

Zeitschrift: Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit
Band: 97 (2006)
Heft: 6

Artikel: Bestimmung von Lysozym in Käse mittels LC-MS
Autor: Bärtschi, Franziska / Mural, Lorenz / Rieder, Konrad
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-982049>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 05.02.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Bestimmung von Lysozym in Käse mittels LC-MS

Franziska Bärtschi¹, Lorenz Muralt¹, Konrad Rieder¹, Urs Kämpfer²,
Johann Schaller²

¹Kantonales Laboratorium Bern (Schweiz)

²Departement für Chemie und Biochemie, Universität Bern (Schweiz)

Eingegangen am 16. Mai 2006, akzeptiert am 22. August 2006

Einleitung

Lysozym ist ein Enzym, das in verschiedenen Organismen vorkommt und sie gegen bakterielle Infektionen schützt. Allerdings wirkt Lysozym nur gegen Bakterien, deren Zellwand aussen aus Murein aufgebaut ist (grampositive Bakterien). Lysozym wurde im Speichel, im Nasenschleim, in der Tränenflüssigkeit und im Blutplasma des Menschen nachgewiesen, aber auch im Eiklar von Vogeleiern, in der Milch von Säugetieren, in einigen Pilzen und sogar in Pflanzensäften.

Empfindlich auf Lysozym sind unter anderem auch Buttersäurebakterien (*Clostridium tyrobutyricum*) und dessen Sporen, die in Milch von mit Silagefutter gefütterten Kühen vorkommen. Solche unerwünschten Bakterien können durch Zusatz von Lysozym in die Käsemilch im Wachstum gehemmt und dadurch eine Spätblähung des Käses verhindert werden. Der Zusatz von Lysozym in die Käsemilch für die Produktion von gereiftem Käse ist in der EU und der Schweiz grundsätzlich zugelassen (im Rahmen der Guten Herstellungspraxis, keine Höchstmenge festgelegt). Die Verwendung des Zusatzstoffes muss deklariert werden (E 1105). In den Spezifikationen von Käsesorten mit geschützter Ursprungsbezeichnung oder geschützter geografischer Angabe wird aber oft ausdrücklich auf den Einsatz dieses Enzyms verzichtet. Biokäse darf in der Schweiz nicht mit Lysozym hergestellt werden.

In der Literatur sind bis jetzt nur wenige Methoden für die analytische Bestimmung von Lysozym in Lebensmitteln, publiziert worden, die sich für die Praxis der staatlichen oder betrieblichen Überwachung eignen (1, 2, 3). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine für die Überwachung geeignete Methode zur Bestimmung von Lysozym in Käse zu entwickeln. Die Identifikation sollte mit zwei voneinander

unabhängigen Detektionsverfahren möglich sein und die Bestimmungsgrenze unter 50 mg/kg liegen.

Vorversuche

In der Aminosäuresequenz von Lysozym kommt die fluoreszierende Aminosäure Tryptophan relativ oft vor. Pellegrino und Tirelli publizierten im Jahr 2000 eine gut reproduzierbare Methode für die Bestimmung von Lysozym in Milchprodukten mittels isokratischer HPLC-FLD (1). Bei der Erprobung dieser Methode stellten wir fest, dass sich – je nach Käsesorte – im Chromatogramm die für Lysozym spezifischen Signale teilweise mit störenden Matrixsignalen überlagerten. Für Übersichtsmessungen wurde das von Pellegrino entwickelte Verfahren beibehalten, die chromatografische Trennung erfolgte aber durch Elution mit einem Gradienten. Für Bestätigungsanalysen wurde eine LC-MS-Methode entwickelt. Zusätzlich wurde Lysozym mittels HPLC gereinigt und mit Trypsin hydrolysiert. Mit LC-MS konnte im Hydrolysat ein für Lysozym spezifisches Peptid nachgewiesen und dessen Identität mittels Analyse der Aminosäuresequenz zusätzlich abgesichert werden.

LC-MS-Methode

Prinzip

Die Probe wird zerkleinert und mit Natriumchloridlösung bei pH 6,0 extrahiert. Störende Proteine werden bei pH 4,3 ausgefällt und abfiltriert. Im filtrierten Extrakt wird Lysozym mittels LC-MS identifiziert und quantifiziert.

Probenlagerung

Die Proben werden nach dem Eingang im Laboratorium bei 4°C gelagert.

Probenvorbereitung

Für die Untersuchung wird eine repräsentative Teilprobe ausgewählt. Die Teilprobe wird an einer Käseraffel (handelsübliche Käseraffel, Lochdurchmesser ca. 2 mm) geraffelt.

Geräte

LC-MS mit folgenden Komponenten: Gradientenpumpe P680, Autosampler ASI-100, Säulenthmostat TCC-100, Massendetektor MSQ, Integrationssoftware Chromeleon, Dionex AG.

Weitere Geräte: Polytron PT 3000, Kinematica AG; Analysenwaage, Ablesbarkeit $\pm 0,01$ mg; Laborwaage, Ablesbarkeit ± 10 mg; Schüttler, GFL 3017; pH-Meter; Membranfilter Millex-GV PVDF 0,22 μm , Millipore Art. SLGV 013 NL.

Trennsäulen

Trennsäule für Lysozym

PLRP-S 250×4,6 mm, 300 Å, 5 µm, Polymer Laboratories

Falls eine schlechte Empfindlichkeit von Lysozym beobachtet wird oder eine nicht lineare Kalibrierkurve resultiert, kann die Trennsäule mit Acetonitril/Wasser 80:20+0,1 mol Ammoniak regeneriert werden.

Trennsäule für Untersuchungen des Trypsinhydrolysates

Nucleodur Gravity C18, 250×2 mm, 3 µm, Macherey Nagel

Reagenzien

Lysozym (Biochem, Sigma); Trypsin (from porcine pancreas, Merck, 40 U/mg); Natriumchlorid (pro analysi, Merck, Reinheit: >99%); HCl 37% (puriss, Fluka); NaOH 50% (pro analysi, Baker); Ameisensäure (pro analysi, Merck, Reinheit: >98%); Trifluoressigsäure (UvaSolv, Merck, Reinheit: >99,8%); Acetonitril (LiChrosolv, Merck, Reinheit: >99,9%).

Arbeitsvorschrift für die Extraktion und Reinigung des Lysozyms

- 2,00 g homogenisiertes Probenmaterial in einen 100 mL Erlenmeyerkolben mit Schliff einwiegen.
- 20 mL Natriumchloridlösung $c=1$ mol/L zugeben, mit Natronlauge $c=1$ mol/L auf pH 6,0 stellen.
- Mit Polytron bei 2500–3000 U/min während ca. 30 Sekunden dispergieren.
- Zum Spülen des Polytron-Stabes 20 mL Natriumchloridlösung $c=1$ mol/L in ein 100 mL Becherglas geben, kurz dispergieren und Spüllösung zum Käse-Dispergat geben.
- Erlenmeyerkolben mit einem Stopfen verschliessen und während einer Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur mit einer Frequenz von ca. 160/min schütteln.
- Käse-Dispergat mit Salzsäure $c=1$ mol/L auf pH 4,3 stellen, mit Natriumchloridlösung $c=1$ mol/L in einen 50 mL Messkolben überführen und 15 Minuten stehen lassen.
- Anschliessend durch ein Faltenfilter filtrieren, Filtrat durch ein Membranfilter Millex GV PVDF 0,22 µm in ein HPLC-Vial filtrieren und messen.

Bedingungen LC-MS für die quantitative Bestimmung von Lysozym und Untersuchung des Lysozym-Trypsinhydrolysates

Lysozym-Standardlösungen mit 2, 4 und 8 mg/L aus Standardstammlösung 1000 mg/L und Natriumchloridlösung $c=1$ mol/L täglich neu herstellen.

Da die Standardlösungen und die Probelösungen in Natriumchloridlösung $c=1$ mol/L gelöst sind, muss ein Motorschaltventil (z.B. 6-Weg) zwischen der Trenn-

säule und dem Massendetektor installiert sein. Dieses Ventil wird während den ersten 7 Minuten der Chromatografie so geschaltet, dass die mobile Phase in einen Abfallbehälter fließt und kein NaCl zum Massendetektor gelangt.

Das Laufmittel darf keine Trifluoressigsäure enthalten, da sonst die Ionisation von Lysozym gänzlich unterdrückt wird.

Tabelle 1
Bedingungen LC-MS

	<i>Bestimmung von Lysozym</i>	<i>Untersuchung Lysozym-Hydrolysat</i>				
Einspritz-Volumen	5 µL	5 µL				
Säule	PLRP-S 250*4,6 mm, 300 Å, 5 µm, Polymer Laboratories	Nucleodur Gravity C18, 250 mm, 3 µm, 2 mm, Macherey Nagel				
Temperatur Säule	40°C	40°C				
Eluent A	0,5 % Ameisensäure in Wasser	0,1 % Ameisensäure in Wasser				
Eluent B	0,5 % Ameisensäure in Acetonitril	0,1 % Ameisensäure in Acetonitril				
Flow Eluent	0,80 mL/min	0,20 mL/min				
Flow-Split	0,5 mL/min MS; 0,3 mL/min Waste (bei 25 % B)					
MS	Needle 3,0 kV Probe 550°C Cone 130 V	Needle 2,6 kV Probe 450°C Cone 55 V				
Masse zu Ladungsverhältnis	1431 [M+H ₁₀] ¹⁰⁺ 1590 [M+H ₉] ⁹⁺ 1788 [M+H ₈] ⁸⁺	Peptid 523 [M+H ₂] ²⁺				
Retentionszeit	~ 12,5 min	~ 16,0 min				
Motorschaltventil	0,0 min Eluent MS 0,5 min Eluent Waste 7,0 min Eluent MS					
	<i>min</i>	<i>% A</i>	<i>% B</i>	<i>min</i>	<i>% A</i>	<i>% B</i>
Gradient	0,0	70	30	0,0	90	10
	9,0	30	70	10,0	80	20
	9,1	0	100	18,0	70	30
	12,0	0	100	20,0	60	40
	12,1	70	30	20,1	30	70
	16,0	70	30	21,0	30	70
				21,1	30	70
				30,0	90	10

Lysozym kann massenspektrometrisch als Ion mit der Ladung $z=8^+$, 9^+ oder 10^+ nachgewiesen und quantifiziert werden. Abbildung 1 zeigt als Beispiel das Chromatogramm mit $z=10^+$ eines mit Lysozym hergestellten Emmentalerkäses.

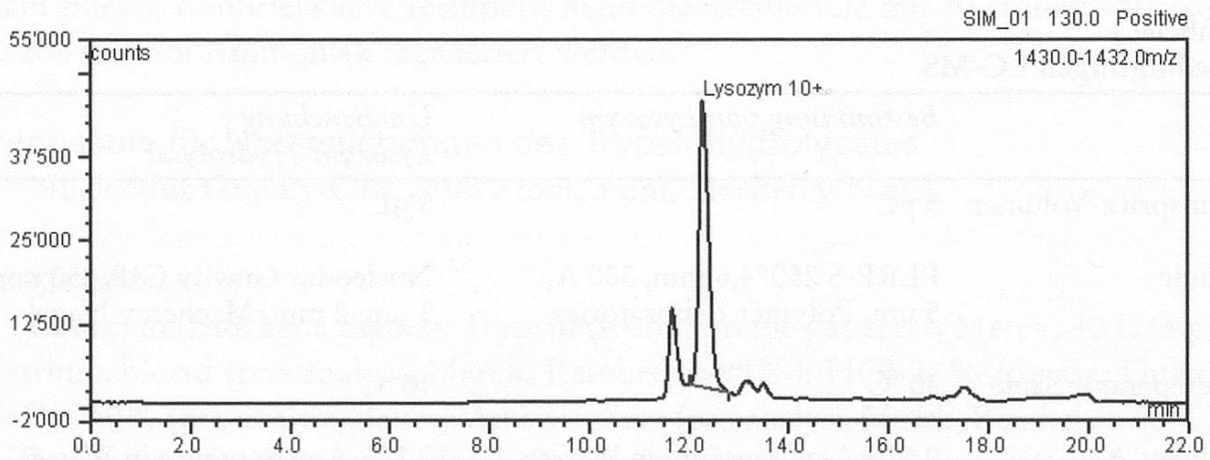


Abbildung 1 LC-MS-Chromatogramm von Emmentalerkäse, hergestellt mit Lysozym ($z=10^+$), bestimmter Gehalt: 240 mg/kg

Als zusätzliche Absicherung kann im Retentionszeitfenster von Lysozym ein TIC-Spektrum aufgenommen und mit reinem Lysozym als Referenz verglichen werden (Abbildung 2).

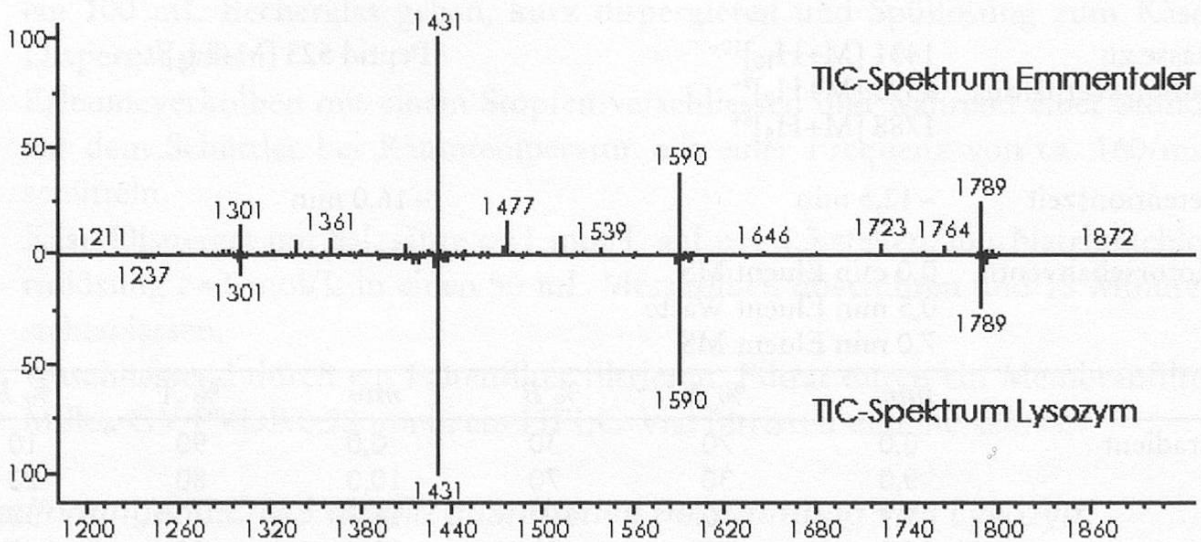


Abbildung 2 Vergleich der TIC-Spektren von Emmentalerkäse, hergestellt mit Lysozym und reinem Lysozym)

Berechnung des Lysozymgehaltes

$$\text{mg Lysozym pro kg} = \frac{\text{MW} \cdot 50}{\text{EW}}$$

MW = Messwert der Probelösung (mg/L)

EW = Einwaage (g)

Hydrolyse von Lysozym mit Trypsin für zusätzliche Bestätigungsanalysen

- 200 µL der membranfiltrierten Extraktionslösung im Zeitfenster von Lysozym fraktionieren (HPLC-FLD).
- Aufgefangene Fraktion mit einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac) zur Trockene einengen.
- Rückstand in 500 µL Hydrolysepuffer (395 mg Ammoniumhydrogencarbonat in 100 mL Wasser lösen, mit Ammoniaklösung auf pH 8,5 einstellen) lösen, 20 µL Trypsinlösung (10 mg lyophilisiertes Trypsin in 10 mL 0,01 % Trifluoressigsäure lösen) zugeben und während 24 h bei 35 °C inkubieren.
- Lysozymhydrolysat in ein HPLC-Vial transferieren und mit LC-MS untersuchen.

Ergebnisse und Diskussion

Extraktionszeit

Im Extrakt einer Probe Grana Padano, hergestellt mit Lysozym wurde der Lysozymgehalt nach verschiedenen langen Extraktionszeiten bestimmt. Die Resultate bestätigten, dass die von Pellegrino (1) vorgeschlagene Extraktionsdauer von 60 Minuten optimal ist (Tabelle 2).

Tabelle 2

Einfluss der Extraktionsdauer bei Grana Padano

Extraktionsdauer	Lysozymgehalt in mg/kg
1 Minute	165
15 Minuten	161
30 Minuten	162
60 Minuten	184
90 Minuten	178

Kalibrierung

Standardlösungen mit 2, 4 und 8 mg/L wurden je dreifach mit LC-MS gemessen. Die relativen Standardabweichungen lagen im Bereich von 1–10%. Die Kalibrierkurve war im Messbereich von 2 bis 8 mg/L linear ($R^2 > 0,99$).

Untersuchungen von Emmentalerkäse ohne und mit Lysozym

In einer Käserei wurden zwei Chargen Emmentalerkäse mit (=Proben A und B) und eine Charge ohne (=Probe C=Nullprobe) Lysozym hergestellt. Die Käselai

wurden etwa während eines halben Jahres in einem Käsekeller gereift. Für die Proben A und B wurde aus der Rezeptur ein Lysozymgehalt von 235 mg/kg abgeschätzt (Annahme: Lysozym geht vollständig in den Käseteig über). Die gemäss Vorschrift hergestellten Extrakte der 3 Proben wurden mit der LC-MS- und HPLC-FLD- Methode von Pellegrino untersucht.

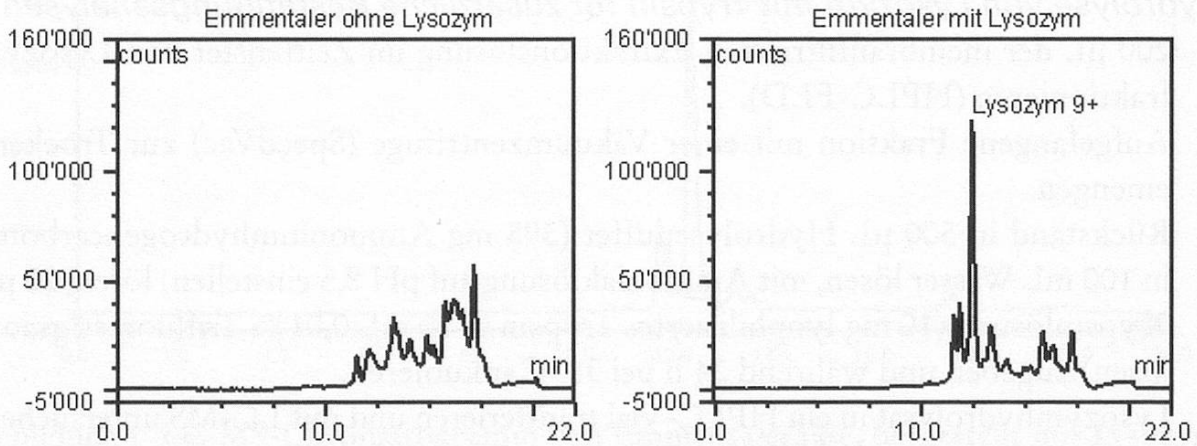


Abbildung 3 LC-MS-Chromatogramm von Emmentalerkäse, hergestellt ohne und mit Lysozym ($z=9^+$)

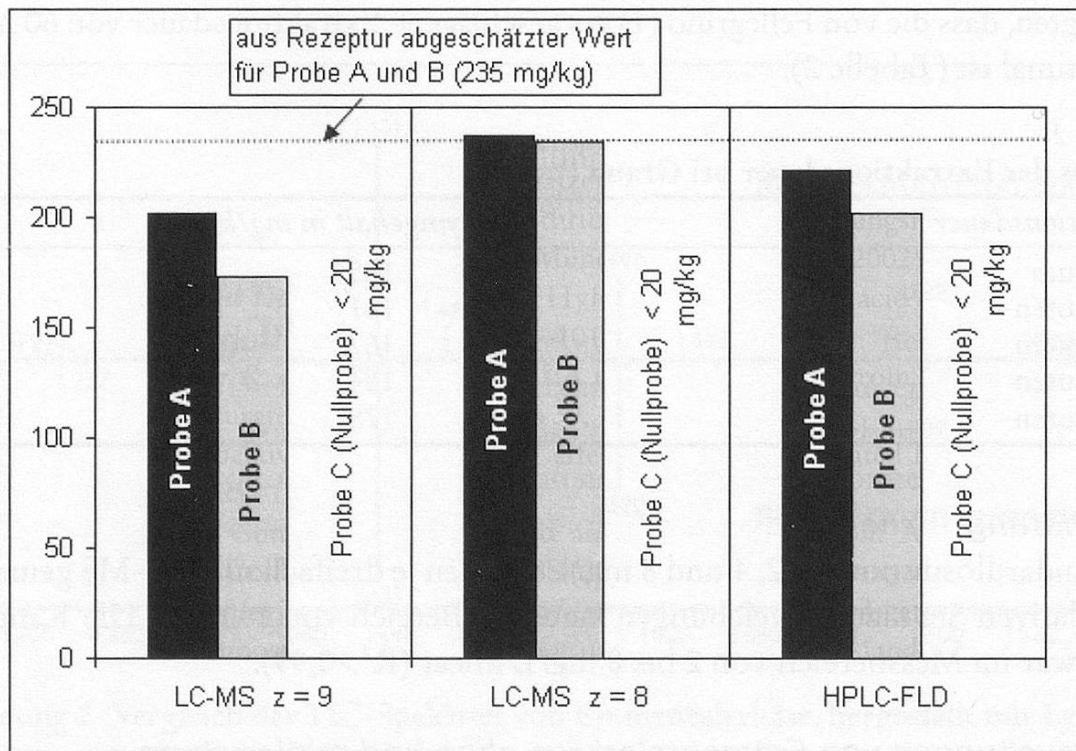


Abbildung 4 Wiederauffindungsraten mit LC-MS und HPLC-FLD

Das Chromatogramm von Probe C (Nullprobe) mit LC-MS und $z=9$ wies im Zeitfenster von Lysozym einige Matrixsignale auf, die aber die quantitative Auswertung nicht erheblich störten (Abbildung 3).

Die Resultate für Probe A und B stimmten erstaunlich gut mit dem aus der Rezeptur abgeschätzten Wert überein (Abbildung 4). Sie zeigen auch, dass Lysozym in Emmentalerkäse während der Reifung nur wenig abgebaut wird. Die Abweichungen zwischen den LC-MS-Resultaten mit $z=9$ und $z=8$ sind vermutlich auf die unterschiedlichen Signalintensitäten und die erwähnten Matrixsignale im Zeitfenster von Lysozym zurückzuführen.

Wiederholbarkeit der LC-MS-Methode

3 Proben wurden gemäss Vorschrift je 2mal aufgearbeitet. Die Wiederholbarkeit der LC-MS-Methode lag im Bereich von 6 bis 14%.

Bestätigung mittels Peptidanalyse nach Hydrolyse mit Trypsin

In einem Vorversuch wurde eine Standardlösung von Lysozym gemäss Vorschrift mittels HPLC fraktioniert und mit der Endoproteinase Trypsin hydrolysiert. Trypsin spaltet dabei interne Peptidbindungen der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin C-terminal. Das für Lysozym charakteristische Peptid f(117–125) GTDVQAWIR (Abbildung 5) konnte mit der beschriebenen LC-MS-Methode und einer Sequenzanalyse nach Edman identifiziert werden (Sequenzanalyse, durchgeführt durch die Forschungsgruppe für Proteinanalytik, Departement für Chemie und Biochemie, Universität Bern, Schweiz).

```
1  KVFGRCELAA  AMKRHGLDNY  RGYSLGNWVC  AAKFESNFNT  QATNRNTDGS
51  TDYGILQINS  RWWCNDGRTP  GSRNLCNIPC  SALLSSDITA  SVNCAKKIVS
101 DGNGMNAWVA  WRNRCKGTDV  QAWIRGCRL
```

Abbildung 5. Peptid f(117–125) GTDVQAWIR in der Aminosäuresequenz von Lysozym aus Hühnereiweiss)

Je eine Probe Käse, hergestellt mit und ohne Lysozym, wurden gemäss Vorschrift aufgearbeitet. Die Lysozym-Fractionen wurden mit Trypsin hydrolysiert und auf das Peptid f(117–125) GTDVQAWIR untersucht. Ein Vergleich der Chromatogramme zeigt, dass das Signal des gesuchten Peptids (m/z 523, $z=2$) nur im Hydrolysat der Käseprobe mit Lysozym erscheint (Abbildung 6).

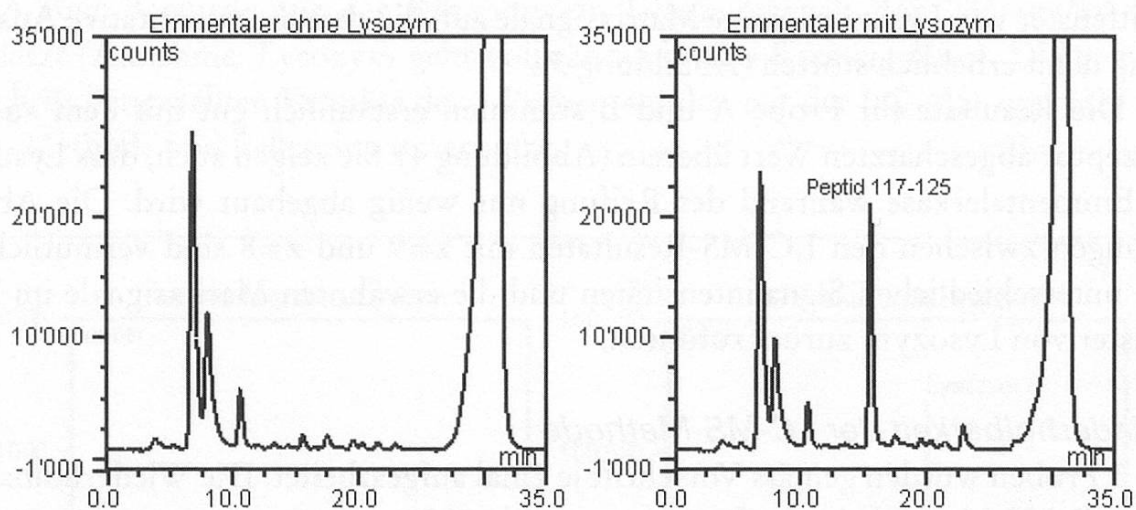


Abbildung 6 Vergleich der Trypsin-Hydrolysate von Käseproben ohne und mit Lysozym)

Abschätzung der Bestimmungsgrenzen

Die Bestimmungsgrenze mit LC-MS (halbe Standardabweichung des Rauschens $\times 10$) für Lysozym beträgt ca. 1 mg/L in der Messlösung; dies entspricht etwa 25 mg/kg im Käse.

Untersuchungen von Käseproben aus dem Handel

Im Zeitraum 2002 bis 2005 wurden insgesamt 258 Käseproben aus Verkaufsgeschäften im Kanton Bern mit der Methode von Pellegrino (1) auf ihren Lysozymgehalt untersucht. Lysozym war vor allem in den Käsesorten Grana Padano (Italien), Manchego (Spanien) und in geriebenem Parmigiano Reggiano (Italien) nachweisbar (Abbildung 7). 7 Proben mit Gehalten über 50 mg/kg wurden auch mit der LC-MS-Methode untersucht. Sie zeigten alle das für Lysozym charakteristische Massenspektrum. Die Abweichungen zwischen der LC-MS- und der HPLC-FLD-Methode lagen im Bereich von $\pm 20\%$.

Lysozymgehalte über 100 mg/kg wurden auch in Proben von Le Petite Chaudmes, Brebiou (Frankreich); Castelões, Queija (Portugal) und Montasio (Italien) gemessen.

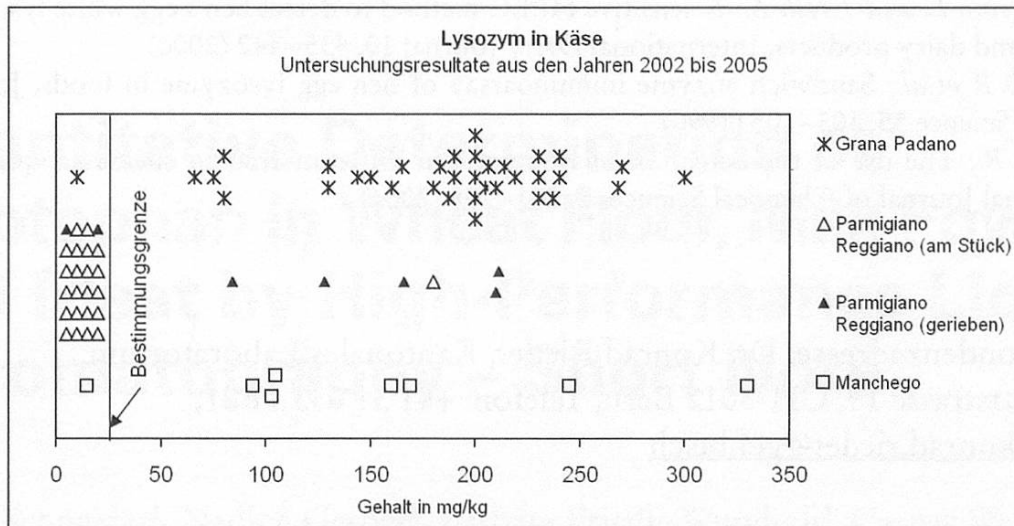


Abbildung 7 Lysozym in Proben von Grana Padano, Parmigiano Reggiano und Manchego)

Zusammenfassung

Für die Bestimmung von Lysozym in Käse wurde eine LC-MS-Methode entwickelt und in der Praxis erprobt. Die Bestimmungsgrenze lag bei 25 mg/kg. In einer mit HPLC gereinigten Fraktion konnte nach Hydrolyse mit Trypsin ein für Lysozym spezifisches Peptid mit LC-MS nachgewiesen und die Identität mittels Aminosäure-Sequenzierung zusätzlich abgesichert werden.

Résumé

Une méthode LC-MS a été développée et utilisée en routine pour le dosage des lysozymes dans le fromage. La limite de quantification est de 25 mg/kg. Après hydrolyse trypsique d'une fraction purifiée par HPLC, un peptide spécifique aux lysozymes peut-être décelé. L'identification de ce dernier peut-être en outre certifiée par le séquençage d'acides aminés.

Summary "Determination of Lysozyme in cheese by LC-MS"

A LC-MS method for the determination of Lysozyme in cheese was developed and tested in practice. The detection limit was about 25 mg/kg. An extract, purified by HPLC was digested with Trypsin. A peptide characteristic for Lysozyme was identified by LC-MS and additionally by amino acid sequence analysis.

Key words

Lysozyme, Cheese, HPLC, LC-MS

Literatur

- 1 *Pellegrino L. and Tirelli A.*: A sensitive HPLC method to detect hen's egg white lysozyme in milk and dairy products, *International Dairy Journal* 10, 435–442 (2000)
- 2 *Rauch P. et al.*: Sandwich enzyme immunoassay of hen egg lysozyme in foods, *Journal of Food Science* 55, 103–105 (1990)
- 3 *Sariri R.*: The use of the detection of lysozyme in different Iranian cheese samples, *International Journal of Chemical Sciences* 2, 291–298 (2004)

Korrespondenzadresse: Dr. Konrad Rieder, Kantonales Laboratorium,
Muesmattstrasse 19, CH-3012 Bern, Telefon: +41 31 633 11 21,
E-Mail: konrad.rieder@gef.be.ch