

Kan makromolekylers funktionalitet fastslås med NIR?

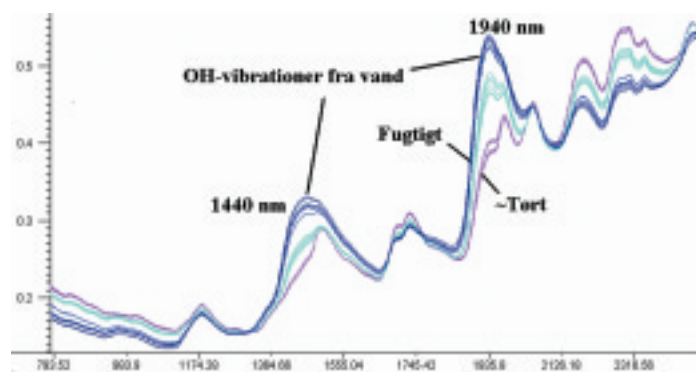
Ved at bruge glutenetværket som modelsystem er det undersøgt, om NIR kan bruges til at fastslå makromolekylers funktionalitet. Resultaterne er lovende

Af Susanne W. Bruun, Ib Søndergaard, Susanne Jacobsen, Biochemistry and Nutrition Group, BioCentrum-DTU

Makromolekylers funktionalitet spiller en vigtig rolle for funktionen af levende celler og for fødevarers kvalitet. Derfor er en nem og hurtig metode til bestemmelse af makromolekylers funktionalitet ønskelig. Nærinfrarød-spektroskopi (NIR) er hurtig, foregår uden nedbrydning af prøven og er derfor potentielt anvendelig som *online*-metode [1].

Detektion af konformationer og interaktioner

Som en af få metoder er vibrationspektroskopi følsom over for hydrogenbindinger. Metoden er i stand til at detektere ændringer i makromolekylers konformationer og interaktioner, der er essentielle faktorer for makromolekylernes funktionalitet. I



Figur 1. NIR-spektre af glutenprøver med forskellige fugtigheder. Pink: 4-5% vandindhold. Lyseblå: 7-14% vandindhold. Mørkeblå: 20-33% vandindhold. Spektrene er korrigeret for lysspredningseffekter. De brede absorptionsbånd ved 1440 nm og 1940 nm øges med vandindholdet og stammer fra hhv. 1. overtone af OH-stræk og kombinationen af OH-stræk og HOH-bøjning.

modsatning til infrarød spektroskopi (IR), der benyttes rutinemæssigt til at bestemme proteiners sekundære struktur, er anvendeligheden af NIR til dette formål ikke blevet videre undersøgt. I IR-spektre ses de fundamentale absorptioner, mens det er de svagere overtoner og kombinationer af disse, der forekommer i NIR-spektrene.

Fugtning af hvedegluten og hvedestivelse

Hvedemel og destilleret vand blev rørt til en dej, og en glutenfraktion blev isoleret ved udvaskning i hånden. Ligeledes blev en stivelsesfraktion isoleret fra en dej. Fraktionerne blev dernæst frysetørret, malet i en laboratoriemølle og sigtet. Små prøver blev spredt på petriskåle, placeret i en lukket beholder med destilleret vand i bunden og derefter opbevaret ved enten stuetemperatur (25°C) eller ved 5°C. Efter forskellige perioder med absorption af vand fra luften ($t=1, 2, 4, 23, 27, 45$ og 53

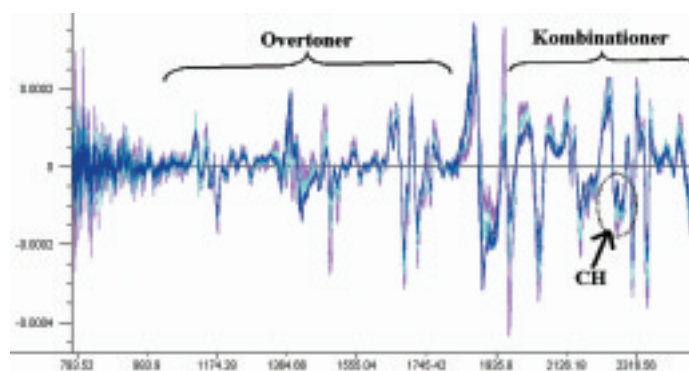
timer) blev prøverne vejede og NIR-reflektans-spektrene optaget fra 790 nm til 2500 nm.

Spektrene blev korrigeret ved »multiplicativ scatter correction« (MSC), og anden afledte-spektre blev beregnet fra de MSC-korrigerede spektre ved brug af Savitzky-Golay-transformation. Glutenprøvernes vandindhold beregnet på våd basis ud fra prøvernes vægtforøgelse gik fra ca. 4 til 33%.

Effekten af vand på glutenets spektrum

I glutenspektrene (figur 1) afspejles det øgede vandindhold i intensiteten af to brede absorptionsbånd, som stammer fra OH-vibrationer.

Ved stigende vandindhold i gluten øges først gluten-vand-interaktionerne, og ved højere vandindhold ses også ændringer i glutenets sekundære struktur, hvilket bringer det til den funktionelle viskoelastiske tilstand. Det forventes, at denne udvikling vil ledsages af små ændringer i proteintoppens form og placering, idet vibrationsfrekvenserne er følsomme over for



Figur 2. Anden afledte-spektre af glutenprøver med forskellige fugtigheder. Pink: 4-5% vandindhold. Lyseblå: 7-14% vandindhold. Mørkeblå: 20-33% vandindhold. De originale absorptionsbånd ses som nedadpegende toppe, og de er skarpere og bedre adskilte end i råspektrene (figur 1). Et interessant område ses i CH-kombinationsbåndene.

den ændrede hydrogenbinding. Det undersøges ved brug af anden afledte-spektre, hvor overlappende toppe er bedre adskilte (figur 2). I anden afledte-spektrene ses de oprindelige toppe som nedadpegende toppe, og proportionaliteten mellem intensiteten og koncentrationen er bevaret.

Amid-kombinationsbåndene omkring 1775 nm, 2050 nm og 2180 nm skyldes protein backbone-vibrationer, som er følsomme over for proteinets konformation. Ved hydreringen ses dog kun små skift i disse absorptionsbånd. I stedet ses større

FREM bruger vor viden og teknik fra 65 lande!



"Air Liquide har siden 2001 forsynet os med kuldioxid til at karbonisere vore mineralvand og sodavand, så de både kilder gansen og får øget holdbarhed.

Air Liquide har projekteret vort anlæg, så det dækker vore behov og er ekstremt driftssikkert. Via et telefio-system overvåger Air Liquide, hvornår tiden er inde til en ny levering – det fungerer automatisk, så vi har ikke ringet efter gas de seneste to år! Desuden er Air Liquide altid behjælpelige med at foreslå nye produkter og forbedringsmuligheder."

Egon Nielsen, direktør for Mineralvandsfabrikken FREM A/S i Ribe

Gas og gasekspertise fra Air Liquide er også en naturlig ingrediens i mange andre danske levnedsmiddelvirksomheders produktionsprocesser. Færdigmad og råvarer køles og fryses ned med gas for at bevare smag og friskhed eller pakkes i en oxygenfri atmosfære, som bevarer kvaliteten hele vejen frem til tallerkenen.

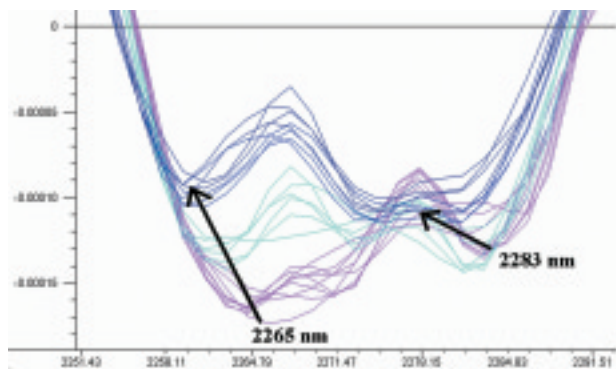
Som verdens førende gasvirksomhed har vi den viden og de produkter, du behøver. Ring allerede i dag og få en uforpligtende snak med en af vores levnedsmiddelekspert!



Verdens største inden for industrielle gasser!

Air Liquide Danmark A/S | Godsbanegade 2 | 8700 Horsens | Tlf 76 25 25 25 | Fax 76 25 25 35 | www.airliquide.dk

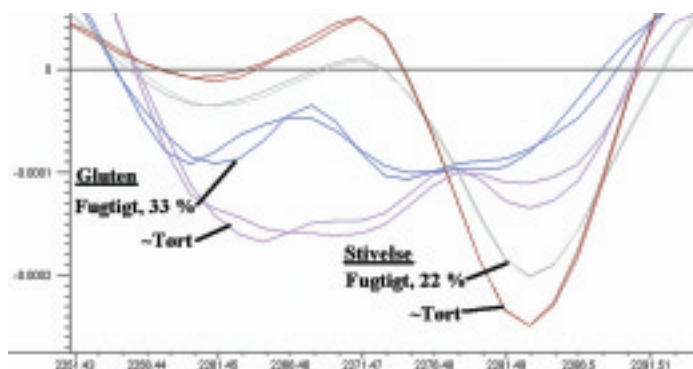
spektrale ændringer i et område med CH-kombinationsbånd, som stammer fra aminosyresidekæde-vibrationer (figur 3).



Figur 3. Zoom-billede af CH-kombinationsbånd (udpeget i figur 2) fra anden afledte-spektre af gluten med forskellige fugtigheder. Pink: 4-5% vandindhold. Lyseblå: 7-14% vandindhold. Mørkeblå: 20-33% vandindhold.

Kvalitativ ændring i aminosyresidekæde-absorptioner

I området med CH-kombinationsbåndene ses ikke blot en kvantitativ ændring, idet det observeres, at en top ved 2265 nm gradvis skifter mod 2260 nm og bliver smallere ved øget fugtighed, mens en anden top ved 2283 nm skifter mod 2278 nm og bliver bredere (figur 3). Denne spektrale ændring finder sted for alle fugtede glutenprøver uafhængig af deres forskellige opbevaringstemperatur (5°C eller 25°C) og er observeret gentagne gange i lignende forsøg. Skiftene i disse bånd er ikke direkte forårsaget af en ændring i hydrogenbindingerne, men kan skyldes ændringer i glutenets struktur, som påvirker C-H-bindingslængden. At resterende stivelse i glutenet er årsag til de spektrale ændringer er blevet udelukket ved sammenligning



Figur 4. Zoom-billede af CH-kombinationsbånd (udpeget i figur 2) fra anden afledte-spektre af gluten og stivelse ved høj og lav fugtighed.

med spektrene for stivelse ved forskellige vandindhold (figur 4).

Stivelse har ligesom gluten et CH-kombinationsbånd ved 2283 nm, men i modsætning til hvad der ses i glutenspektret, bliver dette bånd ikke bredere eller skifter placering ved hydreringen. På denne baggrund og ud fra den betragtning at stivelse, lipider og andre ikke-glutenproteiner kun udgør en meget lille del af glutenfraktionen, tilskrives de spektrale ændringer ved 2250–2290 nm ændringer i glutenproteinerne.

Specifik ændring i glutenproteinerne

I spektre for β -lactoglobulin ved forskellige fugtigheder ses små skift i proteintoppene ved hydreringen, men ingen ændrin-

ger i toppenes bredde. Fænomenet i glutenspektrene er altså ikke generelt for alle proteiner, og det kan i stedet afspejle specifikke ændringer, der finder sted under udvikling af glutennetværket. Dette er sandsynligvis ikke strukturelle ændringer, da det benyttede vandindhold formodentlig er for lavt til at medføre signifikante ændringer i den sekundære struktur. I en IR-analyse af hydrerede glutenproteiner er et skift i et af de fundamentale CH-bånd blevet tilskrevet aggregering af prolin helicer [2].

Perspektiver

Undersøgelsens resultater tyder på, at NIR kan detektere de ændringer, der finder sted i glutenproteiner ved øgning i vandindholdet. NIR kan derved blive et vigtigt redskab til at bestemme glutenets funktionalitet. De eksakte ændringer i glutenproteinerne, der er årsag til de observerede spektrale ændringer, kan i fremtidige eksperimenter fastslås ved brug af andre målemetoder såsom IR, der giver mere detaljeret information om strukturen.

E-mail-adresse:

Susanne W. Bruun: swb@biocentrum.dtu.dk

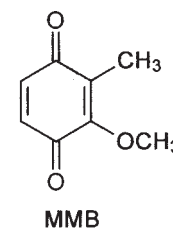
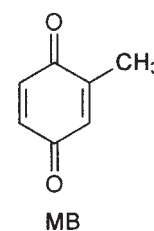
Referencer

1. Blanco M., and Villarroya, I. 2002. *TrAC-Trends. Anal. Chem.* 21, 240-250.
2. Wellner, N., Belton, P.S., and Tatham, A.S. 1996. *Biochem. J.* 319, 741-747.

Nyt om... aber – og myggebalsam

Kapucineraber knuser tropiske tusindben og smører sig ind i de knuste insekter. Tusindbenene indeholder større mængder af 1,4-benzoquinoner – for visse arter op til 350 mg pr. tusindben. Undersøgelser viser, at det for størstedelen drejer sig om 2-methyl-1,4-benzoquinon MB og 2-methoxy-3-methylbenzoquinon MMB.

Begge disse forbindelser virker frastødende på myg. Man har givet aber servietter, der var imprægneret med den ene eller en blanding af MB og MMB. Aberne tog straks servietterne og



begyndte at tørre sig over hele kroppen med dem. Man så endog aber, som lånte servietterne ud til artsfæller efter endt brug. Der er ud fra forsøgene ingen tvivl om, at aberne i naturen på denne måde forsøger at undgå at blive stukket af myg.

Desværre er der ingen hjælp at hente her for mennesker, idet begge stoffer er cancerogene. Om aberne har problemer med dette vides ikke.

Carl Th.

Benzoquinones from milipedes deter mosquitoes and elicit self-anointing in capuchin monkeys, *Naturwissenschaften* 90, 2003, side 301.