

Research Article

근적외선분광법을 이용한 수입건초의 Ca과 P 함량 예측

이배훈, 김지혜, 오미래, 이기원, 박형수*
국립축산과학원

Predicting Calcium and Phosphorus Concentrations in Imported Hay by near Infrared Reflectance Spectroscopy

Bae Hun Lee, Ji Hye Kim, Mirae Oh, Ki Won Lee and Hyung Soo Park*
National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan, 31000, Republic of Korea

ABSTRACT

Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) is routinely used for the determination of nutrient components of forages. However, little is known about the impact of sample preparation and wavelength on the accuracy of the calibration to predict minerals. This study was conducted to assess the effect of sample preparation and wavelength of near infrared spectrum for the improvement of calibration and prediction accuracy of Calcium (Ca) and Phosphorus (P) in imported hay using NIRS. The samples were scanned in reflectance in a monochromator instrument (680-2,500 nm). Calibration models ($n = 126$) were developed using partial least squares regression (PLS) based on cross-validation. The optimum calibrations were selected based on the highest coefficients of determination in cross validation (R^2) and the lowest standard error of cross-validation (SECV). The highest R^2 and the lowest SECV were obtained using oven-dry grinded sample preparation and 1,100-2,500 nm wavelength. The calibration (R^2) and SECV were 0.99 (SECV: 468.6) for Ca and 0.91 (SECV: 224.7) for P in mg/kg DM on a dry weight, respectively. Results of this experiment showed the possibility of NIRS method to predict mineral (Ca and P) concentration of imported hay in Korea for routine analysis method to evaluate the feed value.

(Key words: Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS), Mineral, Imported hay, Forages, Quality evaluation)

I. 서론

우리나라의 조사료 연간 공급량은 2019년 기준 대략 605만톤으로 국내에서 487만톤을 자급하고 있으나, 118만톤을 외국에서 수입하고 있으며 수입 조사료의 대부분은 건초형태로 수입되고 있다(MAFRA, 2020). 조사료 수입개방에 대응하고 국내산 조사료의 품질향상과 규격화를 위해 정부에서는 2016년부터 동계사료작물과 2019년부터 하계사료작물을 대상으로 근적외선분광법을 이용한 조사료 품질검사 및 등급제 사업을 추진하고 있다(MAFRA, 2019).

조사료의 품질은 초종, 수확시기 및 저장방법에 따라 변이가 크고 다양하다. 현행 조사료 품질검사 및 등급화 사업의 품질평가 항목은 수분, 섬유소, 단백질, 조회분 함량을 분석하여 평가(Kim et al., 2019)하고 있으나 광물질과 비타민과 같은 미량성분을 평가할 수 있는 데이터베이스가 구축되어 있지 않다. 가축 사양에 있어서 다량광물질인 칼슘과 인은 골격이나 조직의 구성성분으로 이용될 뿐만 아니라 체액의 구성성분으로 체액의 산과 염기의 균형에 중

요한 기능을 수행한다(Suttle, 2010). 조사료와 농산물에서 광물질은 무기 및 유기 복합체 모두에 존재하고 있다. 조사료의 무기성분 농도는 작물 숙기, 부위, 대기온도, 시비량, 토양 비옥도 및 토양의 물리적 특성에 따라 달라진다(MacPherson, 2000).

조사료 분야에서 근적외선분광법(NIRS)을 이용한 다량 및 미량 광물질 함량의 분석 가능성에 대한 연구결과가 보고되고 있다(Clark et al., 1987, 1989; Saiga et al., 1989; Smith et al., 1991).

근적외선분광법(NIRS)을 이용한 조사료의 광물질 함량 분석은 광물질은 무기물로 근적외선 영역에서 흡수가 일어나지 않는다는 것과 조직 내에 극히 소량 함유되어 있다는 이유로 분석 가능성의 일관성을 나타내지 못하였다(Whetsel, 1968). 그러나 근래에 들어 NIRS를 이용한 광물질의 분석결과가 보고되고 있으며, Clark et al.(1987)에 의하면 일반적으로 식물체 조직 내의 무기물은 단독으로 존재하지 않고 유기물과 결합되어 존재하기 때문에 유기물과의 결합에 대한 물리성을 측정함으로써 가능하다고 보고하였다.

따라서 본 연구는 근적외선분광법을 이용한 조사료의 품질검

*Corresponding author: Hyung Soo Park, National Institute of Animal Science, RDA, 31000, Cheonan, Republic of Korea. Tel: +82-41-580-6751, Fax: +82-41-580-6779, E-mail: anpark69@korea.kr

사 성분을 확대하기 위하여 조사료의 다량광물질인 Ca과 P 함량의 분석 가능성을 검토하고 광물질 분석 근적외선 DB 구축과 최적의 검량식을 개발하기 위하여 수행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 및 NIR 스펙트라 수집

근적외선분광법을 이용한 조사료의 Ca과 P 함량의 분석 가능성을 검토하기 위하여 2016년부터 2019년까지 전국 건초 수입상, TMR 회사와 축산 농가에서 수집한 수입 화분과와 두과 목건초 392점에서 무작위로 126점을 선별하였다. 선별된 시료는 시료측정 전처리 방법을 생시료 처리구와 건조분쇄 처리구로 나누어 근적외선 스펙트라를 측정하였다. 생시료 처리구는 생시료를 가위로 3~5 cm정도로 절단하여 직경 15 cm인 원형 시료컵에 약 100 g 정도를 충전하여 근적외선 스펙트라를 측정하였다. 건조분쇄 처리구는 생 시료를 열풍건조기에서 65 ℃로 72시간 건조한 후 1 mm mesh Mill로 분쇄하고 직경 3.5 cm인 원형 시료컵에 약 20 g을 충전하여 근적외선 스펙트라를 측정하였다. 근적외선 분광기(Unity SpectraStar 2500X, Brookfield, WI, USA)를 이용하여 680~2,500 nm의 파장범위에서 매 1 nm의 간격으로 반사도를 측정한 후 검량식 유도를 위해서 흡광도(log 1/R : absorbance)로 변환시켜 수집하였다.

2. 수입건초의 Ca 및 P 함량 분석

수입건초의 Ca과 P 함량은 ICP(Inductively Coupled Plasma, Perkin Elmer Optima 5300DV, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 분석하였다. 분쇄된 시료 100 mg과 강한 질산(HNO₃ 67%)

용액 4 ml를 50 ml flask에 넣어 하루 동안 시료에 포함되어 있는 유기물을 녹였다. 이 용액을 hot plate에서 200℃로 가열하며 과산화수소수를 조금씩 첨가하며 용액이 완전히 투명해질 때까지 첨가하였다. 투명해진 용액에 lanthanum 1000 ppm이 포함된 1 M 염산을 넣어 20 ml로 맞추었다. 제조된 시료를 syringe filter(0.45μm, PVDF filter, Pall, USA)를 사용하여 여과한 후 ICP로 분석 하였다.

3. NIR 검량식 작성

수입건초의 Ca과 P 함량 예측 가능성과 정확성을 비교하기 위하여 원시 스펙트라의 파장을 가시영역(680~1,099 nm), 근적외선 영역(1,100~2,500 nm), 전파장영역(680~2,500 nm)로 구분하여 검량식을 개발하였다. 검량식 작성 알고리즘은 시료의 스펙트라에서 입자의 크기, 수분, 밀도 등 물리적 성질에 의한 산란효과에 대한 오차를 줄이기 위해 원시 스펙트라를 Standard Normal Variate and Detrending (SNV-D) 전처리 기법과 수 처리(Math treatment, 1,8,8,1) 기법을 이용하여 보정하고 회귀분석은 부분최소제곱법 (Partial Least Square)을 이용하여 검량식을 유도하였으며(Shenk and Westerhaus, 1993) 상호검증하였다(Shenk and Westerhaus, 1994). 통계적 처리는 상업용 프로그램인 Ucal version 3.0.4.15 (Unity Scientific, Brookfield, CT, USA)를 이용하였다.

시료 전처리 방법과 파장대역별로 구분하여 작성된 검량식의 예측 정확성에 대한 평가에는 Shenk and Westerhaus (1991a, b)가 제시한 검량식 결정계수(Determination Coefficient, R²), 검량식 표준오차(Standard Error of Calibration, SEC), 상호검증 표준오차(Standard Error of Cross Validation, SECV)를 이용하였으며 최적의 검량식은 SECV가 가장 낮은 값을 갖는 것을 선택하였다.

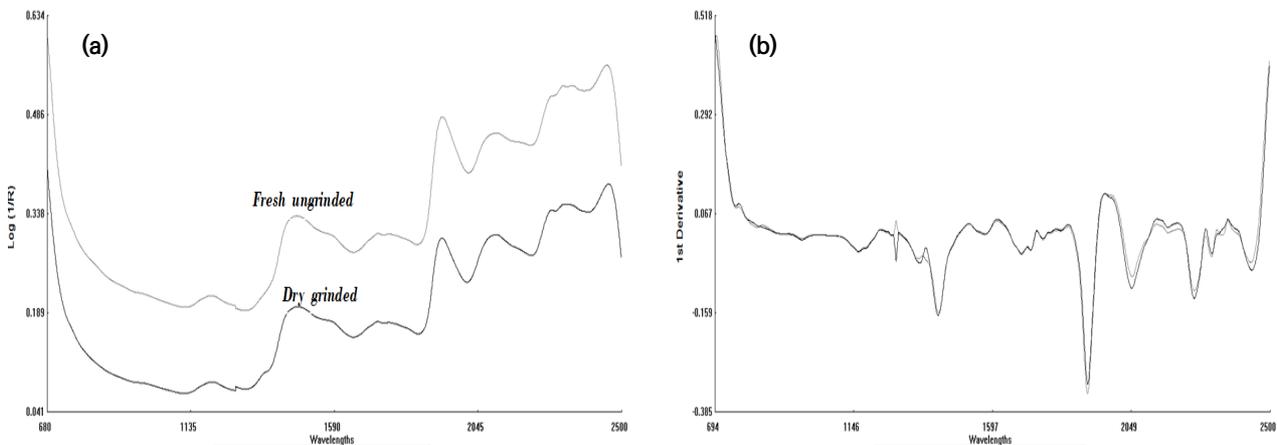


Fig. 1. Average NIR original spectra of sample pre-treatment (a) and a first derivative (b) for imported hay.

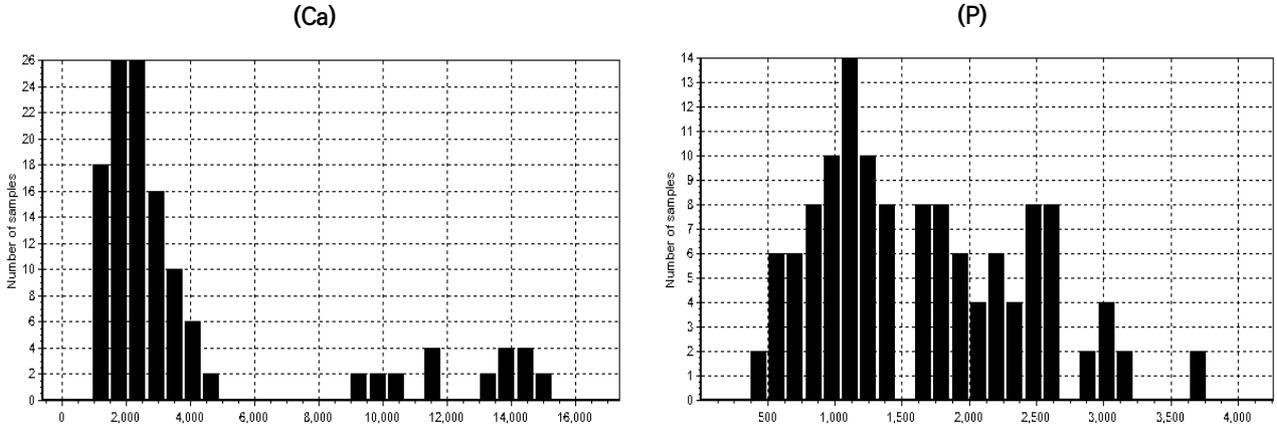


Fig. 2. Histogram of calcium (Ca) and phosphorus (P) concentrations for imported hay calibration set samples.

III. 결과 및 고찰

1. NIR 스펙트라의 특성

수입건초 시료의 근적외선 영역인 680 nm ~ 2,500 nm에서 생시료와 건조분쇄한 시료의 평균 원시 NIR 스펙트라와 1차 미분 처리한 스펙트라는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 수입건초 시료 집단의 근적외선 배역대에서의 흡수 스펙트라를 살펴보면 1,410~1,420, 1,895~1,905, 2,040~2,050 및 2,245~2,255 nm 배역대에서 흡수피크가 크게 나타났으며 나머지 배역대에서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 배역대별 흡수강도는 1차 미분 처리한 스펙트라에서 나타난 것과 같이 수입건초의 시료 전처리 방법에 따라 다르게 나타났다.

Cozzolino and Moron(2004)은 콩과사료작물에서 미량광물질과 상관관계가 높은 파장대역은 1,100~1,300 nm, 1400 nm 및 1,900~2,200 nm라고 보고하였다. 이들 파장 대역의 스펙트라 흡수는 주로 O-H 결합(수분)과 C-H 결합(유기물)과 연관성이 높은 것으로 알려져 있다(Garnsworthy et al., 2000). 또한 가시영역에서도 광물질과 유기물질간의 상관관계가 높은 것으로 보고되고 있다(De Aldana et al., 1995).

2. 수입건초 시료집단의 Ca 및 P 함량 범위

수입건초의 광물질 함량 예측을 위한 검량식(Calibration) 개발에 이용되어진 수입건초 시료집단(Calibration set)의 Ca과 P 함량 범위는 Table 1에서 보는 바와 같다. 수집된 화분과 수입건초 시료집단의 Ca 함량 범위는 1,202~15,573 mg/kg, 평균은 4,397 mg/kg으로 나타났으며, P 함량 범위는 429~3,835 mg/kg, 평균은 1,703 mg/kg으로 나타났다. 각 성분에 대한 분포빈도는 Ca 함량 범위는 넓은 반면 분포빈도가 고르지 못하고 P 함량 범위는 넓고 분포빈도가 전반적으로 고르게 분포하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

Table 1. The range of calcium (Ca) and phosphorus (P) concentrations for collected imported hay samples (calibration set)

Constituent	n	Min.	Max.	Average	Standard deviation
Ca (mg/kg)	126	1,202	15,573	4,397	4,050
P (mg/kg)	126	429	3,835	1,703	759

3. 검량식 작성 및 검증

수입건초의 Ca과 P 함량의 예측 정확성이 우수한 검량식을 개발하기 위하여 시료 전처리 방법과 파장대역별로 검량식을 개발하고 검증한 결과는 Table 2와 Fig. 3에서 보는 바와 같다.

조사료의 주요 무기물인 Ca과 P 함량에 대한 예측 정확성은 시료 전처리 방법과 파장대역별에 따라 다양하게 나타났으며, 시료 측정을 위한 전처리 방법은 건조하여 분쇄하는 방법이 생시료를 바로 측정하는 방법보다 예측 정확성이 높게 나타났다. 파장대역별로는 근적외선 파장(1,100~2,500 nm)대역을 이용하여 검량식을 개발하는 것이 예측 정확성이 가장 높게 나타났다. 수입건초의 Ca 함량 예측 정확성은 근적외선 파장대역에서 건조분쇄 측정이 SEC 292.3 mg/kg($R^2=0.99$)과 SECV 468.6 mg/kg($R^2=0.98$)으로 가장 정확한 예측능력을 나타냈다. 수입건초의 P 함량은 근적외선 파장대역에서 건조분쇄 측정이 SEC 204.4 mg/kg($R^2=0.91$)과 SECV 224.7 mg/kg($R^2=0.89$)으로 가장 정확한 예측능력을 나타냈다.

Tremblay et al.(2009)은 근적외선분광법을 이용하여 티머시 건초 모집단(n=240)의 광물질 함량 예측 연구에서 Ca 함량은 SECV 0.64 g/kg($R^2=0.91$), P 함량을 SECV 0.23 g/kg($R^2=0.69$)의 예측 정확성을 보고하였다.

이상의 결과를 종합해보면 근적외선분광법을 이용하여 조사료

Table 2. The calibration and validation statistics for the prediction of calcium (Ca) and phosphorus (P) concentrations of imported hay

Wavelength	Sample pretreatment	Constituent	n	Calibration		Validation	
				SEC [†]	R ²	SEC [‡]	R ²
680~1,099 nm	Fresh ungrinded	Ca	108	1175.8	0.85	1504.8	0.74
		P	94	208.6	0.91	238.5	0.87
	Dry grinded	Ca	119	1264.4	0.85	1786.6	0.67
		P	77	226.8	0.89	235.7	0.73
1,100~2,500 nm	Fresh ungrinded	Ca	119	595.1	0.98	907.9	0.95
		P	93	190.7	0.91	215.3	0.88
	Dry grinded	Ca	110	292.3	0.99	468.6	0.98
		P	94	204.4	0.91	224.7	0.89
680~2,500 nm	Fresh ungrinded	Ca	119	575.8	0.98	983.2	0.94
		P	98	227.0	0.87	252.1	0.84
	Dry grinded	Ca	110	299.2	0.99	479.4	0.97
		P	92	206.8	0.92	227.0	0.89

[†]Standard error of calibration, [‡]Standard error of cross validation

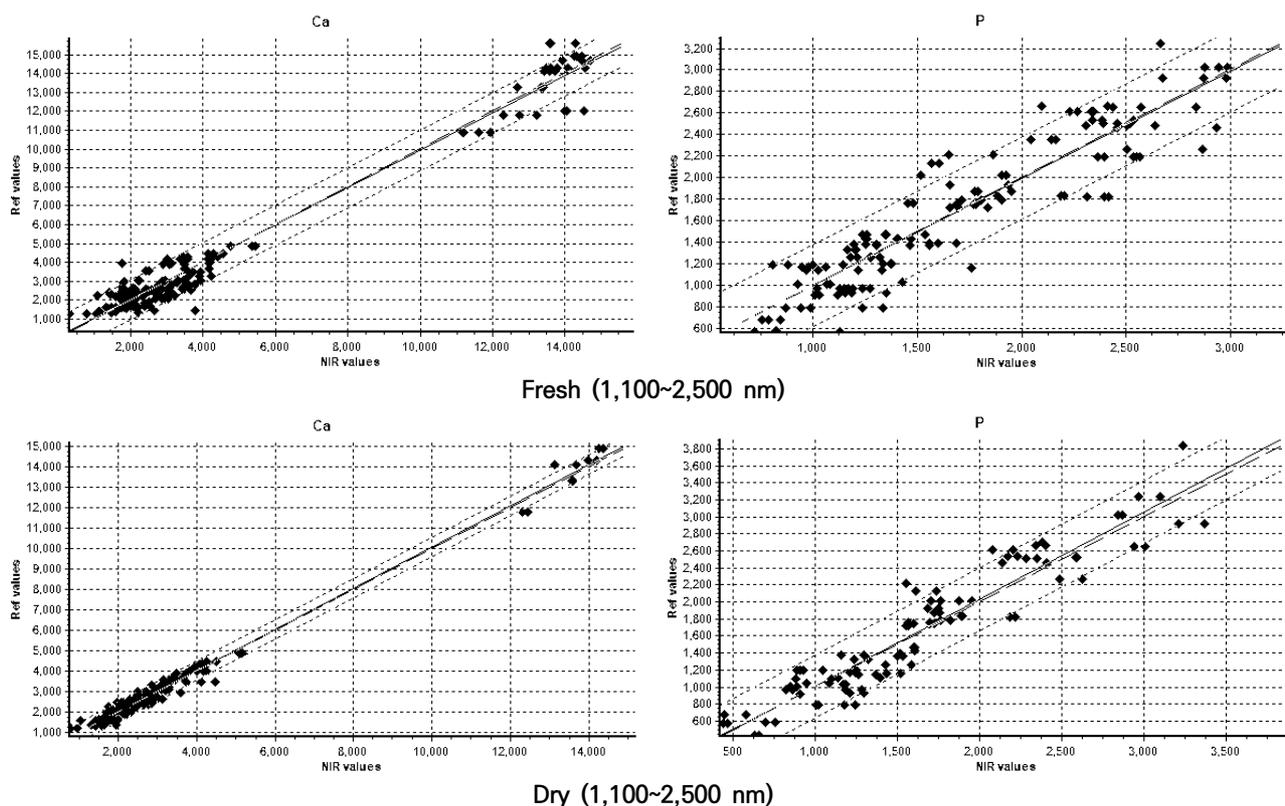


Fig. 3. Relationships between laboratory determined and NIRS predicted values of imported hay.

의 주요 광물질인 Ca과 P 함량을 신속하고 정확하게 분석이 가능하였으며 시료 측정시 건조하여 분쇄하는 전처리 방법과 근적외선 파장 대역(1,100~2,500 nm)에서 검량식을 개발하는 것이 가장 높은 예측 정확성을 나타내었다. 따라서 향후 기존에 구축

된 조사료 품질평가 NIR DB에 Ca과 P 함량을 분석할 수 있는 NIR DB를 확장하면 축우산업에서 조사료의 활용영역이 더욱 확대될 것으로 예상된다.

IV. 요약

본 연구는 근적외선분광법을 활용한 조사료의 Ca과 P 함량의 분석 가능성을 검토하고 예측 정확성이 높은 검량식을 개발하기 위하여 전국 건초 수입상, TMR 회사와 축산 농가에서 수집한 수입 화본과와 두과 목건초 392점 중에서 무작위로 126점을 선택하여 검량식 개발에 이용하였다. 선택된 시료는 시료측정 전처리 방법을 생시료 처리와 건조분쇄 처리구로 나누어 근적외선 스펙트라를 측정하고 근적외선 파장대역을 가시영역, 근적외선, 전파장영역으로 구분하여 검량식을 개발하여 예측 정확성을 평가하였다. 수입건초의 Ca과 P 함량에 대한 예측 정확성은 시료 전처리 방법과 파장대역별에 따라 다양하게 나타났으며, 시료전처리 방법은 건조하여 분쇄하는 방법과 파장대역별로는 근적외선 파장(1,100~2,500 nm)대역에서 예측 정확성이 높게 나타났다. 수입건초의 Ca 함량 예측 정확성은 근적외선 파장대역에서 건조분쇄 측정이 SEC 292.3 mg/kg($R^2=0.99$)와 SECV 468.6 mg/kg($R^2=0.98$)로 가장 정확한 예측능력을 나타냈다. 수입건초의 P 함량은 근적외선 파장대역에서 건조분쇄 측정이 SEC 204.4 mg/kg($R^2=0.91$)과 SECV 224.7 mg/kg($R^2=0.89$)로 가장 정확한 예측능력을 나타냈다. 이상의 결과를 종합해보면 근적외선분광법을 이용하여 조사료의 주요 광물질인 Ca과 P 함량을 신속하고 정확하게 분석이 가능하였으며, 시료 측정시 건조하여 분쇄하는 전처리 방법과 근적외선 파장대역에서 검량식을 개발하는 것이 예측 정확성이 가장 우수한 것으로 나타났다.

V. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(근적외선분광법을 이용한 수입 조사료 품질평가 기술 개발, PJ01201202)과 2021년도 농촌진흥청 국립축산과학원 전문연구원 과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

VI. REFERENCES

- Clark, D.H., Cary, E.E. and Mayland, H.F. 1989. Analysis of trace elements in forages by near infrared reflectance spectroscopy. *Agronomy Journal*. 81(1):91-95. doi:10.2134/agronj1989.00021962008100010016x
- Clark, D.H., Mayland, H.F. and Lamb, R.C. 1987. Mineral analysis of forages with near infrared reflectance spectroscopy 1. *Agronomy Journal*. 79(3):485-490. doi:10.2134/agronj1987.00021962007900030016x
- Cozzolino, D. and Moron, A. 2004. Exploring the use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict trace minerals in legumes. *Animal Feed Science and Technology*. 111(1-4):161-173. doi:10.1016/j.fuel.2008.07.031
- De Aldana, B.V., Criado, B.G., Ciudad, A.G. and Corona, M.P. 1995. Estimation of mineral content in natural grasslands by near infrared reflectance spectroscopy. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 26(9-10):1383-1396. doi:10.1080/00103629509369379
- Garnsworthy, P.C., Wiseman, J. and Fegeros, K. 2000. Prediction of chemical, nutritive and agronomic characteristics of wheat by near infrared spectroscopy. *The Journal of Agricultural Science*. 135(4):409-417. doi:10.1017/S0021859699008382
- Kim, J.H., Lee, K.W., Oh, M., Choi, K.C., Yang, S.H., Kim, W.H. and Park, H.S. 2019. Evaluation of moisture and feed values for winter annual forage crops using near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science*. 39(2):114-120. doi:10.5333/KGFS.2019.39.2.114
- MacPherson, A. 2000. Trace minerals status of forages. In D.I. Givens, E. Owen, R.F.E. Axford and H.M. Omedi (Eds.), *Forage evaluation in ruminant nutrition* (pp. 345-373). CABI Publishing, Wallingford, UK.
- MAFRA. 2019. Business enforcement policy on government's support for forage production enlargement. Ministry of Agriculture Food and Rural Affairs.
- MAFRA. 2020. Business enforcement policy on government's support for forage production enlargement. Ministry of Agriculture Food and Rural Affairs.
- Saiga, S., Sasaki, T., Nonaka, K., Takahashi, K., Watanabe, M. and Watanabe, K. 1989. Prediction of mineral concentrations of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) with near infrared reflectance spectroscopy. *Japanese Journal of Grassland Science*. 35(3):228-233. doi:10.14941/grass.35.228
- Shenk, J.S. and Westerhaus, M.O. 1991a. Population definition, sample selection, and calibration procedures for near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Science*. 31(2):469-474. doi:10.2135/cropsci1991.0011183X003100020049x
- Shenk, J.S. and Westerhaus, M.O. 1991b. Population structuring of near infrared spectra and modified partial least squares regression. *Crop Science*. 31(6):1548-1555. doi:10.2135/cropsci1991.0011183X003100060034x

- Shenk, J.S. and Westerhaus, M.O. 1993. Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy. Infra Soft International(ISI), Silver Spring, MD, USA.
- Shenk, J.S. and Westerhaus, M.O. 1994. The application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to forage analysis. In G.C. Fahey Jr., M. Collins, D.R. Mertens, L.E. Moser (Eds.), Forage quality, evaluation and utilization (pp. 406-450). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI, USA.
- Smith, K.F., Willis, S.E. and Flinn, P.C. 1991. Measurement of the magnesium concentration in perennial ryegrass (*Lolium perenne*) using near infrared reflectance spectroscopy. Australian Journal of Agricultural Research. 42(8):1399-1404. doi:10.1071/AR9911399
- Suttle, N.F. 2010. The mineral nutrition of livestock (4th ed.). Wallingford, Oxfordshire: CABI Publishing. pp. 1-3.
- Tremblay, G.F., Nie, Z., Belanger, G., Pelletier, S. and Allard, G. 2009. Predicting timothy mineral concentrations, dietary cation-anion difference, and grass tetany index by near-infrared reflectance spectroscopy. Journal of Dairy Science. 92(9):4499-4506. doi:10.3168/jds.2008-1973
- Whetsel, K.B. 1968. Near-infrared spectrophotometry. Applied Spectroscopy Reviews. 2(1):1-67. doi:10.1080/05704926808050886

(Received : February 15, 2021 | Revised : March 10, 2021 | Accepted : March 16, 2021)