

近赤外分光法によるイタリアンライグラスサイレージの有機酸含量の測定

梅田剛利・藤吉弘子・棟加登きみ子
(畜産研究所)

イタリアンライグラスサイレージの有機酸含量を簡易迅速に測定するため、乳酸、酢酸+プロピオン酸 (C2+C3)、酪酸以上 (C4<) の揮発性脂肪酸 (VFA)、を対象とした近赤外分光法による測定を試みた。県内イタリアンライグラスサイレージ 134 点を用いて検量線の作成と検定を行った。乳酸、酢酸+プロピオン酸、および酪酸以上の VFA は、検定における測定値と化学分析値の間の相関係数が 0.824~0.948 で、EI 値 (2×検定による測定値と差の標準誤差/(最大値-最小値)) は 22.0%~31.1% であった。これらの結果から、近赤外分光法によるイタリアンライグラスサイレージの有機酸含量の測定は、可能であると考えられた。

[キーワード：近赤外分析、イタリアンライグラスサイレージ、有機酸]

Prediction of Italian Ryegrass Silage Organic Acid Content with Near Infrared Reflectance Spectroscopy.

UMEDA Taketoshi, Hiroko FUJIYOSHI and Kimiko MUNEKADO (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 18:147-151(1999)

Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) was used to analyze lactic acid, acetic acid + propionic acid and VFA higher than C₄ (butyric acid), of Italian ryegrass silages (n=134). The accuracy of the Analysis was evaluated based on correlation coefficients (r) and evaluation index (EI=2×SDP/range×100(%)). The 'r' and EI of lactic acid, acetic acid + propionic acid and VFA higher than C₄ were 0.824-0.948 and 22.0%-31.1%, respectively.

These results indicated that lactic acid, acetic acid + propionic acid and VFA higher than C₄ of Italian ryegrass silages could be analyzed by using NIRS techniques.

[key words : Near infrared reflectance spectroscopy, Italian ryegrass silage, Organic acid]

緒 言

サイレージの発酵品質の良否は、外観から判断する官能評価と、乳酸、酢酸、酪酸等の生成された有機酸含量によるフリーク評点等によって判定されている⁴⁾。生産現場での実際の給与に際しては、栄養成分に関する情報と発酵品質に関する情報により給与量を設定することになるが、後者は家畜への給与が生理障害につながらないように給与設計するための重要な情報となる。しかし、サイレージ中の有機酸含量を化学分析によって求めるには時間を要するため、現段階では十分に要望に対処できていない。

近赤外分析計を用いた近赤外分光法による飼料成分の測定は、短時間で測定ができる分析方法であり、すでに実用化されている⁵⁾。この手法を用いたサイレージの有機酸含量の測定が可能であれば、生産現場での要望にも対応できるものと考えられる。有機酸含量を近赤外分光法で測定した報告は、蒲川・水野の稲ホルクロップサイレージ⁶⁾、大竹・田中のウメ果汁中⁷⁾、があるのみである。稲ホルクロップサイレージとは成分組成が大きく異なるイタリアンライグラスサイレージについて検討した報告はない。そこでイタリアンライグラスサイレージの乳酸、酢酸+プロピオン酸、酪酸以上の揮発性脂肪酸を対象とした近赤外分光法による測定を試みたので報告する。

試験方法

1 供試材料

供試材料は、福岡県内の農家から、1995、1996、1997年に収集したイタリアンライグラスサイレージ 134 点を用いた。供試材料は直ちに抽出液の調製を行った。

2 サイレージの前処理及び化学分析方法

(1) サイレージ抽出液の調製

サイレージサンプルを 10mm 程度に細切し 70g (低水分サイレージについては乾物で 15g 程度になる現物量) を広口プラスチックのサンプル瓶に採取後、水 140 ml ~ 200 ml を入れ、冷蔵庫内で時々ふりまぜながら 16 時間から 24 時間浸漬した³⁾。保冷後、葉さじなどでよく圧搾し二重ガーゼでよくしぼり、3,000rpm で 10 分程度遠心分離した後、上澄み液を濾紙 No.5A で濾過して抽出液とした。

(2) 有機酸の定量

サイレージ抽出液中の有機酸である乳酸、酢酸 (C2)、プロピオン酸 (C3)、イソ酪酸 (iC4)、酪酸 (C4)、イソ吉草酸 (iC5)、吉草酸 (C5) の定量は、大桃ら⁸⁾ の高速液体クロマトグラフィによるポストラベル法の変法で行った。なお、大桃ら⁸⁾ が前処理で使用したイオン交換樹脂は用いなかった。

3 近赤外分光法によるサイレージ抽出液中の有機酸の測定

(1) 分析項目

分析項目は、乳酸、酢酸+プロピオン酸 (C2+C3) 含量、酪酸以上 (C4<) のVFA (揮発性脂肪酸) の3項目である。酪酸以上 (C4<) のVFAとは炭素数が酪酸の4ヶ以上であるイソ酪酸 (iC4)、酪酸 (C4)、イソ吉草酸 (iC5) および吉草酸 (C5) である。

(2) 検量線の作成および検定

サイレージ抽出液のスペクトルは、近赤外分析計6500型 NIRSystems社を用い、光路長4mmのセルを用いて透過法により2nmごとの減光度を測定した。測定範囲は、可視光から近赤外までの400nm~2,500nmにおける波長域である。

近赤外スペクトルはNIRSソフトウェアで解析し、検量線の作成を行った。すなわち、近赤外スペクトルを2次微分処理 (微分条件: Segment 20, Gap 0) した光学データを測定成分毎に、目的とする成分のレンジ (最大値-最小値) や平均値が同等になるように、全サンプルを検量線作成用サンプルと検定用サンプルに分け、検量線作成用サンプルを用いて行った。検量線の作成は化学分析値と近赤外スペクトルとの関係を示す校正式の説明変数となる波長を1つずつ増加させる変数増加法 (MLR: 線

形重回帰分析)²⁾により、1波長、2波長、3波長、4波長を用いる方法で行った。

次に、検量線の精度検定は、検量線作成に使用していないサンプルによる検定用サンプルを用いて行った。

4 吸収波長の帰属性の検討

吸収波長の帰属性は、サイレージ抽出液5点と、乳酸、酢酸 (C2)、プロピオン酸 (C3)、酪酸 (C4) の1%標準液、計4点の近赤外スペクトルをそれぞれ取り、2次微分処理したスペクトルで検討した。

結 果

1 イタリアンライグラスの水分含量と有機酸含量

イタリアンライグラスの水分含量の範囲は22.0~81.7%と低水分から高水分までのレンジが広く、平均で53.5%であった (第1表)。

高速液体クロマトグラフィで定量した有機酸のうち、乳酸、酢酸+プロピオン酸 (C2+C3) ではほとんどのサイレージで検出されたが、酪酸以上のVFA (C4<) では、

第1表 イタリアンライグラスサイレージの水分および有機酸含量

	水分	乳酸	C2+C3	C4以上
	μg/ml			
全サンプル	134	134	134	134
ND	-	2	1	60
n	134	132	133	74
平均	53.5	2341	733	744
最大値	81.7	13828	5384	4993
最小値	22.0	15	3	23
レンジ	59.7	13828	5381	4970
平均(全サンプル)	53.5	2306	728	359

1) 高速液体クロマトグラフィで検出されなかったサンプル数
2) 平均: 上段-検出されたサンプルのみ、下段-全サンプル

第3表 検量線の検定結果

成分名	検 定		
	r ²	SDP ²⁾	FI値 ³⁾ %
乳 酸	0.403	1880	43.9
	0.862	1040	24.3
	0.886	945	22.0
	0.873	1000	23.3
酢酸+プロピオン酸	0.653	505	35.2
	0.674	504	35.1
	0.736	447	31.1
	0.617	522	36.4
酪酸以上のVFA	-0.864	429	34.2
	-0.856	407	32.4
	-0.936	309	24.6
	-0.913	336	26.8

1) 相関係数: 検定における測定値と化学分析値との相関係数
2) 予測標準誤差: 検定における測定値と化学分析値の差の標準誤差
3) 2×SDP/レンジ×100

第2表 有機酸の近赤外分光法による検量線

成分名	検 量 線				r ²	SEC ²⁾
	1	使 用 波 長 nm		4		
乳 酸	1706				0.597	1820
	1706	1640			0.850	1200
	1706	1640	1770		0.899	1000
	1706	1640	1770	1674	0.928	861
酢酸+プロピオン酸	686				-0.718	545
	686	1714			0.787	488
	686	1714	1818		0.824	453
	686	1714	1818	2310	0.892	366
酪酸以上のVFA	1700				-0.781	372
	1700	1296			0.857	313
	1700	1296	1632		0.949	196
	1700	1296	1632	1262	0.958	182

1) 相関係数: 検量線による測定値と化学分析値との相関係数
2) 検量線標準誤差: 検量線による測定値と化学分析値の差の標準誤差

検出されない (ND) サンプルが60点あった (第1表)。

2 有機酸の検量線

1) 検量線の使用波長

検量線作成に使用した波長のうち、乳酸の第1波長が1,706nm、第2波長が1,640nm、第4波長が1,674nmで、酢酸+プロピオン酸の第2波長が1,714nmであり、酪酸以上のVFAの第1波長が1,700nm、第3波長が1,632nmであった (第2表)。

2) 検量線の精度

サイレーズ抽出液の近赤外スペクトルと有機酸含量とを関連づける検量線の測定精度を第2表に示した。選択した波長が多いほど検量線の精度は向上し、4波長使用した検量線の相関係数はそれぞれ0.892~0.958であった。

3) 検量線の検定

乳酸、酢酸+プロピオン酸 (C2 + C3)、酪酸以上 (C4 <) のVFAの検量線の検定結果を第3表に示した。相関係数が高く、SEP、EI値の低い検量線は、それぞれ3波長使用した検量線であり、最も精度が良かった。乳酸と酪酸以上 (C4 <) のVFAの相関係数は0.886と-0.936、EI値は22.0%と24.6%であり、酢酸+プロピオン酸 (C2 + C3) の相関係数が0.736でEI値が31.1%と、乳酸と酪酸以上 (C4 <) のVFAの検量線が、酢酸+プロピオン酸 (C2 + C3) の検量線に比べ精度が良かった。

3 吸収波長の帰属性の検討

サイレーズ抽出液5点と、乳酸、酢酸 (C2)、プロピオン酸 (C3)、酪酸 (C4) の1%標準液の2次微分スペクトルは第1図と第2図に示した。スペクトルを示したサイレーズ抽出液の有機酸含量は第4表のとおりである。

第4表 2次微分スペクトルを示したサイレーズサンプルの有機酸含量

サンプル	乳 酸	C2+C3	C4以上
	μg/mL		
1	5118	1207	303
2	844	231	486
3	2827	173	0
4	2851	644	2562
5	8340	1754	0

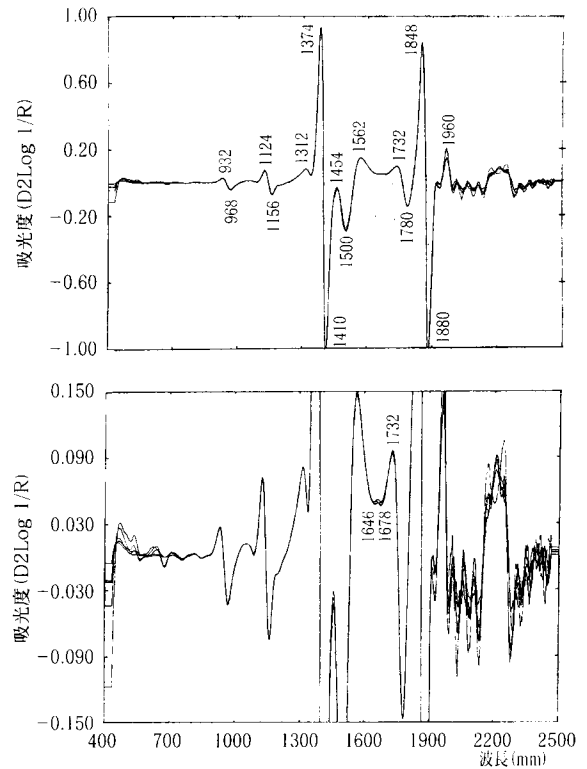
第5表 全サンプルの有機酸成分間の相関関係

	乳 酸	C2+C3	C4以上
乳 酸	1.000		
C2+C3	0.418	1.000	
C4以上	0.103	0.113	1.000

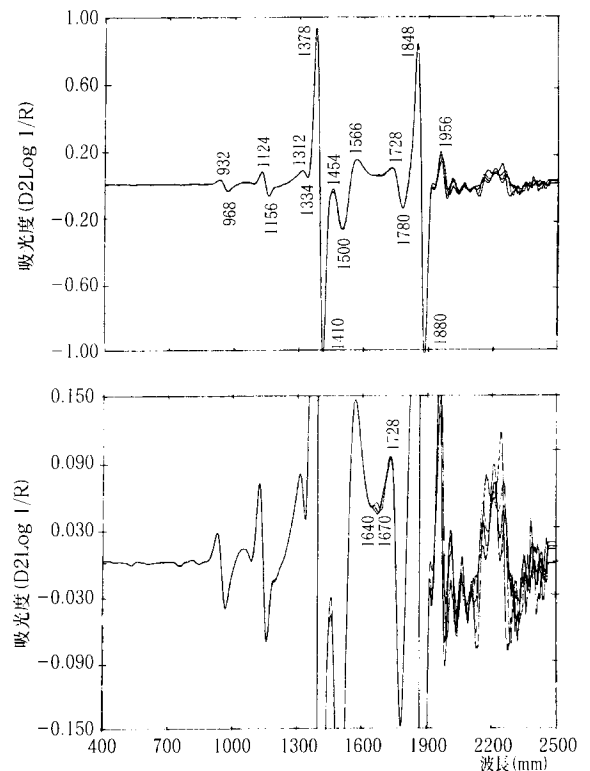
第6表 酪酸が検出されたサンプルの有機酸成分間の相関関係

	乳 酸	C2+C3	C4以上
乳 酸	1.000		
C2+C3	0.259	1.000	
C4以上	0.150	0.347	1.000

1)酪酸が検出された68点



第1図 サイレーズ抽出液の2次微分スペクトル
—下図は上図の拡大図—



第2図 乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸溶液の2次微分スペクトル
—下図は上図の拡大図—

サイレージ抽出液および有機酸の標準溶液の2次微分スペクトルは1,400nm付近と1,900nm付近が大きな吸収特性を示した。これは水の吸収波長であることが知られている⁴⁾。サイレージの抽出液では、水以外の波長で、932nm, 968nm, 1,124nm, 1,156nm, 1,312nm, 1,454nm, 1,500nm, 1,562nm, 1,732nm, 1,780nm, 1,960nmに吸収特性を示した(第1図上図)。これは、有機酸の標準液でも同様に認められた(第2図上図)。また、サイレージ抽出液では1,646nmから1,732nm付近で各サンプル間でスペクトルの差異が認められ(第1図下図)、各有機酸の標準液間で同様に1,640nmから1,728nm付近でスペクトルに差異が認められた(第2図下図)。

4 有機酸含量間の相関関係

各有機酸成分間の相関関係を第5表に示した。乳酸、酢酸+プロピオン酸(C2+C3)、酪酸以上(C4<)のVFA含量間の相関係数は0.418以下と低かった。酪酸が検出された比較的品质の低いサイレージを用いて同様に相関関係を求め、第6表に示した。この結果も同様、各有機酸成分間の相関係数は0.347以下と低かった。

考 察

1 検量線の精度

検定の結果が最も良かった検量線のEI値は、22.0%~31.1%であった(第3表)。EI値はSDPの2倍量を幅で割って100を乗じた値であり、パーセントで表される。SDPは検定を行ったとき、近赤外測定値の基準値(この場合化学分析値)に対する標準誤差であるので、この誤差が正規分布すると仮定すると、誤差は基準値に対して±2倍以内に約95%が収まることになる。言い換えれば最大でSDPの2倍程度の誤差は生じ得る⁴⁾。この評価方法で乳酸の検量線の精度を検討すると、乳酸の検量線のEI値が22.0%であるので±22%の範囲に約95%が含まれるような測定精度となる。今回検討した有機酸は発酵品質評価を目的とするものであるため、この推定精度で、実用性はあると判断した。

浦川ら⁹⁾は稲ホールクロップサイレージを用いて有機酸の検討を行っている。酢酸+プロピオン酸(C2+C3)、酪酸のEI値は21.6%と35.0で、実用性が認められることを報告しており、今回検討した有機酸の精度がほぼ同程度であったことから、実用性はあると考えられる。

2 使用波長の帰属

検量線に使用した波長のうち、乳酸では1,706nm, 1,640nm, 1,674nmが、酢酸+プロピオン酸では1,714nmが、酪酸以上のVFAでは1,700nm, 1,632nmと1,632nm~1,714nmの波長が選択されている(第3表)。サイレージ抽出液の2次微分処理スペクトルでは1,646nm~1,732nm付近で特異的なスペクトルの差異が認められ(第1図下図)、各有機酸の標準液の2次微分スペクトルでも1,640nm~1,728nm付近で同様に差異が認められた(第2図下図)。このことから、この波長付

近にそれぞれの有機酸含量に関する情報があり、それぞれの有機酸含量を個別に特徴付ける波長域であったため、上述した選択波長が、検量線の使用波長として選択されたと考えられる。

酢酸+プロピオン酸(C2+C3)の検量線では、第1波長に686nmを選択している。酢酸およびプロピオン酸標準液の2次微分スペクトルでは特異的な吸収波長は686nm付近には認められなかったが、サイレージ抽出液の2次微分スペクトルでは686nm付近にスペクトルの差異が認められることから、酢酸+プロピオン酸(C2+C3)の情報が686nm付近にあることが推測される。ただし、700nmより波長の短いところは可視光域で近赤外域ではない^{1,3)}ため、サイレージ抽出液の色によるスペクトルの差異と干渉する可能性が考えられることから、酢酸+プロピオン酸(C2+C3)の検量線の精度が、乳酸および酪酸以上のVFAの検量線に比べやや低くなった要因と考えられた。

さらに、各有機酸含量の間に相関があるか否かを検討した。第5表に全試料134点の各成分間の相関係数を、第6表に酪酸が検出された試料63点の各成分間の相関係数を示した。各有機酸含量の間に高い相関関係が認められなかったことから、内部相関による間接的な測定ではなかった。すなわち、ある有機酸含量と関係の深い波長を選択して、他の有機酸を間接的に測定した検量線ではないことが確認された。

以上のことから、EI値から見た有機酸の測定精度は、サイレージの品質評価を目的とした場合有効であり、これらの成分の測定に用いた波長は、それぞれの成分に関与する波長域を選択した結果と推察され、EI値との結果と併せて、近赤外分光法による有機酸の測定は可能であると考えられた。

今後、サイレージの発酵品質評価に必要なpH、全窒素等の近赤外分光法による測定技術を確認し、実用化に向けて対応を進める。

謝 辞

本試験の成果は、農林水産省畜産試験場家畜栄養部飼料鑑定研究室への内地留学研修中に得られたものを、更に発展させたもので、御指導、御協力をいただいた皆様、並びに業務科員の皆様方に深謝します。

引用文献

- 1) 甘利雅弘(1993)飼料分析—近赤外分析法を中心に—。ぶんせき, No.2(1993)。日本分析化学会、東京:p112-116。
- 2) 岩元睦夫・河野澄夫・魚住 純(1994)近赤外分光法入門。幸書房:p75-92。
- 3) 自給飼料品詞評価研究会編(1994)粗飼料の品質評価ガイドブック。日本草地協会、東京:p79-94。
- 4) 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

- 地試研報 **38**:35 - 48.
- 5) 農林水産省農林水産技術会議事務局編(1995)日本標準飼料成分表(1995年版). 中央畜産会:p10.
- 6) 大桃定洋・田中 治・北本宏子(1993)高速液体クロマトグラフィによるサイレージ中の有機酸の定量. 草地試研報 **48**:51 - 56.
- 7) 大竹良知・田中喜久(1994)近赤外分光法によるウメ果汁中の個別有機酸含量の測定. 愛知農総試研報 **26**:293 - 297.
- 8) 浦川修司・水野隆夫(1994)稲ホールクroppサイレージの品質評価. 三重県農業技術センター研報 **22**:45 - 55.