

Fotoluminescentie van speeksel en omstandigheden die leiden tot onderdrukken hiervan

- demo-

1. Samenvatting.....	1
2. Inleiding	2
3. IJzerionen.....	5
4. Literatuuronderzoek.....	6
4.1. Complexvorming.....	6
4.2. Zure eigenschappen.....	7
4.3. Oxidatie	8
4.4. Katalyse.....	10
4.5. Tyrosine.....	11
5. Discussie	13
6. Conclusie.....	13
7. Overzicht	14
8. Appendix: Vragen en antwoorden	15

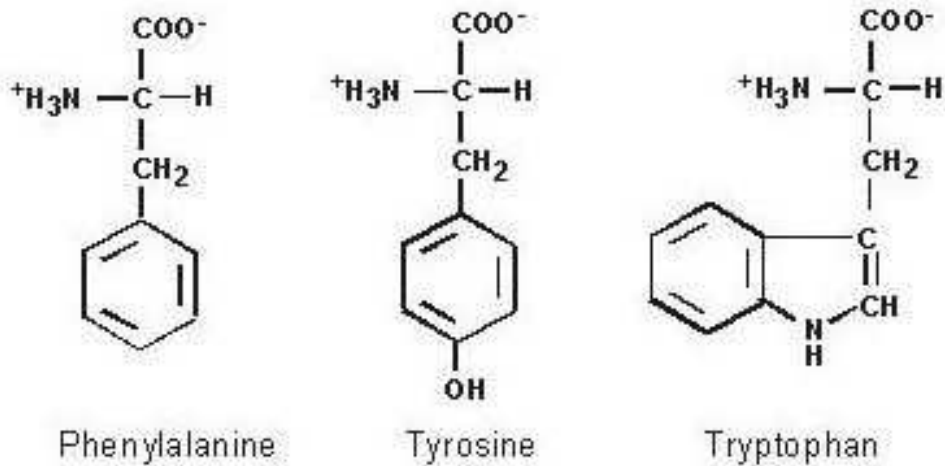
1. Samenvatting.

Drie aromatische aminozuren worden verantwoordelijk gehouden voor fotoluminescentie van speeksel, daarvan is tryptofaan het meest prominente. In combinatie met ijzer-ionen treden vele vormen van interactie op, waarvan oxidatie met behulp van zuurstof de meest rigoureuze is. Literatuuronderzoek laat zien, dat dit binnen het gestelde tijdsraam van enige jaren moet hebben geleid tot volledig verlies van fotoluminescentievermogen op plaatsen, waar speeksel is blootgesteld aan ijzerverbindingen. Meerdere scenario's passeren de revue.

In het vonnis van het herzieningsproces in de Deventer Moordzaak (2003/4) is geopperd en voor waarschijnlijk aangenomen, dat het ontbreken van fotoluminescentie wijst op huidcellen als bron voor het aangetroffen DNA. In deze review komt naar voren, dat voor deze aanname geen argument aan het ontbreken van de fotoluminescentie mag worden ontleend.

Aangezien buiten de rozerode vlekken wel fotoluminescentie bij het DNA werd aangetroffen, dus heel wel mogelijk wijzend naar de herkomst van speeksel als bron van het DNA, resteert slechts hetzelfde type bron als de meest waarschijnlijke bron van DNA voor de rozerode vlekken.

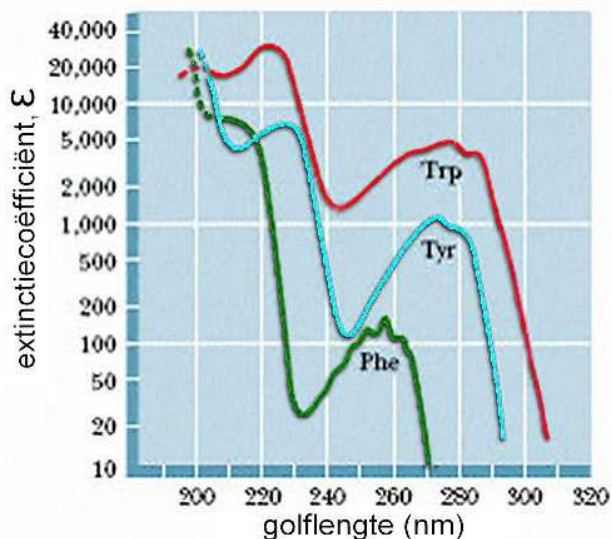
2. Inleiding



Tijdens de bespreking van het DNA bewijs voor het Hof van Den Bosch 2003/4, werd bijzondere aandacht besteedt aan het oplichten van sporen onder de crimescope en het ontbreken daarvan in een aantal sporen met DNA. Alhoewel de omstandigheden omtrent dit oplichten in de flankerende NFI-rapporten ontbreken, kan uit de context worden afgeleid, dat hier sprake was van fotoluminescentie, waarbij zowel sprake kan zijn geweest van fluorescentie als van fosforescentie. (¹Gibson 1977, ²Herman et al. 2012).

De fotoluminescentie van speeksel wordt toegeschreven aan een drietal aminozuren, te weten phenylalanine, tyrosine en tryptofaan (³Lakovicz 2006).

Van deze drie is de bijdrage van tryptofaan de sterkste en overheersend (³Lakovicz 2006, ⁴Truong et al. 1967, ⁵Steiner & Kolinsky 1968, ⁶Zulich et al. 1973). Belangrijk is, dat tryptofaan veel sterker UV-straling absorbeert dan de overige twee:



Ultraviolet absorptie spectra van de aromatische aminozuren bij pH 6.

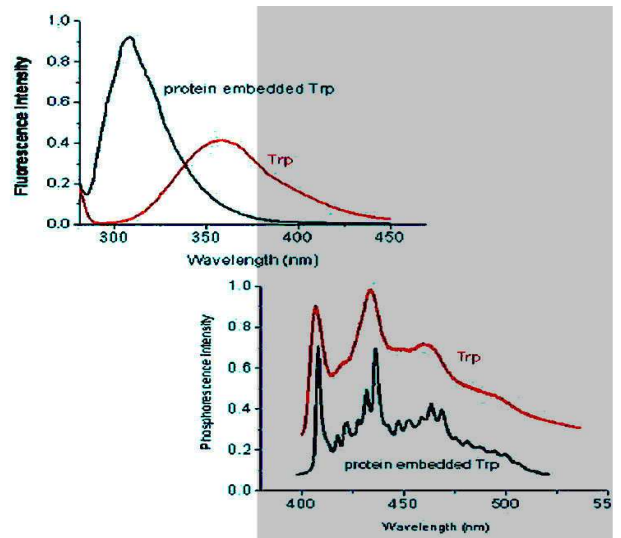
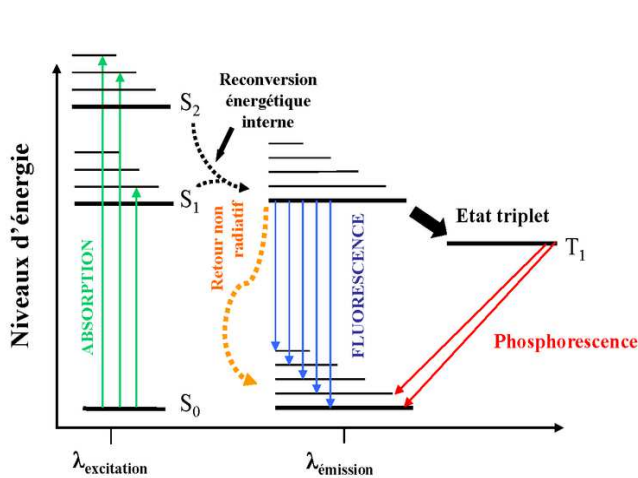
Trp tryptofaan
Tyr tyrosine
Phe phenylalanine

De verticale schaal is logaritmisch, dus de absorptie van UV door tryptofaan is een orde van grootte sterker dan die van tyrosine.

Naar ⁷Wetlaufer 1962.

⁸Nanda et al. 2011 maken melding van de grote mate van overeenkomst tussen de emissiespectra van speeksel en tryptofaan.

Via fluorescentie en fosforescentie wordt bij hogere golflengte de energie weer uitgestraald, bij tryptofaan duidelijk ook in het zichtbare licht (vanaf 380 nm en hoger):



Absorptie van straling leidend tot directe fluorescentie en fosforescentie via een zgn. triplet-toestand. (Jablonski-diagram)

Emissie spectra van tryptofaan via fluorescentie (boven) en fosforescentie (onder). Vanaf 380 Naar ⁹Nonell & Viappiani 2012

Bij fosforescentie is sprake van het optreden van een zogenaamde triplet-state, waardoor het oplichten langer duurt dan bij fluorescentie. De betrokken tijdschalen maken het mogelijk, dat het verschil voor de waarnemer niet duidelijk is. De fosforescentie-emissie ligt beduidend verder in de zone van het zichtbare licht, hetgeen aannemelijk maakt, dat fosforescentie een belangrijk deel van het verschijnsel vormt. Traditioneel wordt het verschijnsel fosforescentie in verband gebracht met lage temperaturen. Recent is duidelijker geworden, dat onder specifieke omstandigheden deze fosforescentie ook goed waarneembaar is bij kamertemperatuur. Dan is sprake van zogenaamde *solid-surface(matrix) room temperature phosphorescence*. De beschreven procedure hiervoor komt wonderwel overeen met het waarnemen van oplichtende sporen op een kledingstuk onder het licht van een crime-scope (cf. ¹⁰Miller 1985). Wel moet in deze beschouwing worden meegenomen, dat een aanzienlijk percentage (80%) van de fosforescentie wordt weggedrukt door atmosferische zuurstof (cf. ¹¹Ramasamy & Hurtubise 1998). Voorts is de positie van het fosforescerende onderdeel in het eiwit van belang. Bevindt het zich diep genesteld in het eiwit, dan is de kans op het wegdrucken van de fosforescentie door atmosferische zuurstof geringer (¹²Vanderkooi et al. 1990). Het verschil in gevoeligheid voor opgewekte luminescentie van de drie genoemde aminozuren valt goed in te zien aan de hand van de elektronenstructuur van de geconjugeerde systemen in de drie aminozuren phenylalanine, tyrosine en tryptofaan, lettend op de functionele groepen daarin, namelijk respectievelijk benzeen, fenol en indool.

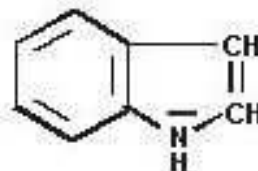
benzeen



fenol

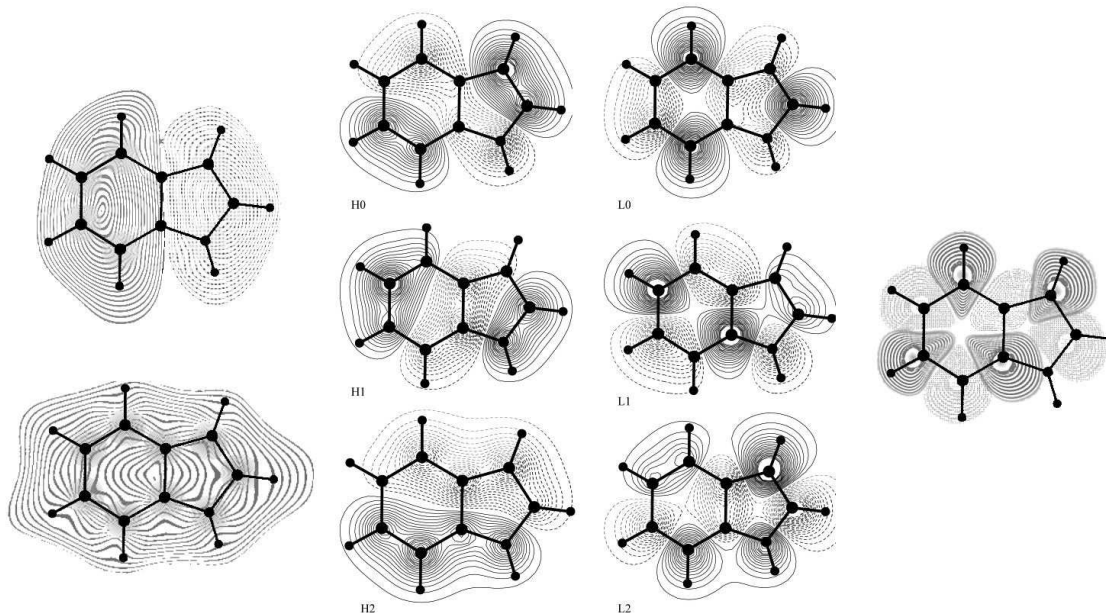


indool



Benzeen is volledig symmetrisch, fenol vertoont nog spiegelsymmetrie, maar indool is volledig asymmetrisch. Daarnaast bestaat het geconjugeerde systeem van benzeen uit 6 orbitalen met 6

electronen, fenol heeft 7 orbitalen met 8 electronen en indool telt 9 orbitalen met 10 electronen daarin. Hierdoor zijn de energie-stappen tussen de verschillende orbitalen in de reeks benzeen-fenol-indool steeds kleiner en zijn er dus veel meer mogelijkheden tot op absorberen, omvormen en emitteren van elektromagnetische straling, zie het Jablonski-diagram. De spectrometrische eigenschappen van indool en tryptofaan lijken als twee druppels water op elkaar (¹³Bent & Hayon 1975b).

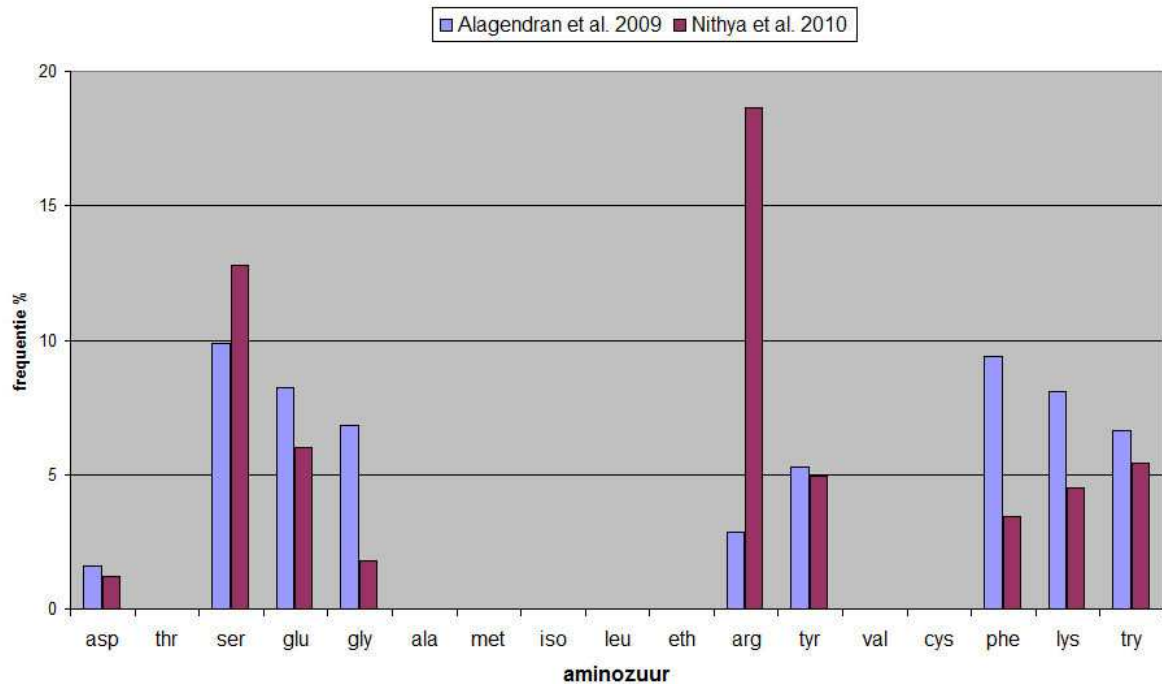


Molecuulorbitalen van indool, op basis van ¹⁴Clare 2004 (aangevuld). In de grondtoestand zijn de vijf linker orbitalen bezet met vijf elektronenparen.

Tyrosine komt iets meer voor dan tryptofaan. Tryptofaan neemt in het algemeen gemiddeld ongeveer 1% van de menselijke eiwitten in beslag. Speeksel bevat rond 2 g/L eiwit (cf. ¹⁵Bonilla 1972). Het gehalte in speeksel-eiwit blijkt sterk te wisselen, maar lijkt door de bank genomen groter dan deze 1%. De in ¹⁶Alagendran et al. 2009 en ¹⁷Nithya et al. 2010 opgenomen waarden wijzen op gehalten in speeksel voor tyrosine en tryptofaan van zo'n 5% van het totale eiwit (20-150 mg/L bij ¹⁸Alagendran et al. 2009).

De fotoluminescentie van phenylalanine is verwaarloosbaar. Als tryptofaan in het eiwit aanwezig is, wordt de fotoluminescentie van tyrosine vrijwel geheel overgenomen door het tryptofaan (¹³Bent & Hayon 1975, ⁴Truong et al. 1967, ³Lakowicz 2006).

Vergelijking van enige partiële aminozuurprofielen van speekseleiwitten



3. IJzerionen.

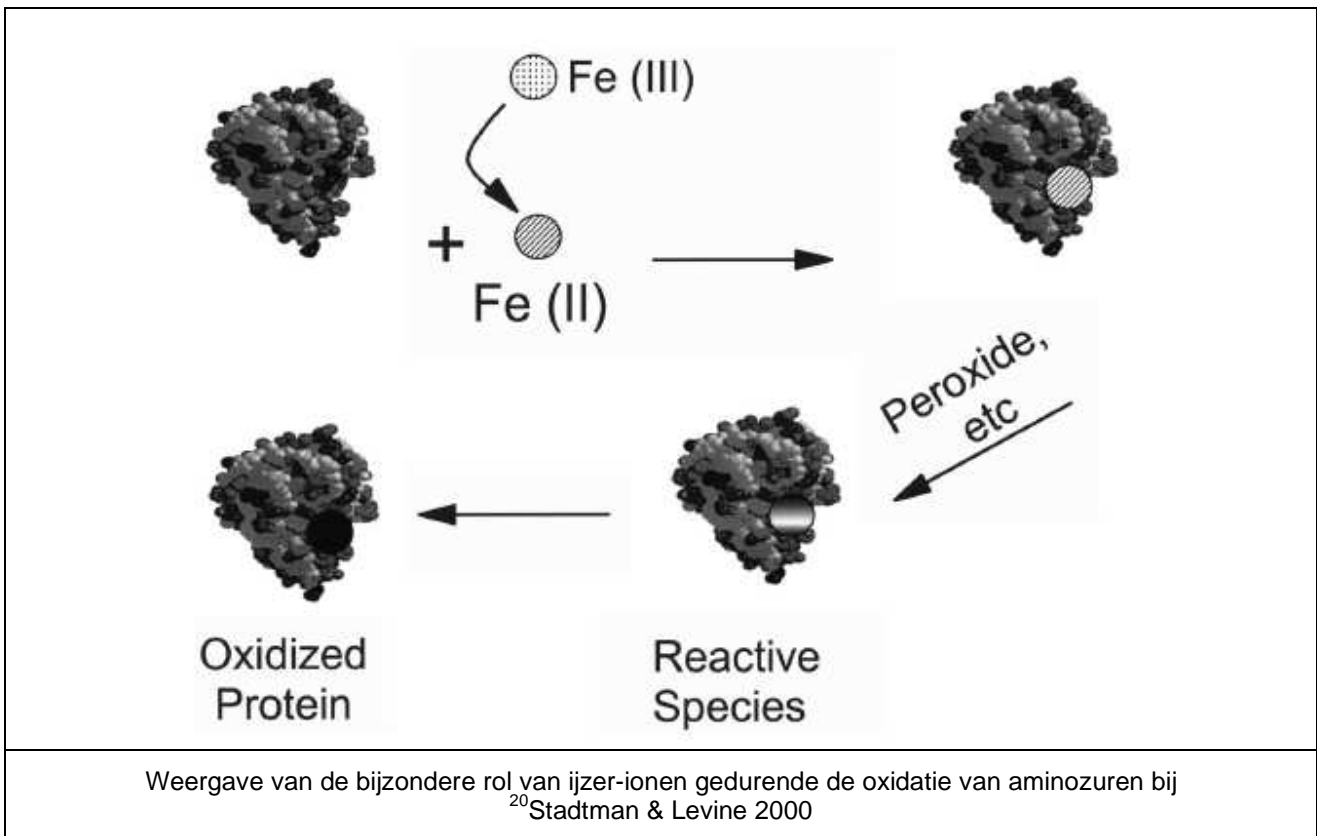
De fotoluminescentie van speeksel kan op vele manieren teloor gaan. Deze manieren kunnen in verband gebracht worden met de aanwezigheid van ijzer-ionen.

Tijdens het oriënterend onderzoek, dat in 2006 door het OM werd uitgevoerd, werd het NFI gevraagd om een onderzoek naar de zogenaamde roze vlekken. Het NFI rapporteerde de vondst van de elementen ijzer en titanium.ⁱ

IJzer-ionen beschikken over een ruim palet aan biologisch relevante eigenschappen (cf. ¹⁹Haas & Franz 2009, ²⁰Stadtman & Levine 2000), die ook hier een rol hebben moeten spelen, zoals:

1. IJzer-ionen hebben zeer goede complexerende eigenschappen, dwz, dat zij zich zeer gemakkelijk binden aan deeltjes met vrije elektronenparen en moleculen met een zgn π -systeem (zoals de drie genoemde aminozuren bezitten).
2. IJzer(III)-ionen vormen in combinatie met watermoleculen complexen met uitgesproken zure eigenschappen. De zuursterkte is vergelijkbaar met de tweede protolysetrup van zwavelzuur.
3. IJzer(III)-ionen zijn goede oxidatoren, waarbij specifiek ook de oxidatie door ijzer van indoolazijnzuur -dat chemisch zeer nauw verwant is aan tryptofaan- is onderzocht. Net zoals indool blijkt ook tryptofaan reacties met ijzer-ionen aan te gaan.
4. IJzer-ionen zijn zeer geschikte katalysatoren voor een veelheid van reactietypen, in het bijzonder voor oxidatieprocessen, waarbij het van betekenis is, dat het ijzer gemakkelijk kan wisselen tussen de valenties 2+ en 3+. Dit wordt onder meer gedemonstreerd in de zgn luminol-reactie.

ⁱ In 2003 had het NFI een dergelijk onderzoek nog van de hand gewezen.



4. Literatuuronderzoek

4.1. Complexvorming

De bijzondere relatie van ijzer-ionen met tryptofaan blijkt o.m. uit de vermeldingen omtrent het nut van ijzer ten behoeve van de opname van deze aminozuren en visa versa, cf. ²¹Miski&Kratzer 1977, ²²Oduho 1993.

Het complexeren door IJzer(II) en IJzer(III) hangt samen met de bijzondere electronenconfiguratie van deze ionen: $[Ar]4s^03d^6$ resp $[Ar]4s^03d^5$. Deze configuraties gaan samen met een hoge effectieve kernlading (6,25+ resp. 6,6+ in de berekening van Slater). Hierdoor heeft het ion een hoge attractiviteit voor negatieve deeltjes en heeft het plaats in de electronenwolk voor het aangaan van vele bindingen (met liganden), cf. ²³Dougherty 1996, ¹⁹Haas & Franz 2009.

De functionele groep van tyrosine is de fenolgroep. IJzer(III)-ionen vormen met fenol een verbinding met een opvallende kleur, ten teken van de sterk gewijzigde spectroscopische eigenschappen. Het purperen IJzer(III)-tyrosinaat lijkt een belangrijke rol te spelen in het functioneren van ijzeropslag d.m.v. ferritin, cf. ²⁴Waldo&Theil 1993, ²⁵Takagi 1998. ²⁶Miura et al. 2001 leveren rechtstreeks bewijs voor de sterke binding van Fe(III) aan tyrosine. Een dergelijke kleurverandering kan consequenties hebben voor de absorptie van straling door het eiwit en de daaruit volgende fotoluminescentie. Zo kan overlap tussen de luminescentie- en absorptiespectra van een donor en een acceptor leiden tot onderdrukking van de fluorescentie van de eerste (²⁷Lehrer 1969, ²⁸Ross et al. 2002).

Het optreden van sterke ijzer(III)-tryptofaan complexen werd door ²⁹Kamnev et al. 1997 beschreven en door ³⁰Kamnev et al. 2001, ³¹Kovács et al. 2006 en ³²Kovács et al. 2007 nader onderzocht voor het zeer hieraan verwante ijzer(III)-indoolazijnzuur-complex. Deze complexvormingen gaan gepaard met

intensieve kleuring.ⁱⁱ Uit dergelijke kleurveranderingen volgt automatisch, dat de spectroscopische eigenschappen van de betrokken deeltjes zijn gewijzigd; dit kan hebben geleid tot afname (quenching) van de fotoluminescentie.

³³James et al. 2010 laten zien, dat aan human-serum-transferrin (htF) gebonden ijzer de fluorescentie van het tryptofaan in dit eiwit terugbrengt tot 25 à 50% van de oorspronkelijke intensiteit. ³⁴Nagami & Senoh 1974 beschrijven een eiwit, waarin de binding van ijzer aan een tryptofaan-eenheid leidt tot een reductie van de fluorescentie met 75%.

4.2. Zure eigenschappen

Ter bepaling van de samenstelling van eiwitten, dienen de eiwitten te worden gesplitst in afzonderlijke aminozuren. De 'klassieke' werkwijze, is de hydrolyse in zuur milieu. Daarbij wordt echter er voortdurend voor gewaarschuwd, dat in dat geval de resultaten voor tyrosine en tryptofaan onbetrouwbaar zijn, wegens de gevoeligheid voor oxidatie in zuur milieu (³⁵Hill&Schmidt 1962, ³⁶Edelhoch 1967, ³⁷BGVV 1989, ³⁸Pickering & Newton 1990, ³⁹Strydoma et al. 1993, ⁴⁰Fountoulakis & Lahm 1998).

IJzer(III)-ionen zijn niet alleen oxidatoren, maar dragen ook nog eens bij tot een zuur milieu (pK_a = 2,2). Indien enig vocht aanwezig isⁱⁱⁱ, kan de zuurgraad door een hoge ijzer(III)-concentratie behoorlijk oplopen. Door de aanwezigheid van deze protonen loopt de redoxpotentiaal van in het vocht opgeloste zuurstof op en komt daarmee in dezelfde orde van grootte als die van waterstofperoxide, een stof die tryptofaan vlot oxideert (⁴¹Simat & Steinhart 1998).

Voorts kan er ook een rechtstreekse invloed van de zuurgraad op de mate van hydrolyse van de betrokken eiwitten van invloed zijn; ¹²Vanderkooi et al. 1990 beschrijven het onderdrukken van fosforescentie door reagentia als zuurstof in afhankelijkheid van de afstand tussen onderdrukker en het tryptofaan. Deze afstand is groter indien het tryptofaan nog in het eiwit zit opgesloten. Ook ⁴²Saviotti & Galley 1974 wijzen op het onderdrukken van de fosforescentie door zuurstof, indien de zuurstof toegang heeft tot het tryptofaan in het eiwit.

Anders gezegd komt dit erop neer, dat de fosforescentie van vrij (dus gehydrolyseerd) tryptofaan veel sterker wordt onderdrukt door zuurstof e.d., in vergelijking met tryptofaan, dat is opgesloten in een eiwit.

ⁱⁱ Dit kan ironisch genoeg kan hebben bijgedragen aan de vorming van de roze-rode kleur van de zogenaamde make-up vlekken.

ⁱⁱⁱ Zie de vele vochtsporen op de blouse, die fotografisch zijn vastgelegd en let ook op de vochtsporen, die in het Rapport van de Technische Recherche zijn opgenomen en gezien de aard moeten worden toegeschreven aan vochtverlies uit het vest van het slachtoffer.

oxidator		reductor	pH	V ₀
$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}_3\text{O}^+ + 2\text{e}$	\rightleftharpoons	4 H_2O	0	1,77
$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{e}$	\rightleftharpoons	2 OH^-	7	1,35
$\text{O}_2 + 4\text{H}_3\text{O}^+ + 4\text{e}$	\rightleftharpoons	6 H_2O	0	1,23
$\text{O}_2 + 4\text{H}_3\text{O}^+ + 4\text{e}$	\rightleftharpoons	6 H_2O	2	1,11
$\text{Tryp}^- + \text{H}_3\text{O}^+ + \text{e}$		$\text{TrypH} + \text{H}_2\text{O}$	7	0,94 - 1,02
$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{e}$	\rightleftharpoons	2 OH^-	14	0,94
Phe-O^-	\rightleftharpoons	Tyr	7	0,85
$\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}$	\rightleftharpoons	4 OH^-	7	0,81
$\text{Fe}^{+3} + \text{e}$	\rightleftharpoons	Fe^{+2}	-	0,77
	\rightleftharpoons	Fenol		0,63
$\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}$	\rightleftharpoons	4 OH^-	14	0,40

Standaardelektrodepotentialen van enige besproken redoxkoppels (⁴³Javonovic et al. 1986, ⁴⁴Harriman 1987, ⁴⁵Verkerk et al. 2004). De vuistregel die gehanteerd wordt luidt, dat oxidatoren links in de tabel reductoren rechts in de tabel kunnen oxideren, indien geldt: $\Delta V_0 > -0,3 \text{ V}$. Andere in ⁴⁴Harriman 1987 besproken waarden voor tryptofaan (TrypH) liggen tussen 0,60 en 0,98 V.

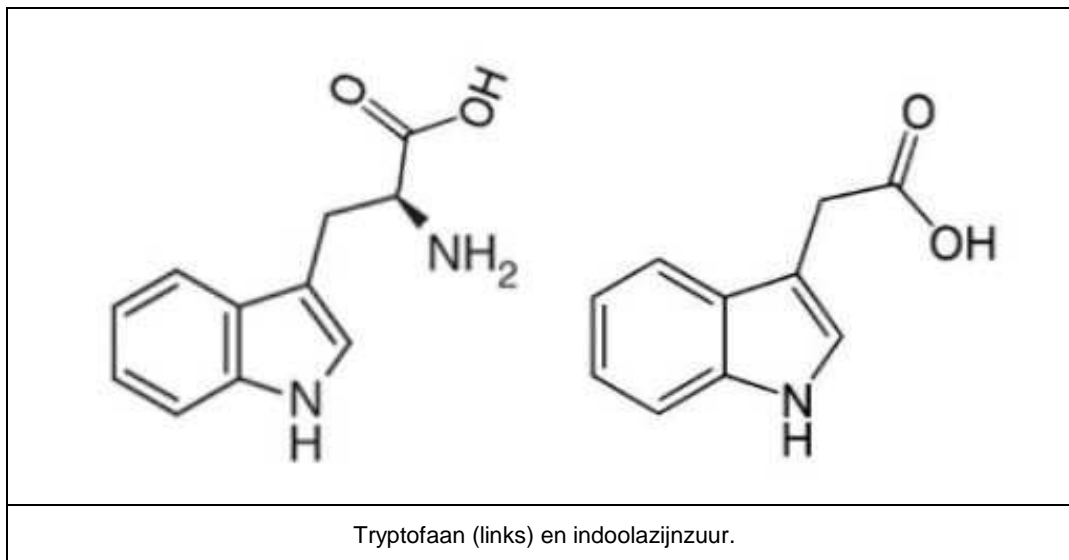
4.3. Oxidatie

Rond 1995 kwam een melkvariant op de markt met extra toevoeging van een mengsel van ijzer-ionen (10 ppm) en vitamine-C (10-70 ppm)^{iv}. Vitamine-C (L-ascorbinezuur) heeft als eigenschap, dat het de pH verlaagt, maar tegelijkertijd ook actief is als anti-oxidant, waardoor het de kans op oxidatie verlaagt cf. ⁴⁶Shacter 2000. Desondanks troffen ⁴⁷Birlouez-Aragon et al. 1997 aan, dat het tryptofaan-gehalte in deze melk gemiddeld 36% lager was^v dan in ongewijzigde melk en dat de tryptofaan-fluorescentie driemaal zo laag was. De auteurs vermoedden, dat hier sprake was van oxidatie van de fluorescerende componenten van het melkeiwit, cf. ⁴⁸Leclère et al. 2002. Er was dus minder tryptofaan over en de resterende tryptofaan onderging ook nog eens afname (quenching) van fotoluminescentie, gezien de discrepantie tussen de afname van het tryptofaan en de tweemaal zo sterke afname van de bijbehorende fluorescentie. ⁴⁹Almaas et al. 1997 stelden vast, dat zowel het ijzer, als het ascorbinezuur bijdragen aan de vorming van oxiderende hydroxylradikalen.

³⁰Kamnev et al. 2001 en ³²Kovács et al. 2008 onderzochten het gedrag van indoolazijnzuur, dat zeer nauw verwant is aan tryptofaan, tegenover ijzer(III)-ionen in een waterige oplossing met opgeloste zuurstof en stelden vast, dat het ijzer(III) in twee etmalen geheel werd omgezet in ijzer(II), hetgeen door de auteurs werd toegeschreven aan de reducerende eigenschappen van het indoolazijnzuur, dat derhalve werd geoxideerd door het ijzer(III).

^{iv} Het toevoegen van ascorbinezuur verbetert de oplosbaarheid van de ijzer-ionen en daarmee de opname door de gebruiker.

^v Dit ondanks dat de hoeveelheid toegevoegd ijzer (0,2 mmol/L) veel lager was, dan de hoeveelheid tryptofaan in melk (4 mmol/L). Daarnaast moet het ijzer, door de aanwezigheid van ascorbinezuur als ijzer(II) aanwezig geweest zijn en kan dus niet rechtstreeks hebben bijgedragen tot de oxidatie. Wellicht was de in de melk opgeloste zuurstof de uiteindelijk beperkende factor. Het ijzer trad dan op als katalyserende factor, voortdurend wisselend tussen de valenties 2+ en 3+. Zie ook de bespreking van de katalyserende eigenschappen van ijzer(II) en ijzer(III).



In ²⁹Kamnev et al. 1997 was al geconstateerd, dat ijzer(III) tryptofaan aantastte onder de onderzochte condities. Ook werd hier reeds gewezen op de mogelijkheid van het optreden van cyclische processen, onder de invloed van zuurstof uit de omgeving, waarbij het vrijgekomen ijzer(II) weer zou kunnen zijn omgezet in ijzer(III). Het ijzer(II)-ion kan op zijn beurt ook weer een rol spelen bij de vorming van waterstofperoxide, dat rechtstreeks tryptofaan oxideert.

⁴¹Simat & Steinhart 1998 verwijzen naar 23 onderzoeken betreffende de oxidatie van tryptofaan, w.o. meerdere referenties naar de rol van ijzer-ionen en van O₂. In het eigen onderzoek komt naar voren, dat reeds op de beperkte tijdschaal, waarin zij experimenteerden (tot 6 uren) rond 20 tot 70% van het tryptofaan werd omgezet en 80% van de gevormde producten géén duidbare sporen achterliet in de UV- en fluorescentiemetingen: *"However, only ~20% of the determined Trp loss could be elucidated by the determined degradation compounds. Some substance peaks (Figure 3) remained unidentified and non-UV-detectable compounds remained disregarded."*

Extrapolatie naar een tijdschaal, zoals van toepassing in de onderhavige casus (4 jaar), levert uiteraard op, dat het verlies aan tryptofaan en fotoluminescentie oploopt tot 100%.

⁴¹Simat & Steinhart voerden hun experimenten uit met waterstofperoxide in een –vrijwel neutraal-milieu met pH tussen 6,3 en 8,3 en bij temperaturen van 30 en 40°C, dus temperaturen, vergelijkbaar met de hoogste temperaturen, waaronder de blouse werd bewaard.^{vi} Bij pH=7 en kamertemperatuur bedraagt de redoxpotentiaal van waterstofperoxide 1,35 V, terwijl die van zuurstof bij pH= 2 (door de aanwezigheid van Fe+3) 1,11 V bedraagt. Voorts speelt de katalyse door de ijzer-ionen een onmiskenbare rol (zie verderop).

Voorts is het van belang, dat er wel erg veel oxidatieproducten van tryptofaan zijn (ook omdat er meerdere oxidatiestappen goed mogelijk zijn), die niet eens alle zijn geïdentificeerd, hetgeen de oxidatie van tryptofaan vanuit een statistisch-thermodynamisch perspectief extra waarschijnlijk maakt (⁴¹Simat & Steinhart 1998, ⁵⁰Finley et al. 1998, ⁵¹Acworth 2003). Ook merken ⁴¹Simat & Steinhart 1998 op, dat de reactieproducten uit het tryptofaan nog gevoeliger blijken te zijn voor oxidatie, dan het tryptofaan zelf, zodat ook langs deze weg de fotoluminescentie weer verder (uit het zicht..) verdwijnt.

Het is zelfs niet uit te sluiten, dat zelfs nog tijdens de belichting door de crimescope de intermediaire triplet-toestand wordt geoxideerd; ⁵²Claesson 1963 bespreekt de gevoeligheid van de triplettoestand van fluoresceïne voor o.m. zuurstof en ijzer(III)-ionen. ¹³Bent & Hayon 1974 laten zien, dat tryptofaan

^{vi} Tijdens de zomers, in de periode van bijna vier jaar tussen de opslag van de blouse op de zolder van een garage en het weer terugvinden ervan, steeg de buitentemperatuur meerdere malen tot boven de 35 °C.

bij toenemende lichtintensiteit evenredig meer gehydrateerde electronen produceert, m.a.w. gevoeliger wordt voor oxidatie.

De reactie van fluoresceïne met ijzer(III) leidde bij ⁵²Claesson 1963 tot een permanente vermindering van het fluoresceïne met 90%. ⁵³Feng & Nansheng 2000 bespreken in een review de bijzondere oxidatieve eigenschappen van Fe(III)-verbindingen onder de invloed van UV-licht, waarbij de bijzondere rol van carbonzuurgroepen (zoals in elk aminozuur aanwezig), opvalt. Deze Fe(III)-verbindingen blijken zeer geschikt voor het opruimen van organische verbindingen t.b.v. waterreiniging.

Tenslotte laten Sheraghi et al. 2012 zien, dat ijzer(III)citraat onder UV-belichting sterke oxiderende reagentia oplevert. Juist ijzer(III)citraat (of ijzer(III)ammoniumcitraat) is gezien de kleur (roodbruin) en de mogelijke herkomst van de roze-rode vlekken een kandidaat voor de op blouse aanwezige bruine en rode vlekken.^{vii} m-Cresol, dat grote overeenkomsten vertoont met tyrosine werd hierdoor zeer snel geoxideerd.

4.4. Katalyse

Eerder werd al gerefereerd naar ⁴⁷Birlouez-Aragon et al. 1997, die ontdekten, dat met rond 12 mg/L toevoeging van ijzer aan melk, het tryptofaan-gehalte met 36% afnam. Van belang is het gehalte van tryptofaan in melk, namelijk gemiddeld 750 mg/L (3,7 mmol/L). Dit betekent, dat 0,2 mmol/L ijzer verantwoordelijk lijkt voor de afbraak van rond 1,2 mmol/L tryptofaan. Deze verhouding wijst erop het ijzer actief is als katalysator voor de oxidatie van het tryptofaan door een derde stof, ook al omdat nog andere substanties in de melk geoxideerd zullen zijn (⁵⁴cf. McSweeney & Fox 2009).

In de bespreking van de oxidatieprocessen van tryptofaan en andere gemakkelijk te oxideren biologische producten duikt stelselmatig de verwijzing op naar de oxidatie door waterstofperoxide, die heel effectief wordt gekatalyseerd door ijzer-ionen. Dit reactietype staat bekend als de Fenton-reactie, cf. ⁵⁰Finley et al. 1998, ⁵⁵Bolm et al. 2004.

⁵⁶Qian et al. 1999 toonden aan, dat een soortgelijke reactie ook mogelijk is met dioxygeen (luchtzuurstof) i.p.v. waterstofperoxide, met ijzer-ionen als katalysator en dat deze reactie de waarschijnlijke aanstichter is van oxidatieprocessen in de biologische cel, indien waterstofperoxide ontbreekt.

Een rol van waterstofperoxide is op voorhand trouwens niet uit te sluiten; ⁵⁷Tabner et al. 2011 bediscussiëren, hoe ijzer(II)-ionen gebonden aan korte peptidefragmenten verantwoordelijk kunnen zijn voor de vorming van waterstofperoxide en hydroxylradicalen. Dit stemt dan weer goed overeen met de verwijzing naar de hydroxylradicalen bij ⁴⁹Almaas et al. 1997.

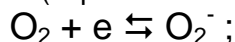
Het belang van de katalyse door ijzer als doorslaggevende factor bij de verondersteld onjuiste analyse van de DNA-monsters in de Deventer Moordzaak laat zich ook als volgt verduidelijken:

In het algemeen zullen biologische sporen niet bestand zijn tegen een langdurige blootstelling aan luchtzuurstof, immers is zuurstof een krachtige oxidator, terwijl de biologische producten altijd als reductor kunnen optreden, uitmondend in de uiteindelijke vorming van kooldioxide. Deze reacties zijn verlopen exotherm en vertonen daarnaast een toenemende entropie. Ze zijn thermodynamisch dus 'gunstig'.

Toch zullen deze reactie normaal gesproken zeer traag verlopen.

^{vii} Het rapport van de technische recherche speelde geen enkele rol bij de gerechtelijke procedures. In dit rapport staan vochtsporen beschreven, die leidden van de trap naar de woonkamer. Op de blouse zijn de meeste bruine en rode vochtsporen zichtbaar op plaatsen, waar het vest, dat het slachtoffer droeg, het sterkst in contact stond met de blouse. E.e.a. wekt sterk de indruk, dat het vest schoonmaakvocht had opgenomen en vervolgens met het stoffelijk overschot door het huis werd gesleept. Met een dergelijke aanname zijn vele bijzonderheden, die geheel buiten beschouwing bleven in één keer verklaard. Allesreinigers bevatten doorgaans citroenzuur (of citraat) en ammonium-verbindingen.

Dit heeft te maken met de eigenschappen van zuurstof (O₂). De oxiderende werking van luchtzuurstof is afhankelijk van een aantal opeenvolgende stappen. De eerste stap behelst de opname van een electron onder vorming van een negatief ion (superoxide anion):



deze stap is energetisch *ongunstig* (endotherm) en verhindert praktisch gesproken een merkbare reactie bij kamertemperatuur. Pas de vervolgreacties (o.a. de vorming van hydroxylionen, hydroxylradicalen of waterstofperoxide) verlagen de energie en verlopen ook bij kamertemperatuur snel.

Indien zich een andere reactant aandient, die de eerste stap overbodig maakt, kan de reactie zich wel geheel bij kamertemperatuur afspelen. Een belangrijke kandidaat in dit verband is het Fe²⁺-ion, dat rechtstreeks met luchtzuurstof kan reageren onder vorming van een - superoxide complex, dat na het uiteenvallen vervolgens 'dubbelop' verder kan reageren; 'dubbelop' omdat er nu twee oxiderende deeltjes gevormd zijn. Na zijn oxiderende werking vertoont te hebben verandert het Fe³⁺-ion weer in een Fe²⁺-ion en kan de cyclus zich herhalen, immers de O₂ is in overmaat voorhanden.

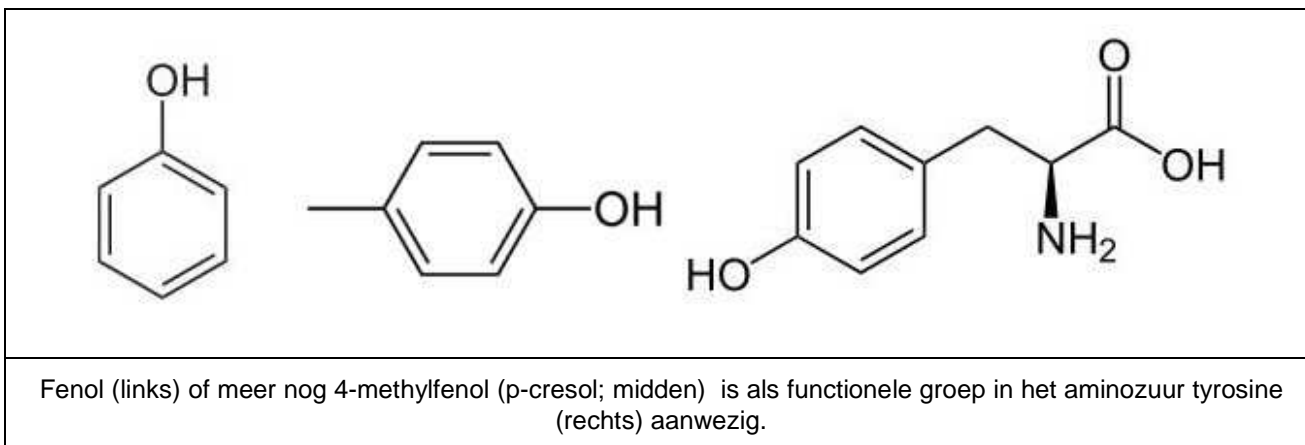
Op deze manier laat zich verklaren, dat de fotoluminescerende sporen wel 'overleven' buiten de ijzerhoudende vlekken, maar daarbinnen niet, cf. ⁵⁸Valentine 1994.

4.5. Tyrosine

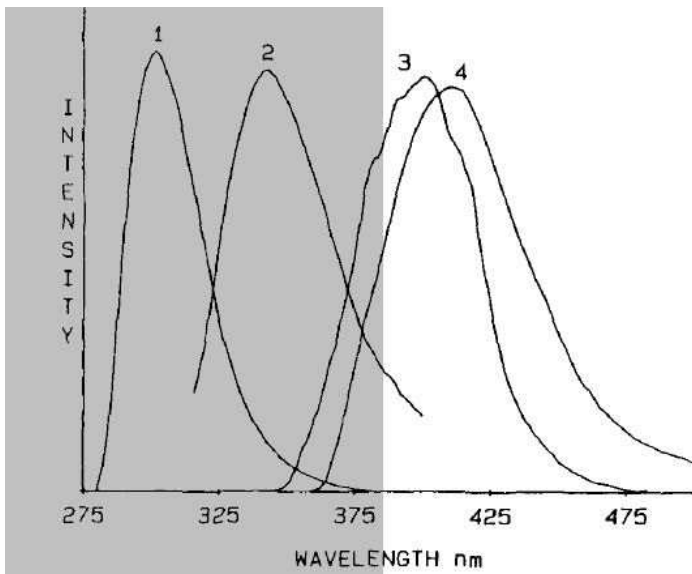
Pas als tryptofaan als bron van fotoluminescentie afwezig is, c.q. is uitgeschakeld, komt de fotoluminescentie door tyrosine aan de orde (³Lakovicz 2006, ⁴Truong et al. 1967, ⁵Steiner & Kolinsky 1968). Deze is veel minder 'indrukwekkend' (⁷Wetlaufer 1962). Dit houdt in, dat na het 'uitschakelen' van de fotoluminescentie van tryptofaan, nog slechts de fotoluminescentie via tyrosine resteert, die gebaseerd is op de veel matiger absorptie van UV-licht door deze component. Deze bedraagt slechts rond 25% van de absorptie, die tryptofaan vertoont (³Lakovicz 2006). Gezien de marginale omstandigheden van de gebruikte methode (een crime-scope zonder nadere specificaties) kan het best zo zijn, dat een dergelijke verzwakt signaal al niet meer wordt waargenomen.

Desondanks komt hier de fotoluminescentie van tyrosine aan de orde, omdat ook deze wordt uitgeschakeld via de aanwezigheid van ijzerionen.

Tyrosine is een aminozuur, dat als functionele groep een molecuul fenol heeft geïncorporeerd:



Tyrosine is derhalve in eigenschappen verwant aan fenol en p-cresol, zeker ook, als het als aminozuur in een peptide is gekoppeld. Voor tyrosine geldt weer, dat het oplichten onder een crime-scope hoofdzakelijk, zo niet uitsluitend is toe te schrijven aan fosforescentie:



De fluorescentie (1-2) en fosforescentie (3-4) van respectievelijk tyrosine en tyrosinaat (afgeleide van tyrosine in een basisch milieu). De aanwezigheid van ijzer(III)-ionen maakt een zuur milieu waarschijnlijk, zodat de curven 1 en 3 het meest in aanmerking komen. Vanaf 380 nm en hoger is het verschijnsel zichtbaar met het blote oog. (In²⁸Ross et al. 2002)

Dit verkleint a priori de kans, dat het oplichten van de vlekken aan tyrosine moet worden toegedicht, immers wordt fosforescentie sterk weggedrukt door atmosferische zuurstof, cf. ³Lakovicz 2006, ⁵⁹PerkinElmer 2006.

Afgezien hiervan levert het gebruik van fenol als 'model' voor de oxideerbaarheid van tyrosine onmiddellijk duidelijkheid. Immers is fenol een belangrijke factor in modellen voor waterzuivering. De grootschalige verwijdering van fenol en soortgelijke producten uit (industriële) afvalwater staat hoog op de wetenschappelijke agenda, waarbij nadrukkelijk gezocht wordt naar duurzame oplossingen. Een dergelijke oplossing wordt gezocht in zogenaamde Catalytic Wet Air Oxidation, ofwel CWAO. Hierbij is zuurstof de oxidator en wordt actief gezocht naar geschikte katalysatoren, om het proces bij zo gematigd mogelijke omstandigheden uit te voeren, waardoor een grote capaciteit bereikt wordt.

Verschillende onderzoeken richten zich in deze op het gebruik van ijzerverbindingen. ⁶⁰Mendoza 2008 onderzocht de effectiviteit van actieve koolstof (AC) op de omzetting van fenol, en toonde aan, dat deze voornamelijk afhangt van de aanwezigheid van ijzer in de AC. Dit door enerzijds aan te tonen, dat de verwijdering van ijzerionen uit de AC deze onwerkzaam maakt en anderzijds, door aan te tonen, dat de toevoeging van ijzer de AC juist activeert.

Overigens bestaat er een duidelijke overeenkomst tussen de proefomstandigheden bij Mendoza en de praktische omstandigheden 'op de blouse'. In beide gevallen zijn de ijzerionen geadsorbeerd op een 'drager', respectievelijk de AC en de cellulose (katoen en viscose) van de blouse. De les van Mendoza is, dat juist een degelijke combinatie goed werkt.

⁶¹Vicente et al. 2005 laten zien, dat o.i.v. homogeen opgeloste ijzer-ionen de omzetting van fenol bij redelijke neutrale pH aflopend is (binnen een uur gegeven de reactieomstandigheden), waarbij de ijzer-ionen onder invloed van de zuurstof enerzijds en de fenol anderzijds pendelen tussen de ladingen +2 en +3.

Weer geldt ook nu, dat de hier onderzochte processen zich in korte tijd afspelen bij verhoogde druk, temperatuur en concentratie. Voor de sporen op de blouse geldt, dat er tijd genoeg beschikbaar was (25.000 uur) en zeer weinig substraat behoefde te worden omgezet, zodat de reacties ook bij veel mildere omstandigheden tot voltooiing zullen zijn gekomen.

Dat tyrosine gemakkelijk oxideerbaar is, blijkt uit de standaardpotentiaal van het bijbehorende koppel (zie de tabel in paragraaf 4.2): de waarde is ligt in dezelfde orde van grootte als de waarde voor O₂.

In de marge valt nog het volgende op: ⁶²Laoufi et al. 2008 melden een zeer snelle fotokatalytische oxidatie van fenol door luchtzuurstof onder invloed van TiO₂ als katalysator bij lage temperaturen (32 °C!). Ook titanium (ongetwijfeld in de vorm van TiO₂) werd door het NFI aangetroffen in de roze-rode

vlekken. De gebruikte lamp (Philips HPA 400 Watt, gebruikt in hoogtezonnen) was zodanig 'mild' (UV-A), dat hetzelfde belichtingseffect kan worden bereikt met toetredend daglicht of met langdurige TL-verlichting. De veel 'hardere' UV-belichting door een crime-scope kan op een overeenkomstige manier ook in korte tijd geleid hebben tot destructie van de aanwezige tyrosine.

Nog een andere bijkomstigheid verdient vermelding. Onder oxiderende omstandigheden wordt cysteïne omgezet in cystine, of wel, uit tweemaal de groep -SH wordt de brug -S-S- gevormd. Reeds ⁶³Mathews & Walker 1909 en ⁶⁴Harrison 1924 stelden vast, dat de aerobe omzetting van het aminozuur cysteïne in cystine zeer vatbaar is voor katalyse door Fe^{3+} . Daarnaast kan cysteïne ook nog rechtstreeks geoxideerd worden door complexen van Fe^{3+} , cf. ⁶⁵Jameson et al 1988. Bij ²⁸Ross 2002 en ⁶⁶Bent & Hayon 1975a kunnen wij lezen, dat aanwezige disulfides de fotoluminescentie van tyrosine onderdrukken.

5. Discussie

Het is een bijkans onbegonnen zaak, uit te maken, langs welke route de fotoluminescentie van tryptofaan en tyrosine verdwijnt uit het speeksel. Analoge verschijnselen en de vele aangehaalde processen, waarbij ijzer(II)- en ijzer(III)-ionen zijn betrokken en die elkaar lijken te beconcurreren geven intussen voldoende aanwijzing, dat hetgeen werd waargenomen -wel fotoluminescentie buiten de rozerode vlekken en niet erin- gezien de aanwezigheid van ijzerionen in de rozerode vlekken onvermijdelijk was. In het bijzijn van ijzer-ionen zullen aanvankelijk wel luminescerende organische resten bezwijken aan de oxidatieve druk van de omringende luchtzuurstof, geholpen door eventuele vochtresten, bestraling met UV-licht -juist toegepast om de luminescentie op te wekken- en héél véél beschikbare reactietijd.

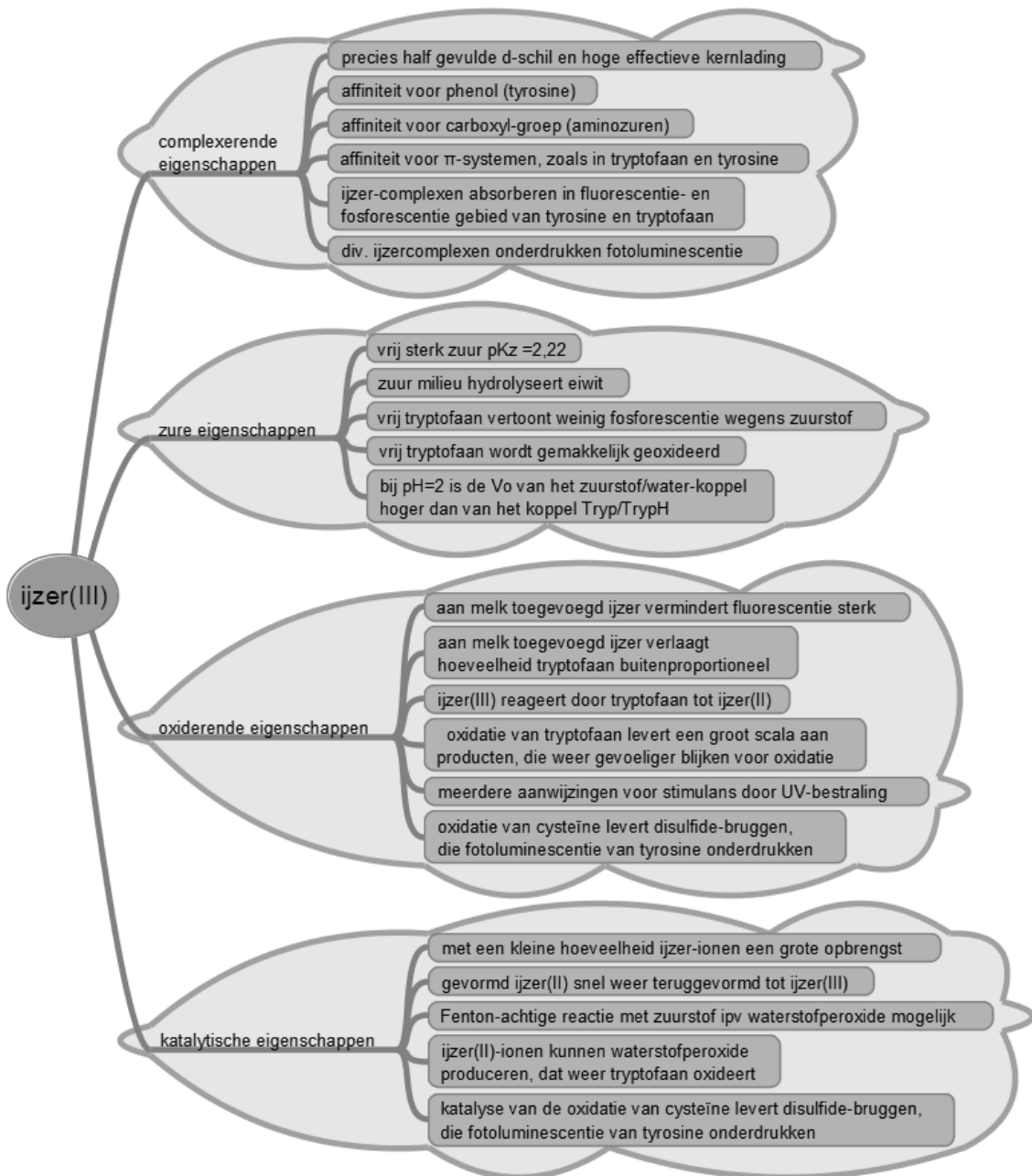
Bij dit alles is nog niet eens gekeken naar microbiologische processen, die door ijzer-ionen worden gestimuleerd (cf. ⁶⁷Church et al. 2000, ⁶⁸Wander et al. 2009, ⁶⁹Morikawa 2010), dat is immers mijn deskundigheid niet. Wel heb ik er al op gewezen, dat gedurende meerdere zomers in de tussenliggende periode, dat de blouse was opgeslagen, de temperatuur naar hoge waarden is opgelopen. Dit wekt op zijn minst de voor de handliggende suggestie, dat bacteriële groei op de biologische resten mogelijk is geweest.

Overigens wekt het bevreemding, dat in de forensische wetenschap geen interesse is voor de aard van de fotoluminescentie, waarvan men gebruikt maakt en ook geen interesse is voor de omstandigheden, waarin deze onwerkzaam wordt. In de op de forensische toepassingen gefocuste literatuur valt daaromtrent immers niets te vinden..

6. Conclusie

Het opstellen van enige hypothese omtrent de correlatie tussen de aanwezigheid rozerode vlekken en afwezigheid van fotoluminescentie, onder uitsluiting van de effecten van de aangetoonde aanwezigheid van ijzer-ionen is ongegrond.

7. Overzicht



8. Appendix: Vragen en antwoorden

Na blootstelling op internet rezen aldaar enige vragen, die, vergezeld van mijn antwoorden, hieronder staan weergegeven.

- Gegeven dat er/ons niet bekend is hoeveel ijzer er in de rode vlekken zat en in welke chemische vorm dat ijzer aanwezig was en dus of het al dan niet in water oplosbaar was, is jouw hele nat-chemische analyse en redenering dat de speekselkenmerken ahw weggetitreerd zouden zijn door ijzer (ionen) binnen de rode vlekken, hoogst speculatief.

De rol van het ijzer (II/III) is zodanig, dat de hoeveelheid een ondergeschikte rol speelt. Het treedt namelijk op als katalysator.

Voor die katalyse zijn meerdere paden voorstelbaar en in de literatuur nawijsbaar. Zo kan het ijzer(III) als oxidator optreden; wordt zelf dan ijzer(II), dat in de praktijk vrijwel onmiddellijk weer ijzer(III) vormt aan de lucht. Ook kunnen ijzer-ionen zich eerst binden aan dioxygeen (luchtzuurstof), waardoor deze ineens wel een snel reagerende oxidator wordt.

De ijzer(II)-ionen kunnen ook nog een andere rol spelen, omdat zij de vorming van waterstofperoxide kunnen stimuleren, waardoor ook weer oxidatie optreedt.

In alle gevallen is het ijzer in een oneindige herhaling bruikbaar. In het praktijkgeval van het verdwijnen van tryptofaan en de bijbehorende fluorescentie oiv toegevoegd ijzer, heb ik voorgerekend, dat de hoeveelheid toegevoegd ijzer (veel te klein) an sich de mate van opgetreden oxidatie niet kan verklaren.

De tijdfactor speelt daarnaast een dominante rol. Op zich vind ik het al verbazend, dat je überhaupt na 4 jaar nog fluorescentie aantreft. Dit heeft alles te maken met de merkwaardige eigenschappen van dioxygeen.

- Er vanuitgaande dat de rodevlekken door rouge en dus door een vaste stof zijn veroorzaakt is een dergelijke gang van zaken ook al was speeksel althans voordat het opdroogde wel vloeibaar niet alleen hoogst speculatief maar ook nog eens zeer onwaarschijnlijk. Dit nog los van de genoemde onzekerheden.

M.i. werkt ijzer ook heel goed in heterogene toestand, hetgeen o.m. blijkt uit de toepassing in de oxidatie van fenolen (zie onder 4.5 tyrosine). Omdat fenolen veel lastiger te oxideren zijn dan het veel belangrijker tryptofaan, zie ik hier geen beletsel. Voorts blijkt uit de sterke mate van plooiing van de blouse, dat deze na veiligstelling op de pd nogmaals behoorlijk vochtig is geweest.

- Wat is de oorsprong van de ijzerionen?

De herkomst kan zijn: verdund bloed (mijn insteek) of make-up-pigment.

Of make-up-pigment van minerale of biologische herkomst is, weet ik niet. Je kunt via massaspectroscopie de minerale of biologische herkomst vaststellen (ander isotopenprofiel).

- Het NFI rapporteert alleen het element ijzer in de make-up vlekken. Begrijp ik nu dat hier tevens ijzer in ionvorm wordt bedoeld?

De kleur van de vlekken verraadt dat ijzer(III) aanwezig is, wellicht in complexe vorm (geeft intensievere kleur). Ijzer(III) is onder 'atmosferische omstandigheden' de enige stabiele vorm.

– Welke concentratie aan ijzerionen is nodig om de luminescentie teniet te doen?
Vrijwel alle profielen waren incompleet, hetgeen erop wijst, dat de DNA-gehalten van de sporen rond de 50-100 ng schommelden. Vanaf 200 ng worden zeker complete profielen gevonden.

Speeksel bevat 1000-10000 ng DNA per mL.

Langs deze weg kunnen wij vaststellen, dat minder dan 0,1 mL speeksel voldoende is voor een meetbaar DNA-profiel van het aangetroffen type. Dit is uiteraard een natte-vinger-berekening, omdat de marges DNA-gehalte lopen van 1 tot 10. Aan het andere uiterste zitten wij met slechts 0,01 mL als benodigde hoeveelheid. Voorts zitten wij met de effecten van degradatie. Alleen zijn die voor de fluorescerende stoffen vermoedelijk veel ingrijpender (en de effecten vallen tegen elkaar weg).

0,1 mL speeksel bevat 0,2 mg eiwit (alweer gemiddeld), waarin zich zo'n 0,01 mg tryptofaan zal bevinden (vermoedelijk minder). Met een molaire massa van 200 komt dit neer op 50 nMol. De ondergrens is dan 5 nMol.

De vinger wordt nog natter....

Hoeveel ijzer-ionen zich in de rode vlekken bevonden weet ik uiteraard niet. De kleurintensiteit, zoals zichtbaar op de foto's behoort bij een behoorlijk verdunde oplossing, ik neem hiervoor aan: 1 mMol/L (). Om een vlek van 2 cm doorsnee te verkrijgen, is ongeveer 0,05 mL nodig (dit correspondeert met een druppel uit een buret, een analytisch-chemische vuistregel). Hierin bevindt zich dan 50 nMol ijzer.*

Dus zeker niet weinig vergeleken met de hoeveelheid tryptofaan, die moet verdwijnen.

Aangezien de rol van het ijzer tijdens de oxidatie (vrijwel) steeds wordt toegeschreven aan de katalytische eigenschappen van dit ijzer zit hier geen probleem. Zeker niet gezien de beschikbare tijdsduur en de overmaat beschikbare luchtzuurstof.

() Een veilig lage schatting, 10x zo hoog is veel reëler; ga je uit van make-up, dan zijn de gehalten ijzer al gauw beduidend hoger.*

– Make-up zal ijzeroxide als kleurstof bevatten, hier ontbreken dan ijzerionen, omdat ijzeroxide onoplosbaar is.
De mogelijkheid bestaat dan nog dat er sprake zou zijn van heterogene katalyse, er moet dan wel sprake zijn van verschillende fasen (bv. waterige oplossing en vast ijzeroxide). Daarom is het van belang om te weten of er vochtplekken op de make-up plaatsen aanwezig waren.

In de review heb ik getracht te vermijden om te speculeren over de herkomst van de ijzerionen. Ik baseer mij dus op de mededeling, dat er ijzer is aangetroffen in de roze-rode vlekken.

Er bestaat bij onderzoekers van exobiologie grote interesse voor de interactie van mineralen en aminozuren (wegens het transport langs die weg van aminozuren en peptiden op micro-meteorieten). Een ^{viii}Matrajt & Blanot (2004) verhalen van een experiment op basis van

^{viii} Amino Acids (2004) 26: 153–158

synthetisch ijzeroxide/hydroxide ()^{ix}. In dit experiment wordt bewezen, dat dit mineraal heel goed is in het adsorberen van aminozuren, waarna een prompte condensatiereactie (koppeling) optrad tussen de aminozuren (oiv van het katalyserende oppervlak). Maar dan komt het: De hoeveelheid aminozuren en peptides namen vervolgens in hoog tempo af (in dagen), vooral in droge toestand. Hoe ze verdwenen is niet nader onderzocht (is ook helemaal niet relevant), maar één van de verwijzingen betreft oxidatie. In ^xWang 1999 worden de bijzondere eigenschappen van een natuurlijke ijzerrijke klei (nontronite) besproken.*

Bottom-line lijkt te zijn, dat heterogene katalyse zeer effectief is door de combinatie van adsorberende en katalytische eigenschappen.

^{ix} Een mineraal met een sterk overeenkomende samenstelling (limonite) is een gewild, want veilig onderdeel van cosmetica.

^x Clays and Clay Minerals, Vol. 39, No. 2, 202-210, 1991

1 Gibson 1977 J Forensic Sci 22(4): 680-696
2 Herman et al. 2012 Olympus Microscopy Resource Centre
3 Lakowicz 2006 Principles of Fluorescence Spectroscopy Springer
4 Truong et al. 1967 J Biol Chem 242(12): 2979-2985
5 Steiner & Kolinski 1968 *Biochemistry* 7(3): 1014-1018
6 Zuclich et al. 1973. Photochem and Photobiol 18: 161-168
7 Wetlaufer, D.B., 1962. Advances in Protein Chemistry 17: 303-390
8 Nanda KD et al. 2011 J Oral Maxillofac Pathol 15: 22-25
9 Nonell & Viappiani 2012 Basic Spectroscopy PHOTOBIOLOGICAL SCIENCES ONLINE
10 Miller 1985 Pure & Appl. Chem 57(3): 515-522
11 Ramasamy & Hurtubise 1998 Talanta 47: 971-979
12 Vanderkooi et al. 1990 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87: 5099-5103
13 Bent & Hayon 1975b J Am Chem Soc 97(10): 2612-2619
14 Clare 2004 J Molec Struct: THEOCHEM 712(1-3): 143-148
15 Bonilla 1972 J Dent Res 51(2): 664
16 Alagendran et al. 2009 African Journal of Biochemistry Research 3(5): 185-189
17 Nithya et al. 2010 International Journal of Biological Technology 1(1):84-89
18 Alagendran et al. 2009 African Journal of Biochemistry Research 3(5): 185-189
19 Haas & Franz 2009 Chem Rev 109: 4921-4960
20 Stadtman ER, & Levine RL 2000 Protein oxidation. Ann N Y Acad Sci 899: 191-208
21 Miski & Kratzer 1977 J Nutr. 107, 24-34
22 Oduho 1993 J Nutr. 1993 123(12): 2201-2206
23 Dougherty 1996 *Science* New Series 271 (5246): 163-168
24 Waldo & Theil 1993 Biochemistry 32: 13262-13269
25 Takagi 1998 J Bio Chem. 273(30): 18685-18688
26 Miura et al. 2001 J Mol Struct 598: 79-84
27 Lehrer 1969 J Biol Chem 244(13): 3613-3617
28 Ross et al. 2002 in Lakowicz 2006 Topics in Fluorescence Spectroscopy Vol 3 Kluwer Acad Pub
29 Kamnev et al. 1997 Biochemistry and Molecular Biology International 41(3): 575-581
30 Kamnev et al. 2001 Journal of Molecular Structure 565-572
31 Kovács et al. 2006 Struct Chem 17: 105-120
32 Kovács et al. 2008 Struct Chem 19:109-114
33 James et al. 2010 Protein Science 19(1): 99-110
34 Nagami & Senoh 1974 J Biochem 75(2): 389-398
35 Hill&Schmidt 1962 J Bio Chem 237(2): 389-396
36 Edelhoeh 1967, Biochemistry 6:1948-1954
37 Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin 1989 49.07-3: In Amtliche
38 Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; Beuth Verlag GmbH: Berlin
39 Pickering&Newton 1990 LC-GC 8(10): 778-780
40 Strydoma et al. 1993 Tech Prot Chem IV: 279-288
41 Fountoulakis & Lahm 1998 Journal of Chromatography, 826: 109-134
42 Simat & Steinhart 1998 J. Agric. Food Chem. 46: 490-498
43 Saviotti & Galley 1974 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 719(10): 4154-58
44 Jovanovic et al. 1986, J. Phys Chem 90: 1935-1939
45 Harriman 1987 J Phys Chem 91: 6102-6104
46 Verkerk et al. 2004 BINAS havo/vwo Wolters-Noordhoff Groningen
47 Shacter 2000 DRUG METABOLISM REVIEWS, 32(3&4): 307-326
48 Birlouez-Aragon et al. Food Additives and Contaminants 14(4): 381-388
49 Leclère et al. 2002. Food Chemistry 76(4): 491-499
50 Almaas et al. 1997. Eur J Pediatr. 156(6): 488-492
51 Finley et al. 1998. Protein Sci., 7, 2391-2397
52 Acworth 2003 The Handbook of Redox ESA Inc Chelmsford USA: 110 & 397
53 Claesson 1963 Ft. Belvoir: Defense Technical Information Center
54 Feng & Nansheng 2000 Chemosphere 41: 1137-1147
P. L. H. McSweeney, P. F. Fox 2009 Advanced Dairy Chemistry: Volume 3: Lactose, Water, Salts and
Minor Constituents: 633

55 Bolm et al. 2004 Chem. Rev. 104: 6217-6254
56 Qian et al. 1999 Free Radic Biol Med. 26(11-12):1447-56
57 Tabner et al. 2011 Int J Alzheimer's Disease Article ID 546380, 6 pg
58 Valentine 1994 in Bioinorganic Chemistry (University Science Books, Mill Valley, California): 253-314
59 PerkingElmer 2008 An introduction to Phosphorescence Spectroscopy
60 Mendoza, 2008. TAILORING ACTIVATED CARBONS AS CATALYST FOR CATALYTIC WET AIR
OXIDATION OF PHENOL. Dissertation Tarragona
61 Vicente et al. 2005 J Chem Technol Biotechnol 80: 1031-1035
62 Laoufi et al. 2008 Global NEST Journal, Vol 10, No 3, pp 404-418
63 Mathews & Walker 1909 J Biol Chem 6: 21-28
64 Harrison 1924 Biochem J 18(5): 1009-1022
65 Jameson et al. 1988 J Chem Soc Dalton Trans 943-946
66 Bent & Hayon 1975a J Am Chem Soc 97(10): 2599-2606
67 Church et al. 2000 Appl Env Microbiol 66(2): 455-466
68 Wander et al. 2009 Am J Hum Biol 21: 192-197
69 Morikawa 2010 Appl Microbiol Biotech 87(5):1595-1603