

Neuartige Oligosaccharide als Schlüsselmoleküle mit physiologischen Funktionen

Hintergrund

Eine Reihe von Oligosacchariden besitzen gegenüber anderen niedermolekularen Sacchariden eine Schlüsselrolle im Metabolismus. Während Saccharose, Maltose u.a. Glycoside im Magen durch Enzyme und das saure Milieu leicht hydrolysiert werden können, bestehen andere Oligosaccharide, wie Fructosyl-Oligosaccharide (FOS) weiter und gelangen vom Dünndarm in den Dickdarm. Dies ist eine Voraussetzung für die präbiotische Wirkung. Im Dickdarm werden die Oligosaccharide von probiotischen *Biofidobakterien* verstoffwechselt, zu kurzkettigen Fettsäuren abgebaut¹ und somit der Fortbestand und das Wachstum dieser Mikroorganismen für die Aufrechterhaltung wichtiger physiologischer Funktionen des Verdauungstraktes gewährleistet.^{2,3,4,5,6} Ebenfalls wird die Absorption von Mineralien wie Ca^{2+} und Fe^{3+} begünstigt.^{4,7} Darüber hinaus wurde ein präventiver Effekt von unverdaubaren Oligosacchariden auf Darmkrebs durch Mausstudien belegt.⁸ Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, daß Oligosaccharide ebenfalls als Immunomodulatoren agieren.^{9,10,11} Kommerziell werden insbesondere Oligosaccharide als *functional food* angeboten. Ein Markt der sich zur Zeit auf 20 Milliarden US-Dollar beziffert und dem weiteres Wachstum prognostiziert ist.⁴ Eine Schlüsselrolle bei den Oligosacchariden kommt den Fructooligosacchariden (FOS) zu. Dies gründet in der Tatsache, dass die Oligomer-gebundene Fructose von den oben genannten Mikroorganismen leicht verstoffwechselt wird.

Zielsetzung

Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass sich auf dem Markt befindliche Oligosaccharide für die Gesundheit und Ernährung des Menschen vorteilhaft auswirken.⁴ Ziel des angestrebten Projektes war die enzymdirigierte Herstellung von neuartigen, insbesondere galactosehaltigen funktionellen Fructooligosacchariden mit neuen immunoregulatorischen Eigenschaften.

Durchgeführte Arbeiten

Es wurde das Saccharose-Analog β -D-Fructofuranosyl α -D galactosid (Gal-Fru) mit Hilfe einer Fructosyltransferase (FTF) hergestellt und charakterisiert (Abb. 1).

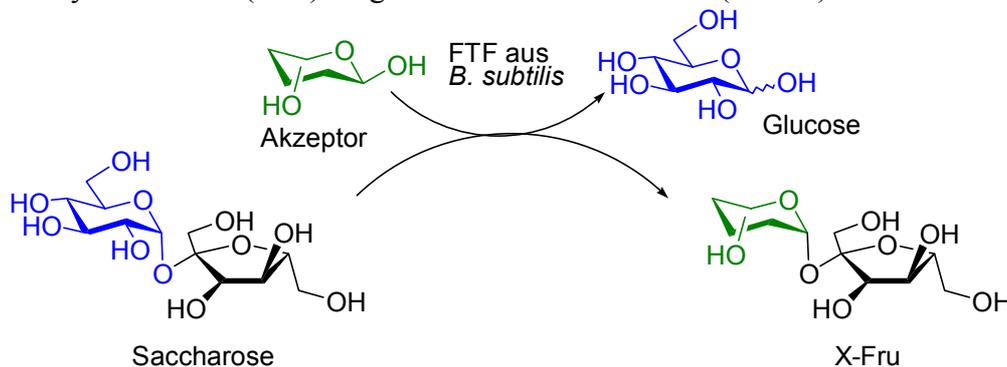


Abb. 1: Enzymatische Synthese der Saccharose-Analoga

Zur Optimierung der Enzymproduktion wurden Versuche zur Fermentation des Organismus durchgeführt. Als Fermentationsmedium wurde ein Salz-Minimalmedium mit 1% Saccharose sowie das gleiche Medium mit einem Zusatz von 0.1% Hefeextrakt eingesetzt. Die maximale Aktivität der FTF aus *Bacillus subtilis* wird in einem pH-Bereich von 5.0 bis 6.5 und Temperaturen von 50°C bis 60°C erreicht (Abb 2.). Neben Saccharose dienen auch das

Trimer Raffinose (Raf) und das Tetramer Stachyose (Sta) als Fructosyldonor. Als Akzeptoren wurden Galactose, Xylose und Fucose erfolgreich eingesetzt.

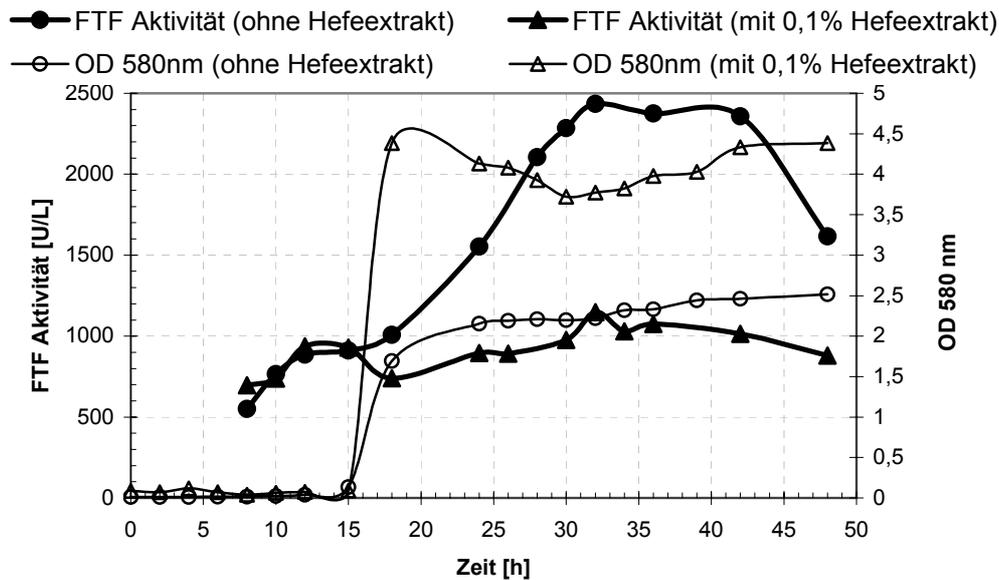


Abb. 1: Fermentation von *B. subtilis* NCIMB 11871.

Ebenso konnte das Enzym immobilisiert werden. Dazu kamen zwei Methoden zum Einsatz: Immobilisierung an Glutardialdehyd aktivierten porösem Glasträger Trisopor® sowie die Immobilisierung an Eupergit® C bzw. Eupergit® C250L. Für die Trennung der Saccharose-Analoga wurden mehrere stationäre Phasen, unter anderem Kieselgel 60 und technisch relevante Ionentauscher in unterschiedlichen Ionenformen (Lewatit Monoplus M 500 Cl⁻ - Bayer und PCR 6 Na⁺ - Purolite) getestet.

Die beste Trennung konnte mit Polystyrol/ Divinylbenzolharz PCR 6, einem stark sauren Kationentauscher mit einem Vernetzungsgrad von 6% in der Natriumform, erzielt werden. Parameter wie Harzbettlänge, Säulendurchmesser, Durchfluss des Eluents (dest. Wasser) und Temperatur wurden für das genutzte Trennmedium optimiert.

Dieses auch industriell genutzte Trennmedium ist unter geeigneten Bedingungen (Harzbettlänge 180 cm, Säulendurchmesser Ø= 3.9 cm, Eluent dest. Wasser, 70°C, max. 4.5 mL/ min., max. 400 g/L Gesamtzuckerkonzentration) in der Lage, eine weitgehende Trennung des Reaktionsgemisches zu gewährleisten. So wurden β -D-Fructofuranosyl α -D galactosid (Gal-Fru) sowie β -D-Fructofuranosyl α -D xylosid (Xyl-Fru) enzymatisch mit einer Fructosyltransferase aus *Bacillus subtilis* hergestellt, gereinigt und massen- sowie NMR-spektroskopisch (¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HMBC, HMQC) charakterisiert.

Neuartige Fructooligosaccharide

Das Saccharose-Analog β -D-Fructofuranosyl α -D galactosid (Gal-Fru) wurde als Substrat für die Umsetzung mit Levansucrase aus *Lactobacillus reuteri* eingesetzt. Saccharose würde als mögliches Substrat zu Gemischen mit Glucosyl-Fructosiden führen.¹² Dazu wurde die Gensequenz der Levansucrase mit einer His-Tag-Sequenz fusioniert und in ein Arabinose-induzierbares Plasmid (pBAD_BDRI) überführt (AG Dijkhuisen, Gronigen). Der Stamm *E. coli* DH10B, welcher eine hohe Stabilität gegenüber rekombinanter DNA aufweist, wurde zur heterologen Proteinexpression transformiert (Malten/Jahn).

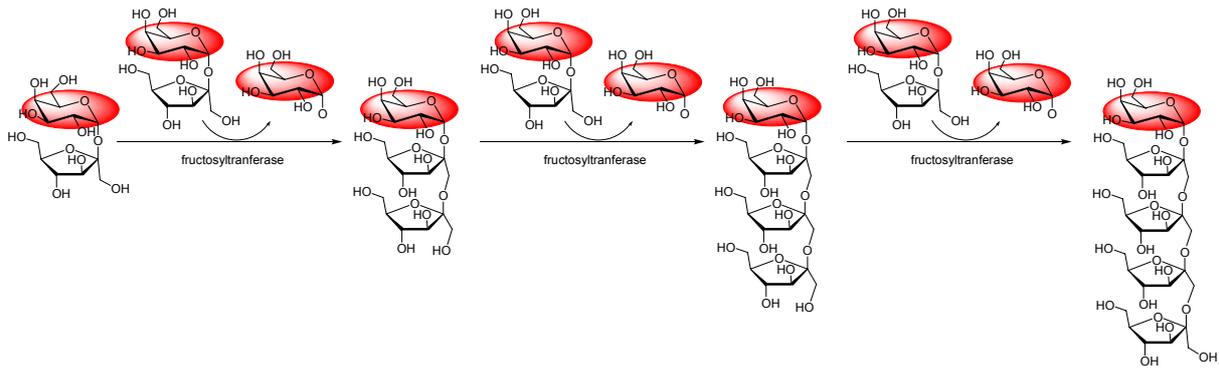


Abb. 3: Enzymatische Synthese von Fructo-Oligosacchariden mittels einer Fructosyltransferase

Die Produktion der neuen Oligosaccharide konnte durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, HPAEC) qualitativ und quantitativ analysiert werden. Das β -D-Fructofuranosyl α -D galactosid (Gal-Fru) dient als Substrat und bildet vorwiegend neue Oligosaccharide und ein neuartiges Levan.

Ausblick

In biologischen Systemen spielen Oligosaccharide eine immer wesentlichere Rolle. Das erwähnte *functional food* ist dabei nur ein Segment eines stark expandierenden Marktes bzw. Anwendungsfeldes von Oligosacchariden. Die biologische Aktivität solcher Oligosaccharide ist zwar seit langem bekannt, dennoch bedarf es noch vieler Untersuchungen. So sind Oligosaccharide z.T. als Bausteine ebenfalls an vielen zellulären Prozessen, wie der Zell-Zell-Erkennung, der Zelladhäsion bzw. dem Programmierten Zelltod (Apoptose) beteiligt, die Mechanismen kennt man jedoch kaum.

In dem beschriebenen Projekt wurde eine schnelle, selektive, enzymatische Synthese von neuartigen Oligosacchariden erfolgreich durchgeführt. Diese könnten über den Bereich des *functional food* hinaus auch als biologische Hilfsmittel und als mögliche Bausteine für Arzneistoffe eingesetzt werden.

¹ M. Kihara, T. Sakata, *Comp. Biochem. Physiol. A Mol Integr Physiol* **2002**, 132(2), 333-340.

² C.E. Rycroft, M.R. Jones, G.R. Gibson, R.A. Rastall, *J Appl Microbiol* **2001**, 91(5), 878-887.

³ K.S. Swanson, C.M. Grieshop, E.A. Flickinger, L.L. Bauer, H.P. Healy, K.A. Dawson, N.R. Merchen, G.C. Fahey, *J Nutr* **2002**, 132(5), 980-989.

⁴ Functional Food, Zentrum für TA, Schweizerischer Wissenschafts- u. Technologierat, **2000**.

⁵ G. Tzortzis, A.K. Goulas, M.L. Baillon, G.R. Gibson, R.A. Rastall, *Appl Microbiol Biotechnol* **2003** [Epub ahead of print]

⁶ R. Barrangou, E. Altermann, R. Hutkins, R. Cano, T.R. Klaenhammer, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100(15), 8957-8962.

⁷ T.A. Zafar, C.M. Weaver, Y. Zhao, B.R. Martin, M.E. Wastney, *J Nutr* **2004**, 134(2), 399-402.

⁸ F. Pierre, P. Perrin, M. Champ, F. Bornet, M. Khaled, J. Menanteau, *Cancer Res* **1997**, 57, 225.

⁹ N. Manhart, A. Spittler, H. Bergmeister, M. Mittlbock, E. Roth, *Nutrition* **2003**, 19(7-8), 657-660.

¹⁰ A. Hosono, A. Ozawa, R. Kato, Y. Ohnishi, Y. Nakanishi, T. Kimura, R. Nakamura, *Biosci Biotechnol Biochem* **2003**, 67, 758-764.

¹¹ C. Cherbut, C. Michel, G. Lecannu, *J Nutr* **2003**, 133, 21-27.

¹² H. Hidaka, M. Hirayama, N. Sumi, *Agric Biol Chem* **1988**, 52, 1181.