

近赤外分析法による暖地型牧草の成分および栄養価の推定

(4) ローズグラスにおける粗タンパク質含有率および乾物消化率の検量線作成

長利真幸 守川信夫 眞眞嗣平 望月智代

I 要 約

暖地型牧草の成分と栄養価を迅速に測定するために、ローズグラスの粗タンパク質含有率(CP)と乾物消化率について、近赤外分析法(NIRS)を用いて検量線の作成を行なった。試料サイズでは粉碎試料(1 mm)と未粉碎試料(200~300 mm)、検量線の作成方法については線形重回帰分析(MLR)と部分最小二乗法による回帰分析(PLS)を用いて比較検討し、推定精度の検証を行なった。

1. CPについて、MLRを用いた検量線の推定精度は粉碎試料で $r=0.994$, $SDP=0.52$, $EI=6.03\%$, 未粉碎試料で $r=0.995$, $SDP=0.44$, $EI=5.03\%$ となった。PLSを用いた検量線の推定精度は、粉碎試料で $r=0.998$, $SDP=0.30$, $EI=3.52\%$, 未粉碎試料で $r=0.997$, $SDP=0.38$, $EI=4.34\%$ となり、PLSがMLRより高い推定精度を得た。

2. 乾物消化率について、MLRを用いた検量線の推定精度は粉碎試料で $r=0.980$, $SDP=2.02$, $EI=11.81\%$ 未粉碎試料で $r=0.978$, $SDP=2.11$, $EI=12.34\%$ となった。PLSを用いた検量線の推定精度は、粉碎試料で $r=0.985$, $SDP=1.74$, $EI=10.18\%$, 未粉碎試料で $r=0.980$, $SDP=1.98$, $EI=11.58\%$ となり、PLSがMLRより高い推定精度を得た。

3. 試料サイズについては、CP、乾物消化率ともに粉碎試料を用いた検量線がより高い精度を示したが、未粉碎試料においても十分な精度を得ることができた。

II 緒 言

NIRSは非破壊的な分析法であることから、迅速かつ同時に多成分の分析が可能であること、試薬・薬品が不要であり安価であること、化学分析に比べて高度な分析技術を必要としないことなど多くの利点を持つため、早くから飼料分析に応用され実用化されている。しかし、NIRSは光学的なデータを変数とした重回帰分析等による推定であり、飼料成分は数種の化学的性質の類似した物質群であることから、NIRS推定値と化学分析値は必ずしも一致するとは限らない。また、各種成分を構成する主要物質の化学的特徴の違いにより、分析精度および適用範囲が異なる¹⁾ので、試料の種類や分析項目ごとに検量線を作成する必要がある。

現在、NIRSを利用した暖地型牧草およびサイレージの成分および栄養価について多くの研究が報告されている^{2~5)}が、沖縄で栽培されている暖地型牧草での報告は少ない。前報^{6, 7)}では、NIRSを用いて、ギニアグラスとパンゴラグラス(品種:トランスパーラ)のCPおよびペプシンセルラーゼ法による乾物消化率(*in vitro*)での検量線を作成し、高い推定精度を得た。本報では、沖縄で奨励品種に選定されている⁸⁾ローズグラス(品種:カタンボラ)を用いてCPと乾物消化率についての検量線を作成し、その推定精度を検証する。加えてサンプルの粉碎作業を省力化するために粉碎試料と、未粉碎試料について比較検討したので報告する。

III 材料および方法

1. 供試試料および調製

供試試料であるローズグラスは本試験場(国頭マージ土壤)で、圃場、生育ステージ、刈取間隔を変えて採取した100点を用い、化学分析値の成分範囲が同程度になるように検量線作成用試料60点と検定用試料40点に分けた。試料は200~300 mmに細断し、縮分したものを2つに分け72℃で48時間乾燥させた後、片方はカッティングミル(1 mmメッシュ)にて粉碎し、もう一方はそのまま未粉碎試料とした。

2. 分析方法

乾物消化率はペプシンセルラーゼ法⁹⁾、CPはケルダール法¹⁰⁾により求めた。

3. 検量線の作成

近赤外分光光度計はNIRSystem社 Model-6500型を用いて1100nm～2500nmの波長のスペクトルを測定し、得られた原スペクトルについては2次微分処理(微分条件:GAPO, Segment20)を行なった。粉碎試料は標準セルを用いた反射法による2回の反復測定、未粉碎試料は長方形型セルを用いた反射法による3回の反復測定^{11, 12)}を行なった。検量線作成についてはNSASソフトウェアを用い、MLRとPLSの2種類の方法で行なった。

MLRは成分由来の官能基が持つ吸収波長を説明変数として用いる重回帰分析である。波長については、尖突なピークは避け、波長の変化に対して安定した幅の広い吸収帯を選択¹³⁾した。また、補正のための波長を追加していき、第1波長から第4波長までの組み合わせにて、検量線の候補を作成した。

PLSは多変量解析法である主成分分析法を応用した方法で、全波長域における少数の無相関な主成分(因子)を説明変数として用いる解析法である。因子の選択についてはNSASソフトウェアを用いた。

4. 検量線の検定

作成した検量線は検定用試料40点により推定精度の検証を行ない、最適な検量線を決定した。推定精度の検証は、検定試料を未知飼料とした検量線の推定値と化学分析値の相関係数(r)、推定誤差の標準偏差(SDP)、および推定精度の評価指数であるEI¹⁴⁾を用いて比較した。

IV 結果および考察

供試試料の成分範囲を表1に示した。一般に、検量線の検定においては、検量線を作成した試料と同様な種類・レンジを持った試料群を用いることが最良とされている。今回の供試試料では、CPでの検量線作成用および検定用試料の成分レンジについては18.20%、17.29%と幅広いものであり、乾物消化率での成分レンジについても同様に35.71%、34.20%と幅広いレンジが得られ、供試試料としての条件を満たしていたと考えられる。

表1 供試試料の成分範囲(%DM)

分析項目	検量線作成用試料						検定用試料					
	n	最小値	最大値	レンジ	平均	SD	n	最小値	最大値	レンジ	平均	SD
CP	60	5.71	23.91	18.20	12.48	4.51	40	5.97	23.26	17.29	11.74	4.47
IVDMD	60	39.44	75.15	35.71	55.91	10.16	40	39.75	73.95	34.20	54.31	10.04

注1) CP:粗タンパク質含有率

2) IVDMD:乾物消化率(*in vitro*)

3) レンジ:最大値-最小値

MLRおよびPLSによる検量線作成結果を表2に示した。MLRによる検量線ではCPで各4波長、乾物消化率では粉碎試料で3波長、未粉碎試料で4波長を選択したものが最良の検量線となった。CPについては粉碎試料・未粉碎試料ともに2160nmを第1波長に選択しており、これらはタンパク質の代表的な吸収がある^{15, 16)}とされている波長付近であった。乾物消化率については粉碎試料で2259nm、未粉碎試料で2360nmを第1波長に選択しており、これらはリグニンの吸収があるとされる^{16, 17)}波長付近であった。リグニンは粗繊維の主たる構成物質で、植物の生長が進むとともに増大し、消化率とは負の相関を示すとされていること¹⁸⁾から乾物消化率と密接に関係があると思われる。

PLSによる検量線においては、CP・粉碎試料で因子数9、未粉碎試料で7、乾物消化率では粉碎試料・未粉碎試料ともに因子数8を選択した検量線が最良であった。

表2 MLRおよびPLSによる検量線の作成結果

項目	試料サイズ	MLR法					PLS法			
		使用波長 (nm)				r	SEC	因子数	r	SEC
1	2	3	4							
CP	粉碎	2160	1982	1966	2318	0.997	0.37	9	0.999	0.23
CP	未粉碎	2160	2266	1694	2006	0.993	0.54	7	0.997	0.38
IVDMD	粉碎	2259	1894	1492		0.981	2.04	8	0.992	1.41
IVDMD	未粉碎	2260	2372	1890	2342	0.987	1.71	8	0.991	1.45

注1) MLR: 線形重回帰分析

2) PLS: 部分最小二乗法による回帰分析

3) r: 検量線作成における相関係数

4) SEC: 検量線における標準誤差

MLRおよびPLSにより作成した検量線の推定精度を表3に示した。MLRを用いたCPでの検量線の推定精度は、粉碎試料で $r=0.994$, $SDP=0.52$, 未粉碎試料で $r=0.995$, $SDP=0.44$, 乾物消化率では、粉碎試料で $r=0.980$, $SDP=2.02$, 未粉碎試料で $r=0.978$, $SDP=2.11$ となった。

MLRにおいては推定する目的成分の吸収波長とされる波長を選択することが重要であり、CPについてはこれに準じる結果で、高い推定精度を得た。乾物消化率のように多くの物質が関与したものでは、検量線に用いる波長の特定は難しいとされているが、今回の検量線作成では、リグニンを中心とした繊維成分の波長を選択する事によって十分な推定精度を得ることができた。これらCPおよび乾物消化率における波長の選択や推定精度については、前報^{6, 7)}にて報告したギニアグラス、トランスパーラでの検量線と同様の傾向を示した。

PLSを用いたCPでの検量線の推定精度は、粉碎試料で $r=0.998$, $SDP=0.30$, 未粉碎試料で $r=0.997$, $SDP=0.38$, 乾物消化率では粉碎試料で $r=0.985$, $SDP=1.74$, 未粉碎試料で $r=0.980$, $SDP=1.98$ となった。MLRに比べPLSでは解析に用いる情報量を飛躍的に増やすことができ、物質由来の吸収とノイズを分離し易く、オーバーフィッティングが避けられる¹⁹⁾等の利点が挙げられている。そのため、牧草の栄養成分項目に関係なくPLSを用いた検量線の報告は多数あり^{20~22)}, 比較的精度の高い検量線が作成できるとされている。

MLRとPLSを推定精度で比較すると、試料サイズ(粉碎・未粉碎)や測定項目(CP・乾物消化率)において、PLSで作成した検量線が SDP , r ともに優れた結果となった。PLSにおいて作成した検量線におけるNIR値と化学分析値との関係を図1に示した。図1のようにCP, 乾物消化率について、NIRS推定値と化学分析値との間に高い相関が確認できた。

表3 検定試料におけるMLRおよびPLSによる検量線の推定精度

項目	試料サイズ	MLR				PLS			
		r	SDP	EI	評価	r	SDP	EI	評価
CP	粉碎	0.994	0.52	6.03	A	0.998	0.30	3.52	A
CP	未粉碎	0.995	0.44	5.03	A	0.997	0.38	4.34	A
IVDMD	粉碎	0.980	2.02	11.81	A	0.985	1.74	10.18	A
IVDMD	未粉碎	0.978	2.11	12.34	A	0.980	1.98	11.58	A

注1) MLR: 線形重回帰分析

2) PLS: 部分最小二乗法による回帰分析

3) r: 検量線検定における相関係数

4) SDP: 検量線の検定における標準誤差

5) $EI=2 \times SDP / \text{レンジ} \times 100$ (%)

A=very good (~12.4) B=good (12.5~24.9) C=fair (25.0~37.4) D=poor (37.5~49.9)

E=very poor (50.0~)

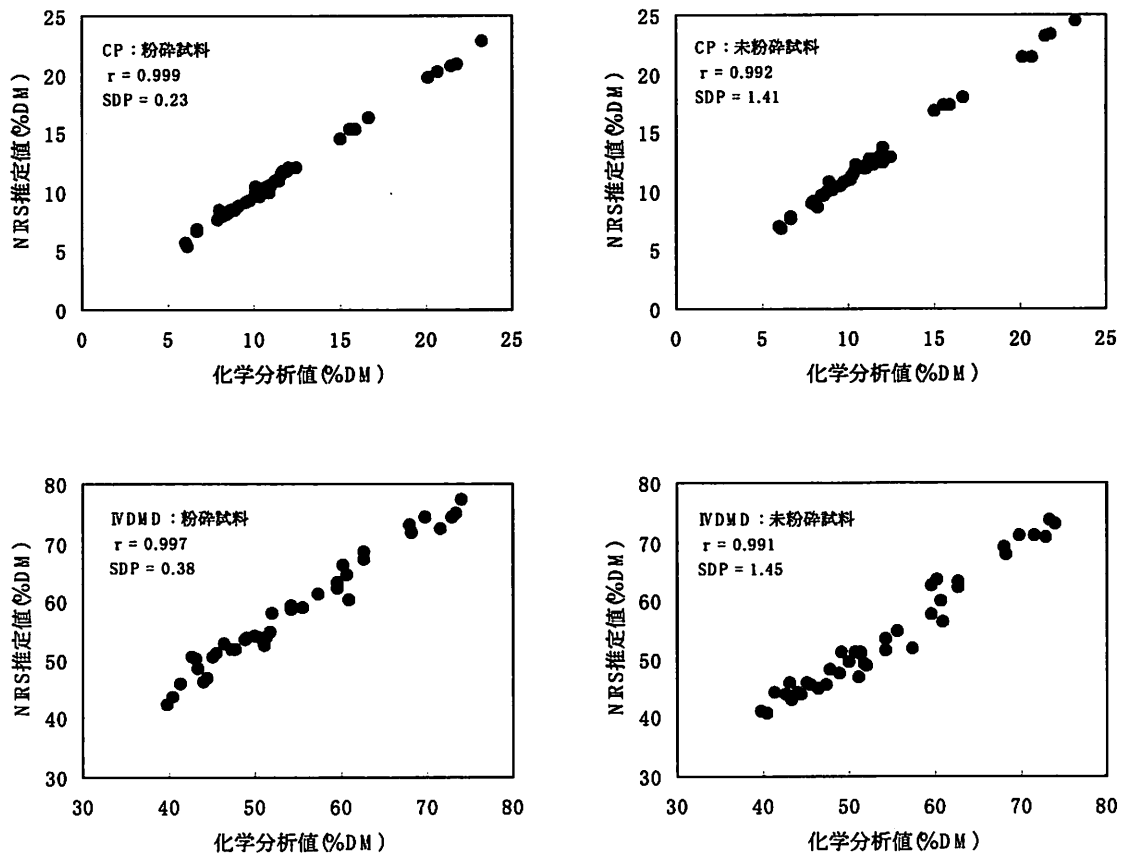


図1 PLSにより作成した検量線の検定用試料におけるNIRS値と化学分析値との関係

推定精度の評価指数であるEIにおいて、粉碎試料によるCPの検量線ではMLRで6.03%, PLSでは3.52%, 未粉碎試料においてもMLRで5.03%, PLSで4.34%と、すべてにおいてA評価となった。粉碎試料による乾物消化率については、MLRで11.81%, PLSでは10.18%, 未粉碎試料においてもMLRで12.34%, PLSで11.58%と、すべてにおいてA評価であった。以上のことから今回作成した検量線では、粉碎試料についてはCP、乾物消化率ともに高い推定精度が得られ、未粉碎試料についても粉碎試料よりは若干劣るが、十分な推定精度が得られることが分かり、試料のサイズに応じた検量線を作成することによって粉碎作業の省力化が可能になると考えられた。

V 引用文献

- 1) 自給飼料品質評価研究会(2001)改訂粗飼料品質評価ガイドブック, 日本草地畜産種子協会, 53-54
- 2) 水野和彦・石栗敏機・近藤恒夫・加藤忠司(1988)近赤外線反射率測定法による乾草の成分および栄養価の推定Ⅱ. 推定精度に及ぼす草種構成の影響および推定に有効な波長の検討, 草地試験場研究報告, 38, 48-54
- 3) 水野和彦・石栗敏機・近藤恒夫・加藤忠司(1988)近赤外線反射率測定法による乾草の成分および栄養価の推定Ⅲ. 栄養価の推定方法としての近赤外線反射率測定法と化学分析法の比較—オーチャードグラスについて—, 草地試験場研究報告, 38, 56-60
- 4) 垣内一明・脇大作・町田豊・千葉昭弘(2000)飼料作物の品質評価法の確立 第1報. 近赤外分析における一般成分, 繊維成分の検量線作成, 鹿児島県畜産試験場研究報告, 33, 52-54
- 5) Michael O' Keefe・Gerard Downey and James C Brogan(1987)The Use of Near Infrared Reflectance Spectroscopy for Predicting the Quality of Grass Silage, *J. Sci. Food. Agric.*, 38, 209-216

- 6) 長利真幸・守川信夫・當眞嗣平・望月智代(2003)近赤外分析法による暖地型牧草の成分および栄養価の推定(1)ギニアグラスにおける粗タンパク質含有率および乾物消化率の検量線作成, 沖縄畜試研報, 41, 113-117
- 7) 長利真幸・守川信夫・當眞嗣平・望月智代(2003)近赤外分析法による暖地型牧草の成分および栄養価の推定(2)パンゴラグラスにおける粗タンパク質含有率および乾物消化率の検量線作成, 沖縄畜試研報, 41, 118-122
- 8) 沖縄県農林水産部畜産課(1998)沖縄県牧草飼料作物奨励品種の特性及び栽培基準, 1
- 9) Goto, I. and D. J. Minson(1977) Prediction of the dry matter digestibility of tropical grasses using a pepsin-cellulase assay, *Animal Feed Science and Technology*, 2, 247-253
- 10) 自給飼料品質評価研究会(2001)改訂粗飼料品質評価ガイドブック, 日本草地畜産種子協会, 8-9,
- 11) 自給飼料品質評価研究会(2001)改訂粗飼料品質評価ガイドブック, 日本草地畜産種子協会, 68-69
- 12) 水野和彦・榊原敏之・杉田紳一・中山貞夫(1998)近赤外線反射測定法(NIRS)によるオーチャードグラス未粉碎試料の化学分析および分解率の簡易推定法, 日本草地学会誌, 44(別), 266-267
- 13) 甘利雅弘・阿部亮・田野良衛・榎木茂彦・芹沢駿治・古賀照章(1987)近赤外分析法による粗飼料の成分分析と栄養価の推定法 I. キャリブレーションの精度と未知飼料の推定精度, 日本草地学会誌, 33(3), 219-226
- 14) 水野和彦・石栗敏機・近藤恒夫・加藤忠司(1988)近赤外線反射率測定法による乾草の成分および栄養価の推定 I. 成分および栄養価の推定精度とその評価, 草地試験場研究報告, 38, 35-46
- 15) ニレコー-NIRS システムズ(1994)近赤外分光分析法技術資料Ⅲ, 18-19
- 16) 自給飼料品質評価研究会(2001)改訂粗飼料品質評価ガイドブック, 日本草地畜産種子協会, 61
- 17) 甘利雅弘・阿部亮・河野澄夫・趙爽光(1991)近赤外スペクトルにおける粗飼料中の繊維性成分の吸収特性, 畜産試験場研究報告, 51, 17-27
- 18) 阿部亮(1988)炭水化物成分を中心とした飼料分析法とその飼料栄養価評価法への応用 3)酸性デタージェント繊維とリグニン定量, 畜産試験場研究資料第2号, 23-29
- 19) 自給飼料品質評価研究会(2001)改訂粗飼料品質評価ガイドブック, 日本草地畜産種子協会, 54
- 20) 垣内一明・脇大作・町田豊・千葉明宏(2000)飼料作物の品質評価法の確立 第2報. 近赤外分析におけるローズグラス中の硝酸態窒素の検量線作成, 鹿児島県畜産試験場研究報告, 33, 55-57
- 21) 梅田剛利・小山太・高椋久次郎(2001)近赤外分光法による肉牛ふん堆肥の無機塩類含量の推定, 福岡県農業総合試験場研究報告, 20, 105-108
- 22) 金谷千津子・丸山富美子・清水雅代・赤江静雄・斉藤堅伸・石崎和彦・土屋いずみ・清水政浩・平尾賢一(1999)近赤外分析法による粗飼料の中性デタージェント繊維(NDF)の推定精度, 富山県畜産試験場研究報告, 14, 29-31

研究補助：竹内千夏，平良樹史，具志堅興司