

Neue Technologien in der Analytik von Milch und Milchprodukten - Möglichkeiten und Grenzen

Ernst Jakob, Daniel Wechsler
FML Wintertagung 6. Februar 2017
Zentrum Liebegg, Gränichen

Übersicht

- Automatisierte Probenaufarbeitung für molekularbiologische und biochemische Analysen
- Quantitative molekularbiologische Methoden mit hohem Durchsatz (High Throughput qPCR)
- Einsatz von LC-MS zur Abklärung proteolysebedingter Produktfehler (Bitterkeit, Gerinnung)

Automatisierte Probenaufarbeitung

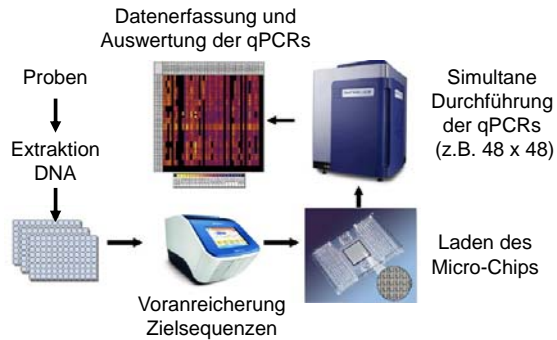


Übersicht

- Automatisierte Probenaufarbeitung für molekularbiologische und biochemische Analysen
- Quantitative molekularbiologische Methoden mit hohem Durchsatz (High Throughput qPCR)
- Einsatz von LC-MS zur Abklärung proteolysebedingter Produktfehler

High throughput qPCR System

→ Quantitative Bestimmung verschiedener Merkmale in einer Probe



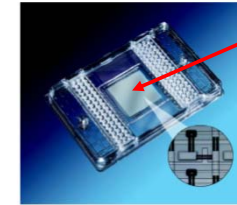
Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch

5

High throughput qPCR

Beispiel: Fluidigm 48.48 Dynamic Array™ IFC

- qPCR-System, entwickelt für hohen Probendurchsatz
- micro-Chip, entwickelt für miniaturisierte qPCR-Analysen
- gleichzeitige Analyse von 48 Proben auf 48 Zielsequenzen
- 2304 Einzelanalysen auf einem Silicon-Chip (ca. 10 x 15 cm)



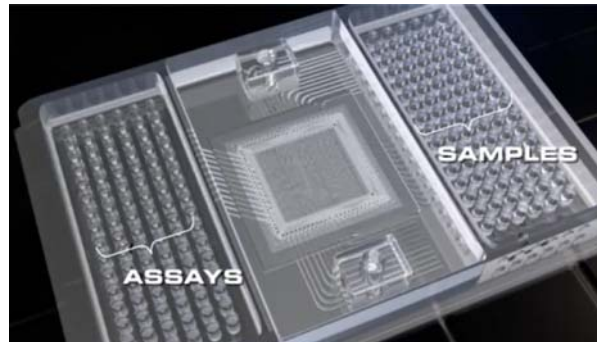
«Mikrolabor» bestehend aus Röhren, Ventilen, Reagenziengefässen und Probengefässen im Nano-Massstab

<https://www.youtube.com/watch?v=s9HUuCbhhU>

Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch

6

High throughput qPCR



Links: Reagenzien Mitte: Micro-Labor Rechts: Proben
Abmessungen Chip: 128 mm x 85 mm x 14 mm

Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch

7

High throughput qPCR



Probenkammer im «Mikro-Labor» (Volumen = 9 Nanoliter)
Chipgrösse: Chip 48x48 mit 2304 Probenkammern

Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch

8

High throughput qPCR

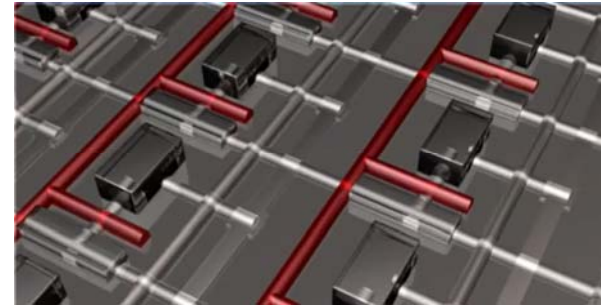


Reagenzienkammer im «Mikro-Labor» (Volumen = 1 Nanoliter)
Chipgröße: Chip 96x96 mit 9216 Probenkammern

Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch

9

High throughput qPCR

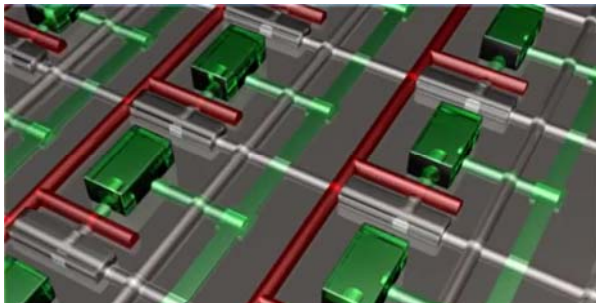


Schritt 1: Schliessen der Verbindung zwischen Probenkammer und Reagenzienkammer mit einer Flüssigkeit (rot)

Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch

10

High throughput qPCR

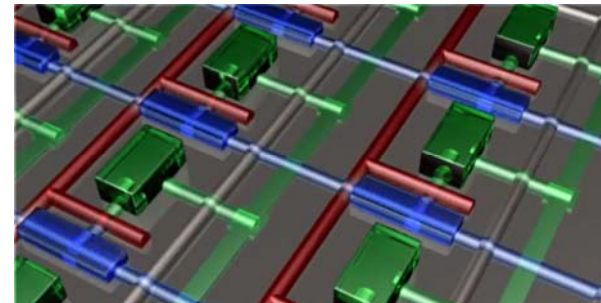


Schritt 2: Füllen der 2304 Probenkammern mit Proben (grün)
(48 Kammern mit Probe 1, 48 Kammern mit Probe 2, etc...)

Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch

11

High throughput qPCR

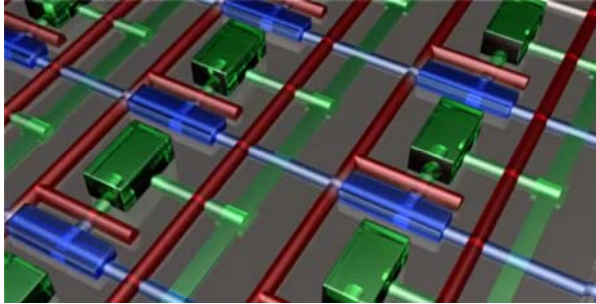


Schritt 3: Füllen der 2304 Reagenzienkammern (blau)
(48 Kammern mit Primer 1, 48 Kammern mit Primer 2 etc...)

Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch

12

High throughput qPCR

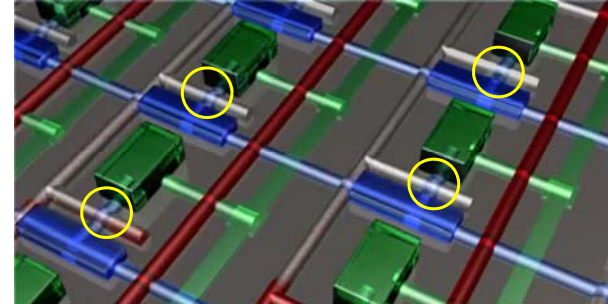


Schritt 4: Verschluss der Reagenzien- und Probenkammern mit einer Flüssigkeit (rot)

Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch

13

High throughput qPCR

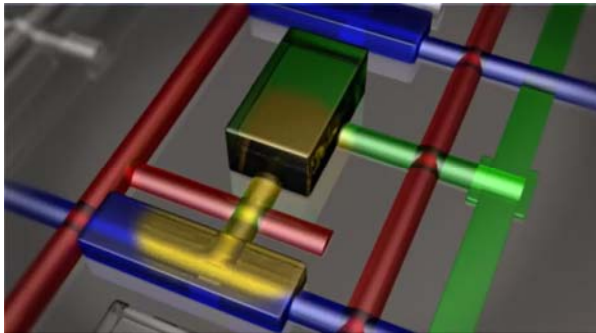


Schritt 5: Öffnen der Verbindung zwischen Reagenzien- und Probenkammern, damit Probe und Reagenzien sich vermischen

Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch

14

High throughput qPCR

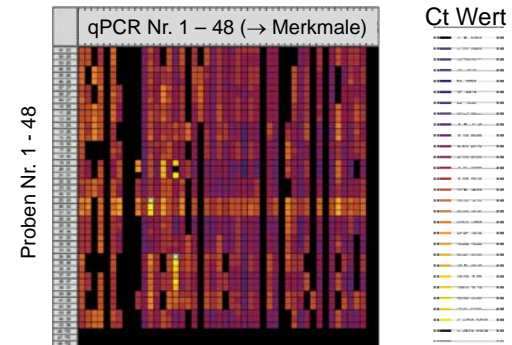


Schritt 6: Durchführung der qPCR-Cyclen; Messung der 2304 Reaktionen mit «Mikrokamera» (z.B. Fluoreszenz)

Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch

15

High throughput qPCR



Schritt 7: Digitale Erfassung und Auswertung der erfassten Messsignale mittels «Farbenkarte» (heat-map)

Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch

16

➤ Anwendungen High throughput qPCR

First set (core)	Second set	Third set
1 Streptococcus thermophilus	21 Clostridium beijerinckii	41 Pseudomonas putida
2 Lactococcus lactis	22 Clostridium botulinum	42 Macrococcus caseolyticus
3 Lactobacillus delbrueckii	23 Clostridium butyricum	43 Lactobacillus buchneri
4 Lactobacillus helveticus	24 Pediococcus acidilactici	44 Enterococcus casseliflavus
5 Lactobacillus casei	25 Pediococcus pentosaceus	45 Corynebacterium casei
6 Lactobacillus rhamnosus	26 Citrobacter freundii	46 Arthrobacter arilaitensis
7 Lactobacillus paracasei	27 Thermus thermophilus	47 Brevibacterium linens
8 Leuconostoc mesenteroides	28 Lactobacillus coryniformis	48 Brevibacterium aurantiacum
9 Lactobacillus plantarum	29 Lactobacillus curvatus	
10 Enterococcus faecalis	30 Lactobacillus brevis	
11 Enterococcus faecium	31 Yarrowia lipolytica	
12 Enterococcus durans	32 Geotrichum candidum	
13 Lactobacillus fermentum	33 Debaryomyces hansenii	
14 Lactobacillus parabuchneri	34 Listeria innocua	
15 Propionibacterium acidipropionici	35 Listeria monocytogenes	
16 Propionibacterium freudenreichii	36 Salmonella typhimurium	
17 Propionibacterium jensenii	37 Escherichia coli	
18 Propionibacterium thoenii	38 Proteus vulgaris	
19 Clostridium tyrobutyricum	39 Hafnia alvei	
20 Staphylococcus aureus GTB	40 Morganella morganii	

z.B. Gleichzeitige, quantitative Bestimmung von 48 Spezies in Käse (oder Nachweis von bestimmten Genen → z.B. Aspartase)

➤ Kosten High throughput qPCR

Tarife an der EPFL (für interne):

The cost for the Biomark HD is as follow (all the reagents including mastermix are included):

- 700 CHF für Analysen im 48.48 Format (inkl. Voranreicherung DNA) (48.48 Chip → 2304 qPCR → CHF 0.30 pro qPCR)
- 1900 CHF für Analysen im 96.96 Format (inkl. Voranreicherung DNA) (96.96 Chip → 9216 qPCR → CHF 0.20 pro qPCR)

Zusätzliche Analysenkosten für

- Probenaufarbeitung (DNA-Extraktion)
- Beschaffung Primersysteme

Analysen mit High-Trouput qPCR sind ca. **10 x günstiger als herkömmliche qPCR-Analysen**, so dass gute Chancen bestehen, dass sich solche Systeme in der Routineanalytik etablieren werden.

➤ Ausblick High troughput qPCR



- Quantitative Bestimmung des Mikrobioms von qualitativ **guten** Sortenkäsen (Sammlung von Referenzdaten)
 - Quantitative Bestimmung des Mikrobioms von qualitativ **fehlerhaften** Sortenkäsen
- Vergleich der Mikrobiome von guten und fehlerhaften Käsen

Praxisorientierte Anwendungen

- Ursachen von ev. mikrobiologisch bedingten Qualitätsfehlern
- z.B. Ursache für kurzer weisser Teig bei Emmentaler

➤ Grenzen der Methode

- Kleine Volumina (z.B. 9 nL) bedeuten auch wenig DNA, trotz Voranreicherung der DNA
- Nachweisgrenze ohne vorangehende **kulturelle** Anreicherung bleibt zu hoch z.B. für Keime, die in geringen Konzentration schädlich sind, z.B. *Clostridium tyrobutyricum*, *Listeria monocytogenes* (Schadenschwelle: 25 Keime/Liter)
- Gefunden wird nur, wonach gesucht wird
- Gibt es 48 relevante Zielsequenzen?

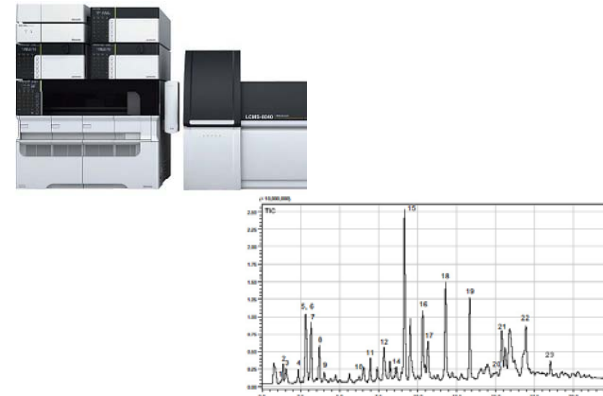
Übersicht

- Automatisierte Probenaufarbeitung für molekularbiologische und biochemische Analysen
- Quantitative molekularbiologische Methoden mit hohem Durchsatz (High Throughput qPCR)
- Sequenzierung von Erbsubstanz mit Methoden der neuesten Generation (Next Generation Sequencing)
- Einsatz von LC-MS zur Abklärung proteolysebedingter Produktfehler (Bitterkeit, Süßgerinnung)

Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch

21

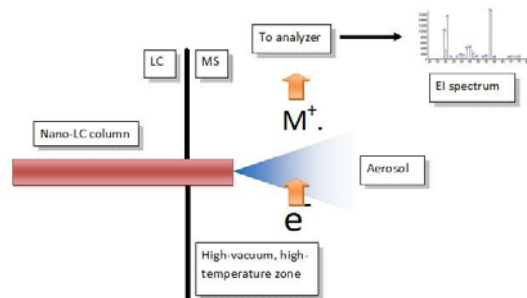
Koppelung von Flüssigchromatographie (LC) und Massenspektroskopie (MS)



Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch

22

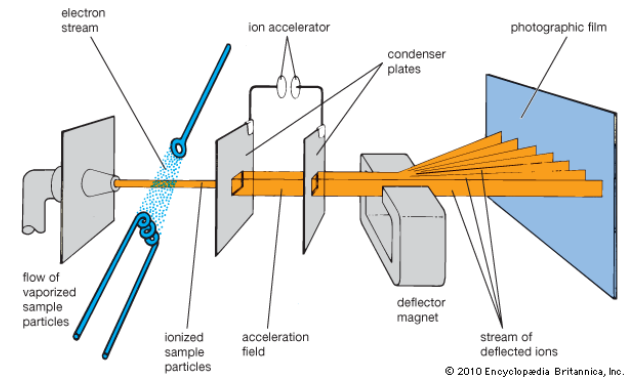
Prinzip der LC-MS



Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch

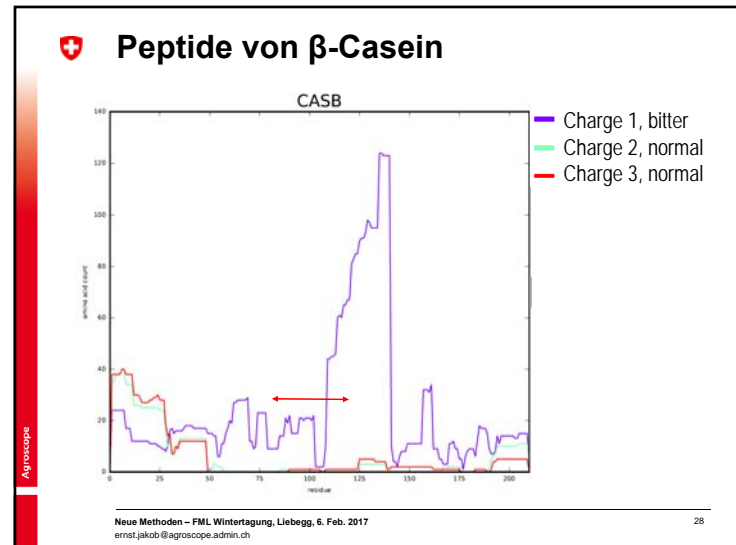
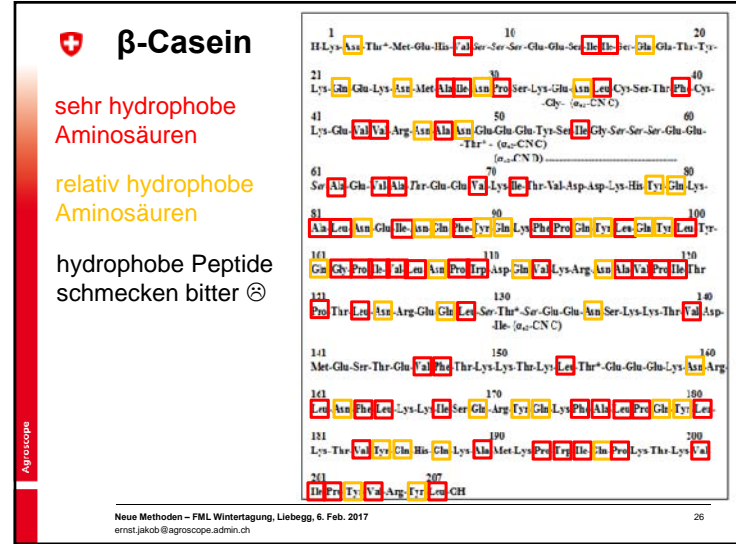
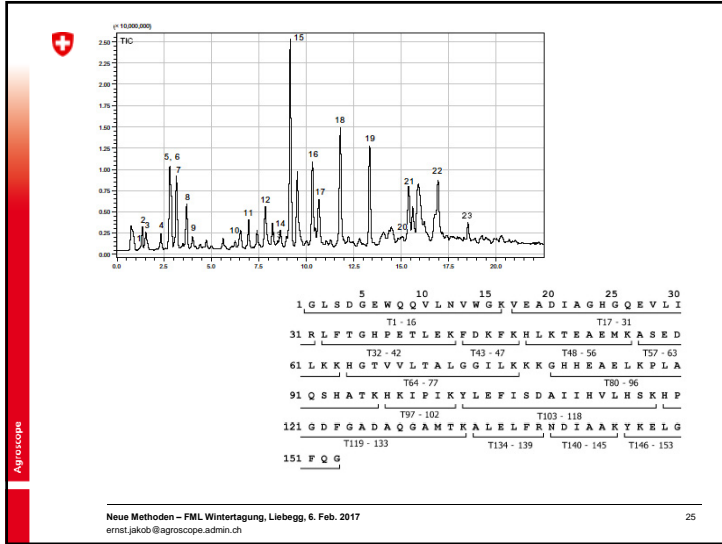
23

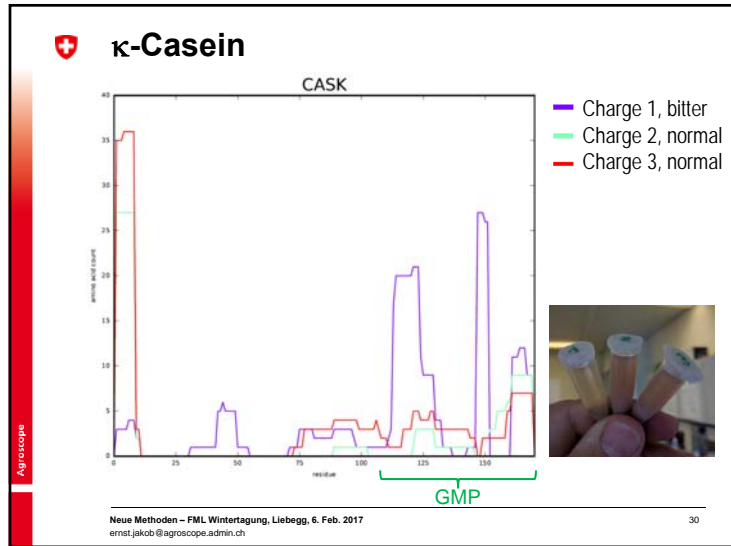
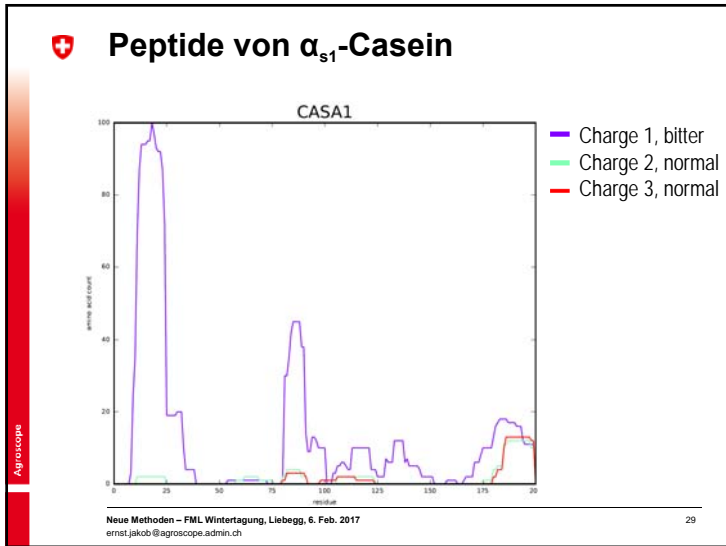
Prinzip der Massenspektroskopie



Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch

24





- ### Fazit LC-MS
- Ursache der Bitterkeit von Milchprodukten kann mit LC-MS klar identifiziert werden → Proteolyse
 - LC-MS ist auch anwendbar zur Abklärung von Gerinnungsphänomenen, die proteolytisch bedingt sind
 - Aber: Damit ist die eigentlich Ursache noch nicht identifiziert
 - Rohmilchqualität ?
 - Biofilme ?
 - Kulturen ?
 - ...
- Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch

- ### Quintessenz
- Neue Labortechnologien bieten teilweise phantastische Möglichkeiten zur Beantwortung alter und neuer Fragestellungen
 - Aber: Die **eierlegende Wollmilchsau gibt es** auch in der Analytik **nicht**
- Neue Methoden – FML Wintertagung, Liebegg, 6. Feb. 2017
ernst.jakob@agroscope.admin.ch