

MALDI-TOF MS zur Tierartenbestimmung in Milch und Käse

Männig, A., Hiller E., Rau, J.

Joerg.Rau@cvuas.bwl.de

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, Schaflandstraße 3/2, 70736 Fellbach

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart

EINLEITUNG

Der Schutz des Verbrauchers vor falsch deklarierten Lebensmitteln ist ein wichtiges Ziel der amtlichen Lebensmittelüberwachung. Bei Molkereiprodukten ist die Angabe der Tierart dabei besonders relevant für die Kaufentscheidung: Ist der teure Büffel-Mozzarella auf der Pizza nicht doch die günstigere Variante aus Kuhmilch? Sind die als Feta ausgelobten weißen Würfel im Salat kein Imitat? Für den analytischen Routine-Nachweis solcher Täuschungen sind bisher vor allem molekularbiologische, immunologische oder fettanalytische Methoden im Einsatz.

Einen weiteren Zugang zur Tierartbestimmung bietet die MALDI-TOF Massenspektrometrie (MS) [1,2,3]. Hiermit können gut ionisierbare große Biopolymere, wie beispielsweise Proteine aus Mikroorganismen, Fleisch oder Milch relativ schonend analysiert werden (s. Abb. 1).

Die Identifizierung einer unbekannt Probe gelingt durch Vergleich des erhaltenen Massenspektrums mit den in einer Datenbank hinterlegten Referenzen. Diese Datenbank ist der Schlüssel zur Identifizierung. Für die Bestimmung der Tierart von Milch und Käse ist kommerziell bisher keine Datenbank verfügbar.

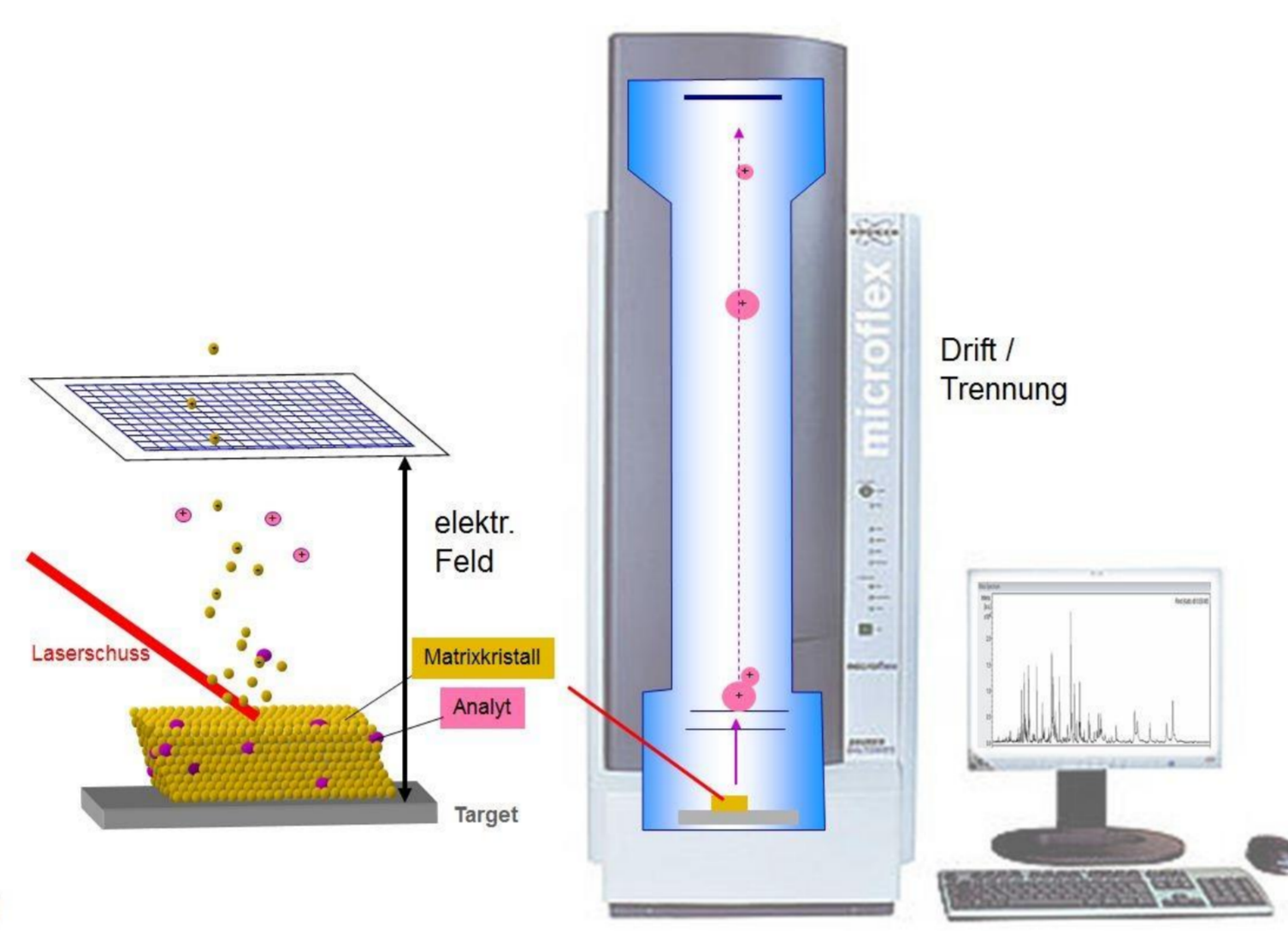


Abb. 1: MALDI-TOF MS Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation Flugzeit-Massenspektrometrie

REFERENZPROBEN / PROBENVORBEREITUNG

Für den Aufbau der Datenbank wurden deklarierte Milch und Käseprodukte gezielt erworben und teilweise über konventionelle Methoden in der Tierart bestätigt. Ausgehend von unseren Erfahrungen mit der Fleischaufarbeitung [1] wurde ein für Milchprodukte optimiertes Protokoll für die Probenvorbereitung erarbeitet:

Milch:

- Fettabspaltung der Milch durch Zentrifugation
- Fällung des Caseins durch 5% Essigsäure
- Waschen des Caseinats mit Wasser

Käse:

- Lösen des Caseinates in einer Mischung aus 50% Acetonitril, 47,5% H₂O und 2,5% Trifluoressigsäure
- Übertragen von 1 µl der gelösten Proteine auf den MALDI-Träger
- Trocknen bei Raumtemperatur
- Überschichten mit 1 µl Matrixlösung (α-Cyano-4-hydroxymethylsäure, HCCA)
- Trocknung/ Kristallisation
- MALDI-TOF MS Messung

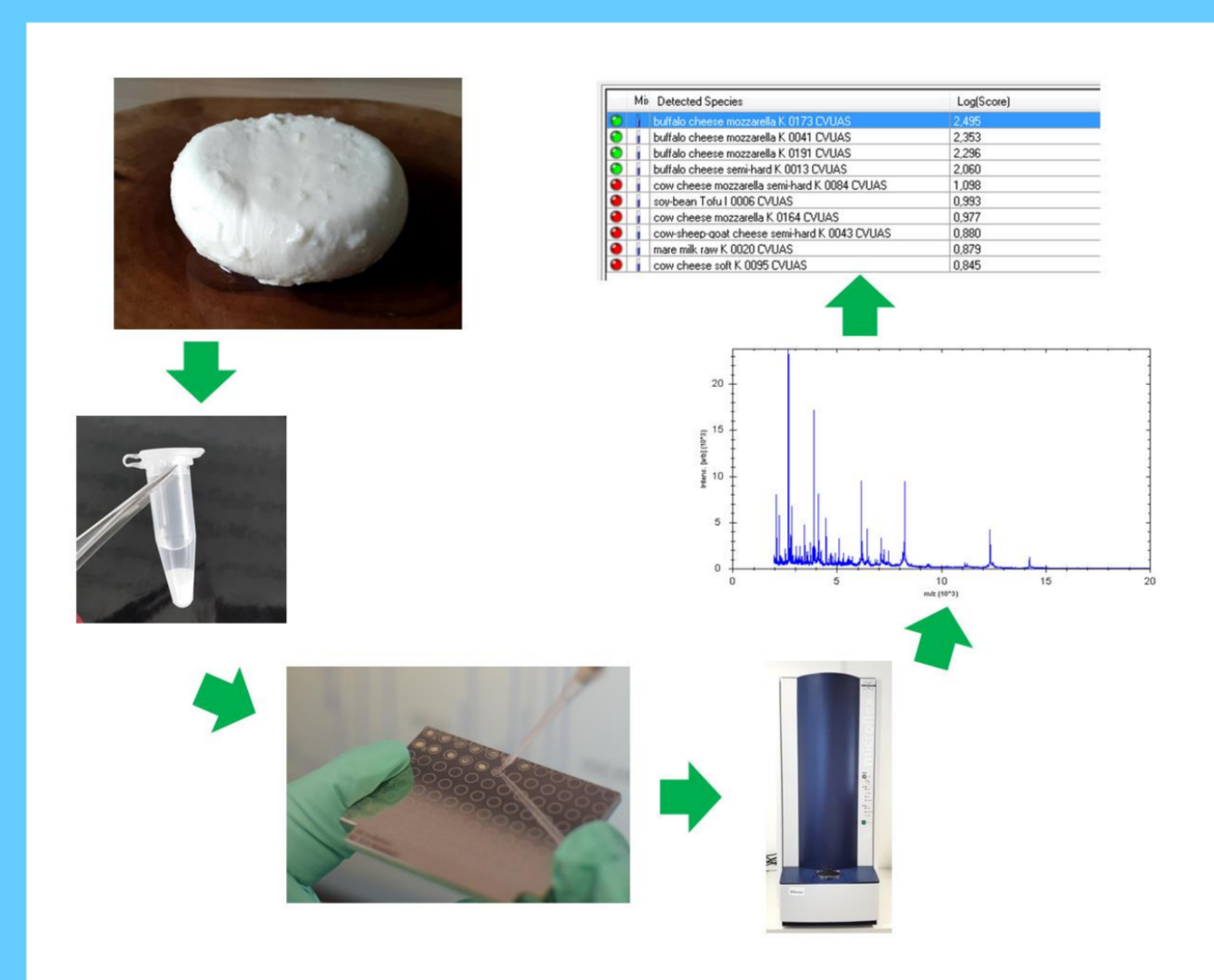


Abb. 2

BEARBEITUNG DER SPEKTREN & AUFBAU DER DATENBANK

Das beladene Target kann unmittelbar im MALDI-TOF MS (Biotyper LT-microflex, Bruker Daltonik, Bremen) vermessen werden (s. Abb. 2). Die im Bereich von 2-20 kDa aufgenommenen Rohspektren werden zu MSP reduziert (Biotyper 3.x, Bruker) (s. Abb. 3). Diese können als Referenz in der eigenen Datenbank hinterlegt oder als Probe mit einer vorhandenen Datenbank verglichen werden.

Das Ergebnis der Probe wird im Biotyper als Score-Wert angegeben, der die Übereinstimmung des Proben-MSP mit den Datenbankeinträgen widerspiegelt. Die erhaltenen MSP von Käse, hergestellt aus Milch unterschiedlicher Tierarten, unterscheiden sich dabei deutlich (s. Abb. 4).

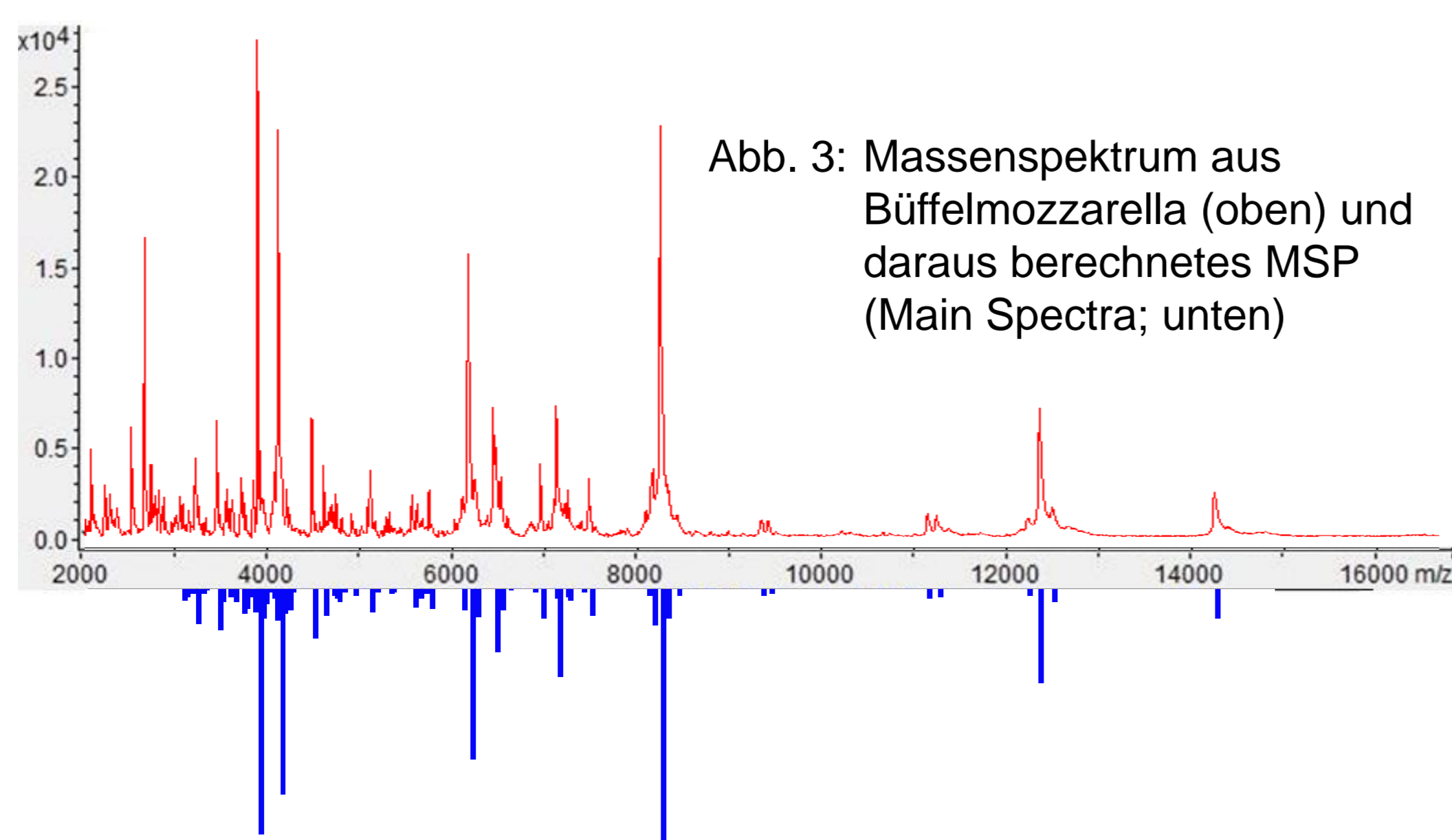


Abb. 3: Massenspektrum aus Büffelmozzarella (oben) und daraus berechnetes MSP (Main Spectra; unten)

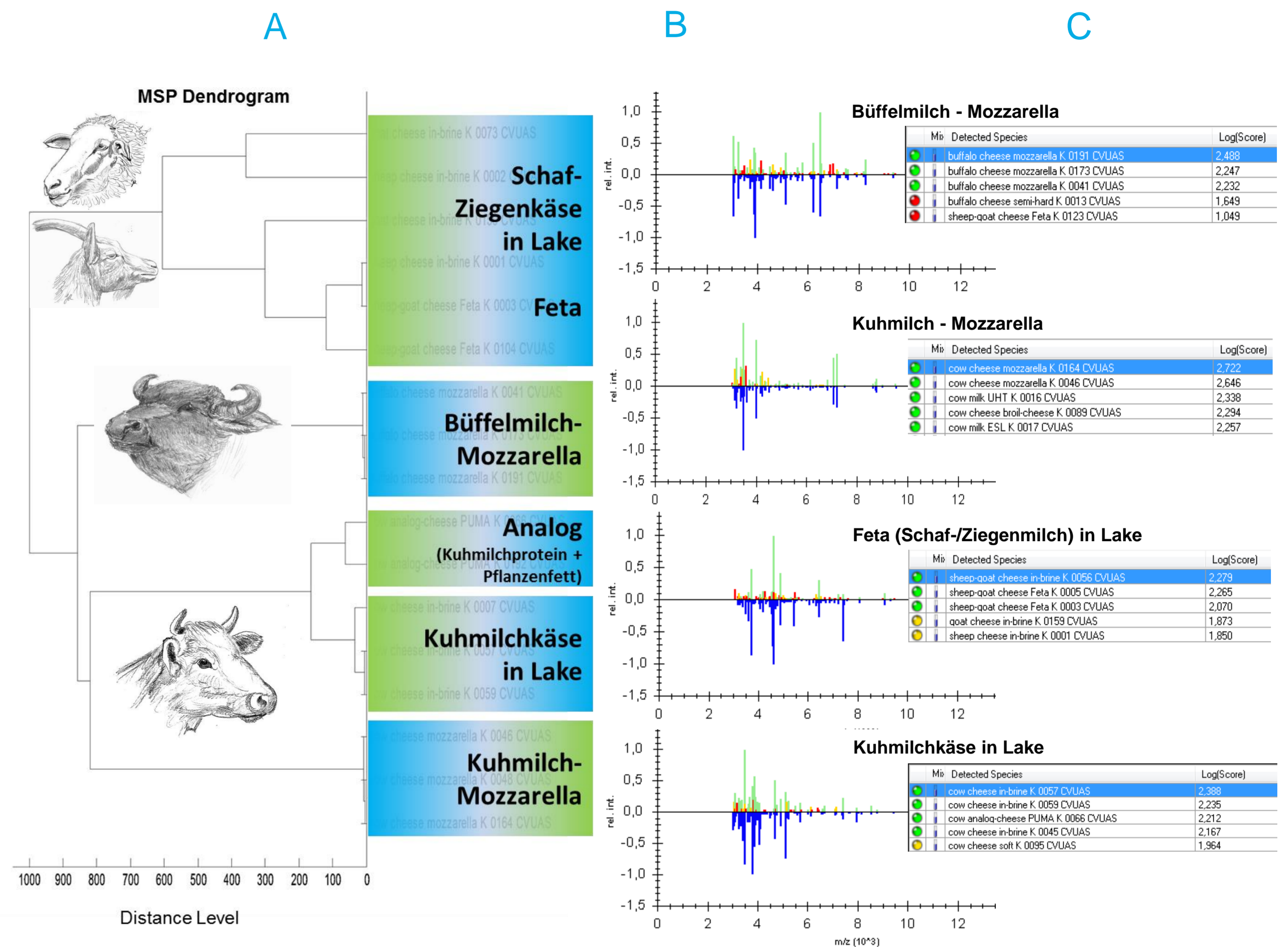


Abb. 4: A Baumdiagramm der MSP von Käse aus Milch verschiedener Tierarten
B MSP Vergleich: Jeweils oben Probe, unten Referenz-MSP der Datenbank
C Hitliste der Proben. Sie zeigt die Übereinstimmung mit der Datenbank in absteigender Reihenfolge des Score-Wertes.

MILCH UND KÄSE-DATENBANK

Bisher wurden >75 unabhängige Einträge verschiedener Milchprodukte von 5 verschiedenen Milch-liefernden Tierarten in die CVUAS-Datenbank aufgenommen. Die erstellten MSP sind innerhalb der gleichen Geräteplattform übertragbar. Der aktuelle Stand vorhandener Datenbankeinträge mit zusätzlichen Informationen sind auf www.maldi-up.ua-bw.de gelistet [4].

VALIDIERUNG

Zur Überprüfung des Systems werden Spezifität und Selektivität der einzelnen Parameter anhand von unabhängigen Referenzproben ermittelt. Als Beispiel sind die zusammengefassten Ergebnisse für den Parameter Wasserbüffel und Kuh bei Mozzarella, sowie für Schaf/Ziege und Kuh bei weißem Käse in Lake (Feta, analog hergestellte Produkte aus Schaf-, Ziegen- und Kuhmilch) dargestellt (s. Abb. 5).

Biotyper-Ergebnis	Kontrolle		Gegengruppe	
	Σ Proben	richtig-positiv [%]	falsch-negativ [%]	falsch-positiv [%]
Mozzarella				
- Wasserbüffel	22	100	0	0
- Kuh	23	100	0	0
Weißer Käse in Lake				
- Schaf/Ziege	32	100	0	0
- Kuh	21	100	0	0

Abb. 5: Validierungsergebnis für Mozzarella und Feta-ähnliche Käse in Lake

FAZIT & AUSBLICK

Eine routineteugliche und übertragbare MALDI-TOF MS Methode für die Tierartbestimmung in Mozzarella und Feta-ähnlichen Produkten ist erstellt. Die Methode umfasst eine optimierte Probenvorbereitung, eigene Datenbankeinträge und erste abgeschlossene Validierungen.

Die Durchführung der Analyse ist einfach, die Geschwindigkeit ist hoch (Probenahme bis Ergebnis < 1h) und die Verbrauchskosten sind gering.

Der weitere Aufbau der Datenbank (Tierarten, Käsetypen, MoPro, Imitate und Ersatzprodukte) und die Fortsetzung der formellen Parameter-Validierungen werden die Akzeptanz der Methode steigern.

Die Arbeiten zur Validierung wurden von Nadine Korte (Lebensmittelchemikerin im Praktikum) im Rahmen eines einmonatigen Projektes unterstützt.

LITERATUR

- [1] Stoll P & Rau J (2015) Lebensmittelchemie 69: 142
- [2] Sassi M et al. (2015) J. Agric. Food Chem 63: 6157-6171
- [3] Hiller E et al. (2017), DLR 113: 12-16
- [4] <http://www.maldi-up.ua-bw.de>

