

肉および植物性代替肉の LC/Q-TOF 分析 およびノンターゲットケモメトリックス プロファイリング

Agilent 1290 Infinity II LC および Agilent 6546 Q-TOF に
よる食品官能検査

著者

Toh Seok Hwa,
Upendra Khurana,
Tarun Anumol, and
Daniel Cuthbertson
Agilent Technologies, Inc.

概要

植物由来および細胞由来の食品など、タンパク質の代替肉は、消費者の関心、規制の緩和、および世界的な食品システムが組み合わさることにより世界的に普及しつつあります。例えば、シンガポールは 2030 年までに食料自給率 30 % の達成を目標にしており、多くの既存食品企業やスタートアップ企業が代替肉製品の開発を進めています。シンガポールの食料自給率目標の主な動機になっているのは、健康および環境に対する関心です。歴史的には、植物性代替肉食品に対して、動物の肉と同じ食感と味覚を実現しようとする取り組みが行われてきました。しかし、最近の植物性代替肉は、製造法の技術的進歩により、従来の肉と味覚、食感、および組成の点で非常に類似しています。このアプリケーションノートでは、高分解能精密質量 LC-Q/TOF を使用した、未知の食品の化学的組成を特性解析するためのノンターゲットプロファイリングメソッドについて説明します。また、精密質量 LC/Q-TOF のデータを、より簡単に理解できる情報に変換するためのさまざまな統計ツールも紹介しています。データの主成分分析 (PCA) を使用することにより、異なったサンプル中の化合物の同定およびその強度分布、さらにはその化合物が味覚プロファイルにどのように影響しているかを知ることができます。食品原材料のヒートマップおよび階層的クラスタリングは、味覚プロファイルを持つタンパク質に類似した分布を示しています。

はじめに

食品官能評価は、消費者が認識している項目を測定するため、食品の香気品質を評価する主要な手法です。ただし、これは主観的なものです。技術の進歩とともに、液体クロマトグラフィー / 質量分析法 (LC/MS) のような客観的に測定可能な手法が使用されています。基本的な 5 種類の味覚 (つまり、甘味、塩味、酸味、苦味、旨味) は LC/MS で特性解析することができ、データは食品全体の味覚の最適化に使用できます。

代替肉は、動物性肉の代わりになるものです。ただし、消費者に受け入れられるための主な障害として、味覚、食感、および栄養があります。代替肉食品を口にしている消費者にとっては、同等の健康効果と味覚が得られることを確認するための検査が不可欠です。そのため、動物性肉と代替肉製品との間の栄養および味覚の違いを比較する研究も多く実施されています。¹

ターゲット分析は、既知の栄養素または香気成分に重点を置いています。ターゲット分析法および官能評価検査の結果は、ターゲットリストに含まれていない化合物が全体の味覚に影響していることがあるため、異なる場合があります。一方、ノンターゲット高分解能精密質量分析は、特定の化合物のグループに制限されません。先入観のない方法で、タンパク質中の化合物をプロファイリングおよび同定し、代替肉と実際の肉を比較できます。食品官能分析検査などの場合、ノンターゲット LC/MS 手法では特定の香気成分プロファイル进行分析するのではなく、先入観なしに全化合物のプロファイルに注目しており、味覚に類似しています。

さまざまな味覚のプロファイルに影響を与えるさまざまな化合物を検出することは別に、各タンパク質の強度も同様に重要です。定量分析では標準品が使用できない場合もよくありますが、さまざまなタンパク質中の化合物の相対強度差を使用して区別できます。人は、化合物に極端な強度差が存在する場合にのみ、匂いを区別できます。この研究では、四重極飛行時間型 (Q-TOF) LC/MS と統計ソフトウェアを使用して、香気プロファイルを同定して区別しました。この手法は、植物性タンパク質食品で同等の香気プロファイルを開発するのに有効です。

実験方法

溶媒

Agilent UltraPure LC/MS グレードメタノール (部品番号 5191-4497)、アセトニトリル (部品番号 5191-4496)、および純水 (部品番号 5191-4498) を使用しました。LC/MS 用ギ酸 (Fluka、現在の Honeywell) および LC/MS 用ギ酸アンモニウム (LiChropur、MerckMillipore) も使用しました。

部品

移動相に対しては、キャップ付き Agilent InfinityLab 溶媒ボトル (部品番号 9301-6528) を使用しました。Agilent InfinityLab セーフティキャップ、GL45、1 ポート、InfinityLab ベントバルブ x 1、外径 3.2 mm フィッティング PTFE インサート (部品番号 5043-1217) を、オープントップキャップに取り付けました。耐久性のある真空ボトルキャップの O-リングを使用して、ボトルの PTFE インサートをシールしました。標準 PTFE 溶媒ラインを PTFE インサートを通して装着しました。次に、Agilent ステンレス 12 ~ 14 μm 溶媒ボトルインレットフィルタ (部品番号 01018-60025) を、溶媒ラインに取り付けました。

試料

表 1 で説明されている植物性代替肉は市販品です。ミンチ肉も含めた実際の肉は市場で購入しました。

表 1. 植物性代替肉試料と試料コード

試料コード	食品の説明
PBC 1	植物性代替鶏肉
PBC 2	植物性代替鶏肉
PBB 3	植物性代替牛肉
PBB 4	植物性代替牛肉
PBP 5	植物性代替豚肉
PBP 6	植物性代替豚肉
PBP 7	植物性代替豚肉

試料前処理

試料採取と前処理の手順はすべて、ポリエチレンまたはポリプロピレン容器で実施しました。全体を通して、プラグキャップ付き 15 および 50 mL 高性能ポリプロピレン遠心分離チューブ (VWR International Ltd.、英国) を使用しました。Agilent 2 mL スクリュートップ茶色ガラスオートサンプリヤル (部品番号 5182-0716) とスクリュウキャップ (部品番号 5185-5862) を使用しました。試料を遠心分離チューブで計量し、70:30 メタノール:水を試料に 1:2 の比で加えました。この試料を 10 分間ボルテックスして、4,000 rpm で 15 分間遠心分離しました。同じ条件下で、試料を再抽出しました。次に、Agilent 0.45 μm ポリエーテルスルホン (PES) フィルタ (部品番号 5190-5276) を使用して、抽出物をオートサンプリヤルにろ過しました。

装置構成

HPLC として、Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ（部品番号 G7120A）で構成される Agilent 1290 Infinity II LC を使用しました。またシステムに、Agilent InfinityLab サンプルサーモスタットと Infinity マルチウォッシュオプションを装着した Agilent 1290 Infinity II マルチサンプルラ（部品番号 G7167B）も搭載しました。LC には、Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタットカラムコンパートメント（部品番号 G7116B）を含めました。精密質量測定には、Agilent 6546 Q-TOF MS システム（部品番号 G6546A）を使用しました。質量分析計は「データ非依存型 All Ions フラグメンテーション」取り込みモードで測定しました。このモードでは、すべてのイオンが、正イオンモードで Q-TOF コリジョンセルを通過します。

データ解析には、Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0、Profinder 10.0、および Mass Profiler Professional 15.1 ソフトウェアを使用しました。

表 2. Agilent 6546 LC/Q-TOF LC/MS システム (G6546A) の分析条件

HPLC 条件																						
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm (部品番号 695975-302)																					
注入量	5 μL																					
移動相	A) 10 mM NH ₄ F + 0.1 % FA (DIW 中) B) アセトニトリル																					
初期	A) 98 % 10 mM NH ₄ F + 0.1 % FA (DIW 中) B) 2 % アセトニトリル																					
グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.30</td> <td>98.0</td> <td>2.0</td> </tr> <tr> <td>7.27</td> <td>20.0</td> <td>80.0</td> </tr> <tr> <td>10.27</td> <td>1.0</td> <td>99.0</td> </tr> <tr> <td>12.00</td> <td>1.0</td> <td>99.0</td> </tr> <tr> <td>12.10</td> <td>98.0</td> <td>2.0</td> </tr> <tr> <td>15.00</td> <td>98.0</td> <td>2.0</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	%A	%B	0.30	98.0	2.0	7.27	20.0	80.0	10.27	1.0	99.0	12.00	1.0	99.0	12.10	98.0	2.0	15.00	98.0	2.0
時間 (分)	%A	%B																				
0.30	98.0	2.0																				
7.27	20.0	80.0																				
10.27	1.0	99.0																				
12.00	1.0	99.0																				
12.10	98.0	2.0																				
15.00	98.0	2.0																				
流量	0.4 mL/min																					
MS 条件																						
ESI	陽性																					
イオン源パラメータ																						
ガス温度	300 °C																					
ガス流量	11 L/min																					
ネブライザ	35 psi																					
シースガスヒーター	350 °C																					
シースガス流量	11 L/min																					
キャピラリー	3,500 V																					
V 充電	1,000																					

結果と考察

LC/Q-TOF データは m/z 100 ~ 1,700 Da の範囲のフルスペクトルおよび 3 段階の異なるコリジョンエネルギー（10、20、および 40 eV）でのフラグメンテーションスペクトルを取り込みました。化合物の同定には、味覚に影響を与えている可能性のある化合物で作成したカスタム MS フラグメンテーションライブラリを使用して精密質量データを探索しました。これらの化合物には、アミノ酸、短鎖ペプチド、ヌクレオチド、脂肪酸、およびさまざまなビタミンが含まれていました。

図 1 に示すように、生データの実際の肉と代替肉の TIC には多少の差があることがわかります。また、スペクトルライブラリを用いて各化合物をライブラリ検索して同定するには時間がかかります。そのため、ノンターゲット分析の生データを有用な情報に変換する際には、統計解析ツールが有効になります。

主成分分析 (PCA) では、各抽出で 3 回の注入を実行して、試料のクラスタリングを観察することにより、データの再現性を確認しました。概ね、各食品サンプルの繰り返し分析は厳密にクラスタリングされていることがわかりましたが、これはメソッドの再現性が高いことを示しています（図 2）。図 2 のスコアプロットでは、各ドットは試料の 1 回の測定を表しています。タンパク質試料には、ターゲット風味プロファイル別に色付けされた個別のデータポイントを割り当て、個別の製品には異なる形状を割り当てて区別しました。図 2 のスコアプロットは、風味成分プロファイルと特定の製品との間の差に影響を与えている試料群の傾向を示しています。また、このプロットは、PCA スコアプロットで同じ領域を共有することにより、異なる試料が類似しているかどうかを示すことができます。予想通り、代替タンパク質食品は、ターゲット風味成分プロファイルで適切にクラスタリングされており、食品の各種類の香気成分プロファイル間で大きな差が認められました。一方、PCA ローディングプロット（図 3B）では、各ドットは 1 つの化合物を表しています。このプロットは、PCA でスコアプロットに影響を与えている化合物に関する情報を提供しています。主成分のローディングが最高の化合物（記号で表示）は、試料中のその化合物の高い強度と相関があります。

図 2 は、肉とその植物性代替肉の各種類の概要を示しています。揮発性化合物の二次元 (2D) PCA プロットから、それぞれの肉（例えば、鶏肉）とその植物代替肉同等品（例えば、PBC 1 と PBC 2）は、他の肉（例えば、牛肉または豚肉）と比較して、お互いによく類似していることがわかります。

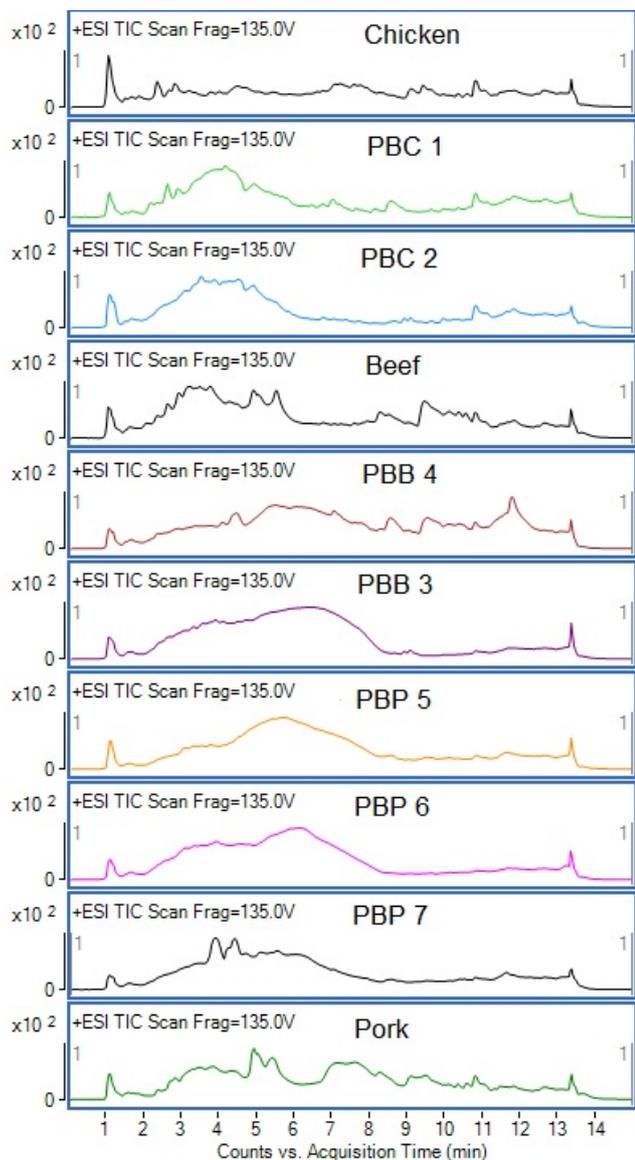


図 1. 実際の肉および植物性代替肉の TIC



図 2. 豚肉、牛肉、鶏肉、およびその植物性代替肉の 2D PCA スコアプロット

1 つの肉の種類に対して PCA スコアプロットとローディングプロットを並べて表示することにより、栄養素または風味成分のグループに関連付けられている化合物の相互関係を示すのが簡単になります。図 3A は、鶏肉の 3D スコアプロットを示しており、各軸に沿って異なるグループが分離されています。ローディングプロット (図 3B) は、スコアプロットでの差の原因となる化合物に関する情報を提供しています。

ヒートマップは、色スケールで化合物の強度を示すデータ視覚化手法であり、赤色は強度が高いこと、青色は強度が低いことを表しています。図 4 に示すように、ヒートマップを使用することにより、風味成分プロファイルの特定の群での化合物の強度差を即座に確認できます。

代表的な調理温度で肉の表面に形成される遊離アミノ酸は、消費者が好む「焼いた肉」の香りを生成します。¹そのため、植物性代替牛肉食品メーカーでは、製品中のさまざまなアミノ酸の強度を管理することが重要になります。図 4 は、植物性代替牛肉製品 PBB 3 と 4 には、実際の牛肉より高い強度で苦味アミノ酸が含まれていることを示しています。これらのアミノ酸は、製品の最終的な味覚に影響を与える場合があります。食品中のアミノ酸のプロファイルデータを使用することで、風味化合物群の強度が目標値に類似した食品原材料を選択できます。

植物性代替鶏肉 PBC 2 には多数の短鎖ペプチドが存在しているのに対して、試料PBC 1 には多数のヌクレオチド旨味増強成分が存在しており、これは大豆または豆由来の食品原材料から生じている可能性があります。図 3 に示すように、実際の鶏肉には、脂肪酸、アミノ酸、およびアセチルカルニチンが含まれていることがわかっています。鶏肉は、Y 軸と Z 軸の間のプロットの右上にあります。PBC 1 は 3 軸の原点の近くにあり、PBC 2 は X 軸の下端にあります。グルタミン-グルタミン (glu-glu)、アデノシン二リン酸 (ADP)、イノシン-5-二リン酸 (IDP)、バリン-グルタミン (val-glu) などの化合物は、植物性代替肉に実際の鶏肉の旨味を加えます。²

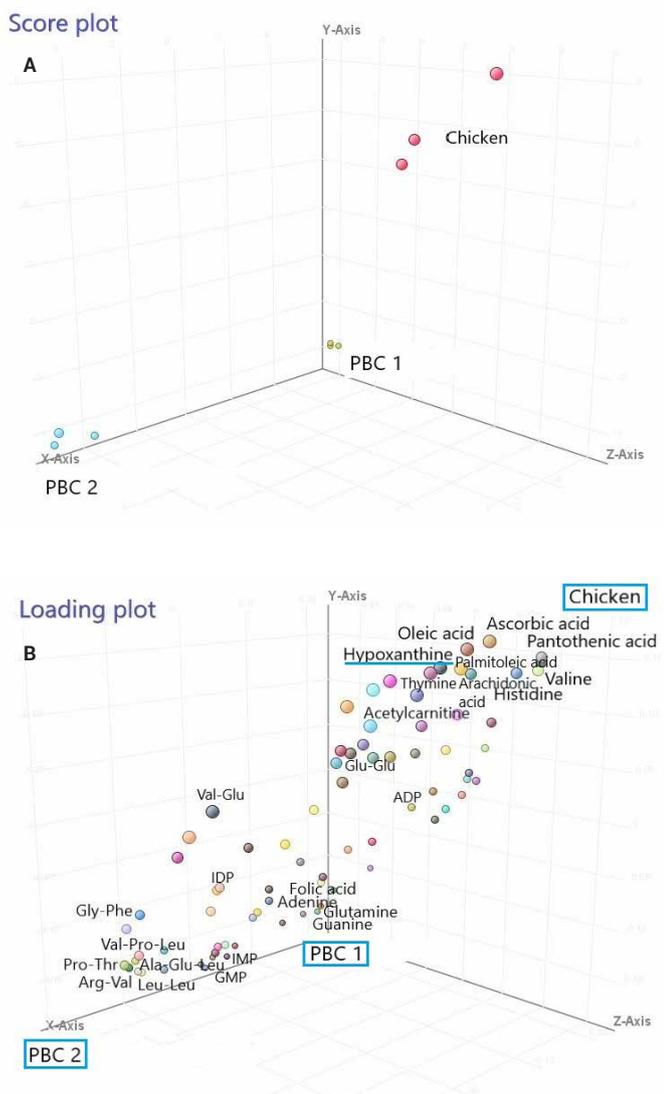


図 3. 鶏肉およびその植物性代替肉PBC 1 および PBC 2 の 3D PCA スコアプロット (A) とローディングプロット (B)

PBC 1 および PBC 2 中の高レベルのこれらの風味は、化合物データポイントで Y 軸の上側にシフトしており、鶏肉の領域に近づいています。

天然由来のプリン誘導体であるヌクレオチドヒポキサンチンは、鶏肉の旨味で重要な役割を果たしています。ただし、プリン (グアニン) 含有量が低い PBC 2 は、通風を引き起こす場合もある尿酸の形成を低減させる健康的な選択肢になる場合もあります。³

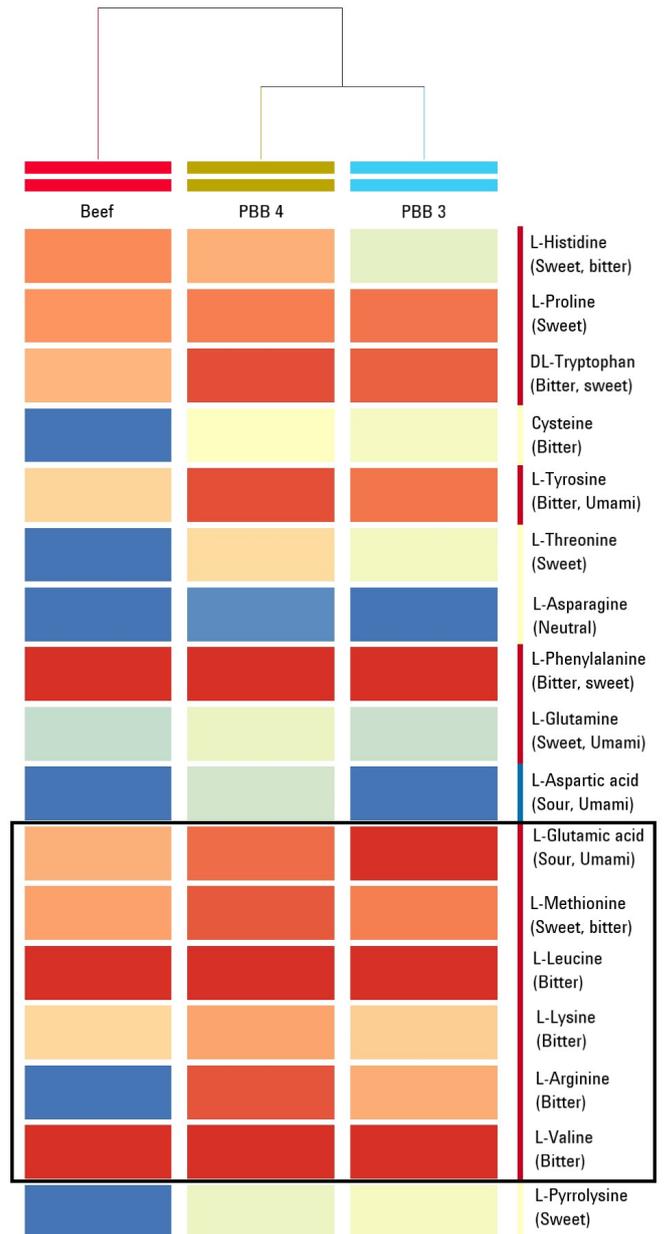


図 4. 牛肉およびその植物性代替肉 PBB 3 および PBB 4 中のアミノ酸のヒートマップ

結論

代替肉の風味、食感、および栄養価は、消費者の認識、受け入れやすさの評価にとって非常に重要です。

高分解能 Agilent 6546A Q-TOF LC/MS システムを使用したノンターゲットでデータ非依存型の All Ions ワークフローでは、鶏肉、牛肉、豚肉、およびその植物性の代替物中の多数の風味化合物を適切にプロファイリングして同定しました。Agilent Mass Profiler Professional (MPP) ソフトウェアの高度な統計解析および視覚化ツールを使用して、実際の肉と植物性代替肉間の関係を特定しました。PCA スコアプロットおよびローディングプロットは、食品中の化合物を比較するのに役立ちます。ヒートマップも、肉および市販の植物性代替肉食品中のアミノ酸などの化合物のプロファイリングを視覚化するのに有効なツールです。

包括的な LC/MS データ取り込みおよび統計ワークフローは、代替タンパク質食品のメーカーに対して、その製品に関する重要な分子情報を提供します。プロファイルデータは、メーカーが製品の食品原材料を微調整して、動物性の肉の味覚を再現するのに有効です。

参考文献

1. Kaczmarek, K. *et al.* Flavor and Metabolite Profiles of Meat, Meat Substitutes, and Traditional Plant-Based High-Protein Food Products Available in Australia. *Foods* **2021**, *10*(4), 801.
2. Ueda, Y. *et al.* Flavor Characteristics of Glutathione in Raw and Cooked Foodstuffs. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **1997**, *61*(12), 1977–80.
3. Jakse, B. *et al.* Uric Acid and Plant-Based Nutrition. *Nutrients* **2019**, *11*(8), 1736.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE68216217

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, July 26, 2022

5994-5130JAJP