

# Tierartendifferenzierung von Fleisch mittels MALDI-TOF MS

Stoll, P., 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 Fleisch ist die Angabe der Tierart dabei von besonderer Bedeutung. Für den analytischen Nachweis sind bisher vor allem molekularbiologische und immunologische Methoden im Einsatz.

Einen neuen Zugang zur Tierartbestimmung bietet die Massenspektrometrie (MS) [1,2,3]. Die MALDI-TOF MS kombiniert eine Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation (MALDI) mit einem Flugzeitanalysator (time of flight, TOF) zur MS (s. Abb. 1). Hiermit können gut ionisierbare große Biopolymere, wie beispielsweise Proteine aus Mikroorganismen, Fisch oder Fleisch, relativ schonend analysiert werden. Die Technik zeigt eine inzwischen rasant steigende Verbreitung und wird insbesondere zur Differenzierung von Bakterien eingesetzt.

Die Identifizierung einer unbekannt Probe gelingt durch Vergleich des erhaltenen Massenspektrums mit den in einer Datenbank hinterlegten Referenzen. Dieser Datenbank kommt für die Identifizierung eine zentrale Bedeutung zu. Für die Tierartendifferenzierung von Fleisch sind allerdings bisher keine kommerziellen Datenbanken verfügbar.

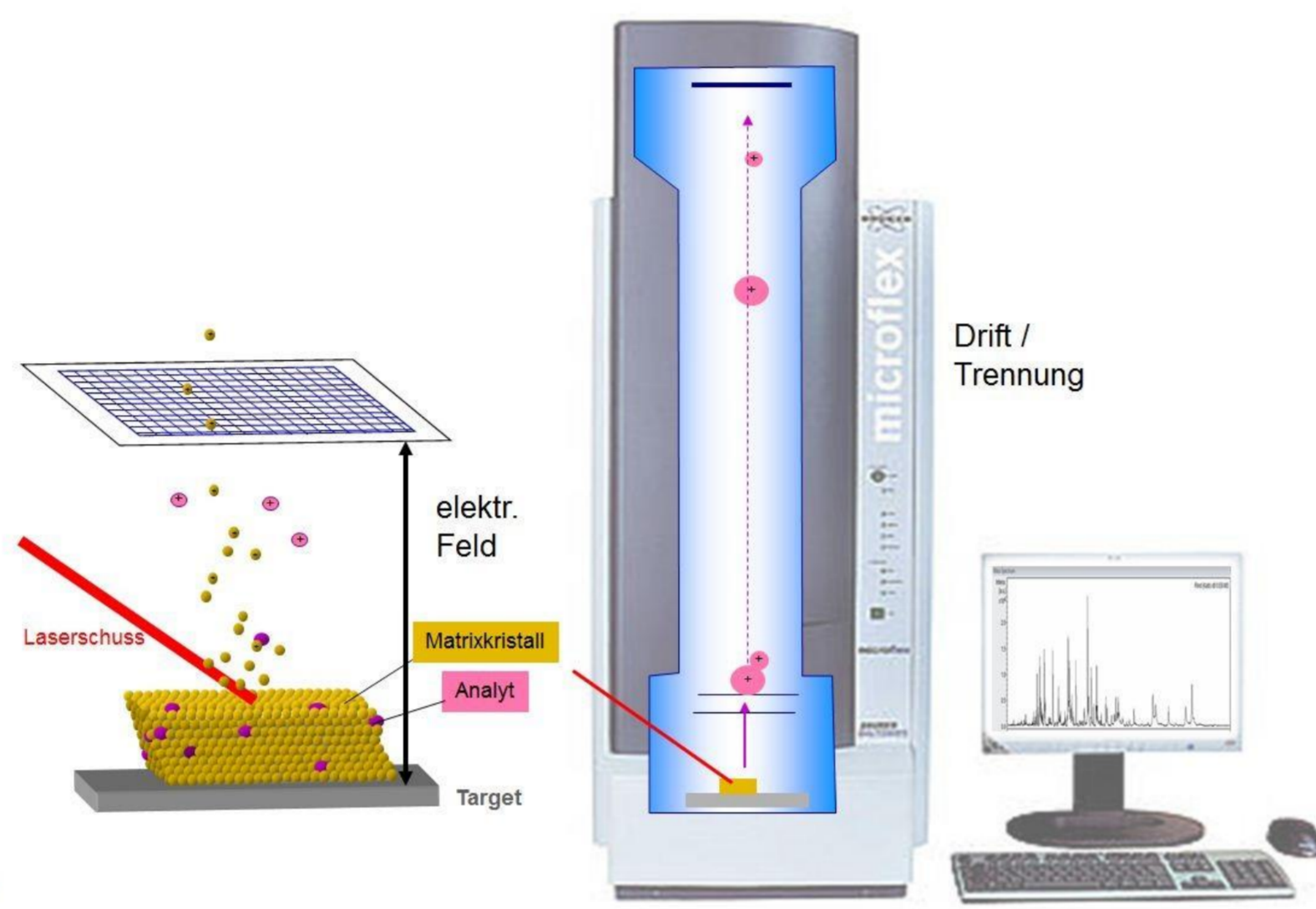


Abb. 1: MALDI-TOF MS

## REFERENZPROBEN / PROBENVORBEREITUNG

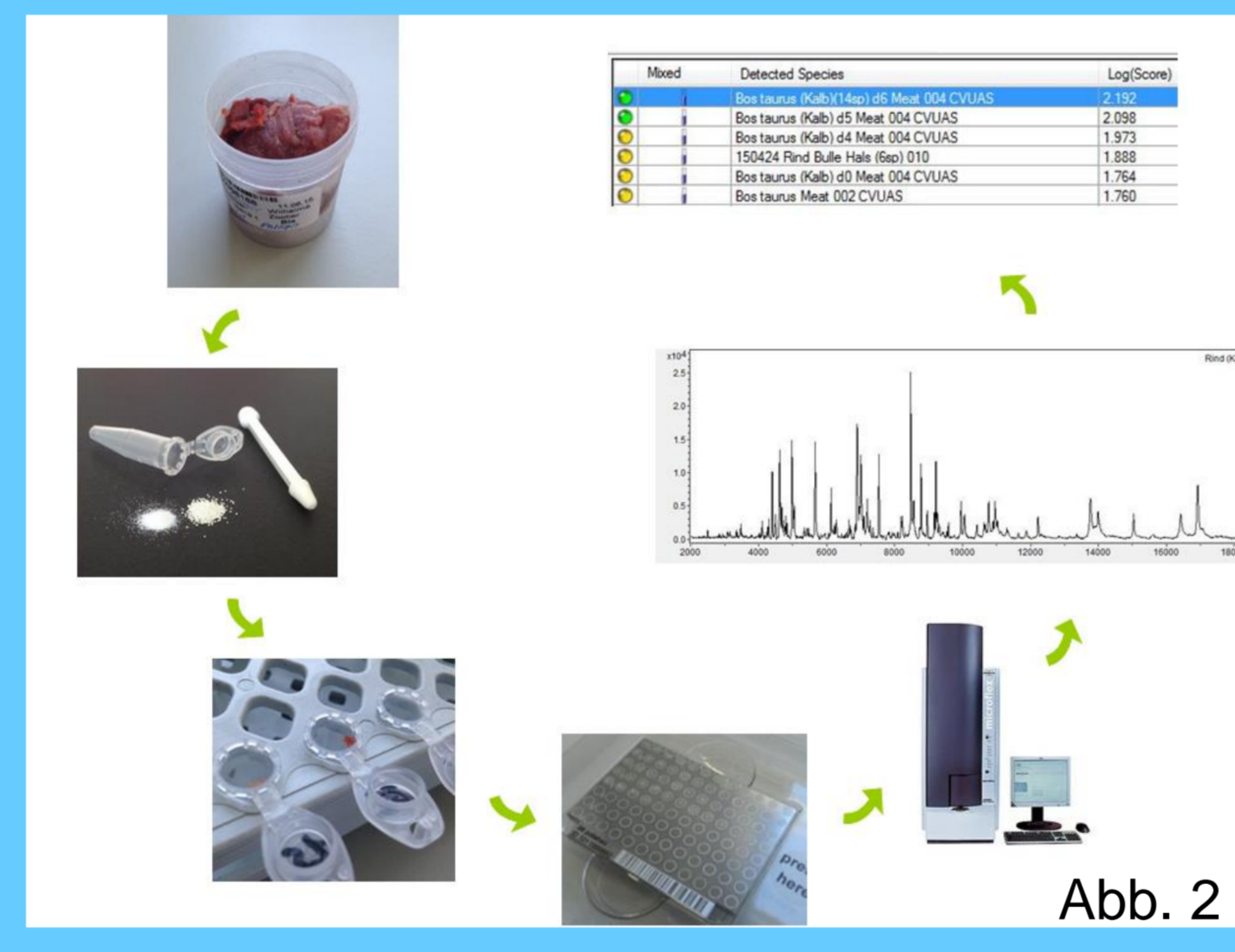
Als Referenz für den Aufbau der Datenbank wurde rohes Muskelfleisch aus der veterinärmedizinischen Tierkörperuntersuchung von Nutz-, Zoo-, Haus- und Wildtieren verwendet.

Ausgehend von Post & Dikler 2010 [1] wurde ein für Fleisch optimiertes Protokoll für die Probenvorbereitung erarbeitet:

Im 1,5 ml Reaktionsgefäß wird ca. 5 mg Muskelfleisch in einer Mischung aus 50% Acetonitril, 47,5% H<sub>2</sub>O und 2,5% Trifluoressigsäure mit einem Mörser und 5 mg Zirconia/Silica Beads 0,1 mm (BioSpec) zermahlen.

15 s mit Labormischer extrahieren  
120 s bei 14000 rpm zentrifugieren

1 µl Überstand auf Stahltarget übertragen  
Trocknen bei Raumtemperatur (ca. 60 s)  
Überschichten mit 1 µl Matrix-lösung (α-Cyano-4-hydroxymethylsäure, HCCA, Bruker)  
Trocknen + schonende Kristallisation der HCCA bei Raumtemperatur (ca. 120 s)



## 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 Rohspekten werden zu MSPs (Main Spectra Projections) reduziert (Biotyper 3.0, 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's mit den Datenbankeinträgen widerspiegelt. Die erhaltenen MSP's der unterschiedlichen Tierarten unterscheiden sich dabei deutlich (s. Abb. 4).

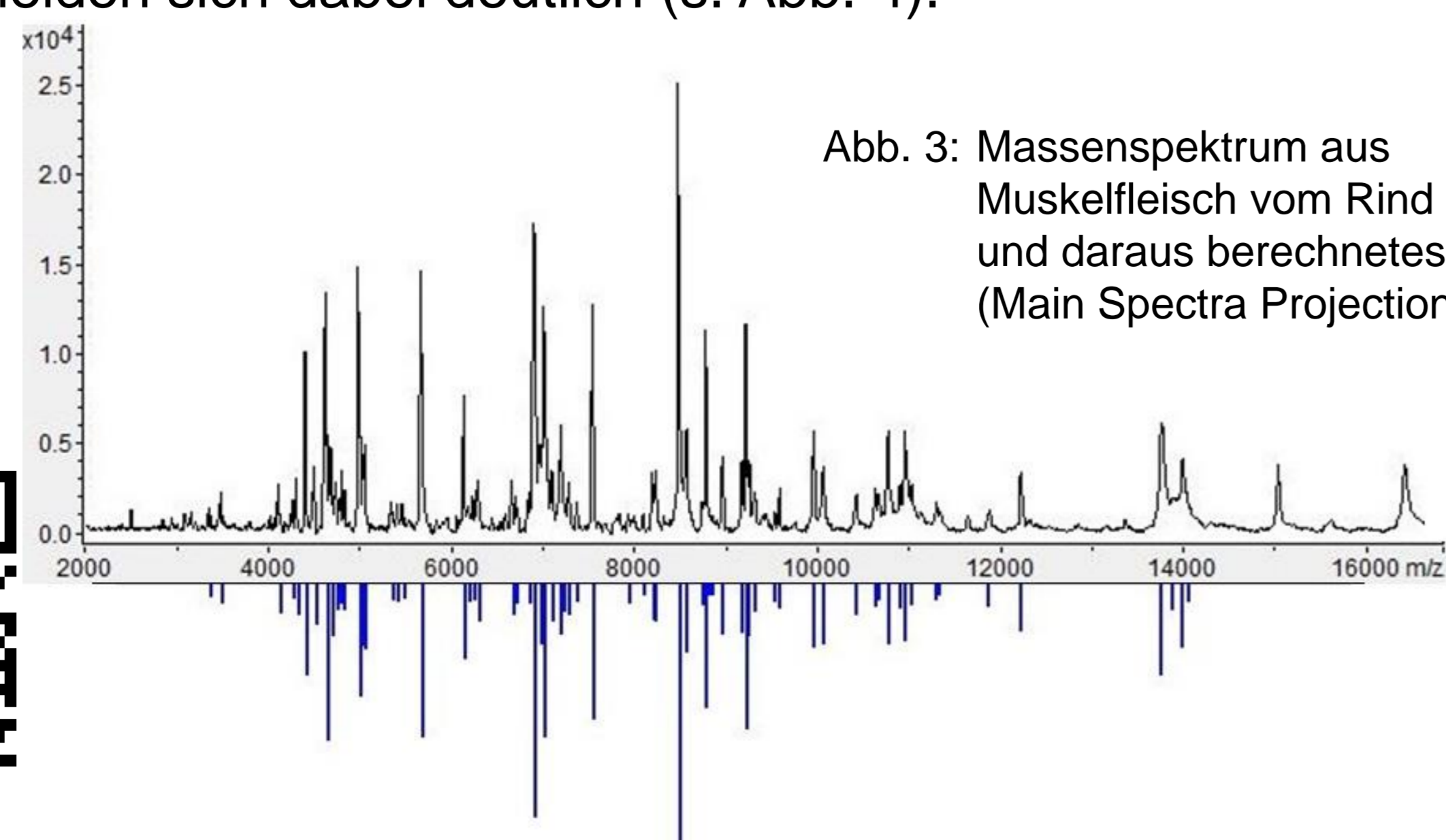


Abb. 3: Massenspektrum aus Muskelfleisch vom Rind (oben) und daraus berechnetes MSP (Main Spectra Projection; unten)

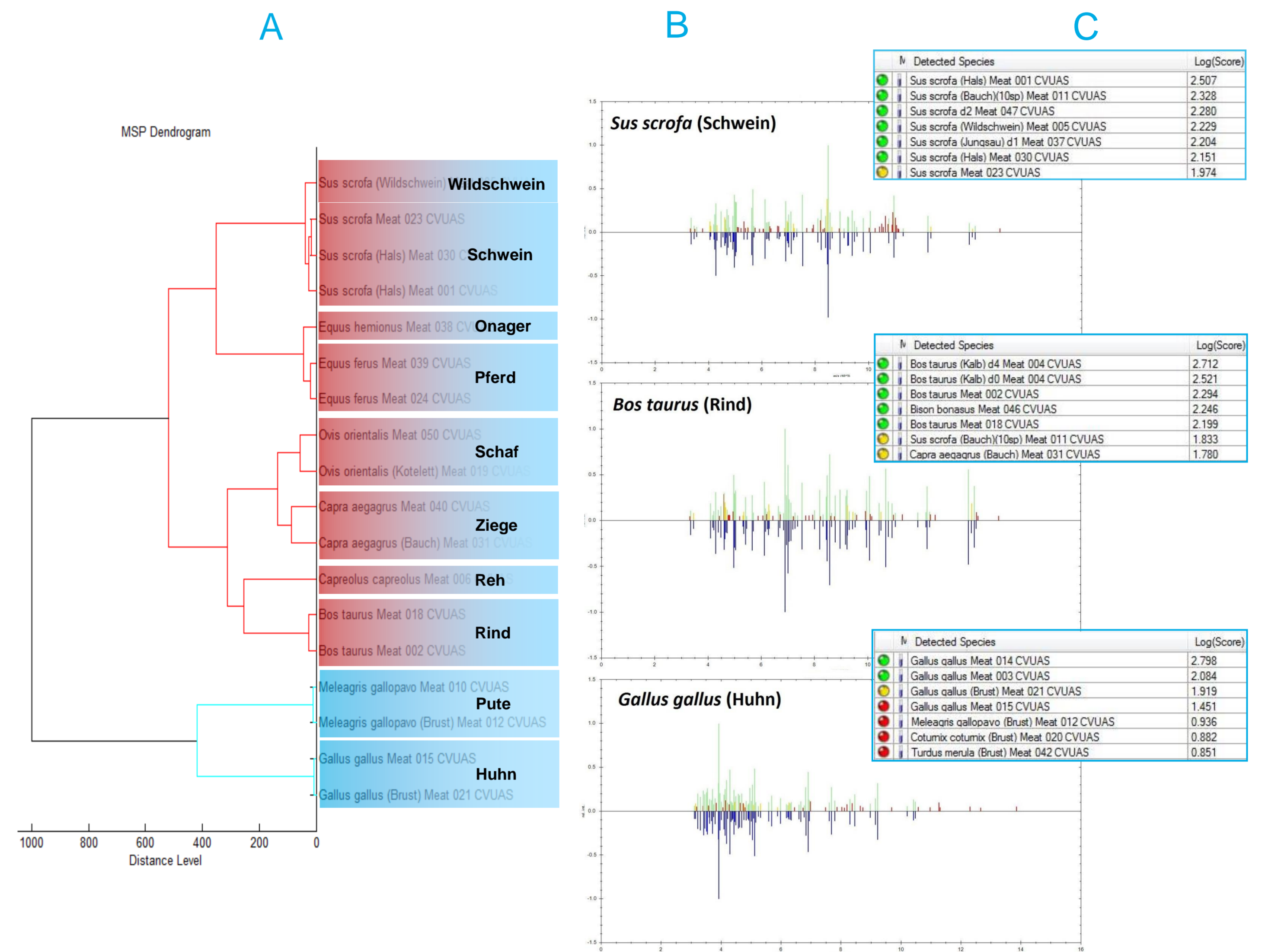


Abb. 4: A Baumdiagramm von MSPs verschiedener fleischliefernder Tierarten  
B MSP Vergleich: Jeweils oben Probe, unten Referenz-MSP der Datenbank  
C Hitliste der Proben. Sie zeigt die Übereinstimmung mit der Datenbank in, nach Score-Wert, absteigender Reihenfolge.

## FLEISCH-DATENBANK

Bisher wurden 51 unabhängige Einträge von 29 verschiedenen Tierarten in die CVUAS-Datenbank aufgenommen. Die erstellten MSPs sind innerhalb der gleichen Geräteplattform übertragbar. Eine Auswahl der vorhandenen Datenbankeinträge mit zusätzlichen Informationen zum aktuellen Stand sind auf [www.maldi-up.ua-bw.de](http://www.maldi-up.ua-bw.de) gelistet [4].

## VALIDIERUNG

Zur Überprüfung des Systems werden Spezifität und Selektivität der einzelnen Parameter anhand von unabhängigen Muskelfleisch-Referenzproben ermittelt. Als Beispiel sind die zusammengefassten Ergebnisse für den Parameter *Sus scrofa* (Schwein), *Bos taurus* (Rind) und *Gallus gallus* (Huhn) dargestellt (s. Abb. 5).

		Validierungssatz	
Biotyper Ergebnis	<i>Bos taurus</i>	<i>Bos taurus</i> n = 9	# <i>Bos taurus</i> n = 56
	<i>Bos taurus</i>	100% (9)	-
	# <i>Bos taurus</i>	-	98,1% (53)
fraglich*	-	-	5,4% (3)

		Validierungssatz	
Biotyper Ergebnis	<i>Sus scrofa</i>	<i>Sus scrofa</i> n = 29	# <i>Sus scrofa</i> n = 36
	<i>Sus scrofa</i>	93,1% (27)	-
	# <i>Sus scrofa</i>	-	97,2% (35)
fraglich*	6,9% (2)	2,8% (1)	-

		Validierungssatz	
Biotyper Ergebnis	<i>Gallus gallus</i>	<i>Gallus gallus</i> n = 7	# <i>Gallus gallus</i> n = 58
	<i>Gallus gallus</i>	85,7% (6)	-
	# <i>Gallus gallus</i>	-	96,6% (56)
fraglich*	14,3% (1)	3,4% (2)	-

Abb. 5: Validierungsergebnis in Form von einer erweiterten Vierfeldertafel; links Schwein, rechts Rind und Huhn. Jeweils oben links → Sensitivität; Mitte rechts → Spezifität; # = „nicht“

## FAZIT / AUSBLICK

Eine routinetaugliche und übertragbare Methode für die Bestimmung von ersten Tierarten aus rohem Muskelfleisch per MALDI-TOF MS ist erstellt. Diese umfasst eine optimierte Probenvorbereitung, eigene Datenbankeinträge und erste Validierungen.

Die Geschwindigkeit (<1h), die einfache Durchführung und die geringen Verbrauchsmittelkosten lassen den Einsatz für ein Screening auf die Tierart bereits jetzt zu.

Der weitere Aufbau der Datenbank (Tierarten, technologische Verarbeitungsschritte) und die Fortsetzung der formellen Parameter-Validierungen werden die Akzeptanz der Methode steigern.

Die Arbeit wurde von P. Stoll vollständig im Rahmen des Praktikumssemesters im 3. Jahr des Studienganges Biotechnologie der Hochschule Esslingen durchgeführt.

## LITERATUR

- [1] Post A, Dikler S (2010) FACSS 2010, 583
- [2] Stephan R et al. (2014) Food Control 46: 6–9
- [3] Flaudrops C et al. (2015), J. Food Comp. Anal. 41: 104-112
- [4] <http://www.maldi-up.ua-bw.de>

