

근적외 분광분석법을 이용한 녹차의 색도 분석

이민석* · 정명근**†

*아모레퍼시픽 (주)장원 설록차 연구소, **강원대학교 생약자원개발학과

Determination of Color Value (L, a, b) in Green Tea Using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy

Min-Seuk Lee* and Myoung-Gun Choung**†

*Sulloc Cha R&D Center, Amorepacific, Seogwipo 699-920, Korea

**Dept. of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-711, Korea

ABSTRACT Near infrared spectroscopy (NIRS) is a rapid and accurate analytical method for determining the composition of agricultural products and feeds. The applicability of near infrared reflectance spectroscopic method was tested to determine the color value (L, a, b) of green tea. A total of 162 green tea calibration samples and 82 validation samples were used for NIRS equation development and validation, respectively. In the developed NIRS equation for analysis of the color value (L, a, b), the most accurate equation for L value was obtained at 2, 8, 6, 1 (2nd derivative, 8 nm gap, 6 points smoothing, and 1 point second smoothing), and for a, and b value were obtained at 1, 4, 4, 1 (1st derivative, 4 nm gap, 4 points smoothing, and 1 point second smoothing) math treatment condition with SNVD (Standard Normal Variate and Detrend) scatter correction method and entire spectrum (400~2,500 nm) by using MPLS (Modified Partial Least Squares) regression. Validation results of these NIRS equations showed very low bias (L: 0.005%, a: 0.003%, b: -0.013%) and standard error of prediction (SEP, L: 0.361%, a: 0.141%, b: 0.306%) as well as high coefficient of determination (R^2 , L: 0.905, a: 0.986, b: 0.931). Therefore, these NIRS equations can be applicable and reliable for determination of color value (L, a, b) of green tea, and NIRS method could be used as a mass screening technique for breeding programs and quality control in the green tea industry.

Keywords : NIRS, green tea, color value

녹차는 동백나무과의 차나무(*Camellia sinensis* L.) 잎을 시기별로 채취하여 가공한 것을 말하는데, 이때 증기로 찌거나 뒤음으로써 polyphenol oxidase를 불활성화 시켜 발효를 방지한 불발효차이기 때문에 반발효차인 우롱차와 완전 발효차인 홍차 등과 구분하여 부른다(송 등, 2006).

녹차의 품질평가는 제품의 형상과 색상을 평가하는 외관 평가와 침출액의 색, 향기, 맛 등으로 결정되는 내질 평가에 의하며, 주로 관능적 평가에 의존하므로 검사시간, 검사방법, 검사자의 개인적 오차 및 편견 등으로 객관적, 혹은 일정한 결과를 얻기가 힘든 단점이 있다(Sohn *et al.*, 1988).

이러한 관능평가의 문제점을 보완하기 위하여 녹차의 품질에 관여하는 가공조건과 이화학적 성분연구를 통해 관능평가 결과와 녹차 함유성분과의 상관관계를 구명하려는 노력들이 진행되고 있으며, 일부 연구결과에 의하면 총질소, 유리 아미노산, 테아닌, 카테킨, 카페인 및 엽록소 함량 등이 품질과 밀접한 관련을 맺고 있는 성분으로 평가 되고 있다(Hou *et al.*, 1993; Lee & Yamaguchi, 1997; Park *et al.*, 2002). 특히 녹차에서 색상은 우롱차 및 홍차와 구별되는 녹차 고유의 기호성을 결정하고, 제품의 품질을 좌우하는 중요한 요소 중 하나로 평가되고 있다(Higuchi *et al.*, 2004).

근적외 분광분석법(Near-Infrared Reflectance Spectroscopy, NIRS)은 시료조제가 간단하고 다량의 시료를 신속하게 분석 할 수 있을 뿐만 아니라 다성분 동시분석도 가능하여 산업현장의 제품 품질평가에서 생산성을 높일 수 있는 분석방법으로 유용하게 사용되고 있다. 최근 녹차 산업에서도 NIRS를 이용하여 총질소, 아미노산, 카테킨, 카페인, 중성 섬유소 및 비타민 C 등의 주요성분을 분석하기 위해 다양한 검량식이 유도된 바 있다(Ikegaya, 1990; Goto, 1992;

†Corresponding author: (Phone) +82-33-570-6491
(E-mail) cmg7004@kangwon.ac.kr

<Received November 28, 2008>

Choi *et al.*, 2001; Chun & Choi, 2007).

녹차의 품질관련 특성평가 시 NIRS 분석방법을 이용할 경우 소량의 시료로 품질과 관련된 여러 성분을 동시에 신속, 간편하며 재현성 높은 분석을 수행할 수 있으므로 차나무 신품종 육성 연구나 다원에서 수확시기 결정을 위한 성분분석에 유용하게 사용할 수 있다.

따라서 본 연구는 녹차의 품질평가의 한 요인이 되는 색도평가 시 기존 평가방법인 육안평가 혹은 색차 분석에 의존하고 있는 현행 분석방법을 신속, 간편하며 재현성이 높고, 녹차 품질관련 기타 성분과 동시분석이 가능한 NIR System을 적용하여 색차 분석과 동시에 기타 녹차 품질관련 유용성분의 동시분석이 가능한 효율적 분석방법을 제공하여, 산업현장과 녹차관련 연구의 효율성을 증대하기 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

녹차 시료의 색차 분석

본 시험에 이용된 녹차는 제주특별자치도 소재 아모레퍼시픽그룹 (주)장원의 다원에서 2006~2008년도에 1번차 및 2번차 생산시기에 수확된 녹차 잎을 증기로 찌고, 뒤어서 표준가공법으로 생산된 녹차제품 244점을 이용하였다. 가공된 녹차는 분쇄기(Cyclotec 1093, Foss, Sweden)로 분쇄하고, 1.0 mm 이하의 분말로 사별하여 분석에 사용하였다. 색차 분석에 사용된 색차계는 일본 Minolta 사의 CR-400 모델을 이용하였고, 색차값은 Hunter's value인 L(lightness, 명도), a(redness, 적색도) 및 b(yellowness, 황색도)값으로 평가하여 분석 시료 당 3반복으로 측정하여 평균값을 사용하였다.

녹차 시료의 NIRS 스펙트럼 측정 및 스펙트럼 전처리

녹차 시료의 NIRS 스펙트럼 측정은 Foss사의 NIRs-XDS (USA)기종을 사용하였다. 색도 측정을 한 분말시료 약 3 g을 standard small ring cup에 넣고 근적외 분광분석기의 가시광선 및 근적외선 대역(400~2,500 nm)에서 흡광특성을 측정하였다. 근적외선 흡수 스펙트럼의 측정, 흡수 스펙트럼의 수처리 및 회귀분석은 WinISI II software(Ver. 1.50, Foss and Infrasoft International LLC, Stage College, PA, USA)를 이용하였다. 근적외 흡수 스펙트럼이 측정된 총 244점의 녹차 시료 스펙트럼 중 WinISI II software의 "score" 파일 작성을 통해 162점은 검량식 작성용(calibration set)으로 이용하였고, 나머지 82점은 예견치 분석용(validation set)

으로 구분하여 사용 하였으며, 색차계의 분석 결과와 검량식에서 얻은 분석치의 표준오차(SEC) 및 결정계수(R^2) 등을 비교 분석하여 검량식의 적용성을 평가하였다.

녹차 시료의 색차 분석을 위한 NIR 검량식 작성

녹차 시료 162점의 색도 분석치인 Hunter's L, a 및 b value에 대한 NIRS 검량식의 작성은 WinISI II software의 "Global Equation" 프로그램을 이용하였다. 측정된 스펙트럼의 원시($\log 1/R$), 1차 미분($D^1 \log 1/R$) 및 2차 미분($D^2 \log 1/R$) 스펙트럼을 대상으로 다양한 회귀분석법(PLS: Partial Least Squares, MPLS: Modified Partial Least Squares, MLR: Multiple Linear Regression)을 적용하여 최적의 검량식을 산출 하였고, 본 실험 결과 MPLS법에서 가장 좋은 결과를 도출할 수 있었다. 검량식 작성 시 산란보정(Scatter correction)은 SNVD(Standard Normal Variate and Detrend) 방법을 이용하였고(Shenk & Westerhaus, 1991), 최적의 검량식 선정은 SEC(Standard error of calibration), R^2 (Coefficient of determination), SECV(Standard error cross-validation) 및 1-VR(One minus the ratio of unexplained variance to total variance) 등의 통계치를 사용하였다(Windham *et al.*, 1989).

녹차 시료 색차 분석용 NIR 검량식의 예견치 분석

녹차 시료의 색차 분석용으로 작성된 NIRS 검량식의 미지시료 적용성을 검증하기 위해 검량식 작성에 사용하지 않았던 녹차 시료 82점을 대상으로 validation file을 작성하고, WinISI II software의 "Monitor Result" 프로그램을 이용하여 미지시료의 적용성을 검증하였다. 작성 검량식의 적용성 검증은 SEP(Standard error of prediction), r^2 , bias, RSD(Standard deviation of residual) 및 SEP/Mean(Standard error of prediction per mean) 등의 통계값을 이용하여 정확성을 검증하였다(Windham *et al.*, 1989).

결과 및 고찰

녹차의 색차 분석 및 NIRS 스펙트럼 검증

일반적으로 녹차 및 발효차의 색도를 비교하였을 때 가루 및 추출액의 색도는 모두 녹차에 비해 발효를 많이 시킨 차일수록 L값은 낮아지고, a 와 b값은 높아지는 경향을 나타낸다고 보고 하였다(Choi *et al.*, 2003). 녹차 제조과정 중 차 엽색의 변화는 증제차에서는 증열시간이 길어지면 L값은 조금씩 저하되고, a 및 b값은 약간 증가하는 경향을 보

이며(Ohmori *et al.*, 1986), 덩음차에서도 덩음 횟수의 증가에 따라 L값은 유의적으로 감소하고, b값은 증가하는 경향을 나타내는데, 이는 녹차 색도에 대한 관능검사 결과와 뚜렷한 상관관계가 있다고 보고된 바 있다(Jeon *et al.*, 1999). 본 시험에서는 다양한 계통의 녹차를 다양한 방법으로 가공하였으므로 녹차의 색도가 다양하게 변화된 양상을 확인할 수 있었고, 이들의 다양한 색도 차이를 이용하여 최적의 NIRS 검량식을 작성하고자 하였다.

색차계를 이용하여 분쇄된 녹차 시료의 색도(L, a, b)를 분석한 결과는 Table 1과 같고, 검량식 작성용 시료의 색도값은 L값이 평균 53.37(48.52~57.72), a값은 평균 -7.55(-10.02~-4.63), b값은 평균 18.07(14.00~22.02)을 나타내었으며, 각각의 표준편차는 1.32, 1.23 및 1.18을 나타내어 검량식 작성용 162개의 녹차 시료에 대한 색도의 변이가 존재함을 알 수 있었고, 시료집단 내에 존재하는 비교적 넓은 범위의 색차 변이가 NIRS 검량식 작성에 유리하게 작용할 것을 예측

할 수 있었다.

또한 작성된 NIR 검량식의 미지시료 적용성을 검증하기 위한 예견치 분석용 녹차 시료의 색도를 분석한 결과 L값이 평균 53.37(49.80~56.23), a값은 평균 -7.58(-9.71~-4.54), b값은 평균 18.13(15.23~21.37)을 나타내었으며, 검량식 작성용 시료의 집단과 매우 유사한 범위를 나타내었다.

녹차 시료 중 분석된 색차 값에 차이가 있는 시료의 NIRS 원시 스펙트럼(Log 1/R) 및 2차 미분 스펙트럼(D²log 1/R)을 Fig. 1 및 2에 나타내었다. 원시 스펙트럼에서는 L 및 b의 값이 낮은 시료가, a값은 높은 시료의 흡수 스펙트럼이 400~2,500 nm까지의 전 파장범위에서 높은 흡광력을 나타내는 것을 알 수 있고, 2차 미분 처리를 통해 baseline의 변동 요인을 제거한 후 스펙트럼을 비교한 결과 400~800 nm, 1,100~1,800 nm 및 1,940~2,450 nm 범위에서 색도의 차이에 따른 일정한 경향이 없이 파동에 따라 흡광력의 차이를 나타내었다. 검량식 작성에 이용된 녹차 시료 162계통의 총

Table 1. Laboratory reference value statistics for L, a, and b values in green tea.

Sample set	Color value	Mean	Range	SD
Calibration (n = 162)	L	53.37	48.52~57.72	1.32
	a	-7.55	-10.02~-4.63	1.23
	b	18.07	14.00~22.02	1.18
Validation (n = 82)	L	53.37	49.80~56.23	1.23
	a	-7.58	-9.71~-4.54	1.20
	b	18.13	15.23~21.37	1.18

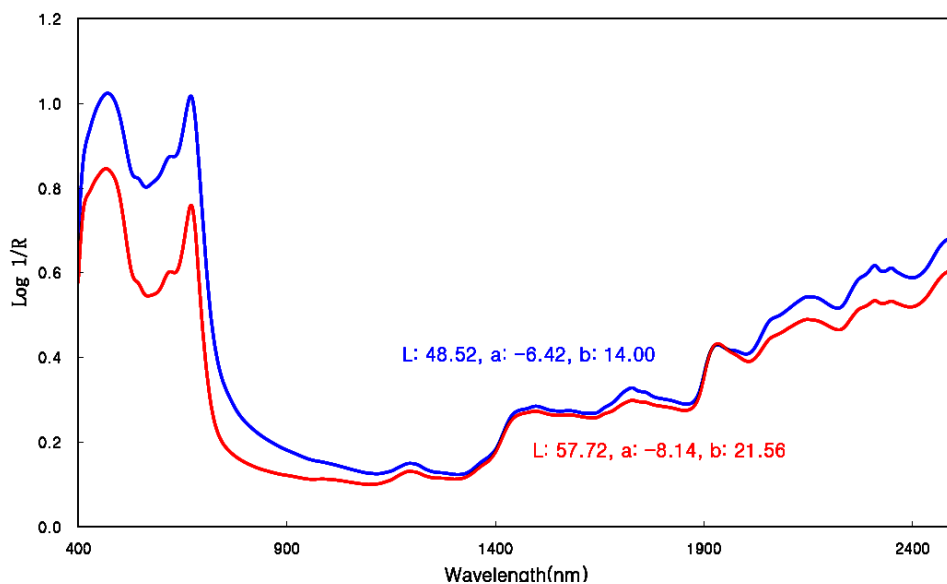


Fig. 1. Comparison on the raw spectra of NIRS with different color values in green tea powder.

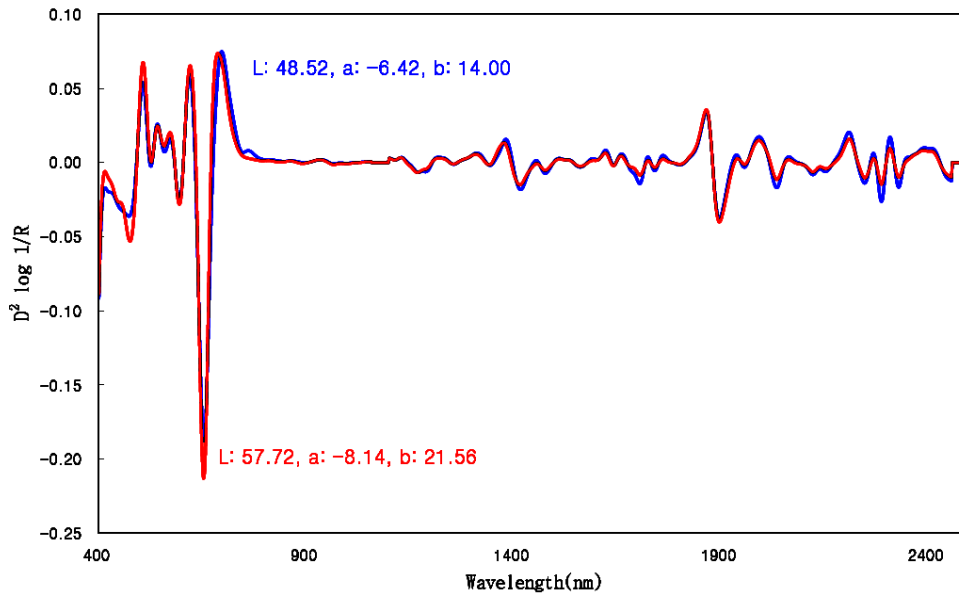


Fig. 2. Comparison on the second derivative spectra of NIRS with different color values in green tea powder.

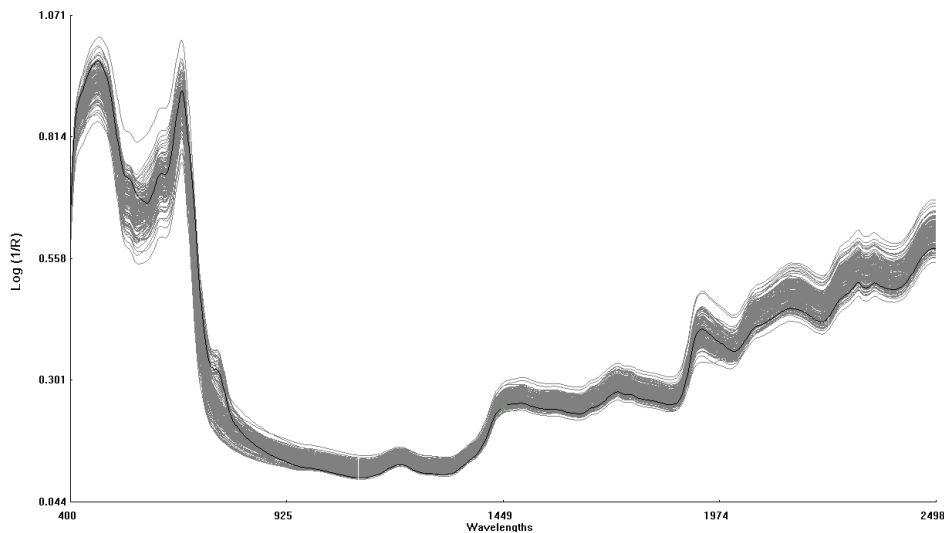


Fig. 3. Total raw spectra of NIRS in green tea calibration sample set.

원시 스펙트럼을 Fig. 3에 나타내었으며, 전체 흡광파장 대역에서 시료 간 흡광력의 차이가 뚜렷이 존재함을 확인할 수 있었다.

녹차 시료의 색차(L, a, b) 분석을 위한 NIRS 검량식 작성
 녹차 분쇄 시료의 색차인 L, a 및 b값에 대한 최적의 NIRS 검량식을 작성하기 위하여 다양한 회귀분석법(MPLS, PLS, MLR 및 PCR)을 적용하여 예비 분석을 실시한 결과 MPLS 방법이 가장 우수한 결과를 나타내었으므로, 회귀분석법을 MPLS법으로 제한하고, 산란방식은 SNVD 방법으로, 분석

파장은 400~2,500 nm 범위의 전 파장 대역에서 파장간격을 8 nm로 구분하고, 각 스펙트럼에 원시, 1차 및 2차 미분을 적용하여 가장 우수한 분석결과를 나타내는 검량식 작성 조건을 검토하였다(Table 2).

색차 중 명도에 해당하는 L값은 원시 스펙트럼에 2차 미분(2nd derivative, 8 nm gap, 6 points smoothing, 1 point second smoothing)을 수행한 조건에서 $R^2 = 0.936$ 으로 가장 높은 양상을 나타내었고, SEC는 0.336으로 가장 낮아 다른 수 처리 조건보다 우수한 분석결과를 나타내었다(Fig. 4). 또한 적색에 해당되는 색차 a값과 황색에 해당하는 b값은

Table 2. Equation development statistics using MPLS and SNVD scatter correction for the NIRS prediction of L, a, b values in green tea samples.

Color value	Transformation	Terms	Calibration		Cross-validation		
			SEC	R^2	1-VR	SECV	RSC
L	0, 0, 1, 1	8	0.402	0.906	0.892	0.432	3.06
	1, 4, 4, 1	5	0.389	0.909	0.878	0.448	2.95
	2, 8, 6, 1	10	0.336	0.936	0.902	0.415	3.18
a	0, 0, 1, 1	10	0.137	0.988	0.984	0.158	7.78
	1, 4, 4, 1	9	0.118	0.991	0.986	0.145	8.48
	2, 8, 6, 1	9	0.139	0.987	0.980	0.166	7.40
b	0, 0, 1, 1	10	0.262	0.952	0.941	0.288	4.10
	1, 4, 4, 1	9	0.246	0.958	0.940	0.291	4.05
	2, 8, 6, 1	8	0.273	0.947	0.931	0.312	3.78

SEC: standard error of calibration, R^2 : coefficient of determination of calibration. 1-VR: one minus the ratio of unexplained variance divided by variance, SECV: standard error of cross-validation, RSC: SD/SECV, the ratio of SD (standard deviation of reference data) to SECV in the calibration set.

1차 미분(1st derivative, 4 nm gap, 4 points smoothing, 1 point second smoothing)조건에서 R^2 가 각각 0.991 및 0.958로 가장 높은 양상을 나타내었으며, 이때 SEC는 각각 0.118 및 0.246으로 가장 낮은 분석 결과를 보였다(Fig. 4). 또한

각 수 처리에 따른 검량식 작성 시 전체 검량식 작성에 이용된 분석 시료 중 1/4에 해당하는 시료는 작성 검량식의 미지시료 적용 시 정확성을 평가할 수 있는 교차검정(Cross-validation)용으로 이용되는데, 이 교차 검정에 의한 분석 결

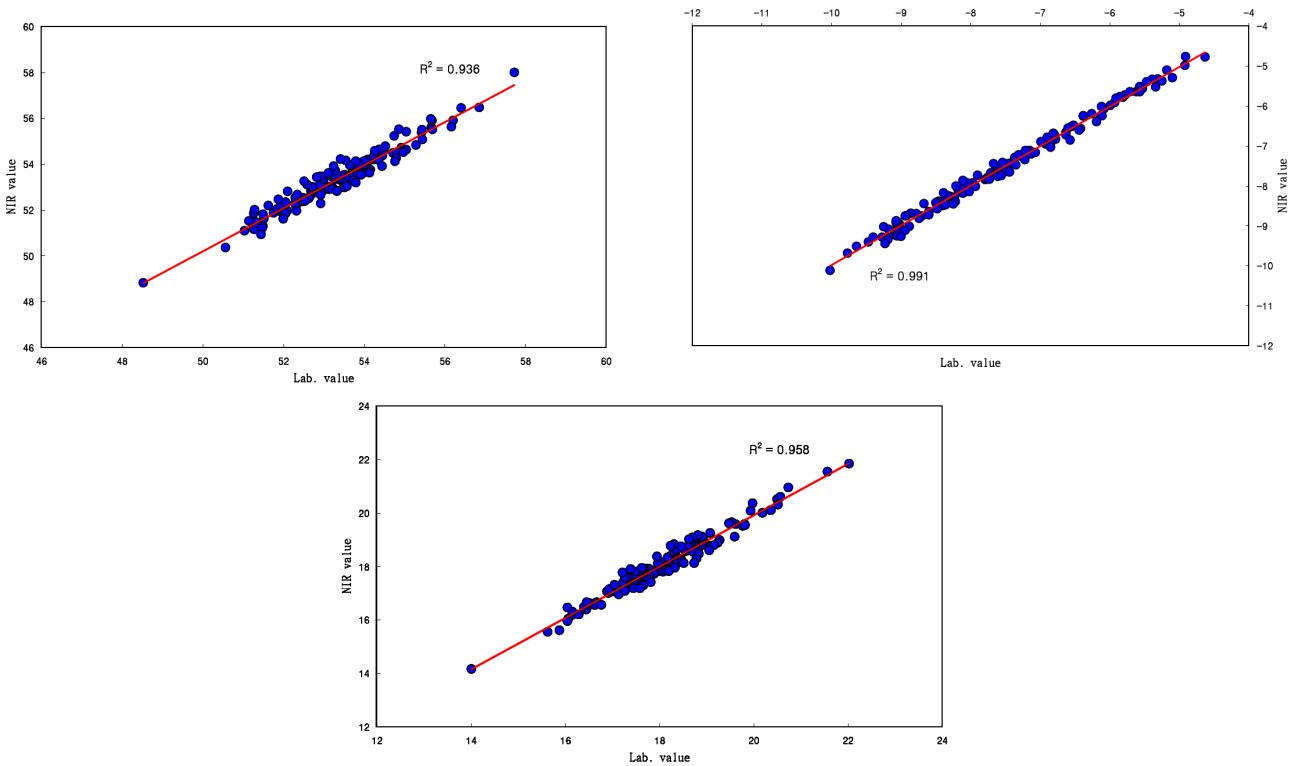


Fig. 4. Scatter plots of L (left), a (right), and b (center) values in green tea samples by colorimeter versus by NIRS for the calibration sample set.

Table 3. External validation statistics for L, a, b values in green tea samples.

Color value	N	mean	SD	bias	r^2	SEP	Sloop	RSP
L	78	53.43	1.11	0.005	0.905	0.361	1.002	3.07
a	80	-7.59	1.17	0.003	0.986	0.141	1.009	8.30
b	80	18.12	1.13	-0.013	0.931	0.306	0.997	3.69

N: samples used to monitor the model, SD: standard deviation of mean, Bias: average difference between reference and NIRS values, r^2 : coefficient of determination of cross-validation, SEP: the corrected standard error of prediction, Slope: the steepness of a straight line curve, RSP: SD/SEP, the ratio of SD of reference data to SEP in the external validation set.

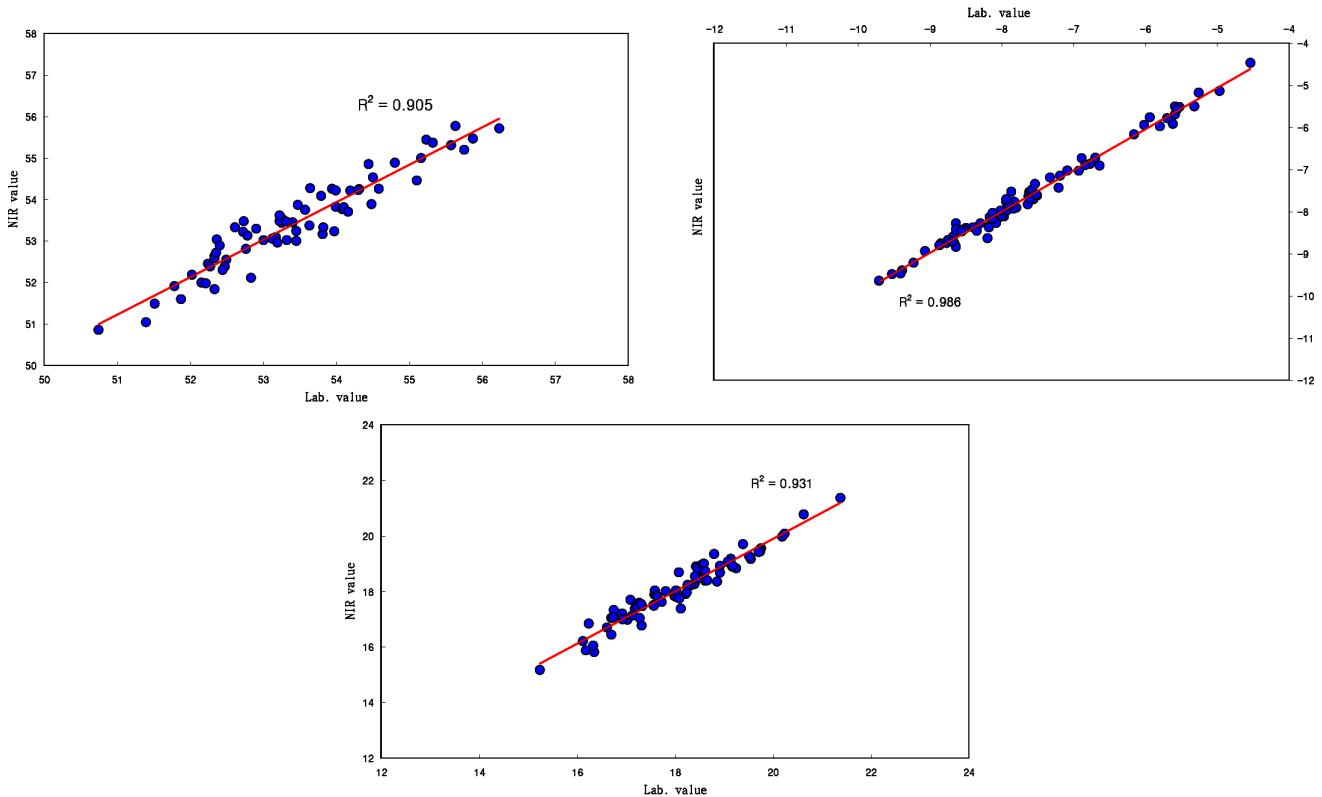


Fig. 5. Scatter plots of L, a, b value in green tea samples by colorimeter versus by NIRS for the external validation sample set.

과도 각 색차별로 가장 우수한 결과를 도출한 수 처리 조건에서 가장 좋은 결과를 나타내었다.

녹차 시료 색차(L, a, b) 분석용 작성 NIRS 검량식의 예견치 분석

녹차의 색차 분석용으로 작성된 NIRS 검량식은 미지의 시료에 적용하였을 때에도 정밀하게 분석이 가능하여야 하므로, 미지시료에 대한 작성 NIRS 검량식의 예견치 분석은 중요한 검량식 평가 과정 중 하나이다. 이를 위해 검량식 작성에 사용되지 않았던 82점의 녹차 시료를 대상으로 validation 파일을 작성하고, 작성된 검량식으로 미지시료의 예견치 분

석을 수행하였을 때 각 통계적 수치(r^2 , SEP, sloop, bias 및 RSP)를 통하여 검량식의 유효성을 판단하였다(Windham *et al.*, 1989).

녹차 시료의 색차 분석용으로 작성된 각 색차별 최적의 NIRS 검량식을 대상으로 예견치 분석을 수행한 결과를 Table 3에 나타내었다. 색차 중 L값의 r^2 는 0.905로 검량식 작성 시의 결정계수 보다는 다소 낮으나, 비교적 높은 결정계수를 나타내었고, 예견치 분석의 표준오차(SEP) 또한 0.361%로 양호한 양상을 나타내었다(Fig. 5). 또한 색도 a와 b의 r^2 도 각각 0.986 및 0.931로 색도 L과 동일 양상으로 검량식의 결정계수 보다는 다소 낮으나, 높은 예견치 분석효

울을 나타내는 것으로 조사되었으며, SEP 역시 각각 0.141% 및 0.306%를 나타내어 고도로 정밀한 예견치 분석이 가능함을 알 수 있었다(Fig. 5).

향후 이들 녹차 시료의 색차 분석용으로 작성된 신규 NIRS 검량식은 기존 녹차의 타 성분 분석을 위해 작성된 검량식과 함께 녹차 신제품 육성을 위한 육종 프로그램에서 mass screen 기법으로 활용이 가능할 것이며, 더 나아가 녹차 산업현장에서 신속하고 효율적인 품질관리에도 효율적으로 사용가능할 것으로 판단된다.

적 요

녹차 품질평가의 한 요인이 되는 색도 평가 시 기존 평가 방법인 육안평가 혹은 색차 분석에 의존하고 있는 현행 분석방법을 신속, 간편하며 재현성이 높고, 녹차 품질관련 기타 성분과 동시분석이 가능한 녹차 색차 분석용 NIRS 검량식을 작성한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 공시된 녹차 시료를 대상으로 색차계를 이용하여 색도값(L, a, b)을 조사한 결과 검량식 작성용 시료는 L값이 평균 53.37(48.52~57.72), a값이 평균 -7.55(-10.02~-4.63), b값이 평균 18.07(14.00~22.02)을 나타내었고, 작성 검량식의 평가용으로 이용된 예견치 분석용 시료와 거의 동일한 범위를 나타내었다.

2. 녹차의 색차 분석용 NIRS 검량식을 검토한 결과 색차 중 명도에 해당하는 L 값은 원시 스펙트럼에 2차 미분(2nd derivative, 8 nm gap, 6 points smoothing, 1 point second smoothing)을 수행한 조건에서 $R^2 = 0.936$ 으로 가장 우수한 양상을 나타내었고, 적색에 해당되는 색차 a값과 황색에 해당하는 b값은 1차 미분(1st derivative, 4 nm gap, 4 points smoothing, 1 point second smoothing)조건에서 R^2 가 각각 0.991 및 0.958로 가장 우수한 결과를 나타내었다.

3. 최적의 녹차 색차 분석용으로 작성된 각각의 NIRS 검량식을 미지시료에 적용하여 정확성을 평가한 결과 색도값 L, a 및 b의 결정계수는 각각 0.905, 0.986 및 0.931로 매우 높은 상관을 보였으며, 이들 검량식은 향후 NIRS를 이용한 녹차 관련 연구 및 녹차 산업현장에서 품질관리를 위한 효율적 분석방법으로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

인용문헌

Choi, J., J. U. Chun, J. H. Park, G. H. Shin, G. C. Lim, and K. C. Cho. 2001. A simple analysis method for chemical

- components of tea leaves using near-infrared spectroscopy. *Korean J. Tea Soc.* 7(2) : 77-90.
- Choi, O. J., H. J. Rhee, and K. S. Kim. 2003. The sensory characteristics of Korean wild teas according to the degree of fermentation. *Korean J. Food Sci. Nutr.* 32(7) : 1011-1020.
- Chun, J. U., and K. S. Choi. 2007. Nondestructive and rapid method for measurement of catechin contents in green tea products using NIRS. *Korean J. Tea Soc.* 13(3) : 99-112.
- Goto, T. 1992. Studies on NIR analyses of the chemical components in fresh tea leaf and crude tea and the evaluation of tea quality. *Jpn. J. Tea Research* 76 : 51-61.
- Higuchi, M., M. Hamasaki, T. Orita, and S. Satou. 2004. Development of the methods for the evaluation of the color of made tea and the analysis for the changes of the pigments during tea manufacturing. *Jpn. J. Tea Research* 97 : 17-25.
- Hou, W. N., J. S. Han, J. H. Park, and H. K. Choi. 1993. Effects of mechanical 1st rolling time during processing on quality of five times pan-fired green tea. *Korean J. Tea Soc.* 5(1) : 21-31.
- Ikegaya, K. 1990. Determination of chemical constituents in processed green tea by near infrared analysis. *JARQ.* 24 : 49-53.
- Jeon, J. R., G. S. Park, and S. J. Lee. 1999. The sensory characteristics of Korean green tea produced by Kujungkupo's method. *Korean J. Food Sci.* 15(5) : 475-482.
- Lee, S. H. and Y. Yamaguchi. 1997. Comparison of chemical components among spontaneous populations of Korean tea plant and Japanese green tea cultivar "Meiryoku". *J. Kor. Tea Soc.* 3 : 57-65.
- Ohmori, K., S. Nakamura, and T. Watanabe. 1986. Changes in color of a tea leaf steamed under different steaming conditions. *Jpn. J. Tea Research* 63 : 24-29.
- Park, Y. H., E. K. Won, and D. J. Son. 2002. Effect of pH on the stability of green tea catechins. *J. Food Hygiene and Safety* 17(3) : 117-123.
- Shenk, J. S. and M. O. Westerhaus. 1991. Population structuring of near infrared spectra and modified partial least squares regression. *Crop Sci.* 31 : 1548-1555.
- Sohn, T. H., D. H. Chung, S. L. Oh, S. H. Hwa, and D. H. Shin. 1988. Quality evaluation of various green tea by the physicochemical analysis and organoleptic characteristics. *Korean J. Agric. Chem. Soc.* 31(3) : 284-291.
- Windham, W. R., D. R. Metens and F. E. Barton. 1989. Protocol for NIRS calibration: Sample selection and equation development and validation. In G. C. Marten *et al.*(ed.) *Near infrared reflectance spectroscopy(NIRS): Analysis of forage quality.* Agric. Handb. 643. USDA-ARS, Washington, DC.
- 송관경, 김찬식, 김영걸, 이진호. 2006. 녹차학. 제주대학교 출판부.