

α -Amylases molekylære interaktion med stivelse

Sekundære bindings-sites på byg α -amylases overflade er karakteriseret vha. »site-directed« mutagenese og kulhydrat affinitetsmålinger. Forsøgene bekræfter, at byg α -amylases overflade-sites er vigtige for substratkontakten. Resultaterne baner vej for udvikling af mere effektive amylaser til modificering eller forflydning af stivelse ved f.eks. bagning og produktion af glucosesirup

Af Morten Munch Nielsen¹, Sophie Bozonnet^{1,2}, Vibeke Barkholt¹ og Birte Svensson¹

¹Biochemistry and Nutrition Group, BioCentrum-DTU, DTU ²Ny adresse: Laboratoire Analyse et Environnement, Université d'Evry-Val d'Essone, Evry, Frankrig

Kulhydratombdannende enzymer indeholder ofte særlige kulhydratbindende moduler (domæner) eller har sekundære kulhydrat bindings-sites, der fremmer reaktionen med makromolekylære substrater, f.eks. stivelse eller cellulose. Stivelse findes i naturen som semi-krystallinske partikler (stivelseskorn) opbygget af tætpakkede polysaccharidmolekyler, der vanskeligt angribes af enzymer. Sekundære bindings-sites og kulhydratbindende moduler virker dels ved at hæfte enzymet til substratoverfladen, så den lokale koncentration og kontaktperioden forøges, dels ved at vriste de enkelte polysaccharidkæder fra hinanden, så de bliver tilgængelige for enzymangreb [1,2].

Vi har vha. kemisk mærkning og røntgenkrystallografi identificeret to sekundære bindings-sites i byg α -amylase. For at afdække deres rolle i stivelsesnedbrydning er aminosyrerester i disse sites udskiftet ved »site-directed« mutagenese. Derefter har vi målt enzymmutanternes evne til at binde stivelse og β -cyclodextrin, der betragtes som en model for stivelse.

Stivelses struktur

Stivelse findes i almindelige fødevarer som brød, kartofler, ris og pasta og er et vigtigt næringsstof for mange dyr og mikroorganismer. Det syntetiseres i planter fra glucose via sucrose og oplagres i frø og rodknolde som mikroskopiske stivelseskorn (figur 1A), der mobiliseres ved spiring. Stivelseskorn består af

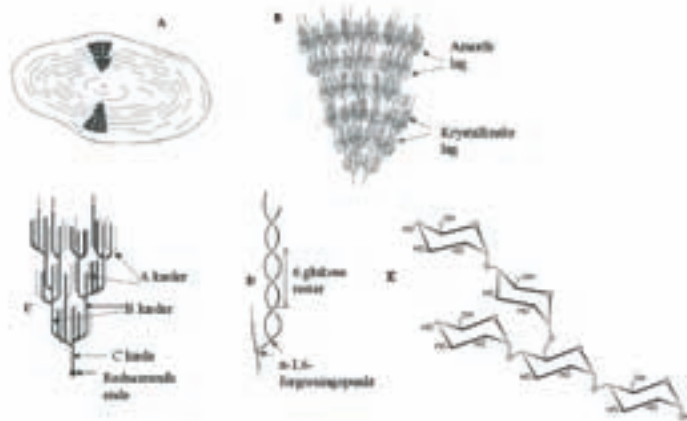
polysacchariderne amylose og amylopektin. Amylose, der udgør 20-25%, er en lineær polymer af α -1,4-bundne glucoserester med molmasse 1×10^5 - 1×10^6 og polymeriseringsgrad (DP) 600-6000 [3]. Amylopektin er med en molmasse på 1×10^7 - 1×10^9 og DP 6×10^4 - 6×10^6 [3] blandt de største molekyler i naturen. Det indeholder 95% α -1,4- og 5% α -1,6-bundne glucoserester, hvoraf de sidstnævnte udgør forgreningspunkter (figur 1C, D). I stivelseskorn alternerer krystallinske og amorfe lag (figur 1B). De krystallinske lag består af tætpakkede dobbeltspiraler (figur 1D) dannet af forholdsvis korte parallelle forgrenede kæder i amylopektin [3] (figur 1E). Ved syre- eller enzymkatalyseret hydrolyse nedbrydes de amorfe områder hurtigt, hvorefter man tydeligt kan se de krystallinske lag med elektronmikroskopi.

Amylaser i malt

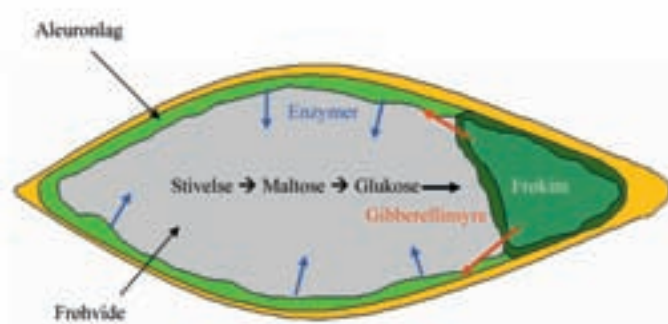
En række enzymer samarbejder i naturen om at nedbryde stivelse til glucose, der er den vigtigste energi- og kulstofkilde for de allerfleste organismer.

α -Amylaser (α -1,4-D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) er endohydrolaser, der katalyserer spaltning af interne α -1,4-O-glucosidbindinger i amylose og amylopektin samt i glykogen og lignende poly- og oligosaccharider.

α -Amylaser, der er vidt udbredt i planter, dyr og mikroorganismer, grupperes pga. aminosyresekvenslighed sammen med α -glucosidhydrolaser og transglucosidaser i glycosidhydrolase



Figur 1. A-B) Stivelse findes som mikroskopiske stivelseskorn opbygget af skiftevis krystallinske og amorfe lag. C-D) Amylopektin er blandt de største molekyler i naturen og indeholder forgreninger. De krystallinske lag består af dobbeltspiraler, dannet af parallelle, korte forgrenede kæder. E) Den kemiske struktur af et forgreningspunkt (α -1,6-O-glucosidbinding).



Figur 2. Spiringen igangsættes ved en forøgelse af temperatur og fugtighed, hvorved frøkimmen udskiller plantehormonet gibberellinsyre, som i aleuronlagets celler aktiverer produktionen af enzymer, heriblandt α -amylase 1 og 2, der i fællesskab med andre maltzymer nedbryder frøhvidens lagerstivelse til maltose og glucose. Frøhviden indeholder foruden stivelse, proteiner og lipider, der forsyner kimen med næringsstoffer, indtil den ny plante har etableret sit rodnet og de første kimblade.

familie 13 (GH-13), der omfatter flere end 2500 sekvenser (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) [4].

Byg (*Hordeum vulgare*) er Danmarks mest almindelige korn-afgrøde (26% af det samlede dyrkede areal i 2004)¹. Hovedparten bruges til foder, mens 20% er maltbyg til ølfremstilling. Når byg spires til malt ved at hæve temperatur og fugtighed, udskiller kimen plantehormonet gibberellinsyre.

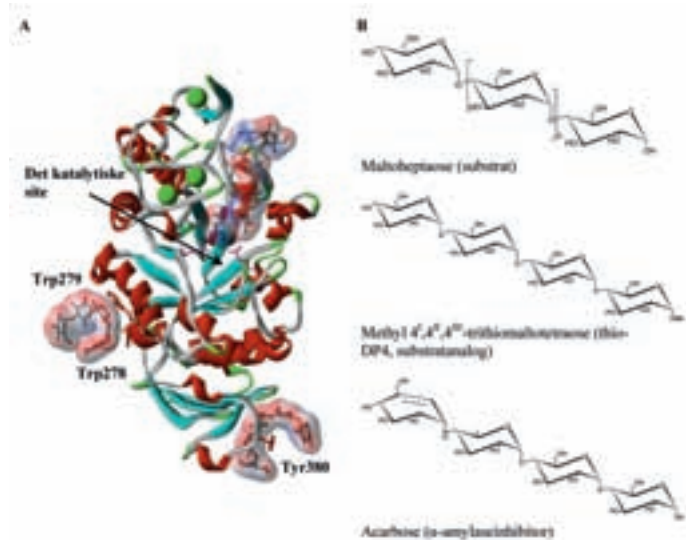
Gibberellinsyre aktiverer gener i aleuronlaget bl.a. for to α -amylaser (AMY1 og AMY2), der angriber frøhvidens lagerstivelse (figur 2). α -Amylaserne hydrolyserer sammen med tre andre maltzymer stivelse til glucose og maltose, der efterfølgende fermenteres til alkohol. AMY1 og AMY2 består begge af en polypeptidkæde med ca. 400 aminosyrer. Selvom omtrent 80% af aminosyresekvensen er ens, adskiller isoenzymernes egenskaber sig klart fra hinanden:

- AMY1 har højere affinitet for Ca^{2+} -ioner, bedre stabilitet ved svagt surt pH, lavere varmelabilitet og den højeste affinitet over for forskellige substrater. AMY1 er desuden mest effektiv ved hydrolyse af stivelseskorn.

- AMY2 har højest aktivitet over for opløselige substrater og kun AMY2 hæmmes af frøets egen byg α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI).

Struktur af AMY1 og AMY2

Begge byg α -amylasernes tredimensionale struktur er bestemt ved røntgenkrystallografi (figur 3A). De er opbygget som andre α -amylaser med tre domæner A, B og C [5;6], hvoraf A – en såkaldt $(\beta/\alpha)_8$ -tønde – indeholder det katalytiske site med tre syregrupper, asparaginsyreresterne Asp180 og Asp291 og glutaminsyreresten Glu205 (AMY1-nummerering) [5,6]. Domæne



Figur 3.

A) Krystalstruktur af komplekset mellem den katalytisk inaktive mutant af byg α -amylase I, Asp180→Ala AMY1, og maltoheptaose, der udfylder syv subsites i substratbindingskløften mod den ikke-reducerende ende startende fra det katalytiske site (med de tre katalytiske grupper Ala180, Asp291, Glu205 markeret med lyserødt) [7]. Ud over substratbindingskløften har AMY1 to sekundære overflade-bindings-sites: »det stivelseskornbindende overfladesite« karakteriseret ved Trp278 og Trp279 (markeret med rødt; til venstre) og »sukkertangen«, der indeholder Tyr380 (markeret med rødt; nederst).

B) Den kemiske struktur af: 1) maltoheptaose (substrat), 2) methyl 4',4'',4'''-trithiomaltotetraose (thio-DP4, substratanalog) og 3) acarbose (α -amylaseinhibitor).

A og B danner sammen en lang kløft med en række subsites, der hver binder en glucoserest fra substratmolekylet. Domæne B indeholder tre Ca^{2+} -ioner, hvoraf én er bevaret i alle α -amylasestrukturer. Ca^{2+} -ioner påvirker AMY1's og AMY2's stabilitet og enzymaktivitet forskelligt. Derfor undersøges det strukturelle



MIKROLAB AARHUS

Deres suveræne leverandør af analytisk tilbehør og udstyr.

HPLC
GC
Fast-fase-ekstraktion
Standarder
Dataloggere
Miljø
Dosering
Flow
Automatisering
Hjælpeudstyr - EGA



Se os på stand nr. C3-026

TLF. 86 29 61 11 - FAX 86 29 61 22

AXEL KIERS VEJ 34 - 8270 HØJBJERG

Besøg vor hjemmeside : www.mikrolab.dk



Specialister i

- Automatiseret Fastfaseoprensning Gilson ASPEC XL, ASPEC XLi, ASPEC XL4.
- Automatisering af væskehåndtering.
- HPLC, LC, SFC kromatografi.
- ERWEKA Dissolution systemer.
- Avancerede systemer til tabletkontrol.
- Salg og kalibrering af Gilson pipetter.



Biolab A/S · Sindalsvej 29 · DK-8240 Risskov
Telefon 8621 2866 · Telefax 8621 2301
E-mail: sales@biolab.dk

Enzym	Cl-pNPG ₇ ^a			Amylose ^b			β-Cyclodextrin
	<i>k</i> _{cat}	<i>K</i> _m	<i>k</i> _{cat} / <i>K</i> _m	<i>k</i> _{cat}	<i>K</i> _m	<i>k</i> _{cat} / <i>K</i> _m	<i>K</i> _D
	(s ⁻¹)	(mM)	(s ⁻¹ × mM ⁻¹)	(s ⁻¹)	(mg × ml ⁻¹)	(s ⁻¹ × ml × mg ⁻¹)	(mM)
AMY1	52	0,76	69	189	0,19	485	0,20
AMY2	86	2,1	40	721	1,1	655	0,63
Ser378→Pro AMY1	59	0,86	69	163	0,20	815	0,25
Tyr380→Ala AMY1	19	0,67	28	95	0,36	264	1,40

Michaelis-Menten-bestemmelserne er foretaget ved henholdsvis a) pH 6,8 og 30°C, og b) pH 5,5 og 37°C [15].

grundlag for hver enkelt Ca²⁺-ions rolle i et andet projekt. Indtil for nylig var domæne C's funktion ukendt for byg α-amylaser og alle andre »familie 13 enzymer«. Imidlertid viser nogle af vores seneste resultater, at domæne C er vigtigt for enzymets evne til at binde sig til stivelse.

Sekundære bindings-sites i AMY1 og AMY2

På AMY1's overflade er der uden for kløften med det katalytiske site identificeret to kulhydrat-bindings-sites. Begge sites kan ses i krystalstrukturer af AMY1 i kompleks med den ikke-hæmmende substratanalog methyl 4^I,4^{II},4^{III}-trithiomaltotetraose (thio-DP4) og en katalytisk inaktiv mutant Asp180→Ala AMY1 i kompleks med substratet maltoheptaose (figur 3A) eller pseudotetrasaccharidet acarbose, der er en hæmmer og malto-tetraoseanalog (figur 3B) [5;7]. I overflade-sites kan aromatiske aminosyrer (tyrosin og tryptofan) »stække« til kulhydrat ved vekselvirkning mellem de aromatiske sidekæders π-orbital og hydrofobe områder af glucoseringen. Disse og andre aminosyre-sidekæder kan desuden hydrogenbinde til hydroxylgrupper i kulhydratet.

Det stivelseskornbindende overflade-site

Det første overflade-site blev identificeret i en α-amylase i midten af firserne ved at oxidere tryptofansidekæders indolring i AMY2 med N-bromsuccinimid. Derefter fulgte en aminosyresekvensbestemmelse af, hvilke tryptofaner β-cyclodextrin beskyttede mod oxidationen [8]. Da β-cyclodextrin konkurrerer med stivelseskorn om binding til AMY2, blev sitet døbt »det stivelseskornbindende overflade-site« (»starch granule binding surface site«). Det viste sig senere at binde acarbose i AMY2's krystalstruktur [6]. I AMY1 »stækker« de samme Trp278 og Trp279 med to glucoseringe i forskellige bundne oligosaccharider (figur 3A).

Sukkertangen

Det andet overflade-site blev for nylig opdaget i domæne C i AMY1's krystalstruktur [5]. Den centrale tyrosinrest, Tyr380, indgår med 8 af de 17 intermolekylære hydrogenbindings- og van der Waals kontakter til thio-DP4 (substratanalog). Tyr380 sidder i et bevægeligt loop, og sidekæden svinger adskillige ångstrøm, når den »griber om sukkeret«. Sitet kaldes derfor en sukkertang (»a pair of sugar tongs«). Det er det først beskrevne af sin art og den første indikation af en funktion [5] for domæne C i glycosidhydrolase 13 familien. Til trods for, at AMY2 har den tilsvarende Tyr378 (AMY2-nummerering), er binding til sukkertangen kun set for AMY1 [5]. Den mest iøjnefaldende forskel i denne del af strukturen er AMY2's prolinrest (Pro276), der svarer til en serinrest (Ser378) i AMY1. Aminosyren prolin

nedsætter generelt peptidkædens fleksibilitet og er måske grunden til, at Tyr378-loopet i AMY2 ikke reagerer som sukkertangen i AMY1.

»Site-directed« mutagenese af sekundære bindings-sites i AMY1

Det er ukendt, hvordan overflade-sites'ene medvirker ved byg α-amylasers hydrolyse af stivelse. For at undersøge dette er de aromatiske aminosyrer Trp278, Trp279 og Tyr380 i AMY1 udskiftet med den lille alifatiske aminosyre alanin. Desuden er mutanten Ser378→Pro AMY1 fremstillet for at efterligne AMY2's struktur. AMY1-mutanterne fremstilles i gæren *Pichia pastoris* [9] ved transformation med mutantgener, hvis DNA-sekvens er ændret ved »site-directed« mutagenese. Når methanol tilsættes som kulstofkilde, udskiller den enkelte *Pichia*-transformant det tilsvarende mutantgenprodukt, dvs. mutantenzym, som oprenses fra kulturvæsken ved ultrafiltrering og ionbytterkromatografi, da flere af sukkertang-strukturændringerne var ufornelige med affinitetsoprensning på β-cyclodextrin-konjugeret Sepharose.

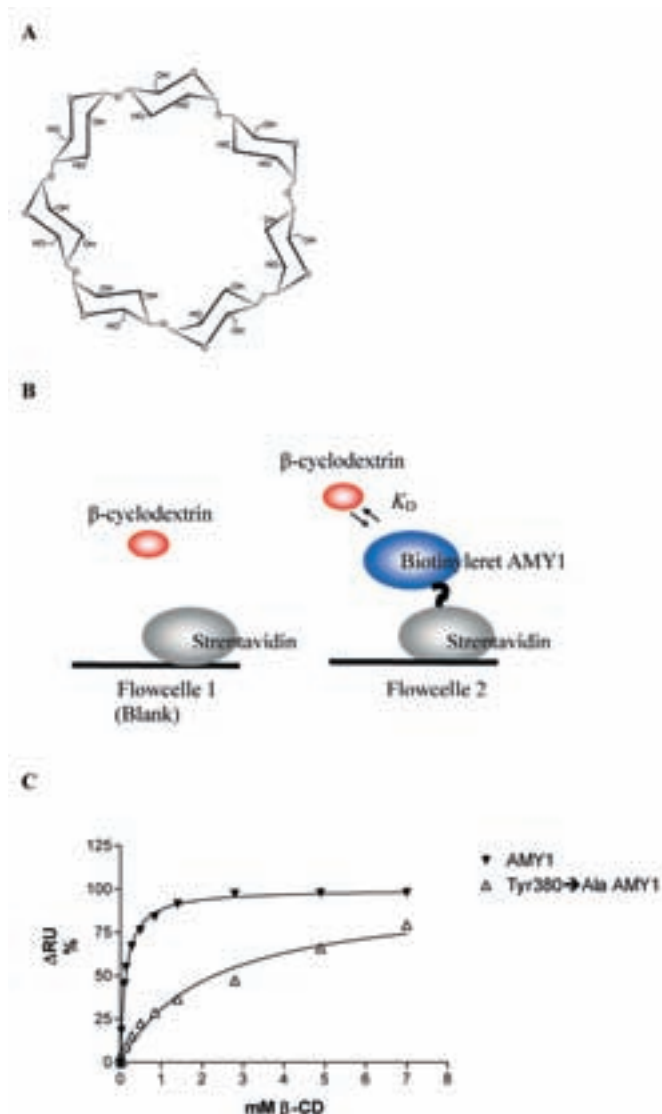
Enzymmutanternes affinitet for β-cyclodextrin (figur 4A) måles ved »surface plasmon resonance«-analyse (BIAcore) (tabel 1). Først biotinyleres proteinet, og dernæst bindes det på en streptavidin-coated chip, der eksponeres for β-cyclodextrinopløsninger af forskellig koncentration (figur 4B). Fra de målte response units (figur 4C), som angiver massetilvæksten til chippen, bestemmes dissociationskonstanten (*K*_D).

*K*_D var 1,4 mM for Tyr380→Ala AMY1, hvilket svarer til syv gange svækket affinitet ift. AMY1 (tabel 1). Tyr380 er derfor nødvendig for normal binding, hvilket er i god overensstemmelse med sidekædens og kulhydratmolekylets tætte indbyrdes kontakt [5].

Desuden bestemmes affiniteten for stivelseskorn ved måling af fordelingen af enzym i opløsning og bundet til stivelseskorn. Tyr380→Ala mutanten bandt 16 gange svagere, men Ser378→Pro mutanten havde samme affinitet som AMY1 for stivelseskorn. Det er derfor ikke kun Pro376, der er årsagen til AMY2's svagere binding af stivelse og β-cyclodextrin.

Tryptofan Trp279 i domæne A's overflade-site var med i den første serie af AMY1-mutanter, der også omfattede de katalytiske grupper [10]. Desværre gav den tidligere benyttede værtsorganisme *Saccharomyces cerevisiae* 50-10⁴ mindre udbytte af rekombinant enzym end *P. pastoris*, og der blev kun opnået en meget lille mængde Trp279→Ala AMY1, som dog viste sig at have svækket binding til stivelseskorn og β-cyclodextrin [10].

Enzymatisk hydrolyse af amylose og af oligosaccharidet 2-chlor-4-nitrophenyl β-D-maltoheptaosid (Cl-pNPG₇) påvirkedes af Tyr380→Ala mutationen (tabel 1). Tyr380 har således en vis indflydelse på den katalytiske aktivitet,



Figur 4. Bindingsanalyse for β -cyclodextrin og AMY1 ved surface plasmon resonance (SPR). Sukkertang-mutanternes affinitet for β -cyclodextrin (A) er bestemt ved immobilisering af de biotinylerede enzymer på streptavidin chips (B). K_D beregnes fra plots af response units mod β -cyclodextrinkoncentrationen (C) (se tabel 1).

hvilket peger på et samspil mellem overflade-sitet og det aktive site. Dette vil blive undersøgt nærmere, da Tyr380→Ala og Ser378→Pro AMY1 for nylig er blevet krystalliseret [11]. I lyset af den nyeste viden om forekomst og betydning af overflade-bindings-sites i α -amylaser har vi fremstillet Trp278→Ala, Trp279→Ala og dobbeltmutanten Trp278→Ala/Trp279→Ala samt kombinationer med mutationer i såvel sukkertangen som i det aktive site. Affiniteten af disse AMY1-mutanter karakteriseres for tiden, og flere krystalstrukturer er ved at blive opklaret.

Introduktion af ekstra kulhydrat bindings-sites

De beskrevne mutanter belyser gennem tab af kulhydratbinding de to sekundære sites' egenskaber. Omvendt er det vist, at vi kan fremstille α -amylaser med forbedret bindingsevne ved at tilføre ekstra kulhydratbindende sites [12]. Flere glycosidhydrolaser er fra naturens side udstyret med særlige kulhydratbindende moduler [13], der især er effektive ved omdannelse af uopløselige substrater f.eks. stivelseskorn og cellulosefibre.

Vha. gensplejsning er AMY1's C-terminal koblet til N-terminalen af det kulhydratbindende modul SBD (»starch binding



Mød Foss på Scanlab/BioTech Forum

Og se hvordan du kan spare tid på dit analysearbejde med instrumenter fra FOSS.

Vi præsenterer en række nyudviklede og veletablerede analyseinstrumenter til reference-, NIR- og NIT-analyser.

Oplev blandt andet analyseinstrumenterne, som i stor stil anvendes i laboratorier indenfor fødevarer- og landbrugsindustrien samt den kemiske og farmaceutiske industri. F.eks. den nyeste destruktionsblok til Kjeldahl analyse samt 3 minutters antibiotikatesten fra Charm.

Vi glæder os til at møde dig på stand C3-017

Dedicated Analytical Solutions

Tel.: 70 20 33 80 www.foss.dk



domain«) fra *Aspergillus niger* glucoamylase, der har to kulhydrat bindings-sites [14]. Fusionsproteinet AMY1-SBD hydrolyserede stivelseskorn fra byg eller kartofler med op til 15 gange AMY1's egen hastighed. AMY1-SBD bandt også seks gange stærkere til stivelseskorn end AMY1, hvilket stemmer fint med den forøgede enzymatiske nedbrydning af stivelse, mens der ikke var nogen forskel på AMY1-SBD og AMY1's hydrolytiske aktivitet for oligosaccharidsubstrater.

Konklusion

Den indledende karakterisering af AMY1's sukkertang forbedrer forståelsen af, hvordan sekundære bindings-sites vekselvirker med substrat og muligvis samarbejder med det aktive site. Sukkertang - dvs. Tyr380-mutanternes tab af bindings- og hydrolyseevne over for stivelseskorn (ikke-publicerede resultater, S. Bozonnet m.fl.) er bekræftet af de tilsvarende krystalstrukturer i kompleks med forskellige kulhydrater.

Perspektivet er at kunne indføre lignende overflade-sites i andre stivelsesnedbrydende enzymer, eventuelt i kombination med fusion til stivelsesbindende moduler, og dermed forøge den enzymatiske aktivitet.

Det vil i den nærmeste fremtid blive undersøgt, om de to overflade-sites deltager i en særlig reaktionsform kaldet »multiple attack«, hvor AMY1 eller AMY2 i kompleks med polysaccharidsubstrat hydrolyserer flere end en enkelt glucosidbinding før enzym-substratkomplekset dissocierer. Det antages, at substratmolekylet, efter at det første produkt er frigjort, skubbes i stilling i det katalytiske site til det næste angreb, muligvis ved medvirken af sekundære bindings-sites.

Det forventes, at »protein engineering« også kan optimere enzymer rettet mod andre kulhydrater end stivelse ved at indføre særlige kulhydratbindende overflade-sites eller moduler, der fremmer funktionen over for polymere substrater.

Tak til EU-projektet CEGLYC og Forskningsrådet for Natur og Univers for økonomisk støtte samt til DTU for et ph.d.-stipendium (MMN).

E-mail adresser:

Morten Munch Nielsen: mmn@biocentrum.dtu.dk

Birte Svensson: bis@biocentrum.dtu.dk

Fodnote

¹⁾ Tal om Landbruget 2004 - Landbruksrådet

Referencer

- Morris,V.J., Gunning,A.P., Faulds,C.B., Williamson,G., & Svensson,B. (2005) AFM images of complexes between amylose and *Aspergillus niger* glucoamylase mutants, native, and mutant starch binding domains: A model for the action of glucoamylase. *Starch-Stärke* **57**, 1-7.
- Southall,S.M., Simpson,P.J., Gilbert,H.J., Williamson,G., & Williamson,M.P. (1999) The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *FEBS Letters* **447**, 58-60.
- Tester,R.F., Karkalas,J., & Qi,X. (2004) Starch - composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science* **39**, 151-165.
- Coutinho,P.M. & Henrissat,B. (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering (Gilbert,H.J., Davies,G., Henrissat,B., & Svensson,B., eds), pp. 3-12. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Robert,X., Haser,R., Gottschalk,T.E., Ratajczak,F., Driguez,H., Svensson,B., & Aghajari,N. (2003) The structure of barley alpha-amylase isozyme 1 reveals a novel role of domain C in substrate recognition and binding: A pair of sugar tongs. *Structure* **11**, 973-984.
- Kadziola,A., Søgaard,M., Svensson,B., & Haser,R. (1998) Molecular structure of a barley alpha-amylase-inhibitor complex: Implications for starch binding and catalysis. *Journal of Molecular Biology* **278**, 205-217.
- Robert,X., Haser,R., Mori,H., Svensson,B., & Aghajari,N. (2005) Oligosaccharide binding to barley alpha-amylase 1. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 32968-32978.
- Gibson,R.M. & Svensson,B. (1987) Identification of tryptophanyl residues involved in binding of carbohydrate ligands to barley alpha-amylase 2. *Carlsberg Research Communications* **52**, 373-379.
- Juge,N., Andersen,J.S., Tull,D., Roepstorff,P., & Svensson,B. (1996) Overexpression, purification, and characterization of recombinant barley alpha-amylases 1 and 2 secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* **8**, 204-214.
- Søgaard,M., Kadziola,A., Haser,R., & Svensson,B. (1993) Site-directed mutagenesis of histidine-93, aspartic acid-180, glutamic acid-205, histidine-290, and aspartic acid-291 at the active-site and tryptophan-279 at the raw starch binding-site in barley alpha-amylase 1. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 22480-22484.
- Tranier,S., Deville,K., Robert,X., Bozonnet,S., Haser,R., Svensson,B., & Aghajari,N. (2005) Insights into the »pair of sugar tongs« surface binding-site in barley alpha-amylase isozymes and crystallization of appropriate sugar tongs mutants. *Biologia* **60**, 37-46.
- Juge,N., Nøhr,J., Le Gal-Coëffet,M.F., Kramhøft,B., Furniss,C.S.M., Planchot,V., Archer,D.B., Williamson,G., & Svensson,B. (2006) The activity of barley alpha-amylase on starch granules is enhanced by fusion of a starch binding domain from *Aspergillus niger* glucoamylase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1764**, 275-284.
- Boraston,A.B., Bolam,D.N., Gilbert,H.J., & Davies,G.J. (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal* **382**, 769-781.
- Sorimachi,K., LeGalCoëffet,M.F., Williamson,G., Archer,D.B., & Williamson,M.P. (1997) Solution structure of the granular starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to beta-cyclodextrin. *Structure* **5**, 647-661.
- Mori,H., Sass Bak-Jensen,K., Gottschalk,T.E., Motawia,S.M., Damager,I., Lindberg Møller,B., & Svensson,B. (2001) Modulation of activity and substrate binding modes by mutation of single and double subsites +1/+2 and -5/-6 of barley alpha-amylase 1. *European Journal of Biochemistry* **268**, 6545-6558.

Nyt om...

... sommerfuglekemi

Sommerfuglen bjørnespinder er øjensynligt uønsket i et edderkoppespind. Hvis den bliver fanget i et edderkoppespind, ser man edderkoppen føle på sommerfuglen med benene, så giver den sig til at skære spindet i stykker omkring sommerfuglen, som så falder ud af spindet, befriet.

Sommerfuglen falder åbenbart ikke i edderkoppens smag, men hvorfor? Det er en indviklet historie. Sommerfuglen lægger fortrinsvis sine æg på en græslignende plante *Crotalaria mucronata*. Planten beskytter sig mod at blive foder for dyr ved at indeholde et giftigt alkaloid, monocrotalin 1, der smager bittert. Sommerfuglens larver elsker monocrotalin og kan smage det i en koncentration på 10^{-11} mol/L. De finder frem til plantens frø, der er særlig rige på monocrotalin og æder dem

med stor fornøjelse uden at tage skade af det. En larve kan indeholde op til 0,4% monocrotalin.

De har nemlig en oxygenase, der kan oxidere monocrotalin til det ugiftige N-oxid 2. Efter forpupningen indeholder den færdige sommerfugl stadig så meget monocrotalin, at den er sikret resten af livet mod at blive ædt. Derfor edderkoppens manglende lyst til at fange den i sit spind.

Carl Th.

Die Chemie eines kleinen Spinners, *Chemie in Unserer Zeit*, 39, 2005: 72.

