

Projectnr.: 71.988.01 en 72.109.01

Titel project: Expertise ontwikkeling eiwit identificatie-technieken

Projectleiders: R. Frankhuizen en mw. M. Bremer

Rapport 2006.014

november 2006

Identificatie van plantaardige eiwitten in magere melkpoeder

D. Luykx, J. Cordewener¹, S. van Steenis, P. Ferranti², R. Frankhuizen,
M. Bremer, H. Hooijerink en T. America¹

¹ PRI - Plant Research International, P.O. Box 16, 6700 AA Wageningen

² University of Naples, Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Edificio 84, Portici, Italy

Business Units: Analyse & Ontwikkeling en Veiligheid & Gezondheid

Clusters: Authenticiteit & Identiteit en Biomoleculaire Detectie

RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Tel: 0317-475422

Fax: 0317-417717

Internet: www.rikilt.wur.nl

Copyright 2006, RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid.

Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid is het niet toegestaan:

- a) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport gedeeltelijk te publiceren of op andere wijze gedeeltelijk openbaar te maken;
- b) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport, c.q. de naam van het rapport of RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid, geheel of gedeeltelijk te doen gebruiken ten behoeve van het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin;
- c) de naam van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid te gebruiken in andere zin dan als auteur van dit rapport.

VERZENDLIJST

Plant Research International (dr. J. Cordewener en dr. T. America)

INHOUDSOPGAVE	blz
SAMENVATTING	3
AFKORTINGEN	4
1 INLEIDING	5
2 IMMUNOBLOTTING	7
2.1 Inleiding	7
2.2 Materialen en methoden	7
2.3 Resultaten	8
2.4 Conclusies	10
3 VOORSCHIEDING PLANTAARDIGE/MELK EIWITTEN	11
3.1 Inleiding	11
3.2 Voorextractie	11
3.3 HPLC	12
3.4 Conclusies	13
4 MASSASPECTROMETRIE	14
4.1 MALDI-TOF MS	14
4.1.1 Inleiding	14
4.1.2 Matrix en opbrengmethode	15
4.1.3 MALDI-methode Wageningen Universiteit	15
4.1.4 MALDI-methode Universiteit Napels	16
4.1.5 Oplosbaarheid van eiwitten	16
4.1.6 MALDI TOF MS metingen	17
4.1.7 MALDI TOF MS metingen na HPLC-voorscheiding	18
4.1.8 Conclusies	19
4.2 LC-MS	20
4.2.1 Inleiding	20
4.2.2 Targeted LC-MS	21
4.2.2.1 Materialen en methoden	21
4.2.2.2 Resultaten	21
4.2.2.3 Conclusies	23
4.2.3 Untargeted LC-MS(/MS)	23
4.2.3.1 Materialen en methoden	23
4.2.3.2 Resultaten	24
4.2.3.3 Conclusies	30
4.2.4 Untargeted LC-MS/MS na HPLC-voorscheiding	31
4.2.4.1 Materialen en methoden	31
4.2.4.2 Resultaten	31
4.2.4.3 Conclusies	32
5 CAPILLAIRE ELECTROFORESE	33
5.1 Inleiding	33
5.2 Materialen en methoden	33
5.3 Resultaten	33
5.4 Conclusies	35
6 CONCLUSIES	36

7	AANBEVELINGEN	38
8	REFERENTIES	39
BIJLAGEN		
Bijlage 1	Overzicht molecuulmassa's van melk- en plantaardige eiwitten	
Bijlage 2	Aminozuursequenties van verschillende soja glycinine subeenheden	
Bijlage 3	Eigenschappen van melkeiwitten	

SAMENVATTING

De EU subsidieert het gebruik van magere melkpoeder (MMP) in diervoeders. Een voorwaarde is wel dat de melkpoeder aan een aantal specificaties voldoet. Het RIKILT controleert deze specificaties in opdracht van de AID. Er zijn aanwijzingen dat er misbruik wordt gemaakt van het subsidiabel MMP gehalte door middel van het toevoegen van plantaardige eiwitten en/of eiwithydrolysaten. Deze eiwitten zijn niet toegestaan en kunnen met de huidige analysetechnieken niet of in onvoldoende mate worden gedetecteerd. Om eiwitbevestigingsmethoden op te zetten is medio 2005 binnen het RIKILT een Taskforce 'Eiwitdetectie' opgestart. Omdat het RIKILT niet alle expertise in huis heeft om deze methodieken op te zetten is samenwerking gezocht met Plant Research International, Universiteit van Napels (Italië), Wageningen Universiteit, Universiteit Utrecht en NIZO. Voor het kunnen screenen en identificeren van plantaardige eiwitten in MMP zijn een aantal technieken gekozen om nader te onderzoeken in de tweede helft van 2005. Dit betreft immunoblotting, voorscheidingen d.m.v. voorextractie of HPLC, MALDI TOF MS, targeted LC-MS, untargeted LC-MS(/MS) en capillaire electroforese. Hierbij is gebruik gemaakt van standaard MMP monsters waaraan al dan niet verschillende percentages (1 en 5% m/m) soja, erwten of tarwe eiwitpreparaten waren toegevoegd. Geconcludeerd kon worden dat immunoblotting een veelbelovende techniek is voor het screenen van plantaardige eiwitten in MMP. Met MALDI TOF MS bleek het niet mogelijk om lage percentages plantaardig eiwit aan te tonen in MMP indien aan intacte eiwitten werd gemeten. In combinatie met een voorscheiding en/of digesteren van de eiwitextracten zou deze techniek op termijn echter wel een goede en snelle screening kunnen opleveren. Voor het identificeren van soja, erwten en tarwe eiwit in MMP lijkt de 'targeted' LC-MS(/MS) benadering een geschikte methode. Voor het identificeren van plantaardige eiwitten in het algemeen is 'untargeted' LC-MS/MS in combinatie met een voorselectie van plantaardige eiwitten de meest geschikte benadering. Deze voorselectie kan via comparative LC-MS, verrijking van cysteïne bevattende peptiden en/of een voorscheiding (HPLC of voorextractie). Verwacht wordt dat na verdere optimalisatie en nader onderzoek de genoemde screenings- en/of identificatietechnieken een waardevolle bijdrage kunnen leveren aan het vaststellen van de authenticiteit en identiteit van MMP.

AFKORTINGEN

CAPS	N-Cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid
CBB	Coomassie brilliant blue
CE	Capillaire electroforese
Cys	Cysteïne
CZE	Capillaire zone electroforese
DAD	Photodiode array detector
DDA	Data dependent analysis
DDT	Dithiothreitol
2,5-DHAP	2,5-Dihydroxyacetophenone
E	Erwten eiwitproduct Pisane HD
EDTA	Ethyleendiaminetetra-acetaat
ESI	Electrospray ionisation
HCCA	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horse radish peroxidase
LC-MS	Liquid chromatography - massaspectrometrie
MALDI TOF	Matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight
MMP	Magere melkpoeder
MS	Massaspectrometrie
PB	Polybreen
PVS	Polyvinylsulfonaat
Q TOF	Quadrupole time of flight
S	Soja eiwitproduct
SA	Sinapinic acid
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SK	Soja eiwitproduct type K
SPE	Solid phase extraction
SS	Soja eiwitproduct Supro 500 E
T	Tarwe eiwitproduct
TFA	Trifluorazijnzuur
Tris	Trishydroxymethylaminomethane
TTS	50 mM Tris (pH 8.0) met 0.25 % Tween 20 en 150 mM NaCl

1 INLEIDING

In het kader van controle op gebruik van magere melkpoeder (MMP) in kunstmelkvoeder (KUVO, verordening 2799/99) onderzoekt het RIKILT ca. 800 monsters per jaar in opdracht van de AID. De kwaliteit en samenstelling van de verwerkte grondstoffen dient van interventie kwaliteit te zijn. Er zijn aanwijzingen dat er plantaardige eiwitten en/of eiwithydrolysaten (bijvoorbeeld soja, tarwe, erwten, maïs, etc.) worden toegevoegd aan het subsidiabel MMP terwijl dat niet is toegestaan.

Eiwithydrolysaten zijn mengsels van polypeptiden, peptiden en aminozuren. Ze worden verkregen door peptide bindingen in eiwitten te verbreken met behulp van proteases, via een hittebehandeling of zuurbehandeling, of een combinatie van behandelingen. Over het algemeen gebruikt men eiwithydrolysaten vanwege de hoge voedingswaarde (beter verteerbaar, minder allergen), en functionele (o.a. beter oplosbaar, stabiel) en biologische eigenschappen (o.a. regulering immuunsysteem, maag darm functies, bloeddruk). Om de plantaardige toevoegingen aan te tonen in MMP zijn diverse onderzoeksmethoden en vergelijkingsmodellen in de EU werkgroep voor Zuivel deskundigen besproken en in gang gezet. Tot nu toe heeft dit echter tot onvoldoende resultaten geleid. Op dit moment is een capillaire zone electroforese (CZE) methode de enige gevalideerde analyse methode voor de detectie van soja eiwitten. Hoewel met deze methode aan de hand van eiwitprofielen afwijkende eiwitten kunnen worden aangetoond kan echter niet met zekerheid worden gesteld dat dit plantaardige eiwitten betreft. Voor het RIKILT is het echter van belang dat er een juridisch waterdichte methode wordt ontwikkeld om de aanwezigheid van plantaardige eiwitten/eiwithydrolysaten in MMP vast te kunnen stellen. Het RIKILT kan hierdoor een belangrijke rol (toezicht en adviseur) binnen Europa gaan spelen gezien het belang bij de controle van grote subsidiestromen die verstrekt worden voor de verwerking van melkpoeder in kunstmelkvoeder binnen de EU.

Om expertise op te bouwen met betrekking tot eiwitbevestigingsmethoden is medio 2005 binnen het RIKILT een Taskforce 'Eiwitdetectie' opgestart. Om deze expertise sneller op te bouwen is samenwerking gezocht met universitaire vakgroepen, instituten en bedrijven. Er is contact gelegd met de Wageningen Universiteit, Universiteit Utrecht, Universiteit van Napels (Italië), Plant Research International (PRI) en het NIZO. Op dit moment is massaspectrometrie (MS), met of zonder een voorafgaande scheidingstechniek, de geeigende techniek voor het identificeren van eiwitten en peptiden. Met name LC-MS(/MS) en MALDI TOF MS in combinatie met digesteren zijn uitermate geschikt [1-5]. Met deze technieken zou een gedetailleerd beeld verkregen kunnen worden van de MMP eiwitsamenstelling zodat ongewenste eiwitten kunnen worden opgespoord. Uiteindelijk zijn voor het ontwikkelen van een geschikte methode om plantaardige eiwitten/hydrolysaten in MMP te kunnen screenen en/of identificeren een aantal technieken gekozen om nader te onderzoeken (Fig. 1).

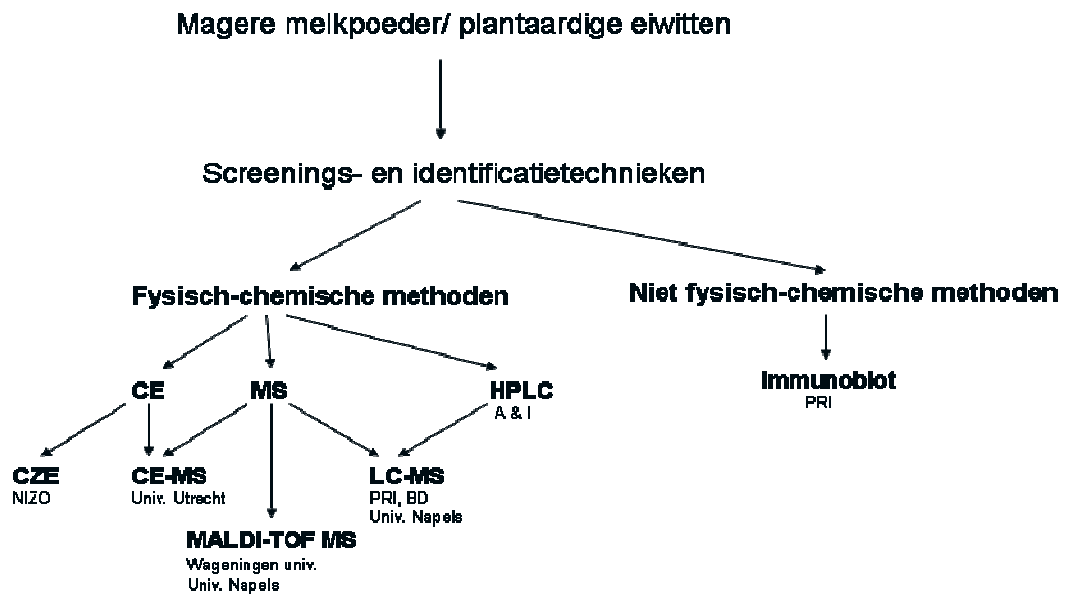


Fig. 1: Overzicht van de verschillende technieken en onderzoekspartners binnen dit onderzoek.

Er zal tijdens dit onderzoek gebruik worden gemaakt van standaard MMP monsters waaraan al dan niet verschillende percentages (1, 2 en 5%) plantaardige eiwitten/hydrolysaten zijn toegevoegd (vervaardigd door NIZO). Er is in eerste instantie gekozen voor plantaardig materiaal van soja, erwten en tarwe aangezien de verwachting is dat deze mogelijk gebruikt worden voor vermenging met MMP. Gezien de te verwachten problemen met de oplosbaarheid van sommige plantaardige eiwitten zal ook hier aandacht aan worden besteed.

De geschiktheid van de diverse technieken is onderzocht in de tweede helft van 2005 en de resultaten staan vermeld in dit rapport. Immunoblotting is toegepast voor het screenen van specifieke plantaardige suikers die aan de eiwitten gekoppeld kunnen zijn (hoofdstuk 2). Een techniek om de abundant melkeiwitten van de plantaardige eiwitten te kunnen scheiden zou het screenen/identificeren van de plantaardige eiwitten in MMP erg kunnen vergemakkelijken. In hoofdstuk 3 is daarom het onderzoek beschreven dat is gedaan naar een geschikte voorscheiding. De toepasbaarheid van MS m.b.t. de MMP problematiek staat centraal in hoofdstuk 4 waarbij zowel MALDI TOF MS als LC-MS wordt onderzocht. Bij LC-MS zijn meerdere benaderingen toegepast, waaronder 'targeted' en 'untargeted' LC-MS. Tenslotte, wordt in hoofdstuk 5 capillaire elektroforese (CE) behandeld als mogelijk geschikte screenings- en/of identificatietechniek. Het rapport wordt afgesloten met conclusies en aanbevelingen (hoofdstuk 6 en 7).

2 IMMUNOBLOTTING

2.1 Inleiding

Immunoassays maken gebruik van het feit dat men antilichamen kan maken die zeer specifiek bepaalde stoffen kunnen herkennen en binden. Immunoassays hebben als voordeel dat er snel en relatief goedkoop gescreend kan worden op bepaalde componenten. Daarnaast zijn immunoassays over het algemeen gevoelig en eenvoudig uit te voeren. Een van de beperkingen is echter dat het antilichaam zich soms ook aan andere stoffen bindt [6]. Vaak gaat het hierbij om stoffen met structurele verwantschap met de te onderzoeken stof. Dit noemt men kruisreactiviteit.

Plantaardige glyco-eiwitten kunnen xylose en fucose bevatten, suikergroepen die niet of nauwelijks voorkomen in dierlijke eiwitten. Hoewel fucose ook in wei-eiwitten (melk) voorkomt, is de suikergroep hier anders gebonden aan het eiwit. Een commercieel verkrijgbaar polyclonaal antilichaam tegen horseradish peroxidase (HRP) heeft de eigenschap dat het kan binden aan de specifieke plantaardige suikergroepen. Met behulp van dit antilichaam in een immunoblotting experiment is getracht om de aanwezigheid van plantaardig eiwit in melkpoeders indirect aan te tonen.

2.2 Materialen en methoden

De volgende monsters zijn tijdens dit onderzoek gebruikt:

- Standaard MMP, gepasteuriseerd (RIK0150581)
- MMP met 1% of 5% plantaardig eiwit (soja, erwten en tarwe)
- Tarwe eiwitisolaten SWP 100 en Solpro 050
- Verschillende plantaardige eiwitextracten van afd. Biomoleculaire Detectie (RIKILT)

Monstervoorbereiding en SDS-PAGE

10 mg monster werd opgenomen in 1 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8) en 5 min verwarmd bij 50°C. De eiwitoplossing werd verdund in SDS sample buffer en 5 min verwarmd bij 95°C. Vervolgens werden de eiwitmonsters gerund op een 12.5 % SDS-PAGE gel en gekleurd met Coomassie Brilliant Blue (CBB).

Immunoblotting

De eiwitten uit de SDS-PAGE gel werden overgeblot naar nitrocellulose m.b.v. een BioRad blotapparaat (blotbuffer: 10 mM CAPS (N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid), 10 % ethanol). Vervolgens werd de blot 1 uur geïncubeerd met 2 % BSA in 50 mM Tris (pH 8.0) met 0.25 % Tween 20 en 150 mM NaCl (TTS), en 1 uur met rabbit anti-HRP (Rockland), 1:1000 verdund in 1 % BSA in TTS. Na wassen met TTS werd de blot 1 uur geïncubeerd met goat anti-rabbit HRP (Rockland), 1:1000 verdund in 1 % BSA in TTS. Na wassen werd de blot ontwikkeld met de chemiluminiscentie reagentia van Pierce en gescand met de Lumi-Imager.

2.3 Resultaten

Fig. 2A laat de eiwitprofielen zien van een CBB-gekleurde gel waarop de verschillende melkpoeders zijn gerund. Opvallend is dat het loopgedrag van de abundante eiwitten rond 30 kDa (caseïnes), 18 kDa (β -lactoglobuline) en 14 kDa (α -lactalbumine) verschilt tussen het standaard MMP en de melkpoeders waaraan plantaardig eiwit is toegevoegd. Fig. 2B laat de immunoblot met anti-HRP zien van dezelfde eiwitmonsters als in Fig. 2A. Alléén de melkmonsters die eiwitten van soja en erwt bevatten, vertonen een signaal met het antilichaam. De sterkte van het signaal lijkt goed te correleren met de hoeveelheid aanwezig plantaardig eiwit. Ook 1% plantaardig eiwit is goed detecteerbaar op de blot met chemiluminiscentie.

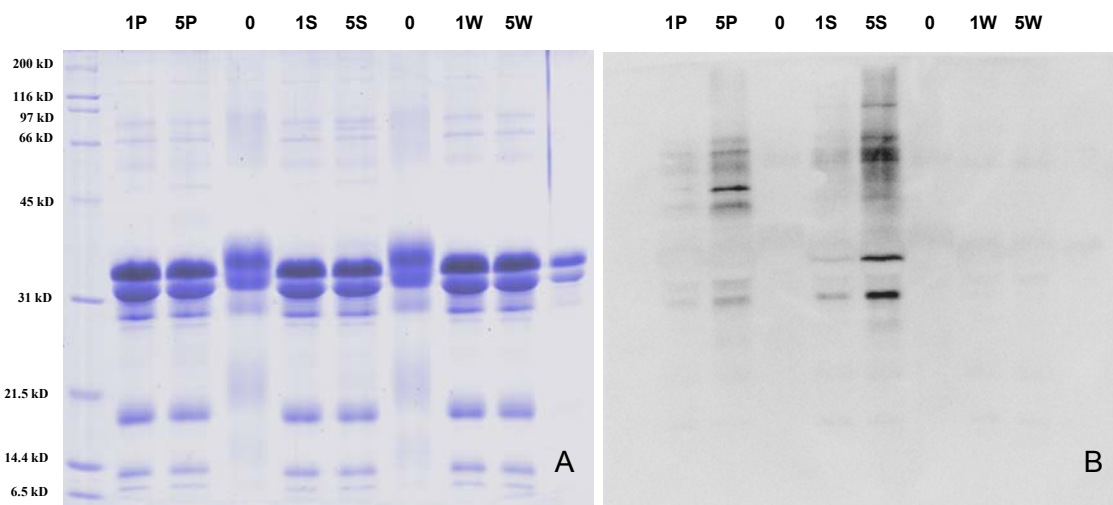


Fig. 2: CBB-gekleurde gel (A) en immunoblot (B) van MMP waaraan wel/geen plantaardige eiwitten zijn toegevoegd. Standaard MMP (0); MMP+1% erwt (1P); MMP+5% erwt (5P); MMP+1% soja (1S); MMP+5% soja (5S); MMP+1% tarwe (1W); MMP+5% tarwe (5W).

Er werd geen signaal gevonden bij het MMP dat tarwe-eiwitten (gluten) bevat. Een mogelijke verklaring hiervoor kan liggen in het feit dat het toegevoegde tarwepreparaat (SWP-100) een enzymatische “voorbehandeling” heeft ondergaan om de gluteneiwitten water-oplosbaar te maken. Tijdens deze behandeling zouden de eiwitten geknipt kunnen zijn tot kleinere eiwitten/peptiden en de suikerketens van de in tarwe aanwezige glyco-eiwitten verwijderd kunnen zijn. Om dit na te gaan, en om te kijken hoe algemeen de immunodetectie met anti-HRP te gebruiken is voor het screenen op plantaardig eiwit, werden vervolgens eiwitextracten van verschillende plantaardige herkomst getest. Deze extracten zijn verkregen/vervaardigd bij Biomoleculaire Detectie (RIKILT). In Fig. 3A is de CBB-gekleurde gel te zien en in Fig. 3B de corresponderende immunoblot. Behalve rozijnen geven alle plantenextracten een signaal op de blot, inclusief tarwe (# 36). Ook alle eiwitextracten in Fig. 4 geven een signaal met anti-HRP, behalve Solpro 050 (# 61). Solpro 050 is evenals SWP 100 een commercieel verkrijgbaar tarwepreparaat dat behandeld is om de gluteneiwitten oplosbaar te maken. Zowel Solpro 050 (Fig. 4A) als SWP 100 (Fig. 5A) geeft een smeer over de hele lengte van de CBB gekleurde gel, terwijl een niet behandeld gluten preparaat (Fig. 3A en Fig. 5A) discrete eiwitbanden vertoont. Deze onbehandelde tarwepreparaten geven ook discrete banden op de immunoblot, terwijl SWP 100 alleen onder in de gel enig signaal geeft met het anti-lichaam (Fig. 5B).

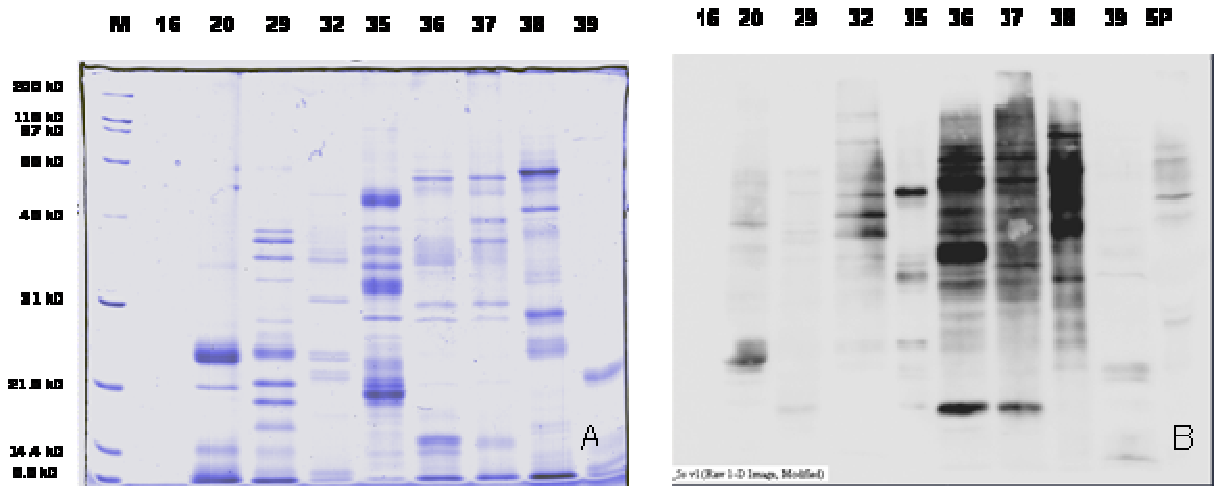


Fig. 3: CBB-gekleurde gel (A) en immunoblot (B) van plantaardige eiwitextracten. Rozijn (16); hazelnoot (20); panda (29); zonnebloem zaad (32); lupine (35); tarwe (36); rogge (37); maïs (38); haverhout (39).

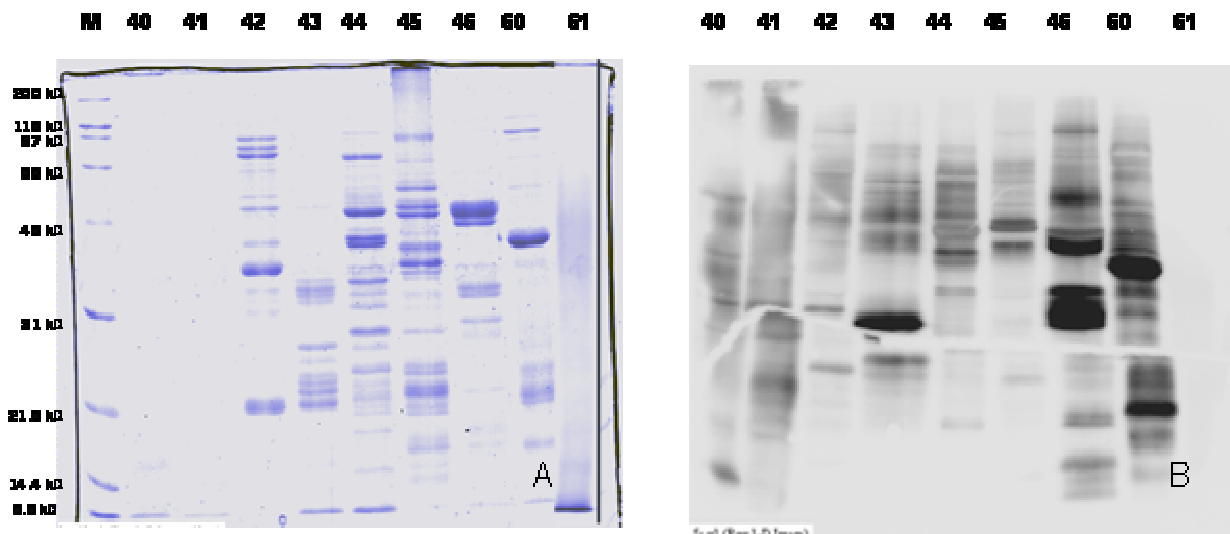


Fig. 4: CBB-gekleurde gel (A) en immunoblot (B) van plantaardige eiwitextracten. Gerst (40); rijst (41); soja (42); kikkererwt (43); erwt (44); linzen (45); witte bonen (46); aardappel (60); Solpro 050 (61).

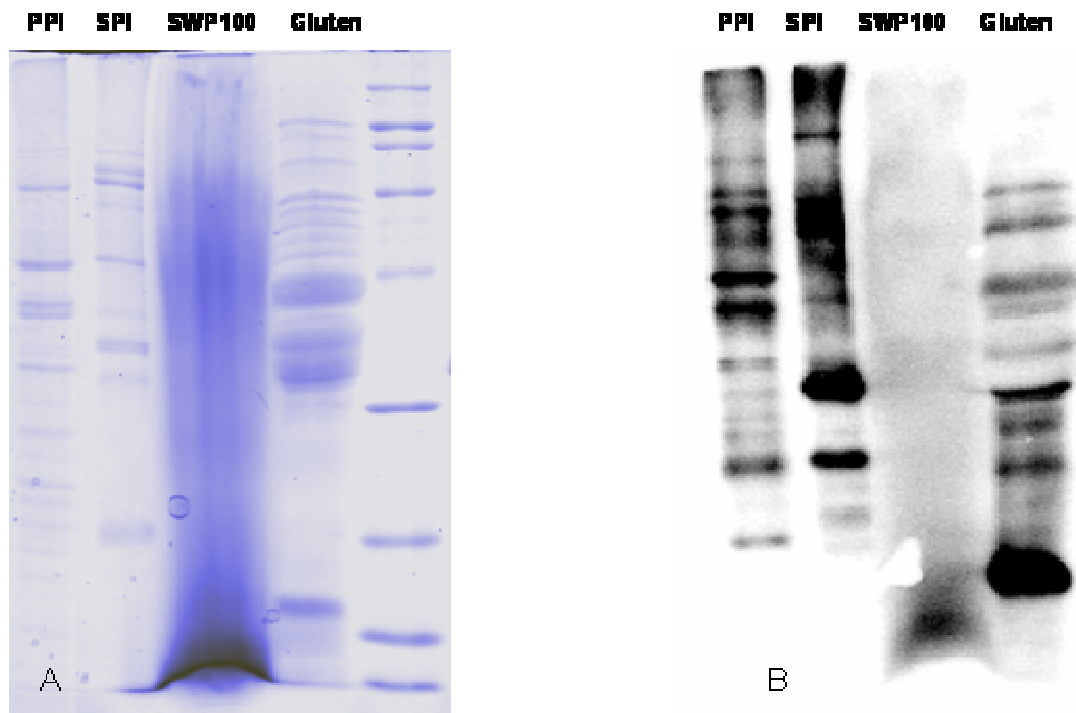


Fig. 5: CBB-gekleurde gel (A) en immunoblot (B) van plantaardige eiwitextracten. Erwt eiwitisolaat (PPI); soja eiwitisolaat (SPI); water-oplosbaar tarwe-eiwit (SWP 100); in ethanol-oplosbare glutenfractie van tarwe (Gluten).

2.4 Conclusies

De immunoblot methode met anti-HRP blijkt een snelle en voldoende gevoelige methode om planteneiwitten in MMP aan te tonen. Standaard melkpoeders geven geen signaal met het anti-lichaam, terwijl toevoeging van 1 % soja- of erwtisolaat goed aantoonbaar is in een immunoblot experiment. Alle geteste plantextracten (16) vertonen een signaal met anti-HRP, en bevatten dus glyco-eiwitten waarbij een fucose en/of xylose aanwezig is in de suikerketen. Daarnaast geven de verschillende plantenextracten verschillende bandenpatronen op de immunoblot. Op deze manier zou men aan de hand van het bandenpatroon een idee kunnen krijgen van de herkomst van het plantenmateriaal. Wanneer echter de tarwepreparaten enzymatisch/chemisch behandeld zijn (commerciële producten) lijkt de immunoblot analyse minder geschikt. Mogelijk zijn hierbij de suikerketens verwijderd of zijn de eiwitten dusdanig gehydrolyseerd dat de specifieke suikers nog gebonden zijn aan peptiden die vanwege hun lage moleculaire massa niet meer waarneembaar zijn op de gel en immunoblot. Het feit dat bij SWP 100 een band wordt aangetroffen onder in de gel bevestigt dit vermoeden (Fig. 5A). Uiteindelijk zullen meerdere commerciële plantaardige eiwitproducten en experimentele omstandigheden (blottijd, verschillende gels en blotmembranen) getest moeten worden om de geschiktheid van de immunoblot analyse te bevestigen.

3 VOORSCHIEDING PLANTAARDIGE/MELK EIWITTEN

3.1 Inleiding

Bij eventuele aangelengde MMP monsters worden lage hoeveelheden plantaardig eiwit verwacht. Hoeveelheden die variëren van 1 tot 5% zijn vanuit commercieel oogpunt nog steeds aantrekkelijk. Dit maakt echter het aantonen en/of identificeren van de plantaardige eiwitten tussen de bulk melkeiwitten gecompliceerd. Daartoe is onderzocht in hoeverre het mogelijk is om een scheiding tussen de plantaardige en melkeiwitten te bewerkstelligen. Dit zou uiteindelijk het screenen en/of identificeren van de plantaardige eiwitten met bijvoorbeeld massaspectrometrie kunnen vereenvoudigen. Als voorscheiding zijn twee verschillende methoden getest. De eerste methode betreft een voorextractie en de tweede methode een HPLC-scheiding.

3.2 Voorextractie

Er zijn twee verschillende voorextracties toegepast. De eerste extractie had als doel het verwijderen van de caseïnes uit MMP. Deze groep melkeiwitten beslaat een groot deel van de melkeiwitten aanwezig in MMP. Hiertoe werd 1 mg MMP afgewogen en opgenomen in 1 ml azijnzuuroplossing, pH 4.6. Onder deze condities zouden de caseïnes niet oplossen en de wei-eiwitten wel. Dit werd bevestigd via MALDI TOF MS (massa's) en RP-HPLC (chromatogram/profiel) (zie ook 3.3 en 4.1.6). Bij het testen van de plantaardige eiwitisolaten bij dezelfde condities bleek echter dat deze eiwitten ook grotendeels niet oplossen. Dit maakt deze methode minder geschikt als voorextractie.

Een andere voorextractie is gedaan met een 30 mM tetraboraat en 40 mM EDTA, pH 8.3 buffer (dinatriumtetraboraat-10-hydraat en Titriplex (Merck)). In deze buffer zouden melkeiwitten oplossen maar plantaardige eiwitten niet. Voor dit experiment werd 1 mg monster afgewogen en vervolgens opgenomen in 1 ml boraat EDTA buffer. Na vortexen, sonificeren en centrifugeren werd het supernatant gescheiden van de pellet. De overgebleven pellet werd opgelost in 500 µl 3M ureum met 5 mM DTT. Ook deze fractie werd weer gevortext, gesonificeerd en gecentrifugeerd. Zowel het supernatant als de in ureum/DTT opgeloste pellet werden gecontroleerd op aanwezigheid van de verschillende eiwitten met behulp van MALDI TOF MS (massa's) en RP-HPLC (chromatogram/profiel) (zie ook 3.3 en 4.1.6). Hierbij werd geen storing van de ureum ondervonden. Uiteindelijk bleek dat met behulp van de boraat buffer soja eiwitten goed waren te scheiden van de melkeiwitten. De soja eiwitten bevonden zich namelijk hoofdzakelijk in de pellet en de melkeiwitten in het supernatant. Erwten eiwitten waren echter gedeeltelijk te scheiden van de melkeiwitten. Deze plantaardige eiwitten bevonden zich namelijk in zowel de pellet als het supernatant na behandeling met boraat buffer.

3.3 HPLC

Er zijn verschillende HPLC-experimenten gedaan om de plantaardige eiwitten van soja, erwten en tarwe te scheiden van de melkeiwitten. Hierbij werd gebruik gemaakt van een Poros R2/10 perfusion RP-HPLC kolom (Applied Biosystems) met als eluens A 0.1% TFA en eluens B acetonitrile met 0.1% TFA. De verschillende eiwitmonsters werden voor injectie opgenomen in 3 M ureum (Fluka) met 5 mM DTT (Sigma), 1 min gevortext en 5 min gesonificeerd. De HPLC-instellingen zijn gevarieerd om een zo goed mogelijke scheiding tussen de diverse eiwitten te bewerkstelligen. De volgende instellingen gaven uiteindelijk een redelijk goede scheiding tussen de melkeiwitten van MMP en de verschillende plantaardige eiwitten (zie Fig. 6): kolomtemperatuur 60°C, flow 2 ml/min, detectie bij 214 nm en gradiënt programma volgens tabel 1.

Tabel 1: Gradiënt programma bij HPLC-scheiding

Tijd (min)	Eluens B (%)
0	5
1	5
2	35
4	45
5	45
6	80
7	80
8	5

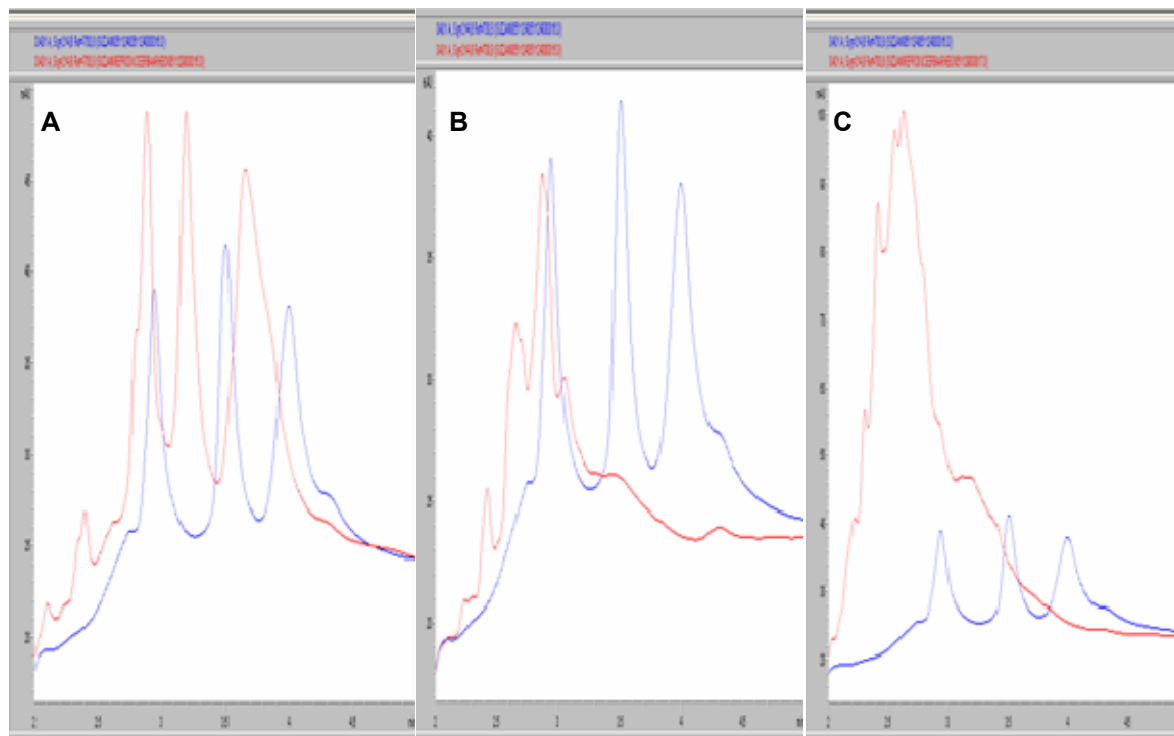


Fig. 6: HPLC chromatogrammen van MMP (blauw) en een soja eiwitproduct (rood) (A), erwten eiwitproduct (rood) (B) en tarwe eiwitproduct (rood) (C).

Deze HPLC-methode is tevens gebruikt om fracties op te vangen van zowel een MMP monster als soja eiwitproduct. Het opvangen van de fracties werd gestart nadat er 2 minuten van het gradiënt programma was verlopen, vervolgens werd er elke 20 seconden een fractie opgevangen. In Fig. 7 is het HPLC chromatogram van MMP en een soja eiwitproduct weergegeven samen met de verschillende opgevangen fracties. De fracties van beide producten zijn vervolgens met MALDI TOF MS onderzocht op de aanwezigheid van de verschillende eiwitten (zie Hoofdstuk 4.1.7).

De HPLC-runs zijn tevens in duplo uitgevoerd waarbij de overeenkomende fracties zijn gepooled. De opgevangen fracties (± 1.2 ml) werden vervolgens ingedampt met behulp van een Speedvac (Afdeling Toxicologie (RIKILT)). De fracties zijn dusdanig ingedampt dat er nog ca. 200 μ l van elke fractie over was. Om eventuele problemen met de eiwitoplosbaarheid te voorkomen is voorlopig nog niet verder geconcentreerd. De ingedampte monsters zijn vervolgens onderzocht met MALDI TOF MS en LC-MS (zie Hoofdstuk 4.1.7 en 4.2.4).

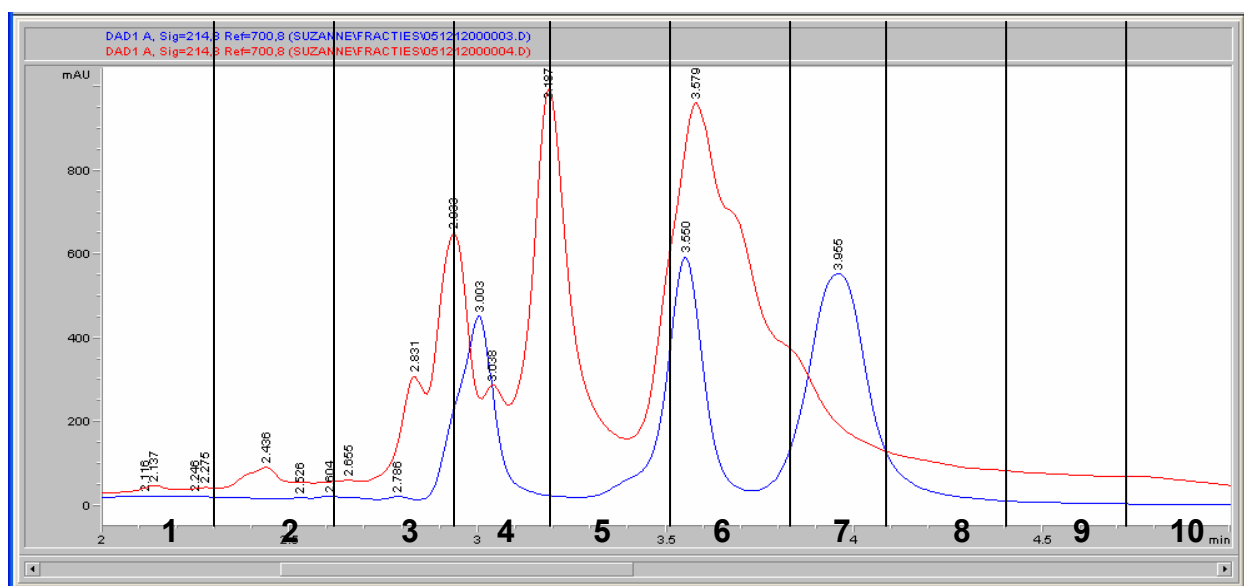


Fig 7: HPLC chromatogram van MMP (blauw) en soja eiwitproduct (rood) met de opgevangen 10 fracties van elk monster aangegeven.

3.4 Conclusies

Uit bovenstaande blijkt dat een voorscheiding d.m.v. een extractie bij lage pH niet afdoende functioneert. De extractie met behulp van boraat buffer lijkt daarentegen meer perspectief te bieden. De geschiktheid van deze extractie zal echter verder moeten worden onderzocht d.m.v. het controleren van de reproduceerbaarheid en het testen van meerdere plantaardige eiwitproducten. Daarnaast zal moeten worden nagegaan in hoeverre het nadelig is als plantaardige eiwitten deels oplosbaar en deels onoplosbaar zijn in de boraatbuffer (kwantitatieve aspect). Met behulp van HPLC is een redelijke scheiding te bewerkstelligen tussen de diverse plantaardige eiwitten en melkeiwitten. Mogelijk dat de scheiding nog meer geoptimaliseerd kan worden. Indien de eiwitconcentratie in de diverse HPLC-fracties voor massaspectrometrie doeleinden (zie Hoofdstuk 4.1.7 en 4.2.4) nog te laag blijkt te zijn zou verder concentreren nog een optie zijn. Tot nu toe zijn alleen HPLC-fracties van MMP of een soja eiwitproduct geanalyseerd, monsters MMP in aanwezigheid van soja, erwten of tarwe eiwit (bijv. 1, 5 en 50%) dienen nog onderzocht te worden.

4 MASSASPECTROMETRIE

Massaspectrometrie (MS) is een techniek waarmee een molecuul geïdentificeerd kan worden aan de hand van de molecuulmassa en/of het patroon van massa's van molecuulfragmenten (peptiden en aminozuren) die vervaardigd kunnen worden. Bij MS aan peptiden en eiwitten worden zwakke ionisatie technieken gebruikt om intacte gasfase ionen te verkrijgen. De Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI) en ElectroSpray Ionisation (ESI) ionisatie technieken worden op dit moment veelal toegepast bij het analyseren van biomoleculen [1-4]. Na ionisatie worden de ionen gescheiden op basis van hun massa/ladingsverhouding (m/z) waarna detectie volgt. In een MS-spectrum wordt de intensiteit van iedere m/z weergegeven.

4.1 MALDI-TOF MS

4.1.1 Inleiding

Bij MALDI-MS worden eiwitten en/of peptiden samen met een UV absorberende substantie (de matrix) op een vlakke metalen plaat gebracht [4]. Na drogen en uitkristalliseren wordt het monster in het hoogvacuüm van de ionenbron van de MALDI massaspectrometer geplaatst. Daarna worden de biomoleculen met behulp van een laser geïoniseerd naar de gasfase. Via MALDI worden over het algemeen enkelvoudig geladen ionen gevormd [7]. MALDI wordt vaak gecombineerd met een vluchttijd 'Time of Flight' massaspectrometer (TOF-MS). De geïoniseerde biomoleculen worden hierbij versneld en een veldvrije buis ingejaagd, met de detector aan het andere eind. In deze buis worden de moleculen gescheiden op basis van hun massa. Kleine moleculen bereiken de detector sneller dan grote moleculen.

MALDI-TOF MS wordt in het algemeen gebruikt voor de detectie en karakterisering van eiwitten, peptiden, oligosacchariden en oligonucleotiden, met molecuulmassa's tussen de 400 en 400000 Da. Het staat beschreven als een eenvoudige, accurate (0.01%) en gevoelige methode waarbij detectie van 10^{-15} tot 10^{-18} mol van een component in een zuiver preparaat mogelijk zou moeten zijn. Met MALDI-MS kunnen veel monsters binnen korte tijd geanalyseerd worden (ca. 100 monsters per uur) en de techniek is relatief ongevoelig voor zouten. MALDI-MS aan mengsels van eiwitten en peptiden kan uiteindelijk resulteren in complexe spectra waardoor het traceren van een bepaald ongewenst eiwit in een monster zeer moeilijk is. Een voorscheiding met bijvoorbeeld LC is dan gewenst. Het nadeel van MALDI-MS is echter dat een directe koppeling met LC zoals bij ESI-MS nog niet mogelijk is. Bij het analyseren van eiwitmonsters heeft MALDI-MS tevens als beperking dat het een semi-kwantitatieve methode is aangezien het detectiesignaal niet altijd evenredig toeneemt met de eiwitconcentratie. Ook ioniseren niet alle eiwitten even goed. Met name eiwitten die in kleine hoeveelheden aanwezig zijn in een eiwitmengsel en/of die een relatief hoge molecuulmassa hebben (> 25 kDa) ioniseren over het algemeen slechter. Daardoor is het moeilijk om kleine hoeveelheden van een relatief groot eiwit in een eiwitmengsel te detecteren.

Er is met betrekking tot het screenen en/of identificeren van plantaardige eiwitten in MMP nagegaan in hoeverre MALDI TOF MS een geschikte techniek daarvoor is. Voor dit onderzoek zijn in eerste instantie intacte eiwitmengsels gebruikt. Het idee was om te proberen op basis van de eiwitmolecuulmassa's de plantaardige eiwitten aan te tonen. Voordat aan de metingen werd begonnen is onderzoek gedaan naar een geschikte matrix en opbrengmethode voor optimale kristallisatie op de

MALDI-plaat. Daarnaast is gekeken naar een optimale (softwarematige) methode m.b.t. tot alle instellingen van de MALDI apparatuur en de oplosbaarheid van de diverse eiwitten.

4.1.2 Matrix en opbrengmethode

Verschillende matrices en opbrengmethoden zijn geprobeerd op de MALDI-plaat voor optimale kristallisatie van de eiwitmoleculen en goede MALDI-spectra. De matrices α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), sinapinic acid (SA) en 2,5-dihydroxyacetophenone (2,5-DHAP) zijn getest. HCCA zou het meest geschikt zijn voor massa's < 5 kDa, SA voor massa's > 3 kDa en 2,5-DHAP voor massa's tussen de 8 en 100 kDa. De standaard bereidingsmethode van Bruker is gebruikt, product informatie van de starter kit versie 17-12-03 en 2,5-DHAP versie 01-11-04. Van deze drie matrices gaf SA het beste resultaat wanneer er werd gemeten over een range van 10 tot 70 kDa. De signaal-ruis verhouding was hierbij het beste en de pieken het meest gelijkvormig.

Voor een optimale kristallisatie zijn ook drie verschillende methodes toegepast bij het aanbrengen van de monsters en matrix op de MALDI-plaat. Een methode was eerst het monster aanbrengen en direct daarop de matrix, een andere methode was eerst het monster aanbrengen en vervolgens de matrix en deze te mengen door beiden een paar keer op te zuigen m.b.v. een pipetpunt. De laatste methode wordt ook wel de sandwich methode genoemd waarbij eerst een laagje matrix wordt aangebracht die wordt gedroogd, vervolgens wordt het monster aangebracht en gedroogd en als laatste komt er nog een laagje matrix overheen. Tussen de eerste twee methodes waren niet zo heel veel verschillen te zien, alleen de kristal grootte van de spot was kleiner na het mixen van het monster met de matrix. De sandwich methode veroorzaakte soms een te dikke laag kristallen waar de laser niet doorheen kwam. Er is verder gegaan met de methode waarbij eerst het monster en daarna direct de matrix werd aangebracht.

4.1.3 MALDI-methode Wageningen Universiteit

De MALDI metingen bij de afdeling Levensmiddelenchemie aan de Wageningen Universiteit zijn uitgevoerd met de reeds bestaande standaard methode LP_44Da_25V op de UltraflexTM (Bruker Daltronics; A). Deze methode meet over een range van 10 tot 70 kDa. Wanneer er over deze range gemeten wordt zal het optimum qua signaal-ruis verhouding ongeveer in het midden van de range zitten (aangegeven met 44 Da in methode naam).

De monsters voor de MALDI-metingen betroffen: nieuwe standaard MMP (AI 69), soja eiwitproducten Supro 500 E en type K, erwten eiwitproduct pisane HD, tarwe eiwitproducten Solpro 050 en 508. In bijlage 1 is een overzicht te zien van de theoretische molecuulmassa's van de verschillende eiwitten in melk en van de plantaardige eiwitten. Omdat de meeste massa's van de gemeten monsters tussen de 10 en 30 kDa liggen (zie ook Fig. 8 en 9), is 'suppress up to' ingesteld op 3 i.p.v. 10 kDa. Nu worden alle moleculen met een massa boven de 3 kDa doorgelaten in plaats van alleen de moleculen met een massa van boven de 10 kDa. In deze methode is tevens het aantal laser shots verhoogd van 50 tot 150. Verschillende spectra van hetzelfde monster kunnen opgeteld worden, hierdoor wordt een hogere signaal intensiteit en lagere ruis verkregen. De gebruikte laser intensiteit hangt van het monster af, een zuiver eiwitpreparaat heeft een lagere laser intensiteit nodig voor een goed MALDI-spectrum dan een eiwitmengsel. De gebruikte laser intensiteit zit tussen 20 en 30% van de maximale intensiteit. De aangepaste methode is opgeslagen als LP_44Da_25V 3000 suppr.

4.1.4 MALDI-methode Universiteit Napels

De volgende MALDI-TOF MS apparatuur en instellingen werden gebruikt aan de Universiteit van Napels in Italië:

<i>Merk/type</i>	Applied Biosystems/ Voyager DE PRO (vertical TOF)	
<i>Mode</i>	Operation mode, linear Polarity, positive Extraction, delayed	
<i>Spectrometer</i>	Accelerating voltage, 25 kV	Grid voltage, 93%
	Guide wire voltage, 0.300%	Delay time, 750 nsec
	Mass range, 10 to 100 kDa	Low mass gate, 5 kDa
	Laser power, 3215	Shots/Spectrum, 150
<i>Matrix</i>	Sinapinic acid (10 mg/ml)	
<i>Monstervoorbereiding</i>	1 mg monster werd opgenomen in 1 ml 0.1% TFA, gevortext en gesonificeerd waarna 1 µl op MALDI-plaat werd gebracht. Vervolgens werd 1 µl matrix toegevoegd aan monsteroplossing. Uitkristalliseren volgde.	

4.1.5 Oplosbaarheid van eiwitten

Verschillende oplosmiddelen zijn gebruikt voor het testen van de oplosbaarheid van de erwten, soja en tarwe eiwitproducten (zie tabel 2). Aan de hand van MALDI-spectra (intensiteit pieken), HPLC metingen (piekintensiteit in chromatogram) en op het oog bleek 3 M ureum met 5 mM DTT (Ureum (Fluka) en Dithiothreitol (Sigma)) het beste oplosmiddel voor de verschillende eiwitmonsters. Ook is ureum en DTT te combineren met MALDI TOF MS, guanidine tast de MALDI-plaat aan.

Voor een MALDI-meting aan de Wageningen Universiteit wordt 1 mg monster opgenomen in 1 ml 3 M ureum met 5 mM DTT, 1 minuut gevortext en 5 minuten gesonificeerd. Voordat de monsters opgebracht worden op de MALDI-plaat wordt er 15 minuten 10.000 min^{-1} gecentrifugeerd en vervolgens 3 tot 6 keer verdund met 0.1% TFA. Wanneer er aan een zuiver eiwitpreparaat wordt gemeten kan er meer verdund worden dan wanneer er aan een eiwitmengsel wordt gemeten. In sommige gevallen is een verdunning van 6 keer voor een MMP monster al te veel en wordt er geen signaal verkregen met MALDI.

Tabel 2: Oplosbaarheid van erwten, soja en tarwe eiwitproducten in verschillende oplosmiddelen.

Oplosmiddel	Oplosbaarheid
0.1% TFA	Slecht
50 mM Tris HCl, pH 8	Slecht
30% ACN + TFA	Slecht
60% EtOH	Slecht
3 M Guanidine	Alleen tarwe goed
6 M Ureum	Goed
10 mM DDT	Alleen tarwe goed
3 M Guanidine + 5 mM DTT	Goed
3 M Ureum + 5 mM DTT	Goed
1% TFA	Slecht
5% ACN + 1% TFA	Slecht

4.1.6 MALDI TOF MS metingen

Een MALDI MS meting van een MMP monster geeft een massa spectrum waarin de specifieke massa's van de caseïnes en wei-eiwitten goed te onderscheiden zijn (zie Fig. 8). De caseïne en wei-eiwit pieken zijn opgesplitst in meerdere pieken dat is te wijten aan lactosekoppeling. Deze koppeling vindt plaats tijdens de melkpoederproductie (verhitte) en betekent een toename van de eiwitmassa van x maal 342 Da (molecuulmassa lactose), afhankelijk van het aantal lactose-groepen dat koppelt. MALDI MS spectra van de plantaardige eiwitisolaten zijn weergegeven in Fig 9. Hieruit blijkt dat er minder verschillende massa's worden aangetroffen dan bij MMP en dat er weinig massa's boven 20 kDa worden teruggevonden wat aan de hand van de literatuur niet werd verwacht (bijlage 1). De gevonden massa's overlappen voor een groot deel met de massa's van de melkeiwitten in MMP. Wanneer een plantaardig eiwitisolaat met MMP 1:1 wordt gemengd zijn de plantaardige eiwitpieken moeilijk terug te vinden tussen de melkeiwitpieken in het MALDI-spectrum (Fig. 10). Wanneer aan MMP met 5% plantaardig eiwit wordt gemeten zijn deze plantspecifieke eiwitten niet meer terug te vinden. Vanwege de massa overlap en de aanwezigheid van een te grote hoeveelheid melkeiwitten die tijdens de MALDI metingen het grootste deel van de laser energie wegnemen is voor het kunnen aantonen van de plantaardige eiwitten in MMP hier een voorscheiding noodzakelijk.

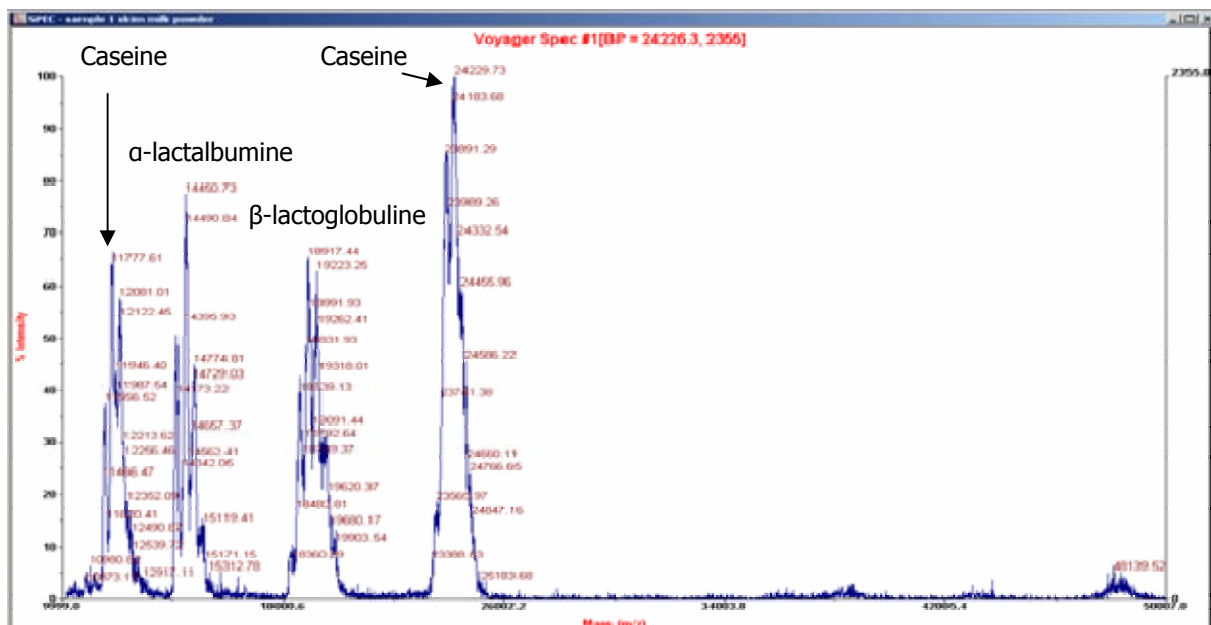


Fig. 8: MALDI TOF MS-spectrum van een standaard MMP over een range van 10-50 kDa (gemeten aan Universiteit van Napels). Te zien zijn de caseïnes rond 12 en 24 kDa, α -lactalbumine rond 14 kDa en β -lactoglobuline rond 19 kDa.

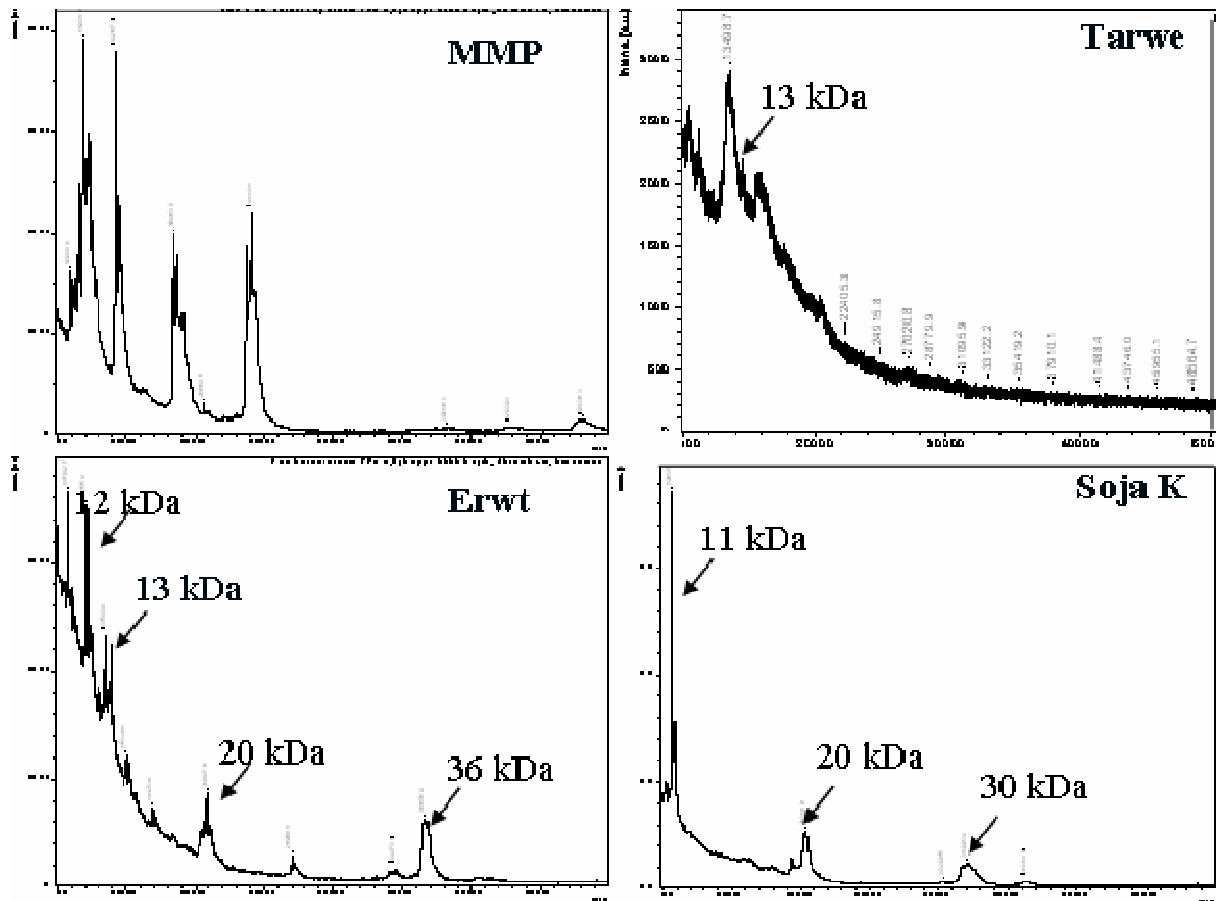


Fig. 9: MALDI TOF MS-spectra van MMP (range 10-70 kDa), tarwe, erwt en soja eiwitproducten (range 10-50 kDa) (gemeten aan Wageningen Universiteit).

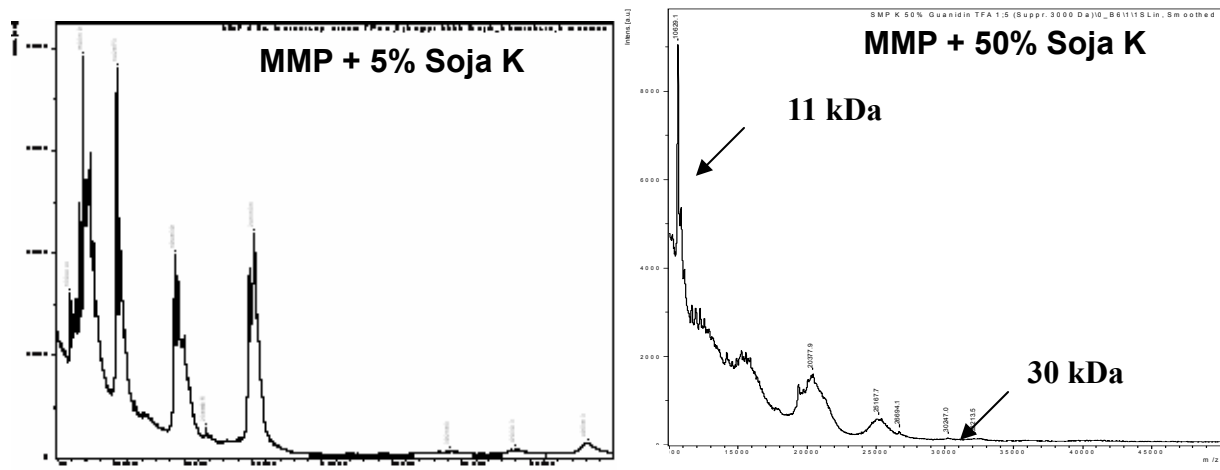


Fig. 10: MALDI TOF MS-spectra van MMP met 5% (range 10-70kDa) en 50% soja eiwit type K (range 10-50 kDa, soja pieken bij 11 en 30 kDa aangegeven).

4.1.7 MALDI TOF MS metingen na HPLC-voorscheiding

Er zijn MALDI TOF MS metingen gedaan aan opgevangen HPLC fracties van zowel een MMP als soja eiwitmonster dat over een HPLC-kolom is geweest (details beschreven in Hoofdstuk 3.3). Indien rechtstreeks werd gemeten aan de HPLC fracties werden geen pieken waargenomen in de MS spectra, de eiwitconcentraties waren te laag. Indien de HPLC fracties waren geconcentreerd (via speedvaccen)

werden echter wel pieken gedetecteerd in de MALDI-MS spectra (Fig. 11 en 12). In dit geval was de eiwitconcentratie voldoende hoog. In de afzonderlijke HPLC-fracties van het MMP monster werden verschillende melkeiwitten gevonden en in de afzonderlijke HPLC-fracties van het soja eiwitmonster werden verschillende soja eiwitten gevonden.

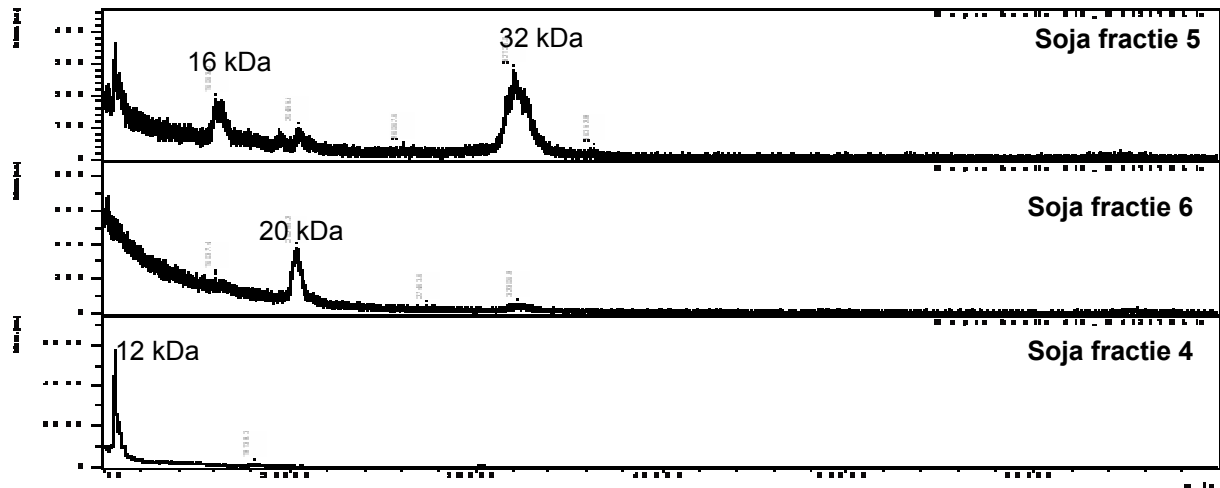


Fig. 11: MALDI TOF MS-spectra (massa range 10-70 kDa) van de geconcentreerde soja eiwit HPLC-fracties 4, 5 en 6.

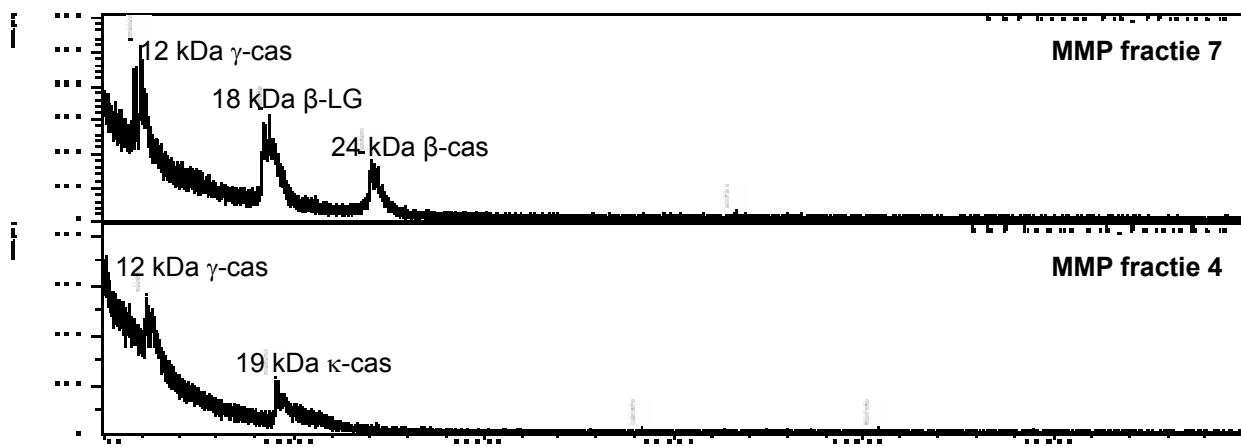


Fig. 12: MALDI TOF MS-spectra (massa range 10-70 kDa) van de geconcentreerde MMP HPLC-fracties 4 en 7.

4.1.8 Conclusies

MALDI TOF MS blijkt een snelle en eenvoudige techniek te zijn waarmee het mogelijk is om aan intacte eiwitmengsels te meten (zowel MMP als plantaardige eiwitproducten) Hoewel in de MALDI MS spectra van MMP met lage concentraties plantaardig eiwit ($\leq 5\%$) de pieken van de afzonderlijke melkeiwitten zichtbaar zijn, zijn de pieken van de plantaardige eiwitten niet aan te tonen. Om deze reden is een voorscheiding tussen de melk- en plantaardige eiwitten noodzakelijk. Met behulp van HPLC is het mogelijk om de eiwitten van MMP en plantaardige eiwitproducten (gedeeltelijk) te scheiden (Fig. 6). Tot nu toe zijn via MALDI MS verschillende melkeiwitten en soja eiwitten in HPLC fracties van respectievelijk MMP en een soja eiwitmonster aangetoond. MALDI MS metingen aan geconcentreerde HPLC fracties afkomstig van MMP monsters in aanwezigheid van lage concentraties

plantaardig eiwit na HPLC-scheiding moeten uitwijzen of de plantaardige eiwitten dan nog detecteerbaar zijn. Indien dit het geval blijkt te zijn zou MALDI TOF MS een goede screeningsmethode zijn. Het toekennen van een piek aan een plantaardig eiwit op basis van alleen de eiwitmolecuulmassa is echter vrijwel onmogelijk. Dit toekennen zou verbeterd kunnen worden door de eiwitten eerst te digesteren waarna met MALDI TOF MS een peptide fingerprint verkregen kan worden. Deze fingerprint is vervolgens toe te kennen via een zoekprocedure in een eiwitdatabase.

4.2 LC-MS

4.2.1 Inleiding

Bij ESI-MS wordt het monster opgelost in een vluchtig oplosmiddel. De oplossing wordt vervolgens via een dunne metalen capillair (naald) naar de massaspectrometer geleid [8]. Doordat er een hoge elektrische potentiaal (2-5 kV) tussen de capillair en ingang van de massaspectrometer is gezet worden kleine geladen druppeltjes gevormd tijdens het verlaten van de capillair. Door verdamping van het oplosmiddel worden de geladen druppeltjes steeds kleiner totdat uiteindelijk de te analyseren moleculen geladen geraken. De gevormde meerwaardig geladen ionen komen uiteindelijk in het hoge vacuüm van de massaspectrometer terecht waar ze worden gescheiden op basis van de m/z ratio [9]. Met ESI kunnen negatieve of positieve ionen verkregen worden. Eiwitten en peptiden worden meestal als positieve ionen geanalyseerd.

Doordat er meerwaardig geladen ionen worden gevormd bij ESI, kan er aan grote moleculen MS gedaan worden met relatief eenvoudige massa-analysatoren met een beperkt massa bereik. De meest gebruikelijke massa-analysatoren zijn een tripel quadropool, quadropool-TOF en ion-trap. ESI biedt een makkelijke en directe koppeling met scheidingstechnieken zoals HPLC (LC-MS). Op deze manier kunnen eiwitten en/of peptiden in een complex monster worden voorgescheiden. De uiteindelijke MS spectra kunnen desondanks behoorlijk complex zijn vanwege de aanwezigheid van meerwaardig geladen peptide/eiwit-ionen. Software is noodzakelijk om de bijbehorende molecuulmassa van het betreffende eiwit of peptide te berekenen (= deconvolutie). Bij ESI-MS is het achtergrond signaal in de MS spectra erg laag en de ontwikkeling van nano-LC-MS heeft geleid tot nog betere signaal-ruis verhoudingen [10]. De nadelen bij nano-LC-MS zijn echter relatief snel verstoppingen in de te gebruiken LC capillair en een instabiele spray. Via ESI-MS kan uiteindelijk zeer nauwkeurig de molecuulmassa worden bepaald (0.01-0.001%). Daarnaast is het een kwantitatieve methode die echter wel gevoelig is voor zouten.

Omdat het zeer moeilijk is om aan de hand van alleen de molecuulmassa een eiwit toe te kennen, kan een LC-MS peptide patroon uitkomst bieden. Daartoe wordt het eiwitmonster eerst in peptide-brokstukken geknipt (digesteren) waarna het peptidemengsel via LC-MS wordt geanalyseerd. In het uiteindelijke LC-MS peptide patroon kan vervolgens gericht gezocht worden naar al bekende peptiden met een specifieke massa en retentietijd (targeted LC-MS). Voor de identificatie van eiwitten/hydrolysaten in het algemeen zullen de peptiden gefragmenteerd (MS/MS) dienen te worden waarna de aminozuursequentie kan worden achterhaald (untargeted LC-MS/MS).

4.2.2 Targeted LC-MS

4.2.2.1 Materialen en methoden

De volgende monsters zijn gebruikt bij dit deel van het onderzoek:

- MMP, standaard, gepasteuriseerd (RIK0150581)
- Soja eiwitisolaten Supro 500 E en type K
- Erwten eiwitisolaat Pisane HD
- Tarwe eiwitisolaat SWP 100
- MMP met 5% soja, erwt of tarwe eiwit

De volgende LC-MS apparatuur en condities zijn gebruikt:

<i>HPLC-systeem</i>	Agilent 1100
<i>MS-detector</i>	Agilent, type LC/MSD SL
<i>LC-kolom</i>	Vydac 218TP52 (C ₁₈ -Reversed-Phase HPLC-kolom)
<i>Eluens</i>	A: Water + 0.2% mierenzuur B: Acetonitril + 0.2% mierenzuur Lineaire gradiënt van 0 naar 75% acetonitril

Monstervoorbewerking: 1 mg monster werd opgenomen in 200 µl 0.4% ammoniumbicarbonaat, pH 8.5 (gesteld met 10% NH₃). Voor het digesteren werd trypsine toegevoegd (ratio 1:50) waarna 6 uur incubatie bij 37 °C volgde. Hierna werd 5 µl gemengd met 15 µl mierenzuur (0.1%) en geïnjecteerd op de HPLC. In het geval van de tarwe eiwit monsters werd 1 mg opgenomen in 200 µl mierenzuur (5%) waarna 20 µl pepsine (1 mg/ml) werd toegevoegd voor digesteren. Twee uur incubatie bij 37 °C volgde. Vervolgens werd trypsine digestie toegepast voor injectie op HPLC.

4.2.2.2 Resultaten

De LC-MS metingen in Napels betroffen een ‘targeted’ benadering. Indien namelijk plantaardige eiwitten worden gebruikt voor bijmengen in MMP zijn deze zeer waarschijnlijk afkomstig van soja, erwt, tarwe, maïs en/of aardappel. In Napels is begonnen met het aantonen van soja eiwitten in MMP d.m.v. het selecteren/zoeken van specifieke soja peptiden na digesteren. Een belangrijk voordeel hierbij is dat de verkregen plantaardige peptiden beter oplosbaar zijn dan de oorspronkelijke intacte plantaardige eiwitten.

Na digesteren van soja eiwitisolaat Supro 500E werden tal van peptiden verkregen zoals aangegeven in het LC-MS chromatogram (Fig. 13A). Drie specifieke soja peptiden werden vervolgens geselecteerd/geëxtraheerd (op basis van molecuulmassa en retentietijd) die ook terug waren te vinden in het LC-MS peptide patroon van soja eiwitisolaat type K. De soja peptiden betroffen: peptide 1, massa 794 Da bij retentietijd 29.5 min (Fig. 13B); peptide 2, massa 714 Da bij retentietijd 32.3 min (Fig. 13C); peptide 3, massa 990 Da bij retentietijd 22.6 min (Fig. 13D).

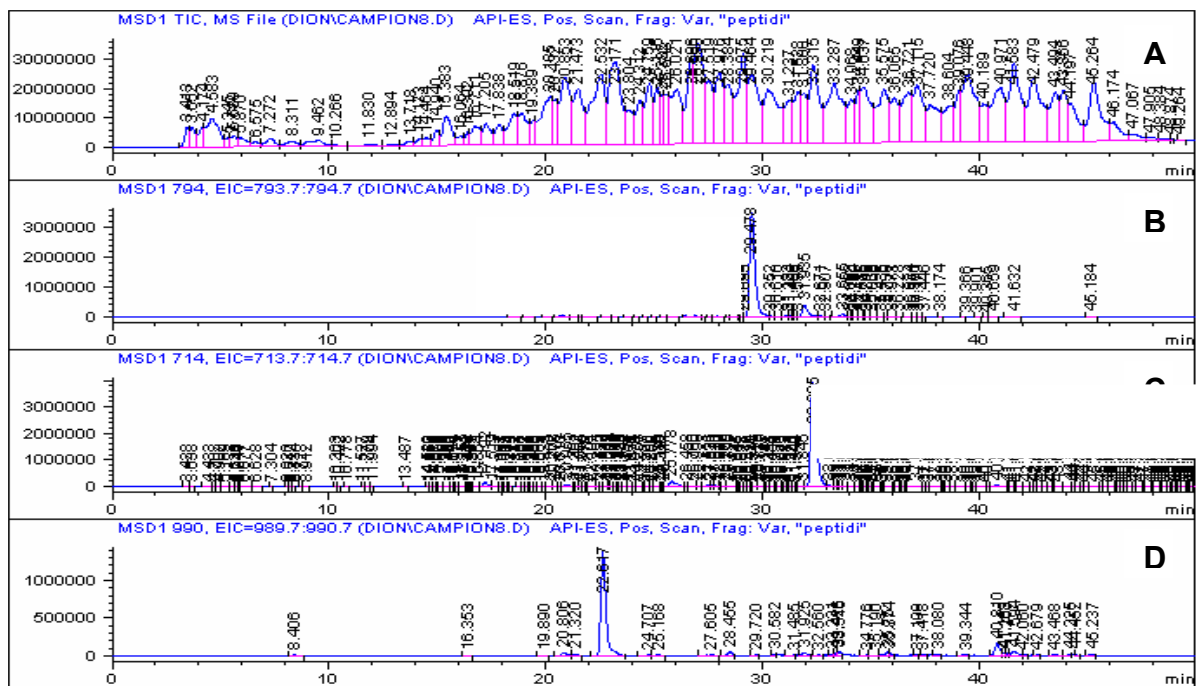


Fig. 13: LC-MS peptide patroon van soja eiwitisolaat SuproE (A) en geselecteerde soja peptiden 1, 2, 3 (B-D).

Deze drie specifieke peptiden werden niet teruggevonden in het LC-MS peptide patroon van het standaard MMP monster. In het LC-MS peptide patroon van MMP met 5% soja SuproE (Fig. 14) en MMP met 5% soja type K werden de specifieke peptiden echter wel gedetecteerd.

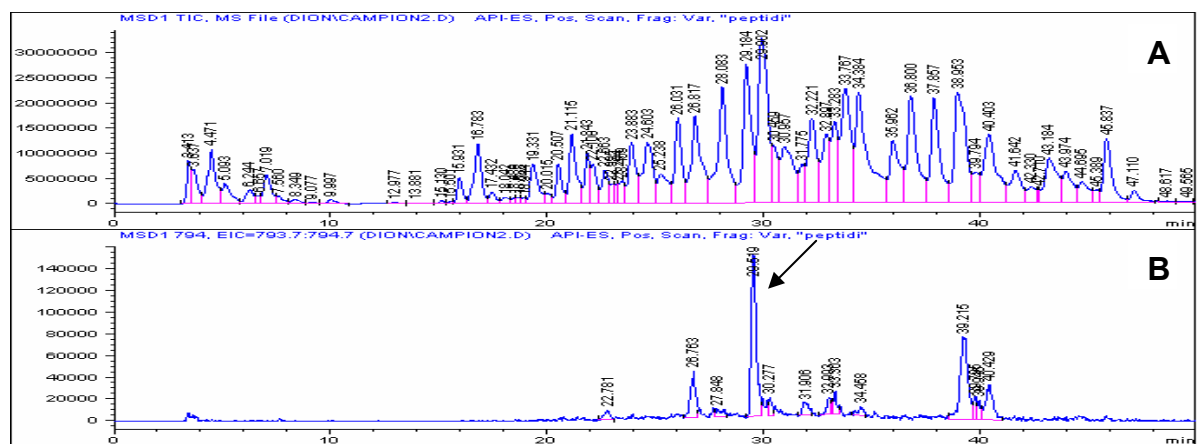


Fig. 14: LC-MS peptide patroon van MMP met 5% soja SuproE (A) en teruggevonden 794 Da peptiden waaronder het specifieke soja peptide 1 (B).

4.2.2.3 Conclusies

Op basis van de vrij eenvoudige ‘targeted’ LC-MS methode lijkt het mogelijk om lage concentraties soja eiwit (bijv. 5%) aan te tonen in MMP. De hierbij gebruikte screening op 3 specifieke soja peptiden zou nog geoptimaliseerd kunnen worden. Het is namelijk mogelijk dat andere soja peptiden nog specifiek zijn voor soja eiwitten. Daarnaast biedt het screenen op meer dan 3 peptiden meer zekerheid. De werkzaamheid van deze methode zou ook getest moeten worden voor MMP-monsters met 1% plantaardig eiwit (kwantitatieve aspect). Voor de identificatie van soja eiwit behoren de geselecteerde soja peptiden gefragmenteerd te worden via LC-MS/MS en de daaruit voortkomende aminozuursequenties moeten dan getoetst worden met sequenties in een eiwit database. Intussen zijn ook erwten en tarwe eiwitproducten gedigesteerd en geanalyseerd met LC-MS. De selectie van specifieke erwten en tarwe peptiden moet echter nog geschieden waarna de aan/afwezigheid van deze peptiden in MMP, MMP met erwt, MMP met tarwe en MMP met soja kan worden getest.

4.2.3 Untargeted LC-MS(/MS)

4.2.3.1 Materialen en methoden

Vrijwel alle experimenten zijn uitgevoerd met de monsters MMP, MMP met 5% erwten-eiwit (MMP+E), MMP met 5% soja-eiwit (MMP+S) en MMP met 5% tarwe-eiwit (MMP+T). Hierbij is van belang om op te merken dat op een later moment in het project werd ontdekt dat het MMP monster zelf afwijkend is van de meeste MMP “standaard” monsters. Waarschijnlijk is een afwijking ontstaan in de melkeiwitten tijdens de opslag van het monster. Deze afwijking is niet opgetreden bij de monsters waaraan het plantaardig materiaal was toegevoegd.

Van bovenstaande monsters zijn tryptisch digesten gemaakt. Vervolgens werden de peptiden geconcentreerd middels een C₁₈ micro-SPE spin kolom (Agilent C₁₈ evt. gevuld met POROS R2). In dit complexe peptidenmengsel is vervolgens gezocht naar de aanwezigheid van peptiden van plantaardige oorsprong. Hiervoor zijn verschillende trajecten mogelijk:

- 1) Niet-selectieve DDA (data dependent analysis) LC-MS/MS: verzamelt MS/MS spectra van de meest abundante peptiden
- 2) Meervoudig opeenvolgende DDA LC-MS/MS met een exclude list (eerste selectie wordt excluded in de tweede acquisitie, etc.), verzamelt ook MS/MS spectra van minder abundante peptiden.
- 3) Untargeted DDA LC-MS/MS met een vooraf vastgestelde exclude list van de bekende massa/retentietijd paren van de verwachte melkpeptiden (zodat voornamelijk afwijkende peptiden gefragmenteerd worden)
- 4) Comparative LC-MS (vergelijking peptide patronen) ter selectie van unieke peptiden (massa’s) per sample en vervolgens gerichte LC-MS/MS met een include list van de geselecteerde massa’s. Hierbij worden de unieke massa’s geselecteerd en vervolgens gericht geïdentificeerd.
- 5) Verrijking van een subset van de peptiden: isolatie van cysteïne (Cys) bevattende peptiden en vervolgens comparative LC-MS/MS zoals in traject 4. Caseïnes van melk bevatten namelijk in tegenstelling tot plantaardige opslageiwitten (vrijwel) geen Cys.

4.2.3.2 Resultaten

Methode 1: Niet-selectieve DDA leverde een lijst van peptide identificaties op waarbij alleen melkeiwitten werden gedetecteerd, zowel in het MMP monster als in MMP+E, MMP+S en MMP+T (tabel 3). De peptiden van plantaardige oorsprong waren in te lage concentratie aanwezig om te kunnen worden geselecteerd voor MS/MS.

Tabel 3: Overzicht van geïdentificeerde eiwitten na 1e run DDA, niet-selectief, van MMP monster

Peptide Matches	Coverage (%)	Mw (Da)	pI	Eiwit
12	26.17	24513.4	4.794	casein alpha S1
10	59.26	18297.4	4.638	lactoglobulin
8	17.57	26002.3	8.659	casein alpha S2
6	20.53	21255.9	6.356	kappa casein
5	39.84	14176.8	4.607	lactalbumin
2	6.16	16442.7	9.546	casein beta
2	3.46	52798.9	6.422	ImP DH
2	1.34	82483.6	5.04	ICDH
2	100.00	1383.7	6.941	ACE inhibitor

Methode 2: Opeenvolgende DDA MS/MS analyse met exclude list. Bij deze methode wordt hetzelfde monster meerdere keren geïnjecteerd, en wordt een exclude list opgebouwd van die massa/retentietijd paren waar al in de voorgaande runs MS/MS gegevens van verkregen zijn. Hierdoor wordt de lijst van geselecteerde massa's groter, en dus ook de kans dat de plantaardige verontreinigingen worden gedetecteerd. Bij meerdere analyses van het MMP monster worden een aantal extra peptiden gedetecteerd echter deze zijn van dezelfde melkeiwitten die reeds waren geïdentificeerd. Daarnaast wordt nu ook trypsine (toegevoegd voor de digestie) gedetecteerd. Bij de monsters MMP+S en MMP+E worden nu enkele peptiden gedetecteerd van plantaardige oorsprong (tabel 4). In het MMP+S monster worden 3 peptiden gevonden die "matchen" met glycinine (of proglycinine) (Fig. 15). In het MMP+E monster wordt 1 peptide gevonden dat "matcht" met viciline (uit erwt). NB. Opvallend is dat er ook enkele extra melkeiwitten zijn geïdentificeerd (n.l. PP3, enterotoxine BP en een antibody fragment).

Tabel 4: MMP+S MS/MS 1, 2 en 3; overzicht van geïdentificeerde eiwitten na 3e run DDA, met exclude list

Peptide	Coverage	Mw	pI	Eiwit	Beschrijving
Matches	(%)	(Da)			
1	100.0	1383.723	6.94	ACE inhibitor	inhibitor angiotensin converting enzyme
1	6.4	24443.97	7.62	Antibody	anti testosterone antibody Bos taurus
9	26.2	24513.42	4.79	casein alpha S1	casein alpha S1 Bos taurus
7	17.6	26002.27	8.66	casein alpha S2	casein alpha S2 Bos taurus
6	7.1	25082.25	4.97	casein beta	casein beta Bos taurus
3	20.0	12279.2	9.06	casein kappa	casein para kappa
3	4.7	24092.06	4.90	CSCSN1	CSCN1 Capra hircus
1	40.0	2264.224	9.63	enterotoxin BP	enterotoxin binding glycoprotein pp20k
3	6.2	54356.97	5.30	glycinine	glycinin max gi 32328880
3	3.5	52798.91	6.42	IMP DH	inosine 5 monophosphate dehydrogenase
3	17.9	14149.75	4.42	lactalbumin	alpha lactalbumin bovine
14	46.3	18255.4	4.64	lactoglobulin	beta lactoglobulin
4	25.9	15294.97	5.95	PP3	component PP3 cattle milk
1	2.5	53544.67	5.70	proglycinin	proglycinin
4	7.1	25131.25	5.25	unnamed protein product	unnamed protein product Bos taurus

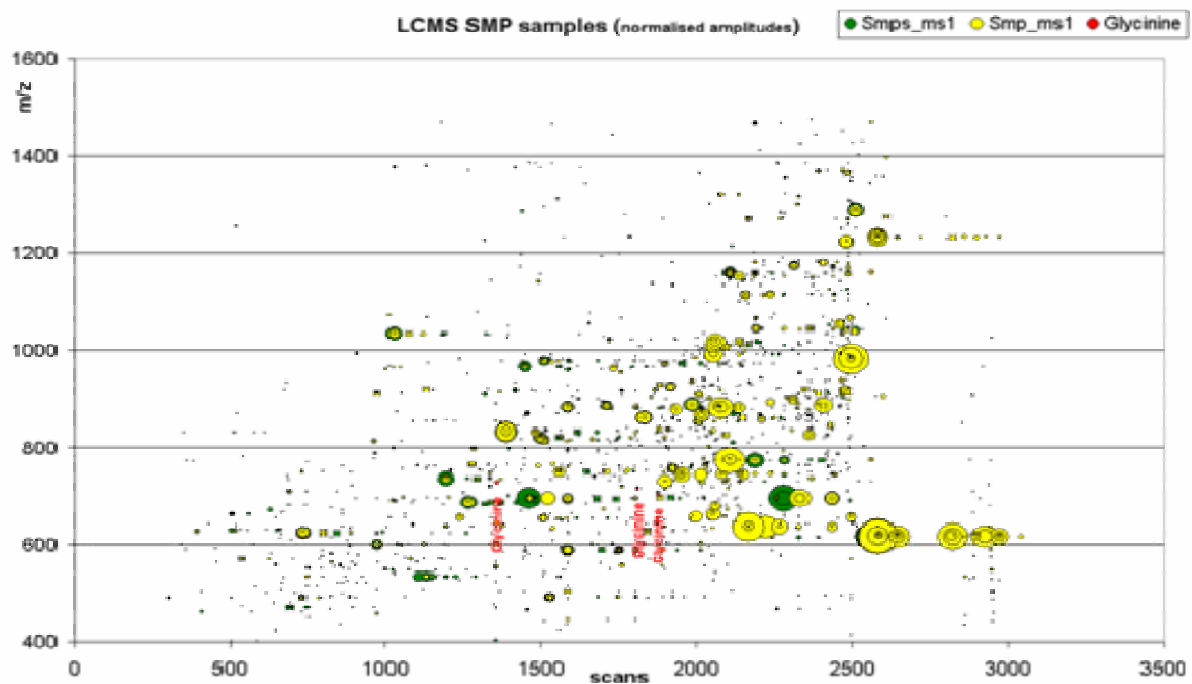


Fig 15: Bubble graph (m.b.v. MetAlign software) van gedetecteerde pieken in MMP (geel) en MMP+S (groen). De 3 geïdentificeerde glycinine peptiden zijn in rood aangegeven.

Methode 3: Voor het uitvoeren van untargeted DDA MS/MS met een exclude list van alle (de meeste) verwachte melkeiwit peptiden moet eerst een vergelijkende analyse worden uitgevoerd met meerdere MMP monsters. Door een aantal monsters met elkaar te vergelijken kan een selectie lijst worden gemaakt van de meest voorkomende peptiden. Van deze peptiden wordt een exclude list gemaakt (met massa/retentie tijd) zodat bij een DDA analyse bij voorkeur op afwijkende/nieuwe peptiden MS/MS wordt gemeten. Deze methode is nog niet toegepast.

Methode 4: Bij de comparative LC-MS methode (zie Fig. 16) worden eerst LC-MS runs uitgevoerd (in triplo) per gedigesteerd monster. Deze runs worden vervolgens aligned met MetAlign software (ontworpen door Arjen Lommen, RIKILT (www.metalign.nl)) [5]. De verschillen tussen de peptide piekpatronen worden dan uit de complete dataset gefilterd. Deze lijst van differentiële massa's (met retentietijd) wordt verder opgeschoond en vervolgens gebruikt als include list voor een DDA LC-MS/MS run, waarbij selectief op de aangegeven massa's/retentietijd combinatie wordt geschakeld voor MS/MS.

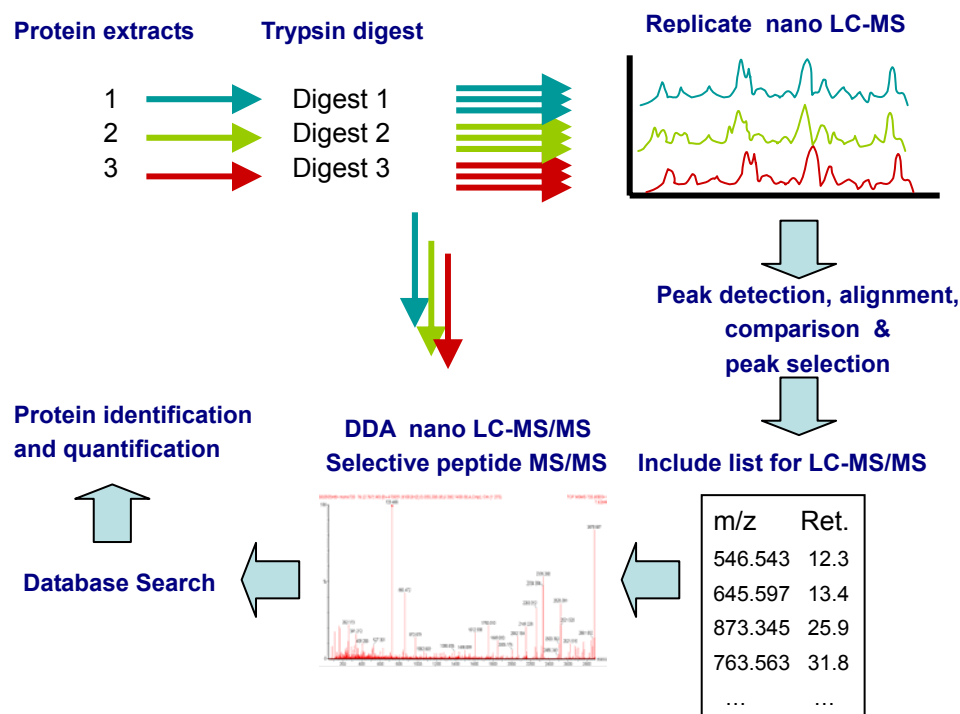


Fig. 16: Schema van de comparative LC-MS methode voor selectieve identificatie van differentiële peptiden.

In tabel 5 is het aantal pieken aangegeven dat via MetAlign werd gedetecteerd in de LC-MS runs van MMP, MMP+S en MMP+E. Opvallend is het zeer hoge aantal pieken. Het blijkt dat een groot aantal pieken ook dicht bij de ruis drempel ligt. Indien gefilterd wordt op piek intensiteit (bijv. based peak intensity > 1000) dan neemt het aantal pieken af tot ca. 3000. De statistische filtering van differentiële pieken (bij 95% confidence, min. ratio pieken MMP+S/MMP > 3, signaal/ruis > 5) levert eveneens een groot aantal pieken. Door verder sorteren op intensiteit en verwijderen van isotopen zijn vervolgens include lijsten gemaakt met circa 50 tot 300 massa/retentietijd paren voor de verschillende monsters.

Tabel 5: Aantal gedetecteerde pieken en aantal geselecteerde massa's voor de include list m.b.t. MMP+S en MMP+E

MMP vs. MMP+E			
Total detected peaks		11374	
MMP	Stat 1-2	3552	
MMP+E	Stat 2-1	551	

MMP	include list Stat 1-2	301
MMP+E	include list Stat 2-1	57

MMP vs. MMP+S			
Total detected peaks		13846	
MMP	Stat 1-2	4069	
MMP+S	Stat 2-1	1182	

MMP	include list Stat 1-2	181
MMP+S	include list Stat 2-1	172

Opvallend is dat ook in het MMP monster een groot aantal pieken zijn geselecteerd die niet in MMP+S of MMP+E zitten (Fig 17 en 18). Deze pieken zijn waarschijnlijk toe te kennen aan peptiden van melkeiwitten die gemodificeerd zijn geraakt tijdens opslag.

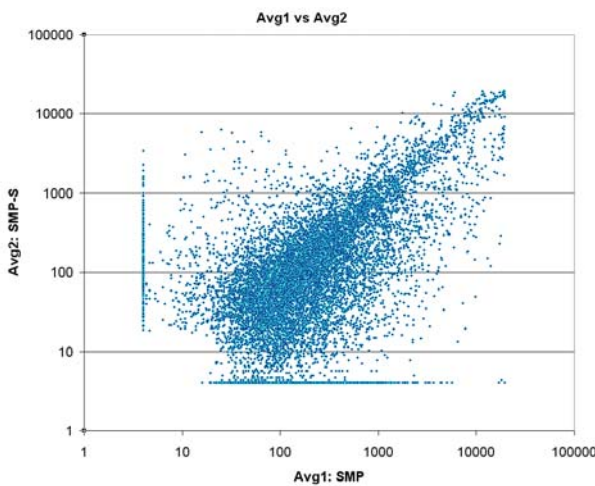


Fig. 17: Scatter plot van amplitude van alle pieken van MMP+S vs. MMP.

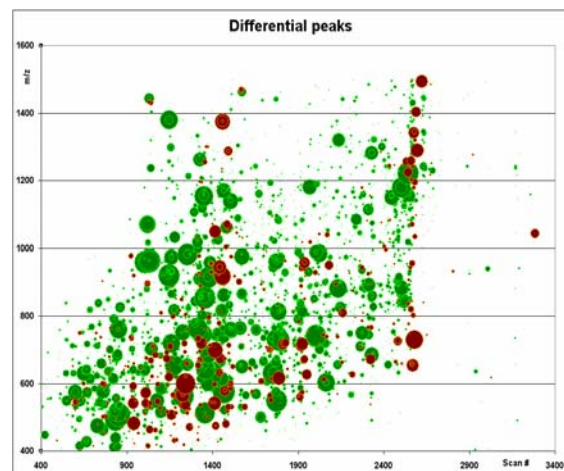


Fig. 18: Bubble graph van differentiële pieken (Stat1-2, groen: MMP en Stat2-1, rood: MMP+S).

De MS/MS data verkregen met de selectieve include lists zijn vergeleken met de NCBI database. De resultaten van de database search zijn samengevat in tabel 6. Het blijkt dat bij deze data 3 soja eiwitten worden gedetecteerd met resp. 7, 10 en 1 peptiden. In deze dataset zijn ook de abundante melkeiwitten gedetecteerd, echter met een lagere frequentie dan in de untargeted DDA dataset. Het aantal van in totaal 18 peptiden die met soja eiwit “matchen” mag beschouwd worden als een bewijs dat inderdaad soja eiwit in MMP+S aanwezig is. De probability scores van de meeste peptide matches is tegen de 100% (tabel 7).

Tabel 6: Vergelijking van aantal peptide matches per eiwit verkregen via de verschillende LC-MS benaderingen zoals beschreven in dit hoofdstuk.

Eiwit	Methode 1 # Matches	Methode 2 # Matches	Methode 4 # Matches	Methode 5 # Matches
Lactalbumin	5	3	2	4
Lactoglobulin	10	14	2	0
Casein alpha S1	12	9	3	0
Casein alpha S2	8	7	5	2
Casein beta	2	6	4	0
Casein kappa	6	3	5	0
Albumine	0	0	2	4
Glycine	0	3	7	6
Conglycinin	0	0	10	0
Napine	0	0	1	2

Tabel 7: Overzicht van de peptide matches per eiwit verkregen met de DDA methode met include list voor differentiële massa's uit MMP+S.

peak Mz	Ret	Chrg	#	pep #	pep MW	delta M	Score	ladder sc	Sequence	
740.39	29.62	2		1	1478.788	-6.93	273.30	100.00	LGEYGFQNAILVR	albumin
505.76	18.98	2		1	1009.512	9.98	171.81	97.30	FFEITPEK	allergen
740.39	29.62	2		1	1478.788	-6.93	273.30	100.00	LGEYGFQNAILVR	alpha fetoprotein
546.26	17.01	2		1	1090.512	0.78	126.05	100.00	LDQWMLCEK	alpha lactalbumin
400.88	20.55	3		2	1199.645	3.46	60.03	87.76	VGINYWLAHK	alpha lactalbumin
640.63	22.00	4		3	2558.506	78.44	127.87	44.04	KHPIKHGQVVPQEVLNENLLR	casein alpha S1
893.40	29.85	3		2	2677.21	75.60	152.04	44.63	VNELSKDIGSESTEDQAMEDIK	casein alpha S1
624.66	23.06	3		1	1870.979	4.57	152.12	76.47	YKVPQLEIVPNSAEER	casein alpha S1
684.84	20.55	2		2	1367.672	-27.94	280.60	92.73	ALNEINGFYGK	casein alpha S2
684.34	20.55	2		1	1366.688	27.78	418.67	100.00	ALNEINGFYGK	casein alpha S2
490.28	23.84	2		1	978.554	-12.23	222.30	100.00	FALPGYLLK	casein alpha S2
598.34	15.52	2		3	1194.672	9.20	116.40	83.64	NAVPIPTPLNLR	casein alpha S2
893.40	29.85	3		2	2677.21	75.60	152.04	44.63	VNELSKDIGSESTEDQAMEDIK	casein alpha S2
640.63	22.00	4		3	2558.506	78.44	127.87	44.04	KHPIKHGQVVPQEVLNENLLR	casein alpha S3
687.94	17.85	3		1	2060.821	10.90	292.19	68.24	FQSEEQQTDELQDK	casein beta
507.26	6.97	2		2	1012.516	7.72	46.75	97.30	HKEMPPFK	casein beta
501.76	24.07	2		3	1001.522	-4.02	199.24	95.35	QPEVLGMSK	casein beta
698.83	29.13	2		2	1395.656	-0.70	225.07	86.89	VPPEPTESQSL	casein beta
898.50	32.11	2		2	1794.999	-30.40	204.66	96.47	AGILGWQVLSNTVPAK	casein kappa
625.78	6.27	2		1	1249.554	12.41	287.78	94.55	SCQAQPTTMR	casein kappa
783.91	34.13	2		5	1565.82	-121.60	162.57	79.45	SPAQILGWQVLSNT	casein kappa
626.35	29.85	2		3	1250.702	-3.51	186.16	87.76	YIPQYVLSR	casein kappa
762.35	20.13	2		4	1522.709	3.93	180.79	91.80	YPSYGLNYYGQK	casein kappa
622.33	18.60	2	1	4	1242.657	19.84	14.38	60.00	AILTLVNHDDR	conglycinin
592.28	14.52	2	2	2	1182.556	2.27	216.17	100.00	ESYFVDAQPK	conglycinin
505.76	18.98	2	3	1	1009.512	9.98	171.81	97.30	FFEITPEK	conglycinin
615.33	17.01	2	4	3	1228.666	-3.18	95.88	89.09	QQEGVIVELSK	conglycinin
478.26	9.79	2	5	1	954.525	13.49	222.88	97.30	SPQLQHLR	conglycinin
703.86	14.75	2	6	4	1405.72	6.60	14.91	63.93	TVSSEDKPFNLR	conglycinin
618.29	14.18	2	7	2	1234.583	-5.44	128.28	104.08	VLFGEFEQR	conglycinin
688.02	28.15	3	1	1	2061.049	-14.10	146.74	71.85	AIPSEVLSHSYNLGQSQVR	glycinin
632.32	23.74	2	2	5	1262.644	-10.54	78.46	100.00	EAFGVHMQIVR	glycinin
586.81	12.21	2	3	2	1171.624	28.55	62.88	79.59	FLVPPQESOK	glycinin
847.07	29.39	3	4	1	2538.196	-34.53	83.79	60.63	GAIGFAFPGCPETFEPQQSSR	glycinin
1007.82	33.53	3	5	2	3020.445	21.02	210.56	66.23	IESEGGFIETWPNPNKPFQCAVALSR	glycinin
490.26	17.62	2	6	4	978.513	2.06	201.26	95.35	LSAEFGSLR	glycinin
660.33	16.78	3	7	1	1977.991	5.68	289.80	74.73	RPSYTHGPPQEIYIQGK	glycinin
725.82	22.66	2	8	2	1449.641	1.94	245.18	100.00	SQSDHFEYVFSK	glycinin
575.27	13.17	2	10	3	1148.546	-3.61	214.50	100.00	VFDGELQEGR	glycinin
801.09	37.09	3	11	2	2400.269	13.43	83.18	54.33	VFDGVEQEGGVLIVPQHFVAQAK	glycinin
546.26	17.01	2		1	1090.512	0.78	126.05	100.00	LDQWMLCEK	lactalbumin
400.88	20.55	3		2	1199.645	3.46	60.03	87.76	VGINYWLAHK	lactalbumin
660.83	23.39	2		1	1319.662	5.18	11.92	63.93	SFQLFGSPPGQR	lactoferrin
739.83	11.06	2	1	1	1477.661	-13.14	111.84	100.00	IMENOSELEEK	napin
505.76	18.98	2	1	1	1009.512	9.98	171.81	97.30	FFEITPEK	viciin
684.84	20.55	2		2	1367.672	-27.94	280.60	92.73	ALNEINGFYGK	
432.72	13.89	2		1	863.439	16.26	59.74	100.00	ISEPYGK	
740.39	29.62	2		1	1478.788	-6.93	273.30	100.00	LGEYGFQNAILVR	
1041.24	41.21	4		1	4160.971	105.39	53.47	15.64	RPSARGSRPMSMYETGSGQKPYLPMGEVTPYESITR	

Methode 5: Verrijking van de Cys bevattende peptiden en vervolgens comparative LC-MS/MS. Bij deze benadering werden uit het tryptisch digest m.b.v. Thio-propyl sepharose beads selectief die peptiden geïsoleerd die een Cys bevatten. Voor dit doel is het tryptisch digest uitgevoerd zonder eerst de Cys te alkyleren met iodoacetamide, zoals gewoonlijk wel gebeurt bij de bovenstaande methodes. Voordeel van deze methode is dat de complexiteit van het peptide mengsel afneemt, en tevens dat de relatieve inbreng van de abundante melkeiwitten afneemt. α_{S1} -Caseine en β -caseine bevatten namelijk geen Cys (zie ook bijlage 3), terwijl de plantaardige opslageiwitten juist wel Cys bevatten. Na extractie van de Cys-peptide fractie is comparative LC-MS uitgevoerd met MMP, MMP+E en MMP+S. Vervolgens zijn include lijsten gemaakt voor selectieve DDA LC-MS/MS. De resultaten van de database searches zijn weergegeven in tabel 8. Opvallend hierbij is dat er nieuwe eiwitten zijn gedetecteerd, zowel melkeiwitten als plantaardige eiwitten. Met name serum albumine, lactoferrine, butyrophilin, lactoperoxidase en folate binding protein. Deze eiwitten zijn minder abundant aanwezig in melk dan de caseine eiwitten. Verder zijn er uit soja 3 eiwitten gedetecteerd: naast glycinine en napine nu ook een peptide van sucrose binding protein. Conglycinine is daarentegen niet gedetecteerd. Dat kan kloppen aangezien dit eiwit geen Cys bevat volgens de database sequentie. Ook in het MMP+E monster werden nieuwe eiwitten gedetecteerd (tabel 9): een IgG, een IgG receptor en trypsine. Daarnaast ook legumine en albumine uit de erwten.

Tabel 8: Overzicht van de peptide matches per eiwit verkregen met de DDA methode met include list voor differentiële massa's uit Cys-peptiden verrijkt monster MMP+S.

Mw	elt Mw	score	Prob%	sequence	Organ	Protein
1553.848	11.884	79.20	74.627	DDPHACYSTVFDK	bovine	albumin
1477.516	30.9	142.00	66.085	ETYGDMADCCCK	bovine	albumin
1501.806	13.332	280.18	103.279	EYEATLECCCAK	bovine	albumin
1777.809	25.818	57.93	79.452	SOYLQQCPFDEHVK	bovine	albumin
2002.811	23.893	176.68	85.714	DDQNPHESSNICNISCDK	bovine	alpha lactalbumin
3683.492	56.275	182.23	49.704	DQNPHESSNICNISCDKFLDDDLTDDIMCVK	bovine	alpha lactalbumin
1698.748	14.875	126.23	87.671	FLDDDLTDDIMCVK	bovine	alpha lactalbumin
2647.158	58.199	37.42	33.884	KWCKDDQNPHESSNICNISCDK	bovine	alpha lactalbumin
1253.532	17.139	100.30	83.673	FDSWPCVMGR	bovine	butyrophilin
801.3151	-11.349	61.97	108	CSTFCK	bovine	casein alpha S2
1167.485	8.908	276.34	104.651	ENLCSTFCK	bovine	casein alpha S2
1899.718	45.75	80.98	89.412	LSDAGMYVCOAGDDAK	bovine	IgG receptor
1207.602	2.729	178.20	87.755	TVTINCFTR	bovine	IgG receptor
2370.223	28.533	316.21	70.339	KPYTEAGQSCHLAVAPNHAVVSR	bovine	Lactoferrin
1550.74	35.03	197.01	98.507	NLLFNDNTECLAK	bovine	Lactoferrin
1378.655	-0.089	253.73	102.985	CLQDGAGDVAIVK	bovine	Lactoferrin
1072.57	0.797	199.30	92.979	LGAPSTCVR	bovine	Lactoferrin
835.466	-8.84	187.62	105.405	PSHAWAR	bovine	Lactoferrin
1393.648	21.373	208.30	98.182	QAYPNLCQLCK	bovine	Lactoferrin
1190.57	6.619	119.12	83.673	VPCFLAGDFR	bovine	lactoperoxidase
1589.581	23.177	33.44	78.182	EDCGSWWEDCR	bovine	Milk folate binding
1371.693	15.307	196.19	103.279	ALIQVINCNGER	soya	glycinin
1104.537	11.241	180.29	87.766	GIDETICTMR	soya	glycinin
1161.57	2.732	185.62	100	GVEENICTLK	soya	glycinin
2690.077	43.383	83.99	66.118	KPQCEEDDDDEEEQPCVETDK	soya	glycinin
1439.697	-9.935	69.71	95.075	SVAPFGLCFNSNK	soya	glycinin
1676.794	34.508	132.31	91.139	VWNCQGNVFDGELR	soya	glycinin
1184.463	-33.184	36.21	86.047	CCTEMSELR	soya	napin
1435.632	21.258	79.98	74.419	IQCNISSDI	soya	napin
1508.698	14.564	157.69	88.06	GHLQSCPHMSSR	soya	sucrose binding pi
				= no Cysteine		
				= Soya		

Tabel 9: Overzicht van de peptide matches per eiwit verkregen met de DDA methode met include list voor differentiële massa's uit Cys-peptiden verrijkt monster MMP+E.

Mw	delta Mw	score	Prob%	sequence	Organism	Protein	Acc.Numb
2781.337	2.809	198.582	60	DTLTISGTPEVTCVWVDVGHDDPEVK	1	7547266	Ig heavy chain
946.4906	-5.675	53.178	81.081	LLCLDGTR	5	504	Lactoferrin
1053.532	-12.977	109.544	105.405	PDKFCLFK	5	504	Lactoferrin
1553.646	8.879	69.333	65.672	DDPHACYSTVFDK	3	30794280	serum albumin
1901.806	-11.787	256.662	96.721	EYEATL=ECCAK	1	229552	serum albumin
1748.692	25.131	89.416	68.354	KDCCHGDLLECAADDR	1	229552	serum albumin
2246.972	32.054	168.987	68.807	KDCCHGDLLECAADDRADLAK	1	229552	serum albumin
1777.809	13.939	57.192	49.315	SQYLQOCPPFDEHK	4	229552	serum albumin
2002.811	3.291	358.768	87.912	DDQNPSSNICNISCDK	3	7435409	alpha lactalbumin
1698.748	-15.378	166.8	83.562	FLDDDLTDDIMCVK	3	7435409	alpha lactalbumin
2590.089	28.75	74.197	37.391	FNQDESWVSELRONMMSSCDK	1	42555186	alpha lactalbumin
1103.543	82.748	55.532	63.265	ITPANPGFCK	1	27383073	alpha lactalbumin
2590.136	43.643	136.319	33.884	KVWCKDDQNPSSNICNISCDK	3	7435409	alpha lactalbumin
1090.512	-26.305	188.256	100	LDQWLCEK	3	7435409	alpha lactalbumin
2281.002	17.018	220.423	66.055	CMENSAEPEQSLVCQSLVRT	1	162748	beta lactoglobulin
2264.006	-36.663	3.753	22.33	CMONSAEPEQSLVCQCLVR	1	162748	beta lactoglobulin
2233.149	81.564	130.975	45.055	ENSAEPEQSLVCQCLVR	1	162748	beta lactoglobulin
1774.834	3.852	78.234	92.405	SAEPEQSLVCQCLVR	1	162748	beta lactoglobulin
2763.319	-25.356	89.967	46.207	VAGTYYSLAMAASDISLLDAQSAPLR	1	162748	beta lactoglobulin
2276.99	3.646	7.438	17.431	VMENSAEPEQSLVCQCLVR	1	162748	beta lactoglobulin
3472.707	47.527	199.812	68.098	VYVEELKPTPEGDLEILLOKWEDECA	1	162748	beta lactoglobulin
1157.485	-0.211	276.129	104.651	ENLCSTFCK	1	27806963	casein alpha S2
2012.912	3.578	343.915	95.604	NMAINPSKENCSTFCK	1	27806963	casein alpha S2
1583.707	6.629	74.641	98.507	NPSKENLCSTFCK	1	27806963	casein alpha S2
1634.669	-2.165	137.932	90.164	YWCHWEEAQNGR	2	32189338	IgG receptor
2055.38	24.819	135.834	75.624	FNKCOLDSINALEPDHR	2	403336	Legumin
1106.528	0	76.687	89.796	GLEETICSAK	2	403336	Legumin
2048.97	-35.387	38.541	71.429	LNQCOLDNINALEPDHR	3	282925	legumin
1777.846	11.604	128.43	92.405	FCALIDYAPHSNKDK	1	113570	pea albumin
1881.835	32.889	73.544	67.01	SCAAAGTECLISGWNTK	2	51247812	Trypsin

Deze resultaten duiden aan dat de methode van Cys verrijking goed werkt. Er worden nauwelijks peptiden gevonden zonder een Cys in de sequentie. En er worden meer verschillende eiwitten gedetecteerd, waaronder dus 3 soja eiwitten. Deze methode is een aanvulling of een verfijning van methode 4.

4.2.3.3 Conclusies

Bovenstaande resultaten hebben aangetoond dat het goed mogelijk is via DDA LC-MS/MS plantaardige verontreinigingen in MMP te detecteren. Echter er zijn wel maatregelen noodzakelijk om deze minder abundante eiwitten te selecteren voor MS/MS. De beste methode hiervoor blijkt methode 4 of 5 te zijn. Deze methodes zijn iets arbeidsintensiever maar leveren veel detail informatie op. Methode 3 is momenteel nog niet uitgevoerd. Om een collectie van bekende peptide massa/retentietijd te maken is het noodzakelijk om de variatie tussen enkele melkpoederpreparaten te meten. Deze methode is ook geschikt om afwijkingen in melkpreparaten te detecteren die niet ten gevolge van bijmenging van andere eiwitten komt, maar bijvoorbeeld door modificaties tijdens opslag of verwerking (oxidatie, maillard producten e.d.). Zoals vermeld, het gebruikte MMP monster bevatte waarschijnlijk veel van deze afwijkingen. In de bovenstaande studie is hier niet in detail op ingegaan. De data analyse en filtering m.b.v. MetAlign en Excel is momenteel nog een redelijk complexe procedure. Deze dient verder geoptimaliseerd en mogelijk geautomatiseerd te worden, zodat het totale analyse traject van comparative LC-MS en DDA LC-MS/MS inclusief data analyse bij voorkeur binnen één dag kan worden uitgevoerd. Nieuwe ontwikkelingen in LC-MS alignment software maken het binnenkort mogelijk om op basis van accurate massa's pieken te vergelijken. Hierdoor wordt de betrouwbaarheid, detectie gevoeligheid en analyse snelheid verder verbeterd.

4.2.4 Untargeted LC-MS/MS na HPLC-voorscheiding

4.2.4.1 Materialen en methoden

De ingedamppte soja eiwit HPLC fracties (fractie 4 t/m 7 van de RP-Poros kolom, zie hoofdstuk 3.3) werden opgenomen in SDS-sample buffer en de eiwitten werden geanalyseerd op een 12.5% SDS-PAGE gel na CBB kleuring. De 12 meest intense banden zijn uitgesneden en in-gel gedigesteerd met trypsine. De geëxtraheerde peptiden zijn geanalyseerd m.b.v. de Q-TOF in MS/MS mode na on-line scheiding op een nano-RP kolom. Na processing van de verkregen fragmentatiespectra m.b.v. ProteinLynxGlobalServer is geblast tegen de NCBI nr database.

4.2.4.2 Resultaten

De verkregen bandenpatronen van de vier verschillende geconcentreerde soja eiwit HPLC-fracties met SDS-PAGE zijn weergegeven in Fig. 19. Alle m.b.v. de Q-TOF geanalyseerde eiwitbanden konden geïdentificeerd worden (tabel 10). Het merendeel van deze eiwitten bleken glycinines te zijn. Sojazaad bestaat voor meer dan 20% uit het opslageiwit glycinine. Glycinine is een hexameer dat bestaat uit 5 soorten subeenheden, genaamd Gy1 t/m Gy5. Elke subeenheid is weer opgebouwd uit een zure en een basische eiwitcomponent, die via S-S bruggen covalent aan elkaar gekoppeld zijn. Zo bestaat b.v. subeenheid G1 (genaamd A1aB1b) uit het zure eiwit A1a en het basische eiwit B1b. Omdat SDS-PAGE onder reducerende condities uitgevoerd werd, zijn de zure en basische eiwitten van elke subeenheid van elkaar gescheiden op de gel.

Mede door het hoge aantal “matching peptides” konden 8 van de uitgesneden eiwitbanden geïdentificeerd worden als subeenheid van glycinine. In bijlage 2 zijn de sequenties van de verschillende subeenheden weergegeven, met in kleur de peptiden die geïdentificeerd zijn. Twee eiwitbanden (band 8 en 10 in fractie 6) zijn afkomstig van de α - (63.1 kDa) en β -subeenheid (47.9 kDa) van β -conglycinine, een ander belangrijk opslageiwit van soja. Band 4 is een napin-type 2-S albumine van 14.2 kDa.

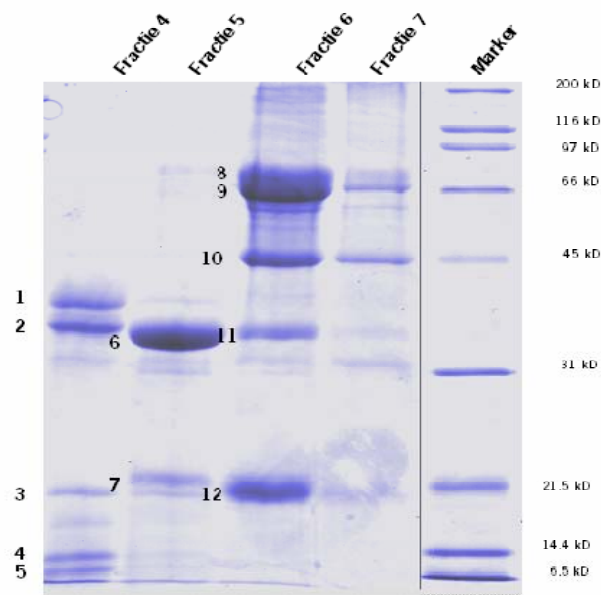


Fig. 19: SDS-PAGE analyse van de 4 geconcentreerde soja eiwitfracties verkregen na HPLC voorscheiding

Tabel 10: Identificatie van soja-eiwitten in HPLC fracties 4 t/m 7.

Band	Gen	Subunit	Zuur/base eiwit	Peptide matches
11	Glycinine <i>Gy1</i>	G1 (A1aB1b)	A1a	8
12			B1b	7
6	Glycinine <i>Gy2</i>	G2(A2B1a)	A2	11
5	Glycinine <i>Gy4</i>	G4 (A5A4B3)	A5	7
2			A4	8
7			B3	11
1	Glycinine <i>Gy5</i>	G5 (A3B4)	A3	12
3			B4	9
4	2-S Albumine			3
8	β -Conglycinine	α		18
10	β -Conglycinine	β		18

4.2.4.3 Conclusies

Na scheiding van verschillende soja eiwitten afkomstig van een soja eiwitisolaat m.b.v. een Poros HPLC kolom waren de eiwitten in de verkregen HPLC-fracties met behulp van LC-MS/MS te identificeren. Aangezien het mogelijk is om met dezelfde HPLC-kolom eiwitten van MMP en plantaardige eiwitproducten (gedeeltelijk) te scheiden (hoofdstuk 3.3) lijkt HPLC een geschikte manier om de meest abundant melkeiwitten kwijt te raken en de identificatie van het plantaardige materiaal in aangengd MMP met LC-MS/MS te vergemakkelijken. Testen met MMP in aanwezigheid van een laag percentage plantaardig eiwit zouden dit moeten uitwijzen.

Na indampen van de HPLC fracties afkomstig van een soja eiwitisolaat waren de meest abundant soja-eiwitten goed zichtbaar op een CBB-gekleurde gel. Voor identificatie van de soja-eiwitten na tryptische digestie m.b.v. de Q-TOF zou volstaan kunnen worden met 10-100 keer minder materiaal, hetgeen betekent dat detectie van 5% soja-eiwit in MMP op deze manier mogelijk zou moeten zijn. Indien de CBB gel (Fig. 19) wordt vergeleken met de MALDI spectra (Fig. 11) van de geconcentreerde soja HPLC fracties 4 t/m 6 lijkt de gevoeligheid voor de detectie van soja eiwitten bij MALDI TOF MS lager. Hoewel HPLC fractie 5 nog vergelijkbare patronen oplevert (MALDI MS pieken bij 32 en 20 kDa komen overeen met respectievelijk banden 6 (glycinine A2) en 7 (glycinine B3) in de CBB-gel) is dit bij fractie 4 en 6 niet het geval. De eiwitten met een molecuulmassa boven de 30 kDa zijn namelijk zichtbaar op gel maar ontbreken in de MALDI spectra. Er dient hierbij wel opgemerkt te worden dat bij de CBB gel onder reducerende condities is gewerkt en bij MALDI TOF MS niet.

5 CAPILLAIRE ELECTROFORESE

5.1 Inleiding

Bij capillaire electroforese (CE) wordt een monster pneumatisch of electrokinetisch in een capillair gebracht. Hierna wordt er een spanning tot maximaal 30 kV over het capillair gezet waardoor de diverse componenten (over het algemeen op lading) worden gescheiden. Het monstervolume bedraagt minimaal 15 μl , hiervan wordt een klein deel (bijv. 5 nl) in het capillair gebracht. Bij eiwitten is een concentratie van 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ meestal voldoende om gedetecteerd te kunnen worden indien het CE-systeem een UV-detector omvat. CE-apparatuur is voor veel verschillende analyseterreinen te gebruiken, o.a. eiwitten en peptiden, DNA (enkel en dubbelstrengs) en RNA, ionen, organische moleculen, enz. Over het algemeen staat CE bekend als een techniek met een hoog scheidend vermogen maar met een wat mindere reproduceerbaarheid en lagere gevoeligheid (vanwege inbreng kleine volumes).

Om te kijken of CE-MS mogelijk een geschikte screenings/identificatietechniek zou zijn voor plantaardige eiwitten in MMP is in eerste instantie gekeken in hoeverre CE toepasbaar is voor het scheiden van de plantaardige en melkeiwitten. Daartoe is contact gezocht met de Universiteit Utrecht, afdeling Biomedische analyse (contactpersonen Javier Sastre Toraño en Govert Somsen) waar gebruik wordt gemaakt van gecoate capillairen voor het scheiden van eiwitten onder natieve condities.

5.2 Materialen en methoden

De volgende monsters zijn gebruikt bij de CE-analyse:

- MMP, standaard
- Soja eiwitproducten Supro 500 E en type K
- Erwt eiwitproduct Pisane HD
- Caseine α (Sigma, purity > 85%), β (Sigma, purity > 90%), κ (Sigma, purity > 80%)
- Wei-eiwitten α -Lactalbumine (Sigma, purity > 85%) en β -lactoglobuline (Sigma, purity 90%)

Het CE-systeem omvatte de volgende onderdelen en instellingen:

- P/ACE MDQ CE-apparaat met DAD detector (Beckman Coulter)
- Fused-silica capillair (Composite Metal Services), 60 cm x 50 μm (effective length 50 cm)
- Coating met polybreen (PB) en polyvinylsulfonaat (PVS)
- Injectie hydrodynamisch 5 sec 34.5 mbar (0.5 psi), 5 nl (max. 1% van capillair)
- Scheidingsvoltage 30 kV
- Temperatuur 25 $^{\circ}\text{C}$
- Detectie bij 214 nm

5.3 Resultaten

Nadat de caseines en wei-eiwitten afzonderlijk waren opgelost in water (0.5 mg/ml) werden de melkeiwitten met 300 mM Tris-fosfaat buffer, pH 7.0, als running buffer op de capillair gerund. De melkeiwitten bleken bij verschillende migratietijden te elueren (Fig. 20). De migratietijden verkregen uit de electroferogrammen bedroegen: β -caseine, 9.8 min; α -lactalbumine, 10.5 min; β -lactoglobuline,

12.0 min; α -caseine, 13.8 min; κ -caseine, 16.2 min. α -Caseine en κ -caseine vertoonden brede pieken. Voor diverse eigenschappen van de verschillende melkeiwitten, zie bijlage 3.

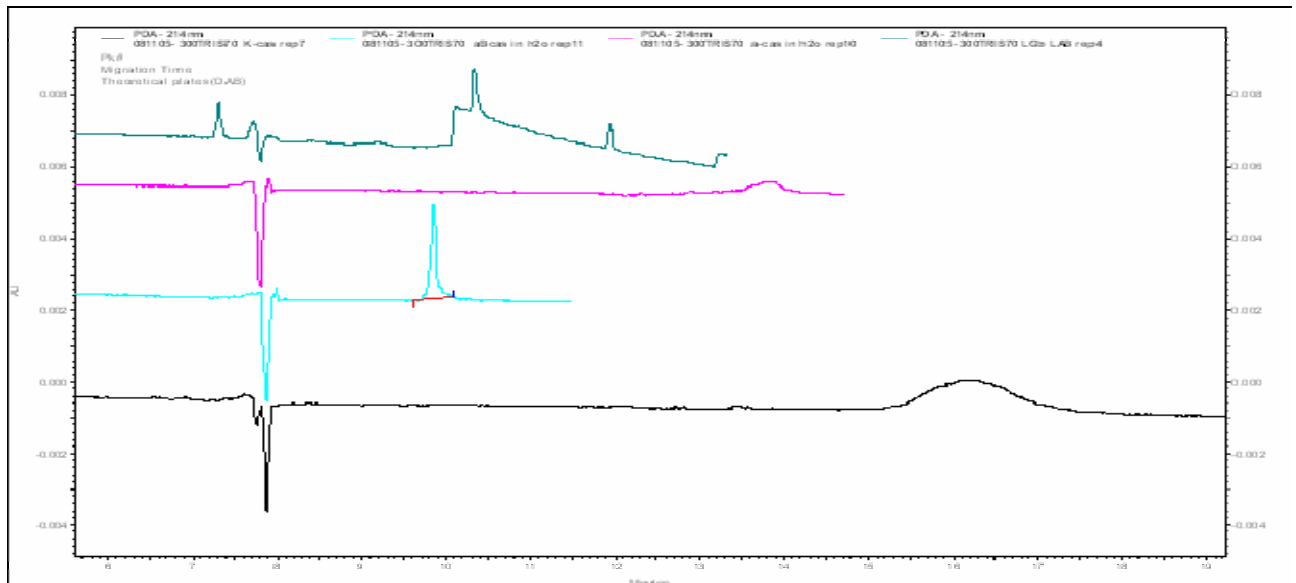


Fig. 20: Electroferogrammen van α -lactalbumine en β -lactoglobuline (donkergroen), α -caseine (rose), β -caseine (lichtblauw) en κ -caseine (zwart).

Het MMP monster (0.5 mg) bleek moeilijk op te lossen in water (0.5 ml). Door toevoegen van 0.5 ml 75 mM ammoniumformaat, pH 8.5, was het wel oplosbaar. Het verkregen electroferogram (Fig. 5.2) week af van het electroferogram verkregen met de verschillende afzonderlijke melkeiwitten. Dit zou kunnen komen door de aanwezigheid van meerdere eiwitvarianten in MMP en/of omdat het standaard MMP monster verouderd en mogelijk niet meer geschikt is (zie ook hoofdstuk 4.2.3).

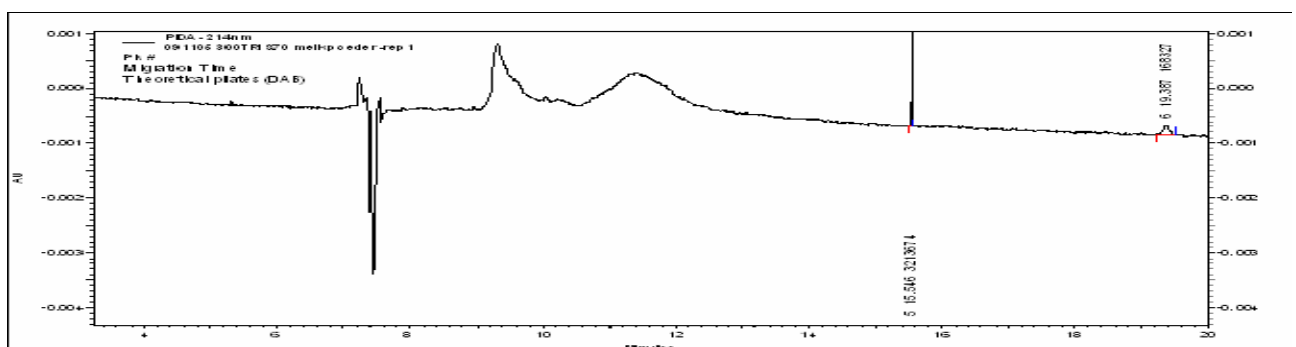


Fig. 21: Electroferogram van MMP.

Voor de plantaardige eiwitisolaten (Soja Supro, Soja K en erwit) zijn de volgende buffers (geschikt voor de gecoat capillairen) getest voor oplossen (0.5 mg/ml):

1. 300 mM Tris-fosfaat, pH 7.0
2. 75 mM Ammoniumformaat, pH 8.5
3. 300 mM Ammoniumbicarbonaat, pH 8.5

Zelfs na vortexen, 4 min. sonificeren en 3 min. centrifugeren bleken de eiwitisolaten niet geheel op te lossen (pellet na centrifuge). De Soja Supro loste het minst goed op. Over het algemeen leken de eiwitisolaten iets beter op te lossen bij pH 8.5. Vanwege de slechte oplosbaarheid werd er weinig signaal waargenomen in de gemeten electroferogrammen.

5.4 Conclusies

Met het gebruikte CE-systeem is het mogelijk om de verschillende melkeiwitten te scheiden al dient de methode nog wel geoptimaliseerd te worden. Dit zou kunnen door het gebruik van andere buffers, bij hogere pH (8.5) en hogere eiwitconcentraties. Op deze manier zou mogelijk vermenging van MMP met wei-eiwitten (kwantitatief) gemeten kunnen worden. Voor deze metingen is echter wel een juiste standaard MMP noodzakelijk.

Aangezien de oplosbaarheid van de diverse plantaardige eiwitten in de gebruikte CE-buffers slecht is lijkt het onhaalbaar om met het huidige CE-systeem lage percentages plantaardig eiwit (bijv. 1-5%) in MMP aan te tonen. Een voorextractie zou dan in ieder geval noodzakelijk zijn (bijv. boraatbuffer voor scheiden melkeiwitten van plantaardige eiwitten) met daarnaast het gebruik van denaturanten met/zonder reducerende agentia (bijv. 6 M ureum + 50 mM DTT) voor het oplossen van de plantaardige eiwitten. Dit compliceert uiteindelijk de combinatie van CE met MS voor het identificeren van de eiwitten.

6 CONCLUSIES

Voor het aantonen van plantaardige eiwitten in MMP zijn geschikte screenings- en identificatietechnieken nodig. In samenwerking met verschillende universiteiten in binnen- en buitenland, PRI en het NIZO zijn daarom in de tweede helft van 2005 diverse technieken onderzocht op geschiktheid daarvoor (tabel 11). De immunoblot methode blijkt een snelle en gevoelige screeningsmethode om planteneiwitten in MMP (zowel 1 als 5%) aan te tonen. De methode dient echter wel verder geoptimaliseerd te worden om ook toepasbaar te kunnen zijn indien enzymatisch/chemisch behandelde plantaardige eiwitpreparaten zijn toegevoegd aan de MMP. Een voorscheiding tussen de plantaardige- en melkeiwitten om vervolgens het screenen en/of identificeren van kleine hoeveelheden plantaardig materiaal in MMP te vereenvoudigen is via HPLC of een extractie (m.b.v. boraat buffer) te bewerkstelligen. Beide methoden zijn snel en eenvoudig, met name de extractie. Ook hier is verdere optimalisatie gewenst. Met de snelle en eenvoudige MALDI TOF MS techniek bleek het niet mogelijk om lage percentages plantaardig eiwit aan te tonen in MMP indien aan intacte eiwitten werd gemeten. Op basis van de vrij eenvoudige targeted LC-MS methode is het mogelijk om lage concentraties soja eiwit (5%) aan te tonen in MMP. De hierbij gebruikte screening op specifieke soja peptiden kan nog worden geoptimaliseerd waarbij tevens de aminozuursequenties van de peptiden nog dienen te worden achterhaald via LC-MS/MS. De werkzaamheid van deze targeted methode zou ook getest dienen te worden voor MMP met 1% soja eiwit. Selectie van specifieke erwten en tarwe peptiden moet nog geschieden. Hierna zouden dan mogelijk ook lage concentraties erwten en tarwe eiwit in MMP aan te tonen zijn. Untargeted LC-MS/MS blijkt de meest geschikte techniek voor het identificeren van plantaardige eiwitten in MMP. Er zijn echter wel maatregelen nodig om de minder abundante plantaardige eiwitten eerst te selecteren voor MS/MS. Comparative LC-MS, verrijking van cysteine bevattende peptiden, een HPLC-voorscheiding of extractie blijken hiervoor geschikte methoden te zijn. Hoewel hiermee de tijdsduur toeneemt wordt daarna wel de identificatie sterk vereenvoudigd. Comparative LC-MS is ook geschikt om afwijkingen in MMP te detecteren die niet ten gevolge van bijmenging van andere eiwitten komt, maar bijvoorbeeld door eiwitmodificaties tijdens opslag of verwerking. De data analyse en filtering dient echter verder geoptimaliseerd en geautomatiseerd te worden, zodat het totale analyse traject van comparative LC-MS en DDA LC-MS/MS inclusief data analyse versneld kan worden. De gebruikte CE opzet blijkt niet geschikt om lage percentages plantaardig eiwit (bijv. 1-5%) in MMP aan te tonen. Een voorextractie en gebruik van denaturanten en reducerende agentia voor het oplossen van de plantaardige eiwitten is noodzakelijk. De combinatie van CE met MS (voor uiteindelijke identificatie) wordt hierdoor echter sterk bemoeilijkt.

Tabel 11: Overzicht geschiktheid diverse technieken voor screenen en/of identificeren van plantaardige eiwitten en/of eiwithydrolysaten in MMP: geschikt (+), beperkt geschikt (+/-), niet geschikt (-).

Techniek	Screening	Identificatie	
	plantaardig eiwit	Soja, erwt, tarwe eiwit	plantaardig eiwit
Immunoblotting	+	-	-
HPLC/ Extractie	+/-	-	-
MALDI TOF MS	+/-	-	-
Targeted LC-MS(/MS)	-	+	-
Untargeted LC-MS(/MS)	+	+	+
CE	-	-	-

7 AANBEVELINGEN

Gezien de resultaten en conclusies die getrokken zijn in dit rapport is het zaak dat het RIKILT zich in 2006 verder richt op de untargeted LC-MS/MS en dan met name comparative LC-MS(/MS). De methode dient verder geoptimaliseerd te worden en de resultaten gereproduceerd. Hierbij zal tevens gelet worden op de nieuwste ontwikkelingen in LC-MS alignment software die het binnenkort mogelijk maakt om de betrouwbaarheid, detectie gevoeligheid en analysesnelheid verder te verbeteren. De kennis en ervaring die vooral bij PRI is opgedaan m.b.t. deze techniek dienen in 2006 ook naar het RIKILT te worden overgebracht. De methode van comparative LC-MS voor proteomics doeleinden is een zeer recente methode [5]. De toepassing van deze methode om verontreinigingen respectievelijk aanlegingen van eiwitmonsters te detecteren is dan ook nog niet eerder gepubliceerd. Er wordt naar gestreefd om eind 2006/begin 2007 een dergelijke publicatie te schrijven. Zoals eerder bleek kan een goede voorscheiding tussen de plantaardige eiwitten en abundant melkeiwitten de identificatie van het plantaardige materiaal met untargeted DDA LC-MS/MS ook sterk vereenvoudigen. Daartoe zal in 2006 ook aandacht besteed dienen te worden aan optimalisatie van de HPLC-scheiding en extractie m.b.v. boraatbuffer. Beide methoden zijn snel en eenvoudig, met name de extractie. De effectiviteit van de voorscheiding kan daarna getest worden m.b.v. LC-MS/MS. Afhankelijk van de vorderingen en resultaten m.b.t. bovenstaande untargeted LC-MS/MS technieken is er in 2006 mogelijk nog ruimte om andere technieken uit te werken. Hoewel de targeted LC-MS methode ook nog geoptimaliseerd dient te worden lijkt het er nu al sterk op dat via deze techniek lage concentraties soja eiwit in MMP aan te tonen zijn. De toepasbaarheid van deze techniek zou ook getest moeten worden voor MMP in aanwezigheid van erwten en tarwe eiwitten. Voor de identificatie van de verschillende plantaardige eiwitten zouden bij deze targeted methode van de geselecteerde peptiden de aminozuursequentie bepaald dienen te worden m.b.v. LC-MS/MS. In combinatie met een voorscheiding en/of digesteren (peptide fingerprint) van de eiwitextracten zou MALDI TOF MS op termijn een goede screeningstechniek kunnen zijn. Om dit te bevestigen zou ook hier aandacht aan besteed kunnen worden. Tenslotte, de immunoblot methode dient verder geoptimaliseerd te worden. Uiteindelijk zullen meerdere commerciële plantaardige eiwitproducten (die enzymatisch/chemisch behandeld zijn) getest moeten worden om de geschiktheid van de analyse te bevestigen. Gezien de vorderingen die met deze techniek zijn gemaakt kan op termijn ook hier een publicatie van worden verwacht.

8 REFERENTIES

1. Barber M, Bordoli RS, Sedgwick RD, Tyler AN and Bycroft BW (1981) Fast atom bombardment mass spectrometry of bleomycin A2 and B2 and their metal complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 632-638
2. Morris HR, Panico M, Barber M, Bordoli RS, Sedgwick RD and Tyler AN (1981) Fast atom bombardment: a new mass spectrometric method for peptide sequence analysis. *Biophys. Res. Commun.* 101, 623-631
3. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF and Whitehouse CM (1989) Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71
4. Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC and Chait BT (1991) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal. Chem.* 63, 1193A-1203A
5. America AHP, Cordewener JHG, van Geffen HA, Lommen A, Vissers JPC, Bino RJ, Hall RD (2006) Alignment and statistical difference analysis of complex peptide data sets generated by multidimensional LC-MS. *Proteomics* 6 (2), 641-653
6. Haasnoot W, Olieman K, Cazemier G. and Verheijen R (2001) Direct biosensor immunoassays for the detection of nonmilk proteins in milk powder. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5201-5206
7. Krueger R, Pfenninger A, Fournier I, Gluckmann M and Karas M (2001) Analyte incorporation and ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes. *Anal. Chem.* 73, 5812-5821
8. Pitt AR (1998) Applications of ESI [electrospray] mass spectrometry in biology. *Nat. Prod. Rep.* 15, 59-72
9. Jonsson AP (2001) Mass spectrometry for protein and peptide characterisation. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 868-884
10. Wilm M and Mann M (1996) Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem.* 68, 1-8
11. Fanton C, Delogu G, Maccioni E, Podda G, Seraglia R and Traldi P (1998) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in the dairy industry 2. The protein fingerprint of ewe cheese and its application to detection of adulteration by bovine milk. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 12, 1569-1573
12. Renkema JMS, Gruppen H and van Vliet T (2002) Influence of pH and ionic strength on heat-induced formation and rheological properties of soy protein gels in relation to denaturation and their protein compositions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6064-6071
13. O'Kane FE, Vereijken JM, Gruppen H and van Boekel MAJS (2005) Gelation behavior of protein isolates extracted from 5 cultivars of *Pisum sativum* L. *Journal of Food Science* 70, 132-137
14. O'Kane FE, Happe RP, Vereijken JM, Gruppen H, and van Boekel MAJS (2004) Heat-induced gelation of pea legumin: Comparison with soybean glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 5071-5078
15. Cunsolo V, Foti S and Saletti R (2004) Mass spectrometry in the characterisation of cereal seed proteins. *European Journal of Mass Spectrometry* 10, 359-370

Bijlage 1: Overzicht molecuulmassa's van melk- en plantaardige eiwitten [11-15].

Eiwitten	Molecuulmassa (kDa)
Melkeiwitten	
α -Caseine _{s1}	23.6
α -Caseine _{s2}	25.3
β -Caseine	24.0
κ -Caseine	19.0
α -Lactalbumine	14.2
β -Lactoglobuline	18.4
Soja eiwitten	
Glycinine (zuur)	38.0
Glycinine (basisch)	20.0
β -Conglycinine	
a	65.0
a	62.0
b	47.0
Erwten eiwitten	
Legumine	60.0
- Zure polypeptide	40.0
- Basische polypeptide	20.0
Viciline*	50.0
Conviciline	70.0
Tarwe eiwitten	
Water oplosbaar >20%	
Prolamines >50%	
-Gliadines (oplosbaar)**	
a-, b-type	30.0-40.0
y-type	30.0-40.0
w-type	55.0-77.0
-Glutenine (onoplosbaar)**	
HMW y-type	67.0-74.0
HMW x-type	83.0-88.0
LMW B-type	42.0-51.0
LMW C-type	30.0-40.0
LMW D-type	55.0-77.0

*Kan op verschillende manieren geknipt worden tot diverse molecuulmassa's

**In waterige alcoholen

Bijlage 2: Aminozuursequenties van verschillende soja glycinine subeenheden.

Subunit A1aB1b: N-terminus

15988119 Coverage Map

1	FSSR EQPQON	ECQIQ KLNAL	KPDNR IE SEG	GLIETW PNW	KPFOC AGVAL
51	SRCTL NRNAL	RRPSY TNGP O	EIY IQQ GKI	FGMIY PGC PS	TFEE PQQP QO
101	RGQSS R PQDR	HQKIY N FREG	DLIA VPTG V	WWMY N EDTP	VVA VSI IDTN
151	SLEN Q LDQMP	RR F YLAG NQ E	Q EFL KY Q Q EQ	G G H S Q K G K H	Q Q E E N E G G S
201	ILSG F TLEFL	E H A F S V D K Q I	A K N L Q E N E G	EDK G A I V T V K	G G L S V I K P P T
251	DE Q Q R P Q EE	E E E E E D E K P O	C K G K D K H C Q R	P R G S Q S K S R R	N G I D E T I C T M
301	RLR H N I G Q T S	S P D I Y N P Q A G	S V T T A T S L D F	P A L S W L R L S A	E F G S L R K N A M
351	F V P H Y N L M A N	S I I Y A L N G R A	L I Q V V N C N G E	R V F D G E L Q E G	R V L I V P Q N F V
401	V A A R S Q S D N F	E Y V S F K T N D T	P H I G T L A G A N	S L L N A L P E E V	I Q H T F N L K S Q
451	Q A R Q I K N M N P	F K F L V P P O E S	Q K R A V A		



Subunit A1aB1b: C-terminus

15988119 Coverage Map

1	FSSR EQPQON	ECQIQ KLNAL	KPDNR IE SEG	GLIETW PNW	KPFOC AGVAL
51	SRCTL NRNAL	RRPSY TNGP O	EIY IQQ GKI	FGMIY PGC PS	TFEE PQQP QO
101	RGQSS R PQDR	HQKIY N FREG	DLIA VPTG V	WWMY N EDTP	VVA VSI IDTN
151	SLEN Q LDQMP	RR F YLAG NQ E	Q EFL KY Q Q EQ	G G H S Q K G K H	Q Q E E N E G G S
201	ILSG F TLEFL	E H A F S V D K Q I	A K N L Q E N E G	EDK G A I V T V K	G G L S V I K P P T
251	DE Q Q R P Q EE	E E E E E D E K P O	C K G K D K H C Q R	P R G S Q S K S R R	N G I D E T I C T M
301	RLR H N I G Q T S	S P D I Y N P Q A G	S V T T A T S L D F	P A L S W L R L S A	E F G S L R K N A M
351	F V P H Y N L M A N	S I I Y A L N G R A	L I Q V V N C N G E	R V F D G E L Q E G	R V L I V P Q N F V
401	V A A R S Q S D N F	E Y V S F K T N D T	P H I G T L A G A N	S L L N A L P E E V	I Q H T F N L K S Q
451	Q A R Q I K N M N P	F K F L V P P O E S	Q K R A V A		



Subunit A2B1a: N-terminus

295800 Coverage Map

1	MAKLVL S LCF	LLFSGCFALR	EQAQQNECQI	QKLNALKPDN	RIESEGGFIE
51	TWNPNNKPFQ	CAGVALSECT	LNRNALRRPS	YINGPQEIYI	QQNGIFGMI
101	FPGCPSTYQE	PQESQQRGRS	QRPQDRHQKV	HRFRGGDLIA	VPTGVAMWY
151	QMEDTPVVAV	SIIDTNSLEN	QLDOMPRRFY	LACMQEQEFL	KYQQQQQGS
201	QSQK K QQEE	ENEGSNILSG	FAPEFLK A AF	GVNMQIVRNL	QGENEEDSG
251	AIVTVKGGLR	VTAPAMR K PQ	QEEDDDDEEE	QPQCVD T IG	CQRQSKRSRN
301	GIDETICTMR	LRQNIQNSS	PDIYNPQAGS	ITTATSLDFP	ALWLLKLSAQ
351	YGSLRKNAMF	VPHYTLNANS	IIYALNGRAL	VQVVNCMGER	VFDGELQEGG
401	VLIVPQNFAV	AAKSQSDNFE	YVSFKTMDRP	SIGNLAGANS	LLNALPEEVI
451	QHTFMLKSQQ	ARQVKNNPFF	SFLVPQESQ	RRAVA	



Subunit A5A4B3: N-terminus

56201482 Coverage Map

1	MGKPF T LSLS	SLCLLLSSA	CFAISSSKLN	ECQLNNLNAL	EPDHRVESEG
51	GLIQTWNSQH	PELKAQVTV	SMTLNRNGL	HLPSYSPYPP	NIIIAQGRGA
101	LGVAIPGCPE	TFEEPQEQSN	RRGSRSQKQQ	LQDSHQKIRH	FNEG D VLVIP
151	PGVPYWTYNT	GDEPVVAISL	LDTSNFNNQL	DQTPRVFYLA	GNPDI E YPET
201	MQQQQQKSH	GGRKQ Q HQQ	EEEEEGGSVL	SGFSKHFLAQ	SFNT M EDIAE
251	KLQSPDDERK	QIVTVEGGLS	VISPKMQEQQ	DEDEDEDED	EDEQIPSHPP
301	RRPSHGKREQ	DEDEDEDEDK	PRPSRPSQ G K	REQDQDQDED	EDEDEDQPRK
351	SREWRSKKTQ	PRRPRQEEPR	ERGCETRNGV	EENICTLKLH	ENIARPSRAD
401	FYNPKAGRIS	TLNSLTLPAL	RQFQLSAQYV	VLYKNGIYSP	HWNLNANSVI
451	YVTRGQ G KVR	VVNCQGN A VF	DGELRRGQLL	VVPQNFVVAE	QAGEQGF E YI
501	VFKTHHNAVT	SYLKDVFRAI	PSEVLAHSYN	LRQSQVSELK	YEGNWG P LVN
551	PESQQGSPRV	KVA			



Subunit A5A4B3: middle part

255224 Coverage Map

1	MGKPFTLSLS	SLCLLLSSA	CFAISSSKLN	ECQLNMLNAL	EPDHRVESEG
51	GLIQTWNSQH	PELKCAGVTV	SKLTLNRNGL	HLPSPYSPYPR	MIIIAQGKGA
101	LGVAIPGCPE	TFEEPQEQSN	RRGSRSQKQQ	LQDSHQKIRH	FNEGDVLVIP
151	PGVPYWTYNT	GDEPVVAISL	LDTSNFNNQL	DQTPRVFYLA	GMPDIEYPET
201	MQQQQQKSH	GGRKQGQHQQ	EEEEEGGSVL	SGFSKHFLAQ	SFNTMEDIAE
251	KLQSPDDERK	QIVTVEGGLS	VISPKWQEQQ	DEDEDEDED	EDEQIPSHPP
301	RRPSHGKREQ	DEDEDEDEDK	PRPSRPSQ GK	REQDQDQDED	EDEDEDQPRK
351	SREWRSKKTQ	PRRPRQEEPR	ERGCETRNGV	EENICTLKLH	ENIARPSRAD
401	FYNPKAGRIS	TLNSLTLPAL	RQFQLSAQYV	VLYKNGIYSP	HWNLMANSVI
451	YVTRGQGKVR	VVNCQGNVAVF	DGELRRGQLL	VVPQNFVVAE	QAGEQGFEYI
501	VFKTHHNAVT	SYLKDVFRAT	PSEVLAHSMY	LRRQARQVK	MNPPFSFLVP
551	PKESQRRVVA				



Subunit A5A4B3: C-terminus

56201482 Coverage Map

1	MGKPFTLSLS	SLCLLLSSA	CFAISSSKLN	ECQLNMLNAL	EPDHRVESEG
51	GLIQTWNSQH	PELKCAGVTV	SKLTLNRNGL	HLPSPYSPYPR	MIIIAQGKGA
101	LGVAIPGCPE	TFEEPQEQSN	RRGSRSQKQQ	LQDSHQKIRH	FNEGDVLVIP
151	PGVPYWTYNT	GDEPVVAISL	LDTSNFNNQL	DQTPRVFYLA	GMPDIEYPET
201	MQQQQQKSH	GGRKQGQHQQ	EEEEEGGSVL	SGFSKHFLAQ	SFNTMEDIAE
251	KLQSPDDERK	QIVTVEGGLS	VISPKWQEQQ	DEDEDEDED	EDEQIPSHPP
301	RRPSHGKREQ	DEDEDEDEDK	PRPSRPSQ GK	REQDQDQDED	EDEDEDQPRK
351	SREWRSKKTQ	PRRPRQEEPR	ERGCETRNGV	EENICTLKLH	ENIARPSRAD
401	FYNPKAGRIS	TLNSLTLPAL	RQFQLSAQYV	VLYKNGIYSP	HWNLMANSVI
451	YVTRGQGKVR	VVNCQGNVAVF	DGELRRGQLL	VVPQNFVVAE	QAGEQGFEYI
501	VFKTHHNAVT	SYLKDVFRAT	PSEVLAHSMY	LRQSQVSELK	YEGNUGPLVM
551	PESQGS PRV	KVA			



Subunit A3B4: N-terminus

33357662 Coverage Map

1	TSSK	NECOL	NNLNALPDP	RVESEGGLP	TWNSOHPELO	CAGVTYSF	RT
51	LMR	JGLHLPS	YSPYPOMIIV	VOGKGAIGFA	FPGCPETF EK	PQQSSRRGS	
101	R	SQQQLQDSH	QRIRHFNEGD	VLVIPPQVPY	WTYNTGDEPV	VAISLLDTSN	
151		FNNQLDQWPR	VFYLAGHPDI	EHFETMDQDD	QQSHGGRKQ	GQHQQQEEEG	
201		GSVLSGFSKH	FLAQSFNTNE	DTAEKLRSPD	DERKQIVTVE	GGLSVISPKW	
251	QE	QEDEDEDE	DEEYEQTPSY	PPRRPSHGKH	EDDEDEDEEE	DQPRPDHPPQ	
301	RPSR	PEQQEP	RGRGCQTRNG	VEENICTMKL	HENIARPSRA	DFYNPKAGRI	
351	STLNSL	TLPA	LRQFGLSAQY	VVLYRNGIYS	PHWNLNANSV	IYVTRGKGRV	
401	RVVNCQ	GNNAV	FDGELRRGQL	LVPQNFVVA	EQGGEQGLE Y	VVFKTHHNAV	
451	SSYIKD	VFR	IPSEVLSNSY	NLGQSQVRQL	KYQNSGPLY	NP	



Subunit A3B4: C-terminus

PQ0806 Coverage Map

1	DE	DEDEEYEQ	TPSYPPRRPS	HGKHEDDEDE	DEEEDQRPD	HPPQRPSRPE
51	QQE	PRGRGCQ	TRNGVEENIC	TMKLNENIAR	PSRADFYNPK	AGRISTLNSL
101	TL	PALRQFGL	SAQYVVLVYR	GIYSPHWNLN	ANSVIYVTRG	KGRVR
151	SN	AYFDGELR	RGQLLVYPQV	FVVAEQGGEQ	GLEVVVFKTH	HNAVSSYID
201	VFR	AIPSEVL	SNSYNLGQSQ	VRQLKYQGNS	GPLVNP	

PQ0810 Coverage Map

1	PSR	PEQQEPR	GRGCQTRNGV	EENICTMKLH	ENIARPSHAD	FYNPKAGRIS
51	TL	NSLTLPAL	RQFGLSAQYV	VLYRNGIYSP	HWNLNANSVI	YVTRGKGRVR
101	VV	NCQNAVY	DEGLRQGQLL	VVPQNFVVAE	QGGEQGLEVV	VFKTHHNAV
151	SYIK	DVFRAT	PSEVLSNSYN	LGQSQVRQLK	YQNSGPLYN	P

1303273A Coverage Map

1	QE	DEDEDEDE	EYEQTPSYPP	RRPSHGKHED	DEDEDEEHQ	PRPDHPPQRP
51	SR	PEQQEPRG	RGCQTRNGVE	ENICTMKLHE	NIARPSRADF	YNPKAGRIST
101	LN	SLTLPALR	QFGLSAQYVV	LYRNGIYSPH	WNLNANSVIY	VTRGKGRVR
151	VN	CQNAVYD	GELRQGQLLV	VVPQNFVVADQ	GKQGLEVVV	FKTHHNAVSS
201	YIK	DVFRATP	SEVLSNSYNL	GQSQVRQLKY	QNSGPLYNP	

Bijlage 3: Eigenschappen van melkeiwitten.

Eigenschap	α_{s1} -caseine* (B)	α_{s2} -caseine* (A)	β -caseine*	κ -caseine*	β -lactoglobuline*	α -lactalbumine*
Massa (kDa)	23.6	25.2	24.0	19.0	18.3	14.2
Cysteïnes	0	2	0	2	5	8
Aminozuren (AZ)	199	207	209	169	162	123
Geladen AZ (%)	34	36	23	21	30	28
Netto lading/residu	-0.10	-0.07	-0.06	-0.02	-0.04	-0.02
IEP	4.5	5.0	4.8	5.6	5.2	4.3

*Verhouding caseïnes/wei-eiwitten (α -lactalbumine + β -lactoglobuline)/rest is 80:15:5