

FT-NIR을 이용한 상추(*Lactuca sativa* L) 종자의 비파괴 선별 기술에 관한 연구

안치국¹ · 조병관^{1*} · 강점순² · 이강진³

¹충남대학교 바이오시스템기계공학과, ²부산대학교 원예생명과학과, ³농촌진흥청 국립농업과학원 농업공학부

Study on non-destructive sorting technique for lettuce(*Lactuca sativa* L) seed using fourier transform near-Infrared spectrometer

Chi-Kook Ahn¹, Byoung-Kwan Cho^{1*}, Jum-Soon Kang², Kang-Jin Lee³

¹Department of Biosystems Machinery Engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

²Department of Horticultural Bioscience, Pusan National University, Gyeongnam 627-702, Korea

³National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon-city, Gyeonggi-do 441-100, Korea

Received on 2 March 2012, revised on 15 March 2012, accepted on 23 March 2012

Abstract : Nondestructive evaluation of seed viability is one of the highly demanding technologies for seed production industry. Conventional seed sorting technologies, such as tetrazolium and standard germination test are destructive, time consuming, and labor intensive methods. Near infrared spectroscopy technique has shown good potential for nondestructive quality measurements for food and agricultural products. In this study, FT-NIR spectroscopy was used to classify normal and artificially aged lettuce seeds. The spectra with the range of 1100~2500 nm were scanned for lettuce seeds and analyzed using the principal component analysis(PCA) method. To classify viable seeds from nonviable seeds, a calibration modeling set was developed with a partial least square(PLS) method. The calibration model developed from PLS resulted in 98% classification accuracy with the Savitzky-Golay 1st derivative preprocessing method. The prediction accuracy for the test data set was 93% with the MSC(Multiplicative Scatter Correction) preprocessing method. The results show that FT-NIR has good potential for discriminating non-viable lettuce seeds from viable ones.

Key words : Lettuce Seed, Non-destructive test, FT-NIR, PLS, PCA

I. 서론

세계인구의 급속적인 증가와 함께 에너지 및 식량 문제는 앞으로 인류가 해결해야 할 중대한 과제가 되었다. 식량 생산 증대를 위해서는 가뭄, 고온 등 기후변화에 강하면서 생산성이 높은 종자 개발이 필수적이며 재배면적당 생산성을 높이기 위해서는 우량종자의 선별과 사용이 매우 중요하다.

우량종자 선별을 위해 기존 활용되는 기술로는 비중선별법과 무게로 선별하는 물리적 방법이 있으나 많은 노동력이 소요되며 정확한 선별을 기대하기 힘들다. 또한 Tetrazolium

test와 Standard germination test와 같은 화학적 방법이 있는데 이들 방법은 시간과 노동력 소모가 많고 파괴적이며 숙련된 전문기술이 필요하다. 최근 근적외선 분광분석법을 이용한 비파괴적 선별방법이 연구되고 있다. 근적외선 분광분석은 780~2500 nm의 파장영역에서 주로 C-H, N-H, O-H 등의 작용기를 가지는 물질을 정량, 정성 분석할 수 있어 농업뿐만 아니라 식품, 화학, 제약 등 다양한 분야에서 응용되고 있다. 최근 근적외선 분광분석을 이용한 우량종자 선별에 관한 연구가 시도되고 있는데, 비파괴적 측정으로 퇴화 및 공동에 의한 불량종자 등을 판별할 수 있다고 보고되었으며(Lestander 등, 2002), 박과 및 무종자의 활력도를 근적외선 분광으로 분석가능하다고 보고되고 있다(Min 등, 2003; Shetty 등, 2011).

*Corresponding author: Tel: +82-42-821-6715

E-mail address: chobk@cnu.ac.kr

기존 NIR측정 방법은 기계적인 회전으로 파장을 측정하기 때문에 파장의 정확성이 떨어지고 장치의 낮은 안정성으로 시료의 성상이 복잡한 경우 정밀한 분석이 어려운 문제가 있다. 본 연구에서 사용한 FT-NIR 측정방법은 이러한 기기 구조의 단점을 보완하기 위해 간섭계를 장착하고 여기에서 얻은 신호를 푸리에 변환함으로써 정확도 높은 스펙트럼을 얻고 기기내부에 He-Ne 레이저를 장착해 파장의 위치를 언제나 정확하게 컨트롤함으로써 측정의 정확도와 안정성을 개선한 방식이다.

본 연구에서는 FT-NIR Spectroscopy와 PLS 분석법을 이용하여 상추의 건전종자와 퇴화종자를 비파괴적으로 선별하는 기술을 개발하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시재료

본 연구에 사용한 종자는 H종묘사의 상추(열강적치마) 종자를 이용하였다. 퇴화처리하는 종자의 함수율을 20%로 조정된 후 진공 포장하여 45°C의 water bath에서 완전히 퇴화 할 때 까지 72시간 보관하였으며 종자들 간의 수분의 영향을 최소화하기 위해 incubator에서 20°C로 원래의 무게까지 건조하였다(Kang, 2008). 외부적으로 종피나 색, 모양 모두 건전종자와 퇴화종자 동일하였다. 준비된 시료를 FT-NIR spectroscopy에 의한 비파괴 측정과 발아력 검증 실험에 이용하였다.

2. FT-NIR spectroscopy 시스템 및 스펙트럼 측정과 전처리

Fig. 1은 본 연구에서 구축한 FT-NIR 장비(Antaris II,



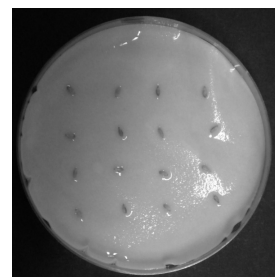
Fig. 1. FT-NIR spectroscopy.

Table 1. Specification of the FT-NIR spectroscopy.

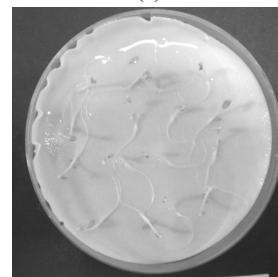
Detection	Hight-sensitivity, high-estability matched InGaAs
Instrument	Dimensions 40.6 cm (width) × 68.5 cm (depth) × 33 cm (height)
Weight	47.7 kg
Source	Halogen NIR source
Spectral Range	12,000 ~ 3,800 cm ⁻¹ (833~2,630 nm)
Resolution	4 cm ⁻¹ across spectral range (6 nm at 1,250 nm)

Thermo, USA)이다. 시스템의 세부정보는 Table 1과 같다. 시료는 건전종자 120립과 12h, 24h, 48h, 72h로 퇴화 처리한 각 120립씩 480립의 퇴화종자를 실험에 이용하였다. 총 측정된 상추종자는 600립이며 측정된 스펙트럼 범위는 1100 nm ~ 2400 nm이었고 해상도는 약 2.8 nm 였다. 스펙트럼은 연속적으로 32번 스캔한 평균값을 이용하였다.

스펙트럼 측정 시 포함된 외부의 영향 또는 분광기의 노이즈를 제거하여 데이터 분석 결과를 향상시키기 위해 측정된 스펙트럼에 전처리를 실시하였다. 고체 시료의 광 경로 및 광원의 변동 같은 광산란의 영향을 제거하기 위해 MSC(Multiplicative Scatter Correction), SNV(Standard Normal Variate) 전처리 방법을 사용하였으며 미소성분의 스펙트럼 특성을 강조하기 위해 Savitzky-Golay 1차, 2차 미분법 전처리 방법을 사용하였다.



(a)



(b)

Fig. 2. Seed viability test before (a) and after germination (b).

3. 발아력 실험

건전종자와 퇴화종자를 식별하기위해 국제종자검정협회(ISTA) 규정에 따라 발아실험을 시행하였다. Fig. 2와 같이 발아시험은 90×15 mm의 petri-dish에 filter paper(Whatman No.2) 2장을 겹쳐 증류수 10 mL를 관수 후 16립씩 20 °C 조건으로 항온항습기의 중간 위치에 치상하여 10일간 발아력 시험을 실시하였다. 일반적인 건전종자는 3일 이내에 발아가 끝나는 것으로 확인되었다.

4. 데이터 분석

측정된 상추종자의 스펙트럼을 전처리한 후 주성분분석(principal component analysis)을 이용하여 건전종자와 퇴화종자의 구분여부를 정성적으로 분석하였으며 총 600립의 상추종자의 스펙트럼 중 발아력실험 후 식별된 미지의 건전종자 117립과 퇴화종자 333립의 스펙트럼에 부분최소자승법(Partial Least Squares)을 적용하여 식별 모델을 개발하였다. 또한 개발된 모델의 검증을 위해 건전종자 39립과 퇴화종자 111립의 스펙트럼을 이용하여 정확도를 평가 하였다. 모든 스펙트럼 전처리 및 데이터 분석은 MATLAB(version 7.0.4, The Mathworks, Natick, MA, USA) 프로그램을 이용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 스펙트럼 분석

FT-NIR을 이용하여 측정된 스펙트럼 중 발아력시험을 통해 건전종자와 퇴화종자 스펙트럼을 분류하여 분석에 사

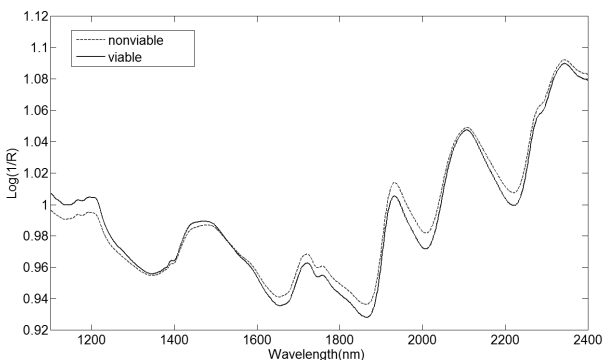


Fig. 3. Mean spectra of viable and non-viable of lettuce seeds.

용하였다. 건전종자와 퇴화종자의 평균 스펙트럼은 Fig. 3과 같다. 두 그룹의 스펙트럼이 비슷한 형태로 나타났으나 스펙트럼 중 1200 nm, 1700 nm, 2000 nm, 2200 nm 부근에서 다소 다른 양상을 보였다.

2. 발아력 실험 결과

건전종자와 퇴화종자의 스펙트럼 식별을 위해 실시한 발아력 실험 결과 Fig. 4와 같이 건전종자는 3일 이내에 발아가 발아율 98%로 완료되는 것을 확인 할 수 있었다. Fig. 4는 발아기간 동안 퇴화시간에 따른 발아율을 나타낸 것이다. 퇴화시간 24h 이후로 발아되는 종자가 확연히 줄어들었고 퇴화처리 후 발아가 진행 되더라도 발아시간이 길어짐을 확인 할 수 있었다.

3. PCA Analysis

실험에 사용된 총 600립의 상추 종자의 스펙트럼을 이용하여 주성분 분석을 수행하였다. 변환행렬의 고유치를 분석한 결과 PC1에서 PC4까지의 주성분만 사용하여 전체 99%까지 표현이 가능하였다. Fig. 5는 PC1부터 PC4까지의 파장별 weight 결과 그래프이다. 가중치는 각 파장의 선형결합으로 이루어지기 때문에 가중치가 높은 것은 해당 파장의 영향력이 크다는 것을 의미 한다. 이에 수분에 의한 영향으로 보여지는 1950 nm를 제외하고 스펙트럼의 변이에 주된 영향을 미치는 파장은 1215, 1440, 1725, 2310 nm 였다. 1215 nm의 파장대는 CH₃ 구조, 1725 nm와 2310 nm는 CH₂, 1440 nm는 CH 영향을 미치는 파장대로 모두 C-H 결합에 의한 CH, CH₂, CH₃ 화학적 작용기의 영향으로 판단 된다.(Chung 등, 2000) 배의 성장, 즉 발아를 억제하고 있

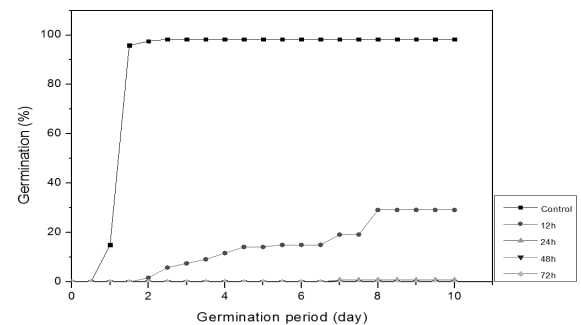


Fig. 4. Germination at different ageing treatment time during germination period.

는 것은 종피인데 특히 종피에 들어 있는 발아억제물질인 Abscisic acid(ABA)는 이러한 작용기로 구성되어 있으며 이는 상추 종자가 퇴화과정 등의 발아에 부적합한 환경 하에서 다른 성장조절 물질 및 환경조건 등에 연계되어 휴면 유발 및 유지에 영향을 주는 원인으로 알려져 있다 (Hwang 등, 2008; Dong 등, 2012). 이러한 발아억제 물질의 변형으로 건전종자와 퇴화종자의 스펙트럼 차이가 발생한다고 사료된다.

Fig. 6은 Savitzky-Golay 1차 미분한 데이터를 이용하여 전처리한 후 주성분 분석을 하고 주성분 요소 PC2, PC3을 이용하여 건전종자와 퇴화종자의 분리 성능을 보여준다. 하지만 PCA 방법이 높은 정확도의 분리성능은 보여주지 못했다.

4. PLS 모델 개발 및 성능평가

Table 2는 발아력실험 후 건전종자 117립과 퇴화종자

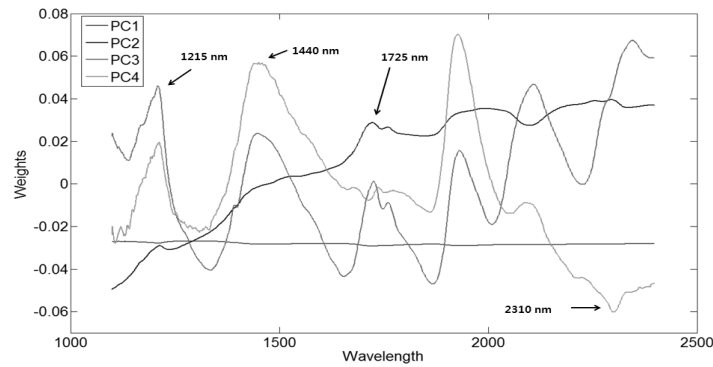


Fig. 5. PC weights for FT-NIR spectra of 600 lettuce seed samples in the range of 1000~2500 nm.

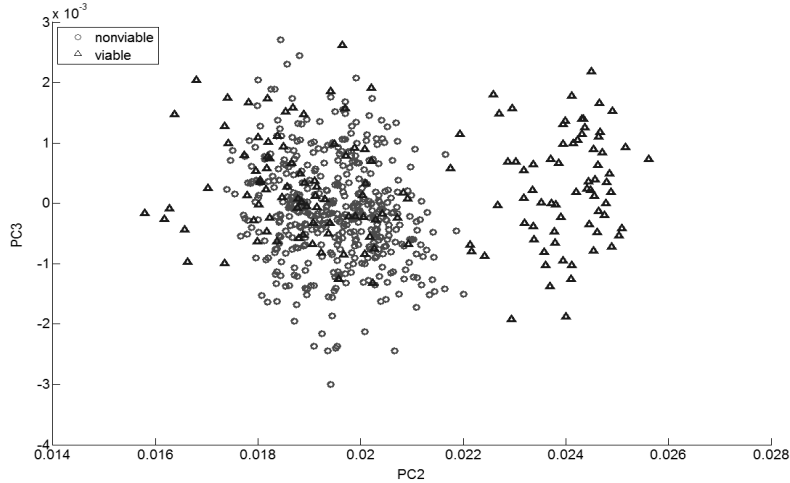


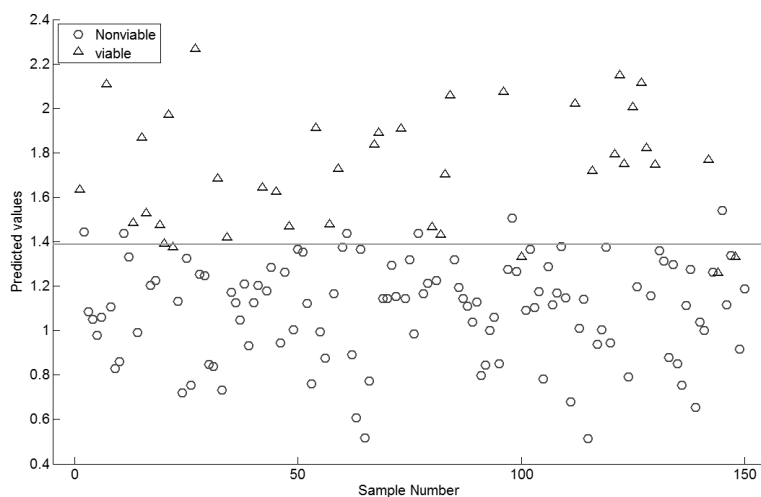
Fig. 6. Principle component score plot for lettuce seeds.

Table 2. Calibration results for PLS-DA models for viable and nonviable lettuce seeds with various preprocessing method.

Data set	Viable seed		Non-viable seed		Total		Accuracy(%)
	correct	wrong	correct	wrong	correct	wrong	
Raw	108	9	323	10	431	19	96
MSC	108	9	319	14	427	23	95
SNV	109	8	319	14	428	22	95
1st derivative	115	2	324	9	439	11	98
2st derivative	88	29	267	66	355	95	79

Table 3. Test results for PLS-DA models for viable and nonviable lettuce seeds with various preprocessing methods.

Data set	Viable seed		Non-viable seed		Total		Accuracy (%)
	correct	wrong	correct	wrong	correct	wrong	
Raw	33	6	104	7	137	13	91
MSC	35	4	105	6	140	10	93
SNV	33	6	102	9	135	15	90
1st derivative	33	6	91	20	124	26	83
2st derivative	19	20	69	42	88	62	59

**Fig. 7.** Classification results of viable and non-viable seed using PLS-DA model with MSC preprocessing.

333립의 스펙트럼을 이용해 개발된 PLS calibration의 결과를 보여준다.

결과에 따르면 raw data set의 구분 정확도가 96%로 나타났다으며 스펙트럼 전처리 중에는 MSC가 95%, SNV가 95%, 그리고 Savitzky-Golay 1차 미분과 2차 미분이 각각 98%, 79%의 정확도를 보였다. Savitzky-Golay 1차 미분 전처리 PLS-DA 모델이 가장 우수한 분류 정확도를 보였다.

Table 3은 건전종자 39립과 퇴화종자 111립 총 140립 상추종자의 스펙트럼을 이용하여 test set을 구성하여 분류 정확도를 계산한 결과이다. 두 그룹은 분리 후 각각 식별 가능하도록 퇴화종자는 1, 건전종자는 2로 설정하여 개발된 모델에 적용하여 정확도를 평가 하였다.(Woo 등, 1999) 결과에 따르면 raw data set은 91%, SNV 전처리를 사용했을 경우 90%의 정확도를 보였다. Calibration set에서 좋은 결과를 보였던 Savitzky-Golay 1차 미분한 전처리는 정확도가 높지 않았다. 스펙트럼 전처리 중 MSC 전처리를 사용했을 때 정확도가 93%로 건전종자와 퇴화종자 구분에 가장 우수하였다. Fig. 7은 MSC 전처리를 활용한 PLS-DA

의 분리 성능을 보여준다.

IV. 결론

본 연구에서는 FT-NIR spectroscopy를 이용하여 상추의 건전종자와 퇴화종자를 선별하였다. PC weights를 통해 주된 영향을 미치는 파장대는 CH, CH₂, CH₃ 화학적 작용기를 가진 발아억제물질인 Abscisic acid(ABA)의 변형과 관련되리라 사료된다. 건전종자와 퇴화종자 선별을 위해 개발한 PLS-DA calibration 모델은 raw data set이 96%의 분류 정확도를 보였으며 스펙트럼 전처리 중 MSC는 95%, SNV는 95%, Savitzky-Golay 1차 미분과 2차 미분은 각각 98%, 79%의 정확도로 Savitzky-Golay 1차 미분 처리한 결과가 가장 정확도가 높았다. 개발된 모델의 검증 결과, MSC 스펙트럼 전처리를 이용했을 때가 93%의 정확도로 건전종자와 퇴화종자를 선별하는 가장 우수한 모델임을 보였다. 본 연구의 결과는 FT-NIR을 이용한 종자 선별이 가능함을 보여준다.

감사의 글

본 논문은 농림수산식품부기술기획평가원에서 주관하는 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

참고 문헌

- Chung HI, Kim HJ. 2000. Near-infrared spectroscopy : Principles. *Journal of Korean Analytical Science & Technology* 13(1): 1A-14A. [in Korean]
- Hwang HJ, Lee JM, Kim SY, Choi GW. 2008. Seed Germination in lettuce affected by light quality and plant growth regulators. *Journal of Bio-Environment Control* 17(1): 51-59.
- Kang WS. 2008. Nondestructive determination of seed viability by optical methods. Ph.D. Dissertation, Daegu Univ. Daegu, Korea.
- Lestander TA, Oden PC. 2002. Separation of viable and non-viable filled scots pine seeds by differentiating between drying rates using single seed near infrared transmittance spectroscopy. *Journal of Seed Science and Technology* 30: 383-392.
- Min TG, Kang WS. 2003. Nondestructive separation of viable and non-viable gourd seeds using single seed near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Korean Horticultural Science and Technology* 44(5): 545-548.
- Shetty N, Min TG, Olesen MH, Boelt B. 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 (6): 451-461.
- Dong T, Tong J, Xiao L, Cheng H, Song S. 2012. Nitrate, abscisic acid and gibberellin interactions on the thermoinhibition of lettuce seed germination. *Journal of Plant Growth Regulation* 66: 191-202.
- Woo YA, Kim HJ, Chung Hi. 1999. Classification of cultivation area of ginseng radix with NIR and Raman spectroscopy. *Journal of Analyst* 124: 1223-1226.