

Innovationen dank Proteomics

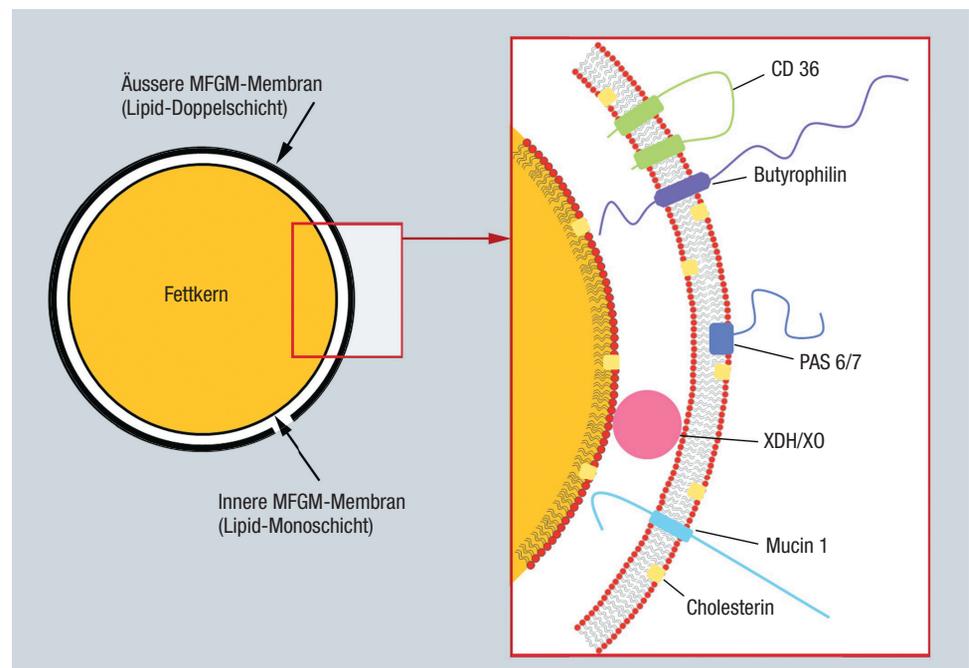
Mit Proteomics-Methoden werden die Proteine von Lebensmitteln erforscht. An der Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux wird so die Milchfettkugelchenhülle und die Aromabildung in Käse untersucht.

Stefan Irmeler, Charlotte Egger.* Die Gesamtheit aller Proteine (Eiweisse) eines biologischen Systems bezeichnet man als Proteom. Anfang der 90er-Jahre des letzten Jahrhunderts entstand Proteomics als eine wissenschaftliche Disziplin, um diese Gesamtheit aller Proteine qualitativ und quantitativ zu erforschen. Moderne Proteomics-Methoden basieren auf biochemischen Trennverfahren wie die zweidimensionale (2-D) Gelelektrophorese und Flüssigchromatographie, welche mit Massenspektrometrie und Bioinformatik gekoppelt sind.

Mit Proteomics-Methoden werden komplexe Mischungen mit vielen hundert Proteinen gleichzeitig analysiert und erlauben damit einen umfassenden Einblick in die Proteinwelt eines Systems. Proteine sind nicht nur zentraler Bestandteil von Organismen, sondern auch zahlreicher Lebensmittel, weshalb diese Methoden auch wirkungsvoll für die Untersuchung von Lebensmitteln eingesetzt werden können.

Proteomics-Methoden

In einer 2-D-Gelelektrophorese werden Proteingemische in einem elektrischen Feld zuerst nach ihrem isoelektrischen Punkt und anschliessend nach ihrer Grösse aufgetrennt. Der isoelektrische Punkt eines Proteins bezeichnet den pH, bei welchem die Nettoladung des Proteins null beträgt. Nach der Auftrennung werden die Proteine mit Farbstoffen sichtbar gemacht. Mit dieser Methode können Hunderte von Proteinen in einem Gel aufgetrennt und dargestellt werden. Enthält die Probe stark hydrophobe, stark saure oder stark basische Proteine, ist die Trennung mittels 2-D-Gelelektrophorese oftmals schwierig. In solchen Fällen bietet es sich an, die Proteine vor der Auftrennung in kleinere Peptide zu



Schematische Darstellung der MFGM, bestehend aus einer einfachen und einer doppelten Lipidschicht, in welcher sich die Fettkugelchenhüllenproteine befinden. Hauptproteine sind Xanthinoxidase, Mucin 1, Butyrophilin, CD36, PAS 6/7 (Periodic acid Schiff 6/7) und Adipophilin. Mit Proteomics-Methoden wurden an der ALP mehr als hundert weitere Proteine nachgewiesen.

Représentation schématique des MFGM. Les MFGM sont constituées d'une couche de lipide simple et double, dans lesquelles se trouvent les protéines de la membrane lipidique. Les plus connues sont: Xanthinoxidase, Mucin 1, Butyrophilin, CD36, PAS 6/7 (Periodic acid Schiff 6/7) et Adipophilin. Grâce aux méthodes protéomiques, plus d'une centaine de protéines ont été identifiées à l'ALP.

spalten. Da sich Peptide in Grösse, Ladung, Löslichkeit und Bindungsaffinität unterscheiden, können sie mit physikalischen Trennmethoden getrennt werden.

Proteine und Peptide können mit Massenspektrometrie identifiziert werden. Dazu werden die Proteine aus einem Gel geschnitten und chemisch oder enzymatisch zu Peptiden zerkleinert. Deren Grösse kann mit einem Massenspektrometer bestimmt werden. Man erhält ein Massenspektrum, welches mithilfe von Computern ausgewertet wird. Spezielle Computerprogramme wandeln die Erbinfor-

mation zu Proteinen um, zerlegen diese dann in Peptide und berechnen deren Masse. Durch einen Vergleich der gemessenen Massenspektren mit den theoretischen können die Peptide und somit das Protein identifiziert werden.

Fettkugelchenhüllenproteine in Buttermilch

Die Milchfettkugelchenhülle MFGM (milk fat globule membrane) umhüllt die Fetttropfen in der Milch und ist für den emulgierten Zustand des Milchfettes verantwortlich. Die Zusammensetzung und die Struktur der MFGM sind bisher nicht restlos aufgeklärt.

Nach derzeitigem Kenntnisstand besteht die MFGM unter anderem aus einer proteinhaltigen Lipiddoppelschicht, deren Hauptbestandteile Fettkügelchenhüllenproteine sowie Phospho- und Glykolipide sind. An der Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP) werden die noch wenig erforschten Fettkügelchenmembranproteine mit Proteomics näher untersucht, da diese Proteine grosses Potenzial für neue, natürliche Produkte mit einzigartigen technologischen und gesundheitsrelevanten Eigenschaften besitzen.

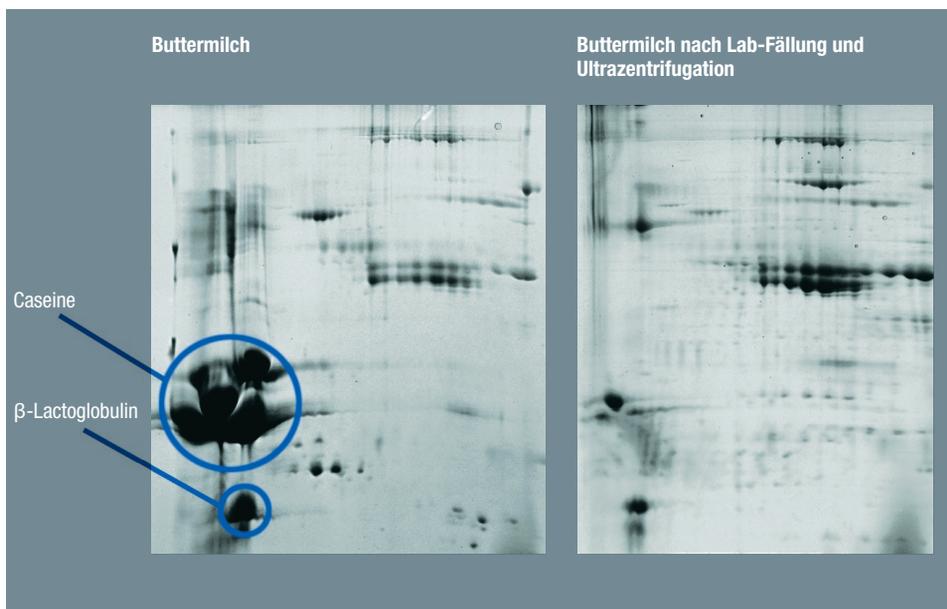
Werden Proteine von Milchprodukten per Gelelektrophorese analysiert, sieht man vor allem die sechs Hauptproteine α -, β -, κ -Casein, β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin und bovines Serumalbumin. Auch in Buttermilch, welche als Nebenprodukt bei der Butterherstellung anfällt, sind Caseine und Molkenproteine die Hauptproteine. Allerdings sind im Vergleich zu Milch die Fettkügelchenhüllenproteine angereichert. Daher ist Buttermilch ein sehr geeignetes Ausgangsmaterial, um die Eigenschaften dieser Proteine näher zu untersuchen.

Um die Fettkügelchenhüllenproteine, welche nur in Spuren vorkommen, mit einem Proteomics-Ansatz möglichst umfassend zu entschlüsseln, ist es notwendig, zuerst die in grossen Mengen vorhandenen Caseine und Molkenproteine abzutrennen.

Eine Möglichkeit, Caseine abzutrennen, ist die Fällung dieser Proteine mit Lab. Nach der Behandlung der Buttermilch mit Lab wurden die gefällten Proteine entfernt und der verbleibende Rückstand einer Ultrazentrifugation unterworfen, um die Fettkügelchenhüllenproteine zu sedimentieren. Die 2-D-Gelelektrophorese zeigte, dass mit einer Kombination aus Lab-Fällung und Ultrazentrifugation der grösste Teil der Caseine und Molkenproteine aus der Buttermilch abgetrennt wurde.

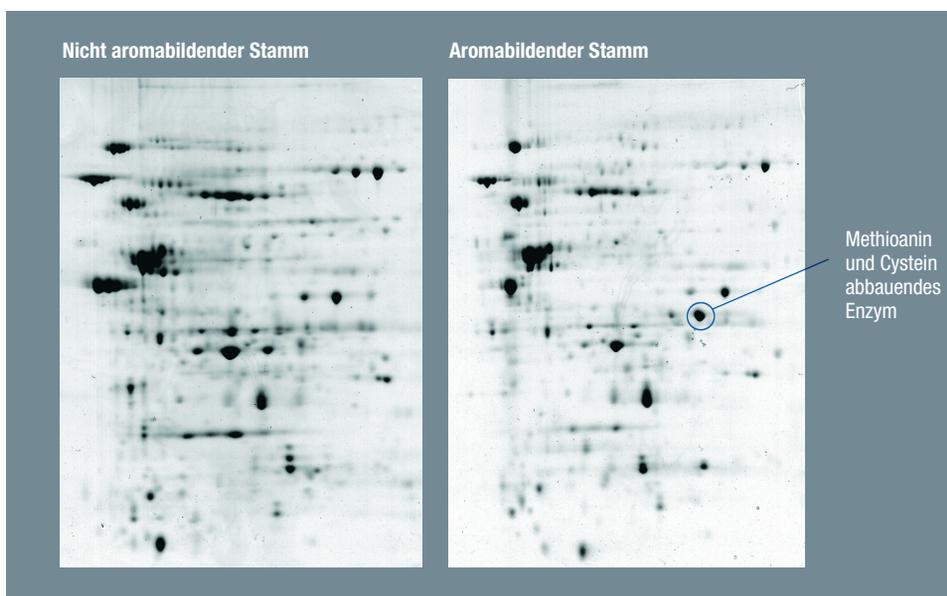
Mit der anschliessenden Massenspektrometrie wurden neben den bereits bekannten Fettkügelchenhüllenproteinen Butyrophilin, Xanthinoxidase, Mucin-1 und Adipophilin mehr als hundert weitere Proteine gefunden. Die Funktionen dieser Proteine sind bislang unbekannt und werden gegenwärtig erforscht.

Die Erkenntnisse aus diesen Proteomics-Untersuchungen können von Züchtern, Pro-



Auftrennung von Proteinen mittels 2-D-Gelelektrophorese. Caseine, welche einen Hauptbestandteil von Buttermilch ausmachen, wurden mit einer Lab-Behandlung aus der Probe entfernt. So werden die in Spuren vorhandenen Fettkügelchenhüllenproteine angereichert.

Séparation des protéines du babeurre avant et après traitement à la présure au moyen du gel d'électrophorèse en 2D. La caséine, principal constituant du babeurre, a été séparée de l'échantillon, afin que les protéines de la membrane lipidique soient concentrées et visibles sur le gel.



Vergleichende 2-D-Gelelektrophorese von zwei Bakterienstämmen mit unterschiedlicher Bildung von flüchtigen schwefelhaltigen Aromakomponenten. Das Protein im blauen Kreis wurde nur in aromabildenden Stämmen nachgewiesen und konnte mit Massenspektrometrie als Cystathioninlyase identifiziert werden. Es spaltet Methionin und Cystein und setzt dadurch flüchtige schwefelhaltige Aromaverbindungen frei.

Gels d'électrophorèse en 2D comparatifs entre deux espèces, l'une produisant des composantes aromatiques soufrées volatiles, l'autre pas. La protéine dans le cercle bleu a été révélée uniquement dans les espèces formant des composants aromatiques et a pu être identifiée comme Cystathioninlyase grâce à la spectrométrie de masse. Elle scinde la méthionine et la cytéine et libère ainsi des composés aromatiques.

duzenten und Verarbeitern vielseitig genutzt werden. So sind MFGM zum Beispiel anfällig für Modifikationen, und mit Proteomics ist es möglich, den Einfluss der Verarbeitung auf die Funktion und Struktur der Fettkügelchenhüllenproteine zu untersuchen. Dieser Ansatz erlaubt es zudem, die Gene, welche an der Bildung, Sekretion sowie der Zusammensetzung von Milch beteiligt sind, zu identifizieren und den Einfluss von Fütterung, Jahreszeit und genetischer Ausstattung von Rinderrassen auf die Milchezusammensetzung zu untersuchen.

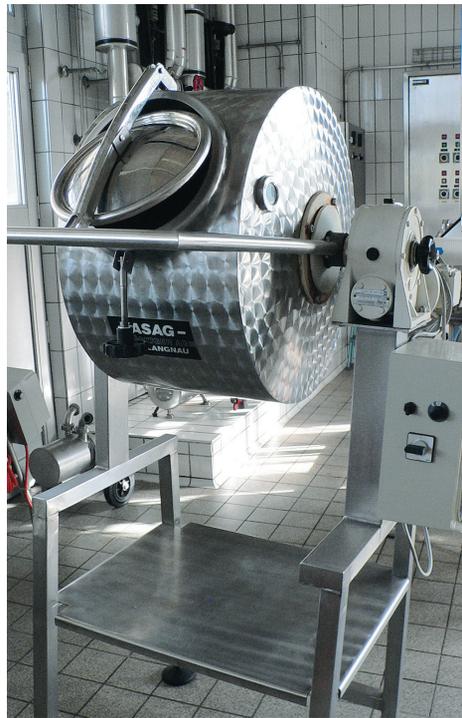
Bakterieller Aromastoffwechsel

Das Aroma von Käse wird wesentlich durch die Stoffwechselaktivität von Starterkulturen und der Rohmilchflora geprägt. An ALP wird die Aromabildung in Käse erforscht. So wurde beispielsweise in zahlreichen Rohmilchkäsen am Ende der Reifung *Lactobacillus casei*, ein fakultativ heterofermentatives Milchsäurebakterium, als wesentlicher Bestandteil der Käseflora identifiziert. Es ist daher naheliegend, dass diese Spezies entscheidend an der Aromabildung beteiligt ist und Potenzial hat, als Aromabildner für Halbhart- und Hartkäsesorten eingesetzt zu werden.

Die ALP-Bakterien-Stammsammlung enthält *L.-casei*-Stämme, welche die Fähigkeit haben, aus der Aminosäure Methionin, einem Bestandteil der Caseine, flüchtige aromaaktive schwefelhaltige Verbindungen zu bilden – auch *L.-casei*-Stämme, die diese für das Aromaprofil diverser Käse wichtigen Verbindungen nicht bilden können. Die vergleichende Proteomanalyse mit 2-D-Gelelektrophorese ist ein ideales Werkzeug, diesen Unterschied auf molekularer Ebene aufzuklären.

Beispielhaft sind in der Abbildung die Proteome von zwei Stämmen in der 2-D-Gelelektrophorese dargestellt. Einer der Stämme setzt flüchtige schwefelhaltige Aromaverbindungen frei, der andere nicht. Beim Vergleich der Proteinmuster wurde ein Protein gefunden, welches nur in aromaproduzierenden Stämmen vorhanden ist. Mit der Massenspektrometrie wurde das Protein als Cystathioninlyase identifiziert.

Cystathioninlyasen sind wichtige Enzyme im bakteriellen Schwefelstoffwechsel. Um die



Die Buttermilchproben für die Analyse der MFGM-Proteine wurden in der Pilothalle von ALP im traditionellen Batchverfahren im Kleinmassstab aus Rohrahm hergestellt.

Les échantillons de babeurre pour l'analyse des protéines MFGM ont été prélevés dans la halle pilote de l'ALP par un processus batch traditionnel à petite échelle à partir de crème crue.

biochemischen und katalytischen Eigenschaften des Enzyms besser zu verstehen, wurden grössere Mengen der Cystathioninlyase mit rekombinanter DNA-Technologie hergestellt. Die Analysen zeigten, dass das Protein tatsächlich Cystathionin, aber auch die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein spaltet, wobei aromaaktive flüchtige schwefelhaltige Verbindungen freigesetzt werden. So war es möglich, mit Proteomics ein Enzym zu identifizieren, welches an der mikrobiellen Aromabildung beteiligt ist und als Biomarker für die Selektion von aromabildenden Stämmen herangezogen werden kann. Zurzeit wird in Käseversuchen untersucht, ob *Lactobacillus casei*-Stämme, die das Protein von Natur aus in grossen Mengen herstellen, sich als aromabildende Kulturen verwenden lassen.

**Die Autoren arbeiten an der Forschungsanstalt ALP Liebefeld-Posieux, Bern.*

Sciences du lait

Innovations grâce à la protéomique

La station fédérale de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux peut étudier l'enveloppe des particules de graisse du lait ou encore la formation d'arômes dans le fromage grâce aux méthodes protéomiques. Celles-ci ont été développées dans les années 90 afin d'analyser quantitativement et qualitativement l'ensemble des protéines d'un système biologique, appelé les protéomes. Les méthodes modernes sont basées sur des procédés de séparation biochimiques tels que le gel d'électrophorèse en deux dimensions et la chromatographie en phase liquide, associés à la spectrométrie de masse et la bio-informatique. Ainsi, les divers peptides et protéines peuvent être identifiés, permettant également l'étude des produits alimentaires.

La membrane globulaire de la graisse du lait (en anglais milk fat globule membrane MFGM) englobe les particules de graisse dans le lait et est responsable du stade émulsifié de la graisse du lait. La composition de cette MFGM n'a jusqu'à aujourd'hui pas totalement été élucidée. La station fédérale de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP) analyse de plus près les membranes protéiques des particules de graisse, car ces protéines représentent un grand potentiel pour de nouveaux produits naturels. Les MFGM sont par exemple très sensibles à des modifications. Il est donc possible par les méthodes protéomiques d'étudier l'influence de la fabrication sur la fonction et la structure de ces protéines.

L'arôme du fromage est principalement dû à l'activité métabolique des cultures et de la flore du lait cru. Par exemple, le *Lactobacillus casei* est le principal constituant de la flore du fromage. La protéomique a permis d'identifier l'enzyme responsable de la formation de substances aromatiques, appelé cystathioninlyase. Désormais, cet enzyme pourrait être utilisé comme biomarqueur pour la sélection des souches de bactéries qui développent des arômes. *Stefan Irmeler, Charlotte Egger, ALP Liebefeld-Posieux*