

연구과제 최종보고서

과 제 명	이화학분석기술을 이용한 콩 원산지판별법 정립 연구				
총연구기간	2018년 1월 ~ 2018년 12월	당해연도 연구기간	2018년 1월 ~ 2018년 12월		
수행부서/ 세부수행부서	시험연구소 원산지검정과 (자체)	연구 책임자	구분	직위(급)	성명
			정	과장	한국탁
			부	주무관	이지혜
		참여 연구원	직위(급)		성명
			팀장		신병곤
			주무관		김현정
			주무관		강동진
			주무관		장은희
주무관		김정현			
참여부서					
사업구분	단년도 (√) 다년도 ()	총 (1)개년 중 (1)차 연도			
연구결과 요약	<p>본 연구는 원형의 콩을 퓨리에변환 NIRS(FT-Near Infrared Spectroscopy)를 이용하여 원산지 판별 시 콩의 공극 차이로 인해 발생하는 빛의 산란현상을 개선하고자 하였다. 또한 원산지 판별 결과의 신뢰성을 향상시키기 위해 콩에 존재하는 유기성분 뿐만 아니라 무기성분을 활용한 산지 구별법을 개발하기 위해 X선 형광분석기 방법(XRF)을 연구하였다. 국내산 150점, 외국산 150점을 수집하여 분석용 시료로 사용하였다. 원형의 콩을 동결건조 후 실험용밀로 분쇄하여 분말의 형태로 FT-NIRS에 적용하였을 때 원산지판별식의 정확도, 상관계수(R^2)가 원형의 콩 보다 우수하였다. XRF를 활용한 콩의 원산지 판별은 93%의 정확도를 나타내어 원산지 검정 법 개발 기준인 95%에 미치지 못해 검정 업무에 활용은 제한적이다.</p>				

이화학분석기술을 이용한 콩 원산지 판별법 정립연구

1. 연구배경 및 목표

콩(*Glycine max*)은 국민 다소비 잡곡류로서 국내 생산량은 대폭 감소 추세이며 국내산이 외국산에 비해 가격이 높아 원산지 표시위반이 지속적으로 발생하는 품목이다.

- * 원산지 검정의뢰 건수: 콩('17년) 80점, ('16년) 60점, ('15년) 36점 '15년 대비 220% 증가
- * 콩 생산량: ('15년) 103,503톤 → ('16년) 75,448톤 → ('17년) 76,303톤 '15년 대비 35.6% 감소
- * 콩 수입량: ('15년) 160,148톤 → ('16년) 135,889톤 → ('17년) 209,462톤, '15년 대비 130.8% 증가
- * 콩 가격(도매): 국내산 4,914원/kg, 외국산 3,171원/kg(1.5배 차이)

현재 콩의 이화학 원산지검정은 시료를 분쇄하지 않고 원형의 콩을 이용해 유기성분이 흡수하는 흡광도 차이를 측정하여 국내산과 외국산 콩을 판별하는 근적외선분광분석법(NIRS법)을 활용하고 있다. 사용 중인 NIRS법은 회절격자를 사용하는 모노크로메이터방식의 장비에는 적합하나 간섭계를 사용하는 퓨리에 변환 방식의 장비에선 공극에 따른 빛의 산란현상이 발생한다. 이를 극복하기 위해 보정 및 시료 검정에서 수 회 반복적인 기기측정을 해야 한다는 불편함이 존재한다.

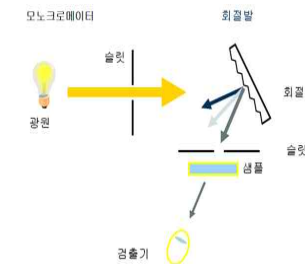


Figure. 1. Monochromator NIRS

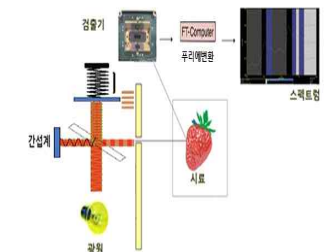


Figure. 2. Fourier-transform NIRS

이 등(2011)은 NIRS를 이용한 콩의 총 이소플라본, 아미노산, 단백질 함량 분석 시 콩 종실의 통 알곡, 난알, 분말 형태를 이용하여 판별 식을 비교 분석한 결과 분말 형태에서 정확성, 재현성이 우수한 것으로 나타났다. 이 등(2001)에 따르면 강낭콩 종실 및 분말 상태로 조 단백, 조 지방 함량을 NIRS로 분석하여 비교한 결과 분말시료가 판별식의 작성에 유리함을 알 수 있었다. 이는 원형의 형태로 NIRS 분석을 하면 콩의 큰 입자크기(particle size)에 따른 공극으로 인해 빛이 산란되어 정확한 물질정보를 측정하기 어렵기 때문이다. 위의 사례는 NIRS를 이용한 원산지 판별 연구는 아니지만 획득한 스펙트럼으로부터 물질의 정보를 얻어 판별 식을 작성한다는 원리는 원산지 판별에도 동일하게 적용될 수 있다. 그러므로 분쇄된 콩을 이용하여 원산지 판별 연구를 수행하여 재현성이 높고 판별 정확도가 우수한 결과를 얻고자 한다.

콩은 탄수화물, 단백질, 지방과 같은 유기성분이 풍부하지만 칼륨, 인, 철분, 규소, 망간, 구리와 같은 무기질 함량도 건물 기준 5%로 존재한다. 콩에 존재하는 유기성분 뿐만 아니라 무기성분을 활용한 산지 구별법을 개발하여 분석 결과를 종합적으로 활용한다면 원산지 판별 결과의 신뢰성을 향상시킬 수 있다. XRF를 이용하여 길경의 원산지 판별한 연구가 있고, 에너지 분산형 X-선 형광분석기(ED-XRF)를 사용하여 무기질을 분석하여 방풍, 시호, 천궁, 황기 등의 한약재에서 무기성분을 분석하여 원산지 판별 연구를 수행한 바 있어, 콩에서도 적용해 보고자 한다.

2. 연구내용 및 방법

가. 시료수집

- 1) 국산: 농가 방문, 로컬푸드 샵 등을 통하여 150점 수집
- 2) 외국산: 착항지, 농산물유통공사, 수입국 현지 출장 등을 통해 5개국(미국, 베트남, 중국, 캐나다, 태국) 150점 수집

나. 시료전처리

- 1) 시료 선별 및 균분

시료의 수분함량이 14% 이하여야 하며 이를 초과 시 적정상태로 건조하였다. 시료에 혼입된 이물, 이종곡립을 제거 후 균분기로 축분하여 2분된 시료의 중량이 200g이 되도록 한다.

2) 원형의 콩

2분된 시료 중 임의로 그 하나를 선택하여 NIRS 기기 분석 소요량인 40g이 될 때까지 축분하여 원형 상태의 시료를 추가적인 처리과정 없이 NIRS 분석에 사용한다.

3) 분말 콩

2분된 시료 중 나머지 200g을 -40℃에 8시간 예비동결 후 실험용밀(Rotor mill, pulverisette 14, FRITSCH, Germany)로 분쇄하여 0.5mm 필터를 통과한 분말을 시료로 사용하였다.

다. 근적외선분광분석기(FT-Near Infrared Spectroscopy)를 이용한 분석

1) 분석원리

농산물의 각종 분자결합 관능기(C-H, O-H, N-H, S-H)들은 근적외선 대역에서 분자진동에 의한 흡광이 일어나며 발생한 흡광에너지에 의해 스펙트럼을 얻는다. 스펙트럼 정보는 물리·화학적인 결합정보이므로, 이를 체계적인 통계분석을 통하여 판별 판별 식을 작성하여 원산지를 판별한다.

2) 분석방법 및 조건

원형의 콩은 40g, 분말 콩은 15g을 51mm diameter 시료 컵(IN311-S Low OH Quartz, Bruker, Germany)에 담아 근적외선 분광분석기(FT-NIRS Tango, Bruker optics)를 사용하여 시료별 분석조건에 따라 분석 후 스펙트럼 data를 수집한다.

3) 판별식 설정

근적외선 대역 11,500 cm^{-1} ~ 4,700 cm^{-1} 범위에서 16 cm^{-1} 간격으로 파장별 흡광도를 3만복 측정하여 국산, 외국산 간에 성분 차이에 따른 흡광도에 차이를 보이는 최적의 파장 구간을 찾는다. FT-NIRS 분석에서 얻어진 스펙트럼은 복합적으로 구성되어 있어, 다변량(Multivarlate) 회귀분석을 사용해 판별식을

작성한다.

라. X선 형광분석기(X-ray Fluorescence spectrometer)를 이용한 분석

1) 분석원리

고전압을 이용하여 X-선을 발생시켜 이를 시료에 조사하면 형광현상에 의하여 시료에 함유된 원소별로 고유의 X-선이 방출하는데 이러한 형광 X-선을 검출해 무기성분의 종류와 양을 알 수 있다. 농산물은 원산지의 토양과 재배환경에 따라 무기원소의 함량이 다른 특성을 가지고 있다. 이런 특성을 이용하여 먼저 국산과 외국산 시료를 정성 분석하여 다량 무기성분을 파악한 후, 각 무기성분의 함량을 상대적 비교개념에 따라 백분비를 구해, 원소별 함량 분포를 그룹별로 통계 처리하여 원산지를 판별한다.

2) 분석방법 및 조건

분말 콩 5g을 칭량하여 시료컵 (Chemplex, 30.7 mm diameter x 22.9 mm height, Palm City, FL, USA)에 담아 에너지 분산형 X 선 형광분석기를 이용하여 무기 성분별 형광에너지를 측정하여 무기 성분의 함량을 분석하였다. 실험에 사용된 1차 X선은 Rh target tube에서 얻었으며, 검출기는 Si(Li) 검출기를, 무기 원소 분석을 위한 X선 형광에너지는 K-α선을, Beam path는 헬륨(helium)을, acquisition time은 180초, 전압은 7, 8, 12, 20, 28, 50kV를 이용했다.

3) 판별 판별 식 설정

국내산과 외국산 시료에 대하여 25종의 무기성분을 반정량법인 Standardless fundamental parameter(SLFP) 방법으로 무기성분 함량 분석 데이터를 얻었다. SLFP법은 시료와 matrix 조성이 동일한 인증표준물질이 없을 때 농산물과 광물 등에서 무기 함량 분석에 이용된다. 국내산과 외국산에서 차이가 있는 무기 성분의 함량 데이터를 선택하여 이를 통계분석 software인 UNISTAT (ver 6.5, London, England)에 다변량통계분석법의 하나인 Canonical Discriminant Analysis를 이용하여 판별식을 설정하였다.

$$Y=B_0+B_1X_1+B_2X_2+\cdots+B_nX_n$$

(Y: 판별분석값, B0: 상수, Bn: 상관계수, Xn: 각 무기성분 함량)

3. 결과 및 고찰

가. 근적외선분광분석기(FT-Near Infrared Spectroscopy)를 이용한 분석

1) 근적외선스펙트럼

근적외선분광법을 통해 얻은 스펙트럼은 시료의 화학적 성질뿐만 아니라 입자의 크기, 밀도와 같은 물리적 성질에 의해서도 영향을 받게 되는데 물리적 영향을 감소시키고 보다 나은 산지판별 모델을 개발하기 위해서는 스펙트럼을 적절히 수학적으로 수 처리(Spectra preprocessing)가 필요하다. 수 처리 전 원형 콩과 분말 콩의 스펙트럼을 비교해 보면(파란색:원형, 녹색:분말) 원형 콩의 전체적인 스펙트럼 양상은 브로드하고 흡광도 값이 높게 위치하며 폭이 큰 것을 알 수 있다. 수 처리 후 원형 콩과 분말 콩의 스펙트럼을 살펴보면 원형의 콩에서 수처리가 공극에 의한 물리적 영향을 많이 감소시켰음을 알 수 있다.

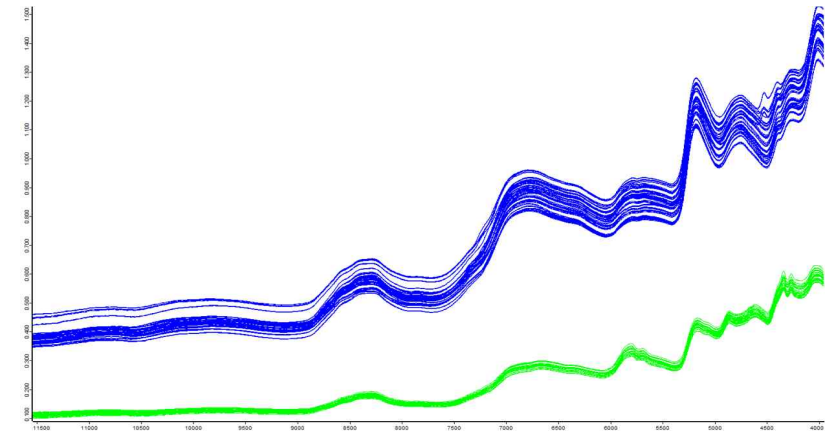


Figure. 3. Raw NIRS spectra of whole soybeans and milled soybeans

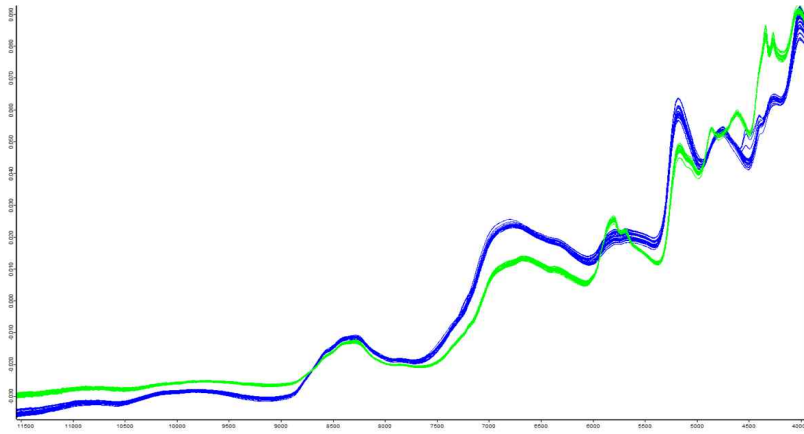


Figure. 4. NIRS spectra of whole soybeans and milled soybeans with pretreatment

2) 콩 원형 형태의 판별 판별 식 설정

국산 콩과 외국산 콩의 스펙트럼으로 차이가 나는 부분을 보면 $9311.2\text{cm}^{-1} \sim 8805.2\text{cm}^{-1}$, $8764.4\text{cm}^{-1} \sim 8152.4\text{cm}^{-1}$, $8119.7\text{cm}^{-1} \sim 7605.6\text{cm}^{-1}$, $7556.7\text{cm}^{-1} \sim 7042.6\text{cm}^{-1}$, $5834.8\text{cm}^{-1} \sim 5377.8\text{cm}^{-1}$, $4839.2\text{cm}^{-1} \sim 4365.9\text{cm}^{-1}$ 의 특정 파장대에서 흡광도 차이가 나는 것을 확인 할 수 있다. 획득한 스펙트럼 값에 대한 회귀분석을 수행하기 전에 수 처리를 수행하였는데 N=200은 1차미분, N=300은 SNV를 사용하였다.

Table 1 The best performance of spectral preprocessing method and spectra range to build the identification model.

Segment	Number of samples			Spectral preprocessing	spectral region(cm^{-1})
	Total	Domestic	Foreign		
Whole soybeans (N=200)	200	100	100	Fitst vector	$9311.2 \sim 8805.2$, $8764.4 \sim 8152.4$, $8119.7 \sim 7605.6$, $7556.7 \sim 7042.6$, $5834.8 \sim 5377.8$, $4839.2 \sim 4365.9$
Whole soybeans (N=300)	300	150	150	SNV	$9311.2 \sim 8805.2$, $8764.4 \sim 8152.4$, $8119.7 \sim 7605.6$, $7556.7 \sim 7042.6$, $5834.8 \sim 5377.8$, $4839.2 \sim 4365.9$

시료의 로딩 값(loading value)을 국내산은 100, 외국산은 1로 설정하였으며, 농식품의 근적외선 스펙트럼 분석에 일반적으로 사용되는 다변량통계분석법의

부분최소제곱법(PLS)으로 판별식을 설정한 결과 N=200의 국내산 판정 범위는 60-144이었으며, 외국산 판정 범위는 -37-42이었다. N=300의 국내산 판정 범위는 60-153이었으며, 외국산 판정 범위는 -27-42이었으며 국내산과 외국산 판정 범위를 벗어난 경우에는 이 판별 식으로 원산지 판별이 불가능하다. N=300의 판정범위를 보면 40-60구간에서 국산과 외국산간에 중첩되는 샘플이 많아 판별이 어려울 것으로 예측된다. 원산지 판별 판별식의 성능을 나타내는 R^2 , RPD는 높을수록 RMSEE는 낮을수록 판별식의 정확도가 높다. R^2 0.7 이상, RPD 2.5이상, RMSEE 20이하 일 때 상관성이 높은 것으로 결정하는데 샘플 수 가 100개가 더 추가된 N=300은 판별 성능이 떨어지는 것을 알 수 있다. 판별식의 성능을 높이기 위해서는 아웃라이어 시료를 제외한 나머지 시료에 대해 수처리와 산지별 차이나는 스펙트럼 구간을 다시 찾은 후 판별 식을 재설정하는 방법이 있다. 하지만 이는 R^2 , RPD, RMSEE 값은 좋아지나 자칫 over fitting이 되어 판별식에 사용된 시료 외의 검증용 시료에서 정확도가 떨어질 수 있으므로 주의해야 한다.

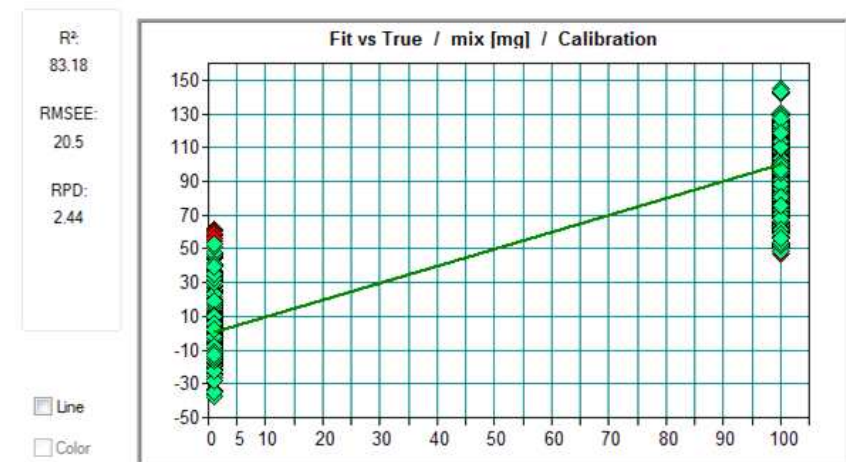


Figure. 5. Discrimination of geographical origin for whole soybeans(N=200) by partial least square(PLS) method.

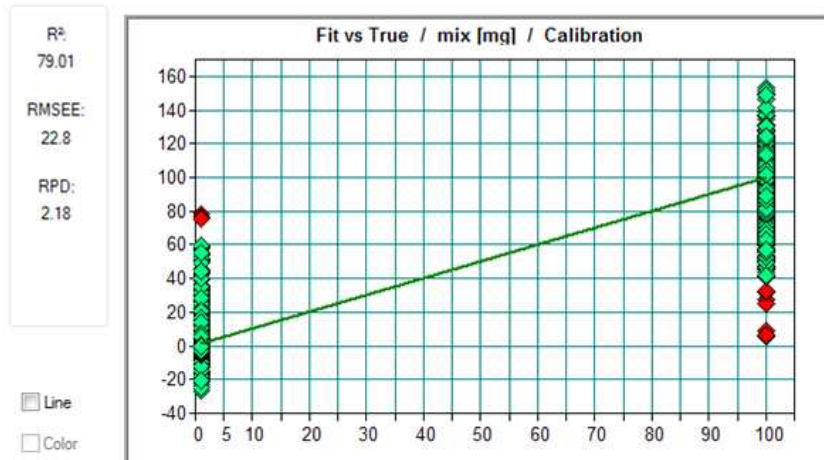


Figure. 6. Discrimination of geographical origin for whole soybeans(N=300) by partial least square(PLS) method.

3) 콩 분말 형태의 원산지 판별 식 설정

분말된 콩의 형태에서 국산과 외국산이 차이나는 스펙트럼 영역은 Table 2와 같다. 판별식에 사용된 샘플의 수가 전체 200개 일 때 최적의 수 처리 방법은 SNV였고 전체 300개 일 때는 1차 미분을 사용하였다.

Table 2 The best performance of spectral preprocessing method and spectral region in identification model of milled soybeans.

Segment	Number of samples			Spectral preprocessing	spectral region(cm ⁻¹)
	Total	Domestic	Foreign		
Milled soybeans (N=200)	200	100	100	SNV	9376.5~8846, 8813.4~8283, 8250.3~7719.9, 7687.2~7116, 4765.8~4414.9, 4382.2~4170
Milled soybeans (N=300)	300	150	150	First vector	8813.4~8283, 7687.2~7116, 7099.7~6504, 6471.3~5867.4, 5230.9~4782.1, 4765.8~4414.9, 4382.2~4170

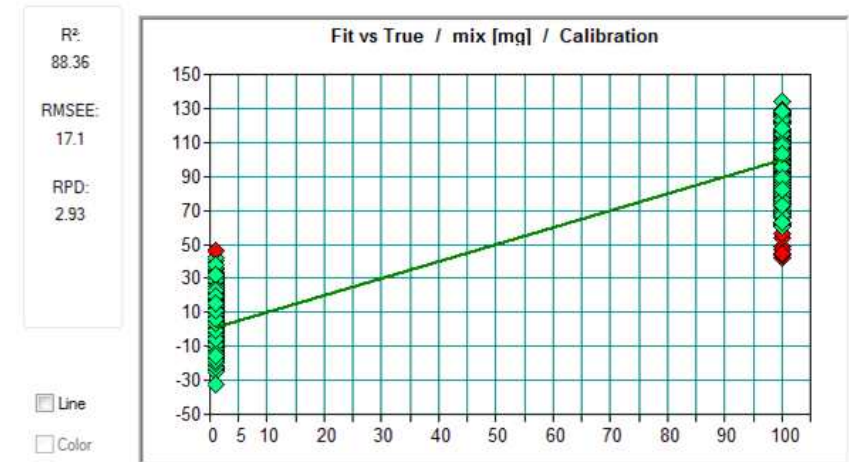


Figure. 7. Discrimination of geographical origin for Milled soybeans(N=200) by partial least square(PLS) method.

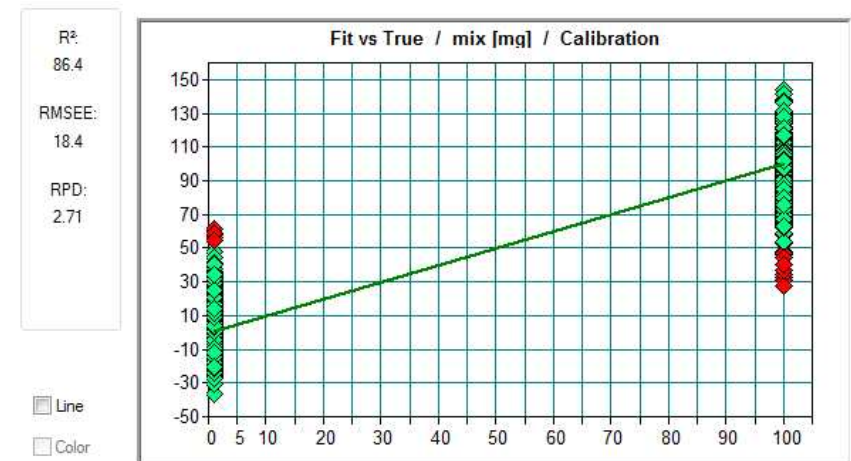


Figure. 8. Discrimination of geographical origin for Milled soybeans(N=300) by partial least square(PLS) method.

R^2 0.7 이상, RPD 2.5이상, RMSEE 20이하 일 때 상관성이 높은 것으로 결정하는데 분말 콩의 형태에서는 N=200 과 N=300 모두 판별 성능이 우수하였다. N=200 일 때 R^2 , RPD, RMSEE 값이 N=300 일 때 보다 좋은데 이는 모집단이 많아질수록 여러 생산지역, 생산자, 재배방식 등 다양한 샘플의 특성이 반영되기 때문이다.

4) 콩의 형태별(원형VS분말) 원산지판별 정확도 비교

판별식의 정확도를 분석한 결과 국산시료 N=200 일 때 원형의 콩과 분말 콩 모두 원산지검정법 정확도 기준인 95%이상을 만족했다. 하지만 100의 샘플이 추가된 N=300은 분쇄된 콩에서는 정확도 기준을 충족시켰지만 원형의 콩에서는 정확도가 미흡하였다. 콩의 원산지 판별 판별식을 이용하여 실제로 원산지를 판별하고자 하는 콩의 원산지 구별을 잘 하기 위해서는 더욱 다양한 산지에서 많은 시료 량을 확보하여 국산과 외국산을 충분히 대표할 수 있는 모집단을 구축하는 것이 필수적이다. 원형의 콩의 판별식은 분말 콩에 비해 모집단이 증가할수록 판별 정확도가 현저히 떨어질 것으로 예상된다.

Table 3 Comparison of the discrimination results of whole soybeans and milled soybeans models.

Classification		No. of samples				Total
		Total	Domestic	Foreign		
Whole soybeans	N=200	Domestic	100	95(95.0%)	5(5.0%)	95.0%
		Foreign	100	5(5.0%)	95(95.0%)	
	N=300	Domestic	150	136(90.7%)	14(9.3%)	90.0%
		Foreign	150	1(0.7%)	149(99.3%)	
Milled soybeans	N=200	Domestic	100	97(97.0%)	3(3.0%)	98.0%
		Foreign	100	1(1.0%)	99(99.0%)	
	N=300	Domestic	150	143(95.3%)	7(4.7%)	96.6%
		Foreign	150	3(2.0%)	147(98.0%)	

나. X선 형광분석기(X-ray Fluorescence spectrometer)를 이용한 분석

1) 무기원소 함량 비

국산 콩과 외국산 콩의 무기원소를 XRF를 이용하여 총 25종의 원소를 분석하였다. 각 무기질의 상대적 함량을 보면 가장 많은 함유량을 보인 K의 평균값의 경우 국산이 672,761ppm, 외국산이 684,755ppm을 보였으며 Ca는 국산이 143,712ppm 외국산이 145,933ppm의 함량을 보였다. 이외에도 Zn은 국산이 4,737ppm 외국산이 4,153ppm, Mn은 국산이 3,519ppm 외국산이 2,928ppm, S는 국산이 71,710ppm 외국산이 68,319ppm, P는 국산이 76,502ppm 외국산이 66,672ppm, Fe는 국산이 8,561ppm 외국산이 8,658ppm, Mg는 14,011ppm 14,342ppm으로 모두 오차 범위 내에서 차이가 나므로 유의성이 있다고 볼 수 없었다(Figure. 9). 또한 미량 원소 성분분석 결과 Ni의 경우 국산과 외국산의 차이를 확인 할 수 있었으나 표준 오차 범위가 커서 유의성이 있다고 할 수 없었다(Figure. 10).

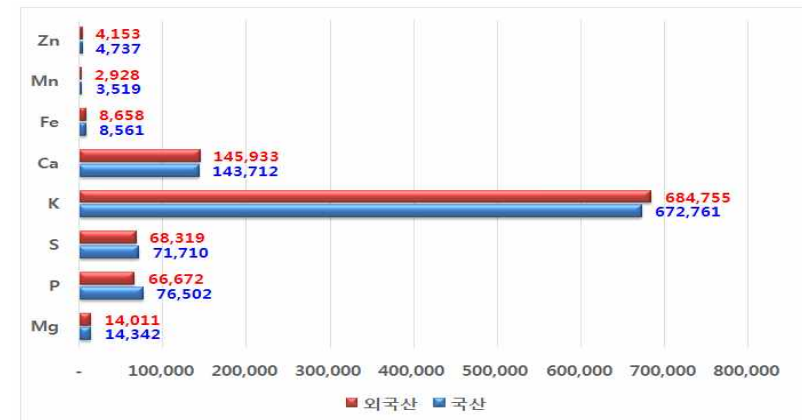


Figure. 9. Comparison of inorganic elements content between domestic and foreign soybean

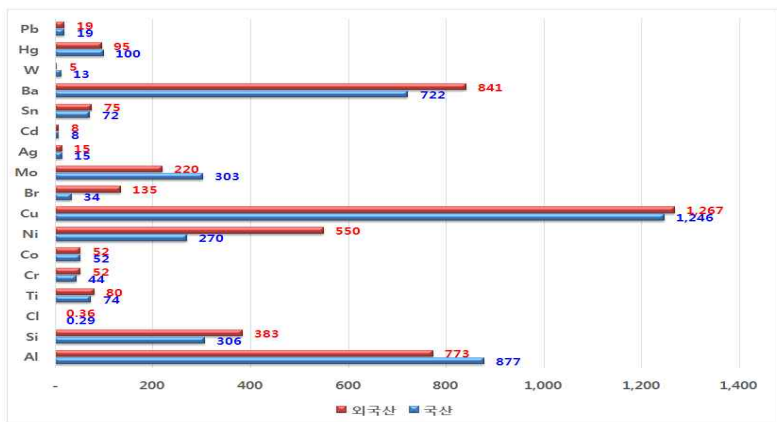


Figure. 10. Comparison of microelements content between domestic and foreign soybean

2) 원산지검정 판별식 설정

판별계수(Discriminant score)는 두 그룹을 판별하기 위한 함수 값으로 얻어지는데 판별하고자 하는 두 그룹이 가장 잘 구분될 수 있는 각 그룹의 중심 값을 의미한다. 국산 콩의 판별계수는 -1.6562이었고, 외국산 콩의 판별계수는 1.6562이었다. 국산과 외국산의 판별 구분을 할 때, 두 그룹간의 거리가 2 이상이면 구분이 가능한 결과로 해석 할 수 있는데 3.4145이므로 판별 구분이 잘 된 것으로 판단된다.

Table 4. Comparison of discriminant scores between domestic and foreign soy bean using result of canonical discriminant analysis

Parameters		Score
R^2		0.8564
Distance between centroids		3.3125
Discriminant score	Domestic	-1.6562
	Foreign	1.6562

총 25종의 원소를 분석하여 반 정량법으로 얻은 상대 함량 비를 이용하여 판별식을 확립한 결과 국산 시료 100점 중 91점을 국산, 9점을 외국산으로 판별하여

91%의 정확도를 보였다. 또한 외국산 시료 100점 중 95점을 외국산으로, 5점을 국산으로 판별하여 95%의 판별 정확도를 보여 종합적으로 93%의 정확도를 나타냈다. 총 판별정확도가 원산지 검정 법 개발 기준인 95%에 미치지 못하는 것으로 나타나 검정 업무에 활용은 제한적이다.

Table 5. The result from the canonical discriminant analysis showed that accuracy of geographical origin discriminant between domestic and foreign

Classification		No. of samples			Correctly classified
		Total	domestic	Foreign	
Total		200	100	100	93%
Discriminant result	domestic	100	91	9	91%
	Foreign	100	5	95	95%

4. 기대성과 및 활용방안

간접계를 이용한 퓨리에변환 방식의 NIRS를 이용하여 원산지를 판별 시 원형의 콩보다 분쇄한 콩에서 판별식의 상관계수(R^2) 및 판별 정확도가 우수하였다. GUO(2011)는 콩의 총 탄수화물, 지방, 단백질, 수분함량을 NIRS 분석한 연구에서 콩을 분말로 제조시 종피가 완전히 분쇄되지 않기 때문에 종피를 벗겨서 분쇄할 것을 제안하였다. 하지만 본 연구에서는 종피를 제거하지 않고 콩을 동결건조 후 분쇄 하여 균일한 입자를 얻을 수 있었다. 현재 곡류, 두류는 수수쌀과 간 녹두를 제외하고 10개 품목을 알곡 상태로 검정·보정에 이용하고 있다. 분쇄는 노동력과 시간이 많이 소모되기 때문에 전 품목을 분말 상태로 활용하는 데는 한계가 있으므로 알곡 size가 큰 품목에 본 연구를 적용한다면 분석의 정확성을 높일 수 있을 것이다.

XRF를 활용한 콩의 원산지 판별은 원산지 검정 법 개발 기준인 95%에 미치지 못해 무기성분에서 산지 구별 인자를 연구하는 방법보다 유기성분의 범주를 확대하는 것이 의미 있을 것이다. 분석결과와 신뢰성 확보를 위해 유기성분이지만 NIRS법에서 탐색할 수 없는 적외선영역의 대사산물, 2차 대사산물의 연구를 추후에 진행하여 NIRS법과 상호보완이 필요하다.

5. 참고문헌

Ahn HG, Kim YH. Discrimination of Korean domestic and foreign soybeans using near infrared reflectance spectroscopy. Korean J. Crop Sci. 57:296-300(2012)

Akiko O, Akiko H, Izumi N. Determination of trace elements in soybean by X-ray fluorescence analysis and its application to identification of their production area. Food Chemistry 147:318-326(2014)

Jun G, Tiefeng Y, Randall N. NIR Calibrations for soybean seeds and soy food composition analysis: total carbohydrates, oil, proteins and water contents. Nature precedings(2011)

Lee HB, Choi BR, Kang CS, Kim YH, Choi YJ. Determination of seed protein and oil concentration in kidney bean by Near Infrared Spectroscopic analysis. Korean J. Crop Sci. 46:248-252(2001)

Lee HS, Kim JB, Lee YY, Lee SY, Gwag JG, Baek HJ, Kim CK, Yoon MS. Estimating the important components in three different sample types of soybeans by near infrared reflectance spectroscopy. Korean J. Crop Sci. 56:88-93(2011)

Woo YA, Cho CH, Kim HY, Cho JH, Cho KK, Chung SS, Kim SJ. Discrimination of herbal medicine according to geographical origin(Korea, China) using near infrared reflectance spectroscopy. Korean J. Yakhak Hoeji 42:359-363(1998)