

식품의 근적외선 반사분광분석법에서 균질의 정도가 흡광도에 미치는 영향 및 수학적 처리방법에 관한 연구

오은경*, Dieter Grossklaus

독일 연방보건연구원

*건국대학교 동물자원연구센터

Influence of the homogenizing grade and mathematical treatment on the determination of ground beef components with near infrared reflectance spectroscopy

Eun-Kyong Oh*, Dieter Grossklaus

Bundesgesundheitsamt in Berlin, Germany

*Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University

Abstract

This study was conducted to determine the effect of the homogenizing grade of sample on absorbance of near infrared reflectance spectrophotometer with which chemical compositions of food were rapidly and effectively analyzed. By the mathematical treatment of absorbance values standard error of prediction was reduced as follows. 1. The absorbance values of various samples ground for the same periods of time were calibrated before or after treatment with first or second derivative in an attempt to accurately predict the components of samples ground for the different periods of time. The standard error of prediction for moisture content were 1.478%, 0.658% and 0.580%, respectively, those for fat content 0.949%, 0.637% and 0.527%, respectively, and those for protein content 0.514%, 0.493% and 0.394%, respectively. Calibration of absorbance values after second derivative treatment showed the highest accuracy in predicting sample components. 2. The absorbance values of various samples ground for the different periods of time were calibrated before or after treatment with first or second derivative in order to accurately predict the components of samples ground for the different periods of time. The standard error of prediction for moisture content were 1.026%, 0.589% and 0.568%, respectively, and those for protein content 0.860%, 0.557% and 0.399%, respectively. The standard error of prediction were lower in the order of calibrations before and after first and second derivative treatments. As a result, calibration of absorbance values after second derivative treatment showed higher accuracy regardless of grinding time of samples.

Key words: near infrared reflection, mathematical treatment

서 론

시료입자의 크기와 흡광도와와의 관계는 근적외선 분광 분석시 자주 논의되는 문제중의 하나이다. 일반적으로 흡광도가 높지않는 물질에서는 그 반사율이 물질의 입자가 작을수록 증가하여 거꾸로 흡광도로 나타내면 그 값이 감소한다. 이러한 현상은 입자가 작을수록 그 산란율이 증가하여 분말속에 빛이 침투되는 깊이가 감소하는 것에 기인된다¹⁾. 시료속에 빛이 침투되는 두께의 평균값이 작아짐에 따라 빛의 흡광도도 낮아진다. 이러한

현상은 물질의 성분내용을 알고 있을 때 근적외선 반사분광을 이용하여 분말제품의 입도를 판명할 수 있는 가능성에 이용되고 있다²⁾. 분말시료는 균질의 정도를 체의 mesh수로서 규정지을 수 있으며 따라서 일정한 수준의 균질된 시료를 제조할 수 있으나 분쇄기의 종류나, 원료의 정도에 따라 흡광도의 변이가 나타남이 보고되고 있다^{3, 6)}.

반면 액상의 시료는 충분히 균질된 상태로 제조할 수 있으므로 흡광도 측정에 문제가 거의 없다.

위에서 언급된 시료의 조직특성과는 반대로 정육과 肉제품의 시료에 있어서는 일정한 균질도를 가진 표면 조직을 제조하는 것이 매우 어렵다. 肉의 연하면서도 탄력적인 물성과 인대 등의 결체조직으로 인해 균질도의 표준화가 불가능하다. 따라서 측정된 흡광도는 수분, 단

Corresponding author: Eun-Kyong Oh, Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University, 93-1 Mojin-Dong, Seongdong-Ku, Seoul 133-701, Korea

백질, 지방 등의 화학성분의 변화이외에도 그 균질정도에 따라 커다란 변화를 초래하여 성분측정의 정확성을 감소시키게 된다.

본 실험에서는 근적외선 반사 스펙트럼을 이용한 肉제품의 성분측정에 있어서 calibration에 이용되는 시료의 세절도에 따른 흡광도를 수학적으로 처리하여 검량선을 산출함으로써 비교적 균질도가 낮은 시료의 성분 함량 예측시 정확성의 증가를 검토하였다.

재료 및 방법

재료

독일 시중에서 판매되는 직경 2~3 mm인 chopper plate를 통과한 같은 쇠고기를 구입하여 다시 직경 1.5 mm의 구멍이 뚫린 plate를 장착한 실험실용 chopper를 통과시킨 것을 기초 균질시료로 한후 세절기(Moulinette, Moulinex Co., France)에 넣어 추가로 10, 20, 30, 40, 50, 60 및 75초간 세절하여 균질도를 달리한 시료를 조제하였다.

분석방법

일반성분분석은 독일 연방공화국 §35 LMBG에 따라 수분(건조법)⁽⁷⁾, 단백질(켈달법)⁽⁸⁾ 및 지방(숙슬렛추출법)⁽⁹⁾ 함량을 측정하였다.

근적외스펙트럼 측정에는 InfraAlyzer 500 scanning spectrophotometer(Brann + Luebbe, Germany)를 사용하여 1100~2500 nm까지 2 nm 간격으로 측정된 흡광도를 $\log 1/R$, 1차 미분 및 2차 미분변화시킨 흡광도는 각각 $d \log 1/R$ 과 $d^2 \log 1/R$ 값으로 나타내었다. 흡광도를 측정하기 위하여 용기(open cup)에 시료를 담은뒤 표면조직을 얇은판으로 매끈하게 깎아내는 전처리를 행하였다.

표준화 및 정확성 검토

기존 분석법에 의해 측정된 시료의 성분함량을 독립 변수로하고 특정한 파장에서 흡수된 $\log 1/R$ 값인 흡광도를 종속변수로하여 다중직선 회귀계수를 산출하였다.

$$C = B_0 + B_1R_1 + B_2R_2 + \dots + B_nR_n$$

C = 성분함량

B_0 = 절편

$B_1 \dots B_n$ = 회수계수

$R_1 \dots R_n$ = $\log 1/R$

각 성분측정을 위한 회귀계수 및 파장의 선택은 단계적 회귀분석법을 선택하였으며 그 원리는 다음과 같다^(10,11).

어떤 파장에서의 흡광도가 특정한 성분함량과 고도의 상관관계로 입증되면 그 파장을 회귀방정식에 도입한다. 같은 방식으로 몇개의 파장을 회귀방정식에 선택한 후 서로 그 상관성의 정도를 비교한 후 가장 상관관계의 정도가 낮은 파장은 회귀방정식으로부터 제거된다.

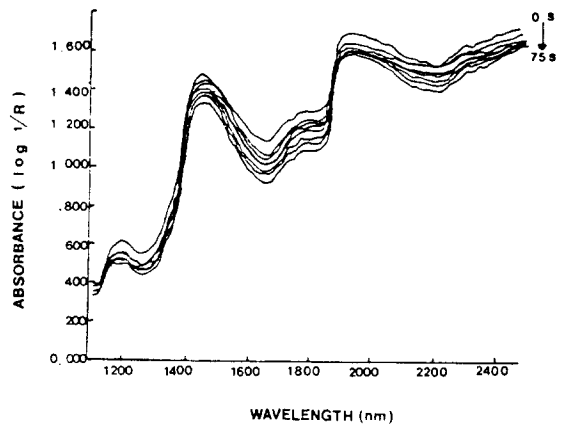


Fig. 1. Near infrared reflectance spectra of homogenized beef ground for the different periods of time (0~75 sec.)

이 회귀방정식으로 기기를 표준화시킨 후 미지의 시료로서 그 성분함량을 예측함으로써 근적외분석법의 정확성을 검토하였다.

회귀분석의 평가에 이용한 Standard Error of Estimate(SEE)와 Standard Error of Prediction(SEP)의 산출식은 아래와 같다.

$$SEE = \frac{\left[\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2 \right]^{1/2}}{n - m - 1}$$

d_i = 표준법의 분석치와 근적외분석치와의 차이

\bar{d} = d_i 의 평균치

m = 근적외분석에 이용된 파장의 수

n = 시료의 수

$$SEP = \frac{\left[\sum_{i=1}^n (d_i - \bar{d})^2 \right]^{1/2}}{n - 1}$$

결과 및 고찰

Moulinette에서 20초 정도 세절후 시료는 이미 상당히 균질화된 것으로 보였으며 그후 계속 세절함에 따라 균질정도가 높아졌다. 균질시간이 오래 경과함에 따라 시료의 물성은 연해졌는데 이것은 세절중에 시료의 품온이 올라가는 것에 기인되며 시료의 품온이 내려감에 따라 시료의 물성은 다시 단단해졌다. 20초 이상 균질한 시료는 육안으로 판단하기에 그 후의 균질정도에 관계없이 거의 비슷한 것으로 나타났다.

결체조직의 함량이 높은 시료는 그 함량이 낮은 시료보다 균질도가 현저히 낮았으며 세절후의 표면조직은 매우 거칠었다.

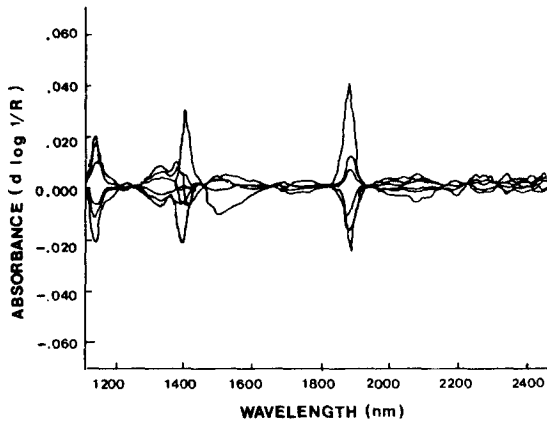


Fig. 2. Difference spectra with the mean value subtracted from each first derivative data of homogenized beef ground for the different periods of time (0~75 sec.)

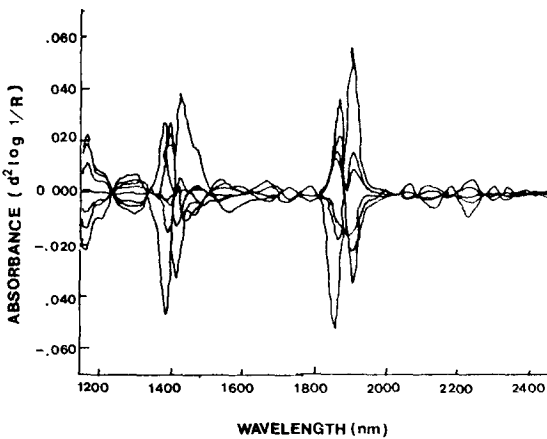


Fig. 3. Difference spectra with the mean value subtracted from each second derivative data of homogenized beef ground for the different periods of time (0~75 sec.)

세절정도가 다른 정육의 근적외선 흡광도의 log 1/R 값을 Fig. 1에 나타내었으며 흡광도를 1차 미분한 d log 1/R 값을 각각 계산한 후 d log 1/R의 평균을 뺀 差 스펙트럼을 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 3은 2차 미분한 2차 差 스펙트럼을 d² log 1/R로 나타낸 것이다. Fig. 2와 3에서는 세절도가 흡광도에 미치는 영향이 큰 파장범위와 그렇지 않은 파장을 명확히 보여주고 있다.

이러한 균질도의 차이에 의한 흡광도의 변이를 1차 미분 또는, 2차 미분 등의 수학적처리로서 보정한 2차 회귀계수를 산출하여 calibration에 이용한 결과는 다음과 같다.

세절시간이 일정한 시료의 calibration(C₁)

Table 1과 같은 성분분포를 가진 34점의 쇠고기정육

Table 1. Chemical component of beef samples for calibration

Component	Mean(%)	Range(%)	Standard deviation
Moisture	67.6	57.2~75.3	4.65
Fat	10.4	2.3~26.3	5.65
Protein	20.4	15.6~22.4	1.21

시료를 구입하여 Moulinette에서 30초간 같은 후 온도의 범위를 20~25°C로 유지하며 1100~2500 nm 범위의 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 log 1/R, d log 1/R 및 d² log 1/R로 변형시킨 후 각각의 data로 회귀 계수를 산출하여 검량식을 작성하였다. Prediction을 위하여 10점의 정육시료를 재료 및 방법에서 설명한 시료준비과정에 의해 각각 8단계의 세절도로 처리함으로써 총 80개의 균질도의 변이가 큰 prediction시료군으로 만들었다.

Table 2는 각각의 검량식으로 기기를 표준화시킨 후 prediction 시료군에 대한 정확성을 검토한 결과이다. 표에서 보는 바와 같이 수분, 지방 및 단백질 함량측정 모두 d² log 1/R을 이용한 다중직선회귀가 가장 낮은 SEP를 보였고, 그 다음 d log 1/R, log 1/R의 순으로 나타났다.

일반적으로 수분, 지방 및 단백질함량 측정을 위하여 2차 미분을 이용할 경우 7개의 파장이 필요하였으며 그 이외에는 약 10개 정도의 파장이 calibration에 필요하였다.

세절시간이 다른 시료의 calibration(C₂)

Calibration에 이용되는 시료의 세절도를 다양하게 함으로써 예측의 정확도를 높일 수 있음은 분말시료에 있어서 입도가 근적외 분광분석의 정확성에 미치는 영향의 연구⁽¹²⁾에서 보고된 바 있으며, 특히 이 실험에서와 같이 예측에 이용되는 시료의 세절시간이 0~75초로서 매우 광범위하므로 세절시간이 다양한 시료를 calibration에 이용하여 앞에서의 실험결과와 비교하고자 한다. 34점의 쇠고기 정육시료는 Moulinette에서의 세절시간을 0, 10, 20, 30 및 40초로 구분하여 균질하였으며 온도의 범위는 20~25°C로 일정하게 유지하였다. C₁과 같은 방법으로 흡광도를 수학적으로 변형시켜 calibration한 후 앞의 실험에서 prediction에 이용된 시료를 분석한 결과는 Table 3에서 나타난 바와 같다. Table 2의 결과와 마찬가지로 모든 성분함량측정에 있어서 흡광도의 2차 미분치로 계산한 calibration이 가장 낮은 SEP 값을 나타냈으며 그 다음 1차 미분, 무변형의 순으로 나타났다. Table 2와 3의 결과를 좀더 구체적으로 비교하기 위하여 각각의 calibration에 이용된 파장의 수와 SEP를 Table 4에 나타내었으며 선택된 파장은 Table 5에 정리하였다.

Table 4의 calibration 1과 calibration 2에 의한 결과를

Table 2. Results of calibration and validation for beef ground for 30 seconds

	log 1/R ¹⁾		d log 1/R ²⁾		d ² log 1/R ³⁾	
	Wavelength (nm)	Regressions-Coefficient	Wavelength (nm)	Regressions-Coefficient	Wavelength (nm)	Regressions-Coefficient
W A T E R	Intercept	31.69	Intercept	64.36	Intercept	73.56
	2497	121.47	1767	-740.26	1722	137.76
	1949	-1348.41	1815	-1601.35	2162	732.07
	1917	1248.83	1783	448.12	2030	-444.15
	SEE	1.031	SEE	0.469	SEE	0.471
	SEP	1.478	SEP	0.658	SEP	0.580
F A T	Intercept	23.86	Intercept	-0.34	Intercept	5.21
	2325	-367.68	2315	351.15	2274	282.93
	2309	355.99	1691	-246.26	1710	-217.49
	SEE	0.638	SEE	0.466	SEE	0.421
	SEP	0.949	SEP	0.637	SEP	0.527
	P R O T E I N	Intercept	27.05	Intercept	14.40	Intercept
1505		-66.74	1767	-640.28	2190	-442.03
2449		-52.21	1671	-1086.61	2158	-681.29
1873		-34.84	1375	103.27		
2165		146.49	1791	729.68		
			2159	-803.72		
	SEE	0.448	SEE	0.326	SEE	0.484
	SEP	0.514	SEP	0.493	SEP	0.394

¹⁾Raw data, ²⁾The first derivative, ³⁾The second derivative

Table 3. Results of calibration and validation for beef ground for 0 to 40 seconds

	log 1/R ¹⁾		d log 1/R ²⁾		d ² log 1/R ³⁾	
	Wavelength (nm)	Regressions-Coefficient	Wavelength (nm)	Regressions-Coefficient	Wavelength (nm)	Regressions-Coefficient
W A T E R	Intercept	52.94	Intercept	77.60	Intercept	81.57
	2225	763.64	1663	922.23	1722	307.71
	2249	-831.00	1811	-1492.93	1910	90.19
	2241	81.83	2323	-240.55	1526	623.55
					1690	552.06
		SEE	0.742	SEE	0.519	SEE
	SEP	1.026	SEP	0.589	SEP	0.568
F A T	Intercept	20.75	Intercept	-5.02	Intercept	-1.40
	2213	-129.19	1223	730.75	2298	-164.70
	2385	528.25	2303	-356.14	1218	-143.36
	2437	-409.73				
	SEE	0.491	SEE	0.448	SEE	0.555
	SEP	0.828	SEP	0.639	SEP	0.602
P R O T E I N	Intercept	22.94	Intercept	19.18	Intercept	24.29
	2165	-184.91	1767	-546.04	2190	-471.65
	1877	-84.80	1819	1909.80	2158	-744.72
	2409	-46.32	1663	-2036.75		
	1509	-59.66	1687	447.32		
			2483	300.62		
	SEE	0.447	SEE	0.380	SEE	0.477
	SEP	0.860	SEP	0.557	SEP	0.399

¹⁾Raw data, ²⁾The first derivative, ³⁾The second derivative

Table 4. Influence of mathematical treatment of raw reflectance data on SEP in beef of different homogenizing time using low- or high-variance nomogenizing grade calibration samples

Component	Low-variance homogenizing grade = C ₁		
	log 1/R	d log 1/R	d ² log 1/R
water	1.478(3) ¹⁾	0.658(3)	0.580(3)
Fat	0.949(2)	0.637(2)	0.527(2)
Protein	0.514(4)	0.493(5)	0.394(2)
	High-variance homogenizing grade = C ₂		
	log 1/R	d log 1/R	d ² log 1/R
Water	1.026(3)	0.589(3)	0.568(4)
Fat	0.828(3)	0.639(2)	0.602(2)
Protein	0.860(4)	0.557(5)	0.399(2)

¹⁾number of wavelengths used for prediction

Table 5. Wavelengths(nm) selected for near infrared reflectance measurement in beef of low- or high-variance homogenizing grade after treatment with second derivative

Component	Selected wavelengths	
	Low-variance homogenizing grade	High-variance homogenizing grade
Water	1722, 2162, 2030	1722, 1910, 1526, 1690
Fat	2274, 1710	2298, 1218
Protein	2190, 2158	2190, 2158

비교해 보면 log 1/R을 이용한 calibration에 있어서는 수분함량과 지방함량측정에 있어서 세절도가 다양한 시료의 calibration 즉, C₂에 의한 prediction의 결과가 정확성이 높았고 반대로 단백질 함량측정에 있어서는 그 정확성이 낮았다.

또한 흡광도를 1차 미분 또는 2차 미분하여 calibration한 경우에는 시료의 세절도가 다양한 경우와 일정한 경우의 차이가 거의 나타나지 않았다.

Table 5를 보면 흡광도의 2차 미분치로 calibration한 결과, C₁과 C₂ 모두 각 성분함량과 상관성이 아주 높은 파장이 우선적으로 선택되어졌음을 알 수 있다. 즉, 단백질분자에 기인한 N-H combination 진동은 2190 nm에서 나타나며 1710 nm 및 2298 nm의 흡수대는 C-H combination 및 overtone으로 추정할 수 있다.^{13, 15)} 이러한 결과는 균질도가 다양한 소맥분시료에 있어서 2차 미분치로서 Calibration한 Norris 등¹²⁾의 보고와도 일치하였다. 또한 Norris¹²⁾와 Lanza¹⁶⁾는 한 파장의 2차 미분값을 또다른 파장의 2차 미분값으로 나눈 수치 즉,

$$\frac{d^2 \log 1/R_1}{d^2 \log 1/R_2}$$

의 값을 calibration에 도입함으로써 가장 좋은 결과를

얻었다고 보고하였다. 그러나 정육시료를 대상으로한 Lanza의 위와같은 수학적변형에 의한 결과는 본실험에서 2차 미분을 이용한 단백질 함량측정식에 나타난 SEP가 0.394인데 비하여 0.57로서 그 정확성이 낮았다.

이상의 결과는 정육시료의 높은 수분함량의 결과로 나타나는 강한 흡광도 때문에 calibration에 이용된 시료의 세절도가 흡광도에 미치는 영향은 건조시료에 비해서 상대적으로 낮아지는 것을 보여주었다. 그러므로 흡광도를 2차 미분으로 변환시켜 작성한 calibration을 이용하여 세절도가 다양한 시료의 성분함량을 근적외선 분광분석하므로써 calibration을 위한 시료의 세절도의 다양성에 관계없이 결과의 정확성이 높아졌다.

요 약

신속 간편법으로서 식품의 성분함량 측정에 이용되는 근적외 반사분광분석에서 문제가 되고있는 시료의 균질도의 차이가 흡광도에 미치는 영향을 조사하고 흡광도로 나타난 수치를 수학적으로 처리함으로써 예측의 오차는 다음과 같이 감소하였다.

1. 세절도가 일정한 시료의 흡광도를 무변형, 1차 미분 및 2차 미분하여 calibration한후 세절도가 다양한 시료의 성분을 예측한 결과 예측오차(standard error of prediction)는 수분함량에 있어서 1.478%, 0.658% 및 0.580%, 지방함량의 예측오차 0.949%, 0.637%, 및 0.527%이었으며 단백질 측정시 각각 0.514%, 0.493% 및 0.394%로 2차 미분의 예측오차가 모든 성분측정에서 가장 낮음을 알 수 있었다.

2. 세절도가 다양한 시료의 무변형, 1차 미분 및 2차 미분치로한 calibration을 이용하여 세절도가 다양한 시료의 성분을 예측한 결과 수분함량 예측오차는 각각 1.026%, 0.589% 및 0.568%, 지방함량 예측오차는 각각 0.828%, 0.639% 및 0.602% 이었으며 단백질함량 예측오차는 0.860%, 0.557% 및 0.399%로서 역시 2차 미분, 1차 미분, 무변형의 순으로 정확성이 높았다.

결과를 종합할 때 흡광도를 수학적으로 처리하여 calibration에 이용하므로써 calibration시료의 세절도에 관계없이 측정결과의 정확성은 높아졌다.

문 헌

1. Kortim, G.: Reflexionsspektroskopie. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, p.25(1969)
2. Clurzak, E.W., Torlini, R.P. and Demkowicz, M.P.: Determination of particle size of pharmaceutical raw materials using NIR spectroscopy. *Spectroscopy*, 1(7), 36 (1986)
3. Hunt, W.H., Fulk, D.W. and Thomas, T.: Effect of type of grinder on protein-values of hard red winter wheat when analyzed by infrared reflectance devices. *Cereal Food World*, 23(3), 143(1978)

4. Osborne, B.G., Douglas, S. and Fearn, I.: Assessment of wheat grain texture by NIR measurement on Bühler-Milled flour. *J. Sci. Food Agric.*, **32**, 200(1981)
5. Osborne, B.G., Douglas, S.D., Fearn, T. and Willis, K. H.: The development of universal calibrations for measurement of protein and moisture in UK home-grown wheat by NIR analysis. *J. Sci. Food Agric.*, **33**, 736(1982)
6. Nadai, B.T.: Preliminary experiments for measuring meat composition by near infrared reflection technique. *Acta Alimentaria*, **12**, 119(1983)
7. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG: Bestimmung der Trockenmasse im Fleisch und Fleischerzeugnissen. L 06.00/3(1980)
8. Bestimmung des Gesamteiweißgehaltes im Fleisch und Fleischerzeugnissen. L 06.00/7(1981)
9. Bestimmung des Gesamtfettgehaltes im Fleisch und Fleischerzeugnissen. L 06.00/6(1980)
10. Zurmuel, R.: Praktische Mathematik fuer Ingenieure and Physiker. Verl. Springer, Berlin-Heidelberg, p.386 (1965)
11. Bandermann, F.: *Auswertung von Maßdaten*. Ullmans Encyklopädie der technischen Chemie; Band 5: *Analysen- und Meßverfahren*, verl. Chemie, Weinheim, p. 41(1980).
12. Norris, K.H. and Williams, P.C.: Optimization of mathematical treatments of raw near infrared signal in the measurement of protein in hard red spring wheat; 1. Influence of particle size. *Cereal Chem.*, **61**, 158 (1984)
13. Kaye, W.: Near-infrared spectroscopy; A review 1. Spectral identification and analytical applications. *Spectrochim. Acta*, **6**, 257(1954)
14. Gddu, R.F. and Delker, D.A.: Spectra-structure correlations for the near-infrared region. *Annal. Chem.*, **32**, 140(1960).
15. Fraser, R.D.B.: Interpretation of infrared dichroism in fibrous proteins; the 2 μ m region. *J. Chem. Phys.*, **24**, 89(1956)
16. Lanza, E.: Determination of moisture, protein, fat and calories in raw pork and beef by NIR-spectroscopy. *J. of Food Sci.*, **48**, 471(1983)

(1992년 2월 13일 접수)