

## 近赤外分光分析法과 Micro-Kjeldahl 法 間의 麥酒보리 種實의 蛋白質含量 分析 比較

金炳鎬 · 徐得龍 · 徐亨洙\*

## Comparisons between Micro-Kjeldahl and Near Infrared Reflectance Spectroscopy for Protein Content Analysis of Malting Barley Grain

Byung Joo Kim · Duck Yong Suh and Hyung Soo Suh\*

**ABSTRACT** : Near Infrared Reflectance Spectroscopy(NIRS) has been used as a tool for the rapid, accurate, protein assay of malting barley. NIRS used in this study was filter type instruments, Neotec 102. The objective of this study was to obtain the best calibration equation, for the rapid, ease and accurate protein content analysis of malting barley using NIRS system.

The optimum wavelength for protein content analysis used NIRS were 2095nm, 2095/1941nm, 2095/1941/2282nm, 2095/1941/2282/2086nm, respectively. Mean protein content with this calibration equation in NIRS analysis was 10.59%, while 10.60% in Micro-Kjeldahl one. The range of protein content in Micro-Kjeldahl was 8.66~12.66% and that in NIRS was 8.80~12.35%.

When 18 other varieties produced in 1992 were analysed with 2095nm, 2095/1941nm, 2095/1941/2282nm, 2095/1941/2282/2086nm equation, standard deviation of difference(SDD) and standard error of performance(SEP) and  $R^2$  values were 0.47, 0.43, 0.95, respectively. Both the mean protein content by Micro-Kjeldahl and by NIRS was 10.25%.

With this equation, analysed 31 varieties produced in 1993, SDD and SEP and  $r$  values were 0.69, 0.67, 0.91, respectively, and that bias value was 0.65. In this analysis, mean protein content by Micro-Kjeldahl was 10.17% and by NIRS was 10.81%. The range of protein content in Micro-Kjeldahl was 7.58~14.29%, What that in NIRS was 8.63~13.93%.

After adjusted bias in the best calibration equation, mean protein content of Micro-Kjeldahl was 10.17% and that of NIRS was 10.09%, without variance of SDD, SEP and  $r$  values.

**Key word** : Malting barley, Protein content, NIRS

麥酒보리는 香氣가 좋고 蛋白質含量이 낮은 것  
을 要求한다. 蛋白質은 麥酒의 釀造過程에서 poly-

phenol化合物과 結合하여 흰 앙금을 誘發하므로  
含量이 낮은 品種이 有利하며<sup>12)</sup> 蛋白質含量이 높으

\* 嶺南作物試驗場(Yeongnam Crop Expt. Station, Milyang, Gyeongnam 627-130, Korea)

〈'94. 8. 12. 接受〉

면 抽出획득량이 낮을 뿐만 아니라 麥芽汁의 濾過가 힘들며 貯藏性이 불량해진다.

그러므로 麥酒보리에 있어서 蛋白質含量은 다른 作物보다 品質面에서 더욱 重要的 要因이 될 뿐만 아니라 國際 競爭力 提高를 위하여도 高品質인 麥酒보리의 開發이 育種의 重要的 目標가 되고 있다<sup>11,13)</sup>.

蛋白質含量 分析은 주로 Micro-Kjeldahl法을 利用하여 왔으나 最近 近赤外分光分析計(NIRS; Near Infrared Reflectance Spectroscopy)를 利用한 分析方法이 널리 普及되고 있는 實情이다. 지금까지 利用되고 있는 Micro-Kjeldahl分析法은 多量의 系統을 短期間에 分析해야 하는 品種育種面에서는 效率性이 낮으므로 이러한 短點補完을 위해서는 近赤外分光分析法을 이용하는 것이 유리하다.

近赤外分光分析法の 檢量式 作成에는 計數檢量과 分析檢量으로 나눌 수 있으며 前者는 閉集團(closed population)에서 無作爲로 試料를 蒐集하여 定量하는 方法이고, 後者는 開集團(open population)에서 定量分析하는 方法이다. 近赤外分光分析法을 이용한 定量分析時에는 baseline 變動과 吸光度의 妨害 등이 存在하며 이러한 要因들은 數處理나 回歸分析 등으로 正確한 檢量式을 誘導할 수 있고 回歸分析의 種類에는 크게 多重回歸分析法(MLR)과 多重變形法(multivariate)이 있다.

近赤外分光分析法은 주로 飼料作物의 蛋白質, 水分 및 脂質分析에 利用되고 있으나<sup>2,4,8,10,14-16)</sup> 國內에서는 아직 들깨에서 利用한 報告가 있을 뿐<sup>6,11)</sup> 近赤外分光分析計를 利用한 檢量式을 報告한 것은 찾아보기가 힘들며 특히 NIRS Model Neotec 102를 利用하여 麥酒보리의 蛋白質檢量式 作成方法을 報告한 文獻은 찾지 못하였다.

本 試驗은 Micro-Kjeldahl法을 利用하여 麥酒보리의 蛋白質含量을 分析한 후 檢量式 作成을 위해 Micro-Kjeldahl分析法과 近赤外分光分析法을 相互 比較한 것이다.

## 材料 및 方法

이 試驗은 嶺南作物試驗場 田作圃場(덕평동)을

利用하여 遂行한 것으로서 供試品種은 사천 6호의 69品種이며 播種은 10a당 13kg을 1991年 10月 20日에 畦幅 40cm, 播幅 18cm로 條播하였고 施肥量은 10a당 질소-인산-카리를 10-8-8kg 水準으로 施肥하되 질소의 50%는 越冬 後 3月 5日에 追肥로 주었다.

分析用試料는 全 品種을 收穫脫穀하여 水分을 14% 이하로 乾燥시킨 후 穀粒크기가 2.5mm 이상인 것을 選別하여 利用하였으며 蛋白質含量分析은 Micro-Kjeldahl法으로 測定하였다. 70品種 중 52品種은 4個의 檢量式 作成을 위하여 利用하였고, 나머지 18品種은 4個의 檢量式 중 最適 檢量式과 Micro-Kjeldahl法과의 相關關係 算出을 위하여 利用하였다.

이렇게 作成된 檢量式의 適正性을 再確認하기 위해 1993년 同一 圃場에서 生産된 麥酒보리 31品種에 대한 蛋白質含量을 Micro-Kjeldahl法으로 分析하여 얻은 成績과 相互 比較 分析하여 그 相關關係를 推定하였다. 蛋白質含量 分析에 利用한 NIRS의 機種은 Filter-type의 Neotec 102(1901~2320nm)이고 檢量式 作成은 重回歸(MLR; multiple linear regression) 方法을 利用하였으며, 作成된 4個의 檢量式 중에서 가장 適切한 檢量式을 選擇 利用하였다. 本 試驗에서 利用된 蛋白質含量 算出 方法은;

$$\text{蛋白質含量(\%)} = K_0 + K_1(\log_1) + K_2(\log_2) + K_3(\log_3) + K_4(\log_4)$$

에 의해 算出하였고 각 試料에 대한 吸光度는 Beer's의 法則에 의한  $A = \log 1/R$ 이며 2차 微分된 境遇는  $(\log/R)d\lambda^2$ 로 測定하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 蛋白質含量의 檢量式 作成

'92年度에 生産된 麥酒보리 70品種의 蛋白質含量을 Micro-Kjeldahl法으로 測定한 結果 蛋白質含量의 分布는 8.66%에서 12.66%의 變異幅을 나타내었으며 供試된 70品種중 52品種은 檢量式을 作成하는데 利用하고 나머지 18品種은 檢量式으로

推定値를 얻기 위하여 活用하였다. 檢量式 作成方法중에서 가장 높은 相關을 나타낸 것은 MLR方式이었으며 52品種에 대한 分析成績을 2차 微分하여 얻은 calibration의 結果는 表 1과 같다.

이같은 성적은 Burdick 等<sup>1)</sup>도 분석성적을 2차 微分하게 되면 N-point smooth한 狀態로 檢量式을 作成하는 것보다 훨씬 誤差가 적다고 報告한 바도있다. 이 表에서 보는 바와 같이 4個의 各 檢量式에 대한 分析 結果 2095/1941/2282/2086nm의 4波長으로 構成된 檢量式에서 標準誤差(SEC)가 0.33으로 낮았으며 決定係數(R<sup>2</sup>)도 0.95로서 가장 높았는데 이를 回歸式으로 나타내면 그림 1과 같고 各 試料들의 波長에 대한 重相關과 敏感度를 나타내면 그림 2와 같다.

Table 1. Determination coefficients(R<sup>2</sup>), best mathematical treatment, and wavelength need to equation development for protein analysis of malting barley

| NO. | DN | Wavelength          | SEC  | R <sup>2</sup> |
|-----|----|---------------------|------|----------------|
| 1   | 2  | 2095                | 0.34 | 0.94           |
| 2   | 2  | 2095/1941           | 0.33 | 0.95           |
| 3   | 2  | 2095/1941/2282      | 0.33 | 0.95           |
| 4   | 2  | 2095/1941/2282/2086 | 0.33 | 0.95           |

DN=Difference number(2=second derivative)  
 SEC=Standard error of calibration  
 R<sup>2</sup>=Coefficient of multiple determination

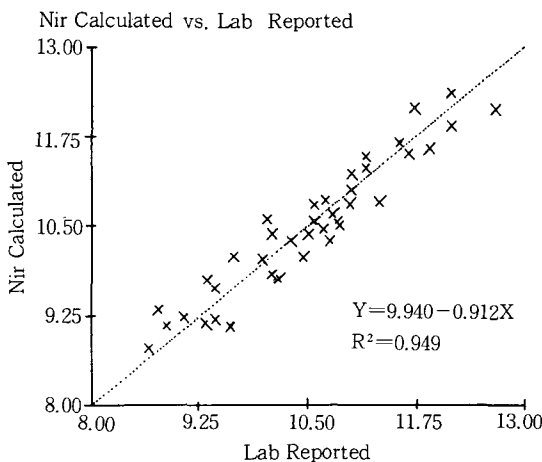


Fig. 1. The curve obtained by plotting values derived from the NIRS and Micro-Kjeldahl results.

2095/1941/2282/2086nm의 檢量式으로 分析된 蛋白質含量과 Micro-Kjeldahl分析법에 의한 蛋白質含量의 分布範圍는 表 2와 같으며 NIRS에 의한 蛋白質含量의 平均은 10.59%이고, 分布範圍는 8.80%에서 12.35%까지 였다.

따라서 이들 52品種을 利用하여 作成된 各各의 檢量式으로써 같은 年度에 生産된 나머지 18品種을 分析한 結果 (표 3), 蛋白質含量의 平均은 Micro-Kjeldahl法이 10.25%였고 NIRS의 2095/1941/2282/2086nm 波長으로 構成된 檢量式에서 測定한 것이 10.25%로서 동일한 數値를 나타내었으며 實驗標準誤差(SEP)도 0.43으로써 가장 낮은 값을 나타내었다. 또한 이들 두 分析方法間의 單純 相關(r)도 0.95로서 가장 높은 값을 나타내었다.

이러한 結果는 Klepper와 Wilhelm<sup>5)</sup>, 그리고 Loffler와 Busch<sup>7)</sup>가 밀의 두 生育段階別로 蛋白質含量을 測定한 結果 單純相關이 各各 0.82~0.97,

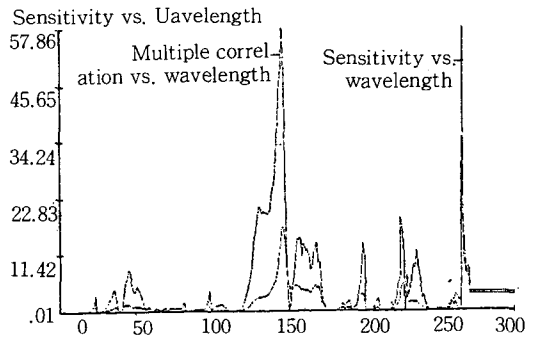


Fig. 2. Multiple correlation vs. wavelength and sensitivity vs. wavelength for the 2095/1941/2282/2086nm calibration equation.

Table 2. Comparisons of coefficient of multiple determination, means and range values between Micro-Kjeldahl and NIRS protein analysis of 52 malting barley varieties

| Determination coefficient (R <sup>2</sup> ) | Protein content(%) |       |            |            |
|---|--------------------|-------|------------|------------|
|   | Mean               |       | Range      |            |
|   | Kjeldahl           | NIRS  | Kjeldahl   | NIRS       |
| 0.949                                       | 10.60              | 10.59 | 8.66~12.66 | 8.80~12.35 |

Table 3. Validations of percent predict for each calibration equation with 18 varieties harvested in 1992

| Calibration equation(nm.) | Lab       | Predicted | SDD  | SEP  | r    | Bias      | Slope |
|---------------------------|-----------|-----------|------|------|------|-----------|-------|
|                           | $\bar{X}$ | $\bar{X}$ |      |      |      |           |       |
| 2095                      | 10.25     | 10.24     | 0.50 | 0.46 | 0.94 | -.127E-01 | 1.71  |
| 2095 /1941                | 10.25     | 10.27     | 0.43 | 0.43 | 0.95 | -.211E-01 | 1.15  |
| 2095 /1941 /2282          | 10.25     | 10.24     | 0.46 | 0.43 | 0.95 | -.137E-01 | 1.15  |
| 2095 /1941 /2282 /2086    | 10.25     | 10.25     | 0.47 | 0.43 | 0.95 | -.314E-01 | 1.19  |

SDD=Standard deviation of difference, r=Simple correlation, SEP=Standard error of performance

Table 4. Validations for the best calibration equation with 31 varieties harvested in 1993

| Protein content (%) |            |       |            |      |      |      |      |      |
|---------------------|------------|-------|------------|------|------|------|------|------|
| Kjeldahl            |            | NIRS  |            | SDD  | SEP  | r    | B    | S    |
| Mean                | Pr         | Mean  | Pr         |      |      |      |      |      |
| 10.17               | 7.58~14.29 | 10.81 | 8.63~13.93 | 0.69 | 0.67 | 0.91 | 0.65 | 1.13 |

r=Simple correlation, B=Bias  
S=Slope, Pr=Percent range

0.88~0.93이었다는 報告와 비슷한 傾向이었다.

이상의 結果에서 表 3의 2095/1941/2282/2086nm 波長으로 構成된 檢量式이 가장 適切한 것으로 推定되었다.

## 2. 年次間 未知試料의 蛋白質含量에 의한 檢量式 再檢定

위에서 言及한 바와 같이 '92年度에 生産된 品種間의 蛋白質含量은 高度의 有意성이 認定되어 Micro-Kjeldahl分析法 대신 NIRS 分析으로도 可能하게 되었으나 이 檢量式으로 生産年度가 다른 未知의 試料들에 대한 利用 可能性을 檢討하기 위해 蛋白質含量을 다시 Micro-Kjeldahl法으로 分析한 후 '92年度에 生産된 試料로서 作成된 2095/1941/2282/2086nm의 檢量式으로 '93年度에 生産된 試料 31品種들의 蛋白質含量을 分析한 結果(表 4), Micro-Kjeldahl法의 平均은 10.17%였고, 分布範圍는 最低 7.58%에서 最高 14.29%였으며 NIRS法의 平均은 10.81%, 分布範圍는 最低 8.63%에서 最高 13.93%까지 分布하였다. 이 境遇 差의 標準誤差(SDD)는 0.69, 實驗의 標準誤差

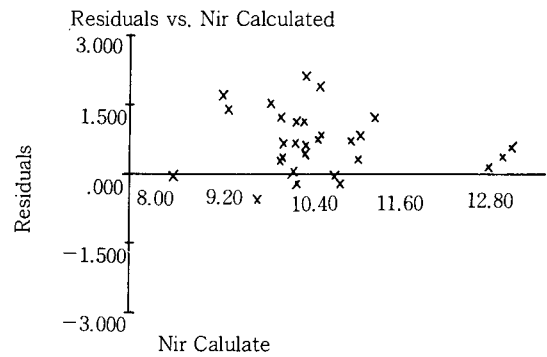


Fig. 3. Scattergram of residuals vs NIRS calculated before adjusted bias.

(SEP)는 0.67를 나타내었다. 또한 두 分析法간의 單純相關(r)은 0.91로써 高度의 有意성이 認定되었으며 同一年度에 生産된 18品種들과의 檢定에서 나타난 값(表 3)보다는 SDD나 SEP값이 높고 單純相關인 r값이 낮았는데 이것은 de Ruiter와 Burns<sup>3)</sup>가 報告한 結果와 비슷한 傾向을 나타내었다. 한편 bias값은 2095/1941/2282/2086nm의 檢量式일 境遇 -.314E-01로서 거의 0에 가까웠으나 表 4에서는 0.65로서 bias의 차이가 크게 나타났는데 Marten 等<sup>9)</sup>은 NIRS 分析에 있어서의 bias값은 큰 意味를 가지지 않는다고 보고한 바 있다.

한편 表 4의 bias값들에 대한 NIRS와 Micro-Kjeldahl法 간의 相互關係는 그림 3에서 보는 바와 같이 蛋白質含量의 分布가 위로 偏倚되어 있었다.

또한 表 5와 그림 4는 bias값을 0에 가깝도록 矯正해 준 것이며 Marten 等<sup>9)</sup>이 言及한 것처럼 bias를 矯正하기 前이나 矯正한 후, 差의 標準誤差(SDD), 實驗의 標準誤差(SEP), 單純相關(r) 값들은 變하지 않았으나 이 境遇 bias값은 0.65에서

Table 5. Validations for the best calibration equation after adjusted bias with 31 varieties harvested in 1993

| Protein content (%) |                |       |                |      |      |      |           |
|---------------------|----------------|-------|----------------|------|------|------|-----------|
| Kjeldahl            |                | NIRS  |                | SDD  | SEP  | r    | B         |
| Mean                | Pr             | Mean  | Pr             |      |      |      |           |
| 10.17               | 7.58~<br>14.29 | 10.09 | 7.90~<br>13.20 | 0.69 | 0.67 | 0.91 | -.835E-01 |

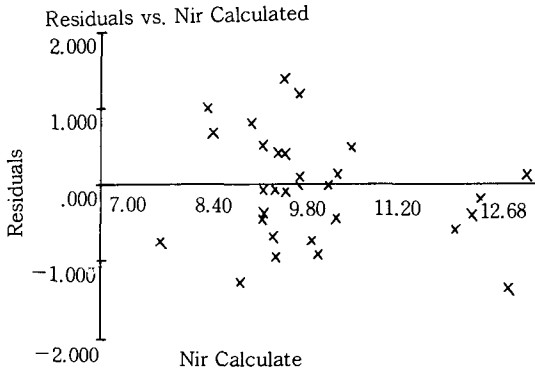


Fig. 4. Scattergram of residuals vs. NIRS calculated after adjusted bias.

-.835E-01로 줄어 들었으며 Micro-Kjeldahl법으로 분석한 평균 단백질함량 10.17%에 가까운 10.09%를 나타내었다.

이상의 결과로 미루어 2095/1941/2282/2086 nm의 검량식은 생산年度가 다른 未知의 試料들과도 高度의 有意相關이 認定되었으므로 NIRS分析法은 實用性이 높다 하겠으며 이 중 bias값을 矯正해 주었을 때 r값은 변하지 않았으나 단백질함량의 평균은 Micro-Kjeldahl법과 類似한 평균값을 나타내어 bias값을 矯正해 주면 더욱 正確한 分析을 할 수 있을 것으로 생각되었다.

## 摘 要

麥酒보리 品質에서 重要한 成分인 蛋白質함량을 NIRS를 利用하여 迅速하고 正確하게 分析하기 위해 最適의 檢量式 作成에 관한 一連의 試驗을 實施

한 結果는 다음과 같다.

1. Micro-Kjeldahl法에 의해 분석한 단백질함량을 이용하여 作成된 NIRS의 檢量式중 2095/1941/2282/2086nm 波長으로 構成된 檢量式에서 決定係數( $R^2$ )가 0.95로서 가장 높았다.
2. NIRS의 2095/1941/2282/2086nm 波長으로 構成된 檢量式으로 '92年度에 生産된 18品種을 分析한 結果 SDD가 0.47, SEP가 0.43, r이 0.95로서 매우 優秀하였으며 平均 蛋白質함량도 Micro-Kjeldahl法の 10.25%와 同一하였다.
3. NIRS의 2095/1941/2282/2086nm 波長으로 構成된 檢量式으로 '93년에 生産된 未知의 試料 31品種을 Micro-Kjeldahl法과 比較分析한 結果 SDD가 0.69, SEP가 0.67, r(simple correlation)이 0.91이었다.
4. 本 試驗에서 作成된 NIRS의 檢量式을 利用할 境遇 Micro-Kjeldahl 分析値와 r값이 0.91로서 高度의 有意性이 認定되었으며 bias값을 補正해 주면 蛋白質함량의 平均값이 Micro-Kjeldahl法과 매우 近接된 값을 얻을 수 있어서 麥酒보리 育種의 初期世代에서 短期間 多量의 系統을 分析할 수 있을 것으로 期待되었다.

## 引用文獻

1. Burdick, D., Franklin E. Barton, and Billy D. Nelson. 1981. Prediction of bermudagrass composition and digestibility with a near-infrared multiple filter spectrophotometer. *Agron J.* 73:399-403.
2. Coleman, S. W., F. E. Barton, and R. D. Meyer. 1985. The use of near infrared reflectance spectroscopy to predict species composition of forage mixture. *Crop Sci.* 25:834-837.
3. de Ruiter, J. M. and J. C. Burns. 1987. Cell wall carbohydrates of flaccidgrass plant part. Near infrared reflectance spectroscopy determination, rate, and extent of fermentation. *Crop Sci.* 27:1069-1076.

4. Hymowitz, T., J. W. Dudley., F. I. Collins, and C.M.Brown. 1974. Estimation of protein and oil concentration in corn, soybean, and oat seed by near-infrared light reflectance. *Crop Sci.* 14:713-715
5. Klepper, L. and Kenneth Wilhelmi. 1980. Comparison between Kjeldahl and near infrared protein analysis on vegetative and head samples of wheat. *Crop Sci.* 20:923-925.
6. 李正日, 方鎮淇, 李奉鎬, 金光鎬. 1990. 들깨遺傳資源의 蛋白質含量과 아미노산 造成. 韓作誌. 35(5):449-463.
7. Loffler, C. M. and R. H. Busch. 1982. Determination of protein percentage of wheat vegetation at two growth stages by infrared reflectance. *Crop Sci.* 22:167-168.
8. Marten, G. C., G. E. Brink, D. R. Buxton, J. L. Halgerson, and J. S. Hornstein. 1985. Near infrared reflectance spectroscopy analysis of forage quality in four legume species. *Crop Sci.* 25:1179-1182.
9. Marten, G. C., J. I. Halgerson, and D. A. Sleper. 1988. Near infrared reflectance spectroscopy evaluation of ruminal fermentation and cellulose digestion of diverse forages. *Crop Sci.* 28:163-167.
10. Marten, G. C., J. L. Halgerson and J. H. Cherney. 1983. Quality prediction of small grain forages by near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Sci.* 23:94-96.
11. 南重鉉, 李段燮, 洪丙熹, 金基駿. 1990. 보리蛋白質의 特性和 地域間의 變異. 韓作誌. 35(5):387-395.
12. 朴容陣. 1989. 麥酒麥 種實에 있어서 phenol化合物의 造成 및 proantocyanidins 蓄積部位에 관한 研究. 서울대 碩士學位論文.
13. Scholz, F. 1984. Some results with cross-bred desendants of induced high protein mutants in barley, IAEA. *Cereal grain protein improvement* 111-116.
14. Shenk, J. S., I. Landa, M. R. Hoover, and M. O. Westerhaus. 1981. Description and evaluation of a near infrared spectro-computer for forages and grain analysis. *Crop Sci.* 21:355-358.
15. Philip, C. W. 1975. Application of near infrared reflectance spectroscopy to analysis of cereal grains and oil seeds. *Cereal Chem.* 52:561-576.
16. Windham, W. R., J. A. Robertson, and R. G. Leffler. 1987. A comparison of methods for moisture determination of forages for near infrared reflectance spectroscopy calibration and validation. *Crop Sci.* 27:777-783.