

흑자색미의 C3G 색소함량 신속 예측모델 개발

류수노[†] · 양종진 · 박순직

한국방송통신대학교 자연과학대학 농학과

Development of Rapid Prediction Model of C3G Content in Black Pigmented Rice

Su-Noh Ryu[†], Jong-Jin Yang, and Sun-Zik Park

Department of Agricultural Science, Korea National Open University, Seoul 110-791, Korea

ABSTRACT : It has been reported that Cyanidin 3-Glucoside (C3G) of the black pigmented rice was as the high anti-oxidency and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). However, the analysis of C3G by HPLC is needed long pre-treated steps, so development of methods with simple pre-treated steps is needed in order to breed rices with high C3G contents. The analysis of components using near infrared reflectance (NIR) is well known as non pre-treated and nondestructive. C3G contents of Hengjinjubyeo × Suwon425 F₁₀ 385 lines were used in order to develop C3G content prediction model in pigmented rice using FT-NIR. The results of C3G content of FT-NIR compared with HPLC were showed that the equation was $f(x) = 0.9427x + 34.0430$, R^2 , standard error of calibration was 0.943, 0.116 and those of validation was 0.928, 0.122, respectively. This prediction model will be able to be used for analyzing C3G contents in black pigmented rice.

Keywords: black pigmented rice, C3G, FT-NIR, HPLC

식생활이 서구화되고 다양화됨에 따라 생리적, 기능적 측면에서 천연색소의 역할은 새롭게 평가되고 있다. 유색미 중 흑자색미에 많이 함유된 anthocyanin은 폐놀계 화합물로서 동물체내에서 항산화, 항염, 항암 및 심혈관 질병의 예방과 치료 효과 등을 나타내는 것으로 보고되고 있다 (Osawa, 1995; Wang *et al.*, 1997). 유색미에서 anthocyanin의 대부분은 C3G로 구성되어 있으며(Park *et al.*, 1998), C3G의 항산화능력이 anthocyanin의 다른 구성 성분보다 뛰어난 것으로 확인되었다 (Wang *et al.*, 1997). 따라서 C3G 함량이 높은 쌀은 소비량이 감소하고 있는 우리나라에서 쌀의 이용 범위를 확대하는데 기여할 것으로 기대된다.

현재까지 유색미에서 C3G 함량 분석은 주로 HPLC를 이용하였다(Park *et al.*, 1998; Ryu *et al.*, 2000; Park *et al.*,

2000; Ryu *et al.*, 2002). HPLC 분석법은 유색미에서 용매를 이용하여 C3G를 여러 단계를 거쳐 추출하여 분석하는 방법으로, 분석결과는 정확하나 분석하기 위한 복잡한 전처리를 거쳐야 하므로 많은 양의 시료를 빠르게 분석하는 데는 적합하지 않다. NIR을 이용한 분광분석법은 물질이 각기 특정한 파장의 빛만을 흡수하는 성질을 이용하여 분석하는 방법이다. NIR을 이용한 C3G 함량의 분석은 시료를 분쇄하고 추출하는 과정없이 현미 상태로 빠르게 분석가능하다. 따라서 분석할 시료수가 많고 더욱이 적은 시료량으로 여러 성분을 함께 분석하고자 할 때는 NIR 기기로 분석한 뒤 다른 분석이 가능하며, 특히 많은 시료를 전처리없이 빠르게 분석할 수 있으므로 쌀, 콩 등 식품을 비롯한 다양한 분야에 쓰이고 있다(Norris, 1989; Velasco *et al.*, 1996).

본 연구의 목적은 NIR 분광분석법을 흑자색미의 C3G 함량 분석에 이용할 수 있도록, FT-NIR을 이용한 흑자색미의 C3G 분석의 예측값과 HPLC 측정값의 정확도를 비교하여 흑자색미의 C3G 함량 예측 모델을 개발하는 것이다.

재료 및 방법

분석 재료

본 연구에 사용된 시료는 국내 육성된 흑자색미 중 C3G 함량이 가장 높은 흑진주벼와 수원425를 교배하여 얻은 F₁₀ 385 계통을 이용하였다. 시료는 2004년 경기도 수원시에 위치한 작물과학원 수도육종과 포장에서 재배하였고, 작물과학원 표준 재배법에 따라 재배하여 수확하였다.

HPLC를 이용한 C3G 함량 분석

흑자색미에 함유된 안토시아닌 색소의 추출은 곱게 분쇄된 현미가루 2g을 0.1% Trifluoroacetic acid(TFA)-95% Ethanol 용매 20ml로 3시간씩 3회에 걸쳐 상온에서 반복 추출하였다. 추출액을 여과지(Whatman No. 2)를 이용하여 여과한 후 회전감압농축기로 농축하였으며, 최종 25 ml로 정량하여 분석하

[†]Corresponding author: (Phone) +82-2-3668-4631 (E-mail) ryusn@knou.ac.kr

였다.

흑자색미에 함유된 C3G 함량 분석은 HPLC(Waters 510 pump, millipore gradient controller, Waters 480 UV-Vis detector)를 이용하였다. 컬럼은 ODS-5(4.6 mm × 250 mm, Nomura Chemical Co., Japan)를 사용하였고, 검량파장은 530 nm이었으며, 이동상으로 0.1% TFA in water, liner gradient, 0.1% in Acetonitrile을 사용하였고 유속은 1.0 ml/min이었다. 본 실험의 모든 시약은 HPLC용 시약을 사용하였다(Park *et al.*, 1998).

FT-NIR을 이용한 C3G 함량 분석

흑자색미의 NIR spectrum을 측정하기 위하여 FT-NIR 분광 분석기(FT-NIR N-200, Buchi, Switzerland)를 이용하였다. 1,000 nm~2,500 nm의 파장 영역에서 2 nm 간격으로 스펙트럼을 측정하였으며, FT-NIR의 운영 프로그램인 NIRLabWare (FT-NIR N-200, Buchi, Switzerland)를 이용하였다. 흑자색현미 종자를 3 cm petridish에 2 cm 높이로 취하여 시료에 광선을 각각 3회 주사하였고 측정된 간섭파장을 FT(Fourier Transform) 변환을 통하여 스펙트럼으로 저장하였다.

C3G 함량 예측 모델 개발

흑자색미 중의 C3G 함량 예측 모델을 개발하기 위하여 전체 스펙트럼의 65%를 교정부로, 35%를 검증부로 사용하였다. 교정부와 검증부의 스펙트럼은 중복하여 사용하지 않았으며, 검증부의 스펙트럼은 교정부 영역의 95% 이상을 포괄하도록 분포시켰다. C3G 함량 예측 모델은 부분최소자승법(Partial Least Squares; PLS)을 이용하여 개발하였다. 다중회귀모델의 개발을 위하여 수처리 프로그램인 NIRCal 4.21(FT-NIR N-200, Buchi, Switzerland)을 사용하였다. 개발된 모델의 평가는 교정부 오차(Standard Error of Estimation, SEE), 검증부 오차(Standard Error of Prediction, SEP), SEE와 SEP의 상관식인 Consistency, 회귀계수(Regression Coefficient), 검증부의 편차(Validation Bias)를 이용하였다. 또한, NIRCal 4.21 (FT-NIR N-200, Buchi, Switzerland)의 기능인 Q-value(Quality Value)를 이용하여 가장 우수한 모델을 선정하였다.

결과 및 고찰

HPLC를 이용한 흑자색미 C3G 함량 분석

NIR 분석값과 비교하기 위해 HPLC를 이용하여 흑자색미의 C3G 함량을 측정하였다. 흑진주벼와 수원425호를 교배하여 얻은 F₁₀ 계통을 분석한 결과, C3G 함량은 0~2,400 mg/100 g 현미의 다양한 함량변이를 보였다. 분석에 이용한 집단은 C3G가 높은 계통만을 선발하여 세대진전한 교배집단으로, 교배모본인 흑진주벼의 함량(500 mg/100 g 현미)보다 높은 1,000 mg/100 g 현미 이상의 계통을 분석하였다.

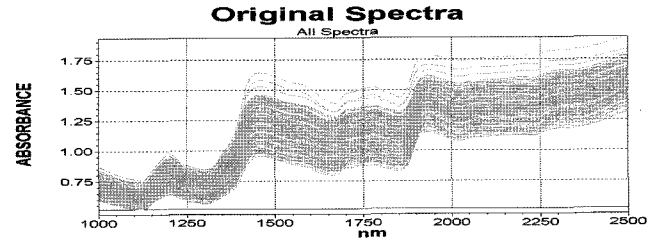


Fig. 1. FT-NIR spectrum of F₁₀ lines in the cross of Heugjinjubyeo × Suwon425.

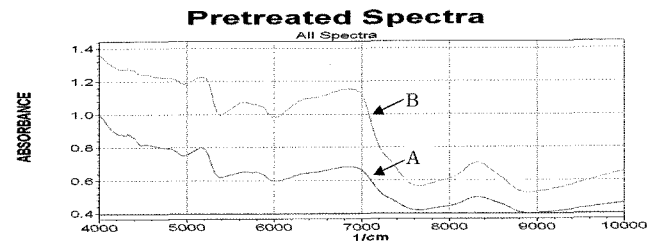


Fig. 2. FT-NIR spectrum of high and low C3G content in black pigmented rice. A : 2,000 mg/100 g rice bran, B : 10 mg/100 g rice bran

Table 1. C3G content prediction model in black pigmented rice

Calibration- R^2	Validation- R^2	SEE	SEP	Consistency
0.943	0.928	0.116	0.122	94.686

FT-NIR을 이용한 흑자색미 C3G 함량 분석 및 예측모델 개발

FT-NIR을 이용한 흑자색미의 C3G 함량 분석은 소량의 시료를 현미상태로 측정 가능하였다. FT-NIR을 이용하여 흑자색미를 측정된 스펙트럼은 Fig. 1, 2와 같다. NIR 파장의 빛이 시료에 닿아 C-H, C-O와 같은 구조에서 흡수되고 산란, 반사한 광선을 detector가 감지하여 흡수한 양을 측정한다. C3G 함량이 높은 흑자색미는 광원에서 나온 NIR을 흡수하는 양이 많아 반사되는 광의 양이 적게 발생하였다(Fig. 2).

흑자색미의 C3G 함량을 예측하기 위하여 측정된 결과값을 HPLC 분석 결과값과 비교하여 NIRCal 4.21 프로그램으로 부분최소자승법(PLS)을 이용한 다중회귀모델을 개발하였다. 총 385개의 시료 중 임의의 276개 스펙트럼을 이용하여 흑자색미의 C3G 함량 예측 모델을 개발하였으며, 나머지 109개의 스펙트럼을 이용하여 모델의 적합성을 검증하였다. 개발한 모델은 1,000~2,500 nm의 파장 영역에서 스펙트럼 전처리인 다분산 보정과 Smoothing으로 처리한 모델이 가장 우수한 예측 성능을 보였다(Table 1). 모델의 검량식은 $f(x) = 0.9427x + 34.0430$ 으로 구해졌고, 검량식은 평가에 주로 이용되는 검량식 결정계수(R^2)와 표준오차(SEE)가 각각 0.943, 0.116으로 예측정확도가 매우 높은 결과를 보였다(Table 1, Fig. 3).

개발된 모델에 대한 예측정확도를 판단하기 위해 교정부에

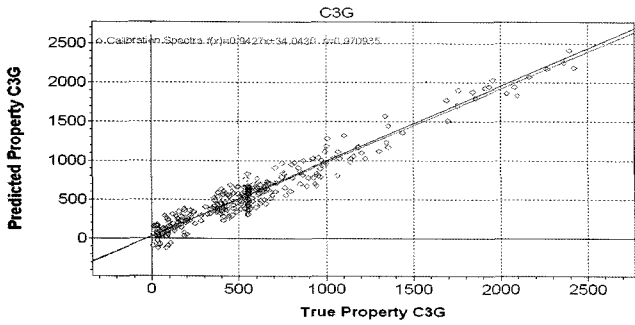


Fig. 3. Calibration curve of C3G content prediction model in pigmented rice.

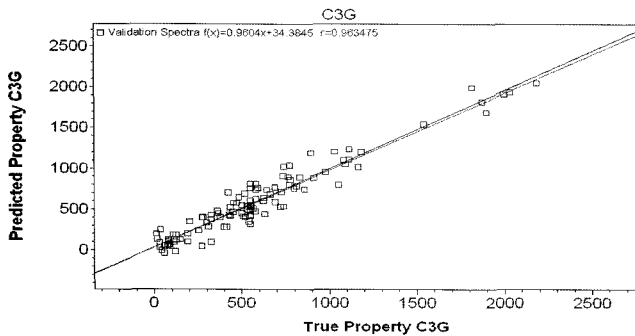


Fig. 4. Validation curve of C3G content prediction model in pigmented rice.

이용하지 않은 106개의 시료로 검정한 결과, R^2 는 0.928, SEP는 0.122로 나타나 HPLC 측정값과 FT-NIR 측정값 사이에는 매우 높은 정의 상관을 보이며 표준오차도 매우 적음을 알 수 있었다. 예측 모델의 Consistency는 94.686으로 나타나 교정부와 검증부의 변이가 유사함을 보였다(Table 1, Fig. 4).

적 요

흑자색미의 C3G 함량을 신속하게 분석하는데, FT-NIR을 이용한 C3G 함량 분석의 예측값과 HPLC 측정값의 정확도를 비교하였다.

1. FT-NIR을 이용한 C3G 함량 분석에서 사용된 시료는 별도의 전처리 과정없이 현미 상태 측정하여 HPLC 분석방법에

비하여 많은 시간과 비용을 아낄 수 있다.

2. 흑진주벼와 수원425호를 교배한 F₁₀ 385 계통을 사용하여 얻은 FT-NIR 검량식은 매우 높은 정상관을 보였다($R^2=0.943$, $SEE=0.116$). 이 검량식을 검증한 결과도 매우 높은 정상관을 보이고 실험오차도 매우 적어($R^2=0.928$, $SEP=0.122$) 측정정확도가 높게 평가되었다.

3. 본 연구의 결과, FT-NIR을 이용하여 비파괴적으로 신속하게 흑자색미의 C3G 함량을 측정할 수 있게 되었다. 그리고 본 연구의 결과를 C3G 함량이 높은 벼를 개발하는데 많은 양의 시료를 빠르게 분석할 수 있는 방법으로 이용할 수 있을 것이다.

인용문헌

Daun, J. K., K. M. Clear, and P. Williams. 1994. Comparison of three whole seed near-infrared analyzers of measuring quality components of canola seed. *JAOCS*. 71(10): 1063-1068.

Kim, Y.H., Kang, C.S., and Lee, Y.S., 2004, Quantification of tocopherol and tocotrienol content in rice bran by near infrared reflectance spectroscopy. *Korean J. Crop Sci.* 49(3): 211-215.

Osawa, T. 1995. Antioxidative defense systems present in higher plants, and Chemistry and function of antioxidative components. *Food & Food Ingredients J. of Jpn.* 163: 19-29.

Park, S.Z., J.H. Lee, S.J. Han, H.Y. Kim and S.N. Ryu, 1998, Quantitative analysis and varietal difference of cyanidin 3-glucoside in pigmented rice, *Korean J. Crop Sci.* 43(3): 179-183.

Ryu, S.N., S.J. Han, S.Z. Park and H.Y. Kim, 2000, Antioxidative activity and varietal difference of cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside contents in pigmented rice. *Korean J. Crop Sci.* 45(4): 257-260.

Ryu, S.N., S.Z. Park and .C.T Ho. 1998. High performance liquid chromatographic determination of anthocyanin pigments in some varieties of black rice. *Journal of Food and Drug Analysis.* 6(4): 729-736.

Ryu, S.N., S.Z. Park, S.S. Kang and S.J. Han. 2003. Determination of C3G content in blackish purple rice using HPLC and UV-Vis spectrophotometer. *Korean J. Crop Sci.* 48(5): 369-371.

Velasco, L., J. Fernandez-Martinez, and A.D. Haro. 1996. Screening dthiopian mustard for erucic acid by near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Sci.* 36: 1068-1071.

Williams, P.C., H.M. Cordeiro, and M.F.T. Harnden. 1991. Analysis of oat bran products by near intrared reflectance spectroscopy. *Cereal Foods World.* 36(7): 571-574.