

## 라만분광을 이용한 오이 종자의 발아예측

모창연<sup>1</sup> · 강석원<sup>1\*</sup> · 이강진<sup>1</sup> · 김기영<sup>1</sup> · 조병관<sup>2</sup> · 임종국<sup>1</sup> · 이호선<sup>1</sup> · 박종률<sup>1</sup><sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원, <sup>2</sup>충남대학교 바이오시스템기계공학과Germination Prediction of Cucumber (*cucumis sativus*)  
Seed using Raman SpectroscopyChangyeun Mo<sup>1</sup>, Sukwon Kang<sup>1\*</sup>, Kangjin Lee<sup>1</sup>, Giyoung Kim<sup>1</sup>, Byoung-Kwan Cho<sup>2</sup>,  
Jong-Guk Lim<sup>1</sup>, Ho-Sun Lee<sup>1</sup>, Jongryul Park<sup>1</sup><sup>1</sup>National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon, Korea<sup>2</sup>Department of Biosystems Machinery Engineering, Chungnam National University, Daejeon, KoreaReceived: November 5<sup>th</sup>, 2012; Revised: December 10<sup>th</sup>, 2012; Accepted: December 17<sup>th</sup> 2012

## Abstract

**Purpose:** The objective of this research was to select high quality cucumber (*cucumis sativus*) seed by classifying into viable or non-viable one using Raman spectroscopy. **Method:** Both transmission and back-scattering Raman spectra of viable and non-viable seeds in the range from 150 cm<sup>-1</sup> to 1890 cm<sup>-1</sup> were collected with a laser illumination. **Results:** The Raman spectra of cucumber seed showed Raman peaks with features of polyunsaturated fatty acids. The partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) to predict viable seeds was developed with measured transmission and backscattering spectra with Raman spectroscopy and germination test results. Various types of spectra pretreatment were investigated to develop the classification models. The results of developed PLS-DA models using the transmission spectra with mean normalization or range normalization, and back-scattering spectra with mean normalization treatment or baseline correction showed 100% discrimination accuracy. **Conclusions:** These results showed that Raman spectroscopy technologies can be used to select the high quality cucumber seeds.

**Keywords:** Cucumber seed, Discrimination, Germination prediction, Raman, PLS-DA

## 서 론

종자는 동식물을 막론하고 생명의 근원이 되며, 농식품 산업에서도 시발점이 되는 중요한 자원이다. 특히 농업에서 파종, 생육, 수확 등으로 이어지는 모든 농작업에서 품질이 우수한 종자는 그 건전성으로 인하여 농업 노동력을 절감시키고, 불량 종자로 인한 손실을 줄일 수 있다.

대부분의 필수 영양소를 포함하고 있는 오이는 중요한 채소

작물 중 하나로서, 음식 원료 뿐만 아니라 미용 재료나 건강식품의 원료로 많은 양이 다양하게 소비되고 있다. 품질이 우수한 오이의 수확량을 높이기 위해서는 병이 없고 발아율이 높은 건전 종자를 선별하여 보급되어야 한다.

현재 건전 종자의 선별은 무게, 비중, 충실도나 색상 등과 같은 외부 특성을 이용한 기술들이 사용되고 있다. 일정 기간 동안 발아하는 종자의 비율인 발아세 등 종자의 내부 품질을 측정하기 위하여 표준발아 발아검정법, 생화학적 측정방법이나 물리적인 측정방법이 이용되고 있다(ISTA, 2008). 내부품질 측정방법 중에서 발아검정방법은 8일~14일 정도로 장시간 소요되는 반면 테트라졸롤 검사 등의 생화학적 측정 방법과 전기전도율 검

\*Corresponding author: Sukwon Kang

Tel: +82-31-290-1903; Fax: +82-31-290-1900

E-mail: skang@korea.kr

사와 같은 물리적인 측정방법은 분석시간이 적게 소요되는 장점은 있으나 전문적인 기술과 많은 노동력이 요구되는 단점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 종자의 내부 품질을 간단하고 신속하게 판정할 수 있는 기술이 요구되고 있으며, 이를 위해 근적외선 분광법을 이용하여 종자의 성분측정이나 발아 여부 판별하는 연구들이 수행되었다(Min and Kang, 2003; Shetty et al., 2011).

라만 분광법은 특정한 단색 여기광을 시료에 조사하였을 때 분자의 진동수만큼의 차이가 있는 산란광이 생기는 현상을 이용하여 분자의 구조를 구하는 방법으로 전처리없이 비파괴적으로 신속하게 시료를 분석할 수 있어 미량 원소의 성분이나 내부 품질을 측정에 이용되고 있다. 이와 같은 특성 때문에 라만 분광기술은 유채 종자의 불포화지방산 측정이나 식물의 카로틴노이드 측정 등과 같이 종자의 품질 측정에 적용되고 있다(Reitzenstein et al., 2007; Schulz et al., 2005). 특히 표면측정범위를 확대시킨 광대역 라만 분광시스템은 기존의 라만 분광시스템보다 라만의 정량 분석 성능 및 재현성이 높고 시료 측정부의 레이저 광 강도가 저감되기 때문에 생체 시료가 손상받는 위험을 줄일 수 있다(Kim et al., 2006; Shin et al., 2012).

본 연구에서는  $150\text{ cm}^{-1} \sim 1890\text{ cm}^{-1}$  영역의 광대역 라만 분광법을 이용하여 발아능이 우수한 오이 종자를 선별하는 기술에 대한 연구를 수행하였다. 오이종자의 투과 라만스펙트럼과 역산란 라만스펙트럼의 분광특성을 구명하고 이를 이용하여 활력이 높은 우량 종자를 판별하기 위한 PLS-DA 판별 예측모델을 개발하였다.

## 재료 및 방법

### 가. 재료

공시재료는 2012년에 시중 종묘상에서 판매하고 있는 코팅 처리를 하지 않은 오이종자(*cucumis sativus*)를 구입하여 사용하였다. 종자의 노화에 따른 발아 특성을 확인하기 위하여 종자의 노화처리기간을 0일부터 18일까지 1일 단위로 증가시켜 총 19단계로 하였으며, 각 단계 별로 종자 20립씩을  $45^\circ\text{C}$ , 상대습도 96%의 항온항습챔버에 보관하여 인위적으로 노화를 촉진시켰다. 또한 종자의 발아 특성을 예측하기 위해 인위노화 처리를 하지 않은 종자와 18일간 인위노화 처리를 한 종자, 각 50립씩 총 100립의 종자를 사용하였다. 종자의 함수율이 인위노화 처리전과 동일하도록 인위노화처리 후  $22^\circ\text{C}$ 에서 24시간동안 건조하였다. 종자는 진공포장을 하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 보관하며 실험을 하였다. 이 종자를 이용하여 라만 분광 스펙트럼 측정과 발아검정 실험을 수행하였다.

### 나. 라만 분광 시스템 및 데이터 획득

종자의 라만스펙트럼을 수집하기 위해  $785\text{ nm}$ 인 다이오드 레이저(Invictus  $785\text{ nm NIR Laser}$ , Kaiser Optical Inc., MI, USA)와 이미지 스펙트로그래프와 전하결합소자 검출기(charged-coupled device, CCD) 등이 구비된 광대역 라만분광시스템(Raman Workstation DM2500P, Kaiser Optical Inc, MI, USA)을 사용하였다. 투과 라만스펙트럼은 레이저를 종자의 하부에서 조사하여 투과한 라만 신호를 측정하였고, 역산란 라만스펙트럼도 동일한 종자에 대해 레이저를 종자의 상부에서 조사하여 광원과 동일한 방향으로 나오는 라만 신호를 측정하였다. 투과 스펙트럼은 레이저를  $3\text{ mm}$  직경으로 시료에 조사하면서 노출시간과 누적횟수를 각각 2초와 15회로하여 측정하였고, 역산란 라만스펙트럼은 레이저 조사부 직경  $3\text{ mm}$ , 노출시간 2초, 누적횟수 50회로하여 측정하였다. 이때 레이저 광의 출력은  $225\text{ mW}$ 이었다. 스펙트럼은  $1890\text{ cm}^{-1}$ 에서  $150\text{ cm}^{-1}$ 까지 영역에서  $0.3\text{ cm}^{-1}$ 의 간격으로 측정하였다. 투과 및 역산란 라만스펙트럼은 100개의 오이종자에서 측정하여 총 100개의 스펙트럼을 획득하였다.  $785\text{ nm}$  레이저의 조사부위 직경과 오이종자의 조사위치에 따라 라만스펙트럼의 크기가 달라질 수 있기 때문에 본 연구에서는 오이종자의 중심에 레이저를 조사한 후 라만스펙트럼을 측정하였다. 이 때 조사부위의 레이저 직경은  $3\text{ mm}$ 로 하여 오이종자 중심에서 바깥부위까지 대부분이 포함될 수 있도록 하였다. 한편 Fig. 1은 오이종자에 10립에 대해 라만스펙트럼을 1시간 간격으로 3회 반복하여 측정한 결과로서, 3회 반복실험에서 스펙트럼의 변이를 관측할 수 없었기 때문에 이 실험에서는 시료의 위치에 따른 신호변화를 무시할 수 있었다.

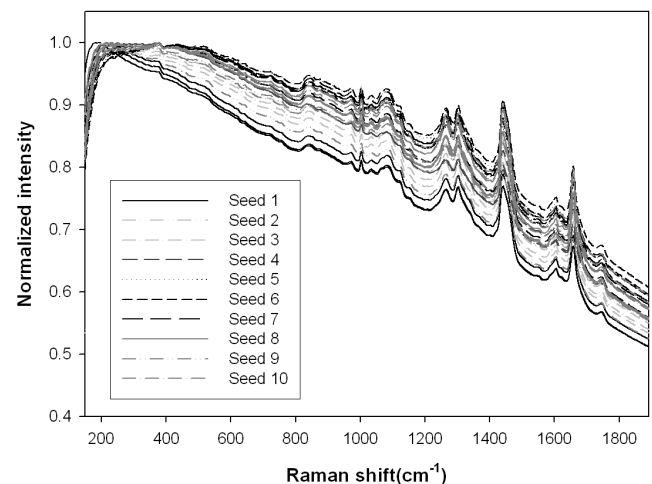


Figure 1. Back-scattering Raman spectra ( $150\text{ cm}^{-1} \sim 1890\text{ cm}^{-1}$ ) of ten cucumber seeds with maximum normalization treatment measured three times.

#### 다. 발아 검정 실험

종자의 라만스펙트럼을 측정된 후 개별종자들에 대한 우량 종자와 불량 종자를 판별하기 위해서 국제종자검정협회 규정에 의거하여 발아검정을 수행하였다(ISTA, 2008). 발아검정은 두 층의 종이사이에서 종자를 치상하는 간치식(between paper) 방법으로 수분이 공급된 여과지 위에 일정한 간격으로 종자 20립(5립 \* 4립)을 배치하고 이 여과지를 말아 세운 상태로 비닐용기에 담아 25°C, 65%RH 인 항온항습챔버의 중간 위치에 치상하였다. 발아검사는 치상후 8일간 조사하였으며, 유근이 1 mm 이상 나온 것을 발아한 것으로 판정하였다.

#### 라. 오이종자의 발아 예측

오이 종자의 투과 라만스펙트럼과 역산란 라만스펙트럼을 이용하여 부분최소제곱 판별분석법(Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA)을 적용하여 우량종자 예측모델을 개발하였고, 이 예측모델에 대한 판별 정확도를 구하였다. PLS-DA 판별예측모델 개발을 위해 전체 100개의 스펙트럼을 두 그룹으로 분류하였고, 이 중 70개 스펙트럼은 모델 개발용으로, 30개의 스펙트럼은 모델 검증용으로 무작위로 추출하여 그룹화하였다. PLS-DA 판별 모델은 종속변수를 판별하고자 하는 그룹들을 가상 변수로 지정한 값과 독립변수인 스펙트럼 데이터를 이용하여 회귀모델을 개발하였다(Alexandrakis et al., 2008). PLS-DA 모델을 개발하기 위해 활력이 높은 우량 종자의 스펙트럼은 가상변수 값을 '2'로 하고 활력이 없는 불량 종자의 스펙트럼은 가상변수 값을 '0'으로 지정하여 판별 모델을 개발하였으며, 미지의 스펙트럼 30개를 개발된 모델에 적용하여 종자의 활력이 있는지 여부를 예측하였다. 발아력이 우수한 오이 종자를 판별하기 위한 최적의 모델을 개발하기 위하여 투과 라만스펙트럼과 역산란 라만스펙트럼을 이용한 PLS-DA 모델들을 개발하여 비교하였다.

라만 분광스펙트럼은 시료에 가시광 영역의 레이저를 조사하면 레일리 산란이나 라만 산란 이외에 형광이나 발광 현상이 발생하기도 하며, 그 세기가 라만 산란에 비해 매우 강하고 측정영역도 비슷하여 라만스펙트럼 측정 시 형광이나 발광을 제거하는 스펙트럼 전처리가 필요하다. 본 연구에서는 라만스펙트럼의 형광 영향을 제거하기 위하여 5차 함수를 이용한 기준선 보정(Baseline Correction) 방법을 이용하였다(Chad and Anita, 2003). 또한, 광산란의 영향을 최소화하기 위하여 평균값 정규화, 최대값 정규화, 범위 정규화 방법을 사용하였고, 스펙트럼 측정할 때 변화되는 광원이나 온도 등의 조건들로 인한 스펙트럼의 기울기 변화를 보정하기 위하여 1차 미분(1st order Derivatives)과 2차 미분(2nd order Derivatives)의 전처리를 사용하였다. PLS-DA 예측모델은 교차검증법으로 개발하였으며, 예측모델의

정밀도는 검량모델의 결정계수( $R_c^2$ , Determination Coefficient of Calibration)와 검량표준오차(SEC, Standard Error of Calibration), 교차검증모델의 결정계수( $R_v^2$ , Determination Coefficient of Validation), 예측표준오차(SEP, Standard Error of Prediction)와 최적요인수(F, Number of Factors)로 각각 나타내었다.

획득된 스펙트럼 데이터의 전처리 중 5차 함수 기준선 보정은 MATLAB(version 7.0.4, The Mathworks, USA)를 이용하였으며, 나머지 스펙트럼 전처리와 모델 개발 및 검증은 데이터 분석 소프트웨어인 Unscrambler(version 9.2, Camo., Norway)를 이용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 가. 종자 발아검정 결과

Fig. 2는 오이종자의 인위노화처리 조건을 구명하기 위한 실험 결과로서, 우량종자 20립과 1일 단위로 18일동안 인위노화 처리한 종자 20립을 이용하여 발아 검정 시험을 2회 반복한 결과의 평균과 표준편차를 보여주고 있다. 종자의 발아율은 종자를 치상한 후 1일 간격으로 정상 발아된 종자의 수를 측정하여 계산하였다. 오이 종자에서 인위노화처리기간이 9일까지는 발아율이 85%이상 유지되었고 10일부터 발아율이 낮아지기 시작해 18일부터 활력을 상실하였고, 종자의 노화가 급격히 진행되는 10일차부터 종자가 발아되는 시기도 늦어짐을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 18일간 인위적으로 노화시킨 활력 없는 불량 종자 50립과 노화처리를 하지 않은 활력이 높은 우량 종자 50립을 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 오이 종자를 발아검정한 결과, 노화처리하지 않는 종자에서만 정상적으로 발아되어 49%의 발아율을 보였다.

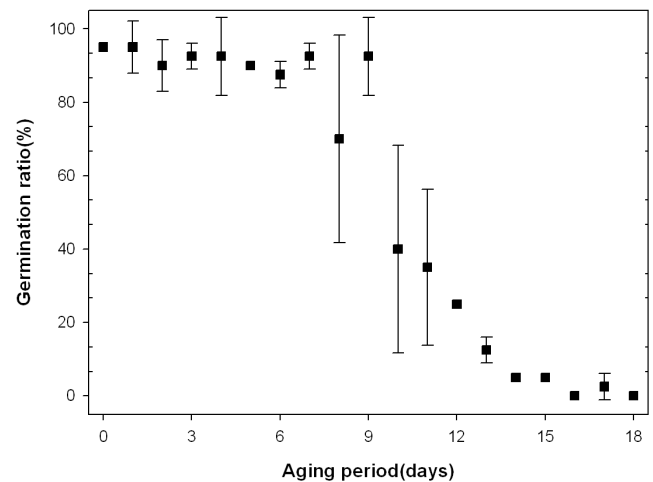


Figure 2. Change of germination ratio with aging period of cucumber seed.

#### 나. 오이종자의 라만 분광 특성

150 cm<sup>-1</sup> ~ 1890 cm<sup>-1</sup> 대역에서 우량 오이 종자를 판별하기 위해 활력이 있는 우량종자와 활력이 없는 불량종자의 투과 및 역산란 라만스펙트럼을 측정된 결과는 Fig. 3과 같이 오이 종자의 투과 및 역산란 라만스펙트럼 모두에서 우량 종자의 라만세기가 불량종자의 라만세기보다 더 크게 나타나 형광이 더 많이 발생하였다. 오이 종자의 투과 라만스펙트럼은 역산란 라만스펙트럼보다 형광은 작게 나타났고 라만피크들의 세기는 더 크게 나타났다.

Fig. 4와 Fig. 5는 150 cm<sup>-1</sup> ~ 1890 cm<sup>-1</sup> 영역에서 우량종자와 불량종자의 형광영향을 제거하기 위해 범위 정규화와 기준선 보정 기법을 적용한 투과 및 역산란 라만스펙트럼을 나타낸다. 범위 정규화 처리된 스펙트럼의 라만 피크는 전처리전의 스펙트럼보다 우량 종자와 불량 종자의 라만 피크 세기의 차이를 크게 하여 두 스펙트럼의 구분을 명확하게 할 수 있었다. Chad와 Anita(2003)가 제시한 방법대로 5차 함수식을 이용하여 기준선 보정을 100회 반복한 결과, 종자에서 발생하는 형광신호가 스펙트럼에서 제거되어 라만피크들이 명확하게 나타났다.

오이 종자의 라만스펙트럼에서는 전형적인 불포화지방산과 관련된 1263 cm<sup>-1</sup>, 1300 cm<sup>-1</sup>, 1441 cm<sup>-1</sup>, 1656 cm<sup>-1</sup>, 1748 cm<sup>-1</sup> 대역의 라만 피크들이 나타났으며, 이 피크들은 각각 (=CH-)의 면내 좌우흔들진동 모드, (=CH-)의 면내꼬임진동모드, (CH<sub>2</sub>)의 변형진동모드, (C=C)의 신축진동모드, 그리고 (C=O)의 신축진동모드와 관련이 있다(da Silva et al., 2008). 기준선 보정 처리된 스펙트럼에서 1263 cm<sup>-1</sup>, 1441 cm<sup>-1</sup>, 1656 cm<sup>-1</sup>, 1748 cm<sup>-1</sup>의 모든 라만피크에서 활력이 있는 우량종자가 활력이 없는 불량종자보다 피크가 더 낮게 나타나는 경향을 보여 종자가 노화되어 활력이 저하됨에 따라 지질이나 불포화지방산이 감소하는 특성을 보였다(Koostra & Harrington,

1969). 이 라만피크들을 이용하여 종자의 발아예측이 가능할 것으로 판단되었다.

#### 다. 투과 라만스펙트럼을 이용한 오이 종자의 발아 예측

150 cm<sup>-1</sup> ~ 1890 cm<sup>-1</sup> 대역에서 0.3 cm<sup>-1</sup> 간격으로 5801개의 파수를 측정된 투과 라만스펙트럼을 이용하여 활력이 있는 우량종자와 활력이 없는 불량종자를 판별할 수 있는 PLSR-DA 판별모델을 개발하였다. 오이종자에서 측정된 70개의 스펙트럼을 이용하여 PLS-DA 판별모델을 개발하였고, 30개의 미지 오이종자의 스펙트럼을 이용하여 판별모델을 검증하였다. 개발한 PLS-DA 모델의 정확도는 Fig. 6에 나타난 바와 같이 활력이 없는 불량종자의 스펙트럼 그룹과 활력이 있는 우량종자의 스펙트럼 그룹의 판별기준인 상수 값 '0' 과 '2'의 중간 값을 기준으

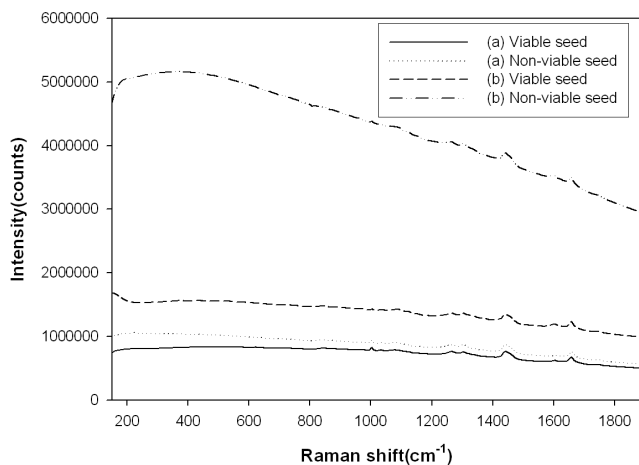


Figure 3. (a) Transmission and (b) back-scattering Raman spectra (150 cm<sup>-1</sup> ~ 1890 cm<sup>-1</sup>) of viable and non-viable cucumber seeds.

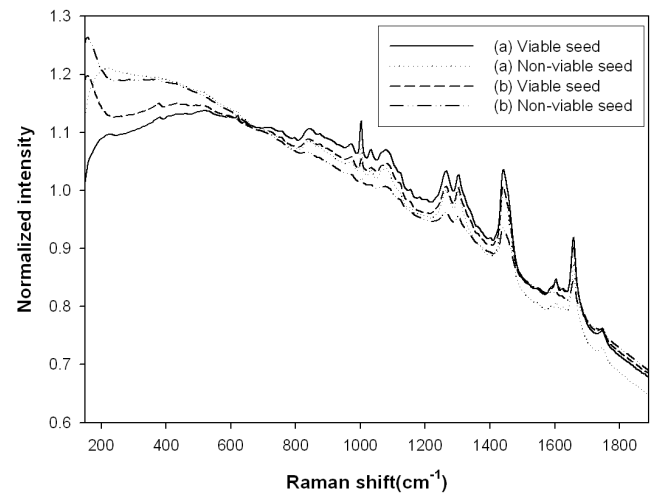


Figure 4. (a) Transmission and (b) back-scattering Raman spectra (150 cm<sup>-1</sup> ~ 1890 cm<sup>-1</sup>) of viable and non-viable cucumber seeds with mean normalization treatment.

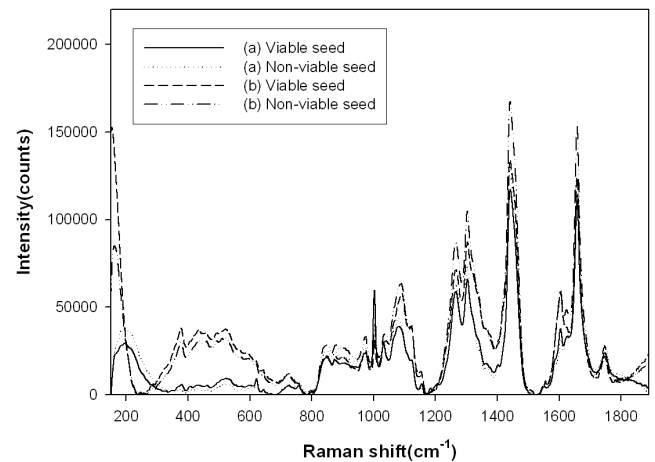
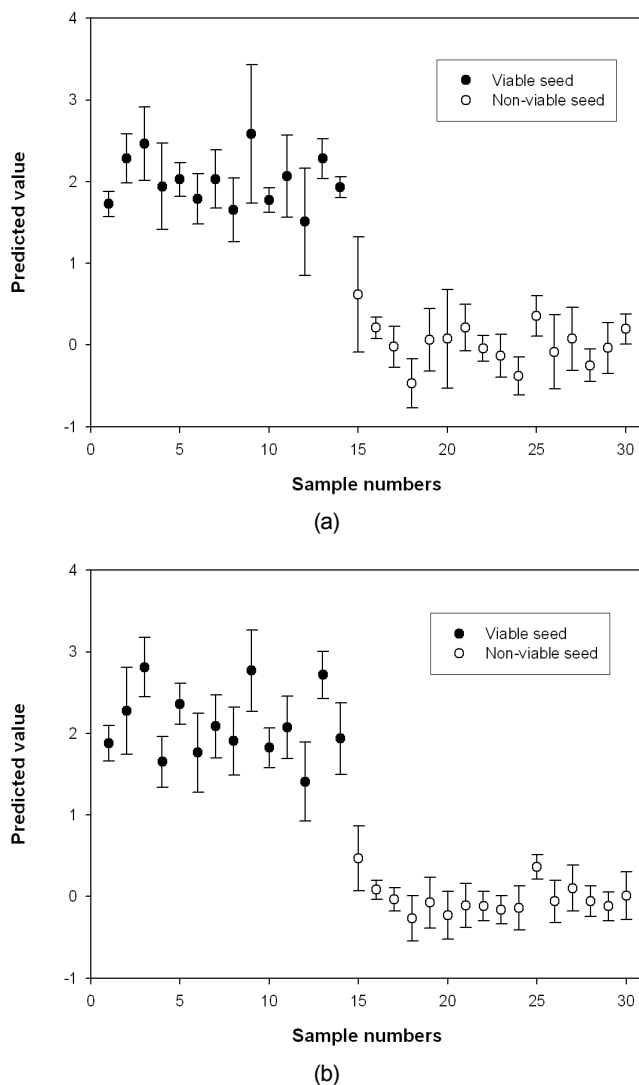


Figure 5. (a) Transmission and (b) back-scattering Raman spectra (150 cm<sup>-1</sup> ~ 1890 cm<sup>-1</sup>) of viable and non-viable cucumber seeds with fifth-order polynomial baseline correction.

**Table 1.** Comparison of PLS-DA models with pretreatments for classification of cucumber seed viability using transmission Raman spectroscopy in the range from 150  $\text{cm}^{-1}$  to 1890  $\text{cm}^{-1}$

Data Pretreatment	Calibration		Validation		F <sup>1)</sup>	Prediction		
	R <sub>c</sub> <sup>2</sup>	SEC	R <sub>v</sub> <sup>2</sup>	SEP		CCR <sup>2)</sup>		CV <sup>6)</sup>
						VS <sup>3)</sup>	NVS <sup>4)</sup>	
Non-Pretreatment	0.962	0.195	0.934	0.261	7	100.0%	93.8%	0.8
Baseline Correction <sup>6)</sup>	0.973	0.162	0.939	0.251	10	100.0%	93.8%	0.7
Mean Normalization	0.954	0.215	0.934	0.261	5	100.0%	100.0%	0.9
Maximum Normalization	0.954	0.214	0.931	0.267	6	100.0%	93.8%	0.8
Range Normalization	0.95	0.224	0.927	0.274	6	100.0%	100.0%	0.9
1st Derivative (gap 9.3 $\text{cm}^{-1}$ )	0.978	0.149	0.926	0.275	7	100.0%	93.8%	1.1
2nd Derivative (gap 15.3 $\text{cm}^{-1}$ )	0.938	0.249	0.818	0.432	5	100.0%	81.3%	1.2

1) F : Number of Factors, 2) Correct Classification Ratio, 3) VS : Viable Seed, 4) Non-Viable Seed, 5) CV : Classification Value, 6) Fifth-order polynomial baseline correction



**Figure 6.** PLS-DA prediction results for discrimination of viable and non-viable cucumber seeds by using transmission Raman spectra with (a) non-treatment and (b) mean normalization treatment.

로 예측값이 구분되기 때문에 오차가 포함된 예측값이 판별기준값보다 크면 우량 종자로, 판별기준값보다 작으면 불량 종자로 판단하였다. 우량 종자의 스펙트럼 예측값이 2에, 불량 종자의 스펙트럼 예측값이 0에 근접할수록 PLS-DA 예측 모델의 판별 성능이 우수하다고 볼 수 있다. 또한 예측모델들의 판별기준값은 최고의 판별정확도가 되도록 전처리방법에 따라 다르게 적용하였다. Table 1은 우량 종자와 불량 종자의 투과 라만스펙트럼을 다양한 전처리를 적용하여 개발한 PLS-DA 판별모델의 종자 발아예측 결과를 보여준다.

전처리를 하지 않은 투과 라만스펙트럼을 이용하여 개발한 PLS-DA 판별모델은 최적요인수가 7일 때, 결정계수( $R_c^2$ )와 예측오차(SEC)가 각각 0.962와 0.195로 나타났으며, 교차검증결과  $R_v^2$ 와 SEP가 각각 0.934와 0.261로 나타났다. Fig. 6a에 나타낸 바와 같이 이 예측모델을 이용하여 미지 시료에 대해 판별기준값을 0.8로 하여 발아여부를 예측한 결과, 활력이 있는 우량종자는 100%의 판별정확도를 보였지만, 활력이 없는 불량종자는 93.8%의 판별정확도를 보였다.

활력이 있는 우량 종자의 판별은 평균값 정규화, 최대값 정규화, 범위 정규화, 1차 미분과 2차 미분 전처리를 적용한 예측모델에서 100%의 정확도를 나타냈다. 활력이 없는 불량 종자의 판별은 평균값 정규화와 범위 정규화 전처리를 적용한 모델에서만 정확도가 100%로 나타났으며, 2차 미분을 적용한 모델에서는 정확도가 81.3%로 낮게 나타났다.

가장 높은 판별정확도를 가진 예측모델은 평균값 정규화와 범위 정규화 전처리를 적용한 경우로, 우량 종자와 불량 종자 모두 판별정확도가 100%로 나타났으며, 이때 판별기준값도 모두 0.9였다. 이중 평균값 정규화 전처리의 PLS-DA 판별모델의  $R_v^2$ , SEP는 각각 0.954, 0.261이었으며 미지 시료에 대한 종자의 우량성 예측결과는 Fig. 6b에 나타낸 바와 같다.

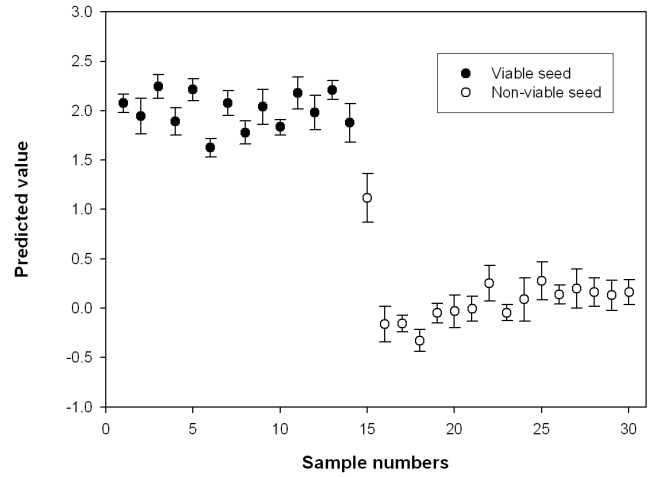
투과 라만스펙트럼을 이용한 우량 종자 판별용 PLS-DA 모델의 예측성능은 스펙트럼 전처리를 통해 판별정확도가 향상되었다.

**라. 역산란 라만스펙트럼을 이용한 오이 종자의 발아 예측**

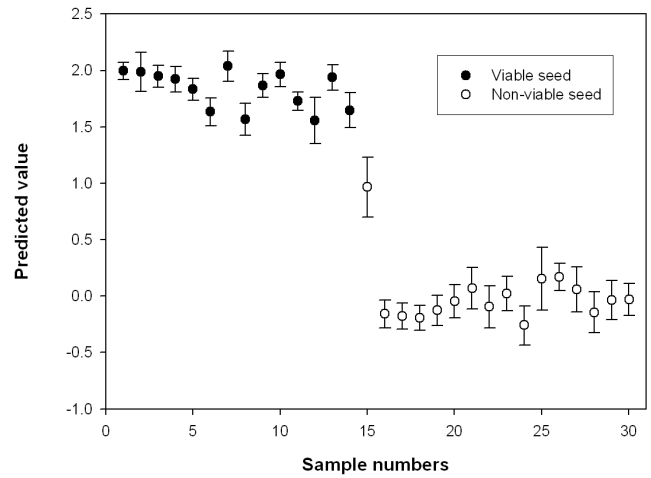
150 cm<sup>-1</sup> ~ 1890 cm<sup>-1</sup> 대역에서 0.3 cm<sup>-1</sup> 간격으로 역산란 라만스펙트럼을 이용하여 활력이 있는 우량 종자와 활력이 없는 불량종자를 판별하는 PLS-DA 예측모델을 개발하였다. 70 개의 오이종자 스펙트럼을 이용하여 PLS-DA 판별모델을 개발하였고, 30개의 미지 종자 스펙트럼을 이용하여 개발한 모델을 검증하였다. 다양한 전처리 기법을 적용하여 개발한 PLS-DA 판별모델의 결과는 Table 2와 같다.

전처리하지 않은 역산란 라만스펙트럼을 이용하여 PLS-DA 판별모델을 개발한 결과, 결정계수(R<sub>c</sub><sup>2</sup>)가 0.986, 예측오차(SEC)가 0.117로 나타났고, 이 모델을 교차검증한 결과 R<sub>v</sub><sup>2</sup>, SEP는 각각 0.978, 0.152였으며, 이때 최적요인수는 7이었다. 이 판별모델을 이용하여 우량 종자 여부를 예측한 결과, 활력이 있는 우량 종자와 활력이 없는 불량 종자의 판별정확도가 모두 100%였으며, 이때 판별기준값은 1이었다(Fig. 7a).

다양한 전처리 방법을 적용하여 개발한 예측모델들의 경우, 활력이 있는 우량 종자의 판별은 Baseline 보정, 평균값 정규화, 최대값 정규화, 범위 정규화, 1차 미분과 2차 미분을 적용한 모든 예측모델에서 100%의 판별정확도를 나타냈다. 활력이 없는 불량 종자의 판별에서는 평균값 정규화를 적용한 판별모델에서만 100%의 판별정확도를 보였으며, 나머지 모델에서는 판별정확도가 93.8%로 낮게 나타났다. 평균값 정규화와 기준선보정 전처리 모델이 가장 높은 판별정확도를 보였으며, 그 중 기준선보정 PLS-DA 모델의 R<sub>v</sub><sup>2</sup>는 0.980, SEP는 0.143이었으며, 판별기준값은 1.25이었다(Fig. 7b).



(a)



(b)

**Figure 7.** PLS-DA prediction results for discrimination of viable and non-viable cucumber seeds by using back-scattering Raman spectra with (a) non-treatment and (b) fifth order polynomial baseline correction.

**Table 2.** Comparison of PLS-DA models with pretreatments for classification of cucumber seed viability using back-scattering Raman spectroscopy in the range from 150 cm<sup>-1</sup> to 1890 cm<sup>-1</sup>

Data pretreatment	Calibration		Validation		F <sup>1)</sup>	Prediction		
	R <sub>c</sub> <sup>2</sup>	SEC	R <sub>v</sub> <sup>2</sup>	SEP		CCR <sup>2)</sup>		CV <sup>5)</sup>
						VS <sup>3)</sup>	NVS <sup>4)</sup>	
Non-Pretreatment	0.986	0.117	0.978	0.152	7	100.0%	100.0%	1
Baseline Correction <sup>6)</sup>	0.988	0.108	0.980	0.143	5	100.0%	100.0%	1.25
Mean Normalization	0.975	0.157	0.963	0.194	6	100.0%	100.0%	1.06
Maximum Normalization	0.971	0.169	0.957	0.209	6	100.0%	93.8%	1
Range Normalization	0.96	0.201	0.94	0.248	6	100.0%	93.8%	0.9
1st Derivative (gap 12.3 cm <sup>-1</sup> )	0.98	0.143	0.97	0.175	5	100.0%	93.8%	1
2nd Derivative (gap 12.3 cm <sup>-1</sup> )	0.977	0.153	0.955	0.215	3	100.0%	93.8%	0.75

1) F : Number of Factors, 2) Correct Classification Ratio, 3) VS : Viable Seed, 4) Non-Viable Seed, 5) CV : Classification Value, 6) Fifth-order polynomial baseline correction

전처리를 하지 않은 라만스펙트럼을 이용하여 건전종자 판별 모델을 개발한 결과 활력이 없는 불량 종자의 판별정확도는 역산란 라만스펙트럼의 PLS-DA 모델이 투과 라만스펙트럼의 PLS-DA 모델보다 높게 나타났으며, 이는 역산란 라만스펙트럼에서 활력이 있는 우량종자가 활력이 없는 불량종자의 라만피크의 세기가 더 크기 때문으로 판단된다(Fig. 3).

## 요약 및 결론

본 연구는 우수한 품질의 종자를 선별하기 위해  $150\text{ cm}^{-1} \sim 1890\text{ cm}^{-1}$  대역의 광대역 라만 분광법을 이용하여 오이 종자의 발아여부를 판별하는 기술을 개발할 목적으로 수행되었다. 활력이 있는 종자를 판별하기 위하여 오이종자의 투과 및 역산란 라만스펙트럼의 분광특성을 구명하고 이를 이용하여 PLS-DA 판별 예측모델을 개발하였다. 활력이 있는 우량 종자의 판별성능을 향상시키기 위해 라만 스펙트럼의 전처리 조건을 구명하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

- (1) 오이종자의 라만스펙트럼에서 불포화지방산 특성을 나타내는  $1263\text{ cm}^{-1}$ (=CH-),  $1300\text{ cm}^{-1}$ (=CH-),  $1441\text{ cm}^{-1}$ (CH<sub>2</sub>),  $1656\text{ cm}^{-1}$ (CH<sub>2</sub>),  $1748\text{ cm}^{-1}$ (C=C) 대역에서 라만 분광피크가 나타났으며, 종자의 활력이 저하됨에 따라 불포화지방산 관련 피크도 감소하는 특성을 보였다.
- (2) 투과 라만스펙트럼을 이용하여 PLS-DA 판별모델을 개발한 결과, 전처리를 적용하지 않은 경우에는 활력이 없는 불량종자의 판별정확도는 93.8%로 낮게 나타났지만, 평균값 정규화, 범위 정규화 전처리를 적용한 경우 활력이 있는 우량종자와 활력이 없는 불량종자에서 100% 판별정확도로 노화에 의해 활력이 없어진 종자의 선별이 가능함을 보여주었다.
- (3) 역산란 라만스펙트럼을 이용하여 개발한 PLS-DA 판별 모델은 스펙트럼 전처리를 적용하지 않은 경우와 평균값 정규화와 기준선보정 전처리를 적용한 경우에서 활력이 있는 우량 종자와 활력이 없는 불량 종자의 판별정확도가 100%로 나타나 활력이 있는 우량종자의 선별이 가능함을 보여주었다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ007427)의 지원에 의해 이루어진 것이다.

## References

- Alexandrakis, D., G. Downey and A.G.M. Scannell. 2008. Detection and identification of bacteria in an isolated system with near-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:3431-3437.
- Chad, A.L. and M.J. Anita. 2003. Automated method for subtraction of fluorescence from biological Raman spectra. *Applied Spectroscopy* 57:1363-1367.
- Da Silva, C.E., P. Vandenabeele, H.G. Edwards and L.F. de Oliveira. 2008. NIR-FT-Raman spectroscopic analytical characterization of the fruits, seeds, and phytotherapeutic oils from rosehips. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392(7):1489-1496.
- ISTA. 2008. International rules for seed testing. edition 2008. International Seed Testing Association.
- Kim, M., H. Chung, Y. Woo and M. Kemper. 2006. New reliable Raman collection system using the wide area illumination (WAI) scheme combined with the synchronous intensity correction standard for the analysis of pharmaceutical tablets. *Analytica Chimica Acta* 579:209-216.
- Koostra, P.T. and J.F. Harrington. 1969. Biochemical Effects of Age on Membranal Lipids of Cucumis-Sativus-D Seed. *The International Seed Testing Association* 34:329-340.
- Min, T.G. and W.S. Kang. 2003. Nondestructive separation of viable and non-viable gourd (*Lagenaria siceraria*) seeds using single seed near infrared reflectance spectroscopy. *Korean Society for Horticultural Science* 44:545-548.
- Reitzenstein, S., P. Rösch, M.A. Strehle, D. Berg, M. Baranska, H. Schulz, E. Rudloff and J. Popp. 2007. Nondestructive analysis of single rapeseeds by means of Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* 38(3):301-308.
- Schulz, H., M. Baranska and R. Baranski. 2005. Potential of NIR-FT-Raman Spectroscopy in Natural Carotenoid Analysis. *Biopolymers* 77(4):212-221.
- Shetty, N., T.G. Min, M.H. Olesen and B. Boelt. 2011. Optimal sample size for predicting viability of cabbage and radish seeds based on near infrared spectra of single seeds. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 19:451-461.
- Shin K., H. Chung and C.W. Kwak. 2012. Transmission Raman measurement directly through packed corn kernels to improve sample representation and accuracy of compositional analysis. *Analyst* 137:3690-3696.