

計畫編號：DOH93-TD-F-113-005

行政院衛生署九十三年度科技研究計畫

發展以基質輔助雷射脫附游離質譜法快速檢測污染
食品中黴菌的方法

研究報告

執行機構：交通大學

計畫主持人：陳月枝

研究人員：陳蕙筠

執行期間：93年1月1日至93年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
壹、計劃摘要	4
貳、前言	6
參、材料與方法	8
肆、結果與討論	12
伍、結論	14
陸、參考文獻	15
柒、圖、表	15
表一	16
表二	17
圖一	18
圖二	19
圖三	20
圖四	21
圖五	22

圖六	23
圖七	24
圖八	25
圖九	26
圖十	27
圖十一	28
圖十二	29
圖十三	30

摘要

基質輔助雷射脫附游離質譜法是一擁有相當高靈敏度、具有相當廣的質量分析範圍，且操作簡易的質譜法，目前已是應用在生化分子的質量分析上最有效的方法之一。基質輔助雷射脫附游離質譜法可直接應用在微生物的細胞分析上，根據不同菌株在質譜圖上所得之離子訊號分佈而建立指紋質譜圖，其所顯現的特徵離子峯可用來當作代表各菌株之生物標幟離子，因此可用為辨認微生物菌株種類的參考。尤其不同屬種之真菌孢子在基質輔助雷射脫附游離質譜圖中顯現的生物標幟離子峯具有相當的特異性，可藉此用以區分不同真菌菌種。

本計劃利用基質輔助雷射脫附游離質譜法分析常污染穀物及水果之青黴菌屬及麴菌屬的孢子，建立代表不同菌種之特異指紋質譜圖及生物標幟離子，以發展可以快速辨認污染食品之微生物的方法為目標，實驗的方法為直接刮取孢子混以基質即可進行質譜分析，結果顯示 2,5-dihydroxybenzoic acid 為最適合用來分析孢子的基質。本計劃已成功完成包括青黴菌屬及麴菌屬等十一種菌種之 MALDI 質譜圖的建立，並已整理出各代表不同菌株之特徵離子峯。

我們在本報告所提出的方法相當簡單且分析時間短，實驗結果已證明可用於實際樣品如發霉柑橘上黴菌的快速鑑定。

關鍵字：基質輔助雷射脫附游離質譜法、孢子、青黴菌、麴菌

Abstract

Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) has been frequently used in the analysis of biomolecules owing to the advantages of high sensitivity, wide mass range, and ease-of-use. MALDI-MS can be used directly to characterize microorganisms based on the biomarker ions and the fingerprint pattern observed in the mass spectra obtained from different microorganism strains. In particular, the high reproducibility and simplicity of the MALDI mass spectra of fungal spores can be employed to the characterization of different strains of fungi.

Both of *Penicillium* and *Aspergillus* species frequently contaminate grains and fruits. In this project, we employed MALDI-MS to characterize fungal spores in fungus-contaminated food. In order to achieve this object for rapid identifying contaminated spore-species, a MALDI mass spectral database, which contains biomarker ions representing for different *Penicillium* and *Aspergillus* species of spores, was established. The mass spectra of these species were directly obtained from the intact spores without extra treatment. Furthermore, the results show that 2,5- DHB was the most suited matrix for the analysis of fungal species. We have successfully established a mass spectral database containing 11 different species of spores from *Penicillium* and *Aspergillus*.

The method proposed herein is very straightforward and only requires a short analysis time. Owing to the high reproducibility of the characteristic ions obtained from the MALDI mass spectra of fungal spores, these characteristic ions can be used to differentiate different species. We also demonstrated that this approach was suitable to be applied directly in identifying the fungal species from rotted citrus fruits.

Keywords: MALDI-MS, spores, *Penicillium*, *Aspergillus*

前言

以植物類為主要來源的食品如穀物、水果等，其生長的條件、儲存的時間或經加工製造的過程，常常會受到黴菌的污染。一般檢測是否遭受污染及符合食品安全的規範方法都以食品中因黴菌滋生產生的二級代謝物為主要偵測的分析目標物。如花生類製品中常以監測食品中所含的黃麴菌的二級代謝物—黃麴毒素為檢測對象，而以酵素免疫分析法為偵測方法，即利用抗原-抗體間之特異辨認能力為篩選有無污染及污染狀況，但是酵素免疫分析法均是針對已知目標物利用專一抗體以進行分析，在污染來源不明的情況下，酵素免疫分析方法的使用則大受限制，因此在本計劃中我們提出一個可快速確認污染食品中黴菌種類的方法，偵測對象為以黴菌孢子為主。

基質輔助雷射脫附游離質譜法 (matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry) 自 1985 年由 Karas 及 Hillenkamp 首先提出將基質添加於樣品中可輔助極性、非揮發性的生化分子脫附游離形成氣相離子的概念，¹ 而在 1988 年成功地以 MALDI-MS 分析質量上萬 Da 的蛋白質以來，² 提供了分析生化分子的有效方法。在 1994 年 Cain 等人就提出使用 MALDI-MS 分析細菌，³ 並根據細菌在 MALDI-MS 中所顯現的蛋白質離子分佈，可以用以當作區分不同細菌菌種的參考，而再配合已解出的細菌基因序列資料庫，可以用以快速確認細菌菌種種類。而到目前為止，大部份利用 MALDI-MS 直接分析微生物細胞的研究，主要是以致病細菌為主，目僅有少數的研究報告應用在黴菌孢子的分析研究。⁴⁻⁶ Welham 等人在 2000 年提出第一篇以 MALDI-MS 分析黴菌孢子的報告，⁴ 隨後本實驗室也發表了利用 MALDI-MS 於分析米麴菌及黃麴菌孢子的結果。⁵ 黴菌孢子的質譜圖一般而言較細菌質譜圖更為簡單，通常只出現三、四支足供代表不同屬種的特徵離子峯，因此

在判定上其實是更為容易的，只要不同屬種間的特徵離子峯有差異，就可以應用於辨別不同的菌種。

而水果中如柑橘類，表皮很容易受到黴菌的污染，而在本計劃所發展的方法為直接刮取檢體中的黴菌孢子，即可進行 MALDI-MS 分析，因此如能建立不同屬種孢子在 MALDI-MS 中出現的代表特徵離子，可以快速確認污染檢體中孢子種類。一般污染柑橘類的黴菌有 *Penicillium digitatum*、*P. citrinum*、*P. italicum* 等，因此在本計劃中我們已針對這些黴菌孢子進行 MALDI 質譜圖的建立，除此之外如易產生赭麴毒素的真菌如 *Aspergillus sulphureus*、*A. awamori* 及 *A. ochraceus* 的 MALDI-MS 質譜圖也完成圖譜之建立，可以用於實際比對質譜圖的分析。

材料與方法

一、培養皿配製

將Potato dextrose broth (9.6克) 與 Agar (6.0克)加入400 mL二次水中，並放置於攝氏 121°C下高溫滅菌箱中滅菌九十分鐘，趁熱在無菌生物操作台下分裝培養基於培養皿中，倒入液體之厚度大約為2/3培養皿高度，之後並置於紫外燈下照射三十分鐘並待其凝固，如不馬上使用則將每個培養皿以石臘膜封好保存於 4°C冰箱。

二、菌種培養

菌種均購自台灣食品工業發展研究所菌種保存及研究中心。培養菌種時以無菌接種環輕輕沾取菌種，在培養基上劃線後置於30°C培養箱培養，並放置一杯水於培養箱中，以避免培養基過於乾燥而碎裂。劃線培養後約三天左右，即可產生菌絲，收集第五天的孢子進行MALDI-TOF分析。

本計劃所建立的菌種質譜資料庫，菌種種類整理如下：

Penicillium brevicompactum

CCRC 32024

IFO 5751

IFO 5884

Penicillium chrysogenum (括弧內+代表該株菌會產生青黴素)

CCRC 30298

ATCC 7813 (+)

ATCC 10002 (+)

ATCC 10106

ATCC 11625 (+)

Penicillium citrinum

CCRC 32029

ATCC 14994

NRRL 24977

Penicillium digitatum

CCRC 30820

CCRC 32028

CCRC 32577

CCRC 32578

Penicillium expansum

CCRC 32045

ATCC 1117

ATCC 7861

Penicillium italicum

CCRC 32575

CCRC 32630

CCRC 35176

ATCC 48114

Penicillium pinophilum

CCRC 32376

CCRC 32388

CCRC 32616

CCRC 32622

ATCC 9644

Aspergillus awamori (括弧內+代表該株菌會產生赭麴毒素 A)

ATCC 14333

ATCC 14335

IFO 6082 (+)

Aspergillus ochraceus

ATCC 1008

ATCC 12066

ATCC 22947 (+)

Aspergillus sulphureus

ATCC 11904

ATCC 18413 (+)

Aspergillus niger

ATCC 6275

ATCC 9642

NRRL 6411

(CCRC : The Culture Collection and Research Center , Taiwan)

(ATCC : American Type Culture Collection , U.S.A.)

(NRRL : Northern Regional Research Center , U.S.A)

(IFO : Institute for Fermentation , Japan)

三、MALDI-TOF 分析

MALDI-TOF(Bruker Biflex III)質譜儀為配備有一吸收波長在 337nm 的氮脈衝雷射，長 1.25 公尺的飛行時間管，並附有一可同時放置 384 個樣品的樣品盤。

樣品製備步驟如下：

- (1) 因為基質與分析樣品間之結晶情形會影響分析之結果，所以我們已嘗試數種不同基質，並將基質溶於不同基質溶劑，比較其質譜圖，用以選擇適合分析麴菌孢子之基質及基質溶劑。經實驗發現Sinapinic acid (SA) 及2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB)為最適合用來分析孢子的MALDI基質。將基質溶於Acetontrile : 0.1%TFA/H₂O = 2 : 1 (v/v) (TFA: 三氟醋酸 (Trifluoroacetic acid)) 溶劑中，配製成濃度30 mg/mL之溶液。
- (2) 以tip刮取在培養基上的孢子，再以3 μL的基質溶液將tip上之孢子洗下，取此1 μL的混合物於MALDI樣品盤上，待揮發性溶劑揮發形成結晶

性固體即可將樣品盤送入質譜儀進行分析。

結果與討論

本計劃所建立的孢子質譜資料庫，主要以污染水果、穀物、咖啡的青黴菌和易產生赭麴毒素的麴菌 (*Aspergillus*) 為主，我們分析的菌株如果以其易污染的食品類型分類可整理如表一。⁷ 我們已經經由實驗得出孢子分析的最佳實驗條件，簡述如下：即用培養五天的孢子當做分析樣品，最適合的 MALDI 基質為 SA 及 2,5-DHB，而配製基質的溶劑則為 acetonitrile : 0.1%TFA=2 : 1。因此本報告所列之質譜圖均是經由此實驗條件所獲得之結果。

圖一至圖十依序為 *P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. digitatum*, *P. pinophilum*, *P. italicum*, *P. brevicompactum*, *A. awamori*, *A. sulphureus*, *A. niger*, *A. ochraceus* 之 MALDI 質譜圖，均是直接刮取孢子混以基質所得之結果，而同一張圖中又包含同屬同種不同亞種孢子之 MALDI 質譜圖，其圖譜中顯現之特徵離子峯非常相似。綜合這些圖譜可歸納整理代表各菌株孢子的特徵離子峯，整理如表二。同屬不同種的孢子確有其具代表性之特徵離子峯。

我們為進一步瞭解所建立的圖譜是否可以直接拿來當作實際樣品的偵測。因此我們將從大賣場購回之柑橘、柳橙及金桔放置暗處培養一段時間，由肉眼觀察長出黴菌孢子後，以 tip 刮取表面之孢子直接混以 MALDI 基質進行 MALDI-MS 分析。圖十二為污染柑橘之孢子的 MALDI 質譜圖。圖十二 (a) 出現之主要離子峯為在 m/z 2981、4988、7292，圖十二 (a) 則是有經過進一步菌種分離後培養出之孢子質譜圖，同樣地在 m/z 2981、4988、7292 也出現了離子峯。比對表二或圖一至圖十一，可以得知這些特徵離子峯均為 *P. citrinum* 之代表離子，因此可判定污染柑橘之孢子為 *P. citrinum*，並且這和我們在前言中所整理的表格一中，可發現 *P. citrinum* 的確是常污染柑橘類水果的真菌之一。利用本報告所實驗的方

法，可以快速確定污染菌種的菌株。

圖十三 (a) 為長徽菌之柳橙表皮上所刮取的孢子混以 MALDI 基質 2,5-DHB 所得之質譜圖，在 m/z 2600、5211、7378 出現了主要離子峯，而圖十三 (b) 為從長徽之金桔表皮所刮取的孢子混以 MALDI 基質所得之 MALDI 質譜圖。同樣地在 m/z 2600 及 5211 均出現離子峯。對照表二及圖一至圖十一，可以比對出此污染菌株為 *P. digitatum*。查表一也可以發現 *P. digitatum* 的確是柑橘類水果表皮上常見之污染菌株之一。

結論

本計劃已成功完成包括 *Penicillium* 及 *Aspergillus* 等十一種菌種之 MALDI 質譜圖的建立，並以整理出各代表不同菌株之特徵離子峯。我們在本報告所提出的方法相當簡單且分析時間短，實際檢測上應有相當大的助益，本計劃的研究菌株均是易污染水果及易產生赭麴毒素的青黴菌或麴菌菌株，如要進一步擴展本方法的應用範圍，則需要建立更多的菌種資料庫，以供比對。如果質譜圖資料庫可以繼續建立地更完備，在實際檢測上應有更大的助益

參考資料

1. Karas M, Bachmann D, Hillenkamp, F. (1985) Influence of the Wavelength in High-irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules. *Anal. Chem.* 1985;57:2935-2939.
2. Karas M; Hillenkamp F. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10,000 Daltons. *Anal. Chem.* 1988;60:2299-2301.
3. Cain TC, Lubman DM, Weber WJ. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1994;8:1026-1030.
4. Welham K.J.; Domin MA; Johnson K; Jones K; Ashton DS. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000;14:307-310.
5. Li T-Y; Liu B-H; Chen Y-C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000;14: 2393-2400.
6. Amiri-Eiasi B; Fenselau C. *Anal. Chem.* 2001;73:5228-5231.
7. The information was obtained from <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/penicill.htm>

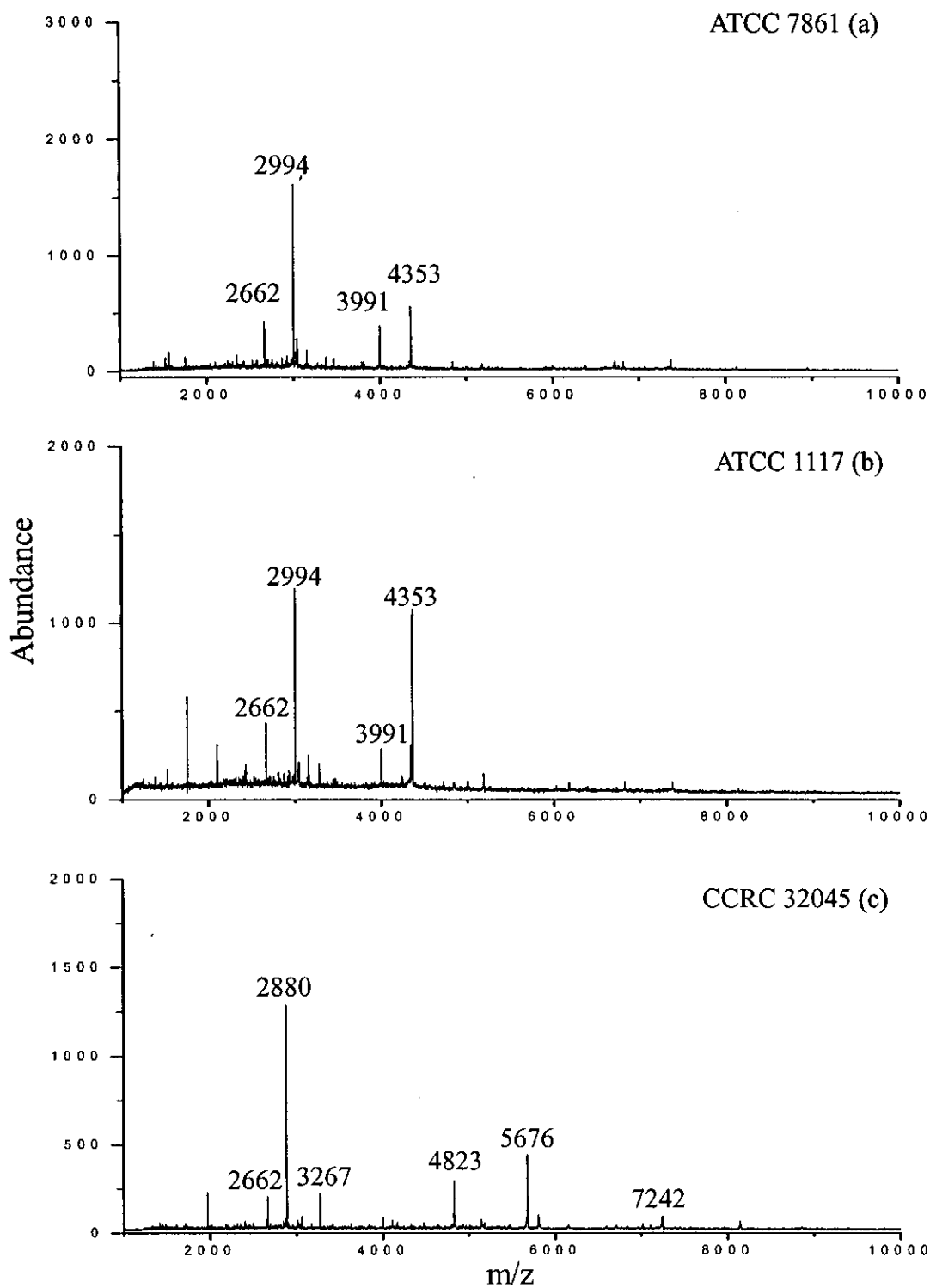
表一 常見污染食品之真菌

菌種種類	污染物種類
<i>P. citrinum</i>	玉米、柑橘類水果
<i>P. italicum</i>	麵包、柑橘類水果
<i>P. chrysogenum</i>	乳酪
<i>P. digitatum</i>	柑橘類水果
<i>P. brevicompactum</i>	檸檬汁
<i>P. expansum</i>	糕餅
<i>P. pinophilium</i>	蘋果
<i>A. ochraceus</i>	咖啡、穀物
<i>A. awamori</i>	咖啡、穀物
<i>A. sulphureus</i>	咖啡、穀物
<i>A. niger</i>	穀物、中藥材

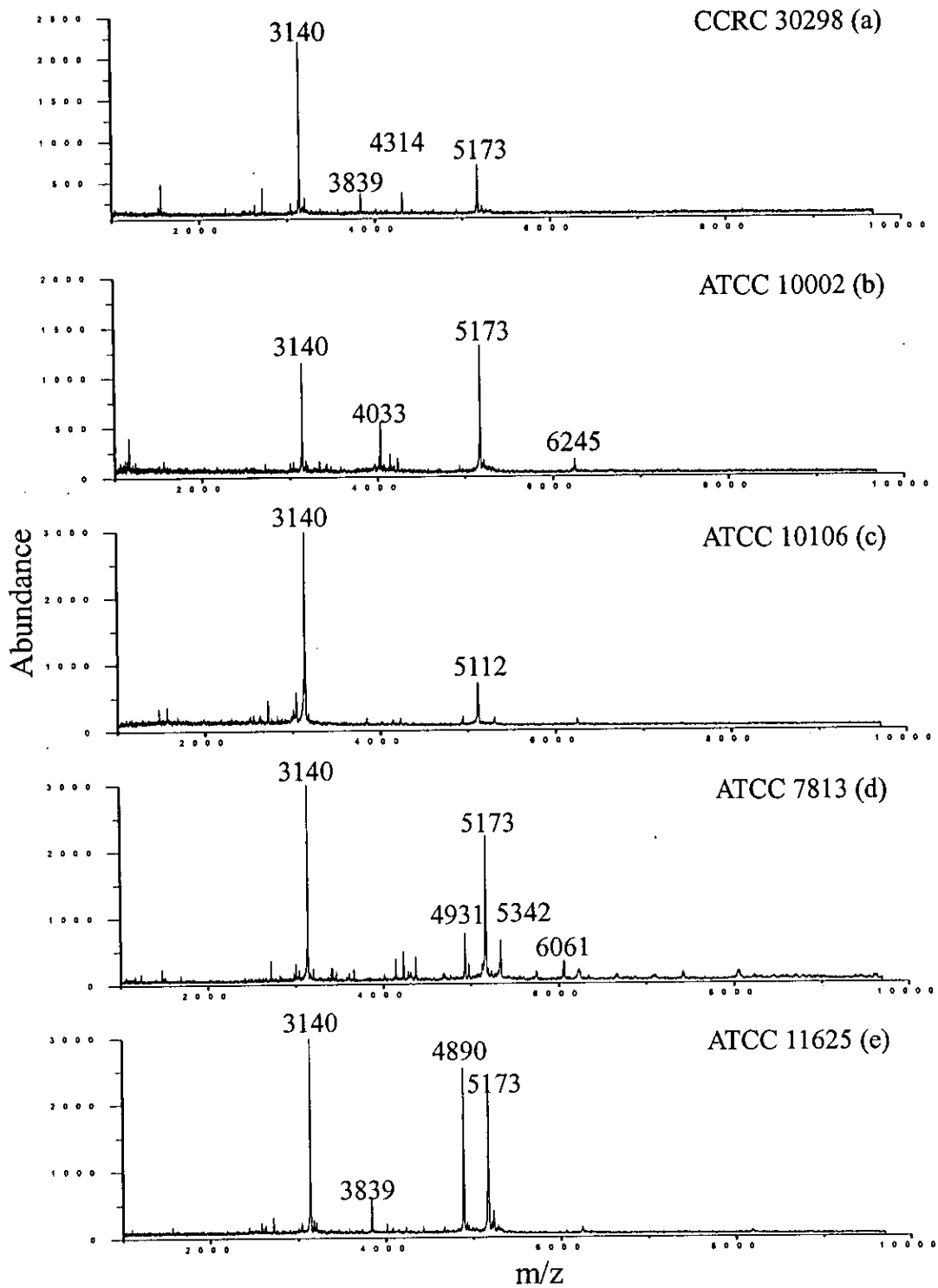
表二、青黴菌及麴菌之生物標幟離子

菌種名稱	生物標幟離子	菌種名稱	生物標幟離子
<i>P. italicum</i>		<i>P. expansum</i>	
CCRC 32575	2662,2994,4850,5253,7172, 7494	CCRC 32045	2662,2880,3267,4823,5676, 7242
CCRC 32630	2994,4736,4872,5222,7156, 7494	ATCC 1117	2662,2994,3991,4353
CCRC 35176	2181,2354,2994,6715,7494	ATCC 7861	2662,2994,3991,4353
ATCC 48114	2994,5210,8068		
<i>P. citrinum</i>		<i>A. niger</i>	
CCRC 32029	2981,4988,6795,7294,7825	6411	2561,6246,6545,7202
ATCC 14994	2981,4988,6795,7294,7825	9642	3183,6362,6705
NRRL 24977	2981,4988,6795,7294,7825	6275	6090,6362
<i>P. digitatum</i>		<i>A. sulphureus</i>	
CCRC 30820	2600,5211,7378	ATCC 11904	3037,3632,4524,4729, 5138,5680,5771
CCRC 32028	2600,5211,7378	ATCC 18413 *	3885,5454,5556
CCRC 32577	2600,5211		
CCRC 32578	2600,5211,7378		
<i>P. chrysogenum</i>		<i>A. awamori</i>	
CCRC 30298	3140,3839,4314,5173	ATCC 14333	6090,6362,6433,7144
ATCC 7813 (+)	3140,4933,5173,5342, 6061,8192	ATCC 14335	6090,6362,6433,7144
ATCC 10002 (+)	3140,4033,5173,6245	IFO 6082 *	6090,6362,6433,7144
ATCC 10106	3140,5112,6245		
ATCC 11625 (+)	3140,3839,4890,5173		
<i>P. brevicompactum</i>		<i>A. ochraceus</i>	
CCRC 32024	2592,2953,3840,4821,6661	ATCC 22947 *	3938,4462,5569,6024
IFO 5751	2953,3914,4878,6563,7707	ATCC 12066	2978,4030,4945,5390, 5529,5660,6007,6788,8583
IFO 5884	2225,2285,2953,3509, 7515,7707	ATCC 1008	4452,5552,6023

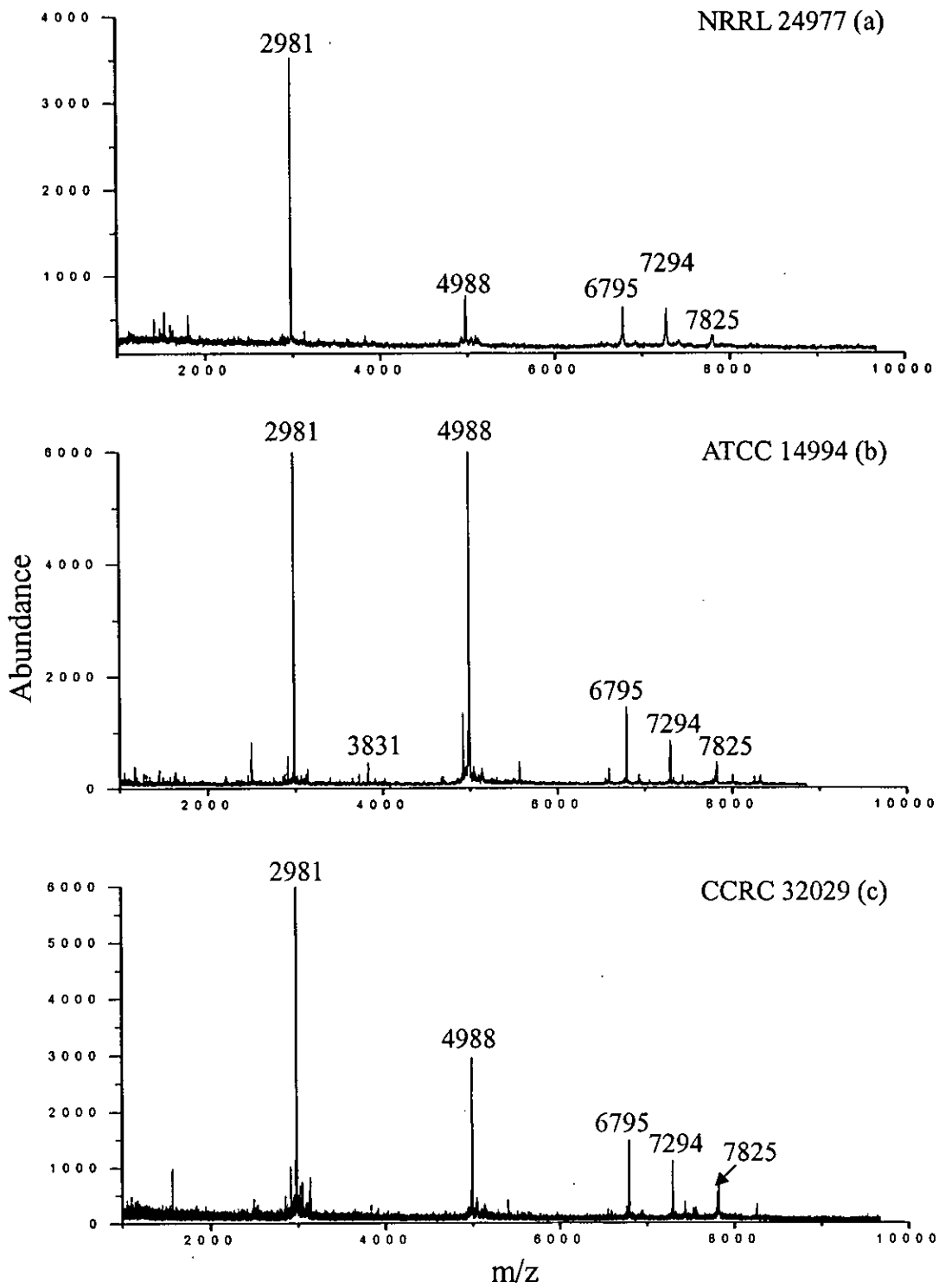
*符號表示該菌株會產生赭麴毒素 A (Ochratoxin A)



圖一、三株 *P. expansum* (a) ATCC 7861 (b) ATCC 1117 (c) CCRC 32045 不同亞種的 MALDI 質譜圖

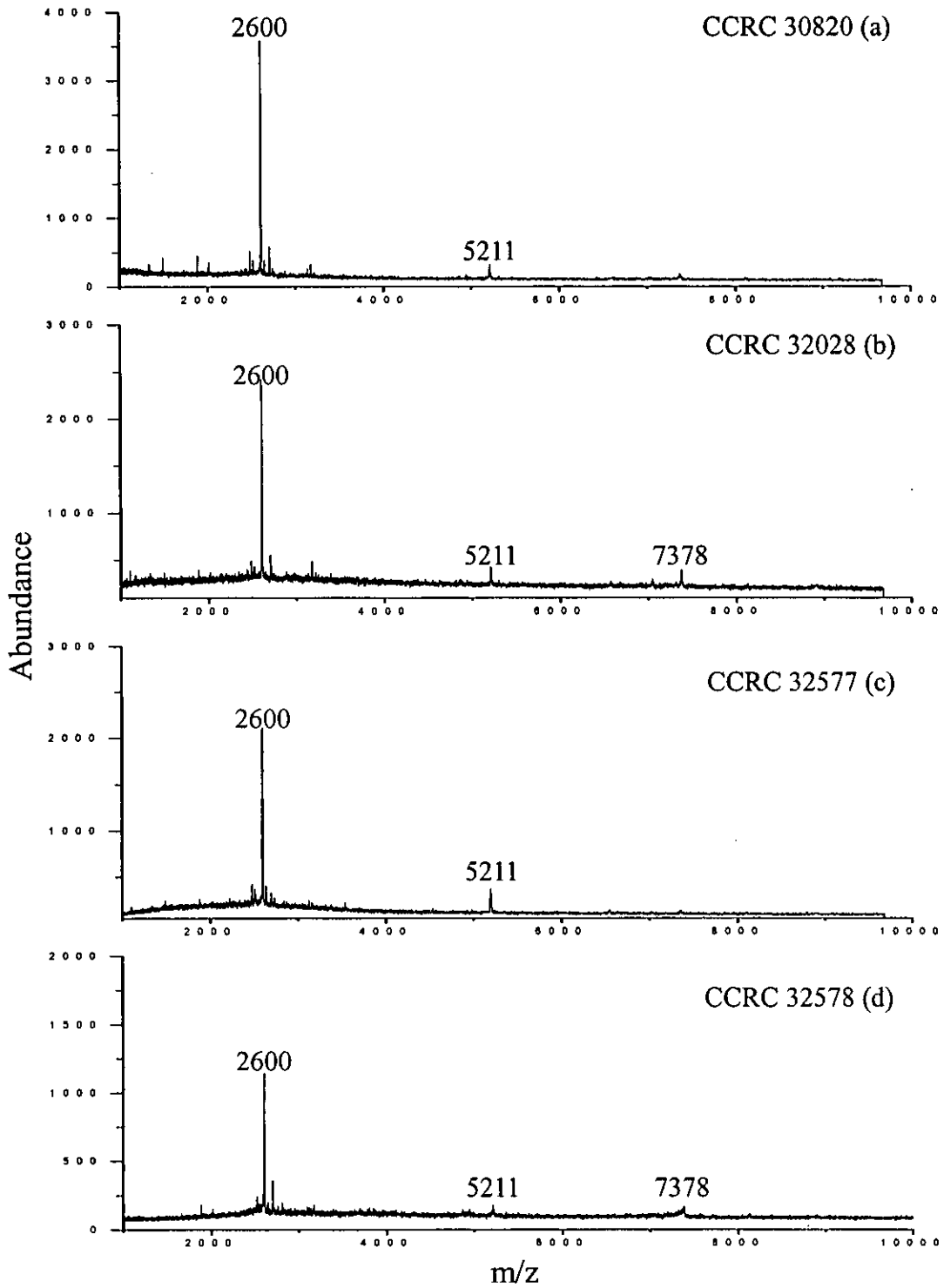


圖二、五株 *P. chrysogenum* (a) CCRC 30298 (b) ATCC 10002 (c) ARCC 10106 (d) ATCC 7813 (e) ATCC 11625 不同亞種的 MALDI 質譜圖

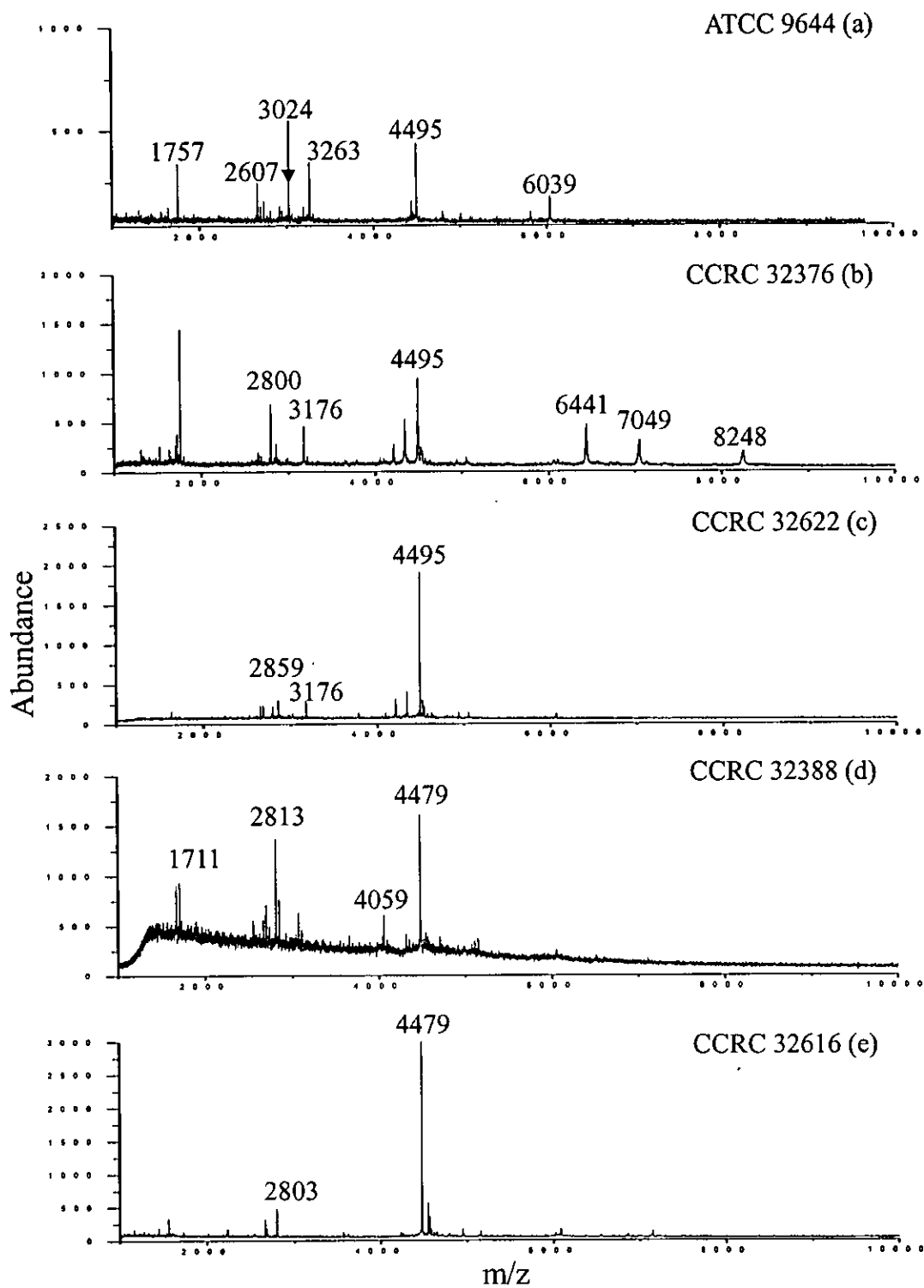


圖三、三株 *P. citrinum* (a) NRRL 24977 (b) ATCC 14994 (c) CCRC 32029

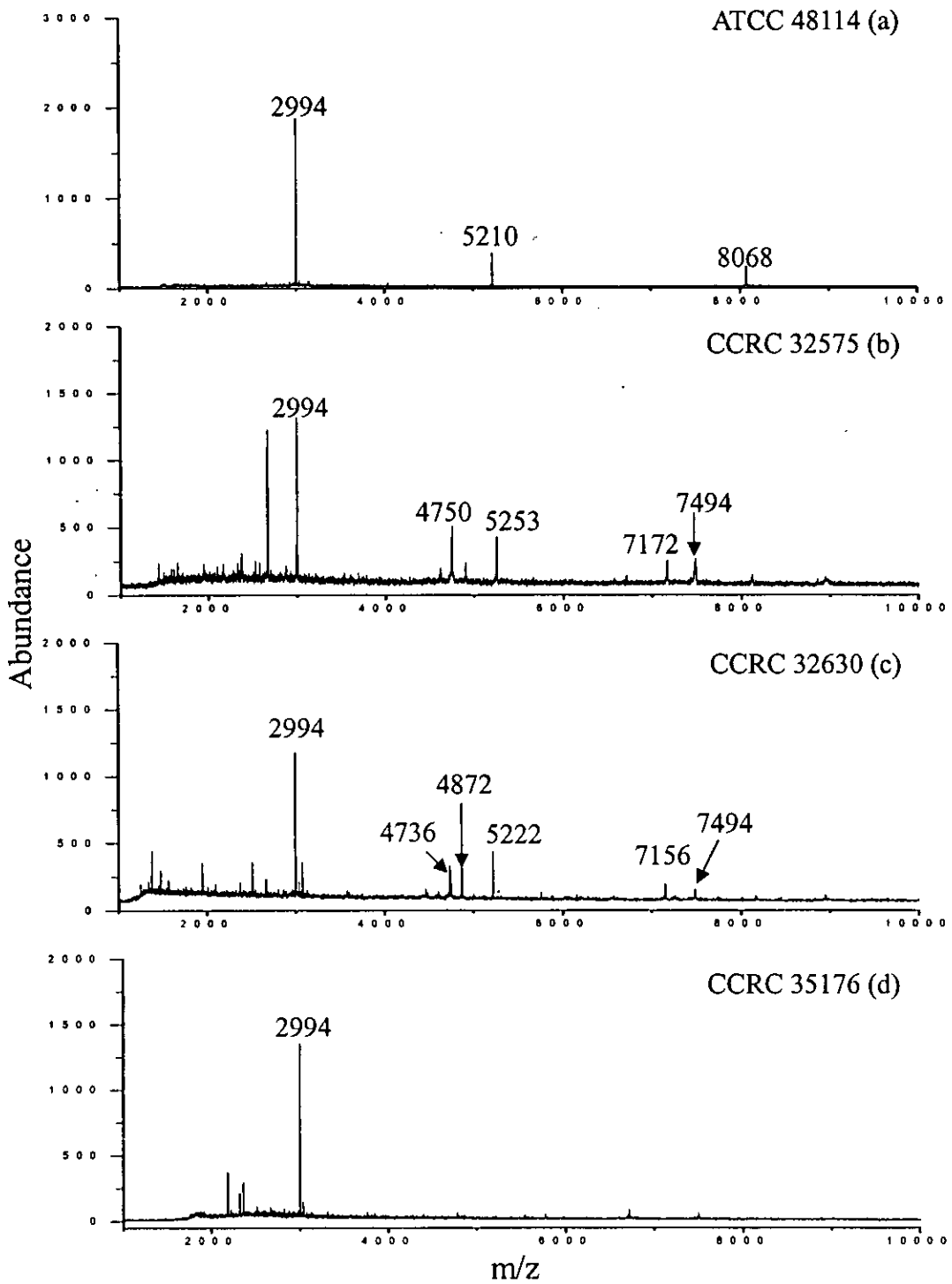
不同亞種的 MALDI 質譜圖



圖四、四株 *P. digitatum* (a) CCRC 30820 (b) CCRC 32028 (c) CCRC 32577 (d) CCRC 32578 不同亞種的 MALDI 質譜圖

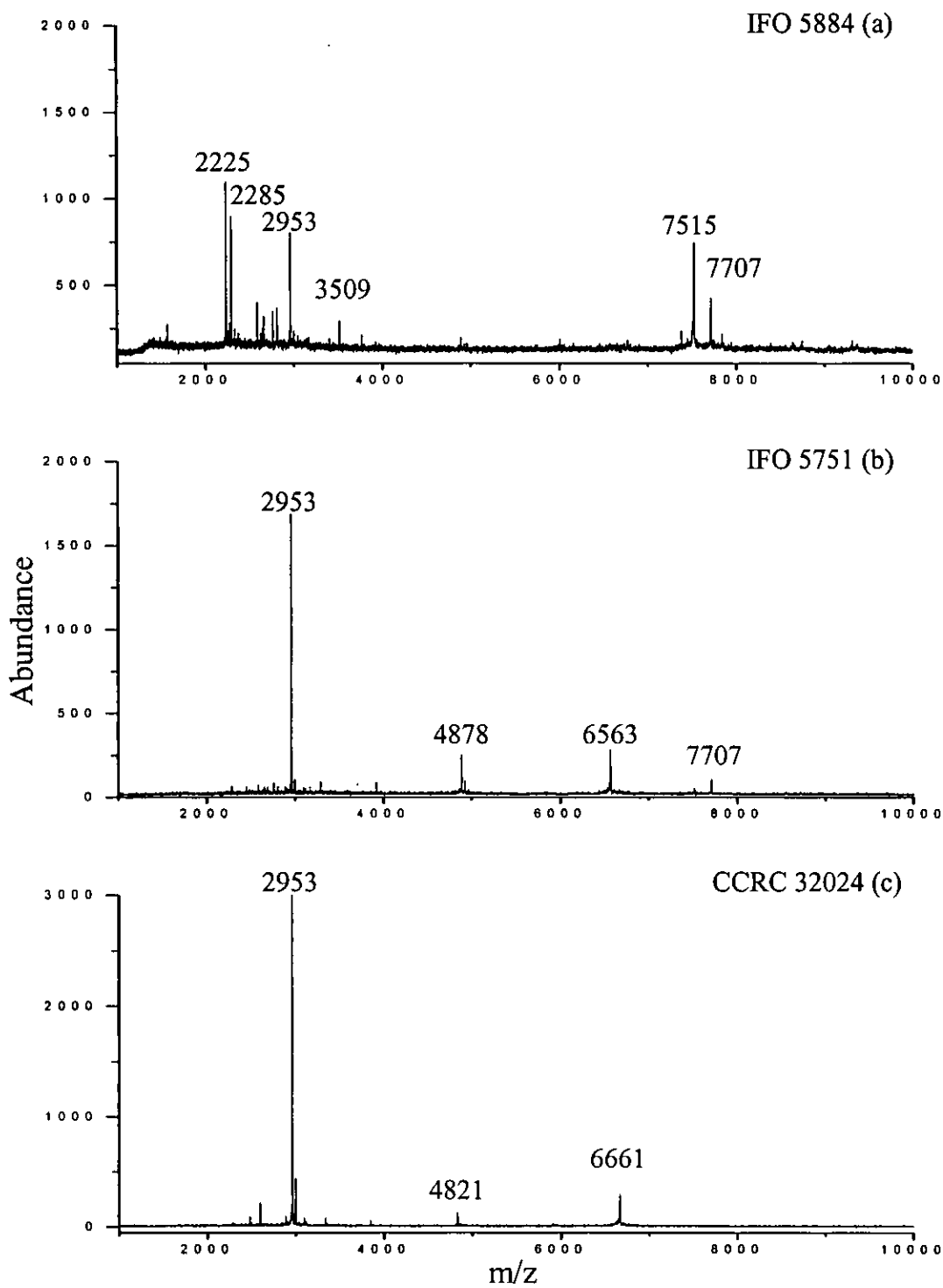


圖五、五株 *P. pinophilum* (a) ATCC 9644 (b) CCRC 32376 (c) CCRC 32622 (d) CCRC 32388 (e) CCRC 32616 不同亞種的 MALDI 質譜圖



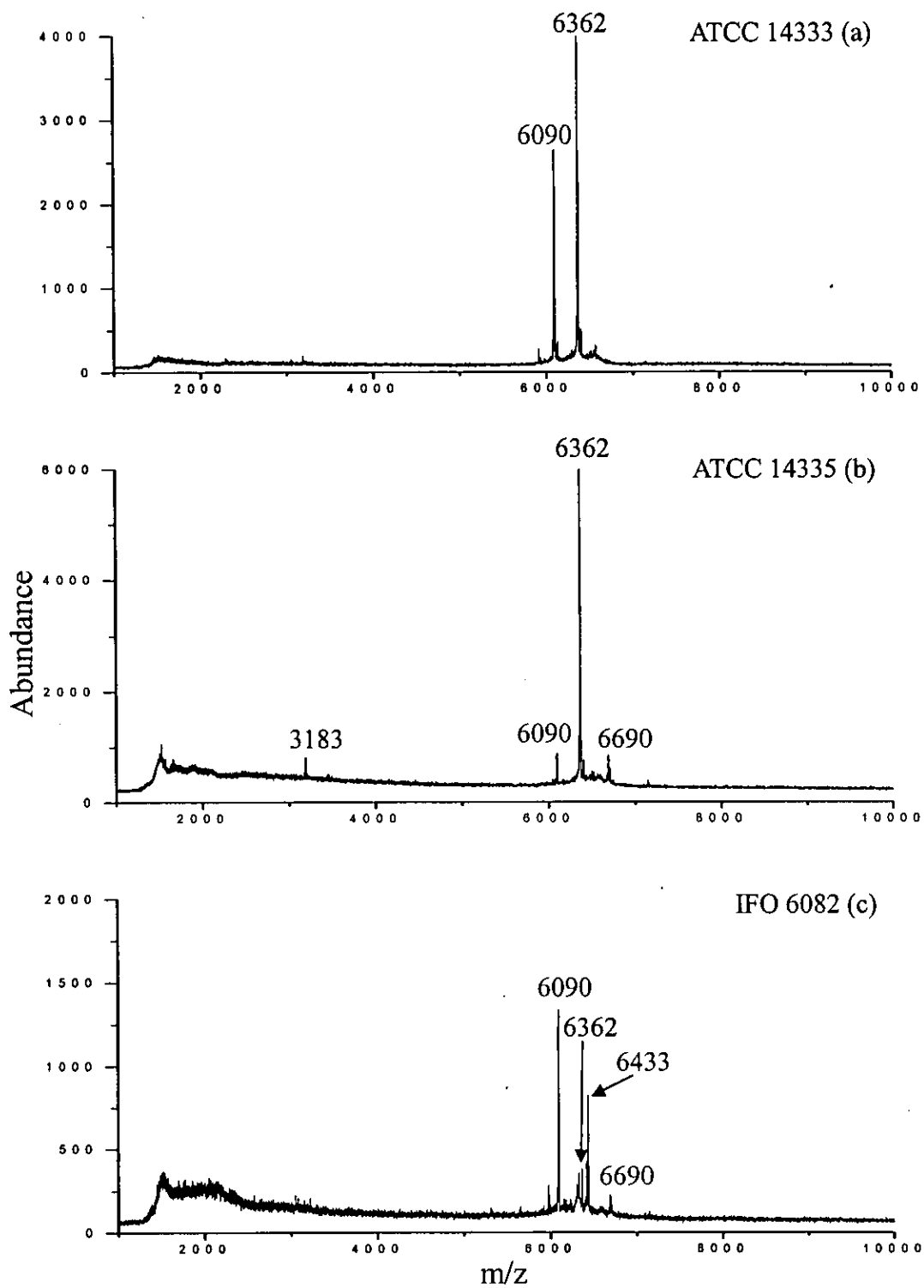
圖六、四株 *P. italicum* (a) ATCC 48114 (b) CCRC 32575 (c) CCRC 32630 (d)

CCRC 35176 不同亞種的 MALDI 質譜圖

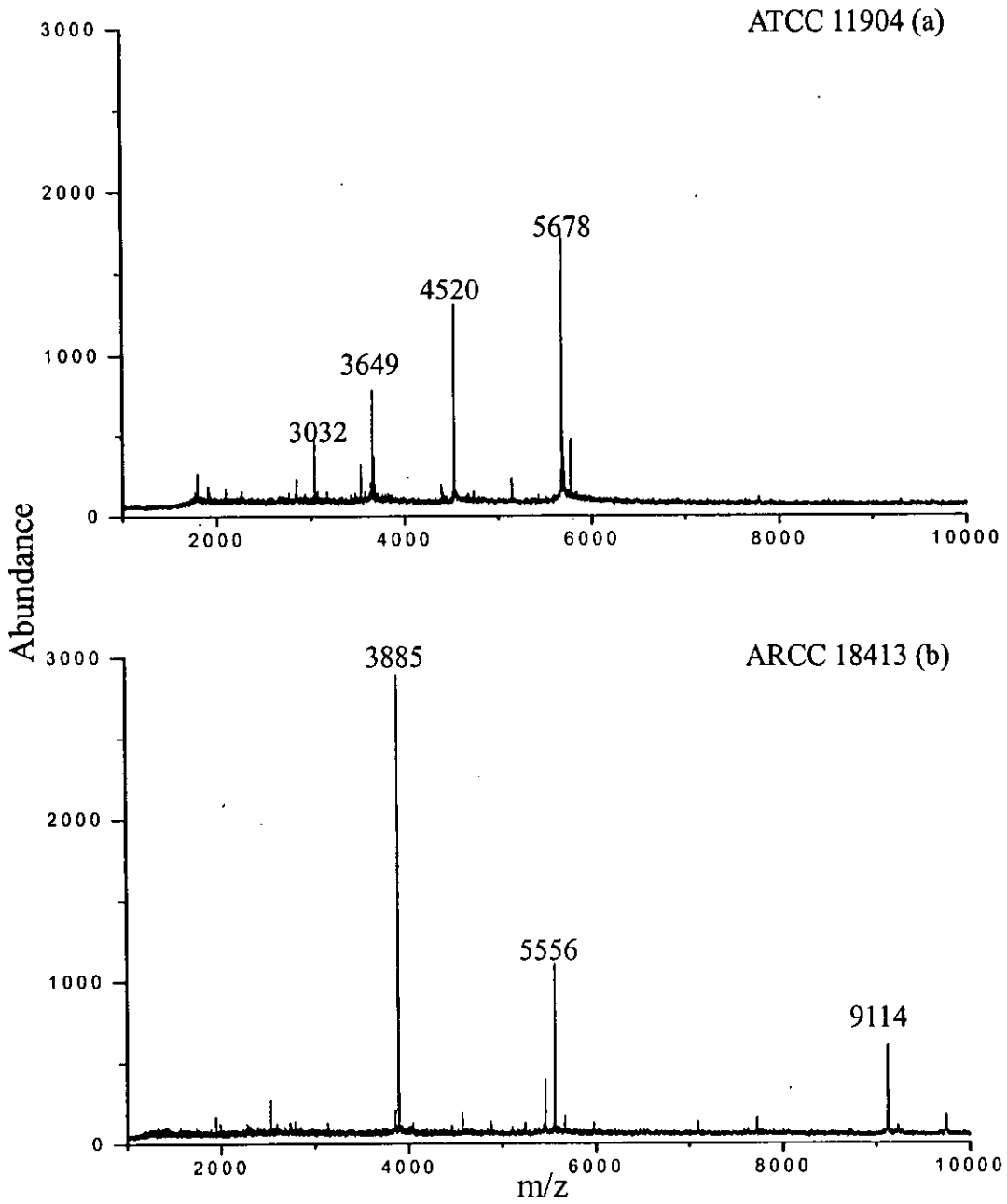


圖七、三株 *P. brevicompactum* (a) IFO 5884 (b) IFO 5751 (c) CCRC 32024

不同亞種的 MALDI 質譜圖

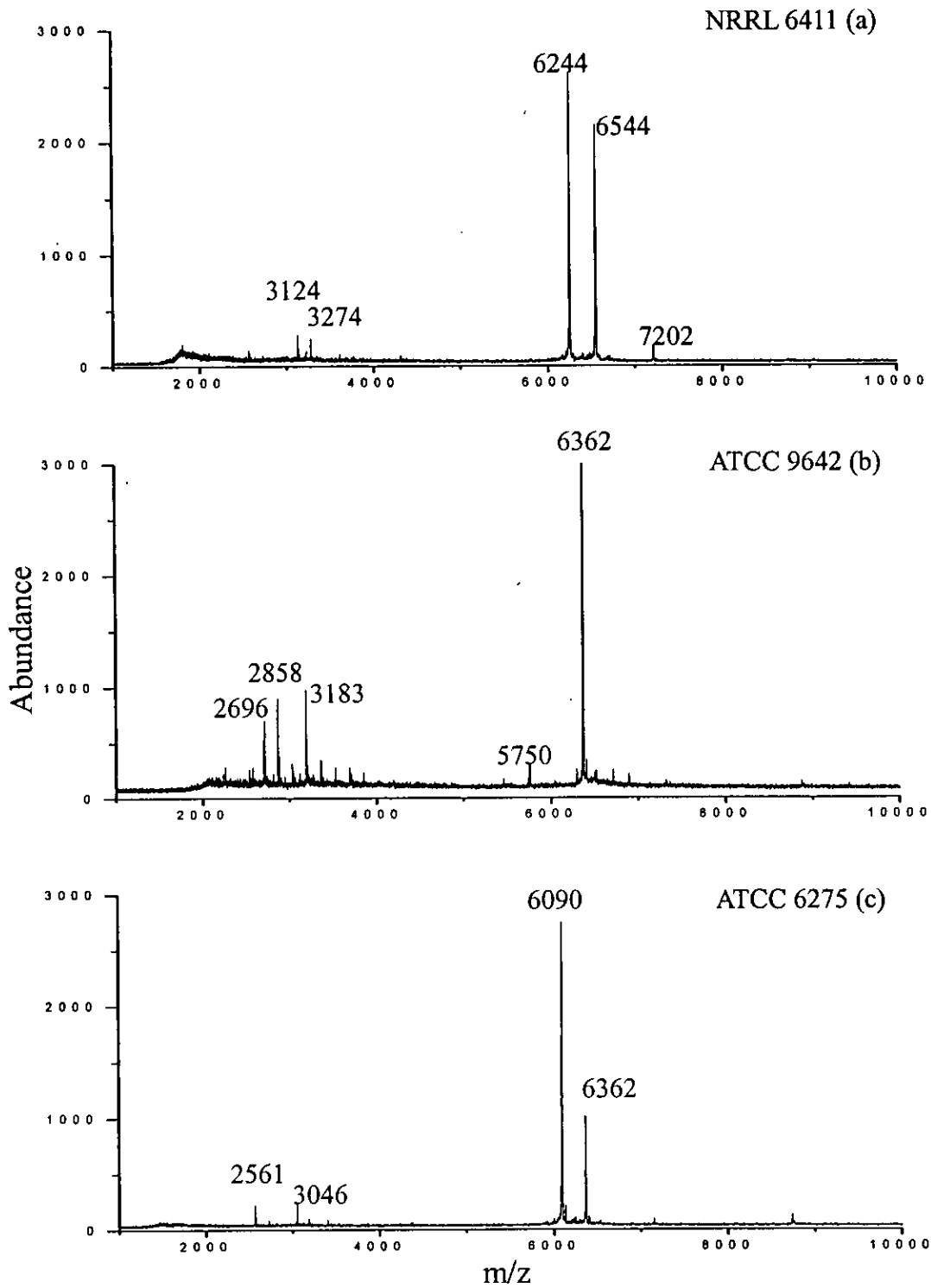


圖八、三株 *A. awamori* (a) ATCC 14333 (b) ATCC 14335 (c) IFO 6082 不同亞種的 MALDI 質譜圖

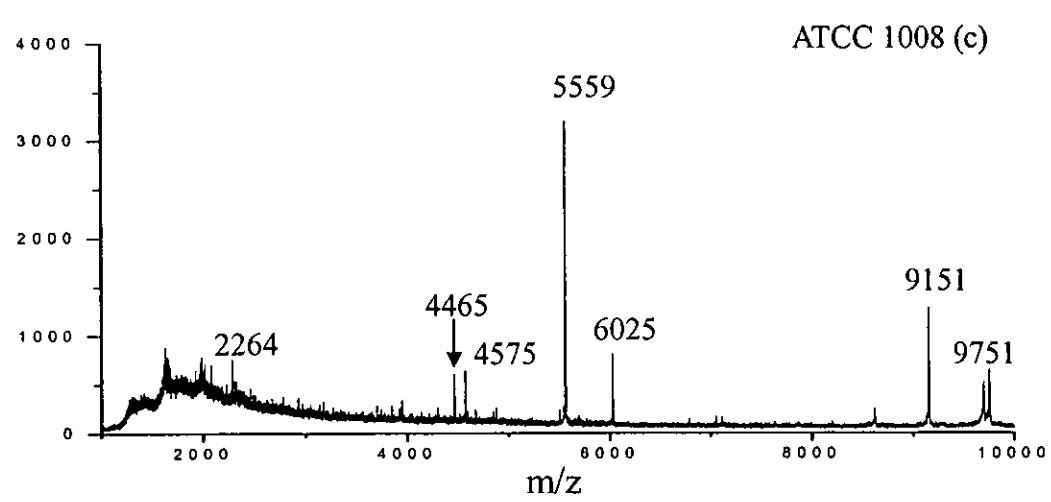
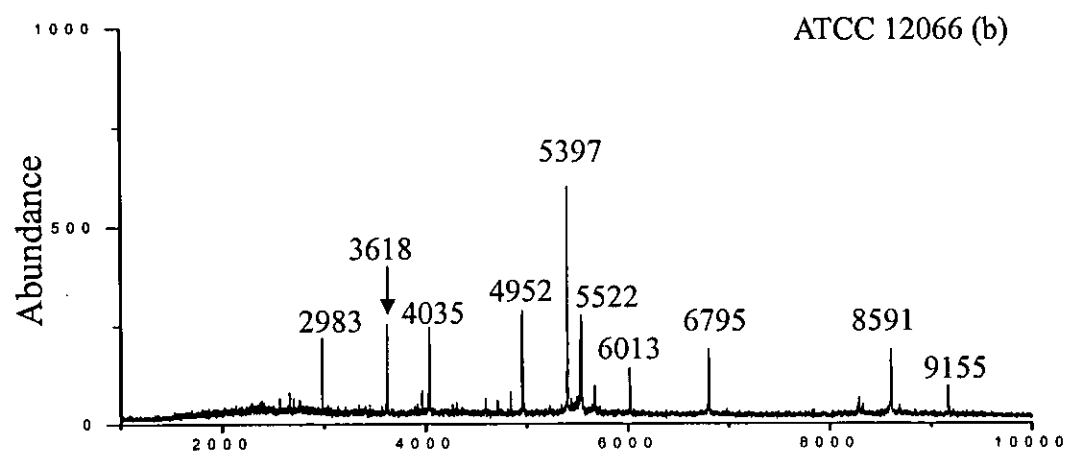
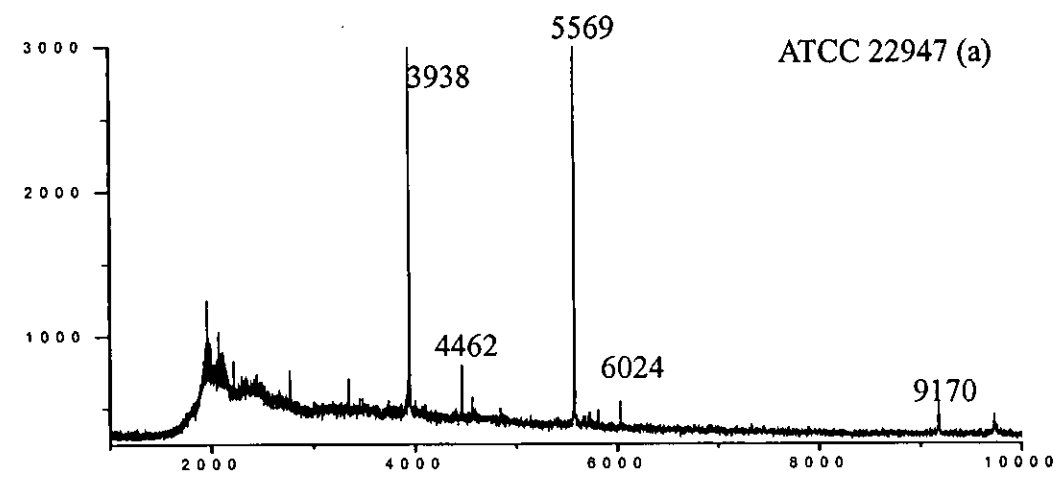


圖九、兩株 *A. sulphureus* (a) ATCC 11904 (b) ATCC 18413 不同亞種的

MALDI 質譜圖

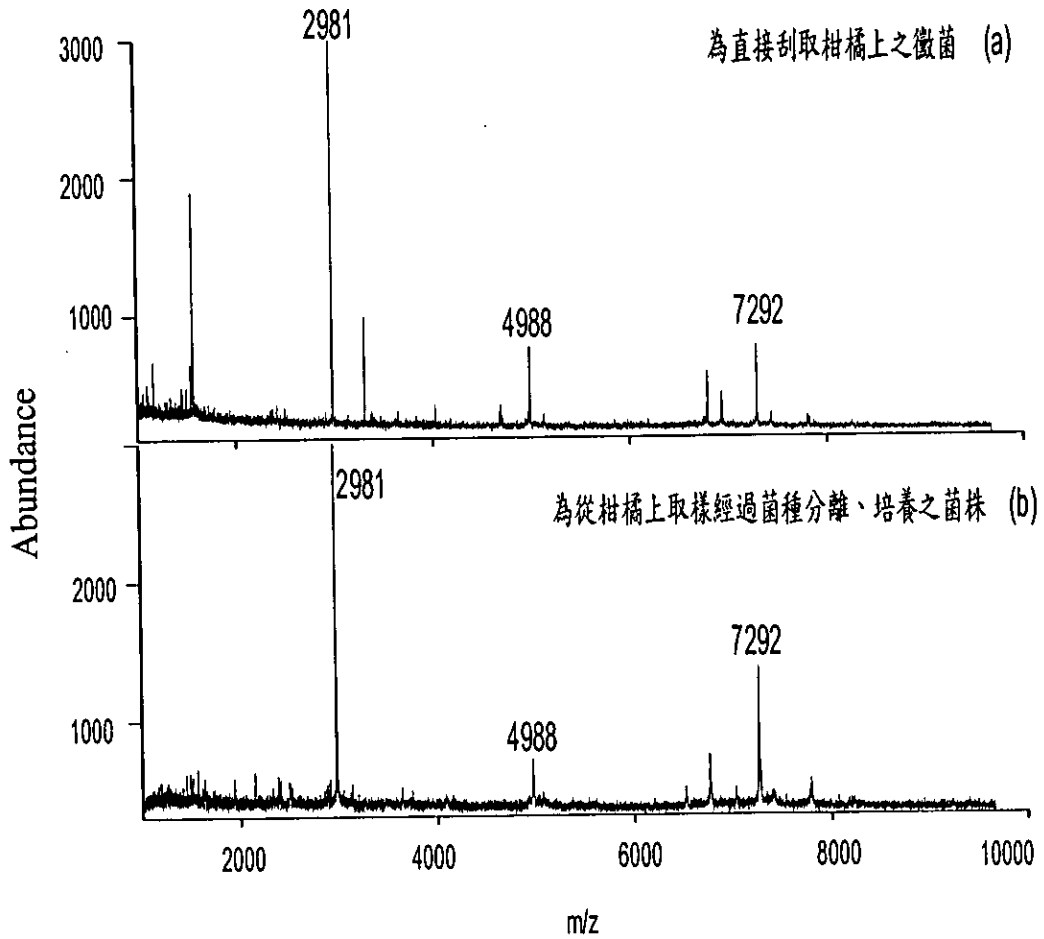


圖十、三株 *A. niger* 亞種(a) NRRL 6411 (b) ATCC 9642 (c) ATCC 6275 不同亞種的 MALDI 質譜圖

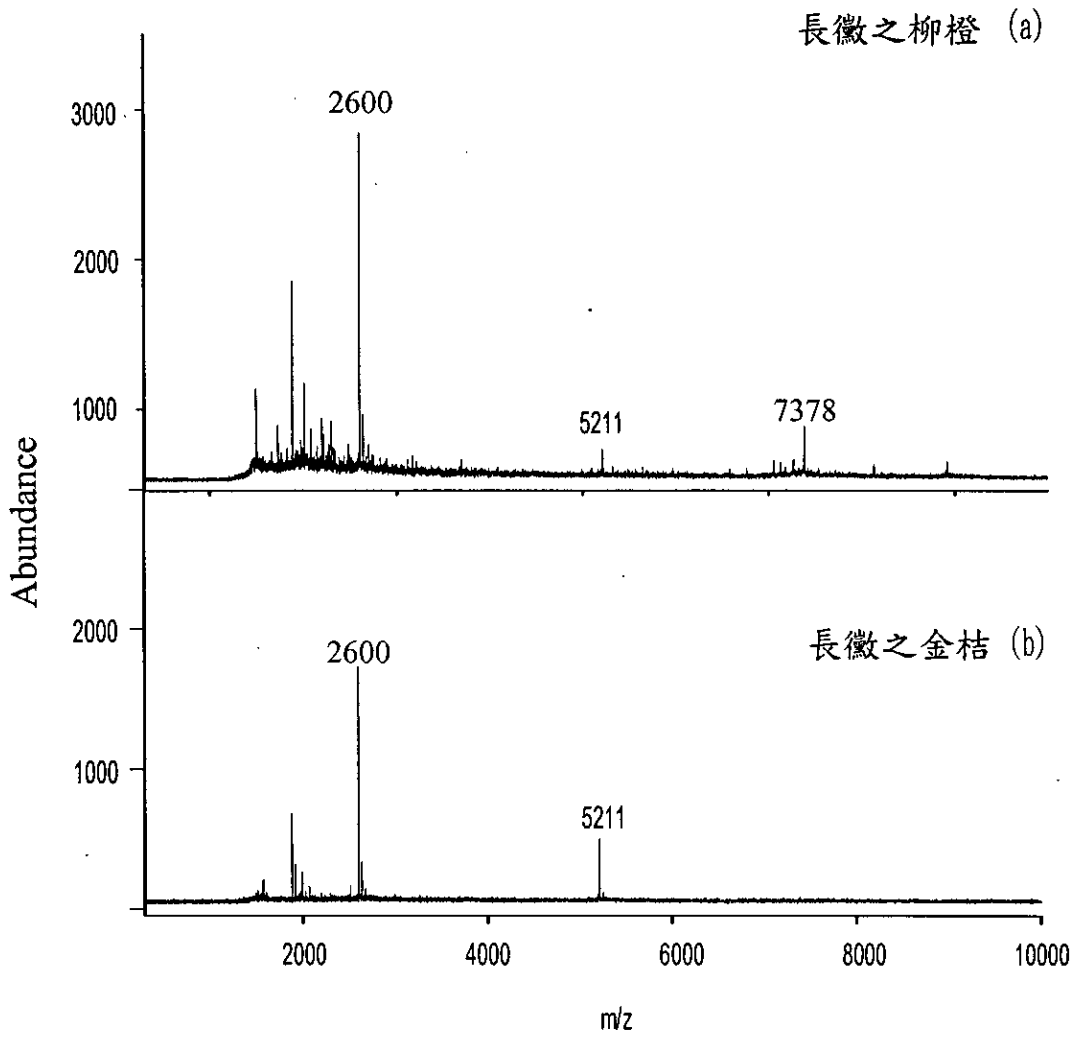


圖十一、三株 *A. ochraceus* (a) ATCC 22947 (b) ATCC 12066 (c) ATCC 1008

不同亞種的 MALDI 質譜圖



圖十二、(a)直接刮取柑橘上之黴菌進行分析所得到的 MALDI 質譜圖；(b)將柑橘上之真菌經過菌種分離、培養之菌株再經 MALDI-MS 分析所得的質譜圖



圖十三、(a)長徽之柳橙 (b)長徽之金桔經 MALDI-MS 分析所得到的
MALDI 質譜圖