

## 벼 생체엽신 질소함량 측정을 위한 근적외선분광분석의 검량식 작성

권영립<sup>†</sup> · 백미화 · 최동철 · 최정식 · 최영근

전라북도농업기술원

### Determination of Calibration Curve for Total Nitrogen Contents Analysis in Fresh Rice Leaves Using Visible and Near Infrared Spectroscopy

Young-Rip Kwon<sup>†</sup>, Mi-Hwa Baek, Dong-Chil Choi, Joung-Sik Choi, and Yeong-Geun Choi

Jeollabuk-do Agricultural Research and Extension Services, Iksan 570-704, Korea

**ABSTRACT :** Near Infrared Spectroscopy (NIRS) has been used as a tool for the rapid, accurate and nondestructive assay of the fresh rice leaf in nitrogen content. NIRS used in this study was visible and near infrared spectroscopy type instrument, Foss model 6500. To obtain a useful calibration equation, standard regression between the data was analyzed by chemical analysis and by NIRS method. Accuracy of calibration equation for nitrogen content on fresh leaf of rice were 0.879, 0.858 and 0.819, respectively. Accuracy of calibration equation after outlier treatment increased as 0.017, 0.02 and 0.061 improved each with 0.896, 0.878 and 0.880, respectively. Calibration equation combined using merge function after accuracy of calibration equation more increased by 0.911. Difference analysis value between calibration equation and lab value by kjeldahl showed 0.001%. With this as same result is the possibility of closing the deterioration of the sample in order to omit a construction and pulverization process it is judged with the fact that the nitrogen content measurement of the fresh rice leaf which the possibility of reducing an hour and an expense is by a near infrared spectroscopy technique will be possible.

**Keywords:** rice, NIRS, fresh leaf, nitrogen, calibration

작물의 시비진단과 처방은 식물체의 영양을 진단하는데부터 시작해야 한다. 식물체의 영양진단법은 SPAD에 의한 엽록도를 측정하는 방법과 질소농도를 측정하는 방법이 있다. SPAD에 의한 엽록도의 측정방법은 측정값의 변위가 크고, 정확도가 낮아 실용화를 위해서는 개선이 요구되고 있다(박 등, 2004). 식물체의 질소농도를 측정하여 정보를 알아내는 방법은 SPAD 방법에 비하여 비교적 정확한 방법으로 여겨지나 식물체를 채취하여 건조와 분쇄 후 정량하는 과정을 거쳐야 하

기 때문에 시료를 준비하는데 상당한 시간과 과정이 필요하다.

비파괴 생체엽신 질소영양 진단법은 건조와 분쇄과정을 생략하기 때문에 간편하게 성분함량을 측정할 수 있으며, 영농 현장에서도 측정이 가능하기 때문에 벼 식물체의 영양진단에 응용하여 시비처방에 활용할 수 있다고 생각한다.

또한 현재 논농업직불제에서 과비답을 구분하기 위해서 엽 질소 농도 측정과 토양검정을 시행하고 있다. 현장에서 실행되기 때문에 측정자와 경작자 그리고 지도사 사이에 투명하게 되어 정책실행 및 현장지도에 신뢰도와 효과를 높여갈 것으로 생각한다. 이러한 기술은 다른 작물에도 확대 적용될 수 있는 선진 기술로 이 분야의 연구자나 지도 관련자들에게 매우 용이하고 편리하게 응용할 수 있는 기술이라고 생각한다. 그러나 이러한 기술이 현장에서 실용화되기 위해서는 먼저 해결해야 할 소프트웨어나 하드웨어 연구가 필요하다.

따라서 본 연구는 근적외선분광분석기를 이용하여 현장에서 영양진단에 활용하고, 시비처방에 응용하기 위한 기초 연구로 벼 생체엽신 질소함량의 측정을 위한 검량식 작성을 실시하였다.

### 재료 및 방법

시험품종은 2004년에 동진1호 등 31품종을 익산, 정읍, 부안 3지역에 재식거리를 30×14cm로 5월 30일에 3반복으로 이앙하였다. 시비량은 질소-인산-칼리를 11-4.5-5.7kg/10a로 하였으며, 질소는 기비-분얼비-수비로 50-20-30%로 분시하였고, 칼리는 기비-수비로 70-30%, 인산은 모두 기비로 시용하였다.

잡초방제는 씨래질과 동시 oxadiazon를 토양처리하였으며, 이앙 후 30일에 pyrazosulfuron - ethyl + molinate를 처리하였다. 기타는 전북농업기술원 표준 재배방법에 준하였다.

질소분석은 벼 식물체를 최고분얼기와 출수기 사이에 반복당 1주씩 4회 채취하여, 생체잎을 가시광선/근적외선 영역의 분광분석기(NIRSystems, Model 6500, FOSS, Sweden)를 이

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-63-839-0325 (E-mail) kyrkwon@hanmail.net

<Received November 1, 2005>

용하여 측정하였다. 스펙트럼은 하프컵을 사용하여 400~2500 nm의 파장영역에서 2nm 간격으로 측정하였으며, 근적외선 분광분석기의 구동을 위하여 전용 프로그램인 Infracsoft International Software(WinISI Ver. 1.5 USA)를 이용하였다. 기준 스펙트럼(Reference)은 항상 일정한 흡광도를 나타내는 ceramic plate를 이용하였다. 회귀분석 방법은 다중회귀분석법(multiple linear regression: MLR)과 부분최소자승법(partial least square method: PLS)을 적용하였다.

질소의 습식분석방법은 NIRS를 이용하여 측정한 시료를 90°C에서 2시간 70°C에서 24시간 건조하여 사용하였는데, 황산으로 습식분해한 후 micro-kiel Dahl법으로 측정하였다. 수분함량은 건조중량법, SPAD값은 minolta 502(Japan) model을 이용하여 측정하였다.

**결과 및 고찰**

분광분석법은 시료 내·외부의 상태에 따른 광학적 특성을 분석하여 농도를 비파괴적으로 분석하는 방법이다. 비파괴 분석은 시료의 추출, 여과, 회석, 시약의 반응, 가열 등의 조작이 필요하지 않으며, 측정된 시료는 무손상 상태로 회수가 가능하다(Clarke *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1991). 또한 동일 시료의 저장 및 가공 중의 변화상태를 관찰할 수 있고 시간이 절약되며 화학약품을 사용하지 않기 때문에 환경오염을 방지할 수 있는 장점이 있다.

근적외선분광광도계를 이용하여 균질화된 벼 시료의 전대역 파장(400~2500nm)에서 확산반사도(diffuse reflectance)를 구하고, 그 중 259개의 파장에서 반사도(Log 1/R)를 성분함량분석이 요구되는 검량식에 대입하여 벼 식물체의 생체잎에 대한 총질소 함량을 분석하였다.

벼 생체잎에 대한 흡광도를 Fig. 1에 나타내었다. 가시광선의 적색부위에서 흡광도의 피크와 차이가 크게 나타났으며, 근적외선 영역에서는 흡광도가 급격하게 감소하는 경향을 나타냈다. 가시광선의 적색부위에서 흡광도의 피크와 차이가 크게

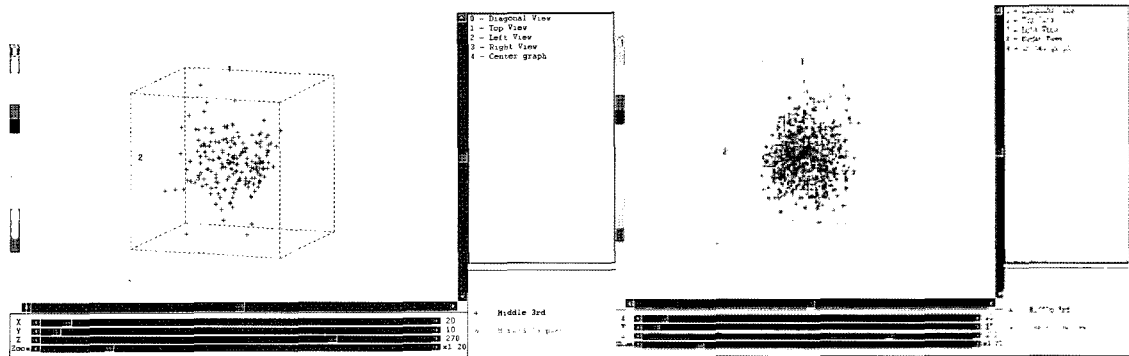


Fig. 1. Typical absorbance spectra of fresh rice leaf using NIRS.

나타난 결과는 벼 식물체의 표피색이 적색의 보색인 녹색인 원인이라고 생각된다.

벼 식물체에서 얻어진 스펙트럼을 이용하여 기본요소분석을 수행했다. 각 기본요소를 중심으로 거리를 구해 모집단을 해석해 본 결과 수집된 모집단의 시료 분포는 그림 2와 같은 3차원 도식을 얻을 수 있었다. 시료의 모집단을 구성하고 spectrum의 다양성을 설명하려면 많은 시료가 필요하다. 또한 올바른 시료로 calibration하는 것이 중요하다. 품종과 지역 변이의 검량식(calibration equation)이 완성된 후 다양성을 구성하기 위해 각 group의 file을 추가하여 검량식 model을 갱신한 결과 시료 모집단이 현저하게 다양해졌다(Fig. 2).

수집샘플의 질소함량 범위를 그림 3에서 살펴보면 질소함량이 품종간의 차이를 나타내고 있는데, 이러한 결과는 벼 품종간 질소흡수능력 차이에서 기인된 결과라고 생각된다. 객관적인 시료의 모집단을 구성하고 spectrum의 다양성을 설명하려면 많은 시료가 필요한데, 각 그룹별로 작성한 검량식은 merge 기능을 이용하기 전에 작성한 것으로 품종별로 구별되



1, 2, 3 - principle component element

Fig. 2. Three dimensional diagram of fresh rice leaf.

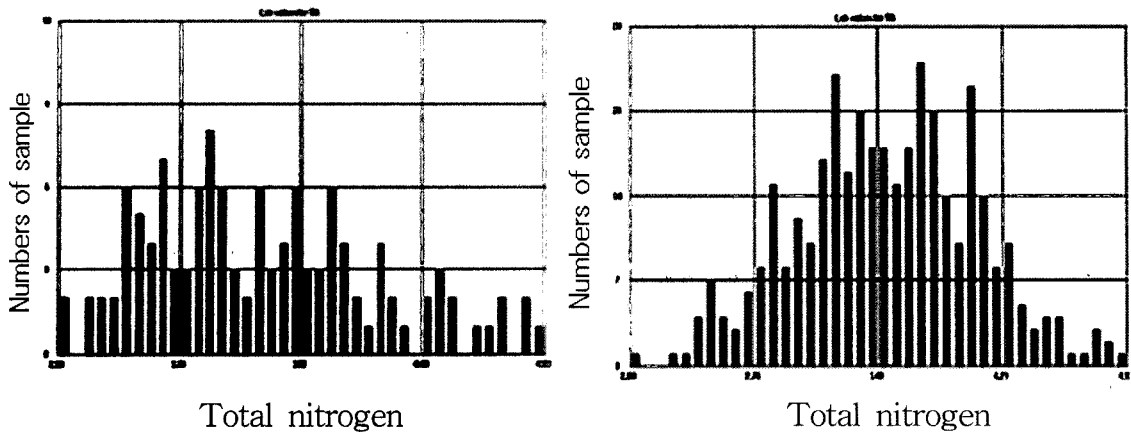


Fig. 3. The ranges of the total nitrogen contents in the fresh rice leaf.

는 현상은 자연적인 결과라고 생각된다. 그러나 익산, 정읍, 부안지역의 시료를 merge 기능을 이용하여 합병한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 비교적 정규분포에 가까운 양상을 나타내고 있으며, Lee 등(2001)도 이와 같은 결과를 보고한 바 있다.

벼 생체엽의 질소함량 측정을 위해 검량식을 작성하여 검증한 결과 모든 시험지역에서 SEC, SECV, 1-VR값이 비슷하였다. 성분 예측 회귀모델에 대한 정밀도의 척도는 표준오차(SEC: standard error of calibration)와 결정계수( $r^2$ : coefficient of determination)로 나타났다. SEC는 작고  $r^2$ 는 1에 가까울수록 개발된 회귀모델의 정밀도가 높음을 의미한다.

회귀모델의 검정은 예측값의 표준오차(SEP; standard error of prediction), 결정계수, 회귀모델에 의한 예측값의 평균과 화학분석값의 평균과의 차이인 Bias로 나타났다. 검정의 척도인 SEP 및  $r^2$ 는 개발된 회귀모델의 SEC 및  $r^2$ 에 가까울수록, Bias는 0에 가까울수록 회귀모델이 정확함을 의미한다.

벼 생체엽 질소함량 검량식의  $r^2$ 는 익산지역이 0.878, 부안지역이 0.858, 정읍지역이 0.819를 나타냈다(Table 1). 이러한 결과는 Begona(1995) 등이 생체 싸이레지 실험에서 보고한 건물중, 조단백질, 조섬유에 비해서는 낮으나, 회분, 효소 소화

성 유기물, pH 등과는 비슷한 결과를 나타냈다. Antonio (1995) 등은 클로버와 라이그라스에서 생체 시료는 0.964~0.953을 보고하였으며, 건조시료는 0.988~0.972를 보고하였으며, 건조시료가 생체시료에 비해 0.02 정도 높은 결과를 나타냈다. 본 연구의 결과와 비교할 때 생체시료가 0.1 정도 낮게 나타났는데 이러한 결과는 향후 보완연구과제로 남는다. Berardo(1995) 등은 생체 사료종의 영양가 측정에서 0.85~0.98을 보고하였는데, 이러한 결과와 비교하면 본 연구에서 0.1 정도 낮게 나타났다. Dardenne(1995) 등은 생체 사료 분석에서 성분에 따라 0.78에서 0.98까지 보고하여 성분에 따라 큰 차이를 나타냈다. 익산지역에서 Outlier 3개를 제거한 후 검량식을 다시 작성한 결과  $r^2$ 가 0.896, 부안지역에서 2개를 제거한 후 검량식을 다시 작성한 결과 0.878, 정읍지역에서 4개를 제거한 후 검량식을 다시 작성한 결과 0.880로 각각 1.7, 2.0, 6.1%씩 향상되었다. 익산, 부안, 정읍지역의 시료를 이용하여 각각 검량식을 작성한 것에 비해 merge 기능을 이용하여 검량식을 합병하고, 이상치 7개를 제거한 후 검량식을 다시 작성한 결과 0.911로 정확도가 더욱 향상되었다. 또한 검량식을 작성하고 Outlier를 제거한 후에 예측값의 표준오차값과 검량식의 표준오차값이 향상되었다(Table 2). 이와 같은 결과는

Table 1. Calibration by partial least squares method in fresh rice leaves.

Region	Outlier treatment	Bias	Slope	S. D.	SEP	No. of Sample	$r^2$
Iksan	Before	-0.004	0.997	0.477	0.166	153	0.878
	After	0.000	1.000	0.471	0.152	150	0.896
Puan	Before	-0.011	1.01	0.491	0.184	103	0.858
	After	-0.000	1.00	0.484	0.168	101	0.878
Joungup	Before	0.004	0.953	0.473	0.202	120	0.819
	After	0.001	1.001	0.479	0.165	116	0.880
Total	Before	-0.001	0.976	0.522	0.174	376	0.889
	After	0.001	0.995	0.525	0.157	369	0.911

S.D. : standard deviations, SEP : standard error of prediction

Zhang(2004) 등의 사과 건조 잎과 생잎분석에서 PLS(부분최소제곱법)방법의 0.748~0.818을 보고한 결과에 비해서 높게 나타났으며, PCR(주성분분석법)방법의 0.640~0.864에 비해서 보다 높은 결과를 나타냈다.

**Table 2.** Calibration by partial least squares method in fresh rice leaf.

Region	Outlier treatment	SEP (C)	Means	SED(C) limit	AVE. global H	Bias limit
Iksan	Before	0.167	3.572	0.250	0.885	0.116
	After	0.152	3.583	0.250	0.997	0.116
Puan	Before	0.185	3.215	0.258	0.977	0.119
	After	0.169	3.229	0.258	0.977	0.119
Joungup	Before	0.202	3.751	0.268	1.033	0.124
	After	0.116	3.746	0.268	1.020	0.124
Total	Before	0.174	3.531	0.254	0.943	0.117
	After	0.157	3.531	0.254	0.938	0.117

SEP(C) : standard error of prediction(calibration)

수처리하는 일반적으로 시료에 조사된 빛의 산란효과를 일차적으로 보정 해주며, 회귀분석의 변수를 줄이고, 검량선을 안정하게 하는 필수적인 도구로서 시료를 전처리 해주는 효과와 크로마토그래프의 컬럼처럼 분리해 주는 효과를 발휘할 수 있다.

과장설정과 스펙트럼 전처리는 최적의 조건에 따라 변화시킬 수 있는 부분으로 자주 사용되는 1,4,4,1과 2,4,4,1 그리고 2,10,10,1을 실행했다(Table 3~5). 익산지역의 1차 미분 0.832, 2차 미분 0.855를 나타내 0.013의 차이를 보였다. 부안지역의 1차 미분 0.878, 2차 미분 0.805, 0.809를 나타내 0.073~0.069의 차이를 보였다. 정읍지역은 1차 미분 0.813, 2차 미분 0.833, 0.844를 나타내 0.02~0.031의 차이를 보였다. Total에서는 1차 미분 0.863, 2차 미분 0.865, 0.855를 나타내 0.002~0.008의 차이를 보였다.

미분법은 스펙트럼을 미분하여 흡수대의 변화를 강조함으로써 스펙트럼의 변화는 증폭되고, 동시에 변화만 보기 때문에 미분법으로 바탕선 변화가 제거된다.

**Table 3.** Results of validation test for determining total nitrogen content by partial least squares method in different rice groups(1-4-4-1).

Region	No. of Sample	Mean	Range	SEC	1-VR	SECV
Iksan	150	3.583	2.58~4.47	0.156	0.832	0.193
Puan	101	3.229	2.37~4.04	0.173	0.878	0.199
Joungup	116	3.748	2.91~4.80	0.170	0.813	0.206
Total	367	3.532	2.16~4.76	0.153	0.863	0.195

SEC : standard error of calibration, SECV : standard error of cross validation. 1-VR : 1-variance ratio

**Table 4.** Results of validation test for determining total nitrogen content by partial least squares method in different rice groups(2-4-4-1).

Region	No. of Sample	Mean	Max	SEC	1-VR	SECV
Iksan	148	3.581	4.986	0.143	0.855	0.178
Puan	102	3.223	4.683	0.169	0.805	0.214
Joungup	116	3.745	5.180	0.138	0.833	0.195
Total	366	3.533	5.084	0.150	0.865	0.190

**Table 5.** Results of validation test for determining total nitrogen content by partial least squares method in different rice groups(2-10-10-1).

Region	No. of Sample	Mean	Range	SEC	1-VR	SECV
Iksan	148	3.581	4.986	0.143	0.855	0.178
Puan	102	3.223	4.683	0.192	0.809	0.212
Joungup	115	3.739	5.164	0.159	0.844	0.187
Total	369	3.532	5.101	0.163	0.855	0.199

분광분석법 중 근적외분광분석법은 다른 비파괴검사법에 비하여 품질 평가의 시스템을 구성하기 쉽고, 분석시 숙련된 기술을 요하지 않으며, 결과의 해석이 간편할 뿐만 아니라 저비용으로 측정시스템을 구성할 수 있는 장점이 있다(Hymowitz *et al.*, 1974; Marten *et al* 1983; Rubenthaler & Bruinsma 1979; Shenk *et al* 1981).

Table 6은 벼 생체엽 질소함량의 분석방법별 차이이다. 습식 분석 평균값과 NIRS분석 평균값이 익산지역은 차이가 없었고 부안지역은 0.009%, 정읍지역은 0.004%, Total은 0.001%로 나타났으며, 전체적으로 0~0.009%의 차이로 매우 적은 변이 폭을 나타내었다. 이러한 결과는 NIRS분석값이 습식분석값과 같이 정확성이 높다는 것을 의미한다. 근적외선 영역에서의 스펙트럼은 유기분자의 광에너지 흡수에 의해 얻어지는데 이들 흡수대에서는 O-H, C-H, N-H, C=O 등의 관능기는 화학결합이 다양하게 나타나며 이를 응용함으로써 수분, 단백질, 전분, 지방 등 복수의 성분을 동시에 신속하게 측정할 수 있다(Abrams *et al.*, 1987; Clarke *et al.*, 1992). 질소와 수분의 검량식 정확도는 비교적 높은 편이나 SPAD값은 낮았고 변이의 폭도 크게 나타났다(Table 7).

근적외선에서는 흡광도의 변위가 화학적, 물리적 성질의 변

**Table 6.** Mean value of lab data and nirs data in fresh rice leaf .

Region	Lab	NIR	Different
Iksan	3.583	3.583	0.000
Puan	3.215	3.226	0.009
Joungup	3.751	3.747	0.004
Total	3.531	3.532	0.001

위에 비해 극히 미약하기 때문에 다양한 다변량 회귀분석법이 사용되고 있는데, MLR(다중선형회귀법) 방법은 보통 시료의 구성이 단순할 때 유용하며 측정성분이 독특한 흡수봉우리가 있을 때 장점이 있다. PLS(부분최소제곱법)방법으로 작성된 검량식은 흡수대들의 중첩으로 스펙트럼이 복잡하고 분석이 어려운 경우 많이 사용된다. MLR 방법과 PLS 방법을 비교한 결과 PLS 방법으로 작성된 검량식은 MLR 방법보다 좀더 정확도가 높은 경향이였다(Table 8).

NIRS의 분석방법은 시료의 추출, 여과, 회석, 시약의 반응, 가열 등의 조작이 필요하지 않으며, 측정된 시료는 무손상 상태로 회수가 가능한 장점이 있지만, 1차적인 실험실의 습식분

석값에 의존하여 분석하는 2차적인 방법이기 때문에 정확도가 무엇보다 중요하다고 생각한다. 그림 4는 검량식 작성시 질소 함량의 일반분석법에 의한 분석치(실측치)와 NIRS에서 도출해낸 분석치(미지 시료의 추정치)의 상관관을 나타낸 것이다. 결정계수값이 0.911을 나타냄으로서 실용 가능성을 나타내었다.

적 요

벼 영양진단에서 중요한 성분인 생체일의 질소함량을 NIRS를 이용하여 신속하고 정확하게 분석하기 위해 최적의 검량식 작성에 관한 일련의 시험을 실시한 결과는 다음과 같다.

벼 생체일 질소함량 검량식의 결정계수는 익산, 정읍, 부안 지역이 각각 0.879, 0.858, 0.819였다. Outlier를 제거한 후 검량식을 다시 작성한 결과 0.896, 0.878, 0.88%로 각각 0.017, 0.02, 0.061씩 향상되었다. Merge 기능을 이용하여 검량식을 합병한 후 검량식을 다시 작성한 결과 0.911로 정확도가 더욱 향상되었다. 벼 생체일의 질소함량 검량식에 의한 분석값과 습식분석 평균값의 차이는 0.001%를 나타냈다. 이와 같은 결과로서 건조와 분쇄과정을 생략하기 때문에 시료의 변질을 막을 수 있고 시간과 비용을 줄일 수 있는 벼 생체일의 질소농도 측정이 근적외분석기술에 의해 가능할 것으로 판단되었다.

Table 7. Ingredient verification of fresh rice leaf calibration.

Chemicals	No. of Sample	Mean	Range	SEC	SECV	1-VR
TN	150	3.583	2.58~4.47	0.156	0.193	0.832
Moisture	529	71.14	79.03	1.154	1.211	0.788
SPAD	534	38.27	46.91	2.217	2.291	0.368

SEC : standard error of calibration, SECV : standard error of cross validation. 1-VR : 1-variance ratio

Table 8. Difference by methods of nitrogen content calibration in fresh rice leaf.

Region	Calibration	No. of Sample	SEC	R <sup>2</sup>
Iksan	PLS	153	0.156	0.878
	MLR	153	0.254	0.715
Puan	PLS	103	0.173	0.858
	MLR	103	0.275	0.686
Joungup	PLS	120	0.170	0.819
	MLR	120	0.288	0.630
Total	PLS	376	0.153	0.889
	MLR	376	0.315	0.636

인용문헌

Abrams, S. M., J. S. Shenk, M. O. Westerhaus, and F. E. Barton. 1987. Determination of forage quality by near infrared reflectance spectroscopy : Efficiency of broad-based calibration equations. J. Dairy Sci. 70: 806-813.

Berardo, N., C. Cunico, A. Tava, and M. Odoardi. 1995. Broad calibration for measuring nutritive value of fresh forage species. Leaping ahead with near infrared spectroscopy. 231-234.

Blanco, A., D. Alomar, and R. Fuchslocher. 1995. Prediction by near infrared spectroscopy of the content of white clover(*Trifolium repens*) and perennial ryegrass(*Lolium perenne*) in fresh or dry mixtures made up from pure botanical samples. Proceedings of the 10th international conference. 299-302.

Clarke, M. A., E. R. Arias, and C. McDonald-Lewis. 1992. Near infrared analysis in the sugarcane factory. Sugary Azucar. pres. at Rus-pam Commun. Inc. USA.

Dardenne, P., R. Agneessens. and G. Sinnaeve. 1995. Fresh forage analysis by near infrared spectroscopy. Near infrared spectroscopy : The future waves. 531-536.

De La Roza, B., A. Martinez, S. Modrono, and B. Santos. 1995. Determination of the quality of fresh silages by near infrared reflectance spectroscopy. Near infrared spectroscopy: The future waves. 537-541.

Hymowitz, T., J. W. Dudley, F. I. Collins, and C. M. Brown. 1974. Estimation of protein and oil concentration in corn, soybean, and oat seed by near infrared light reflectance. Crop Sci. 14: 713-715.

Lee, H. B., B. R. Choi, C. S. Kang, Y. H. Kim, and Y. J. Choi. 2001.

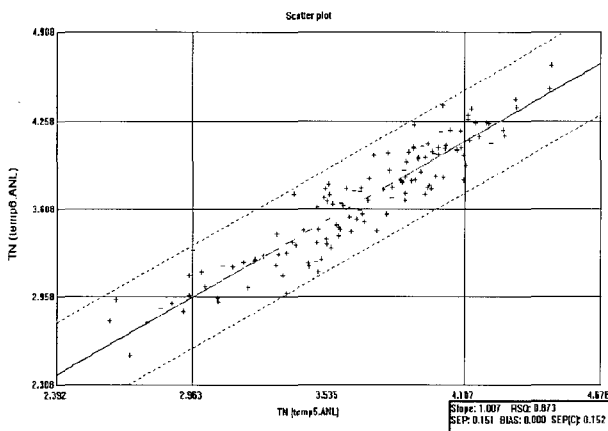


Fig. 4. Correlation between lab data and NIRS measurements for fresh rice leaf of total nitrogen.

- Determination of seed protein and oil concentration in kidney bean by near infrared spectroscopic analysis. *Korean J. Crop Sci.* 46: 248-252.
- Marten, G. C., J. L. Halgerson, and J. H. Cherney. 1983. Quality prediction of small grain forage by near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Sci.* 23: 94-96.
- Park, K. H., C. H. Pyun, and J. P. Han. 2004. Development of a digital chlorophyll meter II. Manufacturing of digital chlorophyll meter. *Korean J. Crop Sci.* 49: 198-199.
- Rubenthaler, G. L. and B. L. Bruinsma. 1979. Lysine estimation in cereals by near infrared reflectance. *Crop Sci.* 19: 1039-1042.
- Shenk, J. S., I. Landa, M. R. Hoover, and H. O. Westerhaus. 1981. Description and evaluation of a near infrared reflectance spectrometer for forage and grain analysis. *Crop Sci.* 21: 355-358.
- Williams, P. C., H. M. Corderiro, and M. F. T. Hamden. 1991. Analysis of oat bran products by near infrared reflectance spectroscopy. *Cereal Foods World.* 36: 571-574.
- Zhang, G. C., S. H. Seo, Y. B. Kang, X. R. Han, and W. C. Park. 2004. Determination of nitrogen in fresh and dry leaf of apple by near infrared technology. *Korean Soc. of Soil Science and Fertilizer.* 37: 259-265.