

2750 - A

Patroonherkenningstechnieken en de inzichtelijkheid van de biotechnologie

J. van der Greef, S.G.A.F. Angelino en A.C. Tas

TNO-Voeding

De huidige vraagstelling binnen de analytische chemie richt zich niet alleen op uiterst selectieve meting op ultrasporenniveau, maar in steeds belangrijker mate op het karakteriseren en monitoren van complexe (bio)chemische systemen. Deze laatste problematiek vergt juist een brede, weinig selectieve analytische aanpak omdat er a priori geen kennis bestaat van de componenten die betrokken zijn bij de eigenschappen van dergelijke systemen. Voorbeelden van complexe systemen zijn micro-organismen, cellen, voedsel, plantenmaterialen, fossiele bestanddelen, lichaamsvloeistoffen en weefsels. In zijn algemeenheid zijn de bouwstenen van deze mengsels sterk verschillend met betrekking tot hun fysico-chemische eigenschappen. Hierdoor is een aanpak gebaseerd op scheiding van de individuele componenten slechts mogelijk indien er voldoende voorkennis omtrent de probleemstelling aanwezig is.

Karakteriseren van dergelijke systemen door thermische degradatie, aangeduid als pyrolyse, is een alternatief waarbij een grote variatie aan verbindingen tegelijkertijd kan worden gemeten zonder uitgebreide monstervoorbewerking. De pyrolytisch gevormde brokstukken worden bij voorkeur geanalyseerd met een massaspectrometer, waarbij na zachte ionisatie van het pyrolysaat een molecuulgewichtsverdeling wordt gegenereerd. De detectie is zeer gevoelig, terwijl aangetoond is dat door modificatie van de pyrolyse-omstandigheden hoogmoleculaire fragmenten kunnen worden gemeten (Tas et al., 1989). In de studie van Tas et al. is tevens aangegeven dat de te onderzoeken matrix eenvoudigweg kan worden aangebracht op een platina draadje, dat na positionering in de massaspectrometer snel wordt verwarmd, waarna de gevormde produkten direct kunnen worden geïoniseerd en gedetecteerd. Als voorbeeld kan worden genoemd de detectie van degradatieprodukten van membraanfosfolipiden uit *Salmonella*-bacteriën (Tas et al., 1987), die kunnen worden gebruikt voor de differentiatie van bacteriestammen of voor de analyse van genetisch gemanipuleerde micro-organismen. De gebruikte methode is snel, krachtig en simpel uitvoerbaar.

De beschreven pyrolyse – massaspectrometrietechniek levert een karakteristieke ‘vingerafdruk’ van de geanalyseerde matrix, maar deze vingerafdruk is complex en bevat zeer veel informatie (van der Greef et al., 1986): zo’n duizend kenmerken worden vastgelegd in één enkele meting. Voor het volgen van een proces worden diverse metingen uitgevoerd, en aldus ontstaat er een gegevensbestand dat visueel niet meer te doorgronden is: de kans bestaat dat dan 99 % of meer van de informatie verloren zou gaan! Teneinde inzicht te krijgen in deze complexe systemen is het dus

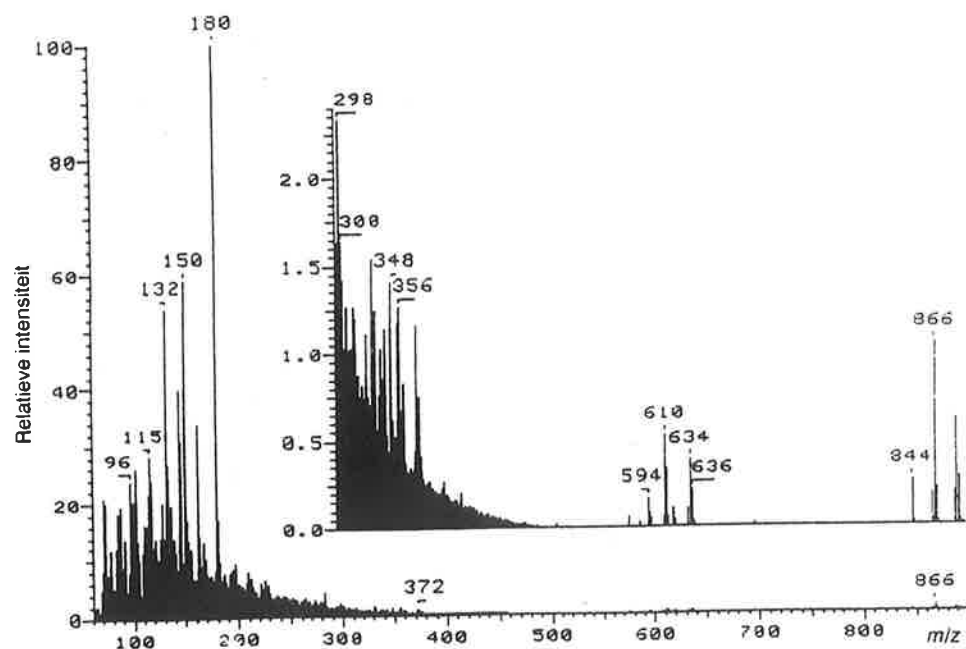
zaak de inzichtelijkheid van de karakteristieke patronen te verbeteren. Hiertoe zijn patroonherkenningstechnieken de aangewezen weg, omdat hiermee een eenvoudige weergave van grote gegevensbestanden mogelijk is met slechts geringe informatie-verliezen. Vele patroonherkenningmethoden berusten op 'display'-technieken waarbij de informatie wordt samengevat in tweedimensionale figuren, zodat het unieke menselijke vermogen om visueel verbanden en onregelmatigheden te detecteren optimaal kan worden benut (Windig et al., 1983). Systematische trends, het bestaan van clusters, het detecteren van uitschieters ('outliers') of het vóór-komen van relevante componenten voor waargenomen effecten zijn in deze aanpak direct zichtbaar.

Bij bestudering van bijvoorbeeld biotechnologische processen kan men via de hierboven beschreven analytische aanpak aanwijzingen verkrijgen over de relevante componenten die tijdens een proces of bij optredende verschillen in eigenschappen een rol spelen. De eenduidige bevestiging van de identiteit van een component is echter niet voldoende; er is nog een extra stap vereist. In het pyrolysaat bevinden zich immers vele componenten en bij het vaststellen dat een bepaalde piek relevant is voor de vraagstelling, is alleen informatie over het molecuulgewicht aanwezig, en bij toepassen van metingen met een hoge resolutie ook nog de elementsamenstelling. Extra structuurinformatie, aangereikt door structuurfragmenten, gaat verloren in het complexe pyrogram. Het toepassen van 'tandem'-massaspectrometrie, twee aan elkaar gekoppelde massaspectrometers, levert deze mogelijkheid wél. Het principe berust op het selecteren van de interessante component in de eerste massaspectrometer, waarna via interactie met botsingsgas de component uiteenvalt in brokstukken die de structuur onthullen. Vervolgens worden deze brokstukken met de tweede massaspectrometer geanalyseerd. Zo wordt een interferentie-vrij massaspectrum verkregen, waaruit de structuur kan worden afgeleid (Tas et al., 1987).

De analytische strategie bestaat uit een drietal duidelijk te onderscheiden fasen. In fase 1 wordt de vingerafdruk van de matrix met pyrolyse – massaspectrometrie vastgelegd, in fase 2 wordt de gegevensverwerking met patroonherkenning gerealiseerd, terwijl in fase 3 de gedetailleerde structuuropheldering van de belangrijkste componenten plaatsvindt (de Waart et al., in druk).

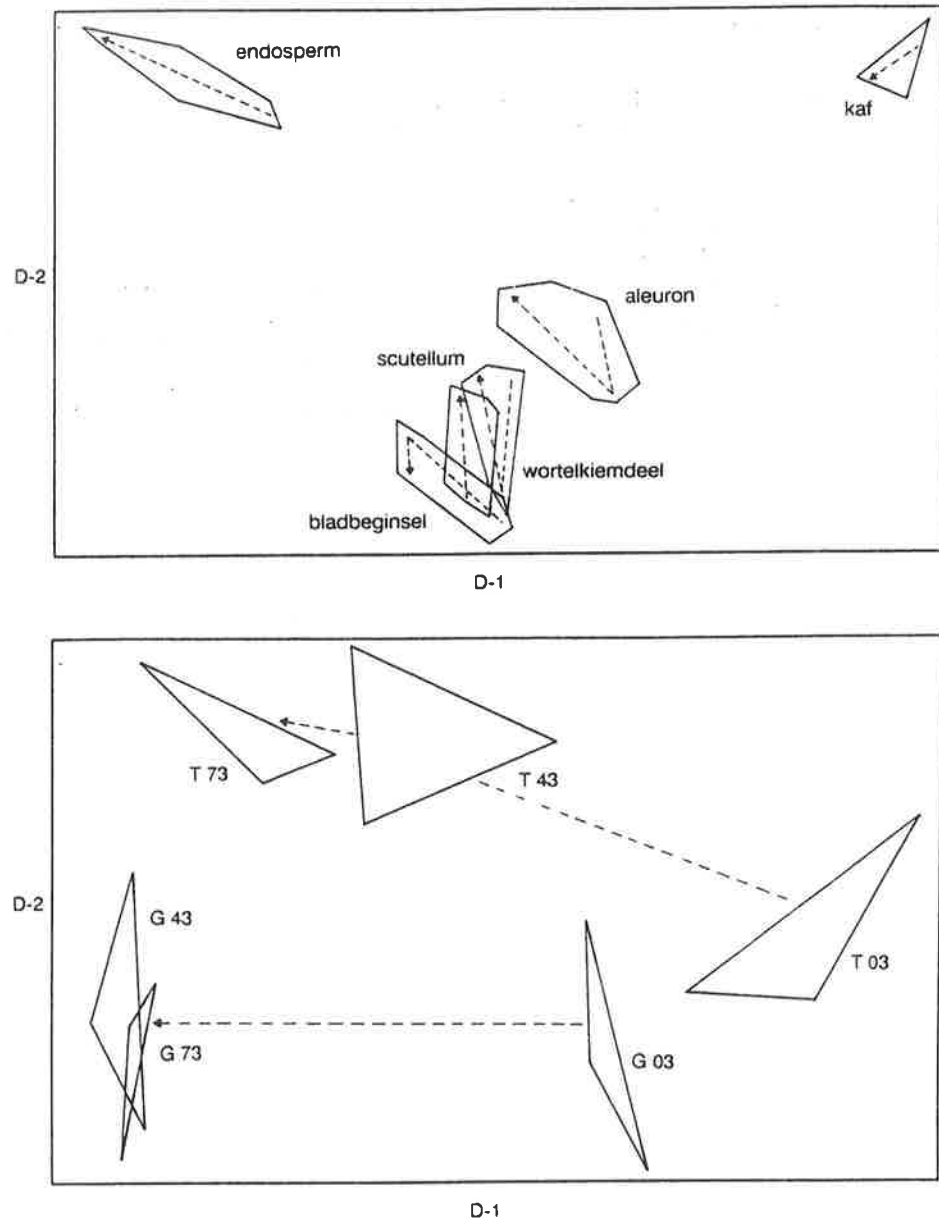
In een recente studie werden de nieuwe analytische mogelijkheden benut om de kenmerken van brouwerst tijdens het vermouten van twee gerstrassen te bestuderen, waarbij de aandacht in het bijzonder was gericht op de diverse korrelonderdelen. Bij de twee gerstrassen Golf en Triumph werden kaf, aleuron, endosperm, scutellum, wortelkiemdeel en bladbeginsel gemeten vóór het vermoutingsproces, na vier dagen vermouten en na het eesten op dag 7.

Een typische vingerafdruk van het korrelonderdeel scutellum wordt weergegeven in figuur 1. Dit pyrogram geeft de intensiteiten weer van verbindingen met een verschillend molecuulgewicht (X-as). De clusterpieken rond de massa's 840 – 900 zijn opgebouwd uit triglyceriden, de cluster by 570 – 640 bestaat uit diglyceriden en de pieken bij massa (m/z) 180 en 150 tonen de aanwezigheid aan van hexose- en pentose-eenheden. Deze vingerafdruk bevat daarnaast nog honderden andere componenten, hetgeen de complexiteit van de korrelonderdelen onderstreept.



Figuur 1. Vingerafdruk (pyrogram) van het gerstkorrelonderdeel scutellum van het ras Triumph. De x-as geeft in dit experiment de molecuulgewichten van de gevormde componenten weer, de y-as de intensiteiten (concentraties).

Het vermoetingsexperiment levert rond de honderd pyrogrammen op, zodat de toepassing van patroonherkenning – in dit geval de combinatie van principale-componentenanalyse en discriminantanalyse – de enige zinvolle weg voor de gegevensverwerking is. Het resultaat van een dergelijke analyse wordt weergegeven in figuur 2a. Elk spectrum resulteert in een punt in de figuur en de verschillende metingen voor een bepaald korrelonderdeel zijn omlijnd terwijl met een pijl de trend tijdens het vermoetingsproces is aangegeven. Punten (pyrogrammen) die dicht bijeen liggen lijken sterk op elkaar, terwijl ver uit elkaar gepositioneerde punten duidelijke verschillen vertonen. Het meest duidelijk is dat de verschillen tussen de korrelonderdelen het beeld domineren. Voor het verkrijgen van gedetailleerde informatie over de biochemische veranderingen tijdens het proces moet ingezoomd worden op elk van de individuele korrelonderdelen, hetgeen voor endosperm in figuur 2B is weergegeven. In deze weergave zijn duidelijk de verschillen in begin- en eindstadium tussen de twee gerstrassen te traceren alsmede de verschillen wat betreft het doorlopen van het vermoetingsproces, terwijl de richting van de trend wél gelijk is. Met name zijn kenmerkende verschillen gevonden in peptidegehalten van beide gerstrassen. Daarnaast werden aanwijzingen verkregen voor verschillen in vertakkingsgraad van het zetmeel.



Figuur 2. Het patroonherkenningsresultaat van de analyse van de vermoeting (aangegeven met een pijl) voor de verschillende korrelonderdelen (omlijnd) (figuur 2A, boven) en voor endosperm alleen (figuur 2B, onder) waarin T en G respectievelijk de gerstrassen Triumph en Golf aanduiden, vóór de vermoeting (T 03, G 03), na vier dagen vermouten (T 43, G 43) en na het eesten op dag 7 (T 73, G 73).

Literatuur

- Greef, J. van der, Tas, A.C., Bouwman, J. & ten Noever de Brauw, M.C., 1986. Pattern recognition of complex matrix profiles generated by soft ionization pyrolysis. *Advances in Mass Spectrometry* 10: 1227 – 1228.
- Tas, A.C., de Waart, J., Bouwman, J., ten Noever de Brauw, M.C. & van der Greef, J., 1987. Rapid characterization of *Salmonella* strains with direct chemical ionization pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 11: 329 – 340.
- Tas, A.C., Kerkenaar, A., La Vos, G.F. & van der Greef, J., 1989. Pyrolysis – direct chemical ionization mass spectrometry of some biopolymers in the positive and negative ionization mode. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 15: 55 – 70.
- Waart, J. de, Tas, A.C., La Vos, G.F. & van der Greef, J., Characterization of algae by pyrolysis – direct chemical ionization (tandem) mass spectrometry. *Journal of Applied Pyrolysis* (in druk).
- Windig, W., Haverkamp, J. & Kistemaker, P.G., 1983. Interpretation of sets of pyrolysis mass spectra by discriminant analysis and graphical rotation. *Analytical Chemistry* 55: 81 – 88.

Dokkum, W. van, D.G. van der Heij (Red.).
Voedsel in beweging.
Symposium 50 jaar voedingsonderzoek TNO,
Utrecht, 3-5 oktober 1990.
Wageningen, Pudoc, 1990.

