

근적외선 분광법을 이용한 새로운 비파괴적 계란 신선도 측정방법의 개발에 관한 연구

김상호* · 이상진 · 이덕수 · 조원보† · 이성훈† · 스튜어드 보든‡ · 우영아† · 김효진‡

축산연구소 가금과

†스펙트론 테크 부설 연구소

‡동덕여자대학교 약학과

(2005. 7. 5 접수)

Non-Destructive Measurement of the Egg Freshness by Near Infrared Spectrometry

Sang Ho Kim*, Sang Jin Lee, Duk Su Lee, Won Bo Cho†, Seong Hun Lee†, Stuart Borden‡,
Young A Woo†, and Hyo Jin Kim‡

Poultry Science Division, National Livestock Research Institute, Suwon 441-706, Korea

†Institute of Development, Spectrontech Co., Ltd.

‡Department of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

(Received July 5, 2005)

요 약. 본 연구는 현재 계란의 신선도를 측정하는 방법은 계란을 할란하여 호우 유닛(HU) 값으로 측정하였으나, 기존의 방법과 달리 할란하지 않고 비파괴적으로 측정할 수 있는 근적외선 분광 분석법을 연구하였다. 본 연구는 근적외선 분광법과 계란 측정용 모듈을 사용하여 신선도 지수인 70 HU에서 100 HU사이의 계란의 흡수 스펙트럼을 측정하였으며, PLSR(Partial Least Square Regression)를 사용하여 정량하였다. 이 결과 결정 계수(R)가 0.99로 매우 좋은 직선성을 보였으며, 1.35 HU 오차 범위에서 측정이 가능하였다. 기존의 계란 품질 평가를 위한 호우유닛 측정과 근적외선 분광 분석법과의 상관성이 매우 높아 비파괴적으로 계란 품질 인자인 신선도를 측정할 수 있으며, 궁극적으로 계란 품질 전용 측정 장비로 개발이 가능하도록 제시하였다.

주제어: 근적외선 분광학, 비파괴적분석, 부분최소제곱 회귀곡선, 계란품질, 호우유닛

ABSTRACT. The objective of this study was to develop a non-destructive, rapid and accurate analytical method to measure the quality(freshness) of egg. Near-infrared(NIR) spectra of 48 egg samples ranging from 70 HU(Haugh Unit) from 100 HU, PLSR(Partial Least Squares Regression) was used to build calibration model using the multiplicative scatter correction spectra in the 1100~1750 nm range. The results were very promising with correlation coefficient of 0.99 and standard error of prediction(SEP) of 1.35 HU. The overall results suggest that NIR spectroscopy can be used for rapid non-invasive determination of egg quality.

Keywords: NIR Spectroscopy, Nondestructive Analysis, PLSR, Egg Quality, Haugh Unit

서 론

최근 농수산물의 신선함에 관련한 소비자들의 관심이 증폭되고 있는 시점에서 계란 유통은 기존의 중량

등급과 더불어 신선도 등급까지 차별을 둔 상품이 출시되고 있는 실정이다. 이 상품은 기존의 계란에 비해 가격이 높지만, 계란의 품질이 개선되어 소비자와 공급자 모두가 만족하고 있다. 하지만 이 상품들의 신

선도는 난백의 높이와 난중의 무게를 측정하는 호우 유닛(Haugh Unit, HU) 값으로 표현 된다.^{1,2} 이 식은 아래와 같은 식으로 구성된다.

$$HU=100 \log (H- 1.7W^{0.37} + 76) \quad (1)$$

HU=Haugh unit

H=알부민 높이(mm)

W=난중의 무게(g)

HU는 신선도의 상대적인 값으로 HU값이 높으면 신선도가 높고 낮으면 신선도가 낮다는 것으로 나타난다. 일반적으로 HU값이 70이상은 신선한 것으로 HU값이 70 이하인 것은 신선하지 않은 것으로 판단한다. 이러한 HU는 계란을 파괴하여 알부민의 난백의 높이와 난중의 무게를 측정하기 때문에 계란의 신선도 측정을 위해 시료를 채취하여야 한다. 따라서 검체로 사용된 시료는 파괴가 되기 때문에 전체시료를 대상으로 신선도를 측정할 수 없는 단점이 있다. 현재 국내에는 하루 1000만개 이상의 계란이 생산되어 다양한 경로를 통하여 유통이 되고 있으나 계란의 신선도를 측정하는것은 0.01% 미만이며, 계란의 HU값은 동일한 농장의 계란도 닭의 나이에 따라 처음부터 70이하의 HU값을 보여주고 있는 실정이다. HU값은 저장온도 및 시간에 따라 저하되며 25이상의 실온에서는 3일만에 70이하로 떨어지는 등 많은 변화가 있다. 더구나 냉장 보관 및 유통을 하는 일본등 선진국과는 달리 상온에서 보관 및 유통을 하는 국내에서는 일부 냉장보관을 하지 않는 곳에서는 HU값이 30이하로 떨어지는 계란을 일반국민이 소비하고 있는 실정이다. 따라서 계란의 신선도를 비파괴적으로 신속하게 정량적으로 측정할 수 있는 새로운 방법의 개발이 필수적이다.

근적외선 분광 분석법은 식품구성 성분인 C-H, N-H, O-H 등의 관능기가 800~2500 nm의 파장영역에서 가지는 배음 및 결합음에 의한 에너지의 흡수를 이용하는 방법으로 Chemometrics가 발달하기 전까지는 많은 피크들이 중첩되어 있어 고전적인 자료 처리법으로는 활용이 어려워 실제 분석에는 사용되지 않았으나, 처음으로 Karl Norris에 의해 농업 분야에서 농산물의 수분, 단백질의 분석에 사용된 이후로 다변량 분석법의 발달로 많은 분야로 그 응용이 확대 되고 있다.³ 실제 곡류, 육류 및 유제품의 수분, 지방, 단백질, 탄수 화물과 섬유질의 신속한 정량에 많이 사용되고

있다.⁴ 시료 전처리의 간단함과 신속한 분석으로 농업 뿐만 아니라 약학, 섬유, 석유 화학, 식품, 고분자 분야에서도 널리 응용되고 있다.^{5,6} 그 외에도 광섬유를 이용한 실시간 분석으로 각종 공정의 제어나 관리에 까지 성공적으로 그 응용의 폭을 넓히고 있다. Karen 등은 근적외선 분광 분석법을 이용하여 면실유, 땅콩유, 대두유, 카놀라유의 네 가지 식용유를 구별하였다.⁷ Scotter등은 오렌지 주스의 산지를 구분하는 데 근적외선 분광 분석법을 시도하였다.⁸ Gerard 등은 근적외선 분광 분석법으로 커피를 정성 분석하였다.⁹ 약제 산업에서는 원료 물질의 순도 시험¹⁰이나 바이알이나 저장기에 담겨 있는 제품의 품질을 확인하기 위하여 근적외선 분광기를 이용하고 있다.

본 연구에서는 계란의 주요 품질 평가인자 중의 하나인 신선도를 측정하기 위하여 근적외선 분광 분석법을 적용하였으며 계란시료의 측정을 위하여 계란 측정용 모듈을 개발하였다.

실 험

시료

본 연구에서 사용한 계란은 농촌진흥청 축산 연구소의 가금과에서 생산된 계란을 대상으로 하였으며, 갈색계란은 우리나라 시장의 95% 이상이 생산되고 있으며, 우리나라의 일반국민 전체가 시장에서 접하고 있는 실정이므로 계란의 크기에 상관없이 갈색계란을 사용하였다.

측정 방법

가. 계란 품질 측정용 모듈을 이용한 비파괴 근적외선 스펙트럼 측정

본 연구를 수행하기 위하여 Fig. 1과 같은 시스템을 구성하였다. 스펙트럼 을 측정하기 위하여 NIR 영역(1100~1750 nm)을 InGaAs diode-array 검출기로 구성된 HN 1100(Spectrontech, Korea)을 사용하였다. 광원은 0.5 W halogen lamp을 사용하였고, 이 광원은 측정용 모듈에 장착되어서 계란을 비 접촉식으로 주사할 수 있도록 하여 계란의 곡면을 측정할 수 있도록 하였다. 이 측정용 모듈은 확산 반사 형태(diffuse-reflectance)로 구성되었다. Fig. 2는 계란을 확산 반사 형태로 비접촉식 측정방식으로 이루어진 계란 측정용 모듈이다. 계란의 외형은 중앙에 폭이 넓고 양 끝

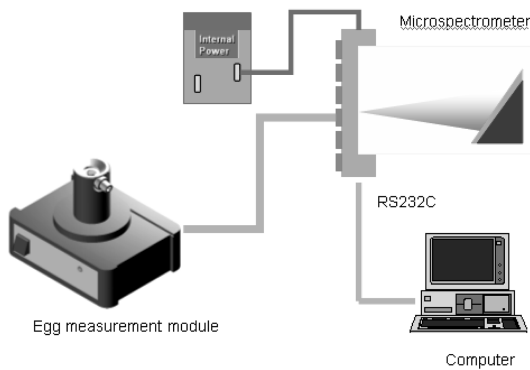


Fig. 1. Schematic diagram of Near Infrared Spectrophotometer for the quality evaluation of eggs.

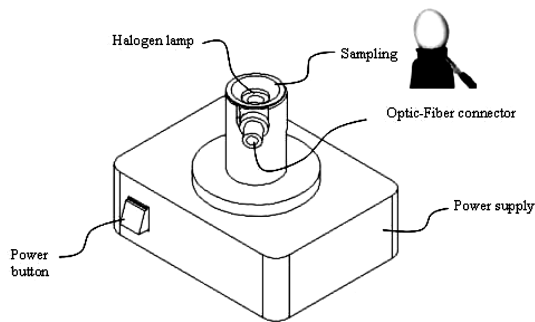


Fig. 2. 3D-drawing of module for determination of quality characteristics of egg.

단의 폭이 좁기 때문에 폭이 넓은 중앙 부분을 측정할 수 있도록 측정용 모듈을 구성하여 계란의 양 끝단 부분의 비측정부 면적을 최소화하여 충분한 시그널을 얻게 하였다. 확산 반사된 계란의 스펙트럼의 신호가 매우 약하기 때문에 집적 렌즈를 사용하여 광섬유로 빛을 받도록 하여 스펙트럼 신호를 높일 수 있도록 하였다. 측정 모듈은 모두 black-anodizing을 하여 빛의 산란 등을 최소화 하였으며, 광원 집적 반사를 최소화 하였다. 집적 렌즈와 광섬유를 SMA 방식으로 연결하였다고 다시 이 광섬유를 HN1100 spectrometer와 연결하였다. 계란 측정을 위하여 기준물질을 고체 형태인 Teflon과 PE(Polyethylene)를 각각 사용하였다. 모든 데이터 처리는 개인용 컴퓨터로 하였으며, 데이터 처리에 사용한 PLS(Partial Least Squares) 방법은 ChemoHN 1100(Spectrontech, Korea)를 이용하였다.

계란의 흡수 스펙트럼에서 계란의 크기 차이에 의한 산란 효과를 줄이기 위해서 원래 스펙트럼을 multiplicative

scatter correction(MSC)와 1차 미분을 한 다음 다변량 분석법 PLS¹¹를 이용해 정량 하였다.

나. 호우 유닛(HU) 및 무게 측정

계란의 품질 특성 인자로 호우 유닛(HU) 단위로 측정되는 신선도 값은 다목적 계란 품질 시험기(EGG MULTI Tester: EMT-5200, Hikari Technology Ltd., 15-26 Abeno-Motomachi, Abeno-Ku, Osaka, 545-0034, Japan)에 의해서 측정되었고, 계란의 중량, 난백의 높이, 난황 착색도를 비 접촉으로 전기적으로 자동 측정하며, 자동으로 계량화하여 기록 인쇄 출력을 할 수 있다.

결과 및 고찰

계란의 내부 품질 인자인 호우 유닛과 근적외선 흡수 스펙트럼

Fig. 3은 계란 측정용 모듈을 사용하여 얻어진 계란의 근적외선 스펙트럼이다. 계란의 내부는 난황과 난백으로 구성되며, 특히 난백의 경우에는 알부민으로 주로 구성되어 있다. 알부민 과장은 주로 2062 부터 2353 nm 영역에서 나타나는 데, 이것의 overtone으로 1100과 1750 nm사이에서 일부의 알부민 흡수^{12,13,14}가 나타난다. 기준 스펙트럼은 Teflon을 사용하여 측정되었고, 흡수 스펙트럼은 0.2 AU값과 0.6AU값 사이에서 주로 나타난다. 주로 나타나는 스펙트럼은 1400에서 1500 nm에서 흡수가 많이 나타난다. 주로 O-H band 피크이다. 그리고 1600 nm 부분에서도 전체적으로 약간의 흡수 피크가 나타난다.

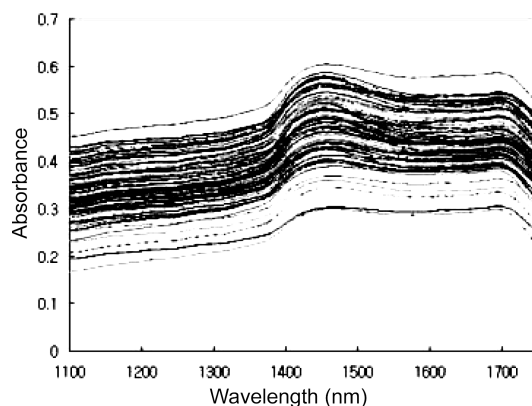


Fig. 3. NIR spectrum of egg using teflon reference.

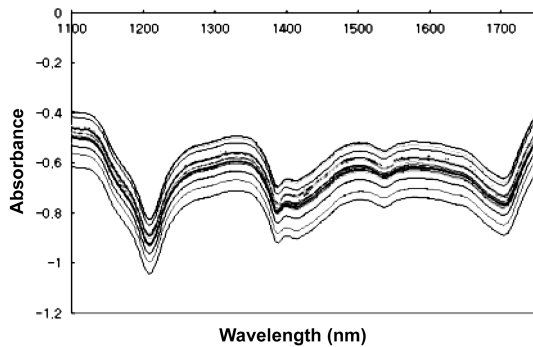


Fig. 4. NIR spectrum of egg using PE reference.

그리고 Fig. 4의 경우에는 기준 물질로 PE(Polyethylene)를 사용하였으며, 흡수 스펙트럼은 -0.4 AU부터 -1.0 AU로 나타난다. 음값의 흡광도는 기준 물질보다 높은 빛의 세기가 들어옴으로 해서 나타난 것으로 기준 물질의 reference 세기는 10,000 부터 15,000 count로 조절 하였다. 이 흡수 스펙트럼의 특징은 기준 물질의 PE의 특징과 비슷하게 흡수 스펙트럼이 나타났다. Teflon을 기준 물질로 하여 측정할 때 보다 PE로 기준 물질을 측정할 때 특정 파장에서 더 많은 변화량을 알 수가 있다. Teflon은 전체 스펙트럼에서 반사되어 그 변화량을 알 수가 없는 반면 PE는 일부 특정 파장에서만 반사되므로 다른 특정 파장에서는 기준 물질에서부터 흡수가 되어 그 변화량이 더욱 잘 나타난다.

계란 측정 결과

상기 그림의 스펙트럼들은 1100 nm부터 1750 nm 까지 2 nm간격으로 측정한 $\log 1/T$ 형태의 흡광도로 나타난 스펙트럼이다. 스펙트럼의 경우에는 주로 수분 피크 변화가 크기 때문에 상대적으로 다른 변화가 작다. 이러한 계란의 흡광도를 입력 데이터인 독립 변수로 한 다중 회귀 분석을 이용하여 신선도 관련 예측 모델을 개발 하였다. 분석용으로 80개의 시료를 취하여 검량식 작성용으로 사용하였다. 본 실험에서는 근적외 분광분석기에 사용하는 수학적 모델 중 정확도가 가장 높은 것으로 알려진 PLS를 이용하여 신선도를 분석하였다. PLS regression 은 다변량 회귀 분석법의 한 방법으로 최적의 factor수를 정하기 위해 cross-validation을 실행한다. Cross-validation은 data를 정량 data와 validation data로 나누어 필요한 요인수

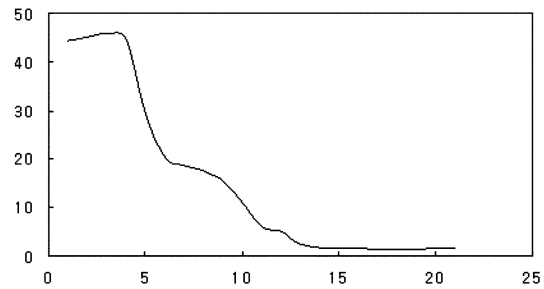


Fig. 5. Diagram for PRESS of HU in quality characteristics of egg using diffuse reflectance mode by PE reference at 1100 to 1750 nm.

를 임의로 증가 시키면서 동시에 PRESS(Prediction Residual Error Sum of Squares)의 변화를 관찰하여 계산 한다. Fig. 5는 Factor 수에 따른 PRESS 값의 변화를 보여주고 있다. Fig. 5에서 보는바와 같이 최적의 요인수가 12개로 하였을 때 가장 양호한 결과를 얻을 수 있었다. 여기서 총 12개의 요인을 적용하여 PLS 모델을 개발한 결과 80 HU부터 100 HU까지 범위에서 Fig. 6과 같이 상관 계수(R , correlation coefficient)는 0.99이고, SEC(Standard Error of Calibration)는 0.7 HU으로 양호한 직선성과 상관성을 얻을 수 있었다. 이때 검량식이 정량 모델 자체에 적용되었을 때의 그 SEC는 그 다음과 같이 실제값과 근적외선 분광 분석법으로 분석한 값과의 차이인 $f(\text{Residual})$ 로부터 계산 된다.

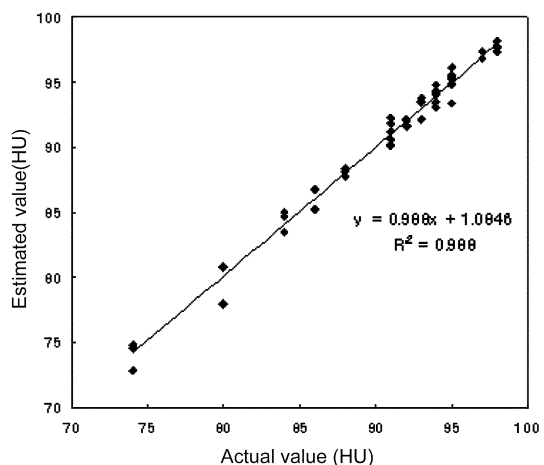


Fig. 6. Calibration plot of HU in quality characteristics of egg by PLSR using NIR.

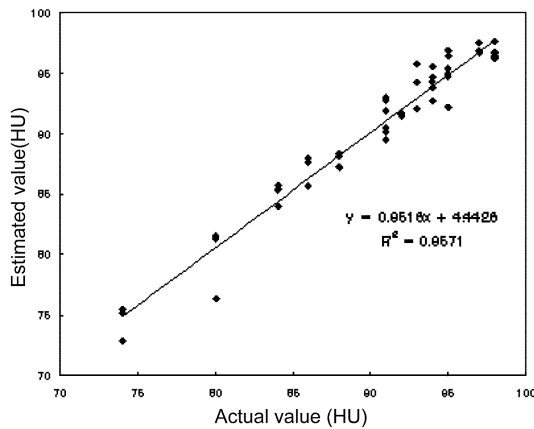


Fig. 7. Validation plots of HU in quality characteristics of egg by PLSR using NIR.

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum f^2}{N-K-1}}$$

이때 N 은 검체의 개수이고, K 는 파장이나 factor의 개수이다.

Fig. 6에서 구한 검량식을 이용하여 실제 미지 시료를 분석하였다. Fig. 7는 Validation set을 이용하여 검증한 결과로, x 축은 실제 함유된 값이며 y 축은 근적외선 분광 분석법을 이용하여 분석한 결과이다. SEP (Standard Error of Prediction)는 다음과 같이 계산하였다.

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_{actual} - C_{estimated})^2}{n}}$$

이 때 C_{actual} 은 표준 물질 관련 계란의 내부 품질 인자인 호우 유닛 값이고, $C_{estimated}$ 은 근적외선 분광법으로 계산된 호우 유닛 값이다.

Fig. 8은 PLSR법으로 계산된 이 정량모델의 loading 값과 분석에 사용된 계란 NIR 스펙트럼의 평균스펙트럼을 보여준다. 각 factor에 대한 loading 값들은 1350 nm에서 1600 nm에 걸쳐 계란 스펙트럼에서 나타나는 다양한 OH 흡수 밴드를 잘 설명하고 있다. 계란 스펙트럼의 1400 nm 주변의 뚜렷한 흡수 밴드는 약한 수소결합을 보이는 규칙적인 구조를 가진 연속상이지만 자유롭게 운동하는 액체상태의 물인 자유수와 물 분자와 상호작용으로 물분자가 자유를 잃은 상태인 결합수에 의한 것이다.¹⁵ 또 1550 nm 주변의 특징적인 흡수밴드는 여러 개의 수소결합을 하

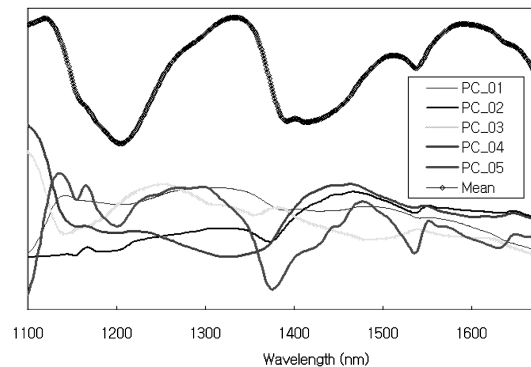


Fig. 8. Average spectrum of NIR spectrum and loading value for quantitative model by PLSR using NIR.

고 있는 결합수와 알부민의 아미드 그룹의 NH stretching mode의 first overtone에 의한 것이다. factor 5의 loading 값은 이를 잘 반영하고 있다. 이를 통해 이 정량 모델이 계란 스펙트럼의 HU 값 변화에 따른 스펙트럼의 특성을 잘 설명하고 있음을 확인할 수 있다.

결론

근적외선 분광 분석법을 이용한 계란 측정용 모델을 사용하여 계란의 내부 품질 인자인 신선도를 전처리 없이 측정할 수 있었다. 근적외선 스펙트럼인 경우 일반적인 스펙트럼 상에서의 농도에 따른 변화는 육안으로 관찰할 수 없지만, 실제 계란 신선도 검사에 적용하기 위하여 다변량 검량식인 PLS regression 방법을 적용하였으며, 이 방법에 의하여 측정하였을 때 오차의 척도인 SEP는 1.35 HU로 매우 좋은 결과를 얻었다. 이 결과에 근거하여 일반적으로 사용되는 기존의 품질검사를 위한 파괴형 다목적용 계란 품질 시험기에 사용한 동일 시료를 근적외선 분광법에 적용하여 비교 측정하였을 때 총 80개의 공시재료에 대하여 5% 미만의 오차를 나타내었다. 그 결과 기존의 파괴형 다목적용 계란 품질 시험기를 이용한 호우 유닛 값에 비해 근적외선 분광법은 비파괴 방식을 도입하여 분석시간이 현저히 줄어드는 장점이 있으므로 공정상에서 on-line 또는 at-line 측정으로 신속하고 효율적인 품질 관리법이 될 수 있을 것이다.

인 용 문 헌

1. Arafat, A. S., R. H. Harms, R. D. Miles, R. B. Christmas and J. H. Choi., Quality characteristics of eggs from different strains of hens as related to time of Oviposition, *Poult. Sci.*, **1982**, *61*, 842-847.
2. Eisen, E. J. and B. B. Bohren., Some problems in the evaluation of egg albumen quality, *Poult. Sci.*, **1963**, *42*, 74-83.
3. Williams, Phil and Norris, Karl: *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industry*, American Association of Cereal Chemists, Inc., Minnesota, U.S.A., 1987; p. 201.
4. Panford, J. A., Williams, P. C., and deMan J. M., Analysis of Oilseeds for Protein, Oil, Fiber and Moisture by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy, *JAOCS*, **1988**, *65*, 1627.
5. Jasper, W. J. and Kovacs, E. T., Using Neural Networks and NIR Spectrophotometry to Identify Fibers, *Textile Res. J.* **1994**, *64*, 444.
6. Kim, Y. B., Studies on the Chemical Analysis in Raw Meat and Meat Product by Near-Infrared Spectroscopy, Seoul Nation University, Ph. D. thesis, 1996.
7. Bewig, K. M., and Unkesbay, Nan: Discrimination Analysis of Vegetable Oils by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy, *JAOCS*, **1994**, *71*, 195.
8. Murray, I. and Cowe, I. A., Making Light Work: *Advances in Near Infrared Spectroscopy*, Weinheim, New York, U.S.A., 1991; p. 395.
9. Davies, A. M. C. and Williams, P., Near Infrared Spectroscopy: *The Future Waves*, NIR Publications, U.K., 1995; p. 411.
10. Gemperline, P. J., Webber L. D., Cox, F. O., Raw Materials Testing Using Soft Independent Modeling of Class Analogy Analysis of Near-Infrared Reflectance Spectra, *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 138.
11. Beebe, Kenneth R. and Kowalski, Bruce R., An Introduction to Multivariate Calibration and Analysis, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1007.
12. McShame, W. J., Applying NIR to Process Control, *JAOCS* **1989**, *66*, 641.
13. J. W. Hall, A. Pollard., Near-Infrared Spectrophotometry, *Clin. Chem.* **1992**, *38*, 1623-1631.
14. J. W. Hall, A. Pollard., Near-Infrared Spectroscopic Determination of Serum Total Proteins, Albumin, Globulins, and Urea, *Clin. Biochem*, **1993**, *26*, 483-490.
15. K. Murayama, Y. Ozaki., Two-dimensional near-IR correlation spectroscopy study of molten globule-like state of ovalbumin in acidic pH region: Simultaneous changes in hydration and secondary structure, *Biospectroscopy*, **2002**, *67*, 394-405.