

이탈리안 라이그라스 사일리지의 품질평가를 위한 근적외선분광 (NIRS) 검량식의 이설 및 검증

조규채 · 박형수* · 이상훈* · 최진혁* · 서 성* · 최기준*

케이씨테크

Transfer and Validation of NIRS Calibration Models for Evaluating Forage Quality in Italian Ryegrass Silages

Cho, Kyu Chae, Park, Hyung Soo*, Lee, Sang Hoon*, Choi, Jin Hyeok*,
Seo, Sung* and Choi, Gi Jun*

KC Tech, Korea Cutting edge Technology, Bundang 463-806, Korea

Summary

This study was evaluated high end research grade Near infrared spectrophotometer (NIRS) to low end popular field grade multiple Near infrared spectrophotometer (NIRS) for rapid analysis at forage quality at sight with 241 samples of Italian ryegrass silage during 3 years collected whole country for evaluate accuracy and precision between instruments. Firstly collected and build database high end research grade NIRS using with Unity Scientific Model 2500X (650 nm~2,500 nm) then trim and fit to low end popular field grade NIRS with Unity Scientific Model 1400 (1,400 nm~2,400 nm) then build and create calibration, transfer calibration with special transfer algorithm. The result between instruments was 0.000%~0.343% differences, rapidly analysis for chemical constituents, NDF, ADF, and crude protein, crude ash and fermentation parameter such as moisture, pH and lactic acid, finally forage quality parameter, TDN, DMI, RFV within 5 minutes at sight and the result equivalent with laboratory data. Nevertheless during 3 years collected samples for build calibration was organic samples that make differentiate by local or yearly bases etc. This strongly suggest population evaluation technique needed and constantly update calibration and maintenance calibration to proper handling database accumulation and spread out by knowledgable control laboratory analysis and reflect calibration update such as powerful control center needed for long lasting usage of forage analysis with NIRS at sight. Especially the agriculture products such as forage will continuously changes that made easily find out the changes and update routinely, if not near future NIRS was worthless due to those changes. Many research related NIRS was shortly study not long term study that made not well using NIRS, so the system needed check simple and instantly using with local language supported signal methods Global Distance (GD) and Neighbour Distance (ND) algorithm. Finally the multiple popular field grades instruments should be the same results not only between research grade instruments but also between multiple popular field grade instruments that needed easily transfer calibration and maintenance between instruments via internet networking techniques.

(Key words : Near infrared spectroscopy, Forage quality, Calibration, Validation)

* 국립축산과학원 (National Institute of Animal Science RDA, Cheonan 330-801, Korea)

Corresponding author : Hyung Soo Park, National Institute of Animal Science RDA, Cheonan 330-801, Korea. Tel: +82-41-580-6753, Fax: +82-41-580-6757, E-mail: anpark69@korea.kr

2012년 11월 7일 투고, 2012년 11월 29일 심사완료, 2012년 12월 4일 게재확정

서 론

경제발전과 더불어 국내의 육류 소비가 과거와 달리 급속도로 증가하고 있으며 또한 소비의 고급화로 인하여 수입육 대비 국내산 초식가축의 선호도가 두드러져 사육두수가 크게 증가하고 있으나 국제 곡물가격 상승으로 조사료의 수요량이 급격히 증가하고 있는 추세이며 대부분의 국내 유통 조사료의 품질은 일부시료의 외관이나 전체 무게 및 경험 등 비과학적 방법으로 평가됨으로서 조사료의 유통시장에서 정상적인 생산자와 소비자의 품질좌표가 없어 상호간의 불신을 야기하는 등 여러 가지 문제점들이 대두되고 있다. 국내산 조사료의 품질에 대한 신뢰도 회복을 위해서는 신속하고 정확한 조사료 품질평가 체계 구축과 현장에서 직접 조사료의 품질을 평가할 수 있는 평가 시스템 구축이 필요하다.

일반적인 조사료 품질 평가방법은 시료를 채취 후 건조 등의 과정을 거쳐 실험실에서 분석을 하는 전통적인 습식 방법에 많이 의존해 왔다. 그러나 이러한 방법은 시간과 인력 및 전수검사를 하는데 있어서 많은 어려움이 있다. 개인용 컴퓨터의 급속한 보급과 이에 따른 통계처리 방법을 손쉽게 접근할 수 있어 근자에 이르러 근적외선 분광분석법이 광범위 하게 쓰이고 있다. 특히 시료를 전 처리 없이 신속하게 동시에 다 성분이 분석 가능하므로 농산물같이 불 균질한 시료의 전수 검사에 매우 적합하다 할 수 있겠다.

근적외선분광분석법은 식품이나 농산물을 구성하는 유기성분들의 관능기인 C-H, O-H, N-H 등이 근적외 영역의 전자파에너지가 투입되고 반사 될 때 생기는 에너지 차이를 응용하여 농산물의 수분, 탄수화물, 지질, 단백질 및 섬유소 등과 같은 이화학성분에 관계되는 물질과의 상관관계를 수량화 한 것으로 다수의 이화학적 특성 정보를 동시에 얻을 수 있을 뿐만 아니라 비 파괴적 이므로 시료

를 반복 사용할 수 있어 농산물뿐만 아니라 식품, 제약, 섬유와 화학분야에서 정량 및 정성적 계측에 널리 이용되고 있다.

근적외선분광 분석법의 활용은 Norris 등 (1976)의 조사료 품질 평가를 시작으로 Williams (1987)의 농업 식품분야 적용 및 Abrams 등 (1988)의 조사료 사료가치 평가, Park 등 (1997)의 목초 사일리지의 발효품질평가, Stuth 등 (2003)의 직접 및 간접 방법의 조사료 품질 평가, Park 등 (2006)의 옥수수사일리지 소화율 및 에너지 평가 등 농산물의 품질을 평가할 수 있는 방법으로 근적외선분광분석법이 농업분야에서 많이 이용되고 있으며 특히, 생산현장에서 직접 품질평가가 가능한 현장용 근적외선분광기가 개발되어 보급되고 있다.

본 연구는 이탈리아 라이그라스 사일리지의 신속한 품질평가를 위하여 연구용 근적외선분광기에서 수집된 검량식 및 데이터베이스를 Network 기법을 이용하여 현장용 근적외선분광기에 검량식의 이설 가능성을 타진하고 이설된 검량식의 품질 평가 정확성을 평가하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 이탈리아 라이그라스 사일리지의 시료 수집

본 실험의 공시재료로는 이탈리아 라이그라스 사일리지 2009년부터 2011년까지 3년간 전국에서 수집된 241점을 이용하였으며 지퍼백에 밀봉하여 -20°C 의 냉동고에 보관하였다.

2. 이탈리아 라이그라스 사일리지의 NIR 스펙트럼 수집

-20°C 의 냉동고에 보관 하여 수집된 시료는 5°C 냉장고에 해동하여 상온에 30분 이

상 방치한 후 시료를 가위로 5 cm 이하로 절단하여 직경 15 cm의 원형 컵을 이용 근적외선분광기 Model 2500X 파장범위 650 nm~2,500 nm (Spectrastar, Unity scientific, USA)에서 1 nm 간격으로 흡광도를 측정하여 수집된 검량식 작성용 데이터베이스를 이용 이를 현장용 보급형 근적외선분광기 Model 1400 파장범위 1,400 nm~2,400 nm (Infrastar, Unity scientific, USA)에 검량선을 이설 하여 조사료의 품질평가 항목에 대한 예측정확성을 비교하였다.

3. 이탈리아 라이그라스 사일리지의 사료 가치 분석

수집된 시료는 오븐에서 65℃에서 72시간 건조 후 건물을 구하고 이를 냉각 시킨 후 1 mm 채가 달린 사이틀론 분쇄기로 분쇄하여 화학적 분석을 수행하였다. 단백질 함량은 AOAC (1990)법에 의거하여 듀마스법 (Elementar varioMAX System)를 이용하여 분석하였고 NDF 및 ADF 함량은 Goering 및 Van soest (1970)법에서 사용되어지는 시약을 이용하여 Ankom fiber analyzer (Ankom technology, 2005a; 2005b)로 분석하였다. 사일리지의 pH 측정은 시료 25 g에 증류수 255 ml를 첨가 후 잘 혼합하여 Electrometric pH meter (HI 9024: Hanna Instrument Inc.)를 이용하여 측정하였으며 젖산분석은 사일리지 추출액을 Gas Chromatography (6890N, Agilent Co. USA)를 이용하여 Fussel과 McCalley (1987)에 의한 80/120 mesh Carbopack, B-DA/4% Carbowax (Supelco Inc., Bellefonte, PA. Cat. No. 1-1889) 컬럼을 이용하여 분석하였다.

4. 검량식의 이설 및 이의 검증

3년 동안 상위모델에서 수집된 Database를 활용하여 검량식의 유도 및 검증은 보편화된

방법을 통하여 시료의 크기, 불균일성, 밀도, 등등에 의한 다중산란효과 및 기준선의 변위를 최소화 하기위하여 Standard Normal Variate and Detrend 및 흡광도의 중첩으로부터의 분리를 위하여 미분처리 (1,8,8,1)를 이용 불필요한 변위를 최소화 한 후 교차검증 (Cross Valibation)을 이용 최적 검량식 유도법인 부분최소제곱법 (Partial Least Square Regression) PLS 방법 (Shenk and Westerhaus, 1991)을 이용하여 UniStar Ucal Software (Unity Scientific U.S.A)를 사용 하였으며 연구용 장비의 파장범위 650 nm~2,500 nm에서 얻어진 Database를 보급형장비의 파장범위 1,400 nm~2,400 nm로 파장을 줄여 보급형 장비에 맞도록 Networking 기법으로 Database를 업데이트 하여 작성하여 이를 검증 하였다.

결과 및 고찰

1. NIR 장비간 Spectrum 특성

두 장비간의 표준화를 위해 4점의 이탈리아 라이그라스를 각각의 장비에서 스펙트럼을 얻었다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 650 nm에서 2,500 nm 대역에서 전형적인 근적외 스펙트럼을 얻을 수 있었으며, 동일한 시료의 이탈리아 라이그라스 시료를 1,400 nm~2,400 nm 대역의 장비에서 얻은 결과는 Fig. 2와 같이 결합과 배음대역의 수분피크의 양상은 비슷하나 장비간의 차이 때문에 흡광도의 일정성, 즉 Spectral Linearity가 다르기 때문에 서로 일치 하지 않음을 알 수 있다. 근적외선을 시료에 조사시 흡수는 기준진동의 배음 및 결합음에 의해 생기고 주로 수소원자가 관련하는 원자단에 의한 흡수가 주종을 이루며 파장이 큰 영역에서 흡광계수가 커져 흡광도의 변위가 커지게 되는데 Fig. 3과 같이 큰 차이의 흡광도 변위가 생긴다고 보고 하였다 (Chung과 Kim, 2000).

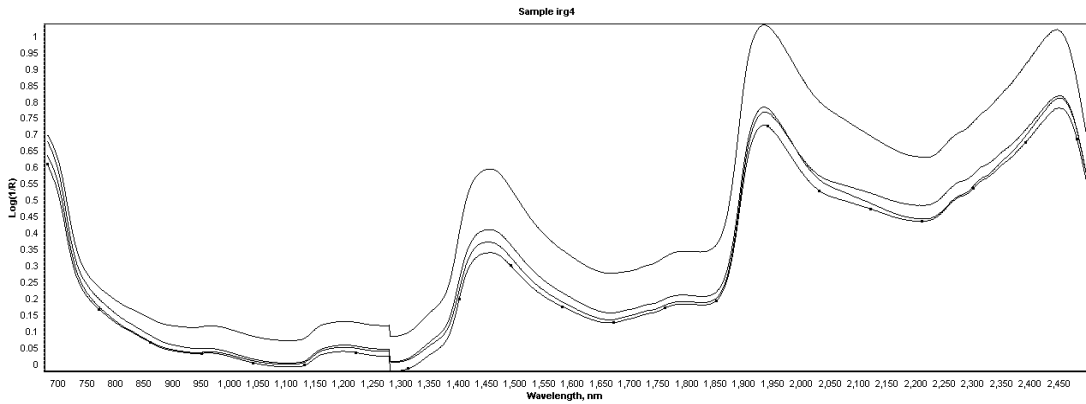


Fig. 1. 4 samples of Italian ryegrass silage spectrum at 650~2,500 nm with Unity Model 2500X.

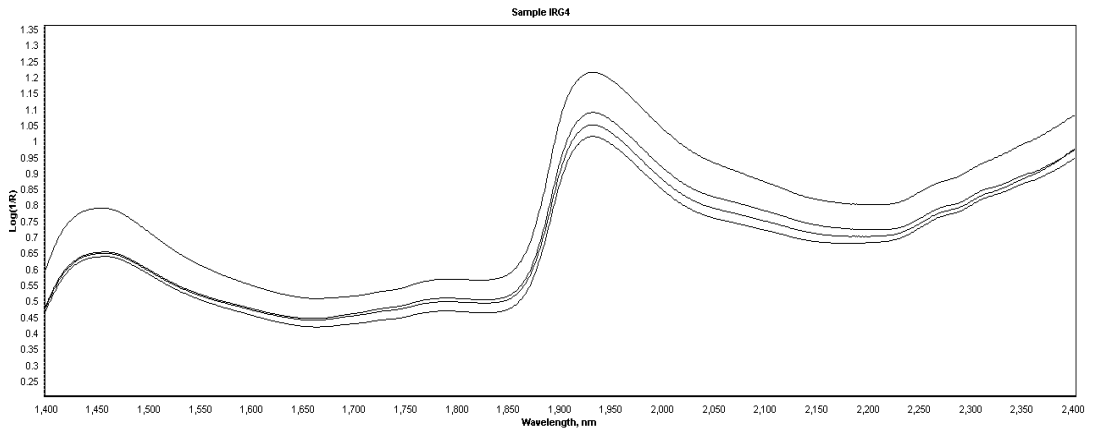


Fig. 2. 4 samples of Italian ryegrass silage spectrum at 1,400~2,400 nm with Unity Model 1400.

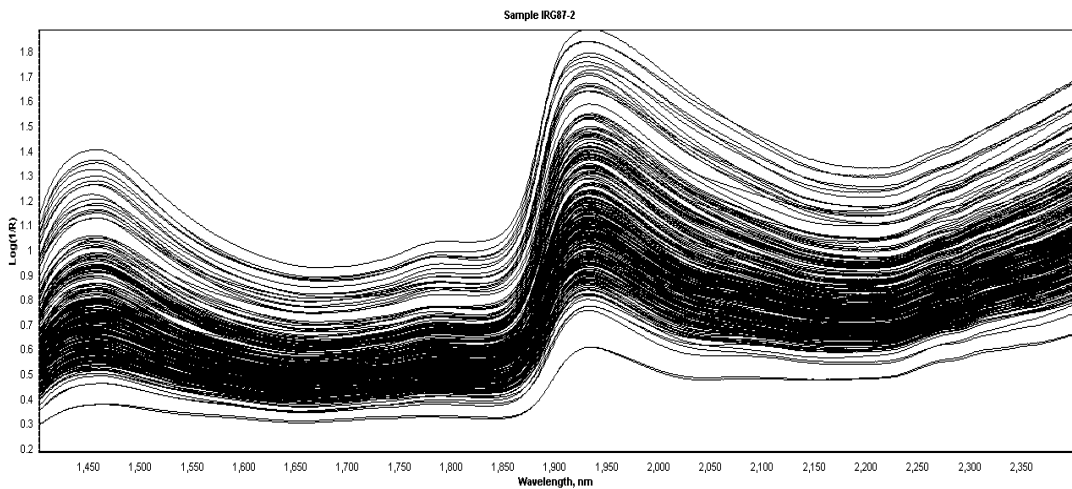


Fig. 3. Converted from 2500X to 1400 Spectrum Database 1,400~2,400 nm.

이는 Cell 내의 시료의 분쇄정도 및 충전 밀도, 시료의 표면상태 그리고 장비의 변화에 따라서도 영향을 받게 된다. 이런 경우 스펙트럼의 peak가 겹치게 되고 peak의 면적도 broad한 단일극대 흡수양태로 가져와 흡광도 해석의 방해요인이 되고 있다. 이때 이들 original spectra 들에 대해 Standard Normal Variance and Detrend 처리를 하면 겹쳐져 있는 흡수대 및 Broad한 스펙트럼의 단일극대 스펙트럼의 위치확인 그리고 급격하게 상승하는 부분에 숨겨진 약한 흡수대 역시 확인할 수 있어 데이터 해석에 정확도를 기할 수가 있다 이와 관련 Chung과 Kim (2000)은 고체 시료의 산란 및 확산에 미분법 및 다중산란보정(MSC: Multiplicative Scatter Correction)의 효과를 보고 하였다.

Fig. 4는 original spectra들에 대해 SNV and Detrend 처리를 실시한 경우로서 스펙트럼의 peak가 좀 더 세분화되어 있음을 알 수 있고 original spectra에서 볼 수 없었던 peak도 선명히 나타남을 알 수 있다. 따라서 여타의 보고(Williams, 1987, Edward. 1994, Shenk and Westerhaus, 1996)에서처럼 근적외 파장에 대한 검량식 작성을 위해서는 스펙트럼

획득 후 수치처리 하여 사용하였다.

한편, 얻어진 스펙트럼으로 모집단 분포에 관한 보고한 Shenk와 Westerhaus (1991)의 방법대로 주성분 분석(principal component analysis) 분석을 실행한 후 중심샘플로부터의 각 시료 간 거리(Maharanobis Distance)로 Fig. 5와같이 3개의 주성분으로 얻어진 3차원 공간의 좌표상의 시료구성을 볼 수 있다. 이를 이용향후 미지 시료 분석 시 위치를 파악하여 예측치의 정확성 및 확장의 여부를 파악할 수 있다.

2. 시료의 특성 및 검량식 이설

검량식 유도 및 이의 이설을 위해 사용되어진 이탈리아인 라이그라스 사일리지의 시료 집단에 대한 화학성분 및 발효품질에 대한 통계치는 Table 1에서 보는 바와 같다. 사일리지의 화학성분으로 조단백질 및 조회분 함량의 평균값은 각각 10.92%, 8.15% 이며 이들의 변위 값 즉 최소 최대 범위는 각각 4.60% ~ 19.6%, 4.39% ~ 14.57%로서 넓은 범위의 분포를 가지고 있어 측정가치에 많은 경우의 수를 포함 할 수 있음을 알 수 있다.

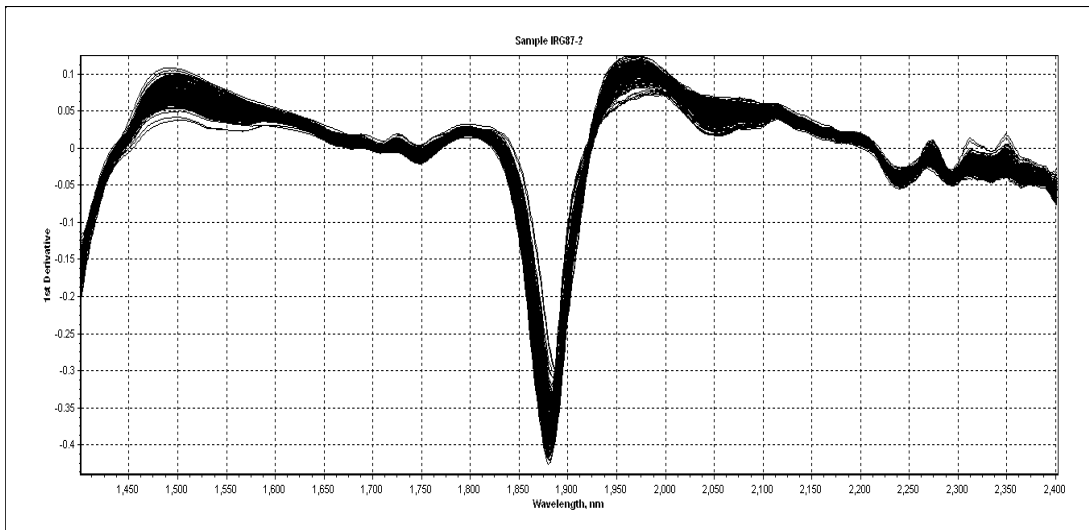


Fig. 4. SNV & Detrend, 1st dv. Math treatment Converted Spectrum Database 1,400~2,400 nm.

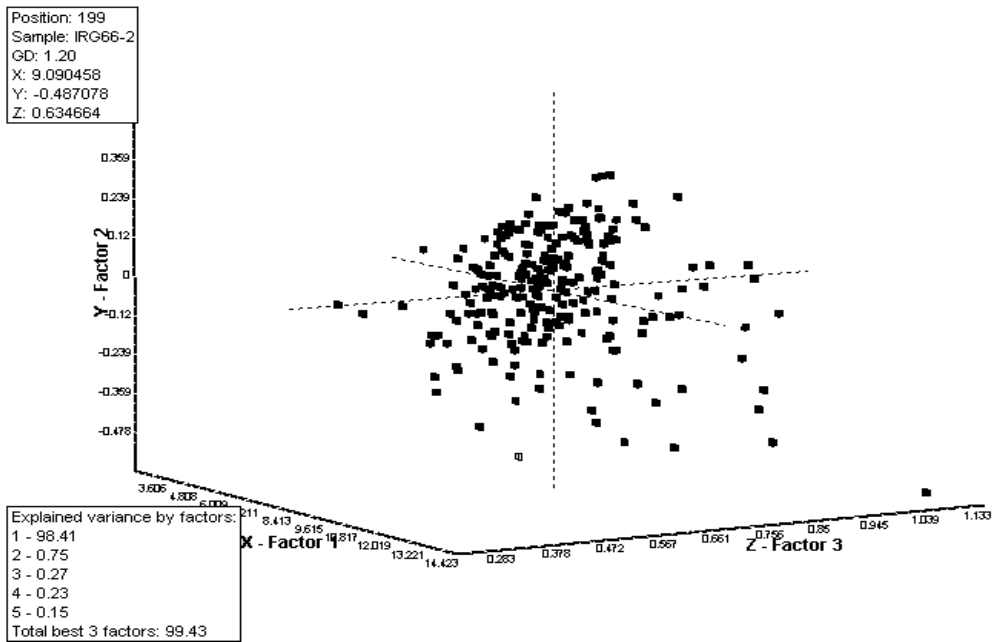


Fig. 5. 3D PCA Plot of Converted Spectrum Database.

특히 조희분 함량의 경우를 보면 변위가 10%를 상회함으로 이는 시료 중 토양이나 이물질이 상당량 혼입되었음을 반증하고 있어 이러한 경우도 신속하게 조사료 품질을 판단 할 수 있는 좌표로서 활용될 수 있다. NDF 및 ADF 함량의 경우는 평균이 각각 61.07%, 39.54% 이었으며 범위는 50.91%~74.24% 및 33.18%~48.17%로서 많은 경우의

범위를 포함하고 있다. 사일리지 발효 품질의 평가지표인 수분, pH 및 젖산함량의 평균 값은 각각 57.19%, 5 및 1.20%로 수집되어 일반 사일리지 함량과 비슷한 결과를 나타내고 있다.

이탈리안 라이그라스 사일리지 시료(N=241)의 연구용 장비의 파장범위 650 nm~2,500 nm에서 얻어진 Database를 보급형장비의 파장범

Table 1. Statistical value on moisture, pH, Lactic acid and ADF, NDF, crude protein for Italian ryegrass silages

	N	Minimum	Maximum	Standard Deviation	Average
Moisture (%)	240	27.62	79.59	9.77	57.19
Ash (%)	240	4.39	14.57	1.87	8.15
NDF (%)	240	50.91	74.24	4.91	61.07
ADF (%)	240	33.18	48.17	3.20	39.54
Crude protein (%)	240	4.60	19.46	3.85	10.92
pH	241	3.80	8.66	1.24	5.00
Lactic acid (%)	231	0.08	2.43	0.66	1.20
TDN (%)	241	51.38	88.90	3.19	58.23
RFV	240	64.37	115.21	10.68	89.35

위 1,400 nm~2,400 nm로 파장을 줄여 Network 기법을 이용 보급형 장비에 맞도록 Database 를 업데이트 하여 다중회귀 분석(Edward, 1994)을 이용 유도된 결과는 Table 2에서 보 는바와 같다.

유도된 검량식의 결과는 수분 pH 및 젖산 함량의 경우 분석치 간의 결정계수(R^2)가 0.984, 0.808 및 0.896으로 나왔고 PLS 방식은 검량 선 작성과 동시에 교차 검증(cross validation) 을 통하여 외부 검증결과와 동일한 결과를 얻을 수 있으며 예측 정확성은 각각 $SECV = 1.612, 0.634, 0.287$ 로 실험실과 거의 같은 유 의 수준으로 작성이 양호하였다. 또한 NDF 와 ADF 함량의 결과를 보면 ($R^2 = 0.835$) $SECV = 2.453\%$ 및 ($R^2 = 0.866$) $SECV = 1.699\%$ 로서 현장에서 시료를 간단히 절단하여 분석을 시행하는 정도의 수준으로는 실용할 만 한 분석의 결과를 얻을 수 있었으나 오차는 실험실 분석과 실제 시료를 근적외선으로 측정 한 시료간의 오차로 보이며 향후 시료를 먼저 스펙트럼을 얻은 후 이를 실험분석을 시행하게 되면 우수한 상관도와 분석오차를 줄일 수 있을 것으로 추정된다.

조단백질과 조회분 함량은 각각 ($R^2=0.907$)

$SECV = 1.506\%$ 및 ($R^2 = 0.767$) $SECV = 1.163\%$ 으로서 조단백질 함량의 경우 범위가 넓어져 상관도에 비해 오차가 약간 상승하였으며 조 회분의 경우 시료 고유의 조회분과 시료 채 취시 유입되는 토양 등의 오염 등을 좀더 연구 해 볼 필요가 있다. 알려진 대로 조회분 은 무기물의 총합체이며 이는 근적외선 영역 에서 흡광을 방해하는 요인으로 작용하므로 전대역의 간접측정으로 이루어진다.

3. 이설된 검량식의 예측 정확성 평가

조사료의 품질평가를 위한 실험실용 근적 외선분광기와 현장용 근적외선분광기의 이탈 리안 라이그라스의 화학적 조성분 함량과 발 효품질 및 품질평가치에 대한 예측 정확성을 평가한 결과 조사료의 품질평가에서 보급형 장비의 검량식 유도 결과는 연구용장비와 거 의 유사하게 나타났다. 기기간의 오차를 살펴 보면 0.000%~0.343%로써 양호하게 나타났 다. 또한 분석대상의 성분이 결합 및 1차 배 음대 위주에서 강하게 나오므로 파장을 줄여 도 결과는 유사함으로 현장 적용의 보급형 장비에 이용 가능하여 보급형 현장용 근적외

Table 2. Comparison of equation statistics for the prediction of moisture, ash, NDF, ADF, crude protein, pH and lactic acid, TDN, RFV for Italian ryegrass silages

	n	Mean	SEC	R^2	SECV	R^2
Moisture (%)	230	57.193	1.223	0.984	1.612	0.973
Ash (%)	211	7.941	0.698	0.767	1.163	0.424
NDF (%)	233	60.990	1.987	0.835	2.453	0.732
ADF (%)	234	39.472	1.157	0.866	1.699	0.724
Crude protein (%)	230	10.785	1.144	0.907	1.506	0.840
pH	230	4.895	0.499	0.808	0.634	0.699
Lactic acid (%)	225	1.184	0.209	0.896	0.287	0.803
TDN (%)	234	58.151	0.901	0.866	1.323	0.724
RFV	235	89.337	4.291	0.834	5.641	0.708

* SEC : Standard error of calibration,

** R^2 : Coefficient of determination of calibration

*** SECV : Standard error of cross validation.

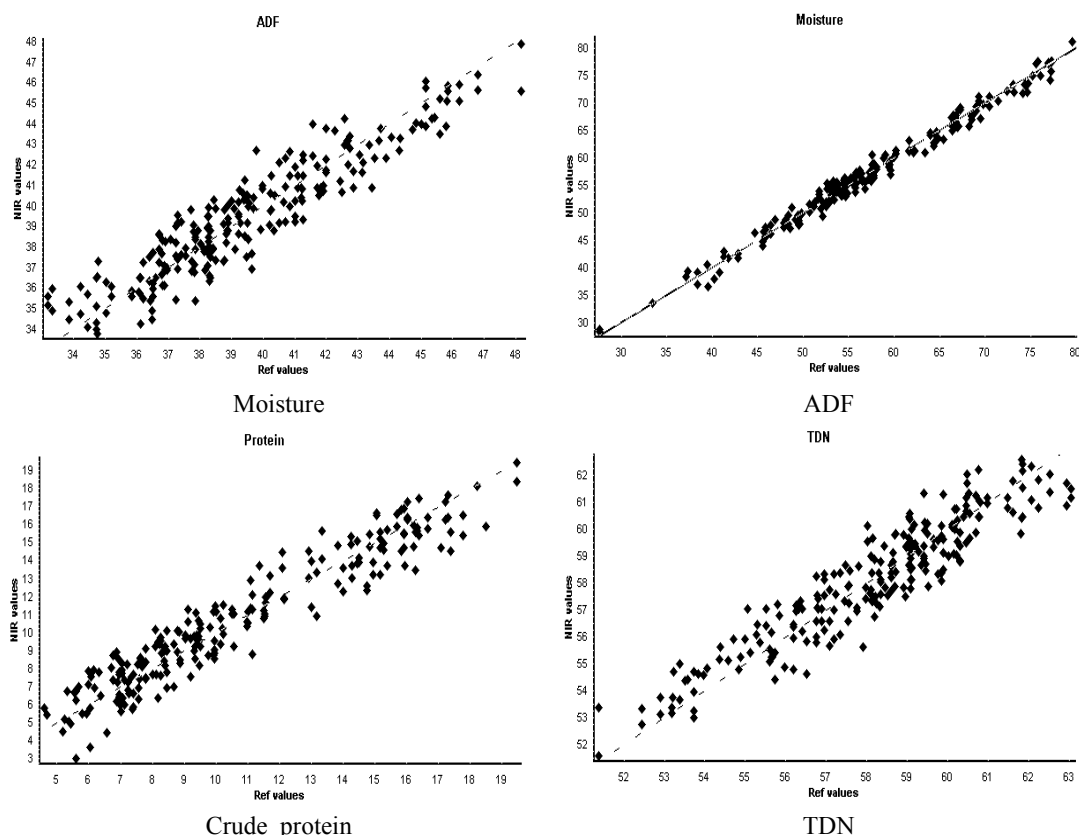


Fig. 6. Calibration Plot for moisture, ADF, crude protein and TDN for Italian ryegrass silages.

Table 3. Validation result between Master NIR calibration and cross validation vs Host NIR statistics for moisture, crude protein, NDF, ADF, ash, pH, lactic acid, TDN, RFV and error between two instruments of Italian rye grass silages

	n	Master NIRs (650~2,500 nm)			Host NIRs (1,400~2,400 nm)		
		SEC	R ²	SECV	SEC	R ²	SECV
Moisture (%)	224	0,778	0.993	1.316	1.223	0.984	1.612
Crude Protein (%)	219	0.834	0.950	1.163	1.144	0.907	1.506
NDF (%)	234	1.416	0.916	2.453	1.987	0.835	2.453
ADF (%)	230	0.987	0.905	1.531	1.157	0.866	1.699
Ash (%)	223	0.669	0.822	1.120	0.698	0.767	1.163
pH	224	0.444	0.850	0.601	0.499	0.808	0.634
Lactic acid (%)	226	0.187	0.918	0.278	0.209	0.896	0.287
TDN (%)	221	0.757	0.898	1.222	0.901	0.866	1.323
RFV	235	3.730	0.878	5.332	4.291	0.834	5.641

* SEC : Standard error of calibration,
 *** SECV : Standard error of cross validation.

** R² : Coefficient of determination of calibration

선분광기로 현장에서 신속하게 품질을 평가할 수 있는 것으로 판단되었다.

적 요

본 연구는 종래의 실험실 및 연구용 근적외선 분광분석기를 보급형 현장용 다수의 장비를 이용하여 신속하게 현장에서 조사료의 품질 평가의 예측 정확성을 평가하기 위하여 3년간 전국에서 수집된 이탈리아인 라이그라스 사일리지 241점을 이용하여 연구용 장비 Unity Model 2500X에 구축된 Database를 활용하여 현장용 보급형 장비 Unity Model 1400에 맞춰 Database를 업데이트 하고 검량선을 작성 한 후 검량선 이설 알고리즘을 사용하여 검량선 이설결과 연연구용 장비와 거의 동일한 수준의 결과로 0.000%~0.343%로 의 차이로서 현장에서 신속하게 NDF, ADF 및 조단백, 조회분등의 화학적 성분 및 수분, pH 젖산의 발효품질, 그리고 TDN, RFV의 조사료 품질 평가치를 실험실 수준과 같이 5분내에 동시에 분석 할수 있는 결과를 얻었다. 하지만 3년 동안 얻어진 검량선 작성용 시료는 유기적인 시료이므로 지역적 년도별 차이를 가져올 수 있다. 이는 향후 모집단에 의한 지속적인 검량식의 업데이트 및 Database 관리기법이 실험실 분석 및 이를 이용 검량식을 유지 관리 할수 있는 중앙 Control Center 의해서 관리되어야 지속적인 현장 분석이 가능하다는 것을 강력히 시사한다. 현장분석기라 하더라도 조사료 같은 농산물은 계속 변화하는 성질을 가지고 있으므로 현장분석시 변위를 쉽게 파악하여 이를 신속히 보강 하지 않으면 장기적인 분석이 되지 않는다. 그동안 여러 근적외선 분광법의 연구들이 이루어져 왔지만 현장에서 직접 사용할 수 없었을 뿐 아니라 지속성의 결여로 장비들이 잘 활용되지 않고 있었다. 조사료 같은 농산물 등은 단기적으로 맞지만 불과 1년

정도가 지나면 분석결과가 상당히 신뢰성이 결여되어 활용도가 떨어지는 현실이다. 결론적으로 조사료의 향후 계속적인 시료의 보강과 모집단 분석을 이용한 체계적인 관리 및 시료의 확충방식을 직관적으로 할 수 있는 GD(Global Distance) 및 ND(Neighbour Distance) 기법의 신호등 방식으로 손쉬운 한글화된 운영체제를 사용하게 된다면 향후 효과적인 분석을 수행할 수 있어 이에 대한 여러 기대효과가 예상되어진다. 마지막으로 동일 목적으로 다수의 장비를 운영할 경우 장비마다 동일한 시료가 동일한 결과가 나올 수 있도록 하는 기법 및 손쉽게 검량식을 작성 할 수 있는 프로그램과 작성된 검량식을 장비에 직접 기존의 컴퓨터 Network에 연결 전송하고 관리하는 Network 기능이 필수적이라 할 수 있겠다.

인 용 문 헌

1. Abrams, S. M., Shenk, J. S., Harpster, H. W. 1988 Potential of near infrared reflectance spectroscopy for analysis of silage composition. *Journal of Dairy Science*, 71. 1955-1959.
2. ANKOM Technology. 2005a. Method for determining neutral detergent fiber. ANKOM Technology, Fairport, NY. http://www.ankom.com/09_procedures/procedures2.shtml. Accessed May 8, 2005.
3. ANKOM Technology. 2005b. Method for determining acid detergent fiber. ANKOM Technology, Fairport, NY. http://www.ankom.com/09_procedures/procedures1.shtml. Accessed May 8, 2005.
4. AOAC. 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
5. Edward, V. Thomas. 1994. A Primer on

- Multivariate Calibration. J. Analytical Chemistry Vol. 66 No.15 :795A-804A.
6. Fussel, R. J., McCalley, D. V. 1987. Determination of volatile fatty acids (C2-C5) and lactic acid in silage by gas chromatography. *Analyst*. 112:1213-1216.
 7. Goering, H. K. and Van Soest, P. J. 1970. Forage Fiber Analysis. *Agric. Handb.* 379. US Department of Agriculture, Washington, DC.
 8. Chung Hoe-Il and Hyo-Jin Kim, 2000. Near-Infrared Spectroscopy: Principles. *ANALYTICAL SCIENCE and TECHNOLOGY*. 13(1):1-14.
 9. Norris, K. H., Barnes, R. F., Moore, J. E., Shenk, J. S. 1976. Predicting forage quality by near infrared reflectance spectroscopy. *J. Anim. Sci.* 43, 889-897.
 10. Park, H. S., Lee, J. K., Lee, H. W., Kim, S. G., Ha, J. K. 2006. Prediction of the Digestibility and Energy Value of Corn Silage by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *J. Korean Grassl. Sci.* 26. 45-52.
 11. Shenk, J. S. and Westerhaus, M. O. 1991. Population definition, sample selection, and calibration procedures for near infrared Reflectance spectroscopy. *Crop Sci.* 31, 469-474.
 12. Shenk, J. S. and Westerhaus, M. O. 1996. Calibration the ISI way. In: Davies, A. M. C., Williams, P., *Near Infrared Spectroscopy. The Future Waves.* NIR Publications, West Sussex, UK. 198-202.
 13. Stuth, J. W., Jama, A. and Tolleson, D., 2003. Direct and indirect means of predicting forage quality through near infrared reflectance spectroscopy. *Field Crops Research* 84. 45-56.
 14. Williams, P. C. 1987. Variables affecting near-infrared reflectance spectroscopic analysis. In: Williams, P., Norris, A.(Eds.), *Near-infrared Technology in the Agricultural and Food Industries.* American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, p. 143-167.