

Application News

No.**B57**

MALDI-TOF 質量分析法 MALDI-TOF Mass Spectrometry

MALDI-TOF MS による 乳製品のプロファイリング

Milk and Dairy Product Profiling Using MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS による微生物同定の手法は、微生物以外のサンプルの分子プロファイリングに応用できる可能性があります。当社の MALDI-TOF MS ラインナップである AXIMA と微生物同定のためのデータベース検索用ソフトを組み合わせた AXIMA 微生物同定システムが有するオープンデータベースの柔軟性が、分子プロファイリング、すなわち各サンプル固有の特長に基づいたサンプルの識別を可能にします。

新規に登録したサンプル固有のデータ(SuperSpectra™)を既存のデータベースに追加することにより、特定の分野の研究に関連するカスタマイズデータベースを作成することが可能です。MALDI-TOF MS による分子プロファイリングが報告されている分野は様々で、細胞株の同定、昆虫学、動物プランクトンの研究、魚種の鑑別や食中毒菌の研究など多岐に渡ります(参考文献 1-7)。

乳製品の偽装混入が、ヨーロッパにおいて問題となっています。牛以外の動物の、高級なミルクから作られる乳製品に、コスト削減の意図から故意に添加した牛乳を検出する手法は、偽装混入を根絶するために重要です。

欧州連合 (EU) が規定する原産地名称保護制度 (PDO) は、イタリアのカンパニア州地域で生産され、珍重されている、水牛のモッツァレラチーズを保護しています (カンパニアの水牛モッツァレラ)。モッツァレラチーズは牛乳からも作ることができますが、その場合は、PDO の認定を受けることが出来ず、より安価な製品となります。2010 年にイタリアの農業省が "カンパニアの水牛モッツァレラ"とされる製品をチェックしたところ、少なくとも 25 %に牛乳が含まれて

いることが判明しました。これにより、牛乳のモッツァレラを水牛乳のモッツァレラとして偽装する試みが広く行われていることが明らかとなっています。

ここでは、乳製品の迅速な識別による不正行為の特定のための AXIMA 微生物同定システムの有効性について紹介します。この技術のコンセプトを、いくつかの異なる種類のミルクのプロファイリングにより示します。確立した手法を、次に、モッツァレラをモデル試料とした食品の真正性確認に適用しました。

K. Shima

■SuperSpectrum コンセプト

The SuperSpectrum Concept

SuperSpectra はある特定の種もしくはサンプルの個体群を表す、AXIMA 微生物同定システムのデータベースです。そのデータベースは、1つのサンプル種から取得された複数のマススペクトル(ReferenceSpectra)から共通するピークを抜き出したスペクトルを算出し、さらに、それらのピークを特異性に基づき重みづけすることによって作成されています。重みづけのアルゴリズムは、サンプルの種に特異性の高いピークに重みをつけ、特異性の低いピークには重みをつけないようにすることにより、データベースマッチングの際の信頼性を高めます。SuperSpectrum 作成に用いられるプロセスの説明図を Fig. 1 に示します。

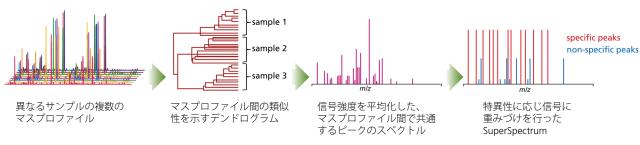


Fig. 1 SuperSpectrum の作成 Creation of a SuperSpectrum

実験

Experimental

3種類のミルク(牛、水牛、ヤギ)と2種類のモッツァレラチーズ(牛と水牛)を複数の施設より入手しました(Table 1)。まずは、各乳製品ごとに複数のマススペクトルを取得し、それらのマススペクトルをもとに各乳製品に特徴的な SuperSpectrum を作成することにより、乳製品固有のデータベースを作成しました。

ミルクのサンプルは、0.1 % トリフルオロ酢酸で 10 倍に 希釈しました。1 μ L のこの溶液をターゲットプレートに搭載し、ほぼ乾燥したところで 1 μ L の CHCA マトリックス溶液を重層しました。モッツァレラのサンプル調製は、白金耳を用いて極少量のモッツァレラを Flexi Mass-DS 微生物同定用ディスポーザブルサンプルプレートに塗布し、1 μ L の CHCA を加えることにより行いました。スペクトルは、m/z 2000 から 20000 の質量範囲で取得しました。

Table 1 ミルクとモッツァレラサンプルの概要 Summary of the Milk and Mozzarella Samples

製品名	製品のタイプ	生物種
Tesco Semi-skimmed	ミルク	牛
Tesco Pure Filtered	ミルク	牛
Tesco Jersey & Guernsey Cow	ミルク	牛
Delamere Sterilized Whole	ミルク	牛
Laverstock Park Semi-skimmed	ミルク	水牛
Laverstock Park Whole	ミルク	水牛
St Helen's Farm Semi-skimmed	ミルク	ヤギ
Galbani	モッツァレラ	牛
Waitrose Italian	モッツァレラ	牛
Cantile	モッツァレラ	水牛
Laverstock Park	モッツァレラ	水牛
Garofalo	モッツァレラ	水牛

■結果

原理の証明 Results

Proof of Principle

分析の結果,異なる種類のミルク(牛,ヤギ,水牛)からはそれぞれの種特異的な質量のピークを示す分類群特異的なマスプロファイルが得られました。Fig. 2 にこれらのプロファイル間で観察された差を表す部分を示します。

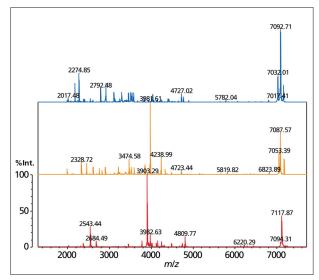


Fig. 2 牛、ヤギ、水牛の乳のマスプロファイル Mass Profiles for Goat, Cow and Buffalo Milk

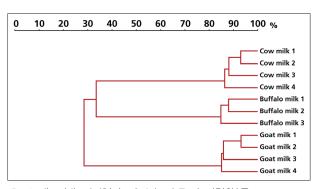


Fig. 3 牛,水牛,ヤギ由来のミルクのクラスター解析結果 Cluster Analysis of Milk Originating from Cow, Buffalo and Goat

さらに、牛、水牛、ヤギのミルクのサンプルを追加で分析 し、クラスター解析を行いました。得られたデンドログラム により、これらのミルクサンプルをうまく識別できることが 確認できました(Fig. 3)。

■混合した乳製品からの混合成分の検出

Food Adulteration Detection

ミルクと同様に、製品特有の質量を示すマスプロファイルが、異なるタイプのモッツァレラチーズからそれぞれ得られました(Fig. 4)。

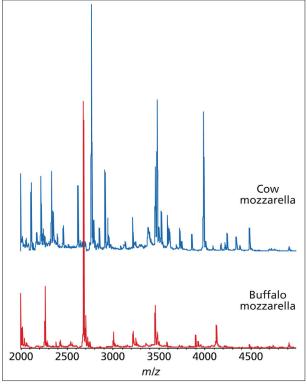


Fig. 4 牛と水牛のモッツァレラチーズのマスプロファイル Mass Profiles for Cow and Buffalo Mozzarella Cheese

モッツァレラ試料への混入をシミュレーションするために、カンパニアの水牛モッツァレラと牛のモッツァレラを混合し、同様にサンプル調製を行いました。この混合サンプルのマススペクトルを Fig. 5 に示します。水牛と牛モッツァレラそれぞれに固有のピークが、明瞭に検出されています。

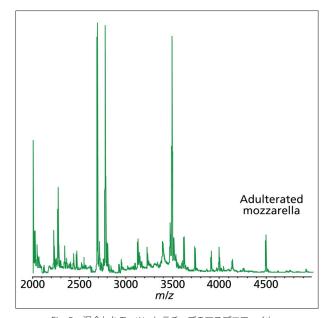


Fig. 5 混合したモッツァレラチーズのマスプロファイル Mass Profiles for Adulterated Mozzarella Cheese

混合したモッツァレラ試料の質量プロファイルを,乳製品用カスタムデータベースを対象に検索にかけると,単一種の同定結果ではなく複数種の同定可能性が示されました(Fig. 6 の赤色表示)。検索結果の詳細を確認すると,混合したモッツァレラ試料の質量プロファイルは,水牛と牛,両方のモッツァレラデータベースにマッチしており,混合試料であることを示すことができました(Fig. 6)。

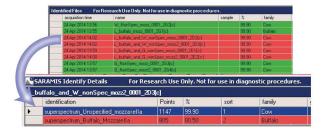
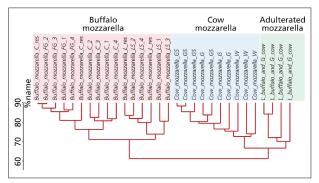


Fig. 6 混合モッツァレラであることを確認できた検索結果 Search Result Confirming Mozzarella Adulteration

混合サンプルのさらなる解析を行いました。クラスター解 析の結果, 牛モッツァレラ, 水牛モッツァレラ, 混合モッ ツァレラ(牛+水牛)と、3つのグループに明確に分かれ、 AXIMA 微生物同定システムが乳製品の偽装混入検出に適用 できる可能性があることが示されました(Fig. 7)。



水牛、牛、混合モッツァレラのクラスター解析結果 Cluster Analysis of Buffalo, Cow and Adulterated Mozzarella

■結論

Conclusion

食品の偽装混入は食品分野において重要な問題です。偽装 混入は、製品の誤表示や、質の劣る原料の故意の混入からな ります。今回の結果は、乳製品の混入の有効な検出が行える ことを示しています。カスタムデータベースの作成は簡単で あり、特許取得済みの SuperSpectrum のコンセプトを利用 することによって信頼性の高い結果を提供します。クラス ター解析ツールは、得られた結果をシンプルでグラフィカル に表示します。AXIMA 微生物同定システムの微生物同定以 外の用途として,今後,シンプルで効率的な食品の混入検出 と真正性スクリーニングの有効なプラットフォームとなるこ とが期待されます。

参考文献

- (1) Vogel et al, BMC Proceedings. 2011; 5 (suppl 8): p45.
- (2) Muller P et al, PLoS ONE. 8 (2): e57486.
- (3) Kaufmann C et al, Parasitology. 2012; 139: 248-258.
- (4) Kaufmann C et al, Medical and Veterinary Entomology. 2011; 25: 32-38.
- (5) Riccardi N et al, Journal of Plankton Research. 2012; 34: 6, 484-492.
- (6) Volta P et al, J. Limnol. 2012; 71 (1): 164-169.
- (7) Stephan R et al, Journal of Microbiological Methods. 2011; 87: 150-153.

株式会社島津製作所

分析計測事業部 グローバルアプリケーション開発センター

555 0120-131691 島津コールセンター

(075) 813-1691

初版発行: 2015年7月

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

https://solutions.shimadzu.co.jp/