

Kan enzymer erstatte funktionelle tilsætningsstoffer?

Det er et af de spørgsmål, der ligger bag et forskningsprojekt, der skal udvikle nye enzymatiske teknologier til »food structure engineering«

Af Charlotte L. Steffensen, Afdeling for Råvarekvalitet, Danmarks JordbrugsForskning

Proteiner bidrager til de strukturelle egenskaber i mange fødevarer. Derfor kan kontrolleret modifikation af proteiner potentielt erstatte visse tilsætningsstoffer til optimering af funktionalitet eller sensorisk opfattelse af fødevarer. Det kan f.eks. være i forbindelse med fremstilling af produkter med et lavt fedtindhold.

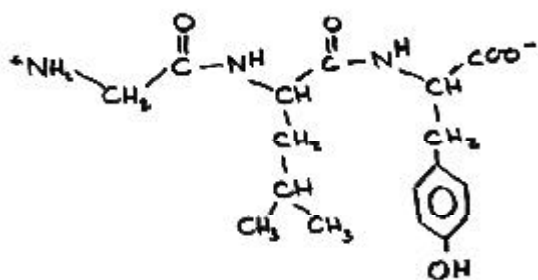
En måde at modificere proteiner på er at skabe krydsbindinger mellem proteiner vha. enzymer. Men, før disse krydsbindende enzymer kan udnyttes i levnedsmidler (på en kontrolleret måde), er det nødvendigt at skaffe sig en basal forståelse af de reaktioner enzymerne katalyserer. Det betyder, at man først må finde ud af, hvordan mekanismerne bag de enzymatisk inducerede krydsbindinger i proteiner kan klarlægges.

Peptider bruges som proteinmodeller

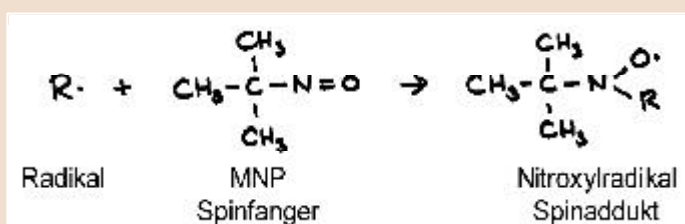
I reaktioner, der katalyseres af oxidative enzymer, vil der indgå et intermediært radikal. Hvis radikalet sidder på et molekyle, der har en størrelse, hvor det frit kan rotere i opløsningen, kan strukturen af dette radikal undersøges ved elektron spin resonance (ESR). Det er én grund til at bruge små peptider som modeller for proteiner. En anden vigtig grund er, at peptiderne er tilpas små til, at en krydsbinding mellem to peptider kan detekteres som en fordobling af massen, vha. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectroscopy (MALDI-TOF MS). I det viste eksempel er tripeptidet GLY (figur 1) brugt som substrat for modelenzymet peberrod peroxidase (høse raddish peroxidase; HRP).

Placeringen af intermediære radikaler bestemmes ved ESR

De intermediære radikaler, der dannes, når peptider bruges som substrat for Peberrod peroxidase, er pga. deres høje reaktivitet kortlivede. For at stabilisere de dannede radikaler tilsættes en spinfanger, der reagerer med radikalerne og danner stabile



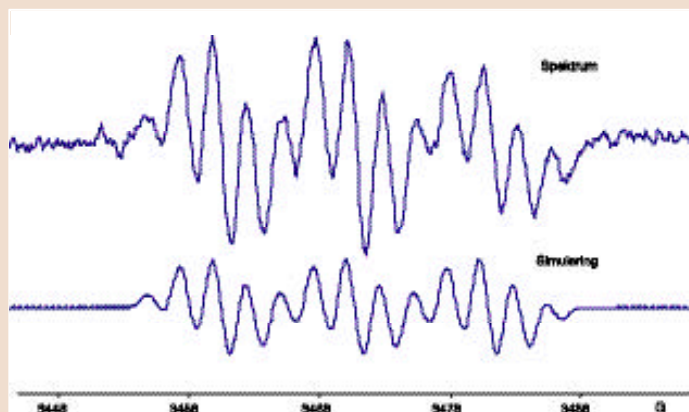
Figur 1. Et af de modelpeptider, der bruges som substrat for forskellige enzymer, er tripeptidet Glycine-Leucine-Tyrosine (GLY).



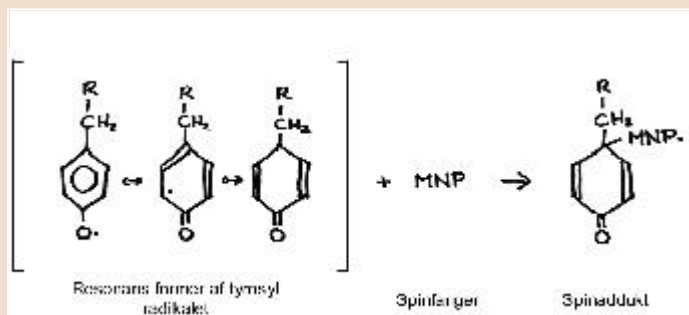
Figur 2. Kortlivede radikaler kan detekteres indirekte som spinaddukter. Spinfangeren t-nitroso-butan (MNP) kan reagere med radikaler og danne stabile nitroxylradikaler. I ESR-spektre af MNP-nitroxylradikalet ses opsplitning i en triplet pga. hyperfin kobling mellem den uparrede elektron og N-atomet. Desuden ses opsplitninger, der skyldes atomer i det spinfangede radikal.

spinaddukter, som kan måles med ESR. Reaktionsskema er vist i figur 2.

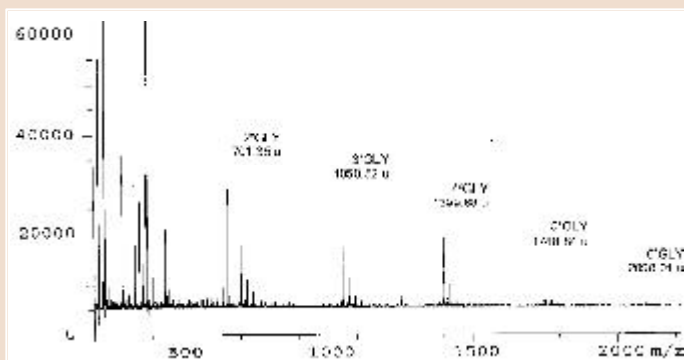
I en reaktionsblanding med 3 mM GLY, 20 mM af spinfangeren MNP og 0.3 mg/ml HRP, der aktiveres ved tilsætning af 1 mM hydrogenperoxid, detekteres et 13 linjers ESR-spektrum (figur 3). Ud fra linjerne kan signalets hyperfin-splitninger bestemmes. Hyperfin-splitninger fortæller, hvilke og hvor mange atomer med spin der befinder sig »tæt på« den frie elektron i radikalet og kan derfor fortælle, hvor i molekylet radikalet er placeret. I dette tilfælde kobler den uparrede elektron til et N-atom (fra spinfangeren) og til 2 gange 2 ækvivalente H-atomer. Det svarer til et tyrosylradikal, der er blevet fanget af spinfangeren på et tidspunkt, hvor den uparrede elektron var placeret på γ C af tyrosin (figur 4).



Figur 3. ESR-spektrum af et spinaddukt, dannet mellem et peptidradikal og spinfangeren MNP. En simulering af spektret er lavet ud fra hyperfin-splitningerne: $a_N = 13.3$ G, $2a_H = 2.5$ G og $2a_H = 2.4$ G.



Figur 4. Reaktion mellem spinfangeren t-nitroso-butan (MNP) og et tyrosylradikal. MNP har her fanget tyrosylradikalet, da den uparrede elektron var placeret på g C



Figur 5. Massespektrum af peptidpolymerer dannet ved HRP-katalyseret krydsbinding af tripeptidet GLY.

Krydsbinding påvises med MS

Til MS benyttes en reaktionsblanding, der indeholder 3 mM GLY, og HRP immobiliseret på sephadex beads. Reaktionen startes ved at tilsætte 1 mM hydrogenperoxid. I det optagne MS-spektrum (figur 5), kan dannelsen af peptidpolymerer med masser tæt på et multiplum af tripeptidmassen ses.

Udledning af mulige reaktionsmekanismer

Ud fra beregninger af teoretiske masser for peptidpolymerer ses det, at hver krydsbinding er opstået ved en nettoelimination af to hydrogenatomer. Samtidig viste ESR, at reaktionen gik gennem et tyrosylintermediat. Derfor er den oplagte hypotese, at to peptider kan bindes sammen enten ved en reaktion mellem

to tyrosylradikaler eller ved en kædereaktion, hvor et tyrosylradikal bindes til et peptid, hvorefter det nye krydsbundne produkt, der stadig indeholder et radikal, kan reagere videre med endnu et peptid.

Det er muligt, at de dannede krydsbindinger er dityrosin- eller isodityrosinbindinger. De to bindingstyper er vist i figur 6 (side 28). Det fremkomne reaktionsprodukt kan nu bestemmes yderligere ved at analysere for tilstedeværelse af hhv. dityrosin- og etherbindinger.

Enzymatisk krydsbinding i proteiner

Når en HRP-katalyseret krydsbindingsreaktion kan foregå på et peptid, der indeholder tyrosin, antages det, at en lignende

TEMADAG



"Sikring af drikkevand til produktionsformål"

BioCenter Østjylland inviterer til temadag. Mød op og hør om de teknologier, der kan hjælpe dig til at sikre og dokumentere kvaliteten af dit drikkevand.

Mandag d. 15. november 2004

Aarhus tekniske Skole
Dollerupvej 2, 8000 Århus C

kl. 12.00 – 17.00 Udstilling af udstyr til sikring af vandkvaliteten og måleteknikker

kl. 13.00 – 16.00 Foredrag om lovgivning, teknologier og målemetoder

Hvis du vil vide mere, bedes du kontakte sekretær Inge Frandsen på tlf. 89373146, på e-mail: if@ats.dk eller læse på hjemmesiden www.biocenteret.dk.

Deltagelse i temadagen er gratis, men vi beder om, at du tilmelder dig.

BioCenter Østjylland er et regionalt vækstcenter bestående af Teknologisk Institut, Aarhus Universitet og Aarhus tekniske Skole. BioCenter Østjylland har til formål at formidle viden inden for vand og luftrensning. BioCenteret har eksisteret i 3 år og vist gode resultater.



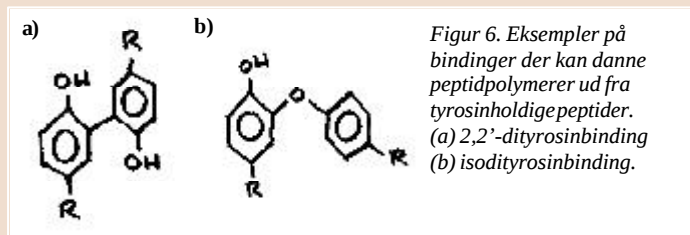
**TEKNOLOGISK
INSTITUT**



AARHUS UNIVERSITET



**Erhvervsakademiet
Aarhus tekniske Skole**
Tekniske Skoler Østjylland



Figur 6. Eksempler på bindinger der kan danne peptidpolymerer ud fra tyrosinholdige peptider. (a) 2,2'-dityrosinbinding (b) isodityrosinbinding.

reaktion kan finde sted mellem proteiner, der har tilgængelige tyrosiner.

Mekanismer bag enzyminduceret krydsbinding kan klarlægges

Som det ses, er ESR og MS nyttige metoder til at studere enzymkatalyserede krydsbindinger mellem peptider. Der arbejdes for tiden videre på at undersøge, om de identificerede

mekanismer kan overføres direkte til proteiner. De beskrevne metoder skal benyttes til at undersøge krydsbindingsmekanismer for andre enzymer; peroxidaser, tyrosinaser og laccaser, der kunne være mere relevante end modelenzymet HRP til brug i forskellige levnedsmidler. Senere er det planen at korrelere de fundne molekulære ændringer med påvirkning af proteinrige fødevarers makromolekulære og funktionelle egenskaber. Herefter kan enzymerne benyttes målrettet i forbindelse med forarbejdning af mejeri-, kød- og kornprodukter.

Flere informationer om projektet, der er en del af EU projektet CROSSENZ, kan findes på <http://crossenz.vtt.fi>

E-mail-adresse

Charlotte L. Steffensen: charlotte.l.steffensen@agrsci.dk

Ph.d.-projekter

Undersøgelse af SO₂-emissioner

Adskillige anlægsmålinger har vist, at emissioner af SO₂ fra cementproduktion hovedsageligt skyldes, at pyritsvovl (FeS₂) i råmaterialerne oxideres til SO₂ under opvarmning i processen. Dannelsen af SO₂ sker typisk i andet trin i en typisk femtrins cyklonforvarmer, der anvendes til forvarmning af råmaterialerne, og omkring 30 til 50% af sulfidet i råmaterialerne undslipper typisk forvarmeren som SO₂. Reaktionshastigheden for dannelse af SO₂ ved oxidation af pyrit er blevet undersøgt i to forskellige laboratoriereaktorer: En fired bed reaktor (FBR), anvendelig under forhold hvor reaktionshastigheden er relativ langsom (ca. 350-500°C), og en entrained flow reaktor (EFR) anvendelig ved højere temperaturer, hvor reaktionshastigheden er betydelig hurtigere. En kraftig forøgelse af reaktionshastigheden ved stigende temperaturer blev målt. Særligt omsætningsgraden steg kraftigt ved ca. 525°C i EFR'en. Da ovenstående forsøg med oxidation af pyrit viste, at helt op til 100% af sulfidet i råmaterialerne omdannes til SO₂ under opvarmning, samtidig

med at anlægsmålinger viser, at kun omkring 30-50% af sulfidet i råmaterialerne sædvanligvis undslipper forvarmeren som SO₂, må en betydelig genabsorption af SO₂ finde sted i de øverste trin af forvarmeren. Termodynamisk set er absorption af SO₂ direkte på CaCO₃ favoriseret ved lave temperaturer, men i praksis falder reaktionshastigheden ved faldende temperaturer. Kinetik, der beskriver dannelse og absorption af SO₂, er kombineret i en model, der simulerer forholdene i en cyklonforvarmer. En endelig evaluering af modellen med svovlmålinger fra fem forskellige anlæg viste en god sammenhæng mellem beregnede og målte mængder sulfid i udgangen fra de enkelte trin for fire ud af fem anlæg. Det var dog ikke muligt at opnå tilfredsstillende sammenhæng mellem beregnede og målte koncentrationer af SO₂, hvilket forklares ved, at den anvendte kinetik for SO₂ absorption er for langsom, eller at modellen ikke beskriver de fysiske forhold tilstrækkeligt.

Jens Peter Hansen, Kemiteknik, DTU

Elektriske chips til bioprocesskontrol

I løbet af de sidste 10 år er en lang række organismers samlede arveanlæg blevet kortlagt - således også bakteriers DNA, af hvilke mere end 150 genomer nu findes totalt sekventeret. Denne viden er nyttiggjort på mange måder i både medicinske og industrielle sammenhænge, f.eks. i tilknytning til fremstilling af DNA-chips, der tillader samtidig aflæsning af alle genomets geners ekspression under givne sæt af betingelser. I mange tilfælde - specielt i produktionssystemer, hvor bakterier udnyttes til fremstilling af særlige fermenteringsprodukter - har man imidlertid »kun« behov for at monitorere nogle få geners aktivitet. Det skyldes, at industrielle fermenteringer normalt er helt standardiserede. Men selv standardiserede processer kan få uforudsigelige forløb, når der er tale om fermenteringer med levende organismer. Det er derfor vigtigt at kunne følge processen online, så man kan justere forholdene mhp. optimering.

Dette ph.d.-projekt er et teknologisk udviklingsarbejde, der

har haft som mål at udvikle et automatisk og følsomt online-system til at følge aktiveringen af specifikke gener ved at måle tilstedeværelsen af disse geners første aflæsningsprodukt - mRNA.

Det store problem er, at mRNA-molekyler normalt produceres i meget små mængder i cellerne, og de er meget ustabile i og udenfor cellen.

Der er udviklet en realistisk metode til at detektere mRNA i meget små mængder ved bl.a. at øge følsomheden i den type assay, der anvendes. Metoden er velegnet til en kobling til små elektriske chips, der kan monteres i direkte forbindelse med fermenteringstanken. Anvendelsesmulighederne er meget store i en lang række sammenhænge inden for såvel fermenteringsindustrien som andre områder, hvor det er af betydning at kunne detektere særlige RNA-molekyler som indikator for mikrobiologisk aktivitet.

Kim Bundvig Barken, BioCentrum-DTU

AAS · ICP/MS
UV-VIS · LC/MS
GC/MS · FT-IR/NIR

Nu er vi her !
48 16 62 00 · Gydevang 17-19 · 3450 Allerød

Thermo
ELECTRON CORPORATION

