

초분광 반사광 영상을 이용한 배추 종자(*Brassica campestris L*) 비파괴 품질 측정기술 개발

안치국 · 백인석 · 모창연¹ · 강석원¹ · 김문성² · 조병관*
¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업공학부, ²미농무성 농업연구청
충남대학교 바이오시스템기계공학과

Development of Non-destructive Quality Measurement Technique for Cabbage Seed (*Brassica campestris L*) using Hyperspectral Reflectance Imaging

Chi-Kook Ahn, In-Suck Baek, Chang Yeun Mo¹, Sukwon Kang¹,
Moon S. Kim², and Byoung-Kwan Cho*

¹National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration
²Environmental Microbial and Food Safety Laboratory, Agricultural Research Service,
United States Department of Agriculture
Department of Biosystems Machinery Engineering, Chungnam National University

Abstract

Cabbage (*Brassica campestris L*) is an important crop for Asian countries, and especially so for Korea, Japan and China. In order to achieve uniform and high-yield rates of cabbage product, seed lot quality needs to be controlled. Non-destructive evaluation of seed viability is an important technique for investigating seed quality. Hyperspectral imaging technique, which combines the features of imaging and spectroscopy, has been considered one of the most powerful nondestructive evaluation methods allowing comprehensive analysis of the physical and biochemical characteristics of materials. In this study, the feasibility of hyperspectral reflectance imaging technique was investigated for the evaluation of seed viability. For the investigation of viable and non-viable seeds, some viable seeds were artificially aged. Hyperspectral reflectance technique was used to discriminate aged cabbage seeds from normal seeds. The PLS-DA and simple image threshold methods were applied to investigate the feasibility of distinguishing the aged seeds from the normal seeds. The discrimination accuracy was 96.7% for the calibration set and 96.9% for the test set. The resultant images from the PLS-DA method showed high classification performance in distinguishing the non-viable from the viable seeds, which is an impossible task by naked eye and by conventional color cameras. Hyperspectral reflectance imaging has good potential for discriminating nonviable cabbage seeds from massive amounts of viable cabbage seeds.

Key words: cabbage, seed quality, nondestructive sorting, hyperspectral image, PLS-DA

서 론

종자 산업은 식량생산의 출발점이자, 첨단기술이 집목되고 부가가치가 높은 바이오 산업이다. 경쟁적인 종자산업에서 고품질 종자를 생산하기 위해 대량의 종자를 비파괴

적으로 선별하는 기술이 중요하게 인식되고 있다. 김치의 주재료로 이용되는 배추는 특히 한국과 중국, 일본 등의 아시아 지역에서 가장 중요한 농작물 중 하나이며 대량으로 재배 및 소비되고 있다. 높은 배추 수확량을 확보하기 위해서는 우수한 재배방법과 함께 발아율이 높은 종자의 확보가 선행 되어야 한다. 고품질 종자를 확보하기 위한 방법으로는 종자처리기술을 이용하여 종자를 고품질화하거나 육종된 종자에서 품질이 우수한 종자를 선별해서 우수 종자를 확보하는 방법이 있다. 종자처리에 의한 방법으로는 노화된 종자에 priming 처리를 함으로써 종자의 활력을 회복시키는 방법과(Kang & Choi, 2006) 종자에 펠렛처리하여 보존성을 높여 오랜 기간 보관이 가능하도록 하는 방

*Corresponding author: Byoung-Kwan Cho, Department of Biosystems Machinery Engineering, College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon, 305-604, Korea

Tel: +82-42-821-6715; Fax: +82-42-823-6246

E-mail: chobk@cnu.ac.kr

Received June 27, 2012; revised August 25, 2012; accepted August 27, 2012

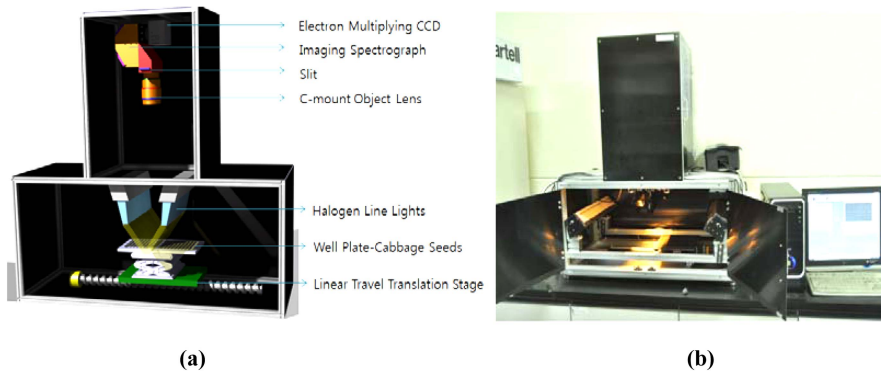


Fig. 1. Schematic (a) and photo (b) of the hyperspectral reflectance imaging system.

법(Kang et al., 2009)등이 있다. 선별을 통해 우수 종자를 확보하는 방법으로는 배추, 무와 같은 십자화 종자에서 퇴화종자를 선별해 내는 기술이 있는데 종자가 퇴화하는 과정에서 발생하는 당 및 아미노산, sinapin, chlorophyll과 같은 물질들을 검사하는 방법이 있다. 그러나 이러한 방법은 전문적인 기술이 필요하고 많은 시간과 노동력이 소요된다. 이러한 단점을 극복하기 위해서는 비파괴적이며 간단하게 종자선별을 할 수 있는 기술 개발이 필요하다. 현재까지 근적외선 분광법을 이용한 비파괴적인 종자 선별에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는데 분광 기술을 이용하는 방법은 빠르고 경제적인 장점이 있다. 가시광 및 근적외선 분광법을 이용한 종자의 물리적 특성을 고려하여 배추(Chinese cabbage)의 종을 분류하고(Wu et al., 2008) 배추, 무와 같은 십자화과 종자(Shetty et al., 2011; Min & Kang, 2008a)와 박(Min & Kang, 2003), 옥수수(Min & Kang, 2008b)의 건전종자와 퇴화종자를 선별해 내는 연구가 이루어 졌다. 이러한 연구들은 비파괴 종자 선별을 위한 근적외선 분광기술의 가능성을 보여주었다. 그러나 개별 종자를 각각 검사해야 하므로 대량으로 전수검사를 하기에는 시간과 노동력이 많이 소모되는 한계가 있다. 실용적인 비파괴 종자선별을 위해서는 대량의 종자를 동시에 검사할 수 있는 기술적 접근이 이루어져야 하는데 최근 농산물 비파괴 검사에서 활발하게 연구되고 있는 초분광 영상 기술이 가능성 있는 후보기술이라 할 수 있다. 초분광 영상기술은 분광기술과 영상을 융합하여 가시광 및 근적외선 영역의 연속적인 파장에 해당되는 영상을 획득할 수 있어 대상물의 물리적 특성뿐만 아니라 생화학적 특성까지 종합적으로 분석이 가능하다. 초분광 영상 기술은 농산물 표면의 오염물(Liu et al., 2007)이나 품질 저하 영역 검출(Cho et al., 2011) 등 최근 농산물 비파괴 품질측정에 많이 응용되어 지고 있다.

본 연구에서는 초분광 반사광 영상을 이용하여 배추 종자(*Brassica campestris* L)의 발아여부를 구별 할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다. 세부 연구 내용으로는 배추종

자의 발아율 판단을 위한 최적의 모델을 개발하고 이를 이용하여 퇴화종자 검출을 위한 영상처리 알고리즘을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

공시재료

본 연구에 사용한 배추종자는 H사 신통노랑 품종이다. 종자를 인위적으로 퇴화시키기 위해 종자의 함수율을 20%로 조정된 후 비닐팩으로 진공 포장하여 45°C의 water bath에서 완전히 퇴화 할 때까지 72 시간 담가서 보관하였다. 그 후 20°C의 incubator에서 원래의 무게까지 건조하였다(Kang, 2008). 외부적으로 건전종자와 퇴화종자의 종피나 색, 모양 모두 동일하였으며, 국제종자검정협회(ISTA) 규정에 따라 4°C로 보관하며 실험에 사용하였다. 준비된 시료는 초분광 영상 시스템에 의한 스펙트럼 영상 측정과 발아력 검증 실험에 이용하였다.

초분광 영상 시스템

건전종자와 퇴화종자를 선별하기 위한 초분광 영상 시스템은 영상 획득을 위한 electron multiplying charge-coupled device(EMCCD) camera(Luca RDL-604M, Andor Technology, South windsor CT, USA)와 imaging spectrograph(VNIR, Headwill photonics, Fitchburg, MA, USA), 그리고 step motor로 구동되는 시료이송부로 구성하였다. 또한 Fig. 2와 같이 광원은 광량 조절이 가능한 100 W급 halogen lamp를 이용하였으며, halogen lamp에 가이드를 설치하여 광의 조사폭 조절이 가능하도록 설계하였다. 가이드는 3 개를 1 set로 하였고, 배추종자에 조명을 최적화하기 위해 각 광원 set는 양쪽에서 시료를 비추도록 수직 방향으로 약 15°, 가이드와 가이드 사이는 약 30° 정도 기울어지도록 설치하여 반사광의 공간에 따른 불균일성을 최소화 하였다.

초분광 영상 시스템은 Visual Basic 6.0을 이용하여 제어하였으며, 렌즈의 노출시간을 설정하면 카메라에서 자동으

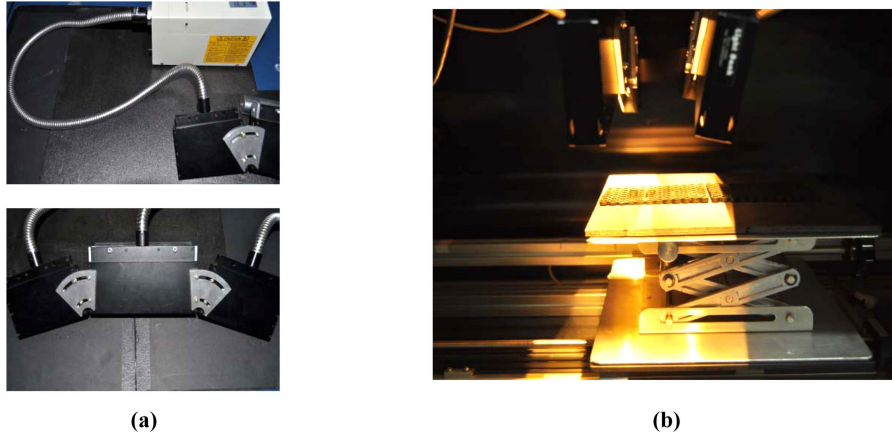


Fig. 2. Photos of (a) a lighting source and (b) the halogen lamp illumination for samples.

로 step motor의 이송속도 및 촬영시간을 계산하여 구동할 수 있도록 하였다. 렌즈에 투사된 영상은 25 μm 두께의 slit을 통과하면서 line-scan되고 spectrograph에 의하여 각 파장별 분광이 생성되게 된다. 분광된 정보는 EMCCD 카메라에 의해 증폭되어 이미지로 저장된다. 본 연구에서는 초분광 영상촬영 시 노출시간(exposure time)은 9.5 msec로 하고 step motor의 이동은 0.1 mm 간격으로 2300 step으로 하며 총 23 cm를 이동하여 배추종자의 초분광 영상을 획득하였다.

발아력 실험

종자의 초분광 영상을 획득한 후 개별종자에 대한 건전종자와 퇴화종자를 식별하기 위해 국제종자검정협회(ISTA) 규정에 따라 발아실험을 시행하였다. 발아시험은 종이 위에 종자를 치상하는 방법인 TP법으로 90 \times 15 mm의 petri-dish에 filter paper(Whatman No.2) 2 장을 겹쳐 증류수 7.5 mL를 관수 한 후 16 립씩 25 $^{\circ}\text{C}$ 조건으로 항온습기기의 중간 위치에 치상하여 10 일간 발아력 시험을 실시하였다. 일반적인 배추종자는 3 일 이내에 발아가 완료되는 것으로 확인되었다.

데이터 분석

발아력 시험을 통해 식별된 건전종자 84 립과 퇴화종자 108 립의 초분광 영상의 각 픽셀에 대한 스펙트럼 데이터를 추출하여 부분 최소 제곱 회귀판별분석법(Partial Least Squares Discriminant Analysis)을 적용하여 건전종자와 퇴화종자를 구별할 수 있는 모델을 개발하였다. 각 종자의 스펙트럼 데이터는 획득된 초분광 영상에서 수동으로 영역 선정을 하였다. 선정된 전체 영역은 건전종자 10,679 Pixel, 퇴화종자 14,117 Pixel 이었으며, 이 중 건전종자 8,542 Pixel, 퇴화종자 11,296 Pixel의 스펙트럼은 식별 모델을 개발하는데 사용했으며, 모델 개발에 사용하지 않았던 건전종자 2,137 Pixel과 퇴화종자 2,821 Pixel의 스펙트럼은 개발된

모델의 검증에 사용하였다.

$$\text{PLS_image} = \sum_{i=1}^n W_i H_i + \text{constant} \quad (1)$$

W_i : beta coefficients

H_i : the image at i_{th} wavelength of a total of n spectral images

Constant : beta coefficients constant

또한 식(1)과 같이 PLS-DA 모델의 beta coefficient를 이용하여 초분광 영상에 적용하여 PLS의 영상을 구성하고 이 영상을 이용하여 퇴화종자를 검출하기 위한 영상처리 알고리즘을 개발하였다. 모든 데이터 분석은 MATLAB(version 7.0.4, The Mathworks, Natick, MA, USA) 프로그램을 이용하였다.

결과 및 고찰

스펙트럼 분석

초분광 영상 시스템을 이용하여 측정된 초분광 영상에서 배추종자 영역의 스펙트럼을 추출하고종자 별 평균 스펙트럼과 발아력시험을 통해 건전과 퇴화로 분류된 종자를 대응시켜 스펙트럼을 두 그룹으로 분류하여 분석에 사용하였다. 배추의 건전종자와 퇴화종자는 외관상 동일하여 육안 및 기존의 칼라영상으로는 구분하기는 불가능하다. 건전종자와 퇴화종자의 평균 스펙트럼은 Fig. 3과 같다. 스펙트럼의 전체적인 경향은 서로 비슷하게 나타났으나, 530-700 nm 범위와 800-1000 nm 범위에서 다소 다른 양상을 보였다. 두 범위 모두 건전종자가 퇴화종자에 비해 높은 intensity로 나타났다. 건전종자와 퇴화종자 두 그룹별로 차이를 나타내는 정확한 파장영역의 분석은 PLS-DA 방법을 통해 분석하였다.

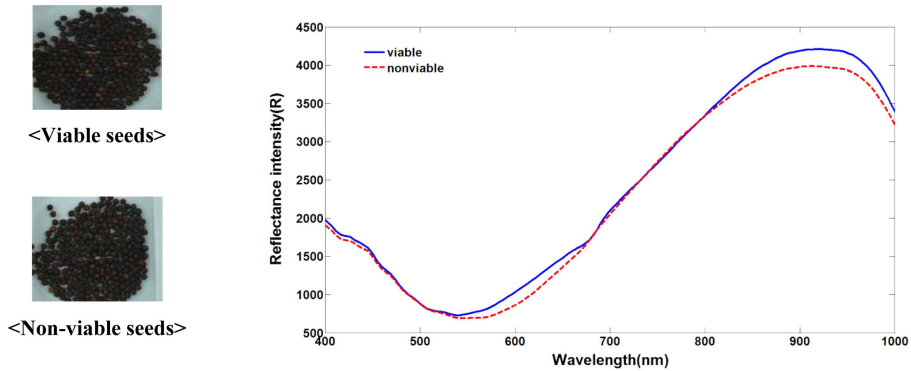


Fig. 3. Photo of representative cabbage seeds and mean spectra of viable and non-viable of cabbage seeds.

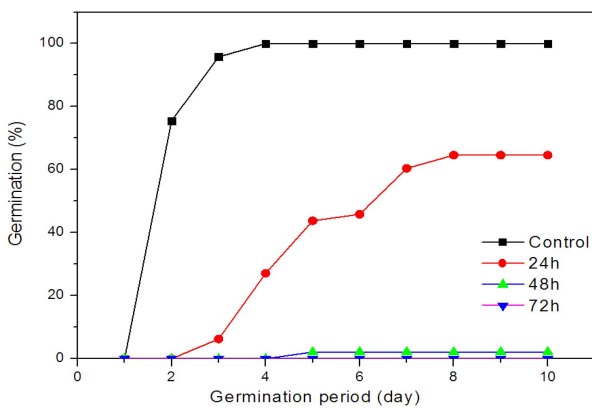


Fig. 4. Viability of cabbage seeds of different ageing treatments.

발아력 실험 결과

건전종자 48 립과 각 48 립씩 24, 48, 72 시간 퇴화처리 후 발아력 실험을 실시하였다. Fig. 4는 발아력 실험 결과를 보여준다. 퇴화처리 시간 별 발아력을 확인한 결과 인위적으로 퇴화 처리한 배추종자는 퇴화시간 24 시간 이후부터는 발아되는 종자가 60%까지 줄어들었으며, 발아가 진행되더라도 발아시간이 길어짐을 확인할 수 있었다. 또한 배추종자는 퇴화시간 72 시간 이후부터 완전히 발아가 되지 않는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 배추종자의 완전퇴화를 위해 퇴화처리 시간을 72 시간으로 설정하여 실험하였다. 본 실험에서 사용한 배추종자의 발아력 실험 결과 건전종자는 3 일 이내에 발아가 100% 완료되었으며, 퇴화처리 한 배추종자는 모두 발아되지 않았다.

PLS-DA(Partial Least Squares-Discriminant Analysis) 모델 개발 및 성능평가

배추의 건전종자와 퇴화종자의 스펙트럼을 이용하여 발아력 판별예측 모델을 개발하기 위해 PLS-DA 방법을 적용하였다. 배추의 건전종자와 퇴화종자 판별에 많은 영향을 미친 영역을 확인하기 위해 PLS-DA 모델의 beta coefficient를 계산하였다. Fig. 5는 건전종자와 퇴화종자를

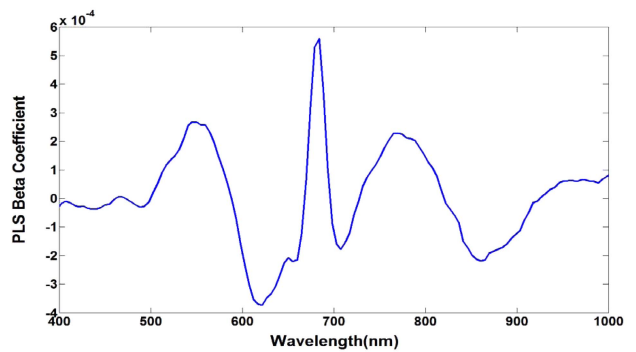


Fig. 5. Beta coefficients of the PLS-DA model.

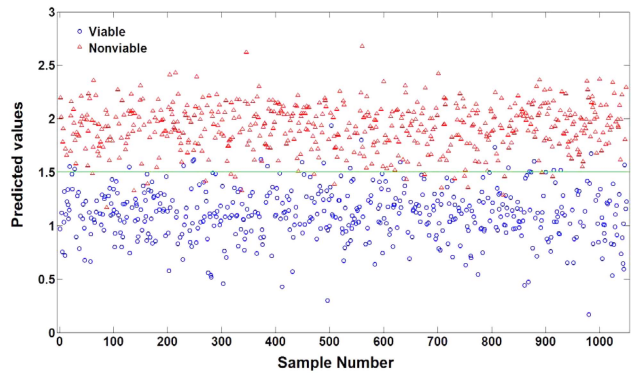


Fig. 6. Classification results of viable and non-viable seeds using PLS-DA model.

구분하기 위해 제안된 최적 모델의 beta coefficient를 나타낸 것이다. 550 nm, 620 nm, 680 nm 파장대가 주된 영향을 미친 것으로 나타났다. 550 nm와 620 nm는 가시광선의 영역으로 건전종자와 퇴화종자 사이의 사람의 육안으로 판별하기 어려운 미세한 색소 차이가 스펙트럼에 반영된 것으로 사료된다. 건전종자와 퇴화종자의 분류에 있어 가장 큰 영향을 미친 파장대는 680 nm 부근인 것으로 나타났다. 680 nm 부근은 chlorophyll의 대표적인 흡수파장 영역대인데(Anatoly et al., 1999), 배추와 같은 십자화과 종자가 퇴화하는 과정에서 발생하는 chlorophyll 변화가 반영된 결

Table 1. Calibration results of the PLS-DA model for viable and nonviable cabbage seeds.

Calibration	Total*	Correct*	Incorrect*	Accuracy
Viable seed	8542	8321	221	97.4 %
Non-viable seed	11296	10875	421	96.2 %
Total	19838	19196	642	96.7 %

*Number of pixels

Table 2. Test results of the PLS-DA model for viable and nonviable cabbage seeds.

Test	Total*	Correct*	Incorrect*	Accuracy
Viable seed	2137	2078	59	97.2 %
Non-viable seed	2821	2729	92	96.7 %
Total	4958	4807	151	96.9 %

*Number of pixels

과라 판단된다(Henk et al., 1998). 배추의 건전종자와 퇴화종자를 판별하는 PLS-DA 모델의 정확도는 Fig. 6에 나타난 바와 같이 건전종자 스펙트럼 그룹과 퇴화종자 스펙트럼 그룹의 판별기준인 상수 값 ‘1’과 ‘2’의 중간 값 1.5를 기준으로 하여 예측결과 값이 1.5 보다 낮으면 건전종자, 1.5 보다 높으면 퇴화종자로 판단하였다(Lim et al., 2011). 따라서 건전종자의 스펙트럼의 예측결과 값이 1에 가깝고 퇴화종자의 스펙트럼의 예측결과 값이 2에 근접할수록 PLS-DA 모델의 판별 성능이 우수하다고 볼 수 있다.

Table 1은 건전종자와 퇴화종자의 초분광 영상의 스펙트럼 데이터를 이용한 PLS-DA 모델의 calibration 결과를 보여준다. 결과에 따르면 앞에서 설명한 판별방법에 의해 건전종자는 97.4%, 퇴화종자는 96.2%의 정확도로 구분되었으며, 전체적으로 96.7%의 분류 정확도를 보였다. 또한 Table 2는 개발된 PLS-DA 모델의 성능을 평가하기 위해 모델 개발에 사용하지 않은 배추종자의 스펙트럼 데이터를 이용하여 test set을 구성하였고 이를 이용하여 분류 정확도를 계산한 결과이다. 결과에 따르면 건전종자는 97.2%이고 퇴화종자는 96.7%의 정확도로 구분되었고, 전체적으

로 96.9%의 분류 정확도를 보였다.

영상처리

퇴화된 배추종자를 검출하는 영상처리 과정은 Fig. 7과 같다. 832 nm의 파장영상을 이용하여 종자를 제외한 나머지 배경을 제거한 마스킹 이미지를 만들었다. 마스킹 영상은 종자 영역은 ‘1’이고 종자를 제외한 나머지 영역은 ‘0’ 값을 가지게 된다. 이 마스킹 이미지에 건전종자와 퇴화종자를 판별하는 PLS-DA 모델의 beta coefficient를 이용한 PLS 영상을 곱하기 연산하여 종자 이외의 배경부분을 제거하였다. 또한 PLS-DA 모델에 의한 건전종자와 퇴화종자를 판별하는 기준인 1.5를 임계값으로 적용하여 퇴화종자만 검출하는 최종 결과 영상을 얻을 수 있었다.

Fig. 8은 본 연구에서 실시한 전체 퇴화종자 검출 영상과 발아테스트의 결과를 보여준다. 또한 Table 3은 초분광 영상을 이용한 퇴화종자 검출 정확도를 나타낸다. 전체 192립의 배추 종자 중 7립이 오분류 되어 96.8%의 정확도

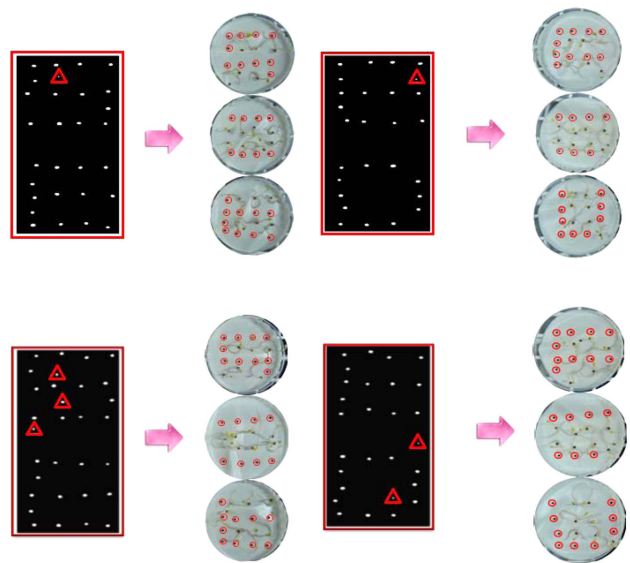


Fig. 8. Detecting results of nonviable cabbage seeds with the germination tests (triangle: error, circle: not germinated).

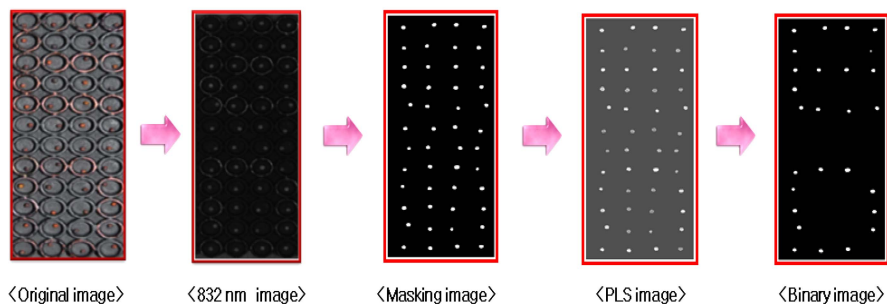


Fig. 7. Image processing for detecting nonviable cabbage seeds.

Table 3. Classification results of PLS-DA models for viable and nonviable cabbage seeds.

Classification	Total*	Correct*	Incorrect*	Accuracy
Total	192	186	7	96.8 %

*Number of seeds

로 나타났다. 오분류 중 검출 픽셀수가 적은 경우는 모폴로지와 같은 영상처리 기법을 통해 제거 가능하므로 정확도가 더 향상 될 수 있다. 본 연구를 통해 육안 및 일반 컬러 카메라로 선별하기 힘든 퇴화종자를 초분광 영상을 이용하면 대량의 종자를 신속하게 검사 가능함을 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 가시광 및 근적외선 초분광 반사광 영상 시스템을 이용하여 배추의 건전종자와 퇴화종자를 선별할 수 있는 기술 개발에 관한 연구를 수행하였다. 초분광 반사광 영상을 이용하여 배추의 건전종자와 퇴화종자를 선별할 수 있는 최적의 반사광 파장 조합을 구명하고 이를 이용하여 퇴화종자를 검출할 수 있는 초분광 영상 알고리즘을 제시하였다. 본 논문의 전체적인 결론을 요약하면 다음과 같다.

가) 배추의 건전종자와 퇴화종자를 구별하기 위해 초분광 반사광 스펙트럼을 이용하여 PLS-DA 모델을 개발하고 성능평가를 수행하였다. Calibration set의 분류 정확도 97.6%이고 test set의 분류 정확도는 96.9% 이었다.

나) 배추의 건전종자와 퇴화종자를 분류하는데 가장 큰 영향을 미치는 파장대는 680 nm로 확인 되었으며, 이는 배추종자가 퇴화하는 과정에서 발생하는 chlorophyll 변화의 영향으로 사료된다.

다) 개발한 PLS-DA모델의 beta coefficient를 적용한 PLS의 영상을 이용하여 건전종자와 퇴화종자를 선별한 결과 분류정확도 96.8%로 육안 및 일반 컬러 카메라로 선별하기 힘든 배추의 퇴화종자 검출이 가능한 것을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 농림수산식품부기술기획평가원에서 주관하는

농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

참고문헌

- Anatoly AG, Buschmann C, Lichtenthaler HK. 1999. The chlorophyll fluorescence ratio F735/F700 as an accurate measure of the chlorophyll content in plants. *J. Remote Sens. Environ.* 69: 296-302.
- Cho BK, Beak IS, Lee NG, Mo CH. 2011. Study on bruise detection of 'Fuji' apple using hyperspectral reflectance imagery. *J. Biosystems Eng.* 36: 484-490.
- Henk J, Rob Van der S, Angela F, Jaap G, Van P, Raoul J. B. 1998. Chlorophyll fluorescence of brassica oleracea seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance. *J. Seed Sci. Res.* 8: 437-443.
- Kang WS. 2008. Nondestructive determination of seed viability by optical methods. Degree of Doctor of philosophy. Ph. D. Thesis. Daegu University.
- Kang JS, Son BG, Choi YW, Lee YJ, Joo WH, Lim CS, Park YH. 2009. Effects of dehydration methods and storage conditions on germinability of pelleted carrot seeds. *J. Life Sci.* 19: 526-531.
- Kang JS, Choi IS. 2006. Leakage of seed reserve nutrient in artificially aged pepper seeds and enhancement of seed vigor by priming. *J. Life Sci.* 16: 352-356.
- Lim JG, Kang SW, Lee KJ, Mo CY, Son JY. 2011. Identification of foreign objects in soybeans using near-infrared spectroscopy. *J. Food Eng. Prog.* 15: 136-142.
- Liu YL, Chen YR, Kim MS, Chen DE, Lefcourt AM. 2007. Development of simple algorithms for the detection of fecal contaminants on apples from visible/near infrared hyperspectral reflectance imaging. *J. Food Eng.* 81: 412-418.
- Min TG, Kang WS. 2003. Nondestructive separation of viable and non-viable gourd(*Lagenaria siceraria*) seeds using single seed near infrared reflectance spectroscopy. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 44: 545-548.
- Min TG, Kang WS. 2008a. Nondestructive classification of viable and nonviable radish(*Raphanus sativus L.*) seeds using single seed near infrared spectroscopy. *J. Hort. Environ. Biotechnol.* 49: 42-46.
- Min TG, Kang WS. 2008b. Nondestructive classification between normal and artificially aged corn(*Zea mays L.*) seeds using near infrared spectroscopy. *Korean j. Crop Sci.* 53: 314-319.
- 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. *J. NIRS.* 19: 451-461.
- Wu D, Feng L, He Y, Bao. Y. 2008. Variety identification of chinese cabbage seeds using visible and near-infrared spectroscopy. *Trans. ASAE.* 51: 2193-2199.