

## 사과 착색도의 비파괴측정을 위한 근적외분광분석법의 응용

손미령 · 조래광  
경북대학교 농화학과

### Application of Near Infrared Spectroscopy for Nondestructive Evaluation of Color Degree of Apple Fruit

Mi-Ryeong Sohn and Rae-Kwang Cho

Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University

#### Abstract

Apple fruit grading is largely dependant on skin color degree. This work reports about the possibility of nondestructive assessment of apple fruit color using near infrared(NIR) reflectance spectroscopy. NIR spectra of apple fruit were collected in wavelength range of 1100~2500nm using an InfraAlyzer 500C(Bran+Luebbe). Calibration as calculated by the standard analysis procedures MLR(multiple linear regression) and stepwise, was performed by allowing the IDAS software to select the best regression equations using raw spectra of sample. Color degree of apple skin was expressed as 2 factors, anthocyanin content by purification and a-value by colorimeter. A total of 90 fruits was used for the calibration set(54) and prediction set(36). For determining a-value, the calibration model composed 6 wavelengths(2076, 2120, 2276, 2488, 2072 and 1492nm) provided the highest accuracy : correlation coefficient is 0.913 and standard error of prediction is 4.94. But, the accuracy of prediction result for anthocyanin content determining was rather low(R of 0.761).

**Key words** : apple, fruit, NIR reflectance spectroscopy, color, anthocyanin, a-value, MLR

#### 서 론

과실의 품질은 크기, 색깔, 모양 등의 외관적인 요소와 당도, 산도, 경도 등의 내부적인 요소들에 의해 종합적으로 결정된다. 이중 색깔은 소비자의 시각을 통해 가장 먼저 인식되는 중요한 요소라 할 수 있는데 여러 과실중 사과의 경우 더욱 그러하다. 사과 껍질의 색이 붉을수록 즉, 착색도가 높을수록 맛있는 사과로 여겨져 고품질로 평가되며 내부품질이 우수하더라도 착색도가 좋지 못하면 상품성은 낮아져(1) 착색도는 사

과의 품질을 평가하는 중요한 지표라 할 수 있다. 사과 선별현황을 보면, 미국의 경우 착색도에 따른 등급 기준에 의해 엄격한 규격화를 시행하고 있으며 일본의 경우 CCD카메라를 이용하여 착색도를 측정할 수 있는 비파괴 분석기를 개발하여 실제 선과장에서 사용하고 있다. 국내의 경우, 일본의 선과기를 수입하여 사용하는 곳이 있으나 대부분 사람의 육안판단에 의존해 분류하고 있는 실정이다.

과실의 색깔을 비파괴측정한 연구로는 가시광선을 이용하여 토마토의 색소량을 측정(2)하거나 CCD(charge coupled device) 카메라를 이용하여 취득한 화상을 해석하는 화상처리법(3)을 사과(4), 감귤(5) 등에 응용한 예가 있으나 근적외광선을 사용하여 착색도를 측정한 연구는 거의 없다. 근적외분석법은 대상물질 내부의 화

Corresponding author : Rae-Kwang Cho, Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University Taegu, 702-701, Korea  
E-mail : rkcho@knu.ac.kr

학 관능기에 기인해 흡수를 나타내는 것인데(6) 당이나 산의 관능기에 근거한 당도(7)나 산도(8,9)의 비파괴 측정이 가능한 점에 착안하여 파괴 색소에 근거한 착색도의 측정가능성을 검토해 보는 것은 의미있는 일이라 생각된다.

일반적으로 식품의 색을 측정하는 방법에는 인간의 육안에 의한 색의 감지기능을 광학적으로 모방한 색차계를 사용하는 방법(10)과 흡광도를 측정하여 총 색소 함량으로 나타내는 분광학적인 방법(11, 12)이 사용되고 있다. 본 연구에서는 사과와 착색도를 a-value와 anthocyanin 함량으로 각각 나타내고 근적외 분광분석법에 의한 이들의 비파괴 예측가능성 및 정확도를 비교, 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 사과시료

본 실험에서 사용한 후지사과는 1998년 경상북도에서 수확된 것을 경북능금조합으로부터 구입하였으며 크기가 비교적 일정하고(270~300g) 착색도가 서로 차이는 것들을 선별하여 시료로 사용하였다.

### a-Value 측정

근적외 스펙트럼이 측정된 사과시료 부위에 색차계(CR-20, Minolta Co., Japan)를 사용하여 a-value를 측정하였다.

### Anthocyanin 함량 측정

근적외 스펙트럼이 측정된 사과시료 부위를 직경 1.6cm의 콜크보러로 7군데 채취한 후 과피에 붙어있는 과육은 칼로 최대한 제거하고 0.5N HCl과 95% 에탄올의 혼합용액(15 : 85, v/v) 100ml에 담귀 암실에서 24시간 동안 방치하면서 색소를 추출하였다. 색소 추출액은 여과지(Whatman No. 2)로 여과하고 532nm에서 흡광도를 측정한 후 검량선에 의해 anthocyanin 함량을 측정하였다.

### Anthocyanin 색소의 정제

Fig. 1에 나타난 방법에 따라 사과과피로부터 anthocyanin 색소를 추출하고 정제하였다. 우선 사과과피를 상기 추출용매로 24시간 동안 암실에서 추출한 후 Büchner funnel로 흡인여과 하고 잔사는 색소가 완전히 제거될 때까지 동일용매를 사용하여 반복추출 하였으며 얻어

진 색소 추출액을 모두 모아 정제용 시료로 사용하였다. 정제용 시료는 회전감압농축기 (EYELA, N-1, Japan)를 사용하여 50℃에서 농축하여 에탄올을 제거하고 원심분리(10,000rpm, 20min)하여 상정액을 분리한 후 분액여두를 사용하여 petroleum ether로 지용성 색소인 chlorophyll과 지용성 성분 등을 제거(13)하였으며 이 과정을 2회 반복하여 실시하였다. 얻어진 색소액 중에는 과량의 당이 존재하므로 효모를 이용하여 당을 제거하였다. 색소액은 pH 1.0~1.4의 강산성으로 효모 생육이 불가능하므로 0.1N NaOH를 첨가하여 색소 안정성(14)을 고려하면서 효모생육이 가능한 pH 3.2 부근으로 조정하였다. 6% sucrose 용액(w/v) 20ml에 건조압착효모(오뚜기社) 5g을 넣고 30℃에서 24시간 방치하여 활성화시킨 후 그 중 5ml를 색소액 100ml에 첨가하여 밀봉한 뒤 30℃에서 3일간 반응시키면서 하루 간격으로 시료를 취하여 TLC로 당의 존재를 확인하였다. TLC는 plastic sheet(Silicagel 60 F254, Merck Co., Germany)를 사용하여 n-butanol, pyridine, dH<sub>2</sub>O를 6 : 4 : 3(v/v/v)으로 혼합한 용매로 전개시킨 후 orcinol, methanol, c-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 혼합액(0.2 : 9 : 1, w/v/v)으로 발색시켰다. 당을 제거한 색소액은 원심분리한 후 동결건조하여 anthocyanin 색소를 얻었다.

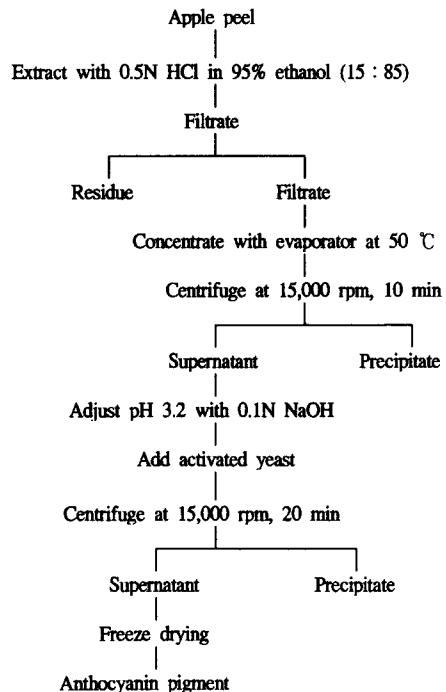


Fig. 1. Flow diagram for the extraction and purification of apple anthocyanin pigment.

근적외 스펙트럼 측정

사과시료의 근적외 스펙트럼은 연구용 분광분석 장치(InfraAlyzer 500, Bran+Luebbe Co., Germany)를 사용하여 1100nm에서 2500nm까지 2nm 간격으로 확산반사 방식으로 측정하였다. 사과시료의 측정방법은 이전(7-9)과 동일하며 정제한 anthocyanin은 알루미늄 시료 컵(9)을 사용하여 근적외 스펙트럼을 측정하였다.

비파괴측정 검량식 작성 및 검증

물리화학적 분석 데이터와 근적외 흡광도 데이터간에는 IDAS program을 사용하여 multiple linear regression(MLR) 분석법으로 검량식을 작성하였으며 얻어진 검량식의 정확도는 중상관계수(R), SEC(standard error of calibration) 및 미지시료에 대한 예측오차인 SEP(standard error of prediction)로 확인하였다.

결과 및 고찰

Anthocyanin 색소의 정제

색소 추출액에 효모를 첨가한 후 시간에 따른 당의 소모를 TLC로 조사하였는데, Fig. 2에서 보는바와 같이 효모첨가 3일 후 당은 거의 제거되었으며 정량분석 결과 약 98%이상 감소되었다. 효모를 첨가하기 전, 후 색소액의 근적외 스펙트럼(Fig. 3)에서도 흡수 피크의

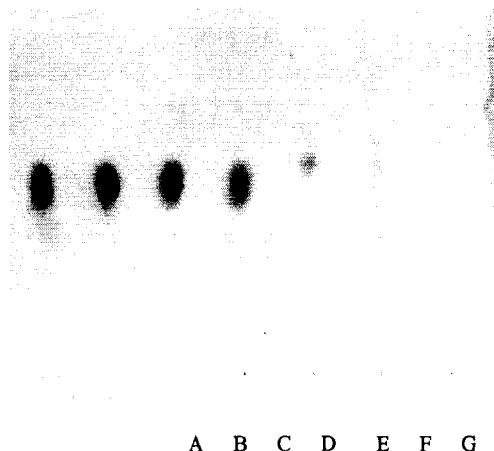


Fig. 2. Thin layer chromatography patterns of apple anthocyanin extract solution reacted with yeast for 3 days at 30°C. Developing solvent : n-butanol : pyridin : water (6 : 4 : 3, v/v/v). A: sucrose, B: glucose, C: fructose, D: before yeast adding, E: after 1 day yeast adding, F: after 2 day yeast adding, G: after 3 day yeast adding.

변화를 잘 관찰할 수 있는데, 효모첨가 후 3일이 경과된 색소액의 경우 효모첨가 전에 비해 1400~1500nm, 1600~1700nm, 그리고 2000~2100nm 영역의 흡수는 감소한 반면 2200~2300nm 영역의 흡수는 크게 증가하였다. 1440nm, 1480nm 및 2080nm의 영역은 sucrose와 glucose에 관련된 흡수파장(6)으로서 효모에 의한 당의 소모로 흡수피크가 감소하였음을 나타내고 2200~2300nm 영역은 전형적인 ethanol의 흡수파장(15)으로 당의 소모를 통한 알코올 발효가 진행되었음을 나타낸다.

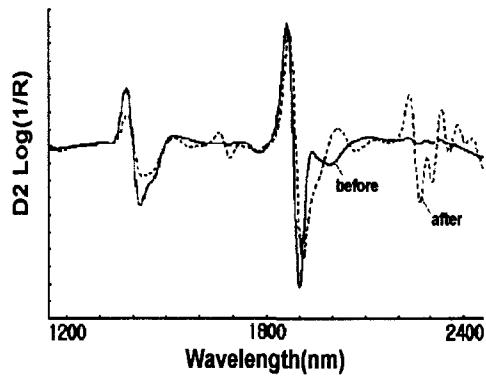


Fig. 3. Second derivative NIR spectra of anthocyanin extract solution before and after yeast adding.

Table 1. Multiple linear regression analysis between near infrared spectrum data and anthocyanin content of apple fruits

Used wavelength(nm)	R	SEC	SEP	F-value
1416, 1508	0.580	0.103	0.565	12.93
1876, 2252, 2176	0.761	0.012	0.343	22.89
2236, 2200, 1872, 1416	0.804	0.342	0.518	22.46
2236, 2200, 2180, 1416, 2196	0.826	0.328	0.614	20.63
2236, 2200, 1432, 1428, 2196, 1876	0.852	0.309	0.551	20.68
2236, 2200, 1432, 1428, 2196, 1876, 2188	0.863	0.301	0.567	19.12
2236, 2200, 1432, 1428, 2196, 1876, 2284, 2252	0.875	0.292	0.529	18.45
2236, 2200, 1432, 1428, 2196, 1876, 2284, 2252, 2308	0.886	0.283	0.546	17.86

Range : 0.19~3.02mg/cm<sup>2</sup>,  
 Mean : 0.92mg/cm<sup>2</sup>,  
 R : Multiple correlation of coefficient,  
 SEC : Standard error of calibration(n=54),  
 SEP : Standard error of prediction(n=36),  
 F-value: Mean square of regression/mean square of error.

Anthocyanin 함량의 비파괴측정 가능성

총 사과시료 90점의 anthocyanin 함량 범위는 0.19~3.02mg/cm<sup>2</sup>이었으며 평균치는 0.92mg/cm<sup>2</sup> 이었다. 54점의 시료의 근적외 스펙트럼 데이터와 anthocyanin 함량치 간에 중회귀분석을 행하여 검량식을 작성한 후 미지시

로 36점에 대입하여 측정정확도를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 1876, 2252 및 2176nm의 3파장으로 구성된 검량식에서 anthocyanin 실측치와 근적외 예측치 간의 중상관계수(R)는 0.761이었고 미지시료에 대한 예측오차(SEP)는 0.343mg/cm로 전체 검량식 중 가장 낮은 측정오차를 보였다.

#### a-Value의 비파괴측정 가능성

총 사과시료 90점의 색차계에 의한 a-value 범위는 3.06~37.10이고 평균값은 21.29이었다. 54점 시료의 근적외 스펙트럼 데이터와 a-value 간에 중회귀분석을 행하여 검량식을 작성한 후 검증용 시료 36점에 대입하여 측정정확도를 조사한 결과를 Table 2에 나타내었다. 2076, 2120, 2276, 2488, 2072 및 1492nm의 6파장으로 구성된 검량식에서 a-value 실측치와 근적외 예측치 간에 0.913의 높은 상관성을 나타내었으며 미지시료에 대한 측정오차는 4.94로 가장 낮았다. a-value 측정을 위한 검량식은 아래와 같다.

$$\begin{aligned} a\text{-Value} = & -179.409 - 12772.5\log(1/R_{2076}) \\ & + 5970.7\log(1/R_{2120}) - 1455.1\log(1/R_{2276}) \\ & + 708.8\log(1/R_{2488}) + 8272.4\log(1/R_{2072}) \\ & - 557.1\log(1/R_{1492}) \end{aligned}$$

Table 2. Multiple linear regression analysis between near infrared spectrum data and a-value of apple fruits

Used wavelength(nm)	R	SEC	SEP	F-value
1888, 2088	0.688	0.891	8.652	22.88
1888, 2124, 2264	0.784	0.954	7.711	26.54
2076, 2104, 2264, 2476	0.878	0.632	7.458	41.29
2076, 2124, 2264, 2456, 2072	0.893	0.396	7.852	37.95
2076, 2120, 2276, 2488, 2072, 1492	0.913	0.029	4.940	39.34
2076, 2120, 2264, 2488, 2072, 1488, 1404	0.928	0.721	7.650	40.84
2088, 2124, 2264, 2488, 2072, 1488, 1396, 2056	0.937	0.519	8.096	40.76
2088, 2124, 2264, 2488, 2072, 1492, 1392, 2056, 2484	0.943	0.393	8.170	39.46

a-value: red-greenness(+red, -green).

Range: 3.06-37.10,

Mean: 21.29,

R: Multiple correlation of coefficient,

SEC: Standard error of calibration(n=54),

SEP: Standard error of prediction(n=36),

F-value: Mean square of regression/mean square of error.

여기서  $\log(1/R_{2120})$ 와  $\log(1/R_{2276})$ 은 각각 2120nm와 2276nm에서의 흡광도를 나타내는데 정제한 anthocyanin 색소의 근적외 흡수피크가 2100nm 및 2280nm 부근의 영역에서 뚜렷한 흡수패턴을 나타내는 것으로 보아 (Fig. 4) 검량식에 사용된 파장 중 2076, 2120, 2276, 2072nm는 anthocyanin에 관련된 선택파장인 것으로 추

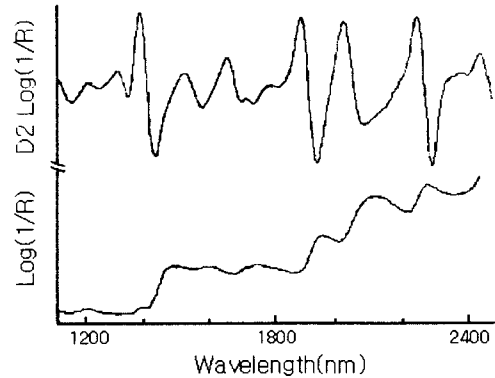


Fig. 4. Raw and second derivative NIR spectra of purified anthocyanin pigment.

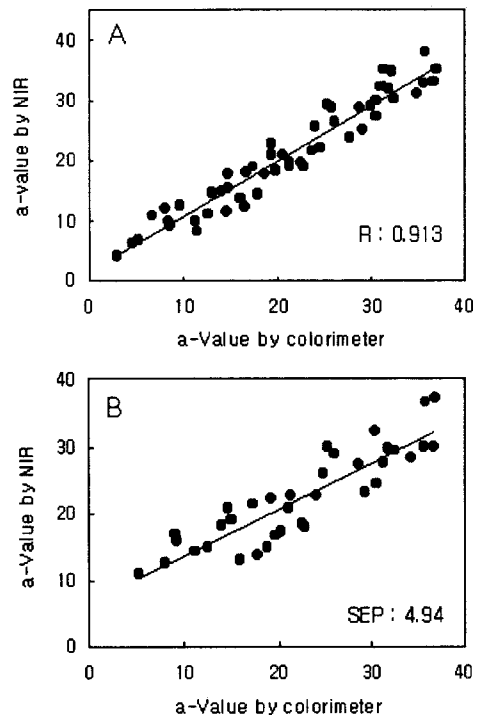


Fig. 5. Scatter plot of NIR predicted versus measured a-value of apple fruits.

A: calibration, B: prediction, a-value: red-greenness (+red, -green).

정할 수 있다. Anthocyanin의 스펙트럼중 1450nm와 1940nm 영역은 물의 흡수를 나타내는 파장이다(6). 색차계에 의한 a-value 실측치와 근적외 예측치 간의 관계를 Fig. 5에 나타내었다. Anthocyanin 함량치를 사용하여 작성한 비파괴 검량식이 a-value를 사용한 경우보다 측정정확도가 더 낮은 것은 긴 화학분석 공정에서

발생한 실험오차 때문인 것으로 사료된다.

이상의 결과를 요약하면 색차계에 의한 a-value와 사과의 근적외 스펙트럼간의 회귀분석에 의해 작성된 검량식을 사용하여 사과의 착색도를 신속하게 비파괴 측정하는 것이 가능함을 알 수 있었다.

## 요약

사과의 착색도는 과실의 등급결정에 중요한 인자로 작용한다. 본 연구에서는 근적외선을 이용하여 사과의 착색도를 비파괴측정 할 수 있는지의 가능성을 조사하였다. 사과의 근적외 스펙트럼은 InfraAlyzer 500C (Bran+Luebbe)를 사용하여 1100~2500nm의 범위 내에서 측정하였으며 이화학 데이터와 근적외 분석데이터 간에는 IDAS 프로그램으로 중회귀분석을 행하여 검량식을 작성하였다. 사과의 착색도는 색차계에 의한 a-value와 추출법에 의한 anthocyanin 함량으로 각각 나타내었다. 총 90점의 시료 중 54점을 검량식 작성용으로 36점을 검정용 시료로 각각 사용하였다. a-value의 비파괴측정 결과, 2076, 2120, 2276, 2488, 2072 및 1492nm의 6파장으로 구성된 검량식에서 가장 높은 정확도를 나타내었는데 기존 분석치와 근적외 분석치간의 중상관계수(R)는 0.913이었으며 미지시료에 대한 예측오차는 4.94이었다. 그러나 anthocyanin 함량의 비파괴측정 결과 중상관계수는 0.761로서 측정정확도는 다소 낮았다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부의 현장어로 기술개발과제의 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 조래광 (1999) 사과 대표 생산기술 및 비파괴 사과 선별기 설명회. 농림기술개발연구 성과보고서. p.27
2. Brith, G.S., Norris K.L. and Yeatman, J.N. (1957) Non-destructive measurement of internal color of tomatoes by spectral transmission. *Food Technol.*, 11, 552-557
3. Geladi, P. and Grahn, H. (1996) Multivariate Image Analysis. John Willy & Sons Ltd., England. p.1-20
4. Noh, S.H., Ryu, K.H. and Kim, S.M. (1991) Classification of apple coloration using image processing system, *J. of Korean Society for Agricultural Machinery*, 16, 272-280
5. 岩元睦夫, (1987) 非破壊計測法の原理と應用. 食品品質成分の非破壊分析測定法. p.1-18
6. Osborne, B.G. and Feam, T. (1986) Near infrared spectroscopy in food analysis. Longman scientific & technical, England. p.36-40
7. Cho, R.K. and Sohn, M.R. (1998) New approach of nondestructive evaluation for sweetness in apple fruit using near infrared spectroscopy. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.*, 39, 745-750
8. Sohn, M.R. and Cho, R.K. (1998) Nondestructive evaluation of free acid content in apples using near-infrared spectroscopy. *Korean J. Agric. Chem.*, 41, 234-239
9. Sohn, M.R. and Cho, R.K. (1999) Application of near-infrared spectroscopy for the determination of malic acid content in 'Fuji' apple fruit. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.*, 40, 45-50
10. Francis, F.J. (1972) Colorimetry of foods. *Food Technol.*, 26, 39-40
11. Fuleki, T. and Francis, F.J. (1968) Quantitative methods for anthocyanins. I. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *J. Food Sci.*, 33, 78 [Korean J. Food Sci. Technol., 29, 497-501(1997)]
12. Somers, T.C. and Evans, M.E. (1974) Wine quality-correlations with color density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines. *J. Sci. Food Agric.*, 25, 1369 [Korean J. Food Sci. Technol., 29, 497-501(1997)]
13. Lee, L.S. and Rhim, J.W. (1997) Thermal Kinetics of color changes of purple sweet potato anthocyanin pigment. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29, 497-501
14. Francis, F.J. (1989) Food colorants : Anthocyanins. *Crit. Rev. Food Sci. & Nutri.*, 28, 273 [Korean J. Food Sci. Technol., 28, 345-351(1996)]
15. Norris, K. (1987) Near-infrared technology in the agricultural and food industries. American Association of Cereal Chemists inc., St. Paul, Minnesota, U.S.A. p.275

(접수 2000년 1월 31일)