

# **Pektiner i tomat ved modning** *(Solanum lycopersicum L.)*

**Maryam Jehad Khalil Houji**



Masteroppgave i farmasi  
Avdeling for farmasøytisk kjemi  
45 studiepoeng  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet  
UNIVERSITETET I OSLO  
Mai 2019



# **Pektiner i tomat ved modning**

## ***(Solanum lycopersicum L.)***

Maryam Jehad Khalil Houji

Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Mai 2019

Veiledere:

Førsteamanuensis Hilde Barsett

Førsteamanuensis Kari Tvette Inngjerdingen

Ekstern veileder:

Rune Slimestad

© Maryam Jihad Khalil Houji

Mai 2019

Pektiner i tomat ved modning

Maryam Jihad Khalil Houji

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

# Sammendrag

Tomat (*Solanum lycopersicum* L.) er en stor bærfrukt som har opprinnelse i Sør-Amerika. Tomatplanten ble innført til Europa på 1500-tallet og bruken av tomat som mat, er i dag verdensomspennende. I denne oppgave ble struktur- og aktivitetsstudier utført på polysakkaridfraksjoner isolert fra tomatsorten Dometica. Pektinfraksjoner fra fire forskjellige modningsgrader (umoden, standard, modnet og modnet oppkuttet) av Dometica-tomaten ble undersøkt for endringer i monosakkaridsammensetning og struktur samt immunomodulerende aktivitet.

Skinn og frø ble fjernet fra tomatene, og fruktkjøttet ble frysetørket før ekstraksjon. Vekt av frysetørket materiale viste at umoden tomat inneholdt mindre vann enn modnet frukt. Ulike pektinfraksjoner ble ekstrahert fra tomatene med kokende destillert vann, etterfulgt av ekstraksjon med CDTA og deretter med NaBH<sub>4</sub> pluss NaCO<sub>3</sub> (NBC). Pektinfraksjonene ble rensert ved gelfiltrering eller dialyse. De høymolekylære pektinfraksjonene ble analysert for monosakkaridsammensetning ved metanolyse og GC. Analyse av bindingstyper ble utført ved en reduksjon- og metyleringsprosedyre etterfulgt av GC-MS.

Monosakkaridsammensetning i vannfraksjonene viser en nedgang i innhold av nøytrale monosakkarider som xylose, mannose, glukose og galaktose ved modning. Det relative rhamnose- og arabinoseinnholdet øker, noe som kan indikere en viss nedbrytning av homogalakturonan ved modning. En reduksjon i andelen av galaktose tyder på, at grad av RG-I forgrening reduseres ved modningen. Ved modning var det også en tydelig nedgang i galaktoseenhetene i pektinfraksjonene isolert ved CDTA og NBC, noe som viser en degradering av sidekjeden i RG-I også i disse pektintype polysakkarider.

Pektinfraksjonene isolert fra vannekstraksjon ga felling med Yariv reagens, hvilket påviste innholdet av arabinogalaktan-II (AG-II) sidekjerder fra RG-I. AG-II har tidligere vist biologisk aktivitet. Analyse av immunomodulerende aktivitet av de isolerte pektinfraksjoner fra vann-, CDTA- og NBC, viste ingen eller ubetydelig komplementfikserende aktivitet i forhold til positiv kontroll. Vannløselige pektinfraksjoner ble enzymdegradert med polygalakturonase for analyse av struktur-aktivitetsforhold. Et større område av RG-I ble isolert etter enzymdegradering, og disse viste høyere aktivitet i komplementsystemet i forhold til de opprinnelige vannfraksjonene. Dette tyder på, at de forgrenede områdene i pektinpolysakkaridene isolert fra vannekstrakter har en viss immunomodulerende aktivitet.

# Forord

Først og fremst vil jeg gi en stor takk til mine fantastiske veiledere, Hilde Barsett og Kari Tvette Inngjerdingen, for fremragende veiledning, god kommunikasjon, positiv innstilling, inspirasjon, hjelp i skriveprosessen og laboratoriet. Tusen takk for alt.

Takk til Berit Smestad Paulsen, Suthajini Yogarajah, Christian Winther Wold for god hjelp og praktisk veiledning under laboratoriearbeidet. Stor takk til Hoai Thi Nquyen for ekstraordinær hjelp og veiledning med GC- og GC-MS analyseresulater. Takk til Nastaran Moussawi for et godt samarbeide og lange dager på labben. En stor takk til alle ansatte på avdelingen farmakonoksi, for et godt og hyggelig arbeidsmiljø.

Med stor kjærighet retter jeg min takknemlighet til min kjære mand «Abed Houji» som har vært en stor støtte igjennom hele studietiden. Du og vår datter, Cyrine, 3 år, har gitt meg glede i livet. Stor takk går til min familie i Danmark og min svigerfamilie i Palestina. Takk til Norge, Universitetet i Oslo og Farmasøytisk institutt.

Takk til alle som ønsker å lese denne masteroppgave

Min glede er ubeskrivelig

Oslo, Mai 2019

Maryam Jihad Khalil Houji

# Forkortelser

4-O-Me-GlcA	4-O-metyl-glukuronsyre
$\alpha$	Alfa-konfigurasjon (aksial posisjon av OH i C1)
AG-I	Arabinogalaktan type I (arabino-4-galaktan)
AG-II	Arabinogalaktan type II (arabino-3,6-galaktan)
Araf	Arabinose på furanoseform
AGA	Apio-galakturonan
Api	Apiose
$\beta$	Beta-konfigurasjon (ekvatorial posisjon av OH i C1)
BP-II	Pektinfraksjon isolert fra <i>Biophytum petersianum</i>
BSA	Bovint serum albumin
<i>c</i>	Konsentrasjon (g/L)
C3	Komplement protein i blodet
CDTA	0,05 M Sykloheksan-trans-1,2-diamin tetra-eddiksyre (C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ) i 0,1 M natriumacetat trihydrat (NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O)-løsning
CMC	Carbodiimid
Da	Dalton (1 Da = 1 g/mol), (1 kDa = 1000 g/mol)
FID	Flammeionisasjonsdetektor
Fuc	Fucose
<i>f</i>	Furanoseform, 5-ring
g	Gram
Gal	Galaktose
GalA	Galakturonsyre
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsyre

GC	Gasskromatografi
GC-MS	Gasskromatografi-massespektrometri
HCl	Hydroklorid, saltsyre
HG	Homogalakturonan
ICH <sub>50</sub>	Konsentrasjon av prøve som gir 50% hemning av hemolyse
IS	Intern standard
L	Liter
m	Milli, tusendel (f.eks 1 mm = 10 <sup>-3</sup> m) eller <i>m</i> = masse (g)
Man	Mannose
Me	Metyl
MS	Massespektrometri
M <sub>molar</sub>	Molarmasse (mol/L)
M <sub>w</sub>	Molekylvekt (molecular weight)
MWCO	Molecular weight cut-off
n	Nano, milliardtedel (f.eks. 1nm = 10 <sup>-9</sup> m) eller <i>n</i> = stoffmengde (mol)
N <sub>2</sub>	Nitrogengass
NK-celler	Naturlig drepercelle
NBC	0,05 M Natriumkarbonat i 0,02 M natriumborhydrid - løsning
OH	Hydroksylgruppe
<i>p</i>	Pyranoseform, 6-ring
PE	Pektinesterase
ppm	Deler per million (parts pr million)
RG-I	Rhamnogalakturonan-I
RG-II	Rhamnogalakturonan-II
Rcf	Relativ sentrifugekraft eller G-kraft (1 rcf =ca. 8,9 rpm)
VIII	



Rha	Rhamnose
Rpm	Omdreiningar per minutt (revolutions pr minute)
T	Terminal enhet
$\mu$	Mikro, milliontedel (f.eks. $1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$ )
V	Volum (L)
% (w/v)	prosentvis vekt per volum
Xyl	Xylose
XGA	Xylogalakturonan

### **Modningsgrader av tomat**

Umoden	Grønn-rød tomat og er de to ytterste tomater i tomatklassen
Standard	Rød tomat og er de to midterste tomater i tomatklassen
Moden	Tomat som har stått to uker lengere enn standard tomat (romtemperatur) og er de to innerste tomater i tomatklassen
Modnet oppkuttet	Tomat som har stått en uke lengere enn standard tomat og kuttet i fire deler og satt på benken (romtemperatur) til over natten

### **Fraksjoner isolert i denne masteroppgave**

#### **Fraksjoner isolert etter dialyse**

PVU	Pektinfraksjon etter ekstraksjon med vann av <i>umoden</i> tomat
PVS	Pektinfraksjon etter ekstraksjon med vann av <i>standard</i> tomat
PVM	Pektinfraksjon etter ekstraksjon med vann av <i>modnet</i> tomat
PVK	Pektinfraksjon etter ekstraksjon med vann av modnet <i>oppkuttet</i> tomat

PCU	Pektinfraksjon etter ekstraksjon med CDTA-løsning av <i>umoden</i> tomat
PCS	Pektinfraksjon etter ekstraksjon med CDTA-løsning av <i>standard</i> tomat
PCM	Pektinfraksjon etter ekstraksjon med CDTA-løsning av <i>modnet</i> tomat
PCK	Pektinfraksjon etter ekstraksjon med CDTA-løsning av modnet <i>oppkuttet</i> tomat
PNU	Pektinfraksjon etter ekstraksjon med NBC-løsning av <i>umoden</i> tomat
PNS	Pektinfraksjon etter ekstraksjon med NBC-løsning av <i>standard</i> tomat
PNM	Pektinfraksjon etter ekstraksjon med NBC-løsning av <i>modnet</i> tomat
PNK	Pektinfraksjon etter ekstraksjon med NBC-løsning av modnet <i>oppkuttet</i> tomat

**Fraksjoner isolert etter enzymdegradering av vannfraksjoner, etterfulgt av separasjon ved gelfiltrering (PD-10-kolonne)**

PVU-E	Enzymdegradert pektinfraksjon I fra PVU
PVS-E	Enzymdegradert pektinfraksjon I fra PVS
PVM-E	Enzymdegradert pektinfraksjon I fra PVM
PVK-E	Enzymdegradert pektinfraksjon I fra PVK

**Fraksjoner isolert etter opprensing av vannekstrakter på Bio-Gel P-30**

PVU-P30	Pektinfraksjoner I og II fra ekstraksjon med vann av <i>umoden</i> tomat
PVS-P30	Pektinfraksjoner I og II fra ekstraksjon med vann av <i>standard</i> tomat
PVM-P30	Pektinfraksjoner I og II fra ekstraksjon med vann av <i>modnet</i> tomat
PVK-P30	Pektinfraksjoner I og II fra ekstraksjon med vann av modnet <i>oppkuttet</i> tomat

# Reagensliste

1-metylimidazol (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> )	Fluka Chemika
Acetatbuffer (0,05 M)	Farmasøytisk institutt
Agarose	Farmasøytisk institutt
Ammoniumhydroksid (NH <sub>4</sub> OH)	Merck
Antistoff (virion 9020 Amboceptor)	Fra kanin
Bio-gel® P-30	Bio-Rad Laboratories
CMC ( <i>N</i> -sykloheksyl- <i>N'</i> -(2-morpholinoetyl) carbodiimide <i>p</i> -toluensulfonat) (C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> N <sub>3</sub> O · C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> S)	Sigma-Aldrich®
Diklormetan (DCM; CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich®
Dimetylsulfoksid (DMSO; C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	Merck
Eddiksyreanhydrid (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> )	Merck
Eddiksyre i metanol (5 %; CH <sub>3</sub> COOH i MeOH)	Farmasøytisk institutt
Etanol (96%)(EtOH; C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Sigma- Aldrich®
Fenol 4%	Merck
Fosfatbuffer (PBS)	Gibco
Gum arabic	Farmasøytisk institutt
HMDS (Heksametyldisilazan)	Sigma-Aldrich®
Imidazole-saltsyre (C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> · HCl)	Sigma-Aldrich®
Iseddik (konsentrert eddiksyre CH <sub>3</sub> COOH)	VWR Chemicals, Prolabs®
Komplement, serum fra ECG (humant)	Folkehelseinstituttet

Konsentrert svovelsyre (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck
Mannitol (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> )	Farmasøytisk institutt
MES (2-[N-morpholino] etan svovelsyre C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S)	Sigma
Metanol (MeOH; CH <sub>3</sub> OH)	VWR Chemicals, Prolabo®
Metyljodid (CH <sub>3</sub> I)	Fluka
Natriumacetat trihydrat (NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O)	VWR Chemicals, Prolabo®
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck
Natriumbordeuterid (NaBD <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich®
Natriumborhydrid (NaBH <sub>4</sub> )	Merck
Natriumklorid (NaCl)	Sigma-Aldrich®
Natriumhydroksid (NaOH)	VWR Chemicals, Prolabs®
Natriumhydroksid pelles (NaOH)	Merck
Natriumkarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck
Natriumthiosulfat 5-hydrat (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · 5 H <sub>2</sub> O)	Merck
Pektinase (polygalakturonase) fra <i>Aspergillus aculeatus</i>	Sigma-Aldrich
Saltsyre i metanol (HCl i MeOH)	Farmasøytisk institutt
Saueblod (10010, tappet 15.01.19 og 08.03.19)	Bygdø kongsgård
Sykloheksan-trans-1,2-diamin tetra-eddiksyre (C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	Fluorochem
TMS-reagens (trimetylklorsilan, heksametyldisilasan, pyridin)	Farmasøytisk institutt
TFA (Trifluoreddikssyre; CF <sub>3</sub> COOH)	Sigma-Aldrich®
TRIZMA (Tris[hydroksymetyl]aminometan; NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich®

Vannfri metanol (MeOH)

Farmasøytisk institutt

Veronal/BSA-buffer

Farmasøytisk institutt

Yariv-reagens

Biosupplies

# Innholdsfortegnelse

Pektiner i tomat ved modning .....	III
Sammendrag.....	V
Forord.....	VI
Forkortelser .....	VII
Reagensliste.....	XI
Innholdsfortegnelse .....	XIV
1 Innledning.....	1
1.1 Tomat ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) .....	1
1.1.1 Taksonomisk klassifisering .....	2
1.1.2 Botanikk og habitat .....	2
1.1.3 Tradisjonell bruk .....	3
1.1.4 Aktive innholdsstoffer i tomat ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) .....	4
1.1.5 Tidligere forskning .....	5
1.2 Plantecelleveggen .....	6
1.2.1 Pektin.....	7
1.2.2 Cellulose og hemicellulose.....	7
1.3 Pektin – Komplekse polysakkarider .....	8
1.3.1 Homogalakturonan (HG).....	10
1.3.2 Rhamnogalakturonan (RG-I).....	11
1.3.2.1 Arabinaner og galaktaner.....	11
1.3.2.2 Arabinogalaktaner .....	12
1.3.3 Substituerte galakturonaner.....	12
1.4 Pektin – Immunomodulerende aktivitet .....	13
1.4.1 Komplementsystemet .....	14
2 Hensikt med oppgaven .....	15
3 Metoder .....	16
3.1 Generelle metoder.....	16
3.1.1 Vannkvalitet .....	16
3.1.2 Innveiing.....	16
3.1.3 Filtrering.....	16
3.1.4 Sentrifugering.....	16

3.1.5	Absorbansmålinger.....	17
3.1.6	De-gassing av løsninger .....	17
3.1.7	Blanding av løsninger.....	17
3.1.8	Oppkonsentrering av løsninger (rotavapor) .....	17
3.1.9	Frysetørring .....	18
3.1.10	Nitrogen tørking .....	19
3.1.11	Syrevasking av glassutstyr .....	19
3.1.12	Tørking med eksikator .....	20
3.2	Isolering og identifisering av pektin.....	20
3.2.1	Preparering av tomat .....	20
3.2.2	Ekstraksjon av pektiner .....	22
3.2.3	Gelfiltrering – eksklusjonskromatografi .....	25
3.2.3.1	Bio-Gel P-30®.....	25
3.2.3.2	PD-10 kolonne.....	27
3.2.4	Dialyse.....	28
3.3	Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av karbohydratinnhold .....	31
3.3.1	Fenolsvovelsyretest .....	31
3.3.2	Metanolyse (Monosakkaridkomposisjon).....	32
3.3.2.1	TMS derivatisering .....	34
3.3.2.2	Gasskromatografi.....	36
3.4	Strukturoppklaring.....	38
3.4.1	Metylering - Bindingsanalyse .....	38
3.4.1.1	Karboksylysrereduksjon .....	38
3.4.1.2	Metylering .....	41
3.4.1.3	Hydrolyse.....	43
3.4.1.4	Reduksjon .....	44
3.4.1.5	Acetylering .....	46
3.4.2	Gasskromatografi-Massespektrometri (GC-MS).....	47
3.4.3	Enzymatisk degradering .....	48
3.4.4	Felling med Yariv reagens – identifisering av AG-II .....	50
3.5	Biologisk aktivitet.....	53
3.5.1	Komplementfikseringstest.....	53
4	Resultater og diskusjon .....	58

4.1	Isolering og opprensning av høymolekylære forbindelser .....	58
4.1.1	Ekstraksjonsutbytte .....	60
4.1.2	Gelfiltrering.....	61
4.1.3	Dialyse.....	63
4.2	Strukturanalyse av pektiner i tomat .....	64
4.2.1	Monosakkaridsammensetning – metanolyse og GC .....	64
4.2.2	Analyse av glykosidbindinger – Metylering .....	70
4.2.3	Identifisering av arabinogalaktan-II – Felling med Yariv reagens .....	76
4.3	Strukturoppklaring ved enzymdegradering .....	77
4.3.1	Monosakkaridsammensetning – Metanolyse og GC.....	78
4.4	Biologisk aktivitet.....	80
4.4.1	Komplementfikseringstest – Vann-, CDTA-, og NBC-fraksjoner.....	80
4.4.2	Komplementfikseringstest – enzymdegraderte vannfraksjoner .....	85
5	Konklusjon .....	88
	Litteraturliste .....	90



# 1 Innledning

## 1.1 Tomat (*Solanum lycopersicum* L.)



**Figur 1:** Fotografi: Klase av veksthusdyrkede tomater (*Solanum lycopersicum* L.) (Rosenqvist, 2009)

Tomat (*Solanum lycopersicum* L.) tilhører søtvierfamilien som på latin kalt «*Solanaceae*». Søtvierfamilien inneholder mere enn 3000 arter, hvilket inkluderer potet, eggplante, petunia, paprika, ananas, kirsebær og tobakk (Bergougnoux, 2014; Knapp & Peralta, 2016). Ifølge etymologien kommer ordet «tomat» fra det spanske «tomate», som stammer fra det aztekiske språk i Mexico, nahuatl. Aztekiskere kalte grønn tomat for «tomatl» og rød tomat for «xitomatl» (Jenkins, 1948). I dag spises tomaten rå, stekt, gratinert, kokt syltet, tørket og er en viktig bestanddel i puré, ketchup og supper (Sunding, 2018). Dette har gitt opphav til tomatens store betydning i verden hvor den produseres i massevis. I dag er Kina, India, USA, Tyrkia, Egypt, Iran og Italia de største produsenter av tomat (Bergougnoux, 2014).

### 1.1.1 Taksonomisk klassifisering

Rike: *Plantae* – plante

Superdivisjon: *Spermatophyta* - frøplante

Divisjon: *Magnoliophyta* – blomsterplante

Klasse: *Magnoliopsida* – tofrøbladet plante

Orden: *Solanales* - søtvierordenen

Familie: *Solanaceae* - søtvierfamilien

Slekt: *Solanum* L. - søtvier

Art: *Solanum lycopersicum* L. – hagetomat

(Plants USDA, 2018)

### 1.1.2 Botanikk og habitat

Tomatplanten er en ettårig plante som blir 0,5-1,5 meter høy. Den har en grenet, kjertelhåret stengel med finnete blad og gule femtallige blomster i sidestilte klaser. Der er to hovedtyper av tomatplanter: vanlig tomat og busktomat. Forskjellen mellom disse ligger i størrelsen av tomatplanten, hvor en vanlig tomat har en sterk lengdevekst og en busktomat har en svak lengdevekst. En vanlig tomat har mange sideskudd og en blomsterstand for hvert tredje stengel led, mens en busktomat avsluttes stengelen med en blomsterklase (Sunding, 2018).

Tomatfrukten er et stort og saftig bær botanisk sett, selv om den har lavere sukkerinnhold sammenlignet med andre frukter (figur 1) (Gerszberg, Hnatuszko-Konka, Kowalczyk, & Kononowicz, 2015; Sunding, 2018). Tomaten har en karakteristisk lukt, velsmakende aromatisk smak og lett syrlig ved modenhet (Astrup, Folke, & Andersen, 2017). Tomaten varierer i utseende i forhold til størrelse og farge. Vanligvis er tomaten rød når den er moden, men kan komme i en rekke farger så som gul, oransje, grønn og lilla (figur 2) (Bergougnoux, 2014). Tomaten kan i noen tilfeller ha en sort-blålig farge (6) (figur 2), som har fått navnet «Indigo rose». Fargen skyldes innholdet av antocyaniner, som også finnes i blåbær (Institutt for biovitenskap, 2019). Tomatens størrelse varierer fra Cherry tomater (1) (figur 2) i

kirsebærstørrelse til store biffotomater (4) (figur 2) som kan veie over et halv kilo. Fasongen kan være alt fra rund til avlang (plommetomat) eller pæreformet (pæretomat) og overflaten glatt eller rillet (Bergougnoux, 2014).



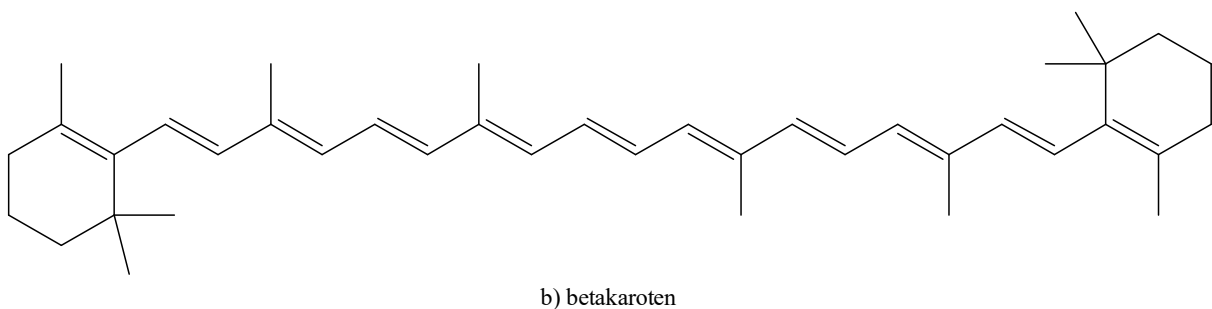
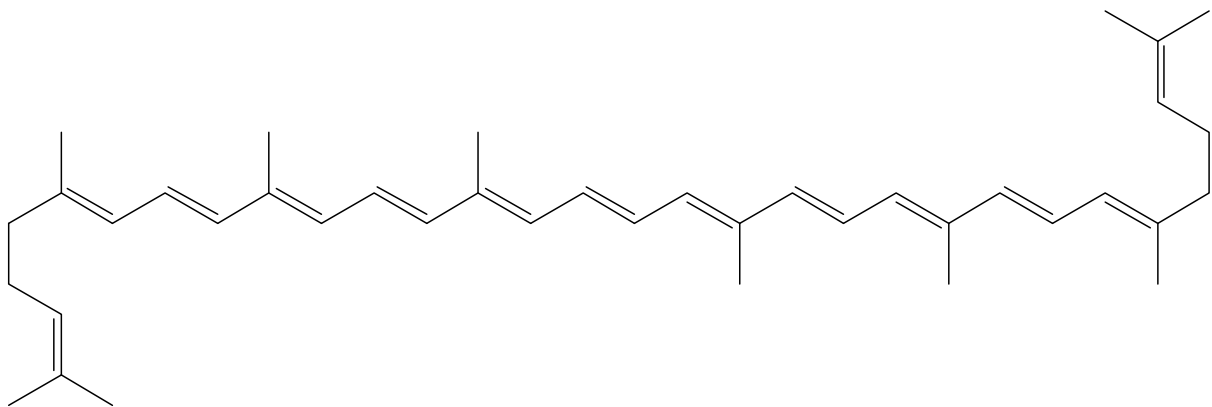
**Figur 2:** Et utvalg av tomatsorter: 1) Røde cherry tomater – 2) Røde klasetomater – 3) Gule cherry tomater – 4) Biffotomater – 5) Gule klasetomater – 6) Indigo rose tomat (Opplysningskontoret for frukt og grønt, 2019)

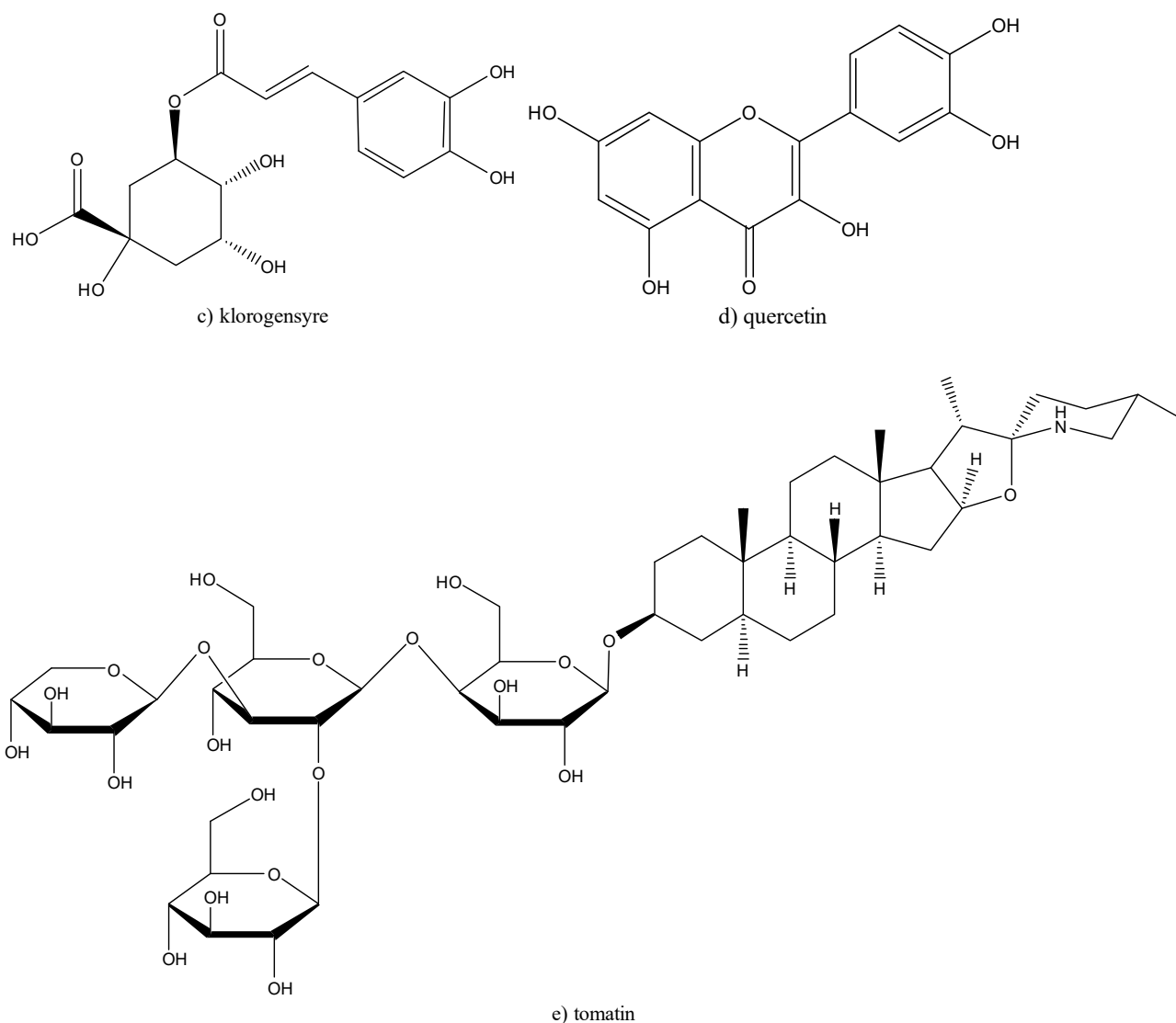
### 1.1.3 Tradisjonell bruk

Tomatplanten stammer fra Andesfjellene i Sør-Amerika, sannsynligvis i Peru og Ecuador (Knapp & Peralta, 2016). Spaniere oppdaget tomaten fra kontakten med aztekiskere under den spanske koloniseringen av Amerika og brakte den til Europa (Bergougnoux, 2014). Tomatplanten ble innført til Europa i 1500-tallet, men brukt som grønnsakplante etter midten av 1800-tallet (Knapp & Peralta, 2016; Sunding, 2018). I Frankrike og Nord-Europa ble tomaten i utgangspunktet brukt som dekorativ plante, på grunn av likheten med den giftige belladonna (Bergougnoux, 2014). Røttene, bladene og umoden tomatfrukt inneholder «tomatin» (e) (figur 3), som i store mengder vil være giftig. Senere fant man, at tomatfrukt er trygt å spise sannsynligvis på grunn redusert innhold av tomatin i moden tomat (Huang et al., 2018). Det anses, at de første tomater som ble kjent hos europeere var gule i fargen og av den grunn ble kalt «golden-apple» (Bergougnoux, 2014; Gentilcore, 2009). Til Norge kom tomatplanten på 1900-tallet og dyrkes nå på friland i de varmeste strøk av landet (Sunding, 2018).

### 1.1.4 Aktive innholdsstoffer i tomat (*Solanum lycopersicum* L.)

Tomat er en god kilde til fenolforbindelser (fenolsyrer og flavonoider), karotenoider (lykopen,  $\alpha$ - og  $\beta$ -karoten), vitaminer (askorbinsyre og vitamin A) og glykoalkaloider (tomatin) (Chaudhary, Sharma, Singh, & Nagpal, 2018). Kjemiske strukturer av viktige bioaktive stoffer i tomat er vist i figur 3. Fenoler og karotenoider er de viktigste bioaktive innholdsstoffer i modne tomater. Den røde farge på modne tomater skyldes lykopen (a) (figur 3), som i tillegg er en potent antioksidant (Gerszberg et al., 2015). Tomatfrukten inneholder  $\beta$ -karoten (b) (figur 3), et provitamin-A, som også har antioksidant effekt. Fenolsyrer i tomat er i form av kaffesyre, klorogensyre (c), sinapinsyre, p-kumarinsyre og ferulasyre. Flavonoider er quercetin (d), rutin, kaempferol og naringenin. Quercetin og klorogensyre er mest omfattende i tomat. Når modningsprosessen starter vil klorofyll (grønn tomat, kloroplaster) bli omdannet og karotenoid (rød tomat, kromoplaster) blir syntetisert. Glykoalkaloider er alkaloider, som inneholder karbohydrat-grupper. I tomat er glykoalkaloider i form av tomatin (e) der beskytter tomaten mot patogener som bakterier, virus og sopp (Chaudhary et al., 2018). I umoden tomat er innholdet av tomatin meget høyere enn i moden tomat. Det høye innhold av tomatin i umoden tomatfrukt gjør det bittert, uønsket å spise og giftig i store mengder (Chaudhary et al., 2018; Huang et al., 2018). Tomat inneholder store mengder vann og i en studie (Koh, Charoenprasert, & Mitchell, 2012) ble vanninnholdet i fersk tomat bestemt til  $\sim 94\%$ .





**Figur 3:** Aktive innholdsstoffer i tomat (*Solanum lycopersicum* L.). a) lykopen; b)  $\beta$ -karoten; c) klorogensyre; d) quercetin; e) tomatin. Tegnet i programvare ChemDraw av Maryam Houji.

### 1.1.5 Tidligere forskning

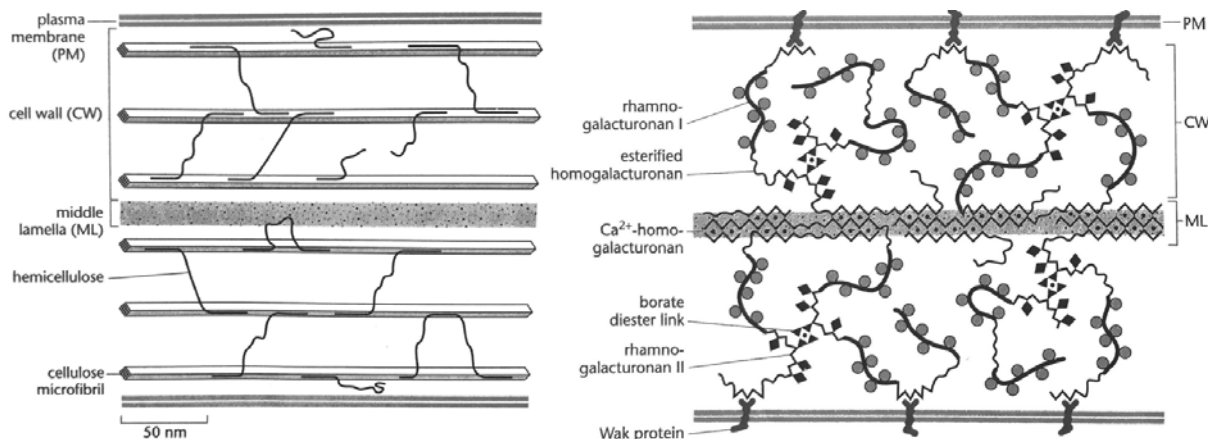
Hovedkomponenten i tomat, lykopen, er blitt godt studert og har vist gunstige helseeffekter. Studier har vist (Chaudhary et al., 2018), at lykopen i tomat kan redusere risikoen for hjertesykdommer og kreft, spesielt prostatakreft. En studie (Palomo, Fuentes, Padró, & Badimon, 2012) har vist tomatens effekt på blodplate-aggregeringsaktivitet og endotelbeskyttelse, noe som kan være gunstig for kardiovaskulær helse. En annen studie (Aune et al., 2012) hos kvinner viser, at høye konsentrasjoner av karotenoider (lykopen), funnet i tomater, kan beskytte mot utvikling av brystkreft.

Pektiner (avsnitt 1.2.1) isolert fra planter har også vist bioaktivitet i tidligere forskning (Smestad & Barsett, 2005). Blant annet har noen pektiner vist prebiotisk effekt, forebygging og reduksjon av karsinogenese, immunomodulerende aktivitet (avsnitt 1.4) og anti-ulcer aktivitet.

Tidligere forskning av pektintype polysakkarider i tomat har vist endring i celleveggssammensetning under modning (Christiaens et al., 2012; Seymour, Colquhoun, Dupont, Parsley, & R. Selvendran, 1990). Fruktmodning avhenger av uttrykket og aktiviteten til celleveggs modifierende proteiner (Albersheim, Darvill, Roberts, Sederoff, & Staehelin, 2011). Modning av frukt bestemmes som blant annet tap av celleadhesjon og omfanget av celleveggs degradering. Variasjon i celleveggs sammensetning og ekspresjonen av veggmodifierende enzymer bidrar til variasjonen observert i tekstur og kvalitet (Albersheim et al., 2011). Dette gir et godt grunnlag for videre undersøkelse og forskning av pektiner isolert fra tomat.

## 1.2 Plantecelleveggen

Plantecelleveggen består av en såkalt «primær cellevegg» (figur 4). Primær celleveggen består av cellulose (25-30%), pektin (30%), hemicellulose (20-30%) og protein (1-10%). Denne cellevegg separeres fra nabocellene med en «midtlamell», som hovedsakelig består av pektiner assosiert med kalsium. Det innerste lag kalles «plasmamembran» og består av dobbel fosforlipidlag og membranproteiner. Plasmamembran-assosierte proteiner «WAK protein» er tett bundet til pektiner i celleveggen (figur 4) (Albersheim et al., 2011). Plasmamembranen kontrollerer og transporterer stoffer inn og ut av cellen. Den primære cellevegg har fleksibilitet og styrke som gjør, at den kan utvide seg i forbindelse med cellevekst og kan dermed vokse i tykkelse. Det dannes fortsatt primærvegg, så lenge en celle er i vekst. Vanninnholdet i den voksende primærvegg utgjør ~ 60 % (w/v) (Jackman & Stanley, 1995; Pettolino, Walsh, Fincher, & Bacic, 2012). Cellen kan beholde sin tynne primære cellevegg når den er ferdig utvokst eller alternativt begynne å legge til flere nye lag på veggen, ved siden av plasmamembranen som kalles «sekundær cellevegg». Sekundær celleveggen inneholder lignin og mer cellulose enn primær celleveggen, hvilket gir styrke i celleveggen (Albersheim et al., 2011; Keegstra, 2010).



**Figur 4:** Plantecellevegg. Cellevegg (CW) bestående av plasmamembran (PM), cellulose mikrofibril, hemicellulose, pektiner. Cellene separeres av midtlammel (ML) (Albersheim et al., 2011).

### 1.2.1 Pektin

Pektin i den primære cellevegg og midtlamell gir plastisitet og formbarhet ved vekst av cellene. Pektinet i planter vil kunne tiltrekke og holde på vann. Under modning blir primær cellevegg tykkere og beriket med pektintype polysakkarider som primært består av homogalakturonan (HG) og rhamnogalakturonan (RG-I) (avsnitt 1.3) (Albersheim et al., 2011). Moden tomat blir myk gjennom tap av celle-adhesjon og noen celler oppløses helt (Albersheim et al., 2011). I umoden frukt og bær finnes mye pektin, men under modning blir pektinet degradert av blant annet enzymet polygalakturonase. Aktiviteten til polygalakturonase er typisk udetekterbar før modning, men øker under modningsprosessen (Albersheim et al., 2011). Dette reduserer pektinets evne til å holde på vann, noe som gjør frukt og bær mer saftig og oftest mykere. Pektin kan også danne en stabil gel ved at kryssbinde kalsium (figur 4), hvilket utnyttes mye i farmasøytisk industri og matindustrien (Albersheim et al., 2011; Thakur, Singh, Handa, & Rao, 1997).

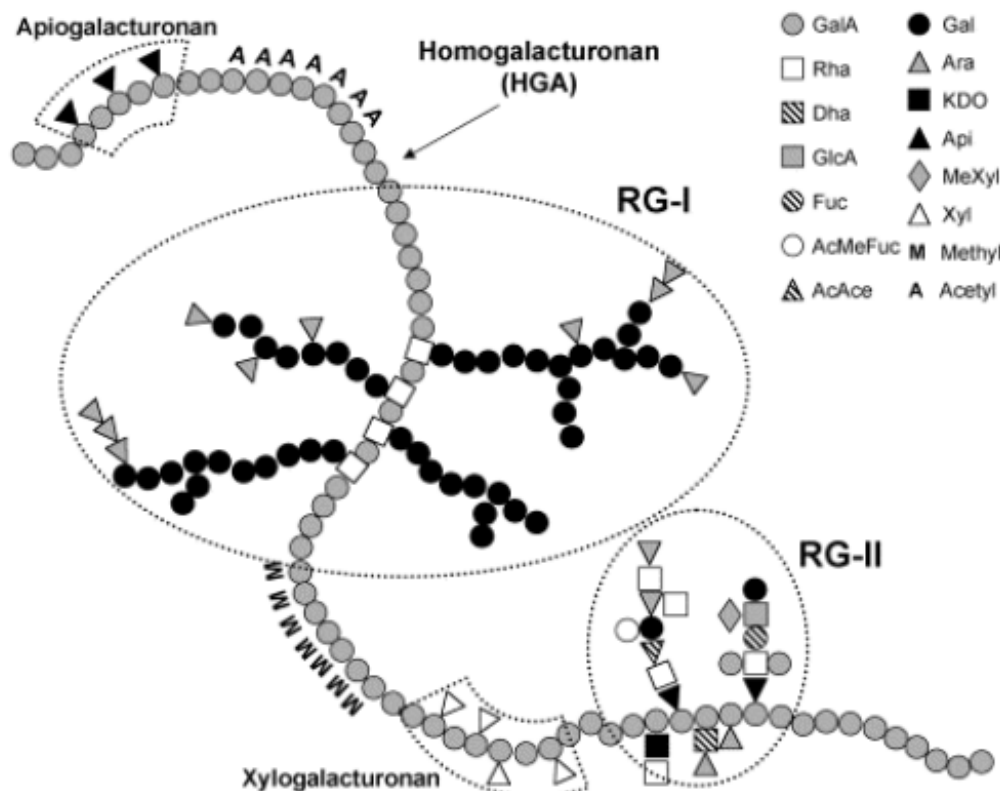
### 1.2.2 Cellulose og hemicellulose

Cellulose er hovedbestanddelen av planters cellevegg. Cellulose er et polysakkarid som består av minst 3000 glukoseenheter bundet sammen med  $\beta$ -1,4-bindinger. Kjedene holdes sammen av hydrogenbindinger i en krystallinsk struktur som kalles «mikrofibril» (figur 4), noe som gjør den sterk og solid overfor ytre angrep (Caffall & Mohnen, 2009). Primær cellevegg består av 20-30% cellulose, mens sekundær cellevegg kan inneholde opptil 50% cellulose (Albersheim et al., 2011).

Hemicellulose er bundet til cellulose mikrofibriller via ikke-kovalente multiple hydrogenbindinger i den primære cellevegg (Albersheim et al., 2011) (figur 4). Hemicellulose er en gruppe komplekse polysakkarider med ulike strukturelle grupper (Ebringerová, Hromádková, & Heinze, 2005). Disse omfatter xylaner (arabinoxylaner og glukuronarabinoxylan), xyloglukaner, mannaner (glakatomannaner, glukomannan og galaktoglukomanann) og ulike  $\beta$ -glukaner (Houben, Jolie, Fraeye, Van Loey, & Hendrickx, 2011).

### 1.3 Pektin – Komplekse polysakkarider

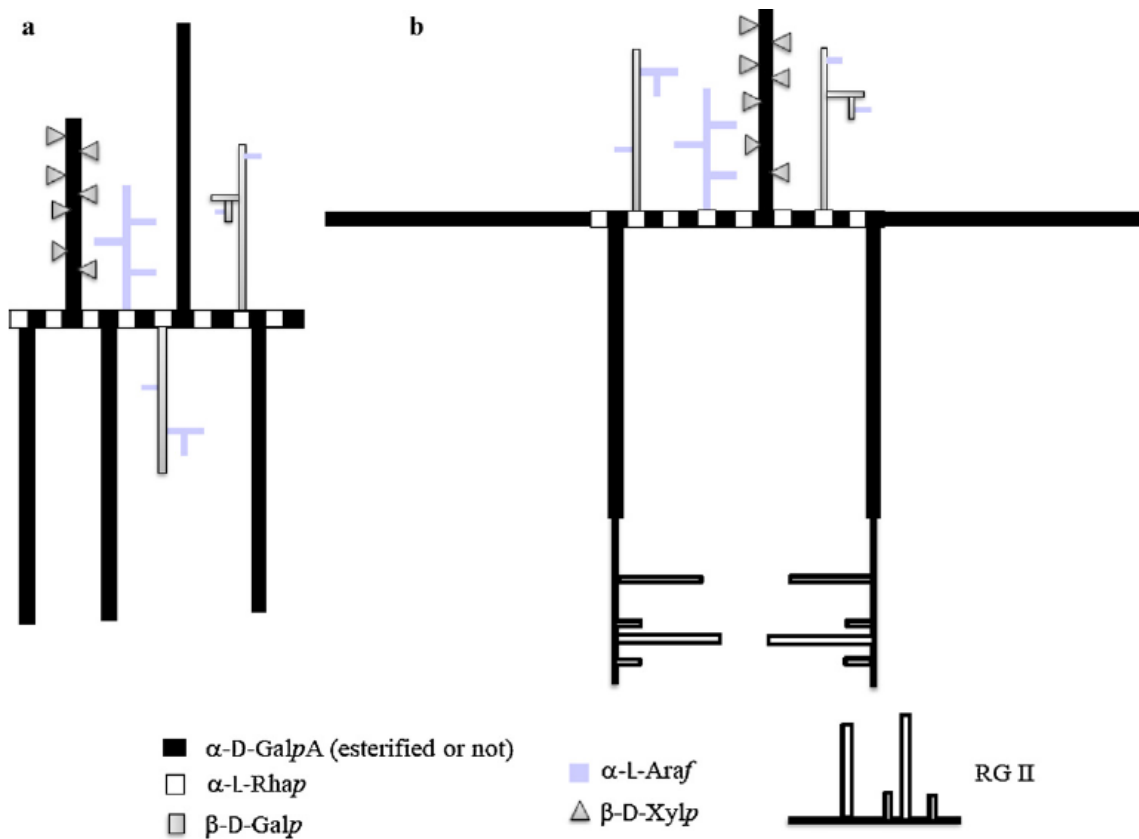
Pektin kalles også «pektintype polysakkarider» og er store komplekse polysakkarider som finnes i den primære plantecellevegg og midtlemell (figur 4). Studier tyder på (Smestad & Barsett, 2005), at pektiner kan bestå av homogalakturonan (HG), rhamnogalakturonan-I (RG-I), rhamnogalakturonan-II (RG-II), xylogalakturonan (XGA) og apio-galakturonan (AGA). Sammensetningen av de forskjellige blokker av polysakkarider kan variere fra pektin til pektin. Hvordan disse er plassert i forhold til hverandre er fortsatt ikke helt klarlagt.



**Figur 5:** Tradisjonell hypotetisk modell av den primære strukturen av pektin (Smestad & Barsett, 2005).



I litteraturen er den tradisjonelle modellen i figur 5 mest brukt. Hovedteorien bak denne modellen er, at homogalakturonan (HG) og rhamnogalakturonan I (RG-I) danner en kontinuerlig hovedkjede (Smestad & Barsett, 2005).

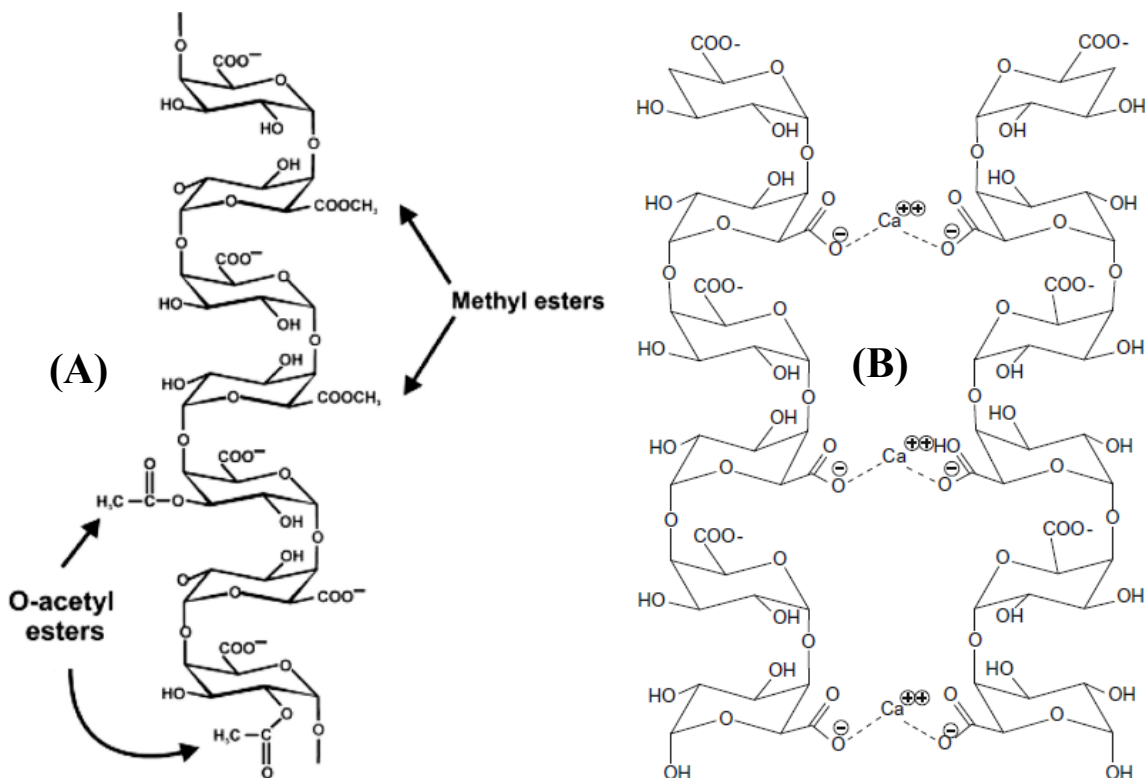


**Figur 6:** Ikke-tradisjonelle hypotetiske modeller av pektinstruktur – a: The RG-I backbone model – b: «living thing-like»-modell (Yapo, 2011)

Flere ikke-tradisjonelle hypoteser rundt pektinstruktur er blitt omtalt. Modellen i figur 6 (a) kalles «The RG-I backbone model». Denne modell presenterer pektiner bestående av en hovedkjede med rhamnogalakturonan-I (RG-I), hvor HG, XGA og nøytrale sukkerne (arabinan, galaktaner og arabinogalaktaner) er sidekjeder av RG-I (Yapo, 2011). Modell (b) i figur 6 kalles «living thing-like». Denne modell fremstiller en hovedkjede, bestående av to uforgrenet HG-blokker per én RG-I kjede, som er bundet alternerende til hverandre. De to HG-blokker kan både være horisontale eller vertikale i forhold til RG-I. To ulike RG-II-blokker kan være bundet til HG-blokker. Begge modeller antar, at HG, RG-I og RG-II er kovalent bundet til hverandre, selv om dette punktet ikke er etablert i litteraturen (Yapo, 2011).

### 1.3.1 Homogalakturonan (HG)

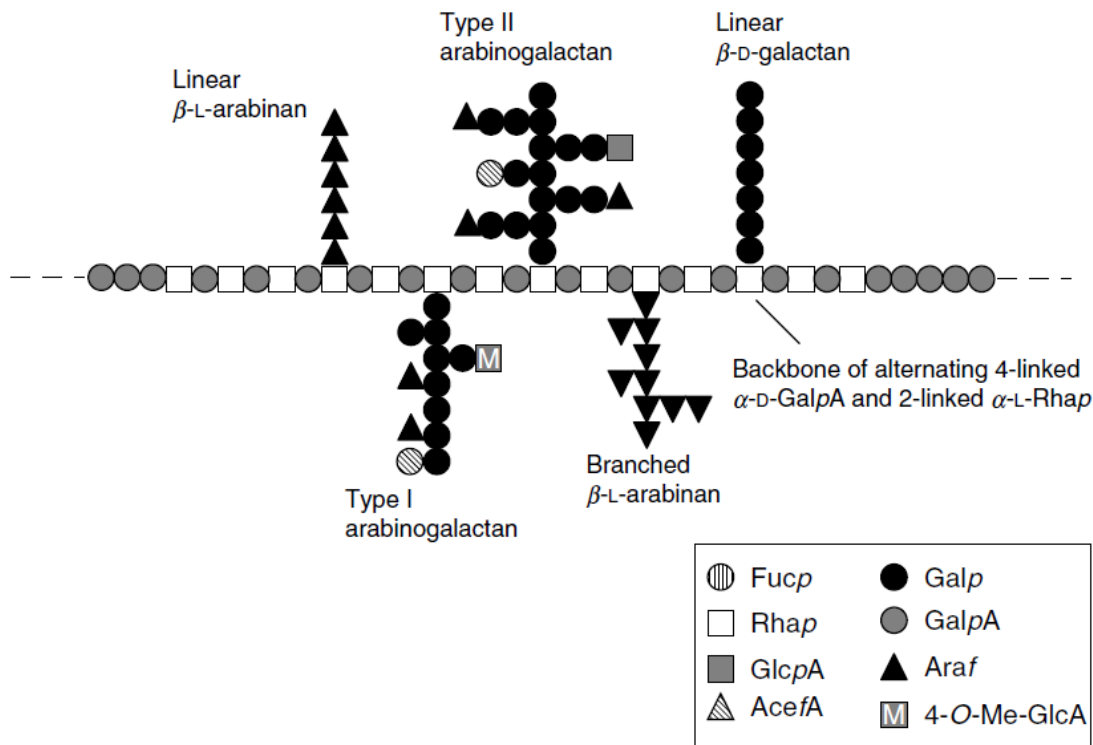
Pektin i plantecelleveggen består av rundt 55-70% homogalakturonan (HG) (Müller-Maatsch et al., 2016; Yapo, 2011). HG kalles «den glatte region» i pektinet, fordi den ikke har mange sidekjeder eller forgreninger. HG består av en lineær hovedkjede med 100-200 enheter av  $\alpha$ -1,4-D-galakturonsyre (GalA). Deler av HG kan være substituert, hvilke er rhamnogalakturonan II (RG-II), xylogalakturonan (XGA) og apio-galakturonan (AGA) (figur 5). Andre deler av HG kan være metyl-esterfisert eller acetylert. HG kan være metyl-esterfisert ved C-6 karboksyl eller acetylert ved O-2 og / eller O-3 (A) (figur 7) (Yapo, 2011). Graden av metylesterfisering og acetylering varierer fra kilde til kilde (Caffall & Mohnen, 2009). Lineær HG har høy grad av metylesterfisering, når mer enn 50 % av galakturonsyre enhetene er metylforestret. De ikke-metylerte C-6 av galakturonsyre er negativ ladet og kan interagere ionisk med  $\text{Ca}^{2+}$  for å danne en stabil gel (B) (figur 7) (figur 4) (Caffall & Mohnen, 2009). Metylesterfisering og acetylering av HG er hovedsakelig ansvarlig for geleringsgraden av pektin (Yapo, 2011).



**Figur 7:** Strukturelle enheter ved homogalakturonan (HG) (Caffall & Mohnen, 2009). (A) 1,4-GalA enheter med metylesterfisering ved C-6 og O-acetylering ved O-2 eller O-3. (B) «Eggboks-model» av kalsium kryssbundet med HG polysakkarider.

### 1.3.2 Rhamnogalakturonan (RG-I)

Pektin i plantecelleveggen består av 5-10 % rhamnogalakturonan (RG-I). RG-I kalles «den hårete region» på grunn av mange forgreninger. RG-I består av alternerende enheter med  $\alpha$ -1,4-D-galakturonsyre (GalA) og  $\alpha$ -1,2-L-rhamnose (Rha) (figur 8) (Yapo, 2011). GalA kan være acetyliert ved O-2 og /eller O-3. Rha inneholder nøytrale sidekjeder med arabinaner, galaktaner eller arabinogalaktaner (AG) bundet i posisjon 4. Graden av substitusjon av nøytrale sidekjeder på RG-I varierer mellom 20 og 80% (Yapo, 2011). Sidekjedene kan også inneholde små mengder fucose (Fuc), glukuronsyre (GlcA) og 4-O-Me-GlcA, hvilket utgjør ~3% av RG-I-region (Albersheim et al., 2011; Mohnen, 2008).



**Figur 8:** Skjematisk tegning av strukturelle enheter ved rhamnogalakturonan-I (RG-I) (Waldron & Faulds, 2007).

#### 1.3.2.1 Arabinaner og galaktaner

Arabinaner kan være lineære eller forgrenete avhengig av kilden og består av  $\alpha$ -1,5-bundet arabinan i furanoseform (Araf), forgrenet i 2 eller 3 posisjon (figur 8) (Albersheim et al., 2011; Yapo, 2011). Arabinaner er mest sannsynlig knyttet til galaktanene i pektinet og frigjort enten via enzymatisk virkning eller ved svak syrehydrolyse under utvinningsprosessen (Smestad & Barsett, 2005). Galaktaner er lineære strukturer bestående av  $\beta$ -1,4-bundet galaktose-enheter

(figur 8). Grad av fordeling av nøytrale sukker som arabinose og galaktose varierer avhengig av blant annet plantekilde og ekstraksjonsmetode (Round, Rigby, Macdougall, Ring, & Morris, 2001). Endringer i fastheten under modning av frukt er sannsynligvis relatert til degradering av arabinan og galaktan sidekjeder (Yapo, 2011).

### 1.3.2.2 Arabinogalaktaner

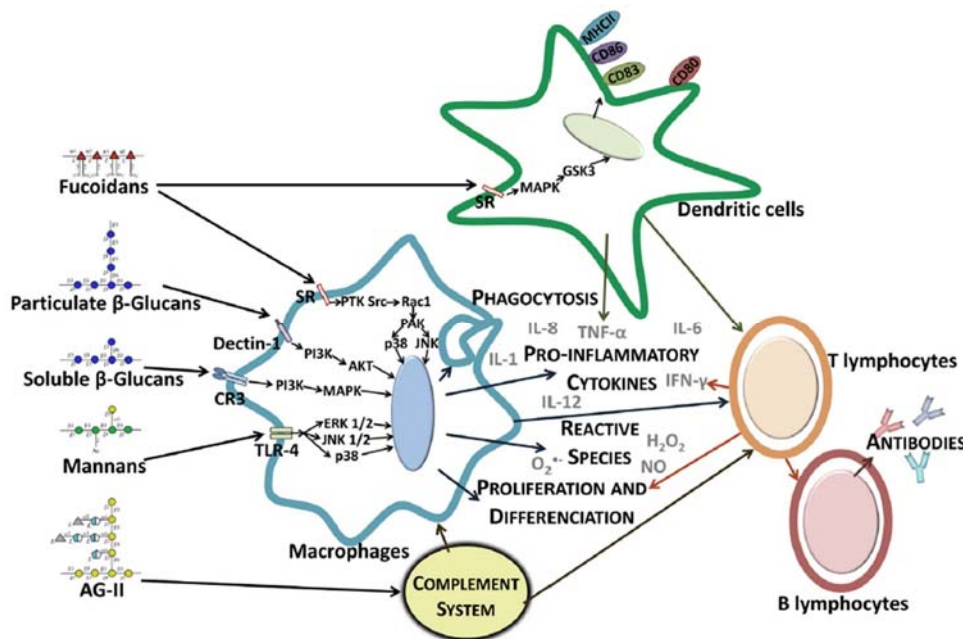
Der finnes tre typer arabinogalaktaner, men kun type I og II har gitt opphav til biologisk aktivitet i struktur-aktivitetsstudier (Yapo, 2011). Arabinogalaktan type-I (AG-I) består av en kjede med  $\beta$ -1,4-galaktaner med sidekjeder av en eller flere terminale arabinose eller 1,5-arabinaner enheter i posisjon 3 (Caffall & Mohnen, 2009; Smestad & Barsett, 2005). Arabinogalaktan-II er mere kompleks og består  $\beta$ -1,3-galaktan med  $\beta$ -6-bundet galaktan eller arabinogalaktan forgreninger bundet i posisjon 6 (Caffall & Mohnen, 2009). AG-II kan derfor inneholde 1,3,6-galaktaner ved forgreningspunktene (Smestad & Barsett, 2005). Sidekjedene kan også bestå av terminal-fucose og glukuronsyre. Begge arabinogalaktanene er bundet til RG-I gjennom posisjon 4 på rhamnose-enhetene (figur 8). En enkelt metode for å skille mellom de to arabinogalaktanene er evnen til å felle ut det såkalte «Yariv reagenset». AG-II har evnen til å danne et rødt bunnfall med Yariv-reagenset, hvilket brukes til å påvise tilstedeværelsen av AG-II (Smestad & Barsett, 2005).

### 1.3.3 Substituerte galakturonaner

Substituerte galakturonaner er rhamnogalakturonan (RG-II), Xylogalakturonan (XGA) og Apio-galakturonan (AGA), idet alle består av en hovedkjede med galakturonan (figur 5). Rhamnogalakturonan-II (RG-II) utgjør rundt 10 % av pektinet og består av en hovedkjede med minst 8 enheter av  $\alpha$ -1,4-galakturonsyre med 4 forskjellige sidekjeder inneholdende 12 ulike typer av monosakkarider inkludert uvanlige karbohydrater som apiose, 2-O-metylxylose, 2-metylfucose og acersyre (figur 5) (Caffall & Mohnen, 2009). Borat diester kan danne kryssbindinger mellom to RG-II-områder via apiosylenheter (figur 4). RG-II er den del av pektinet som er tilnærmet lik fra pektin til pektin. Xylogalakturonan (XGA) består av en lineær kjede med 1,4-GalpA, delvis substituert med enkelte xyloseenheter og / eller med lengere xylaner i posisjon 3, men også posisjon 2 (Yapo, 2011). I Apio-galakturonan (AGA) er HG substituert ved O-2 eller O-3 med apiose.

## 1.4 Pektin – Immunomodulerende aktivitet

Immunsystemet utgjør organismens forsvarssystem overfor vevsfremmede strukturer. Immunsystemet kan inndeles i et uspesifikt (det medfødte) og et spesifikt (det ervervede) immunsystem. Det uspesifikke immunsystem treder straks i funksjon ved mikrobiell invasjon. Det spesifikke immunsystem blir derimot ikke aktivert før patogener har invadert kroppens vev og dermed etablert en immunologisk hukommelse (Kjeldsen, Nielsen, & Peterslund, 2006). Pektiner med aktivitet anses å ha effekt på det medfødte immunsystem (uspesifikke), ervervede immunsystem (spesifikke) eller en kombinasjon av disse. De mest kjente immuncellene i det medfødte immunsystemet er komplementsystemet, makrofager, NK-celler, dendritiske celle, nøytrofile, basofile og eosinofile granulocytter. De mest kjente cellene i det ervervede immunsystemet er T- og B-lymfocytter. Enkelte pektintype polysakkarider vil kunne aktivere fagocytterende celler som makrofager, dendritiske celler, drepende NK-celler eller proliferere B- og T-lymfocytter (figur 9) (Ferreira, Passos, Madureira, Vilanova, & Coimbra, 2015).



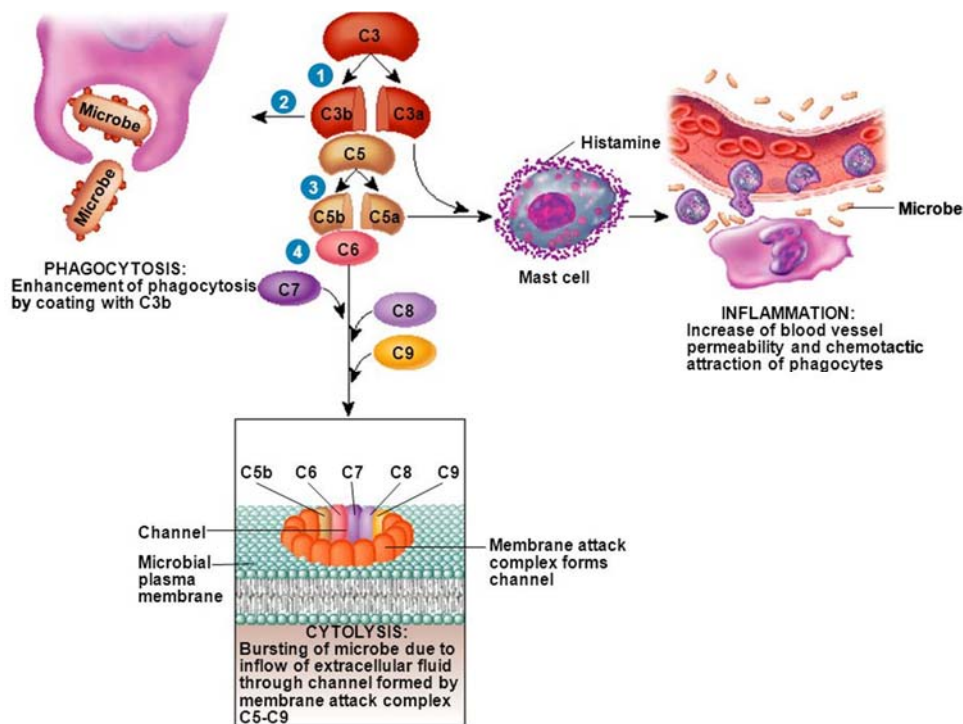
**Figur 9:** Illustrasjon av polysakkariders immunomodulerende aktivitet i immunsystemet (Ferreira et al., 2015)

Immunomodulerende polysakkariders aktivitet avhenger av flere karakteristiske strukturelle trekk. De strukturelle egenskapene så som monosakkaridsammensetning, glykosidbindingskomposisjon, konformasjon, molekylvekt, funksjonelle grupper og forgreninger er viktige forhold, når man ser på biologisk aktivitet (Ferreira et al., 2015). Glukaner, mannaner, pektintype polysakkarider, arabinogalaktaner (AG), fucoidaner, galaktaner og xylaner er

polysakkarider med rapportert immunomodulerende aktivitet (figur 9). Spesielt RG-II og RG-I regioner med sidekjedene AG-II og AG-I har vist å være viktige struktur-aktivitets-forhold for komplementmodulering (Smestad & Barsett, 2005).

### 1.4.1 Komplementsystemet

Komplementsystemet spiller en stor rolle i den primære motstand mot bakterie- eller virusinfeksjoner. Komplementsystemet er en god indikator for biologisk aktive substanser som kan modulere det uspesifikke immunsystem og den påfølgende aktivering av det spesifikke immunsystem (B og T-celler). Komplementsystemet aktiveres via tre forskjellige veier: klassisk aktiveringsvei, alternativ aktiveringsvei eller mannan-bindende lektin aktiveringsvei.



**Figur 10:** Mekanisme for komplement modulering (Tortora, 2014).

Alle aktiveringsveier vil føre til aktivering av C3 (figur 10), som er det vanligste komplement proteinet i blodet. Aktivert C3 blir splittet til C3a og C3b (1) (figur 9). C3b binder opsonin til mikrobens overflate slik, at fagocytose blir aktivert (2) og mikroben blir fjernet. C3b splitter C5 til C5a og C5b (3). C5b binder til C6 gjennom C9 for at danne MAC (membrane attack complex) på celleveggen til patogene mikrober. Den patogene cellen lyses ved at der dannes hulrom i cellemembranen (4). C3a og C5a forårsaker, at mastceller frigjør histamin, noe som resulterer i inflammasjon og tiltrekning av fagocytter (Tortora, 2014).

## 2 Hensikt med oppgaven

Hensikten med denne masteroppgave er å ekstrahere og isolere løst assosiert pektin (vannløselig), ionebundet pektin (chelat-løselig) og kovalent esterbundet pektin (løst i base) fra cellevegg og midtlamell i tomat. Pektintype polysakkarider i umoden, standard, moden og modnet oppkuttet tomat (*Solanum Lycopersicum* L.) analyseres.

- Pektintype polysakkaridenes monosakkaridsammensetning og type glykosidbindinger bestemmes for tomater ved ulike modningsgrader. Tomatens pektinstruktur relateres til tomatens endrede fasthet ved modning.
- Pektinstruktur relateres også til immunomodulerende aktivitet av pektinfraksjonene, som måles ved en komplementfikseringstest.
- Struktur-aktivitetsforhold til pektinene i vannekstraktene undersøkes ved å se på endring i biologisk aktivitet etter enzymdegradering av pektinene.

# 3 Metoder

## 3.1 Generelle metoder

### 3.1.1 Vannkvalitet

Destillert vann ble brukt ved metodene: filtrering, blanding av løsninger, oppkonsentrering av løsning, gelfiltrering.

Destillasjonssystem: Elix 10 med Progard® NP2 (millipore)

### 3.1.2 Innveiling

Analysevekt: Sartorius TE3 135, Sartorius ED2245 Extend

Overskålsvekt: OHAUS® PORTABLE Advanced, Model No. CT1200V

### 3.1.3 Filtrering

Ved preparering av tomatene ble tomat i ekstraksjonsmiddel filtrert med filterpapir og trakt.

*Filterpapir:* Whatman® nr.1

Ved ekstraksjon med destillert vann, CDTA-løsning og NBC-løsning ble glassfilter (nutch)

med vannsug brukt. *Glassfilter:* Whatman™ GF/A 150 mm

Ved applisering på Bio-Gel P-30 kolonne og PD-10 kolonne ble prøvene filtrert med mikrofilter. *Mikrofilter:* Millex-HA 5 µm og 0,45 µm porestørrelse.

### 3.1.4 Sentrifugering

Sentrifugering er en metode for å separere ulike væsker med forskjellig massetetthet eller skiller partikler fra væsker. Dette brukes ved metylering, TMS-derivatisering eller komplementfikseringstest. Hastigheten måles i rpm (revolutions per minute) eller ppm (parts per million).

Sentrifugeinstrumenter:

- Centrifuge 5810 eppendorf (TMS-derivatisering)



- Multifuge 4 KR Heraeus (metylering)
- Labnet Mikrocentrifuge Mini4K (komplementfikseringstesten)

### **3.1.5 Absorbansmålinger**

Intensitet på farge fra fenolsvovelsyretesten eller komplementfikseringstesten fra flatbunnet mikrotiterplate ble målt ved hjelp av spektrofotometer.

Absorbansmåler: iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad) – målt ved 490 nm (fenolsvovelsyretesten)

Absorbansmåler: SpectraMax PLUS 384 – målt ved 415 nm (komplementfikseringstesten)

### **3.1.6 De-gassing av løsninger**

Løsninger (destillert vann) som krever fravær av luft og luftbobler ble behandlet med heliumgass (AGA) 15-20 minutter.

### **3.1.7 Blanding av løsninger**

Blanding av løsninger ble gjort med magnet og magnetrører eller whirlimixer.

Magnetrorer: RCT basic (IKA)

Whirlimixer: MS2 Minishaker (IKA), VWR® lab dancer S040, Heidolph REAX top

### **3.1.8 Oppkonsentrering av løsninger (rotavapor)**

Oppkonsentrering av løsninger ble gjort ved hjelp av rotavapor. En rotavapor er et redskap til å dampe av flyktige substanser og løsemidler som er mere flyktige enn løsningen. Løsningen blir overført til en pærekolbe og under trykk satt på et varmt vannbad. Trykket (vakuumevaporator) utnyttes ved, at væsker fordampes ved lavere temperaturer end det opprinnelige. Løsemidlet som fordampes av samles i en kolbe under kjøling.

#### **Utstyr**

- Ulike størrelser av pærekolber eller rundkolber
- Rotavapor med vannbad: IKA ® HB10 basic (VWR)
- Vakuumevaporator: SpeedVac Savant SPD121P med Vapornet Savant VN100

## Prosedyre

- 1) Løsningen ble overført til en pærekolbe eller rundkolbe
- 2) Løsningen dampes inn til ønsket volum under vakuum ved 37-40 °C

### 3.1.9 Frysetørking

#### Prinsipp

Frysetørking er en metode hvor vann eller andre løsemidler fjernes ved sublimasjon fra frossen tilstand. Prøvene ble først fryst i fryseskap (lite volum) eller i metanolbad ved – 35 °C – 45 C° (stort volum) og tørket på frysetørker i 24-48 timer under trykk.

#### Utstyr

- Metanolbad: Hetofrig (Heto Birkerød, Danmark)
- Frysetørker: ALPHA 1-4, ALPHA 1-4-LDplus, freeze-dryer (Martin Christ Laboratory ®)
- Vakuumpumpe: Direct-Drive High Vacuum Pumps (Welch ®)
- All-Purpose Laboratory Film (Parafilm ®)
- Pæreformet rundkolbe med overgang og glassull eller drammeglass med parafilm
- Fryser for oppbevaring
- Kanyle for å stikke hull i parafilm

#### Prosedyre

- 1) Prøveløsningen ble satt på metanolbad og frosset ned under rotasjon på metanolbad. Ved små mengder ble prøvene satt direkte i fryseskapet.
- 2) Prøver i rundkolber eller pærekolber ble koblet på utsiden av frysetørkeren, mens prøver i andre beholdere ble dekket med perforert parafilm og plassert på innsiden av frysetørkeren.

### **3.1.10 Nitrogen tørking**

En rask og skånsom metode for å tørke små mengder prøve, er ved bruk av N<sub>2</sub>-gass. Gass I kombinasjon med oppvarming av prøveløsning på varmeenhet sørger for rask fordamping av løsemidlet.

- Reacti-Vap<sup>TM</sup> Evaporators og Reacti-therm<sup>TM</sup> III, koblet til komprimert nitrogen (AGA) (Thermo Scientific<sup>TM</sup>)
- Supelcorør med skru lokk

### **3.1.11 Syrevasking av glassutstyr**

#### **Prinsipp**

Glassutstyr oppbevares vanligvis i pappbeholdere som er gode kilder til cellulose. Cellulose er et polysakkarid som interferer med resultater fra metanolyse og metylering. Denne kontaminant ønskes fjernet fra alt glassutstyr før de brukes i testmetodene. Til dette formål brukes konsentrert saltsyre som kan spalte polysakkaridene i glassutstyret. Etterfølgende vaskes rester av saltsyren grundig og tørkes i varmeskap.

#### **Reagenser**

- Konsentrert HCl
- Destillert vann
- Springvann

#### **Utstyr**

- Varmeskap Functionline (Heraus Instruments)
- Begerglass

#### **Prosedyre**

- 1) Glassutstyr ble plassert i et begerglass i avtrekkskap og fylt med konsentrert saltsyre. Dette ble satt til henstand i 30 minutter.
- 2) Glassutstyret ble vasket med springvann og deretter vasket med destillert vann
- 3) Glassutstyret ble til slutt tørket i varmeskap ved 80 °C i 2-3 timer.

### 3.1.12 Tørking med eksikator

I bunnen av en lufttett eksikator plasseres tørkemiddelet  $P_2O_5$ . Prøvene plasseres I eksikator og det tilføres lavt trykk ved bruk av vakuu I minst 30 min.

- Lufttett eksikator
- Vakuumpumpe
- All-Purpose Laboratory Film (Parafilm®)
- Begerglass for oppbevaring
- Kanyle for å stikke hul i parafilm

## 3.2 Isolering og identifisering av pektin

### 3.2.1 Preparering av tomat

Plantematerialet i denne oppgaven er fire ulike modningsgrader (umoden, standard, moden, modnet oppkuttet) av tomat av sorten Dometica. *Umoden tomat* er en grønn-rød tomat og er de to ytterste tomater i tomatklasen (figur 1). *Standard tomat* er en rød tomat og er de to midterste tomater i tomatklasen. *Modnet tomat* har stått to uker lengere enn standard tomat (romtemperatur) og er de to innerste tomater i tomatklasen. *Oppkuttet tomat* har stått i en uke før den ble kuttet i fire deler og satt på benken til natten over (romtemperatur). Skinn og frø fra tomatene fjernes og tomatkjøttet ekstraheres med 96 % etanol for å fjerne upolare substanser.

#### Reagenser

- Destillert vann
- 96 % etanol

#### Utstyr

- Kniv
- Kjele
- Isvann
- Rundkolbe
- Varmemantel

- Tilbakeløpskjøler
- Begerglass
- Filterpapir Whatman® nr.1
- Erlendmeyerkolbe
- Rotavapor (IKA ® RV10 basic)

## Prosedyre

- 1) Det ble snittet et kryss i tomatene som ble lagt i kokende vann i 30 sekunder. Dette ble gjort med 5 tomater om gangen av hver sort. I alt ble i gjennomsnitt 20 tomater brukt.
- 2) Tomatene ble lagt i isvann til de ble avkjølt (ca. 1,5 minutter)
- 3) Skinn og frødelen ble fjernet og tomatkjøttet ble kuttet opp i biter på ca. 1 cm<sup>2</sup>.
- 4) Tomatkjøtt på 400 g ble lagt i en stor rundkolbe.
- 5) Der ble tilsatt 2 liter 96% etanol og rundkolben plassert i en varmemantel med tilbakeløpskjøler.
- 6) Blandingen kokte i 20 minutter. Trinn 3-6 ble gjentatt med ytterligere 400 g tomatkjøtt.
- 7) Blandingen ble filtrert med en trakt og filter ned i en erlendmeyerkolbe. Tomatkjøttrestene i rundkolben ble overført til et begerglass, overdekket med 96% etanol og satt i kjøleskap til natten over.
- 8) Tomatrestene ble most i en foodprocessor sammen med 100 mL vann til en homogen blanding.
- 9) Tomatblandingen ble fordelt i pærekolber og etanolen ble dampet av på rotavapor.
- 10) Tomatblandingen ble tilsatt 100 mL destillert vann og satt i fryseren over natten.
- 11) Tomatblandingen ble satt til frysetørring i 2 dager.
- 12) Dette ble gjentatt med alle tomater fra de forskjellige modningsstadier (henholdsvis umoden, standard, moden og modnet oppkuttet tomat).

## 3.2.2 Ekstraksjon av pektiner

### Prinsipp

Ekstraksjon med ulike ekstraksjonsmidler ble utført for å isolere løst assosiert pektiner, ionebundet pektin og kovalent esterbundet pektin i tomatens cellevegg og midtlamell. Ekstraksjonsmidlene som ble brukt er destillert vann, CDTA og NBC-løsning (NaBH<sub>4</sub> og NaCO<sub>3</sub>). Vannekstraktene inneholder svakt bundet metylforetret pektin. CDTA-ekstraktene inneholder pektiner som holdes i celleveggen og midtlamell ved hjelp av kalsium-broer (Ca<sup>2+</sup>) og danner en såkalt «egg-boks struktur». NBC-ekstraktene inneholder pektiner som er kovalent esterbundet til andre celleveggs-polysakkarider (Houben et al., 2011; Round et al., 2001).

### Reagenser

- Destillert vann
- CDTA
- NBC-løsning

### Fremstilling av reagenser:

**CDTA-løsning:** 0,05 M Sykloheksan-trans-1,2-diamin tetra-eddiksyre (C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) i 0,1 M natriumacetat trihydrat (NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>·3 H<sub>2</sub>O), pH=5.

$$M_w(\text{cyclohexane} - \text{trans} - 1,2 - \text{diamine tetra} - \text{acetic acid}) = 346,333 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$m = M_w \cdot n = M_w \cdot M_{\text{molar}} \cdot V = 346,333 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 0,05 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 2,0 \text{ L} = 34,6 \text{ g}$$

$$M_w(\text{natriumacetat trihydrat}) = 82,0343 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 54 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 136,0343 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$m = 136,0343 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 0,1 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 2,0 \text{ L} = 27,2 \text{ g}$$

Tørrstoffene ble blandet sammen med destillert vann i en 2000 mL målekolbe til ferdig reagens.

**NBC-løsning:** 0,05 M Natriumkarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) i 0,02 M Natriumborhydrid (NaBH<sub>4</sub>)

$$M_w(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 106 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$m = 106 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 0,05 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 2,0 \text{ L} = 10,6 \text{ g}$$

$$M_w(\text{NaBH}_4) = 37,83 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$m = 37,83 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 0,02 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 2,0 \text{ L} = 1,5 \text{ g}$$

Tørrstoffene ble blandet sammen med destillert vann i en 2000 mL målekolbe til ferdig reagens.

## Utstyr

- Vannbad i kjele
- Varmeplate
- Pærekolber
- Tilbakekjøler
- Glasstrakt (nutch)
- Glassfilter (whatman GF/F, 150 mmø, cat no: 1825-150)
- Sugokolbe
- Begerglass
- Rotavapor (IKA ® RV10 basic)
- Vekt

## Prosedyre

### A. Ekstraksjon med vann

- 1) Det ble veid inn 8 g tørrstoff av ulike modningsstadier av Dometica-tomat i pærekolbe.
- 2) 800 mL destillert vann ble tilsatt i hver kolbe og satt på kokende vannbad i 30 minutter.
- 3) Blandingen ble avkjølt på benken før filtrering med glassfilter (nutch) og sugokolbe med vannsug.
- 4) Vannekstraktet ble oppkonsentrert til 100 mL på rotavapor (metode 3.1.8)
- 5) Vannekstraktet (5 mL) ble applisert på Bio-Gel P-30 flere omganger (metode 3.2.3.1)
- 6) Vannekstraktet (5 mL) ble frysetørket (metode 3.1.9).
- 7) Resten av vannekstraktet ble dialysert (metode 3.2.4)
- 8) Tomatrestene fra vannekstraksjonen ble fryst inntil ekstraksjon med CDTA-løsning.

## **B. Ekstraksjon med CDTA-løsning**

- 1) Tomatrestene fra vannekstraksjonen ble tint opp og lagt i hvert sitt begerglass sammen med 400 mL CDTA-løsning.
- 2) Begerglassene ble dekket med folie og satt i romtemperatur til over natten.
- 3) CDTA-løsningen ble filtrert vekk med glassfilter og sugokolbe.
- 4) CDTA-ekstraktene ble dampet inn til 100 mL på rotavapor (metode 3.1.8)
- 5) CDTA-ekstraktene (5 mL) ble frysetørket (metode 3.1.9)
- 6) Resten av CDTA-ekstraktet ble dialysert (se metode 3.2.4)
- 7) Tomatrestene fra CDTA-ekstraksjonen ble satt i kjøleskap til over natten

## **C. Ekstraksjon med NBC-løsning**

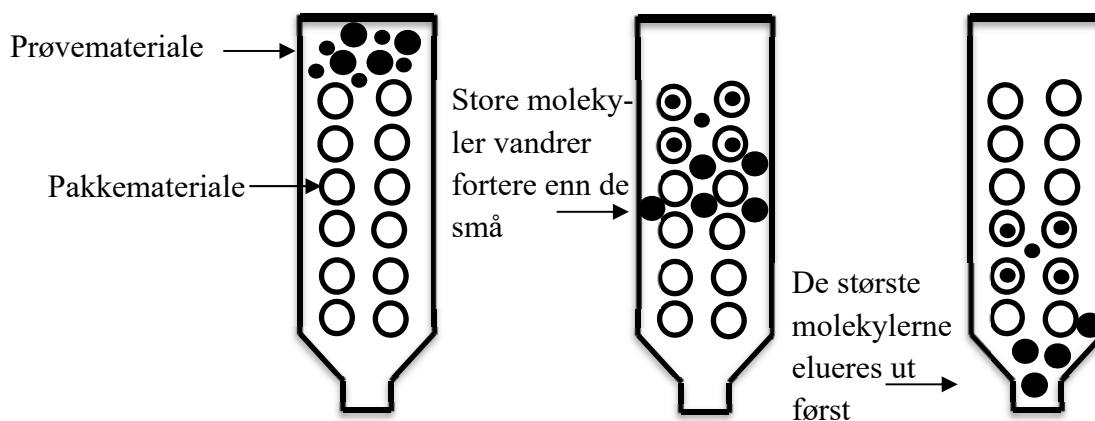
- 1) Tomatrestene fra CDTA-ekstraksjonen ble lagt i hvert sitt begerglass sammen med 400 mL NBC-løsning.
- 2) Begerglassene ble satt i kjøleskap til over natten.
- 3) Begerglassene ble satt i romtemperatur til over natten.
- 4) NBC-løsningen ble filtrert vekk med glassfilter og sugokolbe.
- 5) NBC-ekstraktene ble dampet inn til 100 mL på rotavapor (metode 3.1.8)
- 6) NBC-ekstraktene (5 mL) ble frysetørket (metode 3.1.9)
- 7) Resten av NBC-ekstraktene ble dialysert (metode 3.2.4)
- 8) Tomatrestene fra NBC-ekstraksjonen ble fryst ned.



### 3.2.3 Gelfiltrering – eksklusjonskromatografi

#### Prinsipp

Eksklusjonskromatografi er en kromatografisk metode som separerer stoffer etter deres molekylstørrelse. Når vannløselige stoffer separeres med vandige mobilfaser kalles teknikken «Gelfiltrering» (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 2010). En prøveløsning elueres gjennom en kolonne fylt med et finkornet porøst pakkemateriale med gitt porestørrelse og fraksjoneringsområde (figur 11). De store molekylene vil bevege seg i mellomrommet mellom partiklene, mens mindre molekyler som er små nok vil diffundere ut og inn av porene. Væsken inne i porene kalles stasjonærfase og er en stillestående fase. Væsken på utsiden av partiklene kalles mobilfasen og er en bevegelig fase. Stoffer med størst molekylstørrelse elueres ut først mens stoffer med minst molekylstørrelse blir retardert i gel- matriksen og elueres ut sist.



**Figur 11:** Skjematisert oppsett av prinsippet bak gelfiltrering. Tegnet av Maryam Houji

#### 3.2.3.1 Bio-Gel P-30®

Bio-Gel P-30 er en polyakrylamid gel og benyttes som pakkemateriale i gelfiltrering (figur 11). Polyakrylamid er en polymerisering av akrylamid og N,N-metylenbisakrylamid og er dermed hydrofil og ladningsfri (Greibrokk, Lundanes, & Rasmussen, 1994). Bio-Gel P-30 brukes fordi den er beregnet på bruk i vandige løsninger (pektiner er vannløselige) og i et stort pH-område (2-10). Fraksjonerings-området er mellom 2.5-40 KDa, som betyr at stoffer med molekylstørrelse over eller under området ikke vil bli separert og vil bli ført ut i mobilfasen.

## Reagenser

- Bio-Gel® P-30
- De-gasset destillert vann
- 0,05 % NaN<sub>3</sub>-løsning

## Utstyr

- Kolonne (Pharmacia biotech)
- Fraksjonssamler (Fraction collector, Superfrac™)
- Pumpe (SPETEC)
- Mikrofilter 5 µm og 0,45 µm (Millex-HA)
- Sprøyte 5 mL (BD Plastipak)

## Betingelser

- Elueringshastighet: 0,5 mL/min
- Fraksjonsstørrelse: 5 mL
- Appliseringsvolum: 5 mL

## Prosedyre

### Pakking av kolonne

- 1) Kolonnen for gelfiltrering ble pakket med Bio-gel P30. For tilberedning av Bio-Gel P30 ble en mengde tilsvarende 33 g veid og tilsatt i en kolbe.
- 2) Med målesylinder ble 600 mL destillert vann målt opp og tilsatt i kolben med Bio-Gel P30 og satt til svelling i 2 dager i kjøleskap.
- 3) Supernatanten fra Bio-Gelblandingen ble dekantert av.
- 4) Bio-Gelblandingen ble de-gasset med vakuumpumpe.
- 5) En mengde destillert vann ble de-gasset med helium i 15 minutter.
- 6) Bio-Gelblandingen ble slemmet opp ved forsiktig røring og helt i kolonnen ved hjelp av en glassstav.
- 7) Kolonnen ble pakket med de-gasset destillert vann som ble eluert gjennom kolonnen.

## Applisering og eluering av prøver

8) Prøveløsning (vannekstraktene 80 mg/mL) ble filtrert med 0,45  $\mu\text{m}$  filter og sprøytet ned i drammeglass og applisert på den ferdig pakke kolonne.

9) Det ble samlet 76 fraksjoner på 5 mL hver.

## Vask og konservering av kolonne

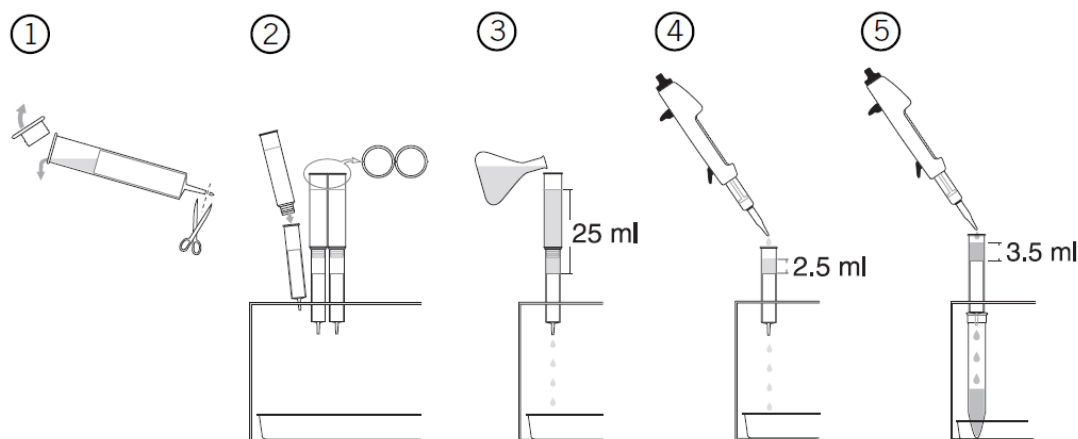
10) En kolonnevolum de-gasset vann ble kjørt gjennom kolonnen.

11) Kolonnen ble til slutt konservert med 1,5 kolonnevolum 0,05 %  $\text{NaN}_3$ -løsning

### 3.2.3.2 PD-10 kolonne

#### Prinsipp

PD-10 desalting kolonner er ferdigpakket engangskolonner som inneholder Sephadex G-25 medium. Sephadex G-25 medium benyttes som pakkemateriale i gelfiltrering og fraksjoneringsområde er mellom 1-5 kDa. Lavmolekylære stoffer såsom salter retarderes i Sephadex matrixen. Stoffer med høyst molekylvekt elueres ut først og minst sist.



**Figur 12:** Skjematisk oppsett av PD-10-kolonne (Amersham Biosciences, 2003)

#### Reagenser

- Destillert vann
- 0,05 %  $\text{NaN}_3$

## Utstyr

- PD-10 desalting kolonne (Amersham Biosciences)
- Sprøyte 5 mL
- Stativ og klype til festing av kolonne
- Målesylindere
- Begerglass
- Fraksjonsrør
- Glasspipetter
- Mikrofilter 5  $\mu\text{m}$  og 0,45  $\mu\text{m}$  (Millex-HA)

## Prosedyre

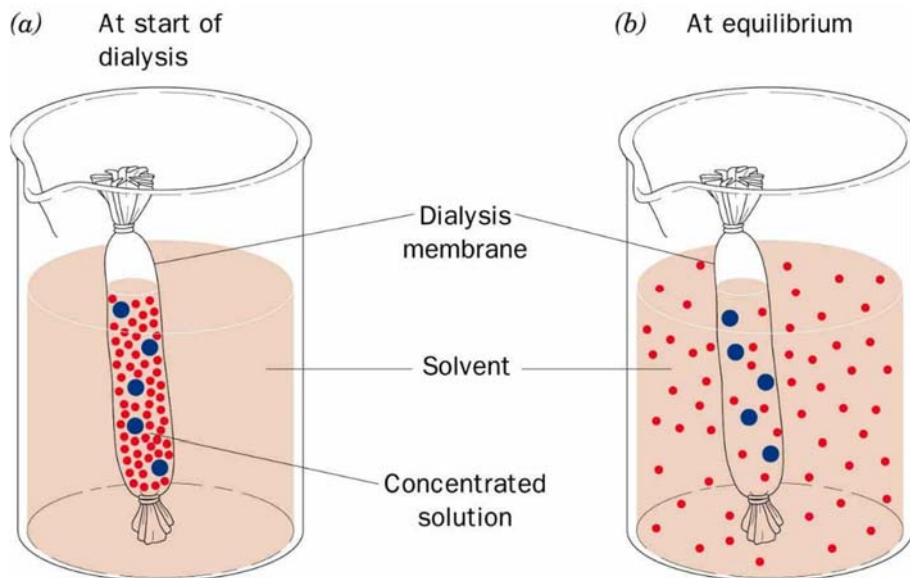
- 1) PD-10 kolonne klargjort (figur 12), nederste tupp ble klippet av.
- 2) Kolonnen ble festet på et stativ med underliggende beholder.
- 3) Kolonnen ble vasket med 25 mL destillert vann
- 4) Prøvevolum ble dampet på rotavapor til 2,5 mL og applisert på kolonnen. Eluatet ble kastet.
- 5) Kolonnen ble eluert med 3,5 mL destillert vann og de høymolekylære substansene ble eluert ut. Dette ble samlet i oppsamlingsrør.
- 6) Kolonnen ble vasket med 25 mL destillert vann mellom hver applisering av ny prøve. Etter endt bruk ble kolonnen fylt med destillert vann for å unngå tørking og satt i kjøleskap til senere bruk.

### 3.2.4 Dialyse

#### Prinsipp

Dialyse er en metode som brukes for å separere lavmolekylære forbindelser og salter fra høymolekylære forbindelser (f.eks. pektin) ved passiv diffusjon. Dialyseslangen er en semipermeabel membran med en gitt porestørrelse. Dialyseslangen med innhold av ekstrakt er plassert i en beholder med destillert vann. Molekyler som har større molekylvekt enn porestørrelsen forblir i slangen. Molekyler som har mindre molekylvekt enn porestørrelsen diffunderer ut av slangen. Etter et stykke tid vil likevekten være oppnådd og en del

lavmolekylære forbindelser vil være utenfor dialyseslangen. På grunn av dette skiftes dialysevannet flere ganger for å ha minst mulig lavmolekylære forbindelser i dialyseslangen (ThermoFischer Scientific, 2009).



**Figur 13:** Prinsippet bak dialyse (Schoolworkhelper, 2017)

### Reagenser

- 2 % NaOH-løsning
- Destillert vann

### Beregning:

4 liter: 2 % w/w NaOH

$c(\text{NaOH}) = 2 \% \text{ w/v NaOH} = 20 \text{ g/L NaOH}$

$m(\text{NaOH}) = 4 \text{ l} \cdot 20 \text{ g/L} = 80 \text{ g tørrstoff NaOH}$

### Utstyr

- Dialyseslanger: Spectra/ Por®3 Dialysis Membrane, MWCO 3,5 kDa, diameter: 29 mm
- Kokeplate
- Stor begerglass
- Boks for oppbevaring
- Dialyseklyper

- Rene plastbøtter
- Magnet og magnetrører
- Glasstaver
- Trakt
- Kjele

### **Prosedyre**

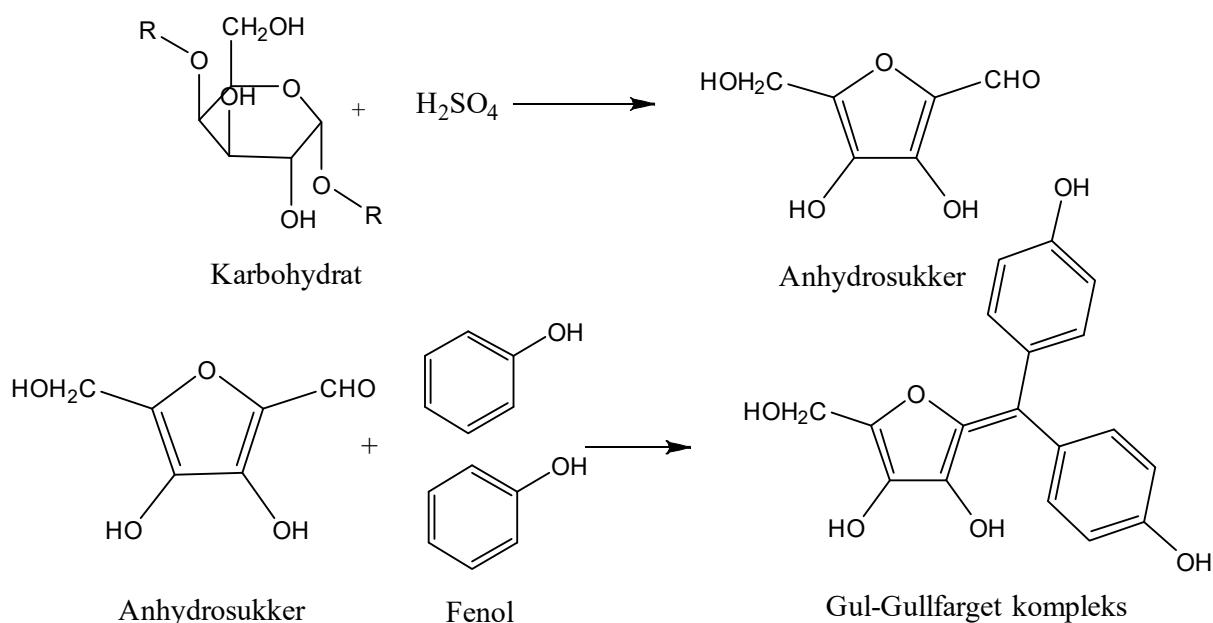
- 1) Dialyseslangene ble klippet i lengde av 80 cm (20 slanger i alt)
- 2) Slangene ble skylt utvendig med springvann i et begerglass og satt i kokende bad med 2 % NaOH-løsning i 10 minutter med glasstaver for å unngå støtkoking.
- 3) Slangene ble vasket innvendig og utvendig med springvann og deretter i destillert vann. Slangene ble kokt i destillert vann i 10 minutter
- 4) Slangene ble knytt i den ene enden og i tillegg festet med dialyseklype. Der ble kontrollert, at slangen er tett ved å tilsette destillert vann. Slangene ble konstant holdt i vann for å unngå tørking og ødeleggelse av slangen.
- 5) Slangene ble fylt med prøveløsning og luftbobler ble forsiktig presset ut av slangene. Slangene ble bundet i den andre ende sammen med dialyseklype.
- 6) To dialyseslanger ble overført til en beholder med destillert vann (i alt 6 beholdere til 12 prøver). Prøveløsningene ble dialysert under magnetomrøring i et kjølerom. For at dialyseslangene ikke skulle komme i kontakt med magneten ble 3 intakte glasstaver plassert under slangene.
- 7) Under dialyseprosessen ble dialysevannet skiftet 3 ganger med destillert vann.

## 3.3 Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av karbohydratinnhold

### 3.3.1 Fenolsvovelsyretest

#### Prinsipp

Fenolsvovelsyretesten er en enkel og rask kolorimetrisk metode for bestemmelse av total karbohydratinnhold i en prøve. Metoden oppdager alle klasser av karbohydrater, inkludert mono-, di-, oligo- og polysakkarider. Konsentrert svovelsyre bryter ned eventuelle polysakkarider, oligosakkarider og disakkarider til monosakkarider. Pentoser dehydreres deretter til furanaldehyd og heksoser til hydroksymetyl furaldehyd, hvilke betegnes under ett som «anhydrosukker» (figur 14). Anhydrosukker reagerer deretter med fenol for å produsere et stabilt gul-gull-farget kompleks (Nielsen, 2017). Dette kompleks absorberer UV-lys og absorbansen er proporsjonal med mengde karbohydrat i prøven og kan måles ved absorpsjonsmaksimum 490 nm (Cui, 2005b).



**Figur 14:** Reaksjon mellom karbohydrat, svovelsyre og fenol under dannelsen av gul-farget kompleks. Tegnet av Maryam Houji

## Reagenser

- 4 % fenol
- Konsentrert svovelsyre

## Utstyr

- Finnpipetter
- Reagensrør av glass (5 mL)
- Whirlimixer (Fisons)
- Mikrotiterplate med flatbunn
- Mikroplateleser: BIO-RAD modell 3550
- Verneutstyr

## Prosedyre

- 1) 100 uL av hver prøve ble overført til glassrør
- 2) 1 mL svovelsyre og 200 uL fenol ble tilsatt reagensrørene. Hvert av glassene ble mikset på whirlimixer.
- 3) Rørene ble satt til henstand i 30 minutter
- 4) 200 uL fra hvert av glassene ble overført til en mikrotiterplate
- 5) Absorbans ble målt og avlest ved 490 nm.

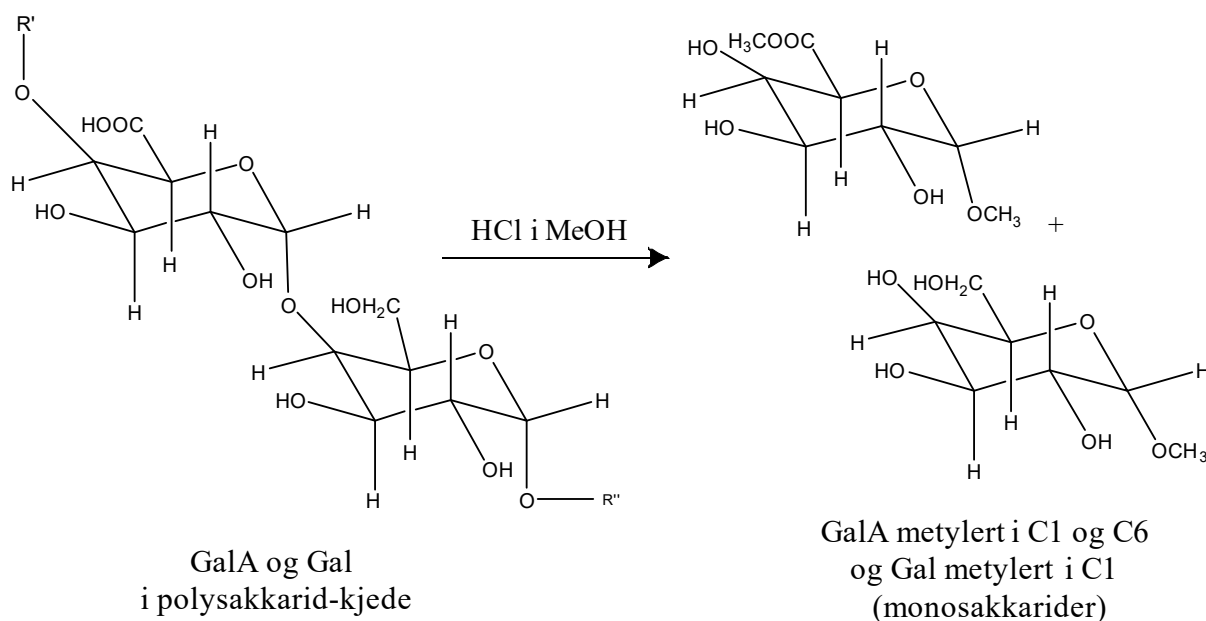
### 3.3.2 Metanolyse (Monosakkaridkomposisjon)

Polysakkarider består av monosakkarider bundet sammen ved glykosidbindinger. Disse bindinger må spaltes av ved metanolyse før de kan omgjøres til flyktige substanser ved TMS-derivatisering og detekteres på GC.



## Prinsipp

Frysetørket prøvemateriale oppløses i vannfritt metanolisk saltsyre. Saltsyre i metanol vil bryte glykosidbindingene i polysakkaridkjede og danne monosakkarider (Cui, 2005a). Ved spaltningen av glykosidbindingen vil nøytrale sukkerer (f.eks. galaktose) bli metylert ved C1 (figur 15). Uronsyrene (f.eks. galakturonsyre) blir metylert ved C1 og C6. Reaksjonen holdes vannfritt for å unngå hydrolyse av metylglykosidene. Mannitol brukes som intern standard (IS) for å utføre kvantitative beregninger, korrigere for tilfeldige endringer under opparbeidelsen og identifikasjon av monosakkarider ved GC-analyse (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 2010)



**Figur 15:** Metanolyse: Spalting av glykosidbindinger i polysakkarid-kjede til monosakkarider ved hjelp av surt vannfritt metanol. Tegnet av Maryam Jehad Khalil Houji

## Reagenser

- 3M HCl i vannfri MeOH
- Intern standard: 1,0 mg/mL mannitol
- Vannfri metanol

## Utstyr

- Syrevasket supelcorør med kork
- Glasspipetter

- Kapillærrør - blå
- SMI-pipette
- Varmeskap (80 °C)
- N<sub>2</sub>-gassoppsett ved 37 °C

## Prosedyre

- 1) Frysetørket materiale ble veid inn til 2 mg i syrevasket supelcorør (metode 3.1.11)
- 2) Rørene ble dekket med parafilm (med hull på toppen) og satt i eksikator i 20-24 timer ved romtemperatur.
- 3) Der ble veid 1 mg i nye syrevaskede supelcorør.
- 4) 100 µL mannitol (1,0 mg/mL) og 1 mL 3 M HCl i metanol ble tilsatt.
- 5) Rørene med kort ble satt i varmeskap (80 °C). Etter 10 minutter ble overtrykk i rørene sluppet ut ved å ta av korken og skrudd fast igjen. Rørene forble i varmeskapet til over natten.
- 6) Prøvene ble tørket under N<sub>2</sub>-gass ved 37 °C (metode 3.1.10).
- 7) Der ble tilsatt 200 µL vannfritt metanol og tørket under N<sub>2</sub>-gass ved 37 °C. Dette ble gjort tre ganger.
- 8) Prøvene ble dekket med perforert parafilm og tørket i vakuum-eksikator (metode 3.1.12) i minst 1 time før TMS-derivatisering

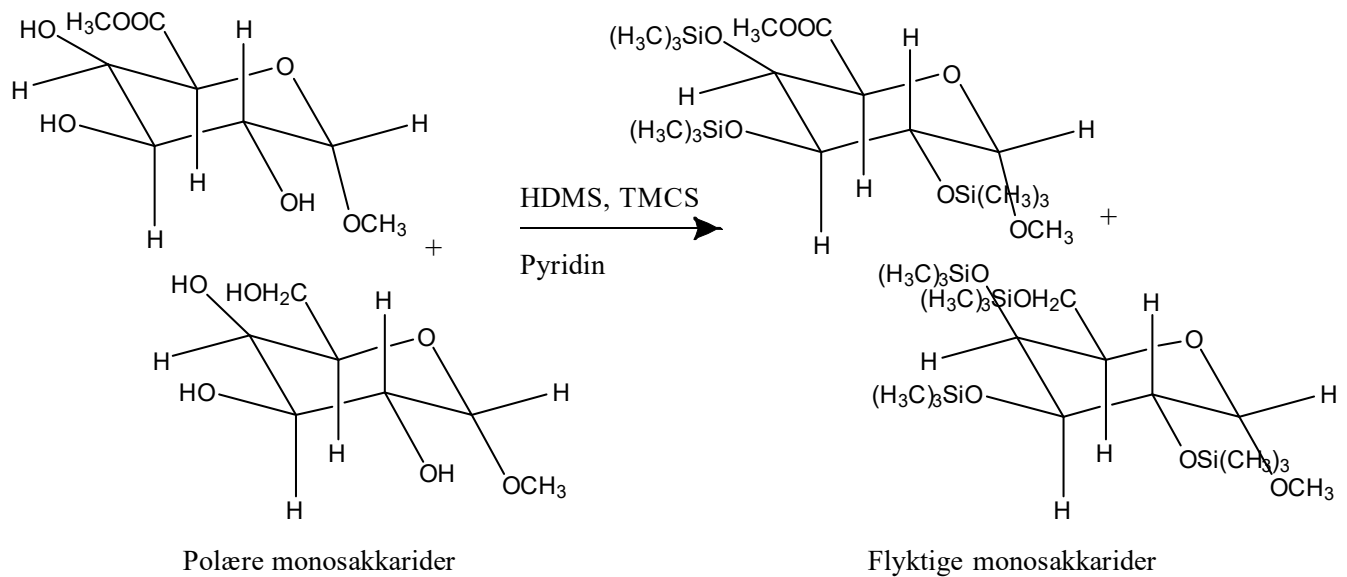
### 3.3.2.1 TMS derivatisering

#### Prinsipp

Monosakkarider er polære forbindelser som inneholder blant annet hydroksygrupper, aminogruupper og acetylgrupper, som nedsetter stoffets flyktighet. GC-analyse krever, at stoffet formeres til gassform og økt flyktighet er dermed ønskelig. Monosakkaridene er ikke flyktige nok til GC-analyse uten derivatisering. Mindre polære forbindelser er ikke egnet da de vil absorberes på aktive steder i GC-systemet. De kromatografiske toppe representert ved disse komponenter kan utvise uønskelig haledannelse og overlapping på grunn av brede toppe. (Sparkman, Penton, & Kitson, 2011).

TMS-derivatisering er en reaksjon mellom de polære hydroksylgrupper og TMS-reagens som består av heksametyldisilazan (HDMS), trimetylklorosilan (TMCS) og pyridin (figur 16). Der

blir dannet flyktige og termisk stabile forbindelser, som gir bedre separasjon på GC-kolonne (Sweeley, Bentley, Makita, & Wells, 1963).



**Figur 16:** Reaksjon mellom frie hydroksylgrupper og TMS-reagens for dannelse av flyktige komponenter. Tegnet av Maryam Jehad Khalil Houji

### Reagenser

TMS-reagens:	Trimetylklorosilan (TMCS)	1 mL
	Heksametyldisilazan (HMDS)	2 mL
	Pyridin	5 mL

### Utstyr

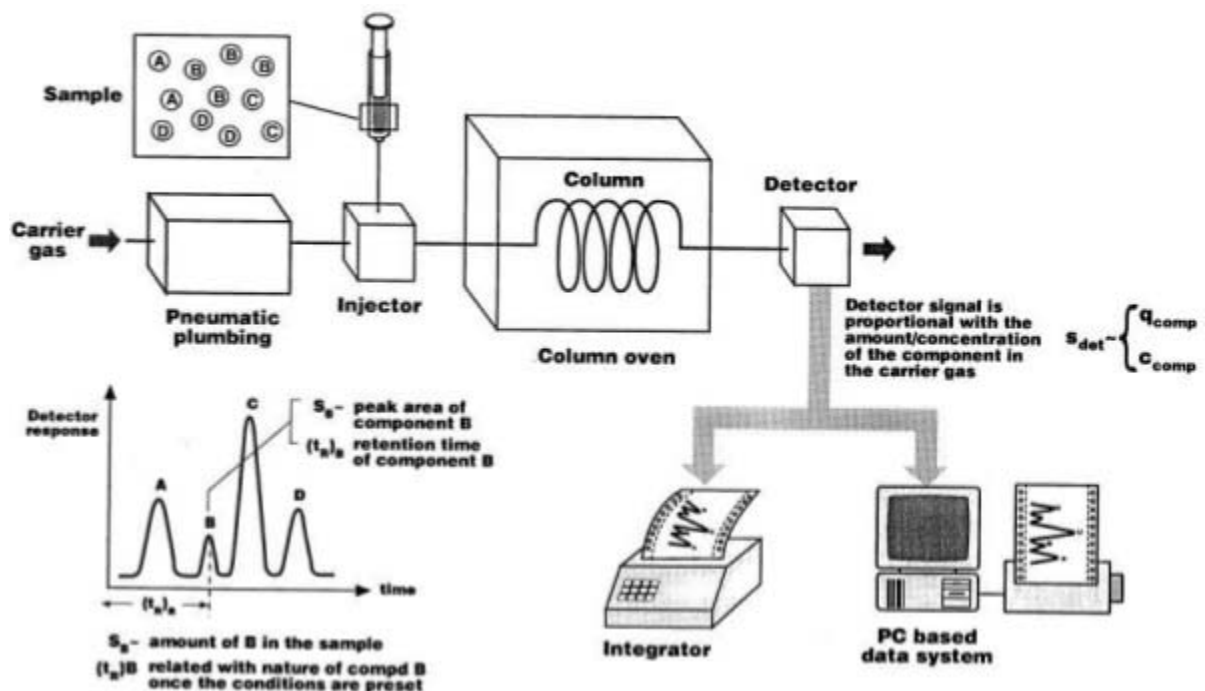
- Kapillærrør (blå)
- SMI-pipette
- Whirlmixer (fixons)
- Sentrifuge

### Prosedyre

- 1) Der ble tilsatt 100 µL TMS-reagens til de metanolyserte prøvene. Prøvene ble blandet på whirlmixer.
- 2) Prøvene ble satt til henstand med kork på i 30 minutter.
- 3) Prøvene ble sentrifugert (metode 3.1.4) og supernatanten ble brukt videre i gasskromatografisk analyse (metode 3.3.2.2)

### 3.3.2.2 Gasskromatografi

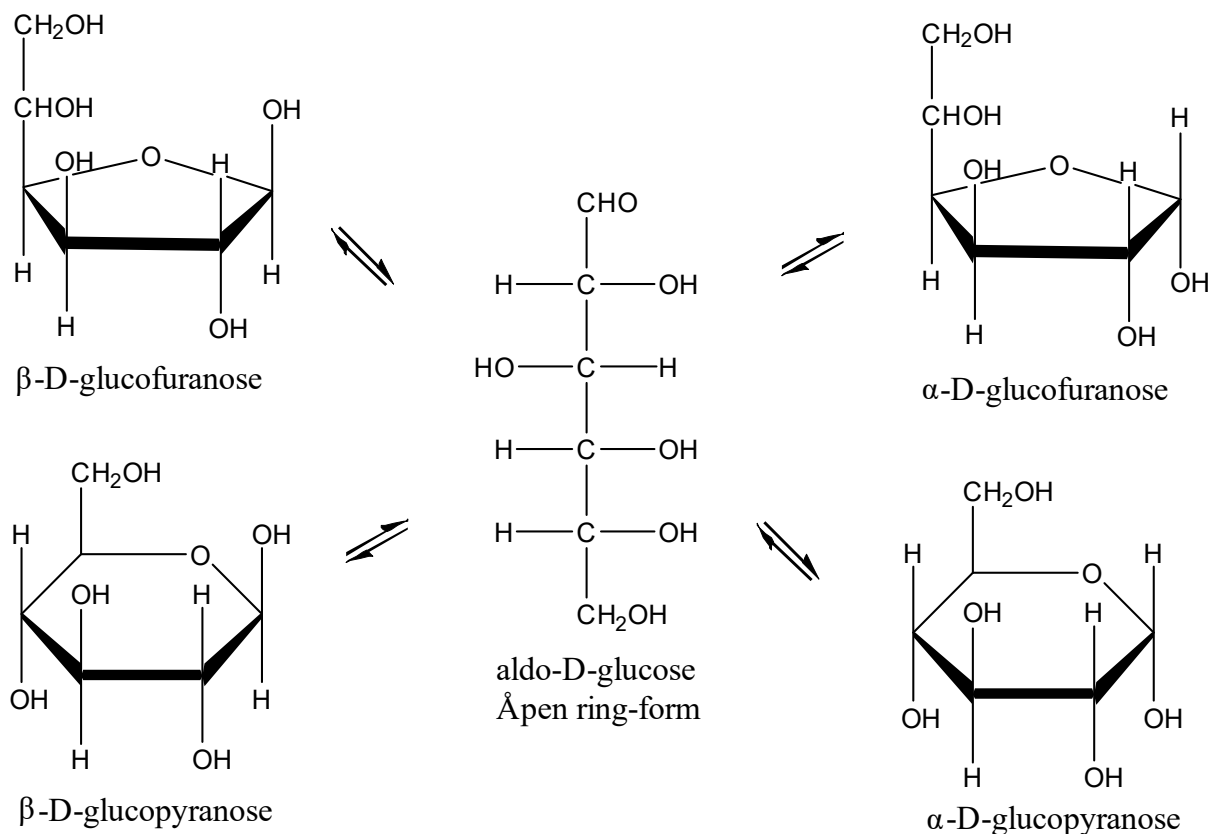
Gasskromatografi (GC) er en analytisk metode for analyse og separasjon av kjemiske stoffer, basert på stoffenes flyktighet. Prøven blir injisert i en oppvarmet injektor som gjør at stoffene fordampes til en gassform (figur 17). Prøvegassen blandes med bæregassen (mobilfasen) og vandrer gjennom GC-kolonnen (stasjonærfasen). De kjemiske stoffer i prøven fordeler seg kontinuerlig mellom stasjonærfasen og mobilfasen. Stoffenes forskjell i kjemisk og fysiske egenskaper gjør at de interagerer ulikt på stasjonærfasen. Denne interaksjonsforskjell fører til at stoffene separeres, noe som måles ved hjelp av detektoren. Detektoren som brukes i denne metode kalles flammeioniseringsdetektor (FID). FID måler elektrisk strøm fra ladede partikler når organiske stoffer brenner i en flamme. Strømmen vil være proporsjonal med mengden av organisk stoff. Resultatet av separasjonen vises i et kromatogram hvor blant annet retensjonstider og areal er vist ved hjelp av et dataprogram (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 2010).



Figur 17: Skjematisk tegning av gasskromatografi (Thi, 2014).

Hvert monosakkarid gir opphav til flere topper på et kromatogram, på grunn av ulike tautomeriske former som åpen kjede form, pyranose og furanose i  $\alpha$  eller  $\beta$ -konfigurasjon (figur 18). Hvert monosakkarid i dets ulike tautomeriske former interagerer ulikt på stasjonærfasen og separeres dermed med forskjellige retensjonstider. Dette karakteristiske mønster i et kromatogram er nødvendig for identifikasjon av et monosakkarid. Standarder for

monosakkaridene er utført på forhånd og brukes sammen med retensjonstidene til identifikasjon av monosakkaridsammensetningen. Intern standard (mannitol), som er tilsatt i en kjent mengde, er brukt sammen med arealforholdene til kvantifisering av mengde monosakkarid i prøven.



**Figur 18:** Mulige tautomeriske former av D-glukose i en løsning. Tegnet av Maryam Jehad Khalil Houji.

### Utstyr og betingelser

Gasskromatograf:	THERMO SCIENTIFIC FOCUS GC
Programvare:	Chromeleon
Detektor:	Flammeioniseringsdetektor (FID)
Injektor:	Splitt/splittless
	Splittforhold: 1/10
Kolonne:	Restex-Rxi 5MS (Fused silica)
	Kapillærkolonne: 30 m
	Indre diameter: 0,32 mm
	Filmtykkelse: 0,25 $\mu$ m

Bæregass:	Helium		
Flow:	Konstant trykk (0,70 bar)		
Injiseringvolum:	1,0 µL		
Injektortemperatur:	250 °C		
Detektortemperatur:	300 °C		
Temperaturprogram:	Hastighet: 1 °C/min	Hastighet: 6 °C/min	
	140 °C	→ 170 °C	→ 250 °C

GC-analysen ble utført av overingeniør Hoai Thi Nguyen, ved avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

## 3.4 Strukturoppklaring

### 3.4.1 Metylering - Bindingsanalyse

Metylering er en fellesbetegnelse for bestemmelse av bindingsmønster. Denne består av karboksylsyre-reduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon og acetylering for til slutt, at kunne bestemme ved GC-MS hvordan monosakkaridene i pektiner er bundet sammen.

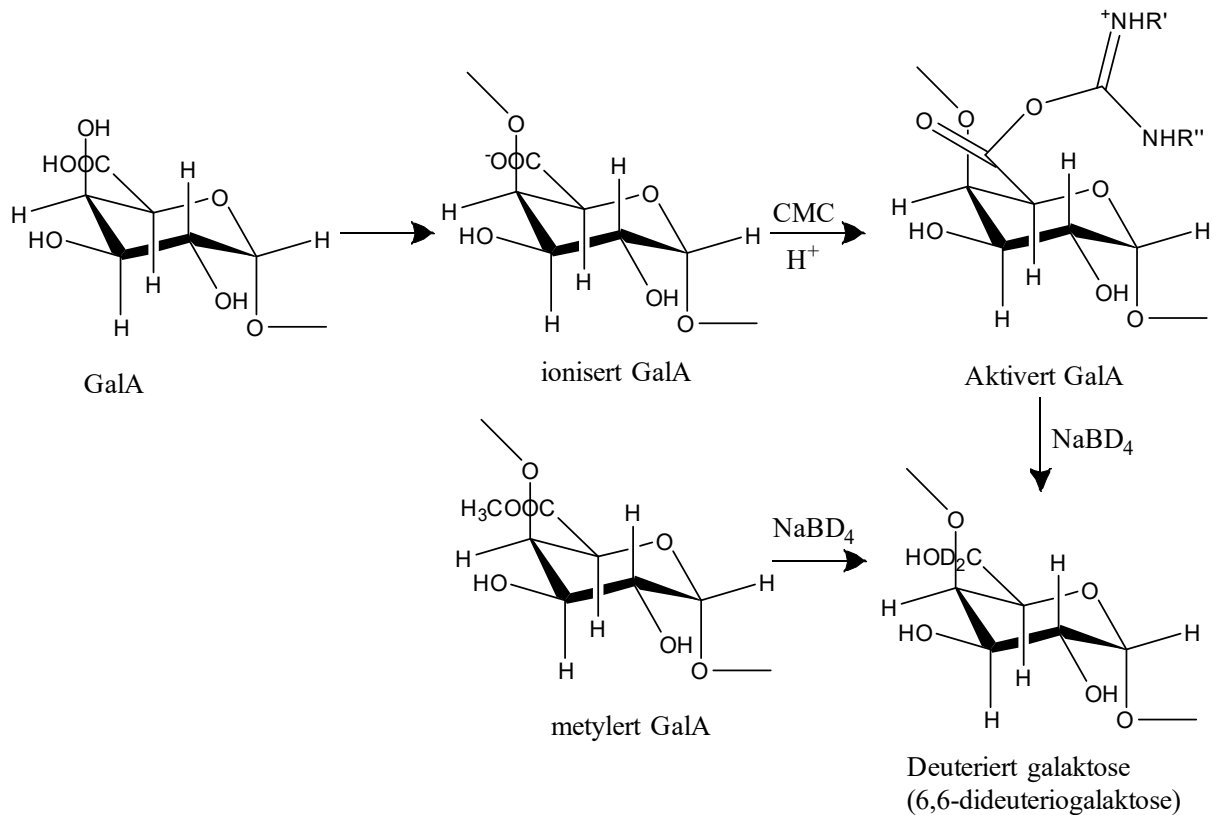
#### 3.4.1.1 Karboksylsyre-reduksjon

##### Prinsipp

De fleste plantecellevegg inneholder uronsyre som galakturonsyre (GalA) og glukuronsyre (GlcA). Glykosidbindinger i tilknytning til disse uronsyrene er vanskelig å hydrolysere effektivt eller kvantitativt (Filomena, Cherie, Geoffrey, & Antony, 2012). Dette kan resultere i tapt informasjon om bindingene mellom uronsyrene og mellom de nøytrale sukkerne. Karboksylsyre-reduksjon er en metode (Kim & Carpita, 1992), som kan skille mellom uronsyre og nøytrale sukkerne. Reduksjon av karboksylsyregrupper (-COOH) med natriumborhydrid (NaBD<sub>4</sub>) krever derfor aktivering med carbodiimide (CMC) (figur 19). GalA kan også være metylforestrert (-COOMe) og disse kan reduseres direkte med NaBD<sub>4</sub>. I begge tilfeller blir produktet 6,6-dideuteriosukker dannet.

Ved en GC-MS analyse vil disse sukkerne (-CD<sub>2</sub>OH) ha fragmenter med økt molekylvekt (M<sup>+</sup>+2) (Filomena et al., 2012). Dette på grunn av deuterium og vil dermed kunne skilles fra de nøytrale sukkerne (CH<sub>2</sub>OH) som galaktose (Gal) og glukose (Glc). Derimot vil skillingen

mellom karboksylsyre (-COOH) og karboksylester (-COOMe) ikke være mulig for analysemetoden, da disse vil omdannes til 6,6-dideuteriosukker og ha samme molekylvekt..



**Figur 19:** Aktivering og reduksjon av galakturonsyre og reduksjon av metylert galakturonsyre. Tegnet av Maryam Houji

### Reagenser

- 500 mM Imidazole-saltsyre ( $C_3H_4N_2 \cdot HCl$ )
- 100 mg/ mL Natriumbordeuterid ( $NaBD_4$ ) i imidazole-HCl
- Iseddik (konsentrert eddiksyre  $CH_3COOH$ )
- 0,2 M MES (2-[N-morpholino]etan svovelsyre, pH= 4,75)
- 500 mg/mL CMC (*N*-sykloheksyl-*N'*-(2-morpholinoetyl) carbodiimide *p*-toluensulfonat) i destillert vann
- 2M TRIZMA (tris [hydroksymetyl] aminometan)
- 0,05 M Natriumhydroksid (NaOH)
- Destillert vann

## Utstyr

- Metyleringsrør
- Rundkolber (25 mL)
- PD-10 kolonne, stativ og klemmer
- SMI-pipette og blå kapillærrør
- Knust is
- Whirlimixer
- Frysetørking

## Beregninger

100 mg/mL NaBD<sub>4</sub> i imidazole-HCl: 650 mg NaBD<sub>4</sub> ble veid og 6,5 mL imidazole-HCl ble tilsatt.

70 mg/mL NaBD<sub>4</sub> i 0,05 M NaOH: 455 mg NaBD<sub>4</sub> ble veid og 6,5 mL 0,05 M NaOH

500 mg/mL Carbodiimide i destillert vann: 1500 mg Carbodiimide ble veid og 3 mL destillert vann ble tilsatt. Løsningen av Carbodiimide i vann ble varmet på varmeplate for at få det tørre stoff oppløst.

## Prosedyre

- 1) 2 mg prøve ble veid inn i metyleringsrør og løst i 5 mL 500 mM iskald imidazole-HCl pH=8. Dette ble gjort med 6 prøver av gangen
- 2) Prøvene ble redusert ved å tilsette 300 µL + 300 µL + 400 µL (total 1 mL) nylaget 100 mg/mL NaBD<sub>4</sub> i imidazole-HCl. Prøvene ble mikset og satt på is i 5 minutter etter de to første tilsetningene og i 30 minutter etter den siste tilsetningen.
- 3) Overskudd reduktant ble ødelagt ved langsom tilsetning av 5 x 100 µL iseddik.
- 4) Prøvene ble applisert på PD-10 kolonne (metode 3.2.3.2). Dialyse i destillert vann kan også brukes (metode 3.2.4)
- 5) Eluatene fra PD-10 kolonnen ble frysetørket (metode 3.1.9) til neste dag.
- 6) Frysetørket prøve ble løst i 1 mL destillert vann, tilsatt 200 µL 0,2 M MES og 400 µL nylaget 500 mg/mL Carbodiimide i destillert vann.
- 7) Prøvene ble blandet godt i whirlimixer og innkubert i 3 timer ved 27 °C i varmeskap.

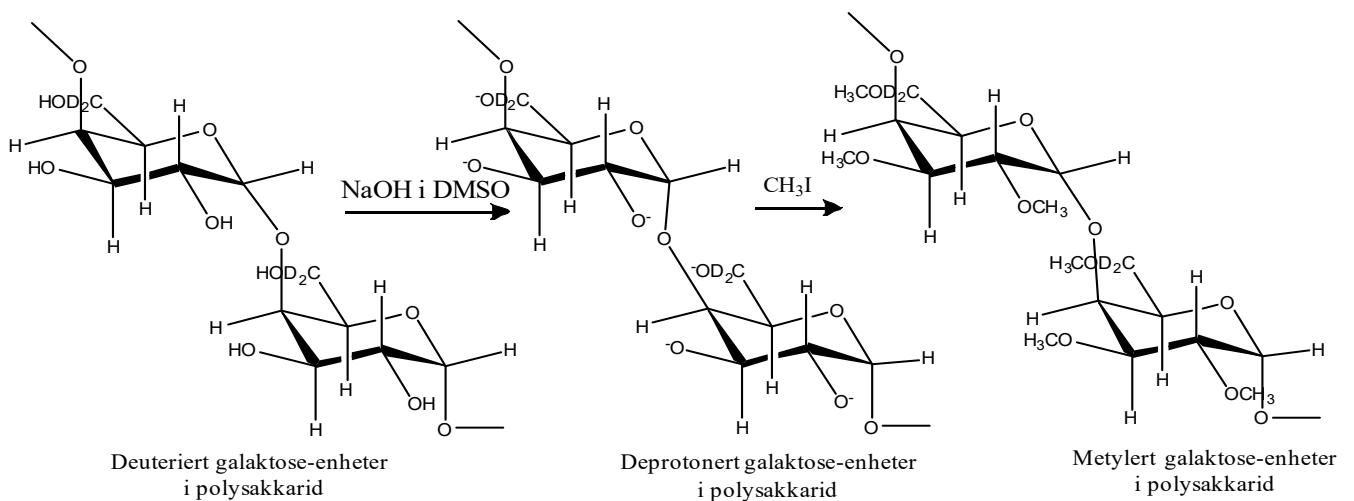


- 8) Prøvene ble tilsatt 1 mL 2 M TRIZMA og deretter avkjølt på is i 5-6 minutter.
- 9) Det ble tilsatt 1 mL nylaget 70 mg/mL NaBD<sub>4</sub> i 0,05 M NaOH-løsning og innkubert ved 4 °C i kjøleskap over natten.
- 10) For å ødelegge reaktant overskuddet ble det langsomt tilsatt 5 x 100 µL iseddik.
- 11) Prøvene ble applisert på PD-10 kolonne (metode 3.2.3.2)
- 12) Eluatene fra PD-10 kolonnen ble overført til metyleringsrør og frysetørket (metode 3.1.9) til neste dag.

### 3.4.1.2 Metylering

#### Prinsipp

Metylering er en metode (Ciucanu & Kerek, 1984), som inkluderer metylering av alle frie hydroksylgrupper (-OH) etterfulgt av syrehydrolyse. De frie hydroksylgrupper er de grupper som ikke er bundet til andre monosakkarider. De frie OH-grupper blir ionisert ved hjelp av NaOH i DMSO som ioniseringsagens (figur 20). Deretter blir de frie OH-grupper metylert ved hjelp av CH<sub>3</sub>I som metyleringsagens. Dette for å kunne skille mellom OH-gruppene som deltar i glykosidbindinger og de som ikke gjør.



**Figur 20:** Metylering av frie hydroksylgrupper ved hjelp av NaOH som ioniseringsagens og CH<sub>3</sub>I som metyleringsagens. Tegnet av Maryam Jehad Khalil Houji

#### Reagenser

- Dimetylsulfoksid (DMSO)
- Natriumhydroksid pellets (NaOH)

- Metyljodid ( $\text{CH}_3\text{I}$ )
- Natriumthiosulfat 5-hydrat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ )
- Diklormetan (DCM)
- Destillert vann

### Utstyr

- Ristemaskin
- Agatmorter og pistill
- Metyleringsrør
- SMI-pipette og blå kapillærrør
- $\text{N}_2$ -gassoppsett med varmeenhet
- Glasspipetter (lange)
- Multifuge

### Beregninger

120 mg/mL NaOH i DMSO: denne konsentrasjon utgjør 2 pellets NaOH per 1 mL DMSO. Pellets blir knust ved hjelp av agatmorter og pistill, DMSO tilsettes deretter og en suspensjon er laget.

100 mg/mL Na-thiosulfat i vann: 6,5 g tørrstoff Na-thiosulfat ble tilsatt i 65 mL destillert vann.

### Prosedyre

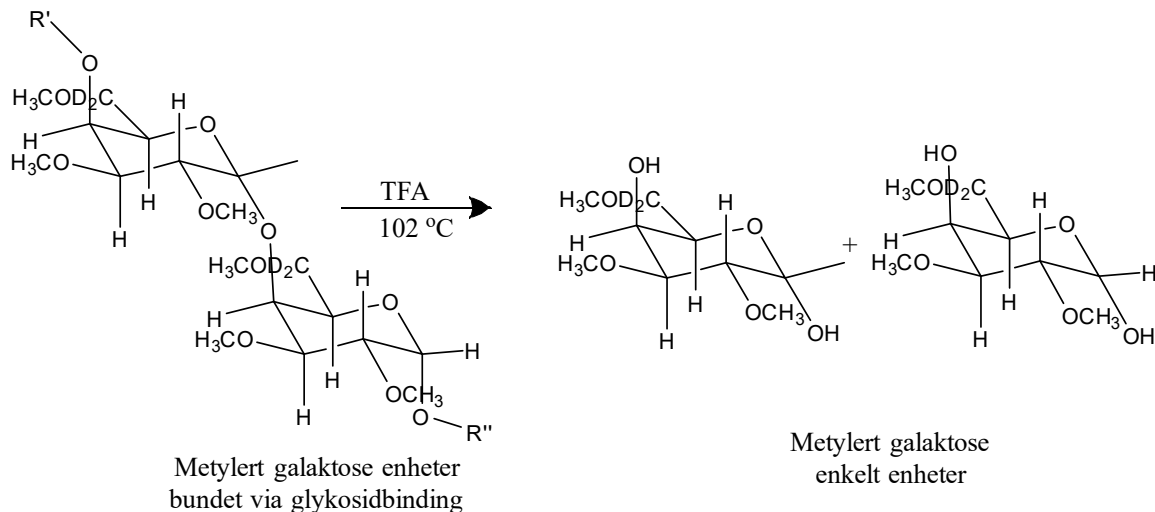
- 1) Frysetørket prøve fra karboksylsyre-reduksjonen ble tilsatt 500  $\mu\text{L}$  DMSO og satt på risting i 20 minutter (200 rpm), slik at glykanene ble løst.
- 2) 500  $\mu\text{L}$  120 mg/mL NaOH i DMSO ble overført med SMI-pipette (blå kapillærrør) direkte ned i glykanløsningen.
- 3) Prøvene ble blåst med nitrogen (metode 3.1.10) en stund og satt på ristemaskin i 40 minutter (200 rpm).
- 4) 100  $\mu\text{L}$   $\text{CH}_3\text{I}$  ble forsiktig tilsatt i prøvene under avtrekksskapet ( $\text{CH}_3\text{I}$  er kreftfremkallende) og videre rystet på maskin i 10 minutter (200 rpm). Dette ble gjentatt én gang.

- 5) 200  $\mu\text{L}$   $\text{CH}_3\text{I}$  ble forsiktig tilsatt og ristet på maskin i 20 minutter (rpm).
- 6) Prøvene ble tilsatt 10 ml nylaget 100 mg/ml Na-thiosulfat i vann og 3 ml diklormetan.
- 7) Prøvene ble mikset på whirlmixer i 40 sekunder og deretter sentrifugert i multifuge (1000 rcf ca. 8900 rpm) (metode 3.1.4) i 3 minutter for å separere fasene.
- 8) Vannfasen ble fjernet og kastet (den øverste fase) ved hjelp av glasspipette, da prøvene er uioniserte og befinner seg i diklormetan-fasen.
- 9) Diklormetan-fasen ble vasket 4 ganger med 5 ml destillert vann, mikset og sentrifugert. Mellom sjiktet og vannfasen ble fjernet med en glasspipette ved hver vasking.
- 10) Diklormetan-fasen ble tørket under  $\text{N}_2$ -gass (metode 3.1.10)

### 3.4.1.3 Hydrolyse

#### Prinsipp

Hydrolyse er en metode for å spalte glykosidbinding mellom de metylerte polysakkaridene og danne monosakkarider i surt miljø (figur 21). Til dette benyttes reagenset trifluoreddiksyre (TFA), på grunn av dets flyktige egenskaper, som lett fjernes i ettertid (Filomena et al., 2012).



**Figur 21:** Hydrolyse av metylert galaktose enheter med trifluoreddiksyre (TFA) under varme og sure betingelser.

#### Reagensliste

- 2,5M Trifluoreddiksyre (TFA)

## Utstyr

- Metyleringsrør
- Speed vaccum dryer
- SMI-pipette og blå kapillærrør
- Varmeskap
- N<sub>2</sub>-gassoppsett med varmeenhet

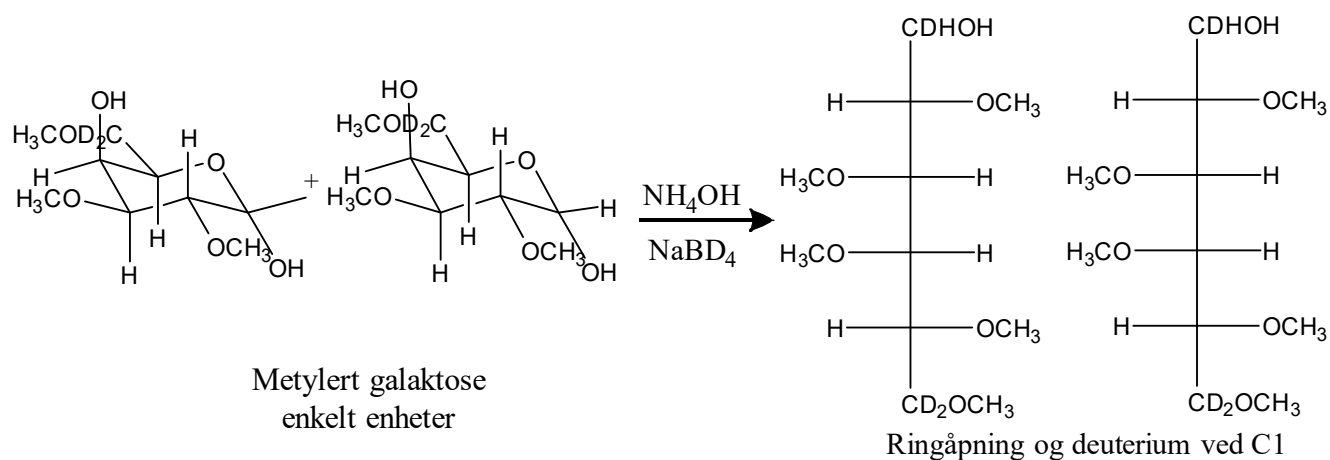
## Prosedyre

- 1) 500 µL 2,5 M TFA ble tilsatt metylert prøve og boblet gjennom nitrogen-gass (metode 3.1.10).
- 2) Prøvene ble hydrolysert i 2 timer ved 102 °C i varmeskap
- 3) Prøvene ble avkjølt og avdampet i 2 timer til tørrhet med speed vacuum dryer.

### 3.4.1.4 Reduksjon

#### Prinsipp

Ringstrukturen til monosakkaridene brytes ved at det sykliske hemiacetalet på C1 reduseres til alditol ved tilsetning av natriumbordeuterid (NaBD<sub>4</sub>) under basiske betingelser (figur 22). C1 blir merket med deuterium fra NaBD<sub>4</sub> og gjør det lettere å skille mellom hydroksylgruppene ved C1 og C6 ved GC-MS analyse. Informasjon om anomerisk konfigurasjon (α og β) går tapt ved ringåpning. Ringåpning gjør monosakkaridene mer flyktige (Cui, 2005a).



**Figur 22:** Ringåpning og reduksjon av hydroksylgrupper ved C1 til deuterium molekyl.

## Reagens

- 2M Ammoniumhydroksid (NH<sub>4</sub>OH)
- Iseddik
- Natriumbordeuterid (NaBD<sub>4</sub>)
- 5 % eddiksyre i metanol
- Methanol

## Utstyr

- Ultralydbad
- Glasspipetter med gummiballong
- Transferpettor med tilhørende spiss
- Frysetørker: Speed Vacuum Dryer
- Varmeskap (Thermo Scientific)

## Beregninger

1 M NaBD<sub>4</sub> i 2 M NH<sub>4</sub>OH:

$$m(\text{NaBD}_4) = c \cdot V \cdot M_W = 1 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot \frac{3,5 \text{ mL}}{1000} \cdot 41,86 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,14651 \text{ g}$$

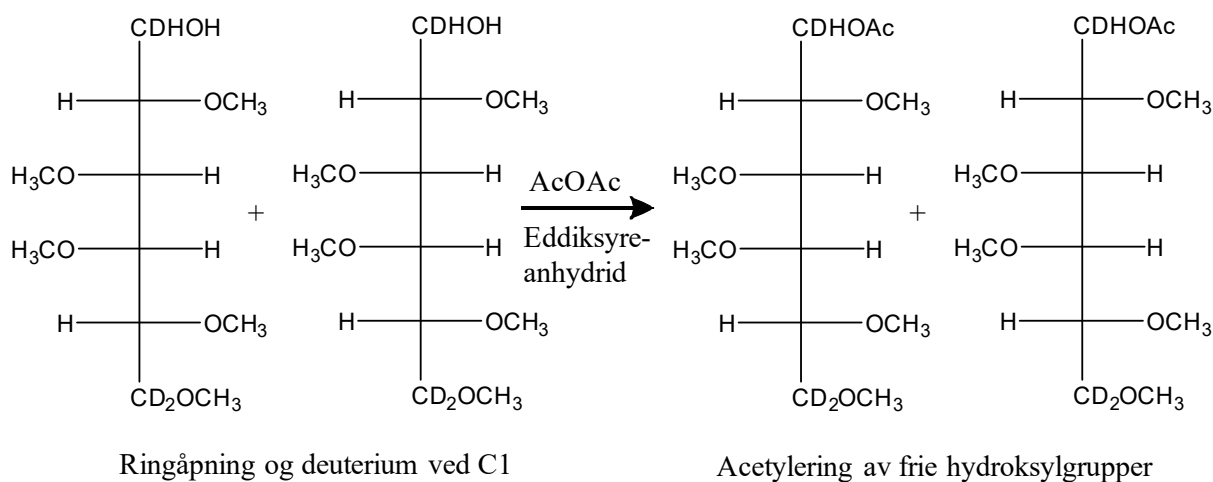
## Prosedyre

- 1) De tørre prøvene fra hydrolysen ble løst i 500 µL 2M NH<sub>4</sub>OH
- 2) 500 µL nylaget 1M NaBD<sub>4</sub> i 2M NH<sub>4</sub>OH
- 3) Prøvene ble sonikert med vortex ett minutt og inkubert i 60 minutter ved 60 °C i varmeskap. Etter 10 og 60 minutter ble overtrykk sluppet ut av rørene.
- 4) Overskudd av reduktant ble ødelagt forsiktig med 3 x 50 µL iseddik.
- 5) Prøvene ble tørket godt med vaccum speed dryer i ca. 3 timer
- 6) 2,5 mL 5 % eddiksyre i metanol ble tilsatt og tørket litt med vaccum speed dryer i ca 20 minutter. Dette ble gjentatt én gang.
- 7) 2,5 mL metanol ble tilsatt og tørket på vaccum speed dryer. Dette ble gjentatt én gang.

### 3.4.1.5 Acetylering

#### Prinsipp

Ved acetylering blir de frie hydroksylgrupper som ble dannet etter hydrolyse og reduksjon acetylet med eddiksyreanhydrid (AcOAc) (figur 23). C-atomene som har vært bundet ved glykosidbinding får en acetyl-gruppe (Ac) og dermed blir mulig å observere hvor der har vært binding. Acetyl-gruppene øker flyktigheten og lipofilisiteten til enhetene og forbereder dem til gaskromatografisk analyse med massespektrofotometri som detektor (Cui, 2005a).



**Figur 23:** Acetylering med eddiksyreanhydrid. Tegnet av Maryam Jehad Khalil Houji

#### Reagenser

- 1-metylimidazol
- Eddiksyreanhydrid
- Diklormetan
- Destillert vann

#### Utstyr

- Supelcorør med kork
- Metyleringsrør
- Glassrør

## Prosedyre

- 1) Prøvene fra reduksjonen ble tilsatt 200 µL 1-metylimidazol og 2 mL eddiksyre-anhydrid.
- 2) Prøvene ble ristet godt på whirlimixer og satt til henstand i 10 minutter.
- 3) 5 mL destillert vann ble tilsatt i de små rør, ristet og overført til metyleringsrør. Ytterligere 5 mL destillert vann ble tilsatt til metyleringsrørene, slik at der i alt ble tilsatt 10 mL destillert vann.
- 4) Prøvene ble ekstrahert med 2 ganger 2 mL diklormetan, mikset i 30 sekunder og sentrifugert i multifuge i 3 minutter ved 1000 rcf (metode 3.1.4). Den nederste fase (organisk fase) ble samlet i et nytt metyleringsrør.
- 5) Organisk fase ble tilbakevasket med 2 gange 5 mL destillert vann. Den øverste fase (vannfasen) og mellomsjiktet ble fjernet før en ny pasteurpipette ble brukt til å overføre den nederste fasen (organisk fase) til et supelcorør.
- 6) Prøvene ble dampet til tørrhet under nitrogen-gass (metode 3.1.10).

### 3.4.2 Gasskromatografi-Massespektrometri (GC-MS)

#### Prinsipp

Gasskromatografi (GC) med hjelp av massepektrometer (MS) benyttes for å finne strukturinformasjon om karbohydratene. I massespektrometret blir monosakkaridene ionisert og fragmentert. Massen til de ioniserte molekylene og fragmenter blir separert etter deres masse/ladningsforhold ( $m/z$ ) og deretter detektert. Detektoren registrerer mengden av ioner som dannes og hvilke masser disse ionene har (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 2010). Monosakkaridbindingstypene kan identifiseres og karakteriseres ved å undersøke deres tilhørende massespektre som er lagret i dataprogrammet.

#### Utstyr

- Programvare: Shimadzu GC-MS solution software
- GC-MS apparat og detektor: Shimadzu GC-MS-QP2010 og MD-800
- Kolonne: Restek-Rtx-5 (silica), (l=30 m, 0,25 mmID), 0,25 µm filmtykkelse.
- Injektor: Splitt: splittless (ratio 1:10)

## Analysevilkår

- Bæregass: Helium
- Flowhastighet: 1 mL/min
- Injektortemperatur: 250 °C
- Temperaturprogram:           20 °C/min           0,5 °C/min           30 °C/min  
                                  80 °C →       170 °C →       200 °C →       260 °C

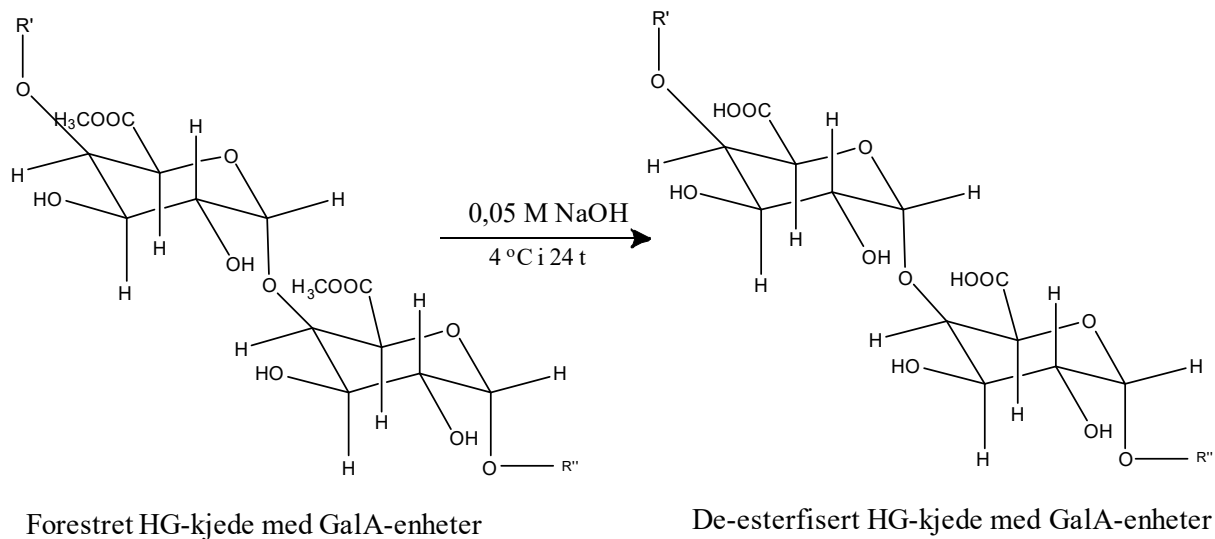
GC-MS analysen ble utført av overingeniør Hoai Thi Nuyen, ved avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

### 3.4.3 Enzymatisk degradering

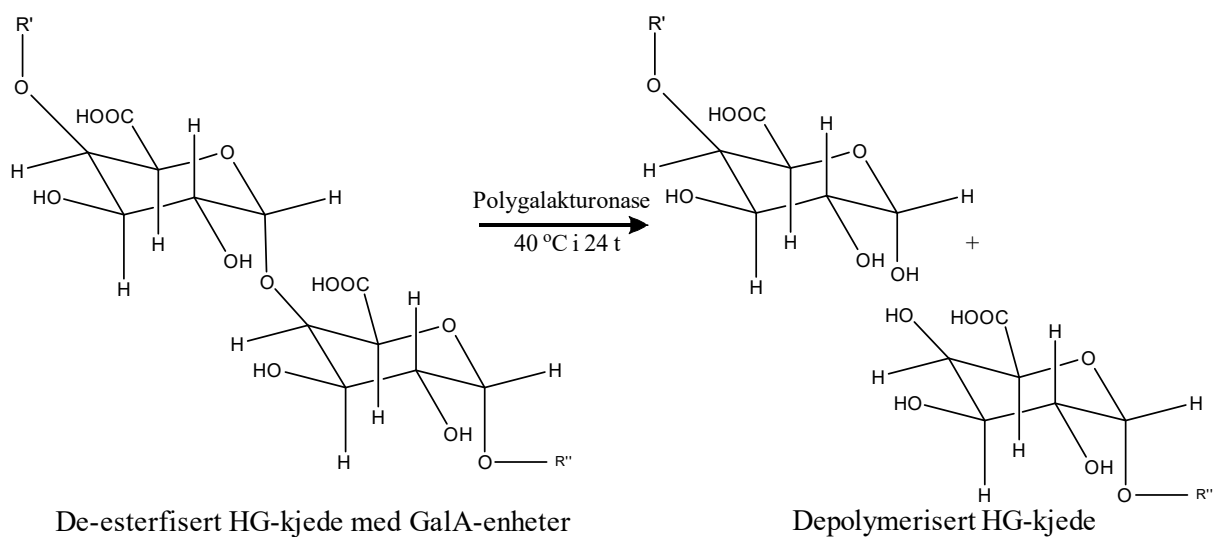
#### Prinsipp

Enzymatisk degradering er en metode, som brukes til å degradere polysakkarider. Enzymer benyttes avhengig av hvilke deler av polysakkaridet man ønsker at undersøke. Rhamnogalakturonan- I (RG-I) med dens forgreninger har vist biologisk aktivitet i tidligere studier (Smestad & Barsett, 2005) og dette ønskes studert på pektin i tomat. Til dette formål endo-polygalakturonase (endo-PG). Endo-PG hydrolyserer  $\alpha$ -1,4-glykosidbindinger mellom to ikke-metylesterfisererte 1,4-GalpA-enheter og vil dermed depolymerisere HG-regionen av pektinet og frigjøre mono-, di og oligo-GalpA (Christiaens et al., 2016; Voragen, Daas, & Schols, 2000). For at endo-PG utelukkende skal bryte ned bindingene mellom galakturonsyre-enhetene må estergruppene som finnes på GalA først de-esterfiseres med NaOH (figur 24) og deretter depolymeriseres med endo-PG (figur 25). Etter degraderingen vil RG-I bli isolert, idet enzymet ikke vil være i stand til å bryte bindingen mellom rhamnose (Rha) og galakturonsyre (GalA) i RG-I.





**Figur 24:** Esterhydrolyse av GalA med NaOH. Tegnet av Maryam Houji



**Figur 25:** Depolymerisering med endo-polygalakturonase for isolering av RG. Tegnet av Maryam Houji

### Reagenser

- 0,05 M NaOH
- 0,05 M acetatbuffer (pH-justert)
- Iseddik
- Pektinase (endopolygalakturonase) fra *Aspergillus aculeatus*, EC number: 3.2.1.15

## Utstyr

- Drammeglass
- pH-meter, stativ med klemmer
- Varmeskap med risting
- Vannbad
- Mikropipetter

## Prosedyre

- 1) 50 mg prøvemateriale ble veid i metyleringsrør og løst i 5 mL 0,05 M NaOH.
- 2) Prøveløsningen ble satt til risting i kjølerommet i 24 timer.
- 3) Et par dråper iseddik ble tilsatt for å justere pH
- 4) 5 mL 0,05 M acetatbuffer ble tilsatt i hvert rør
- 5) 4 uL pektinase ble tilsatt i hvert rør og inkubert ved 40 °C under risting i 24 timer.
- 6) Prøvene ble varmet opp til 100 °C over vannbad for å denaturere enzymet og stoppe enzymaktiviteten.
- 7) Prøveløsningen ble filtrert først på 5 µm filter, deretter på 0,45 µm.
- 8) Prøveløsningen ble applisert på PD-10-kolonne (se metode 3.2.3.2)
- 9) Eluatet fra PD-10-kolonne ble testet for monosakkaridinnhold ved hjelp av fenolsvovelsyretesten (se metode 3.3.1).
- 10) De oppsamlede fraksjoner fra fenolsvovelsyretesten ble frysetørket for undersøkelse av biologisk aktivitet ved hjelp av komplementfikseringstesten (metode 3.5.1) og identifisering av AG-II sidekjeden på RG-I ved felling med Yariv-reagens (metode 3.4.4).

### 3.4.4 Felling med Yariv reagens – identifisering av AG-II

#### Prinsipp

Rhamnogalakturonan-I-region (RG-I) med sidekjeden arabinogalaktan-II (AG-II) er viktige strukturelle elementer av pektinet som har vist modulering av komplementsystemet i tidligere forskning. Identifisering av AG-II er av denne grunn viktig for å kartlegge biologisk aktivitet i forhold til struktur. Dette er en kvalitativ og kvantitativ metode (van Holst & Clarke, 1985) for å bestemme tilstedeværelse av AG-II. AG-II vil felle ut det såkalte «Yariv-reagens» og danne et rødt bunnfall. Yariv-reagenset (figur 26) reagerer med AG-II-proteiner på en gelbondfilm, hvilket ikke er tilstede hos AG-I. En positiv reaksjon og identifisering av AG-II vises ved røde

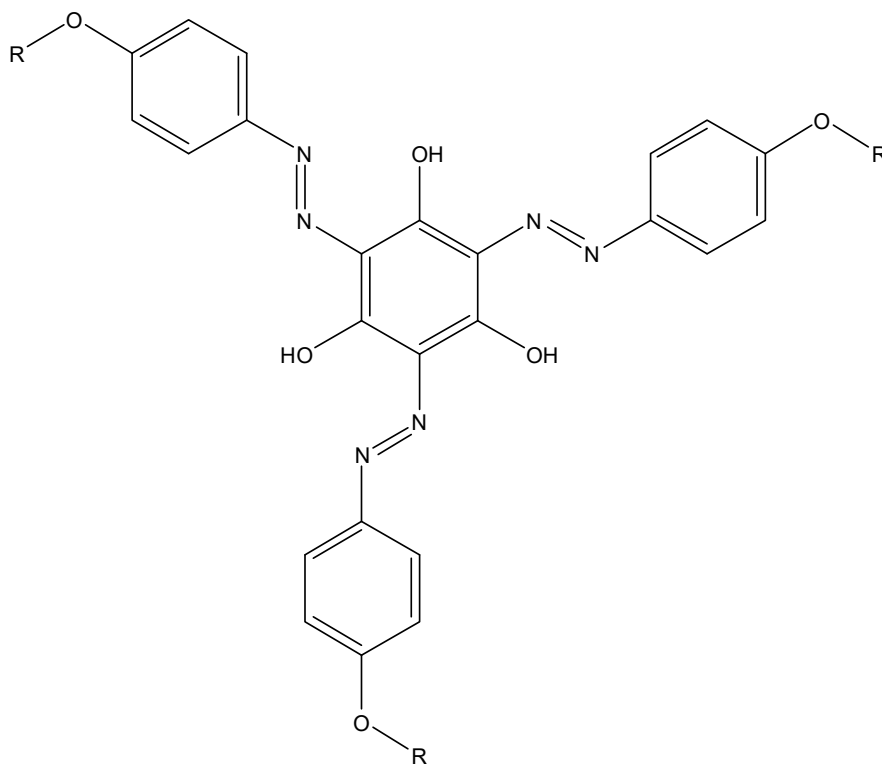
ringer rundt brønnene (figur 26) og intensiteten av rødfargen beskriver mengden på AG-II-proteiner.

### Reagenser

- Yariv reagens, 2 mg/mL
- Standard: Arabisk gummi (Gum arabic), 1 mg/mL
- Destillert vann

Gel: Til en plate med 1 mm geltykkelse (ca. 5 x 7 cm platestørrelse) trengs:

- 35 mg agarose
- 30 mg NaCl,
- 0,7 mg NaN<sub>3</sub>,
- 3,5 mL destillert vann



**Figur 26:** «Yariv reagenset». Tegnet av Maryam Houji

### Utstyr

- Justerbar plate
- Vater

- Gelbondfilm: Gelbond ® film for agarosegel, GE Healthcare
- Små begerglass
- Glassplater
- Whatmanpapir
- Kokeplate
- Cellepapir
- Kar med lokk
- Utstyr for laging av brønner, koblet til vannsug

### Prosedyre

- 1) 0,5 mg prøvemateriale, løses i 62,5  $\mu\text{L}$  destillert vann, slik at man får en konsentrasjon på 8 mg/mL
- 2) Gelbondfilm ble klippet i størrelsen 5 x 7 cm og lagt i vater på den justerbare platen med den hydrofile siden opp.
- 3) Ingrediensene til gelen ble veid i et lite begerglass, som varmes opp til kokepunktet. Foliepapir ble dekket over for å unngå fordamping.
- 4) Umiddelbart etter koking av gelen ble 50  $\mu\text{L}$  Yariv reagens tilsatt. Løsningen ble helt utover hele gelbondplaten.
- 5) Når gelen hadde stivnet, ble der laget små brønner ved hjelp av vannsug. 3 brønner for standarden og prøvene (figur 27).
- 6) Forholdsvis 2, 4, og 6  $\mu\text{L}$  ble applisert i hver sin brønn.
- 7) Et fuktet papir ble lagt i bunnen av et kar og gelplaten ble lagt ned i karet med lokk på. Dette stod i ca. 24 timer ved romtemperatur.
- 8) Etter 24 timer ble platen presset med en glassplate over vått whatman-papir og ti lag med cellepapir. Deretter ble en glassplate lagt over cellepapiret og en tung gjenstand over i 10 minutter.
- 9) Laget med cellepapir ble vendt og presses i nye ti minutter.
- 10) Der det har blitt utfelling kan man se en tydelig rød ring. Platen skannes eller kopieres med farger.

	2 $\mu$ L	4 $\mu$ L	6 $\mu$ L
<b>Standard</b>	•	•	•
<b>PVU<sub>før</sub></b>	•	•	•
<b>PVS<sub>før</sub></b>	•	•	•
<b>PVK<sub>før</sub></b>	•	•	•
<b>PVM<sub>før</sub></b>	•	•	•

	2 $\mu$ L	4 $\mu$ L	6 $\mu$ L
<b>Standard</b>	•	•	•
<b>PVU<sub>etter</sub></b>	•	•	•
<b>PVS<sub>etter</sub></b>	•	•	•
<b>PVK<sub>etter</sub></b>	•	•	•
<b>PVM<sub>etter</sub></b>	•	•	•

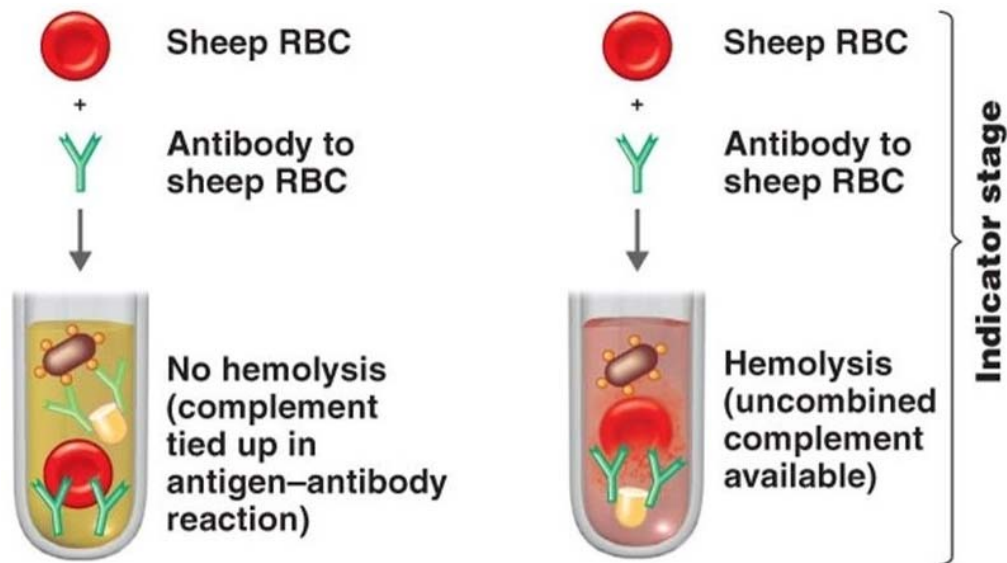
**Figur 27:** Mal for gelplatene før og etter enzymdegradering. Laget av Maryam Jehad Khalil Houji.

## 3.5 Biologisk aktivitet

### 3.5.1 Komplementfikseringstest

#### Prinsipp

Komplementfikseringstesten beskriver hvor stor effekt prøven har på komplementsystemet. Erytrocytter fra sau blir sensibilisert med antistoffer fra kanin (figur 28). Komplementet kan da binde seg på overflaten, og deretter hemolysere erytrocyttene. Prøvematerialet reagerer med komplement før erytrocyttene blir tilsatt. Dersom prøvematerialet enten hemmer eller aktiverer komplement vil hemolysen av blodcellene reduseres. Testen skiller ikke mellom komplementaktivering eller inhibering, fordi begge vil resultere i redusert hemolyse (Michaelsen, Gilje, Samuelsen, Høgåsen, & Paulsen, 2000). Absorbans brukes for måling av supernatantfargens intensitet, som forteller i hvilket grad prøvematerialet har hemmet hemolysen av erytrocyttene. En svak rødfarge gir lavere absorbans som betyr at prøvematerialet har hemmet hemolysen og gir bedre komplementfikserende aktivitet.



**Figur 28:** Illustrasjon av komplementfikseringstesten (Bioscience notes, 2018).

### Reagenser

- Fosfatbuffer (PBS) pH=7,2
- Veronal/BSA-buffer pH = 7,3
- Antistoff: Virion 9021 Amboceptor
- Saueblod (sau 10010): tappet 15.01.19 og 08.03.19 i Bygdø kongsgård
- Humant komplement ECG (Folkehelseinstituttet)
- Destillert vann
- Positiv kontroll: *Biophytum petersianum* (BP-II) 500 µg/mL

### Utstyr

- Rundbunnet og flatbunnet mikrotiterplate med 96 brønner
- Varmeskap med ristepate: 211DS shaking incubator (Labnet International Inc.)
- Whirlimixer: Heidolph REAX top
- Centrifuge 5810 (Eppendorf)
- Mikroplate-absorbansmåler: iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad)
- Eppendorfrør
- Pipetter (10 µL – 5 mL)
- Multipipette

- Plastpipette, 3 mL
- Reagensrør, 10 mL
- Dekkende teip til mikrotiterplater
- Parafilm

## Beregninger

Fremstilling av 2 L veronal/BSA-buffer (pH= 7,3)

- 1 flaske pulver med KBR-buffer (CFT)
- 2000 mL destillert vann
- 13,36 mL Bovint serum albumin (BSA)-antigen
- 4 mL 10% Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )

$$\text{Lyseringsgrad} = \frac{\text{Absorbans}_{\text{veronal buffer}}}{\text{Absorbans}_{\text{vann}}} \cdot 100 \%$$

$$\text{Komplementfikserende effekt} = \frac{\text{Absorbans}_{\text{veronal buffer}} - \text{Absorbans}_{\text{prøve}}}{\text{Absorbans}_{\text{veronal buffer}}} \cdot 100 \%$$

## Prosedyre

### A. Fortynning av prøvemateriale

- 1) Frysetørket prøvemateriale tilsvarende 1,5 mg ble løst i 3,0 mL veronal/BSA-buffer til stamløsning med konsentrasjonen 500  $\mu\text{g/mL}$ .
- 2) Der ble laget en 2-foldsfortynning av hver prøve. Tabell 1 viser oppsett av 2-foldfortynning.

**Tabell 1:** 2-foldsfortynning av prøvemateriale

Rør nr	Konsentrasjon ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fortynning
1	500	Stamløsning
2	250	500 uL fra rør nr 1 + 500 $\mu\text{L}$ veronal/BSA-buffer
3	125	500 uL fra rør nr 2 + 500 $\mu\text{L}$ veronal/BSA-buffer
4	62,5	500 uL fra rør nr 3 + 500 $\mu\text{L}$ veronal/BSA-buffer
5	31,3	500 uL fra rør nr 4 + 500 $\mu\text{L}$ veronal/BSA-buffer
6	15,6	500 uL fra rør nr 5 + 500 $\mu\text{L}$ veronal/BSA-buffer
7	7,8	500 uL fra rør nr 6 + 500 $\mu\text{L}$ veronal/BSA-buffer

## B. Vasking av saueblodceller før sensibilisering

- 1) En mengde saueblod tilsvarende 200  $\mu\text{L}$  (i overskudd til én mikrotiterplate) ble overført til et rent reagensglass uten å slemme opp blodet.
- 2) Blodcellene ble vasket to ganger med fosfatbuffer og en gang med veronal/BSA-buffer. Reagensglasset ble fylt ca. 2/3 med vaskeløsning og sentrifugert i 5 minutter ved 3000 rpm mellom hver vask (metode 3.1.4).
- 3) Vaskeløsningen ble fjernet med plastpipetter mellom hver vask.

## C. Sensibilisering av saueblodceller

- 1) For hver plate ble 15  $\mu\text{L}$  Virion 9020 Amboceptor, 60  $\mu\text{L}$  pakkede blodceller og 5,925 mL veronal/BSA-buffer inkubert i risteskap i 30 minutter ved 37 °C.
- 2) Løsningen ble vasket to ganger med fosfatbuffer og en gang med veronal/BSA-buffer. Mellom hver vask ble blandingen sentrifugert i 5 minutter på 3000 rpm. Vaskevannet ble pipettert av med plastpipette mellom hver vask.
- 3) Blodet ble fortynnet med 5,940 mL veronal/BSA-buffer for å lage en 1 % suspensjon av blodceller.

## D. Titeringskurve for komplementkilden

- 1) Til en mikrotiterplate med runde brønner ble det tilsatt:
  - 100  $\mu\text{L}$  destillert vann til 8 av brønnene (100% lysekontroll)
  - 50  $\mu\text{L}$  veronal/BSA-buffer til 4 x 7 av brønnene, totalt 28 brønner.
  - 100  $\mu\text{L}$  buffer ble tilsatt 4 blankbrønner
- 2) Fortynningsrekke av komplement med veronal/BSA-buffer ble laget (tabell 2)
  - 50  $\mu\text{L}$  fortynning av komplement ble tilsatt (4 paralleller av hver fortynning) unntatt blankbrønner og 100% lysekontroll.
- 3) Mikrotiterplatene ble dekket med plastfilm for å hindre fordamping, og satt til inkubering i risteskapet i 30 minutter ved 37 °C.
- 4) Etter inkubasjon ble det tilsatt alle brønner:
  - 50  $\mu\text{L}$  sensibiliserte saueblodceller (1% suspensjon) og inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C.
- 5) Platen ble sentrifugert ved 3000 rpm i 2 minutter og 100  $\mu\text{L}$  av supernatanten ble overført til en flatbunnet mikrotiterplate. Luftbobler ble fjernet under sentrifugeringen.
- 6) Absorbansen ble målt ved 415 nm og det ble korrelert til grad av hemolyse.



**Tabell 2:** Fortynningsoppsett for å lage titeringskurve av komplementkilden

Komplement/buffer	Komplement ( $\mu\text{L}$ )	Veronal/BSA-buffer ( $\mu\text{L}$ )
1/40	10	390
1/50	10	490
1/60	10	590
1/70	10	690
1/80	10	790
1/90	10	890
1/100	10	990

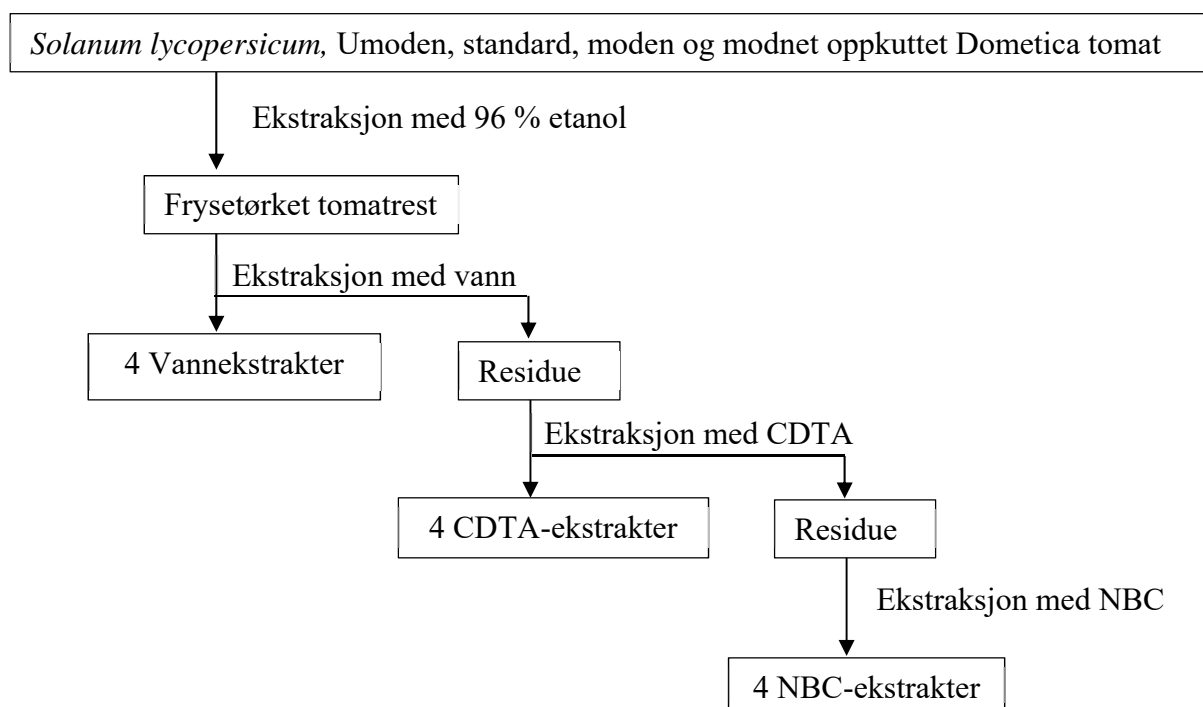
E. Utføring av testen på prøvematerialet

- 1) I en runnbundet mikrotiterplate ble der tilsatt:
  - 50  $\mu\text{L}$  av prøven, 2 paralleller av hver fortynning
  - 100  $\mu\text{L}$  destillert vann til 4 brønner (100% lysekontroll)
  - 50  $\mu\text{L}$  veronal/BSA-buffer til andre 4 brønner (50 % lysekontroll).
- 2) Fryst komplement ble tatt opp rett før bruk og en fortynning som tilsvarer ca. 50 % hemning av hemolyse ut fra titeringskurven ble laget.
  - 50  $\mu\text{L}$  av komplementfortynningen som ga 50% hemolyse av blodcellene ble tilsatt alle brønner unntatt brønnene med 100% lysekontroll.
- 3) Platen ble dekket med teip for å forhindre fordamping og inkubert ved 37 °C under risting i 30 min.
  - 50  $\mu\text{L}$  1% sensibiliserte erythrocytter ble tilsatt til alle brønner og inkubert ved 37 °C under risting i 30 min.
- 4) Platen ble sentrifugert ved 3000 rpm i 5 min og 100  $\mu\text{L}$  av supernatanten ble overført til en flatbunnet mikrotiterplate.
- 5) Platen ble dekket med teip og sentrifugert ved 3000 rpm i 2 min. Luftbobler ble fjernet under sentrifugeringen.
- 6) Absorbansen ble målt ved 415 nm og det ble korrelert til grad av hemolyse.

## 4 Resultater og diskusjon

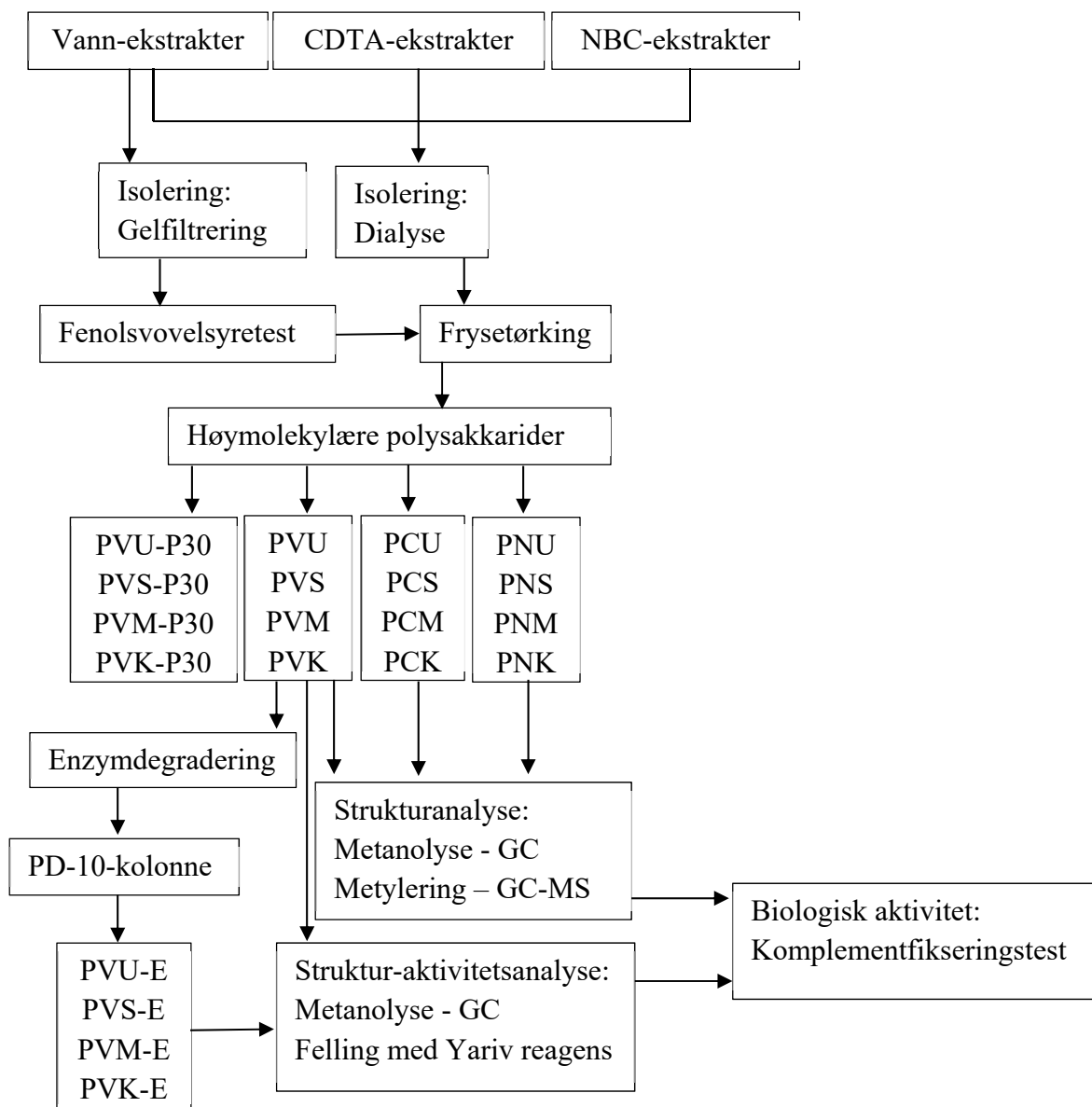
### 4.1 Isolering og opprensning av høymolekylære forbindelser

Tomatene benyttet i denne oppgave er dyrket i veksthus på NiBiO Sørheim, Klepp. Rune Slimestad fra PlantChem AS, Sol næringsssenter, er ekstern veileder og oppgaven er en videreføring av tidligere masteroppgave (Holm, 2018) samt linket mot et forskningsprosjekt om Bio-økonomisk veksthusproduksjon i Norge (BioFresh).



**Figur 29:** Ekstraksjon og isolering av råekstrakter fra *Solanum Lycopersicum* fruktkjøtt.

Umoden tomat, standard tomat, moden tomat og modnet oppkuttet tomat (definert ved avsnitt 3.2.1) ble ekstrahert med 96 % etanol for å fjerne upolare substanser (figur 29). Residuet ble brukt til å ekstrahere de løst assosierte pektiner med kokende vann (vannekstrakter). Videre ble residuet fra vannekstraksjonen brukt til å ekstrahere de kryssbundede pektiner med CDTA (CDTA-ekstrakter). Residuet fra CDTA-ekstraksjonen ble brukt til å ekstrahere de sterkt kovalent bundne pektiner med NBC-løsning (NBC-ekstrakter). Totalt 12 råekstrakter ble isolert for videre opprensning av høymolekylære polysakkarider ved dialyse (figur 30).



**Figur 30:** Oversikt over utført arbeid.

PVU, PVS, PVM, PVK: vannfraksjoner av umoden, standard, moden og modnet oppkuttet tomat etter dialyse. PCU, PCS, PCM, PCK: CDTA-fraksjoner etter dialyse. PNU, PNS, PNM, PNK: NBC-fraksjoner etter dialyse. PVU-P30, PVS-P30, PVM-P30, PVK-P30: vannfraksjoner isolert ved Bio-Gel P-30. PVU-E, PVS-E, PVM-E, PVK-E: enzymdegraderte vannfraksjoner (fraksjon I) isolert ved PD-10-kolonne.

Vannekstraktene ble i tillegg videre rensset på Bio-Gel P-30 (gelfiltreringskolonne) for separasjon av høy og lavmolekylære polysakkarider (figur 30). Elueringsprofilen ble bestemt ved fenolsvovlsyretesten og de isolerte fraksjonene ble frysetørket. Fraksjonene fra Bio-Gel P-30 hadde for lavt utbytte til å kunne analysere disse videre. De høymolekylære forbindelser isolert etter dialyse ble videre analysert for monosakkaridsammensetning og bindingstype ved metanalyse og metylering. Vannfraksjonene fra dialysen ble enzymdegradert med polygalakturonase. Enzymdegraderte vannfraksjoner ble opprenst på PD-10-kolonne og fraksjon I ble undersøkt for monosakkarid-sammensetning. Innhold av arabinogalaktan-II ble undersøkt for vannfraksjonene før og etter enzymdegradering. Alle 16 fraksjoner ble testet for komplementfikserende aktivitet (figur 30).

#### 4.1.1 Ekstraksjonsutbytte

Skinn og frø ble fjernet av en mengde tomater tilsvarende 1,5 kg og disse ble kutte i mindre deler. Resterende tomatkjøtt ble ekstrahert med 96% etanol for å fjerne upolare substanser og frysetørket. Vekt av tomater, tomatkjøtt, frysetørket tomatkjøtt og utbytte er listet i tabell 3.

*Beregningseksempel på utbytte:*

$$\% - \text{vis utbytte umoden tomat fra tomatkjøtt} = \frac{17\text{g}}{859\text{g}} \cdot 100 \% = 2,0 \%$$

**Tabell 3:** Oversikt over frysetørket 96 % etanolekstrahert utbytte av tomat

Dometica Tomat	Totalvekt tomat (g) <sup>a</sup>	Totalvekt tomatkjøtt (g) <sup>b</sup>	Vekt etter frysetørring (g)	Utbytte (%) <sup>c</sup>
Umoden	1524	859	17	2,0
Standard	1580	906	15	1,7
Moden	1507	766	13	1,7
Oppkuttet	1589	801	15	1,9

<sup>a</sup>Totalvekt av tomater med frø og skinn

<sup>b</sup>Totalvekt av tomatkjøtt uten frø og skinn

<sup>c</sup>Utbytte av frysetørket tomatkjøtt i forhold til totalvekt tomatkjøtt uten frø og skinn, se beregningseksempel ovenfor.

Det lave utbyttet for de fire modningsgrader av tomat (tabell 3) tyder på at vanninnholdet er stort, siden frysetørring fjerner vann ved sublimasjon. Dette bekreftes av en tidligere studie (Koh et al., 2012), hvor vanninnholdet ble bestemt til ~94% i fersk tomat. Umoden tomat har et høyere utbytte og dermed lavere vanninnhold enn standard, moden og oppkuttet tomat. En mulig årsak kan være naturlig degradering av pektin under modning og dermed redusert evne til å kunne holde på vann.

Vannekstrakter, CDTA-ekstrakter og NBC-ekstrakter ble frysetørket rett etter ekstraksjon (figur 29) (5 mL ekstrakt tilsvarende 0,4 g frysetørket tomatkjøtt) (metode 3.1.9). Disse ekstrakter inneholder både høymolekylære og lavmolekylære substanser (tabell 4).

*Beregningseksempel på utbytte:*

$$\text{mengde frysetørket ekstrakt fra tomatkjøtt} = 0,064 \text{ g} \cdot \left(\frac{17\text{g}}{0,4\text{g}}\right) = 2,72 \text{ g}$$

$$\% \text{ – vis utbytte av tomatkjøtt} = \frac{2,72\text{g}}{859\text{g}} \cdot 100\% = 0,32\%$$

**Tabell 4:** Oversikt over frysetørket vannekstrahert utbytte fra tomatkjøtt

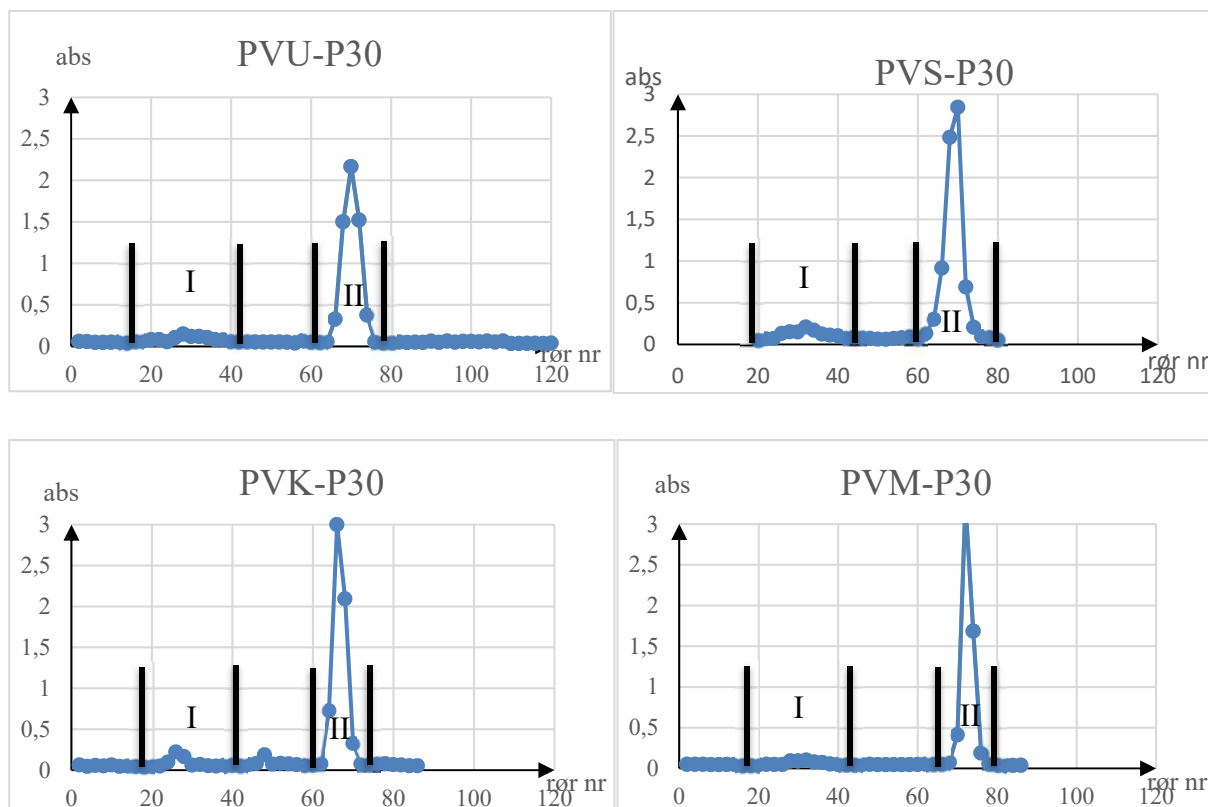
Fraksjon		Gram (g) frysetørket ekstrakt pr 0,4 g tomatkjøtt	Utbytte <sup>d</sup> (%)
Vannfraksjoner	Umoden tomat	0,064	0,32
	Standard tomat	0,108	0,45
	Moden tomat	0,113	0,48
	Oppkuttet tomat	0,157	0,74

<sup>d</sup>Utbytte frysetørket vannekstrakt i forhold til totalvekt tomatkjøtt uten frø og skinn, se beregningseksempel ovenfor.

Det var ikke mulig å frysetørke CDTA- og NBC-fraksjonene. Grunnen til dette kan være et høyt innhold av salter fra CDTA og NBC-løsningen. Umoden tomat viser et lavere innhold av vannløselige komponenter (tabell 4) sammenlignet med oppkuttet tomat. Det ser ut til at innholdet av vannløselige komponenter øker under modning av tomat.

#### 4.1.2 Gelfiltrering

Vannekstrakter ble applisert på gelfiltreringskolonne med Bio-Gel P-30 som pakkemateriale (fraksjoneringsområde: 2.5-40 kDa). Dette resulterte i to fraksjoner, fraksjon (I) og (II). Ifølge gelfiltreringsprinsippet vil høymolekylære polysakkarider (fraksjon I) elueres ut først og til sist lavmolekylære polysakkarider (fraksjon II) (metode 3.2.3.1). Karbohydratprofilene (figur 31) etter eluering ble bestemt ved fenol-svovelsyretesten (metode 3.3.1). Fraksjonene ble frysetørket og utbytte ble beregnet (tabell 5).



**Figur 31:** Karbohydratprofil til høy- (fraksjon I) og lavmolekylære (fraksjon II) polysakkarider i umoden, standard, moden og oppkuttet tomat etter eluering fra Bio-Gel P-30.

*Beregningseksempel utbytte:*

$$\text{Teoretisk mengde av 10 mL umoden tomatkjøtt} = 8 \text{ g} \cdot \left( \frac{10 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} \right) = 0,8 \text{ g}$$

$$\text{mengde fraksjon (I) fra 17 g umoden tomat} = 17 \text{ g} \cdot \frac{0,004 \text{ g}}{0,8 \text{ g}} = 0,085 \text{ g}$$

$$\% \text{ - vis utbytte av tomatkjøtt} = \frac{0,085 \text{ g}}{859 \text{ g}} \cdot 100\% = 0,01\%$$

**Tabell 5:** Oversikt over utbytte av høymolekylære-(I) og lavmolekylære(II) fraksjoner etter ekstraksjon med vann fra tomat etterfulgt av opprensning ved Bio-Gel P-30.

Fraksjon	Mengde før frysetørrking (mL)	Mengde etter frysetørrking fraksjon I (mg)	Utbytte fraksjon I (%) <sup>e</sup>	Mengde etter frysetørrking fraksjon II (mg)	Utbytte fraksjon II (%) <sup>e</sup>
PVU-P30	10	4,0	0,01	37,7	0,09
PVS-P30	10	12,0	0,03	46,4	0,10
PVM-P30	10	6,0	0,01	65,4	0,13
PVK-P30	10	7,0	0,02	104,7	0,25

<sup>e</sup>utbytte frysetørket fraksjon i forhold til totalvekt tomatkjøtt uten frø og skinn, se beregningseksempel over for

PVK-P30 har høyest utbytte av lavmolekylære polysakkarider (II) (tabell 5). Dette kan tyde på degradering av høymolekylære polysakkarider til lavmolekylære ved oppkutting av tomat.

### 4.1.3 Dialyse

Vannekstrakter, CDTA-ekstrakter og NBC-ekstrakter (figur 30) ble dialysert med dialyseslanger som har porestørrelse MWCO 3,5 kDa. Pektintype polysakkarider er høymolekylære stoffer med gjennomsnittlig molekylvekt mellom 50 og 150 kDa (Mudgil, 2017). Pektiner vil derfor forbli i slangen mens lavmolekylære stoffer og salter med mindre molekylvekt enn 3,5 kDa vil diffundere ut av slangen. Utbytte etter frysetørking er presentert i tabell 6.

*Beregningseksempel utbytte:*

$$\text{Teoretisk mengde av 85 mL PVU} = 8 \text{ g} \cdot \left( \frac{85 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} \right) = 6,8 \text{ g}$$

$$\text{mengde fraksjon fra 17 g umoden tomat} = 17 \text{ g} \cdot \frac{0,371 \text{ g}}{6,8 \text{ g}} = 0,9275 \text{ g}$$

$$\% \text{ - vis utbytte av tomatkjøtt} = \frac{0,9275 \text{ g}}{859 \text{ g}} \cdot 100 \% = 0,11 \%$$

**Tabell 6:** Oversikt over utbytte av vann-, CDTA- og NBC-fraksjoner etter dialyse. 100 mL ekstrakt fra 8 g frysetørket tomatkjøtt ble frysetørket.

Fraksjoner	Mengde frysetørket (mL)	Utbytte pr mL frysetørket (g)	Utbytte (%) <sup>f</sup>
PVU	85	0,371	0,11
PVS	80	0,363	0,09
PVM	85	0,319	0,08
PVK	85	0,398	0,11
PCU	80	0,382	0,12
PCS	90	0,369	0,08
PCM	90	0,431	0,10
PCK	80	0,295	0,09
PNU	10	0,082	0,20
PNS	95	0,526	0,11
PNM	95	0,578	0,13
PNK	95	0,401	0,10

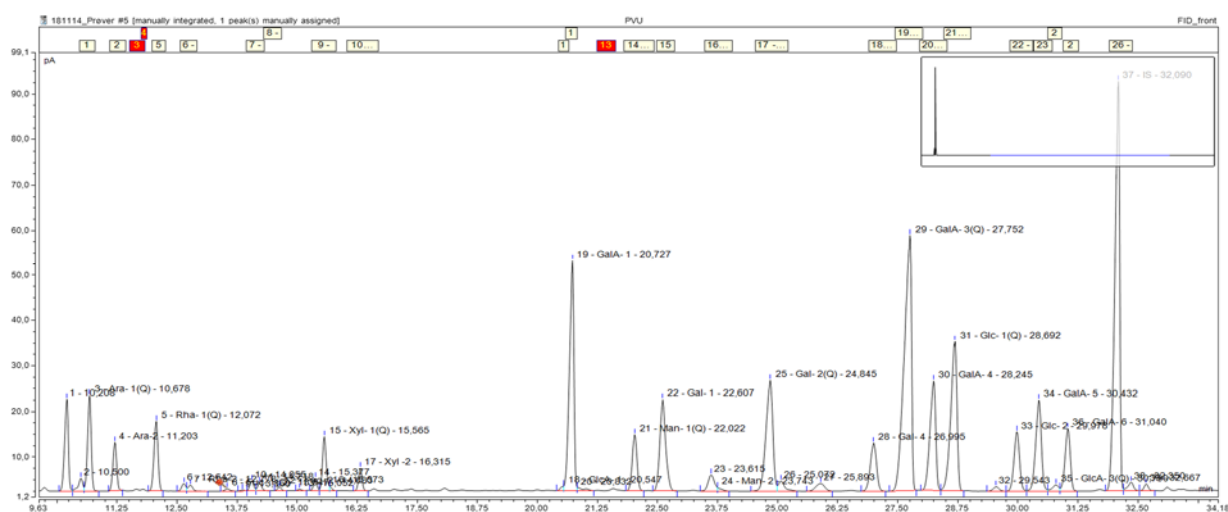
<sup>f</sup>utbytte frysetørket fraksjon etter dialyse i forhold til totalvekt tomatkjøtt uten frø og skinn, se beregningseksempel overfor

Vannfraksjonene (tabell 5) isolert fra gelfiltreringen er mer opprenset enn fraksjonene fra dialyse (tabell 6). På grunn av lavt utbytte av fraksjon I fra gelfiltreringen ble dette ikke analysert videre.

## 4.2 Strukturanalyse av pektiner i tomat

### 4.2.1 Monosakkaridsammensetning – metanolyse og GC

Kvalitativt og kvantitativt innhold av de ulike monosakkarider i fraksjoner isolert etter ekstraksjon med destillert vann, CDTA, NBC etterfulgt av dialyse er bestemt ved hjelp av metanolyse (metode 3.3.2), TMS-derivatisering (metode 3.3.2.1) og gasskromatografi (se metode 3.3.2.2). Hvert monosakkarid gir opphav til flere topper på et kromatogram, på grunn av ulike tautomeriske former som åpen kjede form, pyranose og furanose i  $\alpha$  eller  $\beta$ -konfigurasjon (figur 18) (Cui, 2005a). Et eksempel på kromatogram fra gasskromatografisk analyse er vist i figur 32.



**Figur 32:** Et gasskromatogram av PVU, hvor intern standard (IS) (mannitol 1 mg/mL) er vist til høyre på kromatogrammet.

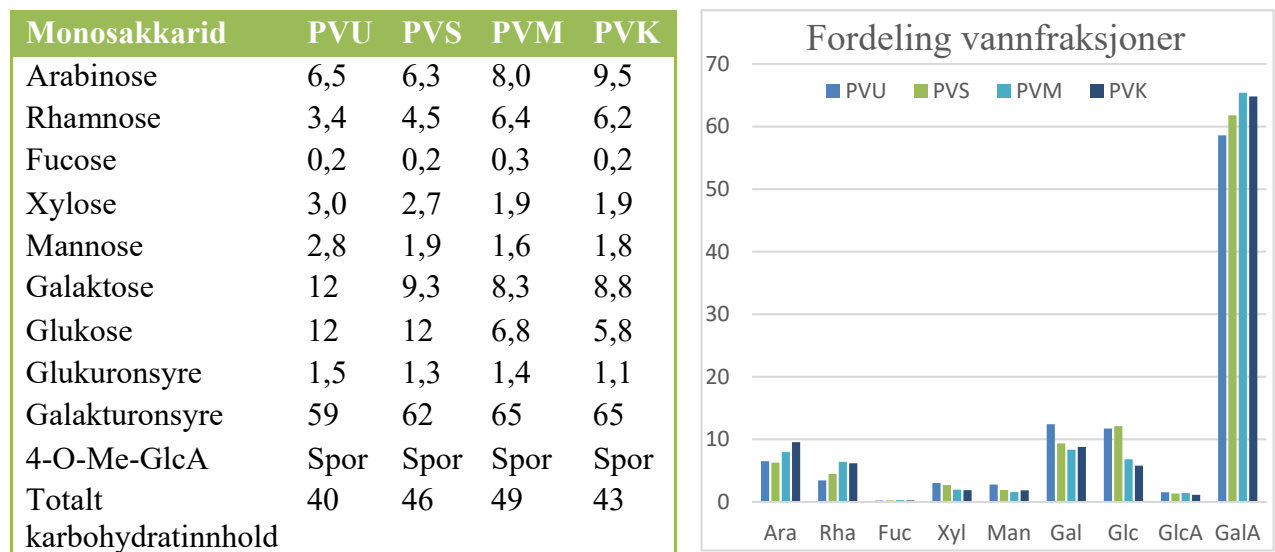
Kvalitativ identifikasjon av hvert monosakkarid er bestemt ved relativ retensjonstid ( $R_t$ ). Relativ retensjonstid beregnes som forholdet:  $\text{retensjonstid}_{\text{prøve}} / \text{retensjonstid}_{\text{internstandard}}$ . Rene standarder av hvert monosakkarid er på forhånd analysert ved gasskromatografi. Relativ retensjonstid er unik for et monosakkarid. Ved identifikasjon av ukjent monosakkarid, vil relativ retensjonstid fra prøve være lik relativ retensjonstid fra ren standard.

Kvantitativ bestemmelse av et monosakkarid er bestemt ved toppens areal. Arealets andel til hver enkelt topp er relatert til intern standard (mannitol). Mengde monosakkarid beregnes ut fra standardkurve ved lineær regresjon med stigningstall og skjæringspunkt. Med dette har vi en matematisk modell, hvor mengde monosakkarid er den eneste ukjente og derved kan beregnes.



Monosakkaridsammensetningen i vannfraksjoner, CDTA-fraksjoner og NBC-fraksjoner etter dialyse er presentert i tabell 7, 10 og 11. Alle de testede fraksjonene inneholder arabinose (Ara), galaktose (Gal), rhamnose (Rha) og galakturonsyre (GalA), hvilket er typisk for pektiner (Ho, 2017). Den store andel av GalA (tabell 7,10 og 11) i alle fraksjoner indikerer, at pektin er dominerende i disse fraksjoner (Müller-Maatsch et al., 2016).

**Tabell 7:** Monosakkaridsammensetning i tomat ekstrahert med vann angitt i prosent (%) i forhold til totalt karbohydratinnhold samt fordeling av monosakkaridsammensetning



For en dypere forståelse av monosakkaridsammensetningen kan bruken av forholdstall mellom de ulike monosakkaridene forbedre tolkningen av disse. Monosakkaridforholdene basert på data fra metanalyse er definert i tabell 8 og presentert i tabell 9. Forhold 1 (tabell 8) beskriver forholdet mellom hovedkjede av galakturonsyre enheter (GalA) til de nøytrale sukkerne, fucose (Fuc), rhamnose (Rha), arabinose (Ara), galaktose (Gal) og xylose (Xyl). Høy andel av GalA indikerer større linearitet av pektinstrukturen og lavt innhold mindre linearitet. Der antas overveiende bidrag fra Rha til RG-I i forhold til RG-II. Forhold 2 beskriver andelen av Rha i forhold til GalA og dermed bidraget fra rhamnogalakturonan-I (RG-I) til pektin populasjonen. Forhold 3 sammenligner andelen av sidekjerder av Ara og Gal i RG-I i forhold til Rha som et mål på grad av RG-I forgrening.

**Tabell 8:** Definisjon av forholdstall basert på data fra metanalyse (Houben et al., 2011).

Forhold	Monosakkaridforhold	Beskrivelse
1	$\frac{\text{GalA}}{\text{Fuc} + \text{Rha} + \text{Ara} + \text{Gal} + \text{Xyl}}$	Linearitet av pektin
2	$\frac{\text{Rha}}{\text{GalA}}$	RG-I-region
3	$\frac{\text{Ara} + \text{Gal}}{\text{Rha}}$	Forgrening av RG-I

**Tabell 9:** Monosakkarid forholdstall for de ulike fraksjoner isolert fra Dometica tomat. Definisjon av de tre forhold er presentert i tabell 7.

Fraksjon	Forhold	Umoden	Standard	Moden	Oppkuttet
Vannfraksjoner	1	2,3	2,7	2,6	2,4
	2	0,06	0,07	0,10	0,09
	3	5,5	3,5	2,6	3,0
CDTA-fraksjoner	1	2,6	2,5	2,5	2,1
	2	0,06	0,08	0,12	0,13
	3	5,1	3,6	2,1	2,5
NBC-fraksjoner	1	1,5	1,6	2,8	2,4
	2	0,11	0,14	0,12	0,13
	3	5,3	3,5	1,9	2,1

**Vannfraksjoner: Diskusjon av monosakkaridinnhold (tabell 7) i lys av tabell 9**

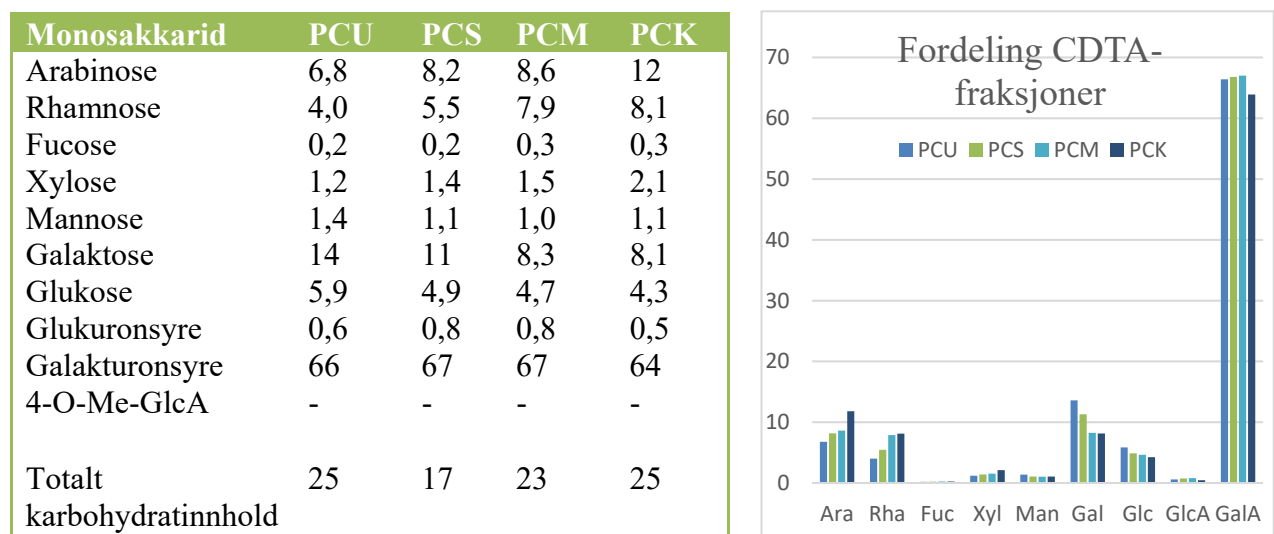
Mengde pektintype polysakkarider som er vannløselige og løst assosiert i celleveggen ble bestemt ved ekstraksjon med vann. Totalt karbohydratinnhold for vannekstraktene er høyest i PVM (49%) og lavest i PVU (40%). Under fruktmodning brytes pektiner noe ned av enzymer, samtidig med at man får økt sødme, lukt og smakskomponenter (Institutt for biovitenskap, 2019). Økt totalt karbohydratinnhold ved modning kan forklares ved at en viss degradering av pektiner under modning, kan gi økt andel lettløselige pektiner som ekstraheres ut i kokende vann. PVM og PVK har tilnærmet lik mengde av de ulike monosakkarider, likeledes med PVU og PVS. Dette tyder på, at modning av tomat kan ha innflytelse på monosakkaridsammensetningen.

Det relative innhold av GalA øker når tomat modner, ettersom PVU har lavest innhold av GalA og PVM og PVK har høyest innhold. Forholdet (1) (tabell 9) mellom GalA og de nøytrale sukkerne er størst for standard tomat. Forholdet (2) (tabell 9) mellom Rha og GalA er størst for PVM, som kan tyde på høyere andel RG-I i moden tomat. Grad av RG-I forgrening kan beskrives ved forholdet (3) mellom Ara, Gal og Rha. RG-I forgrening er størst for PVU med

overveiende Gal-enheter. RG-I forgrening er minst for PVM med minst andel av Gal. Det ser ut til, at sidekjeder med Gal brytes med modningen, mens sidekjeder med Ara bistår.

Glukose, xylose og mannose kan indikere tilstedeværelsen av hemicellulose i vannfraksjonene, ettersom disse monosakkarider ikke er typiske for pektiner. Glukose og xylose er vanlige komponenter i xyloglukaner, som er hovedbestanddelen i hemicellulose (Albersheim et al., 2011)

**Tabell 10:** Monosakkaridsammensetning i tomat ekstrahert med CDTA angitt i prosent (%) i forhold til totalt karbohydratinnhold samt fordeling av monosakkaridsammensetning



### CDTA-fraksjoner: Diskusjon av monosakkaridinnhold (tabell 10) i lys av tabell 9

Mengde ikke-metylerfiserert pektin som holdes kryssbundet i celleveggen ved ioniske bindinger ble bestemt ved ekstraksjon med chelatoren sykloheksan-trans-1,2-diamin tetraeddiksyre i natriumacetat trihydrat (CDTA). Dette for å fjerne kalsiumioner ( $Ca^{2+}$ ) uten å bryte ned galakturonan-kjedene (Jarvis, 1982). Disse fraksjoner inneholder ionebundet pektintype polysakkarider i en såkalt «eggboks-struktur» (figur 7.B) (Houben et al., 2011).

Totalt karbohydratinnhold i CDTA-fraksjonene er innbyrdes tilnærmet likt, men en del lavere enn totalt karbohydratinnhold i vannfraksjonene. Dette kan skyldes, at tomater inneholder mer lettoppløselige pektiner med høy metylforestreringsgrad enn pektiner som er uforestrert og løses i CDTA. For å bekrefte denne påstanden er det nødvendig med bestemmelse av grad av metylesterfisering, hvor prosentvis metylesterfisererte Gala enheter med metanol defineres (Bonnin, Garnier, & Ralet, 2014).

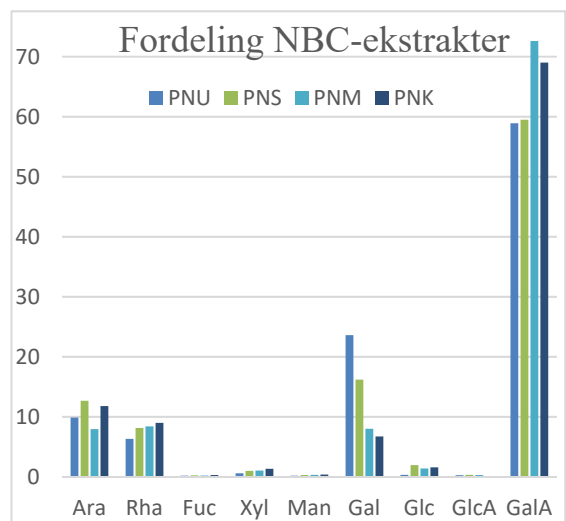
I en tidligere masteroppgave (Holm, 2018), viste IR-spektrene at CDTA-fraksjonene hadde mye lavere forestringsgrad enn vannfraksjonene. GalA kan også være acetyllert, noe som kan påvirke ekstraksjonsutbytte negativt. Acetyllerte GalA er imidlertid ikke rapportert i betydelige mengder for tomat (Bonnin et al., 2014).

Forholdet (2) (tabell 9) mellom Rha og GalA er høyest i PCM og PCK, noe som tyder på større RG-I region med lavere grad av forgrening (forhold 3) i forhold til PCU. Dette kan skyldes større aktivitet av blant annet polygalakturonase og spesifikke  $\beta$ -galaktosidaser og dermed depolymerisering av GalA enheter og Gal sidekjeder under modning (Albersheim et al., 2011)

Relativ mengde xylose, glukose og mannose (tabell 7) er lavere i CDTA-fraksjonene i forhold til vannfraksjonene (tabell 10), noe som kan tyde på mindre kontaminering av hemicellulose i CDTA-fraksjonene.

**Tabell 11:** Monosakkaridsammensetning i tomat ekstrahert med NBC angitt i prosent (%) i forhold til total karbohydratinnhold, samt fordeling av monosakkaridsammensetning

Monosakkarid	PNU	PNS	PNM	PNK
Arabinose	9,9	13	8,0	12
Rhamnose	6,3	8,1	8,4	9,0
Fucose	0,2	0,2	0,2	0,3
Xylose	0,6	1,0	1,0	1,3
Mannose	0,2	0,3	0,3	0,4
Galaktose	24	16	8,0	6,7
Glukose	0,3	2,0	1,4	1,6
Glukuronsyre	0,3	0,3	0,3	-
Galakturonsyre	59	60	73	69
4-O-Me-GlcA	-	-	-	-
<b>Totalt karbohydratinnhold</b>	<b>50</b>	<b>37</b>	<b>29</b>	<b>22</b>



### NBC-fraksjoner: Diskusjon av monosakkaridinnhold (tabell 11) i lys av tabell 9

Mengde pektintype polysakkarider kovalent esterbundet til andre celleveggpolysakkarider ble bestemt ved ekstraksjon med  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i  $\text{NaBH}_4$  (NBC). Disse fraksjoner inneholder natriumkarbonat/-borat oppløselige pektiner.

Total karbohydratinnhold i NBC-fraksjonene varierer, men er høyere enn i CDTA-fraksjonene. Dette skyldes de sterke ekstraksjonsbetingelser fra NBC-løsning. Innholdet av karbohydrat er høyest for PNU (tabell 11) og lavest for PNK. Det betydelige innhold av karbohydrat i PNU

kan skyldes fastheten i umoden tomat og sterke bindinger til celleveggen, sannsynligvis hemicellulose (Caffall & Mohnen, 2009), således at der trengs sterkere ekstraksjonsbetingelser for disse pektiner ekstraheres. Til sammenligning vil en moden tomat, ha myk fruktkjøtt (Albersheim et al., 2011) og kovalente bindinger er sannsynligvis allerede brutt. Dette resulterer, i at der ikke trengs likså sterke ekstraksjonsmidler som NBC. Disse pektin type polysakkarider ekstraheres med vann, idet PVM (tabell 7) har høyest karbohydratinnhold til sammenligning med de andre vannfraksjoner.

Forholdet (1) (tabell 9) mellom GalA og de nøytrale sukkerne er mindre for NBC-fraksjonene sammenlignet med vannfraksjonene og CDTA-fraksjonene. Dette kan skyldes relativt høyere andel av nøytrale sukkerne arabinose og galaktose (tabell 11). Stor andel av arabinose og galaktose i NBC-fraksjonene i forhold til CDTA-fraksjonene er tidligere rapportert for umoden tomatpektin (Round et al., 2001). Samtidig kan det skyldes flere områder med RG-I i NBC-fraksjonene, idet forholdet (2) mellom Rha og GalA er høyere. Grad av RG-I-forgrening (3) reduseres under modningen, hvilket skyldes tap av Gal sidekjedene. Spormengder av glukose, xylose og mannose tyder på mindre andel av hemicellulose i NBC-fraksjonene (tabell 6).

### **Diskusjon av endringer i monosakkaridsammensetning under modning av tomat (tabell 7,10 og 11)**

Vannløselige, ionebundet og kovalent bundet pektin type polysakkarider i celleveggen viser tydelige endringer i monosakkaridsammensetning under modningen av tomat. Relativ mengde galakturonsyre (GalA) holder seg jevnt i fraksjonene. Relativ andel av rhamnose (Rha) og arabinose (Ara) øker og andelen av galaktose (Gal) reduseres, mens andelen av xylose (Xyl), fucose (Fuc), glukuronsyre (GlcA) og mannose (Man) varierer. Andel glukose (Glc) reduseres for de vannløselige pektiner, som kan skyldes frigjøring av glukose ved modning og rensing ved dialyse. Andel Glc varierer for de ionebundet og kovalentbundet pektiner.

Forholdstallene fra tabell 9 for alle 12 fraksjoner viser et konkret mønster. Større eller flere RG-I-regioner (2) (tabell 9), mindre grad av RG-I forgrening (3) og dermed større linearitet av pektin (1) under modningen. Større eller flere RG-I regioner relativt sett kan bety en viss nedbrytning av GalA under modning. Mindre forgrening av RG-I kan skyldes degradering av galaktose under modning.

Depolymerisering av pektin i primær cellevegg og midtlamell var lenge antatt å være hovedprosessen for fruktmodning (Hiromi et al., 2013). Dette ble imidlertid avvist. Ved undertrykkelse av flere andre degraderingsenzymmer som PE-katalysert de-metylering av pektin, i tomatfrukt resulterte dette i minimal effekt på fruktmodning og tekstur (Asif, 2007; Brummell & Harpster, 2001; Saladié et al., 2007). Reduksjon i andelen av Gal observeres i stor grad for alle fraksjoner under modning, hvilket er rapportert i en tidligere studie (Seymour et al., 1990). Dette skyldes større aktivitet av spesifikke  $\beta$ -galaktosidaser under modning, som bryter ned Gal-enhetene i sidekjeder av RG-I. Tap av Gal bidrar vesentlig til fruktmykning, som kan øke tilgangen av andre hydrolaser (Albersheim et al., 2011). Undertrykkelse av  $\beta$ -galaktosidase-aktivitet i tidlig modning har vist betydelig reduksjon i fruktmykning (Smith, Abbott, & Gross, 2002).

#### **4.2.2 Analyse av glykosidbindinger – Metylering**

Analyse av glykosidbindinger ble utført ved hjelp av karboksylsyrereduksjon, etterfulgt av metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC-MS på vannfraksjoner, CDTA-fraksjoner og NBC-fraksjoner. Hver topp i GC-kromatogrammet representerer en bindingstype for et monosakkarid (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 2010). Med utgangspunkt i resultater fra monosakkaridsammensetningen (tabell 7, 10,11) ble prosentandel av de ulike bindingene funnet ved GC-MS. Resultatene fra bindingstypeanalysen er presentert i tabell 12.

#### **Vannfraksjoner: Diskusjon av resultater fra metylering (tabell 12) i lys av monosakkaridsammensetning (tabell 7) og identifisering av AG-II (figur 32)**

Løst assosierte og vannløselige pektiner viser en økning i terminale GalA-enheter ved modning, noe som kan indikere en viss spalting av bindinger i homogalakturonan-kjeden. Tilstedeværelse av 1,3,4-GalA og 1,4-Xyl kan tyde på xylogalakturonan (Yapo, 2011) idet der tidligere er rapportert 1,4-Xyl bundet til posisjon O-3 ved den lineære GalA-kjede (Ho, 2017). 1,2,4-GalA er tilstede i mindre andeler og man har sett at 1,4-Xyl også kan binde seg til posisjon O-2 på GalA og danne xylogalakturonan (Yapo, 2011). Forgreningspunktet 1,3,4-GalA øker ved modning, hvilket kan bety at en viss nedbrytning av pektiner gjør, at pektinet blir lettere tilgjengelig for metyleringsreagenset og at forgreningspunktet av den grunn blir detektert.

**Tabell 12:** Prosentvis fordeling av de forskjellige monosakkarider og bindingstyper.

Monosakkarider og bindingstyper		PVU	PVS	PVM	PVK	PCU	PCS	PCM	PCK	PNU	PNS	PNM	PNK
Araf	Terminal	2,0	1,8	2,2	1,9	1,9	1,7	1,8	4,5	-	-	-	-
	1,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,9	-	1,1	1,0	0,4
	1,3	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-
	1,5	4,3	4,2	5,4	7,5	4,5	6,1	6,6	6,4	9,9	12	7,0	11
	Sum	<u>6,5</u>	<u>6,3</u>	<u>7,9</u>	<u>9,5</u>	<u>6,8</u>	<u>8,2</u>	<u>8,6</u>	<u>12</u>	<u>9,9</u>	<u>13</u>	<u>8,0</u>	<u>12</u>
Rha	Terminal	1,3	1,5	1,7	1,5	1,3	1,2	0,7	2,7	-	3,3	-	0,7
	1,2	1,3	2,1	3,8	3,9	1,8	3,3	6,3	3,9	6,3	3,9	7,8	7,1
	1,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	-	1,2	-	1,0	0,6	0,2
	1,2,4	0,5	0,6	0,7	0,6	0,8	0,8	0,9	0,4	-	-	-	1,1
	Sum	<u>3,4</u>	<u>4,5</u>	<u>6,4</u>	<u>6,2</u>	<u>4,0</u>	<u>5,5</u>	<u>7,9</u>	<u>8,1</u>	<u>6,3</u>	<u>8,1</u>	<u>8,4</u>	<u>9,0</u>
Xyl	Terminal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,4	3,0	2,7	1,9	1,9	1,2	1,4	1,5	2,1	0,6	1,0	1,0	1,3
	Sum	<u>3,0</u>	<u>2,7</u>	<u>1,9</u>	<u>1,9</u>	<u>1,2</u>	<u>1,4</u>	<u>1,5</u>	<u>2,1</u>	<u>0,6</u>	<u>1,0</u>	<u>1,0</u>	<u>1,3</u>
Fuc	Terminal	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-
	1,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	0,3
	Sum	<u>0,2</u>	<u>0,2</u>	<u>0,3</u>	<u>0,2</u>	<u>0,2</u>	<u>0,2</u>	<u>0,3</u>	<u>0,3</u>	<u>0,2</u>	<u>0,2</u>	<u>0,2</u>	<u>0,3</u>
Gal	Terminal	2,1	1,6	2,3	2,1	2,1	2,4	1,6	0,9	-	2,7	1,6	1,1
	1,3	1,7	1,3	1,2	1,4	1,4	1,4	1,4	1,0	-	2,3	0,6	1,3
	1,4	5,5	4,2	2,6	2,9	7,3	4,9	3,8	6,2	24	9,1	5,3	2,6
	1,6	0,8	0,5	0,6	0,7	0,6	0,6	0,1	-	-	-	-	0,3
	1,2,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	Spor	-	-	spor	spor	spor
	1,3,6	2,3	1,6	1,5	1,7	1,9	1,8	1,7	-	-	2,1	0,4	1,4
	Sum	<u>12</u>	<u>9,3</u>	<u>8,3</u>	<u>8,8</u>	<u>14</u>	<u>11</u>	<u>8,3</u>	<u>8,1</u>	<u>24</u>	<u>16</u>	<u>8,0</u>	<u>6,7</u>
Glc	Terminal	0,6	0,7	-	0,2	0,2	0,2	-	-	-	-	-	-
	1,4	9,1	9,3	6,0	4,4	4,9	4,2	4,7	4,3	-	2,0	1,4	1,2
	1,6	0,2	0,2	-	0,3	0,1	-	-	-	-	-	-	0,3
	1,2,3	0,03	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-
	1,4,6	1,8	2,0	0,9	0,9	0,7	0,6	-	-	-	-	-	0,2
	Sum	<u>12</u>	<u>12</u>	<u>6,8</u>	<u>5,8</u>	<u>5,9</u>	<u>4,9</u>	<u>4,7</u>	<u>4,3</u>	<u>0,3</u>	<u>2,0</u>	<u>1,4</u>	<u>1,6</u>
GlcA	Terminal	0,6	0,6	0,5	0,3	0,2	0,2	-	-	-	0,3	0,2	-
	1,4	1,0	0,8	0,9	0,8	0,4	0,5	0,8	-	-	-	0,2	-
		<u>1,5</u>	<u>1,3</u>	<u>1,4</u>	<u>1,1</u>	<u>0,6</u>	<u>0,8</u>	<u>0,8</u>	<u>0,5</u>	<u>0,3</u>	<u>0,3</u>	<u>0,3</u>	-
GalA	Terminal	4,2	3,1	5,6	8,0	2,1	3,6	1,5	1,5	-	2,3	2,4	2,2
	1,4	52	56	57	52	62	61	66	62	59	57	70	65
	1,2,4	0,6	0,4	0,3	0,7	0,5	0,3	spor	-	-	spor	spor	spor
	1,3,4	2,2	2,5	2,7	4,2	2,1	2,1	-	-	-	-	-	2,0
	Sum	<u>59</u>	<u>62</u>	<u>65</u>	<u>65</u>	<u>66</u>	<u>67</u>	<u>67</u>	<u>64</u>	<u>59</u>	<u>60</u>	<u>73</u>	<u>69</u>

Tilstedeværelsen av 1,4-Gal, 1,2,4-Gal, 1,3-Gal, 1,6-Gal og 1,3,6-Gal i alle fraksjoner tyder på innholdet av både AG-I og AG-II (Ho, 2017), med størst mengde i PVU.  $\beta$ -glukosyl Yariv reagens reagerer med 1,3,6-Gal i AG-II-kjeden (Austarheim et al., 2012). Positiv resultat ved utfelling med Yariv reagens bekrefter tilstedeværelsen av AG-II for alle vannfraksjoner (resultat 4.2.3). T-Fuc, T-GlcA og 4-O-Me-GlcA kan være en del av AG-I eller AG-II, hvor disse binder seg til galaktanene (figur 8) (Albersheim et al., 2011).

Arabinan kan enten være direkte bundet til RG-I eller til AG-sidekjedene (Ho, 2017). Mere enn 65 % av arabinose er 1,5-bundet (tabell 12) og ingen forgreningspunkter er detektert, hvilket indikerer en lineær arabinan struktur. Relativ mengde 1,3-Gal, 1,3,6-Gal og 1,4 Gal reduseres ved modning, hvilket kan tyde på en vis nedbrytning av sidekjeder med Gal. Arabinan ikke blir degradert tilsvarende, noe som gir forholdsvis høyere relativt innhold av arabinose ved modning. PVK ble isolert etter at moden tomat ble oppkuttet og oppbevart på lab benken i et døgn. Denne fraksjon har høyest andel av 1,5-bundet arabinan. Den forholdsvis store mengde arabinan i PVK, kan skyldes en vis nedbrytning av Gal ved enzymatisk reaksjon under modning og oppkutting (Smestad & Barsett, 2005). Den typiske 1,3-Ara binding er ikke detektert i fraksjonene, bare litt i PVS. Derimot er den mindre vanlige 1,2-Ara (Smestad & Barsett, 2005) detektert i alle fraksjoner.

Karakteristiske monosakkaridbindingstyper i RG-II er mulig tilstede. Der er detektert er T-Ara, T-Rha, 1,2-Rha, 1,3-Rha, 1,2,4-Gal, T-Gal, 1,3-Fuc men ikke 1,3-apiose (Ho, 2017), hvilket kan stamme fra RG-II. Bindingstypen 1,4-GlcA kan være en del av RG-II region. Det lave innholdet av GlcA er blitt identifisert tilnærmet lik i alle vannfraksjonene. T-GlcA eller T-4-O-Me-GlcA kan komme fra AG-II eller direkte bundet i posisjon 2 eller 3 på 1,4-GalA fra RG-I-region (Renard, Crépeau, & Thibault, 1999).

Høy andel av 1,4 Xyl, 1,4-Glc og 1,4,6-Glc kan indikere tilstedeværelse av xyloglukaner som er hovedbestanddelen i hemicellulose (Albersheim et al., 2011; Ho, 2017). Xylose, galaktose og fucose er tilstede som terminale enheter, som i kombinasjon med 1,4,6-Glc er typisk for xyloglukaner (Hilz, Bakx, Schols, & Voragen, 2005). Mengde xylose og glukose er lavest i PVK i forhold til de andre fraksjonene. Dette kan bety at xyloglukaner fra hemicellulose assosiert med pektin er degradert enzymatisk ved oppkutting og dialysert vekk. Dessuten kan innholdet av glukose (Glc) komme fra stivelse, som blir frigjort og degradert ved oppkutting. PVU og PVS har dobbelt så stor mengde av glukose end PVK og PVM, som viser at økt nedbrytning ved lagring av tomat er sannsynlig.



Arabinoxylaner er en annen bestanddel i hemicellulose og kan muligvis være tilstede. Alle vannfraksjonene inneholder T-Ara, som kan være substituert gjennom O-2 og / eller O-3 i 1,4-Xyl-kjeden og dannet arabinoxylaner (Albersheim et al., 2011). Innholdet av arabinoxylaner er tidligere identifisert i modne tomater (Do Nascimento, Baggio, Werner, Iacomini, & Cordeiro, 2016). Innholdet av mannose er rapportert i tomat fra tidligere studier (Houben et al., 2011; Seymour et al., 1990) som også kan stamme fra hemicellulose. Under fruktmodning er der rapportert depolymerisering av hemicellulose (Houben et al., 2011), hvilket kan relateres til den reduserende relative mengde 1,4-Xyl, 1,4-Glc, 1,4,6-Glc og mannose under modning.

### **CDTA-fraksjoner: Diskusjon av resultater fra metylering (tabell 12) i lys av monosakkaridsammensetning (tabell 10)**

Ionebundet pektin i PCU har relativt lavere innhold av 1,2-Rha enn de modne tomatene. Dette betyr, at PCU har relativt lengre HG-områder. RG-I regionen i PCU er mer forgrenet enn PCK og PCM. PCU har høyere innhold av Gal, noe som kan bety høyere grad av RG-I-forgrening eller lengre sidekjeder. Sidekjedene til PCU, ser ut til å inneholde overveiende mengder av lineære 1,4-Gal i forhold til lineære 1,5-Araf. Typiske strukturelle enheter i AG-II er 1,3-Gal, 1,6-Gal og forgreningspunktet 1,3,6-Gal er detektert i PCU og PCS, men i mindre grad i PCM og PCK.

PCK skiller seg ut med noe lavere innhold av GalA. Der er ikke detektert forgreningspunktene 1,2,4-GalA eller 1,3,4-GalA (tabell 12) noe som kan tyde på manglende tilstedeværelse av xylogalakturonan, fordi xylose oftest er substituert ved O-2 eller O-3 i GalA-kjeden (Yapo, 2011). Større andel av T-Rha i PCK og mindre andel 1,2,4-Rha, tyder på en mindre forgrenet RG-I-region, idet sidekjedene vanligvis bindes til posisjon 4 i Rha. 1,6-Gal og 1,3,6-Gal er likeledes ikke detektert i PCK, som kan bety degradering av AG-II og derved mindre forgrenet RG-I. Ideelt burde Yariv-testen vært utført for å påvise eller avvise tilstedeværelsen av AG-II i PCK, idet 1,3-Gal er detektert, men dette ble der ikke tid til. Med dette ser det ut til, at PCK er forgrenet med lineære 1,5-arabinaner og 1,4-galaktaner. Mindre forgrenet AG-I i PCK er sannsynlig, siden der ikke er detektert 1,2,4-Gal, men meget T-Ara (tabell 12), som også kan sitte terminal på galaktanene. AG-II er mulig degradert ved oppkutting og fjernet ved dialyse, siden der ikke er detektert 1,6-Gal eller forgreningspunktet 1,3,6-Gal. Den store andel av T-Ara og 1,4-Xyl i PCK (tabell 12) i forhold til de andre fraksjoner, kan indikere noe høyere innhold av arabinoxylaner.

## **NBC-fraksjoner: Diskusjon av resultater fra metylering (tabell 12) I lys av monosakkaridsammensetning (tabell 11)**

Kovalent bundet pektin i NBC-fraksjonene skiller seg vesentlig ut, ettersom få terminale enheter er detektert og ingen detektert for PNU. 1,5-Ara og 1,4-Gal som er vanlig i sidekjeder på RG-I er detektert. Forgreningspunktet 1,2,4-Rha er i midlertidig ikke detektert i de fleste fraksjoner, idet sidekjedene oftest binder seg til posisjon 4 i Rha. Det kan bety, at konformasjonen til pektinet gjør, at metyleringsreagenset ikke kommer til RG-I i stor nok grad slik at forgreningspunktet blir metylert og detektert. Forgreningspunktet 1,2,4-Rha er derimot detektert for PNK, som kan bety at denne er blitt metylert lettere, muligvis på grunn av konformasjonen. Den manglende deteksjon av 1,2,4-Rha i de andre fraksjoner kan også være, fordi GC-MS instrumentet ikke var følsom nok til å kunne detektere dette forgreningspunkt. I dette tilfellet burde vi ha oppkonsentrert løsningene og kjørt på nytt.

Pektin type polysakkarider isolert i NBC-fraksjonene viser betydelig høyere andeler av lineære 1,5-Ara i forhold til ionebundet og vannløselige pektiner. Rapporter (Hiromi et al., 2013) viser, at arabinan sidekjeder er viktige for dannelsen av annen celleveggnettverk. Arabinan sidekjeder av RG-I ble rapportert (Zykwinska, Ralet, Garnier, & Thibault, 2005) å interagere med cellulosefibre, hvor forgrenede arabinaner isolert fra sukkerroer og forgrenede galaktaner isolert fra potet (*Solanum tuberosum*) viste lavere adsorpsjon *in vitro* til cellulose mikrofibriller enn ikke-forgrenede arabinaner (Zykwinska et al., 2005). Xyloglukan type hemicellulose er kjent for å kryssbinde cellulose mikrofibriller, hvor et hemicellulose molekyl kan binde til mere enn én cellulose mikrofibrill (Albersheim et al., 2011). Binding eller assosieringen av ikke-forgrenede arabinaner til cellulose i studien (Zykwinska et al., 2005) var sammenlignbar med binding eller assosiering av xyloglukan type hemicellulose til cellulose. Dette kan relateres til den økende mengde 1,5-arabinan i NBC-fraksjonene, hvor det sterke ekstraksjonsmiddel sannsynligvis har brutt bindingene mellom cellulose og arabinan-sidekjeder.

Terminal glukuronsyre (T-GlcA) kan være direkte bundet til 1,4-GalA i posisjon 3 i RG-I eller til sidekjeden AG-II (Ho, 2017). Den lavere mengde GlcA i NBC-fraksjonene i forhold til vannfraksjonene og CDTA-fraksjonene kan skyldes lavere forgrening av 1,4-GalA-hovedkjede i pektin isolert ved de forskjellige ekstraksjonsbetingelsene. Dette stemmer overens med at 1,2,4-GalA og 1,3,4-GalA også reduseres i takt med reduksjon av GlcA mengde. En annen årsak kan være degradering av AG-II, siden de typiske strukturelle enheter 1,3-Gal, 1,6-Gal og 1,3,6-Gal ikke er påvist i PNU og i mindre grad i de andre fraksjoner.

Større andel av 1,4-Gal i NBC-fraksjonene tyder på høyere innhold av AG-I eller 1,4-galaktan sidekjeder i PNU. Det ser ut til at arabinan sidekjeden i pektinet ikke blir særlig degradert ved modning, men at galaktaner eller arabinogalaktan sidekjeden blir degradert i stor grad ved modning.

### **Diskusjon av endringer i monosakkaridsammensetning under modning av tomat (tabell 12)**

Vannløselige, kryssbundet og kovalent bundet pektin type polysakkarider i celleveggen viser tydelige endringer i monosakkaridsammensetning under modningen av tomat. Relativ mengde 1,4-GalA holder seg jevnt i fraksjonene. Relativ andel av 1,2-Rha og 1,5-Ara øker og andelen av Gal reduseres, mens andelen av xylose (Xyl), glukuronsyre (GlcA), fucose (Fuc) og mannose (Man) varierer. Andel glukose (Glc) reduseres for de vannløselige pektiner, men varierer for de kryssbundet og kovalentbundet pektiner.

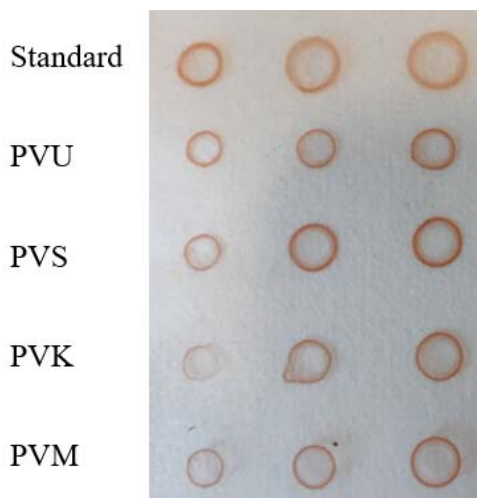
Den reduserende mengde Gal og relativt økende mengde Ara (tabell 12) indikerer endringer i forgreningen av RG-I under modning.

Spesielt observeres reduserende andel 1,4-Gal, 1,3-Gal, 1,6-Gal og 1,3,6-Gal i vannfraksjonene under modningen som kan bety mindre AG-I og AG-II. CDTA-ekstrakter (tabell 12) har forholdsvis lik mengde av de førnevnte bindingstyper, som kan bety mindre forandring i pektiner som er kryssbundet med  $Ca^{2+}$ . Imidlertid er disse bindingstyper ikke detektert for de kovalent bundne pektiner (NBC-ekstrakter) (tabell 12), hvilket sannsynligvis indikerer, at Rha er mindre forgrenet enn i vannfraksjonene og CDTA-fraksjonene.

Kovalent bundet pektiner kan se ut til å inneholde lengere områder av RG-I sammenlignet med de vannløselige og kryssbundet, men de er samtidig noe mindre forgrenet (tabell 8). Sidekjeder for de kovalent bundne pektiner består i stor grad av 1,5-arabinan og 1,4-galaktan sidekjeder, hvilket er rapportert i en tidligere studie (Seymour et al., 1990). Galaktan sidekjedene blir tydeligvis degradert ved modning, noe som vises i alle fraksjonene isolert ved de forskjellige ekstraksjonsbetingelsene.

### 4.2.3 Identifisering av arabinogalaktan-II – Felling med Yariv reagens

Studier har vist at arabinogalaktan-II (AG-II) er viktig for den biologiske aktiviteten (Smestad & Barsett, 2005). Identifisering av arabinogalaktan-II gjøres ved utfelling av det såkalte «Yariv reagenset» (van Holst & Clarke, 1985). En standard løsning av arabisk gummi (Gum arabic) ble brukt som positiv kontroll. Testen ble utført på vannfraksjoner før og etter enzymdegradering. Gelplater med utfelt arabinogalaktan-II (AG-II) er vist på figur 33.



**Figur 33:** Gelplater med utfelt arabinogalaktan II. Brønnene inneholder 2, 4 og 6 µL av prøver (8 mg/mL) og standard (1mg/mL). Standard er arabisk gummi (Gum arabic).

**Tabell 13:** Samlet oversikt over prøvene som inneholder arabinogalaktan II (AG-II). Standard er arabisk gummi (1mg/mL). ++ (tydelig felling) + (lite felling) – (ingen felling)

Fraksjoner	2 µL	4 µL	6 µL
Standard	++	++	++
PVU	++	++	++
PVS	++	++	++
PVK	+	++	++
PVM	++	++	++

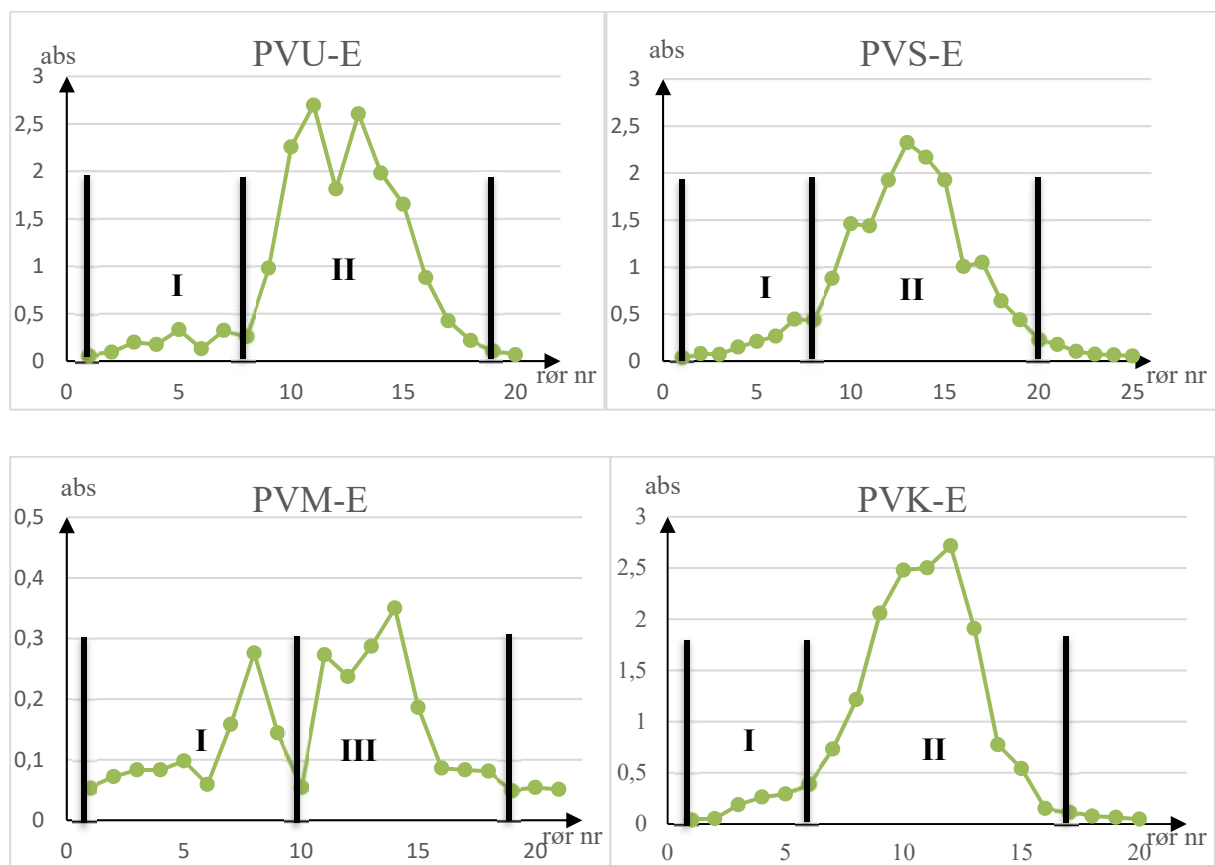
Diameteren på den diffunderte ringen gir et inntrykk av innholdet av AG-II i prøvene (Popper, 2011; van Holst & Clarke, 1985). Positivt resultat vises som rød utfelling av arabinogalaktan-proteiner (AGP) i prøven med  $\beta$ -glucosyl-Yariv. Positivt resultat bekrefter tilstedeværelsen av arabinogalaktan type II (AG-II), idet arabinogalaktan type I ikke er i stand til felle ut med Yariv reagenset. Fraksjonene før enzymdegradering (PVU, PVS, PVM, PVK) gir tydelig tegn på

yariv felling. Fraksjonene etter enzymdegradering (PVU-E, PVS-E, PVM-E og PVK-E) viste ingen tegn til yariv felling (resultater ikke presentert). Årsaken kan sannsynligvis være at fraksjonene etter enzymdegradering ble tillaget i svært lav konsentrasjon på grunn av lite prøvemateriale. Resultatene fra prøvene etter enzymdegradering tolkes som falsk negative, idet AG-II er påvist ved fraksjonene før enzymdegradering.

### 4.3 Strukturoppklaring ved enzymdegradering

#### Enzymatisk degradering av vannfraksjoner

Vannfraksjoner ble behandlet med endo- $\alpha$ -D-(1,4)-polygalakturonase (endo-PG) for å isolere «den hårete region» RG-I. Endo-PG hydrolyserer  $\alpha$ -1,4-glykosidbindinger mellom to ikke-metylerterfiserete 1,4-GalpA-enheter av homogalakturonan og frigjør mono-, di og oligogalakturonsyre (Voragen et al., 2000). Endo-PG er ikke i stand til å bryte bindingene mellom GalA og Rha og derfor vil RG-I kunne isoleres etter enzymdegraderingen.



**Figur 34:** Karbohydratprofiler for enzymdegraderte vannfraksjoner. Fraksjon I har høyest molekylvekt og fraksjon II har lavest molekylvekt. Isolert etter eluering på PD-10-kolonne.

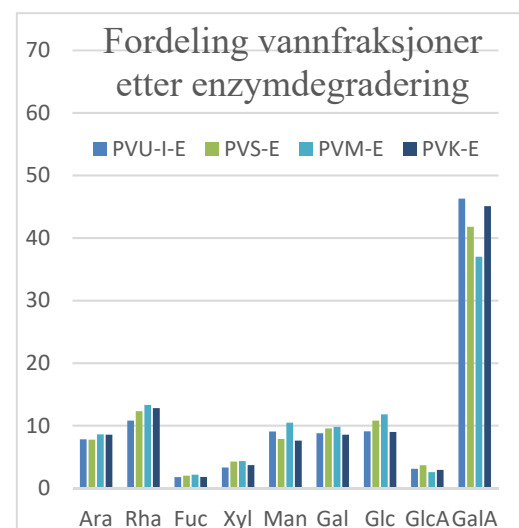
Det degraderte materiale ble applisert på PD-10-kolonne som resulterte i to fraksjoner, fraksjon I med høy molekylvekt og fraksjon II med lavere molekylvekt, hvor fraksjon I ble undersøkt videre. Enzymdegraderte vannfraksjoner av fraksjon-I kalles: PVU-E, PVS-E, PVM-E og PVK-E. Karbohydratprofilene etter eluering ble bestemt ved fenolsvovelsyretesten (metode 3.3.1) og vises på figur 34.

### 4.3.1 Monosakkaridsammensetning – Metanolyse og GC

Enzymatisk degradering ble utført for ytterligere belysning av struktur og strukturaktivitetsforhold. Monosakkaridsammensetningen for de enzymatisk degraderte fraksjonene (I) ble bestemt ved metanolyse (3.3.2), TMS-derivatisering (3.3.2.1) og gasskromatografisk metode (GC) (3.3.2.2). Monosakkaridsammensetningen for fraksjonene før enzymdegradering er presentert tidligere (tabell 7) og etter enzymdegradering presentert i tabell 14.

**Tabell 14:** Monosakkaridsammensetning i enzymdegraderte vannfraksjoner (I) i prosent (%) i forhold til totalt karbohydratinnhold.

Monosakkarid	PVU-E	PVS-E	PVM-E	PVK-E
Arabinose	7,8	7,8	8,6	8,5
Rhamnose	11	12	13	13
Fukose	1,8	2,0	2,2	1,8
Xylose	3,3	4,2	4,3	3,7
Mannose	9,1	7,9	10	7,6
Galaktose	8,8	9,6	9,8	8,5
Glukose	9,1	11	12	9,0
Glukuronsyre	3,1	3,7	2,6	2,9
Galakturonsyre	46	42	37	45
4-O-Me-GlcA	Spor	Spor	Spor	Spor
Totalt karbohydratinnhold	45,3	42,8	37,3	66,1



**Tabell 15:** Monosakkarid forholdstall for vannfraksjoner (I) etter enzymdegradering fra Dometica tomat. Definisjon av de tre forhold er definert i tabell 8.

Fraksjon	Monosakkarid forholdstall	Umoden	Standard	Moden	Oppkuttet
Enzymdegraderte vannfraksjoner (I)	1	1,4	1,2	1,0	1,3
	2	0,2	0,3	0,4	0,3
	3	1,5	1,4	1,4	1,3

## **Enzymdegraderte vannfraksjoner (I): Diskusjon av monosakkaridinnhold (tabell 14) i lys av tabell 7 og 15**

Innholdet av GalA er redusert etter enzymdegradering (tabell 14), hvilket er forventet siden endo-PG splitter glykosidbinding mellom to 1,4-GalA-enheter ved hydrolyse. Forholdet (1) (tabell 15) mellom GalA og de nøytrale sukkerne er redusert, noe som bekrefter, at pektintype polysakkarider etter enzymdegradering er blitt mindre lineære, grunnet færre GalA-enheter. Det relative innholdet av GalA er allikevel høy etter enzymdegradering, noe som kan skyldes for lite enzym tilsetning, ufullstendig de-esterfisering (metode 3.4.4) eller at betingelsene ikke var optimale. Geldannelse etter de-esterfiseringsen kan muligvis gi lavere aktivitet på endo-PG. På den annen side kan det tenkes, at pektin type polysakkarider i vannfraksjon er plassert som "RG-I backbone model" eller "living thing-like model" (figur 6). I dette tilfellet ville pektinene ha større resistens til pektinaser enn den tradisjonelle modellen (figur 5) og dermed føre til redusert GalA-kløyving (Yapo, 2011).

Hydrolysehastigheten av polygalakturonase øker med galakturonan-lengden og lav hastighet er assosiert med kort kjede (Pressey & Reger, 1989). Mengde 1,4-GalA i vannfraksjonene (tabell 12) er lavest for PVU og høyest for PVM. Siden 1,4-polygalakturonase bryter bindinger utelukkende mellom to 1,4-GalA, tillates det å sammenligne 1,4-GalA i vannfraksjonene fra metyleringsresultatene med GalA i enzymdegraderte vannfraksjoner. Mengde GalA i enzymdegraderte vannfraksjoner er lavest for PVM-E og høyest for PVU-E. Dette bekrefter antakelsen om, at aktiviteten av polygalakturonase øker jo høyere 1,4-GalA innhold, siden PVM hadde høyest mengde 1,4-GalA og PVM-E lavest mengde GalA. Etter esterhydrolyse (figur 22) ble løsningene til en fast gel. Dette tyder på, at en stor del av GalA var metylesterfisert siden bare ikke- metylesterfisererte danner gel og "eggboksstruktur" med andre HG-regioner. Dette kan bekreftes av en tidligere studie (Kokini & Chou, 1993) hvor der ble rapportert opptil 70% esterfiseringsgrad i tomat.

Forholdet (2) (tabell 15) mellom Rha og GalA har økt for alle fraksjoner etter enzymdegradering. Dette tilsier god isolering av RG-I-region etter degradering med endo-PG. PVU har hatt høyest grad av RG-I forgrening (2) (tabell 9), i forhold til de andre fraksjoner, hvilket også er gjeldende for PVU-E (2) (tabell 15). Dette bekrefter, at pektintype polysakkarider fra vannekstrahert umoden tomat er mere forgrenet. Fucose, GlcA og 4-O-metyl-GlcA er fortsatt detektert, noe som tyder på, at disse er bundet i sidekjeder i RG-I (Mohnen, 2008).

Identifikasjon av AG-II i enzymdegraderte vannfraksjoner ble forsøkt utført, men det ble ikke noe utslag i yariv-testen. Resultatet tolkes som falsk negativ, siden AG-II er påvist på vannfraksjoner før enzymdegradering. På grunn av svært liten mengde frysetørket materiale av de enzymdegraderte vannfraksjoner, og tilsvarende lav konsentrasjon av prøve ble identifikasjon av AG-II ikke optimal og utelukket. Analyse av bindingstyper på de enzymdegraderte vannfraksjoner ble ikke gjennomført på grunn av mangel på materiale og tid.

Tidligere forsøk på labben har vist at pektinase benyttet ved enzymdegraderingen er kontaminert med mannose. Dette kan relateres til det relative høyere innhold av mannose i fraksjonene etter enzymdegradering.

## **4.4 Biologisk aktivitet**

### **4.4.1 Komplementfikseringstest – Vann-, CDTA-, og NBC-fraksjoner**

Pektintype polysakkarider isolert fra planter har tidligere vist effekt på komplementsystemet (Smestad & Barsett, 2005). Komplementfikseringstest ble utført på vannfraksjoner, CDTA-fraksjoner, NBC-fraksjoner og enzymdegraderte vannfraksjoner. For å studere struktur-aktivitetsforhold ble aktiviteten til enzymdegraderte vannfraksjoner sammenlignet med de opprindelige vannfraksjoner. Positiv kontroll som ble benyttet er BP-II fra *Biophytum petersianum*, som har vist god komplementfikserende aktivitet i tidligere forskning (Inngjerdingen, Coulibaly, Diallo, Michaelsen, & Paulsen, 2006).

Komplementfikserende aktivitet måles ved prosentvis hemning av hemolyse. ICH<sub>50</sub>-verdi er den konsentrasjon av prøvematerialet som gir 50 % hemning av hemolyse. Høy komplementfikserende aktivitet gir en lav ICH<sub>50</sub>-verdi. ICH<sub>50</sub>-verdien gir en indikasjon på komplementfikserende aktivitet ut fra et punkt på kurven og det er viktig å ikke dra konklusjoner utelukkende basert på denne verdi.

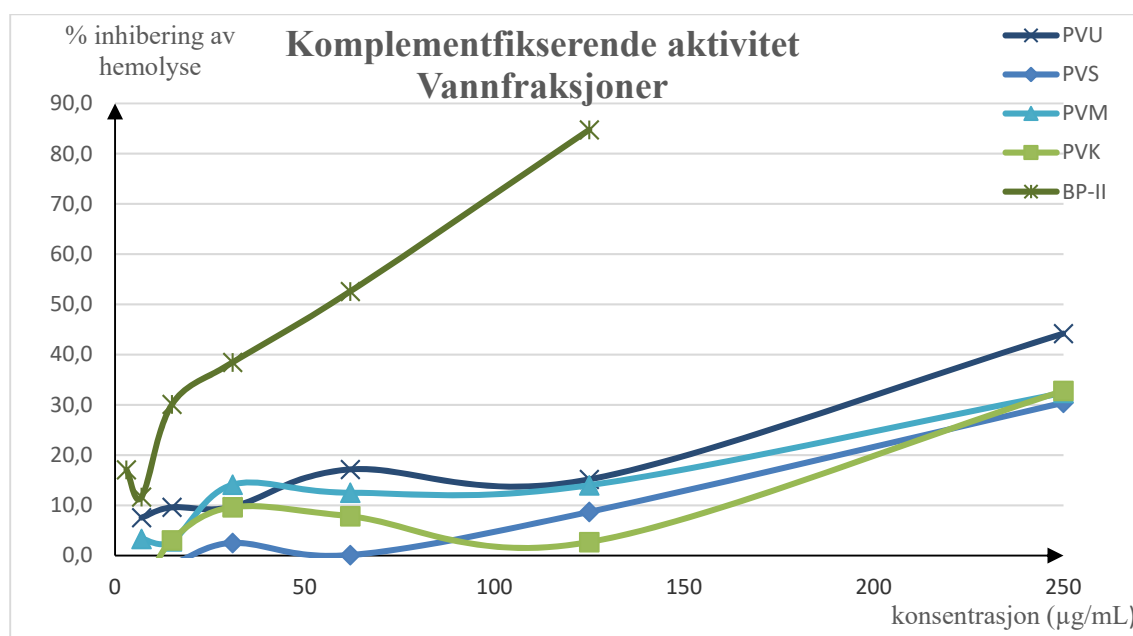
Ulempen ved denne test er, at der ikke skilles mellom aktivering eller hemning av komplement, fordi begge prosesser fører til hemning av hemolyse. Dette er et biologisk testsystem og resultatet kan variere fra den ene dag til den andre, derfor er det nødvendig med testing av komplementfikserende aktivitet flere ganger for å sikre reproducerbare resultater.



Komplementfikseringstesten ble utført tre ganger for hver prøve og grafene (figur 35, 36, 37 og 38) er representativ for alle forsøkene.

**Tabell 16:** ICH<sub>50</sub>-verdier til vannfraksjoner PVU, PVS, PVK og PVM før enzymdegradering samt positiv kontroll BP-II.

Fraksjon	ICH <sub>50</sub> (µg/mL)
PVU	>250
PVS	>250
PVK	>250
PVM	>250
BP-II	56,3



**Figur 35:** Komplementfikserende aktivitet av vannfraksjonene PVU, PVS, PVK, PVM og positiv kontroll BP-II.

### Vannfraksjoner: Diskusjon av biologisk aktivitet (figur 35, tabell 16) i lys av monosakkaridsammensetning (tabell 7) og bindingsanalyse (tabell 12)

Vannfraksjonene (tabell 16) viser svak komplementfikserende aktivitet og ingen nøyaktig ICH<sub>50</sub>-verdi ble beregnet. I en tidligere masteroppgave om pektiner i tomat (Holm, 2018) ble ICH<sub>50</sub>=230,7 µg/mL i VPD (vannekstrahert standard Dometica tomat) og BP-II=18,5 µg/mL. Samme fraksjon i denne oppgave (PVS) ga ICH<sub>50</sub>> 250 µg/mL. Dette skyldes sannsynligvis den høye ICH<sub>50</sub>-verdi for BP-II som ble bestemt til 56,3 µg/mL i denne oppgave. I begge tilfeller tyder det på svak aktivitet i forhold til den positive kontrollen. Der ble ikke testet for konsentrasjoner over 250 µg/mL, da disse uansett ikke vil ha komplementfikserende aktivitet

av betydning. Der antas svak komplementfikserende aktivitet for alle vannfraksjoner idet  $ICH_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ .

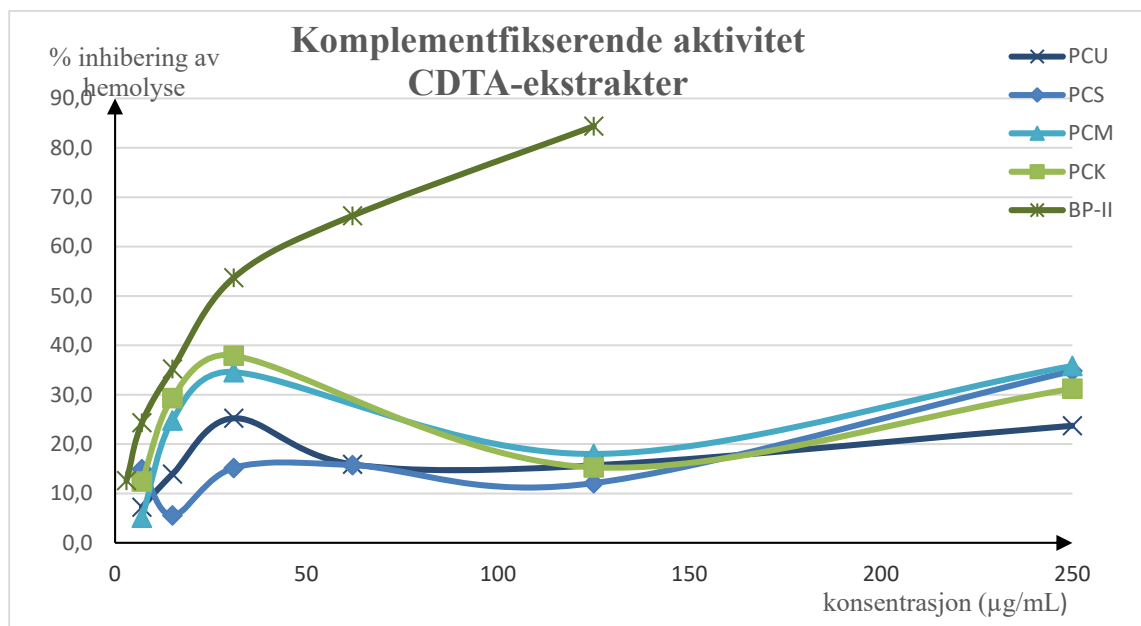
Mulige årsaker til den svake komplementfikserende aktivitet kan være det totale karbohydratinhold i fortynningene, som er mindre enn 50% (tabell 7). Dette betyr, at konsentrasjonene som brukes ved testen bare inneholder 50% karbohydrat. Av det totale karbohydratinhold er det tidligere diskutert (avsnitt 4.2.2) mulig innhold av andre substanser.

HG-region er den største andel i pektinet og dette anses ofte som inaktivt, men er blitt referert som et strukturelt element som kan ha betydning for å holde molekylet i riktig konfigurasjon for optimal aktivitet (Austarheim et al., 2012). Viktige struktur-aktivitetsforhold for komplement modulerende er RG-I-region med AG-I og AG-II sidekjeder (Inngjerdingen et al., 2006) og er ofte tilstede i immunomodulerende polysakkarider (Smestad & Barsett, 2005). Dette betyr, at en svært liten prosentdel av det totale karbohydratinholdet består av de antatt aktive delene, som tidligere har vist god komplementfikserende egenskaper, noe som kan være mulig årsak til den svake komplementfikserende aktivitet (figur35) (tabell 16).

Vannfraksjon fra umoden tomat (PVU) kan ha bedre komplementfikserende aktivitet, enn de andre fraksjoner (figur 34). Monosakkaridinnholdet av galaktose (Gal) er størst i PVU (tabell 7) i forhold til de andre fraksjoner. Spesifikt er relativt store mengder av 1,3-Gal, 1,6-Gal og 1,3,6-Gal (tabell 11) detektert i PVU, hvilke er typiske strukturelle enheter i AG-II. 1,4-Gal er likeledes størst i PVU, som sammen med 1,2,4-Gal indikerer tilstedeværelsen av AG-I i tillegg til tidligere rapportert innhold i tomat (Bonnin et al., 2014). Forholdet (1)(tabell 10) mellom GalA og de nøytrale sukkerne er lavest for PVU, og dermed kortere HG-region, som har vist inaktivitet (Austarheim et al., 2012). Dette kan tyde på, at PVU har bedre aktivitet enn de andre vannfraksjoner, men ikke at effekten er av betydning.

**Tabell 17:**  $ICH_{50}$ -verdier til CDTA-fraksjonene PCU, PCS, PCK, PCM, samt positiv kontroll BP-II

Fraksjon	$ICH_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
PCU	>250
PCS	>250
PCK	>250
PCM	>250
BP-II	26,3



**Figur 36:** Komplementfikserende aktivitet til CDTA-fraksjonene PCU, PCS, PCK, PCM og positiv kontroll BP-II.

### CDTA-fraksjoner: Diskusjon av biologisk aktivitet (figur 36, tabell 17) i lys av monosakkaridsammensetning (tabell 10) og bindingsanalyse (tabell 12)

Alle CDTA-fraksjonene (figur 34, tabell 17) viser  $IC_{50}$ -verdi  $>250 \mu\text{g/mL}$ . I tillegg ser grafene like ut med minimale forskjeller. Dette kan skyldes forholdsvis lik mengde 1,3-Gal, 1,6-Gal og 1,3,6-Gal (AG-II) fra metyleringsresultatene i PCU, PCS og PCM. Total karbohydratinnhold er under 25 % for alle CDTA-fraksjonene, med overveiende GalA innhold, hvilket kan være en grunn til den svake komplementfikseringsaktivitet. Samme Dometica tomatsort etter ekstraksjon med CDTA i en tidligere studie (Holm, 2018) ga en  $IC_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ , noe som bekrefter den svake komplementfikserende effekt fra CDTA-fraksjonene.

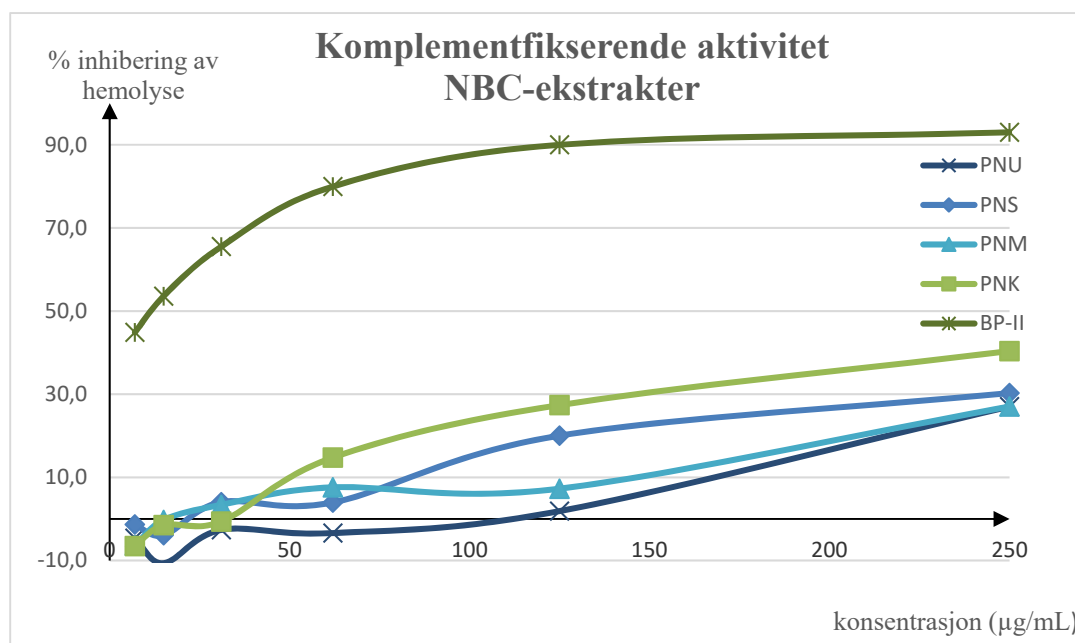
Pektin type polysakkarider kan danne tredimensjonale nettverk ved interaksjoner av de «hårete» områder og / eller ved chelatering mellom frie karboksylgrupper i GalA og  $\text{Ca}^{2+}$  og danne «eggboкс-struktur» (Kiyohara, Cyong, & Yamada, 1988). Der er blitt foreslått (Kiyohara et al., 1988) at metylesterfiseringen av GalA hemmer denne formeringen av egg-boks strukturen (figur 7). Ulik fordeling av metylester grupper kan resultere i forskjellige tredimensjonalt nettverk og påvirke komplementfiksering (Yamada & Kiyohara, 2007). Det kan tyde på, at svak komplementfikserende aktivitet for CDTA-fraksjonene skyldes forskjell i metylesterfordeling.

Terminal arabinose er sannsynligvis bundet til noen av galaktanene på RG-I utover RG-II (Albersheim et al., 2011). Arabinosyl enheter i den ytre del av molekylet ser ikke ut til å spille

en viktig rolle for komplementfikserende aktivitet (Inngjerdingen et al., 2007). PCK inneholder 2,5 ganger mere terminal arabinose (T-Ara) (tabell 12) enn de andre CDTA-fraksjoner. Der observeres ingen forskjell i komplementfikserende aktivitet til PCK, noe som kan vise at arabinosyl-enhetene ikke i seg selv er aktive.

**Tabell 18:** ICH<sub>50</sub>-verdier til NBC-fraksjoner PNU, PNS, PNK, PNM, samt positiv kontroll BP-II

Fraksjon	ICH <sub>50</sub> (µg/mL)
PNU	>250
PNS	>250
PNK	>250
PNM	>250
BP-II	11,7



**Figur 37:** Komplementfikserende aktivitet til NBC-fraksjoner PNU, PNS, PNK, PNM og positiv kontroll BP-II.

### NBC-fraksjoner: Diskusjon av struktur-aktivetsforhold (figur 37, tabell 18) i lys av monosakkaridsammensetning (tabell 11) og bindingsanalyse (tabell 12)

Alle NBC-fraksjonene (figur 35, tabell 18) viser ICH<sub>50</sub>-verdi >250 µg/mL som CDTA og vannfraksjonene. NBC-fraksjonene har imidlertid svakere aktivitet enn CDTA og vannfraksjonene. Dette skyldes, at forholdet (figur 36) mellom aktiviteten til BP-II og NBC-fraksjonene er høyere enn ved de andre ekstraksjonsmidlene (figur 34, 35).

Karakteristiske elementer i AG-I er 1,4-Gal med sidekjeder av 1,5 Ara (Smestad & Barsett, 2005), hvilket er overveiende i NBC-fraksjoner i forhold til vann- og CDTA-fraksjonene. AG-I er mulig tilstede på grunn av spormengde av forgreningspunktet 1,2,4-Gal, hvilket betyr at RG-I er forgrenet med overveiende lineære 1,4-Gal-enheter. Karakteristiske elementer i AG-II er 1,6-Gal, 1,3-Gal med forgreningspunktet 1,3,6-Gal, hvor 1,6-Gal ikke er detektert i PNU, PNS og PNM. Dette tyder på at AG-II muligvis ikke er tilstede.

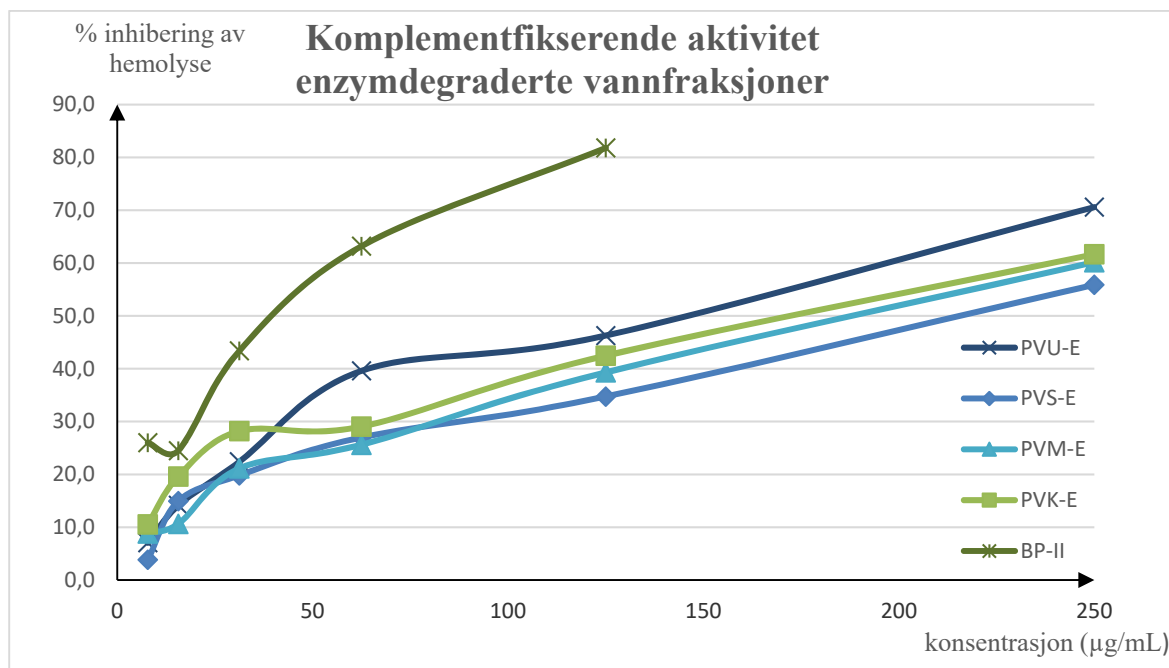
I litteraturen (Smestad & Barsett, 2005) har man observert aktivitet overfor komplement for det meste når AG-II er tilstede alene eller når kombinasjonen av AG-I og AG-II sidekjeder er tilstede i pektinet. Det kan tyde på, at pektin type polysakkarider isolert etter ekstraksjon med NBC-løsning har lav komplementfikserende aktivitet, da AG-II ikke er tilstede.

Ekstraksjon av oppkuttet modnet tomat (PNK) med NBC viser bedre komplementfikserende aktivitet sammenlignet med PNU. PNU har mistet AG-II sidekjeden, fordi 1,6-Gal, 1,3-Gal og 1,3,6-Gal ikke er detektert, hvilket reflekteres på aktiviteten overfor komplement. Der ut over har PNK lavest total karbohydratinnhold (22%) (tabell 11) sammenlignet med det PNU som har høyest karbohydratinnhold (50%). Dette kan bekrefte den merkbare aktiviteten av AG-II-sidekjeden på RG-I, selv om den er tilstede i svært redusert mengde i PNK.

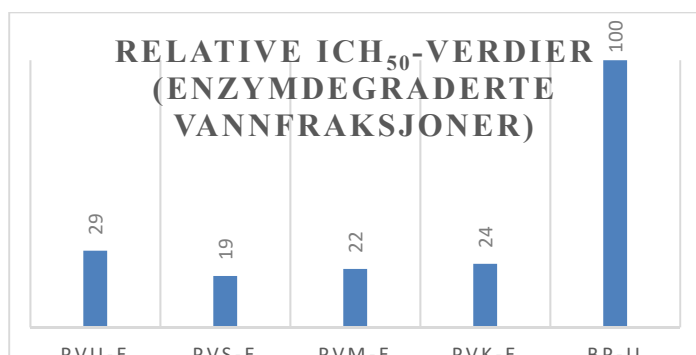
#### 4.4.2 Komplementfikseringstest – enzymdegraderte vannfraksjoner

**Tabell 19:** ICH<sub>50</sub>-verdier til PVU-E, PVS-E, PVK-E, PVM-E samt positiv kontroll BP-II.

Fraksjon	ICH <sub>50</sub> (µg/mL)
PVU-E	144,0
PVS-E	215,2
PVM-E	189,0
PVK-E	173,8
BP-II	41,3



**Figur 38:** Komplementfikserende aktivitet av PVU-E, PVS-E, PVK-E, PVM-E og positiv kontroll BP-II.



**Figur 39:** Relative ICH<sub>50</sub> verdier (%) i forhold til positiv kontroll (BP-II). Grad av komplementfikserende aktivitet sammenlignet med BP-II.

### Enzymdegraderte vannfraksjoner: Diskusjon av struktur-aktivitetsforhold (figur 38, tabell 19) i lys av monosakkaridsammensetning (tabell 14) og bindingsanalyse (tabell 12)

Vannfraksjoner ble behandlet med endo-poly- $\alpha$ -D-(1-4)-polygalakturonase etter de-esterfisering. Dette fører til depolymerisering og redusert innhold av GalA samt isolering av RG-I-region (tabell 11). Der observeres økt komplementfikserende aktivitet for de enzymdegraderte vannfraksjoner enn de opprindelige vannfraksjoner (figur 35, tabell 16). Dette er observert for andre pektin type polysakkarider, som har blitt enzymdegradert med polygalakturonase (Inngjerdingen et al., 2006).

De opprinnelige vannfraksjoner inneholder AG-II- og AG-I-sidekjeder av RG-I (tabell 12). Dette på bakgrunn av det relative innhold av 1,6-Gal, 1,3-Gal, 1,3,6-Gal, 1,4-Gal og 1,2,4-Gal. Der antas at dette også gjelder de enzymdegraderte siden endo-PG degraderer HG og bevarer RG-I. Økt komplementfikserende aktivitet etter enzymdegradering tyder på at RG-I region med tilhørende sidekjeder er viktig for aktivitet. Disse strukturelle elementer har tidligere vist aktivitet på komplement (Inngjerdingen et al., 2006).

Aktiviteten til PVS-E og PVM-E varierende hver gang komplementfikseringstesten ble utført. Den ene fraksjon viste bedre aktivitet enn den andre, sannsynligvis på grunn av minimal forskjell i aktivitet. PVS-E og PVM-E betraktes å ha samme grad av komplementfikserende aktivitet og ICH<sub>50</sub>-verdiene er veiledende (figur 39).

PVU-E hadde lavest ICH<sub>50</sub>-verdi =144 µg/mL (tabell 19) og dermed høyest komplementfikserende aktivitet i alle forsøk som ble utført (figur 38). Grad av RG-I forgrening (3) (figur 14) er størst for PVU-E. Den opprinnelige vannfraksjon (PVU) hadde relativt størst andeler av AG-I og AG-I (tabell 12). Dette bekrefter den viktige betydning av AG-I og AG-II for modulering av komplement.

Graden av komplementfikserende aktivitet for enzymdegraderte vannfraksjoner er fortsatt lavere enn positiv kontrollen BP-II (figur 39). Dette tyder på moderat komplementfikserende aktivitet sammenlignet med BP-II.

## 5 Konklusjon

Pektintype polysakkaridfraksjoner ble isolert fra tomater med ulik modningsgrad, ved ekstraksjon med kokende destillert vann, etterfulgt av ekstraksjon med CDTA og deretter med  $\text{NaBH}_4$  pluss  $\text{NaCO}_3$  (NBC).

Løst assosierte og vannløselige pektiner viser en økning i terminale GalA-enheter ved modning, noe som kan indikere en viss spalting av bindinger i homogalakturonankjeden. Innhold av galaktose blir tydelig lavere ved modning, noe som tyder på en degradering av galaktan- eller arabinogalaktansidekjeder.

Ionebundet pektin isolert med CDTA har ganske lik bindingsstruktur som den vannløselige pektintypen, men lavere metylforestringsgrad og lavere totalt karbohydratinnhold. Ionebundet pektin har lavere innhold av nøytrale monosakkarider som Xyl, Man og Glc og noe lavere andel av forgrenet GalA. Også i disse pektinfraksjonene går galaktoseinnholdet ned ved modning, men 1-4 Gal ser her ut til å degraderes i mindre grad enn de andre galaktose bindingstypene. 1-4 Gal ser også ut til å degraderes mindre ved modning sammenlignet med de vannløselige pektinfraksjonene

Kovalent esterbundet pektin isolert med NBC har et enda lavere innhold av nøytrale monosakkarider som Xyl, Man og Glc enn de andre pektintypene. Arabinose er mindre forgrenet og fremstår som et lineært arabinan med 1-5Ara-enheter. Bindingsanalysen gir inntrykk av hovedsakelig et galaktan av 1-4 Gal-enheter i umoden frukt. 1-4 Gal blir tydelig degradert ved modning, og ved lavere innhold av 1-4 Gal, tydeliggjøres andre galaktose bindingstyper og forgreningspunkter. GalA er mindre forgrenet i de kovalente bundne pektiner enn i de andre pektintypene. Den tydeligste endringen ved modning er nedgang i innhold av galaktose, noe som er likt for de tre forskjellige pektintypene.

Vann-, CDTA- og NBC-fraksjonene utviste ingen eller svak komplementfikserende aktivitet i forhold til positiv kontroll BP-II. Et større område av RG-I isolert etter enzymdegradering av vannfraksjonene, viste høyere aktivitet i komplementsystemet i forhold til de opprinnelige vannfraksjonene. Vannfraksjonene viste bindinger som 1-3 Gal, 1-6 Gal og 1,3,6 Gal noe som kan tyde på AG-II-type arabinogalaktan. Alle pektinfraksjonene fra vannekstraksjonen ga felling med Yariv reagens, noe som stadfester AG-II arabinogalaktanstruktur i disse fraksjonene. AG-II har tidligere vist immunmodulerende effekt, og det kan stemme med at



oppkonsentrering av de forgrenede områdene i de vannløselige pektinfraksjonene gir høyere immunmodulerende aktivitet enn de opprinnelige vannløselige pektinfraksjonene.

# Litteraturliste

- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., & Staehelin, A. (2011). *Plant cell walls*. New York: Garland Science, Taylor & Francis Groups, LLC.
- Amersham Biosciences. (2003). Instructions: PD-10 Desalting column. Retrieved from [http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/dialysis/AMERSHAM\\_PD10Desalting.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/dialysis/AMERSHAM_PD10Desalting.pdf)
- Asif, M. H. (2007). Role of transcription factors in regulating ripening, senescence and organ abscission in plants. *Stewart Postharvest Review*, 3(2), 1-14. doi:10.2212/spr.2007.2.6
- Astrup, A., Folke, H., & Andersen, S. K. (2017). Tomat. Retrieved 06.08.2018, from Den store danske <http://denstoredanske.dk/index.php?sideId=172900>
- Aune, D., Chan, D., Vieira, A., Navarro Rosenblatt, D., Vieira, R., Greenwood, D., & Norat, T. (2012). Dietary compared with blood concentrations of carotenoids and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr*, 96(2), 356-373. doi:10.3945/ajcn.112.034165
- Austarheim, I., Christensen, B. E., Hegna, I. K., Petersen, B. O., Duus, J. O., Bye, R., . . . Paulsen, B. S. (2012). Chemical and biological characterization of pectin-like polysaccharides from the bark of the Malian medicinal tree *Cola cordifolia*. *Carbohydrate Polymers*, 89(1), 259-268. doi:10.1016/j.carbpol.2012.03.005
- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32(1), 170-189. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.11.003
- Bioscience notes. (2018, 14 August). Complement fixation test. Retrieved from <http://www.biosciencenotes.com/complement-fixation-test/>
- Bonnin, E., Garnier, C., & Ralet, M.-C. (2014). Pectin-modifying enzymes and pectin-derived materials: applications and impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 519-532. doi:10.1007/s00253-013-5388-6
- Brummell, D., & Harpster, M. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *An International Journal on Molecular Biology, Molecular Genetics and Biochemistry*, 47(1), 311-339. doi:10.1023/A:1010656104304
- Caffall, K., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879-1900. doi:10.1016/j.carres.2009.05.021
- Chaudhary, P., Sharma, A., Singh, B., & Nagpal, A. K. (2018). Bioactivities of phytochemicals present in tomato. *Journal of Food Science and Technology*, 55(8), 2833-2849. doi:10.1007/s13197-018-3221-z
- Christiaens, S., Van-Buggenhout, S., Houben, K., Chaula, D., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2012). Unravelling process-induced pectin changes in the tomato cell wall: An integrated approach. *Food Chemistry*, 132(3), 1534-1543. doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.148
- Christiaens, S., Van Buggenhout, S., Houben, K., Jamsazzadeh Kermani, Z., Moelants, K. R. N., Ngouémazong, E. D., . . . Hendrickx, M. E. G. (2016). Process–Structure–Function Relations of Pectin in Food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(6), 1021-1042. doi:10.1080/10408398.2012.753029
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131(2), 209-217. doi:10.1016/0008-6215(84)85242-8
- Cui, S. (2005a). Structural analysis of polysaccharides. In S. W. B. R. Cui, Taylor & Francis. (Ed.), *Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications* (pp. 106-145). Boca Raton, Fla: CRC Press.

- Cui, S. (2005b). Understanding carbohydrate analysis. In Y. Brummer & S. Cui (Eds.), *Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications* (pp. 67-99). Boca Raton, Fla: CRC Press.
- Do Nascimento, G. E., Baggio, C. H., Werner, M. F. d. P., Iacomini, M., & Cordeiro, L. M. C. (2016). Arabinoxylan from Mucilage of Tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.): Structure and Antinociceptive Effect in Mouse Models. *Journal of agricultural and food chemistry*, *64*(6), 1239. doi:10.1021/acs.jafc.5b05134
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., & Heinze, T. (2005). Hemicellulose. In T. Heinze (Ed.), *Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use* (pp. 1-67). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Ferreira, S. S., Passos, C. P., Madureira, P., Vilanova, M., & Coimbra, M. A. (2015). Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, *132*, 378-396. doi:10.1016/j.carbpol.2015.05.079
- Filomena, A. P., Cherie, W., Geoffrey, B. F., & Antony, B. (2012). Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. *Nature Protocols*, *7*(9), 1590. doi:10.1038/nprot.2012.081
- Gentilcore, D. (2009). Taste and the tomato in Italy: a transatlantic history. *Food and History*, *7*(1), 125-139. doi:10.1484/j.food.1.100639
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *120*(3), 881-902. doi:10.1007/s11240-014-0664-4
- Greibrokk, T., Lundanes, E., & Rasmussen, K. (1994). Eksklusjonskromatografi (Gelkromatografi). In *Kromatografi - separasjon og deteksjon* (3 ed., pp. 80-100). Universitetsforlaget AS: Oslo.
- Hilz, H., Bakx, E. J., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2005). Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries—characterisation in berries, juice, and press cake. *Carbohydrate Polymers*, *59*(4), 477-488. doi:10.1016/j.carbpol.2004.11.002
- Hiromi, H., Azusa, T., Jun, F., Naoya, S., Hisayoshi, Y., Shinobu, S., & Hiroaki, I. (2013). Tissue specific localization of pectin-Ca<sup>2+</sup> cross-linkages and pectin methyl-esterification during fruit ripening in tomato (*Solanum lycopersicum*). *PLoS ONE*, *8*(11), e78949. doi:10.1371/journal.pone.0078949
- Ho, G. T. T. (2017). *Bioactive compounds in flowers and fruits of Sambucus nigra L.* (Doctoral Thesis), University of Oslo, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, School of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Oslo.
- Holm, V. (2018). *Pektiner i tomat (Solanum lycopersicum L.)*. (Master Thesis), Universitetet i Oslo, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, School of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Oslo.
- Houben, K., Jolie, R. P., Fraeye, I., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2011). Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato: Structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. *Carbohydrate Research*, *346*(9), 1105-1111. doi:10.1016/j.carres.2011.04.014
- Huang, H. C., Wu, L. S., Yu, S. C., Wu, B. J., Lua, A. C., Lee, S. M., & Liu, C. Z. (2018). The Alpha-2A Adrenergic Receptor Gene -1291C/G Single Nucleotide Polymorphism is Associated with the Efficacy of Methylphenidate in Treating Taiwanese Children and Adolescents with Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Psychiatry Investig.* doi:10.30773/pi.2017.07.24
- Inngjerdingen, K. T., Coulibaly, A., Diallo, D., Michaelsen, T. E., & Paulsen, B. S. (2006). A Complement Fixing Polysaccharide from *Biophytum petersianum* Klotzsch, a Medicinal Plant from Mali, West Africa. *Biomacromolecules*, *7*(1), 48-53. doi:10.1021/bm050330h

- Inngjerdingen, K. T., Kiyohara, H., Matsumoto, T., Petersen, D., Michaelsen, T. E., Diallo, D., . . . Paulsen, B. S. (2007). An immunomodulating pectic polymer from *Glinus oppositifolius*. *Phytochemistry*, *68*(7), 1046-1058. doi:10.1016/j.phytochem.2007.01.011
- Institutt for biovitenskap. (2019, 22 February). Tomat. Retrieved from <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/t/tomat.html>
- Jackman, R. L., & Stanley, D. W. (1995). Perspectives in the textural evaluation of plant foods. *Trends in Food Science & Technology*, *6*(6), 187-194. doi:10.1016/S0924-2244(00)89053-6
- Jarvis, M. C. (1982). The proportion of calcium-bound pectin in plant cell walls. *Planta*, *154*(4), 344-346. doi:10.1007/bf00393913
- Jenkins, J. (1948). The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, *2*(4), 379-392. doi:10.1007/BF02859492
- Keegstra, K. (2010). Plant Cell Walls. *Plant Physiology*, *154*(2), 483. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/154/2/483.abstract>. doi:10.1104/pp.110.161240
- Kim, J. B., & Carpita, N. C. (1992). Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of Cell Wall Polysaccharides during Elongation of Maize Coleoptiles. *Plant Physiology*, *98*(2), 646-653. doi:10.1104/pp.98.2.646
- Kiyohara, H., Cyong, J.-C., & Yamada, H. (1988). Structure and anti-complementary activity of pectic polysaccharides isolated from the root of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Carbohydrate Research*, *182*(2), 259-275. doi:10.1016/0008-6215(88)84007-2
- Kjeldsen, K., Nielsen, L., & Peterslund, N. T., M. (2006). Infektioner hos immunkompromitterede patienter. In N. Peterslund (Ed.), *Infeksjonssygdomme og mikrobiologi* (pp. 217-218). København, Danmark: Akademisk forlag.
- Knapp, S., & Peralta, I. E. (2016). *The Tomato (Solanum lycopersicum L., Solanaceae) and Its Botanical Relatives*. In M. Causse, J. Giovannoni, M. Bouzayen, & M. Zouine (Eds.), *The Tomato Genome* (pp. 7-21). doi:10.1007/978-3-662-53389-5\_2
- Koh, E., Charoenprasert, S., & Mitchell, A. E. (2012). Effects of industrial tomato paste processing on ascorbic acid, flavonoids and carotenoids and their stability over one-year storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *92*(1), 23-28. doi:10.1002/jsfa.4580
- Kokini, J. L., & Chou, T. C. (1993). Comparison of the conformation of tomato pectins with apple and citrus pectins. *Journal of Texture Studies*, *24*(2), 117-137. doi:10.1111/j.1745-4603.1993.tb00039.x
- Michaelsen, T. E., Gilje, A., Samuelsen, A. B., Høgåsen, K., & Paulsen, B. S. (2000). Interaction Between Human Complement and a Pectin Type Polysaccharide Fraction, PMII, from the Leaves of *Plantago major* L. *Scandinavian Journal of Immunology*, *52*(5), 483-490. doi:10.1046/j.1365-3083.2000.00801.x
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, *11*(3), 266-277. doi:10.1016/j.pbi.2008.03.006
- Mudgil, D. (2017). The Interaction Between Insoluble and Soluble Fiber. In *Dietary Fiber for the Prevention of Cardiovascular Disease* (pp. 35-59). London, England.
- Müller-Maatsch, J., Bencivenni, M., Caligiani, A., Tedeschi, T., Bruggeman, G., Bosch, M., . . . Sforza, S. (2016). Pectin content and composition from different food waste streams. *Food Chemistry*, *201*, 37-45. doi:10.1016/j.foodchem.2016.01.012
- Nielsen, S. S. (2017). Total Carbohydrate by Phenol-Sulfuric Acid Method. In S. S. Nielsen (Ed.), *Food Analysis Laboratory Manual* (3 ed., pp. 137-141). Cham: Springer International Publishing.
- Opplysningskontoret for frukt og grønt. (2019). Tomat. Retrieved from <https://www.frukt.no/sok/#!/query=tomat>.

- Palomo, I., Fuentes, E., Padró, T., & Badimon, L. (2012). Platelets and atherogenesis: Platelet anti-aggregation activity and endothelial protection from tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3(4), 577-584. Retrieved from <https://search.proquest.com/docview/1859678527?accountid=14699>
- Pedersen-Bjergaard, S., & Rasmussen, K. E. (2010). *Legemiddelanalyse* (2 ed.). Bergen: Fagbokforlaget.
- Pettolino, F. A., Walsh, C., Fincher, G. B., & Bacic, A. (2012). Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. *Nature Protocols*, 7, 1590. doi:10.1038/nprot.2012.081
- Plants USDA. (2018). Classification for Kingdom Plantae Down to Species *Solanum lycopersicum* L. Retrieved 09.09.18, from Plants database <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=SOLY2>
- Popper, Z. A. (2011). Extraction and detection of arabinogalactan proteins. In *The Plant Cell Wall : Methods and Protocols* (Vol. 715). Totowa, NJ: Humana Press : Imprint: Humana Press.
- Pressey, R., & Reger, B. J. (1989). Polygalacturonase in pollen from corn and other grasses. *Plant Science*, 59(1), 57-62. doi:10.1016/0168-9452(89)90008-3
- Renard, C. M. G. C., Crépeau, M.-J., & Thibault, J.-F. (1999). Glucuronic acid directly linked to galacturonic acid in the rhamnogalacturonan backbone of beet pectins. *European Journal of Biochemistry*, 266(2), 566-574. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00896.x
- Rosenqvist, E. (2009). Klase af væksthudyrkede tomater (Fotografi). Available from NTB scanpix Retrieved 12.05.2019 <https://scanpix.no/spWebApp/preview/editorial/20120622-140516-6>
- Round, A. N., Rigby, N. M., Macdougall, A. J., Ring, S. G., & Morris, V. J. (2001). Investigating the nature of branching in pectin by atomic force microscopy and carbohydrate analysis. *Carbohydrate Research*, 331(3), 337-342. doi:10.1016/S0008-6215(01)00039-8
- Saladié, M., Matas, A. J., Isaacson, T., Jenks, M. A., Goodwin, S. M., Niklas, K. J., . . . Rose, J. K. C. (2007). A Reevaluation of the Key Factors That Influence Tomato Fruit Softening and Integrity. *Plant Physiology*, 144(2), 1012-1028. doi:10.1104/pp.107.097477
- Schoolworkhelper. (2017). Selective permeability of dialysis tubing lab: Explained. Retrieved from <https://schoolworkhelper.net/selective-permeability-of-dialysis-tubing-lab-explained/>
- Seymour, G. B., Colquhoun, I. J., Dupont, M. S., Parsley, K. R., & R. Selvendran, R. (1990). Composition and structural features of cell wall polysaccharides from tomato fruits. *Phytochemistry*, 29(3), 725-731. doi:10.1016/0031-9422(90)80008-5
- Smestad, B. P., & Barsett, H. (2005). Bioactive Pectic Polysaccharides. In T. Heinze (Ed.), *Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use* (pp. 69-101). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Smith, D. L., Abbott, J. A., & Gross, K. C. (2002). Down-regulation of tomato  $\beta$ -galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant Physiology*, 129(4), 1755-1762. doi:10.1104/pp.011025
- Sparkman, O. D., Penton, Z. E., & Kitson, F. G. (2011). Appendix G - Derivatization in GC/MS. In *Gas Chromatography and Mass Spectrometry (Second Edition)* (pp. 445-458). Amsterdam: Academic Press.
- Sunding, P. (2018, 20 February). Tomat. *Søtvierfamilien*. Retrieved from <https://snl.no/tomat>
- Sweeley, C. C., Bentley, R., Makita, M., & Wells, W. W. (1963). Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugars and Related Substances.

- Journal of the American Chemical Society*, 85(16), 2497-2507.  
doi:10.1021/ja00899a032
- Thakur, B., Singh, R., Handa, A., & Rao, M. A. (1997). Chemistry and uses of pectin — A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 47-73.  
doi:10.1080/10408399709527767
- ThermoFischer Scientific. (2009). Dialysis Methods for Protein Research. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/dialysis-methods-protein-research.html>
- Thi, T. (2014). GC instrument: injector. *Slideshare* Retrieved from <https://www.slideshare.net/thuochantruongthi/gas-chromatography-cc-ms-principles-is20080418>
- Tortora, G. D. B. (2014). Lymphatic system and immunity. In *Principles of anatomy and physiology* (14 ed., pp. 904).
- van Holst, G.-J., & Clarke, A. E. (1985). Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. *Analytical Biochemistry*, 148(2), 446-450.  
doi:10.1016/0003-2697(85)90251-9
- Voragen, A. G., Daas, P., & Schols, H. (2000). Enzymes as tools for structural studies of pectins. In B. Paulsen (Ed.), *Bioactive carbohydrate polymers* (pp. 129-142). Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Waldron, K., & Faulds, C. (2007). 1.05 - Cell Wall Polysaccharides: Composition and Structure. In H. Kamerling (Ed.), *Comprehensive Glycoscience* (pp. 181-201). Oxford: Elsevier.
- Yamada, H., & Kiyohara, H. (2007). 4.34 - Immunomodulating Activity of Plant Polysaccharide Structures. In H. Kamerling (Ed.), *Comprehensive Glycoscience* (pp. 663-694). Oxford: Elsevier.
- Yapo, B. M. (2011). Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 373-385.  
doi:10.1016/j.carbpol.2011.05.065
- Zykwinska, A. W., Ralet, M.-C. J., Garnier, C. D., & Thibault, J.-F. J. (2005). Evidence for in vitro binding of pectin side chains to cellulose (1). *Plant Physiology*, 139(1), 397.  
doi:10.1104/pp.105.065912