

ANTIVRIES



Chemie beschermt tegen vorst

De natuur heeft talloze manieren ontwikkeld waarop dieren vorst kunnen overleven. Poolvissen hebben speciale eiwitten in hun bloed die ervoor zorgen dat het blijft stromen als het zeewater 2 °C onder nul is. Sommige poolinsecten bestaan voor bijna een kwart uit glycerol, een bekend antivriesmiddel. Canadese kikkers zijn 's winters maandenlang bevroren, maar ontwaken in het voorjaar springlevend dankzij bepaalde beschermende suikers. En ook mensen bestrijden ijs op veel verschillende manieren. Strooizout zorgt ervoor dat Nederland in de winter niet stilstaat, en glycol houdt de radiator aan de praat. Spermabanken en stamcelbanken zouden niet

bestaan zonder vorstbeschermende stoffen. En om kinderen te vervullen zijn wetenschappers steeds op zoek naar nieuwe methoden om eicellen en embryo's veilig in te vriezen.

In deze Chemische Feitelijkheid

- De Context: Antivries van de A van Autoweg tot de Z van Zwangerschap.
- De Basis: Antivriesmiddelen verlagen het vriespunt of ze geven ijskristallen geen kans om te groeien. Hoe doen ze dat?
- De Diepte: Hoe vries je levend materiaal in zonder schade? Wat is vitrificatie?

Zonder zout zou Nederland in de wintermaanden stilstaan. En zonder **glycerol** zouden er geen beenmergtransplantaties of spermabanken zijn.

Antivriesmiddelen en vorstbeschermers

Sneeuw en ijs leveren romantische beelden op: witte kerst, Elfstedentocht, besneeuwde bossen. Maar de vorst heeft ook zijn minder mooie kanten. Sneeuw en ijs zorgen ook voor gladde wegen, vastgevroren wissels en onbegaanbare rivieren. Een fikse vorstperiode kan Nederland Transportland volledig lam leggen. Ook de landbouw kan forse schade ondervinden. Door nachtvorst in het late voorjaar befrist bijvoorbeeld de appelbloesem, waardoor de oogst afneemt. En dan zijn er nog de winterse ongemakken rond het huis: ijs op de autoruiten, gladheid op de stoep en waterleidingen die bevroren.

Mensen beschermen zichzelf tegen de kou met een warme muts, een sjaal, dikke sokken en handschoenen. De ijsbeer doet hetzelfde met zijn dikke vacht, en de zeehond met zijn speklaag. Maar er zijn ook dieren in het poolgebied die prima kunnen overleven zonder die extra isolerende laag. Een voorbeeld is de Arctische ijsvis. Die overleeft in het ijskoude water onder het Noordpoolijs dankzij speciale antivrieseiwitten. Die zorgen ervoor dat hij niet befrist en dat zijn bloed goed blijft stromen. Een knap staaltje natuurlijke aanpassing tegen lage temperaturen. De Noord-Amerikaanse boskikker ontwikkelde weer een andere tactiek om vorst te doorstaan. Hij overleeft de



Koud, maar niet bevroren.

koude winters dankzij antivriessuikers. Ook planten nemen maatregelen tegen de vorst. Bomen verliezen bijvoorbeeld hun bladeren. Knoppen en zaden bevatten suikers zoals sacharose die vorstschade beperken.

STROOIZOUT

Ook mensen gebruiken antivries om ijs te bestrijden. Het bekendste is zonder twijfel strooizout. Begin en eind 2010 stond Nederland bijna stil. Het zout was zover op dat Rijkswaterstaat alleen nog de hoofdwegen begaanbaar kon houden. Gemiddeld is 70.000 ton strooizout voldoende voor één Nederlandse winter, maar in de winter van 2009/2010 is er 191.000 ton zout gestrooid. Ook in 2010/2011 dreigde er weer een tekort. Sommige gemeenten kwamen zonder

strooizout te zitten en gebruikten zand of een mengsel van zand en zout om de wegen begaanbaar te houden.

Strooizout is hetzelfde zout als het keukenzout dat we op ons eitje doen, maar minder zuiver en de korrel is groter en onregelmatiger. Het is een dooimiddel. Op de weg mengt het zout met ijs, sneeuw of smeltwater, vooral doordat het verkeer er overheen rijdt. Het zoute water dat zo ontstaat, ook wel pekkel genoemd, heeft een smeltpunt dat ongeveer 10 °C lager ligt dan dat van sneeuw of ijs. De weg befrist daardoor niet bij een paar graden onder nul. Bij een temperatuur van -5 °C is een kilo strooizout nodig om 11,5 kilo ijs te laten smelten. De meeste strooiwagens strooien overigens geen zout, maar zout en pekkel zodat het direct effect heeft op de weg.

Strooizout is niet goed voor het milieu. Er zitten nog zware metalen in, zoals chroom, koper, lood en nikkel. Deze metalen belanden uiteindelijk via goten en putten in het riool of sloten en rivieren.

Zout heeft ook direct gevolgen voor bomen en bermen langs de weg. Het zout tast de schors van bomen aan, waardoor ze gevoeliger worden voor schimmels. Knoppen kunnen afsterven doordat zout er vocht aan onttrekt. Strooizout in grondwater hindert de groei van bomen en planten en de ontwikkeling van blad. Grassen in de bermen sterven af wanneer er veel zout is gestrooid. De kale plekken worden echter vaak snel ingenomen door zoutminnende planten, die overigens weer snel het onderspit delven als het zout uitspoelt. Het effect is mede afhankelijk van het weer in het voorjaar. Veel regen verdunt het zout snel, wat de schade beperkt.

Strooizout beïnvloedt ook het leven in sloten. Kikkers hebben er doorgaans weinig last van, maar larven van salamanders wel. Vogels in de buurt van wegen die gestrooid zijn, kunnen water drinken met een te hoge zoutconcentratie. De dieren

MAMMOET UIT DE DIEPVRIES

Japane wetenschappers zoeken in de permanent bevroren bodem van Siberië, de permafrost, naar diepgevroren mammoeten. Ze willen intact DNA bemachtigen om het tot de verbeelding sprekende oerdier weer tot leven te wekken – in feite net zoals in de film Jurassic Park. De Japanners wisten al een zestien jaar bevroren muis te klonen, maar een 20.000 jaar oude mammoet lijkt voorlopig nog een stap te ver. Toch leverde het DNA van het uitgestorven dier al interessante informatie op. Kevin Campbell van de Universiteit van Manitoba (Canada) ontdekte in 2010 dat mammoeten zich niet alleen beschermden tegen de kou met



een dikke vacht. Hun bloeiwit hemoglobine blijkt ook bij lage temperaturen zuurstof te kunnen transporteren. Dat betekent dat het bloed van mammoeten zonder directe problemen wat kouder kon worden.

ALTERNATIEVEN VOOR STROOIZOUT

Alternatief	Werking	Nadeel
Vegen/borstelen	Sneeuw/ijs verwijderen	Kost tijd
Zand, steengruis, grind	Meer grip	Verstopt ZOAB en riool
Zeezand	Meer grip + vriespuntsdaling	
Zout/suiker mengsel (bv. melassestroop)	Vriespuntsdaling	Duurder
Houtschilfers	Meer grip	

worden suf, laten zich gemakkelijk benaderen en worden sneller overreden door auto's.

Om al deze nadelen voor het milieu te beperken, gaan er stemmen op om het gebruik van strooizout te verminderen. Zo vroeg de Partij voor de Dieren in Amersfoort in 2011 om alternatieven, zoals gravel en zand. Op de Nederlandse snelwegen van ZOAB (Zeet Open Asfalt Beton) kan dit echter niet, omdat de holtes in het asfalt daardoor verstopt raken. De goede drainage en geluidsdemping zouden daarmee verloren gaan. Maar zeker in minder drukke straten en op fietspaden is dit alternatief een optie, aangezien zout strooien daar toch al weinig effectief is. De fietsersbond pleit vooral voor inzet van borstelwagens op fietspaden.

Een ander bekend antivriesmiddel is glycol, een kleur- en geurloze, stroperige vloeistof. Gemengd met water wordt deze stof gebruikt in autoradiatoren en ruitensproeivloeistof. Afhankelijk van de mengverhouding kan glycol het water tot wel -40 °C vloeibaar houden. Glycol is giftig;

ANTIVRIES IN WIJN EN HOESTDRANK

Het antivriesmiddel glycol (diethyleenglycol) is een goedkope en zoete vloeistof. In 1985 bleken Oostenrijkse wijnboeren het toe te voegen aan witte wijn om deze zoeter te maken. Ook zou glycol het zogeheten 'traaneffect' van duurdere wijnen bevorderen. Goede wijn 'huilt': wanneer het in een glas wordt rondgedraaid, vormen zich hoog in het glas olieachtige druppels die langzaam naar beneden lopen. Maar glycol is giftig: ons lichaam zet de stof om in een zuur dat nierproblemen veroorzaakt (zie basis).

De concentraties glycol in de wijn vormden geen acuut gevaar, maar de Oostenrijkse wijnhandel stortte totaal in. Veel ernstiger was de export vanuit Nederland in 1996 van met glycol vervuilde glycerine. De glycerine werd verwerkt in een pijnstillende siroop voor kinderen. In Haïti stierven daardoor 85 kinderen aan acute nierversgiftiging. En er zijn helaas nog meer gevallen van massavergiftiging met glycol in geneesmiddelen: 47 doden in Nigeria (1990), 236 doden in Bangladesh (1990-1992), 15 doden in Argentinië (1992) en 36 doden in India (1998).

daarom zijn er andere antivriesmiddelen in gebruik voor bijvoorbeeld drinkwater in boten en voor vogelbaden.

BESCHERMING

Antivries voorkomt niet alleen dat water befrist. Het beschermt planten, dieren en cellen ook wanneer ze al bevroren zijn. Antivriesmiddelen voorkomen schade tijdens het bevroren of invriezen. Dat doen ze door de vorming van ijskristallen tegen te gaan (zie basis). Een dergelijke stof wordt ook een cryoprotectant genoemd. Dankzij cryoprotectanten kunnen organismen of cellen na ontdooing de draad weer gewoon oppakken. De Noord-Amerikaanse boskikker *Rana sylvatica* bestaat tijdens zijn winterslaap bijvoorbeeld voor tweederde uit ijs. Dankzij bepaalde suikers lopen zijn cellen hierbij geen onherstelbare schade op. Dat is bijzonder. Een mens loopt al snel letsel op wanneer lichaamsdelen bevroren. Menig bergbeklimmer is een teen kwijtgeraakt op een barre tocht in het hooggebergte. Bij strenge vorst vernauwen bloedvaten in de huid en ledematen zich. Hierdoor verliest het lichaam minder warmte en kunnen de vitale lichaamsdelen op temperatuur blijven. Maar als dit lang duurt, kan de combinatie van lage temperatuur en slechte doorbloeding het weefsel onherstelbaar beschadigen. Vooral tenen, oren, vingers en het puntje van de neus zijn kwetsbaar. Overigens is het feit dat cellen doodgaan door bevroren soms juist nuttig: wratten verdwijnen als de dokter ze aanstipt met vloeibaar stikstof (-196 °C).

Als je biologisch materiaal, zoals stamcellen, bloed of sperma, langere tijd wilt bewaren, dan zul je het moeten invriezen. De lage temperaturen leggen vrijwel alle processen in de cel stil of zetten ze op een zeer laag pitje. Maar zonder speciale maatregelen functioneren de cellen niet meer goed na het invriezen. Het vriesproces veroorzaakt te veel schade.

Ook hier biedt 'antivries' uitkomst. De toevoeging van cryoprotectanten voor-

EICEL VOOR LATER



In 1986 werd het eerste kind geboren uit een bevroren eicel. Het invriezen van eicellen is een uitkomst voor meisjes en jonge vrouwen die een behandeling tegen kanker moeten ondergaan (chemokuur en/of bestraling) waarbij de eierstokken schade kunnen oplopen. Maar er zijn ook dertigplusvrouwen die graag eicellen willen opslaan voor later omdat ze nog niet de juiste partner hebben ontmoet. In april 2011 bood het AMC in Amsterdam als eerste de mogelijkheid aan. Dit leidde tot verhitte discussies in kranten en tv-programma's. Is het verstandig, wenselijk of tegennatuurlijk om het moederschap op deze manier uit te stellen? In België en Engeland kun je overigens al langer je eicellen tegen betaling laten invriezen. Dat kost circa 3000 euro. Eicellen schadevrij invriezen en weer ontdooien is lastig. Het is veel moeilijker dan bijvoorbeeld spermacellen of embryo's invriezen. Er zijn gemiddeld zo'n 35 eicellen nodig voor een succesvolle zwangerschap. Wereldwijd zijn er desondanks inmiddels bijna duizend kinderen geboren uit een eicel die ooit ingevroren was. Tot nu toe zijn er geen medische afwijkingen gevonden bij deze kinderen.

komt dat cellen ernstige schade ondergaan. Cryoconservering vindt voornamelijk plaats voor medische doeleinden, zoals orgaantransplantatie of IVF (in vitro fertilisatie, oftewel reageerbuisbevruchting). In de landbouw is spermaopslag de gewoonste zaak van de wereld. Vrijwel alle melkkoeien en ren- of springpaarden worden verwekt met eerder ingevroren zaadcellen. Voordeel is dat topstieren en -hengsten wereldwijd duizenden nakomelingen kunnen voortbrengen, ook decennialang na hun dood.



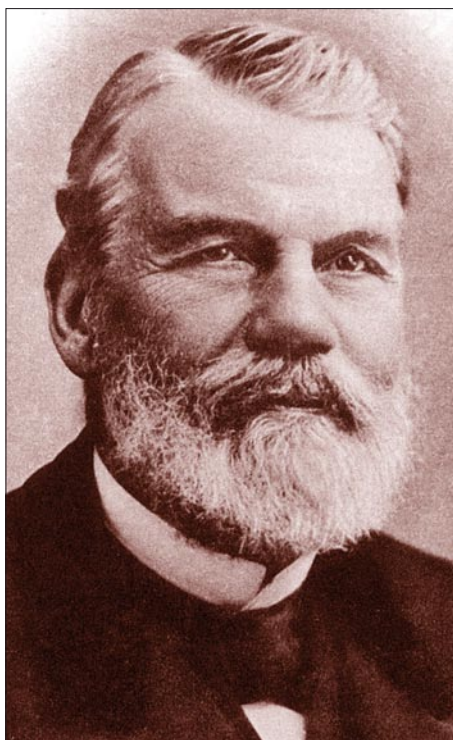
Meer dan de helft van het lijf van de Noord-Amerikaanse boskikker befrist tijdens zijn winterslaap. Toch ontwaakt hij gezond.

Antivriesmiddelen en vriesbeschermers voorkomen **vorstschade**.

Ze verlagen het vriespunt, verhinderen de vorming van ijskristallen of houden de kristallen controleerbaar klein.

Het gevaar van ijskristallen

De Franse chemicus François-Marie Raoult (1830-1901) geldt als de ontdekker van antivries. Aan het einde van de 19e eeuw ontdekte hij dat wanneer hij andere stoffen toevoegde aan de olieachtige stof benzeen, deze vloeistof pas bij een lagere temperatuur bevroor. Zijn eerste artikel over deze *vriespuntsdaling* publiceerde Raoult in 1882. Vervolgonderzoek wees uit dat vriespuntsdaling een algemeen verschijnsel is. Als je stoffen toevoegt aan een vloeistof, daalt het vriespunt. Zuiver water bevriest bij 0 °C. Water waarin de maximale hoeveelheid keukenzout (NaCl) is opgelost, bevriest pas bij -21 °C; een mengsel van half water, half glycol bevriest bij -55 °C.



De Franse chemicus François-Marie Raoult ontdekte dat het vriespunt van vloeistoffen daalt wanneer je er andere stoffen aan toevoegt.

In ijs zijn de watermoleculen netjes geordend in een zogeheten kristalrooster. In die toestand is de vrije energie van de moleculen lager dan in vloeibaar water: ze liggen onbeweeglijk tegen elkaar aan. Als de temperatuur van vloeibaar water daalt, worden de watermoleculen naar het punt van laagste energie getrokken (als knikkers in een knikkerputje) en nemen ze hun plek in het kristalrooster in. Het water is dan bevroren. Boven het vriespunt is de bewegingsenergie (kinetische energie) daarentegen hoog en rollen de moleculen 'over het putje heen'. En de watermoleculen die er al in zitten, wippen eruit: het ijs smelt. Op het vriespunt is er een dynamisch evenwicht: evenveel moleculen laten los als er in ijsvorm bijkomen.

VRIESPUNTSDALING

Maar waarom bevriezen zuivere vloeistoffen eerder dan oplossingen of mengsels? In zuiver ijs zitten geen opgeloste stoffen, alleen water. De moleculen kunnen daardoor relatief makkelijk hun plek in het kristalrooster innemen. Dat gaat minder makkelijk als er stoffen in het water zijn opgelost. Die opgeloste stoffen verschillen van vorm en lading en passen daardoor niet netjes in het kristalrooster van ijs. Iedere stof die is opgelost, verlaagt de 'concentratie' water (waar opgeloste stof zit, kan immers geen water zitten). Er zijn dus in de oplossing minder watermoleculen die kunnen overgaan van vloeibare naar vaste toestand. Het omgekeerde geldt echter niet: er zijn (in vergelijking met zuiver water) evenveel moleculen die per tijdseenheid kunnen loslaten. Maar omdat er minder zijn die zich in het rooster kunnen nestelen, verschuift het dynamisch evenwicht naar de 'smeltkant'. Het moet kouder zijn



Ijskristallen zijn funest voor menselijke cellen.

om het evenwicht weer te herstellen. Dit wordt vriespuntsdaling oftewel *cryoscopie* genoemd. Overigens wordt een water/ijsmengsel vanzelf kouder wanneer je er zout aan toevoegt. Dit komt omdat het smeltproces warmte kost en omdat het oplossen van zout veelal ook een endotherm (warmte vragend) proces is.

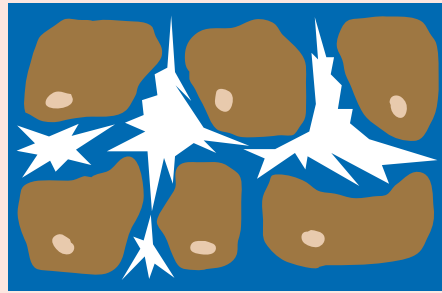
Wanneer we pekkel op autowegen strooien of ethyleenglycol toevoegen aan autoruitsproeiervloeistof, maken we dankbaar gebruik van vriespuntsdaling. Andere zouten, suikers en vloeistoffen zoals ethanol (alcohol), methanol, isopropanol en glycerine (1,2,3-propaantriol) werken ook prima als antivries. Keukenzout (NaCl, natriumchloride) en glycol (1,2-ethaandiol) zijn de meest gebruikte antivriesmiddelen vanwege de lage prijs en het feit dat ze goed oplosbaar of mengbaar zijn met water. Een belangrijk nadeel van glycol is dat de stof giftig is. In het lichaam wordt glycol omgezet in oxaalzuur (ethaandizuur), dat calcium bindt en daardoor oxalaten vormt. Deze oxalaten vormen nierstenen, en kunnen tot nierfalen leiden.

VRIESPUNTSDALING

% glycol in water (v/v)	0	10	20	30	40	50
vriespunt (°C)	0	-3	-8	-16	-25	-55

OSMOTISCHE STRESS

Om het probleem van osmotische stress binnen cellen op te lossen, produceert een organisme niet-giftige polyolen zoals glucose en glycerol. Deze staan bekend als antivries, maar bij vorst-tolerante dieren is het feit dat de stoffen vocht vasthouden in de cel vele malen belangrijker. Een betere benaming voor de 'antivriesmiddelen' van deze dieren is dan ook 'vorstbeschermers', oftewel *cryoprotectants*. Uiteindelijk verkeert het cytoplasma binnenin de cel in een soort *glastoestand*.



De oplossing is vast maar zonder orde-ning, d.w.z. zonder ijskristalvorming. In vakjargon heet dit *vitrificatie* (zie diepte). |

NATUURLIJK ANTIVRIES

Koudbloedige dieren overleven bij temperaturen rond 0 °C dankzij vriespuntsdaling. Insecten in de poolstreken bestaan bijvoorbeeld tot wel 20 procent uit glycerol. Glycerol is de meest voorkomende cryoprotectant, maar ook andere niet-toxische stoffen met meerdere alcoholgroepen (-OH), de zogeheten polyolen, werken goed als een eerste defensiemechanisme tegen kou. Voorbeelden zijn glucose, sacharose en sorbitol. Ze beschermen planten en dieren tot een paar graden onder het vriespunt.

Poolvissengebruikeneenandereantivries-tactiek en overleven in zeewater van circa -2 °C (het zoute zeewater bevriest door vriespuntsdaling beneden 0 °C). Ze houden hun bloed stromend dankzij hoge concentraties antivrieseiwitten (20-35 mg/l). Die maken ze in hun alvleesklier. Ook toendra-eekhoorns gebruiken deze tactiek tijdens hun zeven maanden durende winterslaap, waarbij hun lichaamstemperatuur daalt tot -3 °C. De eiwitten verlagen het vriespunt niet, maar hechten zich aan beginnende ijskristallen. Zo voorkomen ze dat deze uitgroeien. Het bloed raakt in feite 'onderkoeld': het heeft een lagere temperatuur dan het eigenlijke vriespunt, maar is toch vloeibaar.

Deze beschermtechniek is niet zonder risico. Bij schade aan een vissenhuid

kan het bloed van het ene op het andere moment compleet bevroren, en sterft de vis. Dit is te vergelijken met een fles onderkoeld water uit de vriezer. Eén keer schudden en opeens is al het water bevroren.

VORSTTOLERANTE DIEREN

Zoogdieren zoals de mens sterven wanneer ze bevroren. Onze organen of cellen kunnen niet tegen vorst. Om een idee te krijgen van de verwoesting die vorst kan aanrichten: vries eens een komkommer in en laat hem ontdooien. Het resultaat is een grote drab. Hoe komt dit? Komkommercellen, en ook menselijke cellen, vriezen letterlijk stuk doordat scherpe ijskristallen de celmembranen en andere celonderdelen beschadigen. Cellen raken 'lek' en de organellen functioneren niet meer. Daarnaast is *osmotische stress* een belangrijke oorzaak voor sterfte. Wanneer een plant of dier langzaam afkoelt, bevriest eerst het water dat tussen cellen in zit. Tijdens dit bevroren stijgt de concentratie van opgeloste stoffen in het resterende water. Dat zorgt voor osmose vanuit de omringende cellen: water uit deze cellen stroomt naar dit resterende water toe. Binnenin de cel stijgen daardoor de concentraties van zouten en eiwitten. Dit proces stopt wanneer de concentratie opgeloste stoffen in de cel zo hoog is dat er geen water meer onttrokken kan worden. Vooral eiwitten kunnen slecht tegen de hoge concentraties (hoge osmotische druk). Ze *denatureren*: ze verliezen hun driedimensionale vorm die bepalend is voor hun functie. Ook het celmembraan is kwetsbaar. Wanneer de cel sterk krimpt door waterverlies, kan het membraan 'inklappen'.

Toch zijn er vorsttolerante dieren zoals kikkers en insecten die aan al dit onheil

VRIESPUNTSDALING BEREKENEN

Met de onderstaande formule kun je berekenen hoeveel het vriespunt van een vloeistof daalt wanneer je er stoffen in oplost:

$$\Delta T_{vp} = K_{vp} \cdot \frac{n}{m_o} \cdot i$$

ΔT_{vp} is de vriespuntsdaling in °C. K_{vp} is de cryoscopische constante, een karakteristiek van het oplosmiddel. n is het aantal mol opgeloste stof in een hoeveelheid oplosmiddel, m_o de massa van het oplosmiddel en i de van 't Hoff-factor, een maat voor het ionische karakter van een stof. De verhouding n/m_o wordt ook molaliteit genoemd: het aantal mol opgeloste stof per kilogram oplosmiddel. Wanneer je 100 gr. keukenzout (NaCl: $i = 2$, molmassa = 58,44 g/mol) oplost in water ($K_{vp} = 1,86 \text{ kg}\cdot\text{K/mol}$), bedraagt de vriespuntsdaling dus $1,86 \times (100/58,44) \times 2 = 6,37 \text{ °C}$.

(Nb. Deze formule geldt enkel voor verdunde oplossingen)



weten te ontsnappen. De rups van de mot *Gynaephora groenlandica* spant de kroon. Dit insect leeft ruim tien jaar als rups, maar is minstens tien maanden per jaar stijf bevroren (tot -50 °C). Hij haalt geen adem, zijn hart staat stil en er is nauwelijks neurologische activiteit. Desondanks ontwaakt hij in juni elke keer weer springlevend. Hoe kan dat?

Ook voor vorsttolerante dieren en planten zijn ijskristallen een groot gevaar. Binnen in de cel zijn ze funest. De truc is om ijskristalvorming te beperken tot de ruimte tussen de cellen, waar ze het minste schade aanrichten. Daartoe produceren vorsttolerante dieren ijsnucleatoren. Dat zijn eiwitten die de vorming van kristallen juist stimuleren. Ze komen uitsluitend buiten de cel vrij. Tegelijkertijd zijn er eiwitten die kristalgroei afremmen. Het eindresultaat bestaat uit vele kleine ijskristallen tussen de cellen.



De rups van de mot *Gynaephora Groenlandica* is minstens tien maanden per jaar bevroren.

NATUURLIJKE ANTIVRIESMIDDELEN

- glycerol, glucose en sorbitol – vriespuntsdaling, vasthouden water in de cel
- trehalose – stabilisatie van celmembraan
- antivrieseiwitten – voorkomen van de groei van ijskristallen binnen en buiten de cel
- ijsnucleatoren (eiwitten) – stimulatie van gecontroleerde kristalvorming buiten de cel

Antivrieseiwitten stoppen de groei van ijskristallen. Dat 'foefje' is al met succes gekopieerd voor het maken van smeugige ijsjes. In de toekomst kunnen de eiwitten ook ingevroren cellen **beschermen**.

De kunst van het afplakken

De ontdekking dat glycerine sperma beschermt bij het invriezen, dateert van vóór de ontdekking dat kikkers en insecten deze 'kunstjes' ook kennen. Maar soms is het andersom: dan ontdekken wetenschappers een tactiek in de natuur die ze graag zouden willen kopiëren. Poolvissen, Groenlandse rupsen en toendra-eekhoorns hebben antivrieseiwitten die ijskristallen 'afplakken' zodat ze niet verder kunnen uitgroeien.

Ijs groeit doordat bij 0 °C telkens nieuwe watermoleculen zich ordenen aan het oppervlak van een kristal. Daarbij worden andere moleculen van het ijsoppervlak 'weggeduwd' omdat ze niet, of niet zo goed als watermoleculen zelf, passen in het kristalrooster. Voor antivrieseiwitten (*antifreeze proteins*, AFP's) geldt dit echter niet. Zij plakken juist aan het ijskristal

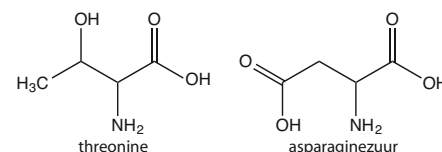
vast en kunnen zo voorkomen dat kristallen verder uitgroeien. Dat kunnen ze uren en zelfs dagen volhouden.

In 1969 ontdekte de Amerikaanse bioloog Art (Arthur) DeVries op Antarctica het bestaan van antivrieseiwitten in poolvissen. Sinds die eerste ontdekking zijn er vele antivrieseiwitten gevonden in vissen maar ook in insecten, planten, schimmels en bacteriën. Opvallend is dat de eiwitten sterk verschillen in aminozuursamenstelling en driedimensionale structuur. En terwijl sommige AFP's van zeer verschillende bronnen grote gelijkenis vertonen, hebben sommige nauw verwante vissen juist heel verschillende antivrieseiwitten. Dit komt doordat de polen in evolutietermen pas relatief kort geleden zijn bevroren (ca. 2 miljoen jaar geleden) en er blijkbaar diverse eiwitten zijn die kunnen evolueren tot AFP's.

Een overeenkomst tussen de diverse antivrieseiwitten is dat ze relatief klein zijn en een plat oppervlak hebben waarop vaak de aminozuren threonine en asparaginezuur voorkomen. In de decennia na de ontdekking van deze eiwitten was de hypothese dat ze veel waterstofbruggen vormen met watermoleculen aan het ijsoppervlak. Nu denken wetenschappers echter dat Vanderwaalskrachten een hoofdrol spelen: de eiwitten passen qua vorm vrijwel perfect op het kristaloppervlak. De meest effectieve antivrieseiwitten passen specifiek op één van de verschillende vlakken van het kristal, maar er zijn ook 'algemenere' AFP's die alle of meerdere kristalvlakken afdekken en zo de kristallen in hun groei belemmeren.

IJSJES MET ANTIVRIESEIWIT

Fabrikanten van diepvriesproducten vinden antivrieseiwitten interessant. Wanneer levensmiddelen langere tijd in de vriezer liggen, ontstaan er grotere ijskristallen. Kleinere ijskristallen smelten



ten gunste van de grotere omdat een zo klein mogelijk ijsoppervlak energetisch het meest gunstig is. Dit heet *herkristallisatie*. Vooral bij ijsjes die (te) lang in de diepvries hebben gelegen, is dit te proeven: het ijs heeft harde stukjes. Bij producten die je opwarmt, is het effect niet direct waarneembaar. Maar de grotere kristallen beschadigen wel de structuur, waardoor vlees taaier, brood minder vers en groente minder stevig wordt.

Antivrieseiwitten zouden bij uitstek geschikt zijn om herkristallisatie te voorkomen en levensmiddelen langer vers te houden. Ze werken al bij lage concentraties (<0.1 mg/l). Unilever produceert al een dergelijk antivrieseiwit voor ijs onder de naam Ice Structuring Protein (ISP). Het gaat om een antivrieseiwit van de Atlantische puitaal (*Macrozoarces americanus*), een vis die leeft in diepe wateren voor de Amerikaanse oostkust. Een genetisch gemodificeerde gist produceert het eiwit nu; sinds 2009 is het ook in Europa toegelaten als ingrediënt voor consumptie-ijs. Het zorgt ervoor dat ijskristallen klein blijven en de ijsjes Solero

NIEUWE KLASSE ANTIVRIES UIT KEVER



Eind 2009 publiceerden Amerikaanse wetenschappers van de Universiteiten van Notre Dame en Alaska een heel nieuw type natuurlijk antivries. Op zoek naar de antivrieseiwitten van de poolkever *Upis ceramoides* stuitten de onderzoekers op een stof die weliswaar kristalgroei afremde, maar geen eiwit bleek te bevatten. Nader onderzoek wees uit dat het gaat om een suikerpolymeer, een (lipo)xyloannaan met als repeterende eenheid β -Manp-(1→4)- β -Xylp. Het geïsoleerde antivries bevatte ook een vetzuur, maar het is nog onduidelijk of dit covalent gebonden is aan het suikerpolymeer. De antivrieswerking is sterk, vergelijkbaar met die van de meest krachtige antivrieseiwitten uit insecten. Wellicht is hiermee een nieuwe klasse antivries ontdekt.



Bij vitrificatie worden cellen met een hoge concentratie cryoprotectants razendsnel ingevroren in vloeibare stikstof zodat ijskristallen geen kans krijgen te ontstaan.

AFKOELEN MET 2000 °C PER MINUUT

In 1949 ontdekten Engelse biologen dat je hanensperma veilig kunt invriezen wanneer je er glycerol aan toevoegt. En al in 1953 werden de eerste vrouwen zwanger met spermacellen die eerder ingevroren waren geweest. Wetenschappers perfectioneerden de invriesmethode tijdens de volgende 50 jaar door te experimenteren met diverse cryoprotectanten, hun concentratie en de invriessnelheid.

Voor spermacellen die relatief klein zijn en weinig water bevatten, werkt de methode redelijk goed. Vaak is een kwart van de ingevroren spermacellen na ontdooiing actief en vitaal. Het invriezen van embryo's lukt inmiddels ook goed: circa de helft van de embryo's is na ontdooiing geschikt voor implantatie. Embryo's zijn groter dan spermacellen, en dus in principe gevoeliger voor bevriezing. Maar als één of meerdere cellen in een embryo sterven, zorgen andere cellen vaak voor compensatie door extra te gaan delen. In 1984 werd in Australië het eerste kind geboren uit een eerder bevroren embryo: een meisje

genaamd Zoë. In 2004 werd een kind geboren uit zaad dat 21 jaar lang bevroren was geweest. En in 2010 werd in Amerika een jongetje geboren dat als embryo 20 jaar lang ingevroren was geweest.

Bij het 'klassieke' invriesproces worden embryo's van een lichaamstemperatuur van 37 °C in kleine stappen naar -196 °C gebracht, de temperatuur van de vloeibare stikstof waar men embryo's in bewaart. Het invriezen is een intensief en ingewikkeld proces, waarbij ijsvorming alleen tussen cellen plaatsvindt dankzij (mengsels van) cryoprotectanten, zoals dimethylsulfoxide, glycerol, etheen- en propeenglycol. Het proces duurt 2 uur en verloopt met een afkoelsnelheid van 0,5 tot 2 °C/minuut. Dankzij de cryoprotectanten bevriest de celinhoud niet, maar wordt die vast zonder ordening (verglazing). Te snel invriezen veroorzaakt schade door ijsvorming binnen de cel; te langzaam invriezen leidt tot schade doordat binnen de cel de concentraties van opgeloste stoffen toenemen (zie ook basis).

Berry Explosion en Exotic Explosion langer smeug smaken.

Voedingwetenschapper Srivassan Damodaran van de Universiteit van Wisconsin (VS) ontdekte in 2009 dat je met bepaalde gelatine-eiwitten eenzelfde effect kunt verkrijgen. Hij kwam op het idee om gelatine te bestuderen omdat het herhalingspatroon van aminozuren in dit eiwit, Gly-Pro-X (waarbij X staat voor een willekeurig aminozuur), lijkt op dat in het antivrieseiwit van de sneeuwvlieg: Gly-X-X. Damodaran knipte gelatine uit koeienhuid op in kortere peptiden met behulp van het enzym papine, en testte zijn hypothese. Het werkte. Omdat gelatine een goedkoop restproduct is uit slachthuizen, denkt de onderzoeker dat zijn ontdekking grote potentie heeft voor de voedingsindustrie. De productie van antivrieseiwitten via genetische modificatie is immers duurder en sommige mensen hebben er principiële bezwaren tegen.

NATUURGETROUW

Een andere voor de hand liggende toepassing van antivrieseiwitten is natuurlijk de bescherming van cellen, weefsels en embryo's die ingevroren moeten worden. Ook in de natuur vinden we immers deze vorm van cryoprotectie. Wetenschappers doen hier onderzoek naar, maar de resultaten zijn tot nu toe niet eenduidig. Met het sperma van chimpansees, stieren en rammen zijn positieve resultaten geboekt, maar bijvoorbeeld niet met het sperma van muizen. De eiwitten blijken soms juist de

vorming van ijskristallen in gang te zetten wanneer ze samenklonteren (aggregeren). Toepassing op korte termijn is dus niet waarschijnlijk, maar het blijft een veelbelovende manier om biologisch materiaal veiliger in te vriezen.

VITRIFICATIE

Voor eicellen bleef het invriessucces echter laag. Een nieuwe Japanse invriesmethode, vitrificatie oftewel 'verglazing', biedt nu uitkomst. Eicellen die op deze manier bewaard zijn, geven inmiddels een vrijwel even hoog succespercentage bij IVF als 'verse' eicellen. De naam is overigens enigszins verwarrend omdat verglazing ook optreedt bij langzaam afkoelen. Bij het 'nieuwe' vitrificeren legt men de eicel eerst in een bad met een cryoprotectant. Vervolgens plaatst men de cel over naar een veel geconcentreerder medium. De concentraties cryoprotectanten zijn hier zo'n drie tot vier hoger dan bij de klassieke vriesmethode. De eicel wordt hierna razendsnel ingevroren

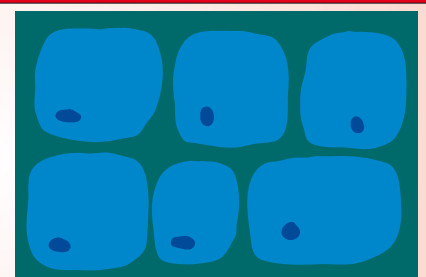
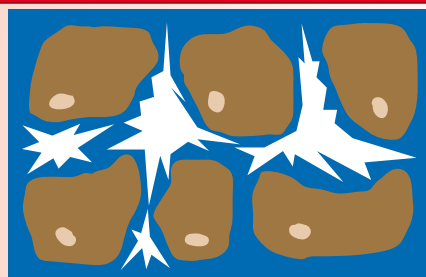
SUPERVERHIT IJS

Amerikaanse en Canadese onderzoekers van Ohio University en Queen's University hebben in 2010 ijs van 0,5 °C gemaakt met hulp van antivrieseiwitten. Dit is mogelijk doordat de eiwitten die kristalaangroei beneden het vriespunt voorkomen, ook het smeltproces remmen. Al 20 jaar geleden hadden wetenschappers gesuggereerd dat je 'warm ijs' zou moeten kunnen maken, maar het was nog niet bewezen. Nu dus wel.

door onderdompeling in vloeibare stikstof. Door deze hoge afkoelsnelheid (10.000-20.000 °C per minuut) heeft het aanwezige water geen kans om te kristalliseren. De cel verglaast en de inhoud is sterk onderkoeld. De verglazing is dus niet stabiel, zoals bij langzaam afkoelen. De hoge concentraties cryoprotectanten zouden bij kamertemperatuur giftig zijn, maar door de lage temperaturen richten ze nauwelijks schade aan. Het ontdooien moet echter ook weer snel gebeuren anders kan er alsnog kristallisatie optreden. En de eicellen moeten zo snel mogelijk het 'overschot' aan antivries kwijt. Inmiddels wordt vitrificatie ook bij embryo's en spermacellen toegepast.

Het invriezen van eicellen blijft echter een belastende medische techniek voor vrouwen. Eerst is een hormoonbehandeling nodig om meerdere eicellen tegelijkertijd te laten rijpen. Vervolgens worden die 'geogst' door met een dikke naald door de vaginawand heen de eierstokken aan te prikken. Onderzoek richt zich daarom ook op het invriezen van eierstokweefsel. In 2004 werd hiermee het eerste grote succes geboekt: een vrouw die de ziekte van Hodgkin had, kreeg een dochtertje: Tamara. Voordat de moeder jaren eerder een zware chemotherapie onderging, was er eierstokweefsel weggehaald en ingevroren. Na genezing werd het weefsel teruggeplaatst en kon ze zwanger worden.

VITRIFICATIE



Links: langzaam invriezen van cellen met cryoprotectants. Rechts: vitrificatie.

Meer weten

AANBEVOLEN LITERATUUR

- Kenneth and Janet Storey, Frozen and Alive, *Scientific American* (1990), december, 92-97,
- Peter Davies *et al.*, Structure and function of antifreeze proteins, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* (2002), 375, 927.
- Kevin Walters *et al.*, A nonprotein thermal hysteresis-producing xylomannan antifreeze in the freeze-tolerant Alaskan Beetle *Upis ceramoides*, *PNAS* (2009) 20210.
- Lessons from nature for preservation of mammalian cells, tissues, and organs, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal* (2011) 47, 210.
- D. Doucet, The bugs that came from the cold: molecular adaptations to low temperatures in insects, *Cell Mol. Life Sci.* (2009) 1404.
- How do embryos survive the freezing process? Interview with Barry Behr, *Scientific American* (2005) June, 13.
- R. Anderson and W. Wallace, Fertility preservation in girls and woman, *Clinical endocrinology* (2011), 75, 409.

AANBEVOLEN WEBSITES

- www.unilever.nl/innovatie: ijsinnovaties die 'cool' zijn
- www.pdb.org: Protein Data Bank, zoek op 'antifreeze proteins'

VOOR OP SCHOOL

1. Op welke drie manieren voorkomen antivriesmiddelen en vriesbeschermers vorstschade?
2. Wat wordt bedoeld met dynamisch evenwicht tussen vloeibaar water en ijs(kristallen)?
3. Leg uit waardoor de antivriesalcoholen goed oplosbaar zijn in water.
4. Oplossen van zouten is veelal een endotherm proces. Door oplossen van bijvoorbeeld ammoniumnitraat in water daalt de temperatuur merkbaar. Vergelijk de oploswarmtes van strooizout (NaCl) en ammoniumnitraat (NH₄NO₃). Zoek de oploswarmtes op internet op.



Was er nou maar wat antivries voorhanden geweest.

5. Wat is het onderscheid tussen molaliteit en molariteit? Waarom heeft molaliteit de voorkeur als er sprake is van metingen bij verschillende temperaturen?
6. Wat betekent denaturatie van eiwitten op moleculair niveau?
7. Geef de reactievergelijking voor de omzetting van 1,2-ethaandiol in oxaalzuur.
8. Oxaalzuur vormt gemakkelijk slecht oplosbare zouten. Welke rol speelt oxaalzuur (in bijvoorbeeld rabarber) bij botontkalking?
9. Leg uit dat de molariteit van opgeloste stoffen stijgt als in een cel ijskristallen ontstaan.
10. Kleine ijskristallen verdwijnen en grote kristallen worden groter, ook bij heel lage temperatuur. Beschrijf hoe cryoprotectanten dit proces kunnen verhinderen.

COLOFON

Chemische Feitelikheden: actuele encyclopedie over moleculen, mensen, materialen en milieu. Losbladige uitgave van de KNCV, verschijnt driemaal per jaar met in totaal tien onderwerpen.

Redactie:
Corry van Driel (C2W)
Gerard Stout (NHL Hogeschool)

Basisontwerp: Menno Landstra

Redactie en realisatie:
Bèta Publishers
tel. 070-262 91 00
info@betapublishers.nl

Opmaak:
F.Koeman DTP Services
f.koeman@casema.nl

Fotoverantwoording:
Foto's zonder bronvermelding zijn afkomstig van www.istockphoto.com

Uitgever:
Sijmen Philips, Bèta Publishers
Postbus 19949, 2500 CX Den Haag
tel. 070-26 29 100, info@betapublishers.nl

Abonnementen:
Abonnementenland, Antwoordnummer 1822
1910 VB Uitgeest
tel. 0900-226 52 63 (€ 0,10/minuut)
klantenservice@aboland.nl

Abonnementen kunnen elk gewenst moment ingaan. Wij hanteren de opzegregels uit het verbintenissenrecht. Wij gaan ervan uit dat Chemische Feitelikheden altijd wordt ontvangen uit hoofde van het beroep.

Hierdoor wordt het abonnement automatisch met een jaar verlengd tenzij 2 maanden vóór de einddatum een opzegging is ontvangen.

Een abonnement op Chemische Feitelikheden geeft via de website toegang tot tien nieuwe edities per jaar en het totale online archief. Daarnaast ontvangen abonnees in drie zendingen per jaar de losbladige edities.

Tarieven vanaf 2012
Voor particulieren:
Online toegang met inlogcode en papieren editie (inclusief verzamelmap): € 79,95.
Leden van KNCV, KVCV en NVON krijgen € 10,- korting.

Voor bedrijven en (onderwijs)instellingen:
Onbeperkt toegang tot de digitale edities op basis van IP-adres en papieren editie in drievoud (inclusief verzamelmappen): € 255,-.

ANTIVRIES

editie 66
nummer 278
december 2011

Met dank aan:

- Dr. Henri Woelders, Wageningen UR Livestock Research
henri.woelders@wur.nl
- Els de Bruin, Unilever
Els-de.Bruin@unilever.com

ISSN 0168-3349

KNCV