

**RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE**

Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte

**SVETLANA GONTA**

**POLISAHARĪDA LEVĀNA ĶĪMISKĀ  
MODIFIKĀCIJA BIOLĒGISKI AKTĪVU VIELU  
IEGUVĒI UN LEVĀNU RAŽOJOŠO BAKTĒRIJU  
MOBILIZĀCIJAS PĒTĪJUMI**

*Promocijas darba kopsavilkums*

**THE LEVAN SYNTHESISING BACTERIA IMMOBILISATION AND  
CHEMICAL MODIFICATION OF POLYSACCHARIDE LEVAN TO  
OBTAIN BIOLOGICALLY ACTIVE PRODUCTS**

*Summary of Doctoral Theses*

**Zinātniskie vadītāji:**

Supervisors:

Dr. habil. chem., profesors **Ojārs Neilands**

Dr. biol. **Ilmāra Vīna**

Rīga - 2005

## SATURS / CONTENT

IEVADS	4
1. <i>Zymomonas mobilis</i> baktēriju šūnu imobilizācija	5
2. Imobilizācija uz nerūsējoša tērauda, kas modificēts ar TiCl <sub>4</sub>	6
3. Imobilizācija uz nerūsējoša tērauda, kas modificēts ar γ-aminopropiltriētoksilānu	7
4. <i>Z. mobilis</i> šūnu imobilizācija	7
5. Levāna ķīmiskā modificēšana fruktozes C3-C4 monomērvienību reģionā	8
6. Perjodātoksidācija	8
7. Oksidēta levāna reducēšana	10
8. Oksidēta levāna modificēšana ar hidrazīnu	11
9. Oksidēta levāna modificēšana ar glicīnu, diglicīnu un triglicīnu	12
10. Fagocitozes pētījumi	12
11. Levāna ķīmiskā modificēšana fruktozes C6 monomērvienību reģionā	13
12. Hidroksilgrupas aizvietošana ar jodu	13
13. Levāna holīna atvasinājuma ieguve	14
13.1. Levāna alkilēšana ar holindibromīdu	14
13.2. Levāna alkilēšana ar dibrometānu	14
13.3. Brometilētā levāna reakcija ar trimetilamīnu	15
14. C3-C4 reģiona ķīmiskās modifikācijas efekta ietekme uz fruktozīda struktūru	16
15. Natīvu un modificētu trifruktozīdu elektroniskie struktūrmodeļi	16
16. Hepta- (3-D-fructozīdu ķēdes telpiskās struktūras kvantu ķīmiskais aprēķins	18
SECINĀJUMI	20
***	
INTRODUCTION	21
1. Immobilisation of <i>Zymomonas mobilis</i> bacteria cells	22
2. Cells immobilisation on stainless steel modified with TiCl <sub>4</sub>	23
3. Immobilisation of cells on stainless steel modified with γ-aminopropyltriethoxysilane	24
4. Immobilisation of <i>Z. mobilis</i> cells	24
5. Chemical modification of C3-C4 levan region	25
6. Periodate oxidation	25
7. Reduction of oxidised levan	27
8. Modification of oxidised levan with hydrazine	27
9. Modification of oxidised levan with glycine, diglycine and triglycine	28
10. Investigation of phagocitose	29
11. Chemical modification of levan C6 region	30
12. Substitution of hydroxyl groups with iodine	30
13. Production of choline and levan derivative	30
13.1. Alkylation of levan with choline dibromide	30
13.2. Alkylation of levan with dibromethane	31
13.3. The reaction of bromethyllevan with trimethylamine	32
14. An effect of chemical modifications of C3-C4 region on its structure	32
15. An electronic structure model of native and modified trifrucosides	33
16. A quantum chemical calculation of the spatial structure of hepta- β-D-fructoside chain	35
CONCLUSIONS	37
LITERATURAS SARAKSTS/REFERENCES	38

## IEVADS

Sistemātiski ziņojumi par dažādu polisaharīdu lomu dzīvības procesos zinātniskajā literatūrā parādījās 20.g. 40-50-jos gados un intensificējās 70-jos gados. Pa šo laiku iegūti daudzveidīgi dati par polisaharīdu struktūru, bioloģiskām īpašībām un modificēšanas paņēmieniem.

LU Mikrobioloģijas un Biotehnoloģijas institūtā darbs ar levāna ražojošām *Zymomonas mobilis* baktērijām iesākts jau 70-jos gados. Ģenētisku manipulāciju un selekcijas ceļā iegūts polisaharīda levāna producents - *Zymomonas mobilis* 113 S. Levāns uzskatāms par medicīnas praksei nozīmīgu un perspektīvu produktu, kas pielietojams kā asins plazmas aizstājējs, imūnmodulators, farmaceitisko preparātu prolongators u.c.

Mūsdienās, lai palielinātu gala produkta iznākumu un biotehnoloģisko procesu ilglaiību, tos pēc iespējas realizē imobilizētās sistēmās. Šajā darbā ir izpētīta iespēja izmantot  $TiCl_4$  un  $\gamma$ -aminopropiltriētoksisilānu, lai modificētu nerūsējoša tērauda virsmu. Mērķis - palielināt *Zymomonas mobilis* baktēriju šūnu piesaisti pie nesēja un tās atkārtoti izmantot fermentācijas ciklos, levāna iegūšanai.

Polisaharīda struktūras izmaiņa ķīmiskās modifikācijas rezultātā var izsaukt polisaharīda bioloģisko un farmakoloģisko īpašību maiņu. Pēc literatūras datiem un analogijas ar citiem cukuriem pieļaujams, ka imunoķīmijā ir ļoti svarīgs  $\beta$ -D-fruktofuranozes monomērvienības C3-C4 reģions. Tāpēc veicām levāna ķīmisko modifikāciju C3-C4 reģionā, konkrēti oksidēšanu ar kālija perjodātu, reducēšanu ar nātrija borhidrīdu, kā arī levāna oksidētas formas modifikāciju ar hidrazīnu, glicīnu, diglicīnu un triglicīnu. Tā kā ļoti svarīgi bija novērtēt levāna oksidācijas pakāpi ar analītiskām metodēm, kam piemīt liela precizitāte un rezultātu precīza atkārtojamība, darbā salīdzinātas divas atšķirīgas analīžu metodes. Literatūrā ir dati ne tikai par C3-C4 saites svarīgo lomu, bet arī par polisaharīda ķēdes nereducējošā gala terminālā atlikuma C6 svarīgumu imunoķīmiskai saistībai, tāpēc veikta arī šī rajona ķīmiskās modifikācijas pētījumi: hidroksilgrupas aizvietošanas ar joda un holīna grupējumiem.

Lai kvantitatīvi izvērtētu levāna ķīmisko modificēto fonnu, struktūru un konformācijas izmaiņas un to saistību ar jauniegūto aktīvo vielu reakcijas spējām veicām dabisko un modificēto levānu fonnu molekulu modeļu pētīšanu ar AM1 metodi, izmantojot "HyperChem" datorprogrammas paketes.

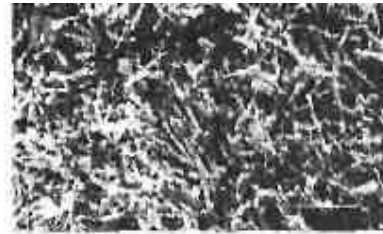
## 17. *Zymomonas mobilis* baktēriju šūnu imobilizācija

Mūsdienās intensīvus biotehnoloģiskos procesus realizē imobilizētās sistēmās, jo tajās ilgāk saglabājas dzīvi bioloģiskie aģenti. Pētījumiem par *Zymomonas mobilis* baktēriju celma 113 S (attēls 1) izmantošanu bioloģiski aktīva fruktozes polimēra - levāna ieguvei, veikta šo baktēriju šūnu imobilizācija uz mehāniski izturīgiem nesējiem, kas ir piemēroti nepārtrauktu tehnoloģisko procesu realizācijai.



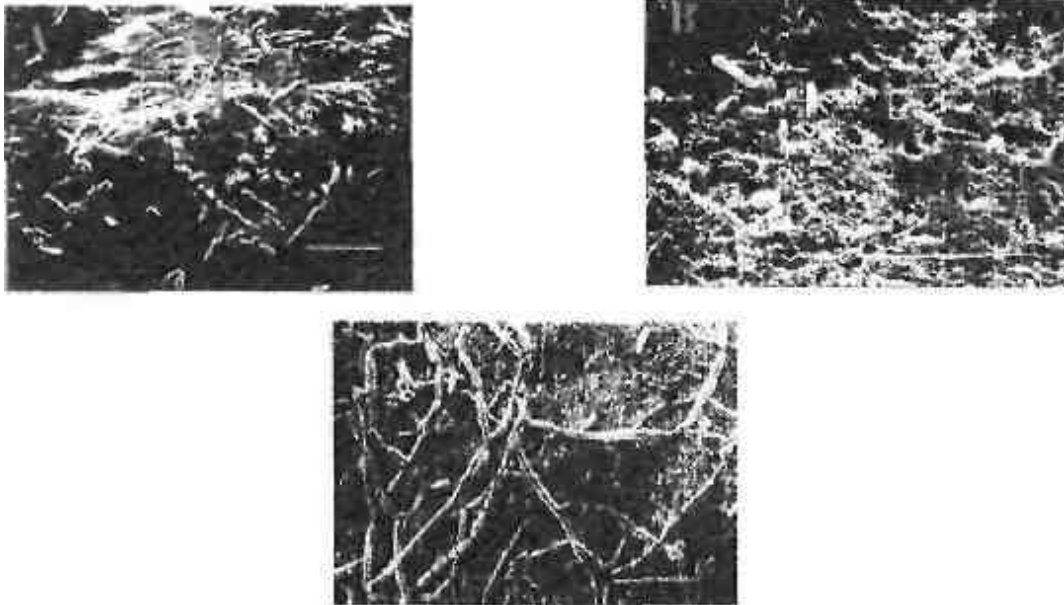
1.attēls, *Zymomonas mobilis* baktērijas; līnijas garums 10  $\mu\text{m}$

Ekspērimētā, imobilizējot šūnas uz nemodificētām nerūsējoša tērauda lodītēm (NTL), skanējoša elektronu mikroskopa (SEM) fotogrāfijā redzams, ka uz nesēja virsmas ir atsevišķas *Z. mobilis* šūnu grupas (attēls 2A).



2. attēls. NTL virsma ar *Z. mobilis* baktērijām pirms fermentācijas:  
A - uz nemodificēta NTL; B - modificēta ar  $\text{TiCl}_4$ ; C - modificēta ar AMS;  
līnijas garums 10  $\mu\text{m}$

Pēc fermentācijas šūnu skaits samazinās, uz nesēja virsmas dažās vietās redzams polimērs levāns (attēls 3A).



3. attēls. NTL virsma ar *Z. mobilis* baktērijām pēc fermentācijas:

A - uz nemodificēta NTL; B - modificēta ar  $TiCl_4$ ; C - modificēta ar AMS;

līnijas garums 10  $\mu m$

Izmantojot uz nemodificēta NTL imobilizētas *Z. mobilis* šūnas fermentācijas rezultātā iegūts 18-25-9-7 g/l (48-96-144-192 stundas, attiecīgi) levāns, sistēmas levāna sintēzes produktivitātei esot  $Q_{lev} = 0.12$  g/lxst (pēc 192 stundām). Zems produkta iznākums saistīts ar to, ka uz nemodificētām tērauda lodītēm *Z. mobilis* imobilizācija ir neapmierinoša. *Z. mobilis* šūnas slikti piesaistās nemodificēta nesēja virsmai, kas savukārt neļauj atkārtoti izmantot imobilizētas *Z. mobilis* šūnas levāna producēšanai.

Lai stiprinātu *Z. mobilis* šūnu saistību ar nesēju veikta NTL virsmas modifikācija. Izvēlētas divas principiāli atšķirīgas modifikācijas metodes: modifikācija ar titāna tetrahlorīdu ( $TiCl_4$ ) un ar  $\gamma$ -aminopropiltriētoksisilānu (AMS). Lodītes ar imobilizētām *Z. mobilis* šūnām izmantotas vairākos atkārtotos fermentācijas ciklos.

## 2. Imobilizācija uz nerūsējoša tērauda, kas modificēts ar $TiCl_4$

NTL modifikācija ar  $Ti^{4+}$ -joniem izmanto, lai palielinātu hidroksilgrupu skaitu, kas savukārt palielina koordinācijas un kovalento saišu skaitu starp modificēto nesēju un šūnu virsmas komponentiem. Modifikācija ar  $TiCl_4$  ne tikai palielināja hidroksilgrupu skaitu, bet arī izmainīja nesēja virsmu palielinot nesēja virsmas platību. Virsma kļūst ļoti nelīdzena, uz tās parādās kanāli un caurumi.

*Z. mobilis* imobilizācija uz modificētām NTL notiek ļoti intensīvi, uz ko norāda sistēmas baktērijās-nesējs analīze ar SEM metodi. SEM fotogrāfijā redzams, ka uz nesēja

virsmas izveidojās blīvs fiksēto šūnu slānis (attēls 2B). Atšķirībā no attēla 2B attēlā 2A (nemodificēta tērauda virsma) redzams, ka šeit šūnas ir noklājušas nesēja virsmu nevienmērīgi - kušķīšu veidā.

NTL apstrāde ar  $\text{TiCl}_4$  veicināja ne tikai *Z. mobilis* šūnu, bet arī sintezētā levāna piesaisti nesējam, veidojot uz nesēja virsmas vienlaicīgi ar šūnām arī polimēra kārtu (attēls 2B). Pie tam konstatēta gan normāla šūnu morfoloģija, gan laba fizioloģija, t.i., levānu sintēzes spēja. Izmantojot *Z. mobilis* šūnas, kas imobilizētas uz modificēta ar  $\text{TiCl}_4$  NTL fermentācijā ieguva 9-19-18-11 g/l (48-96-144-192 stundas, attiecīgi) levāna; sistēmas produktivitāte levāna sintēzei  $Q_{\text{lev}}=0.32$  g/lxst (pēc 192 stundām).

3. Imobilizācija uz nerūsējoša tērauda, kas modificēts ar  $\gamma$ -aminopropiltriētoksisilānu  
Apstrāde ar AMS izmaina lodītes virsmas izskatu mazāk nekā modificēšana ar  $\text{TiCl}_4$ : virsma kļūst vienmērīgi graudaina. Šīs modifikācijas gadījumā starp šūnām un nesēju veidojas elektrostatiskās saistības. Pēc imobilizācijas šūnas pārklāj tēraudu ar fiksēto šūnu slāni (attēls 2C). Tajā pat laikā, pēc fermentācijas levāna slānis uz nesēja virsmas neveidojas, kā tas bija  $\text{TiCl}_4$  modifikācijas gadījumā. Levāns, būdams neitrāls polimērs, nespēj saistīties ar nerūsējošā tērauda virsmu, kas ir modificēta ar alkilamonija katjona grupējumu (attēls 3C). Fotoattēls rāda, ka imobilizējot uz aminogrupas saturoša nesēja, šūnu fizioloģija mainās, t.i., biosintēzes aktivitāte saglabājas, bet to dalīšanās ir traucēta - veidojas filamentu un ļoti gari pavedieni. Ir pamats pieņemt, ka tā ir šūnu un nesēja specifiskās elektrostatiskās iedarbības stresora ietekme. Izmantojot *Z. mobilis* šūnas, kas imobilizētas uz modificētām ar AMS NTL fermentācijas rezultātā iegūts 7-20-22-9 g/l (48-96-144-192 stundas, attiecīgi) levāna, sistēmas produktivitāte levāna sintēzei  $Q_{\text{lev}} = 0.18$  g/lxst (pēc 192 stundām).

#### 4. *Z. mobilis* šūnu imobilizācija

Salīdzinoši pētījumi ar neapstrādātām un modificētām NTL rāda, ka NTL virsma pirms un pēc apstrādes ar  $\text{TiCl}_4$  un AMS būtiski atšķiras pēc virsmas struktūras un fizikāli-ķīmiskām īpašībām. To rāda NTL virsmas analīze ar SEM palīdzību, tā arī *Z. mobilis* šūnu imobilizācijas un fermentācijas rezultāti. Salīdzinoši pētījumi ar neapstrādātām un modificētām NTL rāda, ka nerūsējošā tērauda lodīšu virsmas ķīmiskā modifikācija (kovalentas un koordinācijas saites palielināšanās, kā arī lodīšu virsmas strukturālas izmaiņas) palielina *Z. mobilis* šūnu piesaisti pie nesēja. Tā ja uz neapstrādāta nesēja virsmas ir redzamas atsevišķas šūnu kolonijas, tad uz modificēto nesēju virsmas izveidojas fiksēto šūnu slānis.

Levāns var saistīties ar neapstrādātām un ar  $\text{TiCl}_4$  modificētām NTL (caur hidroksilgrupām), bet nesaistās ar alkilamonija katjona grupējumu. Nemodificētas virsmas gadījumā šūnu morfoloģija ir normāla, bet modificēta - diezgan izmainīta: šūnas ir izstieptas, parādījās filamentu un pavedieni. Izmantojot uz modificēta ar  $\text{TiCl}_4$  NTL imobilizētas *Z mobilis* šūnas fermentācijas rezultātā tika iegūts 14.3 g/l (vidēji) levāna, pēc 192 stundām sistēmas produktivitāte levāna sintēzē  $Q_{lev}=0.32$  g/lxst. AMS modifikācijas gadījumā: 14.5 g/l levāna un  $Q_{lev}=0.18$  g/lxst.

Salīdzinot abus imobilizācijas paņēmienus var secināt, ka nerūsējošā tērauda ķīmiskā modifikācija ievērojami samazina šūnu desorbciju no nesēja virsmas atkārtotos biosintēzes ciklos un pozitīvi ietekmē imobilizēto šūnu darbību. Šūnām kompleksa veidošana (modifikācija ar  $\text{TiCl}_4$ ) ir labvēlīgs, saudzējošs ķīmiskās piesaistes paņemiens. Levānam, iespējams, ir pozitīva loma imobilizēto šūnu normālas morfoloģijas veicināšanā. To apstiprina arī tas fakts, ka dabā levāna sintēze veicina baktēriju izdzīvošanu nelabvēlīgos apstākļos. *Z mobilis* šūnas, kas imobilizētas uz modificētām NTL var atkārtoti un ilgstoši izmantot levāna ieguvei vairākos fermentācijas ciklos.

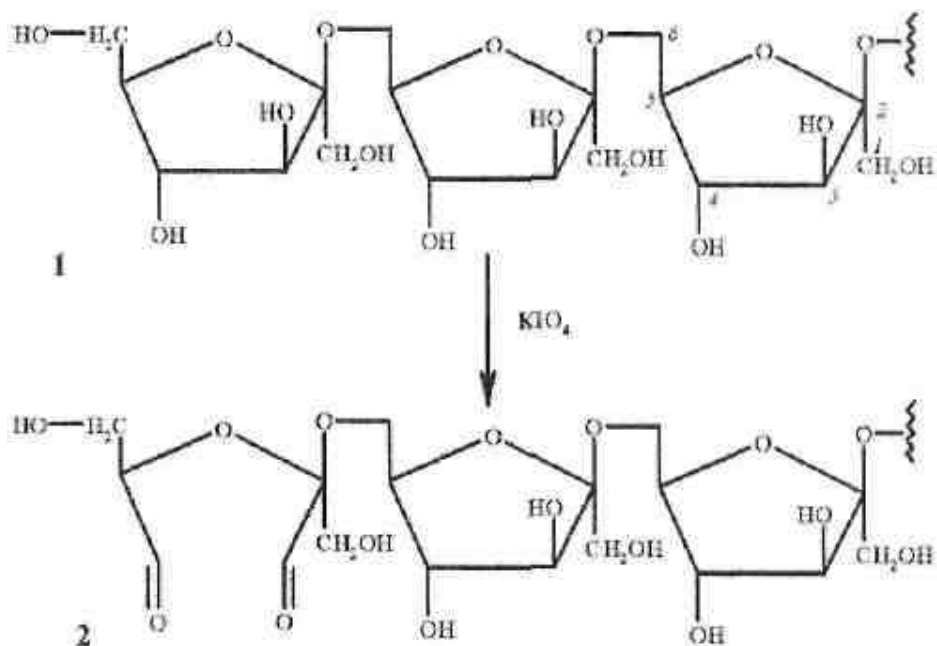
#### 5. Levāna ķīmiskā modifikācija fruktozes C3-C4 monomērvienību reģionā

Polisaharīda struktūras izmaiņas ķīmiskās modifikācijas rezultātā var izsaukt polisaharīda bioloģisko un farmakoloģisko īpašību maiņu. Pēc literatūras datiem un analogijas ar citiem cukuriem pieļaujam, ka imunoķīmijā ir ļoti svarīgs  $\beta$ -D-fruktofuranozes monomērvienības C3-C4 reģions. Tāpēc veicām levāna ķīmisko modifikāciju C3-C4 reģionā - oksidēšanu ar kālija perjodātu (2), reducēšanu ar nātrija borhidrīdu (3), kā arī oksidētas levāna formas modifikāciju ar hidrazūni (4), glicīnu (5), diglicīnu(6) un triglicīnu (7).

#### 6. Perjodātoksidācija

Perjodātoksidācijas metodi parasti lieto lai izpētītu polisaharīdu ķīmisko struktūru. Levāna oksidēšanas reakcija parādīta 1. shēmā.

Tā kā ļoti svarīgi bija novērtēt levāna oksidācijas pakāpi ar analītiskām metodēm, kurām piemīt liela precizitāte un rezultātu precīza atkārtojamība, darbā salīdzinātas divas atšķirīgas analīžu metodes.



Shēma 1. Levāna oksidēšanas reakcija.

Ar Fleury un Lange metodi oksidēto fruktozes monomērvienību skaits rēķināta pēc kopējā perjodāta patēriņa. Savukārt, izmantojot metodi, kas bija aprakstīta Lindenbaumam oksidācijas pakāpe rēķināta pēc aldehīda grupu daudzuma, pirms tam atdalot jodāta un perjodātu jonus ar anjon-apmaiņas hromatogrāfijas palīdzību. Salīdzinot ar abām metodēm sasniegtos rezultātus izrādījās, ka levāna oksidācijas pakāpe, kā arī Fleury metodes precizitāte ir zemāka.

Arī citu autoru publikācijā pēc Fleury metodes noteiktā ogļhidrāta oksidēšanas pakāpe un metodes precizitāte ir samērā zema un līdzīga mūsu darbā iegūtiem rezultātiem. Šo metodi var izmantot tikai oksidēšanas reakcijas gaitas kontrolei, kad parauga attīrīšana pirms analīzes ir apgrūtināta. Perjodātoxidācijas efektivitātes noteikšanas metode, kurā tika analizēti aldehīda grupējumi, deva lielāku precizitāti un atkārtamību nekā augstāk minēta Fleury metode. Iespējams, ka perjodāta un jodāta joni, atdalīti no oksidēta levāna, netraucē aldehīdgrupu noteikšanai, kas uzlabo analīžu metodes precizitāti un atkārtamību. Pēdējās metodes priekšrocība ir arī tā, ka ar šo metodi oksidēto levānu var izmantot turpmākai modificēšanai bez attīrīšanas.

Reakcijā izmanto kālija perjodātu (KIO<sub>4</sub>) ekvimolārā daudzumā no teorētiski nepieciešamā. Oksidēšanai izmantoti levāna paraugi, kas iegūti kultivējot *Zymomonas mobilis* baktērijas barotnēs ar atšķirīgiem oglekļa avotiem. Levāna oksidācija tika pētīta atkarībā no reakcijas ilguma. Reakcijas veiktas pie pH 3.95±0.5. Augstākās oksidācijas pakāpes (60-70 %) sasniegtas izmantojot levānus 1, kā zemmolekulārus, tā arī augstmolekulārus, kuri tika



sintezēti 2. *mobilis* glikozes barotnē. Augstmolekulārajam levānam, kā arī levānam, sintezētiem saharozes barotnē, pēc 120 stundu oksidēšanas oksidācijas pakāpe sasniedza tikai 23% (16.8%).

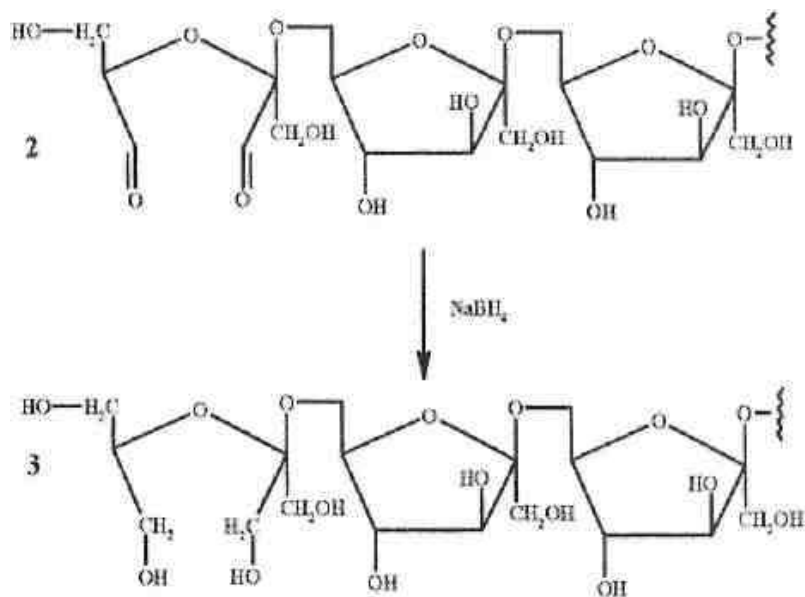
Atšķirīgas glikozes un saharozes barotnēs biosintezēto levānu oksidācijas pakāpes ļauj izteikt domu, ka izmantotais oglekļa avots ietekmē levāna ķīmisko struktūru. Ir dati, ka augstākas oksidācijas pakāpes ir sasniedzamas polisaharīdiem ar zemāku zarojumu pakāpi. Iespējams, ka izmantojot glikozi *Z. mobilis* šūnas sintezē levānus ar mazākotu struktūru. Savukārt, izmantojot kā oglekļa avotu saharozi baktērijas sintezē polimēru ar daudziem zarojuma punktiem.

Tā kā *Z. mobilis* sintezētiem levāniem piemīt mazāk vai vairāk zarota struktūra, pamatoti pieņemts, ka, pirmkārt, modificējas polisaharīda ķēdes nereducējošā gala pirmais cikls un tas savukārt traucē oksidanta molekulas  $KIO_4$  iekļūšanai polimēra iekšienē. Lielmolekulārie bakterialie levāni ar zarotu struktūru ūdens šķīdumos eksistē kā kompakts globulārs veidojums. Tādas struktūras parasti stabilizējas ar ūdeņraža saitēm starp tuvākām ķēdēm, kas arī var traucēt levāna oksidācijai. Tāpēc var secināt, ka pamatā tika oksidēti fruktozes gredzeni, kas atrodas uz molekulas virsmas.

## 7. Oksidēta levāna reducēšana

Lai oksidēta levāna 2 aldehīdgrupu augstā reaģētspēja netraucētu dažādās bioloģiskās test-sistēmās, tās tika reducētas līdz attiecīgajām spirta grupām, pievienojot nātrija borhidrītu  $NaBH_4$ . (2. shēmā). Bet veicot reducēšanas reakciju jāievēro, ka zemas nātrija borhidrāta koncentrācijas var izraisīt oksidēta polisaharīda degradāciju ar  $\beta$ -alkoksikarbonila elimināciju. Lai polimēra degradācija nenotiktu, reakciju jāveic ar lielām  $NaBH_4$  koncentrācijām minimālā laikā. Tieši tāpēc aldehīdgrupas reducēšana tika veikta pievienojot oksidētā levāna aldehīdgrupai divkārtu molāro daudzumu nātrija borhidrīda un reakcijas ilgums nepārsniedza 1 stundu.

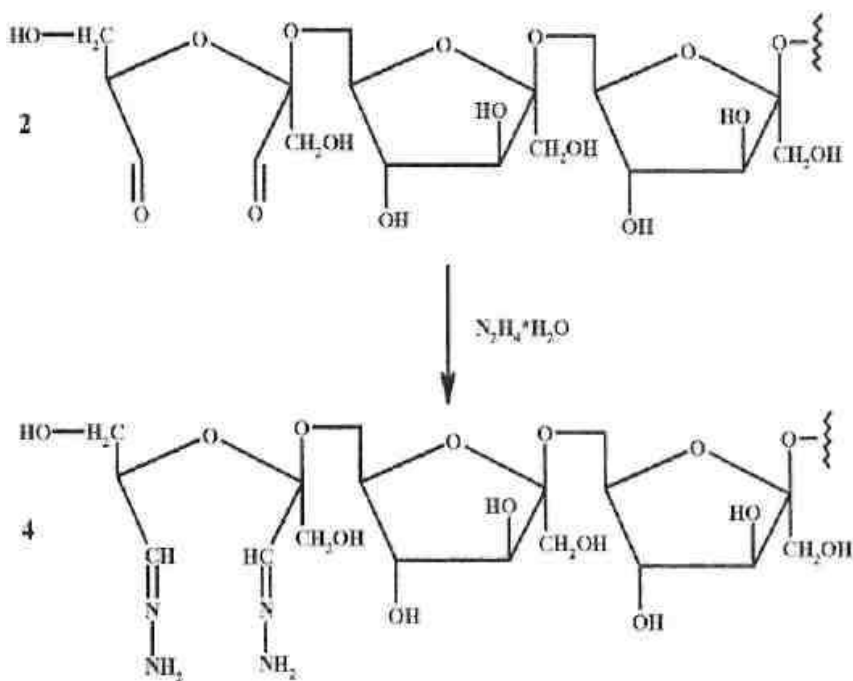
Salīdzinot polisaharīda oksidēšanas pakāpi pirms un pēc reducēšanas reakcijas, var secināt, ka tika reducētas 100 % visas aldehīdgrupas jau stundas laikā.



Shēma 2. Oksidēta levāna reducēšanas reakcija.

### 8. Oksidēta levāna modificēšana ar hidrazīnu

Literatūrā ir informācijā kā mikrobiāliem polisaharīdiem ar lādiņu ir lielāka bioloģiskā aktivitāte nekā neitrāliem polisaharīdiem. Tāpēc, lai oksidēta levāna molekulas ievadīt pozitīvo lādiņu (aminogrupas) **2** bija modificēta ar hidrazin-hidrātu ( $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (3. shēmā)

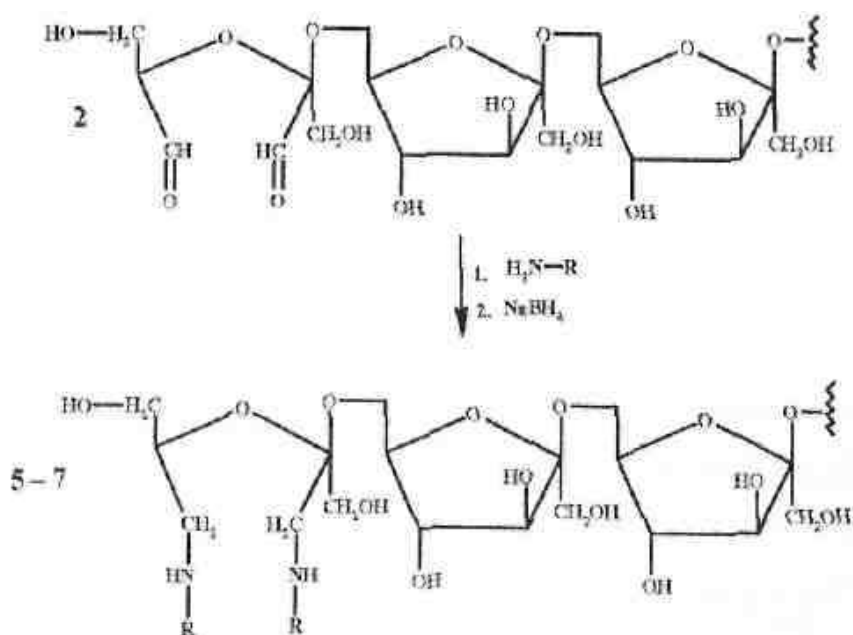


Shēma 3. Oksidēta levāna modifikācija ar hidrazin-hidrātu.

Noteikts, ka reakcijas rezultātā 78 % no oksidēto grupu skaita tika modificēti. Lai selektīvi reducēt brīvas (nemodificētas) aldehīdgrupas līdz attiecīgajām spirta grupējumiem, tālāk modificētais levāns tika apstrādāts ar  $\text{NaBH}_4$ .

#### 9. Oksidēta levāna modificēšana ar glicīnu, diglicīnu un triglicīnu

Ar mērķi ne tikai ievadīt polisaharīdā lādiņu, bet arī aizvietot hidroksilgrupas pie C3 un C4 atomiem ar telpiski apjomīgām aminoskābēm, kas savienos fruktozilatlīkumus ne tikai ar pozitīvo, bet arī ar negatīvo ( $\text{COO}^-$ ) lādiņu, oksidētais levāns tika modificēts ar glicīnu **5**, diglicīnu **6** un triglicīnu **7** (4. shēmā).



Shēma 4. Oksidēta levāna modificēšana ar aminoskābēm

( $\text{NH}_2-\text{R} =$ : glicīns, diglicīns, triglicīns)

Oksidētā levāna reakcijā ar aminoskābēm ūdens šķīdumos veidojas nestabilas azometīnsaites, kuras nākošajā stadijā tika reducētas ar nātrija borhidrīdu un pārvērstas par stabiliem otrējiem amīniem. Vienlaicīgi līdz neitrālām hidroksilgrupām reducējas nenoreāģējušas **2** aldehīdgrupas. Šajā reakcijā nomodificējas 9-15 % fruktozes monomērvienības.

#### 10. Fagocitozes pētījumi

Citoķniskā testā *in vitro* pētīta dažādu levānu (1-3) fagocitārā aktivitāte 9 praktiski veseliem donoriem un 5 hematoloģiskiem slimniekiem:

- aktīvo fagocitējošo leukocītu skaits;

- fagocitozes indekss;
- sārmainās fosfatāzes (ferments - indikators) aktivitāte.

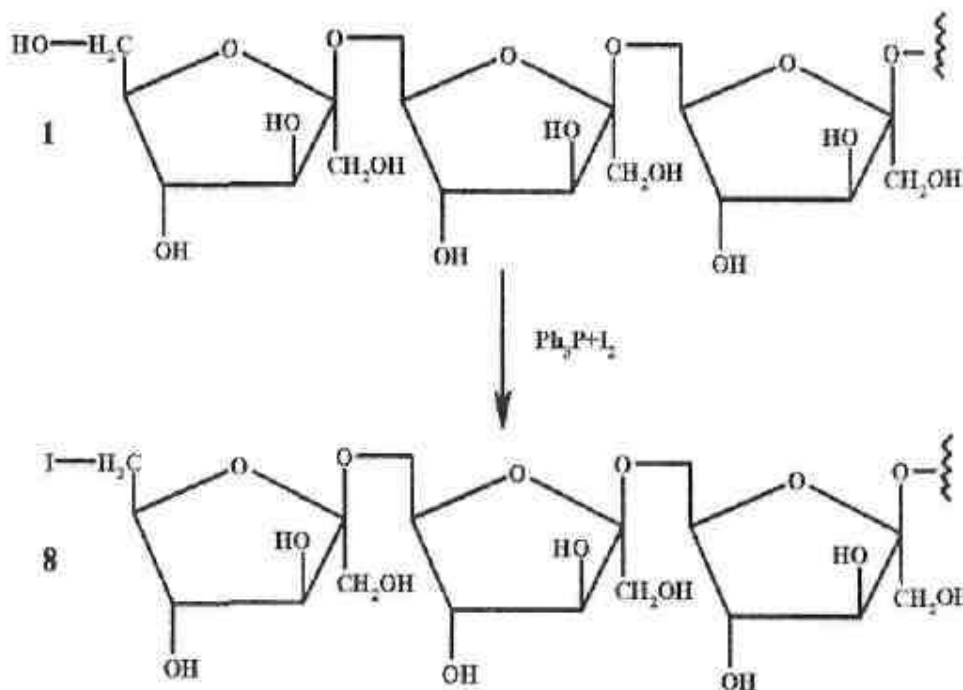
Perjodātoxidācija un iegūto aldehīdgrupu sekojoša reducēšana potencē polimorfnukleāro leukocītu fagocitozi, t.s., palielina aktīvo fagocitējošo leukocītu skaitu līdz 149 % (2), 141 % (3) un fagocitozes indeksu līdz 153 %, palielinās arī indikatorā fermenta sārmainās fosfatāzes aktivitāte līdz 160.7 % (2), 230.5 % (3) asiņu donoriem ar normālu imunitāti pret kontroli (bez levāna). Visaktīvākais, tāpat kā citos aktivitātes testos, izrādījās levāna C3 un C4 stāvokļi oksidētais un secīgi reducētais levāns 3.

### 11. Levāna ķīmiskā modificēšana fruktozes C6 monomērvienību reģionā

Tā kā literatūrā ir dati ne tikai par C3-C4 saites reģionā svarīgo lomu, bet arī par C6 reģionu tika veikti pētījumi par šī reģiona modifikāciju. Levāna nereducējošā gala terminālas hidroksilgrupas tika aizvietotas ar jodu un holīna grupējumu.

### 12. Hidroksilgrupas aizvietošana ar jodu

Levāna hidroksilgrupas reakcija ar trifēnilfosfonija jodīdu veiktas tā ka parādīts 5. shēmā.



Shēma 5. Levāna hidroksilgrupas aizvietošana ar jodu

Tika atrasts ka jodētā levāna 8 paraugos joda saturs 3.36 % (elementāra analīze) un modificēto terminālo hidroksilgrupu daļa- 18 % no tā kopējā skaita. Eksperiments tika veikts

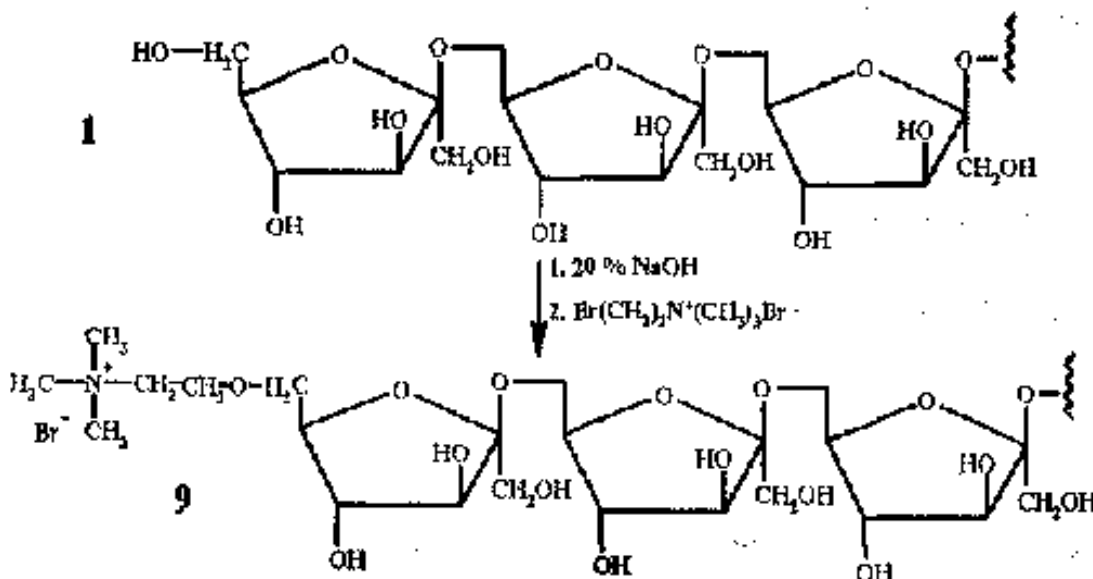
ar nolūku mērķtiecīgi izmantot jodētā levāna augsto ķīmiskās reakcijas spēju tālākai modifikācijai, piesaistot apjomīgus un/vai lādētus grupējumus, piem., aminogrupas.

### 13. Levāna holīna atvasinājuma ieguve

Šī modifikācija tika izvēlēta tāpēc ka polisaharīdi, kas ir spēcīgi imunomodulatori, satur savās imunodeterminatēs lādētas, t.s. arī pozitīvi lādētas grupas, piemēram telpiski apjomīgo holīna atlikumu.

#### 13.1.1. Levāna alkilēšana ar holindibromīdu

Mēģinājums veikt reakciju pievienojot levānam 20 % nātrija hidroksīdu un pēc tam pievienojot holindibromīdu (6. shēmā) izrādījās nesekmīgs.

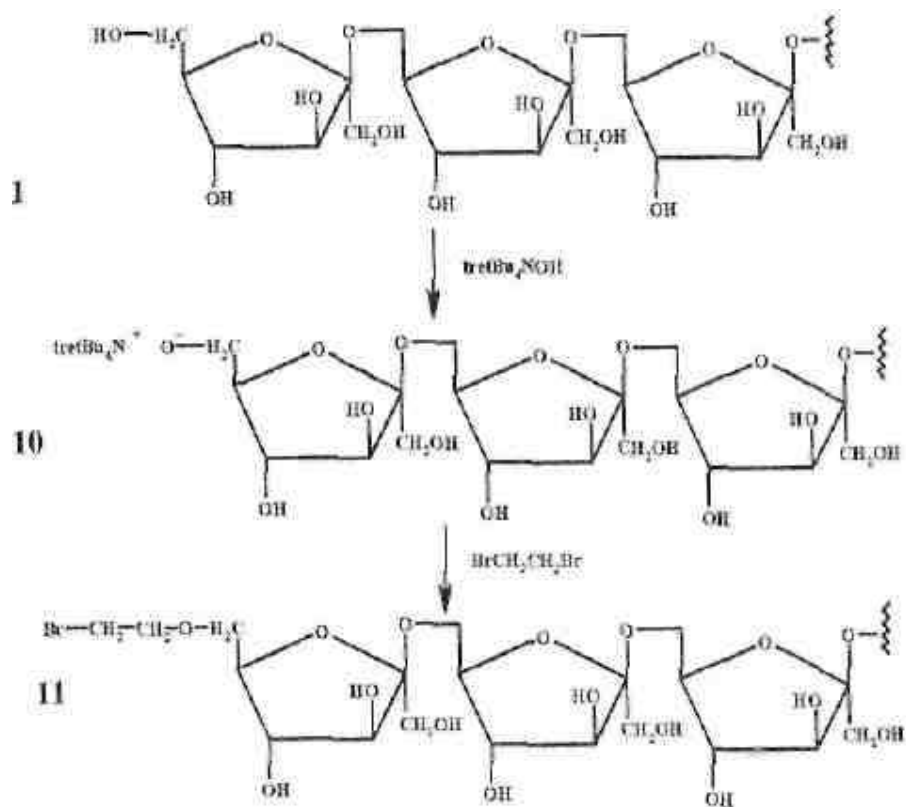


Shēma 6. Levāna hidroksilgrupas aizvietošana ar holindibromīdu.

#### 13.2. Levāna alkilēšana ar dibrometānu

Tā ka tiešais ceļš izrādījās nesekmīgs, lai iegūtu gala produktu reakcija tika veikta levāna modificēšanai 3 stadijās. Pirmajā stadijā levāns tika modificēts ar 40 % tert-butilamonija hidroksīdu. Reakcija tika veikta etanolā. (7. shēmā)

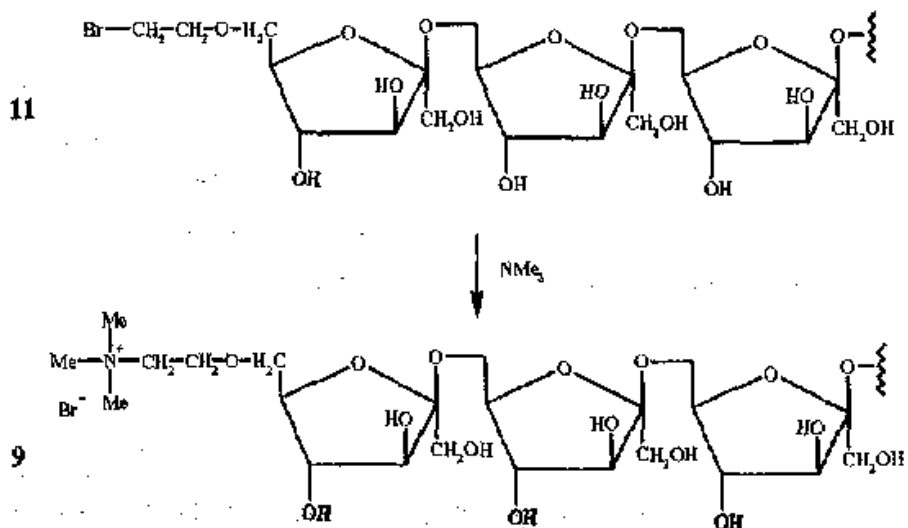
Otrajā stadijā pievienojot pie reakcijas šķīduma 1,2-dibrometānu izgulsnējās brometilētā levāna nogulsnes, kas tika nofiltrētas un izmazgātas ar etanolu.



Shēma 7. Levāna modifikācija ar 1,2- dibrometānu.

### 13.3 Brometilētā levāna reakcija ar trimetilamīnu

Trešajā stadijā pie brometilētā levāna nogulsnes tika izšķīdinātas ūdenī un pie maisījuma pievienots trimetilamīna šķīdums (8. shēmā).

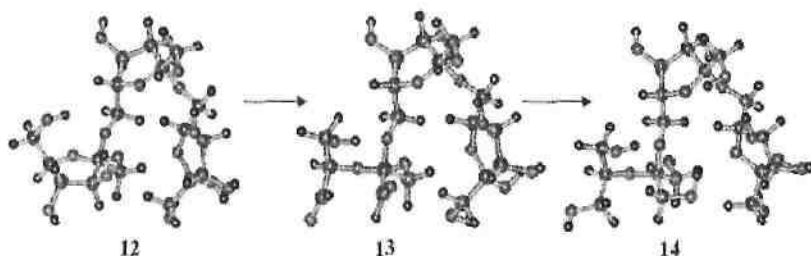


Shēma 8. Brometilētā levāna reakcija ar trimetilamīnu

Rezultātā iegūts gala produkts (Br-holīna un levāna atvasinājums) ar broma saturu 9 %, kas atbilst holīn-grupējumu saturam.

#### 14. C3-C4 reģiona ķīmiskas modifikācijas efekta ietekme uz fruktozīda struktūru

Levāna struktūras tika pētītas ar telpiskajiem atomu modeļiem un kompjūtermodeļiem izmantojot "HyperChem" programmu paketi. Natīva **12**, oksidēta **13** un secīgi reducēta **14** trifruktozīda rindā **12**→**13**→**14** ir sekojošas izmaiņas: nemodificēta fruktoze ir nosacīti planārs pieclocekļu gredzens ar iekšējo leņķi (C-O-C) vid.  $111.263^\circ$  - viens no atomiem (C vai O) ir izvirzīts no cikla plaknes, pie kam, katrā nākošajā fruktozes gredzenā tas ir cits atoms. Oksidēšana ar kālija perjodātu un secīga reducēšana ar nātrija borhidrīdu izjauc fruktozes atlikuma planaritāti; attālums starp C3 un C4 atomiem mainās sekojoši:  $1.55 \text{ \AA} \rightarrow 2.80 \text{ \AA} \rightarrow 3.00 \text{ \AA}$ , un atomu attālināšanās rezultātā izmainās C5-O-C2 leņķis:  $111.3^\circ \rightarrow 120.1^\circ \rightarrow 122.4^\circ$  (9. shēma).



Shēma 9. Oksidēta un secīgi reducēta trifruktozīda datormodelis

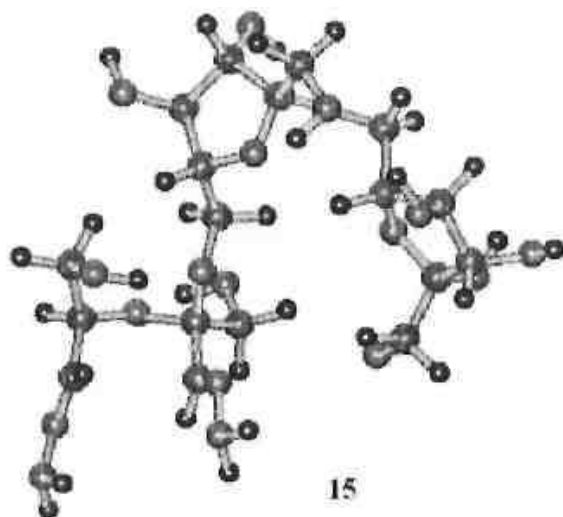
Tā oksidācijas rezultātā ar perjodātu modificētajos fruktozes atlikumos mainās C3 un C4 konfigurācija, kas ir bioloģiskās aktivitātes determinante. Modificētais fruktozes atlikums kļūst telpiski apjomīgāks, - un tas var izmainīt arī blakusesošās nemodificētās daļas konformāciju. Iespējams, ka tāda oligofruktozīdu ķēžu galu telpiskā apjoma palielināšanās, kuras ir eksponētas uz molekulas virsmas var traucēt oksidējošā aģenta iekļūšanu molekulas iekšienē. Šis teorētiskais pieņēmums sakrīt ar iepriekš iegūtajiem eksperimentālajiem datiem par augstmolekulārā levāna zemu oksidācijas pakāpi (17-23 %) perjodātoksidācijas rezultātā.

#### 15. Natīvu un modificētu trifruktozīdu elektroniskie struktūrmodeļi

Nemodificētam trifruktozīdam **12** aprēķini ar AM1 metodi parāda, ka uz -O-H ūdeņraža atomiem ir pozitīvs lādiņš ( $+0.21$  -  $+0.23e$ ), bet uz skābekļa atoma ciklā un uz skābekļa atomiem tiltiņos starp fruktozīda cikliem ir negatīvs lādiņš ( $-0.26$  -  $-0.31e$ ). Struktūras ir stabilizētas ar ūdeņraža saitēm starp šiem atomiem. Saišu O-H...O garumi

svārstās no 2.17 līdz 2.54 Å, kas liecina par samērā stiprām ūdeņraža saitēm un līdz ar to, konformāciju maiņas šīm struktūrām ir apgrūtinātas. Tas pats ir novērojams visām aprēķinātajām heptafuktozīdu struktūrām. Trifuktozīdam **13**, kuram pirmais cikls ir oksidēts arī novērojama līdzīga ūdeņraža saišu veidošanās. Pie tam, jāatzīmē, ka uz karbonilgrupām novērojama sekojoša lādiņu lokalizācija: uz C atomiem no +0.15 līdz +0.17 e un uz O atomiem no -0.25 līdz -0.26 e. No šiem datiem var secināt, ka nukleofilie reaģenti (tādi kā amīni, hidrazīni u.c.) visvieglāk stāsies kondensācijas reakcijās ar šo karbonilgrupu oglekļa atomiem.

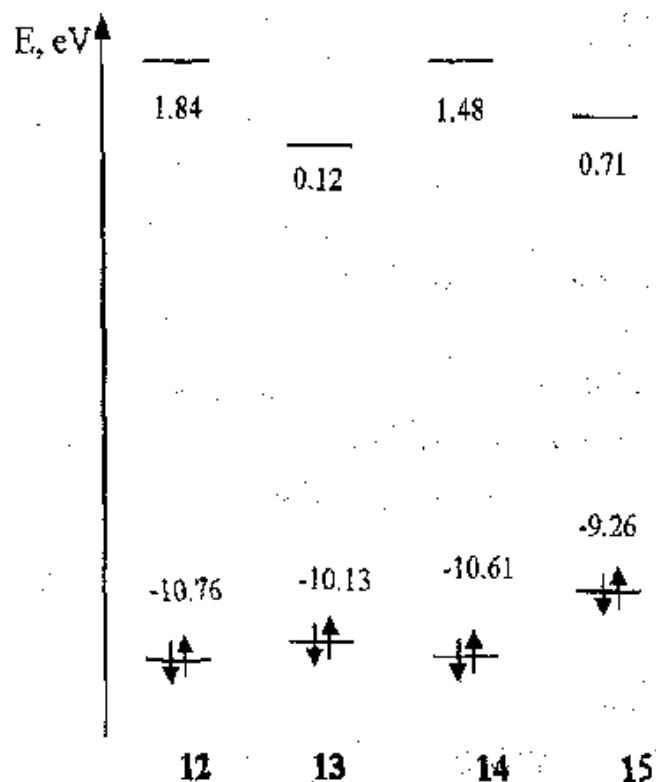
Reducētajām trifuktozīdu formām **14** hidroksilgrupas pēc lādiņu lokalizācijas praktiski neatšķiras no citām polisaharīda hidroksilgrupām. Trifuktozīda dihidrozonatvasinājumiem **15** (10. shēma) savukārt C=N fragmentā parādās neliels negatīvs lādiņš (-0.19 līdz -0.20 e), kurš galvenokārt lokalizēts uz oglekļa atoma. Pārējā molekulas daļā izmaiņas elektronu blīvumā uz atomiem ir niecīgas.



Shēma 10. Trifuktozīda dihidrozonatvasinājuma datormodelis

Salīdzinot trifuktozīdu HOMO un LUMO enerģijas (11. shēma) tika parādīts, ka pēc viena fruktozīdcikla oksidācijas, starpība starp HOMO un LUMO samazinās apmēram par 2.1 eV. To var izskaidrot ar akceptoras C=O saites veidošanos karboksilgrupas oksidācijas rezultātā. Trifuktozīda reducētās formas **14** HOMO un LUMO pēc enerģijām būtiski neatšķiras no nemodificēta trifuktozīda **12** frontālajām orbitālēm. Ar hidrazīnu modificētā trifuktozīda molekulā, **15** starpība starp HOMO un LUMO ir vēl mazāka nekā **13** gadījumā un mazāka par ~ 2.6 eV salīdzinot ar neatīvo trifuktozīdu **12**. Fuktozīdam **15** tika novērota neliela absorbcija spektra redzamajā daļā.





Shēma 11. Natīva un modificētas trifruktozīdu HOMO un LUMO enerģijas

Elektronu blīvuma sadalījums uz cikla skābekļa atomiem, hidroksilgrupai un uz skābekļa tiltiņa starp fruktozīda fragmentiem tika pētīti trifruktozīda stuktūrai. **12** un **14** trifruktozīda struktūrām HOMO un LUMO ir ievērojami delokalizētas. **13** trifruktozīda HOMO daļēji lokalizēta uz -O-C-C=O fragmenta un LUMO uz C=O fragmenta. **15** trifruktozīda HOMO un LUMO ir lokalizētas uz C=N-N fragmenta. Salīdzinot trifruktozīdu **13** un **14** struktūras tika novērots ka elektronu blīvums uz C=O un C=N grupām pie oglekļa atoma stipri mainās. Ja C=O gadījumā uz oglekļa atoma ir lokalizēts ~ 0.16 elektronu pozitīvs lādiņš, tad C=N gadījumā uz oglekļa atoma ir lokalizēts ~ 0.2 elektronu negatīvs lādiņš.

#### 16. Hepta- $\beta$ -D-fruktozīdu ķēdes telpiskās struktūras kvantu ķīmiskais aprēķins

Konformēru ģeometriju oligofruktozīdu (kas sastāv no 3-7 fruktozīdu atlikumiem) gadījumā optimizējām ar AM1 metodi. Saskaņā ar iegūtajiem rezultātiem fruktozīdu atlikumu skaita palielināšana veicina levāna ķēdes spiralizāciju un vienā pilnā vijumā pulksteņrādītāja kustības virzienā sastāv no 5-6 atlikumiem.

Dažādas heptafruktozīdu konfigurācijas tika pētītas mainot torsiālos leņķus. MM+ metode nedod pietiekami labu precizitāti un tāpēc mēs izmantojām AM1 metodi. Izmantojot AM1 metodi, tika iegūtas 63 konfigurācijas ar enerģijām kas variējās no - 1709.92 līdz - 1670.90 kkal/mol (starpība 39 kkal/mol). Acīmredzot, stabilās konformācijas enerģijas samazināšanās ir saistīta ne tikai ar optimāliem torsiālajiem leņķiem bet arī ar iespējamo ūdeņraža saišu veidošanos. Ir redzams, ka pirmajās 10 optimizētajās konformācijas veidojas 2 līdz 4 ūdeņraža saites ar starpkodolu attālumiem no 2.08 līdz 2.3 Å. Lādiņi uz ūdeņraža un skābekļa atomiem vidēji sastāda attiecīgi +/- 0.5 e.

## SECINĀJUMI

1. Ar mērķi palielināt *Zymomonas mobilis* baktēriju šūnu piesaisti pie nesēja ar iespēju atkārtoti tos izmantot fermentācijas ciklos lai iegūtu levānu, veikta virsmas modifikācija ar titāna tetrahlorīdu un ar  $\gamma$ -aminopropiltrioksisilānu.  $TiCl_4$  gadījumā sistēmas produktivitāte levāna sintēzē bija augstāka ( $Q_{lev} = 0.32 \text{ g/l x st}$ ) salīdzinot ar  $\gamma$ -aminopropiltrioksisilānu modifikāciju ( $Q_{lev} = 0.18 \text{ g/lxst}$ ).
2. Veiktas levāna modifikācijas monomērvienības reakcijas C3-C4 rajonā ar K-perjodātu, nātrija borhidrīdu, hidrazīnu, glicīnu, diglicīnu un triglicīnu ar mērķi izsaukt polisaharīda bioloģisko un farmakoloģisko īpašību maiņu.
3. Izpētīta levāna oksidācijas reakcija. Noskaidrots, ka levāna oksidācijas pakāpe ir atkarīga no tā molmasas un levāna biosintēzes apstākļiem.
4. Levāna oksidācijas pakāpes mērīšanai salīdzinoši izpētītas dažādas analīzes metodes: Fleury un Lange (rēķināts pēc kopēja perjodāta patēriņa) un Lindenbauma aprakstītais metode (rēķināts pēc aldehīda grupu daudzumu). Izrādījās, ka Lindenbauma metode deva lielāku precizitāti un atkārtojamību. Fleury metode var izmantot tikai oksidēšanas reakcijas gaitas kontrolei.
5. Ar datoranalīzes palīdzību kvantitatīvi izanalizēta fruktozes C3-C4 rajona ķīmiskas modifikācijas ietekme uz fruktozīda struktūru: atklāts, ka perjodāta oksidācija palielina fruktozīda cikla telpiskos izmērus.
6. Veiktas hepta- $\beta$ -D-fructozīdu ķēdes telpiskās struktūras kvantu ķīmiskie aprēķini: atrasts, ka veidojas ūdeņraža saistības, kas stabilizē polifruktozīdu ķēdi.
7. Promocijas darbā atrasts, ka ķīmiska modifikācija C3-C4 rajonā palielina modificēto formu spēju stimulēt organisma nespecifisko imunitāti. Konkrēti perjodātoksidācija un iegūto aldchīgrupu sekojoša reducēšana potencē polimorf nukleāro leukocītu fagocitozi, t.s., palielina aktīvo fagocitējošo leukocītu skaitu līdz 149 % un 141 % (attiecīgi) un fagocitozes indeksu līdz 153 %. Palielinās arī indikatorā fermenta sārmainās fosfatāzes aktivitāte līdz 160.7 % un 230.5 % (attiecīgi) asiņu donoriem ar normālu imunitāti pret kontroli (bez levāna).
8. Lai izpētītu imunoķīmisko saistību monomērvienības C6 stāvoklī veicam levāna modifikācijas šajā reģiona: aizvietošana ar jodu un holīna grupējumu.

**RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE**

Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte

**SVETLANA GONTA**

**POLISAĀARĪDA LEVĀNA ĶĪMISKĀ MODIFIKĀCIJA  
BIOĻĢISKI AKTĪVU VIELU IEGUVEI UN LEVĀNU  
RAŽOJOŠO BAKTĒRIJU MOBILIZĀCIJAS PĒTĪJUMI**

*Promocijas darba kopsavilkums*

**THE LEVAN SYNTHESISING BACTERIA  
IMMOBILISATION AND CHEMICAL MODIFICATION OF  
POLYSACCHARIDE LEVAN TO OBTAIN  
BIOLOGICALLY ACTIVE PRODUCTS**

*Summary of Doctoral Theses*

**Zinātniskie vadītāji:**

Supervisors:

Dr. habil. chem., profesors **Ojārs Neilands**

Dr. biol. **Ilmāra Vīna**

Rīga - 2005

## INTRODUCTION

Regular news about influence of different polysaccharides on life processes appeared in scientific literature during 1940-1950 and intensified in the 70-ties. At this time the various data about structure, biological properties and modification of polysaccharides were obtained.

Studies on the levan producing bacteria *Zymomonas mobilis* were started at the LU Institute of Microbiology and Biotechnology in the 70-ties. A levan producer - *Zymomonas mobilis* 113 S was obtained in the selection way and by genetic manipulation. Levan is a very perspective and important product in medicine as blood plasma substituter, immunomodulator, pharmaceutical preparation prolongator etc.

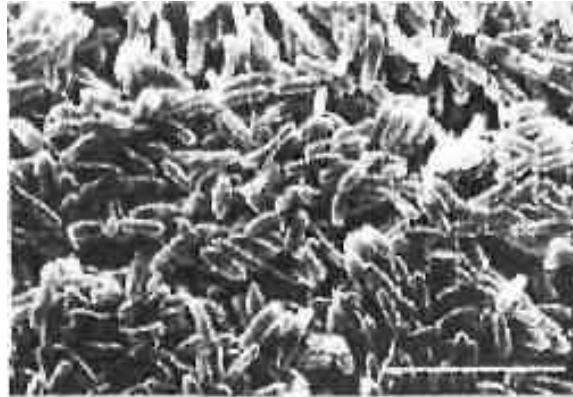
In our days, one of the widely used ways to increase the final product yield and to prolong the biotechnological process is to use the immobilised systems. In this work the stainless steel surface modification with  $\text{TiCl}_4$  and  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane was studied. Purpose was to increase the *Zymomonas mobilis* bacteria cells bounding with carrier and use it in repeated fermentation cycles to produce levan.

It is known, that biological and pharmacological properties of polysaccharides can be increased by chemical modifications. From literature data and analogues of others saccharides the  $\beta$ -D-fructofuranosic ring C3-C4 region were shown important to immunological properties. That's why we make the chemical modification of the levan C3-C4 region: oxidation with potassium periodate, reduction with sodium borohydride, and modification of oxidised levan with hydrazine, glycine, diglycine and triglycine. It is very important to quantify the oxidation degree by employing an analytical method with a high accuracy and reliability of measurements, that's why two principally different methods were used for determination of the oxidation degree. According literature data not only C3-C4 region plays an important role in immunological relationships, but C6 region, as well. That's why the chemical modification of this region was done: the hydroxylgroups of the levan non-reducing terminal were substituted with iodine or choline groups.

To quantitative evaluation of the levan chemically modified form, structure, conformation changes and its relationships with reactivity of new substances, the native and modified form of the model molecule of levan was studied using AMI method from «HyperChem» programme packet.

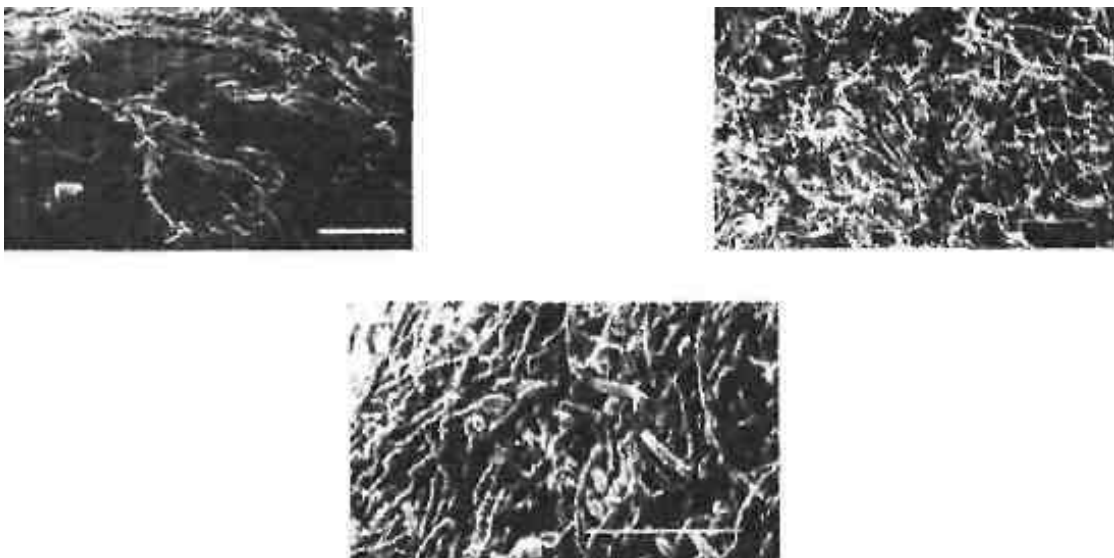
### 1. Immobilisation of *Zymomonas mobilis* bacteria cells

*Zymomonas mobilis* 113 S bacteria strain was immobilised on a mechanically durable carrier (Fig. 1) and a continuous technological process was performed to obtain the biologically active fructose polymer levan.



*Fig. 1. Zymomonas mobilis* bacteria; the bar denotes 10  $\mu\text{m}$

In the cell immobilisation experiment on unmodified stainless steel wire spheres (WS) the scanning electron microscopy (SEM) photo showed separate *Z. mobilis* cell groups (Fig. 2A).



*Fig. 2. WS surface with Z. mobilis cells before fermentation:*

*A -unmodified WS; B-modified with  $\text{TiCl}_4$  C - modified with AMS; the bar denotes 10  $\mu\text{m}$*

After fermentation the cell count decreased and the carrier surface was covered by the polymer levan (Fig. 3 A).

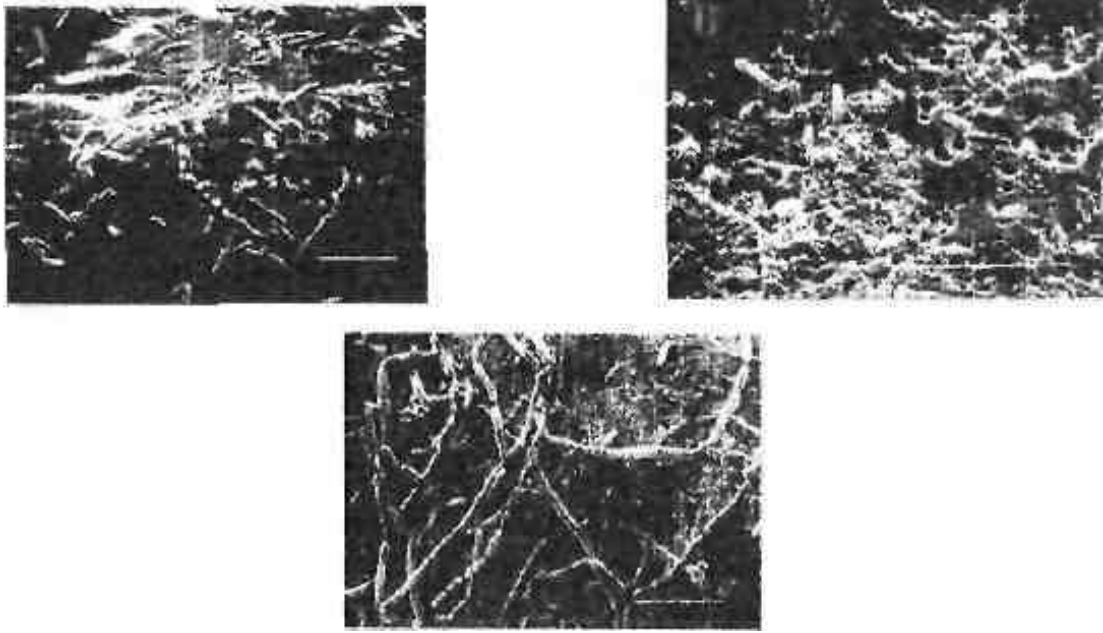


Fig. 3. WS surface with *Z. mobilis* cells after fermentation:

A -unmodified WS; B - modified with  $TiCl_4$ ; C - modified with AMS; the bar denotes 10  $\mu m$

Immobilisation of *Z. mobilis* on unmodified WS resulted in the production of levan 18-25-9-7 g/l (48-96-144-192 hour, accordingly), where the system productivity of levan synthesis was  $Q_{lev} = 0.12$  g/lxh (after 192 hours). The low product yield could be explained by the *Z. mobilis* cells wash off from carrier, as a result of weak bounding with the carrier surface. Therefore, the cells could not be used repeatedly for levan production. Desorption of cells would be prevented by WS modification. We chose two different methods: modification with titanium (IV) chloride ( $TiCl_4$ ) and  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane (AMS). The carrier spheres with immobilised *Z. mobilis* cells were used in four fermentation cycles.

## 2. Cells immobilisation on stainless steel modified with $TiCl_4$

WS  $Ti^{4+}$ -modification was used to increase the hydroxylgroup content which lead to cells immobilisation via electrostatic and co-ordinative complexing (chelation) processes. This modification increased not only the hydroxyl group content but also the carrier surface. The surface was very uneven with channels and holes. The SEM image showed that modified WS was covered by a layer of fixed *Z. mobilis* cells (Fig. 2B) opposite to unmodified WS (Fig. 2A) where the cells layer was not formed.

The cells attached on the WS modified with  $TiCl_4$  were covered by one or more layers of polymer levan (Fig. 2B). The cells had normal morphology and physiological activity (the levan synthesis possibilities). Immobilisation of *Z. mobilis* cells on WS modified with  $TiCl_4$

resulted in levan yield 9-19-18-11 g/l (48-96-144-192 hour, accordingly) with the system productivity of levan synthesis  $Q_{lev} = 0.32$  g/lxh (after 192 hours).

### 3. Immobilisation of cells on stainless steel modified with $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane

Treatment of wire with AMS changed the surface topography to a lesser extent than  $TiCl_4$ : a regular fine pattern was observed on the carrier surface. The cells were immobilised via electrostatic processes. After immobilisation the modified WS was completely covered by a layer of fixed cells (Fig. 2C). But, after fermentation the levan layer did not cover the carrier surface like in case of  $TiCl_4$ . The positively charged silanised stainless steel surface could not adsorb uncharged neutral levan polymer (Fig. 3C). The SEM image showed that in this immobilisation case the cell morphology changed: the product synthesis was preceded, but the cells formed filaments and sometimes long threads. Probably it was caused by strong electrostatic or other unfavourable interactions between the carrier surface and cells. Immobilisation of *Z. mobilis* cells on WS modified with AMS gave the following results: levan yield 7-20-22-9 g/l (48-96-144-192 hour, accordingly), the system productivity of levan synthesis was  $Q_{lev} = 0.32$  g/lxh (after 192 hours).

### 4. Immobilisation of *Z. mobilis* cells

Comparative studies of unmodified and modified WS showed that WS surface before and after modification with  $TiCl_4$  and AMS substantially changed the surface structure and physico-chemical properties. Modifications of carrier's, properties were confirmed by the SEM analysis and immobilisation of *Z. mobilis* cells and fermentation results. Comparative experiments with modified and unmodified WS showed that chemical modification of the stainless steel surface (covalent and co-ordinative bonds increasing, and WS surface structural changes) increase the attachment of *Z. mobilis* cells to the carrier. While we could see separate colonies on an unmodified carrier, the fixed cells formed a layer on a modified carrier surface.

Levan can be attached to an unmodified and modified carrier with  $TiCl_4$ : WS (by hydroxylgroup), but cannot be connected with groups of alkylammonium cation. The cell morphology of an unmodified carrier surface was normal, but it was changed in a modified one: the cells were extended; they formed filaments and long threads. Immobilisation of *Z. mobilis* cells on WS modified with  $TiCl_4$  gave the following results: levan yield 14.3 g/l (average), the system productivity of levan synthesis  $Q_{lev} = 0.32$  g/lxh (after 192 hours).



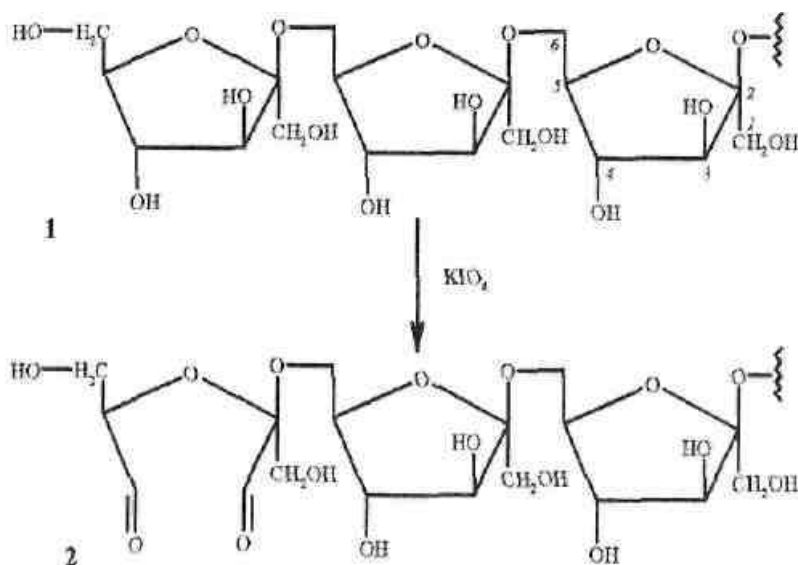
Upon comparing both immobilisation methods it can be concluded that chemical modification of stainless steel decreased desorption of cells from the carrier in a repeated fermentation cycle and positively influenced the work of an immobilised cells. The formation of chelate complex (modification with  $\text{TiCl}_4$  was favourable and mild cells immobilisation technique. Possibly, levan have a positive role in promotion of normal morphology of immobilised cells. It can be also concluded from the fact that in nature the levan synthesis promotes the bacterium survival in inimical conditions. *Z. mobilis* cells immobilised on modified WS can be reused to produce levan in more fermentation cycles.

### 5. Chemical modification of C3-C4 levan region

It is known that the biological and pharmacological properties of polysaccharides can be controlled or induced by chemical modification. Literature on other natural polysaccharides suggests that one of the essential elements for immunochemical binding can be C3-C4 region of the  $\beta$ -D-fructofuranosic unit in the levan molecule. We investigated chemical modification of C3-C4 region - oxidation with potassium periodate (**2**), reduction with sodium borohydride (**3**), and modification of oxidised levan with hydrazine (**4**), glycine (**5**), diglycine (**6**) and triglycine (**7**).

### 6. Periodate oxidation

Usually the periodate oxidation method is used to study the chemical structure of polysaccharides. The oxidation of levan is shown in Scheme 1.



Scheme 1. Levan oxidation reaction.

It is very important to quantify the oxidation degree by employing an analytical method with a high accuracy and reliability of measurements. So, two principally different methods were used for determination of the oxidation degree.

By the method of Fleury and Lange the number of oxidised fructose units (oxidation degree) was calculated from the final periodate consumption. By the method described by Lindenbaum the oxidation degree was calculated directly from the aldehyde analysis after the removal of iodate and periodate by anion-exchange chromatography. The comparative results of the analytical methods showed that the values of the levan oxidation degree and the accuracy of measurements obtained by the Fleury method were lower. Other authors observed similar results upon using the Fleury method. This method can be used only for intermediate control of the oxidation degree during the prolonged process of levan oxidation, when purification of the sample before analysis is difficult.

A higher accuracy and reliability of results were obtained by direct determination of aldehyde groups in oxidised levan. Possibly, periodate and iodate ion removing from oxidised levan increase the accuracy of the results. The advantage of this method is determination of the oxidised levan without purification.

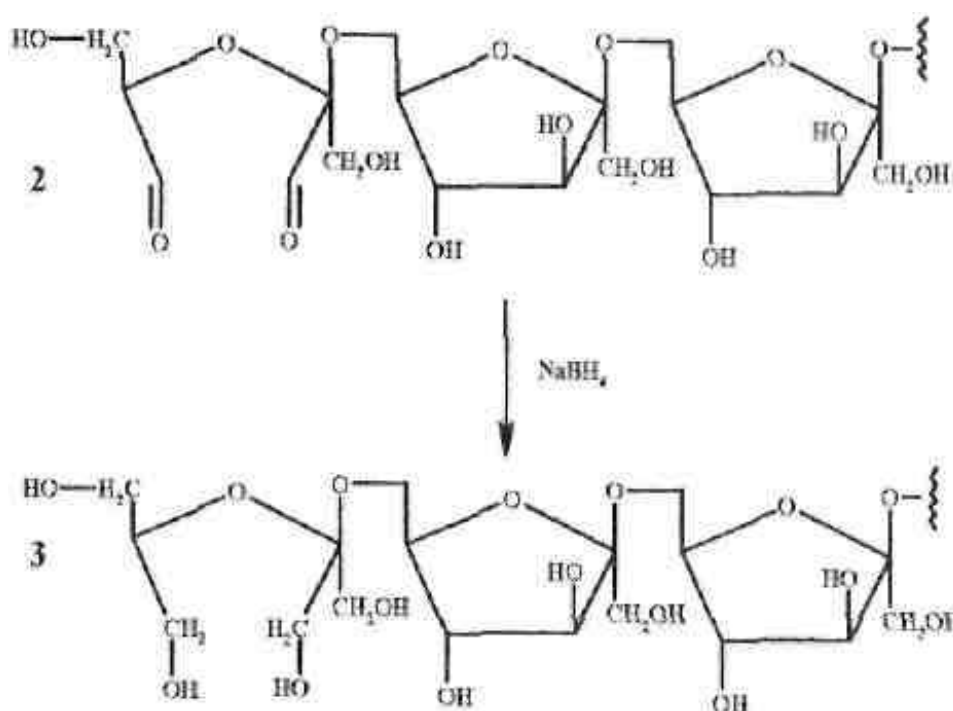
Potassium periodate ( $\text{KIO}_4$ ) was used in an equimolar quantum from the theoretically required one. *Zymomonas mobilis* levan synthesised from different carbon sources was used. Levan oxidation was studied at different times. The reaction pH was  $3.95 \pm 0.5$ . The highest oxidation degree (60-70 %) was achieved with levan 1 (low- and highmolecular), which was synthesised by *Z. mobilis* on glucose. Highmolecular levan and levan synthesised on sucrose after 120 h demonstrated the oxidation degree of only 23 % (16.8%).

The oxidation degree of levan synthesised in different conditions allowed to suggest that the used carbon source influenced the levan chemical structure. A higher oxidation degree was achieved for levan with low branched structure. Possible, the *Z. mobilis* cells on glucose synthesize the levan with a low branched structure. The use of sucrose as carbon source leads to synthesize of highbranched levan molecules.

*Z. mobilis* levan has a branched structure, so, we suggest that the first cycle of polysaccharide non-reducing terminal was preferentially modified and this retarded or prevented the approach of oxidant molecule  $\text{KIO}_4$  to the interior of the molecule. Bacterial highmolecular levan with a branched morphology existed as compact globular-shaped molecules in aqueous solutions. Such structures may be stabilised by hydrogen bonds between nearly arranged carbohydrate chains, preventing levan oxidation. Therefore, it is conceivable that the fructosyl residue was preferably modified on the molecule surface.

## 7. Reduction of oxidised levan

To prevent the high reactivity of aldehyde groups in various biological test-systems, they were reduced to the corresponding alcohols by addition of  $\text{NaBH}_4$  (Scheme 2). However, the observed reactions in the presence of a low concentration of sodium borohydride might have resulted in the degradation of the oxidised polysaccharides by  $\beta$ -alkoxycarbonyl elimination. In order to prevent further elimination, the reaction was performed in the presence of a high concentration of  $\text{NaBH}_4$  for a minimal reduction time. Therefore, the reduction of aldehyde groups was performed by addition of a twofold molar excess of  $\text{NaBH}_4$  per aldehyde, during a period of 1 or less hours.

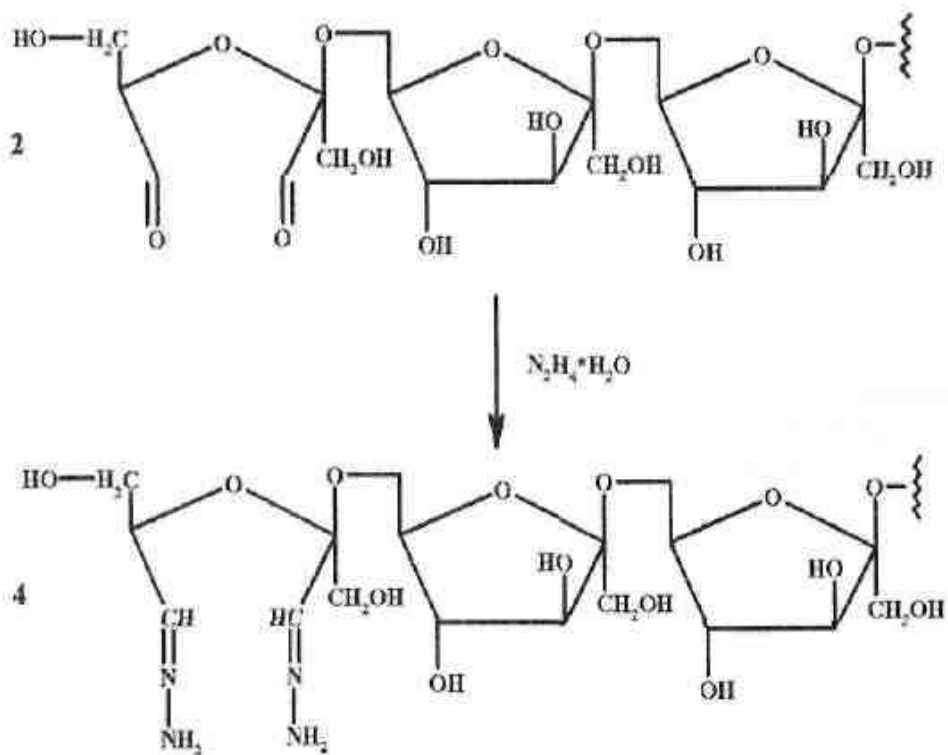


*Scheme 2. Reduction reaction of oxidised levan.*

Comparison of the polysaccharide oxidation degree before and after reduction allowed to conclude that practically all aldehyde groups were reduced after 1 h of reaction.

## 8. Modification of oxidised levan with hydrazine

Literature presents data that microbial polysaccharide with charge has a higher biological activity than neutral polysaccharides. Therefore, in order to convert the oxidised levan molecule 2 to positively charged form it was modified with hydrazine hydrate ( $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (Scheme 3).

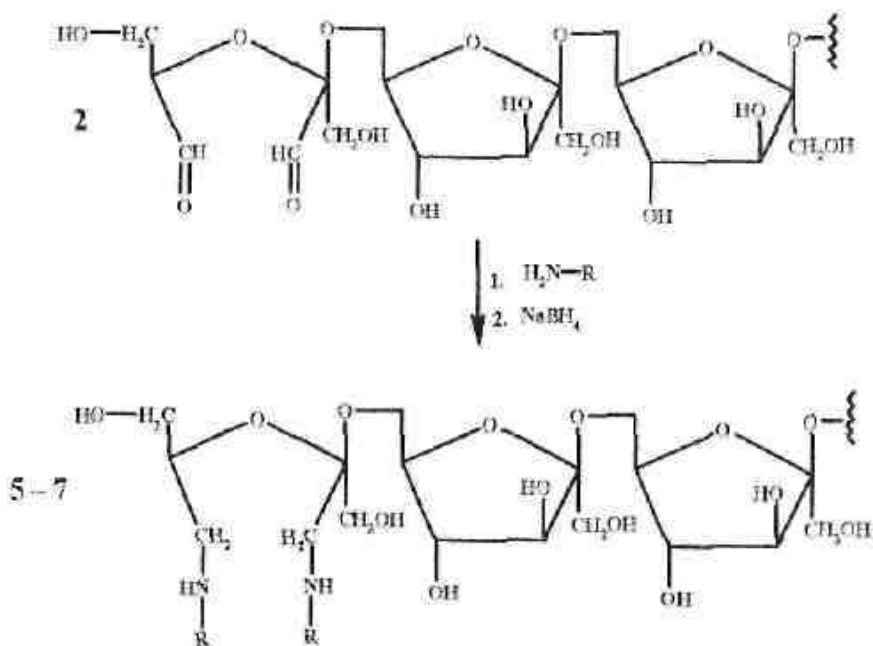


*Scheme 3. Modification of oxidised levari with hydrazine hydrate.*

In this reaction there were modified 78 % of oxidised groups. For a selective reduction of free (unmodified) aldehyde groups to the corresponding alcohols modified levan was later reduced with  $\text{NaBH}_4$ .

#### 9. Modification of oxidised levan with glycine, diglycine and triglycine

For the purpose to give a polysaccharide charge and substitute hydroxyl groups at C3 and C4 atoms with spatial aminoacids which connect fructosyl residues with positive and negative charges ( $\text{COO}^-$ ), oxidised levan was modified with glycine, diglycine and triglycine providing compounds 5-7, correspondingly (Scheme 4).



Scheme 4. Modification of oxidised levan with aminoacids

( $\text{NH}_2\text{-R}$  =: glycine, diglycine, triglycine)

The reaction of oxidised levan with aminoacids in an aqueous solution lead to unstable azomethine bonds which in the next stage were reduced with sodium borohydride and converted to stable secondary amine groups. The unmodified aldehyde groups at the same type were reduced to neutral hydroxylgroups. 9-15 % of fructosyl residues were modified in this reaction.

#### 10. Investigation of phagocitose

The phagocytic activity of 9 healthy volunteers and 5 hematological patients was studied to different levan (**1-3**) in the cytochemical tests *in vitro*:

- percentage of active cells;
- phagocitose index;
- alkaline phosphatase (indicating enzyme) activity.

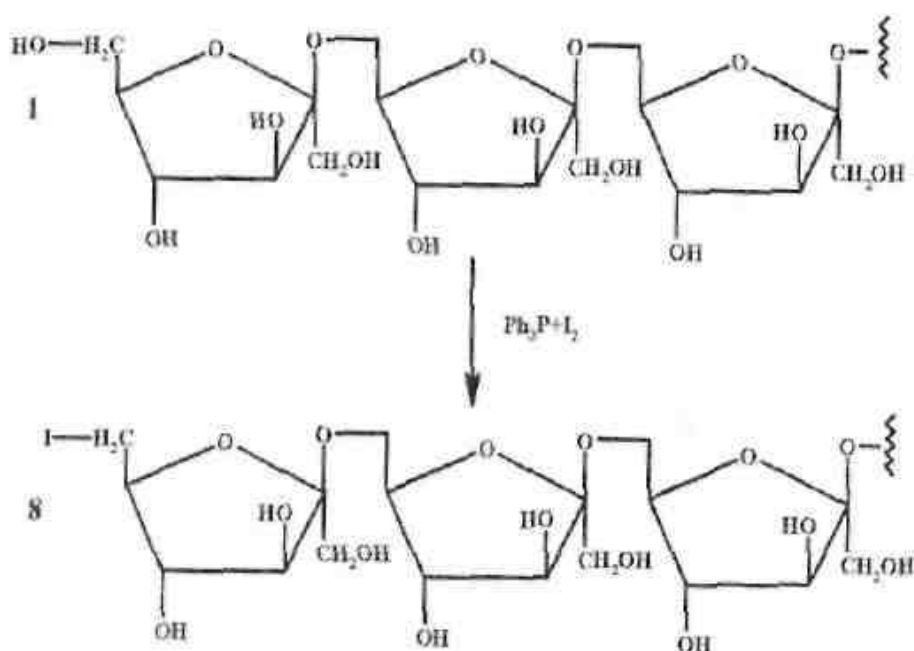
The periodate oxidation and reduction of aldehyde groups leads to increase of polymorphnuclear leukocytes phagocitose - increase the account of the active leukocytes to 149 % (**2**) and 141 % (**3**) and the phagocytic index to 153 %. The blood donor with normal immunity activity of alkaline phosphatase against control (without levan) increase to 160.7% (**2**) and 230.5 % (**3**). The highest activity, like in others activity tests, showed the oxidised and subsequently reduced in monomer unit C3-C4 region levan **3**.

### 11. Chemical modification of levan C6 region

According to literature data not only C3-C4 region plays an important role, but C6 region, as well. That is why modification of this region was done. The hydroxyl groups of the levan non-reducing terminal were substituted with iodine or choline groups.

### 12. Substitution of hydroxyl groups with iodine

The hydroxyl groups of the levan at C6 region were substituted using triphenylphosphine and iodine (Scheme 5).



*Scheme 5. Substitution of hydroxyl groups of the levan with iodine.*

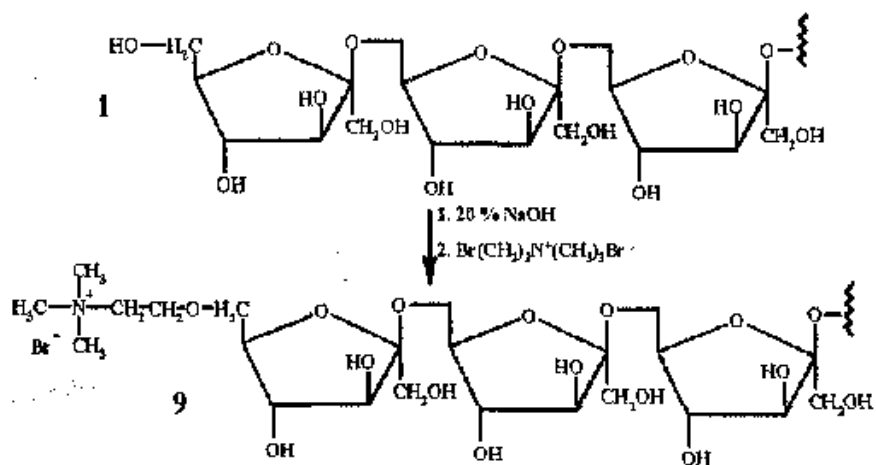
It was found that in iodinated levan 8 the content of iodine was 3.36 % and 18 % from terminal hydroxyl groups were modified. The experiments were done with the purpose to use the chemical reactivity possibilities of levan 8 to further modification with spatial and/or charged groups (for example, amino groups).

### 13. Production of choline and levan derivative

This modification was chosen because a strong immunomodulator has its own charged immunodeterminant, for example, spatial choline residue.

#### 13.1. Alkylation of levan with choline dibromide

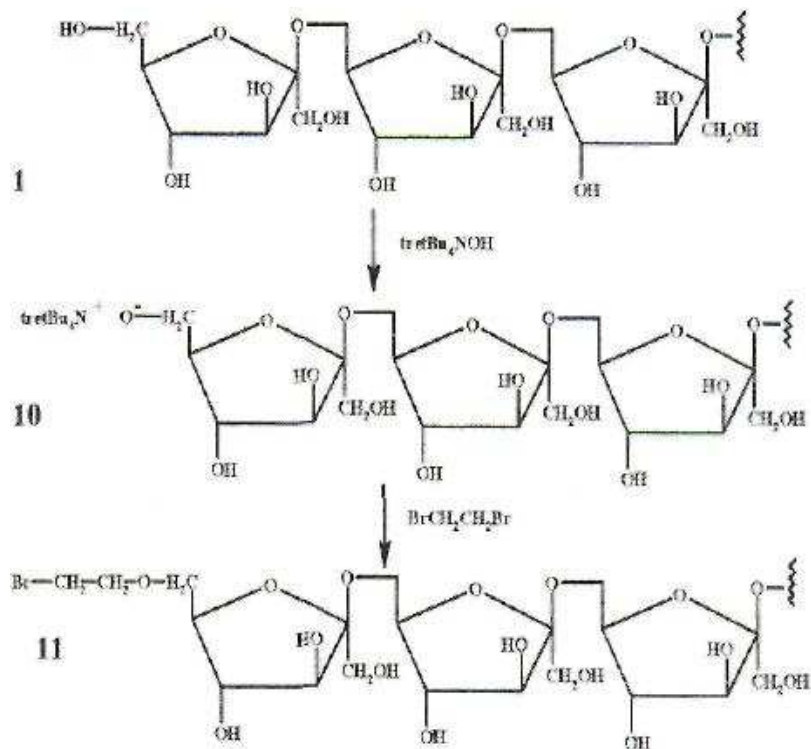
An attempt to perform a reaction by adding to levan of 20 % sodium hydroxide and later cholinedibromide (Scheme 6) was unsuccessful.



Scheme 6. Substitution of hydroxyl groups of the levan using choline dibromide.

### 13.2. Alkylation of levan with dibromomethane

Since the direct way to obtain the final product was unsuccessful the levan modification reaction was done in 3 stages. In the first stage levan was modified with 40 % *tert*-butylammonium hydroxide in ethanol (Scheme 7).

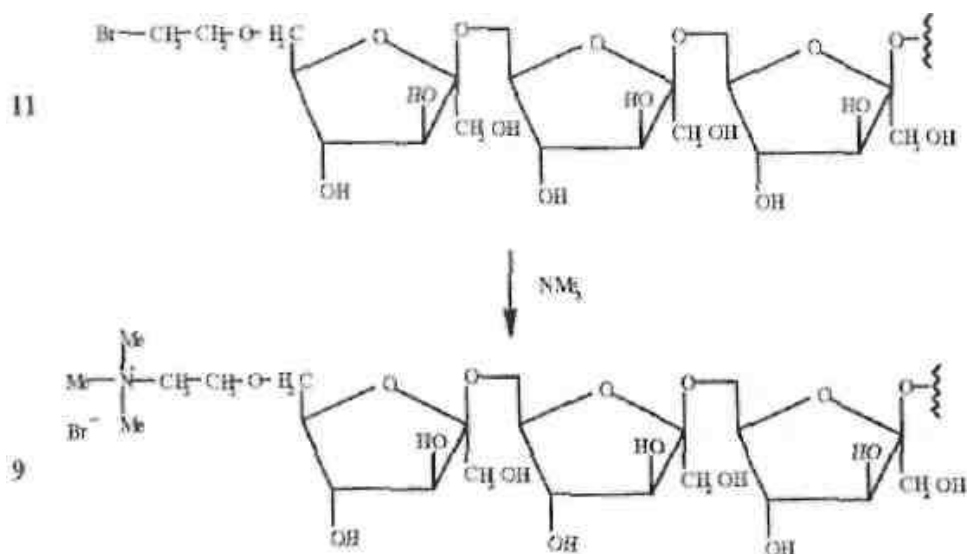


Scheme 7. Modification of levan with 1,2-dibromomethane.

In the second stage after the 1,2-dibromomethane addition bromethyllevan was precipitated, filtered and washed with ethanol.

### 13.3. The reaction of bromethyllevan with trimethylamine

In the third stage the bromethyllevan precipitate was dissolved in water and the trimethylamine solution was added (Scheme 8).



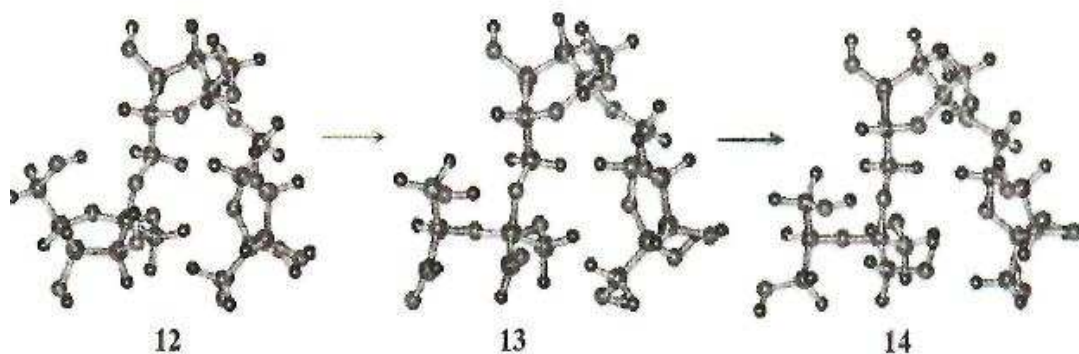
Scheme 8. The reaction of bromethyllevan with trimethylamine.

Eventually, the final product was obtained: Br, choline and levan derivative with a bromine content of 9 %, that met the requirements to the content of choline group.

### 14. An effect of chemical modifications of C3-C4 region on its structure

Native **12**, oxidised **13** and the next reduced **14** fructoside line **12**→**13**→**14** demonstrated the following changes: unmodified fructose had a five-membered planar ring with internal angle average  $111.3^\circ$  - one atom (C or O) was moved forward out of the ring plane; in the next ring the alternate was moved forward. Oxidation with potassium periodate and following reduction with sodium borohydride destroyed the fructoside ring: the distance between C3 and C4 atoms was increased  $1.55 \text{ \AA} \rightarrow 2.80 \text{ \AA} \rightarrow 3.00 \text{ \AA}$  and led to an increase in C5-O-C2 angle  $111.3^\circ \rightarrow 120.1^\circ \rightarrow 122.4^\circ$  (Scheme 9).





*Scheme 9. The computer model of oxidised and reduced trifructoside.*

As the periodate oxidation altered the configuration of C3 and C4 region we suggested that this region could be connected with the biological activity of levan. The modified fructosyl residue was getting more spatial and that could change the contiguous unmodified part conformation. Possibly, the spatial increase of fructoside residue on the molecule surface could prevent the approach of the oxidant molecule to the interior of the molecule. This theory agrees with experimental data about a low oxidation degree (17-23 %) of high molecular level in the oxidation reaction results.

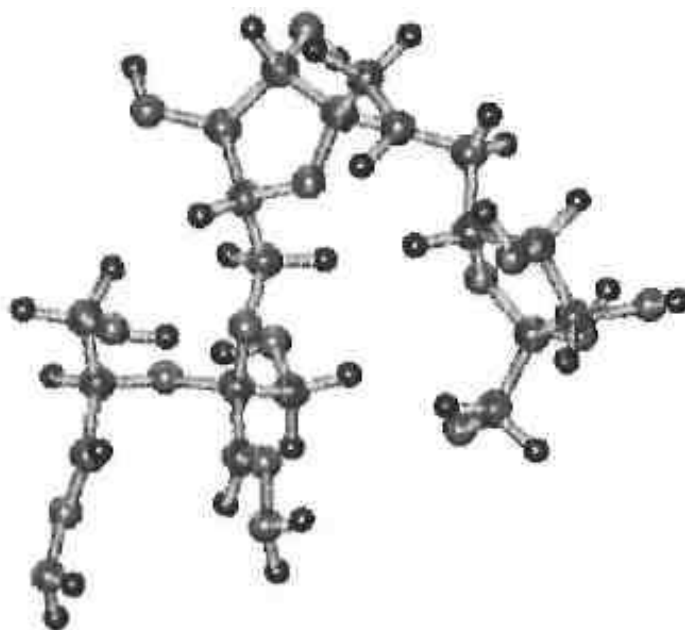
#### 15. An electronic structure model of native and modified trifructosides

Calculations of unmodified trifructoside with AM1 method showed, that hydrogen atom of -O-H group have a positive charge (+0.21- +0.23e), but oxygen atoms in the fructoside cycle and in the oxygen bridge between fructoside cycles to have a negative charge (-0.26 - -0.31e). Structures were stabilised with relatively strong hydrogen bonds between these atoms. The length of O-H...O bonds fluctuated from 2.17 to 2.54 Å, which resulted in strengthening of hydrogen bonds and explained the difficulties in conformational changes in these structures. The same effect was observed for all calculated heptafructoside structures. The same character of the hydrogen bond formation was observed for trifructoside 13 oxidised in the first cycle. Besides, in the same cycle there was observed the next type of the charge localisation on carbonyl groups: from C= +0.15 to 0.17 e, and for O = -0.25-0.26 e. These data allowed resuming that nucleophilic reagents, such as amines or hydrazines, could have an advantage in reacting with carbonyl group C in the condensation reactions.

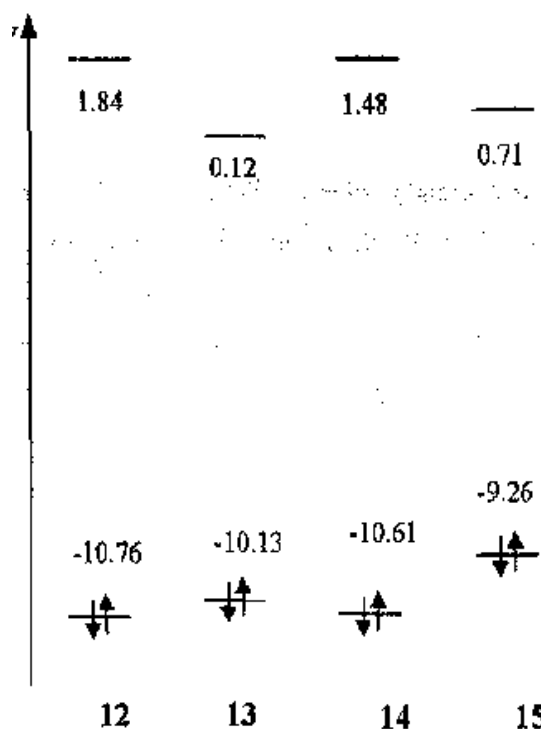
The difference in the distribution of hydroxylgroups charges in reduced trifructosyl forms 14 from other polysaccharide hydroxylgroups was insignificant. A small negative charge in the C=N region (fragment)(-0.19 to -0.20 e) localised mainly on the C atom was

registered in trifructoside dihydrazone derivatives **15** (Scheme 10). The changes in the electron density on the atoms in residual (others) parts of the molecule were insignificant in comparing with unmodified trifructoside.

Upon comparing the trifructoside HOMO and LUMO energy (Scheme 11) it was shown, that after oxidation of one fructoside cycle the difference between HOMO and LUMO decreased by approximately 2.1 eV. This could be explained by the formation of a double bound (C=O) after the oxidation of the carboxyl group. The reduced form of trifructoside **14** HOMO and LUMO did not differ essentially in energy from the unmodified trifructoside **12** frontier orbitals. In a hydrazine modified trifructoside molecule **15** the difference between HOMO and LUMO was even less than in **13** case and less by ~ 2.6 eV in case of native trifructoside **12**. In a hydrazine modified trifructoside molecule **15** low absorption in a visible part of the spectrum was observed.



*Scheme 10. The computer model of dihydrazone derivatives of trifructoside*



*Scheme 11. The HOMO and LUMO energy of native and modified trifructosides*

The distribution of the electron charge density in a native trifructoside molecule in the area of oxygen atoms in a cycle, hydroxyl groups, and on the oxygen bridge between fructoside fragments was studied. Both, in **12** and **14** HOMO and LUMO were strongly delocalized. In oxidized trifructoside **13** HOMO was partially localized in -O-C-C=O fragment, but LUMO in C=O fragment. In **15** trifructoside both, HOMO and LUMO were localized in C=N-N fragment. Upon comparing **13** with trifructoside **14** it was observed that the electron density in C=O and C=N group carbon atom varied strongly. If in C=O case the carbon atom carried ~0.16 el. positive charge, then in C=N case the carbon atom carried ~0.2 el. negative charge,

#### 16. A quantum chemical calculation of the spatial structure of hepta- P-D-fructoside chain

The conformer geometry of oligofructosides that consisted of 3 to 7 fructosyl residues was optimized by AM1 method. According to the obtained results an increase in the fructosyl residue number led to spiralisation of the levan chain and that a full spiral clockwise consists of 5-6 residues.

Various configurations of heptafructoside were investigated by varying of torsion angles. The MM+ method did not give a sufficient accuracy and thus it was substituted by AM1 method. Using AM1 method 63 configurations with energy varying from -1709.92 to -1670.90 kcal/mol (difference is 39 kcal/mol) were obtained. Obviously, a downturn of the

energy of a stable conformation was connected not only with optimum torsion angles, but also with possible hydrogen binding formations. It was assumed that in the first 10 optimized conformations hydrogen bindings could be formed in 2 to 4 points with the internuclear distances from 2.08 to 2.3 Å and with the difference of charges on atoms about +/- 0.5 e in average.

## CONCLUSIONS

1. The stainless steel carrier surface was activated by treatment with titanium (IV) chloride and  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane with purpose to increase the *Zymomonas mobilis* bacteria cells bounding with carrier and use it in repeated fermentation cycles to produce levan. In case of  $\text{TiCl}_4$  system productivity for levan production was higher ( $Q_{\text{lev}}=0.32$  g/lxst) comparing with  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane modification ( $Q_{\text{lev}} = 0.18$  g/lxst).
2. The modification of the C3-C4 region of levan with sodium borohydride, hydrazine, glycine, diglycine and triglycine was realized with purpose to change the biological and pharmacological properties of polysaccharides.
3. The levan oxidation reaction was investigated. The oxidation degree of levan was found to depend on its molmass and the conditions of levan biosynthesis.
4. Various analysis methods for measurements of oxidation degree were compared: the method of Fleury and Lange (calculated from the final periodate consumption) and the method described by Lindenbaum (calculated directly from the aldehyde analysis). A higher accuracy and reliability of results were obtained by Lindenbaum method. The Fleury method can be used only for intermediate control of the oxidation degree.
5. An effect of chemical modifications of C3-C4 region on its structure was analysed: the periodate oxidation led to an increase of the dimensional structure of a fructoside cycle.
6. A quantum chemical calculation of the spatial structure of hepta-  $\beta$ -D-fructoside chain was carried out: possible hydrogen binding formations can stabilise carbohydrate chains and prevent levan oxidation, as well.
7. In the present work it was found that the chemical modification of the C3-C4 region of the levan increase the possibilities of modified form to stimulate the unspecific immunities of organism. The periodate oxidation and reduction of aldehyde groups leads to increase of polymorphnuclear leukocytes phagocitose - increase the account of the active leukocytes to 149 % and 141 % (accordingly) and the phagocytic index to 153 %. The blood donor with normal immunity activity of alkaline phosphatase against control (without levan) increase to 160.7 % and 230.5 % (accordingly).
8. To study the immunochemical relationships of levan monomer unit C6 region reactions (substitution with iodine or choline) was realized.

## LITERATŪRAS SARAKSTS / REFERENCES

1. I. Vina, A. Karsakevich, S. Gonta, R. Linde, M. Bekers. 1998. Influence of some physico-chemical factors on the viscosity of aqueous levan solution of *Zymomonas mobilis*. *Acta Biotechnologica*, 18, No2, pp. 167-174.
2. A. Karsakevich, E. Ventina, I. Vina, M. Bekers, S. Gonta, R. Linde, E. Kaminska. 1998. The effect of chemical treatment of stainless steel wire surface on *Zymomonas mobilis* cell attachment and product synthesis. *Acta Biotechnologica*, 18, No3, pp. 255-265.
3. R. Linde, S. Gonta, A. Karsakevich, I. Vina, M. Bekers. 1996. A method of purification and characteristics of *Zymomonas mobilis* 113 s levan.- *Proceeding of the Latvian Academy of Sciences, Section B.*, 50,3 (584), 140-143.
4. S. Gonta, A. Karsakevich, I. Vina. 1999. The periodate oxidation of levan from *Zymomonas mobilis*. *Proceeding of the Latvian Academy of Sciences, Section B.*, 53, 5 (604), 290-294.
5. I. Vina, M. Bekers, A. Karsakevich, R. Linde, S. Gonta, M. Toma. 1998. Some properties of fructose biopolymer levan produced by *Zymomonas mobilis*. - *Biomass for Energy and Industry. Proceedings of the International Conference, Wurzburg, Germany*, pp. 460-463.
6. S. Gonta, M. Utinans, O. Neilands, I. Vina. 2004. Computational analysis of native and modified oligofructosides. Accepted to publications in *Journal of Molecular Structure (Theochem)*.
7. M. Beķers, J. Laukevics, D. Upīte, E. Kaminska, A. Karsakēviča, I. Vīna, E. Ventīņa, A. Vīgants, S. Gonta, R. Linde. Sējmateriāla gatavošana galvenajā fermentācijas procesā, izmantojot porainā nesējā vāji piesaistītu šūnu kultūru. 1998. Latvijas patents Nr. LV 11973 B.
8. A. Karsakevich, I. Vīna, S. Gonta, R. Linde, M. Beķers. 1996. Production and some unusual properties of levan, a polymer of D-fructose from special *Zymomonas mobilis* strain. - *BIOBALT'96 Workshop, Tartu, Estonia*, 21.
9. S. Gonta, I. Vina, A. Karsakevich, O. Neilands, M. Bekers. 1998. Chemical modification of polysaccharide levan as tool for the study of its immunomodulating mechanisms. - *Abstracts of Scientific Conference "24th Estonian Chemistry Days", Tartu*, p.19.
10. I. Vina, A. Karsakevich, M. Bekers, S. Gonta, O. Neilands, M. Utinans. 1998. Bacterial polysaccharide levan: chemical modification and structure investigations. - *Book of Abstracts of XVth EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry, Edinburgh, Scotland*, p. 170.

11. I. Vīna, A. Karsakevich, M. Bekers, S. Gonta, R. Linde, A. Zhilevica, R. Treimane, H. Grante. 1998. Levan-(3-D-fructofuranose polymer: structure and immunomodulation of phagocytic activity of human polymorphonuclear leukocytes. - Book of Abstracts of XVth EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry, Edinburgh, Scotland, p. 171.
12. S. Gonta, O. Neilands, I. Vīna. 1998. Polisaharīda levāna modificēšana bioloģiski aktīvu vielu iegūšanai. RTU 39. Studentu Konferencē, p.93.
13. S. Gonta, I. Vīna, A. Karsakēviča, O. Neilands. 1999. Levāna ķīmiskā modifikācija bioloģiskās aktivitātes stimulēšanai. Latvijas Universitātes 80. gadu jubilejai veltīta 57. konference. 19-20.
14. S. Gonta, O. Neilands, I. Vīna. 1999. Nerūsējošā tērauda lodīšu izmantošana levānu sintezējošo baktēriju imobilizācijai. RTU 40. Studentu Konferencē, I Ķīmija. Ķīmijas tehnoloģija, 17.
15. S. Gonta, I. Vīna, M. Utinans, O. Neilands. 2000. Three dimensional structure of bacterial fructan levan: computational analysis. Fourth International Fructan Symposium. Arolla, Switzerland, August 16-20, p. 7.9.
16. I. Vīna, A. Karsakevich, S. Gonta. 2000. Immunomodulatory fructan levan: chemical modification for analysis of spatial structure. Fourth International Fructan Symposium. Arolla, Switzerland, August 16-20, p. 7.15.
17. I. Vīna, A. Zilevica, R. Treimane, A. Karsakevich, S. Gonta. 2000. The effect of polyfructans on alkaline phosphatase activity in polymorphonuclear leukocytes. Fourth International Fructan Symposium. Arolla, Switzerland, August 16-20, p. 8.13.
18. R. Linde, I. Vīna, A. Karsakevich, S. Gonta, A. Vigants, M. Bekers. Macromolecular Conjugates of Polysaccharides with Antileukemic Enzymes. XVII<sup>th</sup> International Symposium on Glycoconjugates, Bangalore, India, Jan 12-16 2003, p. 67.
19. Vīna I., Gonta S., Utinans M., Neilands O. Targeted synthesis of new levan-type anticancer immunomodulators. XVIII<sup>th</sup> International Symposium on Medicinal Chemistry, Copenhagen, Denmark & Malmo, Sweden, August 15-19 2004.