

WHITE PAPER

迅速な生乳分析

高い蛍光性を有する
動物由来および
植物由来ミルク製品の
定性および定量分析を
Time-gated ラマン技術で実現

CONTACT US:
TIMEGATE INSTRUMENTS LTD

Tutkijantie 7
FI-90590 Oulu
FINLAND
www.timegate.com
info@timegate.com

はじめに

ラマン分光法は、食品システムの分析において、ここ10年で急速に普及が進んでいます。振動フィンガープリントは、分析対象のサンプル成分や構造に関する豊富な情報を提供します。

食品業界では、原材料と最終製品の双方の品質管理が最も重要です。生活習慣病が急増する中、ベジタリアン向けの代替食品を選ぶ人が増えています。

最近の研究では、植物性タンパク質のカロリーが3%増加することによって死亡リスクが10%減少すると言われています。食品業界の主要製品のひとつに牛乳があります。

動物性乳製品に起因する乳糖不耐症やアレルギーのため、植物性乳製品が盛んに利用されるようになっていきます。

ラマン分光法は、乳製品とその成分の特性評価に用いられてきました。植物由来の製品は動物由来の製品と比較して蛍光性が高いため、ラマン分光法にとって蛍光性は大きな課題です。

本研究では、さまざまな種類の牛乳および乳製品について、連続波ラマン分光法とTime-gated ラマン技術を比較しました。

まず、動物性ミルクを大豆ミルクおよびオートミルクと比較分析しました。

さらに、チーズ、乳糖、ホエイ、ベジタリアン用タンパク質補給パウダーをテストしました。

この技術の定量的な有効性を例示するため、脂肪分と乳糖含有量が異なる牛乳を分析しました。



機器と方法

ラマン分光法は、非破壊的な化学分析を可能にし、試料の構造、相、多形、分子間相互作用に関する情報を明らかにする手法です。また、この技術の大きな利点の一つは、特別な試料準備が不要である点にあります。しかしながら、蛍光の影響によってこの技術の適用範囲が依然として制限される場合があります。特に、アミノ酸が強い蛍光信号を示すことはよく知られており、これが大きな課題となっています。

Time-gated型ラマン技術は、蛍光の発生とラマン散乱光子の発光との時間差を利用します。この技術では、ほとんどの妨害となる蛍光信号が発生する前に、ラマン散乱光子を検出します。Time-gatingは、研究対象のラマン散乱光子と、他の(干渉する)発光との間に時間差がある限り、それらを分離して解析することを可能にします(図1)。

この蛍光抑制技術は、これまで何十年にもわたり研究機関で研究されてきましたが、他の時間ゲート式ラマン技術はコストや複雑さの壁により、商業化には至っていませんでした。

しかし、特許取得済みのCMOS-SPAD電気ゲート式検出器を採用した当社のTimegateラマン技術は、これらの課題を克服し、実現性に優れた解決策として提供します。

この革新的な技術により、従来は蛍光干渉によって制約を受けていたラマン分光法の適用範囲を大きく広げることが可能です。

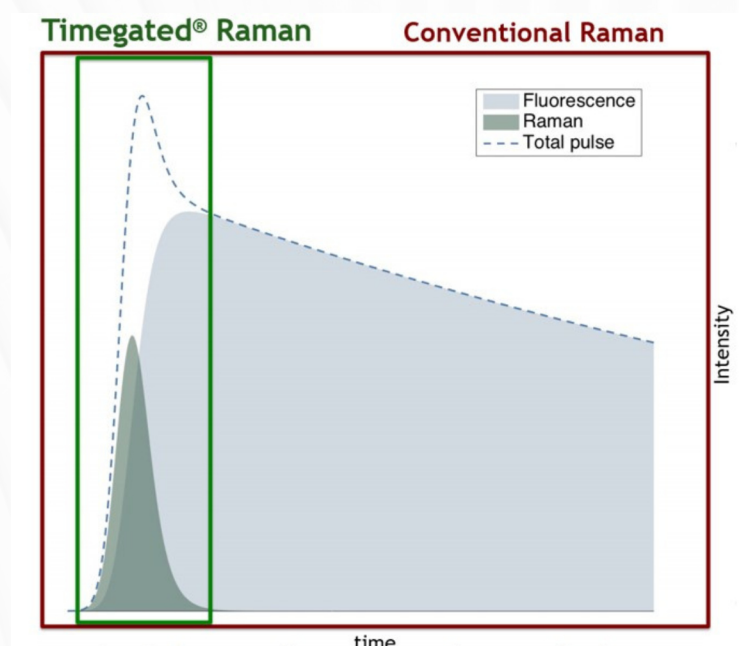


図1. 従来のラマン分光法とTime-gateラマン分光法の比較

連続波（CW）ラマン分光スペクトルは、Thermo Scientific DXR2xiラマンイメージング顕微鏡を使用して、532 nmと785 nmのレーザーを用いて取得され、Time-gated型ラマン分光計であるTimegate Instrument PicoRaman 532 nmから得られた測定結果と比較されました。すべての測定において10xのプロブが使用され、連続波ラマン分光法では、積算回数を3回に設定しました。各測定の時間はCCDの飽和によって制限されました。PicoRamanで各スペクトルを取得する総時間は3分に設定しました。

牛乳および乳製品の定性分

3種類の異なるミルクが研究対象となりました。1つ目のミルクは動物由来で乳糖含有量が低減されたもの、2つ目はオーツミルク、3つ目はソイミルクでした。

これらはすべて地元のスーパーマーケットで市販されている製品です。

図2は、CWラマンとPicoRamanの両方で取得した試料の生スペクトルを比較したものです

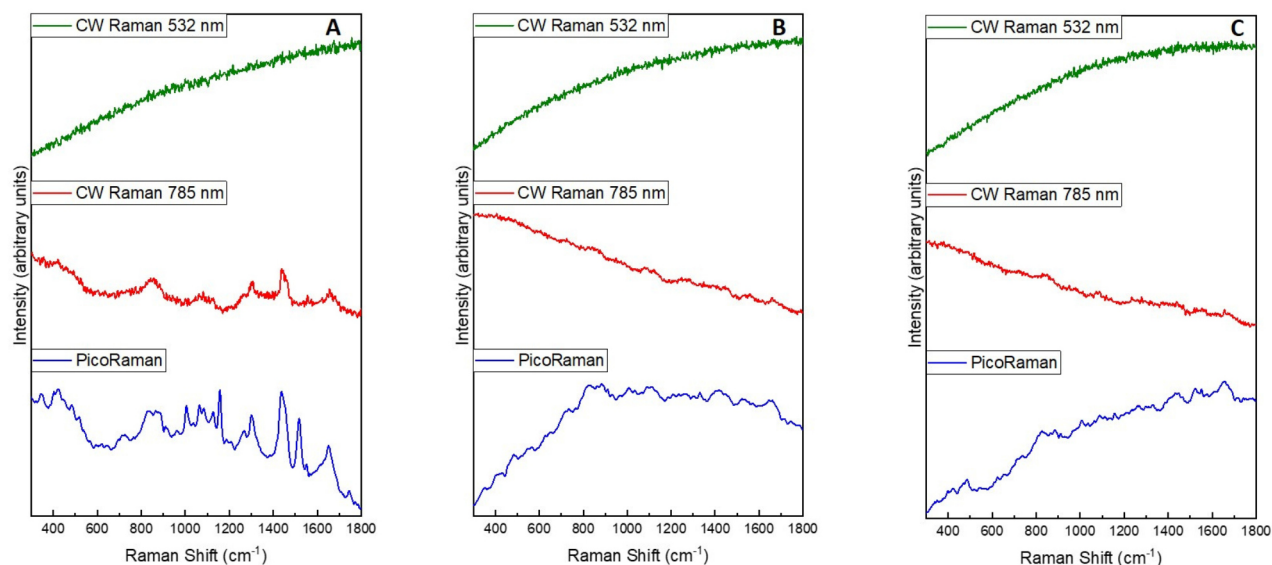


図2. 連続ラマン分光計による532 nmおよび785 nmレーザー励起で測定した(A)ミルク、(B)オーツミルク、(C)ソイミルクの生ラマンスペクトルと、PicoRamanによる532 nmレーザー励起で測定したスペクトル（視認性向上のためYオフセットを適用）。

図3から明らかなように、植物由来のミルク製品は非常に蛍光を発し、連続波（CW）ラマン分光計から得られる蛍光による影響を受けたラマンスペクトルから有意義なデータを得ることはほぼ不可能です。蛍光を効果的に除去すれば、ラマンスペクトルを明確に特性評価し、定量的および定性的に分析することができます。

牛乳中のタンパク質はカゼインとホエイに由来します。そのため、牛乳のスペクトル特性を明確に理解するために、チーズ（カゼイン80%）、乳糖、植物性タンパク質、ホエイタンパク質を測定しました（図4）。

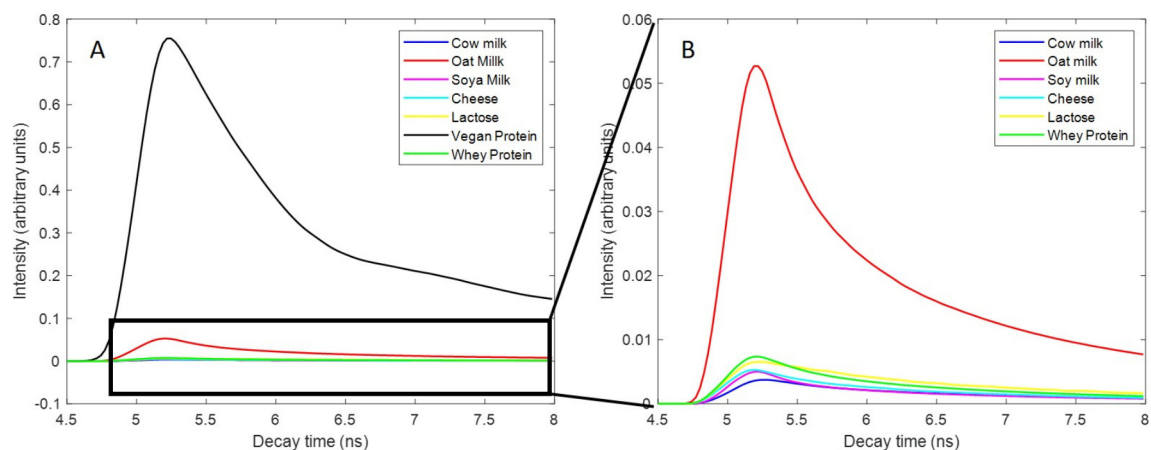


図3. (A) ミルク、オーツミルク、ソイミルク、チーズ、乳糖、ヴィーガンプロテイン、ホエイプロテインの蛍光減衰特性。(B) 蛍光減衰特性の拡大図。

PicoRamanが提供する科学データの一例

Time-gated型ラマン分光法によるオーツミルクのラマンスペクトルは、トリプトファンやフェニルアラニンなどの芳香族アミノ酸の β シート構造を 1672 cm^{-1} で示しています。さらに、アミドIの α ヘリカルバンドが 1654 cm^{-1} 、アミドIIが 1567 cm^{-1} 、アミドIIIの β シートバンドが 1238 cm^{-1} から 1245 cm^{-1} の間、アミドIIIのランダムコイル構造が 1250 cm^{-1} 、アミドIIIの α ヘリカルバンドが 1260 cm^{-1} から 1300 cm^{-1} の間で現れ、これらを利用して試料のタンパク質含有量を定量的に分析できます。飽和脂肪酸の含有量は 1303 cm^{-1} および 1443 cm^{-1} のピークから確認できます。

トリグリセリドは 1748 cm^{-1} でピークを示し、 1654 cm^{-1} のピークは不飽和脂肪酸に起因します。一方、 1087 cm^{-1} のピークは乳糖を示しています。したがって、ラマンスペクトルを基に統計的手法を用いてタンパク質、脂肪、乳糖の含有量を定量化できます。さらに、カロテノイド含有量は 1520 cm^{-1} のピークを基に計算することができます。

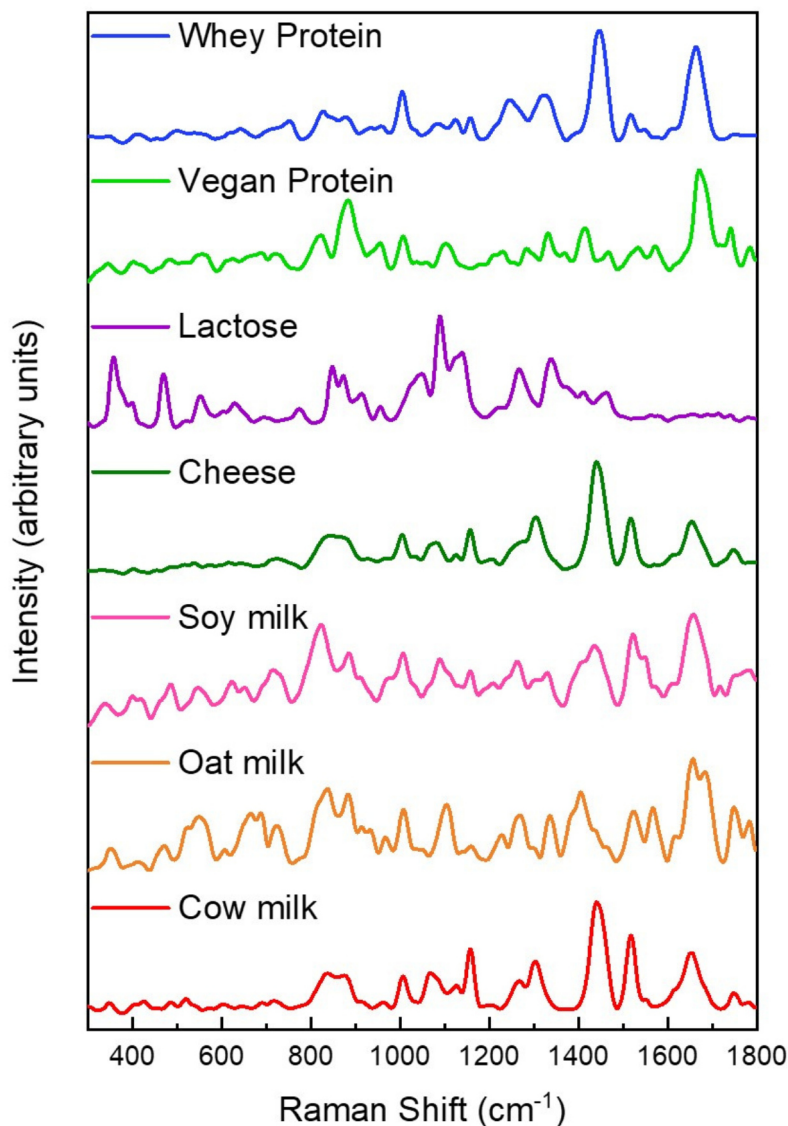


図4. PicoRamanを使用して測定したミルク、オーツミルク、ソイミルク、チーズ、乳糖、ヴィーガンプロテイン、ホエイプロテインのラマンスペクトル（視認性向上のためYオフセットを適用）

ミルクの定量的評価

市販の異なる脂肪含有量（0～3.5 g/100 ml）のミルク（図5）および乳糖含有量（0～4.8 g/100 ml）のミルク（図6）がPicoRamanを使用して測定されました。

すべてのスペクトルは、Timegate Instrumentsが提供するグラフィカルユーザーインターフェースアプリSHSGUIを使用して前処理され、その後ベクトル正規化されました。

1443 cm⁻¹での強度が、10種類のミルクサンプルに含まれる飽和脂肪レベルを定量的に比較するために使用されました。定量分析は、市販のミルクのパッケージに記載された脂肪レベルに基づいて行われました。線形の相関が得られ、相関係数は0.95という高い値を示しました（図7）。

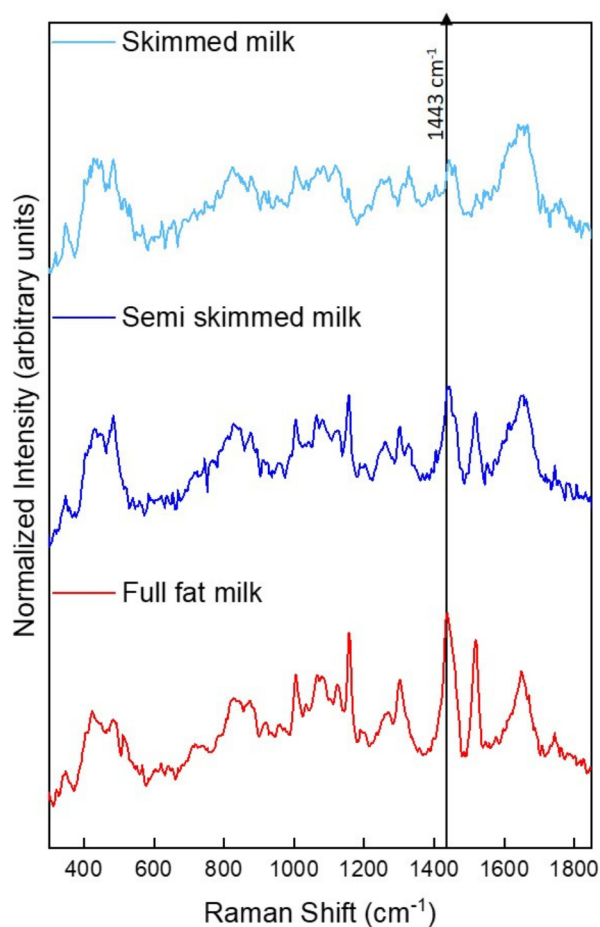


図5. フルファット、セミスキム、スキムミルクの平均ラマンスペクトル（視認性向上のためYオフセットを適用）。

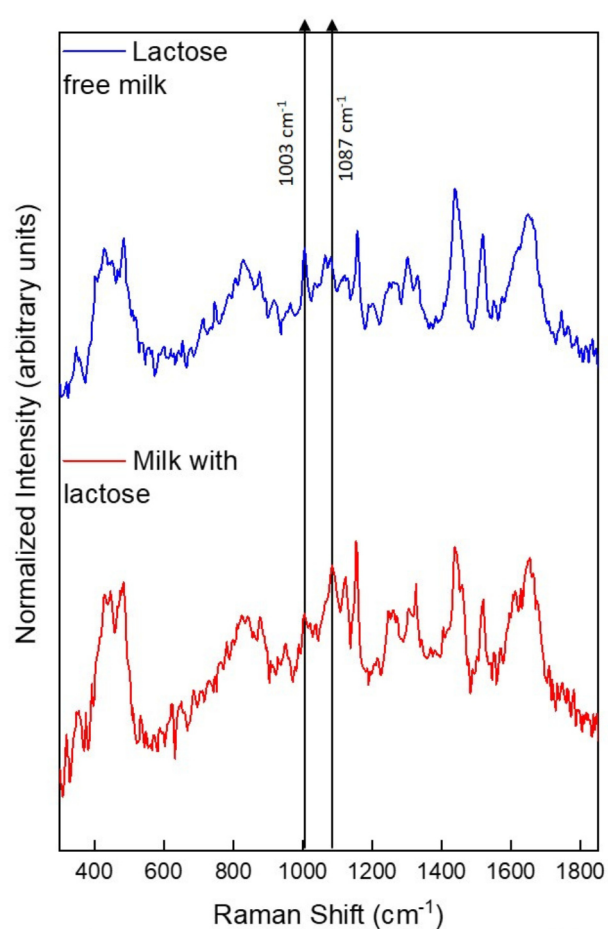


図6. 乳糖を含むミルクおよび乳糖不使用ミルクの平均ラマンスペクトル（視認性向上のためYオフセットを適用）。

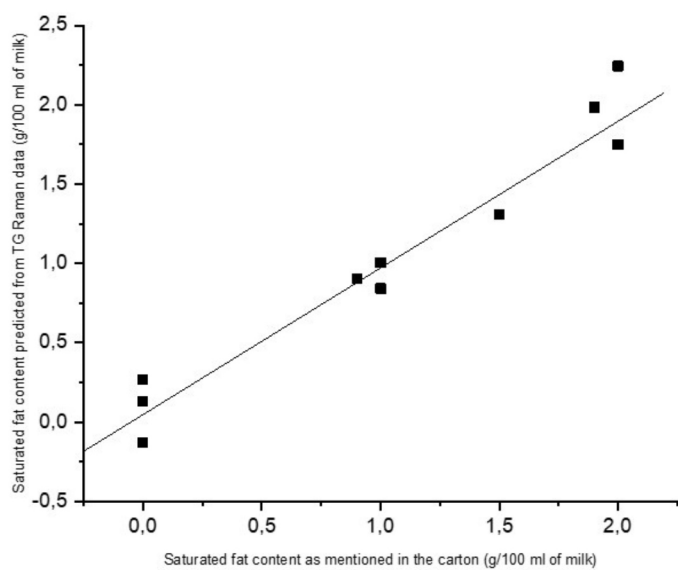


図7. ラマンスペクトルに基づく飽和脂肪の校正曲線。

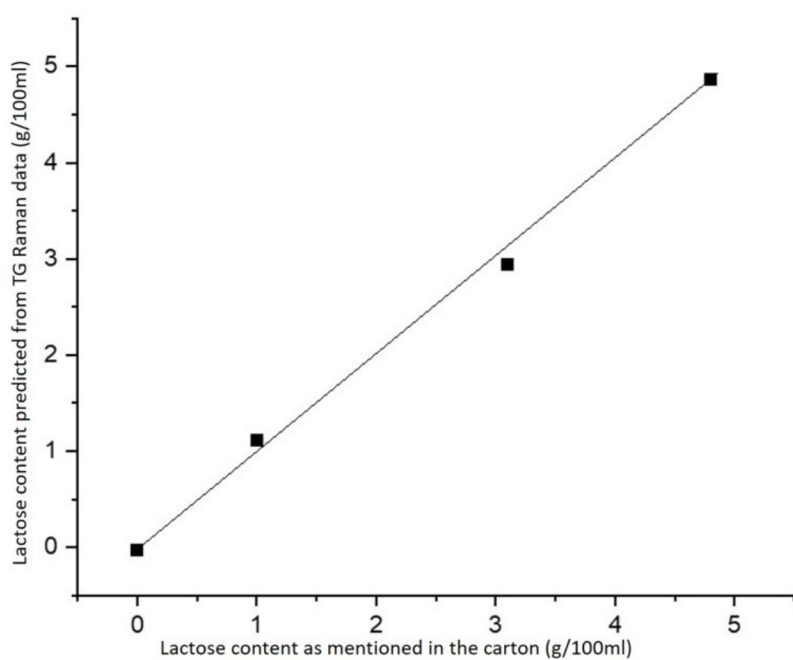


図8. ラマンスペクトルに基づく乳糖の校正曲線。

乳糖含有量は、 1087 cm^{-1} のC-O-H屈曲モードを使用して定量化されました。必須アミノ酸の一つであるフェニルアラニンは、 1003 cm^{-1} で強いピークを示します。すべてのミルクサンプルのタンパク質含有量は比較的似ていたため、 1087 cm^{-1} と 1003 cm^{-1} でのラマン強度の比率を取ります。図8に示されているように、相関係数は0.99でした。

結論

動物由来の乳製品に関するこれまでの研究から、ラマン分光法が乳製品製造のオンラインプロセスにおける品質保証に有効で実際に活用されています。しかし、蛍光がラマン信号を隠すことのないサンプルに限定されているため、蛍光が強いヴィーガン製品の定性分析にはまだ解決されていないニーズがあります。さらに、この技術は脂肪酸、乳糖、さらにはタンパク質のオンライン定量化に効果的に利用できます。

このアプリケーションノートで示されたように、タイムゲート型ラマン技術はこの目的に対して効果的に活用できることが確認されています。