

Enzyminhibering av guluronatoligomere i farmasøytiske applikasjoner

Brita Røyrvik

Bioteknologi

Oppgaven levert: Mai 2011

Hovedveileder: Kurt Ingar Draget, IBT

Biveileder(e): Catherine Taylor Nordgård, IBT

FORORD

Denne oppgaven ble utført ved Norges teknisk-naturvitenskaplige universitet ved Institutt for bioteknologi som en del av det 5-årige masterprogrammet i realfag, innen bioteknologi.

Jeg vil gjerne takke veilederne mine; Kurt Ingar Draget, forsker/Professor II, og Dr. Catherine Taylor Nordgård ved Institutt for bioteknologi for deres veiledning og råd gjennom arbeidet med oppgaven.

Jeg vil også gjerne takke Wenche Iren Strand for å ha utført $^1\text{H-NMR}$ analysene og ha vært en støtte jeg kunne henvende meg til, og Olav Andreas Aarstad for å ha utført HPAEC-PAD analysene og også hjulpet meg med både stort og smått på laben. Jeg vil også takke min familie og kjæreste for at de har hatt troen på meg med støtte og oppmuntring studietiden. Til slutt vil jeg også takke alle mine venner og studievenner som jeg har kunnet dele både frustrasjoner og gleder i studietilværelsen med.

SAMMENDRAG

Alginat har en lang tradisjon som en allsidig marin ressurs. Det har i en årrekke blitt forsket på mulige anvendelser av alginat. Alginatets gelingsevne er den egenskapen som for det meste er blitt utnyttet. I de senere årene er det blitt forsket på oligomere av G-sekvenser i alginat, G-blokker, som har vist seg å ha en interessant effekt på nettopp gelnettverk. Dette har ført til uttesting av G-blokker til bruk i behandling av pasienter med cystisk fibrose.

Alginat har vist seg å ha en effekt på enzymaktivitet til fysiologisk viktige enzymer som pepsin og lipase. Det er derfor av interesse å undersøke om G-blokker kan gi en lignende effekt på enzymer. Dette spesielt siden G-blokk er under klinisk testing, som naturligvis vil føre til at G-blokker vil komme i kontakt med mange av enzymene i kroppen.

I denne oppgaven ble G-blokker med en gjennomsnittlig polymeriseringsgrad, $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 opparbeidet. G-blokkenes effekt ble undersøkt ved å sette de til enzymatiske nedbrytninger. Undersøkelsene ble utført ved å måle endring i viskositet over tid for nedbrytningen av kitosan med lysozym. G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ ble tilsatt til nedbrytningen, og det ble observert en reduksjon i hastigheten til nedbrytningen, noe som tyder på at G-blokken inhiberer enzymets aktivitet. Det ble også utført viskositetsmålinger for nedbrytningen av høymolekylært poly-M med M-lyase ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 . Her ble det observert en nedgang i nedbrytingshastigheten, og det var en sterkere effekt ved tilsats av $\overline{DP}_n \sim 10$ enn ved ~ 20 . For å undersøke effekten tilsats av G-blokk hadde på nedbrytningen av høymolekylært G-rik alginat med GG-lyase ble endringen i absorbans ved 230 nm målt over tid. En økning i absorbans ved denne bølgelengden tyder på en nedbrytning av alginat med alginat lyase. Her ble det observert en kompleks påvirkning på nedbrytningen ved tilsats av G-blokk. Ved $\overline{DP}_n \sim 10$ ble det observert en inhibering, mens det ved tilsats av $\overline{DP}_n \sim 20$ var en mer kompleks effekt, der lave konsentrasjoner førte til en inhibering mens høyere konsentrasjoner førte til en økning i nedbrytingshastighet.

LISTE AV FORKORTELSER

CF – Cystisk Fibrose

\overline{DP}_n – gjennomsnittlig grad av polymerisering

D₂O – deuterium oksid, tungtvann

G – α -L-guluronan

GlcNAc – 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranose (A)

GlcN – 2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranose (GlcN, eller D)

HMW – høymolekylært

HPAEC-PAD – Høypresisjonsanionbytterkromatografi med pulsamperometrisk deteksjon

M – β -D-mannuronan

MCS – mukociliært system

mM – millimolar

M_w – molekylærvækt

NAG – N-acetylglukosamin

NAM – N-acetylmuraminsyre

NMR – Kjernemagnetisk resonans spektroskopi

[η] – relativ viskositet

[η_{sp}] – spesifikk viskositet

OD – optisk tetthet

PGM – Pig Gastric Mucin

TTHA – trietylen-tetraamin-heksaacetat

TSP – trimetylsilylpropionat

X_w – grad av polymerisering

INNHALDSFORTEGNELSE

Forord	I
Sammendrag	III
Liste av forkortelser	IV
Introduksjon	1
1.1 Bakgrunn for oppgaven	1
1.2 Alginat	2
1.2.1 Opprinnelse	2
1.2.2 Struktur og funksjon	3
1.2.2 Anvendelser	6
1.3 Enzyminhibering	11
1.4 Teori bak Analysemetoder	14
1.4.1 Utfelling og nedbrytning av G-blokk	14
1.4.2 Kjernemagnetisk resonans spektroskopi (NMR)	15
1.4.3 Anionbytterkromatografi med pulsamperometrisk deteksjon (HPAEC-PAD)	16
1.4.4 Viskositetsmåling	17
1.4.5 Absorbans 230 nm	18
2.0 Materiale og metode	19
2.1 Prøveforberedelse	19
2.1.1 Felling og syrehydrolyse av G-blokk	19
2.1.2 Felling av poly-M	20
2.2 Metoder	21
2.2.1 Anionbytterkromatografi med pulsamperimetriske deteksjon (HPAEC-PAD)	21
2.2.2 NMR av guluronatoligomere	22
2.2.3 Viskositetsmåling	22
2.2.4 Absorbans UV 230 nm	25
3.0 Resultat og diskusjon	26
3.1 Prøveopparbeidelse	26
3.1.1 Metodeutvikling av prosedyre for produksjon av G-blokk $DP_n \sim 10$	26
3.2 Kitosan og lysozym	29
3.2.1 målinger av nedbrytning ved tilsatt av G-blokk	29
3.2.2 Diskusjon kitosan og lysozym tilsatt G-blokk	36

3.3 poly-M og M-lyase	37
3.3.1 Resultat fra måling av nedbrytning ved tilsats av G-blokk.....	37
3.3.2 Diskusjon	49
3.4 Høy-G alginat og GG-lyase.....	51
3.4.1 Viskositetsmåling	51
3.4.2 Absorbansmåling av Høy-G og G-blokk $DP_n \sim 10$ og ~ 20	52
3.4.3 Resultatene opp mot sin egen kontroll	57
3.4.5 G-blokk som substrat for GG-lyase.....	63
3.4.6 Diskusjon	66
3.5 Generell diskusjon	68
3.6 Forslag til videre studier	70
4.0 Konklusjon	71
Referanseliste.....	72
Vedleggsliste.....	1

1.0 INTRODUKSJON

1.1 BAKGRUNN FOR OPPGAVEN

Målet med dette prosjektet har vært å undersøke hvilken effekt G-blokker har på enzymaktiviteten til fysiologisk og farmasøytisk relevante enzymer. G-blokker er oligomere av G-sekvenser i alginat.

Alginat kan brytes ned til oligomere og anrikes på G-enheter, G-blokker, som også er av interesse på grunn av deres evne til å endre egenskaper til geler. Denne evnen gjør at G-blokk kan ha potensiale innen behandling av cystisk fibrose (CF). Det blir nå utført kliniske tester for å undersøke dette potensialet. Her skal G-blokk redusere viskositeten til det uvanlig viskøse slimet som overproduseres i pasienter med CF. Da G-blokk har en evne til å endre viskositeten til slim, er det også en potensiell anvendelse av denne til å øke biotilgjengeligheten over slimhinner for levering av medisin.

Alginat har blitt utnyttet i lang tid, og det er gelingsevnen som har vært den dominerende egenskapen som tidligere er utnyttet. Det har i en årrekke blitt forsket på mulige anvendelser av alginat. Et aktuelt forskningsområde er bruken av alginat innen farmasi. Det er utført forskning som viser at alginat kan ha en effekt på fysiologisk viktige enzymer som pepsin og lipase. Da G-blokker potensielt skal brukes til behandling av CF, vil det være naturlig å undersøke om også G-blokk kan ha en effekt på enzymaktivitet til fysiologisk og farmasøytiske viktige enzymer.

1.2 ALGINAT

1.2.1 OPPRINNELSE

Alginat er en spennende marin ressurs som har blitt utnyttet i Norge i en årrekke. Fra 1950 og til i dag er det blitt utført iherdig forskning på "Norges nasjonalmolekyl". Dette har ført til at alginatets unike oppbygning og potensiale for anvendelse i et stort antall ulike områder har blitt avdekket (Indergaard 2010).

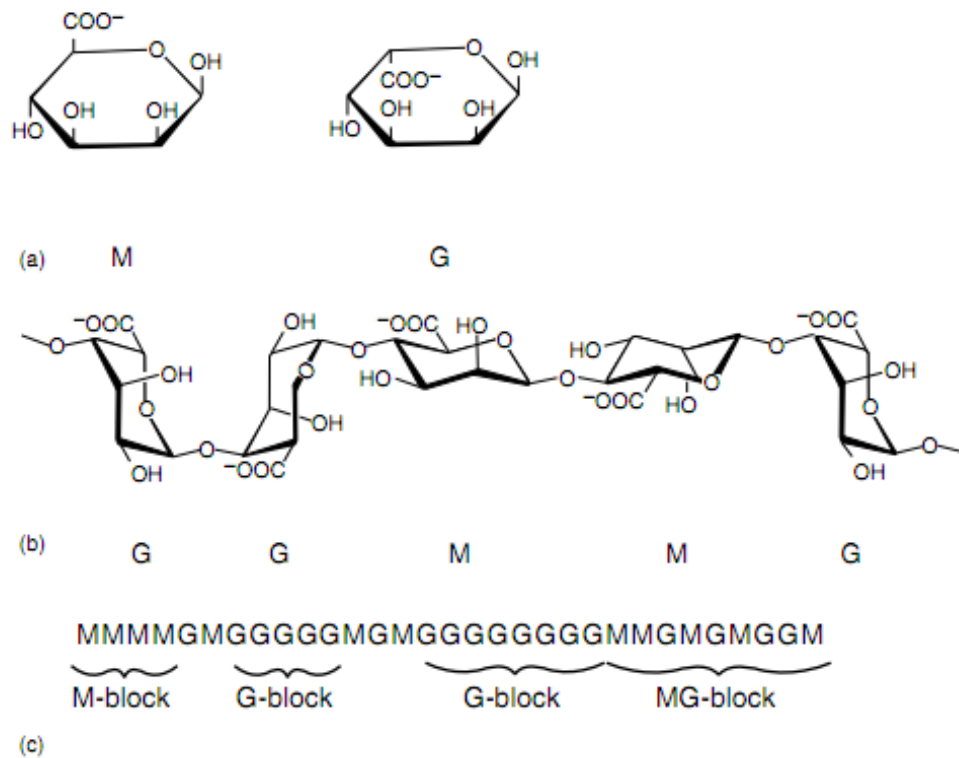
Det er rikelige forekomster av alginat i naturen, som strukturkomponent i marine brunalger, *Phaeophyceae*, og som kapsulære polysakkarider i enkelte typer bakterier. Kommersielt tilgjengelig alginat kommer i dag hovedsakelig fra alger, og da spesielt stortare, *Laminaria hyperborea* (Draget et al. 2006). Kysten av Norge er naturlig rik på denne ressursen. Klimaet, sesongene og den viktige tilstrømningen fra Golfstrømmen gjør at kysten vår gir ypperlige vekstvilkår for brunalger. I Norge blir det hvert år høstet mellom 150 000 og 170 000 tonn stortare fra Rogaland til Sør-Trøndelag til produksjon av alginat (Steen 2009). Figur 1.1 viser stortare ved lavvann i Trondheimsfjorden.



Figur 1.1: Stortare, *L. hyperborea*, ved lavvann i Trondheimsfjorden.

1.2.2 STRUKTUR OG FUNKSJON

Alginat er lineære, binære kopolymere bestående av (1→4) bundne β -D-mannuronat (M)- og α -L-guluronat (G) – monomere, som vist i Figur 1.2. Sammensetning og sekvens av disse varierer, noe som kan gi de resulterende polymerene vidt forskjellige kjemiske og biologiske egenskaper (Draget et al. 2011).

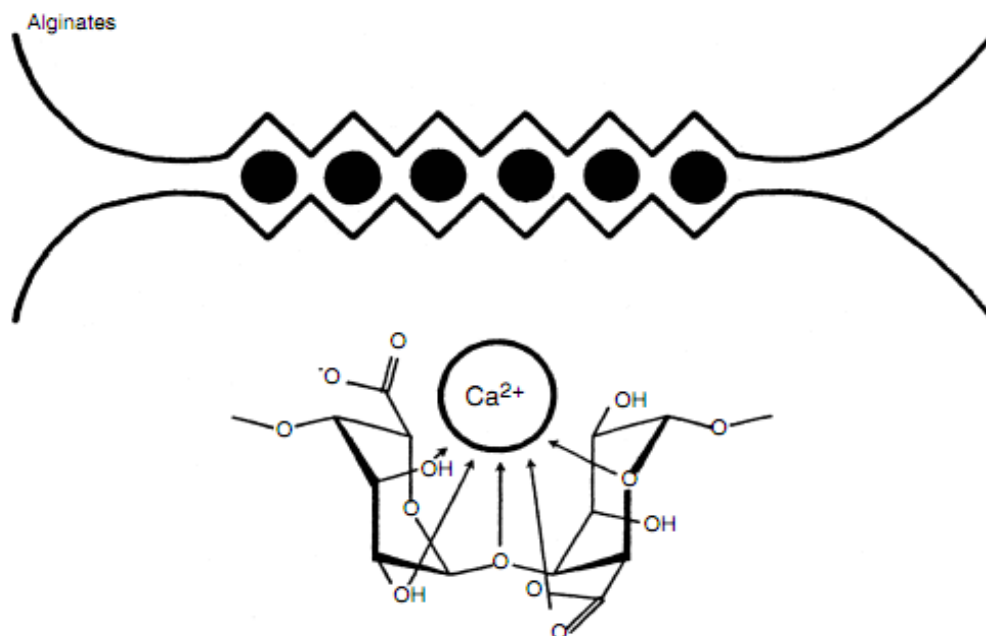


Figur 1.2: (a) monomerene β -D-mannuronat (M) og α -L-guluronat (G), (b) alginatkjede i stolkonformasjon, (c) en alginatkjede med M-, G- og MG-blokker (Draget et al. 2006).

Biosyntesen av alginat i brunalger er noe spesiell, da det først dannes polymannuronan, en homopolymer kun bestående av β -D-mannuronat (M)-monomere. Dette ble vist for første gang i 1966 av Lin og Hassid (Lin et al. 1966b, a). Videre blir noen av M-monomerene i denne polymeren omdannet av mannuronan C-5 epimeraser. Dette ble først vist ved undersøkelser av biosyntesen av alginat i bakterien *A. vinelandii* i 1971 (Larsen et al. 1971). I 1973 bekreftet i 1973 av Madgwick *et al* at det var et tilsvarende spor for biosyntese av alginat i brunalger da de påviste tilstedeværelse av mannuronan C5-epimerase-aktivitet i et cellefritt ekstrakt fra *Pelvetia canaliculata* (Madgwick et al. 1973). Kunnskapen vi i dag har om biosyntesen av alginat, og da spesielt detaljene rundt C-5 epimeriseringstrinnet, kommer hovedsakelig fra forskning utført på bakterier.

Epimeriseringen resulterer i at konformasjonen til C-5 (karbon nr 5 i sukkerringen) endres slik at karboksylsyre (COOH) – gruppen peker nedover, vist i Figur 1.2 a. Dette gir et nytt sukker, α -L-guluronat (G), som på grunn av endring av konformasjonen i C-5 vil ha en 1C_4 -konformasjon mens M har 4C_1 , vist i Figur 1.2 b (Draget et al. 2006).

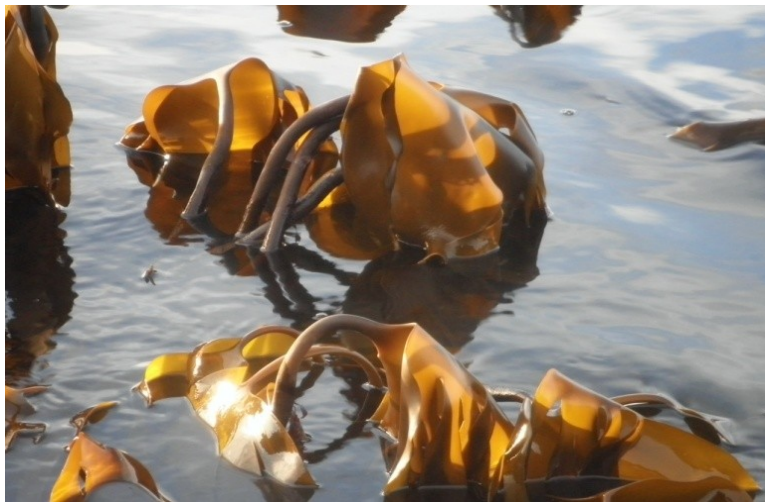
Sammensetningen og sekvensen av de to monomere M og G har stor betydning for funksjonen av alginatet. Når epimeraser omdanner M til G, vil det dannes blokkstrukturer i alginatet. Disse kan være sekvenser bestående av kun M, kun G, eller alternerende M og G, vist i Figur 1.2 I alginat er det ingen repeterende enheter, og heller ikke en tilfeldig fordeling av de to monomere i polymerkjeden (Draget et al. 2006).



Figur 1.3: Antatt modell for geling i alginat, hvordan to lengre sekvenser av G-enheter går sammen i bindingen av Ca^{2+} , "eggeboksmodellen". Guluronat-enheterne i alginat binder spesifikt Ca^{2+} -ion (Grant et al. 1973).

Gelingsevnen til alginat er basert på alginatets selektive binding til multivalente ioner, og er uavhengig av temperatur. Sammensetningen av M og G er viktig for gelingen (A. S. Haug, O. 1964). Polymannuronan har nær ingen selektiv affinitet for ionebinding, mens polyguluronan har en høy affinitet (Draget et al. 2006). Den gjeldende modellen for geling, "eggeboks-modellen", er vist i Figur 1.3 (Grant et al. 1973). Der er også binding av Ca^{2+} til G vist, der konformasjonen til G er viktig. Innholdet av G-enheter og lengden på sekvensene som fører til en geling har betydning for gelstyrken (Kohn et al. 1972; Smidsrød 1974).

Betydningen monomersammensetningen på funksjonen til alginat er tydelig i stortare. Alginat fungerer som et strukturelt komponent, og sammensetningen er ulik fra stilk og festeorgan til bladet, se Figur 1.4. Der stilken stivere enn det fleksible bladet. Dette for at stilken og festeorganet skal kunne motstå kraften fra bølgene og for å holde bladet opp mot sollyset. Sammensetningen av alginatet fra stilken har et høyere innhold av G-enheter som gir det mekanisk styrke. Bladet er mye mer fleksibelt, og sammensetningen



her har et lavere innhold av G. Sammensetningen av alginat varierer også mellom ulike arter, som *L. hyperborea* som har sammensetning med et høyt innhold av G, og *L. japonica* som har et lavere nivå av G (Draget et al. 2006).

Figur 1.4: Stortare der stilken er mer robust og stiv enn de fleksible bladene. Viser hvordan strukturen av alginat påvirkes av sammensetningen av M og G.

G-BLOKK

Sekvensene av G-enheter i alginat har en viktig rolle i alginatets evne til å gele, men det viser seg også at oligomere av disse G-sekvensene, G-blokker, er av interesse. Det er mulig å ekstrahere og separere de ulike delene av alginatet og få anriket for eksempel G. Denne kan videre bli brutt ned til en spesifikk grad av polymerisering ved kontrollert syrehydrolyse (A. & Smidsrød Haug, O. 1966). Det er da mulig å undersøke denne bestanddelen av alginatet.

Det er funnet at disse frie G-blokkene har en effekt på alginatgeler, der de konkurrerer med sekvensene av G i alginat for Ca^{2+} -ionene. Størrelsen av G-blokkene hindrer dem fra å bidra til nettverket og dermed senker de gelstyrken. Slik kan de fungere som modulator for reologien til alginatgeler (Jørgensen et al. 2007)

Det er også blitt vist at G-blokk har en effekt på mucus og mucin/alginat-nettverk, men mekanismen for dette er ennå ikke fastslått. Disse funnene har ført til at det er startet

uttesting på bruk av G-blokk som aktivt farmasøytisk stoff for behandling av hyperviskositet i slim (Draget et al. 2011; Taylor et al. 2006), se .

1.2.2 ANVENDELSER

I norsk sammenheng var det alginatets egenskap som bindemiddel som først ble utnyttet, men senere er det alginatets gelingsevne den viktigste egenskapen som utnyttet kommersielt (Indergaard 2010). I matindustrien brukes alginat i dag som fortykningsmiddel, dispergeringsmiddel og geldanner i mange forskjellige produkter som is, syltetøy, ketchup, eller som stabilisator i sauser eller dypfryste matvarer (Draget et al. 2006). Gelingsevnen til alginat kan også benyttes til å danne gelkuler, som har flere ulike anvendelser. En anvendelse er innen landbruk der alginatkulene fungerer som kunstige frø. Planteceller kan da immobiliseres i alginat (Draget et al. 1989), og har potensial til å fungere som kunstige frø. Dette vil potensielt gi en større sjanse for vellykkede avlinger, som er avgjørende for overlevelse i de fattigste delene av verden. Disse kulene har også potensiale innen farmasøytiske anvendelser, og alginat har også flere muligheter innen farmasøytiske applikasjoner.

FARMASØYTISK ANVENDELSE AV ALGINAT

Innen farmasøytiske applikasjoner har alginat flere anvendelsesområder. Gelingsevnen er viktig for anvendelsen innen dette området. Alginat kan for eksempel brukes som matriks i innkapsling av medisin. Da gelingen av alginat er uavhengig av temperatur, er det dermed en stor fordel med tanke på lagring av eventuelle produkt i tillegg til at det gjør det enklere å kapsle inn temperatursensitive stoffer.

Alginat brukes også til sårheling, som forbindelse for sår. Her er gelingsevnen avgjørende for bidraget til sårheling disse forbindingene har. Alginat gel er en naturlig blodstopper (hemostat), og brukes derfor til blødende sår. Siden det er en gel, er det heller ikke like mange problemer med smerte ved bytte av forbindelse, og det fuktige miljøet gelen bidrar med fører til raskere sårheling (Willi et al. 2004).

Gelingsevnen til alginat brukes også i antirefluksmiddelet Gaviscon^(R), der det hindrer sure oppstøt ved at det dannes et skumlag ved kontakt med magesyren. Alginatet og de andre reagensene vil sammen danne et alginatskum. I dette skummet dannes CO₂-gass

som fører til at det legger seg over mageinnholdet. Dette vil hindre sure oppstøt ved at det sure innholdet i magen ikke kan nå opp i spiserøret (Gaviscon 2011).

Et annet eksempel der gelingsevnen til alginat utnyttes er immobilisering av levende celler som videre kan transplanteres *in vivo*, til behandling av for eksempel diabetes. Da immobiliseres en gruppe celler, langerhanske øyer, som består av sensoriske og insulinproduserende celler. Disse bidrar til å regulere blodsukkeret i pasienter med diabetes (Soon-Shiong et al. 1992). En annen anvendelse av gelkulene kan være til kommersiell produksjon av et ønskelig enzym eller stoff. Figur 1.5 viser immobiliserte gjærceller for produksjon av etanol, som kan anvendes til produksjon av musserende vin.



Figur 1.5: Alginatkuler med immobiliserte gjærceller for produksjon av etanol. (Foto: Brita Røyrvik, 2010)

Alginat har også blitt brukt som aktivt virkestoff i farmasøytisk applikasjon ved at det er påvist at alginat har en effekt på fysiologiske enzymer. Det pågår forskning rundt bruk av alginat som en nutraceutical, et kosttilskudd med helsegevinst. Dette grunnet at det er forskning som viser at alginat kan inhibere enzymaktiviteten til pepsin (Dettmar et al. 2001) og lipase (Pearson et al. 2010) og dermed bidra til vekttap.

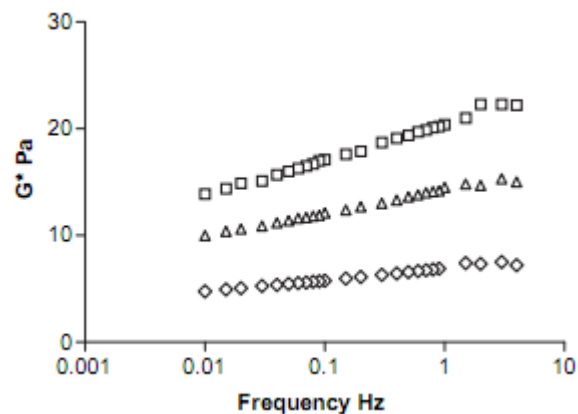
Siden høymolekylært alginat er vist å ha en effekt på enkelte enzymer er det da også interessant å se om guluronatoligomere, G-blokk, kan ha en tilsvarende effekt.

FARMASØYTISK ANVENDELSE AV G-BLOKK

For pasienter med (CF), er det problematisk å få opp og ut det tykke slimet som dannes i lungene. Det mukociliære systemet (MCS) i lungene hos mennesker er til for å holde lungene "rene", hindre patogene angrep og for å transportere ut uønskede elementer. Det består av mucus (slim), cilia (flimmerhår) og luftveisvæske. Sammen vil disse føre slimet i lungene mot strupehodet. Om dette ikke er effektivt nok, er hosting andrelinjeforsvaret. I pasienter med cystisk fibrose klarer ikke MCS effektivt nok å forflytte det hyperviskøse slimet som oppstår (Taylor et al. 2006).

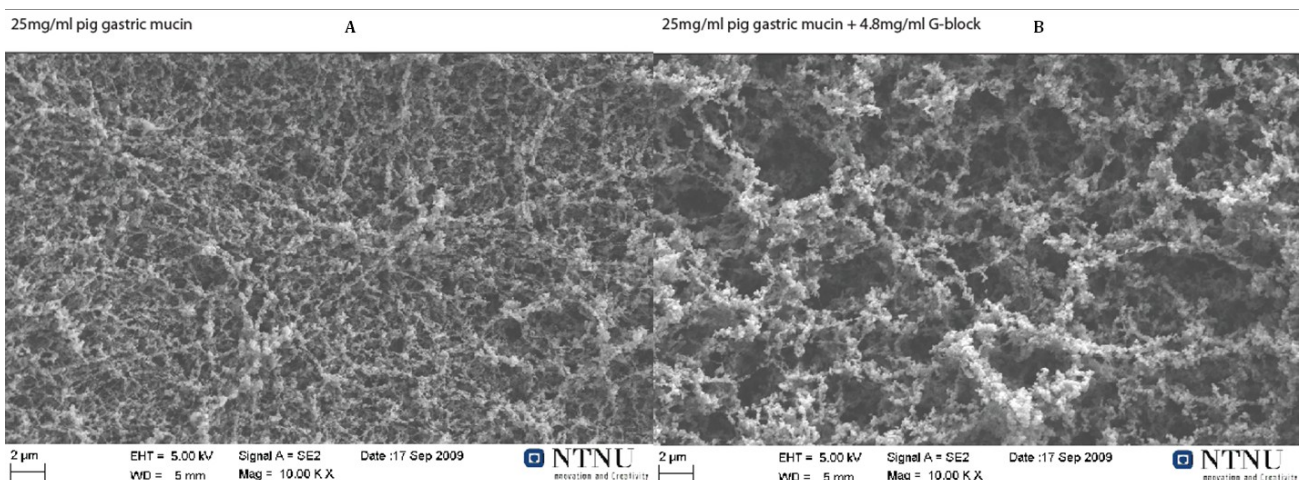
Det er tidligere nevnt at G-blokk har en evne til å modulere egenskapene til geler av alginat. I alt slim som produseres i kroppen finnes mucin, molekyler som er geldannende

og ansvarlige for de fysiske egenskapene til slimet (Taylor et al. 2006). Det er også vist at G-blokk har en effekt på nettverket til mucus/mucin, se Figur 1.6.



Figur 1.6: Mekanisk spectra av delvis rensert fersk Pig Gastric Mucus (PGM, Δ), med tilstedeværelse av høymolekylær alginat (HMW, □) og PGM/HMW alginatblanding med tilstedeværelse av oligogulonat (◊) (Draget et al. 2011).

Høymolekylært (HMW) alginat og G-blokk ble tilsatt til en modell- mucingel (Pig Gastric Mucin, PGM). Ved tilsats av HMW til PGM øker den mekaniske responsen mer enn ved kun PGM. Ved tilsats av G-blokker til det blandede systemet reduseres den mekaniske responsen til mindre enn ved kun ren PGM. Dette viser at det ikke bare er en indikasjon på at G-blokk kan senke viskositeten til hyperviskøst slim, men at det også er et potensiale for å anvende G-blokker for å øke biotilgjengelighet over slimhinnen for makromolekylære farmasøytiske produkt (Draget et al. 2011). I Figur 1.7 viser elektronmikroskopbilder av hvordan nettverkstrukturen til PGM blir svekket ved tilsats av G-blokker.



Figur 1.7: Elektronmikroskopbilder av (A) nettverket til PGM og (B) nettverket til PGM ved tilsatt G-blokk, som er svekket.

Cystisk fibrose er en autosomal recessiv sykdom, og er den mest dødelige av de arvelige sykdommene i den hvite, europeiske populasjonen (Rosenstein et al. 1998). Denne sykdommen skyldes en mutasjon i Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR)-genet som koder for et transmembranprotein. En av funksjonene til dette proteinet er å opprettholde væskebalansen i epitelceller (Ramsey 1996). Sykdommen karakteriseres ved for mye utskillelse av tykt slim over slimhinner i hele kroppen, men det er komplikasjoner som oppstår i lungene som oftest fører til de største plagene og er hovedårsak til dødeligheten av sykdommen. Hos CF-pasienter er slimet tykkere og mer viskøst enn hos friske individer, og det er vanskelig for MCS å fjerne slimet. Dette fører til at lungene er mer mottakelige for infeksjon. En bakterie som er kjent for å angripe CF-pasienter, *P. aeruginosa*, skiller ut mannuronan-rikt alginat, som sammen med mucin danner et nettverk som øker viskositeten av slimet ytterligere (Taylor et al. 2005). Ved å bruke G-blokker er det mulig å blokkere mucin/alginat interaksjonssteder. G-blokkene er i seg selv for korte til å bidra til nettverksstrukturen, og den endelige effekten vil da bli en senket grad av sammenheng i mucin/alginat-nettverket, og dermed også redusere de mekaniske egenskapene til det hyperviskøse slimet (Draget et al. 2011). Bruken av G-blokk som behandling av CF er nå under (Taylor et al. 2006). Denne uttestingen er per dags dato kommet til fase 2 i klinisk testing (Kurt Ingar Draget, personlig kommunikasjon).

G-blokkenes potensielle effekt på mucus/mucin har ikke kun en mulig anvendelse innen en potensiell behandling av pasienter med CF, men det gir også en mulighet for økt biotilgjengelighet over slimhinner. Dette kan bety at det til en større grad kan gis medisiner over slimhinner. Doseringen av medisinene kan bli lavere og mer spesifikk, som vil gi mindre bivirkninger. Medisinlevering over slimhinner i hele kroppen kan brukes, men det er bukkale slimhinner (munnhulen) som har størst potensiale. Slimhinnene her har god blodtilførsel, og ved levering av medisiner her kan doseringen være lavere enn den må være ved medisinlevering peroralt. Enzymatisk nedbrytning i fordøyelseskanalen og rensingen av blodet i leveren vil føre til at mye av virkestoffet blir tapt på veien, og den effektive konsentrasjonen av virkestoffet er mye lavere enn det var i utgangspunktet (Shojaei 1998).

Sputum (slimprøve fra de nedre luftveiene) fra pasienter med CF viser et høyt innhold av ulike enzymer, som lysozym og elastase (Liu et al. 1999). Disse enzymene er

bakteriolytiske i det de bryter ned celleveggen og hindrer bakterievekst, og er en del av immunresponsen. Når disse enzymene lyserer bakteriene i lungene til pasienter med CF, vil celleinnholdet og DNA fra bakteriene lekke ut i slimet, og føre til en økning i slimets viskositet. Som en del av behandlingen av cystisk fibrose brukes i dag DNaser, som senker viskositeten i sputum ved å bryte ned DNA som har lekket ut fra lyserte bakterier (Shak et al. 1990).

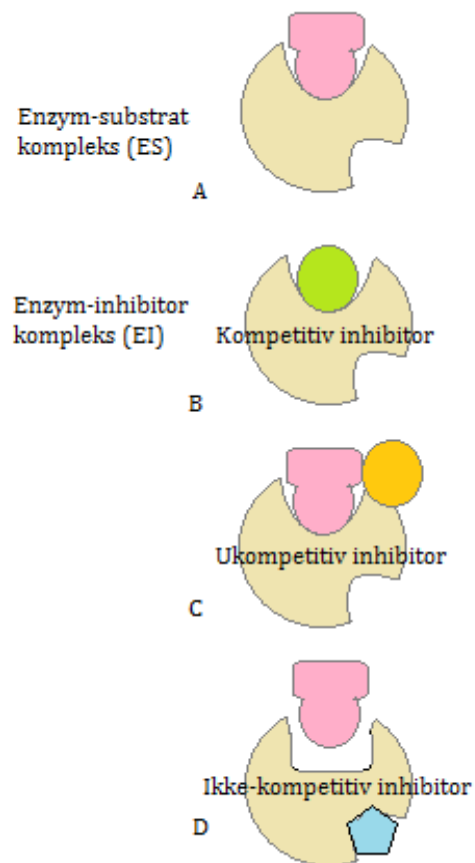
Som nevnt tidligere har alginat en evne til å påvirke enzymer. Det er derfor interessant å se om G-blokk også kan ha en effekt på enzymer. I denne oppgaven ble tre modellsystemer testet for effekt av tilsats av G-blokk; kitosan og lysozym, høymolekylært poly-M og M-lyase, høymolekylært G-rikt alginat og GG-lyase. G-blokker med ulike grad av polymerisering (\overline{DP}_n) og i ulike konsentrasjoner ble benyttet.

1.3 ENZYMINHIBERING

Enzymer kan inhiberes ved at spesifikke molekyler eller ioner binder seg og hindrer optimal enzymaktivitet. Dette kan være en del av den naturlige reguleringen av enzymet, som når et sluttprodukt i en enzymatisk reaksjon inhiberer enzymet ved tilstrekkelig høy nok konsentrasjon. Dette kalles *feedback inhibition*, da sluttproduktene fra reaksjonen virker tilbake på aktiviteten av enzymet. I mange medisiner er det deres funksjon som inhibitor som er årsaken til deres effekt. Et eksempel på dette er penicillin, som binder til enzymet transpeptidase, og hindrer at bakteriene får syntetisert cellevegger, og dermed dør (Berg et al. 2007).

Inhibering kan enten være reversibel eller irreversibel. Ved en irreversibel inhibering tar det lang tid før inhibitoren gir slipp på enzymet. Inhibitoren er da nært bundet til enzymet, enten kovalent eller ikke-kovalent. Penicillin er en irreversibel inhibitor.

Ved en reversibel inhibering binder inhibitoren enzymet, men dissosierer raskt fra det igjen. En slik inhibering kan deles inn i flere underkategorier, vist i Figur 1.8. En kompetitiv inhibitor binder til det aktive setet i enzymet. Denne type inhibering kan reverseres ved å øke konsentrasjonen av substrat, slik at disse er mer tilgjengelig for enzymet enn det inhibitoren er. Molekyler som er ansvarlig for en slik inhibering kan være strukturanaloge til det opprinnelige substratet. Videre er det vist en ukompetitiv reversibel inhibering. Denne inhibitoren fungerer ved å binde seg til enzym-substrat komplekset. Slik inhiberer den enzymet ved at den reduserer den effektive omsetningen av substrat til produkt. Videre er det vist ikke-



Figur 1.8: En skjematisk fremstilling av (A) et enzym-substrat kompleks, (B) et enzym-inhibitor kompleks som viser en kompetitiv inhibering, (C) et enzym-substrat-inhibitor kompleks som viser ukompetitiv inhibering, og (D) en ikke-kompetitiv inhibering der binding av inhibitoren har ført til en konformasjonell endring i aktivt sete slik at ikke substratet kan binde.

konkurrerende inhibering, der inhibitoren binder til et regulatorisk sete på enzymet i motsetning til de øvrige, hvor de bindes til det aktive setet på enzymet. Det kan føre til en modifisering av enzymet som kan påvirke det aktive setet og slik hindre et substrat i å binde seg og blir konvertert til produkt (Berg et al. 2007).

KITOSAN OG LYSOZYM

Kitosan er helt eller delvis deacetykert kitin. Kitin er en lineær polymer bestående av (1→4) bundne 2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukopyranose (GlcNAc, eller A). Denne er uløselig i vandige løsningsmiddel, og forekommer i store mengder i naturen, som strukturelle polysakkarid i det ytre skjelett til for eksempel reker og krabber. Kitosan er lineære binære kopolymere av (1→4) bundne A-enheter og 2-amino-2-deoxy-β-D-glukopyranose (GlcN, eller D). D-enheter dannes ved en deacetylering av A-enheten. Kitosan finnes ikke til en like stor grad i naturen som kitin, og så langt er det kun funnet kitosan i cellevegger til enkelte sopper. Kitosan er løselig i vandige løsninger, avhengig av grad av acetylering (F_A) (Vårum et al. 2005).

Lysozym, muramidase (N-acetylmuramide glykanhydrolase), bryter β-(1→4)-glykosidbindinger mellom N-acetylmuraminsyre (NAM) og N-acetylglukosamin (NAG). Dette er årsaken til enzymets bakteriolytiske egenskap, da enzymet bryter disse bindingene i enkelte bakterielle cellevegger, særlig i grampositive bakterier (Salton et al. 1959, 1960). Noen lysozymer bryter også ned β-(1→4)-acetylglukosaminbindinger i kitin (Berger et al. 1957) og delvis acetykert kitosan kan og være substrat for lysozym (Amano et al. 1978).

Både kitosan og lysozym er positivt ladde molekyler, og det er derfor interessant å se om det har noen betydning når negativt ladd G-blokk tilsettes til denne reaksjonen.

HØYMOLEKYLÆRT ALGINAT OG ALGINAT LYASER

Det er mulig å anrike alginat etter innhold av G- og M- enheter (A. Haug et al. 1966). For å undersøke enzymaktiviteten til alginat lyasene M- og GG-lyase ble det brukt henholdsvis høymolekylært polymannuronan (poly-M) og høymolekylært alginat med høyt innhold av G (Høy-G). poly-M med en fraksjon av G-enheter $F_G=0$ er produsert ved fermentering av *Pseudomonas fluorescens*, der genet for epimerisering er slått ut ved mutering. Høy-G er her et høymolekylært alginat med et høyt innhold av G fra stilken i stortare, *L. hyperborea*.

Alginat lyaser katalyserer en β -elimineringsreaksjon der alginatkjeden brytes. Det dann en umettet ikke-reduserende enden, som kan absorbere UV-lys ved 230 nm (Nakada et al. 1967). Alginat lyaser kan ha en spesifitet for å bryte bindinger mellom M- eller G-enheter. M-lyase har en større spesifitet for å bryte bindinger mellom M-M og M-G enn mellom G-enheter. Tilsvarende har GG-lyase har en større spesifitet for å bryte bindinger mellom G-G enn mellom M-enheter (Østgaard 1993).

1.4 TEORI BAK ANALYSEMETODER

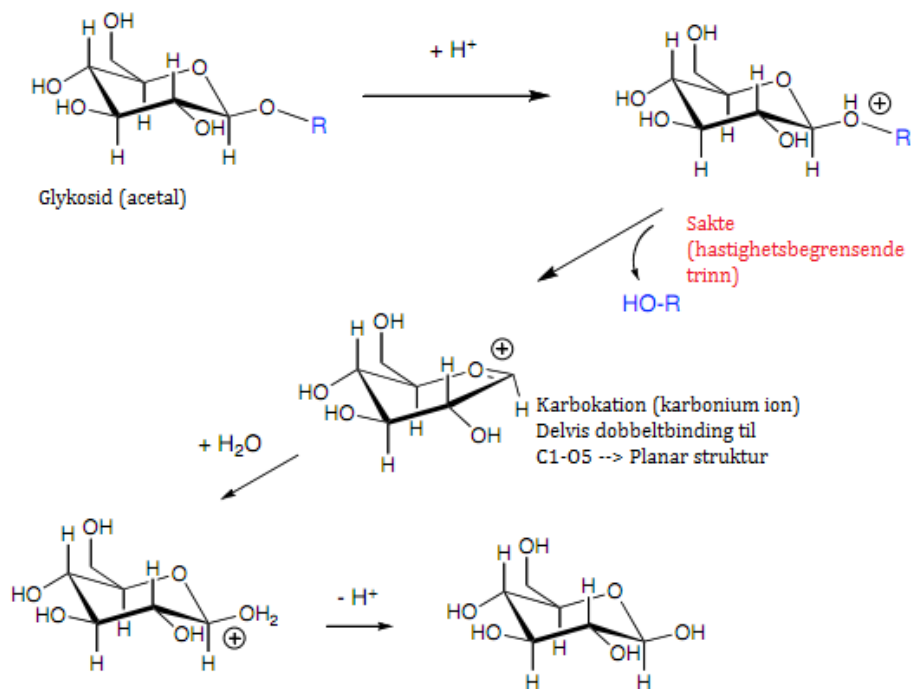
1.4.1 UTFELLING OG NEDBRYTNING AV G-BLOKK

Utfelling av alginat skjer ved en lav pH, da motionene til alginat dissosierer og karboksylgruppen protoniseres. Det dannes en uløselig alginsyre som da feller ut. Det er mulig å fraksjonere alginat etter innhold av G og M, avhengig av pH.

Ved en lav nok senking av pH i en alginatløsning er det da mulig å separere ut alginat ved sentrifugering. Ved en resuspendering og nøytralisering av det utfelte materialet vil det dannes noe salt i løsningen. En dialyse kan fjerne mye av saltet, der løsningen holdes innen en dialysemembran mot ionefritt vann. Saltet vil da gå ut av dialysemembranen, mens ionefritt vann går inn for å utjevne forskjellen i konsentrasjon.

En syrehydrolyse av en alginatløsning bryter glykosidbindinger mellom sukkerenhetene i polymeren. Uronsyrer (som alginat) er spesielt resistente mot syrehydrolyse i motsetning til mange andre type sukker. Dette gjør at det krever relativt harde betingelser for nedbrytning(Christensen 2010). Her ble alginat syrehydrolysert ved 95 °C i 10 timer ved pH 3,6. Løsningen ble også boblet med N₂ før syrehydrolysen. Dette fordi det vil fjerne mye av oksygenet fra løsningen for å hindre sidereaksjoner.

En syrehydrolyse av et glykosid er vist i Figur 1.9, der det ved en senking i pH skjer en protonering av det glykosidiske oksygenet, før bindingen mellom C1 og det protonerte oksygenet brytes. Det oppstår et karbokation, som reagerer med et vannmolekyl og splitter av et proton. Resultatet er et reduserende sukker, der det er en fri OH-gruppe (Christensen 2010).



Figur 1.9: Syrehydrolyse av en glykosidisk binding mellom to sukker i en polymerkjede. I det første trinnet vil det glykosidiske oksygenet protoneres. Dette er et raskt trinn i prosessen. Videre vil den glykosidiske bindingen brytes, og det oppstår et karbokation. Dette er det hastighetsbegrensende trinnet i prosessen. Videre reagerer karbokationen med, og spalter av et proton fra et vannmolekyl. Dette fører til at det dannes et redusert sukker, med en fri OH gruppe (Christensen 2010).

1.4.2 KJERNEMAGNETISK RESONANS SPEKTROSKOPI (NMR)

Den kjemiske sammensetningen og de sekvensielle parametrene i alginat kan bestemmes ved bruk av ^1H - og ^{13}C -NMR spektroskopi (H. Grasdalen, Larsen, B., Smidsrød, O. 1979; H. Grasdalen et al. 1981; H. Grasdalen 1983). For å bestemme den kjemiske sammensetningen (monad-frekvensen F_M og F_G), de fire nærmeste nærliggende diade-frekvensene (F_{MM} , F_{MG} , F_{GM} , F_{GG}) og triade-frekvensene med G i senter (F_{GGG} , F_{GGM} , F_{MGG} , F_{MGM}) er det bare nødvendig å gjøre ^1H NMR. Disse parametrene gjør det mulig å måle $N_{G>1}$ som tilsvarer gjennomsnittlig blokk lengde av etterfølgende G-enheter, ved $\bar{N}_{G>1} = (F_G - F_{MGM})/F_{GGM}$ (Kristiansen).

NMR-metoden for å bestemme kjemisk sammensetning og sekvensielle parametre i alginat ble utviklet av Grasdalen og medarbeiderene hans (H. Grasdalen, Larsen, B., Smidsrød, O. 1979; H. Grasdalen et al. 1981; H. Grasdalen 1983). Metoden innebærer følgende: (i) en mild hydrolyse for å redusere viskositeten av prøven (revidert metode (Abrahamson et al. 1996)). (ii) Tilsats av en chelator som binder og hindrer at eventuelle

divalente kationer i løsningen virker sammen med polymeren, som da vil gele. (iii) NMR analysen skjer ved høy temperatur (~ 90 °C) for å redusere viskositet, øke oppløsningen og for å skifte løsemiddeltoppen (HDO) vekk fra anomer regionen (som er av interesse på spektra). (iv) Signalprosessering og estimering av intensiteten av relevante NMR-signal. (v) Beregning av sekvensielle parametre fra et sett kjente forhold mellom signalintensiteter (Kristiansen).

1.4.3 ANIONBYTTERKROMATOGRAFI MED PULSAMPEROMETRISK DETEKSJON (HPAEC-PAD)

Høypresisjon anionbytter-kromatografi (HPAEC) kan sammed med pulsamperometrisk deteksjon (PAD) brukes til analyser av karbohydrater. Positivt ladde funksjonelle grupper, som oftest protonerte kvartære aminogruupper, er i en anionbytter kovalent bundet til en uløselig matriks av silika eller en polymer (Greibrokk et al. 2005). Både den funksjonelle gruppen og prøvekomponenten er ioniserte ved de forholdene prøven settes på kolonnen. Som regel brukes en pH gradient eller saltgradient for å eluere ut prøven (Greibrokk et al. 2005). Polysakkarider som er fosforylert, sulfatert eller inneholder karboksylgrupper (som alginat har), kan separeres ved både lav og høy pH, henholdsvis 4,6 og 13 (Dionex Corporation 2000). Separasjonen er hovedsakelig bestemt av forholdet mellom masse og ladning ved lav pH, men også type binding kan ha en betydning (Rohrer et al. 1992). PAD fungerer ved et repeterende potensial mot tid til den virkende elektroden i en gjennomstrømnings detektorcelle (Rocklin et al. 1998). I en slik detektor oksideres analytten på overflaten av en arbeidselektrode med en kombinasjon av pH-Ag/AgCl som referanseelektroder. Gullelektroder, som brukt her, krever et alifatisk miljø for å danne katalytisk aktivt Au-OH på overflaten (Larew et al. 1989).

1.4.4 VISKOSITETSMÅLING

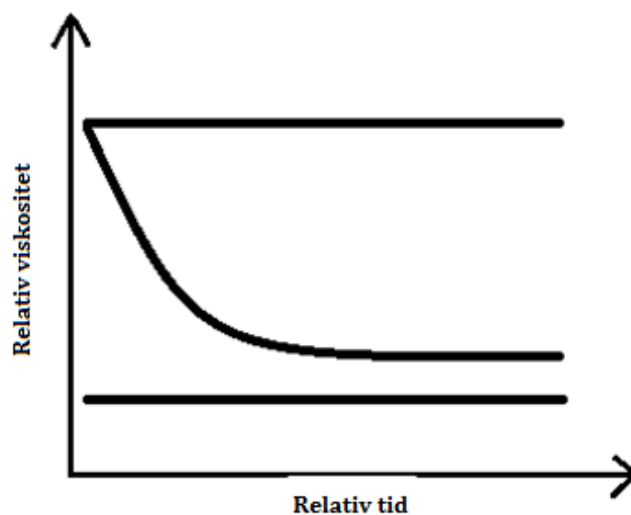
Viskositet er et mål på evnen en løsning har til å motså flyt. I en løsning med makromolekyl vil bidraget til viskositet primært være avhengig av det effektive volumet makromolekylet opptar i en løsning (Smidsrød et al. 2008).

Viskositeten er definert som forholdet mellom skjærstress og skjærrate, vist i 1.1:

$$\eta = \frac{F/A}{dv/dz} = \sigma/\dot{\gamma} \quad (1.1)$$

Forholdet mellom kraft, F og arealet av platen, A , er skjærstress med symbolet σ , og forholdet mellom dv/dz er skjærraten med symbolet $\dot{\gamma}$ (Smidsrød et al. 2008).

Viskositeten kan måles ved kapillærviskometri. Løsningen trekkes gjennom et kapillær og tiden det tar for løsningen å synke ned igjen måles med to fotoceller som referansepunkt. Ut fra disse målingene kan relativ-, spesifikk- og egenviskositet av løsningen beregnes (Smidsrød et al. 2008). Dette kan brukes til å måle nedgangen i viskositet til polymere over tid ved tilsats av enzym, se Figur 1.10. Når enzymet bryter ned polymeren og den kuttes, vil evnen polymeren har til å gi løsningen viskositet avta. En nedgang i viskositet over tid vil derfor kunne brukes til å vise enzymets aktivitet på polymeren.

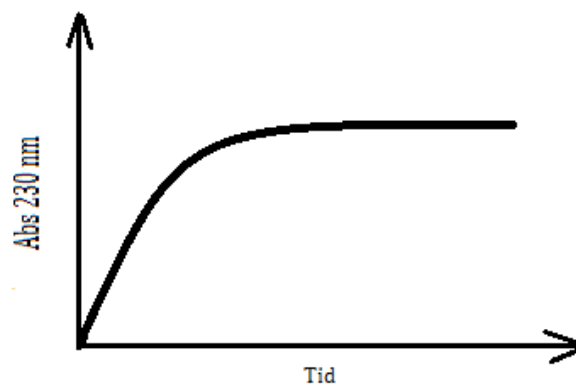


Figur 1.10: En typisk kurve for nedgang i relativ viskositet mot tid for en enzymatisk nedbrytning målt ved kapillær viskometri.

1.4.5 ABSORBANS 230 NM

Funksjonen til alginat lyaser kan overvåkes i et UV-spektrofotometer ved å måle økningen i absorbans ved 230 nm. Dette fordi hvert kutt i en alginatkjede vil føre til en umettet enhet på den ikke-reducerende enden som absorberer lys ved 230 nm (se Avsnitt 1.3). Enzymaktivitet kan altså detekteres som en økt absorbans ved denne bølgelengden, som vist i Figur 1.11.

Alginat lyaser katalyserer som nevnt tidligere en reaksjon der bindinger i alginatkjeden brytes og det dannes en umettet ikke-reducerende ende som absorberer lys ved 230 nm. De kan også være M- eller G-spesifikke, avhengig av om de har en preferanse for hvilke bindinger de bryter (se Avsnitt 1.3). Ved tilsats av guluronatoligomere med ulik konsentrasjon og polymeriseringsgrad kan en eventuell endring fortelle om effekten dette har på enzymaktiviteten.



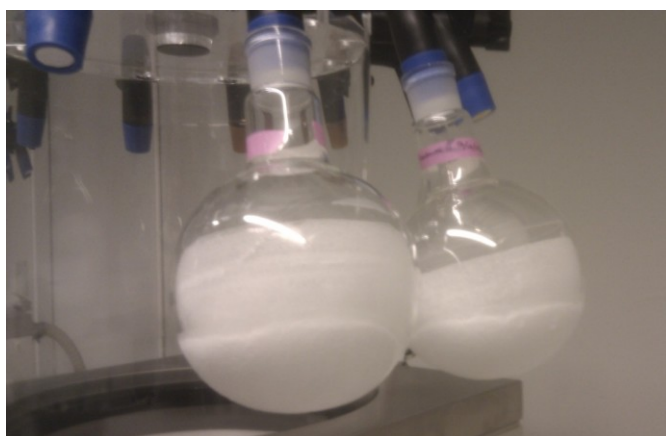
Figur 1.11: En typisk økning i absorbans ved 230 nm for en alginatløsning ved tilsats av en alginat lyase.

2.0 MATERIALE OG METODE

2.1 PRØVEFORBEREDELSE

2.1.1 FELLING OG SYREHYDROLYSE AV G-BLOKK

Alginat fra stilken til stortare, *L. hyperborea*, [batch: 907-255-01] ble brukt til å felle ut G-blokk med en $\overline{DP}_n \sim 20-25$. 20 g ble løst i 1 L MQ-vann med god røring. pH ble så justert til 2,8 med 4 M/0,5 M HCl, og deretter satt til røring i $\sim 2,5$ time. Løsningen ble så sentrifugert ved 800 rpm i 20 min ved 20 °C. Supernatanten ble dekantert og kastet, og utfellingen ble resuspondert i 0,5 L 0,01 M HCl. Denne løsningen ble så sentrifugert ved samme betingelser og supernatanten ble også denne gangen dekantert og kastet, mens bunnfallet ble resuspondert i 0,5 L MQ-vann. En tredje sentrifugering ved samme betingelser og samme behandling av hhv supernatant og bunnfall ble utført. Løsningen med resuspondert utfelling ble deretter nøytralisert til pH 7 med 1 M/0,5 NaOH, før den ble filtrert over GF/A filter med vakuum, og deretter frysetørket, se Figur 2.1. Den syrefelte G-blokken ble så dialysert i en dialysemembran med cutoff 12-14000 til konduktiviteten i vannet var $<2 \mu\text{S}$. Etter nok en frysetørking ble den analysert ved HPAEC-PAD (se 2.2.1), og ved NMR (se 2.2.2).



Figur 2.1: Syrefelt G-blokk under frysetørking.

Guluronatoligomere med en gjennomsnittlig grad av polymerisering (\overline{DP}_n) ~ 10 ble opparbeidet ved å bryte ned syrefelt G-blokk med en \overline{DP}_n på $\sim 20-25$ ved syrehydrolyse.

Etter en metodeutvikling (se Vedlegg V1), ble den endelige prosedyren for nedbrytning av G-blokk som følger. En 0,5 % G-blokk løsning (5 mg/mL) av syrefelt G-blokk ble

justert til pH 3,6 og boblet med N₂ i 3-4 min før den ble satt i vannbad ved 95 °C i 10 timer. Etter nedbrytningen ble løsningen avkjølt, og nøytralisert til pH 7 innen 20 min fra den ble tatt av vannbadet. Den nedbrutte G-blokken ble dialysert i en dialysemembran med cutoff 12-14000 til konduktiviteten i vannet var <2 µS. Etter dialyse ble løsningene filtrert over GF/A filter og frysetørket. Produktene fra nedbrytningen ble karakterisert ved HPAEC-PAD og NMR.

2.1.2 FELLING AV POLY-M

En enkel rensing av høymolekylært mannuronan [batch: 206-011-01-TP, $[\eta] = 872$ mL/g] ble utført ved hjelp av en spritfelling. 2,5 g ble løst i 248 mL MQ-vann og løsningen ble satt på røring på ved kjøling (5 °C) over natt. 1,73 mL 5 M NaCl ble tilsatt under røring til en 0,2 % løsning.

Kald etanol (EtOH) ble brukt til å felle ut poly-M i flere omganger. Det ble vasket 4 runder med 96 % EtOH, og 2 runder med 70 % EtOH. Løsningen ble så filtrert over slimfilter (30 µm) med stor overflate i trakten. Slimfilteret med felt poly-M ble lagt i avtrekkskap til tørking/avdamping i noen timer. Stoffet ble så løst i 1 L MQ-vann, og filtrert over GF/D (2,7 µm) filter før det ble frysetørket.

2.2 METODER

2.2.1 ANIONBYTTERKROMATOGRAFI MED PULSAMPERIOMETRISK DETEKSJON (HPAEC-PAD)

Anionbytterkromatografi med pulsamperometrisk deteksjon ble brukt til å karakterisere syrefelt og nedbrutt G-blokk samt nedbrutt poly-M.

Analyse av syrefelt og syrehydrolysert alginat ble utført på en Dionex BioLC system (Dionex Corp, Sunnyvale, CA) vist i Figur 2.2, bestående av en AS50 autosampler, en ED40 elektrokjemisk detektor med en gull-elektrode og en GP50 gradient pumpe. Prøvene ble injisert via en 100 μ L loading loop. Oligosakkaridene ble separert ved romtemperatur av en gradient eluering med 0-700 MM natriumacetat i 100 mM natriumhydroksid i 80 min på en Dionex IonPac AS4A (4 x 250 mm) anionbytterkolonne forbundet til en IonPac AG4A (4 x 50 mm) forkolonne. Elueringshastigheten ble satt til 1 mL/min ved å bruke bølgeform A for deteksjon. Data fra analysen ble prosessert og integrert med Chromeleon 6.7 software (Ballance et al. 2005; Campa et al. 2004).



Figur 2.2: HPAEC-PAD, Dionex BioLC System (Dionex Corp, Sunnyvale, CA).

2.2.2 NMR AV GULURONATOLIGOMERE

Prøvene ble forberedt til analysen ved NMR som følger: 8 mg av prøven ble løst i 700 μL deuterium oksid (D_2O), og 5 μL 1 % trimetylsilylpropionat (TSP) ble tilsatt som referanseprøve. 20 μL 0,3 M trietylentetraaminheksaacetat (TTTHA) ble tilsatt som en chelaterende agent (binder divalente metallioner). Det tilsettes for å forhindre en eventuell geling ved tilstedeværelse av divalente ioner.

2.2.3 VISKOSITETSMÅLING

Viskositetsmålingene ble utført i en Übbelohde kapillærviskosimeter type 53603/I og 53610/I (Schott-Geräte GmbH, Tyskland) som rommet 4 mL løsning, og gjennomstrømningstiden ble målt ved hjelp av en styringsboks AVS 310 (Schott-Geräte GmbH, Tyskland).

Dobbeltkonsentrert buffer ble fortynnet 1:1 med MQ-vann og gjennomstrømningstiden ble målt i 5-6 paralleller. Polymerløsningen ble blandet ut i dobbel konsentrasjon og tilsatt dobbel konsentrasjon buffer slik at forholdet ble 1:1. Også denne ble målt 5-6 paralleller. Gjennomsnittet fra de respektive målingene ble brukt til å trekke hhv en nedre og øvre grense for nedbrytningskurven. Konsentrasjonsregimet til polymerløsning ble bestemt ved å måle viskositeten til flere konsentrasjoner av polymer, og forholdet mellom viskositeten til denne og bufferen ble tilpasset. Enzymene ble deretter tilsatt i en konsentrasjon som ga en nedbrytningskurve for nedgang i viskositet mot tid. Denne skulle gå over et visst tidsintervall med en passende nedbrytningshastighet.

Etter at konsentrasjonsregimet var bestemt ble guluronatoligomere med ulik polymeriseringsgrad $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 og ulike konsentrasjoner fra 1 mg/mL til 5 mg/mL tilsatt til modellsystemene for å se om dette hadde noen påvirkning på nedbrytningen uten tilsatt av G-blokk. De to polymeriseringsgradene kalles fra dette punktet av \overline{DP}_n .

Resultatene fra viskositetsmålingene kan brukes til å undersøke enzymaktivitet og en eventuell endring i denne. Når enzymet bryter ned polymeren, vil hvert kutt i kjeden føre til at viskositeten går ned. En nedgang i viskositet over tid kan dermed indikere hva aktiviteten til enzymet er og eventuelt endres over tid. Resultatene fra

viskositetsmålingene kan bearbeides, og det ble her brukt et regneark der rådata fra viskositetsmålingene, gjennomstrømningstiden, ble brukt til å beregne relativ (η_r), spesifikk viskositet (η_{sp}) og grad av polymerisering (X_w). Disse kan da plottes mot tid, og ut fra dette kan for eksempel relativ viskositet mot tid gi et bilde av effekten tilsats av guluronatoligomere til et modellsystem har. **Feil! Fant ikke referanseskilden.** viser orsøksbetingelsene for viskositetsmålingene som ble utført på de tre modellsystemene kitosan og lysozym, poly-M og M-lyase, og Høy-G alginat og GG-lyase.

2.0 Materiale og metode

Tabell 2.1: Forsøksbetingelsene for viskositetsmålingene av de tre modellsystemene; kitosan og lysozym, poly-M og M-lyase, og høymolekylært Høy-G alginat og GG-lyase.

Substrat	Enzym	Buffer	G-blokk
<p>Kitosan [η]=870 mL/g $F_A=0,62$</p>	<p>Lysozym (fra høne eggehvite) Sigma (L-6876-1G) $\geq 40\ 000$ units/mg protein</p>	<p>2 % Eddiksyre, KCl (200 mM) pH 5</p>	<p>G-blokk $\overline{DP}_{n,n} \sim 10$: "Nedbrutt 14.04.10" HPAEC-PAD: $\overline{DP}_{n,n}$ 7,34 NMR: $\overline{DP}_{n,n}$ 9,43</p>
<p>Poly-M Renset fra batch 206-011-01-TP, [η] = 872 mL/g $F_G=0$</p>	<p>M-lyase (fra <i>Haliotis tuberculata</i>) 2 U/mL</p>	<p>Ammoniumacetat (200 mM), NaCl (50 mM) pH 6,74</p>	<p>G-blokk $\overline{DP}_{n,n} \sim 10$: "Nedbrutt 06.10.10" HPAEC-PAD: $\overline{DP}_{n,n}$ 7,22 NMR: $\overline{DP}_{n,n}$ 10,1</p>
			<p>G-blokk $\overline{DP}_{n,n} \sim 20$: "unedbrutt 25.03.10" HPAEC-PAD: $\overline{DP}_{n,n}$ 22,03 NMR: $\overline{DP}_{n,n}$ 25,79</p>
<p>Høy-G alginat Renset fra alginat fra stilken til <i>L. hyperborea</i>. [η] = 619 mL/g $F_G=0,66$</p>	<p>GG-lyase (fra mutert <i>Klebsiella pneumoniae</i> lyase AlyA) 18 U/mL</p>	<p>Ammoniumacetat (200 mM), NaCl (50 mM), CaCl₂ (1 mM) pH 6,9</p>	<p>G-blokk $\overline{DP}_{n,n} \sim 10$: "Nedbrutt 06.10.10" HPAEC-PAD: $\overline{DP}_{n,n}$ 7,22 NMR: $\overline{DP}_{n,n}$ 10,1</p>
			<p>G-blokk $\overline{DP}_{n,n} \sim 20$: "unedbrutt 25.03.10" HPAEC-PAD: $\overline{DP}_{n,n}$ 22,03 NMR: $\overline{DP}_{n,n}$ 25,79</p>

2.2.4 ABSORBANS UV 230 NM

Endringen i absorpsjonen ved UV 230 nm ble utnyttet til å måle aktivitet av GG-lyase. Høymolekylært alginat med et høyt innhold av G (alginat fra stilken til stortare, *L. hyperborea*), kalt Høy-G alginat ble brukt her. Denne ble tilsatt en GG-lyase og absorbansen ble målt over tid, med målinger ved hvert sekund med et Perkin Elmer lambda 25 UV/VIS Spektrometer (Perkin Elmer Inc., USA), som vist i Figur 2.3.



Figur 2.3: Spektrometeret absorbansmålingene ble utført i, Perkin Elmer lambda 25 UV/VIS spektrometer(Perkin Elmer Inc., USA).

Målingene ble utført i en kvartskuvette med 0,9 mL prøve, og denne ble vasket mellom hver måling, med vann og 96 % etanol. Forsøkene ble utført ved romtemperatur (~22°C). Også her kan resultatene fra målingene brukes til å undersøke enzymaktivitet og en eventuell endring i denne. Her vil økningen i absorbans over tid brukes til å gi et bilde på enzymaktivitet. En eventuell endring i denne økningen ved tilsats av guluronatoligomere vil kunne si om enzymaktiviteten påvirkes.

Forsøksbetingelsene som ble brukt for absorbansmålinger på Høy-G alginat og GG-lyase med og uten tilsats av G-blokk er de samme som de vist for Høy-G alginat og GG-lyase i Tabell 2.1 i Avsnitt 2.2.3.

M-lyasen som er brukt i denne oppgaven har opprinnelse fra *Haliothis tuberculata* og har en spesifisitet for å bryte bindinger mellom M-enheter i alginat (Boyen et al. 1990).

GG-lyasen som ble brukt i har en høy spesifisitet for å bryte G-G-bindinger, og er konstruert ved å mutere genet som koder for *Klebsiella pneumoniae* lyase AlyA, som bryter både G-G og G-M (Tøndervik et al. 2010).

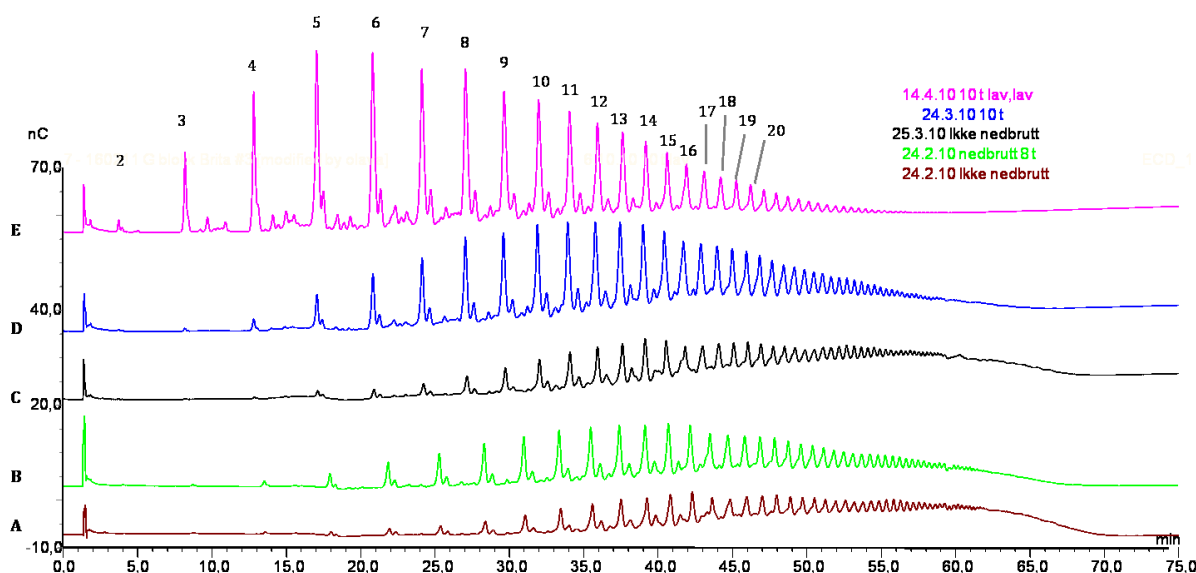
3.0 RESULTAT OG DISKUSJON

3.1 PRØVEOPPARBEIDELSE

G-blokk ble opparbeidet ved å felle ut og bryte ned alginat (Avsnitt 2.1.2). Produktene fra utfelling og nedbrytningen ble karakterisert med HPAEC-PAD og NMR. G-blokken som ble opparbeidet hadde $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 . For å oppnå en $\overline{DP}_n \sim 10$ ble det utført en metodeutvikling, og resultatene fra denne er vist i 3.1.1.

3.1.1 METODEUTVIKLING AV PROSEDYRE FOR PRODUKSJON AV G-BLOKK $\overline{DP}_n \sim 10$

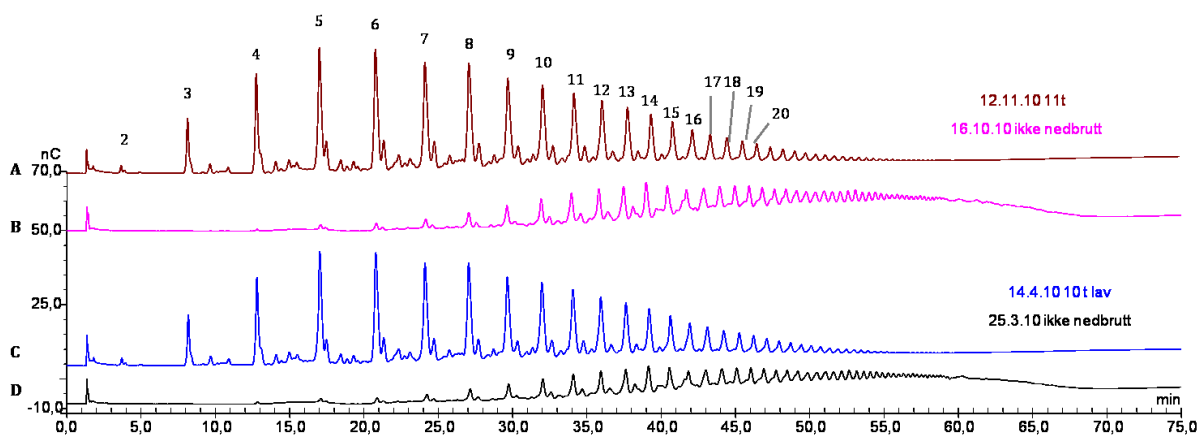
En rekke prosedyrer for å opparbeide G-blokk med en $\overline{DP}_n \sim 10$ ble utført. Den endelige prosedyren ble en nedbrytning, der en 0,5 % alginatløsning med pH 3,6 ble boblet med N_2 før syrehydrolyse i 10 timer ved 95 °C. De øvrige prosedyrene som ble brukt er beskrevet i Vedlegg 1. Figur 3.1 viser hvordan de ulike prosedyrene påvirket resultatet av \overline{DP}_n , her vist ved resultater fra HPAEC-PAD.



Figur 3.1: Viser at \overline{DP}_n til G-blokk blir lavere ettersom prosedyren er videreutviklingen. A: syrefelt G-blokk, B: nedbrutt 8 timer, C: syrefelt G-blokk, D: nedbrutt 10 timer, E: lavere polymerkonsentrasjon, lavere pH og 10 timer nedbrytning.

I Figur 3.1 kan det observeres at endringene i nedbrytningsprosedyren gir et med nedbrutt produkt. Resultatet fra den første prosedyren er vist i Figur 3.1 B, som er nedbrutt G-blokk fra syrefelt G-blokk i A. Endringen i \overline{DP}_n er ikke som ønsket. Det kan observeres at det nedbrutte produktet fra syrefelt G-blokk i Figur 3.1 C som er vist i B er mer nedbrutt enn D. Videre ble syrefelt G-blokk i C brutt ned med den endelige prosedyren, som ga et produkt som gir tilfredsstillende \overline{DP}_n . Det kan også observeres at det i B-E i Figur 3.1 ikke observeres noen di- tri- og tetramere tilstede. Prøvene som er analysert her er dialysert tilsvarende. Det kan se ut til at produktet i E, som er mer nedbrutt enn de øvrige, har en fordeling som har mer av disse di- tri- og tetramerene enn hva de øvrige har. Derfor har ikke dialysen av dette produktet fjernet disse til en like stor grad. Prosedyren for felling tilrettelegger ikke for at disse små molekylene blir inkludert i opparbeidingen, og det kan være noe av grunnen til at det ikke er så mye til stede av de små i de syrefelte G-blokkene.

I Figur 3.2 er resultatene fra to nedbrytninger utført med den endelige prosedyren vist, der de respektive syrefelte G-blokkene som ble brutt ned er vist som referanse for utgangspunktet.



Figur 3.2: Viser reproduserbarheten av den endelige prosedyren til nedbrytningen av G-blokk til $\overline{DP}_n \sim 10$. I A og C er de to nedbrutte G-blokkene vist, og i B og D er utgangspunktet for nedbrytningene, syrefelt G-blokk.

Figur 3.2 viser at de to utførelsene av den endelige prosedyren ga reproduserbare resultat. Figur 3.2 A varte nedbrytningen i 11 timer, men ga fremdeles en \overline{DP}_n som ønsket, her beregnet til $\sim 7,8$. Nedbrytningen vist i C ga ifølge HPAEC-PAD $\overline{DP}_n \sim 7,3$. I Figur 3.2 er toppene merket med tall som indikerer om det er en dimer (2), trimer (3), og så videre.

Prøvene fra metodeutviklingen av prosedyren ble også karakterisert ved analyse på NMR. Resultatene fra disse analysene er vist i Tabell 3.1, der det også er tydelig at metodeutviklingen fører til lavere \overline{DP}_n , og at produktene fra nedbrytningene gir reproduserbare resultat.

Tabell 3.1: Viser resultat fra karakterisering av utfelt og nedbrutt G-blokk fra NMR.

Prøve	Dato	\overline{DP}_n
G-blokk ikke nedbrutt	25.03.2010	25,8
G-blokk nedbrutt 10 t	24.03.2010	16,9
G-blokk nedbrutt 10 t, lav	14.04.2010	9,5
G-blokk nedbrutt 10 t, lav	06.10.2010	9,5
G-blokk ikke nedbrutt	16.10.2010	29,7
G-blokk nedbrutt 11 t, lav	12.11.2010	9,6

3.2 KITOSAN OG LYSOZYM

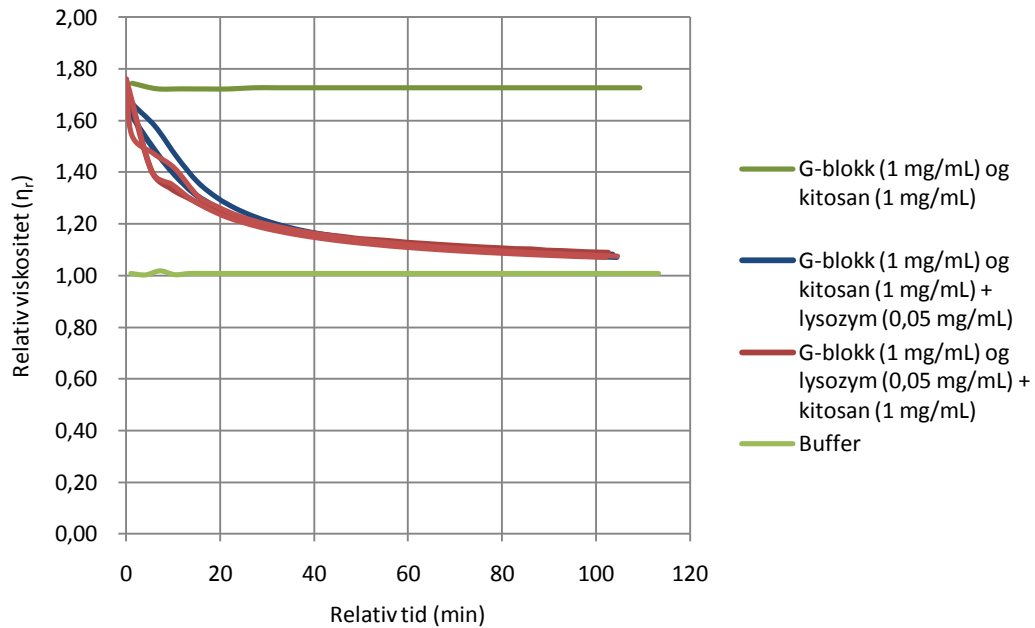
3.2.1 MÅLINGER AV NEDBRYTNING VED TILSATS AV G-BLOKK

Konsentrasjonsregimet ble satt til 1 mg/mL kitosan og 0,05 mg/mL (16 000 U/mL) lysozym. Dette ble utført ved å tilpasse forholdet mellom gjennomstrømningstiden til polymeren og bufferen og nedbrytningshastigheten (Vedlegg 2).

Videre ble det testet om tilsats av G-blokk med en $\overline{DP}_n \sim 10$ til dette modellsystemet hadde noen effekt.

Som nevnt tidligere er både kitosan og lysozym positivt ladde molekyler mens G-blokk er negativt ladd. Det var derfor interessant å se om en eventuell ladningsinteraksjon mellom kitosan eller lysozym og G-blokk ville ha noen påvirkning på nedbrytningen av kitosan med lysozym. For å teste ut dette ble det derfor undersøkt om rekkefølgen til blandingen av de tre hadde noen effekt. G-blokk ble blandet med kitosan før lysozym ble tilsatt, og i en andre rekkefølge ble G-blokk blandet med lysozym før det ble tilsatt til kitosan. Det ble utført viskositetsmåling av de to mulige rekkefølgene for å se om det hadde noen effekt på nedbrytningen av kitosan og lysozym.

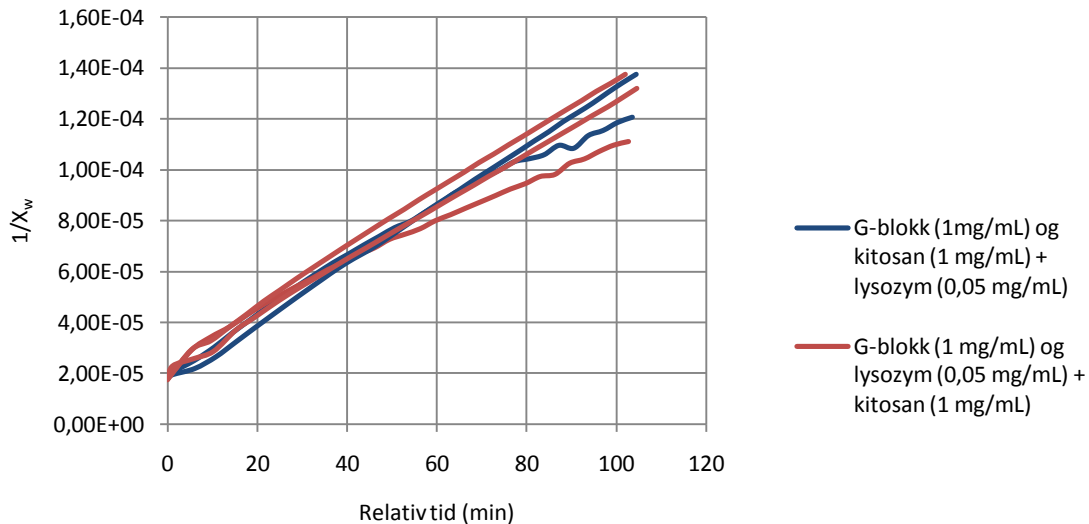
Når enzymet bryter ned polymeren vil kjedene kuttes, og evnen polymeren har til å gi løsningen økt viskositet vil dermed gå ned. En nedgang i viskositet over tid vil derfor kunne brukes som en metode for å demonstrere enzymets aktivitet på polymeren. Det ble utført tre målinger der G-blokk og lysozym ble blandet først, og to målinger der G-blokk ble blandet med kitosan først. Resultatet av målingene er vist i Figur 3.3 som nedgang i relativ viskositet mot tid.



Figur 3.3: Effekten blandingsrekkefølgen har på nedbrytningen av kitosan og lysozym når G-blokk blandes med kitosan før lysozym og når G-blokk blandes med lysozym før kitosan.

I Figur 3.3 er det ikke en påvisbar effekt av blandingsrekkefølgen på nedbrytningen av kitosan med lysozym. Det kan se ut til at kurvene flater ut på samme måte etter 40 minutter, men det kan også se ut til at det er noe forskjell i nedbrytningen opp til 20 minutter. Dette kan komme av at utførelsen av målingene fører til en unøyaktig start på grunn av det praktiske ved blanding av reagensene, som at det er et svært lite volum enzym som tilsettes (40 μ L) eller at de tre stoffene skulle blandes før målingene ble startet.

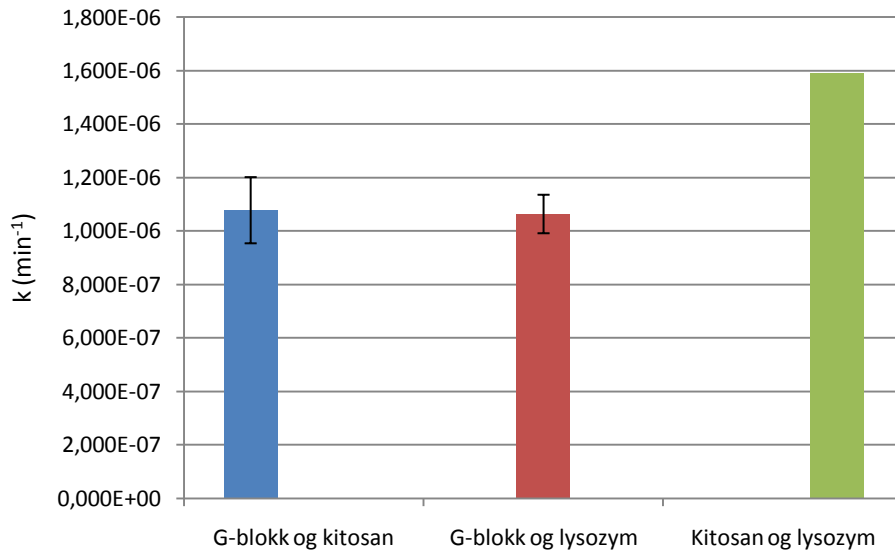
For å illustrere bedre hvordan enzymaktiviteten til lysozym på kitosan ble påvirket av blandingsrekkefølgen er data fra viskositetsmålingene brukt til å beregne nedgangen i grad av polymerisering (X_w) i polymeren. I Figur 3.4 er det vist et plott av den inverse av X_w ($1/X_w$) mot relativ tid. Stigningstallet (k) til kurvene vil være ratekonstanten, hastigheten, til nedbrytningen.



Figur 3.4: Effekten blandingsrekkefølgen av kitosan og lysozym med G-blokk hadde på nedbrytningen, her vist ved nedgang i grad av polymerisering mot tid.

I Figur 3.4 er kan det observeres at det er en liten variasjon i kurvene og at de overlapper hverandre. Kurvene er ikke fordelt etter hvilken rekkefølge de er målt ved, og det kan se ut til at det ikke er noen effekt av om G-blokk ble blandet med kitosan eller lysozym først.

For å vise hvilken effekt blandingsrekkefølgen hadde på hastigheten av nedbrytningen, k , er det i Figur 3.5 vist en fremstilling av de gjennomsnittlige k til nedbrytningene etter blandingsrekkefølge. Disse ble beregnet ved å finne stigningstall til kurvene fra Figur 3.4 (Vedlegg V2). Det er også i Figur 3.4 vist k for en nedbrytning av kitosan med lysozym uten tilsatt av G-blokk. For de to mulige rekkefølgene, kitosan først eller lysozym først, er det også tatt med standardavvikene til målingene som viser variasjonen i målingene.

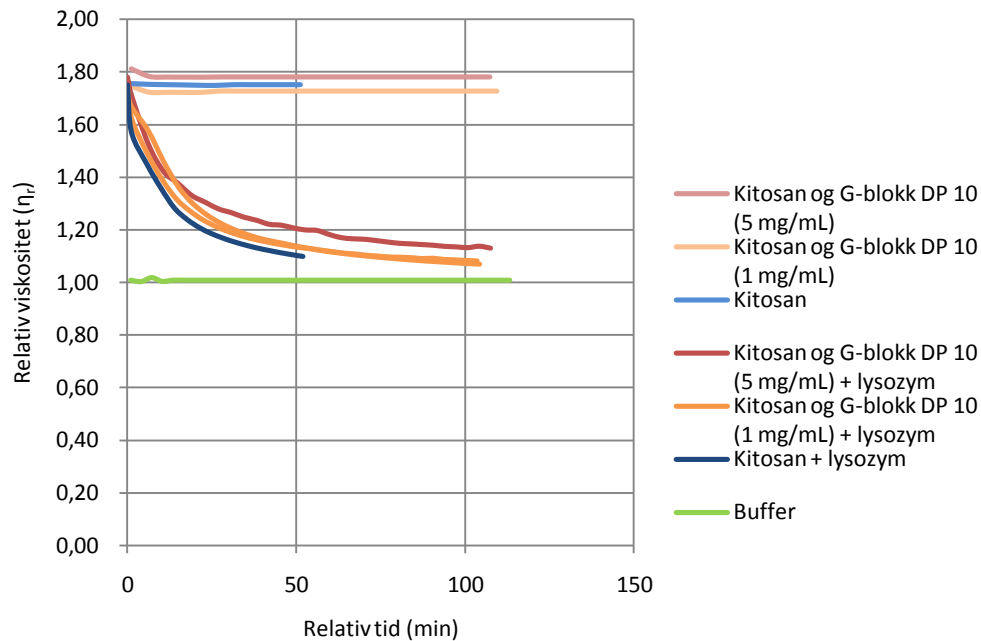


Figur 3.5: Effekt av blandingsrekkefølge av kitosan og lysozym til G-blokk på ratekonstanten, k , til nedbrytningen av kitosan med lysozym.

Ratekonstantene til de to blandingsrekkefølgene som er vist i Figur 3.5 ligger nær hverandre i verdi, og de ligger begge innen hverandres standardavvik. Dette tyder på at rekkefølgen kitosan og lysozym blandes med G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ ikke har noen signifikant betydning. Blandingsrekkefølgen synes dermed å ikke ha betydning for enzymaktiviteten.

Siden blandingsrekkefølge ikke påvirket nedbrytningen ble det valgt å blande kitosan med G-blokk før tilsats av lysozym som standard metode, da dette var mer praktisk gjennomførbart.

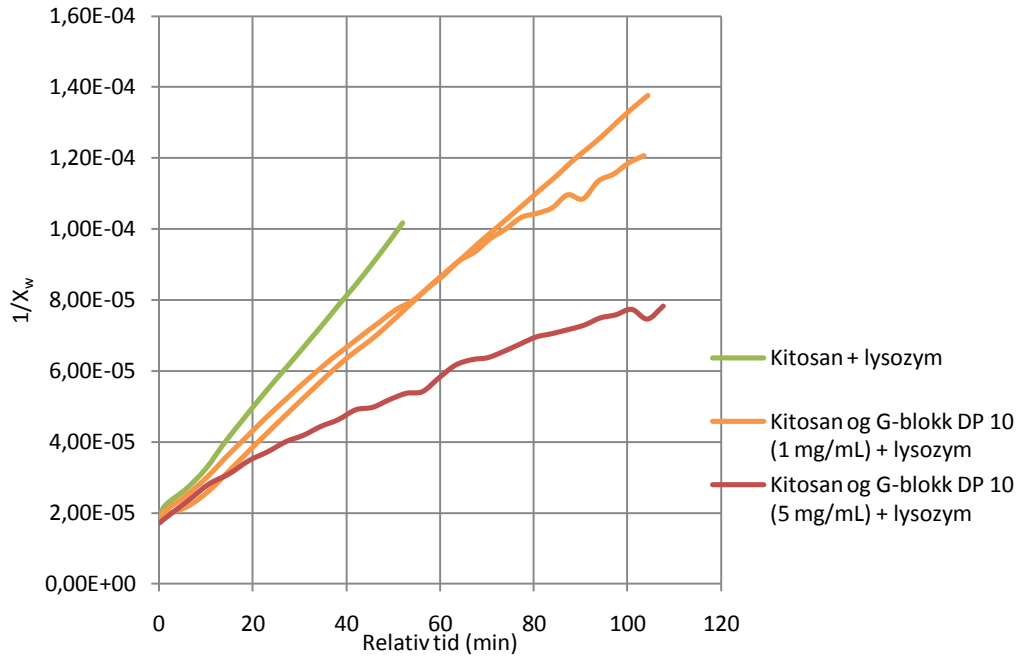
I Figur 3.5 er det også tydelig at tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ hadde en inhiberende effekt på enzymaktiviteten da k er blitt lavere. Det var derfor interessant å se om det kunne være en dose-respons-sammenheng for tilsats av G-blokk. Derfor ble det utført en måling av nedbrytning av kitosan med lysozym ved tilsats av G-blokk med en høyere konsentrasjon, 5 mg/mL. I Figur 3.6 er det vist hvordan den økte konsentrasjon av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ påvirker nedbrytningen av kitosan med lysozym som relativ viskositet mot tid. I Figur 3.6 er det også tatt med data for en nedbrytning av kitosan med lysozym uten G-blokk til stede.



Figur 3.6: Effekten av tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ i 1 og 5 mg/mL på nedbrytningshastigheten, her ved nedgang i relativ viskositet mot relativ tid.

I Figur 3.6 kan det se ut til at det er en dose-respons ved tilsats av G-blokk til nedbrytningen av kitosan med lysozym. Det ser ut til at en økt konsentrasjon av tilsatt G-blokk har en større påvirkning enn det har ved tilsats av 1 mg/mL. Det ser ut til at enzymaktiviteten til lysozym på kitosan inhiberes. Denne konklusjonen kan trekkes ut fra observasjonene fordi nedbrytningskurven til kitosan ved tilsatt G-blokk har et skift som tyder på at nedbrytningen skjer saktere ved tilsats av G-blokk. Ved 5 mg/mL G-blokk tilsatt ser det ut til å være et større skift enn ved tilsats av 1 mg/mL G-blokk.

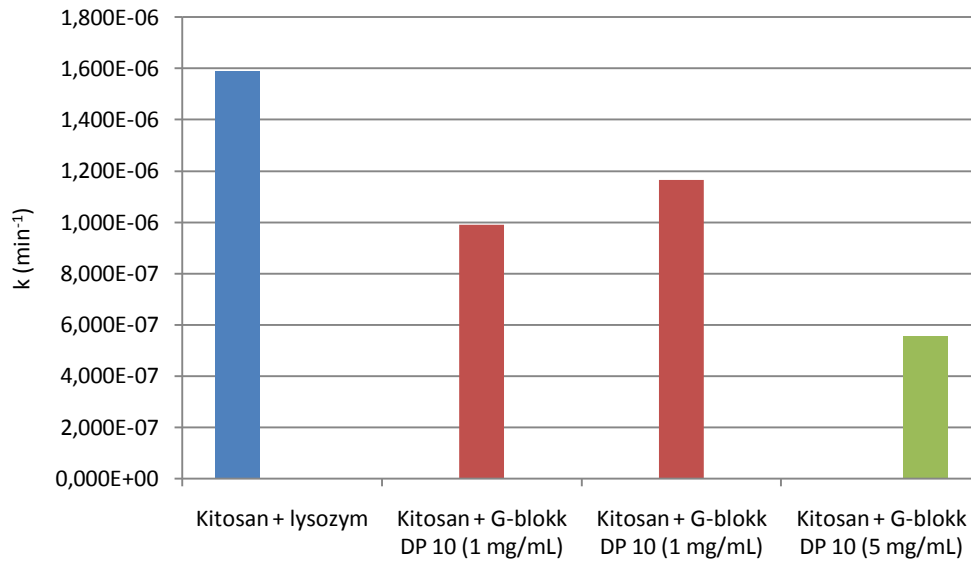
Som ved når blandingsrekkefølgen av kitosan og lysozym ble undersøkt, ble rådata fra viskositetsmålingene brukt til å beregne nedgang i X_w mot tid for tilsatt G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$, 1 og 5 mg/mL. Denne nedgangen, her som den inverse av X_w ($1/X_w$) mot tid, er sammen med en nedbrytning av kitosan med lysozym uten tilsatt G-blokk er vist i Figur 3.7.



Figur 3.7: Effekt av tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ i to ulike konsentrasjoner til nedgangen i grad av polymerisering av mot relativ tid.

I Figur 3.7 kommer effekten G-blokk har på nedbrytningen av kitosan med lysozym tydeligere frem. Det kan her observeres at det er en tydelig forskjell i nedgang i X_w over tid for kitosan nedbrutt av lysozym uten og med tilsatt G-blokk. Også her ser det ut til å være en dose-respons til stede ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$. Ved 1 mg/mL G-blokk tilsatt til kitosan og lysozym går X_w saktere ned enn ved ingen tilsatt G-blokk, men raskere enn det gjør ved tilsats av 5 mg/mL. Dette vises på Figur 3.7 ved at kurven får en svakere helning ved tilsats av 5 mg/mL enn ved tilsats av 1 mg/mL, altså brukes det mer tid på å få en tilsvarende nedgang i X_w enn det gjør i nedbrytningen av kitosan med lysozym uten tilsats av G-blokk. De to målingene som er utført ved 1 mg/mL G-blokk tilsatt ser ut til å stemme overens, i det at det ikke er en stor forskjell mellom de to kurvene for disse nedbrytningene.

Fra kurvene i Figur 3.7 er k beregnet for nedbrytningene i fravær av og tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$. Disse er fremstilt i Figur 3.8.



Figur 3.8: Effekten av tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$, 1 og 5 mg/mL som % av nedbrytningsraten til kitosan tilsatt kun lysozym.

Fra Figur 3.8 er det tydelig at det oppstår en inhibering av enzymaktivitet ved tilsats av G-blokk. Det er også tydelig at det er en dose-respons, der økt konsentrasjon av tilsatt G-blokk gir en større inhibering. Det er en liten variasjon mellom de to målingene utført på 1 mg/mL tilsatt G-blokk. Med tanke på avstanden fra k for fravær av G-blokk og tilsatt 5 mg/mL G-blokk til denne, er variasjonene med høy sannsynlighet ikke signifikant. Det er kun utført én måling på både nedbrytningen av kitosan med lysozym uten tilsats av G-blokk, og ved tilsats av 5 mg/mL.

3.2.2 DISKUSJON KITOSAN OG LYSOZYM TILSATT G-BLOKK

Det ble undersøkt om rekkefølgen på blanding av kitosan og lysozym med 1 mg/mL G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ hadde noen effekt på nedbrytningen av kitosan med lysozym, og det ble funnet at de to rekkefølgene ikke skilte seg fra hverandre, altså kunne det konkluderes med at rekkefølgen ikke hadde noen signifikant betydning på nedbrytningen. Det ble derimot observert at de begge hadde en tilsvarende inhiberende effekt.

Konsentrasjonen av tilsatt G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ ble økt til 5 mg/mL. Fra målingene gjort på nedbrytning av kitosan med og uten tilsatt av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ er det tydelig at det skjer en inhibering ved tilsatt av G-blokk. Fra de videre beregningene av ratekonstantene for nedbrytningene er det også åpenbart at det er en dose-respons for denne effekten på nedbrytningen av kitosan med lysozym.

Mekanismen til inhiberingen er ikke fastslått, men det kan være at de ulike ladningene på molekylene kan ha en påvirkning. G-blokk er negativt ladd, mens både lysozym og kitosan er positivt ladde. Den inhiberende effekten kan komme av at G-blokk assosierer til enzymet, som kan påvirke aktivitet. Det kan oppstå en konkurrerende inhibering om G-blokk assosierer til det aktive sete, men også om den binder til en annen del av enzymet. Det kan da oppstå en ikke-konkurrerende inhibering tilstede. Det ble utført transmittansmålinger av blandingen av G-blokk med kitosan og G-blokk med lysozym (data ikke inkludert). Det ble ikke observert noen kompleksdannelse som kunne observeres ved transmittans. Det kan ikke utelukkes at det ble dannet løselige kompleks, noe som kunne blitt undersøkt videre ved lysspredningsanalyser.

Dose-responsen tilsatt av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ gir på nedbrytningen kan forklares med at det med en økt konsentrasjon av G-blokk er flere elementer til stede som forstyrrer bindingen av lysozym til kitosan. Ved den høyeste konsentrasjonen av tilsatt G-blokk er det fem ganger så mye G-blokk til stede i løsningen som det er kitosan. Dette vil føre til at enzymet ikke møter substratet så ofte, og siden G-blokk ikke er et substrat for lysozym vil en eventuell binding av denne til enzymet ikke være produktiv.

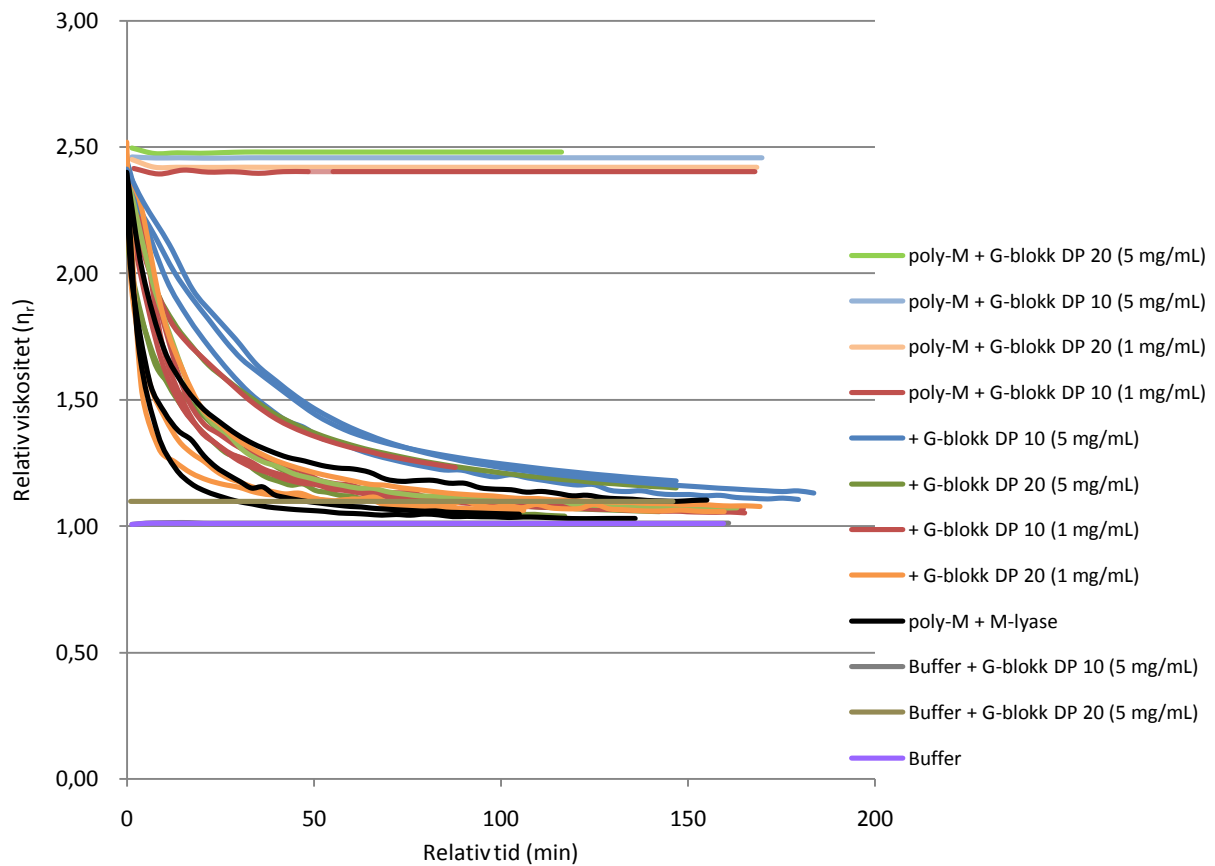
3.3 POLY-M OG M-LYASE

3.3.1 RESULTAT FRA MÅLING AV NEDBRYTNING VED TILSATS AV G-BLOKK

Konsentrasjonsregimet for måling av nedbrytningen av poly-M med M-lyase ble satt til 1,5 mg/mL poly-M og 0,005 mg/mL (0,01 U/mL) M-lyase. Dette ble utført ved å tilpasse forholdet mellom gjennomstrømningstiden til polymeren og bufferen og nedbrytningshastigheten (Vedlegg 3).

Videre ble det undersøkt om tilsats av G-blokk med $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 til dette modellsystemet hadde noen effekt på nedbrytningen. Det ble tilsatt G-blokk med de to \overline{DP}_n i to konsentrasjoner, 1 mg/mL og 5 mg/mL og utført viskositetsmålinger for å undersøke effekten på nedbrytningen. Som i Avsnitt 3.2.1, vil viskositetsmålingene gi et mål på løsnings nedgang i viskositet da enzymet bryter polymerkjedene.

I Figur 3.9 er endring i relativ viskositet plottet mot tid for nedbrytningen av poly-M med M-lyase med og uten tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 . To målinger ble tatt ut fra grafen (Vedlegg 3).



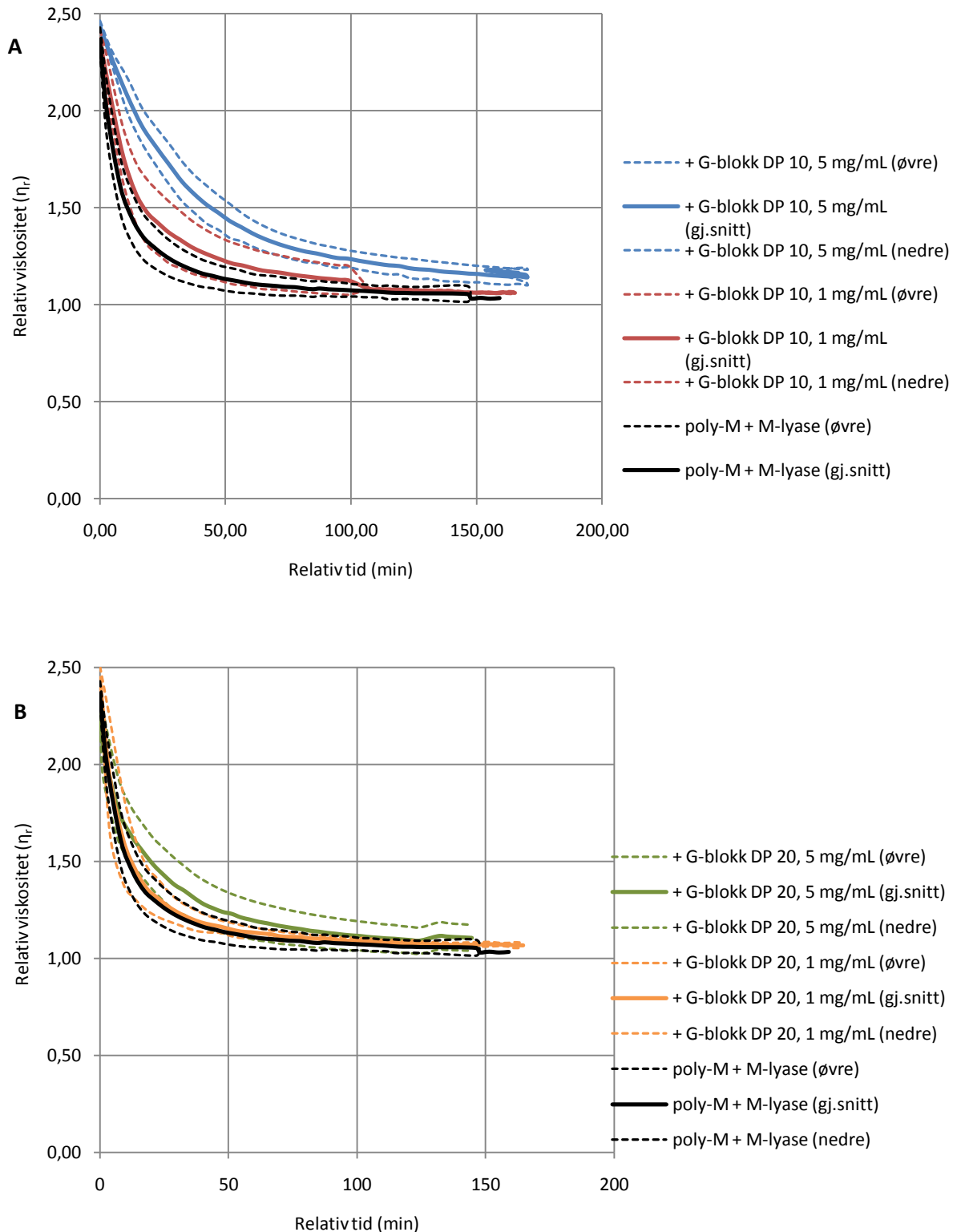
Figur 3.9: Nedbrytningskurven til poly-M av M-lyase ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 i to ulike konsentrasjon, her vist ved relativ viskositet mot relativ tid. I tillegg er det lagt til tre eksempler på nedbrytningskurver til poly-M nedbrutt av M-lyase uten tilsats av G-blokk.

I Figur 3.9 er det i tillegg til målingene som er utført med tilsats av G-blokk også vist tre eksempler på nedbrytning av poly-M med M-lyase uten tilsatt G-blokk. Disse er vist for å ha en referanse til nedbrytningen uten G-blokk til stede. Det kan observeres at de øvrige målingene ligger spredt i grafen, men det ser også ut å være en sammenheng mellom konsentrasjon og \overline{DP}_n G-blokk de er tilsatt. Det kan observeres at ved 1 mg/mL ligger både $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 innen variasjonene til referansemålingene av poly-M og M-lyase uten tilsatt G-blokk. Det er vanskelig å tolke detaljer fra denne grafen ved disse konsentrasjonene da mye overlapping av kurver gjør det vanskelig å trekke noen konklusjon for observasjonene. Det er tydelig at relativ viskositet går saktere ned ved tilsats av 5 mg/mL G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$. Dette kan tyde på at enzymaktiviteten inhiberes ved tilsats av G-blokk ved denne konsentrasjonen og \overline{DP}_n . Det er vanskelig å se om tilsats av 5 mg/mL G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ gir en tilsvarende effekt da disse målingene ser ut til å overlappes i grafen.

Ved tilsats av G-blokk 5 mg/mL oppstod det også en økning i viskositeten til løsningen. Dette kan observeres i grafen i den øvre og nedre delen, der henholdsvis utgangspunktet for nedbrytningen, poly-M, og bufferen er tilsatt G-blokk 5 mg/mL. Disse målingene viste en noe høyere viskositet enn ved ingen G-blokk. I målingene av bufferen var det kun ved tilsatt G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ 5 mg/mL som ga en vesentlig økning i viskositet av bufferen.

Ved å dele grafen opp etter \overline{DP}_n og konsentrasjon er det lettere å se effekten av tilsats av G-blokk. Det er da mulig å sammenligne de to konsentrasjonene tilsatt G-blokk ved hver \overline{DP}_n , og å sammenligne de to \overline{DP}_n med hverandre. Det ble valgt å bearbeide dataene og å fremstille målingene som gjennomsnitt. For å få en øvre og nedre grense for målingene ble standardavviket til hvert gjennomsnitt av målinger lagt til gjennomsnittet (Vedlegg V3).

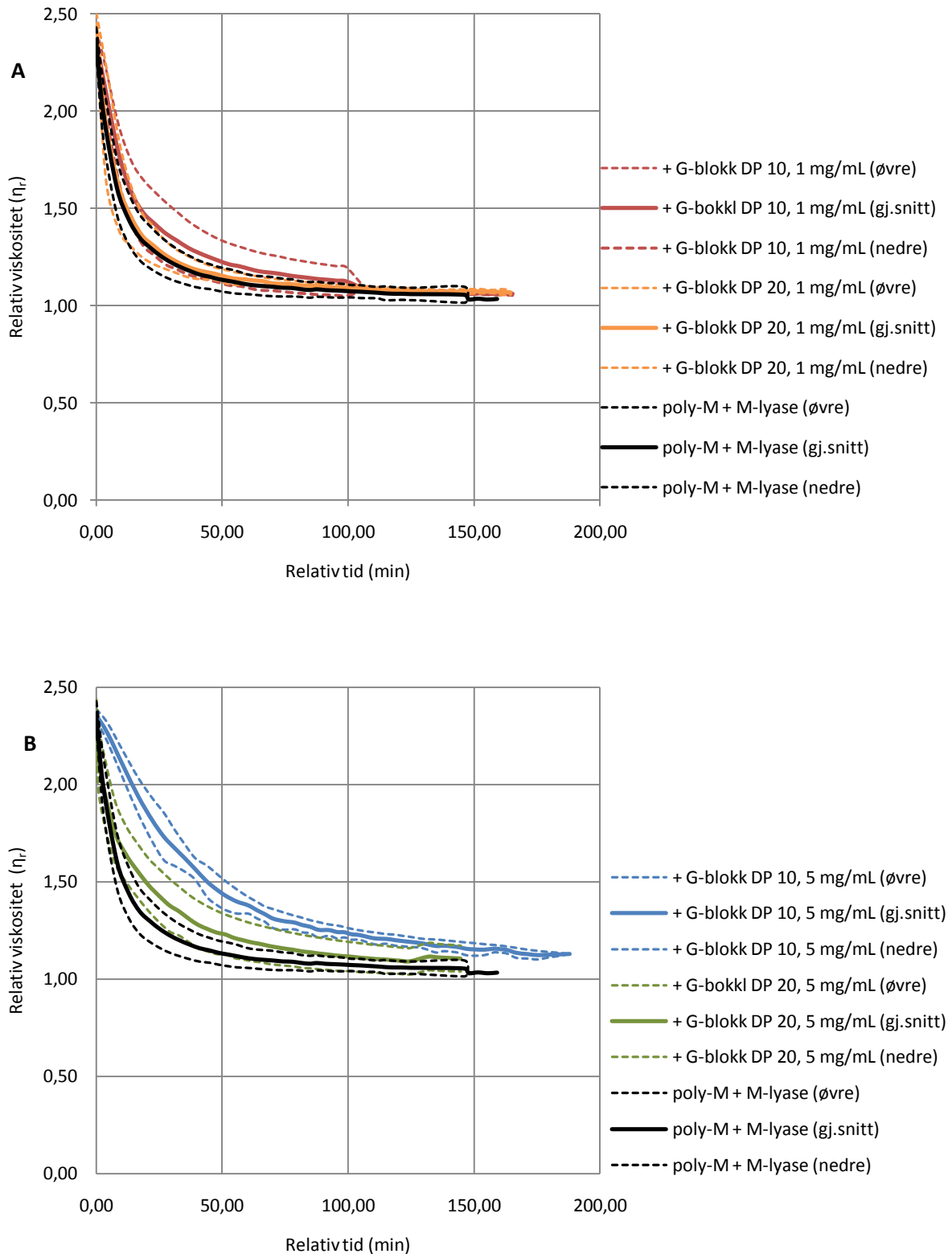
Grafene fra denne bearbeidingen er vist i Figur 3.10 og Figur 3.11, etter henholdsvis \overline{DP}_n og konsentrasjon av tilsatt G-blokk.



Figur 3.10: Målingene til poly-M og M-lyase tilsatt G-blokk er her vist som relativ viskositet mot relativ tid fordelt i to grafer etter hvilken \overline{DP}_n av G-blokken som er tilsatt, A: $\overline{DP}_n \sim 10$ og B: $\overline{DP}_n \sim 20$. I grafene er den tykke markerte linjen et gjennomsnitt for hver av alle målingene som er utført, og de prikkete stripene viser en øvre og nedre grense for variasjonene i målingene.

Det kan ut fra Figur 3.10 observeres at det er en større effekt ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ enn ~ 20 . I Figur 3.10 A er det vist en graf for tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$. Her kan det observeres at tilsats av 5 mg/mL har større inhiberende effekt enn det tilsats av 1 mg/mL har. Det er også en tydelig dose-respons ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ der økt konsentrasjon gir økt inhibering. Dette er ikke like tydelig i Figur 3.10 B, ved tilsats av $\overline{DP}_n \sim 20$. Her er det ikke en like tydelig inhibering, og det er vanskelig å se om tilsats av 1 mg/mL G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ har noen påvirkning på nedbrytningen. Det kan se ut til at en økning i konsentrasjon av $\overline{DP}_n \sim 20$ har en svak inhiberende effekt. Mulig kan denne være sammenlignbar med den fra 1 mg/mL $\overline{DP}_n \sim 10$.

Det er i Figur 3.11 vist effekt av tilsats av G-blokk på nedbrytningen av poly-M med M-lyase fordelt etter konsentrasjon av tilsatt G-blokk.



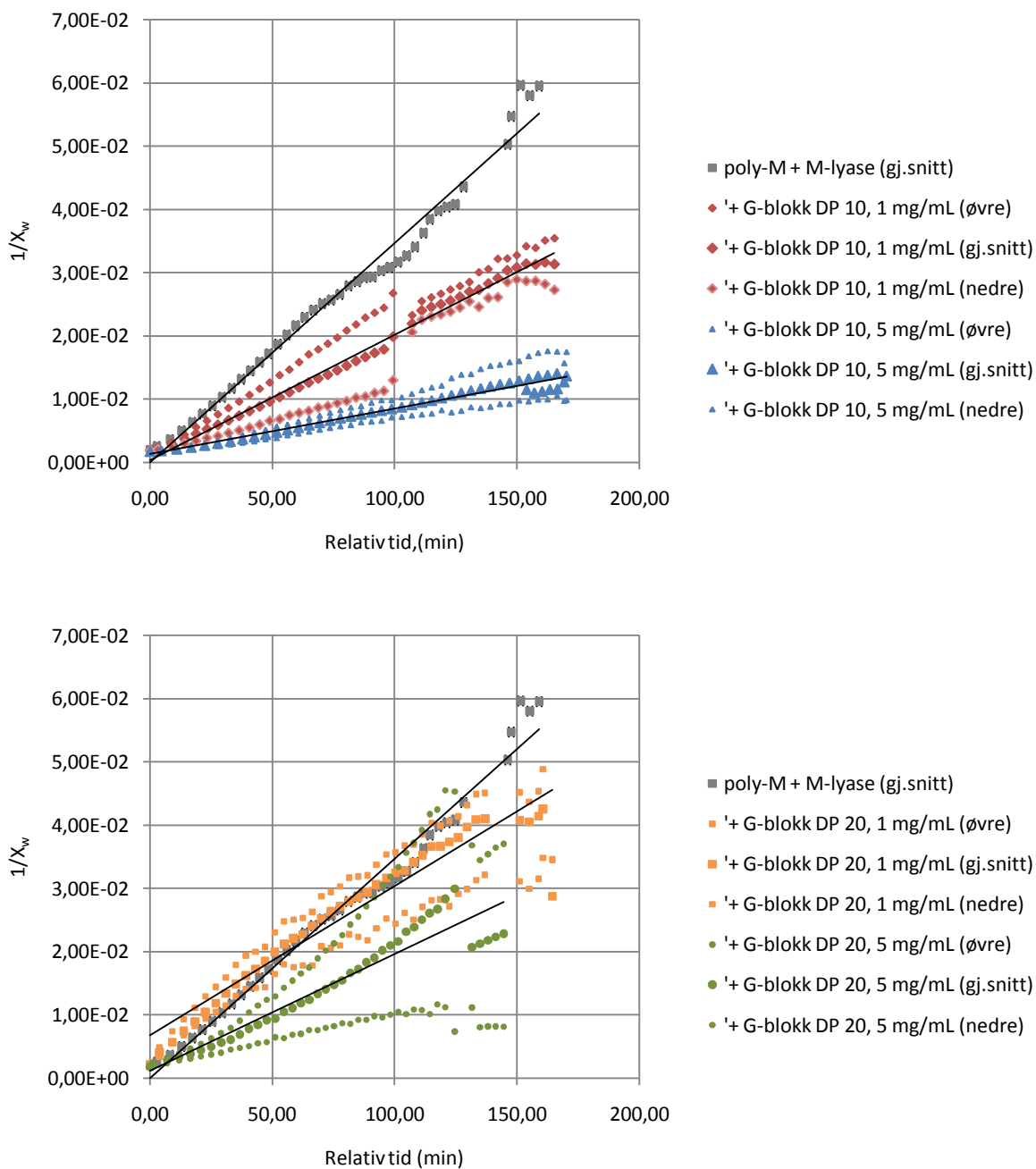
Figur 3.11: Målingene til poly-M og M-lyase tilsatt G-blokk er her vist som relativ viskositet mot relativ tid, fordelt i to grafer etter hvilken konsentrasjon av G-blokk som er tilsatt, A: 1 mg/mL, B: 5 mg/mL. I grafene er den tykke markerte stripen et gjennomsnitt for hver av målingene som er utført, og de prikkete stripene viser en øvre og nedre grense for variasjonene i målingene.

Det kan ut fra Figur 3.11 observeres at når målingene er fordelt etter konsentrasjon, er det fremdeles G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ som har størst påvirkning på nedbrytningskurven.

I Figur 3.11 A er det vist en graf for tilsats av 1 mg/mL av de to \overline{DP}_n . Her er det en antydning til at $\overline{DP}_n \sim 10$ har større effekt enn $\overline{DP}_n \sim 20$. Det kan også i denne grafen se ut til at $\overline{DP}_n \sim 20$ ikke har noen inhiberende effekt på nedbrytningen.

I Figur 3.11 B er en graf for tilsats av 5 mg/mL G-blokk fra de to \overline{DP}_n vist. I motsetning til ved tilsats av 1 mg/mL G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$, kan det se ut til at tilsats av 5 mg/mL fra denne \overline{DP}_n har en viss inhiberende effekt på nedbrytningen. Det kan se ut til at inhiberingen ved tilsats av 5 mg/mL $\overline{DP}_n \sim 20$ har en tilsvarende effekt som den ved tilsats av 1 mg/mL $\overline{DP}_n \sim 10$. Her er det fremdeles tydelig at det er 5 mg/mL $\overline{DP}_n \sim 10$ som har størst effekt.

For å illustrere den inhiberende effekten tilsats av G-blokk har på nedbrytningen av poly-M med M-lyase, er det som i Avsnitt 3.2.1 her vist endring i X_w mot tid, for å se hvordan effekten av G-blokk påvirker enzymaktiviteten. Også her er den inverse av X_w ($1/X_w$) plottet mot tid, og den er fordelt etter \overline{DP}_n og konsentrasjon i henholdsvis Figur 3.12 og Figur 3.13. Da målingene som er gjort på poly-M og M-lyase har en relativt stor variasjon som blir tydeligere ved plotting av $1/X_w$ mot tid (Vedlegg 3), er det i grafene kun lagt ved et gjennomsnitt for målingene med poly-M. For de øvrige målingene er det også her valgt å bearbeide de beregnede data (Vedlegg 3). Det er også trukket en lineær regresjon gjennom de respektive gjennomsnittene, for lettere å kunne se en generell trend i grafene.



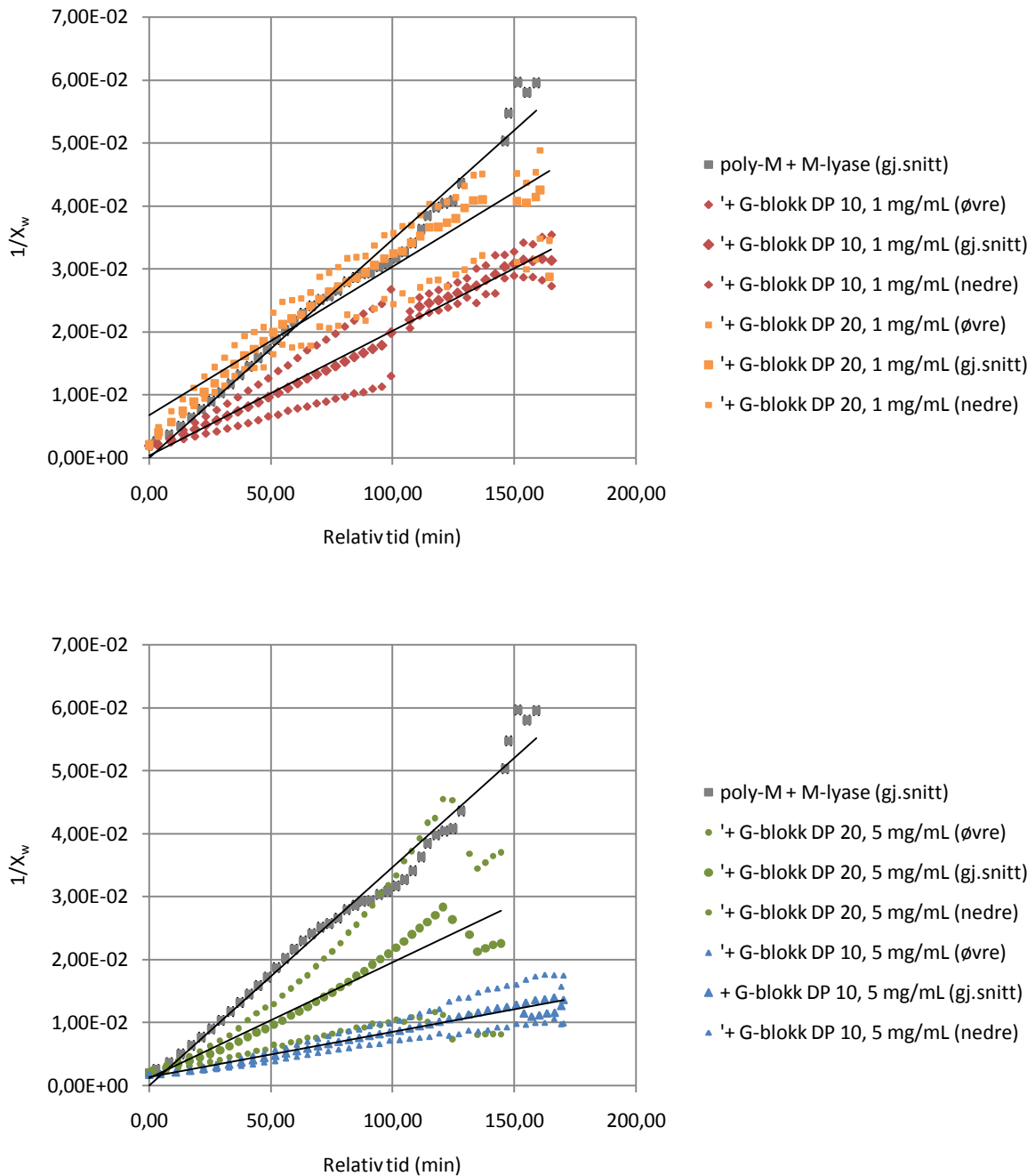
Figur 3.12: Målinger av poly-M og M-lyase tilsatt G-blokk her vist som grad av polymerisering (X_w) mot relativ tid, fordelt etter hvilken \overline{DP}_n av G-blokk som er tilsatt, A: $\overline{DP}_n \sim 10$ og B: $\overline{DP}_n \sim 20$. I grafene er et gjennomsnitt av alle målingene som er utført vist ved en noe større figur, vist med en linje trukket ved en lineær regresjon. De mindre figurene viser en øvre og nedre grense for variasjonene i målingene. I tillegg er det her tatt med et gjennomsnitt av målingene av poly-M og M-lyase uten tilsats av G-blokk, merket som grå bokser med en lineær linje trukket gjennom.

I Figur 3.12 er det i den øvre delen vist en graf for effekt på nedbrytning av poly-M med M-lyase ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ 1 og 5 mg/mL. Her er det tydelig at det skjer en inhibering på nedbrytningen da det ved tilsats av G-blokk skjer et skifte i helningen av kurvene. Dette tyder på at det ved tilsats av G-blokk tar lengre tid for å oppnå en like høy reduksjon i polymeriseringsgrad enn det gjør uten.

I den nedre delen av Figur 3.12 er effekten tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ har på nedbrytningen av poly-M med M-lyase vist. Her er det vanskelig å tolke mye fra grafen, da målingene ligger svært nær hverandre. Det kan se ut til at det er en viss inhiberende effekt også her, om ikke like tydelig som ved tilsats av $\overline{DP}_n \sim 10$. I tillegg er det også for $\overline{DP}_n \sim 20$ 1 mg/mL blir startpunktet for den lineære regresjonen også noe høyere enn for poly-M og M-lyase uten tilsatt G-blokk og ved tilsatt $\overline{DP}_n \sim 20$ 5 mg/mL. Dette kan føre til at det blir en litt feilaktig fremstilling av den lineære fremstillingen av gjennomsnittet for disse målingene. Det er fremdeles mulig å se at tilsats av 5 mg/mL gir en noe større effekt enn hva tilsats av 1 mg/mL gir.

Ved å sammenligne av de to grafene i Figur 3.12, er det tydelig at $\overline{DP}_n \sim 10$ gir en mer effektiv inhiberende effekt enn hva $\overline{DP}_n \sim 20$ har.

Videre er det i Figur 3.13 vist effekt av tilsats av G-blokk på nedbrytningen av poly-M med M-lyase fordelt etter konsentrasjon av tilsatt G-blokk for nedgang i grad av polymerisering mot tid.



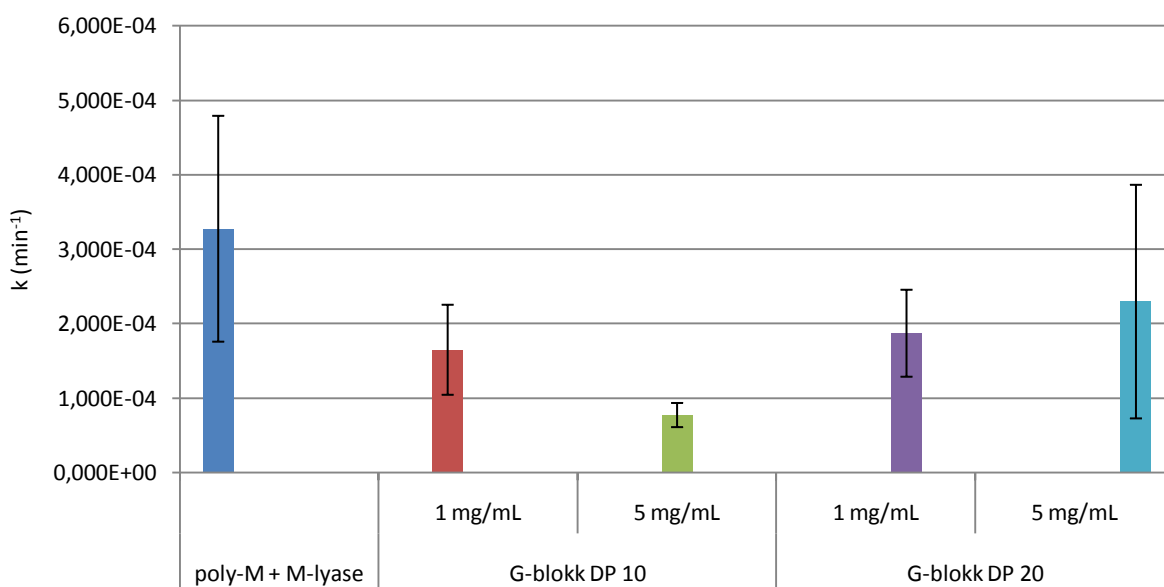
Figur 3.13: Målinger av poly-M og M-lyase tilsatt G-blokk her vist som nedgang i grad av polymerisering (X_w) mot relativ tid, fordelt i to grafer etter hvilken konsentrasjon av G-blokk som er tilsatt, A: 1 mg/mL og B: 5 mg/mL. I grafene er et gjennomsnitt av alle målingene som er utført vist ved en noe større figur, med en linje trukket gjennom ved lineær regresjon. Figurene som er noe mindre viser en øvre og nedre grense for variasjonene i målingene. I tillegg er det her tatt med kun et gjennomsnitt av målingene av poly-M og M-lyase uten tilsatt av G-blokk, merket som grå bokser med en linje trukket ved lineær regresjon.

I Figur 3.13 A vises effekten tilsats av 1 mg/mL av de to \overline{DP}_n har på nedbrytningen av poly-M med M-lyase. Det kan ved denne fremstillingen observeres at det er viss forskjell i effekten på nedbrytningen fra de to \overline{DP}_n ved tilsats av 1 mg/mL. Her har $\overline{DP}_n \sim 10$ en større effekt enn det $\overline{DP}_n \sim 20$ her. Det er som i Figur 3.12 en forskyvning i startpunktet til den lineære regresjonen for tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$.

I Figur 3.13 B er det vist effekten tilsats av G-blokk 5 mg/mL fra de to \overline{DP}_n har på nedbrytningen av poly-M med M-lyase. Her er det en klar forskjell mellom de to \overline{DP}_n på inhibering av nedbrytningen, der G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ 5 mg/mL gir en større inhiberende effekt enn $\overline{DP}_n \sim 20$ 5 mg/mL. Det er også tydelig at her har $\overline{DP}_n \sim 20$ en stor variasjon i målingene.

Figur 3.12 og Figur 3.13 bekrefter observasjonene som ble gjort fra resultatene som ble vist i Figur 3.10 og Figur 3.11. Både \overline{DP}_n og konsentrasjonen har betydning på effekten tilsats av G-blokk har på nedbrytningen av poly-M med M-lyase. Lav \overline{DP}_n og høy konsentrasjon (5 mg/mL) gir størst inhiberende effekt.

For å illustrere hvordan tilsatsen av G-blokk påvirker nedbrytningen av poly-M med M-lyase er k , hastigheten til nedbrytningene, beregnet. De resulterende k er illustrert i Figur 3.14, der standardavvikene til k er tatt med for å vise variasjonen i målingene.



Figur 3.14: Effekten av tilsatt G-blokk med ulike \overline{DP}_n og konsentrasjon til poly-M og M-lyase på nedbrytningsraten, her vist ved % av ratekonstanten til poly-M og M-lyase uten tilsatt G-blokk.

I Figur 3.14 er k til nedbrytningen av poly-M med M-lyase med og uten tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 fremstilt. Det er igjen tydelig at både \overline{DP}_n og konsentrasjon av tilsatt G-blokk har betydning. Det ser ut til at tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ gir en dose-respons med inhiberende effekt ved at k går ned, altså er enzymaktiviteten svekket. Det ser ut til at det ved tilsats av 1 mg/mL $\overline{DP}_n \sim 10$ skjer det en halvering i gjennomsnittlig ratekonstant, og videre blir det nok en halvering i ratekonstant ved tilsats av 5 mg/mL $\overline{DP}_n \sim 10$. Tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ gir ikke en like sterkt inhiberende effekt som $\overline{DP}_n \sim 10$ gjør. Det ser heller ikke ut til å ha noen betydning hvilken konsentrasjon som tilsettes. Det kan observeres at tilsatt G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ 5 mg/mL og $\overline{DP}_n \sim 10$ 1 mg/mL gir tilsvarende k , og de ligger innen hverandres standardavvik. Dette bekrefter de tidligere observasjonene fra Figur 3.10 og Figur 3.11. Variasjonen i k for tilsats av $\overline{DP}_n \sim 20$ 5 mg/mL er relativt stor. Det kan observeres at standardavviket strekker seg over i den til k for poly-M og M-lyase uten tilsatt G-blokk, og gjør det vanskelig å trekke en konklusjon om tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ har en effekt på nedbrytningen. Målingene til $\overline{DP}_n \sim 20$ 1 mg/mL varierer også til en viss grad, og det er derfor vanskelig å fatte en endelig konklusjon om effekten av $\overline{DP}_n \sim 20$ ut fra Figur 3.14.

3.3.2 DISKUSJON

Det ser ut til at tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 til nedbrytningen av poly-M med M-lyase har en inhiberende effekt. Hastigheten til nedbrytningen går ned ved tilsats av G-blokk, avhengig av \overline{DP}_n og konsentrasjon av G-blokk.

Det ser ut til å være en dose-respons ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$, der økt konsentrasjon fører til en sterkere inhibering. Det ser ikke ut til å være en tydelig dose-respons ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$. Tilsats av lav konsentrasjon G-blokk ved denne \overline{DP}_n ser ikke ut til å ha noen innvirkning på målinger av nedgang i viskositet. Ved tilsats av høy konsentrasjon G-blokk med $\overline{DP}_n \sim 20$ kan det ut fra målinger av nedgang i viskositet og endring i grad av polymerisering å være en tilsvarende effekt som den ved den laveste konsentrasjonen av tilsatt G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$.

Det ble observert en økning i viskositet ved tilsats av G-blokk 5 mg/mL i forhold til viskositeten til kun poly-M. G-blokk består av relativt korte sekvenser av G-enheter, som jo er ansvarlig for gelingsevnen til alginat. At det oppstår en økning i viskositet hovedsakelig ved tilsats av G-blokk 5 mg/mL kan komme av at det er en vesentlig høyere konsentrasjon av G-blokk enn det er ved tilsats av 1 mg/mL G-blokk, som ikke gir like mye økning i viskositet. Forholdet mellom konsentrasjon av poly-M og G-blokk er også veldig forskjellig. Ved tilsats av G-blokk 1 mg/mL er forholdet 1,5:1 mot 0,3:1 ved tilsats av 5 mg/mL. Det kan være en årsak til at det er en større økning av viskositet ved tilsats av høyere konsentrasjon. Det ble observert en økning i viskositet ved tilsats av 5 mg/mL G-blokk til poly-M, men i bufferen ble det kun observert en vesentlig økning i viskositet ved tilsatt $\overline{DP}_n \sim 20$ og ikke ved $\overline{DP}_n \sim 10$. Dette kan tyde på at det kan være en interaksjon mellom poly-M og G-blokk fører til en økning i viskositet ved 5 mg/mL G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$, mens dette ikke oppstår ved tilsats til buffer. Siden $\overline{DP}_n \sim 20$ ga en økning i viskositeten av bufferen, kan det være at lengden av polymeren kan ha en betydning for at denne øker viskositeten i både buffer og poly-M. Det kan være at disse lengre sekvensene av G har bundet divalente ioner i løsningen og gelet. Tilstedeværelse av et gelnettverk av G-blokker kan være årsaken til inhiberingen ved tilsats av høy konsentrasjon av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$.

G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ ga en større effekt av inhibering på nedbrytningen av poly-M med M-lyase, og en årsak til dette kan være at det er et større antall molekyler tilstede per

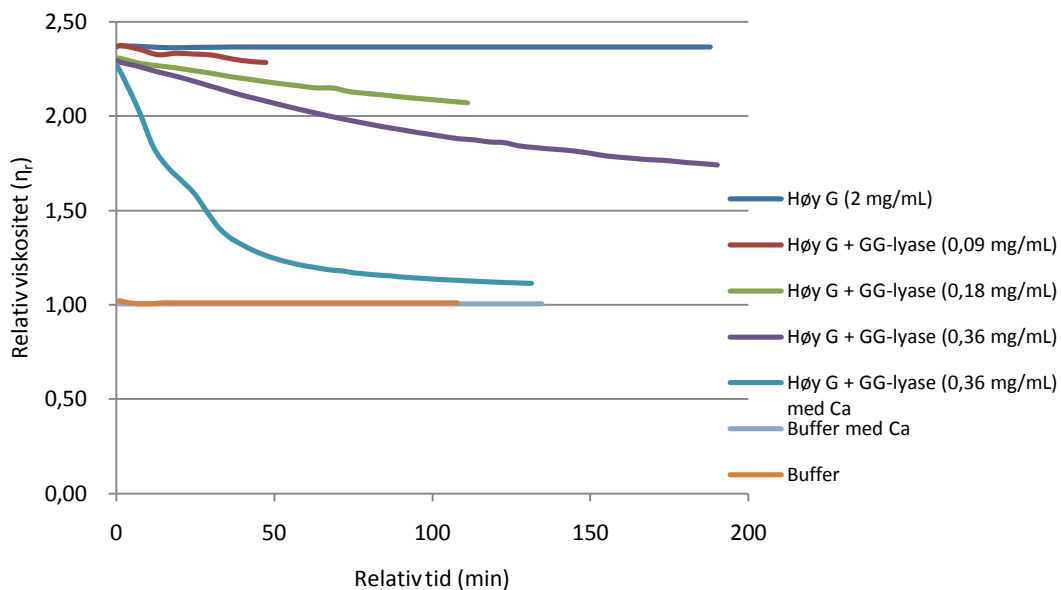
vektenhet ved $\overline{DP}_n \sim 10$ enn ~ 20 . Dette vil være uavhengig av konsentrasjon. Dette gjør at det er flere molekyler til stede til å hindre optimal enzymaktivitet ved $\overline{DP}_n \sim 10$ enn det er i $\overline{DP}_n \sim 20$.

Det var ikke forventet at tilsats av G-blokk skulle inhibere nedbrytningen av poly-M med M-lyase. Dette fordi M-lyasen har en høyere spesifisitet til å bryte bindinger mellom M-M og M-G enn G-G. Det var derfor ikke ventet at det aktive setet i M-lyase kunne utgjøre et aktuelt bindingssete for G-blokk. Samtidig er ladningstettheten til poly-M og G-blokk noe lik, så det er en mulighet for at det skjer en konkurrerende inhibering ved binding av G-blokk. Da det ikke var forventet at G-blokk skulle hindre enzymet ved å binde til det aktive setet, kan det tenkes at G-blokk har forstyrret enzymaktiviteten ved en annen mekanisme. Det kan være at G-blokkene, på grunn av deres små størrelser, delvis kan binde det aktive setet til enzymet og slik hindre at poly-M å bindes fullstendig. Dette kan forklare hvorfor $\overline{DP}_n \sim 10$ har en større effekt på nedbrytningen enn $\overline{DP}_n \sim 20$. G-blokk med en $\overline{DP}_n \sim 20$ er større og stivere molekyler enn det G-blokk med en $\overline{DP}_n \sim 10$ er. Det kan være at disse hindrer bindingen av poly-M til M-lyase sterisk ved å forstyrre tilgangen substratet har til enzymet. Det er heller ikke forventet at aktiviteten av M-lyase skal påvirkes av tilstedeværelse av G, siden enzymet normalt fungerer ved G tilstede i polymerkjeden. I denne situasjonen er G-blokkene fri, og ikke en del av polymerkjeden. Det kan tyde på at dette er avgjørende med tanke på at enzymet ble inhibert av de frie G-blokkene.

3.4 HØY-G ALGINAT OG GG-LYASE

3.4.1 VISKOSITETSMÅLING

Konsentrasjonsregimet for måling av nedbrytningen av Høy-G alginat med GG-lyase ble også her satt ved å tilpasse ulike polymer- og enzymkonsentrasjoner på viskositet. Utgangspunktet for nedbrytningen var en polymerkonsentrasjon på 2 mg/mL Høy-G alginat. Det ble først tilsatt en enzymkonsentrasjon på 0,09 U/mL GG-lyase. Dette ga knapt noen nedbrytning, og konsentrasjonen ble derfor doblet til 0,18 U/mL. Dette ga kun et lite skift videre på nedbrytningen, og enzymkonsentrasjonen ble dermed ytterligere doblet til 0,36 U/mL. Da heller ikke dette ga noen større økning i nedbrytningen av polymeren, kom det frem at det var blitt brukt en buffer uten tilsatt Kalsium (Ca^{2+}), som er en viktig kofaktor for GG-lyasen. Det ble derfor tilsatt 1 mM CaCl_2 til bufferen, og resultatet ble en ønsket nedbrytningskurve ved en enzymkonsentrasjon på 0,36 U/mL. Viktigheten av kofaktor for optimal enzymaktivitet er altså vist ved relativ viskositet mot tid i Figur 3.15.



Figur 3.15: Bestemmelse av konsentrasjonsregimet til Høy-G alginat tilsatt GG-lyase ble funnet, i tillegg til at viktigheten av å ha nødvendige kofaktor tilstede.

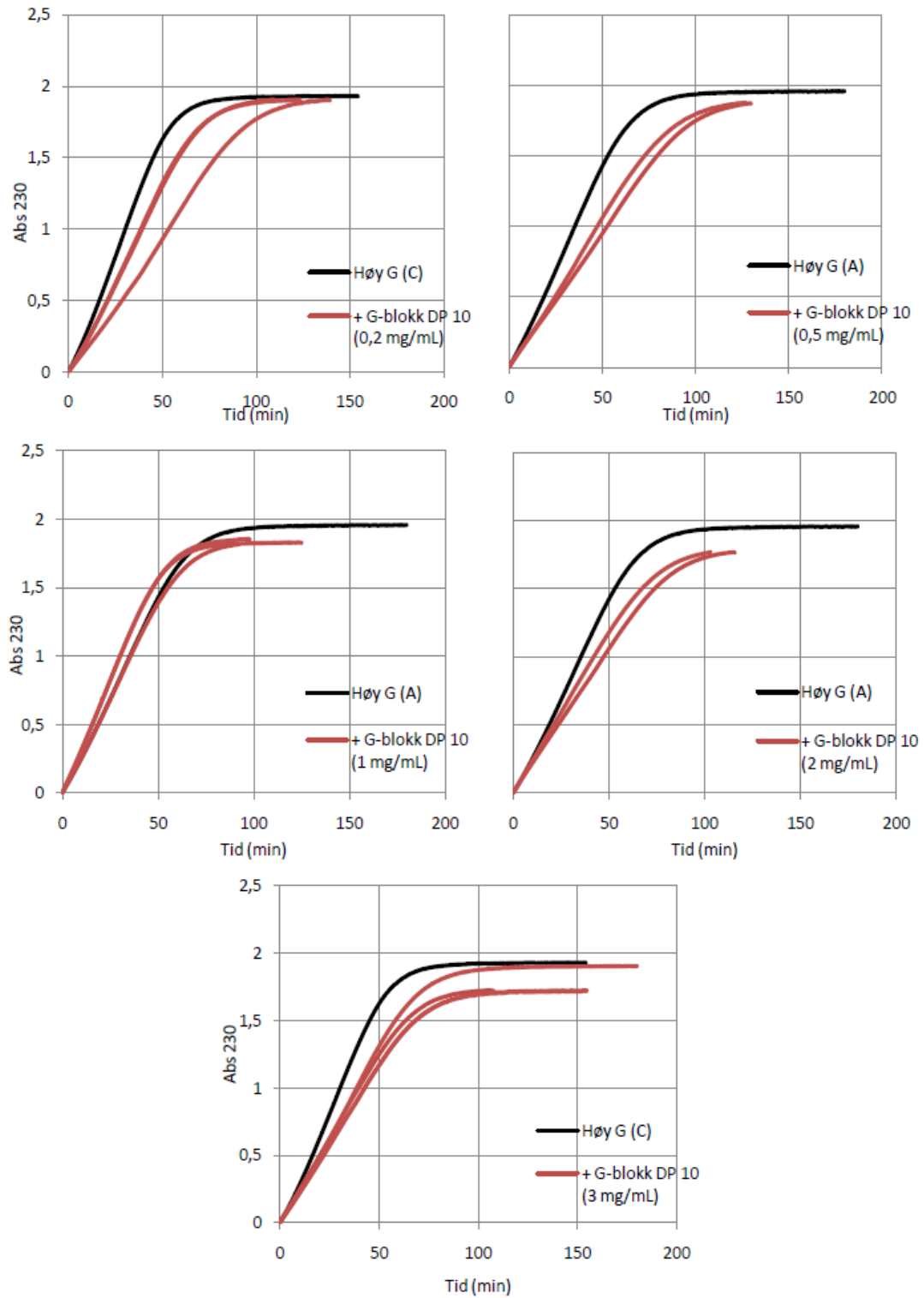
I Figur 3.15 kan det observeres at tilsats av lav konsentrasjon av GG-lyase kun ble resulterte i svak nedbrytning av Høy-G alginat. Ved økende konsentrasjon ble det en tydeligere nedbrytning, men ikke en ønsket nedbrytningskurve. Ved tilsats av Ca^{2+} til

bufferen er det tydelig at nedbrytningen ble mer fullstendig, og at GG-lyase er avhengig av tilstedeværelse av kofaktor, Ca^{2+} .

3.4.2 ABSORBANSMÅLING AV HØY-G OG G-BLOKK $\overline{DP}_n \sim 10$ OG ~ 20

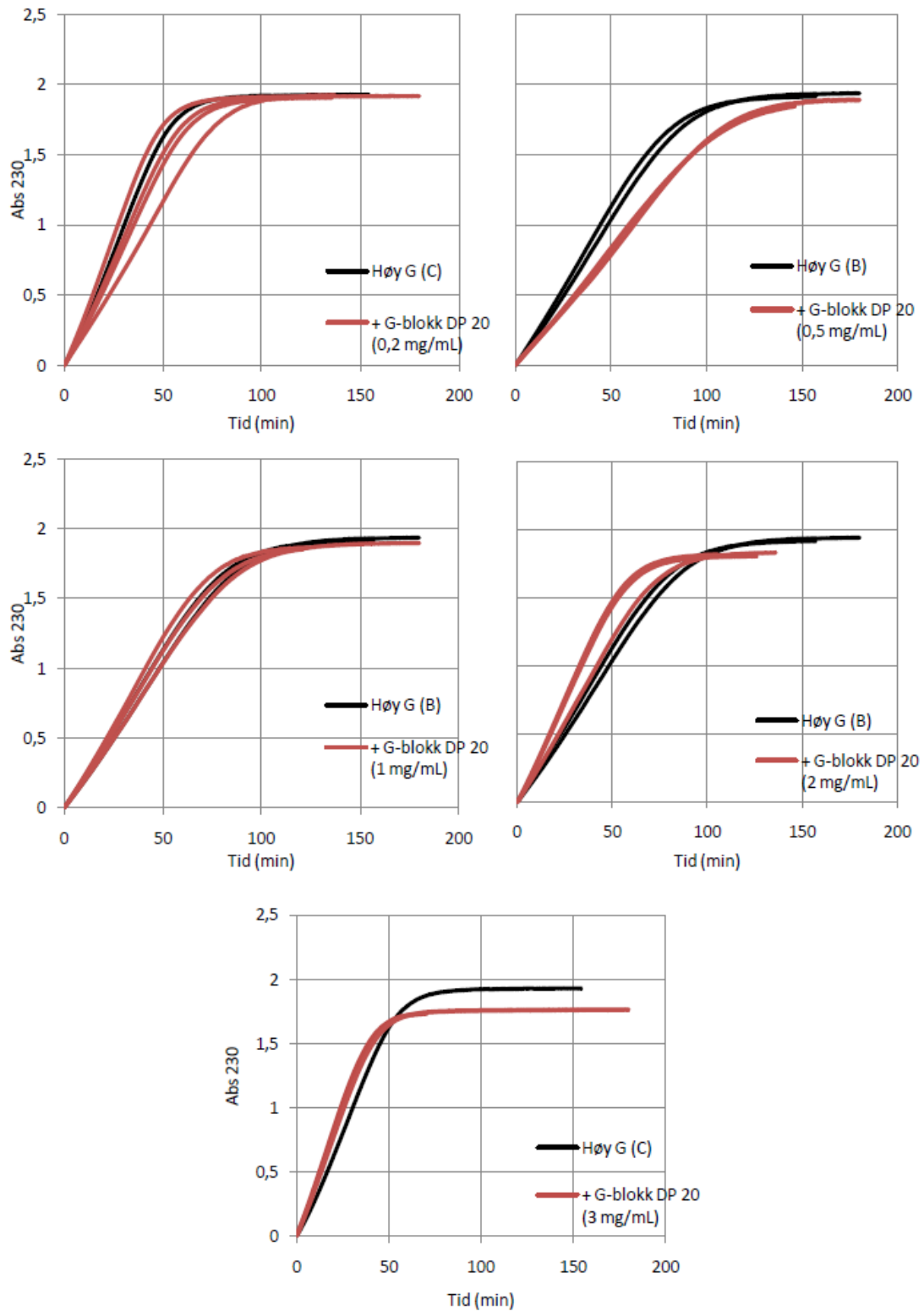
Da konsentrasjonsregimet var satt, ble det utført målinger av nedbrytningen ved absorbans. Dette fordi det er metode som er standard metode å bruke ved undersøkelse av enzymaktivitet til alginat lyase. Alginat lyaser genererer en reduserende ende på sukkerkjeden når den bryter en binding. Denne reduserende enden vil absorbere lys ved 230 nm. Det måles en økning i absorbans i UV ved 230 nm ved nedbrytning av alginat med GG-lyase. Etersom flere og flere brudd dannes i polymeren, vil absorbansen i prøven øke. Dette kan derfor brukes til å vise enzymets aktivitet på polymeren, og også se om tilsats av G-blokk har noen effekt.

Fra kontrolløsninger av Høy-G alginat 2 mg/mL (A, B og C) ble det tilsatt G-blokk til ønsket konsentrasjon før 0,36 U/mL GG-lyase ble tilsatt. Det er i Figur 3.16 og Figur 3.17 derfor tatt hensyn til hvilken kontrolløsning prøvene er fremstilt fra (A, B eller C) når resultatene fra absorbansmålingene av nedbrytningene er fremstilt. G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 ble tilsatt i økende konsentrasjon (0,2, 0,5, 1, 2 og 3 mg/mL).



Figur 3.16: Effekt på målt absorbans ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ med ulike konsentrasjoner på nedbrytningen av Høy-G alginat med GG-lyase.

I Figur 3.16 er kontrolløsning A og C blitt brukt til målingene. Det kan ved alle konsentrasjonene med unntak av 1 mg/mL se ut til å være en inhibering av nedbrytningen av Høy-G alginat med GG-lyase. Det fordi det ser ut til å oppstå et skift i økningen av absorbans ved tilsats av G-blokk. Dette skiftet går mot en saktere økning i absorbans, og derfor, en saktere nedbrytning. Det tar lengre tid for å nå samme absorbansnivå ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ som ved ingen G-blokk tilsatt til nedbrytningen av Høy-G alginat med GG-lyase. Ved tilsats av 1 mg/mL kan det derimot se ut til å være en raskere økning i absorbans. En av målingene ved denne konsentrasjonen var overlappende med kontrolløsningen, noe som tyder på at det er en viss variasjon i målingene. Dette gjør det vanskelig å trekke en konklusjon fra dette. Det er generelt liten variasjon i målingene, men det ser ut til at de fleste flater ut ved samme nivå etter konsentrasjon. Det kan også observeres at nivået for utflating av absorbans, og dermed fullstendig nedbrytning, blir lavere ettersom konsentrasjonen av tilsatt G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ øker. Det må bemerkes at disse utflatingene skjer utenfor det lineære område for absorbansmåling, og man kan dermed ikke si noe sikkert ut fra nivået på utflatingen.

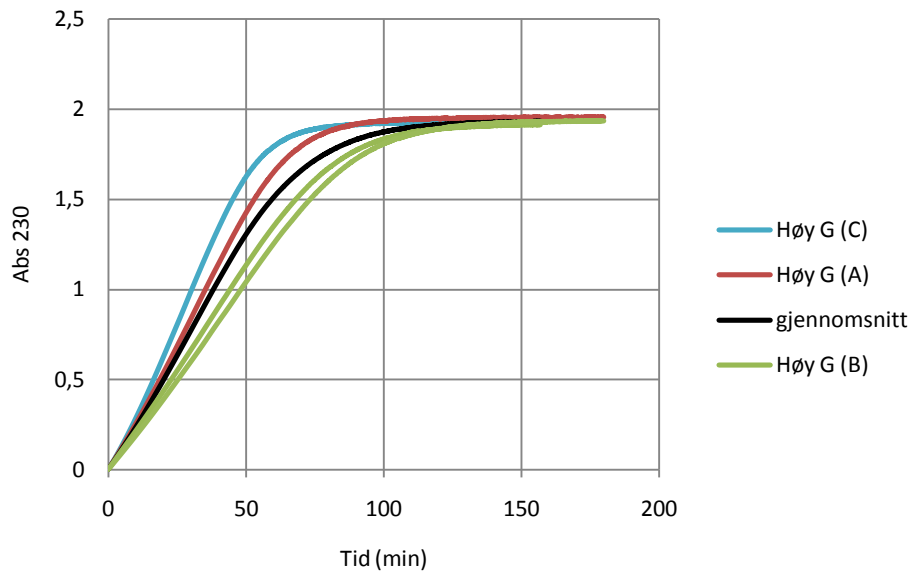


Figur 3.17: Effekten tilsats av G-blokk \overline{DP}_n 20 hadde på målt absorbans under nedbrytning av Høy-G alginat.

I Figur 3.17 er kontrolløsningene B og C brukt i målingene. Her kan det observeres en noe mer kompleks variasjon i målingene enn i Figur 3.16. Det ser ut til at tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ med en lav konsentrasjon (0,2 mg/mL), kan ha en inhiberende effekt på nedbrytningen, og at en økning i konsentrasjonen (0,5 mg/mL) gir en ytterligere inhibering. Ved tilsats av 1 mg/mL \overline{DP}_n overlapper de fleste kurvene med kontrolløsningen, noe som kan tyde på at det denne konsentrasjonen ikke har noen vesentlig innvirkning på nedbrytningen av Høy-G alginat med GG-lyase. Det kan se ut til at en økning av konsentrasjon tilsatt G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ til 2 mg/mL fører til en ytterligere økning i hastigheten for nedbrytningen. Ved en videre økning til 3 mg/mL skjer nedbrytningen fremdeles raskere enn kontrolløsningen, men er ikke like rask som ved tilsats av 2 mg/mL. Dette kan indikere at det er en kompleks mekanisme bak påvirkningen av tilsatt G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ og 20 på nedbrytningen av Høy-G alginat med GG-lyase.

3.4.3 RESULTATENE OPP MOT SIN EGEN KONTROLL

Fra Figur 3.16 og Figur 3.17 kan det observeres variasjoner i både målingene av kontrolløsninger og prøver. Variasjonen i kontrolløsningene er vist i Figur 3.18, der det i tillegg til rådata er et gjennomsnitt av disse målingene.

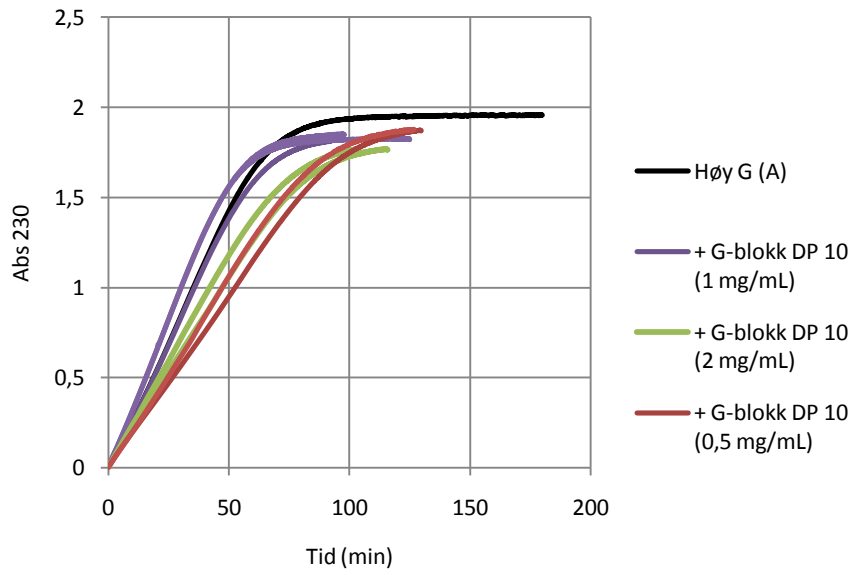


Figur 3.18: Variasjonen i kontrolløsningene A, B og C, og også et gjennomsnitt av de tre.

Fra Figur 3.18 er det tydelig at kontrolløsningene varierer relativt mye i forhold til et gjennomsnitt av de tre. Kontrolløsning A og C ligger noe over gjennomsnittet, mens de to målingene som er utført av kontrolløsning B begge ligger under gjennomsnittet. De to målingene av kontrolløsning B ligger også svært nær hverandre, som viser god reproduserbarhet.

Ut fra Figur 3.18 konkluderes det at det ikke er mulig å bruke gjennomsnittet som et utgangspunkt for de øvrige målingene, da dette vil føre til enten en over- eller underrepresentering av resultatene. På grunn av dette er derfor alle målingene sett mot hverandre etter hvilken kontrolløsning de er laget fra, for å se hvilken effekt tilsats av G-blokk har på nedbrytningen av Høy-G alginat med GG-lyase.

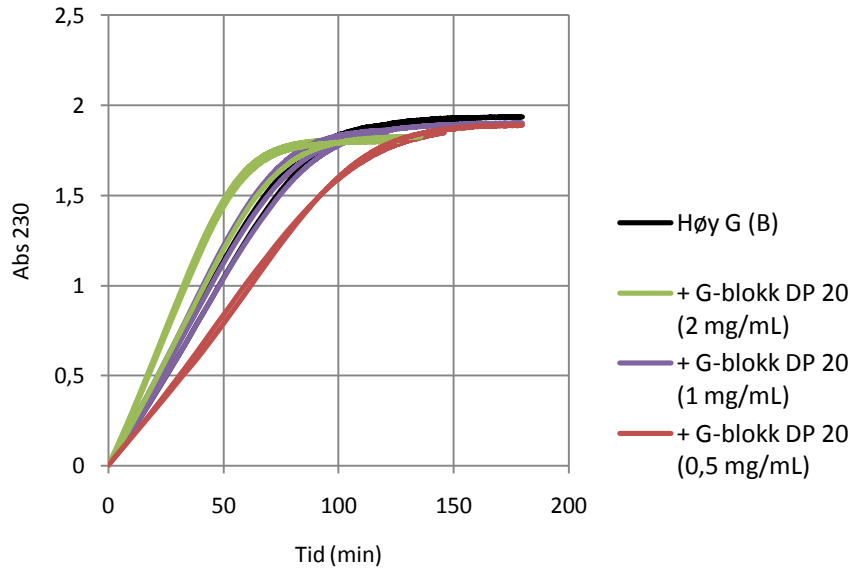
I de følgende figurene er rådata fra målingene vist i forhold til hverandre opp mot sine egne kontrolløsninger, A, B eller C. I Figur 3.19 er målingene som er utført på prøver laget av kontrolløsning A vist, der konsentrasjoner av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ ble testet.



Figur 3.19: Absorbansmåling av Høy-G alginat med GG-lyase ved tilsatt G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ med tre ulike konsentrasjoner, 0,5, 1, og 2 mg/mL.

I Figur 3.19 ser det ut til å være en generell trend at 0,5 mg/mL og 2 mg/mL har en inhiberende effekt på nedbrytningen av Høy-G alginat med GG-lyase. Ved tilsatt av 1 mg/mL G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ kan det se ut til å være en økning i absorbans som overgår den til kontrolløsningen. Det kan tyde på at tilsatt av denne konsentrasjonen har en effekt som øker hastigheten på nedbrytningen. Det ser ut til at nivå for utflating blir lavere ettersom konsentrasjonen av tilsatt G-blokk øker. Det er vanskelig å konkludere med noe fra dette, da disse nivåene for utflating er foretatt utenom den lineære regionen for absorbansmålinger.

Videre er det i Figur 3.20 vist målingene som er utført på prøver som er laget av kontrolløsning B, der det er tilsatt G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ i de samme tre konsentrasjonene som vist i Figur 3.19.

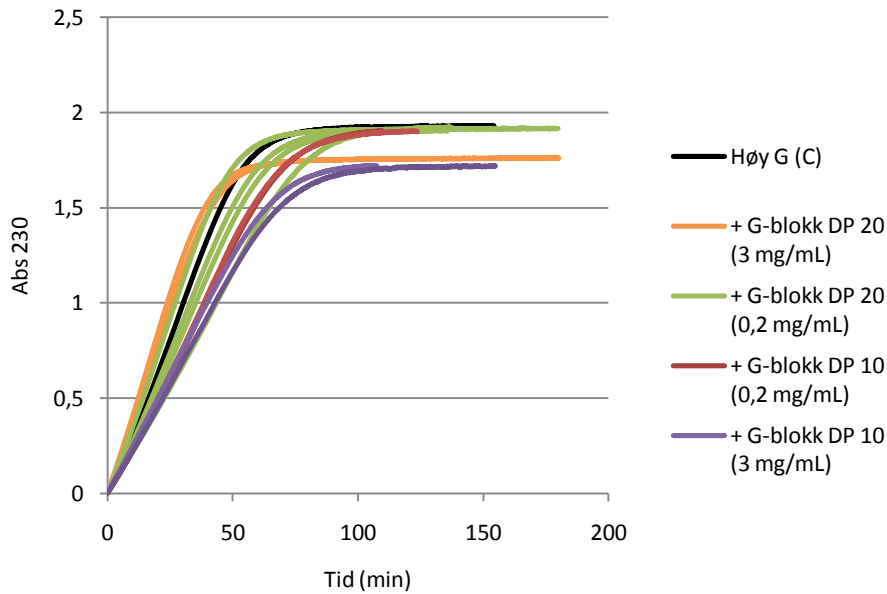


Figur 3.20: Absorbansmåling av Høy-G alginat og GG-lyase ved tilsatt G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ med tre ulike konsentrasjoner, 0,5, 1, og 2 mg/mL.

I Figur 3.20 kan det se ut til å være en dose-respons, da tilsats av 0,5 mg/mL G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ har en inhiberende effekt, mens det ved tilsats av 1 mg/mL ikke har en like sterkt inhiberende effekt, om det har noen påvirkning i det hele tatt. Ved tilsats av 2 mg/mL skjer det en økning i absorbans, og dermed også en økt hastighet på nedbrytningen. Også her kan det observeres at platå for utflating blir lavere jo høye konsentrasjon G-blokk som tilsettes, men dette er igjen nivå som ligger utenfor den lineære regionen til absorbansmåling.

Fra Figur 3.19 ser ut til å bli en inhibering ved både lavere og høyere konsentrasjon av G-blokk, mens det i Figur 3.20 så ut til å være en dose-respons av tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$. Det var derfor interessant å se hvilken effekt en videre tilsats av G-blokk i de to ytterpunktene av konsentrasjon hadde på nedbrytningen av Høy-G alginat med GG-lyase, Det ble derfor testet hvilken effekt tilsats av 0,2 mg/mL og 3 mg/mL av de to respektive \overline{DP}_n hadde på økningen i absorbans. Alle løsningene ble her laget av kontrolløsning C.

I Figur 3.21 er resultatene fra målingene av tilsats av 0,2 mg/mL og 3 mg/mL G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 vist opp mot sin egen kontroll og i forhold til hverandre.



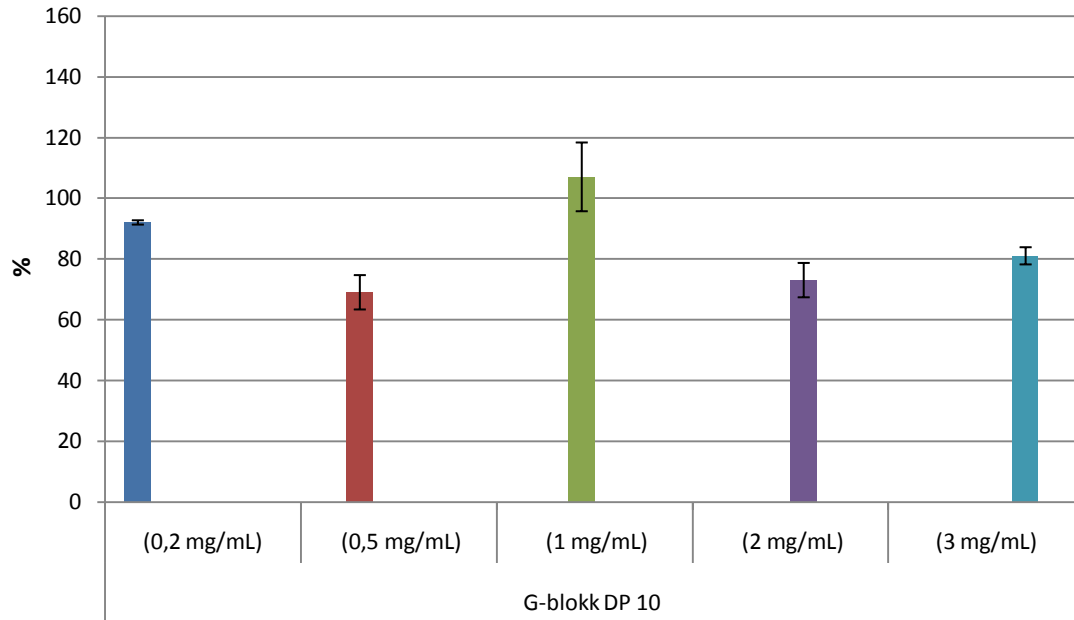
Figur 3.21: Absorbansmåling av Høy-G alginat og GG-lyase ved tilsatt G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 , med to ulike konsentrasjoner, 0,2 og 3 mg/mL.

I Figur 3.20 kan det observeres at det ved tilsats av 0,2 og 3 mg/mL G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ skjer en saktere økning i absorbans enn det gjør ved kontrolløsningen. Det kan også observeres at absorbansen ved den lavere konsentrasjonen flater ut nærmere der kontrolløsningen flater ut enn ved den høyere konsentrasjonen. Dette kan også observeres i målingene til de respektive konsentrasjonene av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$. Ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ ser det ut til å være en raskere økning i absorbans ved tilsats av 3 mg/mL enn det gjør ved tilsats av 0,2 mg/mL. Det er en stor variasjon i målingene ved tilsats av 0,2 mg/mL, men det kan se ut til å være en overvekt av målinger som går saktere enn kontrolløsningen.

Ved utførelse av absorbansmålingene ble det observert at metoden ikke var optimal med tanke på at det ble noe ulike starttidspunkt for målingene. Dette fordi målingene ble startet noe etter at enzymet var satt til, da kuvetten ble satt i spektrometeret satt til blank. Dette kan ha ført til at startpunktet for målingene blir feilaktig, da enzymreaksjonen allerede var startet. Dette kan ha ført til en effekt på for eksempel utflatingsplatået.

For å utelukke denne kilden til variasjon ble det valgt å beregne stigningstall i den lineære regionen av kurvene. Det ble valgt å beregne disse mellom to faste punkt, mellom målt optisk tetthet (OD) 0,6 og 1,2. I Figur 3.22 er gjennomsnittet av stigningstallene til målingene ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ vist. Stigningstallene er

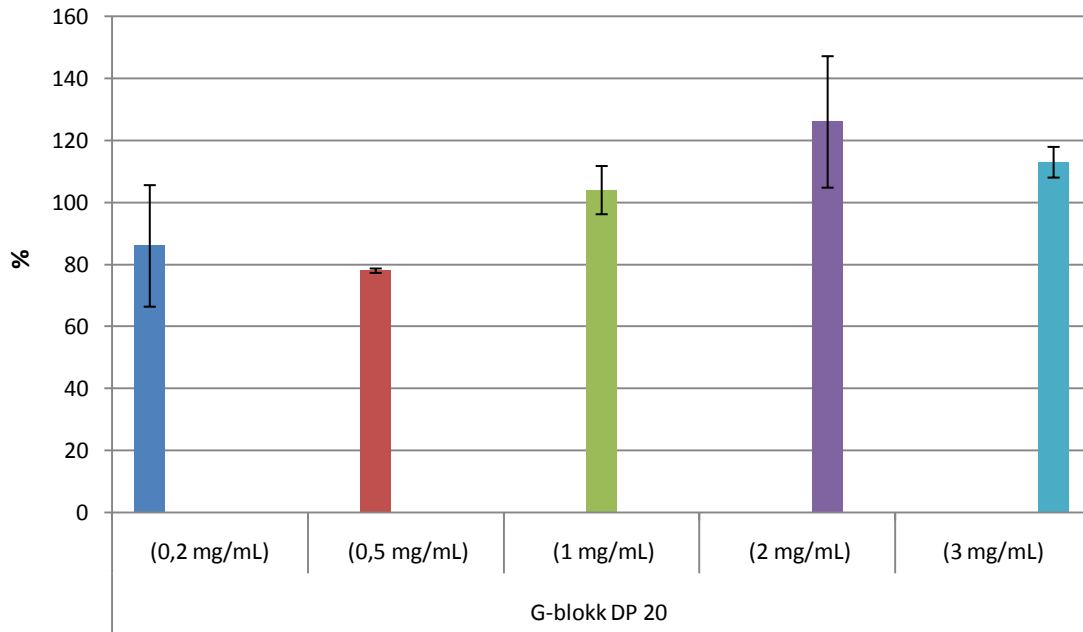
normalisert opp mot sin egen kontroll (her A og C) for å utelukke variasjonen i disse målingene. I tillegg er standardavvikene til målingene vist for å vise variasjonen i målingene.



Figur 3.22: Effekten av tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ på ratekonstanten for nedbrytningen av Høy-G alginat med GG-lyase som normalisert til sine respektive kontrolløsninger.

I Figur 3.22 kan det observeres en trend der tilsats av både lave og høye konsentrasjoner har en inhiberende effekt. Ved tilsats av 1 mg/mL, en median konsentrasjon i forhold til de andre, ser det ut til at det er en liten økning i hastighet på nedbrytningen da gjennomsnittet for disse målingene ligger rett over det for kontrolløsningen. Ved denne konsentrasjonen er det er en relativt stor variasjon i målingene til sammenligning med de øvrige målingene. Det er derfor vanskelig å konkludere med om tilsats av 1 mg/mL faktisk har en effekt som øker aktiviteten av enzymet.

I Figur 3.23 er det tilsvarende vist et gjennomsnitt for stigningstallet til målingene, med standardavvik som viser variasjonen i målingene for tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$. Også her er stigningstallene normalisert til sine respektive kontrolløsninger (her B og C).



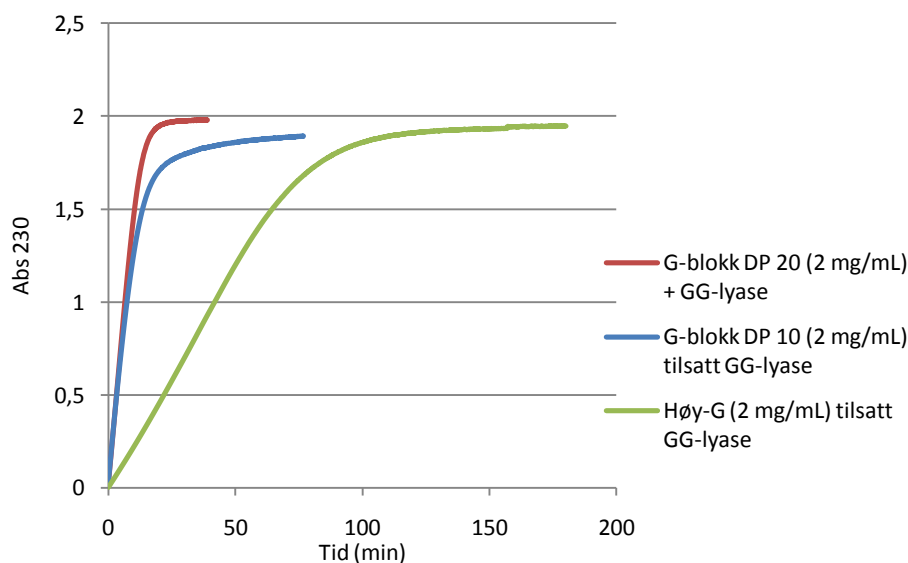
Figur 3.23: Effekten av tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ på ratekonstanten for nedbrytningen av Høy-G alginat med GG-lyase, normalisert til sine respektive kontrolløsninger.

I Figur 3.23 kan det observeres at tilsats av lav konsentrasjon (0,2 og 0,5 mg/mL) av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ har en inhiberende effekt på nedbrytningen av Høy-G alginat med GG-lyase. Dette stemmer godt med observasjonene for de samme konsentrasjonene i Figur 3.22. Ved tilsats av høyere konsentrasjon oppstår det en gradvis mer forsterkende effekt på nedbrytningen opp til 2 mg/mL tilsatt G-blokk. Ved tilsats av 3 mg/mL G-blokk er ikke effekten like stor som ved 2 mg/mL, men det er fremdeles en forsterkende effekt ved denne konsentrasjonen. Ved tilsats av 1 mg/mL G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ stemmer også effekten stigningstallet viser overens med observasjonene som ble gjort i Figur 3.22 ved tilsvarende konsentrasjon.

Fra Figur 3.22 og Figur 3.23 er det tydelig at effekten tilsats av G-blokk med \overline{DP}_n på nedbrytningen av Høy-G alginat med GG-lyase er kompleks. Det er ingen tydelig dose-respons, og heller ingen klar trend for effektene. Det tyder på at det er flere mekanismer som ligger bak påvirkningen tilsats av G-blokk har på nedbrytningen av Høy-G alginat med GG-lyase.

3.4.5 G-BLOKK SOM SUBSTRAT FOR GG-LYASE

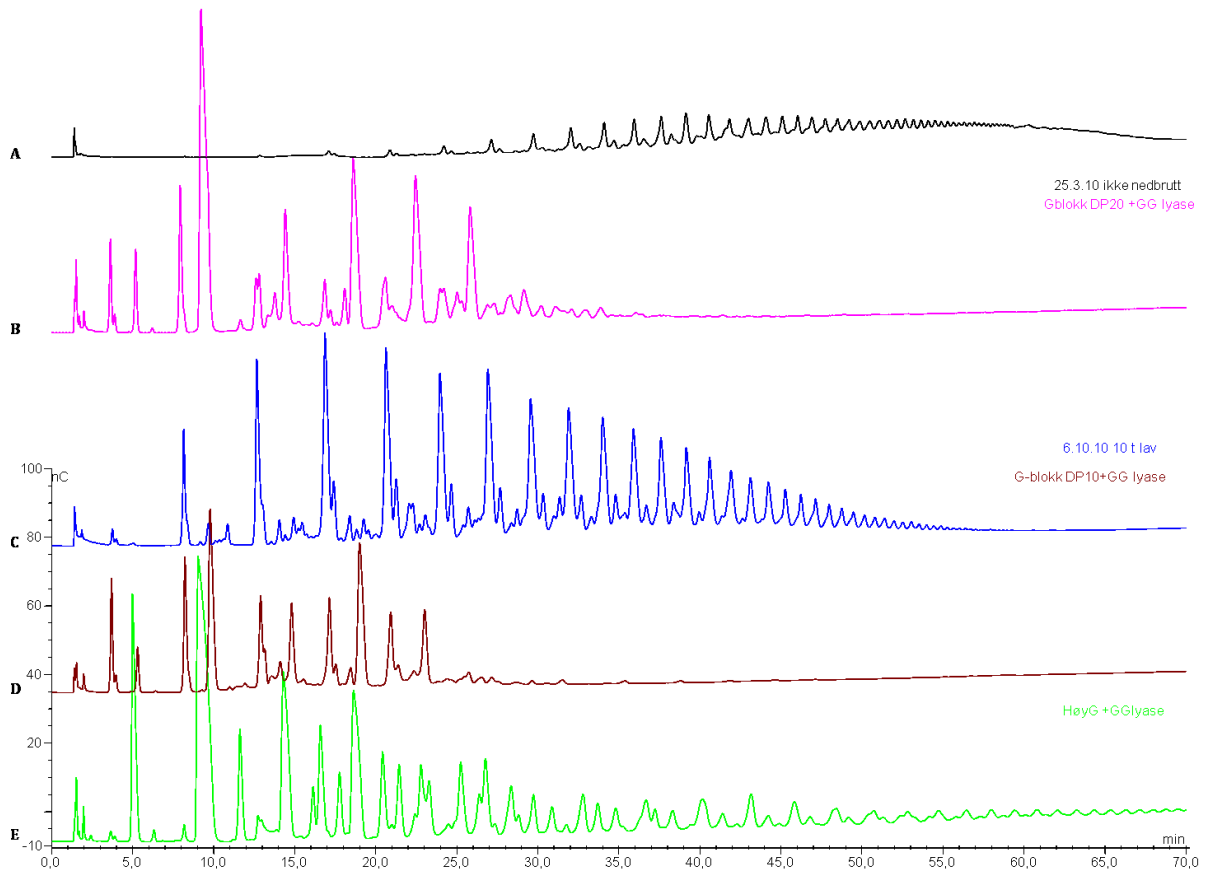
Da GG-lyase bryter bindinger mellom G-G, er det naturlig å tro at G-blokk er et substrat for dette enzymet. Det ble derfor målt endring i absorbanse ved en nedbrytning av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 i en konsentrasjon på 2 mg/mL tilsatt GG-lyase. Figur 3.24 viser endringen i absorbanse målt over tid for de to \overline{DP}_n , i tillegg til et gjennomsnitt av målingene som er utført på høymolekylært Høy-G alginat.



Figur 3.24: Målinger av endring i absorbanse ved 230 nm for G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 brutt ned med GG-lyase og for et gjennomsnitt av målinger utført for nedbrytningen til høymolekylært Høy-G alginat med GG-lyase uten tilsatt av G-blokk.

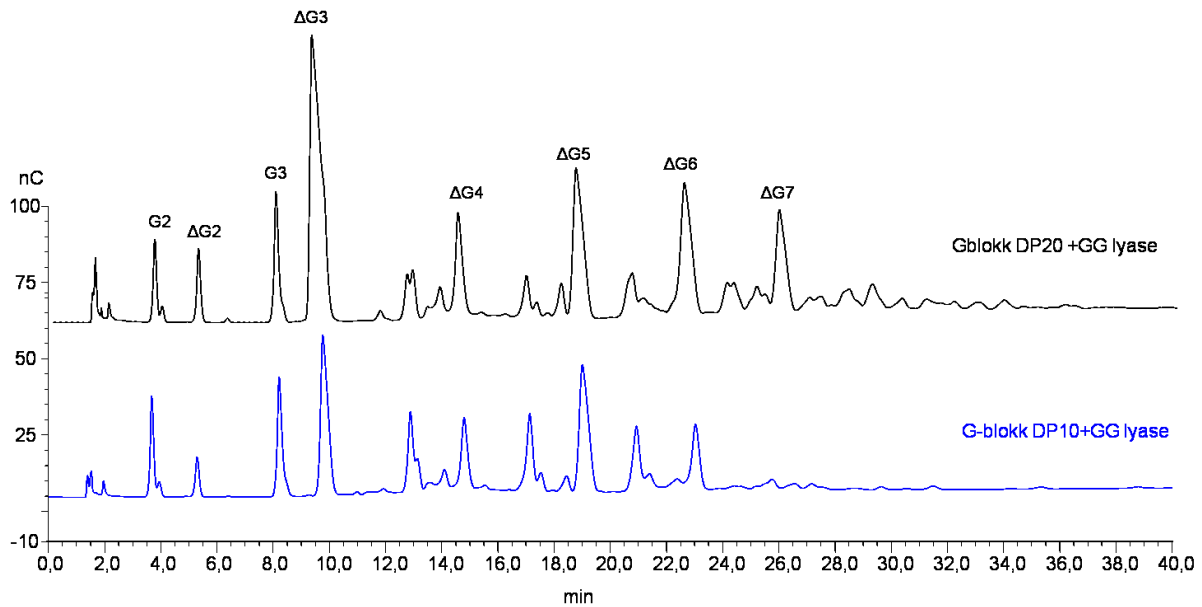
Fra Figur 3.24 kan det observeres at nedbrytningen av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 med GG-lyase gir en raskere økning av absorbanse enn det nedbrytningen av Høy-G med GG-lyase gjør. Det ser ut til at G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ oppnår en utflating på et noe lavere nivå enn det G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ gjør. Det ser også ut til at G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ går noe raskere enn G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$.

For å bekrefte at G-blokk er et substrat for GG-lyase og for å undersøke hvilke sluttprodukter nedbrytningene gir, ble en rekke analyser av produktene fra nedbrytningene utført på HPAEC-PAD. Prøvene ble tatt ut ved en observert utflating i målt absorbanse som vist i Figur 3.24. Resultatene fra HPAEC-PAD analysene er vist i Figur 3.25, der det i tillegg til produktene fra nedbrytningen er tatt med utgangspunktet for de to G-blokkene.



Figur 3.25: Viser A: utgangspunktet for G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$, B: produkt fra nedbrytning av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ med GG-lyase, C: utgangspunktet for G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$, D: produkt fra nedbrytning av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ med GG-lyase, og E: produktet fra nedbrutt Høy-G alginat med GG-lyase.

I Figur 3.25 ser det ut til at det, med hensyn til at utgangspunktene var svært ulike, relativt sett har gitt tilsvarende sluttprodukter fra de tre nedbrytningene. Høy-G alginat er ikke like nedbrutt som de to G-blokkene. Da det er en liten forskjell mellom produktene fra nedbrytningen av de to G-blokkene, er disse to sammenlignet i Figur 3.26.



Figur 3.26: Produktene fra nedbrytning av henholdsvis G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ og ~ 10 , med markerte topper.

I Figur 3.26 er toppene merket etter hva de representerer, G2 for en dimer av G og $\Delta G2$ for en dimer av G med umettet ende, som vil absorbere UV-lys ved 230 nm. Det er tydelig at det er en forskjell i produktene fra nedbrytningen av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 . Nedbrutt G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ har kun topper opp til 6-mer, og dermed mangler 7-mer som er i nedbrytningsproduktet fra $\overline{DP}_n \sim 20$. Det ser ut til å være en forskjell også i signalstyrken, noe som kan komme av at det er en liten forskjell i konsentrasjon til prøvene som ble analysert.

3.4.6 DISKUSJON

Ut fra resultatene presentert her, er det tydelig at effekten tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 har på nedbrytningen av Høy-G alginat med GG-lyase er kompleks.

Det kan se ut til at tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ til nedbrytningen generelt har en inhiberende effekt, da hastigheten for nedbrytningene generelt går ned ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ sammenlignet med nedbrytning uten G-blokk til stede. Tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ ser ut til å ha en inhiberende effekt på nedbrytningen ved lave konsentrasjoner, men at det fører til en raskere nedbrytning ved tilsats av økende konsentrasjon. Ved 2 mg/mL tilsatt G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ observeres det den høyeste økningen av hastigheten til nedbrytning. Ved 3 mg/mL G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ tilsatt går denne effekten noe tilbake, men nedbrytningshastigheten er her fremdeles raskere enn ved ingen G-blokk tilsatt.

G-blokk kan også fungere som substrat for enzymet, noe som ytterligere kompliserer mekanismen for effekten tilsatsen av G-blokk har på nedbrytningen til høymolekylært Høy-G alginat av GG-lyase.

Den inhiberende effekten av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ kan forklares ved at det på grunn av den lille størrelsen forstyrrer bindingen av substratet. Det kan være at den binder det aktive setet i enzymet, men at dette ikke er produktivt. Ved binding hindrer den substratet i å komme i kontakt med det aktive setet, og slik inhiberer aktiviteten av enzymet. Størrelsen til G-blokken ved denne \overline{DP}_n gjør at den raskere brytes ned til det minste mulige produkt for GG-lyasen. For at enzymet skal kunne bryte bindinger mellom enhetene i polymerkjeden må et visst antall enheter binde til det aktive setet. Da G-blokker ved denne \overline{DP}_n raskt brytes ned så mye som enzymet har mulighet til, kan det være at de resulterende produktene fører til en produkthemming av enzymet.

At tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ øker enzymaktiviteten kan forklares med at den ved denne størrelsen kan binde enzymet, og gi en signifikant økning i absorbans i forhold til det G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ gjør. Dette fordi G-blokkene ved denne \overline{DP}_n har en lengre sekvens som kan brytes ned, og derfor også mer som kan gi en økning i absorbans. Dette kan observeres som økt enzymaktivitet, uten at G-blokken direkte har påvirket enzymaktiviteten, bare det at de er lettere tilgjengelig, og lettere å bryte ned enn det høymolekylære alginatet. Siden det skjer en tilbakegang i økning av hastigheten for

nedbrytningen ved høy nok konsentrasjon av tilsatt G-blokk, kan det være at dette skjer fordi enzymet er mettet med substrat, og har nådd maksimal kapasitet. Det kan også være at det skjer en produkthemming.

Resultatene fra HPAEC-PAD analyse av produktene fra nedbrytningen av G-blokkene med GG-lyase viste at de to hadde en liten forskjell i de resulterende \overline{DP}_n sluttproduktene. Produktene fra nedbrytningen av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ hadde maksimalt 7-mer i produktet, mens de tilsvarende sluttproduktene fra G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ kun gikk opp til 6-mer. Det kan være at dette er en avgjørende faktor til den sterkere inhiberingen av $\overline{DP}_n \sim 10$ enn den fra ~ 20 . Det fordi at det er mulig at 6-mer er den korteste mulige sekvens som enzymet kan kutte til. Det vil bety at G-blokker med $\overline{DP}_n \sim 10$ raskere kommer ned i minste mulige produkt enn det $\overline{DP}_n \sim 20$ gjør. Det kan være grunnen til at $\overline{DP}_n \sim 10$ har en større inhiberende effekt enn $\overline{DP}_n \sim 20$, med tanke på en mulig produkthemming.

Det kan se ut til å være ulike mekanismer som virker på nedbrytningen av høymolekylært Høy-G alginat med GG-lyase ved tilsats av G-blokk, avhengig av \overline{DP}_n .

3.5 GENERELL DISKUSJON

Det er avdekt at det ved tilsats av G-blokk til de tre modellsystemene som ble undersøkt har en effekt.

Ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ til nedbrytningen av kitosan med lysozym, skjer en inhibering. Det oppstår en dose-respons ved tilsats av økende konsentrasjon, da det blir en sterkere inhibering av enzymaktivitet. Dose-responsen som oppstår ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ kan forklares med at det ved en økt konsentrasjon av G-blokk er flere elementer til stede som forstyrrer bindingen av lysozym til kitosan. Det kan være at forskjellen i ladningen har en funksjon i denne mekanismen.

Betydningen dette har, med tanke på at G-blokk nå testes ut til bruk i behandlingen av CF, er viktig med tanke på at lysozym er ett av flere enzymer det er et høyt nivå av i slimet i lungene hos pasienter med CF. En inhibering av dette enzymet kan føre til at det ikke lenger har optimal funksjon. Dette kan gi en positiv forsterkende effekt av G-blokk til behandling mot hyperviskositet. Dette fordi lysozym i lungene angriper bakterier, slik at de lyserer og DNA og annet celleinnhold lekker ut som øker viskositeten til slimet. Om denne situasjonen ikke oppstår vil det bety at dette ikke bidrar til at slimet får en økning i viskositet, i tillegg til at G-blokk svekker alginat-mucin nettverket og gjør pasienten i stand til lettere å fjerne slimet fra lungene. Dette vil potensielt bedre livskvaliteten for pasientene, ved forhåpentligvis å senke de plagsomme symptomene med hyperviskositet.

Det ble funnet at G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ og 20 inhiberer nedbrytningen av poly-M med M-lyase. Det ser også ut til å være en dose-respons ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$, der økt konsentrasjon fører til en sterkere inhibering. Dette ser ikke ut til å være tilfelle ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$. Inhiberingen ser ut til å være uavhengig av konsentrasjon, og at denne inhiberingen er på samme nivå som den forårsaket av den laveste konsentrasjonen av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$.

G-blokk, som M-lyasen egentlig ikke skal binde for å bryte, har faktisk en inhiberende effekt. Dette indikerer at G-blokk, med en mekanisme som er ukjent, kan senke enzymaktiviteten til M-lyase. Dette vil være viktig med tanke på at G-blokk er en aktiv substans, som faktisk kan ha en påvirkning på enzymer. Dette er viktig med tanke på

bruken av G-blokk til behandling i mennesker, der de kommer til å komme i kontakt med enzymer.

Ved tilsats av G-blokk til nedbrytningen av Høy-G alginat med GG-lyase ble det funnet at G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ har en inhiberende effekt, mens det ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ er en mer kompleks mekanisme, der det ved lavere konsentrasjoner ser ut til å ha en inhiberende effekt, mens det ved økende konsentrasjon gir en økt hastighet på nedbrytningen. Ved den høyeste konsentrasjonen som ble satt til ble det observert en tilbakegang i økning i nedbrytningshastighet, men at den fremdeles var høyere enn kontrollen uten tilsatt G-blokk. Dette viser at G-blokk har en effekt på GG-lyase, men at denne mekanismen ikke er kjent, og høyst sannsynlig er den også kompleks.

Også her er det tydelig at G-blokk er en aktiv substans i reaksjonen med enzym, da tilsats av G-blokk gir en effekt. Dette viser igjen betydningen av å undersøke en eventuell effekt av G-blokk til viktige fysiologiske enzym, spesielt siden det er planlagt en bruk av dette i mennesker. Det er ikke forventet at mekanismen bak effekten på enzymene i denne oppgaven er den samme som den observert ved enzyminhibering av pepsin og lipase av alginat.

Arbeidet i denne oppgaven har vist at G-blokk har en effekt på aktiviteten til enzymene som ble undersøkt. Til en stor grad var effekten en inhibering, men det viste seg også å gi en økt hastighet på reaksjonen ved tilsats av G-blokk. Denne inhiberende effekten av G-blokk kan være positivt med tanke på at det kan forsterke effekten ved behandling av CF, da G-blokk inhiberer aktiviteten av lysozym. Dette er ikke nødvendigvis bare positivt, da G-blokk også har et potensiale for levering av medisin over slimhinner. Om medisinen som skal leveres er et enzym, kan det potensielt føre til komplikasjoner. G-blokk skal i den situasjonen fungere som en modulator av slim, men om den i tillegg har en inhiberende effekt på medisinen som skal leveres, kan det føre til liten effekt av medisinen.

3.6 FORSLAG TIL VIDERE STUDIER

Ved undersøkelse av effekten tilsats av G-blokk hadde på enzymaktiviteten til lysozym på kitosan, ble det her kun testet G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$. Det kunne være interessant å undersøke hvilken effekt tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ har, og mulig også flere konsentrasjoner. For å avdekke om det oppstod en aggregering av G-blokk til lysozym eller kitosan, kan det være mulig å utføre noen lysspredningsanalyser. Det kan da være mulig å se om det oppstår noen løselige kompleks av G-blokk og enten lysozym eller kitosan.

Ved undersøkelsene av høymolekylært poly-M og høymolekylært Høy-G alginat, kan det være en mulighet å utføre komplementære undersøkelser, med både absorbans- og viskositetsmålinger. Det kan da undersøkes om de to analysene kan gi komplementære resultater, og også bekrefte de observasjonene som allerede er gjort. I tilfellet med høymolekylært Høy-G alginat kan det være interessant å utføre viskositetsmålinger da dette kan bekrefte om det er G-blokk som brytes ned først. Det ble her funnet indikasjoner på at G-blokk brytes ned før høymolekylært alginat, da disse er lettere tilgjengelig. I så tilfelle ville nedbrytningskurven ved relativ viskositet mot tid hatt en forskyvning i starten der det var ingen endring i viskositet før den går ned. Dette ville tyde på at G-blokkene ble brutt ned først, som ikke bidrar til viskositeten av løsningen til en like stor grad som det høymolekylære alginatet gjør.

Enzymene som ble undersøkt ble valgt fordi lysozym har en rolle i cystisk fibrose, og fordi poly-M og M-lyase og Høy-G alginat og GG-lyase er kjente modellsystemer. Videre kunne det være interessant å fortsette de undersøkelsene som er gjort i denne oppgaven på flere typer enzymer. Det hadde vært interessant å undersøke videre effekten av tilsats av G-blokk på proteaser, til eksempel chymotrypsin, og lipase, da disse enzymene har vist å bli inhibert av alginat.

4.0 KONKLUSJON

G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ ga en inhiberende effekt på nedbrytningen til lysozym på kitosan. Det ble observert at det ved tilsats av G-blokk førte til en dose-respons, der økende konsentrasjon tilsatt G-blokk ga en sterkere inhiberende effekt. Den inhiberende effekten av G-blokk på lysozym vil ha en betydning på bruken av G-blokk til behandling av CF. Det vil da være viktig å undersøke nærmere hvilken betydning denne effekten faktisk vil ha i denne sammenhengen.

Ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ til poly-M og M-lyase førte det til en inhibering av nedbrytningen. G-blokk med denne $\overline{DP}_n \sim 10$ ga også en dose-respons, der økt konsentrasjon ga økt inhibering. Ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 20$ til nedbrytningen av poly-M med M-lyase førte det til en inhibering, men ikke like tydelig som ved $\overline{DP}_n \sim 10$, og det var heller ikke så stor forskjell ved de to konsentrasjonene som ble satt til.

Tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ til nedbrytningen av Høy-G alginat med GG-lyase førte til en inhibering av enzymaktiviteten, mens det ved tilsats av $\overline{DP}_n \sim 20$ ga en inhibering ved lave konsentrasjoner, men en forsterking av enzymaktiviteten ved høye konsentrasjoner.

G-blokk har i denne oppgaven vist å ha en effekt på de tre enzymene som ble undersøkt. Dette indikerer at det er viktig å ta hensyn til at G-blokk ikke bare har en evne som modulator til gelnettverk, men også kan virke aktivt i forhold til aktivitet av enzymer. Dette vil ha betydning på bruken av G-blokk til behandling av CF, men også med tanke på den potensielle bruken av G-blokk til å øke biotilgjengeligheten over slimhinner for en eventuell vei for levering av medisin.

REFERANSELISTE

- Abrahamson, M., *et al.* (1996), 'Development of an Artificial Biofilm to Study the Effects of a Single Microcolony on Mass Transport', *Journal of Microbiological Methods*, **26**, 161-169.
- Amano, K. og Ito, E. (1978), 'The Action of Lysozyme on Partially Deacetylated Chitin', *European Journal of Biochemistry*, **85**, 97-104.
- Ballance, Simon, *et al.* (2005), 'Application of High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection and Statistical Analysis to Study Oligosaccharide Distributions - a Complementary Method to Investigate the Structure and Some Properties of Alginates', *Journal of Chromatography A*, **1093** (1-2), 59-68.
- Berg, J. M. , *et al.* (2007), *Biochemistry* (Sixth edn.; New York: W. H. Freeman and Company) 225-226.
- Berger, L.R. og Weiser, R.S. (1957), 'The B-Glucosaminidase Activity of Eggwhite Lysozyme', *Biochimica et Biophysica Acta*, **26**, 517-521.
- Boyen, C., *et al.* (1990), 'Preparation of Alginate Lyases from Marine Molluscs for Protoplast Isolation in Brown Algae', *Phycologia*, **29** (2), 173-181.
- Campa, Cristiana, *et al.* (2004), 'Determination of Average Degree of Polymerisation and Distribution of Oligosaccharides in a Partially Acid-Hydrolysed Homopolysaccharide: A Comparison of Four Experimental Methods Applied to Mannuronan', *Journal of Chromatography A*, **1026** (1-2), 271-281.
- Kompendium i TBT 4135, Biopolymerkjemi.
- Dettmar, P. W., *et al.* (2001), 'Inhibition of Pepsin by Alginates', in Reckitt Benckiser Healthcare (UK) Ltd. (ed.).
- Dionex Corporation 'Analysis of Carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (Hpa-Pad)', <<http://www.dionex.com/en-us/webdocs/5023-TN20.pdf>>, accessed 25.04.2011.
- Draget, K. I. og Taylor, C. (2011), 'Chemical, Physical and Biological Properties of Alginates and Their Biomedical Implications', *Food Hydrocolloids*, **25**, 251-256.

- Draget, K. I., *et al.* (1989), 'Alginate-Based Solid Media for Plant Tissue Culture', *Applied Microbiology and Biotechnology*, **31** (1), 79-83.
- Draget, K. I., *et al.* (2006), 'Alginates', in A. M. Stephen, Phillips, G. O., Williams, P. A. (ed.), *Food Polysaccharides and Their Applications* (Taylor & Francis Group, LLC), 289-328.
- Gaviscon (updated 07.01.11) <<http://www.gaviscon.co.uk/>>.
- Grant, Gregor T., *et al.* (1973), 'Biological Interactions between Polysaccharides and Divalent Cations: The Egg-Box Model', *FEBS Letters*, **32** (1), 195-198.
- Grasdalen, H., *et al.* (1981), '¹³C-N.M.R. Studies of Monomeric Composition and Sequence in Alginate', *Carbohydrate Research*, **89**, 179-191.
- Grasdalen, H. (1983), 'High-Field, ¹H-N.M.R. Spectroscopy of Alginate: Sequential Structure and Linkage Conformations', *Carbohydrate Research*, **118**, 255-260.
- Grasdalen, H., Larsen, B., Smidsrød, O. (1979), 'A P.M.R. Study of the Composition and Sequence of Uronate Residues in Alginate', *Carbohydrate Research*, **68**, 23-31.
- Greibrokk, T., *et al.* (2005), *Kromatografi, Separasjon Og Deteksjon* (Oslo: Universitetsforlaget) 60- 79.
- Haug, A. og Smidsrød, O. (1966), 'A Study of the Constitution of Alginic Acid by Partial Acid Hydrolysis', *Acta Chemica Scandinavia*, **21**, 183-190.
- Haug, A. & Smidsrød, O. (1966), 'A Study of the Constitution of Alginic Acid by Partial Acid Hydrolysis', *Acta Chemica Scandinavia*, **21**, 183-190.
- Haug, A. S., O. (1964), 'Composition and Properties of Alginates', (Norges tekniske høgskole).
- Indergaard, M. 'Tang Og Tare - I Hovedsak Norske Brunalger: Forekomst, Forskning Og Anvendelse.', <<http://www.ntnu.no/ansatte/mentz.indergaard/tang-og-tare>>.
- Jørgensen, Tor Erik, *et al.* (2007), 'Influence of Oligogulonates on Alginate Gelation, Kinetics, and Polymer Organization', *Biomacromolecules*, **8** (8), 2388-2397.

- Kohn, R. og Larsen, B. (1972), 'Preparation of Water-Soluble Polyuronic Acids and Their Calcium Salts, and the Determination of Calcium Ion Activity in Relation to the Degree of Polymerization', *Acta Chemica Scandinavia*, **26**, 2455-2468.
- Larew, L. A. og Johnson, D. C. (1989), 'Concentration Dependence of the Mechanism of Glucose Oxidation at Gold Electrodes in Alkaline Media', *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **262** (1-2), 167-182.
- Larsen, Bjørn og Haug, Arne (1971), 'Biosynthesis of Alginate : Part I. Composition and Structure of Alginate Produced by *Azotobacter Vinelandii* (Lipman)', *Carbohydrate Research*, **17** (2), 287-296.
- Lin, Tsau-Yen og Hassid, W. Z. (1966a), 'Pathway of Alginic Acid Synthesis in the Marine Brown Alga, *Fucus Gardneri* Silva', *Journal of Biological Chemistry*, **241** (22), 5284-5297.
- Lin, Tsau-Yen og Hassid, W. Z. (1966b), 'Isolation of Guanosine Diphosphate Uronic Acids from a Marine Brown Alga, *Fucus Gardneri* Silva', *Journal of Biological Chemistry*, **241** (14), 3283-3293.
- Liu, Hong, *et al.* (1999), 'Neutrophil Elastase and Elastase-Rich Cystic Fibrosis Sputum Degranulate Human Eosinophils in Vitro', *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, **276** (1), L28-L34.
- Madgwick, J., *et al.* (1973), 'Polymannuronic Acid 5-Epimerase from the Marine Alga *Pelvetia Canaliculata* (L.) Dcne. Et Thur', *Acta Chemica Scandinavia*, **27**.
- Nakada, H. I. og Sweeny, R. S. (1967), 'Alginic Acid Degradation by Eliminases from Abalone Hepatopancreas', *Journal of Biological Chemistry*, **19**, 845-851.
- Pearson, J. P. og Brownlee, I. A. (2010), 'Alginate Inhibition of Lipase', *American Chemical Society Spring Meeting 2010* (San Francisco).
- Ramsey, B. W. (1996), 'Management of Pulmonary Disease in Patients with Cystic Fibrosis', *The New England Journal of Medicine*, **335**, 179-188.
- Rocklin, R. D., *et al.* (1998), 'Improved Long-Term Reproducibility for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates Via a New Quadruple-Potential Waveform', *Analytical Chemistry*, **70** (8), 1496-1501.

- Rohrer, J. S. og Olechno, J. D. (1992), 'Secondary Isotope Effect: The Resolution of Deuterated Glucoses by Anion-Exchange Chromatography', *Analytical Chemistry*, **64** (8), 914-916.
- Rosenstein, B. J. og Cutting, G. R. (1998), 'The Diagnosis of Cystic Fibrosis: A Consensus Statement', *The Journal of Pediatrics*, **132** (4), 589-595.
- Salton, M. R. J. og Ghuysen, J. M. (1959), 'Structure of Di- and Tetrasaccharides Released from Cell Walls by Lysozyme and *Streptomyces* F₁ Enzyme and the B(1→4)-N-Acetylhexosaminidase Activity of These Enzymes', *Biochimica et Biophysica Acta*, **36**, 552-554.
- Salton, M. R. J. og Ghuysen, J. M. (1960), 'Acetylhexosamine Compounds Enzymatically Released from *Micrococcus Lysodeikticus* Cell Walls. Iii. Structure of Di- and Tetrasaccharides Released from Cell Walls by Lysozyme and *Streptomyces* F₁ Enzyme', *Biochimica et Biophysica Acta*, **45**, 355-363.
- Shak, S., *et al.* (1990), 'Recombinant Human Dnase I Reduces the Viscosity of Cystic Fibrosis Sputum', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **87** (23), 9188-9192.
- Shojaei, A. H. (1998), 'Buccal Mucosa as a Route for Systemic Drug Delivery: A Review', *Journal of Pharmacy & the Pharmaceutical Sciences*, **1** (15-30), 1998.
- Smidsrød, O. (1974), 'Molecular Basis for Some Physical Properties of Alginates in the Gel State', *Faraday Discussion of the Chemical Society*, **57**.
- Smidsrød, O. og Moe, S. T. (2008), *Biopolymer Chemistry* (Trondheim: Tapir academic press) 281-318.
- Soon-Shiong, P., *et al.* (1992), 'Successful Reversal of Spontaneous Diabetes in Dogs by Intraperitoneal Microencapsulated Islets', *Transplantation*, **54**, 769-774.
- Steen, H. for Havforskningsinstituttet 'Kyst Og Havbruk 2009, Kap. 2: Kystressurser; Stortare',
<http://www.imr.no/filarkiv/kyst_og_havbruk_2009/Kap_2.11.pdf/nb-no>.
- Taylor, C., *et al.* (2006), 'Use of Oligoguluronates for Treating Mucus Hyperviscosity', (WO/2007/039760; Norway: NTNU Technology Transfer AS).

Taylor, C., *et al.* (2005), 'Mucous Systems Show a Novel Mechanical Response to Applied Deformation', *Biomacromolecules*, **6** (3), 1524-1530.

Tøndervik, A., *et al.* (2010), 'Isolation of Mutant Alginate Lyases with Cleavage Specificity for Di-Guluronic Acid Linkages', *Journal of Biological Chemistry*, **285** (46), 35284-35292.

Vårum, K. M. og Smidsrød, O. (2005), 'Structure-Property Relationship in Chitosans', in S. Dumitriu (ed.), *Polysaccharides, Structural Diversity and Functional Versatility* (New York: Marcel Dekker), 625-639.

Willi, P. og Sharma, C. P. (2004), 'Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review', *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, **18**, 18-23.

Østgaard, K. (1993), 'Determination of Alginate Composition by a Simple Enzymatic Assay', *Hydrobiologia*, **260-261** (1), 513-520.

VEDLEGGSLISTE

Vedlegg 1 – Rensing og nedbrytning av G-blokk	1
V1.1 HPAEC-PAD	1
V1.2 NMR	4
Vedlegg 2 – Kitosan og lysozym	5
V2.1 Konsentrasjonsregime	5
V2.2 Bearbeiding av data	6
Vedlegg 3 - poly-M og M-lyase	8
V3.1 Konsentrasjonsregime	8
V3.2 Målinger tatt ut	9
V3.3 Bearbeiding av data	10
V3.4 Variasjon i målingene av poly-M	14

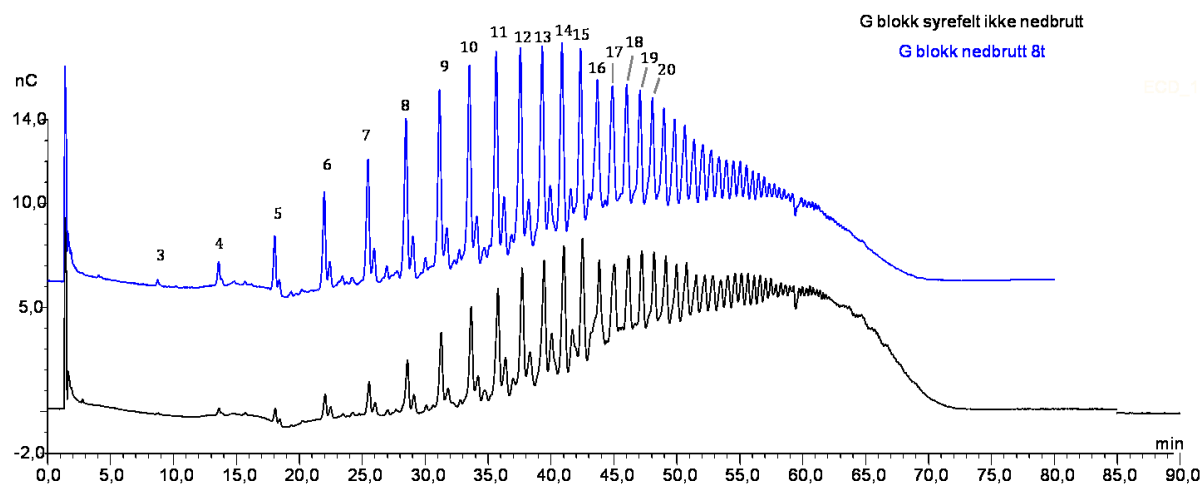
VEDLEGG 1. RENSING OG NEDBRYTNING AV G-BLOKK

G-blokk ble opparbeidet ved en rensing av alginat fra stilk av stortare, *Laminaria hyperborea*, [batch: 907-225-01]. Det ble utført ved en syrefelling før produktet fra denne utfellingen ble brutt ned, der det var ønsket å oppnå en gjennomsnittlig grad av polymerisering, \overline{DP}_n , ~ 10 . Dette ble oppnådd ved en metodeutvikling av prosedyren, som er vist i følgende vedlegg.

V1.1 HPAEC-PAD

G-BLOKK OG POLY-M FEBRUAR 2010

Ved den første prosedyren ble G-blokk brutt ned ved pH 3,8 og syrehydrolyse i 8 timer av en 5 % alginatløsning fra syrefelt G-blokk fra alginat batch: 907-255-01. Resultatet fra analyse ved HPAEC-PAD av produktene fra utfelling og nedbrytningen er vist i Figur V1.1.

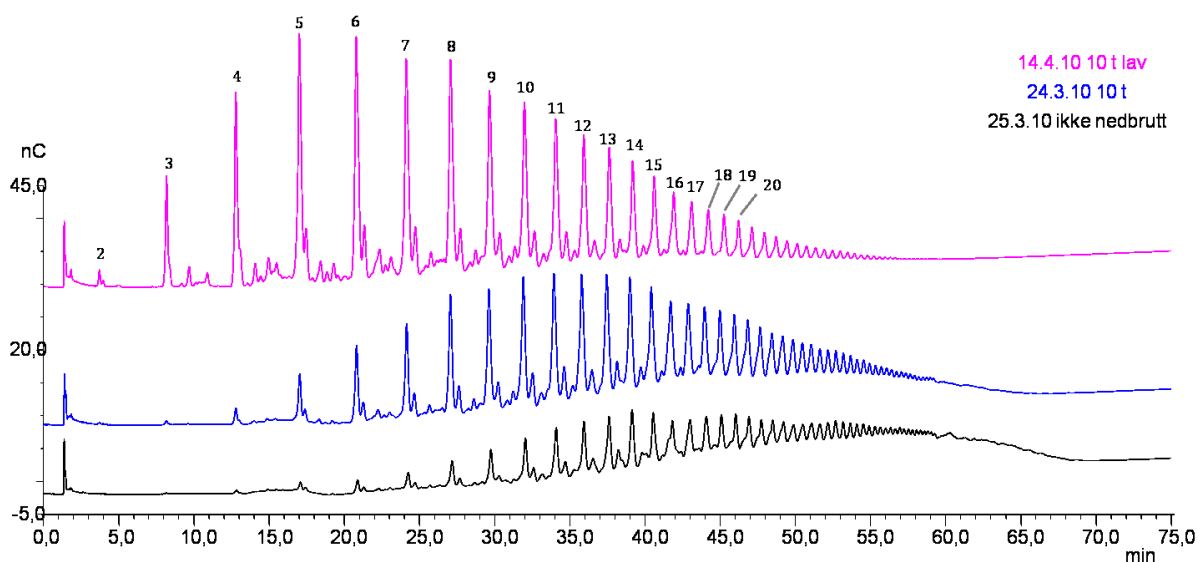


Figur V1.1: Resultat fra analyse av produktene fra utfelling og syrefelling av G-blokk for februar 2010.

Ifølge karakteriseringen av G-blokken på HPAEC-PAD hadde den syrefelte G-blokken en $\overline{DP}_n \sim 24,1$, og nedbrutt G-blokk hadde en $\overline{DP}_n \sim 16,7$. Dette var høyere enn ønsket, og det ble bestemt å utføre en ny utfelling og nedbrytning av G-blokk, med en noe endret prosedyre.

G-BLOKK MARS/APRIL 2010

For å øke graden av nedbrytning av G-blokk ble prosedyren endret til syrehydrolyse ved pH 3,8 i 10 timer og prøven ble boblet med N₂ før syrehydrolysen. En felling av G-blokk ble utført, og en prøve fra denne ble brutt ned ved denne prosedyren. Resultatene fra analyse ved HPAEC-PAD av disse prøvene er vist i Figur V1.2. Der er disse prøvene kalt ikke nedbrutt 25.03.10 og nedbrutt 17.03.10, og det ble derfor videre endringer i prosedyren. En lavere polymerkonsentrasjon (0,5 %) ble brukt til nedbrytningen med lavere pH (3,6). Som før ble den boblet med N₂ før syrehydrolysen, og den varte i 10 timer. Analyse ved HPAEC-PAD op en prøve fra den nye nedbrytningen ble utført, og resultatet er vist i Figur V1.2, der denne er kalt "14.04.10 10 t lav".

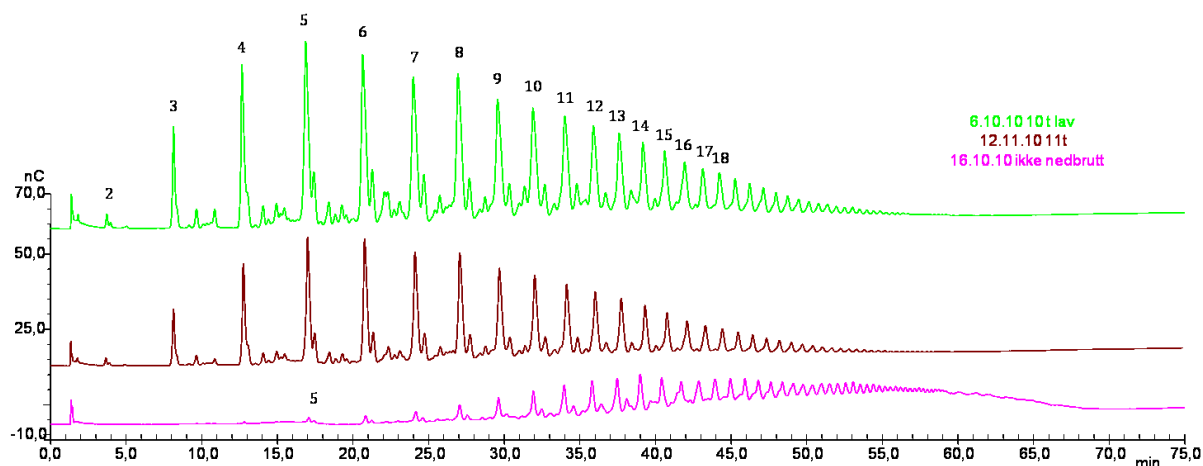


Figur V1.2: Resultat fra analyse av produkt fra utfelling og syrefelling av G-blokk med oppdatert prosedyre mars/april 2010.

Det kan observeres i Figur V1.2 at produktet fra den endelige prosedyren med lavere polymerkonsentrasjon og lavere pH gir et mer nedbrutt produkt enn det den Dette ga en G-blokk med $\overline{DP}_n \sim 8,2$, som var et tilfredsstillende resultat, til sammenligning ble resultatet av kun en forlenging i nedbrytningstid $\overline{DP}_n \sim 15,6$.

G-BLOKK OKTOBER/NOVEMBER 2010

En prøve av G-blokk med en $\overline{DP}_n \sim 19$ ble brutt ned med prosedyren som ble funnet å gi tilfredsstillende \overline{DP}_n . Den 16.10.10 ble en ny runde G-blokk syrefelt, og 12.11.10 ble denne G-blokken nedbrutt med samme prosedyre som tidligere, med unntak av at syrehydrolysen varte i 11 timer. Resultatet fra disse nedbrytningene og fellingen av G-blokk er vist i Figur V1.3



Figur V1.3: Resultat fra analyse ved HPAEC-PAD av produktene fra utfelling og nedbrytning av G-blokk oktober/november 2010.

I Figur V1.3 kan det observeres at den endelige prosedyren gir et reproduserbart resultat, og at det nedbrutte produktet er brutt med til en større grad enn de tidligere nedbrytningene. Forskjellen i signalstyrke kan komme av at det er en forskjell i konsentrasjon av prøvene. Resultatene fra denne analysen på HPAEC-PAD er vist i

Tabell V1.1 sammen med en rekke andre prøver fra felling og nedbrytning fra mars til november 2010.

Tabell V1.1: Resultat fra HPAEC-PAD der prøver fra mars-november 2010 er analysert.

Prøve	Dato	\overline{DP}_n
G-blokk ikke nedbrutt	25.03.2010	22
G-blokk nedbrutt 10 t	24.03.2010	14,5
G-blokk nedbrutt 10 t, lav	14.04.2010	7,3
G-blokk nedbrutt 10 t, lav	06.10.2010	7,2
G-blokk ikke nedbrutt	16.10.2010	22
G-blokk nedbrutt 11 t, lav	12.11.2010	7,1

V1.2 NMR

Syrefelt og nedbrutt G-blokk ble analysert ved NMR for å bestemme den gjennomsnittlige graden av polymerisering, \overline{DP}_n .

G-BLOKK FRA MARS/APRIL 2010

Utfelt G-blokk og nedbrutt G-blokk som ble produsert i mars/april 2010 ble karakterisert ved NMR. Beregnet \overline{DP}_n er vist i Tabell V1.2.

Tabell V1.2: Resultat fra karakterisering av utfelt og nedbrutt G-blokk fra mars/april 2010 fra analyse ved NMR.

Prøve	Dato	\overline{DP}_n
G-blokk ikke nedbrutt	25.03.2010	25,8
G-blokk nedbrutt 10 t	24.03.2010	16,9
G-blokk nedbrutt 10 t, lav	14.04.2010	9,5

G-BLOKK FRA OKTOBER/NOVEMBER 2010

Utfelt G-blokk og nedbrutt G-blokk fra oktober og november ble karakterisert ved NMR, og resultatene av beregnet \overline{DP}_n er vist i Tabell V1.3.

Tabell V1.3: Resultat fra karakterisering av utfelt og nedbrutt G-blokk fra oktober/november på NMR.

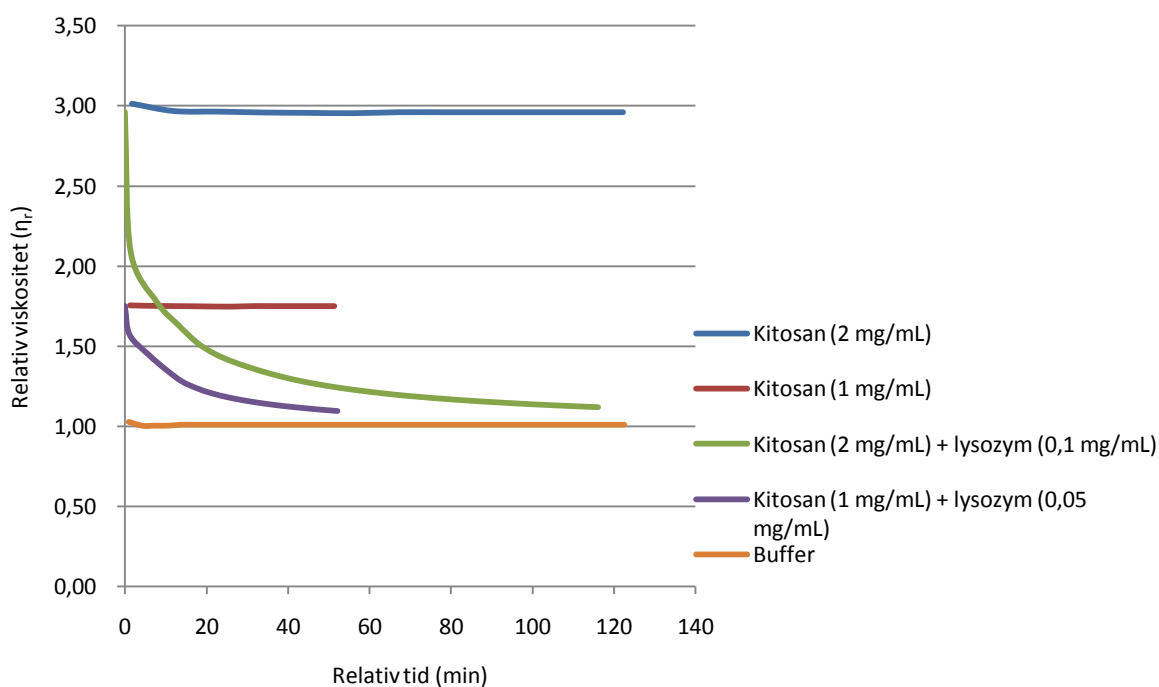
Prøve	Dato	\overline{DP}_n
G-blokk nedbrutt 10 t	06.10.2010	9,5
G-blokk ikke nedbrutt	16.10.2010	29,7
G-blokk nedbrutt 11 t	12.11.2010	9,6

VEDLEGG 2. KITOSAN OG LYSOZYM

V2.1 KONSENTRASJONSREGIME

Konsentrasjonsregimet som skulle brukes for analysene med kitosan og lysozym ble bestemt ved å teste ut forholdet mellom gjennomstrømningstiden til polymeren og buffere, og også at nedbrytningshastigheten og -kurven ble passende.

Polymer- og enzymkonsentrasjonen som ble først testet var hhv 1 mg/mL kitosan og 0,05 mg/mL lysozym. Dette ga en nedbrytningskurve vist ved relativ viskositet mot relativ tid i Figur V2.1. Det ble deretter testet med en doblet konsentrasjon av både polymer- og enzymkonsentrasjon, til hhv 2 mg/mL kitosan og 0,1 mg/mL lysozym. Forholdet mellom buffer og polymer lå i det første tilfellet på 1,74, mens det i andre lå på 2,93. Det ble her valgt å gå for det lavere konsentrasjonsregimet, da dette en praktisk nedbrytningshastighet.



Figur V2.1: Nedbrytningskurven til kitosan tilsatt lysozym, her ved relativ viskositet mot relativ tid.

V2.2 BEARBEIDING AV RÅDATA

Gjennomstrømningstiden og relativ tid for reaksjonen som ble funnet ved kapillærviskosimetri ble bearbeidet i et regneark, der relativ viskositet (η_r) og grad av polymerisering (X_w) ble funnet. I tillegg ble ratekonstanten, k , som representerer aktiviteten til enzymet. Følgende er fremgangsmåten for og eksempel på bearbeiding av rådata vist i Tabell V2.1.

Tabell V2.1: Bearbeidet rådata fra relativ tid og gjennomstrømningstid målt ved kapillærviskosimetri til η_r og X_w som ble brukt til å fremstille enzymaktiviteten.

Relativ tid (min)	Gjennomstrømningstid (min)	η_r	η_{sp}	η_{sp}/c (ml/g)	$[\eta]$	M_w	$1/M_w$	x_w	$1/x_w$
	183,94	1,78	0,78	790	632	10 954 185	9,13E-08	58267	1,72E-05
1,21	176,71	1,71	0,71	719	584	10 171 146	9,83E-08	54102	1,85E-05
6,17	157,71	1,53	0,53	533	452	7 989 630	1,25E-07	42498	2,35E-05
10,67	147	1,42	0,42	428	373	6 665 724	1,50E-07	35456	2,82E-05
14,94	142,28	1,38	0,38	382	337	6 056 405	1,65E-07	32215	3,10E-05
19,08	137,48	1,33	0,33	335	299	5 418 401	1,85E-07	28821	3,47E-05
23,11	134,79	1,31	0,31	309	278	5 052 060	1,98E-07	26873	3,72E-05
27,06	132,18	1,28	0,28	283	257	4 690 117	2,13E-07	24947	4,01E-05
30,81	130,74	1,27	0,27	269	245	4 487 537	2,23E-07	23870	4,19E-05
34,51	128,98	1,25	0,25	252	231	4 237 013	2,36E-07	22537	4,44E-05
38,18	127,79	1,24	0,24	240	221	4 065 730	2,46E-07	21626	4,62E-05
41,95	126,19	1,22	0,22	225	207	3 832 924	2,61E-07	20388	4,90E-05
45,55	125,83	1,22	0,22	221	204	3 780 134	2,65E-07	20107	4,97E-05
49,13	124,77	1,21	0,21	211	196	3 623 798	2,76E-07	19276	5,19E-05
52,69	123,96	1,20	0,20	203	189	3 503 408	2,85E-07	18635	5,37E-05
56,23	123,74	1,20	0,20	201	187	3 470 569	2,88E-07	18460	5,42E-05
59,77	122,19	1,18	0,18	185	173	3 237 438	3,09E-07	17220	5,81E-05
63,26	120,97	1,17	0,17	173	163	3 051 699	3,28E-07	16232	6,16E-05
66,73	120,49	1,17	0,17	169	159	2 978 058	3,36E-07	15841	6,31E-05
70,19	120,31	1,17	0,17	167	157	2 950 359	3,39E-07	15693	6,37E-05
73,64	119,79	1,16	0,16	162	153	2 870 079	3,48E-07	15266	6,55E-05
77,08	119,23	1,15	0,15	156	148	2 783 184	3,59E-07	14804	6,75E-05
80,5	118,72	1,15	0,15	151	143	2 703 641	3,70E-07	14381	6,95E-05
83,92	118,49	1,15	0,15	149	141	2 667 639	3,75E-07	14190	7,05E-05
87,32	118,22	1,15	0,15	147	139	2 625 274	3,81E-07	13964	7,16E-05
90,72	117,94	1,14	0,14	144	136	2 581 219	3,87E-07	13730	7,28E-05
94,12	117,5	1,14	0,14	140	133	2 511 741	3,98E-07	13360	7,48E-05
97,5	117,31	1,14	0,14	138	131	2 481 644	4,03E-07	13200	7,58E-05
100,88	117	1,13	0,13	135	128	2 432 412	4,11E-07	12938	7,73E-05
104,24	117,56	1,14	0,14	140	133	2 521 234	3,97E-07	13411	7,46E-05
107,63	116,82	1,13	0,13	133	127	2 403 754	4,16E-07	12786	7,82E-05

Konstantene som ble brukt til beregningene er vist i Tabell V2.2.

Tabell V2.2: Konstantene brukt til beregning av rådata fra nedbrytningen av kitosan med lysozym.

M_0 (monomer vekt)	188 g/mol
MHS eksponent (a)	1,06
MHS konstant (K)	$2,18 \times 10^{-5}$
Huggins konstant (k')	0,40
Hagenbach konstant	10000

Til denne målingen, kitosan (1 mg/mL) tilsatt lysozym (0,005 mg/mL) er målt gjennomstrømningstid og polymerkonsentrasjon vist i Tabell V2.1.

Tabell V2.3: Målt og Hagenbach korrigert gjennomstrømningstid for buffer og polymerkonsentrasjon av kitosan.

Gjennomstrømningstid for buffer	104,16 sek
Hagenbach korrigert gjennomstrømningstid for buffer	103,24 sek
Polymerkonsentrasjon	0,0010 g/mL

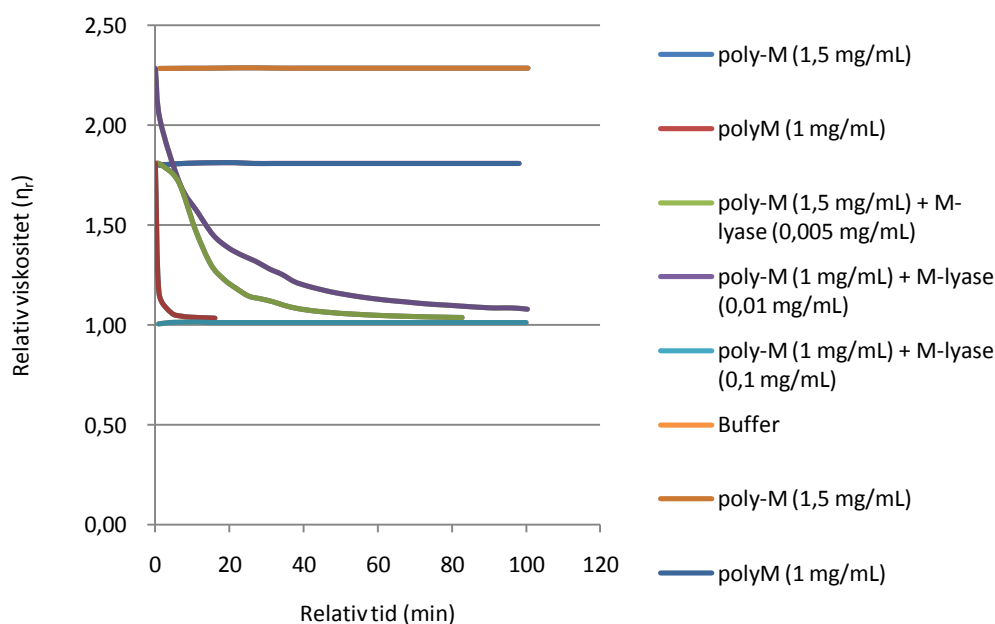
Til disse beregningene ble et regneark brukt, der også stigningstallet til $1/X_w$ ble beregnet. Dette ble brukt til å illustrere enzymaktivitet.

VEDLEGG 3. POLY-M OG M-LYASE

V3.1 KONSENTRASJONSREGIME

Konsentrasjonsregimet som skulle brukes for analysene med poly-M og M-lyase ble bestemt ved å teste ut forholdet mellom gjennomstrømningstiden til polymeren og bufferen, og også at nedbrytningshastigheten og -kurven ble passende.

Først ble poly-M (1 mg/mL) tilsatt M-lyase (0,1 mg/mL), dette ga en veldig rask nedbrytning, og enzymkonsentrasjonen ble dermed satt ned til 0,01 mg/mL, mens polymerkonsentrasjonen ble holdt konstant. Dette ga fremdeles en for rask nedbrytning, så polymerkonsentrasjonen ble satt opp til 1,5 mg/mL mens enzymkonsentrasjonen ble halvert, til 0,005 mg/mL. Nedbrytningskurvene vist ved relativ viskositet mot relativ tid er vist i Figur V3.1, som viser alle konsentrasjonsregimene som ble testet.

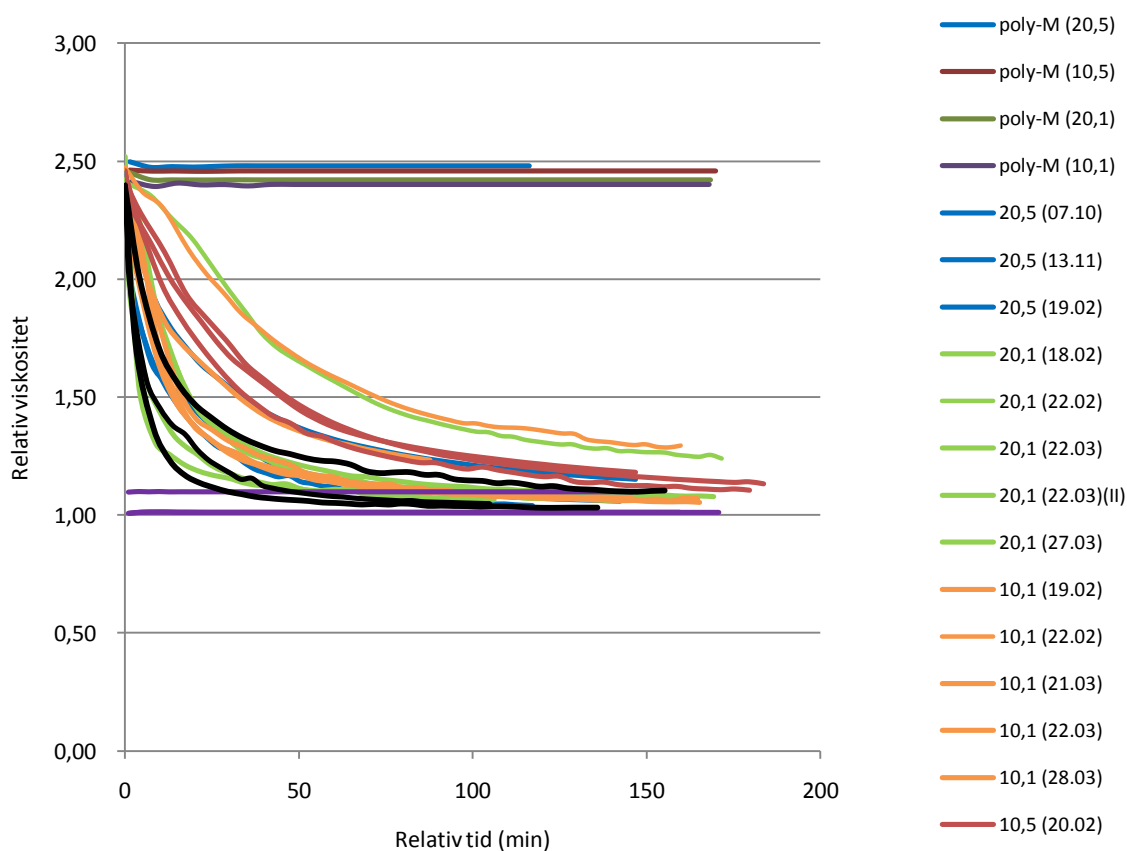


Figur V3.1: Nedbrytningskurvene for konsentrasjonsregimene som ble testet for å finne passende regime for poly-M og M-lyase

Det ble avgjort at en konsentrasjon på 1,5 mg/mL av poly-M og 0,005 mg/mL M-lyase (0,01 U/mL) var det beste konsentrasjonsregimet.

V3.2 MÅLINGER TATT UT

Det ble avgjort å ta ut enkelte målinger da det ble avgjort at disse målingene lå så langt utenfor de andre. I Figur V3.2 er disse målingene tatt med, kalt 10,1 (22.02) og 20,1 (22.02). Det antas at det er skjedd en feil i en konsentrasjon ved feil utveining av polymer eller uttynning med buffer. Disse målingene ble utført samme dag, og det er grunn til å tro at det har oppstått en feil. Det at de to skal ha ulik konsentrasjon og dermed også ulik nedbrytningskurve forsterker inntrykket av at det har her skjedd en feil i målingene. Det ble derfor valgt å ta ut disse målingene.



Figur V3.2: Nedbrytningskurve for alle malinger utført med poly-M og M-lyase tilsatt G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ og ~ 20 . Her er også de to målingene som er tatt ut i senere beregninger tatt med, og er de to kurvene som ligger noe over de øvrige målingene. I tillegg til poly-M og M-lyase tilsatt G-blokk er det også her tatt med tre eksempler på nedbrytningskurver for poly-M og M-lyase uten tilsats av G-blokk.

V3.3 BEARBEIDING AV DATA

Også for målingene fra nedbrytningen av poly-M med M-lyase ble rådata fra kapillærviskosimetri bearbeidet til relativ viskositet, grad av polymerisering og ratekonstant for nedbrytningen.

Da Figur 3.9, som viser alle målingene plottet som relativ viskositet mot tid, ble delt opp etter \overline{DP}_n konsentrasjon. Det ble da tatt et gjennomsnitt for hver måling i parallellene, og standardavvik for hver enkelt måling ble beregnet. Disse ble henholdsvis lagt til eller trukket fra gjennomsnittet for å få en øvre og nedre grense for variasjonen i målingene. Et eksempel på denne bearbeidingen er vist i Tabell V3.1, for målingene til nedbrytningen av poly-M med M-lyase tilsatt 5 mg/mL G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$.

Tabell V3.1: Bearbeiding av data for relativ viskositet, her for nedbrytningen av poly-M med M-lyase ved tilsats av 5 mg/mL G-blokk $DP_n \sim 10$.

Relativ tid (min)	Gjennomsnitt (η_r)	øvre grense	nedre grense
0,00	2,44	2,46	2,42
4,50	2,28	2,31	2,25
10,90	2,08	2,17	1,99
16,78	1,92	2,01	1,83
22,32	1,82	1,91	1,72
27,63	1,72	1,83	1,62
32,82	1,63	1,74	1,53
37,82	1,57	1,67	1,47
42,61	1,52	1,61	1,42
47,25	1,47	1,56	1,39
51,78	1,43	1,52	1,34
56,20	1,40	1,47	1,33
60,67	1,37	1,44	1,30
65,05	1,34	1,41	1,28
69,37	1,32	1,38	1,26
73,62	1,30	1,36	1,25
77,83	1,29	1,34	1,23
82,11	1,27	1,33	1,22
86,31	1,26	1,31	1,22
90,53	1,25	1,30	1,20
94,66	1,24	1,29	1,19
98,80	1,24	1,28	1,19
102,95	1,23	1,27	1,18
107,06	1,22	1,26	1,17
111,14	1,21	1,26	1,16
115,20	1,20	1,25	1,16
119,24	1,20	1,24	1,16
123,30	1,19	1,24	1,14
127,29	1,18	1,23	1,13
131,26	1,18	1,22	1,13
135,22	1,17	1,22	1,12
139,17	1,17	1,21	1,12
143,11	1,16	1,21	1,12
147,03	1,16	1,20	1,12
150,94	1,16	1,20	1,12
154,84	1,15	1,20	1,11
158,73	1,15	1,19	1,11
162,61	1,15	1,19	1,10
166,47	1,15	1,18	1,11
170,34	1,14	1,18	1,10
169,40	1,15	1,19	1,12
154,05	1,18	1,18	1,18
157,21	1,18	1,18	1,18
160,38	1,17	1,17	1,17
163,54	1,17	1,17	1,17
166,68	1,16	1,16	1,16

Data fra beregnet $1/X_w$ mot tid ble bearbeidet noe annerledes enn det vist i Tabell V3.1. Her ble det også beregnet et gjennomsnitt for målingene, men da dette ga en del støy i kurven, se, ble det avgjort å glatte ut disse målingene. Dette ble utført på følgende måte:

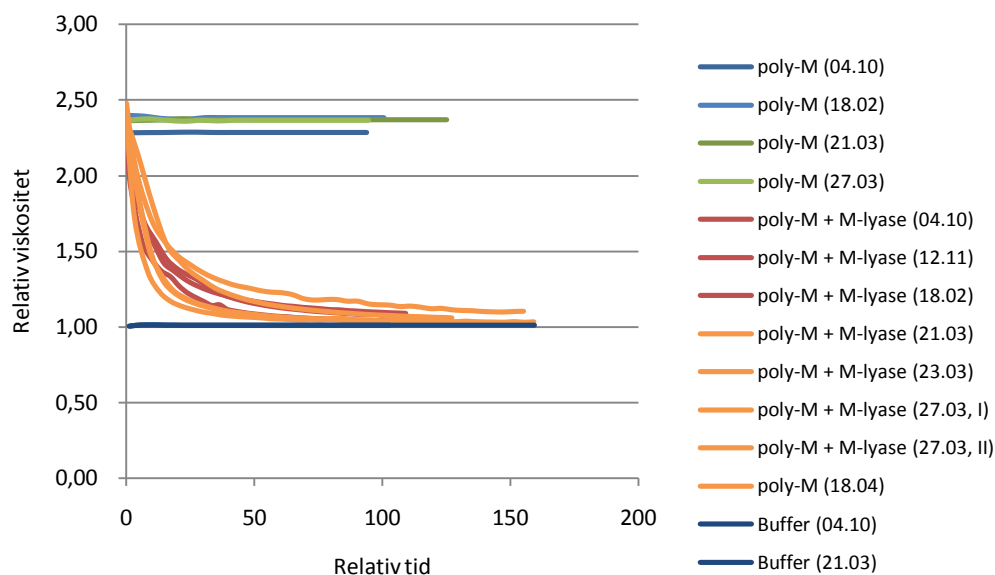
Den ble tatt et gjennomsnitt av den første og andre målingen, dette ble også gjort for den siste og nest siste. For de øvrige ble målingen det tatt et gjennomsnitt av den aktuelle målingen og en måling før og etter. Bearbeidede for $1/X_w$ til nedbrytningen av poly-M med M-lyase ved tilsats av G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$ er vist i Tabell V3.2.

Tabell V3.2: Bearbeiding av data for $1/X_w$, her for nedbrytningen av poly-M med M-lyase ved tilsats av 5 mg/mL G-blokk $\overline{DP}_n \sim 10$.

Relativ tid (min)	Gjennomsnitt ($1/X_w$)	øvre grense	nedre grense
0,00	1,76E-03	1,78E-03	1,73E-03
4,50	1,88E-03	1,92E-03	1,84E-03
10,90	2,13E-03	2,28E-03	1,97E-03
16,78	2,41E-03	2,62E-03	2,20E-03
22,32	2,70E-03	2,99E-03	2,42E-03
27,63	3,02E-03	3,41E-03	2,63E-03
32,82	3,36E-03	3,85E-03	2,87E-03
37,82	3,72E-03	4,30E-03	3,14E-03
42,61	4,06E-03	4,76E-03	3,36E-03
47,25	4,42E-03	5,15E-03	3,69E-03
51,78	4,76E-03	5,65E-03	3,88E-03
56,20	5,14E-03	5,98E-03	4,30E-03
60,67	5,52E-03	6,46E-03	4,58E-03
65,05	5,91E-03	6,94E-03	4,88E-03
69,37	6,29E-03	7,39E-03	5,19E-03
73,62	6,65E-03	7,84E-03	5,47E-03
77,83	7,00E-03	8,28E-03	5,72E-03
82,11	7,30E-03	8,67E-03	5,94E-03
86,31	7,62E-03	8,88E-03	6,35E-03
90,53	7,94E-03	9,42E-03	6,47E-03
94,66	8,21E-03	9,82E-03	6,60E-03
98,80	8,48E-03	9,83E-03	7,13E-03
102,95	8,75E-03	1,03E-02	7,21E-03
107,06	9,13E-03	1,08E-02	7,42E-03
111,14	9,50E-03	1,14E-02	7,59E-03
115,20	9,78E-03	1,18E-02	7,72E-03
119,24	1,02E-02	1,21E-02	8,27E-03
123,30	1,06E-02	1,33E-02	7,91E-03
127,29	1,10E-02	1,39E-02	8,16E-03
131,26	1,13E-02	1,40E-02	8,74E-03
135,22	1,17E-02	1,48E-02	8,60E-03
139,17	1,20E-02	1,53E-02	8,81E-03
143,11	1,23E-02	1,54E-02	9,23E-03
147,03	1,25E-02	1,58E-02	9,25E-03
150,94	1,29E-02	1,60E-02	9,79E-03
154,84	1,32E-02	1,68E-02	9,65E-03
158,73	1,36E-02	1,73E-02	9,94E-03
162,61	1,38E-02	1,76E-02	9,96E-03
166,47	1,40E-02	1,75E-02	1,06E-02
170,34	1,37E-02	1,75E-02	9,86E-03
169,40	1,27E-02	1,57E-02	9,73E-03
154,05	1,15E-02	1,15E-02	1,15E-02
157,21	1,10E-02	1,10E-02	1,10E-02
160,38	1,12E-02	1,12E-02	1,12E-02
163,54	1,15E-02	1,15E-02	1,15E-02
166,68	1,16E-02	1,16E-02	1,16E-02

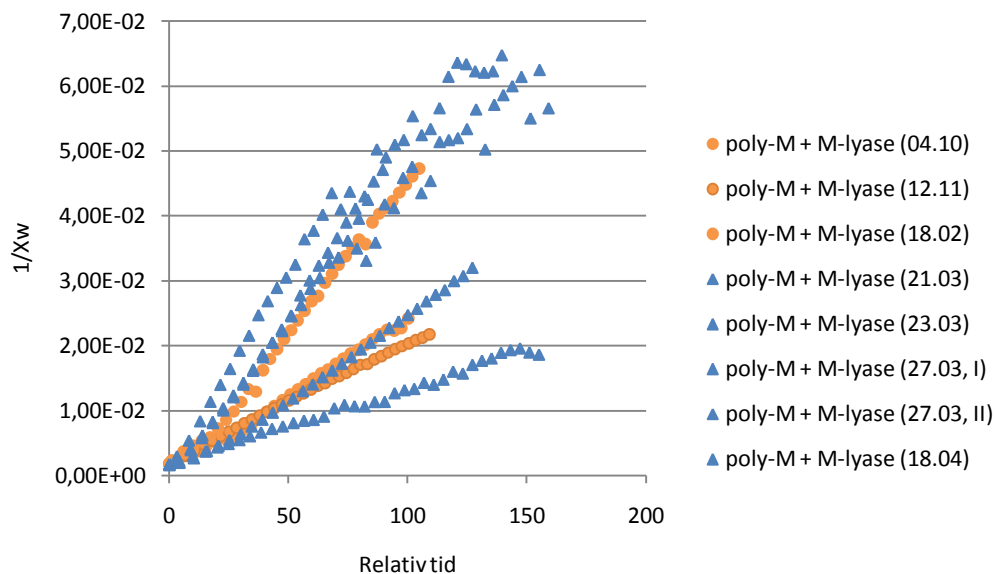
V3.4 VARIASJON I MÅLINGENE AV POLY-M

Målingene av poly-M og M-lyase uten tilsats av G-blokk over forløpet av arbeidet med denne testen fra oktober 2010 til april 2011 er vist i Figur V3.3, vist som relativ viskositet mot relativ tid.



Figur V3.3: Alle malinger utført på poly-M og M-lyase uten tilsatt G-blokk under forløpet av arbeidet med måling av dette modellsystemet.

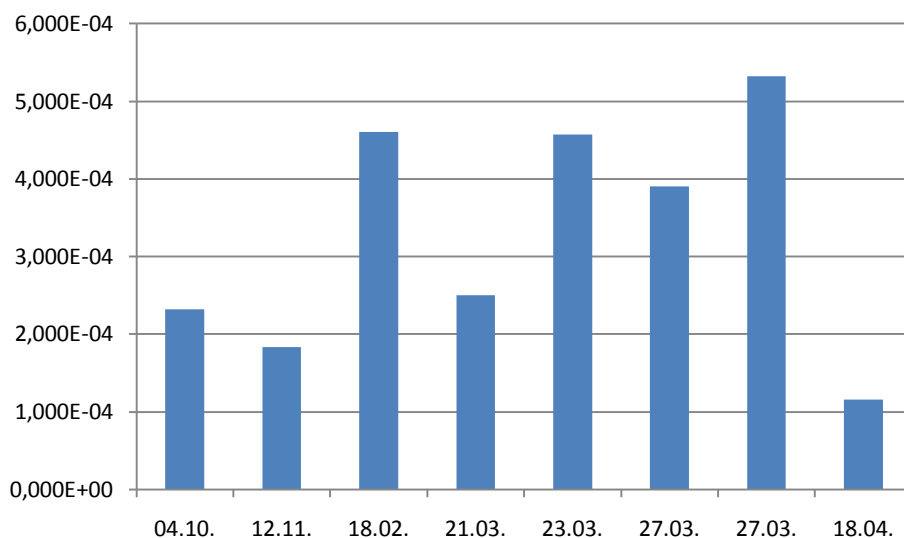
I Figur V3.3 kan det observeres en viss spredning i resultatene, men det blir mer tydelig i det disse målingene skal fremstilles som enzymaktivitet ved ratekonstantene til målingene. Ved beregning av grad av polymerisering og disse settes opp i en graf der den inverse av grad av polymerisering ($1/X_w$) vises mot relativ tid, er det tydelig at det er en veldig stor spredning i målingene, se Figur V3.4.



Figur V3.4: Spredningen i målingene av poly-M og M-lyase ved fremstilling som nedgang i grad av polymerisering mot tid. Fargene på punktene indikerer at målingene er utført med to ulike übbelohder.

Det ble derfor ikke brukt både gjennomsnitt og øvre og nedre grense i fremstillingen av målingene i Avsnitt 3.3.

Videre er det vist en fremstilling av disse målingene som beregnet stigningstall, altså ratekonstanten til enzymreaksjonen, i Figur V3.5 der spredningene i målingene er tydelig.



Figur V3.5: Spredningen i målingene av poly-M og M-lyase uten tilsats av G-blokk etter de beregnede reaksjonsratene.