SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

統計解析ソフトウェア　eMSTAT Solution™
MALDI-TOF MS MALDI-8020/MALDI-8030

乳製品の発酵の進み具合についての解析 -多変量解析と未知サンプルの判別-

阪下七海、脇 華菜

ユーザーベネフィット

- ◆ MALDI/DPiMS™で測定したデータで、サンプル間の識別と識別に寄与するマーカーピークの抽出が簡単にできます。
- ◆ 判別モデルの作成により、未知サンプルが既知のサンプル分類群のいずれに該当するか判別できます。
- ◆ 動的グルーピングの柔軟なサンプル分類機能により、判別モデルの修正も容易です。

■はじめに

統計解析は複数種のサンプル間の違いを抽出するツールとして有用で、化成品の劣化解析 [1]や培養細胞のモニタリング [2),3)]、植物油の品質管理 [4)]など、様々な分野で活用されています。一方で、統計解析を適切に行うためには一定の知識が必要であり、導入のハードルが高いという側面があります。eMSTAT Solutionはこの問題を解決する統計解析ソフトウェアで、直感的かつ視覚的にサンプル間の違いを抽出できます。

本アプリケーションニュースでは、ヨーグルトの発酵サンプルをMALDI-TOF MSで分析したデータをeMSTAT Solutionを用いて統計解析を行いました。多変量解析によるサンプル間の識別と識別に寄与するマーカーピークの抽出から、未知サンプルの識別を行う判別モデルの作成など、多様な解析方法をご紹介します。

■サンプル準備～解析

牛乳もしくは豆乳とヨーグルト3 種（A、B、C）をそれぞれ比率9：1で混合したものを、各サンプルにつき3 セット別個に調整しました。それらを分注し、3 種類の温度（4 ℃、24 ℃、40 ℃）で一晩静置しました（図1）。この処理によるヨーグルトAの性状変化を表1 に示します。見た目だけでも発酵の進み具合を推察できますが、より客観的に考察するためにMALDIによる分析とeMSTAT Solutionによる解析を行いました。発酵サンプル1 セットにつき2 回測定してn=6の測定データを統計解析用データセットとしました（図1）。また、発酵の進み具合の比較対照として、ヨーグルト、牛乳、牛乳とヨーグルトAを測定直前に混合したものも同時に測定・解析に含めました。

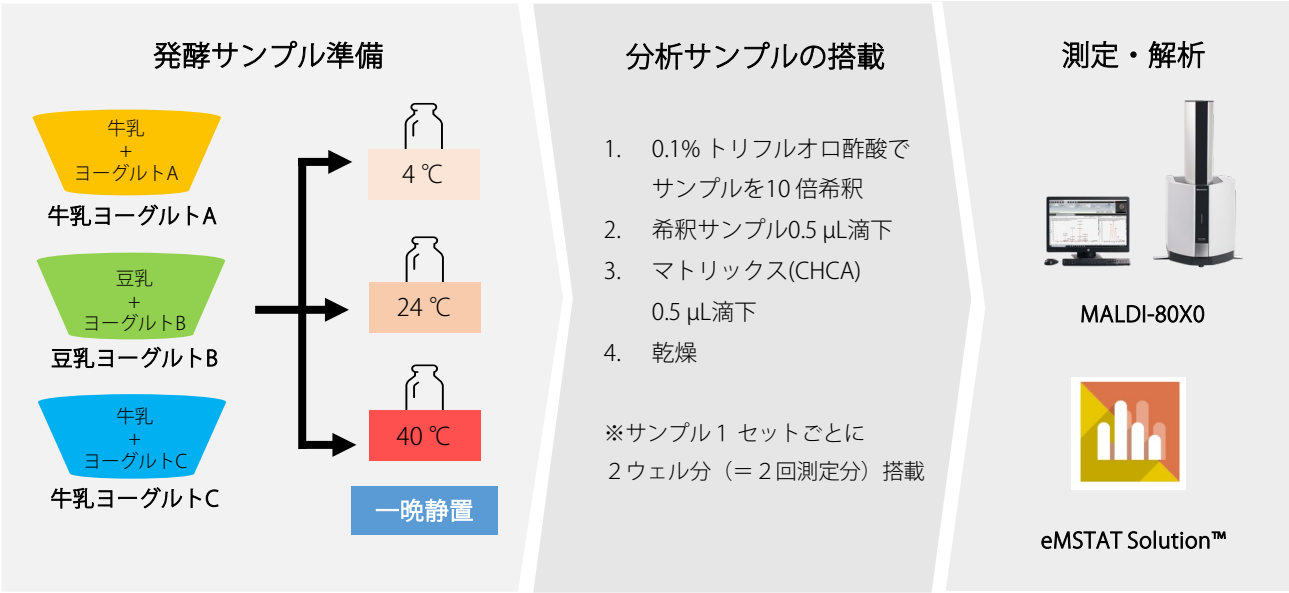

図 1　実験の概要

表 1　ヨーグルトAの性状変化

	測定直前に混合（未発酵コントロール）	湯浴あり 4 ℃	湯浴あり 24 ℃	湯浴あり 40 ℃
牛乳 + ヨーグルトA 牛乳ヨーグルトA	液状	液状	液状	半固形

■発酵の進み具合に応じた分類

牛乳ヨーグルトAについて、温度の違いによる発酵の進み具合を解析した結果が図2 です。Score Plotには各サンプルのMSスペクトルに類似の特徴があるか否かを解析した結果がプロットされています。

今回の解析結果では、右側に未発酵サンプル（牛乳や牛乳とヨーグルトを混合）、中央上部には発酵途中と考えられるサンプル（4 ℃および24 ℃で発酵）、さらに発酵が進行したサンプル（ヨーグルト単品と40 ℃で発酵）が左端にプロットされています。つまり、左にプロットされるものほど発酵が進行した状態であることを示しています。また、発酵の進み具合に基づいて明確に分類されていることもわかりました。

■発酵の進み具合に応じたマーカー抽出

図2 右側のLoading PlotはScore Plotと連動しており、各グループの分離に寄与するピークを点で示しています。例えば、Score PlotとLoading Plotの両方で左側に位置するピーク*m/z* 2358.2 を選択し、 Box Plotを確認します。すると、ヨーグルト単品と40 ℃で発酵させたサンプルで特によく検出されていることがわかりました（図3 A）。それに対し、Loading Plotの右側にある*m/z* 3988.0 は未発酵と4 ℃で発酵させたサンプルでよく検出されますが、発酵が進むにつれて減少しています（図3 B）。これらの結果から、牛乳とヨーグルトAの混合物において*m/z* 2358.2 は発酵の進行マーカー、 *m/z* 3988.0 は未発酵マーカーとして使用できることが示唆されました。

このように、Score PlotとLoading Plotから各グループの特徴を示しているピークを選定し、Box Plotにより各グループ間でのピーク強度の違いを確認することで、マーカーとして使用できるピークを簡単に抽出することができます。

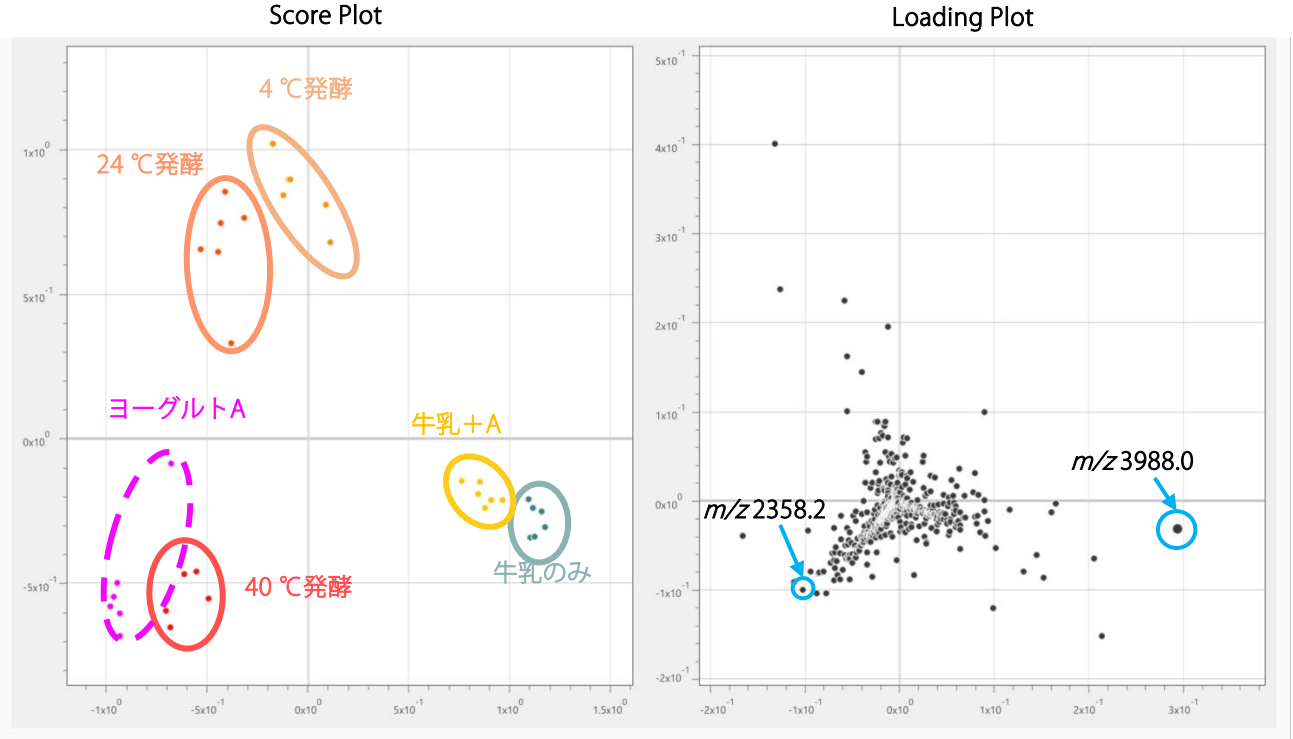

図２　牛乳ヨーグルトAについて、温度の違いによる発酵の進み具合に基づいて分類した結果

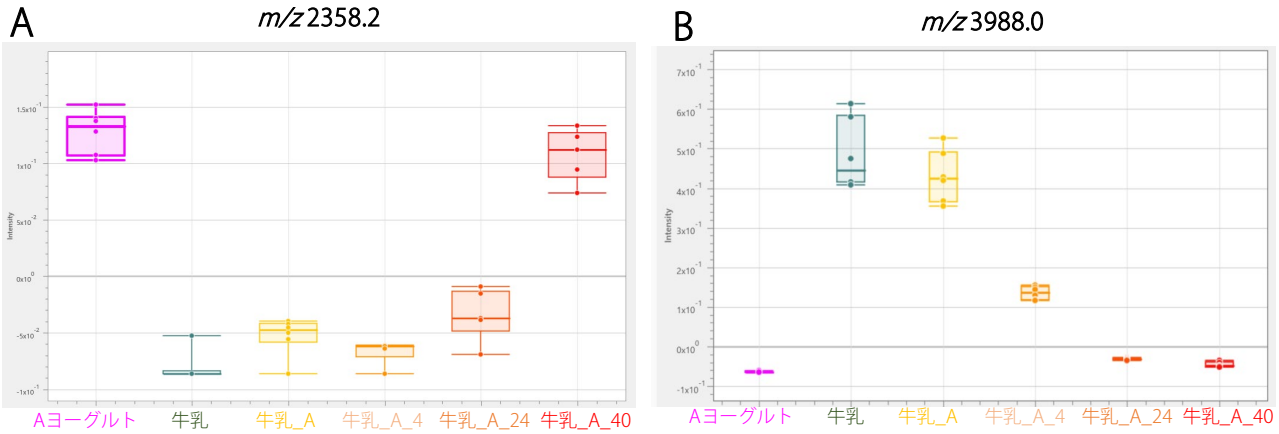

図３　各グループの分離に寄与するピーク*m/z* 2358.2 および*m/z* 3988.0 のBox Plot

■多変量解析によるヨーグルト種間の判別

牛乳ヨーグルトAとCのデータで、同様に多変量解析を行いました（図4）発酵が進むにつれてグループ間の位置が離れており、各グループの特徴に基づいて分類されたとわかります。この結果を基に、ヨーグルトの発酵の進み具合と種類による判別モデルを作成して未知サンプルの分類を行いました（図5）。図5 の白抜きの丸で示された未知サンプルはそれぞれ同色の点付近にプロットされており、発酵の進度とヨーグルトA・Cのどちらに由来するサンプルかを判別できます（表2）。未知サンプルB-Fはスコアも高く、精度よく判別できたことがわかります。一方で、未知サンプルAのみスコアが低くなっています。これは未発酵サンプルと牛乳/ヨーグルトの混合液が近い特徴を持つため、確からしさが低下したためと考えられます。

■動的グルーピング活用による判別モデル作成

次に、牛乳ヨーグルトAとCの多変量解析データに、豆乳ヨーグルトBの結果を追加・プロットしました（図6 B）。発酵の進み具合はおおまかに判断できましたが、ヨーグルトが牛乳由来か豆乳由来かの判別が難しい結果です。このような場合は、eMSTAT Solutionの動的グルーピング機能を用いることで分類を改善できます（図6 A）。この機能はこれまでの分類情報を保持したまま、別の分類を作成するものです。今回はヨーグルト種と培養温度による分類情報を保持したまま、牛乳由来と豆乳由来のグループに新しく分類しました（図6 C）。その結果、サンプルは牛乳由来と豆乳由来の2つのグループに明確に分かれており、分類が改善したことがわかります。

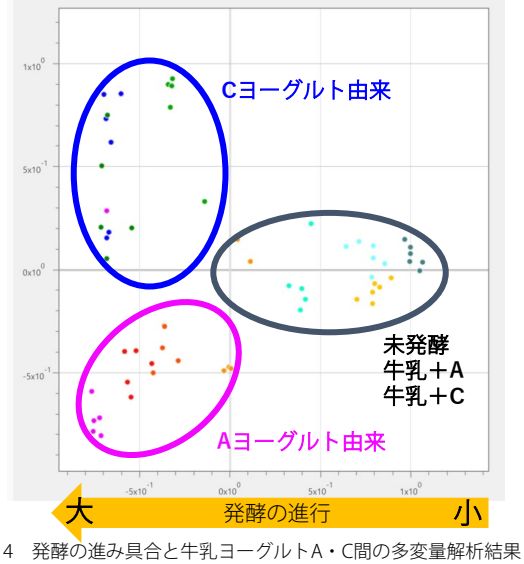

図４　発酵の進み具合と牛乳ヨーグルトA・C間の多変量解析結果
（Score Plot）

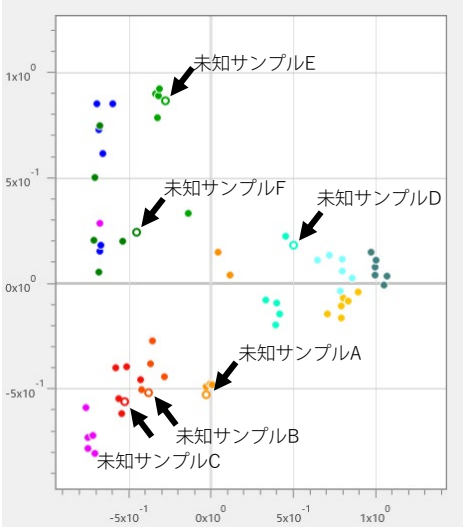

図５　図4のデータを使用した判別分析の結果
（Score Plot）

表２　未知サンプル分類結果と判別スコア

サンプル	未知サンプル A	未知サンプル B	未知サンプル C	未知サンプル D	未知サンプル E	未知サンプル F
分類されたグループ	牛乳ヨーグルトA 4 ℃発酵	牛乳ヨーグルトA 24 ℃発酵	牛乳ヨーグルトA 40 ℃発酵	牛乳ヨーグルトC 4 ℃発酵	牛乳ヨーグルトC 24 ℃発酵	牛乳ヨーグルトC 40 ℃発酵
判別スコア	50	99	99	99	99	99

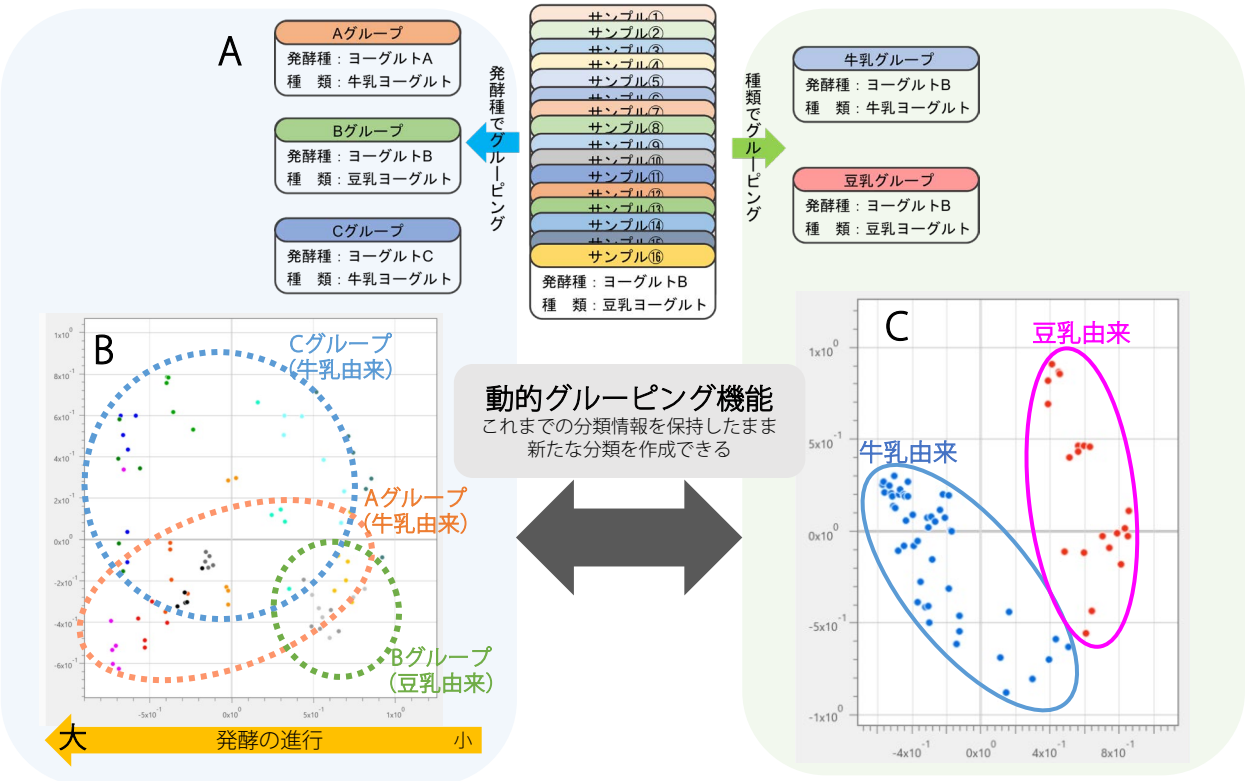

図６　動的グルーピング機能による、ヨーグルト種による分類の改善

また、動的グルーピング機能で新たに分類を行っても、今までと同様にマーカーピークをBox Plotで簡単に選定できます（図7）。動的グルーピングにより改善された分類群での判別モデルを新たに作成し、未知サンプルを判別させた場合のスコアが表3 です。高いスコアが得られており、由来の異なるヨーグルトが判別可能なモデルを作成できました。

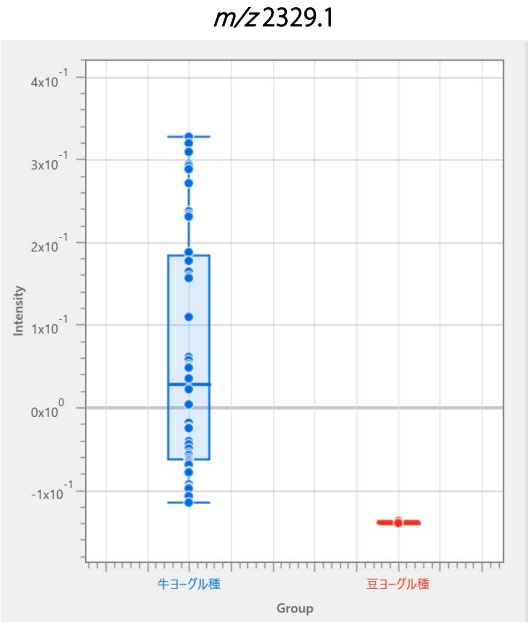

図 7　牛乳由来のヨーグルトに特徴的なマーカーのBox Plot

■まとめ

本アプリケーションでは、ヨーグルトの発酵の進み具合に加え、由来の異なるヨーグルトの判別例を示しました。今回の解析の流れを図8 に示します。簡単かつ高速に分析を行えるMALDI-8020/8030 と、eMSTAT Solutionの多変量解析と判別モデル作成機能を用いることで、様々な分野での活用が期待されます。例えば良品・不良品の特徴を抽出するだけでなく、製品の合否判定などに使用できます。このように、品質管理業務の負担を軽減するなど、応用次第で多様な使い方が可能な装置とソフトウェアです。

＜参考文献＞
1) 卓上型MALDI-TOF MSを用いたポリマーの加熱劣化解析 Application News B85
2) 卓上型MALDI-TOF MSによるがん細胞のプロファイリング Application News B97
3) 培養細胞の簡易評価 -卓上型MALDI-TOF MSを用いたiPS細胞の分化／未分化評価- Application News B98
4) MALDI-8030とeMSTAT Solutionを用いた機械学習によるトリアシルグリセロールプロファイリング Application News 12-MO-485-JP

表 3　改善された判別モデルにおける、未知サンプルの判別スコア

サンプル	未知サンプル A 4 ℃発酵	未知サンプル B 24 ℃発酵	未知サンプル C 40 ℃発酵	未知サンプル D 4 ℃発酵	未知サンプル E 24 ℃発酵	未知サンプル F 40 ℃発酵
分類結果	豆乳ヨーグルト	豆乳ヨーグルト	豆乳ヨーグルト	牛乳ヨーグルト	牛乳ヨーグルト	牛乳ヨーグルト
判別スコア	99	100	100	100	100	100

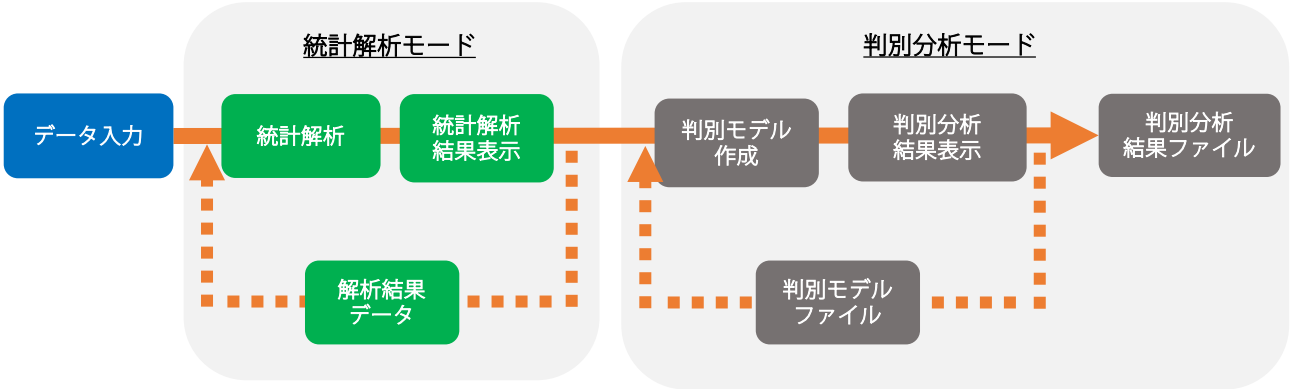

図 8　eMSTAT Solutionによる解析のワークフロー

eMSTAT SolutionおよびDPiMSは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所　分析計測事業部
https://www.an.shimadzu.co.jp/
01-00556-JP　初版発行：2023年 4月
島津コールセンター　0120-131691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

© Shimadzu Corporation, 2023

アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。

MALDI-8020
マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計

MALDI-8030
マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計

eMSTAT Solution
直接イオン化質量分析データ対応 統計解析ソフトウェア

関連分野

食品・飲料

その他

価格お問い合わせ

製品お問い合わせ

技術お問い合わせ

その他お問い合わせ