

# 近红外光谱技术测定紫花苜蓿青贮鲜样的发酵品质

陈鹏飞<sup>1, 2</sup>, 戎郁萍<sup>1\*</sup>, 韩建国<sup>1</sup>

1 中国农业大学动物科技学院, 北京 100193

2 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100193

**摘要** 及时了解青贮饲草的发酵品质, 如青贮饲草中氨态氮( $\text{NH}_3\text{-N}$ ), 乳酸(LA), 乙酸(AA), 丁酸(BA)含量, 对畜牧业生产具有重要意义。应用偏最小二乘回归法(PLS)、傅里叶变换近红外光谱技术和液氮冷冻制样技术, 建立了适合不同品种, 不同生育期, 不同茬次和不同青贮方法即时测定青贮苜蓿鲜样中氨态氮, 乳酸, 乙酸, 丁酸的近红外校正模型, 以期对NIRS在测定紫花苜蓿青贮样品中这些物质的可行性进行分析。所建模型的交叉检验决定系数( $R^2_{cv}$ )为0.6024~0.9497, 交叉检验标准误(RMSECV)为0.559~3.78  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 鲜重。用检验集样品对模型进行外部检验, 预测相关系数( $r$ )为0.8826~0.9853, 预测标准误为0.571~3.15  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 鲜重。结果表明, 采用适当的样品处理方法和光谱分析技术可以实现近红外光谱技术对苜蓿青贮样品发酵品质的评定。

**关键词** 紫花苜蓿青贮; 发酵品质; 未干燥; 近红外漫反射光谱

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2008)12-2799-05

## 引言

由于牧草生长的季节性, 家畜生产单位往往将其制成青贮饲料作为反刍家畜日粮的固定组成成分。青贮料具有较高的营养价值, 且能保持鲜嫩多汁的特性, 为反刍家畜所喜食。但青贮手段不同, 青贮料的质量会有很大差异。青贮过程中的不正确操作会导致牧草营养物质大量损失, 饲草的适口性变低, 影响家畜的干物质采食量<sup>[1-3]</sup>。因此, 饲喂之前及时了解青贮饲料的发酵状况, 对于合理搭配家畜日粮组成, 提高饲喂质量具有重要意义。

衡量青贮质量的指标主要有pH, 氨态氮含量, 乳酸、乙酸、丙酸、丁酸含量等。目前, 常规测定这些指标的方法, 耗时, 耗力, 成本高, 不能实现青贮料发酵品质的即时测定。近红外技术是近几十年来兴起的有机物快速分析技术, 具有快速、准确、成本低的特点, 目前已在各个领域得到广泛应用<sup>[4-12]</sup>, 但将其应用于青贮饲料发酵品质测定的研究报道还较少。

青贮料中的氨态氮和各种有机酸是易挥发性物质, 因此利用近红外技术进行分析时必须新鲜状态下测定, 这给测

定带来了一定的困难。一方面是鲜样不易制备均一的样品, 另一方面是水分在近红外区的大量吸收会掩盖其它成分的信息<sup>[13, 14]</sup>。同时青贮料中这些物质含量较低也给近红外测定带来了一定的困难。不过, 随着近红外分析技术的成熟和样品处理方法的改进, 近红外技术已经突破了这种障碍。Park的研究结果表明, 近红外光谱技术可以准确测定禾草青贮样品中的乳酸、乙酸、丁酸含量, 但是在测定丙酸时效果稍差, 其中乳酸、乙酸与丁酸的建标决定系数( $R^2$ ), 交叉检验决定系数( $R^2_{cv}$ ), 建标标准误(RMSEC), 交叉检验标准误(RMSECV)分别为0.84~0.91, 0.73~0.83, 0.4~2.79, 0.54~3.2  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 鲜重<sup>[15]</sup>。Sorensen的试验表明, 近红外技术能够很好地预测禾草青贮及玉米青贮中的乳酸, 氨态氮, 乙酸含量<sup>[16]</sup>。本研究以苜蓿做为青贮原料, 分生育期, 茬次, 青贮方法制备了青贮样品, 以期对近红外测定苜蓿青贮料发酵品质的可行性进行分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

种植于中国农业科学院畜牧研究所试验地的紫花苜蓿中

收稿日期: 2007-06-16, 修订日期: 2007-09-28

基金项目: 国家植物资源平台项目(2005DKA21007-6-3), 国家“十一五”科技支撑项目(2006BAD16B06)和国家“973”项目(2007CB1068005)资助

作者简介: 陈鹏飞, 1982年生, 中国农业大学资源与环境学院土地利用与信息技术博士研究生 e-mail: dpf001@163.com

\* 通讯联系人 e-mail: rongyuping@cau.edu.cn

苜一号, 中苜二号两个品种, 按四茬分生育期收割, 并分别按四种常用青贮方法进行处理, 即甲酸处理样, 乳酸菌+蔗糖处理样, 半干处理样和鲜样, 共制备青贮样 160 份。样品青贮 45 d, 开封, 每样取 2 份样品, 分别用于常规化学分析和近红外分析。

### 1.2 常规分析

将获取的青贮样品用四分法称取约 20 g 放入料理机中(佛山市顺德区欧科电器有限公司, CDE-220B), 加入 180 mL 蒸馏水, 匀浆 1 min, 然后将匀浆液过四层纱布, 再将滤液过定性滤纸。将制备的滤液 50 mL, 放入离心机中, 于 3 500  $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取上清液 5 mL 过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜, 滤液用于有机酸分析。有机酸分析采用液相色谱法, 所用分析条件为<sup>[17, 18]</sup>: 色谱柱, KG-811 column, Shodex, Shimadzu(日本); 检测器为二极管阵列检测器(SPD-M10A vp, 日本, 岛津公司); 柱温为 50  $^{\circ}\text{C}$ 。流速 1  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 检测波长 210 nm; 流动相 3  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  高氯酸。样品中有机酸含量用如下公式计算。

$$\text{有机酸含量}(\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{鲜重}) = \frac{180 + w \times (1 - a)}{w} \times \rho \times 10$$

$\rho$  为仪器测定值(%);  $w$  为取样重;  $a$  为样品的干物质含量。

### 1.3 近红外分析

#### 1.3.1 仪器与样品光谱测定

将取样后临时存放在冰箱中的未干燥样品放于室温中解冻, 然后置于液氮(-196  $^{\circ}\text{C}$ )中 20 min, 取出, 迅速放入高速万能粉碎机(FW100, 天津泰斯特仪器有限公司)中, 粉碎约 1 min, 以获取均一样品。将粉碎好的样品装入自封袋中, 储存于-20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

近红外仪器采用 Thermo Electron(美国)的傅里叶变换近红外光谱仪(Antaris)。仪器工作参数为: 谱区范围 4 000 ~ 10 000  $\text{cm}^{-1}$ , 扫描次数 16 次, 分辨率 8  $\text{cm}^{-1}$ 。

取适量粉碎好的样品装入旋转样品杯中, 上机扫描。每个样品重复装样 6 次扫描, 然后计算其平均光谱, 存入计算机中。样品的近红外漫反射光谱如图 1 所示。

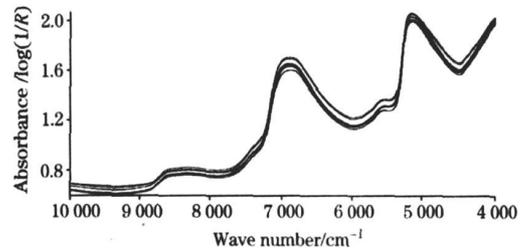


Fig. 1 The four random spectra of alfalfa silage

#### 1.3.2 建立 NIRS 数学模型的方法

将样品分为校正集和检验集。先用校正样品集建立预测模型, 再做交叉检验, 根据  $R^2$ ,  $R_{cv}^2$ , RMSEC, RMSECV 等指标对模型进行优化, 并最终确定模型。然后用检验集样品对模型进行外部验证。整个过程采用热电公司生产的 TQ Analyst(6.2) 光谱定量分析软件进行操作。

## 2 试验结果与分析

### 2.1 紫花苜蓿青贮发酵品质的化学分析结果

由于本实验制备的青贮样品中绝大多数不含有丙酸, 因此未能用近红外技术建立测定青贮样品中丙酸含量的校正模型。表 1 是紫花苜蓿青贮样品中各发酵品质指标的常规分析结果。

Table 1 Fermentation contents of the samples( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  fresh weight)

成分	样品数量	最小值/ $(\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	最大值/ $(\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	平均值/ $(\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	标准差/ $(\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$
$\text{NH}_3\text{-N}$	160	$0.17 \times 10^{-1}$	3.17	0.72	0.71
LA	123	$0.45 \times 10^{-1}$	41.53	15.32	12.66
AA	160	2.17	24.13	7.85	4.24
BA	109	$0.45 \times 10^{-1}$	5.86	0.83	1.09

注:  $\text{NH}_3\text{-N}$ : 氨态氮; LA: 乳酸; AA: 乙酸; BA: 丁酸

### 2.2 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、乳酸、乙酸、丁酸近红外校正模型的建立与优化

实验用 TQ 光谱定量分析软件对获取的光谱进行预处理, 选择谱区范围, 并确定主因子数。 $\text{NH}_3\text{-N}$ , LA, AA 和

BA 的最佳光谱处理方法和谱区范围见表 2,  $\text{NH}_3\text{-N}$  的主成分维数为 15, LA 的主成分维数为 8, AA 的主成分维数为 6, BA 的主成分维数为 13。由此条件所建立的模型的决定系数最大, 标准误最小。

Table 2 Optimal conditions for establishing NIRS prediction models

参数	氨态氮( $\text{NH}_3\text{-N}$ )	乳酸	乙酸	丁酸
光谱预处理方法	MSC	ND+ MSC+ 1 st	NP	MSC
光谱范围	9 877.47~4 087.90	8 994.9~4 123.2	5 473.50~4 681.30	9 895.10~4 087.90
因子数	15	8	6	13

注: 1 st derive: 一阶求导; ND: Norris 平滑; MSC: 多元散射校正; NP: 不处理

利用以上建模条件, 最终建立的校正模型的建模效果见表 3。从表中可以看出, 建立的氨态氮、乳酸、乙酸的近红外校正模型具有较好的建模效果, 其交叉检验决定系数 ( $R_{cv}^2$ ) 分别为 0.925 7, 0.949 7 和 0.912 4, 均在 0.9 以上, 且各模型的建标标准误差分别为 0.16, 3.78, 2.27  $g \cdot kg^{-1}$  鲜重, 接近了化学分析的准确度, 说明所建近红外模型具有较好的预测效果。建立的丁酸预测模型结果稍差, 其交叉检验决定系数为 0.602 4。

**Table 3 Optimization results for the calibration of models of fermentation character**

指标	$n$	RM SEC	$R^2$	RM SECV	$R_{cv}^2$
		$/(g \cdot kg^{-1} \text{ fresh})$		$/(g \cdot kg^{-1} \text{ fresh})$	
氨态氮	110	0.056 5	0.966 5	0.16	0.925 7
乳酸	100	2.72	0.993 7	3.78	0.949 7
乙酸	110	2.05	0.954 7	2.27	0.912 4
丁酸	90	0.302	0.672 9	0.559	0.602 4

注:  $n$ : 样品数; RM SEC: 建标标准差; RM SECV: 交叉检验标准差;  $R^2$ : 建标决定系数;  $R_{cv}^2$ : 交叉检验决定系数

### 2.3 校正模型对 $NH_3-N$ 、乳酸、乙酸、丁酸含量预测效果分析

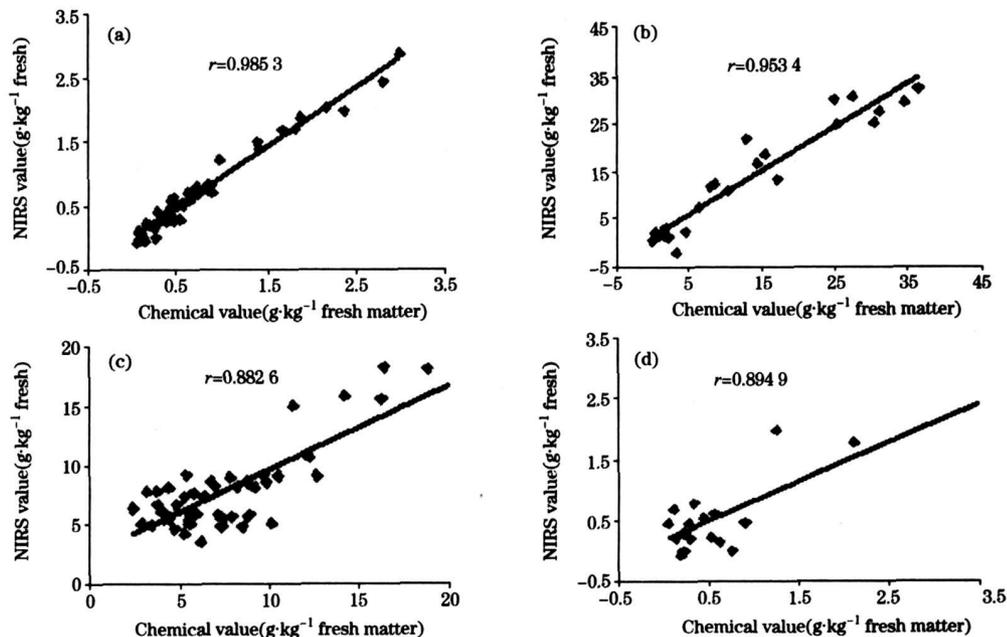
校正模型建立后, 采用外部验证的方法对所建模型的预

测效果进行验证。表 4 为用预测模型对检验集样品  $NH_3-N$ 、乳酸、乙酸、丁酸含量的预测结果。从表中可以看出预测样品各指标的预测值与常规分析值成对数据的双尾  $t$  测验未达到显著水平, 表明预测值与常规分析值之间差异不显著。外部验证误差 (RMSEP) 分别为 0.13 ( $NH_3-N$ ), 3.15 (LA), 2.35 (AA) 和 0.571 (BA)。散点图 2 表明, 预测值与化学值之间的相关系数 ( $r$ ) 分别为 0.985 3 ( $NH_3-N$ ), 0.953 4 (LA), 0.882 6 (AA) 和 0.894 9 (BA), 上述结果表明所建氨态氮、乳酸、乙酸、丁酸的近红外校正模型具有较好的预测效果, 预测值与化学分析值之间具有很好的相关关系, 可以用所建模型对未知样品中这些指标进行估测。

**Table 4 Evaluation of the calibration models with validation sets ( $g \cdot kg^{-1}$  fresh)**

指标	$n$	ANL	LAB	$T_{0.05}$	RMSEP
		$/(g \cdot kg^{-1})$	$/(g \cdot kg^{-1})$		$/(g \cdot kg^{-1})$
氨态氮	50	0.73	0.69	NS	0.13
乳酸	23	13.86	14.04	NS	3.15
乙酸	50	7.81	7.98	NS	2.35
丁酸	19	0.89	0.74	NS	0.571

注:  $n$ : 样品数; ANL: 近红外分析值; LAB: 化学分析值;  $T_{0.05}$ : 双尾  $t$  测验 (0.05 水平); RMSEP: 预测标准差; NS: 差异不显著



**Fig 2 Correlation between measured and predicted value of  $NH_3-N$  (a), LA (b), AA (c) and BA (d)**

## 3 讨论

为更充分利用有用光谱信息, 降低干扰, 建模时采取了求一阶导数、多元散射校正、平滑处理等数学处理方法。这些方法的使用, 使本试验取得了较好的建模效果, 所建各模型的预测相关系数均在 0.88 以上。Reeves<sup>[13]</sup> 用苜蓿青贮样

品建立了关于检测有机酸含量的近红外校正模型, 其所建校正模型的建标决定系数分别为 0.84 (乙酸), 0.86 (丙酸), 0.80 (丁酸), 0.96 (乳酸), 对应的检验决定系数分别为 0.66, 0.71, 0.91 和 0.73。Park<sup>[15]</sup> 以禾草青贮为材料获取了关于氨态氮、乳酸、乙酸、丁酸的近红外校正模型, 模型的交叉检验决定系数分别为 0.92, 0.83, 0.73, 0.83。Sorensen<sup>[16]</sup> 建立了预测禾草青贮及玉米青贮中有机酸含量的近红

外校正模型,其中关于禾草青贮的近红外校正模型的交叉检验决定系数分别为 0.79(氨态氮)、0.93(乳酸)、0.74(丁酸),而玉米青贮校正模型的对应结果为 0.72, 0.91, 0.84。与它们相比本实验建立的关于氨态氮、乳酸、乙酸近红外校正模型取得了更好的效果,但建立的丁酸模型效果要低于 Reeves 和 Park。造成本实验丁酸校正模型效果稍差的原因可能是由于试验所使用的苜蓿青贮中丁酸分布不均的结果。这点可以从表 1 看出,所用青贮样品中丁酸含量的最大值为  $5.86 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  鲜重,最小值为  $0.045 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  鲜重,而平均值为  $0.83 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  鲜重,说明大部分样品的丁酸含量比较低,这就造成了在高值端缺乏足够的样品来训练模型,从而使模型在预测高丁酸含量样品时效果较差。Snyman<sup>[19]</sup>并未直接使用近红外光谱仪扫描未干燥样品来建立校正模型,而是先利用化学方法将样品中的挥发性有机酸转化为相应的盐,再对样品进行干燥处理,然后进行近红外测定并建立校正模型,试验取得了较好的建模效果。这种方法虽然克服了新鲜样品在取样时容易取样不均的缺点,但整个处理过程时间比较

长,不能用于指导生产实践。从以上各试验结果看,近红外技术能用于测定青贮饲料中的氨态氮及乳酸、乙酸、丁酸等有机酸含量。

## 4 结 论

本研究建立了适合不同品种、不同茬次、不同生育期及不同青贮方法近红外漫反射光谱技术测定紫花苜蓿青贮样品发酵品质指标的校正模型。关于氨态氮、乳酸、乙酸、丁酸近红外模型的交叉检验决定系数分别为 0.925 7, 0.949 7, 0.912 4, 0.602 4, 交叉检验误差分别为 0.16, 3.78, 2.27,  $0.559 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  鲜重。用模型对未参与建标的检验集样品进行预测,预测值与化学分析值成对数据双尾  $t$  测验差异不显著( $P > 0.05$ ),预测相关系数在 0.882 6~0.985 3,上述结果表明利用合适的样品制备方法和光谱处理技术可以实现利用 NIRS 技术对苜蓿青贮料发酵品质的评定。

## 参 考 文 献

- [1] Wilkins R J, Hutchinson K J, Wilson R F, et al. *J. Agric. Sci.*, 1971, 77: 531.
- [2] McDonald P, Edwards R A. *Pro. Nutr. Soc.*, 1973, 35: 201.
- [3] Wilkinson J M, Wilson R F, Barry T N. *Outlook Agric.*, 1976, 9: 3.
- [4] HOU Rui-feng, HUANG Lan, WANG Zhong-yi, et al(侯瑞峰, 黄 岚, 王忠义, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(12): 2193.
- [5] CHANG Min, ZHU Peng-jiao, XU Ke-xin(常 敏, 诸鹏蛟, 徐可欣). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2007, 27(1): 43.
- [6] HE Yong, FENG Shui-juan, LI Xiao-li, et al(何 勇, 冯水娟, 李晓丽, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(11): 2021.
- [7] LIU Xian, HAN Lu-jia(刘 贤, 韩鲁佳). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(11): 2016.
- [8] BAI Qi-lin, CHEN Shao-jiang, DONG Xiaoling, et al(白琪林, 陈绍江, 董晓玲, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2006, 26(2): 271.
- [9] ZHANG Jun, ZHANG Yi-rong, LU Bao-hong, et al(张 俊, 张义荣, 卢宝红, 等). *Journal of Maize Sciences(玉米科学)*, 2007, 15(3): 62.
- [10] ZHANG Shao-hua, WANG Yi-xin, TIAN Shou-fu, et al(张绍华, 王玉新, 田守福, 等). *Modern Scientific Instruments(现代科学仪器)*, 2007, (3): 110.
- [11] NIE Zhi-dong, HAN Jiar-guo, YU Zhu, et al(聂志东, 韩建国, 玉 柱, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2007, 27(7): 1308.
- [12] WANG Ji-hua, HUANG Wen-jiang, LAO Cai-lian, et al(王纪华, 黄文江, 劳彩莲, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2007, 27(7): 1319.
- [13] Reeves J B, Blosser T H. *J. Dairy Sci.*, 1989, 72: 79.
- [14] CHEN Peng-fei, RONG Yu-ping, HAN Jiar-guo, et al(陈鹏飞, 戎郁萍, 韩建国, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2007, 27(7): 1304.
- [15] Park R S, Agnew R E, Gordon F J, et al. *Animal Feed Science and Technology*, 1998, 72: 155.
- [16] Sorensen L K. *J. Dairy Sci.*, 2004, 87: 3826.
- [17] BAI Chur-sheng, YU Zhu, XUE Yan-lin, et al(白春生, 玉 柱, 薛艳林, 等). *Chinese Journal of Grassland(中国草地学报)*, 2007, 29(1): 77.
- [18] XU Qing-fang, YU Zhu, HAN Jiar-guo, et al(许庆方, 玉 柱, 韩建国, 等). *Grassland and Turf(草原与草坪)*, 2007, (2): 63.
- [19] Snyman L D, Joubert H W. *Animal Feed Science and Technology*, 1992, 37: 47.

# Evaluation of Fermentation Character of Alfalfa Silage Through Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS)

CHEN Peng fei<sup>1, 2</sup>, RONG Yur ping<sup>1\*</sup>, HAN Jiar guo<sup>1</sup>

1. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

2. College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract** It is very important to evaluate the fermentation character of alfalfa silage using near infrared reflectance spectroscopy technology (NIRS) for animal production, including the content of  $\text{NH}_3\text{-N}$ , lactic acid, acetic acid and butyric acid in silage. In order to evaluate the feasibility of using NIRS to analyze the formation character of alfalfa silage, the near infrared reflectance spectroscopy models were built for  $\text{NH}_3\text{-N}$ , lactic acid, acetic acid and butyric acid in this experiment. Partial least square regression (PLS), Fourier transform technology and sample preparation with liquid nitrogen technology were used to optimize the model. The analyzed samples were obtained with different cultivars, maturity, cuttings and ensiling method. The determination of cross validation was between 0.6024 and 0.9497. The standard errors of cross validation were between  $5.59 \times 10^{-1}$  and  $3.78 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  fresh weight. The validation samples were used to test the performance of the models. The correlation coefficients between the chemical value and the NIRS value were between 0.8826 and 0.9853, and the root mean square errors of prediction were between  $5.71 \times 10^{-1}$  and  $3.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  fresh weight. The results showed the NIRS could evaluate the fermentation of the fresh forage.

**Keywords** Alfalfa silage; Fermentation character; Undried; Near infrared reflectance spectroscopy

(Received Jun. 16, 2007; accepted Sep. 28, 2007)

\* Corresponding author