

## 近赤外分析法によるビール大麦タンパク質含有率の 簡易測定法

大塚勝・石川直幸<sup>1)</sup>・小玉雅晴・加島典子・河田尚之<sup>2)</sup>・五月女敏規

摘要：ビール大麦のタンパク質含有率を少量の粉碎試料で精度よく測定する方法および原麦のまま測定する方法として近赤外分析装置の利用を検討した。

粉碎試料を用いた測定では、必要な試料の量を 1.1g まで下げても、標準誤差 0.24 の測定精度が得られた。原麦非破壊測定では、標準誤差 0.26 で実用上十分な精度でタンパク質含有率測定が可能であった。この方法を用いると、生産者レベルでも迅速に測定でき、栽培指導に利用可能である。

キーワード 近赤外分析法, ビール大麦, タンパク質含有率

## Simplified Method for Measuring Malting Barley Protein Content by Near-Infrared Analysis

Masaru OHTSUKA, Naoyuki ISHIKAWA, Masaharu KODAMA  
Noriko KASIMA, Naoyuki KAWADA, Tosinori SOTOME

Summary : A study was made about utilization of near-infrared analysis as method of measuring protein content of malting barley accurately with small volume and method of measuring in the state of grains.

In measurements made by using crushed samples, measuring accuracy with a standard deviation of 0.24 was obtained even when the amount of required sample was reduced to 1.1g. In measurements made without destruction of grains, measurement of nitrogen was possible with a standard deviation of 0.26 which is an accuracy sufficiently high from the practical viewpoint. By using this method, it becomes possible to make measurements quickly even at producers' level, and this method can therefore be utilized for the purpose of cultivation guidance.

Key words: Near-infrared analysis, malting barley, protein content

## I 緒言

ビール大麦はビール醸造原料として利用されるため、品質が重視される。特にタンパク質含有率は醸造適性に大きな影響を及ぼす特性である。タンパク質含有率が高すぎるとエキス含有率の低下、浸麦時間・麦汁ろ過時間の増大、ビールの濁り、日持ち性の悪化等を招き、低すぎると発酵の停滞、泡持ち性の悪化を招く。タンパク質含有率は土壌条件、気象条件や栽培方法などの環境要因に大きく影響されるが、遺伝的要因も持っている。このため、ビール大麦品種改良の過程においてタンパク質含有率は必須分析項目となっている。特に初期世代における選抜指標として用いる場合には少量サンプルで簡便に測定できなければならない。しかし、従来のケルダール法ではサンプル量は少量でよいが、一日に分析できる点数が限られるため初期選抜に応用することはできなかった。栃木農試では 1966 年から簡便にタンパク質含有率の測定を行うために、近赤外分析装置による分析法（ネオテック社の Grain Quality Analyzer）とブロックダイジェスターで分解しオートアナライザーで測定する分析法の利用を検討した。近赤外分析装置は簡便であったが標準誤差 0.7 と精度が劣り、オートアナライザーで測定する方法では、標準誤差 0.28~0.33 と精度が高かった。そのため、その後栃木分場のタンパク質含有率はオートアナライザーで分析してきた。

当時、川口ら<sup>1,2)</sup>は、近赤外分析法の課題として「精度の向上」と共に「試料の少量化」「原麦での測定精度の向上」をあげている。従来の近赤外分析法は粉碎試料を測定に用いてきたが、原麦のまま測定する手法（非破壊測定法）の開発は、粉碎の労力を軽減するとともに、測定した粒をそのまま播種することが可能となり育種上も大きな意味を持つ。また、近年、実需者からビール大麦のタンパク質含有率を 9.5~11.5%の適正範囲に納めるよう、より強い要望が出されてきている。本県の高品質ビール大麦生産のためには品種改良と共に生産者現場でタンパク質含有率を原麦のまま簡易に測定できる手法を開発し、測定結果を施肥量など栽培方法に反映させることが必要であると考えられる。

近年、近赤外分析装置とデータ処理法の進歩、情報処理装置の高速化に伴い、以前より近赤外分析法の精度が向上したことから、当場では 1992 年から再度近赤外分析装置の利用について、試料の少量化と原麦での非破壊測定の 2 点に重点を置いて検討を行ったのでここに報告する。

## II 材料及び方法

### 1. 少量サンプルカップによる粉碎試料の測定

インフラライザー 500 (ブラン・ルーベ社製、以下 IA500) を用いて測定試料の少量化の検討を行った。

分析材料は 1993 年栃木および福岡県産ビール大麦系統 112 点、1997 年栃木、福岡、岩手、三重県産ビール大麦系統 83 点および 1998 年栃木県産タカホゴールド 113 点である。1993 年産は四国農試とブラン・ルーベ社が共同で開発した少量サンプルカップ (粉約 5.6g) を用いて測定し、1997 年と 98 年産は栃木農試とブラン・ルーベ社が共同で開発した極少量サンプルカップ (粉約 1.1g) で測定を行った。各年のビール大麦の種子は 2.5mm のふるいでふるい、ふるい上に残った種子 (以下原麦と表記) を分析に用いた。試料はサイクロテック 1093 粉碎器で粒径を 1mm に設定して粉碎した粉を用い、測定波長は 1700~2400nm の範囲で 2nm 間隔で測定した 501 波長を用いた。比較のために用いるタンパク質含有率は 1993 年産ではオートアナライザーで吸光度測定して求めた値を水分補正して求め、1997,98 年産はケルテック オートを用いてケルダール分析した値を水分補正して求めた。検量線は、1993 年産は Stepup 法で重回帰分析を行って求め、1997 年産は試料を 2 反復測定して得られた 166 データのうち 114 データで検量線を作成し、残りの 52 データを検定用として波長幅、検量線作成法の検討を行った。1998 年産も 2 反復測定して 226 データをとり、1997 年産 166 データを合わせた 392 データの内、264 データで検量線を作成し、残りの 128 データで検定を行った。

### 2. 原麦での非破壊測定

近赤外分析装置 IA500、ケット科学研究所の「成分分析計 AN-800」(以下 AN-800) と光量改良型 AN-800 (以下改良型 AN-800)、フォス社インフラテック 1229 (以下 I1229) とインフラテック 1275 (以下 I1275) の計 5 機種を用いて、原麦を用いた非破壊測定の精度検定を行った。

1997 年栃木、福岡、岩手、三重県産ビール大麦系統 83 点および 10 年栃木県産タカホゴールド 113 点を用いて AN-800 と IA500 の 2 機種で測定を行い、1998 年産の栃木、福岡産の合同品種比較試験 (以下合比) 材料 53 点を用いて AN-800 と I1229 の 2 機種で測定を行った。また、1999 年栃木県産ビール大麦 105 点を用いて改良型 AN-800 と I1275 の 2 機種で測定を行った。

検量線の作成は、IA500 は 1100~2500nm の範囲で 2nm ごとに反射光を測定し、501 波長を解析ソフト Sesame を用いて作成した。AN-800 と改良型 AN-800 は 12 波長(918, 928, 940, 950, 968, 975, 985, 998, 1008, 1023, 1037, 1045nm)の透過光と 2 カ所の温度 (内部温

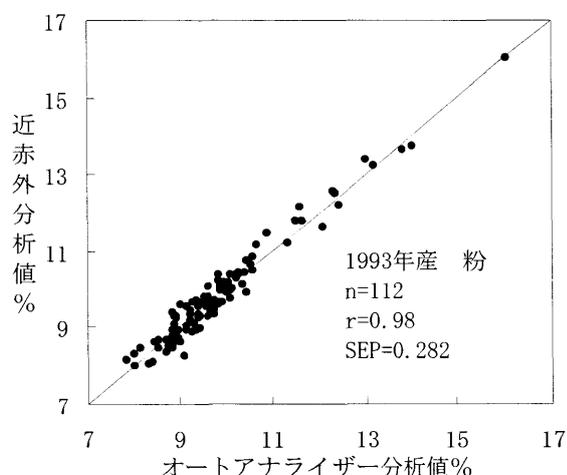
度、試料温度)を3反復で測定し、計14変数を用いて表計算ソフトで作成した。I1229とI1275は、850~1048nmの範囲を2nmごとに10反復測定し、ANN(Artificial Neural Networks)解析を用いた。この検量線は複雑で検量線作成者でなければ操作できないので、日本の材料を含まない外国品種で作成された既存のANN検量線をそのまま用いた。

タンパク質含有率はサイクロテック1093粉砕器で粒径を1mmに設定して粉砕した粉を用い、ケルテックオートを用いてケルダール分析で測定した。

### III 結果

#### 1. 少量サンプルカップによる粉砕試料の測定

少量サンプルカップを用いた近赤外分析の結果はオートアナライザー分析の結果に対し、相関係数0.98、標準誤差0.282と精度の高い結果が得られた(第1図)。



第1図 オートアナライザー分析値と近赤外分析値の比較

極少量サンプルカップを用いて検量線の条件の検討をした結果、1997年産材料を用いた場合では、1100~2100nmの範囲の波長を二次微分して、ファクター数を3とした部分最小二乗法(PLSR)回帰が最も良い結果となった(第1表)。この時作成した検量線用試料の標準誤差は0.196で、検定用試料で検定したところ標準誤差は0.217と十分な精度となった。1997年産と98年産合わせた材料を用いた場合では、1100~2100nmの範囲の波長を二次微分して、ファクター数を5とした部分最小二乗法(PLSR)回帰が最も良い結果となった(第2表、第2図)。この時作成した検量線用試料の標準誤差は0.207で、検定用試料で検定したところ標準誤差は0.227と十分な精度となった。

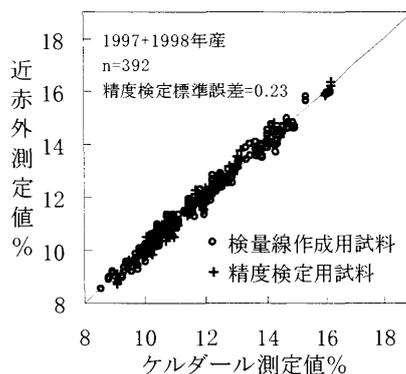
第1表 IA500の検量線計算 1997年産粉砕試料

回帰計算条件				精度検定標準誤差			
波長域	解析	微分	Factor	全体	検量線	検定用	
				166	114	52	
1400:2500	PLSR	1次	4	0.345	0.386	0.228	
			5	0.333	0.369	0.238	
	PLSR	1次	6	0.334	0.339	0.324	
			8	0.332	0.300	0.394	
	MLR	1次	5	0.334	0.339	0.325	
			5	0.405	0.412	0.389	
1100:2200	PLSR	2次	3	0.328	0.349	0.276	
			4	0.278	0.271	0.291	
	PLSR	1次	5	0.224	0.197	0.273	
			6	0.203	0.180	0.246	
	PLSR	1次	7	0.205	0.157	0.283	
			3	0.201	0.191	0.221	
	PLSR	2次	4	0.190	0.151	0.256	
			3	0.204	0.192	0.228	
	1200:2200	PLSR	2次	4	0.194	0.152	0.265
				3	0.203	0.196	0.217
	1100:2100	PLSR	2次	4	0.191	0.162	0.245

PLSR:部分最小二乗法 MLR:重回帰分析

第2表 IA500の検量線計算 H9+10年産粉砕試料

回帰計算条件				精度検定標準誤差		
波長域	解析	微分	Factor	全体	検量線	検定用
				394点	266点	128点
1100:2100	PLSR	2次	4	0.226	0.230	0.218
			5	0.214	0.207	0.227
	PLSR	1次	5	0.230	0.242	0.205
			6	0.225	0.231	0.211
	PLSR	1次	7	0.219	0.222	0.211



第2図 極少量粉砕試料測定

#### 2. 原麦での非破壊測定

##### 1) IA500による原麦の測定

1997年産材料で原麦非破壊測定の最適な検量線の条件を検討した結果、1100~2100nm間の501波長を一次微分して、ファクター数を12とした部分最小二乗法(PLSR)回帰が最も良くなった(表3)。この時作成した検量線用試料の標準誤差は0.212で、検定用試料で検定したところ標準誤差は0.319となった。1998年産材料に1997年産材

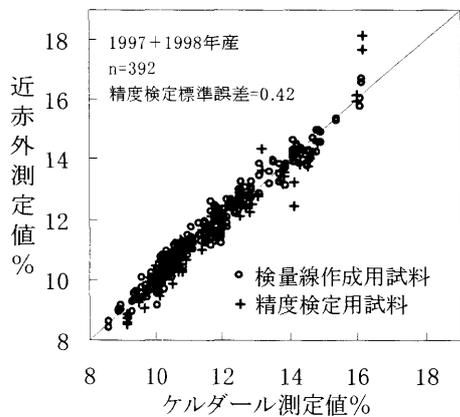
料を合わせて同様に検討した結果、同じ条件で最もよくなり、この時、検量線用試料の標準誤差は 0.339 で、検定用試料で検定したところ標準誤差は 0.493 と平成 9 年産の結果より大きくなった (第 4 表, 第 3 図)。

第 3 表 IA500の検量線計算 1997年産原麦粒

回帰計算条件				精度検定標準誤差		
波長域	解析	微分	Factor	全体	検量線	検定用
1100:1900	PLSR	1次	9	0.290	0.252	0.361
			11	0.282	0.215	0.389
	MLR	2次	10	0.308	0.229	0.435
			10	0.339	0.266	0.461
			10	0.307	0.236	0.422
1100:2200	PLSR	1次	9	0.278	0.256	0.322
			11	0.259	0.224	0.323
	PLSR	1次	10	0.269	0.240	0.322
1100:2100	PLSR	1次	9	0.285	0.261	0.334
			10	0.275	0.244	0.332
	PLSR	1次	11	0.264	0.230	0.328
			12	0.250	0.212	0.319
1200:2200	PLSR	1次	10	0.289	0.251	0.358
再度セットを変えて						
1100:2100	PLSR	1st	9	0.286	0.261	0.334
			12	0.251	0.212	0.320
			10	0.265	0.230	0.328

第 4 表 IA500の検量線計算 1997+1998年産原麦粒

回帰計算条件				精度検定標準誤差			
波長域	解析	微分	Factor	全体	検量線	検定用	
				394点	266点	128点	
1100:2100	PLSR	1次	10	0.418	0.373	0.497	
			11	0.409	0.360	0.495	
	PLSR	1次	12	0.397	0.339	0.493	
			2次	10	0.427	0.366	0.529
				12	0.409	0.339	0.521



第 3 図 IA500を用いた非破壊分析

2) AN-800 による原麦の測定

1997,98 年産材料を測定した 14 変数を用い、最適な検量線の検討を行った。まず、表計算ソフト上で全波長を用いて、重回帰分析を行ったところ、平均化した場合で検定用試料の標準誤差が 0.550 であった (第 5 表)。次にブラン・ルーベ社の処理ソフトに取り込み Stepup 法を用いて、重回帰分析を行ったが、検定用試料の最も低い標準誤差は

0.546 であった。そこで、温度を除く 12 変数を用いて計算したところ、検定用試料の標準誤差が 0.537 と最もよくなった (第 5 表)。全 12 波長を用いた検量線でタンパク質含有率を算出し、最後に装置内温度差 (内部温度-試料温度) とタンパク質含有率の関係 (第 4 図) から補正蛋白=計算値+0.013-39.48×(装置内温度差-0.3377)の計算式を算出し温度補正を行った。標準誤差は、検量線用試料で 0.505, 検定用試料で 0.478 となり (第 5 図), 測定を 2 反復設けた場合で 0.434, 0.416 であった。

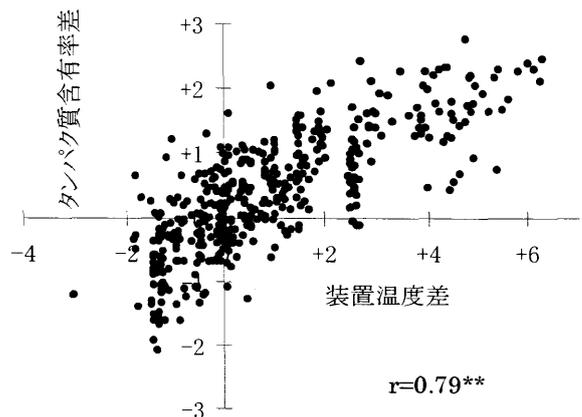
第 5 表 AN-800の検量線計算 1997+1998年産原麦粒

回帰計算条件				精度検定標準誤差		
Soft	波長選択	変数	除かれた変数 1)	全体	検量線	検定用
Excel	全波長MLR	14		0.434	0.597	
		14		0.365	0.550	
Sesame	全波長MLR	14		0.487	0.432	0.591
		12	12,13	0.486	0.432	0.587
		10	8,12,13,14	0.474	0.437	0.546
		8	1,2,3,4,8,13	0.566	0.511	0.671
		9	1,2,3,4,13	0.566	0.510	0.674
		11	8,12,13	0.490	0.433	0.597
		12	13,14	0.470	0.436	0.537

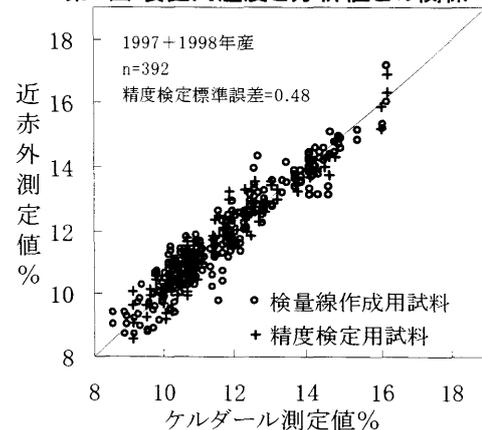
1) 変数は1から順に(918, 928, 940, 950, 968, 975, 985, 998, 1008

1023, 1037, 1045nmの透過光, 内部温度, 試料温度

2) 平均化を行った



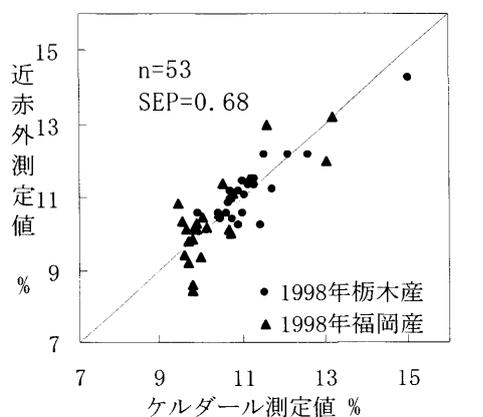
第 4 図 装置内温度と分析値との関係



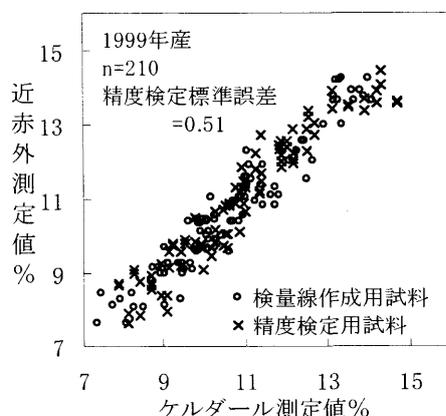
第 5 図 AN-800を用いた非破壊分析

1998年産合比材料を用いた測定は、この検量線をバイアス補正して用いたが、精度は0.667でよくなかった(第6図)。

また、1999年栃木県産ビール大麦を測定した結果を用い、光量を増やす改良を加えた改良型AN-800用に改めて重回帰分析で検量線を作成した結果、検定用試料の標準誤差は0.51となった(第7図)。



第6図 AN-800を用いた非破壊分析-2



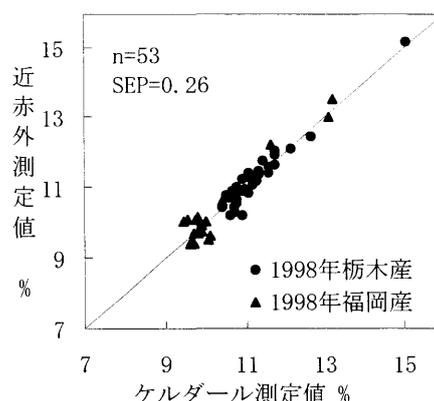
第7図 AN-800を用いた非破壊分析-3

### 3) I1229 と I1275 による原麦の測定

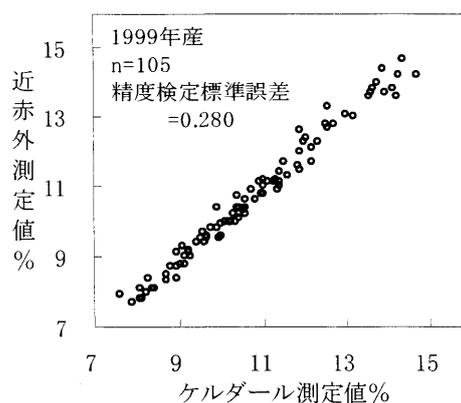
1998年産の合比材料を用いて I1229 で測定した結果、栃木県の合比材料で用いた標準誤差は 0.235、福岡の合比材料で標準誤差は 0.297、試料全体で標準誤差は 0.263 となり、十分な精度が得られた(第8図)。ただし、今回は反復測定の設定を、1 試料につき 10 地点としておいたにもかかわらず、一部の試料において、反復のデータが数地点で測定されないエラーがみられた。これにより、値は算出されるものの精度の劣るデータが精度検定に含まれる結果となった。

1999年栃木県産ビール大麦品種を用いて I1275 で測定した結果、標準誤差は 0.28 となった(第9図)。この材料においては、前年度見られたようなエラーは見られなかった。また、同じ試料を用い、小麦と大麦両方のタンパク質含有率が測定できる検量線の利用についても検討したと

ころ、ケルダール分析値との間にバイアスがあったため、差の平均で補正をかけたところ、検量線の精度は 0.328 となった。



第8図 I1229を用いた非破壊分析



第9図 I1275を用いた非破壊分析

## IV 考察

### 1. 少量サンプルカップによる粉砕試料の測定

粉砕試料での測定では、栃木分場の分析で用いているオートアナライザー法と比較して遜色のない結果となった(第6表)。測定にかかる手間は、粉砕するまでは同じであるが、その後の秤量、ケルダール分解、一日あたりの測定数において飛躍的に労力の軽減につながった。また、同時にケルダール分解の際に生じる硫酸廃液も、検量線の作成にケルダール分解を行うため実際になくすことはできないが、従来と比べて大幅に減った。

1997,98年の結果では、粉砕した粉で測定すれば、1.1gと極少量でも標準誤差0.2程度と十分な精度を示したことから、育種におけるタンパク質含有率の測定に十分適用可能である。

### 2 原麦での非破壊測定

AN-800は、機器が安価であり(約200万円)、比較的少量(50g)の原麦のまま迅速に測定できる点では、ビール大麦生産者現場での利用に有望と考えられたが、測定精度は十分ではなかった。この機種は、本来玄米のタンパ

ク質含有率を測定する目的でつくられているため、穀皮のある大麦では光量不足で十分にその能力を発揮できていないと考えられる。今回 1997,8 年産についてはスペーサーを入れてセルの幅を短くし、光が透過する原麦の量を少なくすることで、1999 年産については光源の光量を強くして光量不足を補ったが、いずれも十分な精度は得られなかった。精度を向上させるには、麦の穂軸、芒、細粒、剥皮粒、浮皮粒等を完全に除去してから測定することが最も有効であり、次に温度・湿度変化をできるだけ少なくすることが重要である。

第 6 表 近赤外分析装置の精度検定

装置	材料	必要量	処理点 / 時間	波長数	手法	精度検定標準誤差
IA500	粉碎粉	1.1g	40	501	PLSR	0.22
IA500	原麦粒	13g	40	501	PLSR	0.32
AN-800	原麦粒	42g	80	12ポイント+ 2温度×3	MLR	0.48
I1229	原麦粒	300g	50	100×10	ANN	0.26
I1275	原麦粒	60g	50	100×10	ANN	0.28

IA500 は、原麦の測定は標準誤差が 0.4 前後であり、生産者の現場で利用するには不十分であった。他の 4 機種が透過光を測定するのに対しこの機種は反射光を用いて本来粉を測定するように設計されているので、穀皮のあるビール大麦では原麦の測定精度が低いと思われる。

I1229 は、標準誤差値が 0.26 と AN-800 よりも精度が高かった。この機種では、必要とする試料の量が多いことから、育種の初期選抜の利用では難しいと考えられた。しかし、生産者現場においては試料の量が問題となることは少ないと考えられるので、この機械で測定したデータを用いて栽培指導等に利用していくことが可能である。

I1275 の標準誤差値は 0.28 と I1229 と同様に精度が高かった。必要とする試料の量は 60g と比較的少量ですむために育種への利用も可能である結果となった。また、この

検量線は年次間による補正を行わずに高い精度を示したことから、生産者現場において比較的容易に利用が可能であると考えられた。同時に使用した小麦・大麦共用検量線については、利用の場面に限られる事に加え、相関係数は高い (0.99) もの、バイアス補正の必要があり、生産者現場で利用するには不十分であった。

今回は、ヨーロッパ各国のビール大麦約 3,000 点を用いて作成された既存の ANN 検量線を用いたが、I1229 は検量線作成試料に含まれないタイプの波長を検知した時に、その測定波長を保存しない設定となっている。エラーの出した試料は粒色が濃く、一部には穂発芽粒もみられたことから、検量線作成試料には被害粒は含まれていなかったと考えられる。エラーデータは精度を悪くする要因となっているので、さらに精度を上げるために、試料の適用範囲について検討を加えるとともに、検量線作成試料に日本産のビール大麦を用い、かつ被害粒の測定にも対応できるように様々なタイプのビール大麦の測定値を加えたデータベースを作成し、検量線をアップデートする必要があると考えられる。

## 謝 辞

最後に、精力的に測定を補助してくれた星野洋子主任技術員、栃木分場でない測定機器を貸して下さった農業研究センター、本場育種部に心から感謝します。

## 引用文献

1. 川口ら (1967) 穀粒分析器 (GQA) によるタンパク質含有率及び水分の測定法について・育種試験のための醸造品質検定法 栃木農試研報 21 : 9-12
2. 川口ら (1967) オートアナライザーによる麦芽のジアスターゼ力と全窒素の測定について、育種試験のための醸造品質検定法 栃木農試験研報 21 : 1-8