

근적외선 분광분석법을 이용한 벌꿀의 품질평가

조현종* · 하영래¹

농협중앙회 식품연구소, ¹경상대학교 응용화학식품공학부

Determination of Honey Quality by Near Infrared Spectroscopy

Hyeon-Jong Cho* and Yeong-Lae Ha¹

Food Research Institute, National Agricultural Cooperative Federation

¹Division of Applied Life Sciences, and Institute of Agriculture and Life Sciences,
Graduate School, Gyeongsang National University

The honey samples harvested in 1996, 1997, and 1998 were used for calibration and validation. NIR spectra were obtained using NIR spectrometer and quartz glass sample device with gold coating diffuser. Multiple linear regression and partial least square were used for calibrations. The correlation coefficient (RSQ) and standard error of prediction (SEP) obtained for moisture were 0.997 and 0.1%, respectively. The RSQ and SEP for fructose and glucose were 0.926 and 0.951%, and the SEP were 0.54% and 0.52% respectively. The validation results for sucrose, maltose, HMF definition, and acidity of honey were considered to be sufficient for practical use. RSQ and SEP for SCIR were 0.950 and 1.08%, respectively. These results are indications of the rapid determination of purity of the honey through NIR analysis.

Key words: honey, near infrared, carbon isotope

서 론

벌꿀의 품질은 밀원이나 기후, 환경조건 등에 의해 영향을 받으며 수분, 전화당, 자당, 회분, 산도 및 HMF(Hydroxy Methyl Furfural) 등 구성성분 함량에 따라 그 품질을 평가하고 있다. 벌꿀의 주요 성분은 수분과 당류로 전체의 90~95% 정도를 차지하고 있는데 일반적으로 수분함량은 19~21% 정도이며, 당류는 단당류인 fructose가 35~40%, glucose는 30~35%, 이당류인 sucrose와 maltose는 2~7%로 총 당함량은 70~75%를 나타내고 있다. 벌꿀의 품질규격에는 국내규격으로 식품공전 규격⁽¹⁾이 있으며 국제규격으로는 CODEX규격⁽²⁾, 그 외 미국의 USDA규격⁽³⁾ 등이 있다.

근적외선 분광분석은 빛의 굴절반사를 이용한 분석방법으로 시료 전처리가 필요 없어 원형 그대로 측정이 가능하고 많은 성분을 동시에 분석할 수 있을 뿐만 아니라 정성 및 정량분석이 가능하여 곡류, 축산물, 사료, 청과물 등 여러 분야에서 연구가 진행되고 있다^(4,6). 근적외선 분광분석법을 이용한 벌꿀의 분석에는 Cho 등⁽⁷⁾이 한국산 아카시아꿀의 품

질평가에 이용하였으며, Ha 등⁽⁸⁾은 MLR 회귀분석법으로, Qiu 등⁽⁹⁾은 PLS 회귀분석법으로 벌꿀의 주성분 분석에 이용한 연구결과를 보고하였다.

벌꿀의 생산시기가 봄과 여름에 집중되어 있는 우리나라에서는 품질평가의 신속성이 요구되는데 품질검사가 늦어지면 여름철 기온상승으로 품질저하와 향미의 변화를 가져올 수 있다. 따라서 벌꿀의 품질평가는 최대한 신속하게 이루어져야 하는데 현행의 이화학적 검사방법으로는 벌꿀의 성분 분석에 많은 시간과 경비가 요구되고 있어 근적외선 분광분석법을 이용하여 벌꿀의 품질을 신속, 정확하게 평가할 수 있는 방법을 모색하고자 하였다.

재료 및 방법

벌꿀시료

일반적인 벌꿀의 품질특성을 대표할 수 있는 벌꿀 시료를 선정하기 위해 '96, '97, '98년 한국산 벌꿀 3,600여점을 대상으로 각각의 일반성분 분석치를 SAS⁽¹⁰⁾통계 프로그램으로 주성분 분석을 한 후 각 시료벌꿀의 제1, 제2 주성분 수치를 이용하여 군집분석을 하고 각 군집별로 다양한 품질특성을 가지는 벌꿀 588점을 1차 선발하였다. 1차 선발된 시료는 근적외선 분광분석기로 scanning한 후 WinISI II program (V.1.50, NIRSystem, USA)을 이용한 spectrum pattern 분석을 통하여 최종적으로 토종꿀 65점, 아카시아꿀 75점, 잡화꿀 90

*Corresponding author : Hyeon-Jong Cho, Food Research Institute, National Agricultural Cooperative Federation, san 38-27, Woundang-dong, Dukyang-ku, Goyang city, Kyongki 412-707, Korea
Tel: 82-31-960-4354
Fax: 82-31-960-4319
E-mail: honey@nonghyup.com

점 등 230점을 선별하여 검량식 작성을 위한 시료(calibration set)로 사용하였다. 검량식 평가를 위한 시료(validation set)는 1차 선별된 시료 중에서 50점을 무작위로 선별하여 사용하였다.

수분함량 측정

굴절계(ATAGO 3T, Japan)에 향온 circulator(LAUDA E100, Germany)를 장착하여 20°C에서 굴절률을 측정하여 수분환산표를 이용하여 수분함량을 구하였다.

당함량 측정

벌꿀의 당은 HPLC(Waters, USA)를 이용하여 fructose, glucose, sucrose 및 maltose를 분석하였다. 시료는 벌꿀 약 5g를 정밀히 달아 50 mL volumetric flask에 완전히 녹여 0.45 µm membrane filter로 여과한 후 시험용액으로 하였다. RI detector(M410, 40°C)와 carbohydrate column(3.9×300 mm, 10 µm, 45°C)을 사용하였으며 attenuation은 64, 용매는 acetonitrile : water를 80 : 20(v/v)으로 혼합하여 1.5 mL/min으로 흘려주었고 시험용액의 주입량은 10 µL로 하였다.

HMF(Hydroxy Methyl Furfural)함량 측정

벌꿀의 HMF함량은 HPLC(Waters, USA)를 이용하여 분석하였으며 시험용액은 당류분석시 조제한 시험용액을 사용하였다. UV detector(M486)와 µ-Bondapak C₁₈ column(3.9×300 mm, 10 µm)을 사용하였으며, 280 nm에서 측정하였다. 용매조건은 water : methanol을 90 : 10(v/v)으로 혼합하여 1.5 mL/min으로 흘려주면서 시험용액 20 µL을 주입하였다.

산도 측정

산도는 AOAC 분석법⁽¹⁾에 따라 벌꿀 10g를 75 mL 증류수에 녹여 0.1 N NaOH로 pH 8.5가 될 때까지 적정하여 free acidity를 측정하고, 0.1 N NaOH을 5 mL 넣은 다음 0.1 N HCl로 pH 8.3이 될 때까지 적정하여 lactone의 함량을 측정하여 이를 합한 수치를 총산으로 하였다.

안정탄소동위원소비율 측정

안정탄소동위원소비율(Stable Carbon Isotope Ratio, SCIR)은 GC-IR/MS(Isochrom-EA, VG ISOTECH, U.K.)를 이용하여 분석하였다⁽²⁾. 벌꿀 시료 약 5 mg정도를 tin capsule에 넣

고 밀봉하여 EA(Elemental Analyser, FISON, Italy)에서 회화하고 CO₂로 산화시켜 GC로 분리하여 He gas diluter로 희석하여 IR/MS로 ¹²C와 ¹³C를 측정하였다. EA의 온도조건은 oxidation tube; 1,030°C, reduction tube; 650°C, oven; 45°C, filament(TCD); 190°C로 하였으며, He gas flow는 Vent-R (Reference He); 40 mL/min, Vent-M(Measure Sample); 80 mL/min, Vent-O₂; 25 mL/min으로 하였다. IR/MS의 Tune Source Electronics는 Accelerating Voltage; 3431.4, Extraction Voltage; 80.55, Half Plate Differential; 11.3, Z-Plates Voltage; 62.2, Trap Current; 400 µA, Electron Volts; 91.06, Ion Repeller Voltage; -2.15, Magnet Current; 3.40002로 하였다. CO₂ Ref. gas는 Delta(¹³C) -26.5‰, Delta(¹⁸O) -18.0‰로 하였다.

근적외선 스펙트럼 측정

벌꿀의 근적외선 스펙트럼은 근적외선 분광광도계(Model 6500, NIRSystem, USA)를 이용하였으며, 석영으로 제작된 reflectance vessel(NR-6544)에 순급으로 도금된 깊이 1 mm diffuser(NR-6543-1)를 사용하여 400~2500 nm 파장범위에서 2 nm 간격으로 측정하였다. 측정된 근적외선 스펙트럼은 WinISI II program(V.1.50, NIRSystem, USA)을 이용하여 수학적 처리(mathematical treatment)와 회귀분석을 하였다.

결과 및 고찰

벌꿀의 이화학적 특성

선별된 벌꿀시료의 수분, 당성분(fructose, glucose, sucrose, maltose), 산도, HMF 및 탄소동위원소비율 등을 분석하여 벌꿀종류에 따라 비교한 결과는 Table 1과 같다. 3년 동안 여러 밀원에서 수집된 벌꿀시료를 모집단으로 하여 군집분석과 근적외선 스펙트럼 패턴분석에 의해 선별된 시료들의 이화학적 특성은 그 함량범위가 넓고 고른 분포를 나타내었다. 벌꿀 종류별로 이화학적 특성 차이를 나타낸 토종꿀의 수분 함량이나 아카시아꿀의 HMF함량 등은 벌꿀의 생산환경이나 밀원의 차이에 의해서 나타난 결과로 보여진다.

검량식 작성

근적외선 분광분석기에 의해 얻은 벌꿀의 raw spectrum은

Table 1. Physico-chemical properties of various honey

Component	Tojong honey	Acasia honey	Poly-flower honey	Total
				Mean ± SD
Moisture (%)	16.5~23.4	17.3~34.4	16.8~34.0	20.76 ± 2.94
Fructose (%)	34.0~42.7	34.0~44.5	32.7~42.5	39.17 ± 2.32
Glucose (%)	23.6~32.2	25.1~32.0	20.1~37.6	28.44 ± 2.72
Sucrose (%)	0.08~3.74	0.11~2.73	0.07~3.17	0.77 ± 0.85
Maltose (%)	0.81~4.94	0.54~3.10	0.63~5.98	2.58 ± 0.85
HMF ¹⁾ (mg/kg)	5.6~109.5	1.0~17.7	1.5~178.4	34.72 ± 39.6
Acidity (meq/kg)	9.4~24.5	7.0~28.4	6.2~31.0	13.99 ± 4.25
SCIR ²⁾ (δ ¹³ C, ‰)	-25.5~-11.9	-27.0~-12.2	-24.6~-11.1	-18.41 ± 5.0

¹⁾Hydroxy Methyl Furfural.
²⁾Stable Carbon Isotope Ratio.

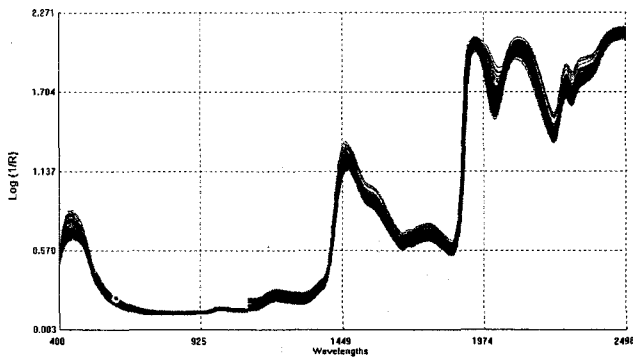


Fig. 1. NIR spectrum of various honey.

Fig. 1과 같다. raw spectrum은 일반적으로 시료에 조사된 빛의 산란효과와 시료의 입도, 결합도, 밀도 등의 물리적 요소들에 의해 base line의 변동이 있으므로 회귀분석의 변수를 줄이고 안정된 calibration curve를 작성하기 위하여 스펙트럼을 수학적으로 처리하게 되는데 그 결과는 Table 2와 같다. 자당을 제외한 당류와 HMF함량, 산도 등은 1차 미분법이 가장 적합하였으며, 수분과 탄소동위원소비율은 2차 미분법이 가장 적합하였다. 근적외선은 2100 nm 이상에서 빛의 산란효과로 인하여 spectrum이 들뜨는 경향이 있으므로 이를 보정하기 위한 scatter correction은 대부분 SNV(Standard Normal Variate transformation) and detrend 처리⁽¹³⁾를 하는 것이

RSQ(R², Coefficient of multiple correlation) 값이 높게 나타났다. 검량식 작성을 위한 회귀분석방법(Regression method)으로 다중회귀분석방법⁽¹⁴⁾인 Partial Least Squares(PLS, 부분최소제곱법), Principle Component Analysis(PCA, 주성분분석법) 및 Multiple Liner Regression (MLR, 다중선형회귀법) 등을 적용해 본 결과 PLS법이 가장 SEC가 적고 RSQ값이 큰 검량식을 나타내었다.

벌꿀의 구성성분 중 거의 20% 정도를 차지하는 수분은 RSQ값이 0.998, SEC는 0.13%로 매우 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있었으며, 벌꿀의 구성성분 중 70% 정도를 차지하는 주요성분인 fructose와 glucose 함량은 RSQ가 각각 0.951, 0.958로 나타났으며, SEC는 0.51%, 0.55% 정도로 두 성분이 비슷한 결과를 나타내었다. sucrose와 maltose는 RSQ가 0.958, 0.928이였으며, SEC는 0.19%, 0.21%로 비교적 안정된 calibration curve를 얻을 수 있었다. 벌꿀의 신선도 척도로 활용되는 HMF는 RSQ가 0.935, SEC는 2.24 mg/kg으로 나타났는데 이것은 HMF함량이 다른 구성성분에 비해 아주 미량 존재하기 때문에 발생된 측정오차라고 생각된다. 산도는 RSQ가 0.959, SEC는 0.56 meq/kg으로 비교적 안정된 결과를 얻을 수 있었다. 탄소동위원소비율은 밀원이나 생산환경에 따라 다소 차이는 있지만 순수 꽃꿀의 경우 -27.0~-21.5% 정도의 분포를 나타내며 사탕수수나 옥수수를 가공하여 생산된 설탕이나 물엿은 -12.0~-9.0% 정도로 확연한 차이를 나타내기 때문에 벌꿀의 순도를 측정할 수 있는 척도로 활용

Table 2. Mathematical treatments and regression methods of optimal calibration equations

Component	Math treatment ¹⁾	Scatter Correction	Regression method	Calibration		
				PLS terms	SEC ³⁾	RSQ ⁴⁾
Moisture (%)	2. 10. 10. 1	SNV & DT ²⁾	PLS	5	0.13	0.998
Fructose (%)	1. 4. 4. 1	SNV & DT	PLS	6	0.51	0.951
Glucose (%)	1. 4. 4. 1	SNV & DT	PLS	9	0.55	0.958
Sucrose (%)	2. 10. 10. 1	SNV & DT	PLS	9	0.19	0.958
Maltose (%)	1. 10. 10. 1	SNV & DT	PLS	9	0.21	0.928
HMF (mg/kg)	1. 4. 4. 1	SNV & DT	PLS	11	2.24	0.935
Acidity (meq/kg)	1. 4. 4. 1	None	PLS	6	0.56	0.959
SCIR ($\delta^{13}C, \%$)	2. 10. 10. 1	SNV & DT	PLS	11	0.93	0.966

¹⁾Derivative. Gap. Smooth. Smooth 2.

²⁾Standard normal variate and de-trend transformation.

³⁾Standard error of calibration data.

⁴⁾Coefficient of multiple correlation.

Table 3. Statistical parameters obtained from the validation of the calibration data

Component	RSQ	SEP ¹⁾	Bias ²⁾	Slope
Moisture (%)	0.997	0.10	-0.012	0.998
Fructose (%)	0.926	0.54	-0.008	0.984
Glucose (%)	0.951	0.52	0.050	1.087
Sucrose (%)	0.894	0.25	-0.023	1.031
Maltose (%)	0.797	0.22	-0.011	0.984
HMF (mg/kg)	0.854	2.96	-0.313	0.926
Acidity (meq/kg)	0.942	0.73	-0.155	1.013
SCIR ($\delta^{13}C, \%$)	0.950	1.08	0.145	1.016

¹⁾Standard error of prediction data.

²⁾Difference between reference and NIR values.

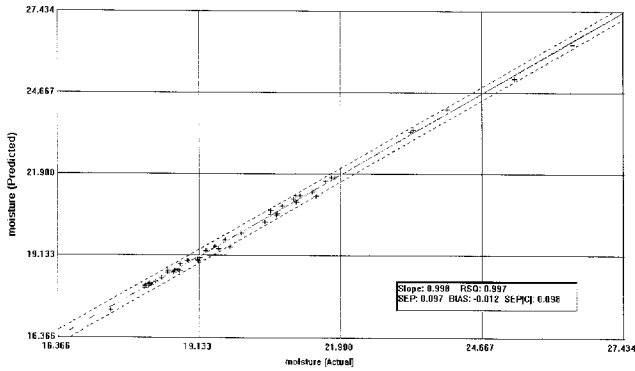


Fig. 2. Relationship between NIR predicted and reference values for moisture contents (%) of honey.

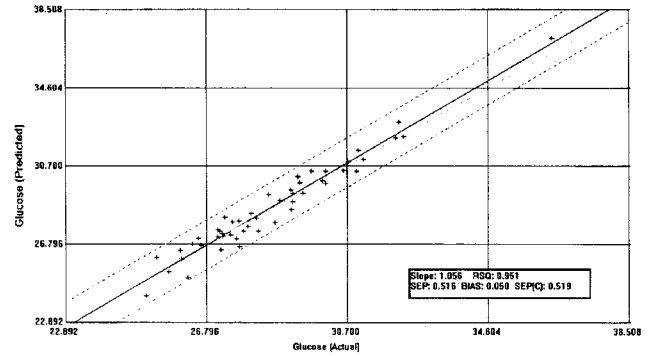


Fig. 4. Relationship between NIR predicted and reference values for glucose contents (%) of honey.

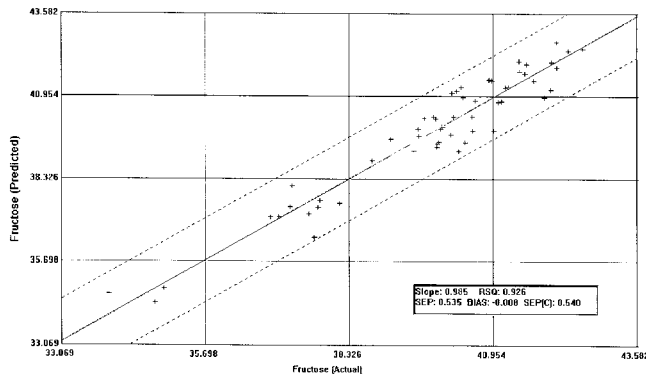


Fig. 3. Relationship between NIR predicted and reference values for fructose contents (%) of honey.

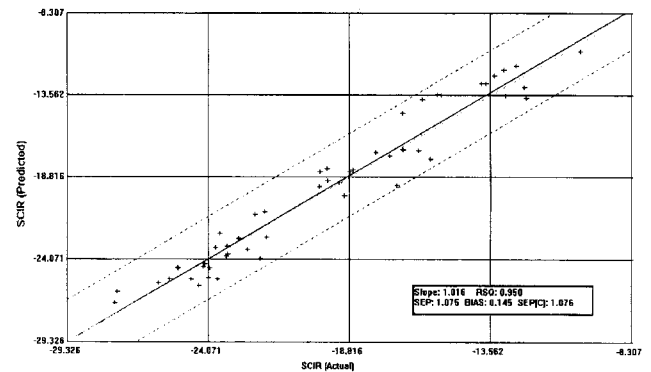


Fig. 5. Relationship between NIR predicted and reference values for stable carbon isotope ratio(‰) of honey.

된다. 탄소동위원소비율의 RSQ값은 0.966, SEC는 0.93‰을 나타내었다.

검량식의 검증

통계적으로 계산된 검량식에 대한 검증을 위해 확인분석을 한 결과는 Table 3에 나타내었다. 벌꿀의 수분함량에 대한 확인분석 결과 RSQ는 0.997, SEP는 0.10%로 매우 신뢰성 있는 결과를 나타내었다(Fig. 2). 전화당을 구성하는 fructose와 glucose의 HPLC 분석치와 NIR을 이용한 분석치를 비교한 결과 RSQ는 각각 0.926, 0.951를 나타냈으며 SEP는 0.54%, 0.52%를 나타내어 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 3, 4). sucrose와 maltose는 RSQ가 0.894, 0.797정도로 신뢰도는 다소 낮았으나 SEP는 각각 0.25%, 0.22%로 벌꿀의 품질평가에는 사용할 수 있을 것으로 사료된다. HMF 함량은 RSQ가 0.854, SEP가 2.96 mg/kg으로 측정오차가 있는 것으로 나타났으나 HMF에 대한 국내의 규격이 80 mg/kg인 것을 고려하면 NIR을 이용하여 측정 가능한 항목으로 판단되었다. 산도는 RSQ값이 0.942, SEP가 0.73 meq/kg으로 비교적 안정된 결과를 나타내었다. 탄소동위원소비율은 SEP가 1.08‰로 오차가 컸으나 RSQ값이 0.950으로 비교적 안정된 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 5). 벌꿀에서 GC-IR/MS에 의해 측정된 탄소동위원소비율은 꽃꿀의 순도를 유일하게 평가하는 수단으로 알려져 있는데 본 연구의 결과 근적외선 분광 분석법으로도 꽃꿀의 순도를 판별할 수 있는 가능성이 제시

되었다. 이러한 결과는 꽃꿀만이 가지는 어떤 특성들이 복합적으로 근적외선 스펙트럼에 영향을 끼쳐 나타난 현상으로 추정되나 이에 대한 연구가 좀 더 필요하리라 생각된다.

요 약

다양한 품질특성을 가지는 230점의 벌꿀시료를 선발하여 품질평가 요소에 대한 각각의 검량식을 작성하였으며, 검량식 평가를 위한 벌꿀시료는 50점을 사용하였다. 근적외선 스펙트럼에 대한 수학적 처리를 하여 검량식을 얻었으며 회귀 분석방법은 PLS법이 가장 적합하였다. 이화학적 분석과 NIR을 이용해 얻은 분석치를 비교한 결과 수분의 RSQ는 0.997, SEP는 0.10%로 매우 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있었다. fructose와 glucose는 RSQ가 0.926, 0.951로 나타났으며 SEP는 각각 0.54%, 0.52%이었으며, sucrose와 maltose는 SEP가 각각 0.25%, 0.22%로 나타났다. HMF의 SEP는 2.96 mg/kg이었으며 산도는 SEP가 0.73 meq/kg이었다. 탄소동위원소비율은 SEP가 1.08‰로 오차가 컸으나 RSQ값이 0.950으로 비교적 안정된 결과를 얻을 수 있어 근적외선 분광분석법으로도 꽃꿀의 순도를 판별할 수 있는 가능성이 제시되었다.

문 헌

1. K.F.D.A. Food Code. Korea Food and Drug Administration.

- Seoul (2000)
2. Codex Alimentarius Commission. CODEX Standard for Honey. FAO/WHO Food Standard Programme Rome, Italy (1994)
 3. U.S.D.A. United States Standards for Grades of Honey. United States Department of Agriculture Washington, DC, USA (1985)
 4. Sohn, M.R and Cho, R.K. Nondestructive evaluation of free acid content in apples using near-infrared spectroscopy. Korean J. Agric. Chem. 41: 234-239 (1998)
 5. Kim, K.O. Rapid determination of ascorbic acid in red pepper leaves by near-infrared reflectance spectroscopic analysis. J. Korean Soc. Food Sci. Nur. 27: 393-398 (1998)
 6. Kim, H.U., Noh, S.H. and Kim, K.B. Nondestructive determination of sugar content in apples using ratio or difference of nir spectral absorbance. Food Engineering Progress 3: 8-14 (1999)
 7. Cho, H.J. and Hong, S.H. Acacia honey quality measurement by near infrared spectroscopy. J. Near Infrared Spectrosc. 6: A329-A331 (1998)
 8. Ha, J.H., Koo, M.S. and Ok, H.E. Determination of the constituents of honey by near infrared spectroscopy. J. Near Infrared Spectrosc. 6: A367-A369 (1998)
 9. Qiu, P.Y., Ding, H.B., Tang, Y.K. and Xu, R.J. Determination of chemical composition of commercial honey by near-infrared spectroscopy. J. Agric. Food Chem. 47: 2760-2765 (1999)
 10. SAS Institute, Inc. SAS User's Guide. Statistical Analysis systems Institute, Cary, NC, USA (1990)
 11. AOAC. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA (1990)
 12. Brookes, S.T., Barrie, A. and Davies J.E. A rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ test for determination of corn syrups in honey. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74: 627-629 (1991)
 13. Barnes, R.J., Dhanoa, M.S. and Lister, S.J. Correction to the description standard normal variate(SNV) and de-trend(DT) transformation in practical spectroscopy with applications in food and beverage analysis. Appl. Spectrosc. 43: 772 (1989)
 14. Martens, H. and Naes, T. Multivariate calibration by data compression. In: Near-infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. Williams, P. and Norris, K.H. (eds.). American Association of Cereal Chemists, USA (1989)

(2001년 11월 26일 접수)