

근적외선 분광광도계를 이용한 벼 유전자원 아밀로스 및 단백질 함량분석을 위한 모델개발

오세종, 이명철, 최유미, 이수경, 오명원, Asjad Ali, 채병수, 현도윤*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원센터

Development of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) Model for Amylose and Crude Protein Contents Analysis in Rice Germplasm

Sejong Oh, Myung Chul Lee, Yu Mi Choi, Sukyeung Lee, Myeongwon Oh, Asjad Ali,

Byungsoo Chae and Do Yoon Hyun

National Agrobiodiversity Center

National Institute of Agricultural Sciences, RDA, Jeonju 54874, Korea

Abstract - The objective of this research was to develop Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) model for amylose and protein contents analysis of large accessions of rice germplasm. A total of 511 accessions of rice germplasm were obtained from National Agrobiodiversity Center to make calibration equation. The accessions were measured by NIRS for both brown and milled brown rice which was additionally assayed by iodine and Kjeldahl method for amylose and crude protein contents. The range of amylose and protein content in milled brown rice were 6.15-32.25% and 4.72-14.81%, respectively. The correlation coefficient (R^2), standard error of calibration (SEC) and slope of brown rice were 0.906, 1.741, 0.995 in amylose and 0.941, 0.276, 1.011 in protein, respectively, whereas R^2 , SEC and slope of milled brown rice values were 0.956, 1.159, 1.001 in amylose and 0.982, 0.164, 1.003 in protein, respectively. Validation results of this NIRS equation showed a high coefficient determination in prediction for amylose (0.962) and protein (0.986), and also low standard error in prediction (SEP) for amylose (2.349) and protein (0.415). These results suggest that NIRS equation model should be practically applied for determination of amylose and crude protein contents in large accessions of rice germplasm.

Key words - NIRS, Germplasm, Milled brown rice, Amylose, Crude protein

서 언

쌀(*Oryza sativa* L.)은 가장 중요한 곡물중의 하나이며 아시아 지역에서 전 세계의 쌀생산의 90% 이상이 생산된다. 쌀의 주요 성분은 아밀로스 및 조단백질로 구성되어 있으며 이들은 품종에 따라 성분의 함량이 다르다. 쌀을 주식으로 하는 나라에서는 이들 성분의 함량에 따라 쌀 품종을 선호하는 경향이 있으며, 품종육성의 경우 아밀로스 성분이 교배종의 지표자료로 사용되기도 한다(Kim, 2004). 아밀로스 및 단백질은 쌀의 미질을 결정하는 중요한 이화학적 특성으로 단백질과 아밀로스 성분은 두 가

지 중요한 품질매개변수이며 취반특성 뿐만 아니라 물리화학적 인 것에도 영향을 준다(Son *et al.*, 2002; Champagne *et al.*, 1997; Gomez, 1979).

Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS)는 근적외선이 시료에 조사될 때 시료내 특정 작용기가 분자진동을 일으키고 특정 파장의 빛을 흡수하게 되는데 이러한 흡광정도는 시료 내 작용기 농도에 비례한다는 램버트 비어 법칙에 근거한 정량분석방법이다. 근적외선영역(800-2,500 nm 파장범위)에서는 주로 수소 결합에 관련된 O-H, C-H, N-H, S-H 및 C=O 관능기들이 중적외선 영역(2,500-25,000 nm 파장범위)의 특정 파장의 빛에너지를 흡수하여 나타나는 분자기진동의 배음(overtone, 700-1950 nm) 진동, 결합(combination, 1950-2500

*교신저자: dyhyun@korea.kr

Tel. +82-63-238-4912

nm) 진동이 나타나게 된다. 농식품의 경우 주요구성 성분인 지방(C-H), 수분(O-H) 및 단백질(N-H, S-H)이 근적외선을 흡수하므로 근적외선 분광 분석법을 이용해 성분을 동시에 분석이 가능하다(Williams *et al.*, 1987). 근적외선 영역에서의 스펙트럼은 측정하는 시료내의 다양한 성분들 간의 흡수파장대가 서로 중첩되거나 시료 입자 크기와 밀도 같은 물리적 요인들에 의해 바탕선의 변화가 일어나는데, 이러한 오차를 줄이고 겹쳐있는 파장들을 분리하기 위해 전용 프로그램을 사용하여 스펙트럼 산란현상을 보정하고 수학적 전처리를 수행하게 된다(Ahn and Kim, 2012). 이후 습식분석결과와 근적외선 스펙트럼간의 상관관계를 회귀분석을 통해 예측모델을 개발하게 된다.

그동안 여러 연구자들이 쌀 분말(Bao *et al.*, 2001; Bean *et al.*, 1990; Delwiche *et al.*, 1995; Shu *et al.*, 1999), 쌀현미(Delwiche *et al.*, 1995; Windham *et al.*, 1997), 쌀 현미가루(Shu *et al.*, 1999)를 이용하여 가장 중요한 아밀로스의 화학적인 특성을 NIRS로 측정하였다. 또한 쌀의 단백질 성분에 대해서도 NIRS를 이용하여 측정하였다(Delwiche *et al.*, 1996; Shu *et al.*, 1999). NIRS를 이용한 측정방법은 쌀의 아밀로스 및 단백질 분석에 있어서 기존의 습식분석 방법을 대체할 수 있는 가능성이 있음을 보여주었다. 아밀로스, 단백질뿐만 아니라 탄수화물, 지방, 회분 등도 NIRS를 이용하여 분석하였다(Ko *et al.*, 1998). NIRS는 짧은 시간 내 많은 시료분석이 가능하다는 장점으로 다양한 농작물 품질평가방법에 이용되고 있다(Kim *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2006, 2014; Han *et al.*, 1996; Hwang *et al.*, 1994; Moon *et al.*, 1994; Kwon *et al.*, 2005, 2006). 또한 NIRS를 이용한 지리적 원산지 쿵판별(Ahn *et al.*, 2012), 보리의 품질효율분석 및 화학적 성분분석(Kim *et al.*, 1996), 옥수수 알곡의 단백질, 전분, 유지함량 측정(Jiang *et al.*, 2007), 약초의 일종인 황금의 약효성분분석(Kim *et al.*, 2014) 등의 연구결과가 보고되었다.

농업유전자원센터에서는 국내외 다양한 유전자원 대하여 3만자원 이상의 벼 자원들을 수집보관하고 있다. 벼 유전자원에 대하여 근적외선 분광분석법을 이용한 선행연구가 있었으나 이는 향미벼 유전자원 활용촉진을 위하여 신속한 자원선발 체계 구축에 그 목적을 두었다. 그러나 선행연구에서는 보존하고 있는 벼 유전자원 전체에 대한 아밀로스와 단백질 분석정보가 제공되고 있지 않다(Kim *et al.*, 2008). 따라서 벼 유전자원에 대한 보다 충실한 정보를 자원이용자에게 제공하기 위하여 다양한 벼 511자원으로부터 밀도있는 검량곡선을 작성하였으며, 이를 바탕으로 벼자원 전반에 대하여 특성평가를 실시함과 동시에 대량 평가체계를 구축하고자 이 연구를 수행하게 되었다.

재료 및 방법

재료준비

본 실험에 사용한 벼 유전자원은 단국대학교에서 “종자유전자원보존관리” 과제수행결과로 얻어진 자료를 토대로 아밀로스 농도 분석 자료를 참조하여 1차 자원을 선발하였으며, 농업유전자원센터 GMS 프로그램을 이용하여 2차로 아밀로스 농도를 기준으로 각 농도구간 별 대표 자원을 정하는 방법으로 총 511자원을 선발하였다(Table 1). 511자원의 종자 50립을 실험실용 현미기로 탈영시킨 후 사미, 피해립을 제거하여 NIR 측정을 위한 현미립을 준비하였다. 이 후 분쇄기로 약 2분간 분쇄하여 100 Mesh (160 μ m)의 체로 쳐서 균일한 현미가루 상태로 만든 후, NIR 스펙트럼 측정과 이화학적 성분 분석(아밀로스함량, 조단백질함량)에 사용하였다. 종자와 준비된 현미시료들은 16°C 저온저장고에 보관하여 수분함량 14% 이하 상태를 유지하였다. 수분함량 분석은 곡류 및 곡류제품-수분함량측정(산업통상자원부 국가기술표준원, 표준번호:KS H ISO 712)을 참조하여 수분측정기(Shimadzu, Japan)를 사용하여 130°C 온도조건에서 측정하였다.

대표자원 파종 및 포장증식

보존종자와 증식종자간 아밀로스, 단백질 농도 차이가 있는 지를 조사하기 위하여 511자원 중 대표 200자원을 시험포장에서 증식하였다. 대표 200자원을 2015년 4월 27일 파종 준비하여 농업유전자원센터 시험포장에서 표준재배법에 따라 재배한 후 2015년 10월 5일 수확하였고, 수확된 벼는 35°C 건조기에서 21시간 건조시킨 후 10월 7일 소형계통탈곡기를 사용하여 탈곡하였다. 이후 제현, 정선, 분쇄, 100 Mesh 체를 치는 과정을 거쳐 균일한 현미가루로 만든 후 이화학적 성분 분석에 사용하였다.

아밀로스농도 분석

아밀로스농도 분석은 Juliano (1971)의 비색 정량법에 따라 측정하였다. 100 mg의 현미가루에 absolute ethanol 1 ml와 1 N NaOH 9 ml를 가해 90°C convection dry oven에 40분간 소화시킨 후 상온의 삼차증류수로 100 ml를 채운 다음, 그 중 5 ml를 취해 1N acetic acid 1 ml와 2% I₂-KI (iodine solution) 2 ml를 가한 후 삼차증류수로 100 ml까지 채우고 30°C에서 30분간 발색 반응시켜 620 nm의 파장에서 UV/Vis분광광도계 (Thermo Fisher Scientific, USAGenesys 20)로 한 자원 당 3반복 측정하였다. 국립식량과학원 남부작물부 벼 이화학적 성분 분석 기준

Table 1. List of rice germplasm used in this study

Origin ^z	Status	Accession	IT Number		
AUS	Variety	1	210125		
BGD	Variety	2	219237, 236095		
BRA	Variety	1	235751		
BTN	Variety	1	219290		
CHN	Variety	94	217611, 229796, 235599, 220078, 223660, 235772, 235778, 220351, 220736, 229054, 235927, 217975, 219249, 215240, 229048, 229799, 219245, 219252, 221708, 229047, 229807, 229050, 229052, 223796, 229806, 219230, 229791, 235684, 229801, 229794, 235683, 219227, 219971, 229789, 235682, 229049, 229792, 219202, 235598, 229803, 235597, 235776, 210106, 235627, 216648, 229808, 229934, 227064, 210099, 223672, 229793, 229804, 235775, 229935, 225236, 223671, 219179, 229811, 210111, 210124, 219180, 229877, 219186, 235835, 229812, 223654, 219906, 219226, 219869, 223653, 223650, 210723, 223655, 220706, 223667, 235626, 219177, 223651, 223663, 235631, 223658, 220593, 223659, 223662, 210118, 220711, 223652, 223657, 219967, 219181, 229846, 117885, 220704, 220703		
			Weed type	1	168493
			Landrace	10	219172, 214463, 219176, 219189, 235771, 219175, 219174, 219248, 196314, 219313
			EGY	Variety	4
ESP	Landrace	2	413, 289		
HTI	Landrace	1	152651		
IDN	Variety	6	219267, 229055, 229060, 229056, 227063, 229057		
IND	Variety	12	236093, 219234, 236076, 236071, 236091, 236089, 236088, 236086, 236087, 219168, 220058, 219162		
	Landrace	2	418, 303		
ITA	Variety	3	210101, 43, 236085		
JPN	Variety	55	218290, 229907, 236025, 210102, 236024, 219950, 218287, 219948, 7694, 219942, 236016, 219251, 236010, 236015, 219933, 219552, 219250, 219938, 219951, 219936, 236021, 219935, 219934, 219078, 236009, 210122, 219867, 7864, 235718, 235721, 236023, 7859, 220592, 235720, 219940, 219939, 219947, 219943, 219937, 8614, 7851, 1613, 236022, 219925, 236017, 236018, 219946, 8607, 210123, 219924, 236011, 210946, 219945, 1612, 220085		
			Landrace	7	218185, 9116, 9230, 9235, 5995, 5947, 9057
KGZ	Landrace	2	228202, 228203		
KHM	Variety	1	227062		
KOR	Variety	77	221716, 196275, 203705, 219209, 235774, 10688, 8156, 219206, 9844, 7225, 7022, 123643, 154881, 210047, 6961, 223956, 8137, 213742, 9842, 203710, 219212, 112506, 219283, 219224, 219286, 219222, 112525, 220052, 8135, 219221, 174739, 8154, 192041, 8955, 220086, 5469, 8029, 6231, 191811, 9841, 8129, 123120, 154879, 8044, 6972, 174737, 7820, 6196, 219211, 174751, 7077, 6637, 7165, 101983, 9006, 7098, 203673, 8157, 6209, 5260, 5340, 6226, 123132, 6019, 8076, 5282, 5475, 4705, 5514, 6199, 5427, 8150, 6186, 112505, 269, 6182, 218586		
			Weed type	24	168679, 122634, 168414, 168544, 168600, 168536, 122637, 168277, 168466, 168440, 168284, 168480, 168434, 168425, 168487, 168389, 168407, 168355, 168486, 168283, 168446, 168456, 168479, 168455

Table 1. Continued

Origin ^z	Status	Accession	IT Number
KOR	Landrace	93	217848, 6684, 213480, 6620, 227933, 6078, 155895, 8883, 215143, 5756, 213708, 6519, 155894, 9121, 220063, 220062, 9236, 219157, 9192, 10564, 104295, 5833, 229902, 4770, 5049, 113344, 8580, 6125, 8267, 10657, 229896, 6774, 8590, 8194, 8413, 6352, 8355, 6775, 10721, 215142, 173444, 6063, 6522, 10163, 7898, 5980, 8467, 8297, 6370, 213470, 163363, 7819, 10339, 229893, 5046, 9030, 6408, 10726, 8815, 6687, 9252, 9142, 8734, 8984, 7389, 5694, 6380, 6151, 5043, 7713, 9267, 7717, 8996, 7629, 123663, 4694, 10554, 6483, 7691, 7697, 8471, 10727, 215158, 6138, 215135, 5928, 4769, 6538, 219170, 219160, 4753, 9060, 6119
LAO	Variety	1	220033
LBR	Variety	1	226970
NPL	Landrace	8	200461, 200463, 200465, 200457, 200468, 200458, 200446, 229820
PHL	Variety	16	219241, 219239, 220054, 219238, 219960, 219231, 220055, 219961, 219311, 220056, 219956, 219957, 219953, 219242, 219958, 219955
PRK	Variety	1	235773
	Landrace	5	113476, 214409, 227935, 227936, 224681
RUS	Variety	5	179829, 179825, 179828, 179827, 179826
SLE	Variety	1	226968
THA	Landrace	1	214281
TWN	Variety	36	236045, 236044, 236039, 236038, 220077, 236030, 236047, 236051, 236049, 236031, 236029, 236083, 236048, 236067, 236050, 236064, 210119, 236043, 236040, 236079, 236052, 236054, 236034, 236059, 236046, 236053, 236065, 236042, 236066, 236032, 236068, 236035, 236026, 236070, 236080, 236061
	Landrace	5	7752, 9079, 210792, 9127, 9118
USA	Variety	16	220060, 219306, 891, 236077, 219302, 417, 219305, 219164, 219301, 219300, 219280, 219303, 219307, 219297, 219308, 236078
UZB	Landrace	3	235707, 235708, 235710
VNM	Variety	4	236094, 215235, 215232, 215234
	Landrace	1	9054
unknown	Variety	3	219233, 219929, 6157
	Landrace	5	219158, 8598, 160064, 9221, 2348

^zAUS, Australia; BGD, Bangladesh; BRA, Brazil; BTN, Bhutan; CHN, China; EGY, Egypt; ESP, Spain; HTI, Haiti; IDN, Indonesia; IND, India; ITA, Italia; JPN, Japan; KGZ, Kyrgyzstan; KHM, Cambodia; KOR, Korea; LAO, Laos; LBR, Liberia; NPL, Nepal; PHL, Philippines; PRK, North Korea; RUS, Russia; SLE, Sierra Leone; THA, Thailand; TWN, Taiwan; USA, United States of America; UZB, Uzbekistan; VNM, Vietnam.

을 적용하여, 신선찰(6.8813%), 백진주(11.4903%), 추청(19.7312%), 고아미(23.2456%)를 표준품으로 사용하여 시험을 수행하였다. 매번 분석 시 마다 표준품중에 대한 농도곡선을 작성하여 실험의 정확성을 확인하였다.

조단백질농도 분석

단백질농도는 micro Kjeldahl 질소정량법(Juliano, 1985)을 이용하여 다음과 같이 구하였다. 시료 500 mg을 Kjeldahl 분해

관에 넣고 진한 황산 12 ml를 가한 후 셀레늄분해촉매제(FOSS, Kjetabs Se/3,5) 1알을 넣고 Kjeldahl 분해 및 포집 장치(FOSS, Tecator Digestor Auto & Scrubber)에 연결하여 420°C에서 1시간동안 분해하였다. 실온에서 냉각 후 잔여 분해가스를 방출시키고 Kjeldahl 자동 증류 및 분석 장치(FOSS, Kjeltec 8400)에 Kjeldahl 분해관을 연결하였다. 연결된 분해관에 40% NaOH 50 ml와 스팀을 가하여 용액을 증류한 후, 발생한 암모니아테 질소 성분을 1% 붕산용액에 포집한 후, 0.1 N HCl 표준용액으로 적정

하여 질소함량(N%)을 한 자원 당 3반복 분석하고, 쌀의 질소보정계수를 적용 ($N\% \times 5.95$)하여 최종 조단백질함량으로 환산하였다. 고아미(6.777%)를 표준품으로 사용하여 분석 batch 간 발생하는 분석오차를 보정하였다.

근적외선 스펙트럼 측정

벼 유전자원 511자원의 현미 및 현미가루 상태에 대한 근적외선 스펙트럼을 측정하기 위해 근적외선 분광분석기(FOSS, XRD near-infrared)와 기기 구동을 위한 전용프로그램인 ISI scan (FOSS, ver. 4.2.0)을 사용하였으며, micro insert ring을 끼운 mini sample cup에 시료 약 0.6 g을 채운 후 sample cup backs를 이용하여 시료 내 공극을 없애준 후, 실온조건 가시광선 및 근적외선 대역(400–2500 nm)에서 한 자원 당 3반복 scanning하여 근적외선 스펙트럼을 얻었다. 이후 검량식 작성을 위하여 벼 유전자원 511자원 별 아밀로스함량 및 조단백질함량을 입력하여, 습식분석값이 저장된 근적외선 스펙트럼을 파일형태로 저장하였다.

NIRS 예측모델 개발

습식분석값이 저장된 근적외선 스펙트럼은 WINISI III project manager (FOSS, ver. 1.50e)의 standard normal variance와 detrend 기능을 이용한 시료 입도차이에서 발생하는 스펙트럼 산란현상 보정, 수학적 처리, 회귀분석과 같은 일련의 연속적 처리과정을 거쳐 검량식 작성에 사용되었다. 수학적 처리는 1,4,4,1 (1st derivative, 4 nm gap, 4 point smooth, 1 point second smooth)을 사용하였으며 회귀분석은 검량식 작성과 동시에 cross validation 결과를 얻을 수 있는 modified partial least squares (MPLS)법을 사용하였다. 습식분석값과 NIR측정값의 통계적 해석과 상관관계분석은 WINISI III project manager의 global equation 기능을 사용하여 예측모델을 개발하였으며, 개발된 예측모델 중 습식분석값을 가장 잘 예측할 수 있는 최적 예측모델은 RSQ, Standard error of calibration (SEC), Standard error of prediction (SEP), Slope, Bias, Standard error of cross-validation (SECV) 및 One minus the ratio of unexplained variance to total variance (1-VR) 등의 통계치를 고려하여 선별하였다.

NIRS 예측모델 검증

벼 유전자원의 이화학적 성분 분석용으로 개발된 최적 NIRS 예측모델의 미지시료 적용가능성을 검증하기 위해, 검량식 작

성에 이용되지 않은 자원들의 아밀로스 및 단백질 농도를 NIRS를 이용하여 측정한 후 각 성분들의 농도를 저농도, 중간농도, 고농도 구간으로 나누고 각 구간별 농도를 대표하는 50자원을 선정하여 최종 아밀로스함량 검증용 150자원과 조단백질함량 검증용 150자원을 선별하였다. 이후, NIR 스펙트럼 측정과 이화학적 성분 분석을 수행하여 validation file을 작성하였다. 작성된 validation file을 대상으로 WINISI III project manager (FOSS, ver. 1.50e)의 monitor result 기능을 사용하여 계산된 Slope, RSQ, SEP, Bias 등의 통계치를 바탕으로 NIRS 예측모델의 미지시료 적용가능성과 정확성을 검증하였다.

결과 및 고찰

아밀로스 및 단백질농도 분석

검량식 작성을 위한 습식분석값을 얻기 위해 벼 유전자원 511자원(Table 1)에 대한 아밀로스 분석을 수행하였으며 상태가 양호하지 못한 7자원을 제외한 총 504자원에서 습식분석값을 얻었다. 아밀로스 습식분석방법은 국립식량과학원 남부작물부 벼 이화학적 성분 분석 기준이 적용된 비색정량법을 사용하였다. 신선찰(6.8813%), 백진주(11.4903%), 추청(19.7312%), 고아미(23.2456%)를 표준품으로 사용하였고, 매번 분석 때마다 표준농도곡선을 작성하여 실험의 정확성을 확인하였다. 각 표준품의 아밀로스 농도는 순수 감자 전분을 기준으로 결정된 값이다. 백진주, 추청, 고아미 표준품의 아밀로스농도는 기존 알려진 값들과 유사하다(Kim *et al.*, 2006; Chun *et al.*, 2014). 그러나 신선찰(6.8813%)의 경우 일반적인 찰벼(1–2%)보다 높은 아밀로스 값을 가진다. 이는 시험에 적용된 비색정량법이 가지는 분석방법의 한계로 낮은 아밀로스 농도의 경우 아밀로펙틴과 요오드가 결합한 비색화합물이 정확한 아밀로스 측정을 방해하여 실제 아밀로스 농도보다 높게 측정되는 단점이 있다(Gibson *et al.*, 1996). 비색정량법에서는 표준농도곡선에 사용된 표준품들의 종류에 따라 동일 찰벼 자원이라도 아밀로스 농도는 다르게 측정될 수 있다. Yoon *et al.* (2015)과 Yoo *et al.* (2013)의 논문을 참조하여 서로 다른 표준품이 적용된 동일한 찰벼의 아밀로스농도를 상호 비교하였다. 이번 연구에 사용된 표준품과 동일한 품종이 적용된 method A의 경우 찰벼의 아밀로스농도 범위는 4.5–5.6% (Yoon *et al.*, 2015)였고, 순수한 아밀로스와 아밀로펙틴의 비율별 혼합물을 표준품으로 사용한 method B의 경우 아밀로스농도 범위는 1.83–1.93%였다(Yoo *et al.*, 2013). 두 방법 간의 분석 차이는 2.66–3.73%포인트였

으며 평균 3.32%포인트였다. 신선찰 표준품의 경우 비율별 혼합물을 사용한 Yoo *et al.* (2013)의 방법에서는 1.84%였으나 4개의 표준품을 이용한 Yoon *et al.* (2015)의 방법에서는 5.4%였다. 두 연구간 아밀로스 농도 차이는 3.56%로 이는 서로 다른 재료를 표준품으로 사용했을 때 결과가 다르게 나타남을 보여준다. Yoo *et al.* (2013)의 방법은 적은 자원의 정밀한 검정에는 적합하나 대량의 자원을 분석하기에는 부적합하다. 본 연구에서는 국립식량과학원 남부작물부 벼 이화학적 성분 분석 기준이 적용된 비색정량법을 사용하는 것이 효율적일 것으로 판단되었다. 비색정량법에 의한 504자원의 아밀로스농도 범위는 6.15-32.25%였으며, 평균 아밀로스농도는 19.10%였다. 아밀로스농도가 19.10(± 0.5)%인 자원의 수는 48점으로 전체의 9.52%를 차지하였고, 아밀로스농도가 16.58% 이하인 자원의 수는 93점으로 전체의 18.5%였다(Fig. 1A).

벼는 아밀로스 농도에 따라 찰(1-2%), 저아밀로스(7-20%), 메벼(20-25%), 고아밀로스(25%이상)로 구분할 수 있다(Song *et al.* 2008). 아밀로스 분석에 사용된 표준품종들의 농도를 기준으로 보존자원을 재분류해 보면 저아밀로스 자원인 신선찰(6.88%) 보다 낮은 농도를 갖는 찰벼 자원은 24자원으로 전체자원의 4.8%를 차지하였고, 고아밀로스 자원인 고아미(23.25%) 보다 높은 농도를 갖는 자원은 120자원으로 전체자원의 23.8%를 차지하였다. 추정(19.73%)과 고아미사이의 농도를 갖는 메벼 자원은 146자원으로 전체자원의 29.0%를 차지하였고, 신선찰과 추정사이 농도를 갖는 저아밀로스 자원은 214자원으로 전체자원의 42.4%였다(Fig. 1A).

켈달분석법에 의한 511자원의 단백질농도 범위는 4.72-14.81%였으며, 평균 단백질농도는 7.77%였고, 단백질농도가 7.77(± 0.5)%인 자원의 수는 전체의 약 31%인 161자원이었다(Fig. 1B). 단백질 분석에 사용한 표준품종인 고아미(6.78%)를 기준으로 보존

자원을 재분류해 보면 고아미보다 낮은 농도를 갖는 자원은 101자원으로 전체자원의 19.7%를 차지하였고, 고아미보다 높은 농도를 갖는 자원은 80.2%인 410자원이었다. 단백질농도 6.62-6.78% 구간의 자원밀도가 상대적으로 낮았으나 자원밀도들이 비교적 정규분포에 가까운 양상을 나타내고 있으므로 현미의 조단백질농도 NIR분석 검량식 작성에 오류가 없을 것으로 판단되었다.

보존자원과 증식자원의 성분비교

동일한 유전자원에 대해 보존자원과 증식자원 간 아밀로스, 단백질 농도 차이가 있는지 알아보기 위하여 검량식 작성용 511자원들 중 대표적 아밀로스 성분 분석값을 갖는 200자원을 선발하여 농업유전자원센터 시험포장에서 포장증식을 수행하였다. 증식자원 중 미발아, 미성숙 자원이 10자원이었으며, 이를 제외한 최종 190자원을 수확한 후 동일한 자원에 대해서 아밀로스, 단백질 성분분석을 하여 보존자원과 증식자원들 간의 성분농도 변화를 비교분석하였다. 보존자원과 비교한 결과 증식자원에서 아밀로스 농도 20.06-23.54% 구간의 자원수가 감소하였으며 단백질 농도는 전반적으로 낮아지는 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 보존자원과 증식자원들 간의 통계적 유의성 검정 결과 아밀로스 농도는 보존자원과 증식자원 간에 집단 간 차이가 없고, 단백질 농도는 집단 간 차이가 있음을 확인할 수 있었다($p < 0.05$). 보존자원과 증식자원을 이용하여 만든 NIRS 예측모델 서로간의 차이를 확인하기 위해 보존자원과 증식자원들의 현미를 이용하여 NIR 측정값과 습식분석값을 얻었다. RSQ 값은 아밀로스 농도의 경우 보존자원은 0.956, 증식자원은 0.996이었고, 단백질농도의 경우 보존자원은 0.982, 증식자원은 0.934였다. Slope 값은 아밀로스 농도의 경우 보존자원은 1.001, 증식자원은 1.003이었고, 단백질농도는 보존자원은 1.003, 증식자원은

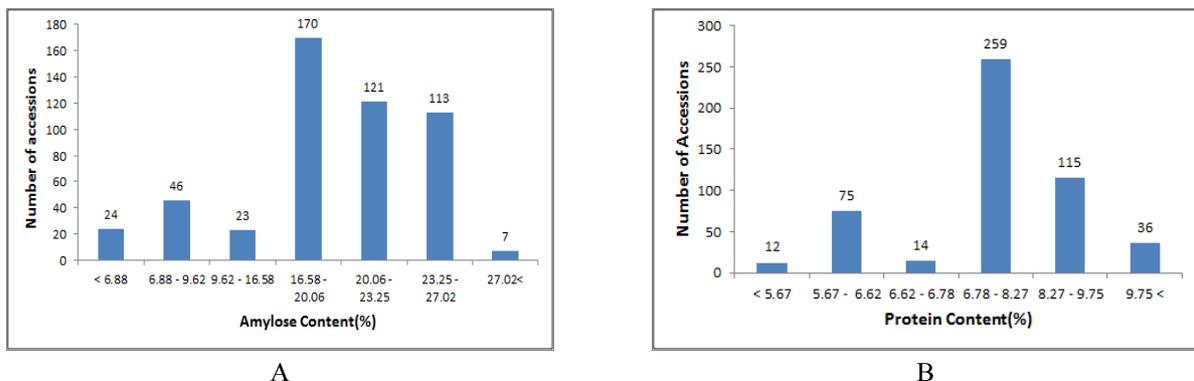


Fig. 1. Amylose (A) and protein (B) content in the milled brown rice for NIRS prediction model.

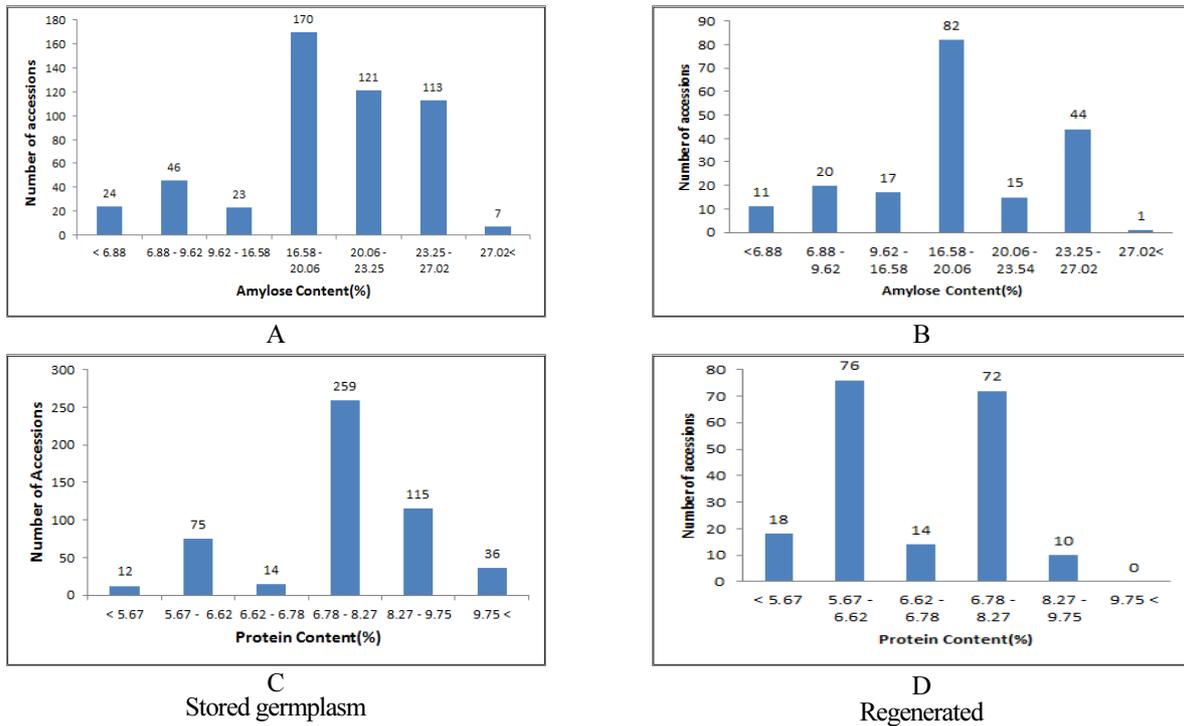


Fig. 2. Amylose and protein content in the milled brown rice between stored germplasm and regenerated germplasm. (A and C: Amylose and protein content of stored germplasm, B and D: Amylose and protein content of regenerated germplasm).

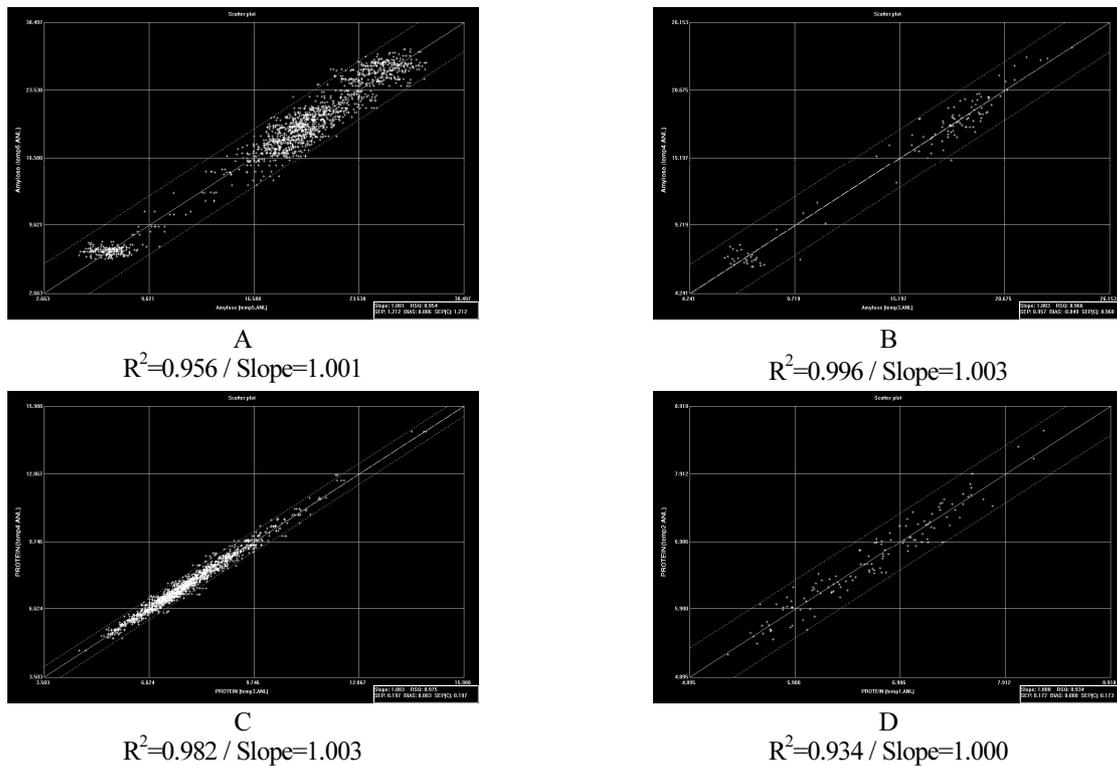


Fig. 3. Correlation plots between NIRS measurements and milled brown rice amylose content (A: Stored germplasm, B: Regenerated germplasm) and protein content (C: Stored germplasm, D: Regenerated germplasm). Calculation was based on 511 stored germplasm and 190 regenerated germplasm.

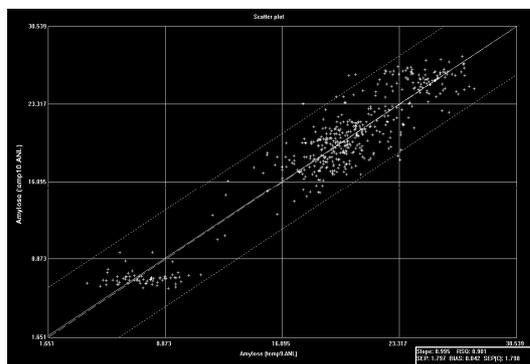
1.000이었다(Fig. 3). 검량식의 기울기인 slope이 1이면 NIR 측정값과 습식분석값이 정확히 일치한다는 의미이며 1에 가까울수록 NIR 측정값과 습식분석값이 높은 상관관계를 갖는다. 보존자원과 증식자원 간의 아밀로스 및 단백질 농도 차이는 있으나 Slope 값들이 유사한 점을 고려할 때 NIRS 예측모델 개발을 위해 보존자원을 이용하는 것에 문제가 없음을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서 사용된 보존자원은 벼의 대량 유전자원평가를 위한 NIRS 예측모델 개발에 충분히 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

NIRS 예측모델 개발

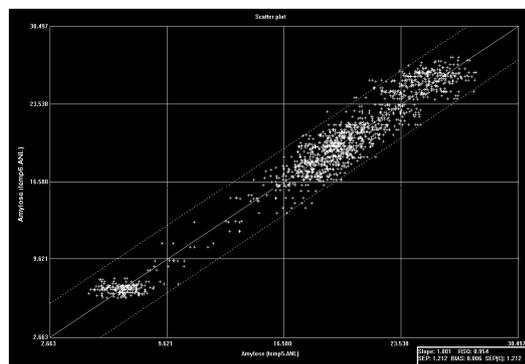
NIRS 예측모델 개발에 있어 적합한 보존자원의 시료형태를 결정하기 위해서 동일한 보존 자원에 대하여 현미와 현미가루 상태의 두 가지 시료를 준비하여 NIRS 예측모델을 만들었다. 시료형태별로 만들어진 NIRS 예측모델 중 RSQ와 1-VR 값이 1에 근접하고 SEC와 SECV 값이 작은 예측모델을 선택하였다. RSQ는 NIRS 예측모델의 결정계수이고 1-VR은 NIRS 예측모델의 교차검증 결정계수이다. 결정계수값이 1에 가까울수록 예측모

Table 2. Calibration equation and cross validation results for the amylose and protein content of brown rice and milled brown rice

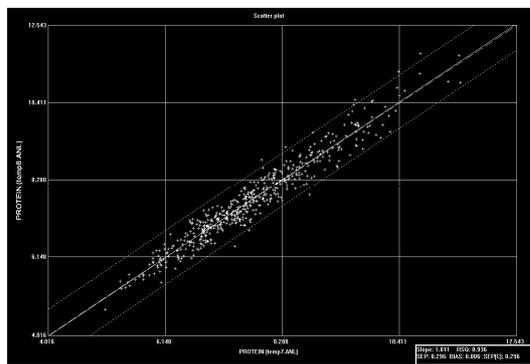
Constituent	N	Lab. Data			NIRS Data			RSQ	SEC	SECV	1-VR	
		Min	Max	Mean	Min	Max	Mean					
Amylose	504	Brown	6.15	32.25	19.10	1.96	36.02	18.99	0.906	1.741	1.915	0.886
		Milled	6.15	32.25	19.10	1.94	36.08	19.01	0.956	1.159	1.180	0.957
Protein	511	Brown	4.72	14.81	7.77	4.26	11.11	7.69	0.941	0.276	0.316	0.923
		Milled	4.72	14.81	7.77	4.06	11.35	7.70	0.982	0.164	0.169	0.981



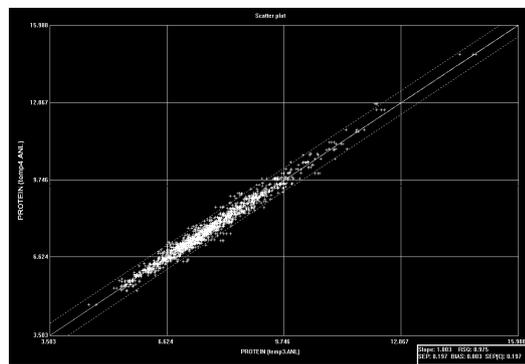
A
 $R^2=0.906$



B
 $R^2=0.956$



C
 $R^2=0.941$



D
 $R^2=0.982$

Fig. 4. Correlation plots between NIRS data and amylose content (A: brown rice, B: milled brown rice) and protein (C: brown rice, D: milled brown rice).

델의 신뢰성은 높아진다. SEC는 검량식 표준오차이고 SECV는 교차검증 표준오차이다. 표준오차값이 0에 가까울수록 예측모델의 정확도는 높아진다.

RSQ는 아밀로스 농도의 경우 현미상태의 값은 0.906, 현미가루상태의 값은 0.956이었고, 단백질농도의 경우 현미상태의 값은 0.941, 현미가루상태의 값은 0.982이었다(Table 2). SEC는 아밀로스 농도의 경우 현미상태의 값은 1.714, 현미가루상태의 값은 1.159였고, 단백질 농도의 경우 현미상태의 값은 0.276, 현미가루상태의 값은 0.164였다. 작성된 검량식의 정확도를 검증하기 위해 검량식 작성에 사용된 보존 자원을 사용하여 교차검증한 결과, 1-VR은 아밀로스 농도의 경우 현미상태와 현미가루상태의 값은 각각 0.886과 0.957이었고, 단백질 농도는 현미상태와 현미가루상태의 값은 각각 0.923과 0.981이었다(Table 2). 현미가루 시료형태를 이용한 NIRS 예측모델이 현미 시료형태에 비해 상대적으로 높은 RSQ와 1-VR, 낮은 SEC와 SECV를 나타냄을 고려해 볼 때, NIRS 예측모델 개발에는 현미가루 시료형태가 적합함을 확인할 수 있었다.

NIRS 예측모델 보완 및 최적화

NIRS 분석방법은 분석하고자 하는 시료를 환경과 인체에 유독한 시약을 사용하지 않고 분쇄, 추출, 여과, 희석 등의 복잡한 전처리 과정 없이 비 파괴적으로 분석할 수 있는 장점을 가지고 있으나 습식분석에 비해 정확성은 낮기 때문에 검량식 자원들을 적정 농도 구간에서 균등한 자원 밀도를 나타내도록 구성하는 것이 중요하다(Kim *et al.*, 2008). 현미가루 검량식이 의미 있는 결과를 나타내었으나(Table 2) 특정 아밀로스 농도 구간의 (9.62~16.58%) 자원밀도가 낮은 농도 결측 구간이 존재하기 때문에 미지시료 측정 시 저 밀도 구간에서 큰 분석오차가 발생할 가능성이 존재한다(Fig. 5B). 이러한 점을 보완하기 위해, 특정 아밀로스 농도 구간에 해당될 것으로 예상되는 200자원을 추가 습식분석한 결과, 26자원만이 원하는 농도 구간에 포함되었다. 선정된 26자원의 NIR 측정과 습식분석값을 기존 검량식 자원에 추가하여 아밀로스 농도 결측 구간을 보완하였다. 이후 아밀로스의 경우 Outlier (이상치) 시료들을 검량식 자원에서 제거하였고, 단백질은 추가 보완 없이 Outlier (이상치) 시료만을 검량

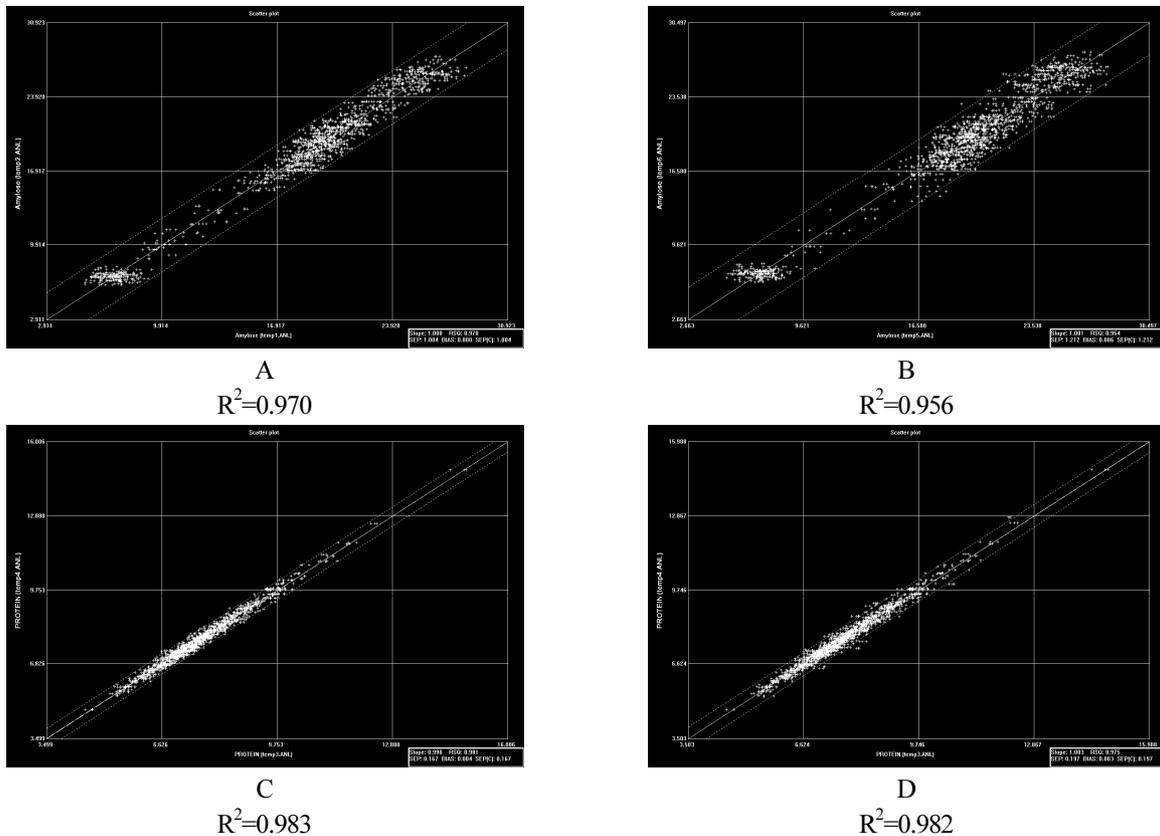


Fig. 5. Correlation plots between NIRS data and amylose content (A: Modified NIRS prediction model, B: NIRS draft model) and protein (C: Modified NIRS prediction model, D: NIRS draft model) in the milled brown rice germplasm.

Table 3. Calibration and cross validation results for the amylose and protein content of modified NIRS prediction model and NIRS draft prediction model

Constituent	Modified NIRS model					NIRS draft model				
	N	RSQ	SEC	SECV	1-VR	N	RSQ	SEC	SECV	1-VR
Amylose	465	0.970	1.010	1.048	0.967	504	0.956	1.159	1.180	0.957
Protein	473	0.983	0.158	0.163	0.982	511	0.982	0.164	0.169	0.981

Table 4. External validation results of NIRS equation model for the amylose and protein content in the milled brown rice

Constituent	External validation				NIRS equation model			
	N	r ²	SEP	Slope	N	RSQ	SEC	Slope
Amylose	132	0.962	2.349	0.811	465	0.970	1.010	1.000
Protein	124	0.986	0.415	1.038	473	0.983	0.158	0.998

식 자원에서 제거하여 현미가루 NIR 예측모델을 최적화하였다. 추가적인 NIR 측정 및 습식분석으로 아밀로스 농도 결측 구간이 보완되었고, RSQ값이 0.956에서 0.970으로 향상된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). 현미가루 NIR 예측모델의 최적화와 최적화하기 전의 NIRS 관련 통계수치들을 나타내었고, 그들의 최적화된 수치를 확인할 수 있었다(Table 3).

NIRS 예측모델 검증

1-VR은 검량식 작성에 이미 이용된 자원을 재차 이용하여 정확도를 평가하는 역검정 방법이다. 간편하게 평가가 이뤄지는 장점이 있으나 1-VR 만으로는 개발된 최적 NIRS 예측모델의 미지시료 분석 시 정확도를 평가하기에 부족하다(Bagchi *et al.*, 2016). 따라서 검량식 작성에 사용된 자원과는 별도의 자원들을 이용하여 NIR 기기내의 external validation 프로그램을 이용한 검증과정을 거쳤다. 검량식 작성에 사용된 511자원 이외의 재래종 벼 2,000자원을 최적 예측모델이 적용된 NIRS를 이용하여 아밀로스 및 단백질 농도를 분석하였다. NIRS로 분석된 자원들을 저농도, 중간농도, 고농도 세 구간으로 나누고 각 농도 구간별 대표자원을 선택하는 방법으로 아밀로스는 132자원, 조단백질은 124자원을 선정하여 NIRS 예측모델 검증자원으로 사용하였다. 선정된 검증자원들의 습식분석값을 NIRS 구동 프로그램의 lab data 항목에 입력하여 external validation set을 구성하였고, 최적 NIRS 예측모델에 external validation set이 적용된 검정 결과를 확인하였다(Table 4).

아밀로스와 단백질의 RSQ (r²) 값은 각각 0.962, 0.986이었고 SEP 값은 각각 2.349, 0.415였다. 단백질 SEP 값이 아밀로스 SEP 값보다 작으므로 단백질 측정 정확도가 높았으며 이는

Hwang *et al.* (1994)이 보고한 결과와 일치하는 경향이었다(아밀로스 SEP 0.882, 단백질 SEP 0.280, Hwang *et al.*, 1994). SEP 값이 아밀로스가 단백질에 비해 높게 나타나는 것은 현미의 경우 아밀로스와 관련이 적은 성분이 많이 존재하는 등 미강의 혼입 및 그 분산 상태가 백미에 비해 다르기 때문인 것으로 생각된다(Moon *et al.*, 1994). 이상의 결과들을 종합해 볼 때 본 연구에서 개발된 최적 NIRS 예측모델은 기존의 습식분석에 의한 성분 분석 결과와 높은 상관도를 가지며, 분석정확도 또한 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 개발된 NIRS 예측모델은 습식분석에 소요되는 시간과 경비를 절감하여 대량의 벼 유전자원에 대한 신속한 이화학적 특성 분석에 적용 가능할 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 벼 유전자원의 이화학적 대량 분석체계 구축을 위하여 비파괴 분석 방법 중의 하나인 근적외선 분광분석(NIRS) 예측모델을 개발하고, 미지 시료 적용 시 분석 정확도와 실제 적용가능성을 평가하기 위해 교차 검정과 외부 검정을 수행하였다. NIRS 예측모델 개발을 위해 농업유전자원센터 보유 자원 중 511자원을 사용하였고, 그 중 아밀로스 농도 대표자원 200점을 추가 선정하여 보존자원과 증식자원의 아밀로스 및 단백질 성분 변화를 비교하였다. 습식분석 상호비교, t-Test를 통한 통계처리 결과로 볼 때 저장고 보존자원과 증식자원 간의 중대한 이화학적 성질의 변이 현상은 관측되지 않았으므로 NIRS 예측모델 개발에 보존자원을 사용하는 것은 가능할 것으로 판단되었다. 511 자원의 습식분석 결과 아밀로스 농도는 6.15~32.25%, 단백질 농도는 4.72~14.81%였다. 현미와 현미가루의 두 가지

시료 형태에 대한 NIR 스펙트럼을 얻었고 일련의 통계적 처리를 이용하여 NIRS 예측모델을 얻었다. 현미의 R^2 , SEC, Slope 값은 아밀로스 농도의 경우 0.906, 1.741, 0.995였고, 단백질 농도의 경우 0.941, 0.276, 1.011 이었다. 현미가루의 R^2 , SEC, Slope 값은 아밀로스 농도의 경우 0.956, 1.159, 1.001이었고, 단백질 농도의 경우 0.982, 0.164, 1.003이었다. 이와 같은 결과로 NIRS 예측모델 개발에는 가루형태의 시료가 효율적임을 알 수 있었다. 아밀로스 농도의 경우 9.62~16.58%의 자원밀도가 상대적으로 낮은 구간에 대한 보완을 위해 추가 200자원의 습식분석, NIRS 측정 수행하였으며, 보완된 최적 NIRS 예측모델의 R^2 , SEC, Slope 값은 아밀로스 농도의 경우 0.970, 1.010, 1.000 이었고 단백질 농도의 경우 0.983, 0.158, 0.998이었다. 최적 NIRS 예측모델의 미지시료 적용 시 정확도를 평가하기 위해 아밀로스는 132자원, 조단백질은 124자원을 검정자원으로 사용하여 외부 검정과정을 거친 결과 R^2 , SEP 값은 아밀로스 농도의 경우 0.962, 2.349였고, 단백질 농도의 경우 0.986, 0.415였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 본 연구에서 개발된 NIRS 예측모델은 습식분석방법을 대체하여 벼 유전자원의 아밀로스 및 단백질 농도의 대량 분석에 효율적으로 적용 가능할 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 농업과학기술연구 개발사업(과제번호: PJ010871)의 지원에 의해 이루어졌습니다.

References

Ahn, H.G. and Y.H. Kim. 2012. Discrimination of Korean domestic and foreign soybeans using near-infrared reflectance spectroscopy. *Korean J. Crop Sci.* 57(3):296-300 (in Korean).
 Bagchi, T.B., S. Sharma and K. Chattopadhyay. 2016. Development of NIRS models to predict protein and amylose content of brown rice and proximate compositions of rice bran. *Food Chemistry* 91:21-27.
 Bao, J.S., Y.Z. Cal and H. Corke. 2001. Prediction of rice starch quality parameters by near infrared reflectance spectroscopy. *J. of Food Science* 66:936-939.
 Bean, M.M., R.E. Miller, B.O. Juliano, K.H. Norris, W.R. Hruschka and B.D. Webb. 1990. NIR and DSC characteristics of rice starch. *Cereal Food World* 35:834.
 Champagne, E.T., K.L. Aett, B.T. Vinyard, B.D. Webb,

A.M. McClung and F.E. Barton. 1997. Effects of drying conditions, final moisture content and degree of milling on rice flavor. *J. of Cereal Chemistry* 74:566-570.
 Choi, H.C., H.C. Hong and B.H. Nahm. 1997. Physico-chemical and structural characteristics of grain associated with palatability in japonica rice. *Korean J. Breeding* 29:15-27 (in Korean).
 Chun, A.R., D.H. Kim, M.R. Yoon, S.K. Oh and I.S. Choi. 2014. Quality characteristics of makgeolli of rice cultivars with different starch compositions. *Korean J. Food&Nutr.* 27(1):50-58 (in Korean).
 Delwiche, S.R., M.M. Bean, R.E. Miller, B.D. Webb and P.C. Williams. 1995. Apparent amylose content of milled rice by near-infrared reflectance spectrophotometry. *Cereal Chemistry* 72:182-187.
 Delwiche, S.R., K.S. McKenzie and B.D. Webb. 1996. Quality characteristics in rice by near-infrared reflectance analysis of whole grain milled samples. *J. of Cereal Chemistry* 73:257-263.
 Gibson, T.S. and V.A. McCleary. 1996. A procedure to measure amylose in cereal starches and flours with concanavalin A. *J. Cereal Science* 25:111-119.
 Gomez K.A. 1979. Effect of environment on protein and amylose content of rice, chemical aspects of rice grain quality. *IRRI.* 59-68.
 Han, C.S. and M.Y. Natsuga. 1996. Development of a constituent prediction model of domestic rice using near-infrared reflectance analyzer(1). *J. of Korean Soc. Agric. Mach.* 21(2):198-210 (in Korean).
 Hwang, H.G., R.K. Cho, J.K. Sohn and S.K. Lee. 1994. Rapid evaluation of chemical components of rice grain using near-infrared spectroscopy. *Korean J. Crop Sci.* 39(1):7-14 (in Korean).
 Jiang, H.Y., Y.J. Zhu, L.M. Wee, J.R. Dai, T.M. Song, Y. L. Yan and S.J. Chen. 2007. Analysis of protein, starch and oil content of single intact kernels by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) in maize. *Plant breeding* 126:492-497.
 Juliano, B.O. 1971. A simplified assay for milled-rice amylose. *Cereal Science Today* 16:334-340.
 Juliano, B.O. 1985. Criteria and tests for rice grain qualities. *In Rice Chemistry and Technology*, American Association of Cereal Chemists, Inc., MN (USA). pp. 443-524.
 Kim, B.J., E.H. Park and C.S. Jung. 1996. Effects of

- chemical contents variation in covered barley seed on near infrared reflectance spectroscopy. *Korean J. Crop Sci.* 41(3):354-361 (in Korean).
- Kim, H.I. 2004. Comparison of Korean and Japanese rice by NIR and chemical analysis. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 14(2):135-144 (in Korean).
- Kim, H.J., S.Y. Kim, Y.S. Lee and Y.H. Kim. 2014. Determination of baicalein contents in *Scutellaria baicalensis* by NIRS. *Korean J. Plant Res.* 27(4):286-292 (in Korean).
- Kim, J.H., S.B. Kim and T.Y. Kim. 2006. Noodle making characteristics of goami rice composite flours. *Korean J. Community Living Science* 17(2):61-68 (in Korean).
- Kim, J.S., M.H. Song, J.E. Choi, H.B. Lee and S.N. Ahn. 2008. Quantification of protein and amylose contents by near-infrared reflectance spectroscopy in aroma rice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 40(6):603-610 (in Korean).
- Kim, J.S., Y.H. Cho, J.G. Gwag, K.H. Ma, Y.M. Choi, J.B. Kim, J.H. Lee, T.S. Kim, J.K. Cho and S.Y. Lee. 2008. Quantitative analysis of amylose and protein content of rice germplasm in RDA-genebank by near-infrared reflectance spectroscopy. *Korean J. Crop Sci.* 53(2):217-223 (in Korean).
- Ko, J.K., K.S. Lee, H.T. Shin and J.S. Shim. 1998. Characteristics of grain quality at different transplanting times among rice cultivars II. variation of some grain appearance and chemical components. *Korean J. Plant Res.* 11(1):64-69 (in Korean).
- Kwon, Y.R., M.H. Baek, D.C. Choi, J.S. Choi and Y.G. Choi. 2005. Determination of calibration curve for total nitrogen contents analysis in fresh rice leaves using visible and near-infrared spectroscopy. *Korean J. Crop Sci.* 50(6):394-399 (in Korean).
- Kwon, Y.R., S.H. Cho, Y.E. Song, J.H. Lee and C.H. Cho. 2006. Nondestructive measurement of chemical compositions in polished rice and brown rice using NIR spectra of hulled rice acquired in transmittance and reflectance modes. *Korean J. Crop Sci.* 51(5):451-457 (in Korean).
- Moon, S.S., K.H. Lee and R.K. Cho. 1994. Application of near-infrared reflectance spectroscopy in quality evaluation of domestic rice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26(6):718-725 (in Korean).
- Shu, Q.Y., D.X. Wu, Y.W. Xia, M.W. Gao and A. McClung. 1999. Calibration optimization for rice apparent amylose content by near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *J. of Zhejiang University (Agriculture & Life Science)* 25:343-346.
- Son, J.R., J.H. Kim, J.I. Lee, J.K. Kim, H.G. Hwang and H.P. Moon. 2002. Trend and further of rice quality evaluation. *Korean J. Crop Sci.* 47:33-54 (in Korean).
- Song, J., J.H. Kim, D.S. Kim, C.K. Lee, J.T. Youn, S.L. Kim and S.J. Suh. 2008. Physicochemical properties of starches in japonica rices of different amylose content. *Korean J. Crop Sci.* 53(3):285-291 (in Korean).
- Song, L.S., Y.H. Kim, G.P. Kim, K.G. Ahn, Y.S. Hwang, I.K. Kang, S.W. Yoon, S.S. Lee, K.Y. Shin, W.Y. Lee, Y.S. Cho and M.G. Choung. 2014. Quantitative analysis of carbohydrate, protein, and oil contents of Korean foods using near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43(3):425-430 (in Korean).
- Song, Y.J., Y.E. Song, N.K. Oh, Y.G. Choi and K.C. Cho. 2006. Relationship between near-infrared reflectance spectra and mechanical sensory score of commercial brand rice produced in Jeonbuk. *Korean J. of Crop Sci.* 51(s):42-46 (in Korean).
- Williams, P. and K. Norris. 1987. Near-Infrared Technology in Agricultural and Food Industries. American Association of Cereal Chemists, Inc., MN (USA). p. 330.
- Windham, W., B.G. Lyon, E.T. Champagne, F.E. Barton, B.D. Webb, A.M. McClung, K.A. Moldenhauer, S. Linscombe and K.S. McKenzle. 1997. Prediction of cooked rice texture quality using near-infrared reflectance analysis of whole-grain milled samples. *Cereal Chemistry* 74:626-632.
- Yoo, J.S., H.S. Park, Y.C. Cho, B.K. Kim and K.Y. Ha. 2013. Comparison of physicochemical and textural properties of glutinous rice cultivars. *Food Eng. Prog.* 17(3):212-218 (in Korean).
- Yoon, M.R., J.S. Lee, J.E. Kwak, J.H. Lee, J.B. Chun, C.I. Yang, J.H. Cho, M.J. Kim, C.K. Lee, B.K. Kim and W.H. Kim. 2015. Starch and pasting characteristics in relation to stickiness of rice cake using glutinous rice varieties. *Korean J. Breed. Sci.* 47(3):199-208 (in Korean).

(Received 13 September 2016 ; Revised 29 November 2016 ; Accepted 2 January 2017)