

Nostoc - en kilde til nye polysakkarider

Av Berit Smestad Paulsen

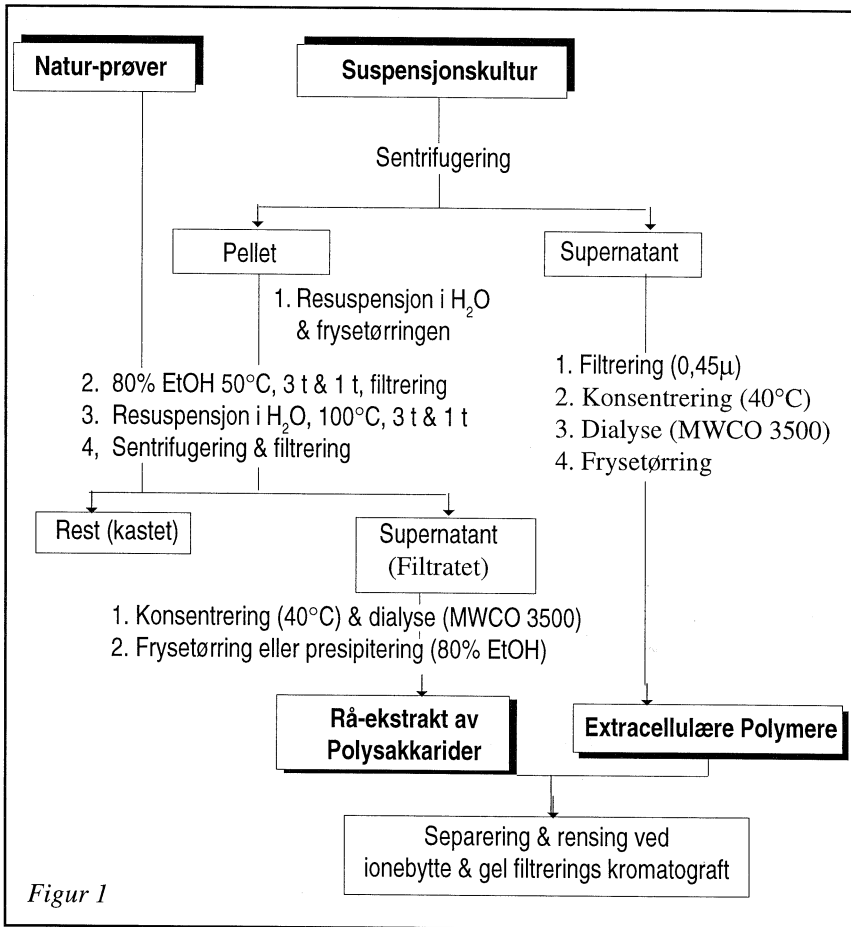
Berit Smestad Paulsen er professor ved avdeling for Farmakognosi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

Nostoc, som er en av de mest utbredte genera av nitrogenfikserende «trådaktige» cyanobakterier eller blågrønne alger, er i stand til å danne makroskopiske eller mikroskopiske kolonier. Enkelte spesielle karakteristika når det gjelder livssyklus og kolonidannelse er velkjent, og til dels ganske forskjellige fra andre cyanobakterier. Morfologiske aspekter tilknyttet livssyklus og kolonidannelse er til dels vel dokumentert, men det eksisterer få studier over kjemien eller biokjemien til den gelatinlignende matrix som ofte omgir koloniene. *Nostoc* har lang tradisjon i Kina som en viktig næringskilde, og også i medisinsk bruk. Her kan nevnes til behandling av kreft, podagra, nattblindhet, forbrenninger etc. Flere antimikrobielle forbindelser er isolert, og det er også vist at *N. commune* forårsaker en signifikant reduksjon av serum kolesterolnivået hos rotter, en effekt som ble forklart å være lik den såkalte «fiber» effekten som har vært sett for plante-fibre.

Som nevnt over er det lite som er

kjent om de komponenter som sannsynligvis er polysakkarider og som omgir organismene med en slimete hinne. Formålet med det pågående prosjekt er bl.a. å sammenligne polysakkarider, cellulært og extracellulært fra *Nostoc* samlet inn i Hubei provinsen, Kina, med tilsvarende fraksjoner fra kulturer med og uten nitrogen i mediet. Det nedestående vil innledende resultater fra studier over polysakkarider produsert av *N. commune* bli diskutert.

Polysakkaridene ble isolert etter ekstraksjoner med varmt vann og påfølgende rensing ved ionebytterkromatografi og gelfiltrering. Prosedyren er gitt i figur 1. Analyse av monosakkaridsammensetningen i de forskjellige polysakkarider, viste det forbausende, at de polysakkarider som forekommer i naturen har en enklere monosakkaridsammensetning enn de som ble dyrket i cellekultur. Xylose, galaktose og glukose var de viktigste isolerte fra materialet fra Hubei, mens kultur-produserte i tillegg inneholdt 2-O-metylhexose og glukuronsyre (tab. 1). Bindingsanalys-



Figur 1

ene (tab.2) viser også at samme bindingstype stort sett er tilstede i alle polymerene. Det er en polymer som skiller seg ut, og det er det extracellulære polysakkaridet fra den kulturen som ikke inneholdt nitrogen. Det er for det første lite 2-0-metyl-hexose og glukuronsyre i denne polymeren, og den har også en mye større grad av forgrening enn de andre polymerene. Denne forskjellen i monosakkarid-sam-

mensetning kan tyde på at nitrogen er viktig i mediet for å «skru på» aktiviteten til de enzymer som medvirker til konvertering av glukose til 2-0-methylhexose og glukuronsyre. Det at dette polysakkaridet skilte seg ut fra de andre ble også vist etter svak syrehydrolyse, da profilen på de dannede oligosakkarider ved analyse i det såkalte Dionex systemet, ble annerledes enn for de andre polymerene.

Tabell 1. Monosakkarid sammensetning (%)*

Prøve	Ara	Xyl	2-O-Mehex	Gal	Glc	GlcA
Naturlig Crude		27,0	tr	21,8	50,2	t
Sur**	tr	28,3	tr	20,9	50,8	tr
HWS	4,4	29,9	24,9	18,0	2,3	20,5
HWS-N	8,6	29,8	17,9	14,9	10,8	17,9
EPS	6,9	30,0	19,6	14,0	10,1	18,4
EPS-N	22,4	13,6	3,4	11,6	39,5	9,2

* Relativ molar ratio funnet ved GC analyse etter metanolyse og TMS-derivatisering

** 1 M NaCl eluat fra anionebytter kromatografi.

Forkortelser:

Ara = arabinose, Xyl = xylose, 2-O-Mehex = 2-O-methylhexose, Gal = galactose, Glc = glucose, GlcA = glucuronic acid, tr = trace (c1%), HWS = "hot water" ekstrakt av suspensjonskultur, EPS = extracellulære polymere, -N = fra medier utenkombinert nitrogen.

For å finne flere detaljer om strukturen til polysakkaridet, ble det utført svak syrehydrolyse og isolering av oligomerfraksjoner ved hjelp av gelfiltrering på en Biogel P2 kolonne. Disse ble deretter fraksjonert videre i Dionex-systemet, og det ble isolert 12 forskjellige oligosakkarider (tab.3). Monosakkarid-sammensetningen ble bestemt, og ved MS ble sekvensen til disse funnet. Majoriteten av de isolerte oligosakkaridene kom fra terminale ender av sidekjeder der glukuronsyre utgjorde den ikke-

reduserende ende. MS viste at det 2-O-methylhexose sitter etter glukuronsyren, og galaktose som den tredje. Ut fra den struktur som til nå er funnet for oligosakkaridene, synes det å være tilstede to forskjellige typer kjeder, der 2-O-methylhexose, henholdsvis glukose sitter som sukker nr. 2 i kjeden. Dette indikerer at methylhexosen er 2-O-methylglukose, men dette er ikke endelig bevist.

Fortsatt er det mye ukjent om strukturen til polysakkaridene fra *Nostoc*

Tabell 2. Bindings-analyser*

Prøve	Ara	Xyl	Gal	Glc	GlcA
Natur		1→4 1→3,4	1→ 1→4	1→4 1→4,6	
HWS	1→5 (4)	1→4 (30) 1→3,4 (1)	1→4 (18)	1→4 (12) 1→3 (8) 1→3,6(8)	1→*20
HWS-N	1→5 (8)	1→4 (20) 1→3,4 (2)	1→4 (14) 1→3,4 (1)	1→4 (18) 1→3 (3) 1→3,6 (6)	1→ (18)
EPS	1→ 5 (6)	1→4 (28) 1→3,4(2)	1→4(16) 1→3,4(8)	1→4 (10) 1→3(20) 1→3,6 (1)	1→ (18)
EPS-N	1→(5) 1→ 5 (15)	1→4 (12) 1→3,4 (1)	1→4 (12)	1→4 (25) 1→3 (3) 1→3,6 (12)	1→ (9)

* Basert på GC-MS data fra alditol acetater fremkommet etter metylering, hydrolyse og reduksjon av polysakkarid fraksjonene. Tall i parentes er mengder tilstede av bindingstypen. 2-O-methylhexose er inkludert i glukose enhetene.

commune, og videre arbeid vil løse mer av detaljene i denne interessante polymeren og også for tilsvarende polymere fra flere andre *Nostoc* species som også p.t. undergår lignende studier. Det bør også trekkes frem at disse polymerene er meget viskøse, noe som burde gjøre dem interessante industri-

elt for en rekke formål. I tillegg har vi preliminært vist at polysakkaridene har aktivitet i det såkalte «anti-komplementære» system, som indikerer at polysakkaridene kan være ansvarlige for en del av den effekt man har sett i tradisjonell medisin i Kina.

Dette arbeidet har støtte fra Norges

Tabell 3. Oligosakkarider isolert fra sure felt polysakkarider vedbiogel P2 og HPAEC

Topp No.	Sukre	Topp No.	Sukre	Topp No.	Sukre
1	Glc Xyl	5	GlcA ₂ +GlcA HexM	9	GlcA Glc Gal Xyl
2	Gal Glc Xyl	6	GlcAHexMGalGlc GlcAHexMGalGlcXyl	10	GlcA Glc Gal
3	Gal(1→4)Glc	7	GlcA(1→3)Glc	11	GlcAGlcGalGlcXyl
4	GlcA HexM Gal	8	GalA Gle Ara	12	GlcA Glc Gal Glc

Topp numrene relaterer til HPAEC kromatogrammet. HexM er 2-0-methylhexose, rekkefølgen av hexosene er ikke endelig bestemt, men posisjon til uronsyrer, HexM og pentoser er bestemt ved forskjellige MS metoder. Sukkersammen-setningen er bestemt etter TFA hydrolyse i Dionex systemet.

forskningsråd og The National Natural Science Foundation of China, som et ledd i en samarbeidsavtale mellom de to institusjoner. I tillegg er Zebo Huang, Wuhan, Jane Thomas-Oates, Umist,

Manchester, Lars Brull, Utrecht, Ellen Cohen, Farmasøytisk institutt, Terje Michaelsen, Folkehelsa, Dag Klaveness, Biologisk Insitutt, og Olav Skulberg, Niva, involvert i arbeidet.