

Review



CrossMark

Open Access

분광분석법을 이용한 형질전환 작물 판별 기술 현황

손수인^{1*}, 오영주², 조우석¹, 조윤성¹, 신은경¹, 강현중¹

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부 생물안전성과, ²(주)미래환경생태연구소

Current Status of GM Crop Discrimination Technology Using Spectroscopy

Soo-In Sohn^{1*}, Young-Ju Oh², Woo-Suk Cho¹, Yoonsung Cho¹, Eun-Kyoung Shin¹, Hyeon-jung Kang¹ (¹Biosafety Division, National Institute of Agricultural Sciences, 370 Nongsaeangmyeong-ro, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do 54874, Republic of Korea, ²Institute for Future Environmental Ecology Co., Ltd., 5 Palbok 1-gil, Deokjin-gu, Jeollabuk-do, 561-842, Republic of Korea)

Received: 3 September 2020/ Revised: 15 September 2020/ Accepted: 17 September 2020

Copyright © 2020 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Soo-In Sohn

<https://orcid.org/0000-0001-8819-7247>

Abstract

BACKGROUND: This paper describes the successful discrimination of GM crops from the respective wild type (WT) controls using spectroscopy and chemometric analysis. Despite the many benefits that GM crops, their development has raised concerns, particularly about their potential negative effects on food production and the environment. From this point of view, the introduction of GM crops into the market requires the development of rapid and accurate identification technologies to ensure consumer safety.

METHODS AND RESULTS: The development of a GM crop discrimination model using spectroscopy involved the pre-processing of the collected spectral information, the selection of a discriminant model, and the verification of errors. Examples of GM versus WT discrimination using spectroscopy are available for soybeans, tomatoes, corn, sugarcane, soybean oil, canola oil, rice, and wheat. Here, we found that not only discrimination but also cultivar grouping was possible.

CONCLUSION: Since for the determination of GM crop there is no pre-defined pre-processing method or calibration model, it is extremely important to select the appropriate ones to increase the accuracy in a case-by-case basis.

Key words: Calibration, Chemometrics, GM crop, Model, Spectroscopy, Pre-processing

서론

GM작물은 제초제저항성, 식물병 및 해충 내성 강화[1], 수확량 증대, 영양성분 개선[2] 등 많은 이점을 제공한다. 이로 인해 세계적으로 GM작물의 재배면적은 해마다 증가하고 있다. 그러나 이들이 식품 안전과 환경에 악영향을 미친다는 우려의 목소리도 높아지고 있다[3]. 따라서 GM작물의 시장 도입은 소비자 안전을 보장하기 위해 GM작물을 모니터링하고 확인할 수 있는 기술 개발을 필요로 한다. 현재 GM작물 존재 여부를 분석 또는 검출하기 위한 다양한 방법, 예를 들어 중합효소 연쇄 반응(PCR, Polymerase Chain Reaction) [4-6], 효소 결합 면역 흡착 분석(ELISA)[7,8], 바이오센서[9], 마이크로어레이[10-12], 전기영동[13], X-선 형광[14], 질량분석법[15] 등이 있다. DNA 또는 단백질에 기초한 이들 방법은 정량·정성적이고 또한 정밀하지만 전문성을 필요로 한다는 것과 소요 비용 및 시간이 많이 든다는 단점을 포함하고 있다. 여기에 단백질에 기초한 방법은 GMO 가공식품에서는 적합하지 않다[16]. 많은 상황에서, 환경이나 식품에서 GMO를 검출할 수 있는 판별기술은 빠르고, 쉽고 저비용이어야 한다.

분광법(spectroscopy)은 원자, 분자, 또는 이온에 의해 발생하는 전자기선(electromagnetic electroma)의 흡수, 방출,

*Corresponding author: Soo-In Sohn

Phone: +82-63-238-4712; Fax: +82-63-238-4704;

E-mail: sisohn@korea.kr

산란 현상을 이용하여 원자 및 분자의 정성·정량적 특성을 연구하는 방법을 말한다. 과거에는 주로 가시광선을 사용하여 파장별로 분리되는 스펙트럼을 사용하였으나 점차 자외선, 적외선, X-선, 마이크로파, 라디오파 등의 전자기파의 영역으로 그 범위가 넓어지고 이러한 스펙트럼을 측정하는 계측기를 포괄적으로 Spectroscopy라 부른다. 분광기술은 기존의 화학 분석 방법과 비교할 때 신속, 정확하고 비파괴적이라는 장점이 있다[16]. 이로 인해 분광법은 다양한 분야, 즉, 농업 [17-19], 식품[20], 환경[21], 그리고 생물·의학[22-24] 등의 광범위한 분야에서 사용되었다. 또한 분광학을 통해 유전적 변이(genetic variation)와 관련된 단백질 분자로부터 흡수 스펙트럼 정보를 수집하고 이를 유전병(genetic disorders)과 GMO(genetically modified crops) 분야에 적용하고 있다[25,26]. 본 리뷰에서는 근적외선(NIR) 분광법의 기초 원리, 분광 스펙트럼을 이용한 GM작물 판별 모델 개발과 검증 과정, 분광법을 적용한 GM작물 판별 사례, 그리고 앞으로의 전망에 대해 고찰해 보고자 한다.

근적외선 분광분석법

빛의 이론적 기술은 두 가지 방법으로 가능한데, 광양자의 흐름 또는 전자기파이다. 빛의 광양자의 흐름으로 나타나는 에너지량은 빛의 파장에 반비례하고 파장 빈도에 비례한다. 빛의 스펙트럼을 에너지 세기에 따라 배열할 수 있는데 가시광선의 적색선보다 파장이 더 긴 적외선은 가시광선이나 자외선에 비해 강한 열선작용을 가지고 있다[27]. 전체 적외선 영역은 700 nm에서 25,000 nm에 해당하며 그 중 근적외선 영역은 700-2,500 nm에 속하고 중적외선 영역은 2,500-25,000 nm로 구분된다. 적외선 분광분석법(Infrared Spectroscopy)은 가장 흔하게 사용되는 분광법이다. 이 방법은 빠르고, 정확하고, 쉬우며, 기체, 액체, 고체 상태의 시료를 위한 다양한 샘플링 기술을 제공한다. 중요한 것은 스펙트럼의 양적·질적 평가가 용이하다는 것이다. 적외선 스펙트럼의 특징은 화합물의 분자 구조와 직접적으로 관련되어 있다. 적외선 스펙트럼은 개개 화합물의 유일한 물리적 특징이며 이는 분자 지표(molecular fingerprint)이다[28].

근적외선 분광분석법(Near-Infrared Spectroscopy)은 가시광선이 가지는 파장대역(400~700 nm)을 넘어선 700-2,500 nm의 근적외선영역을 분석하는 것을 말한다. 1960년대 미국 농무성(USDA)의 Norris에 의해 농업분야에서 처음으로 실용화된 후 다양한 분야에서 널리 응용되고 있다. 근적외선에서의 흡수는 주로 중적외선에서 유래되는 -CH, -OH, -NH작용기 분자진동의 결합대(combination band)와 배음대(overtone band)에서 나타나게 된다. 근적외선에서는 중적외선에서 나타나는 물질의 정보가 나타나지만, 이 때의 흡수영역은 결합대와 배음대이기 때문에 파장의 중첩이 발생된다[29-32]. 이러한 특성 때문에 정량 및 정성 분석에 적용하기가 매우 어려워 근적외선에 관한 연구가 활발하지는 않았다. 그러나 1980년대 이후 chemometrics 검량기법과 컴퓨터의 발달로 인해 중첩된

스펙트럼을 분리해내고 해석할 수 있게 되어 다양한 성분 분석에 적용될 수 있었다. Chemometrics는 기존의 일반적인 회귀분석으로는 상관관계를 찾기 어려울 경우, 알고 있는 시료의 성분분석결과를 이용하여 시료의 스펙트럼 정보와의 상관관계를 만드는 방법이며 이에는 다변량분석 등 실험통계적 기법이 활용된다[33,34].

분광법을 이용한 판별모델 개발과 검증

VIS-NIR (Visible-Near Infrared) 스펙트럼은 화학적 구성성분의 농도와 분석산물의 물리적 특성에 의해 영향을 받는다. 그리고 후자의 특성이 스펙트럼간 변이의 대부분을 설명하는 반면 화학적 조성에 기인한 변이는 적은 것으로 간주된다[35]. Scatter effect를 줄이고 화학적 조성의 기여도를 높이기 위해 수학적 전처리를 하는 것이 필요하다[36]. 전처리 방법에는 평균, 최대값, 일정 범위의 값을 이용한 정규화(Normalization), MSC(Multiplicative scatter), SNV(Standard Normal Variate), 그리고 1차와 2차 미분 특성을 이용한 Savitzky-Golay 방법 등이 있다.

정규화는 데이터를 단일화하기 위해 평균, 최대 및 범위 값을 정규화하는 것을 포함한다. 모든 데이터는 0과 1사이의 값으로 조정 되어진다.

MSC는 고체 시료를 측정할 때 주로 사용한다. 고체시료는 특히 빛의 산란(Scattering)으로 스펙트럼에 많은 변화가 일어나는데 산란정도는 파장에 따라 다르며, 파장이 길수록 크게 영향을 받는다. 산란현상은 파장에 따라 일정하지 않아 바탕선의 이동, 기울기 변화, 그리고 심할 경우 곡선 형태의 바탕선도 발생한다[37]. MSC 방법은 스펙트럼 변화와 농도 간에 선형관계가 존재할 때만 사용되어야 하고, 시료들이 화학적으로 유사할 경우 좋은 결과를 얻을 수 있다.

SNV는 MSC와 같이 광산란 보정을 위한 전처리 방법으로 수학적 모형의 차이가 있다. 각 스펙트럼을 전체 스펙트럼의 표준편차로 정규화하여 광산란의 영향을 제거하는 방법으로, 광경로 및 광원 변동의 영향을 보정할 수 있다. MSC는 SNV보다 더 복잡하고 메모리를 소비하며 전체 스펙트럼 세트에 의존하는 반면 SNV는 각 스펙트럼을 개별적·독립적으로 처리한다. 일반적으로 두 방법 모두 대부분의 응용 분야에서 동일한 결과를 제공한다[38]. 다른 점은 MSC와 SNV는 작업 공간에서 다른 데이터 구조로 이어지며, SNV는 PCA score plot에서 더 많은 곡률(curvature)을 나타내고 MSC는 특이치(outlier)를 강조하는 경향이 더 높다[39]. 전처리는 매우 유용하지만 정보 손실과 노이즈 감소 사이에는 항상 상충 관계가 있다. 산란 효과를 제거할 때 chemical signal이 감소될 수 있다[40].

Savitzky-Golay derivatives[41]가 가장 많이 사용되는 전처리 방법이다. 이는 스펙트럼을 평활하게 하거나 데이터 필터링을 수행하는 데 도움이 된다[42]. 1차 및 2차 미분(derivatives)가 가장 일반적이며 정확도가 높은 결과를 제공한다. 1차 미분은 기준선 오프셋을 제거하고 2차 미분은 파장

에 걸쳐 선형적으로 변하는 신호 향을 수정한다[43].

주어진 스펙트럼에 대한 최적의 전처리는 신호 유형 즉, 투과율, 반사율, 시료 특성, 또는 최종 목표(보정 또는 식별)에 따라 다르다. 적절한 전처리 방법을 선택하기 위한 절대적 또는 일반적인 규칙은 없다. 일반적으로 경험에 따라 시행 착오 과정이 필요하다. 반사율 측정은 종종 MSC 또는 SNV와 같은 광 산란 효과를 줄이는 방법에서 유리하다. 전처리가 신호를 과도하게 매끄럽게 하면 예측 능력이 약화될 수 있으며, 새로운 시료 예측을 위한 모델 능력에 영향을 미친다.

NIR(near-infrared) calibration model은 무처리 또는 전처리된 스펙트럼을 샘플 세트의 하나 또는 그 이상의 화학적-물리적 특성과 연관시킨다. 대부분의 NIR 응용에서 잘 적용되는 것으로 입증된 여러 가지 calibration method 들이 있다.

Calibration을 수행할 때의 첫 번째 가정은 측정할 분석물 또는 측정될 속성과 Beer의 법칙(Beer's Law)에 따른 그들의 흡광도 사이의 선형 상관 관계이다. 다중 선형 회귀(Multiple Linear Regression, MLR), 주성분 회귀(Principal Component Regression, PCR) 및 부분 최소 제곱(Partial Least Squares, PLS)은 이 가정에서 작동하는 가장 잘 알려진 세 가지 calibration method이다.

MLR은 [44]에 의해 처음으로 도입되었다. 이 방법은 세 개 이상의 변수에 대한 이변량 회귀의 확장이다. NIR 데이터와 함께 MLR을 사용할 때의 한계 중 하나는 파장다중공선성(wavelength multicollinearity) 또는 변수 상호의존성(variable codependency)를 고려하지 않는다는 것이다. 이 방법은 약하게 또는 전혀 상관되지 않은 파장이 선택될 경우에만 적합하다. PCR과 PLS는 모두 파장 상관관계를 성공적으로 처리한다. PCR은 주성분 분석(PCA, principal component analysis) 방법의 직접적 적용이며, 일단 스펙트럼 데이터가 이차원 축(PCs)에 투영되면 투영된 데이터와 기준값(reference value) 간 최소 제곱에 의한 회귀 처리가 수행된다. Wold의 PLS도입은 PCR에 대한 대안이었다[45]. 두 방법 모두 새로운 차원의 공간에 투영된 데이터에 대해 회귀를 수행하지만 PLS 회귀에서 PCA와 유사한 프로세스에서 생성된 새로운 공간 좌표는 참조값 매트릭스의 정보를 고려하므로 PLS는 supervised regression 방법으로 분류된다. Calibration에 과도한 수의 변수가 포함되면 노이즈(noise)의 일부도 모델링되고 calibration은 calibration set에 매우 특이적이 된다. 이 현상은 과적합(overfitting)으로 알려져 있으며, 과도한 data smoothing으로 인해 향후 예측에서 모델 정확도가 감소한다. PLS는 일반적으로 PCR보다 정확도가 높지 않지만 최종 보정에서 더 적은 잠재 변수를 포함하여 달성된다[46-48]. 참조 데이터에 노이즈가 있고 모델 복잡성이 높을 때 과적합과 같은 단점이 있지만 알고리즘이 빠르고 모델의 정밀도가 높기 때문에 PLS가 선호된다[49].

인공 신경망 네트워크(Artificial Neural Networks, ANN)는 nonlinear calibration을 개발할 수 있는 방법이며 NIR 데이터에 적용할 수 있다. ANN은 인간의 신경계를 시

뮬레이션 함으로써 calibration set를 사용하여 스펙트럼과 참조값 사이에 존재할 수 있는 모든 관계를 학습한다. 인공 신경망은 뉴런(기본 단위) 또는 노드, 레이어 및 전달 함수로 구성된다. NIR 스펙트럼으로 작업할 때 입력 노드는 파장 또는 주성분이 되고 출력 노드는 예측값이 된다. 다른 노드는 숨겨진 레이어로 생성되어 모델의 복잡성과 비선형 관계를 모델링하는 능력이 향상된다. 노드는 연속 기능인 전송 기능으로 연결된다. 입력 노드 및 숨겨진 계층 노드의 수가 정의되면 학습 프로세스를 시작하기 위해 일반적으로 역전파(backpropagation)에 의해 학습된다. 역전파 알고리즘에 의한 훈련에서, 랜덤 가중치는 각각의 전달 함수에 할당되고 예측 에러에 따라 업데이트되며, 이는 순 요소(노드 및 전달 함수)를 통해 다시 전파된다. 이 프로세스는 여러 번 수행된다. 더 많은 노드와 전송 기능이 추가되면 복잡성이 증가한다. 이러한 이유로 ANN의 사용은 다른 calibration method 만큼 사용자에게 친숙하지 않다[50].

ANN에 대한 비교적 새롭고 보다 강력한 대안인 SVM(support vector machine)이 최근 비선형 NIR calibration을 위해 도입되었다. 복잡한 데이터는 커널(kernel) 또는 커널 함수(kernel function) 라는 매핑(mapping) 기능을 적용하여 보다 높은 차원의 공간에 매핑될 수 있다. 최적의 예측 능력을 위해 함수 정규화 및 커널 매개 변수와 같은 매개 변수를 선택해야 한다. 그러나 조정해야 할 매개 변수의 수는 ANN보다 훨씬 적다. SVM이 ANN에 비해 다른 장점은 필요한 샘플 수가 적고 로컬 최소값에 대한 저항이 있다는 점이다. SVM은 단일 최소값을 갖는 Lagrangian 함수를 사용하기 때문이다[51].

모델의 적절한 검증은 새로운 샘플을 예측하기 위한 모델의 적합성을 결정하는 중요한 단계이다. 이는 이전에 calibration에 사용되지 않은 분산된 샘플을 사용하여 최상의 유효성 검사를 수행해야 한다. 독립적인 검증이 항상 가능한 것은 아니기 때문에 교차 검증은 모델 정확도에 관한 기본 평가를 제공할 수 있다. 개발된 모델은 제외된 샘플로 검증되고 예측 값이 기록된다.

분광법을 이용한 GM작물 판별 기술 현황

분광법과 chemometric method를 이용한 성공적인 GM작물 판별 사례는 제초제 내성 GM작물, 숙성 지연을 통한 보관성 개선 안티센스 GM작물, GM식품 표시제에 따른 GM오일과 non-GM오일 검출, 복합형질을 가진 GM작물, RNAi 기법 이용 GM 작물 등에서 찾아볼 수 있다(Table 1).

제초제저항성 콩(*Glycine max* L.)인 RRS(Roundup Ready soybean) event GTS4 0-3-2는 미국에서 1994년에 식용, 사료용으로 승인되었고 1996년 이후 현재까지 상업적으로 이용되고 있다. RRS와 대조군 콩을 판별하기 위해서 FT-IR 분광(Fourier transform infrared spectroscopy) 기술이 사용되었다. FT-IR 분광법은 DNA concentration level에서 compounds를 판별하기에 충분히 정확하지는 않지만 유전적

Table 1. Calibration Model development for GMO discrimination using spectroscopy and chemometric analysis

GMO	Trait	Spectroscopy	Preprocessing Method	Model	Accuracy (%)	References	
GM Soybean	EPSPS	Glyphosate tolerant	FT-IR	-	PCA, KNN	-	Alcantara et al. (2010) [52]
			THz	SNV	LS-SVM	88.33	Liu et al. (2016) [53]
GM Tomato	Antisense <i>LeETR2</i>	Delaying of Ripening	Vis-NIR	MSC, 1 st and 2 nd derivative	PCA, DA, PLSDA	100 (PLSDA)	Xie et al. (2007) [54]
GM soybean oil	-	Eighty oil samples (GM/non-GM oil)	NIR	Mean centering /MSC	PCA, SVM-DA, PLSDA	100 (PLSDA, training set, GM)	Luna et al. (2013) [56]
GM canola oil	-	117 rapeseed oil from seven brands	NIR		PCA, DPLS	97.3 (DPLS, GM)	Zhu et al. (2010) [57]
GM Maize	<i>Bt EPSPS</i>	Insect-resistant Herbicide-resistant	NIR	WT, SNV, MSC	PCA, SVM, PLS-DA,	99.43 (PLS-DA)	Feng et al. (2017) [3]
GM Sugarcane	<i>Bt Bar</i>		Vis-NIR	Savitzky-Golay	MW-PCA-LDA method	99.1 (GM)	Guo et al. (2014) [60]
GM Rice	<i>cry1Ab/cry1Ac</i>	Insect-resistant	Vis-NIR	CDA	PCA PLSDA LS-SVM PCA-BPNN	100 (LS-SVM)	Lu et al. (2005) [61]
			NIRDRS	SNV MSC Savitzky-Golay 1 st Derivatives	SVN PLSDA	100	Hao et al. (2019) [80]
GM Wheat (RNAi)	<i>α-gliadin ω-gliadin</i>	Shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes	NIR	SNV/DT	DPLS	100	García-Molina et al. (2016) [81]

EPSPS, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase; PCA, Principal component analysis; KNN, k-Nearest Neighbor; PLSDA, partial least squares-discriminant analysis; MSC, Multiplicative scatter machine; MW-PCA-LDA(Moving-window-Principal component analysis-Linear discriminant analysis); CDA, canonical discriminant analysis; LS-SVM, least squares-support vector machine; PCA-BPNN, PCA-backpropagation neural network; NIRDRS, near-infrared diffuse reflectance spectroscopy

변형에 동반하는 구조적 변화에서 야기되는 스펙트럼의 차이는 측정 가능하다[52]. RRS콩과 3개의 다른 콩 품종을 FT-IR과 chemometric analysis로 조사하였을 때 유전적 변형에 따른 화학적 변이를 보여주었고 PCA(Principal components analysis)와 KNN(k-Nearest Neighbor) 모델의 적용으로 GM콩과 대조군 콩의 판별이 가능하였다. 이 방법은 품종을 판별하기에 충분하였고 GM과 non-GM간 판별을 위한 품종 의존성을 강조하였다. FT-IR 분광법 외에 THz (terahertz) 분광법을 사용하여 제조제저항성 GM콩, 대조군 콩, 그리고 두 콩 사이의 교잡종을 판별한 예가 있다[53]. THz 분광법은 일반적으로 0.1–10 THz (파장 30 μm–3 mm)의 주파수와 마이크로파와 적외선 사이의 대역을 가진 전자기파를 일컫으며, DNA 구성요소, 단백질 및 아미노산과 같은 대부분의 생물학적 분자는 THz 영역에서 지문 스펙트럼을 나타내는

것으로 보고되었다. 최근 이는 GM작물을 판별하는 강력한 접근 방식으로 부상하고 있다. 검증 그룹에서 SNV 전처리와 LS-SVM 모델을 적용하였을 때 제조제저항성 GM콩, 대조군 콩, 그리고 교잡종을 88.3%의 정확도로 판별하였다.

토마토(*Solanum lycopersicum* L.) 숙성을 지연시키기 위해 안티센스 에틸렌 수용체 유전자 *LeETR2*는 *Agrobacterium tumefaciens*를 통해 토마토에 도입되었다. VIS-NIR 분광법은 적절한 스펙트럼 데이터 전처리 후 다변량 분석과 결합되어 안티센스 *LeETR2* GM 토마토를 효율적으로 판별할 수 있음이 [54]의 연구로 증명되었다. 안티센스 *LeETR2*를 갖는 GM 토마토와 대조군 토마토가 VIS-NIR 확산 반사 모드에서 측정되었다. 이들의 분류는 derivative 스펙트럼 전처리 후 PLSDA(partial least-squares discriminant analysis)를 사용하였을 때 100%의 정확도를 나타내었다.

전세계적으로 GM식품의 표시제 시행을 위한 신뢰성 있는 GMO 검출 방법의 필요성이 대두되었다[55]. 근적외선 분광법은 GM오일과 non-GM오일 판별에 적용 가능하다는 것을 입증한 두 가지 사례가 있는데 GM 대두유와 카놀라유가 그것이다. 대두유 시료를 non-GM 및 GM으로 판별하기 위해 근적외선(NIR) 분광법 및 다변량 분류를 적용하였다[56]. PCA(Principal Component Analysis)를 적용하여 스펙트럼 데이터에서 관련 특징을 추출하고 특이치(outlier)를 제거하였다. 평균중심화(Mean centering)와 MSC(multiplicative scatter correction)처리 후 SVM-DA(Support Vectors Machine-Discriminant Analysis) 및 PLS-DA(Partial Least Squares-Discriminant Analysis)를 사용하여 최상의 결과를 얻었다. SVM-DA의 경우 각각 GM 대두유와 대조군 대두유에 대해 훈련 그룹(training group)의 경우 100%의 정확도를, 검증 그룹(validation group)의 경우 대조군 대두유는 100%, GM 대두유는 90%를 나타내었다. PLS-DA는 각각 대조유 및 GM 대두유에 대한 훈련 그룹에서 95%와 100%의 정확도를, 검증 그룹에서 각각 100%와 80%의 정확도를 나타내었다. 결과는 NIR 분광법이 대조군 대두유 및 GM 대두유를 구별하기 위한 빠르고 비파괴적이고 신뢰할 수 있는 방법을 제공할 수 있음을 입증하였다.

GM 및 대조군 카놀라유를 판별하기 위해 주성분 분석(PCA) 및 DPLS(discriminant partial least squares)를 적용하였다[57]. 대조군 및 GM 카놀라유는 주성분 요소 공간에서 구별될 수 있었다. 35개의 훈련 샘플이 DPLS 식별 모델을 구축하는데 사용되었고, 검증 세트 샘플로서 다른 82개의 샘플이 모델에 의해 식별되었다. 대조군 카놀라유의 정확한 식별률은 95.56%였고, GM 카놀라유는 97.30%였다. NIR을 사용하여 GM 카놀라유를 판별하려는 시도가 가능하며 DPLS 방법을 결합하여 높은 정확도를 나타냄을 확인하였다.

옥수수(*Zea mays* L.)는 세계에서 가장 중요한 농산물 중 하나이며 가축 사료의 핵심 성분으로 사용된다[58]. 최근 몇 년 동안 유전자 변형(GM) 작물 재배는 "stacked" events라고 하는 유전자 변형 육종에 의해 두 가지 이상의 농경학적 특성을 결합시키는 경향을 따르고 있다[59]. GM 옥수수 생산에서 최초의 stacked event는 제초제 내성 특성과 *Bacillus thuringiensis*(Bt)에 의해 부여된 endotoxin 유전자를 통한 해충저항성 특성을 포함하였다[59]. 옥수수 stacked event인 즉, cry1Ab/ cry2Aj-G10evo과 제초제저항성 유전자인 EPSPS를 포함하는 GM 옥수수 낱알과 대조군 옥수수의 낱알을 근적외선(NIR) 범위(874.41-1733.91 nm)에서 초분광 이미징을 사용하여 분광특성을 조사하였다[3]. Chemometric analysis와 결합된 hypercube data는 탐색 목적으로 PCA(Principal Component Analysis)를 적용하고, SVM(Support Vector Machine) 및 PLS-DA를 통해 GM옥수수 낱알과 대조되는 판별 모델을 확립하였고 GM과 non-GM 옥수수 낱알이 거의 100%의 정확도로 분류될 수 있음을 확인하였다. 이 연구는 또한 SVM 및 PLS-DA 모델이 CARS(competitive adaptive reweighted sampling method)에 의해

선택된 54개의 파장으로 정확도가 높아질 수 있고, 온라인 애플리케이션을 위한 분류 처리가 더욱 신속하게 이루어질 수 있음을 보여주었다. 마지막으로 GM 옥수수 낱알은 개별 초분광 이미지에서 각 픽셀의 특징을 예측함으로써 예측 맵에서 시각적으로 확인되었다.

사탕수수(*Saccharum officinarum* L.)는 전 세계 sugar production의 약 75%를 차지한다. 중국의 설탕 생산은 세계에서 3위를 차지한다. 설탕 정제 외에도 사탕수수는 종이와 연료 에탄올의 생산에도 사용된다. 사탕수수는 높은 온도와 습도 하에서 자라기 때문에 생물적 그리고 무생물적 스트레스, 해충들로 인한 생산성이 낮아질 수 있다. 생명공학기술의 발달로 해충저항성 그리고 제초제저항성 유전자를 사탕수수에 넣음으로써 사탕수수의 생산성, 저장성을 증가시키고 이의 가치를 더하였다. 생명공학기술을 이용한 사탕수수 분자유종에서 외래 유전자가 성공적으로 발현되는지 여부를 결정하는 것이 필요하고 NIR spectroscopy와 chemometrics를 병행한 비파괴적 NIR 분광법은 형질전환 사탕수수 육종 스크리닝을 위한 패턴인식 도구로서 상당한 가능성을 보여주었다[60]. 영양생장 단계에 있는 사탕수수 잎을 들판에서 수집했다. 이들은 *Bacillus thuringiensis*(Bt) 및 제초제 내성(*Bar*) 유전자 둘 다를 함유하는 GM과 대조군 사탕수수로 구성되었다. 스펙트럼 정보 수집 후 분석에서 MW-PCA-LDA (Moving-window-Principal component analysis-Linear discriminant analysis) 방법에 기초하여, 최적의 파장대는 768 nm 내지 822 nm, 최적의 PC 조합은 PC1-PC3, GM 및 대조군에 상응하는 검증 인식률은 각각 99.1% 및 98.0%를 얻었다.

벼(*Oryza sativa* L.)는 전 세계 인구의 거의 절반에게 기본적인 음식과 영양을 공급하는 세계에서 가장 중요한 곡물 중 하나이다[61]. 벼 유전자 변형은 곤충과 질병에 대한 저항력 향상을 포함하여 농업적으로 중요한 특성을 충족시키기 위해 지난 수십 년 동안 급속한 발전을 이루었고[62,63], 품질 개선[64] 및 영양가의 증가[65]를 위한 형질이 벼에 도입되었다. 최근, 곤충 저항성 *Bacillus thuringiensis*(Bt) 쌀이 개발되었으며, 앞으로 많은 아시아 국가의 주요 식품 공급원으로 상용화 될 예정이다. 다중 스펙트럼 이미징 분석은 비파괴적이고 간단하며 빠르며 샘플 전처리가 필요하지 않으므로 온라인 프로세스 모니터링 및 품질 관리에 더 적합하다[66,67]. 더 중요한 것은 이 기술은 품질 보증을 위해 여러 구성 요소를 동시에 측정 할 수 있다는 점이다. 최근에 이 기술은 오염 물질 탐지[68], 결합 식별[69], 성분 분석[65,70-73] 및 품질 평가[74,75]에 이용되어 왔다. 또한, 멀티 스펙트럼 이미징은 원래 벼의 병 및 질소 상태의 검출에 적용되었다[76-78]. 또한 최근에는 벼 잎의 엽록소 및 종자의 질소 함량을 추정하기 위한 강력한 접근 방법으로 등장했다[79]. Chemometric analysis와 결합된 PCA, PLS-DA(partial least squares discriminant analysis), LS-SVM(Least-squares Support vector machine) 및 PCA-BPNN(PCA-backpropagation neural network)방법을 적용하여 벼 종자를 그들의 유전적 기원에 따라 분류하였다. 결과는 대조군

벼 종자와 GM 벼 종자 사이의 명확한 차이가 비파괴적 방법으로 쉽게 시각화 될 수 있음을 보여 주었다. LS-SVM 모델의 경우 최대 100% 정확도를 달성하였다. 다양한 벼 품종의 구별과 GM벼(Bt63)/대조군 벼를 판별하기 위한 연구에서는 NIRDRS(Near-infrared diffuse reflectance spectroscopy)를 사용하였고, 전처리로 Savitzky-Golay 1차 미분과 SVM 모델을 적용하였을 때 벼 품종을 98.33%의 정확도로, 전처리와 모델 조합을 SNV-SVM, MSC/SVM, Savitzky-Golay 1차 미분-PLSDA로 결합하였을 때 100%의 정확도로 GM 벼와 대조군 벼를 판별하였다[80].

분광법은 RNAi 기법에 의해 만들어진 GM작물을 판별하는데도 적용할 수 있음이 증명되었다[81]. RNA 간섭(RNA interference)에 의해 얻어진 글리아딘 함량이 낮은 밀을 대조구 밀과 구별한 것이 그것이다. 전체 밀알 및 밀가루를 사용하여 판별 분석을 수행하였다. Foss-NIR Systems 6500 System II 기기를 사용하여 밀알과 밀가루로부터 스펙트럼을 수집하였고 판별 모델은 전체 스펙트럼 범위(400–2,500 nm)와 400–780 nm, 800–1,098 nm 및 1,100–2,500 nm 범위를 사용하여 개발한 후 PLS의 평균을 분석했다. 2013년과 2014년의 샘플을 사용하여 검증을 수행했으며 밀가루는 99%, 밀알은 96%의 정확도를 나타내었다. 이러한 발견은 더 나은 식이 구성 및 질병 발생률 감소를 달성하기 위해 셀리아병(Celiac disease) 환자를 위한 식료품의 개발 및 분석에 중요하다.

결과 및 고찰

분광법은 유기 화합물 식별, 정량, GMO 판별 등을 위한 빠른 해결책을 제시할 수 있다. 여기에 chemometrics와 모델 검증은 정확도를 높이는 핵심 요소이다. 분광법과 chemometrics를 통해 여러 유형의 GM 작물을 판별할 수 있음이 본 리뷰를 통해 기술되었다. 향후 분광법은 계측 기기의 발전과 이를 분석할 수 있는 calibration model의 기능 향상으로 응용 분야가 넓어질 것으로 예측된다. 시료 전처리가 필요하지 않은 분광법을 이용, GM작물 개발 과정 시 대량의 시료를 빠르게 분석할 수 있다면 GM작물 조기 실용화에 기여할 수 있을 것이다. 농산물 국경 통관 시 GMO 검역을 시행하고 있으나 시간과 비용문제로 극히 일부만을 표본 검사를 하고 있고 여기에 분광법을 이용한다면 대량의 시료를 대상으로 신속한 검사가 가능해 보다 강화된 GMO 검역이 가능할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 GM작물 비의도적 환경방출 대비 분광법을 이용한 GMO 판별기술이 개발된다면 현장에서 저비용으로 신속한 GM작물 판별이 가능하여 인력과 비용을 절감할 수 있으며 결과적으로 유출된 GM작물 제거에 소요되는 시간을 획기적으로 단축할 수 있을 것이다.

Note

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This study was carried out with the support of the Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ014943012020), National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

1. van Rensburg JBJ (2007) First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. *South African Journal of Plant and Soil*, 24(3), 147-151. <https://doi.org/10.1080/02571862.2007.10634798>.
2. Aluru M, Xu Y, Guo R, Wang Z, Li S, White W, Wang K, Rodermeil S (2008) Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *Journal of Experimental Botany*, 59(13), 3551-3562. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern212>.
3. Feng X, Zhao Y, Zhang C, Cheng P, He Y (2017) Discrimination of transgenic maize kernel using NIR hyperspectral imaging and multivariate data analysis. *Sensors*, 17(8), 1894. <https://doi.org/10.3390/s17081894>.
4. Hübner P, Studer E, Lüthy J (1999) Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. *Food Control*, 10(6), 353-358. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(99\)00074-2](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(99)00074-2).
5. Taverniers I, Van Bockstaele E, De Loose M (2004) Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: Different real-time duplex quantitative PCR methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(5), 1198-1207. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2372-5>.
6. Zimmermann A, Lüthy J, Pauli U (2000) Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie-Food Science and Technology*, 33(3), 210-216. <https://doi.org/10.1006/fstl.2000.0637>.
7. Brunnert HJ, Spener F, Borchers T (2001) PCR-ELISA for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified Roundup Ready soybeans. *European Food Research and Technology*, 213(4-5), 366-371. <https://doi.org/10.1007/s002170100371>.
8. Liu G, Su W, Xu Q, Long M, Zhou J, Song S (2004) Liquid-phase hybridization based PCR-ELISA for detection of genetically modified organisms in food. *Food Control*, 15(4), 303-306.

- [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(03\)00081-1](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00081-1).
9. Mannelli I, Minunni M, Tombelli S, Mascini M (2003) Bulk acoustic wave affinity biosensor for genetically modified organisms detection. *IEEE Sensors Journal*, 3(4), 369-375. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2003.815793>.
 10. Guiseppi-Elie A (2001) Biochip platforms for DNA diagnostics. *Biotechnology*, 12, 41-47.
 11. Leimanis S, Hernández M, Fernández S, Boyer F, Burns M, Bruderer S, Glouden T, Harris N, Kaeppli O et al. (2006) A microarray-based detection system for genetically modified(GM) food ingredients. *Plant Molecular Biology*, 61(1-2), 123-139. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-6173-4>.
 12. Wang J (2000) From DNA biosensors to gene chips. *Nucleic Acids Research*, 28(16), 3011-3016. <https://doi.org/10.1093/nar/28.16.3011>.
 13. Obeid PJ, Christopoulos TK, Ionnou PC (2004) Rapid analysis of genetically modified organisms by in-house developed capillary electrophoresis chip and laser-induced fluorescence system. *Electrophoresis*, 25(6), 922-930. <https://doi.org/10.1002/elps.200305772>.
 14. Jastrzębska A, Brudka B, Szumanski T, Szlyk E (2003) Determination of phosphorus in food samples by X-ray fluorescence spectrometry and standard spectrophotometric method. *Food Chemistry*, 83(3), 463-467. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00225-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00225-5).
 15. Redig P, Schmulling T, Van Onckelen H (1996) Analysis of cytokinin metabolism in ipt transgenic tobacco by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Plant Physiology*, 112(1), 141-148. <https://doi.org/10.1104/pp.112.1.141>.
 16. Chen J, Arnold MA, Small GW (2004) Comparison of combination and first overtone spectral regions for near-infrared calibration models for glucose and other biomolecules in aqueous solutions. *Analytical Chemistry*, 76(18), 5405-5413. <https://doi.org/10.1021/ac0498056>.
 17. Chen H, Pan T, Chen J, Lu Q (2011) Waveband selection for NIR spectroscopy analysis of soil organic matter based on SG smoothing and MWPLS methods. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 107(1), 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2011.02.008>.
 18. Pan T, Chen Z, Chen J, Liu Z (2012) Near-infrared spectroscopy with waveband selection stability for the determination of COD in sugar refinery wastewater. *Analytical Methods*, 4(4), 1046-1052. <https://doi.org/10.1039/C2AY05856A>.
 19. Pan T, Liu J, Chen, J, Zhang G, Zhao Y (2013) Rapid determination of preliminary thalassaemia screening indicators based on near infrared spectroscopy with wavelength selection stability. *Analytical Methods*, 5(17), 4355-4362. <https://doi.org/10.1039/C3AY40732B>.
 20. Liu Z, Liu B, Pan T, Yang J (2013) Determination of amino acid nitrogen in tuber mustard using near-infrared spectroscopy with waveband selection stability. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 102, 269-274. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.10.006>.
 21. Tao P, Zhen-Tao W, Hua-Zhou C (2012) Waveband optimization for near-infrared spectroscopic analysis of total nitrogen in soil. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40(6), 920-924. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1096.2012.10987>.
 22. Jiang JH, Berry RJ, Siesler HW, Ozaki Y (2002) Wavelength interval selection in multicomponent spectral analysis by moving window partial least-squares regression with applications to mid-infrared and near-infrared spectroscopic data. *Analytical Chemistry*, 74(14), 3555-3565. <https://doi.org/10.1021/ac011177u>.
 23. Du YP, Liang YZ, Jiang JH, Berry RJ, Ozaki Y (2004) Spectral regions selection to improve prediction ability of PLS models by changeable size moving window partial least squares and searching combination moving window partial least squares. *Analytica Chimica Acta*, 501(2), 183-191. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.09.041>.
 24. Xie J, Pan T, Chen JM, Chen HZ, Ren XH (2010) Joint optimization of Savitzky-Golay smoothing models and partial least squares factors for near infrared spectroscopic analysis of serum glucose. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 38, 342-346. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1096.2010.00342>.
 25. Pan T, Liu J, Chen J, Zhang G, Zhao Y (2013) Rapid determination of preliminary thalassaemia screening indicators based on near-infrared spectroscopy with wavelength selection stability. *Analytical Methods*, 5(17), 4355-4362. <https://doi.org/10.1039/C3AY40732B>.
 26. Xie L, Ying Y, Ying T, Yu H, Fu X (2007) Discrimination of transgenic tomatoes based on visible/near-infrared spectra. *Analytica Chimica Acta*, 584(2), 379-384. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.11.071>.
 27. Davies AMC (2005) An introduction to near infrared spectroscopy. *NIR News*, 16(7), 9-11. <https://doi.org/10.1255/nirn.853>.
 28. Hof M (2003) Basics of optical spectroscopy. *Handbook of Spectroscopy*, 1, 39-47.
 29. Abrams SM, Shenk JS, Westerhaus MO, Barton FE

- (1987) Determination of forage quality by near-infrared reflectance spectroscopy: Efficiency of broad based calibration equations. *Journal of Dairy Science*, 70(4), 806-813.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)80077-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80077-2).
30. Clarke MA, Arias ER, McDonaals-Lewis C (1992) Near infrared analysis in the sugarcane factory. pp. 244-264, Sugary Azucar Press at Ruspam Communication Inc., LA, USA.
31. Oh S, Lee MC, Choi YM, Lee S, Oh M, Ali A, Chae B, Hyun DY (2017) Development of near-infrared spectroscopy(NIRS) model for amylose and crude protein contents analysis in rice germplasm. *Korean Journal of Plant Resources*, 30(1), 38-49.
<https://doi.org/10.7732/kjpr.2016.30.1.038>.
32. Williams P, Norris K (1987) Near-Infrared technology in agricultural and food industries, p. 330, American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota, USA. ISBN: 091325049X.
33. Chung HI, Kim HJ (2000) Near-infrared spectroscopy: principles. *Analytical Science & Technology*, 13(1), 1001-1014.
34. Kim YB (1996) NIRS for food analysis(I). *Buletin of Food Technology*, 9(1), 24-37.
35. Lafargue ME, Feinberg M, Daudin JJ, Rutledge DN (2003) Detection of heterogeneous wheat samples using near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 11(2), 109-121.
<https://doi.org/10.1255/jnirs.359>.
36. Purwanto YA, Sari HP, Budiastira IW (2015) Effects of preprocessing techniques in developing a calibration model for soluble solid and acidity in 'Gedong Gincu' mango using NIR spectroscopy. *International Journal of Engineering and Technology*, 7(5), 1921-1927.
37. Geladi P, MacDougall D, Martens H (1985) Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat. *Applied Spectroscopy*, 39(3), 491-500.
38. Dhanoa MS, Lister SJ, Sanderson R, Barnes RJ (1994) The link between multiplicative scatter correction (MSC) and standard normal variate (SNV) transformations of NIR spectra. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 2(1), 43-47.
<https://doi.org/10.1255/jnirs.30>.
39. Fearn T, Riccicoli C, Garrido-Varo A, Guerrero-Ginel JE (2009) On the geometry of SNV and MSC. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 96(1), 22-26. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2008.11.006>.
40. Barnes RJ, Dhanoa MS, Lister SJ (1989) Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*, 43(5), 772-777.
<https://doi.org/10.1366/0003702894202201>.
41. Savitzky A, Golay MJE (1964) Smoothing and identification of data by simplified least squares procedure. *Analytical Chemistry*, 36(8), 1627-1639.
42. Luo J, Ying K, Bai J (2005) Savitzky-Golay smoothing and differentiation filter for even number data. *Signal Processing*, 85(7), 1429-1434.
<https://doi.org/10.1016/j.sigpro.2005.02.002>.
43. Rinnan Å, Nørgaard L, van den Berg F, Thygesen J, Bro R, Engelsen SB (2009) Infrared spectroscopy for food quality analysis and control. pp 38-39, Elsevier Inc. ISBN: 978-0-12-374136-3.
44. Sternberg JC, Stillo HS, Schwendeman RH (1960) Spectrophotometric analysis of multicomponent systems using the least squares method in matrix form. Ergosterol irradiation system. *Analytical Chemistry*, 32(1), 84-90. <https://doi.org/10.1021/ac60157a025>.
45. Wold S (1975) Soft modeling by latent variables; the non-linear iterative partial least squares(NIPALS) approach. *Journal of Applied Probability*, 12(1), 117-142. <https://doi.org/10.1017/S0021900200047604>.
46. Hammateenejad B, Akhindi M, Samar F (2007) A comparative study between PCR and PLS in simultaneous spectrophotometric determination of dophenylamine, aniline, and phenol: Effects of wavelength selection. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67(3-4), 958-965.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2006.09.014>.
47. Muniz R, Perez MA, De La Torre C, Carleos CE, Corral N, Baro JA (2009) Comparison of principal component regression (PCR) and partial least square (PLS) methods in prediction of raw milk composition by VIS-NIR spectrometry. Application to development of on-line sensors for fat, protein and lactose contents. pp. 2564-2668, XIX IMEKO World Congress Fundamental and Applied Metrology, Lisbon, Portugal. ISBN: 978-963-88410-0-1.
48. Naes T, Irgens C, Martens H (1986) Comparison of linear statistical methods for calibration of NIR instruments. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*, 35(2), 195-206.
<https://doi.org/10.2307/2347270>.
49. Kalivas JH, Gerperline PJ (2006) Practical guide to chemometrics, ed: Gerperline P, pp. 105-166, 2nd edition, CRC Taylor & Francis.

50. Despagne F, Massart DL (1998) Neural networks in multivariate calibration. *Analyst*, 123(11), 157R-178R. <https://doi.org/10.1039/A805562I>.
51. Mangasarian OL, Musicant DR (2001) Lagrangian Support Vector Machines. *Journal of Machine Learning Research*, 1, 161-177. <https://doi.org/10.1162/15324430152748218>.
52. Alcantara GB, Barison A, Santos MDS, Santo LPS, de Toledo JFF, Ferreira AG (2010) Assessment of genetically modified soybean crops and different cultivars by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometric analysis. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, 2(1), 41-52. <https://doi.org/10.17807/orbital.v2i1.120>.
53. Liu W, Liu C, Chen F, Zheng L (2016) Discrimination of transgenic soybean seeds by terahertz spectroscopy. *Scientific Reports*, 6, 35799. <https://doi.org/10.1038/srep35799>.
54. Xie L, Ying Y, Ying T, Yu H, Fu X (2007) *Analytica Chimica Acta*, 584(2), 379-384. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.11.071>.
55. James D, Schmidt AM, Wall E, Green M, Masri S (2003) Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 5829-5834. <https://doi.org/10.1021/jf0341159>.
56. Luna AS, da Silva AP, Pinho JSA, Ferre J, Boqué R (2013) Rapid characterization of transgenic and non-transgenic soybean oils by chemometric methods using NIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 100, 115-119. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.02.085>.
57. Zhu S, Liang J, Yan L (2010) Study on rapid identification methods of transgenic rapeseed oil based on near infrared spectroscopy. *International Conference on Computer and Computing Technologies in Agriculture*, pp. 633-640, Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18336-2_77.
58. Shiferaw B, Prasanna BM, Hellin J, Bänziger M (2011) Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Security*, 3(3), 307. <https://doi.org/10.1007/s12571-011-0140-5>.
59. Agapito-Tenfen SZ, Vilperte V, Benevenuto RF, Rover CM, Traavik TI, Nodari RO (2014) Effect of stacking insecticidal cry and herbicide tolerance epsps transgenes on transgenic maize proteome. *BMC Plant Biology*, 14(1), 346. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0346-8>.
60. Guo H, Chen J, Pan T, Wang J, Cao G (2014) Vis-NIR wavelength selection for non-destructive discriminant analysis of breed screening of transgenic sugarcane. *Analytical Methods*, 6(21), 8810-8816. <https://doi.org/10.1039/C4AY01833H>.
61. Lu BR, Snow AA (2005) Gene flow from genetically modified rice and its environmental consequences. *BioScience*, 55(8), 669-678. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[0669:GFFGMR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0669:GFFGMR]2.0.CO;2).
62. Bajai S, Mohanty A (2005) Recent advances in rice biotechnology-Towards genetically superior transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal*, 3(3), 275-307. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00130.x>.
63. Huang J, Hu R, Rozell S, Pray C (2005) Insect-resistant GM rice in farmer fields: Assessing productivity and health effects in China. *Science*, 308(5722), 688-690. <https://doi.org/10.1126/science.1108972>.
64. Ariizumi T, Kishitani S, Inatsugi R, Nishida I, Murata N, Toriyama K (2002) An increase in unsaturation of fatty acids in phosphatidylglycerol from leaves improves the rates of photosynthesis and growth at low temperatures in transgenic rice seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 43(7), 751-758. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf087>.
65. Peng Y, Lu R (2007) Prediction of apple fruit firmness and soluble solids content using characteristics of multispectral scattering images. *Journal of Food Engineering*, 82, 142-152. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.12.027>.
66. Feng YZ, Sun DW (2012) Application of hyperspectral imaging in food safety inspection and control: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(11), 1039-1058. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.651542>.
67. Gowen, AA, O'Donnell CP, Cullen PJ, Downey G, Frias JM (2007) Hyperspectral imaging-an emerging process analytical tool for food quality and safety control. *Trends in Food Science & Technology*, 18(12), 590-598. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.06.001>.
68. Kim MS, Lefcourt AM, Chao K, Chen YR, Kim I, Chan DE (2002) Multispectral detection of fecal contamination on apples based on hyperspectral imaging: Part I. Application of visible and near-infrared reflectance imaging. *Transactions of the American Society of Agricultural and Biological Engineers*, 45(6), 2027-2037. <https://doi.org/10.13031/2013.11414>.

69. Dissing BS, Papadopoulou OS, Tassou C, Ersbøll BK, Carsensen JM, Panagou EZ, Nychas GJ (2013) Using multispectral imaging for spoilage detection of pork meat. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2268-2279. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0886-6>.
70. Lu R (2004) Multispectral imaging for predicting firmness and soluble solids content of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 31(2), 147-157. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.08.006>.
71. Peng Y, Lu R (2006) Improving apple fruit firmness predictions by effective correction of multispectral scattering images. *Postharvest Biology and Technology*, 41(3), 266-274. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.04.005>.
72. Dissing BS, Nielsen ME, Ersboll BK, Frosch S (2011) Multispectral imaging for determination of astaxanthin concentration in salmonids. *PLoS One*, 6(5), e19032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019032>.
73. Lleó L, Barreiro P, Ruiz-Altisent M, Herrero A (2009) Multispectral images of peach related to firmness and maturity at harvest. *Journal of Food Engineering*, 93(2), 229-235. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.01.028>.
74. Løkke MM, Seefeldt HF, Skov T, Edelenbos M (2013) Color and textural quality of packaged wild rocket measured by multispectral imaging. *Postharvest Biology and Technology*, 75, 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.06.018>.
75. Sun X, Chen KJ, Maddock-Carlin KR, Anderson VL, Lepper AN, Schwartz CA, Keller WL, Ilse BR, Magolski JD et al. (2012) Predicting beef tenderness using color and multispectral image texture features. *Meat Science*, 92(4), 386-393. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.04.030>.
76. Kobayashi T, Kanda E, Kitada K, Ishiguro K, Torigoe Y (2001) Detection of rice panicle blast with multispectral radiometer and the potential of using airborne multispectral scanners. *Phytopathology*, 91(3), 316-323. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.316>.
77. Qin Z, Zhang M (2005) Detection of rice sheath blight for in-season disease management using multispectral remote sensing. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 7(2), 115-128. <https://doi.org/10.1016/j.jag.2005.03.004>.
78. Zhang JH, Wang K, Baiy JS, Wang RC (2006) Predicting nitrogen status of rice using multispectral data at canopy scale. *Pedosphere*, 16(1), 108-117. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(06\)60032-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(06)60032-5).
79. Zhang H, Yao XG, Zhang XB, Zhu LL, Ye ST, Zheng KF, Hu WQ (2008) Measurement of rice leaf chlorophyll and seed nitrogen contents by using multispectral image. *Chinese Journal of Rice Science*, 5, 555-558.
80. Hao Y, Geng P, Wu W, Wen Q, Rao M (2019) Identification of rice varieties and transgenic characteristics based on near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and chemometrics. *Molecules*, 24(24), 4568. <https://doi.org/10.3390/molecules24244568>.
81. García-Molina MD, García-Olmo J, Barro F (2016) Effective identification of low-gliadin wheat lines by near infrared spectroscopy (NIRS): Implications for the development and analysis of foodstuffs suitable for celiac patients. *PLoS One*, 11(3), e0152292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152292>.