

Research Article

근적외선분광법을 이용한 이탈리아 라이그라스, 페레니얼 라이그라스, 톨 페스큐 종자의 초종 판별

박형수 · 최기춘 · 김지혜 · 소민정 · 이기원 · 이상훈*

농촌진흥청 국립축산과학원 초지사료과

Discrimination of Pasture Spices for Italian Ryegrass, Perennial Ryegrass and Tall Fescue Using Near Infrared Spectroscopy

Hyung Soo Park, Ki Choon Choi, Ji Hye Kim, Min Jeong So, Ki Won Lee and Sang Hoon Lee*

National Institute of Animal Science, Cheonan, 330-801, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the feasibility of using near infrared spectroscopy (NIRS) to discriminate between grass species. A combination of NIRS and chemometrics was used to discriminate between Italian ryegrass, perennial ryegrass, and tall fescue seeds. A total of 240 samples were used to develop the best discriminant equation, whereby three spectra range (visible, NIR, and full range) were applied within a 680 nm to 2500 nm wavelength. The calibration equation for the discriminant analysis was developed using partial least square (PLS) regression and discrimination equation (DE) analysis. A PLS discriminant analysis model for the three spectra range that was developed with the mathematic pretreatment “1,8,8,1” successfully discriminated between Italian ryegrass, perennial ryegrass, and tall fescue. An external validation indicated that all of the samples were discriminated correctly. The discriminant accuracy was shown as 68%, 78%, and 73% for Italian ryegrass, perennial ryegrass, and tall fescue, respectively, with the NIR full-range spectra. The results demonstrate the usefulness of the NIRS-chemometrics combination as a rapid method for the discrimination of grass species by seed.

(Key words : Identification, Pasture seeds, Seed quality, Species discrimination)

I. 서 론

최근 국제 곡물가격의 변동 심화, 기상이변 등 불안정한 곡물사료 공급의 안정과 축우농가의 사료비 부담을 완화하기 위하여, 정부는 조사료 생산기반을 확충하기 위하여 양질 조사료 증산대책과 더불어 다양한 지원 정책을 내놓고 있다. 우리나라에서 조사료 생산기반이 확대되고 재배면적이 급격히 증가하면서 해외로부터 사료작물의 종자 수입량도 매년 증가하고 있는 추세이다.

양질의 조사료 생산을 위한 우량한 초종 및 품종을 선택하는 것은 생산성을 높이고 결국 농가의 이익을 증대시킴으로서 우량한 초종 및 품종의 선택의 중요성이 높아지고 있으며 또한 고가로 판매되고 있다. 하지만 국내 조사료 종자 유통시장에서는 발아불량 등 품질이 불량한 종자, 타 초종 및 품종이 혼입되어 있는 종자와 초종 및 품종이 불

명확한 종자들이 유통되어 조사료 생산현장에서 불량종자로 인한 피해가 발생되기 시작하고 있다.

일부 조사료 생산용 종자, 특히 목초류 사료작물의 종자는 형태적 특성이 비슷하여 육안으로 초종 및 품종 구별이 힘들어 현장에서는 출현 후 생육 및 형태적 특성을 이용하여 초종 및 품종을 구별하고 있는 실정이다. 특히 우리나라 주요 동계사료작물인 이탈리아 라이그라스 (*Lolium multiflorum* Lam.)는 페레니얼 라이그라스 (*L. perenne* L.)와 같은 속 (genus, 屬)으로 비슷한 유전자를 가지고 있고 상호 교잡이 가능하여 초종 및 품종 판별이 매우 어렵다 (Warnke et al., 2004).

이러한 품종판별의 문제점을 해결하기 위하여 최근 많은 연구자들은 생화학분석법을 이용하여 품종판별에 대한 접근이 시도되고 있다. 종자의 품종별 유전적 거리를 구분하기 위한 특이 단백질을 이용한 품종판별 (Orman et al.,

* Corresponding author : Sang Hoon Lee, National Institute of Animal Science RDA, Cheonan 330-801, Korea. Tel: +82-41-580-6754, Fax: +82-41-580-6757, E-mail: sanghoon@korea.kr

1991), 다양한 경제작물에서 품종관별과 종자품질 관리를 위해서 PCR 기반 DNA 마커를 활용하는 연구들이 이루어지고 있다(Dongre and Parkhi, 2005; Gethia et al., 2002). 또한 최근에 SSR (Simple sequence repeats) 기법은 밀, 보리, 벼, 콩 등 다양한 작물에서 품종관별 기법으로 활용되어지고 있다(Prasad et al., 2000; Plaschke et al., 1995; Russell et al., 1997). 하지만 초종 및 품종관별을 위한 생화학적 분석법은 관별을 위한 분석시간이 많이 소요되고, 현장에서 대량의 시료를 분석하기 위해서는 매우 제한적인 방법이다.

최근 신속한 분석법인 근적외선분광법(NIRS)을 이용하여 종자의 품질평가와 품종 및 원산지 관별에 활용하는 연구들이 보고되고 있다. Velasco and Möllers(2002)은 소량의 유채종자를 이용하여 종자 내 유지, 단백질 및 지방산 조성 등을 신속하게 분석하였으며, 유럽지역에서 재배되고 있는 밀 12 품종을 관별(Miralbés, 2008)하였다. 또한 국내에서도 근적외선분광법을 이용하여 농산물의 원산지를 관별하는 많은 연구결과들이 보고되고 있다(Kim et al., 2003; Lee et al., 2011; Woo et al., 1999).

따라서 본 연구의 목적은 불량 조사료 종자의 유통방지를 위해 근적외선분광법을 이용한 목초류 종자의 초종관별 가능성을 검토하고 목초류 초종 관별의 분석 기술을 개발하기 위하여 수행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 종자 시료 및 스펙트럼 수집

근적외선분광법을 이용하여 목초류 종자의 초종을 관별하기 위하여 2014년에 수입된 톨 페스큐, 페레니얼 라이그라스, 이탈리아인 라이그라스 3 초종과 초종별로 각 2개 품종의 종자를 국내 종자회사로부터 수집하였다. 초종별로 2개의 품종은 톨 페스큐 'Fawn', 'Kentucky 31', 페레니얼 라이그라스 'Linn', 'Tetrelite', 이탈리아인 라이그라스 'Florida 80', 'Hwasan 104' 등 6품종이었으며 품종별로 2 kg의 종자 시료를 수집하였다.

각 초종 및 품종별 종자 시료의 전체 스펙트럼을 측정하기 위하여 Spectrastar 2500 근적외선분광기(Unity Scientific, Brookfield, USA)를 이용하였으며 초종 및 품종별 종자 시료 4 g을 표준원형 시료컵(직경 35 mm, 깊이 10 mm)에 충전하여 품종별로 50개씩 측정하였다. 검량식 개발(calibration set)을 위해 사용되어진 시료수는 240점으로 이중 톨 페스큐 60점, 페레니얼 라이그라스 60점과 이탈리아인

라이그스 60점이었고 개발된 검량식의 검증(validation set)을 위해 사용되어진 시료는 60점으로 초종별로 각각 20점을 수집하였다. 각 시료의 평균 스펙트럼을 얻기 위해서 680~2,500 nm 범위에서 1 nm 간격으로 반사도를 측정 후, 검량식 개발을 위해서 흡광도는 측정된 반사도에 대한 역수의 대수값(Log 1/R : absorbance)으로 변환시켜 사용하였다.

2. 초종관별 검량식 개발 및 검증

초종 및 품종별로 얻어진 스펙트럼은 중첩으로 인해 생기는 noise와 bias를 줄이기 위해 수 처리를 하였으며 수 처리는 1차 미분을 수행 한 후 미분된 각 스펙트럼을 다시 1차 smoothing과 스펙트럼 gap을 몇 가지 처리로 조합하여 수 처리(1,8,8,1)하였다. 스펙트럼 데이터의 분석과 초종 관별을 위한 검량식 개발은 U-cal software ver 2.0 프로그램을 사용하였으며 NIR loading value를 초종별로 달리 지정한 후 부분최소자승법(PLS : partial least square)을 사용한 회귀분석법에 의하여 작성하였다. 얻어진 검량식의 관별 정확도는 상관계수(R), 검량식의 상호검증 표준오차(SECV : standard error of cross validation)와 예측 표준오차(SEP: standard error of prediction)를 확인하였다. 또한 농산물 원산지 관별에 주로 활용되고 있는 Discriminant Equation 알고리즘(Howard, 1992)을 적용하여 목초류 초종관별의 가능성을 검토하였다. Discriminant Equation 분석은 WINISI II software ver 1.50 프로그램을 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 목초류의 초종별 NIRS 스펙트럼

이탈리아인 라이그라스, 페레니얼 라이그라스 및 톨 페스큐 종자의 평균 NIRS 흡수 스펙트럼은 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 바탕선의 차이, 충전 밀도 등에 따른 스펙트럼의 변이는 있었으나 전체적인 스펙트럼은 목초류 초종에 따라 비슷한 양상을 보였다.

일반적으로 NIRS 흡수 스펙트럼은 측정하는 물질의 화학적 성분, 입자의 크기 및 밀도와 같은 시료의 물리적인 영향에 의해 바탕선의 변화가 일어나고 그 흡수대가 서로 겹치는데 이러한 오차를 줄이고 겹쳐있는 파장을 분리하기 위해 미분법을 통한 수 처리 기법이 이용되어진다. Fig. 2는 Fig. 1의 스펙트럼을 1차 미분하여 수 처리한 스펙트럼으로 미분된 스펙트럼에서는 수 처리 전의 스펙트럼에서와는

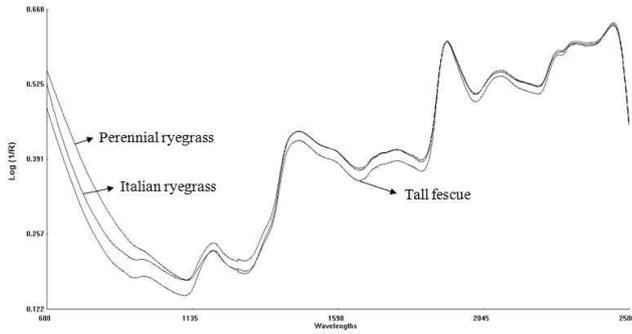


Fig. 1. Mean value of NIRS spectra of Italian ryegrass, perennial ryegrass and tall fescue seeds.

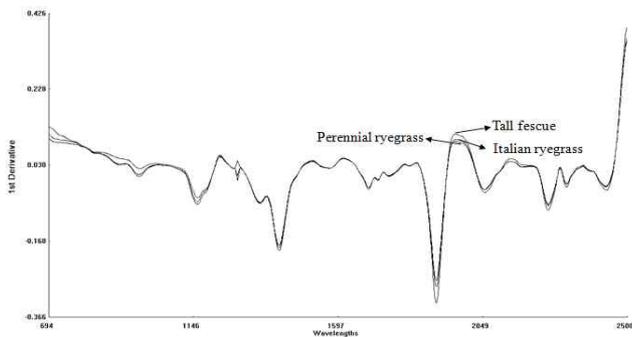


Fig. 2. The first derivative NIRS spectra of Italian ryegrass, perennial ryegrass and tall fescue seeds.

달리 파장별로 흡광도의 차이를 확인 할 수 있다. 목초류의 초종별 종자의 스펙트라는 1,146, 1,400, 1,890, 2,042, 2,238, 2,422 nm 부근에서 흡광도의 차이가 크게 나타났다. 한편, 가시광선영역에서의 변이는 목초류 초종의 종피의 색도 차이에 기인하는 것으로 판단되며 특히 전체 파장대역에서 이탈리아 라이그라스와 페레니얼 라이그라스와 다르게 톨 페스큐 종자의 변이가 크게 나타났다. 이와 같이 원래의 스펙트라를 수 처리를 통해 미분함으로써 바탕선의 변화 제거 및 겹친 흡수대의 분리 등으로 스펙트라 간의

차이를 확인이 가능하였다.

2. 목초류의 초종 판별 검량식 개발 및 검증

수 처리된 초종별 스펙트라의 PLS 회귀분석법을 사용하여 가시영역 파장 (680~1,099 nm), NIR영역 파장 (1,100~1,500 nm)와 NIRS 전체영역 파장 (680~2,500 nm)으로 분리하여 검량식을 작성한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

목초류의 초종판별 검량식 개발을 위하여 이탈리아 라이그라스의 loading value를 ‘10’, 페레니얼 라이그라스를 ‘20’과 톨 페스큐의 loading value를 ‘30’으로 설정한 다음, 1차 미분한 스펙트라를 PLS 회귀분석법을 적용하여 검량식을 유도하였다. 검량식 작성 후에는 다시 교차검증(cross validation)을 사용하여 내부검증을 하였다. 교차검증은 검량식 작성에 사용된 시료를 제외한 나머지 시료를 이용하여 도출된 검량식을 예측 검증하는 방법으로 SECV와 R²_{CV} 값으로 정확도를 검증하였다. 검량식 작성에 있어서 최적화된 factor (파장요인)의 수를 결정하는 것이 중요하며 일반적으로 factor의 수가 증가할수록 R²과 SEC 값이 좋아지는 반면 SECV 값이 증가하므로 적절한 factor를 선택해야 over fitting이 일어나지 않고 정확한 검량식을 유도할 수 있다.

목초류의 초종별 종자의 파장대역별에 따라 유도된 검량식의 판별 정확성은 모든 파장대에서 우수한 결과를 보였다. 목초류의 초종판별 정확성은 가시파장대역에서 SECV 1.732, R²_{CV} 0.96으로 가장 판별 정확성이 낮았으며 NIRS 전체 파장대역에서 SECV 1.182, R²_{CV} 0.98로 가장 높은 판별 정확성을 나타내었다. Ahan and Kim (2012)은 NIRS 전체 파장대역 (400~2,500 nm)에서 국내산 콩과 수입산 콩의 원산지 판별이 가능하다고 보고하였으며, He et al. (2007)은 NIRS의 PCA기법을 이용하여 가시파장대역 (325~1,075 nm)에서 녹차의 품종판별이 가능하였다는 보고를 하였다.

수 처리 및 PLS 회귀분석법에 의해 개발된 검량식을 각 초종별로 20개의 미지시료 (총 60개)를 이용하여 검증한 결

Table 1. Statistics of calibration equation for discrimination among Italian ryegrass, perennial ryegrass and tall fescue seeds

Wavelength (nm)	Math treatment	n	Factor	SEC	R ²	SECV	R ² _{CV}
680~1,099	1,8,8,1	239	12	1.422	0.97	1.732	0.96
1,100~2,500	1,8,8,1	239	12	0.926	0.98	1.319	0.97
680~2,500	1,8,8,1	240	13	0.802	0.99	1.182	0.98

* Math treatment 1,8,8,1 : 1 = derivative, 8 = gap, 8 = 1st smooth, 1 = 2st smooth.

SEC = Standard error of calibration; R² = Multiple correlation coefficient of determination; SECV = Standard error of cross validation; R²_{CV} = Multiple correlation coefficient of cross validation.

Table 2. Validation statistics values for discrimination among Italian ryegrass, perennial ryegrass and tall fescue seeds

Wavelength (nm)	n	Mean value		SEP	R ²	Slope
		Reference	NIRS predicted			
680~1,099	60	20.00	19.81	1.749	0.96	0.95
1,100~2,500	60	20.00	20.02	1.288	0.98	0.99
680~2,500	60	20.00	20.02	1.160	0.98	0.99

SEP = Standard error of prediction; R² = Multiple correlation coefficient of determination.

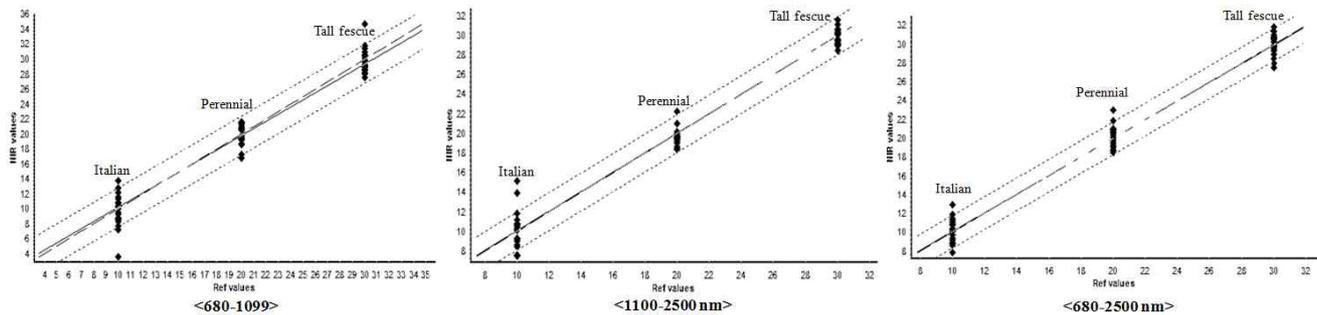


Fig. 3. Relationship between the loading value of discriminant (Ref values) and near infrared spectroscopy (NIRS) predicted value for Italian ryegrass, perennial ryegrass and tall fescue.

과는 Table 2와 Fig. 3에서 보는바와 같다.

과장대역별에 따라 유도된 검량식의 검증 결과는 가시영역 과장대에서 loading value 평균값이 19.81로 상관값이 0.96으로 다른 과장대역보다 예측능력이 낮은 것으로 나타났다. 과장대역별 예측 정확성은 NIR 과장대역(1,100~2,500 nm)에서 교차검증오차(SECV) 1.319에서 예측 오차(SEP) 1.288로 낮아졌으며 가시영역대(680~1,099)는 SECV 1.732에서 SEP 1.749로 약간 높아졌다. 따라서 미지의 시료를 이용하여 검증한 결과 개발된 검량식의 판별 정확성을 확인할 수 있었으며 NIRS에서 본 검량식을 이용하면 목초류 종자를 통해 초종판별이 쉽게 수행될 수 있을 것으로 판단된다.

3. Discrimination equation에 의한 목초류 초종판별

Discrimination equation 분석법에 의한 목초류 종자의 초종판별 결과는 Table 3과 Fig. 4에서 보는 바와 같다.

근적외선분광법(NIRS)을 이용한 농산물 원산지 판별에 활용되고 있는 discrimination equation 분석법은 주성분분석(principle component analysis, PCA)의 중앙 평균에서의 절대거리를 측정함으로써 시료의 동질성 여부를 판단하게 되며, 유도된 PCA 값으로 two-block PLS (partial least square regression) 방법에 의해 집단을 2개로 구분한 후 집단간의 PLS score에 의하여 집단의 차이를 판별한다(Howard, 1992).

Discrimination equation 분석법에 의한 NIRS 과장대역별

Table 3. Classification results from selected discriminant equations for Italian ryegrass, perennial ryegrass and tall fescue seeds

Species	680~1,099 nm			1,100~2,500 nm			680~2,500 nm		
	IRG	PRG	TF	IRG	PRG	TF	IRG	PRG	TF
Total samples	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Certain (hits)	72	71	75	43	48	56	68	78	73
Uncertain	28	29	25	55	52	44	32	22	27
Rejected (miss)	0	0	0	2	0	0	0	0	0

* IRG = Italian ryegrass; PRG= Perennial ryegrass; TF= Tall fescue.

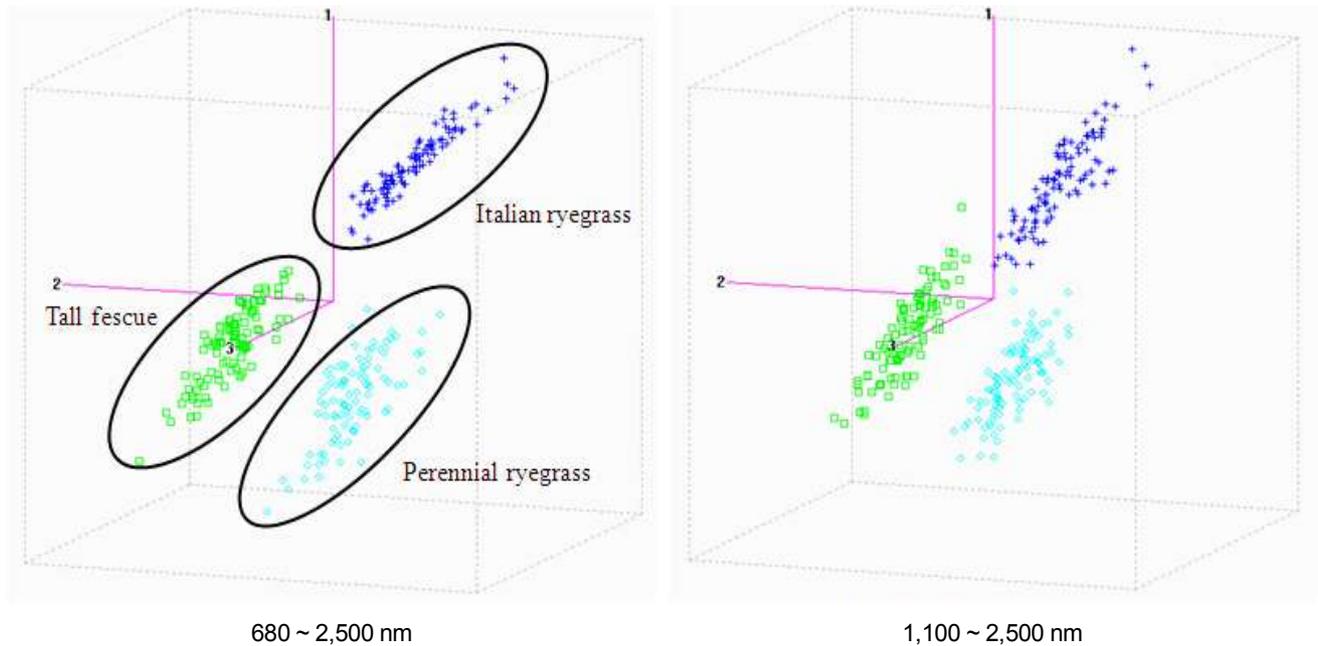


Fig. 4. Score values of PC's 1, 2 and 3 for pasture seeds (Italian ryegrass, perennial ryegrass and tall fescue).

목초류 초종의 판별 결과는 가시영역대에서는 모든 초종이 71% 이상의 정확성을 가지고 정확하게 (hits) 판별하였고 정확하지는 않지만 25~29% 비율로 부정확하게 판별 (Uncertain) 하였으며 전혀 판별을 하지 못하는 (miss) 시료는 없었다. 하지만 NIRS 파장 영역대에서는 'Hits'의 비율이 다른 파장영역대보다 낮게 나타났으며, 이탈리아 라이그라스의 경우는 판정을 하지 못하는 시료가 나타났다. 또한 NIRS 전체 영역대에서는 초종간에 판별 정확성이 차이가 크게 나타났는데 이탈리아 라이그라스의 'Hits'는 68%로 가장 낮았으며 페레니얼 라이그라스가 78%의 정확성을 가지고 판별이 가능하였다.

국내에서 NIRS를 이용한 discrimination equation으로 농산물의 원산지 판별을 수행한 결과를 보면 Chun and Cho (2007)는 국산과 일본산 녹차 판별에서 79.5%의 정확도로 판별이 가능하였고 Chun (2007)은 국산과 중국산 녹차를 79.3%의 정확도로 판별이 가능하였다. 외국에서는 분쇄한 밀을 이용하여 유럽 밀의 품종을 94% 정확도를 가지고 판별이 가능함을 보고하였다 (Miralbés, 2008). 이러한 결과의 차이는 주성분 분석에 사용된 Principle component (주요성분)의 수에 영향을 받는 것으로 생각된다. 따라서 정확한 주성분 분석이 뒷받침 된다면 NIRS를 이용한 discrimination equation 방법도 목초류 초종 판별에 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

IV. 요약

본 연구는 근적외선분광법을 이용하여 우리나라에서 재배되고 있는 목초류 중 외형적 특성이 유사한 이탈리아 라이그라스, 페레니얼 라이그라스와 톨 페스큐 종자의 초종 판별 가능성을 검토하고자 수행되었다. 근적외선분광기를 이용하여 목초류 종자를 가시파장 대역대 (680~1,099 nm), NIRS 파장 대역대 (1,100-2,500 nm) 및 NIRS 전체 파장 대역대 (680-2,500 nm)로 구분하여 스펙트라를 얻은 후 1차 미분과 8 nm gap으로 수 처리를 수행하였으며 부분최소자승 (PLS) 회귀분석법을 통해 초종판별 검량식을 개발하고 판별 정확성을 검증하였다. 목초류의 초종판별 정확성은 가시파장대역에서 $SECV$ 1.732, R^2_{CV} 0.96으로 가장 판별 정확성이 낮았으며 NIRS 전체 파장대역에서 $SECV$ 1.182, R^2_{CV} 0.98로 가장 높은 판별 정확성을 나타내었다. 파장대역별 예측 정확성은 NIR 파장대역 (1,100-2,500 nm)에서 교차검증오차($SECV$) 1.319에서 예측 오차(SEP) 1.288로 낮아졌으며 가시영역대 (680~1,099)는 $SECV$ 1.732에서 SEP 1.749로 약간 높아졌다. Discrimination equation 분석법에 의한 NIRS 전체 파장대역별 목초류 초종의 판별 결과는 초종간에 판별 정확성의 차이가 크게 나타났으며 이탈리아 라이그라스의 'Hits'는 68%로 가장 낮았으며 페레니얼 라이그라스가 78%의 정확성으로 가장 높게 나타났다. 따라서 NIRS를 이용한 목초류 초종의 판별분석이 가능할 것으로

판단되었다.

V. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 연구사업 (과제명 : 근적외선분광법을 이용한 목초자원 특성평가 기술 개발, 과제번호 : PJ009396022015)의 지원에 의해 연구되었다.

V. REFERENCES

- Ahan, H.G. and Kim, Y.H. 2012. Discrimination of Korean domestic and foreign soybeans using Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Korean Journal of Crop Science*. 57(3):296-300.
- Chun, J.U. 2007. Use of Near-Infrared Spectroscopy for Discriminating Korean and Chinese Green Tea Products. *Journal of Korean Tea Society*. 13(2):97-110.
- Chun, J.U. and Cho, K.C. 2007. Discrimination of Korean and Japanese green tea products using NIR Spectroscopy. *Journal of Korean Tea Society*. 13(1):93-104.
- Dongre, A. and Parkhi, V. 2005. Identification of cotton hybrid through the combination of PCR based RAPD, ISSR and microsatellite markers. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 14(1):53-55.
- Gethia, J.G., Labate, J.A., Lamkey, K.R., Smitha, M.E. and Kresovich, S. 2002. SSR Variation in important U.S. maize inbred lines. *Crop science*. 42:951-957.
- He, Y., Li, X. and Deng, X. 2007. Discrimination of varieties of tea using near infrared spectroscopy by principal component analysis and BP model. *Journal of Food Engineering*. 79(4):1238-1242.
- Howard, M. 1992. Qualitative discriminant analysis. In *Handbook of near infrared analysis*. p. 329~363. Marcel Dekker, Inc. NY.
- Kim, E.Y., Kim, J.H., Lee, N.Y., Kim, S.J. and Rhyu, M.R. 2003. Discrimination of geographical origin for astragalus root (*Astragalus membranaceus*) by capillary electrophoresis and near-infrared spectroscopy. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 35(5):818-824.
- Lee, D.Y., Kim, S.H., Kim, Y.C., Kim, H.J. and Sung, S.H. 2011. Discrimination of *Scrophulariae Radix* according to geographical origin and determination of active constituents by near infrared spectroscopy (NIRS). *Microchemical Journal*. 99(2):213-217.
- Miralbés, C. 2008. Discrimination of European wheat varieties using near infrared reflectance spectroscopy. *Food chemistry*. 106(1):386-389.
- Orman, B.A., Lawrance, G.D., Downes, P.M., Phillips, D.S. and Ripberger, C.J. 1991. Assessment of maize inbred genetic purity by isozyme. *Seed Science and Technology*. 19:572-553.
- Plaschke, J., Ganai, M.W. and Röder, M.S. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 91(6-7):1001-1007.
- Prasad, M., Varshney, R.K., Roy, J.K., Balyan, H.S. and Gupta, P.K. 2000. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 100(3-4):584-592.
- Russell, J., Fuller, J., Young, G., Thomas, B., Macaulay, M., Waugh, R. and Taramino, G. 1997. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome*. 40(4):442-450.
- Velasco, L. and Möllers, C. 2002. Nondestructive assessment of protein content in single seeds of rapeseed (*Brassica napus* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy. *Euphytica*. 123(1):89-93.
- Warnke, S.E., Barker, R.E., Jung, G., Sim, S.C., Mian, M.R., Saha, M.C. and Forster, J.W. 2004. Genetic linkage mapping of an annual × perennial ryegrass population. *Theoretical and Applied Genetics*. 109(2):294-304.
- Woo, Y.A., Kim, H.J., Cho, J. and Chung, H. 1999. Discrimination of herbal medicines according to geographical origin with near infrared reflectance spectroscopy and pattern recognition techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 21(2):407-413.

(Received April 30, 2015 / Revised May 30, 2015 / Accepted June 1, 2015)