

T000038921

MONO1201413851

발간 등록 번호
11-1543000-000167-01

현장 적용형 병원체 감염 씨감자 신속진단 기술 개발

Development of a real-time in-situ measurement technology
for detecting disease-infected seed potatoes

충남대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “현장 적용형 병원균 감염 씨감자 신속검출 기술개발에 관한 연구” 과제 (세부과제 “ 현장 적용형 병원균 감염 씨감자 신속검출 기술개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2013 년 07월 일

주관연구기관명 : 충남대학교

주관연구책임자 : 조 병 관

세부연구책임자 : 조 병 관

연 구 원 : 김 대 용

연 구 원 : 이 훈 수

연 구 원 : 박 은 수

연 구 원 : 이 홍 석

연 구 원 : 배 형 진

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 이 윤 수

연 구 원 : 김 상 우

연 구 원 : 이 윤 석

연 구 원 : 거르비 람살

요 약 문

I. 제 목

현장 적용형 병원균 감염 씨감자 신속검출 기술개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 현대 식생활에서 중요한 비중을 차지하고 있는 감자는 재배 시 병원균 감염을 줄이기 위해 씨감자 파종을 통해 재배하는 특징이 있다. 따라서 고품질 감자 생산을 위해 무병우량 씨감자 확보가 매우 중요하다.
- 육안 검사가 어려운 병원균 내부 감염 씨감자를 파종에 사용할 경우 병원균 전염으로 농가의 경제적 손실뿐만 아니라 주요 재배단지의 생산량 및 품질 저하 그리고 품종퇴화 등 감자생산 전반에 걸친 경제적 피해발생이 초래될 수 있다.
- 현재 감염여부 진단을 위해 사용되고 있는 전통적인 미생물 검사방법은 장시간의 측정기간, 숙련된 전문 인력 및 비용 소모, 샘플링 검사만 적용이 가능하다는 단점이 있으므로 대량으로 생산되는 씨감자의 정확한 감염여부 판별을 활용하기에 한계가 있다.
- 기존의 감염 씨감자 검사 방법을 대체할 수 있는 기술로는 비파괴적이며, 신속하여 전수검사가 가능하고, 대상물의 물리화학적 상태를 파악할 수 있는 분광측정법을 들 수 있다. 분광측정기술은 현재까지 장치의 획기적인 발전으로 대상물 상태의 정성 및 정량 분석에 활용이 가능하여 농·식품 분야에 활발히 활용되고 있으며 특히 과실류 비파괴 품질측정 분야에서는 상용화되고 있는 수준이다.
- 본 연구에서는 비교적 경제적이며 간단하면서 대상물의 내부 상태를 정확히 판별할 수 있는 분광측정법을 이용하여 씨감자에 보편적으로 감염되는 병원균의 감염 여부를 실시간 판별할 수 있는 기술을 개발하므로 우량 씨감자의 안정적 공급과 감자의 생산성 향상에 기여하고자 하였다.
- 본 연구에서는 씨감자 내·외부에서 보편적으로 발생하는 병원균의 감염여부를 분광 영상기술을 이용하여 실시간 비파괴 검사할 수 있는 기술을 개발하여 씨감자의 농가 보급 전 비파괴 전수조사로 감염여부를 판별할 수 있는 기술적 기반을 제공하므로 무병 씨감자의 안정적 농가공급과 감자 생산성 향상에 기여하는 것을 연구의 목적으로 하고 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구 범위
1차 연도 (2011)	비과과 신속진단을 위한 병원균 감염 씨감자 제작 및 감염 최적수준 제어	씨감자 감염 병원균 농도 수준 제어 방법 개발	- 병원체 확보 및 배양
			- 씨감자에 병원체 감염 및 재배
			- 감염 수준 제어 - 감염 단계별 시료제작
	투과광 및 반사광 스펙트럼을 이용한 씨감자 내부 병증 검사 시스템 구축	투과광을 이용한 스펙트로미터 센싱부 구축	- 스펙트로미터 센싱부 구축 - 시료의 홀더 제작
		감염 씨감자의 투과 및 반사 스펙트럼 획득	- 투과광 스펙트럼 획득 - 반사광 및 적분구 이용 스펙트럼 획득
		감염 씨감자의 검출 및 정확도 분석 기술 개발	- 병증 진행에 따른 투과 및 반사 스펙트럼 분석 - 다변량 분석기법을 이용한 감염 씨감자 검출 및 정확도 분석

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구 범위
2차 년도 (2012)	씨감자 주요 감 자 병원균을 대 상으로 한 비파 괴 진단을 위한 시료 제작	병원체 확보 및 배양 씨감자 병원체 감염 연구	- 씨감자에 심각한 피해를 발 생시키는 세균 및 곰팡이 선 정
			- 균주 확보 및 최적 배양 연 구
			- 감염 씨감자 제작을 위한 최 적 방안 도출
	감염 씨감자 검 출을 위한 초분 광 영상 기술 적용 및 최적 검출 모델 개발	초분광 영상 시스템 구축	- 시료 전체면 조사를 위한 조 명의 적정 위치 및 광량 구명
			- Step motor를 이용한 line-scan 제어 방식(온라인 선별기반) 구현
			- 초분광 자동 영상획득을 위 한 소프트웨어 개발
		다분광 형광 영상을 이용한 씨감자 표면감염 검출 기술 개발	- 형광특성 분석을 통한 검출 최적 파장 구명
			- 검출 알고리즘 개발(ANOVA, PCA image, PLS-DA)
		다분광 반사광 영상을 이용 한 씨감자 표면감염 검출 기술 개발	- 반사광 분광특성 분석을 통 한 검출 최적 파장 선정
			- 검출 알고리즘 및 분광 특성 별 검출 성능 분석
		반사스펙트럼을 이용한 감 염 씨감자 신속 검출 기술 개발	- 병원체 감염 씨감자의 반사 스펙트럼 획득
			- 스펙트럼 분석기법을 적용한 예측모델 개발
- 스펙트럼 검출 성능 분석			

구분 (년도)	세부과제명	연구개발의 내용	연구 범위
3차 년도 (2013)	비파괴 신속 진단을 위한 병원균 감염 씨감자 제작 및 현장 시료 공급	검증시험을 위한 시료 제작	- 시작기 모델 개발 및 성능평가용 감염 씨감자 제작
		실제 농가 재배된 감염 씨감자 공급	- 시작기 성능 검증을 위한 실제 농가 재배된 감염 씨감자 구입
	현장 적용형 병원균 감염 씨감자 실시간 검출 시스템 개발과 시험 및 검증	현장 적용형 감염 씨감자 선별 시스템 최종 개발	- 현장용 씨감자 선별시스템 구축 - 알고리즘 개발을 위한 감염 씨감자 선별 실험
		자동 선별을 위한 제어 소프트웨어 완성	- 감염 씨감자 선별 모델이 입력된 시스템 제어프로그램 개발
		개발 제품 상품성 향상을 위한 검출성능 안정화	- 시작기 성능평가를 통한 전처리 기법 보완 및 개선
		사용자 편의성 향상을 위한 설계/보완	- 스펙트럼 획득 재현성 확인 및 프로그램 간소화 검토
		현장 실증 시험을 통한 감염 씨감자 검출 정확도 분석	- 실제 농가에서 재배된 감염 씨감자로 시작기 성능 평가

IV. 연구개발결과

본 연구는 현장에서 감염 씨감자의 비파괴 신속진단을 수행할 수 있는 온라인 선별 시스템 개발을 목표로 수행되었다. 선별시스템에 장착될 감염 씨감자 판별모델 개발을 위해 내부에 발생하는 감염 씨감자를 다양한 농도로 제작하고 기초용 분광분석 시스템을 이용하여 PLS-DA의 판별 모델을 개발하였다. 또한 외부에 발생될 수 있는 병증의 신속한 검출을 위해 초분광 영상 및 형광 영상 시스템으로 영상을 획득하고 ANOVA, PCA, PLS-DA 등의 판별 알고리즘으로 감염 부위의 검출 가능성을 평가하였다. 최종적으로 감염 씨감자 중 자연 감염에 가장 가까운 *P. atrosepticum* 병원균을 대상으로 농도별 감염 씨감자를 제작하여 온라인 선별 시스템의 판별모델 개발 및 감염여부 판별 정확도를 분석하고 시스템의 성능 검증을 실시하였다. 최종적으로 씨감자 저장 중에 가장 빈번하게 발생하는 흑색심부병에 감염된 씨감자를 실제 농가로부터 확보하여 온라인 선별 시스템의 현장 적용 가능성을 평가하여 본 연구과제의 목표인 기술 개발의 달성 가능성을 높였다. 개발된 선별시스템은 기존의 씨감자 감염여부 진단에 소요되었던 높은 검사비용, 노동력 및 시간 소모를 획기적으로 절감할 수 있는 방법이 될 수 있으며 나아가 안정적인 씨감자의 공급으로 농가의 소득 증대에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

가. 논문 투고

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Vis/NIR 분광 기법을 이용한 병증 씨감자의 판별에 관한 연구	김대용	조병관	이운수	한국농업기계학회 2011년 동계학술대회 논문집	16(1)	국내	비SCI
2011	Preparation of bacterial inoculum and their effects on potatoes for Vis/NIR spectrometry	김윤석	이운수	김상우, 거비르 람살, 정진희, 조병관	2011년 한국 식물병리학회 춘계학술대회	초록 발표집	국내	비SCI
2011	Preparation of fungal agar plugs and their effects on potatoes for Vis/NIR spectrometry	김윤석	이운수	김상우, 거비르 람살, 정진희, 조병관	2011년 한국 식물병리학회 춘계학술대회	초록 발표집	국내	비SCI
2011	투과 및 반사 스펙트럼을 이용한 병증 씨감자 판별에 관한 연구	김대용	조병관	안치국 백인석 김재곤 이운수 김윤석	한국농업기계학회 2011년 하계학술대회 논문집	16(2)	국내	비SCI
2012	광 반사방식을 이용한 감염 씨감자 비파괴 선별 기술 개발	김대용	조병관	이운수	농업과학연구	39(1)	국내	비SCI
2012	Development of Inoculum method for Non-Destructive Test of Soft Rot Disease on Potatoes	김윤석	이운수	김상우, 거비르 람살, 최원기, 김대용, 조병관	2012년 한국균학회 춘계학술발표회	초록 발표집 24권 1호	국내	비SCI
2012	Multispectral imaging technique for detection of fungi-infected seed potatoes based on hyperspectral imagery	김대용	조병관	이운수	CIGR-AgEng2012	CIGR-AgEng2012	국외	비SCI
2012	Development of Inoculum method for Non-destructive Test of Various Fungal Pathogens and Bacterial Pathogens on Potatoes	김윤석	이운수	김상우, 거비르 람살, 최원기, 김대용, 조병관	강원대학교 농업생명과학연구원	강원 농업생명연구 24권 2호	국내	비SCI
2013	Development of a non-destructive on-line pungency measurement system for red-pepper powder	모창연	조병관	M. Hasegawa K. Lee J.G. Lim M.S. Kim S. Kang H.D. Lee H. Bae D.Y. Kim	Journal of the Faculty of Agriculture	58(1)	국외	SCI
2013	Detection of cuticle defects on cherry tomatoes based on hyperspectral fluorescence imagery	조병관	조병관	김문성 백인석 김대용 김영식	Postharvest Biology and Technology	76(1)	국외	SCI

나. 특허 성과

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2012	광 반사방식을 이용한 감염 씨감자의 선별 방법	충남대학교산학협력단	대한민국	10-2012-0044462

2. 활용 계획

- 비파괴 신속진단 온라인 선별 시스템의 핵심 부분인 씨감자 스펙트럼 획득에 최적화된 분광분석 센싱부와 개발된 PLS-DA 감염여부 예측모델을 기술이전의 목표로 삼고 있다. 향후 병원체별 스펙트럼 획득으로 보다 다양한 농·식품 감염진단 프로그램 개발도 수행될 수 있으리라 사료된다.
- 병원균 감염여부 판별기술은 씨감자뿐만 아니라 식용으로 판매되는 감자의 병원균 감염여부 판별에도 범용적으로 적용될 수 있고 개발된 시작기는 농가 현장에서 사용이 가능한 콤팩트형이므로 빠른 시일 내에 상품화가 가능할 것으로 판단된다.
- 현재 활용되고 있는 미생물 진단킷과 숙련된 전문가를 활용해야 하는 전통적인 감염여부 분석 기법보다는 비용, 노동력, 시간 등의 절감효과가 있는 새로운 비파괴 신속진단 방법을 언론에 홍보할 계획이다.

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	1	1			1	

SUMMARY

Infected seed potato (*Solanum tuberosum* L.) should be discriminated before distribution to the farmers to prevent the infection to the entire lots. Pathogens, such as *Pectobacterium atrosepticum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Streptomyces scabiei*, *Verticillium albo-atrum*, and *Rhizoctonia solani* are the commonly found in the infected seed potatoes during harvest and storage. Since the seed potatoes infected by several bacterial pathogen and fungal spore are not easily discernible by visual inspection, sensitive sensing techniques need to be developed to discriminate infected seed potatoes from the sound seed potatoes.

Of the nondestructive measurement methods, spectroscopic and hyperspectral imaging techniques have shown good potential for identification of biological disorders in agricultural and food materials. In this study, transmittance spectral measurement method and hyperspectral reflectance and fluorescence imaging techniques were investigated to discriminate infected seed potatoes from sound ones. A transmittance spectroscopy with the spectral range from 470 to 1100 nm was used to classify sound and disease-infected seed potatoes. PLS-DA with various preprocessing methods was used to investigate the feasibility of classification between sound and disease-infected seed potatoes. In addition, use of a high spatial resolution hyperspectral imaging technique was presented as a tool for selecting optimal VIS/NIR wavebands to detect infected seed potatoes. It is indicated that the hyperspectral imaging technique combined with multivariate analysis, such as ANOVA method, principle component analysis (PCA) and partial least square discriminant analysis (PLS-DA), has potential for early detection of fungal infected seed potatoes.

Based on the fundamental experiments a prototype of the on-line sorting system was developed. The specially designed transmittance spectral sensing system was embedded in the sorting system. The performance of the sorting system showed good results in that the coefficient of determination (R_p^2) and standard error of calibration (SEC) with average moving smoothing preprocessing was 0.967 and 0.091, and the classification accuracy is 100%. For the blind test to evaluate the performance of the developed sorting system, 50 disease-infected seed potatoes were used with the same number of 30 sound potatoes. The classification accuracy was 100% for discriminating disease seed potatoes from sound ones.

The results indicated that the developed on-line sorting system equipped with the PLS-DA model for transmittance spectra has good potential for discriminating infected seed potatoes from sound ones. The developed system could be transferred to the third party company and commercialized in near future.

Contents

Chapter 1 Introduction	16
Section 1. Project Purpose and Motivation	16
Section 2. Research plan	17
Chapter 2 Domestic and overseas states of the technology	22
Chapter 3 Contents and results of the project	24
Section 1. Fundamental research for discrimination of the infected seed potatoes	24
1. Research motivation and objective	24
2. Selection and incubation of pathogens for interior and exterior infection of seed potatoes	25
A. Selection of pathogens for interior and exterior infection of seed potatoes	25
B. Incubation of pathogens for interior and exterior infection of seed potatoes	25
3. Research on the injection method for making pathogenic seed potatoes	26
A. Optimization method for making pathogenic seed potatoes	26
B. Pathogen inoculation on seed potatoes	32
C. Determination of the concentration level of pathogens	34
D. Preparing infected seed potatoes and pathogen manifestation	36
4. Prototype system construction and spectral analysis for sound and infected seed potatoes	38
A. Construction of the spectroscopic system	38
B. Spectral analysis of the sound and infected seed potatoes	40

C. PLS-DA method for transmittance and reflectance spectra	51
Section 2. Discrimination of infected seed potatoes using hyperspectral images	57
1. Preparation of the sound and infected seed potatoes	57
A. Preprocessing of the samples	57
B. Inoculation method of pathogens on seed potato	58
C. Determination of the minimum concentration level of pathogens for seed potato infection	58
D. Optimal inoculation conditions for seed potato infection	62
2. Construction of the spectroscopic and the hyperspectral imaging systems	63
A. Multi-purpose hyperspectral imaging system for reflectance and fluorescence measurements	63
B. Spectroscopic system measuring reflectance spectra	69
C. Spectroscopic system measuring fluorescence spectra	70
D. Acquiring process of hyperspectral images	72
3. Development of discriminant algorithm for sorting infected seed potato	74
A. ANOVA and PCA methods	74
B. PLS-DA method	76
4. Analysis of fluorescence characteristics for sound and infected seed potatoes	79
5. Optimal wavebands analysis using hyperspectral reflectance and fluorescence images	81
6. Prediction results of reflectance spectra using PLS-DA	87
Section 3. Development of a real-time in-situ sorting system	92
1. Preparation of infected seed potatoes for on-line sorting	92
2. Construction of a prototype for on-line spectroscopic measurement	94
A. Prototype of the transmittance spectroscopic system	94
B. Construction of the on-line sorting part	96
C. Construction of the spectroscopic system suitable for the cup holder	102
D. Construction of the operating program and control system	104
3. Algorithm development for on-line sorting	106
A. Experiments of sound and infected seed potatoes using the on-line sorting machine	106

B. Analysis of transmittance spectra of sound and infected seed potatoes	106
C. Discussion on results of PLS-DA	108
D. Evaluation of the performance for the on-line sorting system	111
4. Summary of the final research products	114
Chapter 4 Achievement of results and contributions	115
Section 1. Achievement of results	115
Section 2. Contributions	118
Chapter 5 Plan for utilization of the research products	119
Section 1. Research products	119
Section 2. Plan for utilization	120
Chapter 6 Collections of the information about overseas science and technology information during research process	121

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	16
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	16
1. 연구개발대상 기술의 경제적 · 산업적 중요성	16
2. 연구개발의 필요성	16
제 2 절 연구개발 수행계획	17
1. 연구개발의 최종목표 및 성격	17
가. 연구개발의 최종목표	17
나. 연구개발의 성격	17
2. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계	18
가. 연구개발의 추진전략·방법	18
나. 연구개발의 추진체계	19
3. 연구개발결과의 활용방안 및 기대성과	20
가. 연구개발결과의 활용방안	20
나. 기대성과	20
제 2 장 국내외 기술 개발 현황	22
제 1 절 국내외 기술 개발 현황	22
1. 국내 수준	22
2. 국외 수준	23
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	24
제 1 절 감염 씨감자 선별을 위한 기초 연구	24
1. 연구 필요성 및 목적	24
2. 씨감자 내·외부 감염 병원체 선정 및 병원체 배양	25
가. 씨감자 내·외부 발생 병원체 선정	25
나. 내·외부 발생 병원체 확보 및 배양	25
3. 인공감염 씨감자 제작을 위한 병원체 감염 연구	26
가. 씨감자 시료 제작을 위한 감염 최적화 연구	26
나. 씨감자 시료를 위한 병원체 접종	32
다. 병원체 감염 농도 결정	34
라. 시료의 제작 및 병원체 발현	36

4. 시작기 구축과 정상 및 감염 씨감자 스펙트럼 분석	38
가. 실험에 이용된 장치 및 스펙트럼 획득부 구축	38
나. 정상 씨감자 및 감염 씨감자 스펙트럼 분석	40
다. 투과 및 반사스펙트럼을 이용한 판별 부분 최소 자승법(PLS-DA)	51
제 2 절 초분광 영상을 이용한 감염 씨감자 선별 연구	57
1. 내·외부 감염 씨감자 제작	57
가. 씨감자 시료의 전처리 과정	57
나. 씨감자 병원체 접종 방법	58
다. 최적 시료 제작을 위한 최소발병농도 확인	58
라. 최적 접종 확인 후 시료 제작	62
2. 실험에 이용된 분광분석 시스템 및 초분광 영상시스템 구축	63
가. 반사 및 형광영상 획득을 위한 다목적 초분광 영상시스템 구축	63
나. 반사 스펙트럼 측정용 시스템	69
다. 형광 스펙트럼 측정용 시스템	70
라. 초분광 영상 획득 과정	72
3. 감염 씨감자 검출 알고리즘 개발	74
가. ANOVA 및 PCA 분석 기법	74
나. PLS-DA 기법	76
4. 정상 및 감염 씨감자 형광특성(EMEX) 분석	79
5. 초분광 영상을 이용한 최적 반사 및 형광 파장 분석	81
6. 반사스펙트럼의 PLS-DA 예측 결과	87
제 3 절 현장 적용형 온라인 비파괴 선별 시스템 개발	92
1. 온라인용 감염 씨감자 시료 제작	92
2. 온라인 적용을 위한 기초용 분광분석 장치 구축	94
가. 실험용 투과식 분광분석 장치 구축	94
나. 온라인 비파괴 선별 장치 개발	96
다. 이송컵에 적합한 분광분석 장치 구축	102
라. 제어 시스템 및 프로그램 구축	104
3. 온라인 선별을 위한 알고리즘 개발	106
가. 온라인 선별 시스템에서의 감염 씨감자 판별 실험	106
나. 획득한 감염 씨감자 투과스펙트럼 분석	106
다. PLS-DA 결과 고찰	108
라. 온라인 선별 시스템에서의 성능 평가	111
4. 연구개발 최종 목표 달성 요약	114
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	115
제 1 절 연구 개발 목표 달성도	115

제 2 절 대외 기여도	118
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	119
제 1 절 연구 개발 성과	119
제 2 절 활용 계획	120
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	121

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구 개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성

- 생산 및 저장 유통 중에 발생하는 씨감자 감염 병원균의 비파괴 신속진단기술의 개발은 고질적 병해의 광범위한 감염피해를 최소화할 수 있으며 양질의 씨감자를 안정적으로 공급할 수 있어 재배 농가의 소득증대에 기여함.
- 생산 및 저장 유통 중의 씨감자의 병원균 감염여부를 진단할 수 있고 신속 조치를 통해 감염확산을 경감시킬 수 있어 씨감자 생산비용을 절감할 수 있음.
- 병원균 감염의 비파괴 신속진단을 통해 기존에 전문가의 미생물학적 검사에 소요되었던 높은 검사비용, 노동력 및 시간 소요를 획기적으로 절감할 수 있음.
- 감염 씨감자의 제거 및 맞춤형 방제로 재배기간 동안에 필요한 농약 등을 경감할 수 있어 친환경 농업이 가능함.
- 감자 병원균 진단시스템의 기술선점을 통한 새로운 시장창조 및 시스템의 국외 수출이 가능함.

2. 연구개발의 필요성

- 육안으로 관측이 불가능한 감염 씨감자의 내부 병증을 비파괴 방법으로 검출할 수 있는 기술을 개발하므로 씨감자 저장효율 향상 및 교차 감염 위험성 최소화할 필요가 있음.
- 씨감자 감염 병원균의 비파괴 신속진단으로 생산단계 및 저장 유통단계에서 발생하는 고질적 병해의 광범위한 감염피해를 최소화하여 양질의 씨감자를 안정적으로 공급하므로 재배 농가의 소득증대에 기여할 필요가 있음.
- 병원균의 신속진단을 통한 전문가 의존 및 고가장비 대체 효과를 기대할 수 있으며, 기존 진단에 소요되었던 검사비용, 노동력 및 시간이 획기적으로 절감할 필요가 있음.
- 감염 씨감자의 제거 및 맞춤형 방제로 재배기간 동안에 필요한 농약 등을 경감시키므로 친환경 농업을 유도할 필요가 있음.
- 병원균 종류별 신속한 진단을 가능하게 하므로 병해 발생상황에서 즉각적인 맞춤형 방제가 이루어지도록 할 필요가 있음.

제 2 절 연구개발 수행계획

1. 연구개발의 최종목표 및 성격

가. 연구개발의 최종목표

- 감염 농도별로 다양한 병원균의 단계별 맞춤형 시료를 공급하여 종합적인 병원균 감염 씨감자 비파괴 판별기술을 개발하도록 함.
- 투과광 스펙트럼을 이용한 병원균별 스펙트럼 DB 구축 및 기초 시작기 개발로 감염 씨감자 판별 가능성 평가
- 초분광 영상 및 형광 영상을 이용하여 다양한 분석기법으로 감염 부위의 다분광 이미지 검출 가능성 평가
- 병원균 감염 씨감자를 실시간 현장 검사할 수 있는 온라인 검출 시스템 개발 및 성능 평가

나. 연구개발의 성격

아이디어 개발		시작품 개발	○	제품 및 공정개발		기타	
---------	--	--------	---	-----------	--	----	--

2. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

가. 연구개발의 추진전략·방법

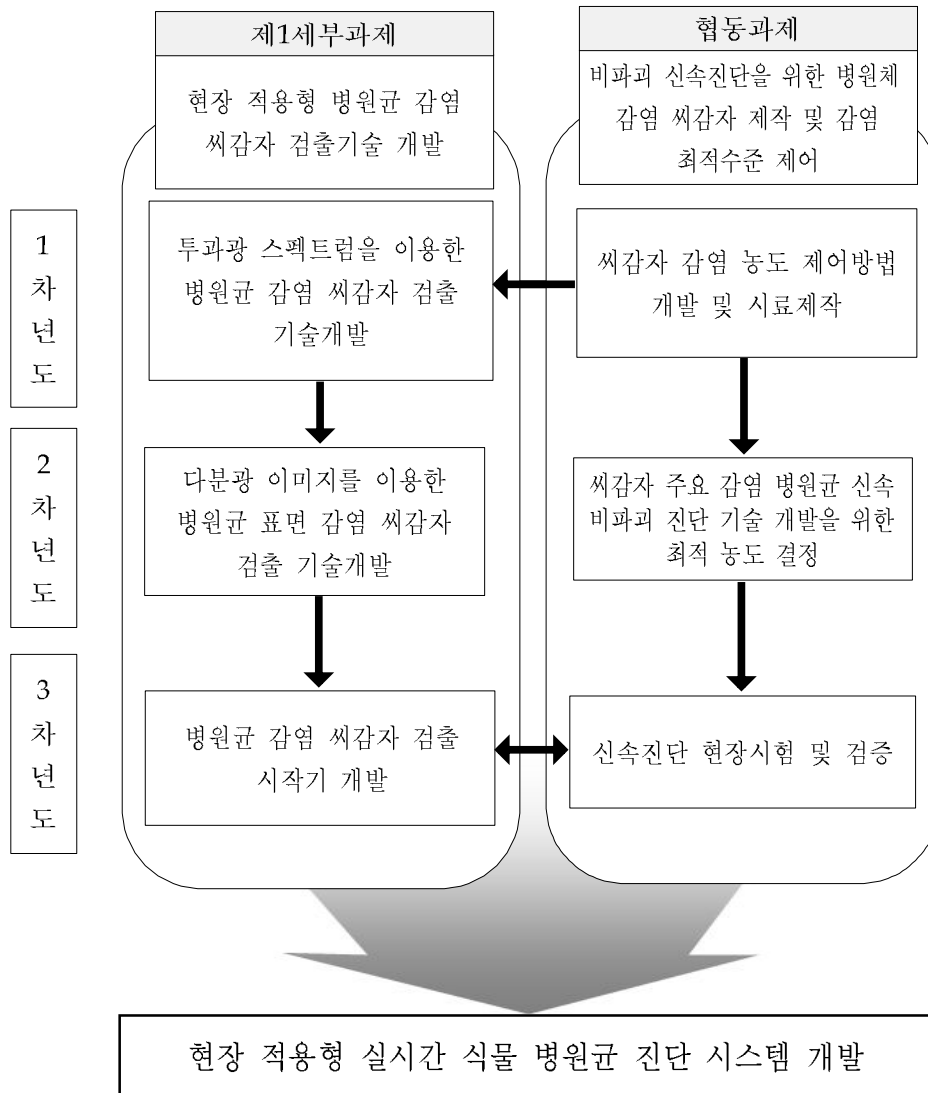
1) 기술정보의 수집

- 현재 국내외에서 식물병원균과 관련된 연구를 수행하고 있는 대학 및 연구소를 통해 관련 자료를 수집 분석하여 원천기술 및 시스템 개발의 기초 자료로 활용함.
- 국내외 식물병 진단 기술개발과 관련된 유관기관 및 기업체의 문헌과 네트워크를 이용하여 연구개발에 도움이 되는 자료를 수집 및 활용함.

2) 전문가 확보

- 하드웨어 측면 : 고성능 고 정확도 씨감자 감염 진단 원천기술과 경쟁력 있는 시스템 개발을 위해서 센서 개발, 신호 및 이미지 처리, 스펙트럼 모델, 패턴인식 및 소프트웨어 개발 분야의 전문 연구자들로 연구 인력을 구성함. 또한 산업화 연구가 필수적이기 때문에 산업체의 다양한 경험을 반영할 수 있도록 참여기업의 해당 전문가가 참여함.
- 소프트웨어 측면 : 식물병원균 감염 시료의 분광스펙트럼을 측정/분석하고 DB를 구축하기 위해서 연구팀에 식물병에 대해 전문적으로 연구하는 연구자가 참여함. 또한 구축된 분광스펙트럼을 이용하여 진단 알고리즘을 개발하기 위해서는 다년간의 데이터 분석 경험이 있는 연구자와 참여기업의 전문가가 참여함.

나. 연구개발의 추진체계



3. 연구개발결과의 활용방안 및 기대성과

가. 연구개발결과의 활용방안

결과활용	제 목	비 고
특허출원	- 현장 적용형 실시간 감염 씨감자 검출 시스템 개발 기술 - 주요 식물병원균 신속진단 개발을 위한 병원균 농도 수준 결정	2011년, 2012년
논문발표	- 주요 씨감자 병원균의 다분광 이미지 패턴 분석법 - 식물병원균 케모메트릭 진단분석법 - 주요 식물병원균 신속진단 기술 개발을 위한 이병 시료 제작	2011년, 2012년, 2011, 2012년
제품화	- 현장 적용형 실시간 감염 씨감자 검출 시스템 개발	2012년
산업화	- 실시간 감염 씨감자 검출 시스템 생산 및 판매	2013년

나. 기대성과

1) 기술적 측면

- 육안으로 관측이 불가능한 감염 씨감자의 내부 병증을 비파괴 방법으로 검출이 가능하여 씨감자 저장효율 향상 및 교차 감염 위험성 최소화
- 기술개발이 되어 있지 않은 병원균 감염 씨감자의 신속진단 원천기술 확보
- 병원균 종류별 신속한 진단이 가능하므로 병해 발생상황에서 즉각적인 맞춤형 방제가 가능함
- 신속 정확한 병원균 검사기술 개발로 관련 학문 발전에 기여

2) 경제적·산업적 측면

- 생산 및 저장 유통 중의 씨감자 감염 병원균의 비파괴 신속진단으로 고질적 병해의 광범위한 감염피해를 최소화할 수 있으며 양질의 씨감자를 안정적으로 공급할 수 있어 재배농가의 소득증대에 기여함
- 생산 및 저장 유통 중의 감염 씨감자의 병원균을 신속 진단할 수 있어 신속 조치를 통한 감염확산을 경감시킬 수 있어 씨감자 전체 생산비용이 절감됨

- 병원균의 신속진단을 통한 전문가 의존 및 고가장비 대체 효과를 기대할 수 있으며, 기존 진단에 소요되었던 검사비용, 노동력 및 시간이 절감됨
- 감염 씨감자의 제거 및 맞춤 방제로 재배기간 동안에 필요한 농약 등이 절감되어 친환경 농업이 가능함
- 감자 병원균 진단시스템의 기술선점을 통한 새로운 시장창조 및 시스템의 국외 수출이 가능함

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

제 1 절 국내외 기술 개발 현황

1. 국내 수준

- 현재 우리나라에서 발생하는 감자 병해충은 약 16종이며 이 중 감자 재배에 가장 문제가 되고 있는 병은 역병, 바이러스병, 무름병, 더뎡이병이 있다. 감자의 병충해를 줄이는 대표적인 방법은 병 저항성이 높은 품종을 개발하는 것이지만 국내에서 한 가지 감자 품종을 육성하는데는 10년 이상이 소요된다는 보고가 있음(김 등, 1999). 국내 원예연구소에서는 감자 바이러스병, 역병 및 무름병 저항성 품종육종을 위해 체세포잡종 식물체를 만들었으며 이를 이용한 저항성 품종육성이 제주도농업기술원에서 수행되었음(An, 2000).
- 감자 무름병은 지면에 접한 잎이나 줄기가 수침상 암록색 부패를 일으키며 고온 다습한 환경에서 급격히 병증이 확대되어 내부가 썩는 병임. 국내에서는 감자 주산지인 대관령과 제주도에서 발병률이 해마다 증가하고 있음(Hahm, 1995; 홍 등, 2000).
- 감자 더뎡이병은 지하부 괴경에서 발생하며 괴경 표면에서 적갈색 반점이 생기고 이것이 확대되면 병반 주변부가 솟아올라 중앙부가 오돌토돌하게 되는 병임. 국내 재배지 대부분의 토양이 감염되어 있으며 병원균도 이미 3종이 동정 되어있음(김 등, 1998b). 제주도 감자 재배지 토양에서 분리된 더뎡이병 균주는 pH 4인 산성에서도 생육이 가능한 것으로 보고됨(김 등, 1998a; 홍, 2001).
- 농촌진흥청에서는 감자 바이러스 동시 진단용 프라이머를 개발하여 감자에서 가장 많이 발생하는 모자이크병과 잎말림 바이러스병, 감자S바이러스 등 4종의 바이러스를 동시에 진단할 수 있는 기술을 개발하여 산업체에 기술이전을 하였음. 이 기술은 RT-PCR을 이용하는 것으로 효소결합항체법(ELISA)에 비해 1,000배 이상 정밀함. 감자 바이러스 진단에 소요되는 진단시약 등의 수입대체 효과가 발생함.
- 또한 농촌진흥청에서는 감자밭에서 신속하게 감자Y바이러스를 검출할 수 있는 신속진단키트를 개발함. 이 진단키트는 임신진단키트와 같은 원리로 감자잎을 착즙한 후 진단키트를 담그고 2분 이내에 결과를 확인 할 수 있음. 고가 실험장비나 인력이 필요하지 않아 효율적이지만 전수검사가 어려운 단점이 있음.

2. 국외 수준

- 병 저항성 품종육성은 야생종 감자 중 *S. brevidens*는 잎말림바이러스병, 감자Y바이러스병, 감자X바이러스병, 무름병 등에 저항성이 있는 것으로 알려져 있음(Jones, 1979; Austin 등, 1988; Gibson 등, 1990). 원형질체 융합으로 만들어진 체세포잡종을 이용하여 교배가 되지 않는 야생종의 병 저항성 형질을 재배품종으로 도입할 수 있음(Watanabe 등, 1995)
- 감자X바이러스 현장에서 신속하게 검출하기 위해 금나노입자와 면역크로마토그래피법을 이용하여 진단키트를 제작함. 이 진단키트의 감자Y바이러스 검출범위는 3~300 ng/ml이고 검출한계는 2 ng/ml로 매우 정확도가 높음
- 감자의 외부 또는 내부에 나타나는 병증을 검출하기 위해 분광분석 방법이나 초분광 영상을 이용한 연구 결과가 보고되었으나 내부 병증의 경우 정확도가 90% 미만으로 나타났으며 무름병과 같은 외부 병증의 경우 정확도가 95% 이상이었음(Vanoli et al., 2012; Daca-Nieto et al., 2011a; Daca-Nieto et al., 2011b). 적용된 기술은 기초연구용으로 현장적용을 위해서는 추가 연구가 필요한 상태임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 개발

제 1 절 감염 씨감자 선별을 위한 기초 연구

1. 연구 필요성 및 목적

본 연구는 병원균에 감염된 씨감자를 분광분석기술을 이용하여 현장에서 비파괴 검출할 수 있는 기술을 개발하기 위해 수행되었다. 현재까지는 육안으로 판별이 불가능한 감자의 내부 병증의 경우 비파괴적인 방법으로 검출할 수 있는 기술이 없었으나 본 연구를 통해 비파괴적으로 신속하고 정확하게 진단하는 것이 가능하게 되면 씨감자 생산 및 저장 그리고 유통단계에서 발생하는 고질적 병해로 인한 광범위한 감염피해를 최소화하고 양질의 씨감자를 안정적으로 공급하여 농가의 소득증대에 기여할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 감자의 내부 병증을 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 기술의 개발을 통해 기존의 씨감자 감염여부 진단과 비교하였을 경우 수분 이내로 비파괴 측정이 가능하며, 전수조사, 다양한 병증에 따른 선별 가능, 노동력 및 전문 인력의 절감효과를 기대할 수 있을 것이다(표 1).

Table 1. Comparison between bio-diagnosis and spectroscopic sorting machine system.

구분	bio-diagnosis method	spectroscopic method	비고
검사 개수	개별 조사만 가능	전수 조사 가능	
소요 시간	2 ~ 3일 소요	수초이내	개당
검사 방식	파괴 방식	비파괴 방식	
검사 대상	미생물 분류 동정법으로 개별 병원체 검출 가능	병증을 검출하므로 병원체 유무만 판별	
판별 방법	병원체의 세균, 곰팡이, 바이러스 등에 따라 다른 방식으로 검사 가능	병원체 마다 발생하는 병증은 스펙트럼에서 거의 동일하므로 모든 감염 씨감자를 검출 가능함.	
검사자	전문 지식 갖춘 인력 요망	장비 관리자 및 운영자	노동력 절감

2. 씨감자 내·외부 감염 병원체 선정 및 병원체 배양

가. 씨감자 내·외부 발생 병원체 선정

본 연구의 수행에 있어 병원체의 선택은 세균 및 곰팡이 감염으로 인해 파종 후 씨감자의 발아부진을 유발하거나 파종기 씨감자 보급을 방해하여 농가에 피해를 입히는 대표적인 감자 병 병원균을 선택하였다. 이들 대부분은 전 생육기에 걸쳐 식물에 침입이 가능하고 식물조직이 섞여있는 토양에서 오랫동안 살아남을 수 있으며 포자 등을 생성하여 이듬해 온도조건이 맞으면 괴경 등에 침입하여 발병을 일으키게 된다. *Pectobacterium atrosepticum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Streptomyces scabiei*은 무름병, 둘레썩음병, 더덩이병을 유발하는 대표적인 씨감자의 병원성 세균들이다. 이들은 전염성이 매우 강하고 토양에서 오랫동안 살아남을 수 있으며 포자 등을 생성하여 이듬해 환경조건이 맞으면 감자의 괴경 등으로 침입하여 발병할 수 있다.

R. solani, *V. albo-atrum*은 감자에서 발병하는 대표적인 곰팡이들로 공기와 토양을 통해 빠르게 전염되고 전 생육기에 걸쳐 발생되며 감자의 뿌리와 줄기, 잎 모두에 피해를 줄 수 있다. 또한 이들 병원체의 특징은 토양병해로 토양 속 식물의 뿌리나 덩이줄기 등을 전염시켜 식물 전체를 죽게 하는 전신감염성 병해를 초래할 뿐만 아니라 발생부위가 토양 속에 존재하여 조기 발견이 어렵고 증상이 발견되어도 이미 병해가 널리 퍼져 있는 경우가 대부분이어서 농작물 생산에 심각한 피해를 입히고 있다.

나. 내·외부 발생 병원체 확보 및 배양

본 실험에 이용된 균주는 농촌진흥청 농업유전자원정보센터(Gene Bank)에서 분양받아 사용하였고 씨감자의 병증 발생을 위하여 계대 배양 후 24 시간 정도 지나 세균 및 곰팡이의 활성 조건이 최상일 때 접종을 실시하였다. *P. atrosepticum*은 NB배지를 이용하여 28°C에서 진탕 배양하였고, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*는 배양온도가 26°C 이상이 되면 생육저하 현상이 나타나기 때문에 TSB배지를 이용하여 24°C에서 진탕 배양하였다. *S. scabiei*는 GYM배지를 이용하여 30°C에서 진탕 배양하였다. *R. solani*는 PDA배지를 이용하여 20°C에서 배양하였다. MEA배지는 *V. albo-atrum*을 20°C에서 배양하는데 사용하였다. 접종한 감자는 각각 발병하기 쉬운 조건에서 저장 및 배양하였으며 세균병 균주인 *P. atrosepticum*은 고온다습한 환경 및 산소결핍 상태에서 발병 및 감염이 촉진되기 때문에 밀폐용기에 넣어 수분을 충분히 공급하였다.

C. michiganensis subsp. *sepedonicus*는 18 ~ 24℃에서 잘 발생하고 온도가 26℃이상 되면 발병이 억제되기 때문에 24℃에서 배양하였다. *S. scabiei*는 발병적온이 30℃로 비교적 높은 편이고 건조한 환경에서 발병률이 높기 때문에 수분공급을 최소화하여 건조조건 하에서 배양하였다. 곰팡이병 균주인 *R. solani*, *V. albo-atrum*은 기온이 비교적 낮고 수분이 많은 상태에서 발병이 촉진되기 때문에 20℃의 온도조건 하에서 충분한 수분공급을 유지한 상태에서 배양하였다(표 2).

Table 2. Type of bacteria and fungi of seed potatoes.

Name	Classification	Disease	Temperature	Note
<i>P. atrosepticum</i>	Bacteria	Inner	28℃	무름병
<i>C. michiganensis</i>	Bacteria	Inner/Outer	18 ~ 24℃	둘레썩음병
<i>S. scabiei</i>	Bacteria	Outer	30℃	더듬이병
<i>R. solani</i>	Fungi	Outer	20℃	검은무늬썩음병
<i>V. albo-atrum</i>	Fungi	Outer	20℃	반죽위조병

3. 인공감염 씨감자 제작을 위한 병원체 감염 연구

가. 씨감자 시료 제작을 위한 감염 최적화 연구

씨감자에 발생하는 병원성 세균 및 곰팡이는 단일 형태로 발생하는 것보다는 여러 종류의 세균 및 곰팡이가 복합적으로 발생하는 경우가 많아 이를 기초 실험에 이용할 경우 처리할 변수가 많아져 분석에 어려움이 따를 것으로 판단되어 단일 병원균 감염을 통한 실험을 수행할 필요가 있다. 또한 감염 씨감자 시료 확보에 있어서 씨감자의 내부 병중 상태를 확인할 수 없어 자연적으로 발생한 감염 씨감자 구입이 어렵다. 따라서 본 연구에서는 인공적으로 시료를 제작하여 실험 및 분석에 이용하는 것이 적합하다고 판단하였다.

시료의 제작에 고려할 사항으로는 정상 씨감자에 병원체를 감염시켜도 접종한 흔적에 의한 스펙트럼의 변화가 관찰되거나 접종된 병원체 이외의 다른 병원체에 오염되어 스펙트럼이 영향을 받는 경우가 없어야 하므로 여러 가지 방법으로 접종을 시도한 다음 최적의 접종 방법을 선택하는 실험을 우선적으로 수행하였다.

우선 씨감자는 씨눈 주위의 움푹하게 들어간 부위에 세균 및 곰팡이 등이 서식할 경우가 많고 세척을 하더라도 제거하기 어려운 점이 있으므로 병원체의 접종을 보다 효율적인 방법으로 하기 위해 껍질을 제거하는 방법을 선택하였다. 따라서 껍질을 제거하더라도 제거하기 전의 시

료와 비교했을 때 스펙트럼의 변화가 없을 경우 껍질이 제거된 시료를 사용해도 판별에 영향을 미치지 않을 것으로 판단하였다.



Fig. 1. Seed potatoes before and after peeling.

그림 1은 껍질을 제거하기 전과 후의 사진이며 껍질을 제거하기 전에 투과 및 반사 방식을 이용하여 스펙트럼을 획득하고 껍질을 제거한 후의 시료의 스펙트럼을 측정하여 비교하였다. 그림 2는 투과 및 반사 스펙트럼의 그래프를 나타낸 것인데 껍질을 제거하기 전과 후가 상당한 차이가 발생함을 알 수 있었다. 반사의 경우 껍질을 제거한 표면에서 반사가 상당히 높아지는 경향을 확인할 수 있었으며 특히 반사 및 투과 모두 800 nm 이상의 영역에서 차이점을 나타내는 변화가 관찰되었는데 이는 껍질 유무에 따라 감자의 성분인 전분량이 달라져 스펙트럼에 의한 영향을 미치는 것으로 판단된다. 또한 680, 960 nm 영역의 valley는 엽록체와 수분에 의한 광흡수 현상을 보여주고 있다.

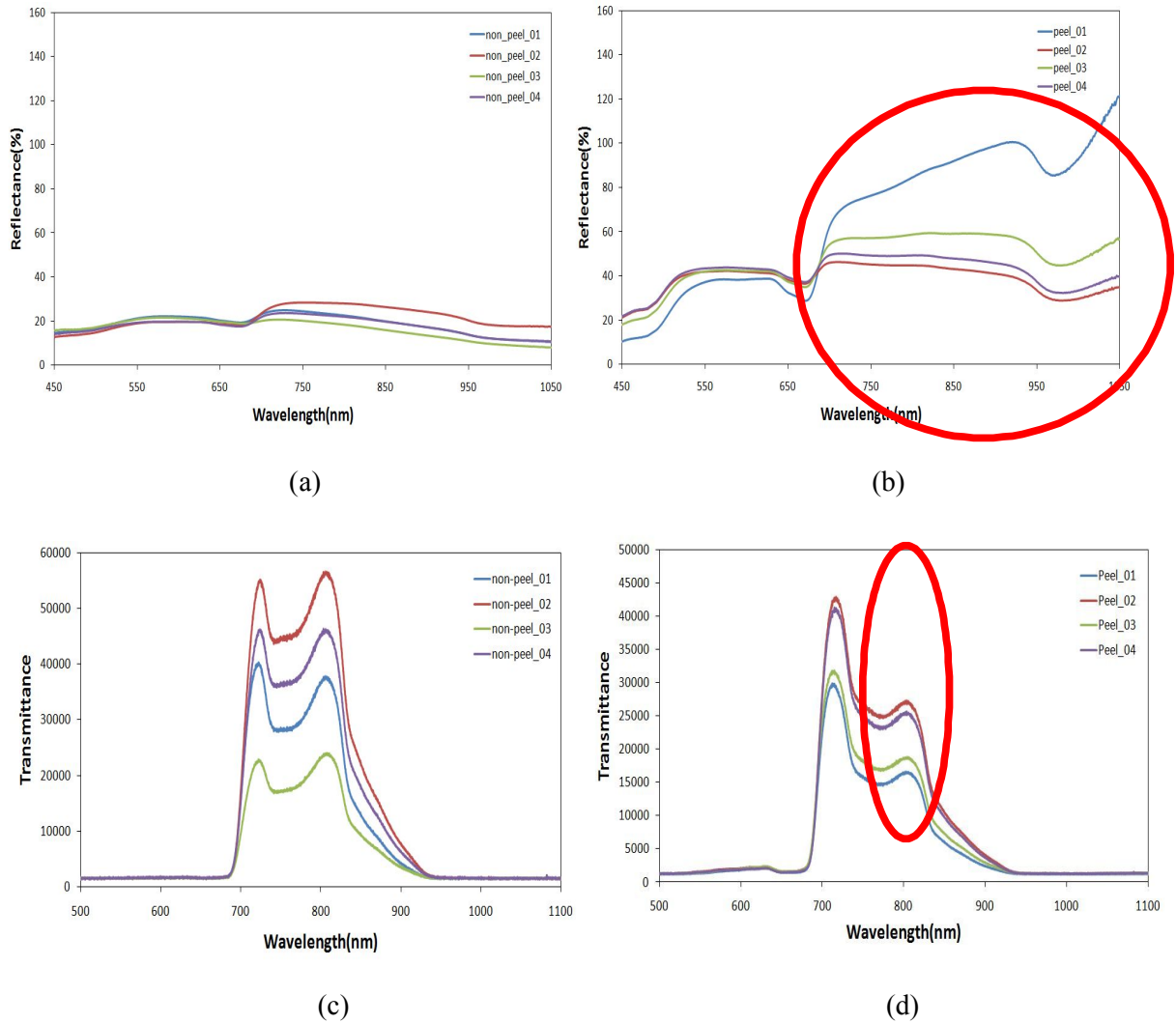


Fig. 2. Measurements of spectra [reflectance spectra before (a) and after (b) peeling, transmittance spectra before (c) and (d) after peeling.

껍질 제거의 경우 스펙트럼의 변화가 관찰되므로 병원체 접종을 위한 방법으로 부적합한 것으로 판단하였다. 따라서 새로운 접종방법으로 씨감자를 절단하고 병원체를 접종한 후 식품포장용 랩을 이용하여 고정하는 방법을 사용하였다. 그림 3과 같이 두 가지의 방향으로 절단하고 병원체를 감염시킨 씨감자의 스펙트럼을 절단하지 않은 이전 상태의 씨감자 스펙트럼과 비교하였다. 두 가지 방법 모두 절단하지 않은 상태의 시료의 스펙트럼과 차이가 없었다. 액체 배지에서 배양한 병원성 세균들은 접종 후 흘러내릴 수 있으므로 접종 방법은 그림 4(b)와 같이 절단면에 병원균을 고정시키는 방법을 선택하였다. 그림 4는 *p. atrosepcticum*, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *S. scabiei*를 접종하는 방법과 접종한 후 랩을 이용하여 시료를 감싼 모습을 보여준다. *p. atrosepcticum*는 내부에 발생하는 병원성 세균으로 그림 4(b)과 같이 씨감자의

중심에 집중하였으며, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *S. scabiei*는 표면 주변에 발생하는 병원성 세균으로 그림 4(c)와 같이 씨감자의 가장자리에 집중하였다.

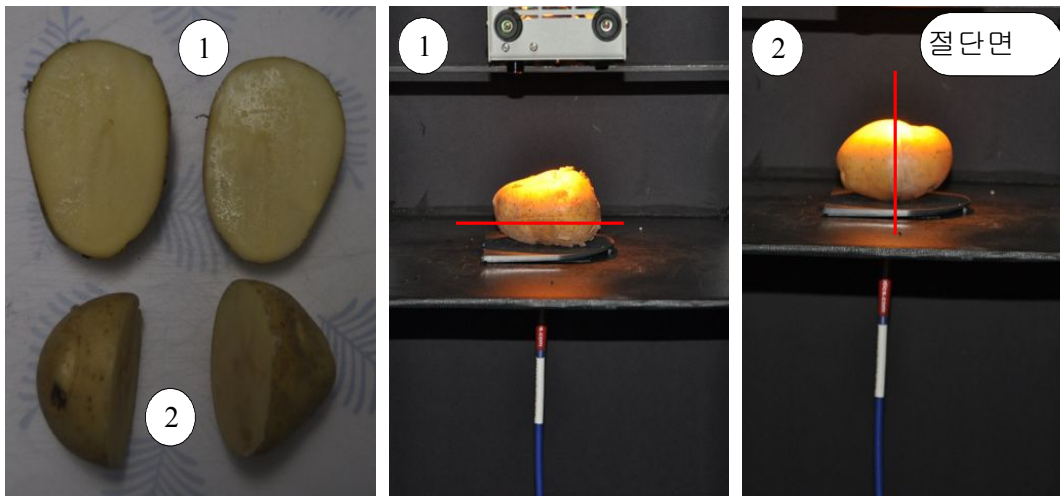
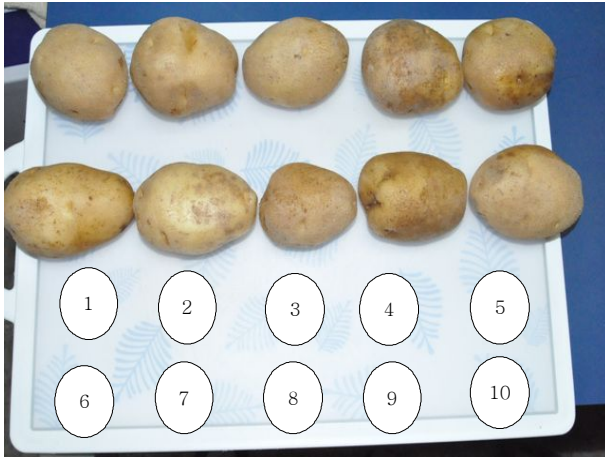


Fig. 3. Seed potatoes prepared in two types of cut and spectral measurements.



(a)



(b)



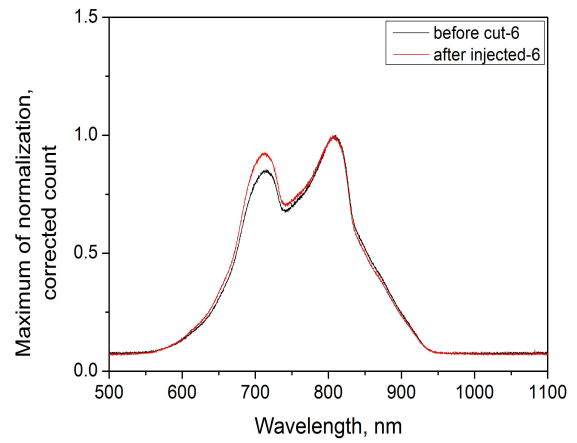
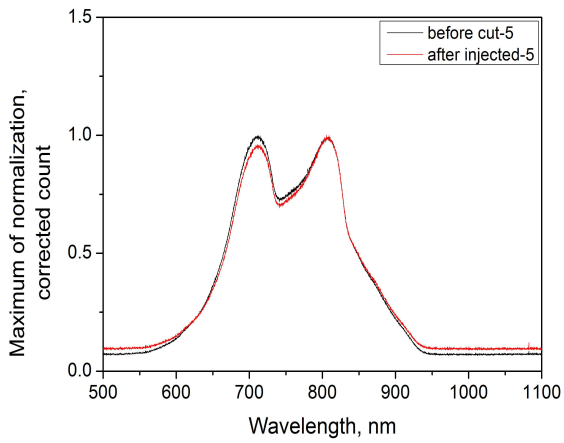
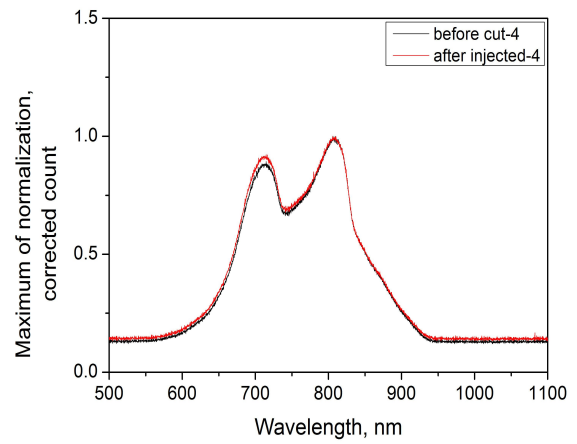
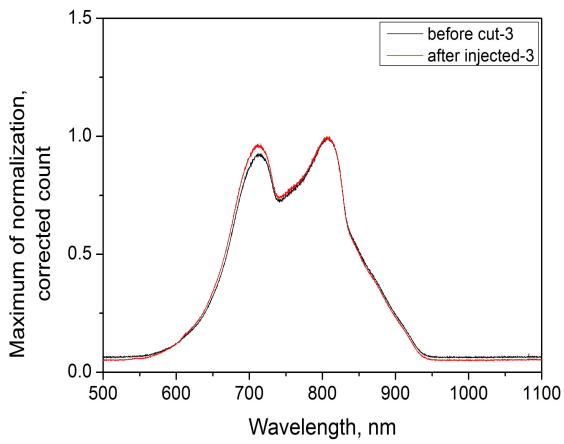
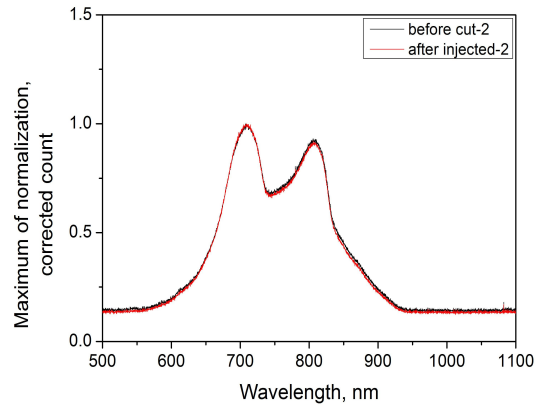
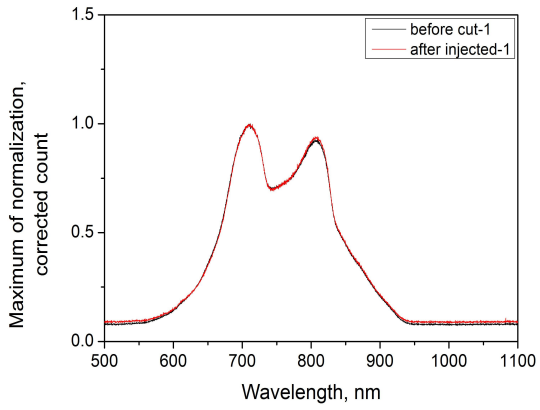
(c)



(d)

Fig. 4. Infection process for seed potatoes.

그림 5는 씨감자를 자른 후 병원성 세균을 접종하고 랩으로 감싼 다음 측정된 스펙트럼과 자르기 전 씨감자의 스펙트럼을 비교한 그림이다. 측정된 스펙트럼의 정확한 비교를 위하여 최대값을 이용한 정규화를 실시하고 패턴의 차이를 확인하였다. 그 결과 패턴의 차이가 오차범위 내에 있는 것으로 나타났으며 향후 분광분석에 적용할 감염 씨감자 제작형태로 절단 후 내부에 병원균을 접종하여 식품용 랩으로 절단면 주변으로 얇게 감싸는 것이 적합한 방법으로 판단하였다. 특히 씨감자의 절단면 부위에 감싸는 랩은 씨감자 스펙트럼 획득에 영향을 미치지 않지만 빛에 노출되는 랩을 최소화하기 위하여 얇게 감싸도록 하였다.



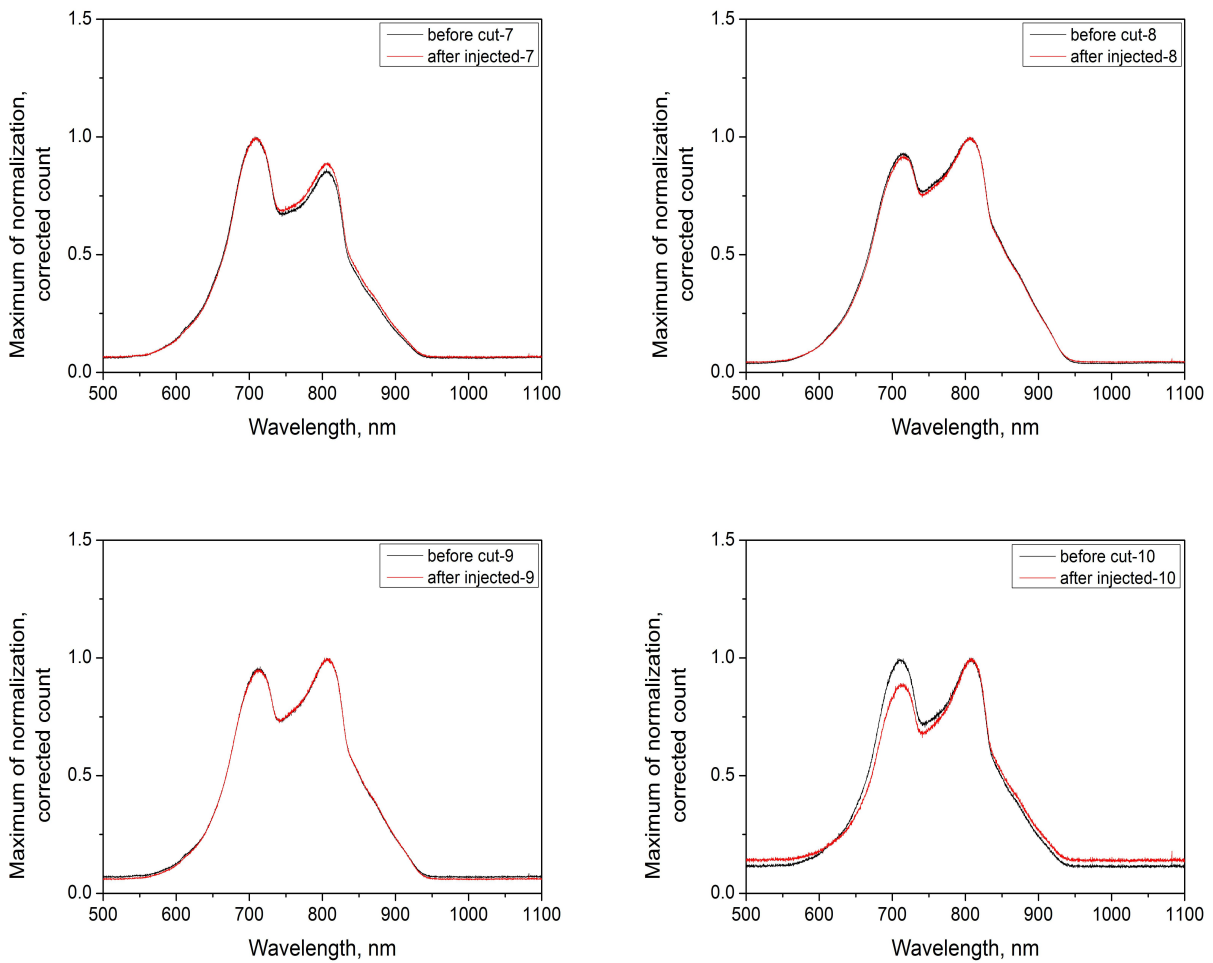


Fig. 5. Comparison with acquired transmittance spectra of seed potatoes after and before half cut.

나. 씨감자 시료를 위한 병원체 접종

강원도 감자종자진흥원으로부터 확보한 씨감자를 이용하여 실험 시료를 제작하기 위해 전처리 및 접종을 실시하였다. 전처리를 수행하는 것은 여러 경로에 의해 발생할 수 있는 교차 감염을 방지하고 접종한 병원체만 씨감자에 발생이 될 수 있도록 하기 위함이다. 전처리 과정은 그림 6과 7에 나타낸 것과 같이 세척, 살균, 건조 과정을 거쳤다. 준비한 씨감자의 표면에 묻어 있는 흙은 세균 및 곰팡이 등 병증을 유발할 수 있었으며 씨눈의 주변에는 흙이 있어 세척하기가 어려워 여러 번에 걸쳐서 세심한 세척이 필요하였다. 따라서 깨끗한 물에 1차로 흙을 제거한 다음 증류수로 2차 세척 후 200배 희석된 살균세제에 15분간 표면을 소독하였다. 그리고 무균실에 넣고 UV 램프를 이용하여 5분간 살균한 다음 씨감자 표면의 수분이 완전히 제거될 때까지 건조한 후 실험에 사용하였다.

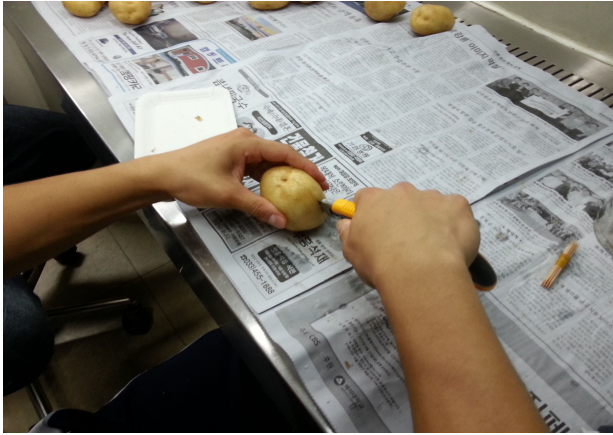


Fig. 6. Washing seed potatoes.



Fig. 7. Sterilized and dried seed potatoes using the UV lamp.

건조 과정을 거친 씨감자는 접종과정 중 실험실 환경에서 발생할 수 있는 교차 오염을 방지하기 위하여 무균실에서 접종을 실시하였다. 그림 8(a)과 같이 화염 소독된 칼을 이용하여 감자의 중심으로 반을 절단하였으며 각각의 시료를 제작할 때마다 기구의 소독 과정을 거쳤다. 그림 8(b)와 같이 잘라진 씨감자 표면에 미세한 구멍을 내어 접합한 후 배양액이 흘러나오지 않도록 중심부에 미세한 구멍을 만들었다. 그 다음 그림 8(c)와 같이 마이크로피펫을 이용하여 접종할 배양액을 일정량 상처부위에 뿌려 주었다. 접종은 세균 또는 곰팡이의 병증이 발현부위에 따라 씨감자의 내부중심 또는 껍질에 가까운 부위로 나누어 접종하였다. 접종 후 랩을 이용하여 절단면 주위로 얇게 감아 분광분석 측정당시 빛에 노출되지 않도록 하였다.



(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 8. Process of injection of seed potato in the bioclean room(a: cutting, b: making a hole, c, d: both sides injecting pathogen).

다. 병원체 감염 농도 결정

세균의 최소 발병농도를 확인하기 위해 *Pectobacterium atrosepticum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Streptomyces scabiei*를 각각 5.0×10^8 cells/ml, 6.2×10^6 cells/ml, 3.3×10^7 cells/ml을 1배, 2배, 4배, 8배로 희석하여 접종하였다. 그림 9와 같이 세균 균주를 농도별로 희석하여 접종한 결과 *P. atrosepticum*는 2배 희석액 이상에서 1일 만에 병증을 확인할 수 있었으며 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*는 가장 높은 농도에서 5일 후 병증을 확인할 수 있었다. 또한 *S. scabiei*는 1배 희석액에서 15일 후 약한 병증을 확인하였다. *S. scabiei*는 기내에서 발병이 어렵고 병증이 잘 나타나지 않아 이후 감자종자진흥원으로부터 더 텡이병에 걸린 감자를 공급받아 샘플을 만들었다.

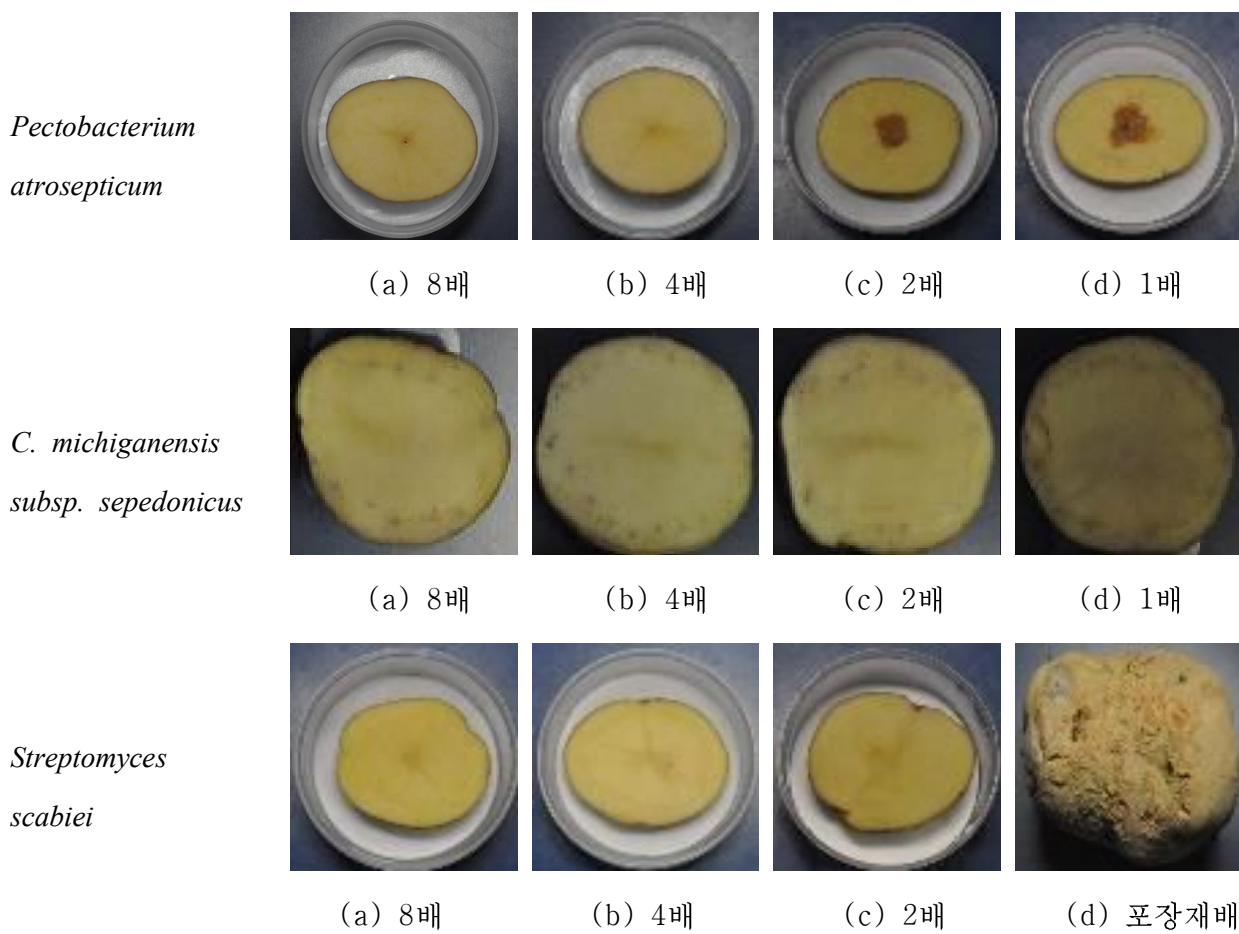


Fig. 9. Seed potatoes infected with *pectobacterium atrosepticum*, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, and *streptomyces scabiei*.

곰팡이의 접종은 그림 10(a) 그리고 10(b)와 같으며 곰팡이는 각각의 Agar pug를 접종하였다. 이후 포자현탁액을 만들어 곰팡이병 또한 농도별로 희석하여 최소 발병농도를 구하고 각각의 발병단계에서 씨감자의 내부 상태가 변하는 정도를 확인하였다. 곰팡이 균주를 Agar plug 접종한 결과 7일 이상 배양했을 때 확실한 병증을 확인할 수 있었다. 그림 10(c)와 10(d)는 곰팡이 접종 후 10일 이상 된 씨감자에서 발현된 곰팡이를 나타낸다. 이는 곰팡이의 배양온도가 낮은 범위에서 생육하므로 병증이 육안으로 관찰되기까지 더 많은 시간이 필요하기 때문이다.

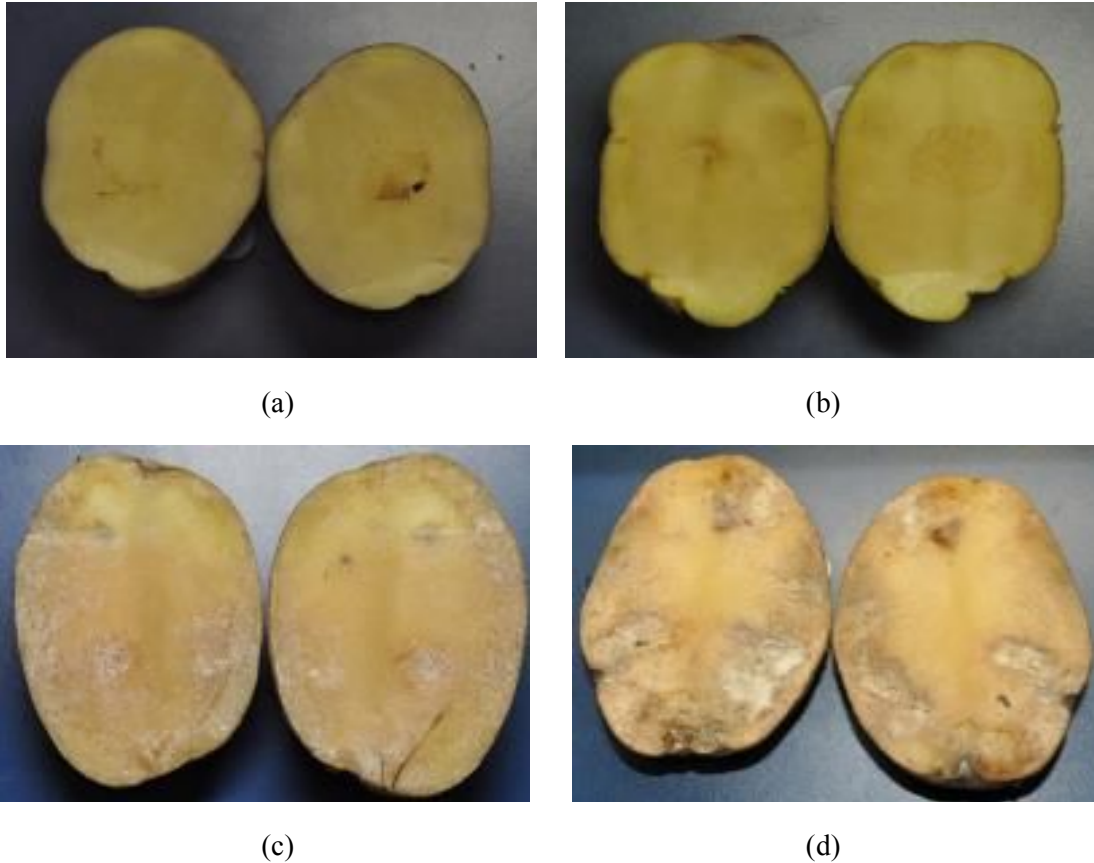


Fig. 10. Seed potatoes infected with fungi; (a) *Rhizoctonia solani*, (b) *Verticillium albo-atrum*, and after 10 days (c) *Rhizoctonia solani*, (d) *Verticillium albo-atrum*.

라. 시료의 제작 및 병원체 발현

앞에서 설명한 것과 같이 전처리된 씨감자를 이용하여 세균 및 곰팡이가 농도별로 접종된 총 160개의 감염 씨감자를 제작하였다. 또한 비교실험을 위해 정상 씨감자 30개를 준비하였다. 준비된 감염 씨감자는 그림 11과 같이 멸균된 용기를 준비하여 아래에 거름종이를 깔고 수분을 유지하기 위하여 증류수를 넣어 각각의 균주별로 최적의 온도를 유지할 수 있는 인큐베이터에 보관하였다. 그림 12는 부위에 따라 접종된 씨감자를 나타낸다.

*P. atroscopicum*은 감자의 중앙에 50 ul을 접종 하였고 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*은 감자의 껍질 가까운 부분에 피펫 팁으로 구멍을 뚫어 100 ul를 접종하였다. 또한 *S. scabiei*는 접종이 잘되지 않아 표면에 scratch를 내어 접종하였는데 접종 후 병증이 거의 나타나지 않는 경향을 보였다. 정상씨감자와 감염된 씨감자는 12시간 후 1차 스펙트럼을 측정하였고 그 후 2 ~ 3일 간격으로 투과 및 반사 스펙트럼을 측정하였다. 각각의 시료는 10일 동안 5회를 측정하였으며 측정된 스펙트럼은 감염 씨감자를 판별하는데 이용하였다.



Fig. 11. Seed potato in plastic container and samples stored in a constant temperature and humidity chamber.

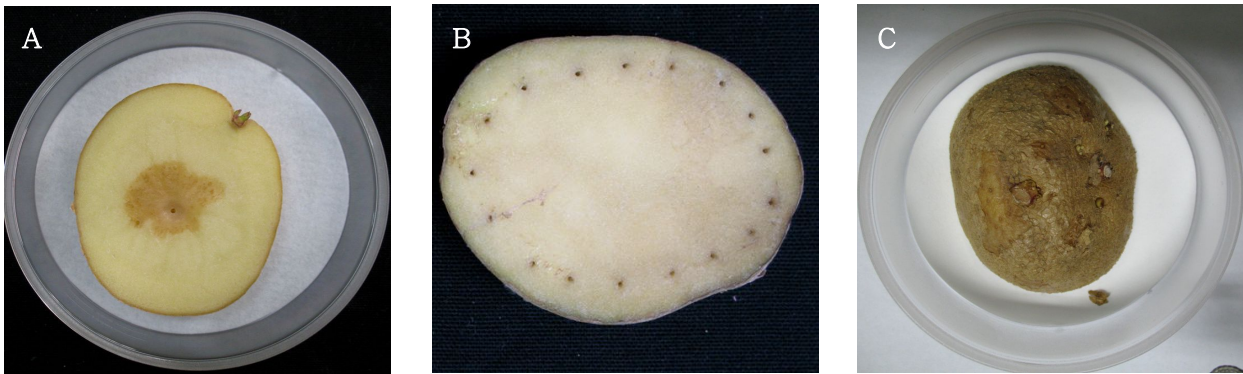


Fig 12. Samples infected with pathogens. (A) *P. atrosepticum*-inoculated, (B) *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*-inoculated, (C) *S. scabiei*-inoculated.

4. 시작기 구축과 정상 및 감염 씨감자 스펙트럼 분석

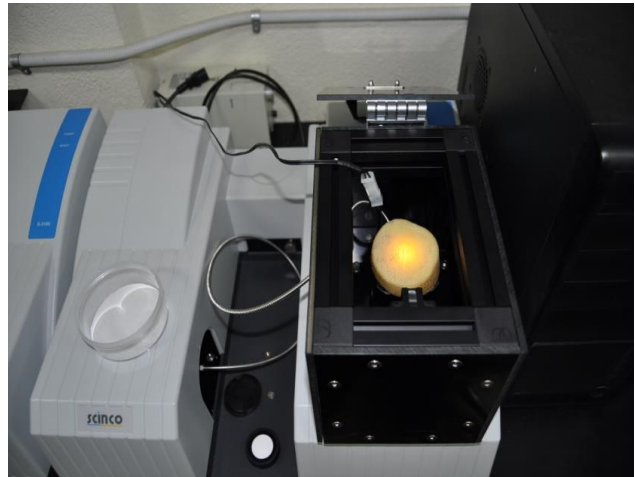
초기 기초연구로서 분광분석기술의 적용을 위한 1차 시작기를 제작하고 감염 씨감자 판별을 위한 기초 자료를 확보하였다. 기초연구를 바탕으로 하여 최종적으로는 현장에서 적용할 수 있는 실시간 온라인 선별 시스템을 개발하고자 하였다. 1차 시작기를 통해 씨감자가 병원균에 감염되었을 경우 병증이 발현되는 최소농도를 확인하고 감염이 진행되는 시간별로 분광정보를 획득하여 씨감자의 감염여부를 판별할 수 있는 측정기술을 개발하고자 하였다.

가. 실험에 이용된 장치 및 스펙트럼 획득부 구축

본 연구에서는 내부 및 외부에 발생하는 병증에 감염된 씨감자를 시료로 제작하였으므로 투과 신호와 반사 신호를 각각 측정할 수 있는 분광분석 장치를 이용하였다. 그림 13(a)는 휴대용 스펙트로스코피(USB4000, Ocean Optics)를 이용하여 투과방식으로 스펙트럼을 측정할 수 있는 실험 장치이고 그림 13(b)는 반사방식으로 스펙트럼을 측정하는 스펙트로미터(S-3100, SINCO. Co., LTD)를 나타낸다. 투과방식의 스펙트로스코피는 470 ~ 1150 nm의 파장대역을 측정할 수 있으며 파장간격은 0.2 nm이다. 반사방식의 스펙트로미터는 300 ~ 1100 nm의 파장대역을 측정할 수 있으며 파장간격은 1 nm 이다.



(a)



(b)

Fig. 13. Apparatus of (a) transmittance and (b) reflectance spectrometers used for the experiments.

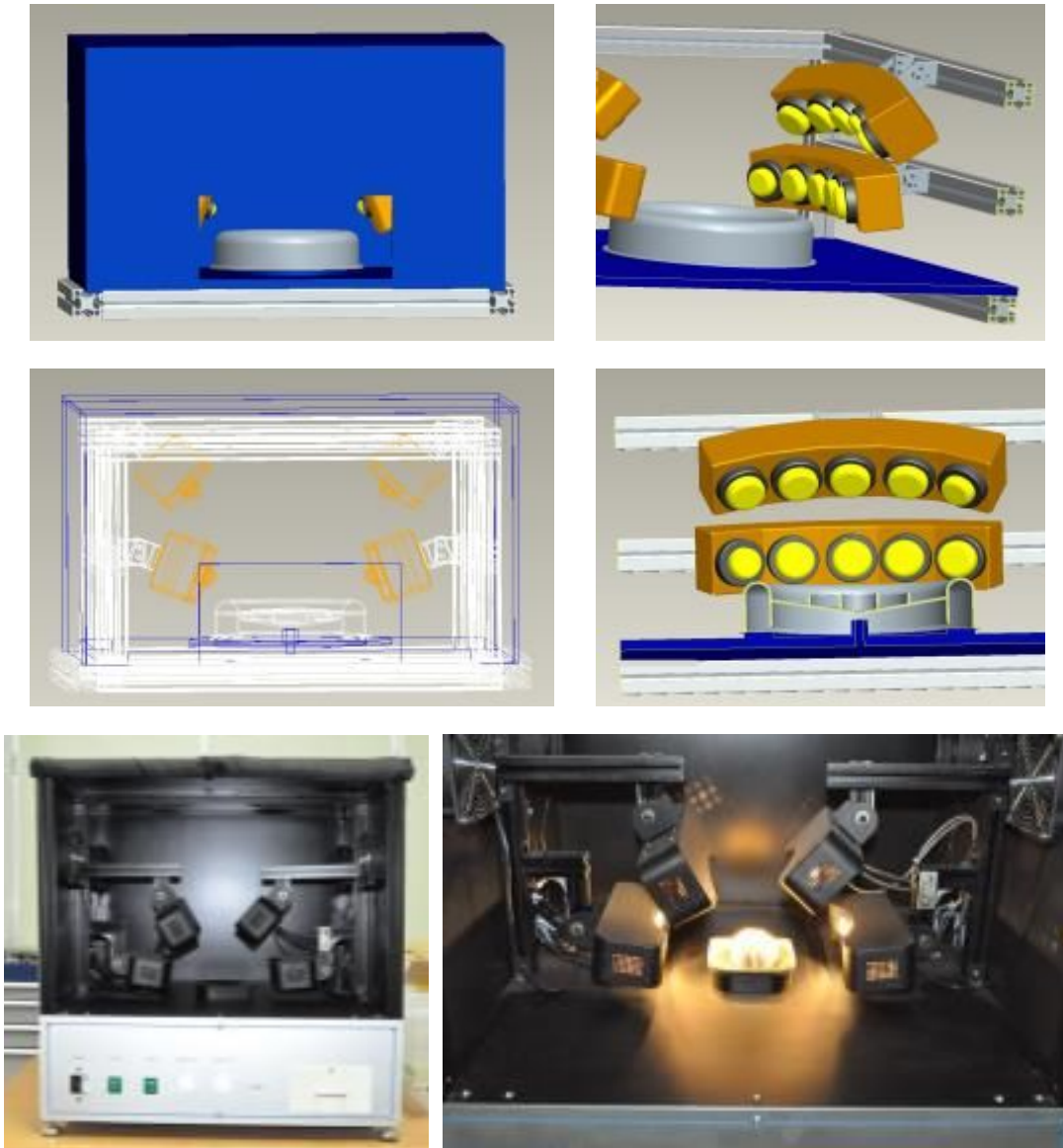


Fig. 14. Schematics of the prototype for the seed potato quality measurement system.

휴대용 스펙트로스코피를 이용하여 투과스펙트럼을 획득하기 위해 시료부 및 할로겐램프의 위치를 조정하고 외부 빛에 의한 영향을 배제할 수 있도록 분광분석 장치를 제작하였다. 그림 14는 개발된 기초 분광분석 장치 시스템을 나타낸다. 본 기초시스템은 최종 온라인 시스템에서 시료 투입부, 자동 이송부와 배출부를 제외한 스펙트럼 획득부에 해당하는 부분이다. 암실로 제작된 시스템의 내부는 중앙부에 시료를 올려놓을 수 있는 시료부를 설치하였고 시료부 바로 아래에 광섬유를 설치하여 투과된 광이 스펙트로미터로 전송될 수 있도록 하였다. 측정된 스펙트럼은 컴퓨터에 저장한 후 분석하였다. 암실의 내부에는 할로겐램프를 설치하여 근적외선 영역까지 스펙트럼을 측정할 수 있도록 하였다. 씨감자의 위치에 따라 감염된 부위의 검출 신호

가 달라지는 것을 최소화하기 위해 할로겐램프를 시료부 양쪽에 2단으로 설치하여 씨감자 전체를 고르게 비출 수 있도록 설계하였다. 또한 암실의 내부는 할로겐램프의 영향으로 내부의 온도가 올라갈 수 있으므로 양쪽 벽면에 쿨링팬을 설치하여 암실의 온도를 일정하게 유지할 수 있도록 제작하였다.

나. 정상 씨감자 및 감염 씨감자의 스펙트럼 분석

실험에 이용한 감염 씨감자는 저장기간 동안에 뚜렷한 병증의 변화를 확인할 수 있으므로 일정한 기간 동안 스펙트럼의 변화를 관찰하였다. 이는 병증이 발현되는 크기에 따라 선별이 가능한 수준을 판단하는 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 판단하였기 때문이다.

획득한 정상 및 감염 씨감자의 투과 및 반사 스펙트럼에서 스펙트럼의 시작부분과 끝부분에서 시료의 상태와 관계없이 노이즈가 발생하는 것이 확인되어 이 파장대역들을 분석에서 제외하였다. 따라서 분석에 사용된 파장대역은 투과 스펙트럼의 경우 500 ~ 1000 nm 영역을 이용하였고 반사 스펙트럼의 경우 400 ~ 1000 nm 영역을 이용하였다. 그림 15에서 보는 바와 같이 정상 씨감자는 저장기간 동안 육안으로는 거의 상태변화를 관찰할 수 없었으나 저장기간이 오래될수록 표면의 무름 현상이 진행되는 것을 촉감으로 확인할 수 있었다. 또한 저장기간 중 씨감자의 씨눈이 자라면서 내부의 영양분을 이용하게 되는데 실험용 씨감자를 안정적으로 보관할 수 있도록 씨눈이 발생할 때마다 제거하였다.

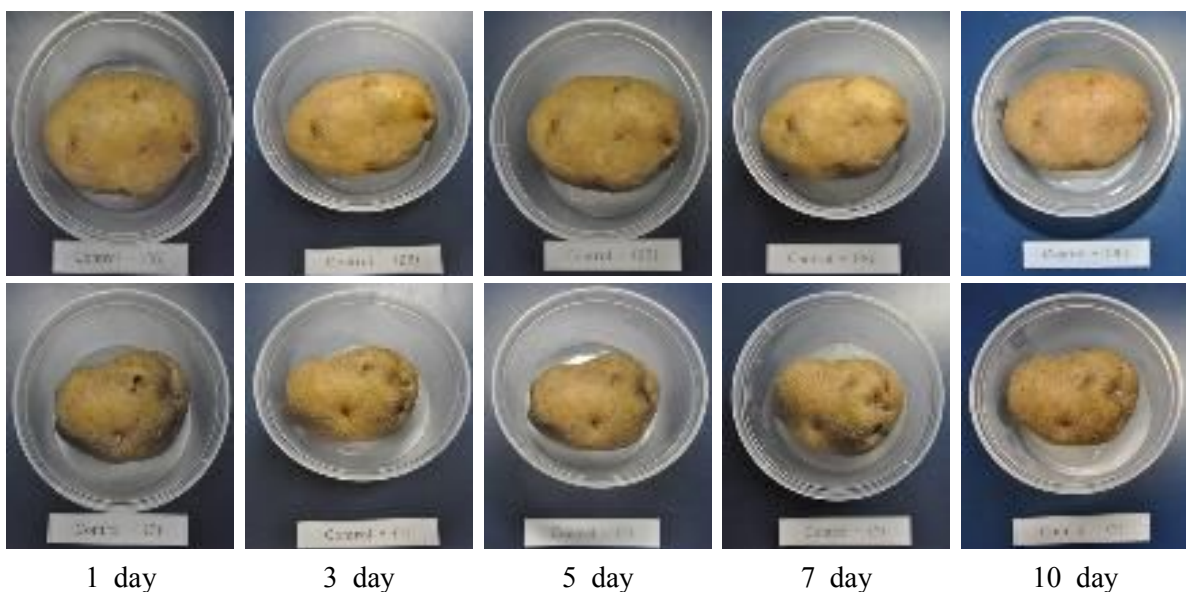


Fig. 15. Control seed potatoes during storage.

정상 씨감자를 측정된 투과 및 반사 스펙트럼을 그림 16과 같다. 그림 16(a)는 저장 전 씨감자의 투과 스펙트럼이고 그림 16(b)는 10일 저장 후 씨감자의 투과 스펙트럼이다. 그림 16(c)는 저장 전 씨감자의 반사 스펙트럼이고 그림 16(d)는 10일 저장 후 씨감자의 반사 스펙트럼이다. 정상 씨감자의 경우 저장된 10일 동안 표면에서는 전혀 병증을 확인할 수 없었으며 시료의 1번과 22번의 경우 패턴이 달라지는 투과 스펙트럼이 확인되어 조사한 결과 저장기간 동안 병증이 발생한 것을 확인할 수 있었다. 따라서 정상 씨감자 자료에서 1번과 22번의 스펙트럼을 제외시켰다. 그림 16의 투과 스펙트럼의 변화를 보면 저장 기간이 경과할수록 전체적으로 스펙트럼이 조금 낮아지는 경향이 관찰되었으며 특히 750 nm 이전의 스펙트럼에서 유의할 만한 변화가 관찰되었다. 이는 씨감자 내부의 수분이 감소하면서 세포의 부피가 작아질 뿐만 아니라 세포간의 결합이 약해져 씨감자의 내부에서 입사광의 난반사가 더욱 심해지게 되어 스펙트럼 강도가 낮아지기 때문인 것으로 판단된다.

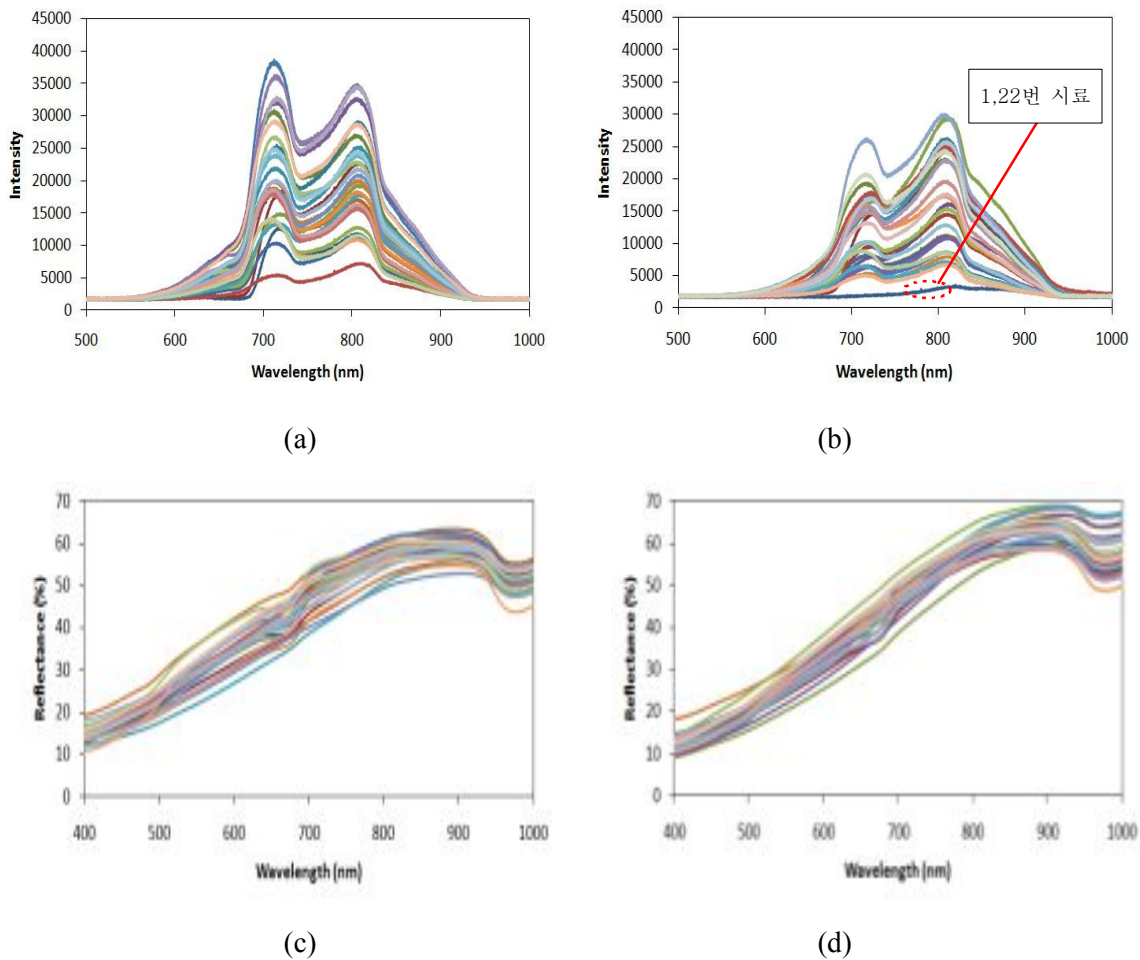


Fig. 16. Transmittance (a, b) and reflectance (c, d) spectra of sound seed potatoes before (left side) and after (right side) 20 days storage.

반사 스펙트럼의 경우도 저장기간이 경과됨에 따라 변화가 관찰되었으며 낮은 파장에서 높은 파장으로의 스펙트럼 기울기가 정상 씨감자에 측정된 스펙트럼보다 더 가파른 곡선을 나타내었다. 이는 투과 스펙트럼과 마찬가지로 저장기간이 증가함에 따라 씨감자 내부의 수분이 감소하여 나타나는 씨감자 표면조직의 변화와 관련이 있는 것으로 판단된다. 특히 병증이 발현된 1번과 22번 시료의 경우는 투과 스펙트럼과 달리 급격한 변화를 관찰할 수는 없었다. 따라서 반사 스펙트럼의 경우 내부 상태의 변화를 확인하는 데는 한계가 있음을 보였다.

그림 17은 *P. atrosepticum*을 접종한 씨감자의 투과 및 반사 스펙트럼을 나타낸다. *P. atrosepticum*은 병증의 발생이 하루가 지난 시점에서부터 육안으로도 뚜렷이 관찰될 만큼 병증의 진행이 빨랐으며 특히 투과 스펙트럼의 경우 정상 스펙트럼과 비교해 볼 때 스펙트럼의 강도가 현저하게 낮아지는 경향을 확인할 수 있었다. 스펙트럼이 변화는 감염된 부위를 중심으로 갈변이 일어나고 함몰되는 현상이 발생하면서 투과 스펙트럼의 흡수도가 증가하는 것이 원인으로 판단되었다.

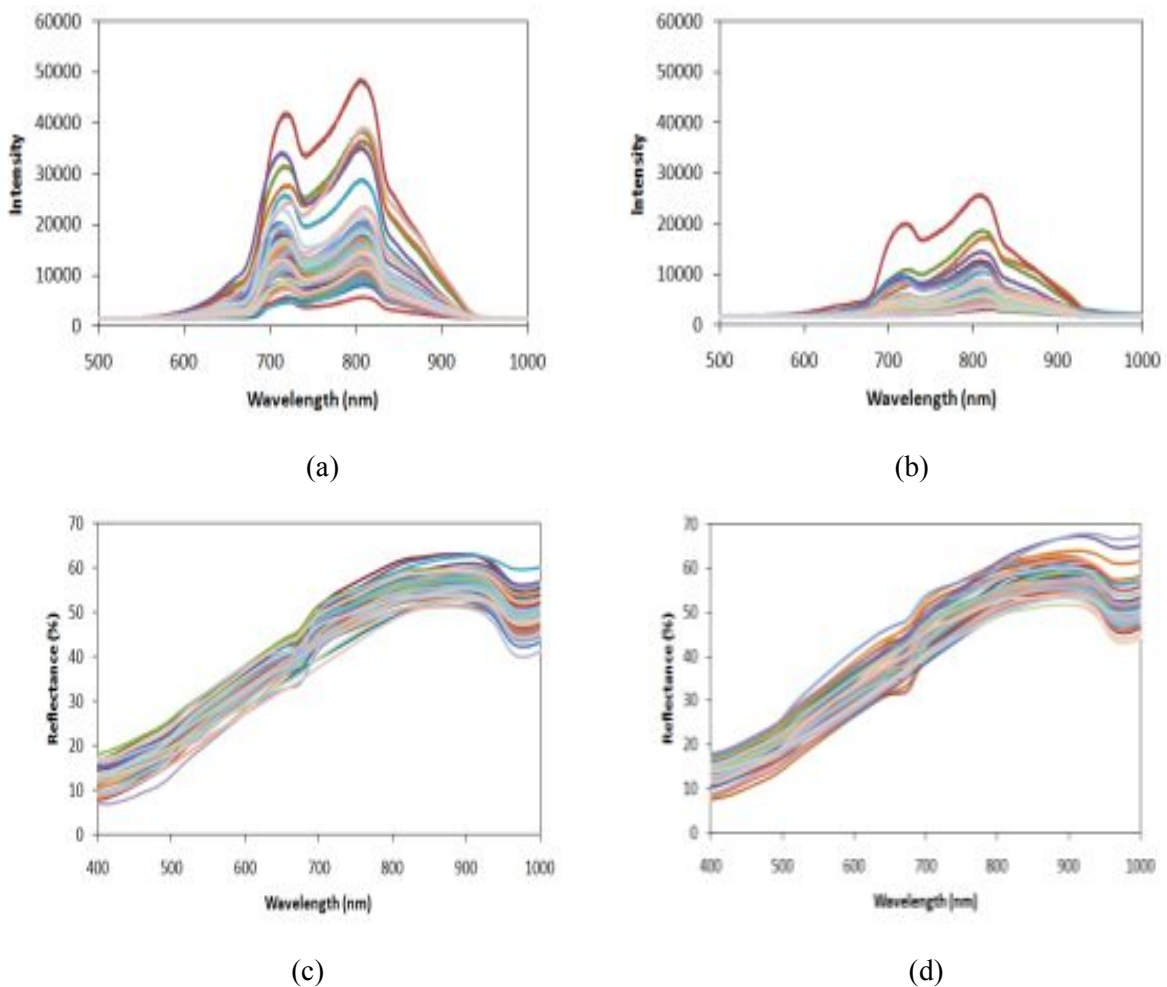


Fig. 17. Transmittance (a, b) and reflectance (c, d) spectra of seed potatoes infected by *P. atrosepticum* after 1 day (left side) and (right side) 10 days storage.


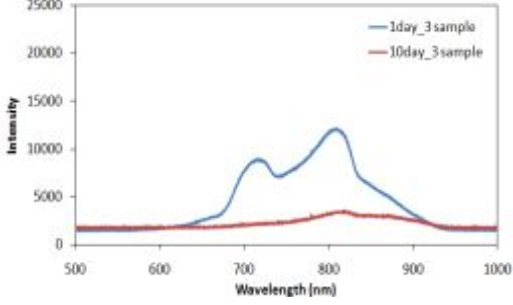

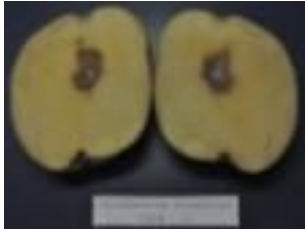
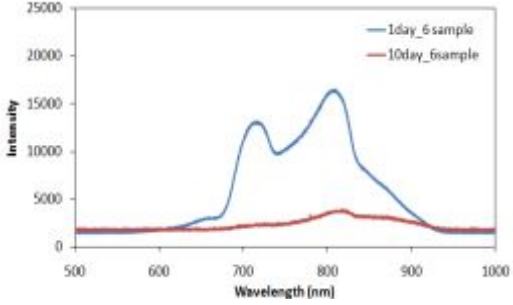


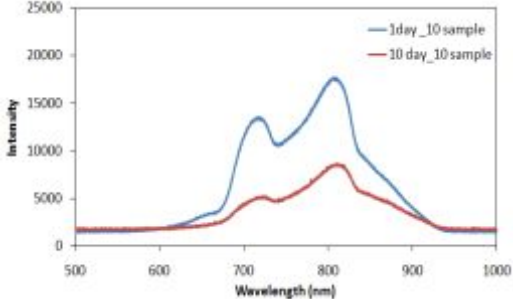

병증 등급	저장 기간	병증 발현 모습 (감자 무름병)	스펙트럼 변화
상	1day		
	10 day		
중	1day		
	10 day		
하	1day		
	10 day		

Fig. 18. Photos and representative spectra of seed potatoes infected by *P. atrosepticum* after 1day and 10 days storage.

그림 18은 병증의 발현 정도를 상, 중, 하로 나누어 측정된 투과 스펙트럼의 변화와 함께 나타내었다. 병증의 진행이 육안으로 관찰하였을 때 상과 중으로 판단되는 경우, 즉 접종 10일이 지난 후 측정된 씨감자의 스펙트럼은 거의 동일하게 나타났으며 하의 경우는 다소 초기 또는 정상 형태의 스펙트럼과 유사한 패턴을 나타내었으나 스펙트럼의 강도가 현저히 낮아짐을 확인할 수 있었다.

C. michiganensis subsp. *sepedonicus*를 접종한 씨감자의 투과 및 반사 스펙트럼은 그림 19와 같다. *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*도 *P. atrosepticum*와 비슷하게 접종 10일이 지난 후 측정된 씨감자의 스펙트럼은 투과도가 정상 스펙트럼에 비해 현저히 낮아짐을 확인할 수 있었다. 그림 20은 병증의 발현 정도를 상, 중, 하로 나누어 측정된 투과 스펙트럼의 변화와 함께 나타내었다. 병증의 진행이 *P. atrosepticum*의 경우보다는 뚜렷하지 않았지만 전체적으로 스펙트럼의 변화는 뚜렷이 관찰이 됨을 확인할 수 있었다.

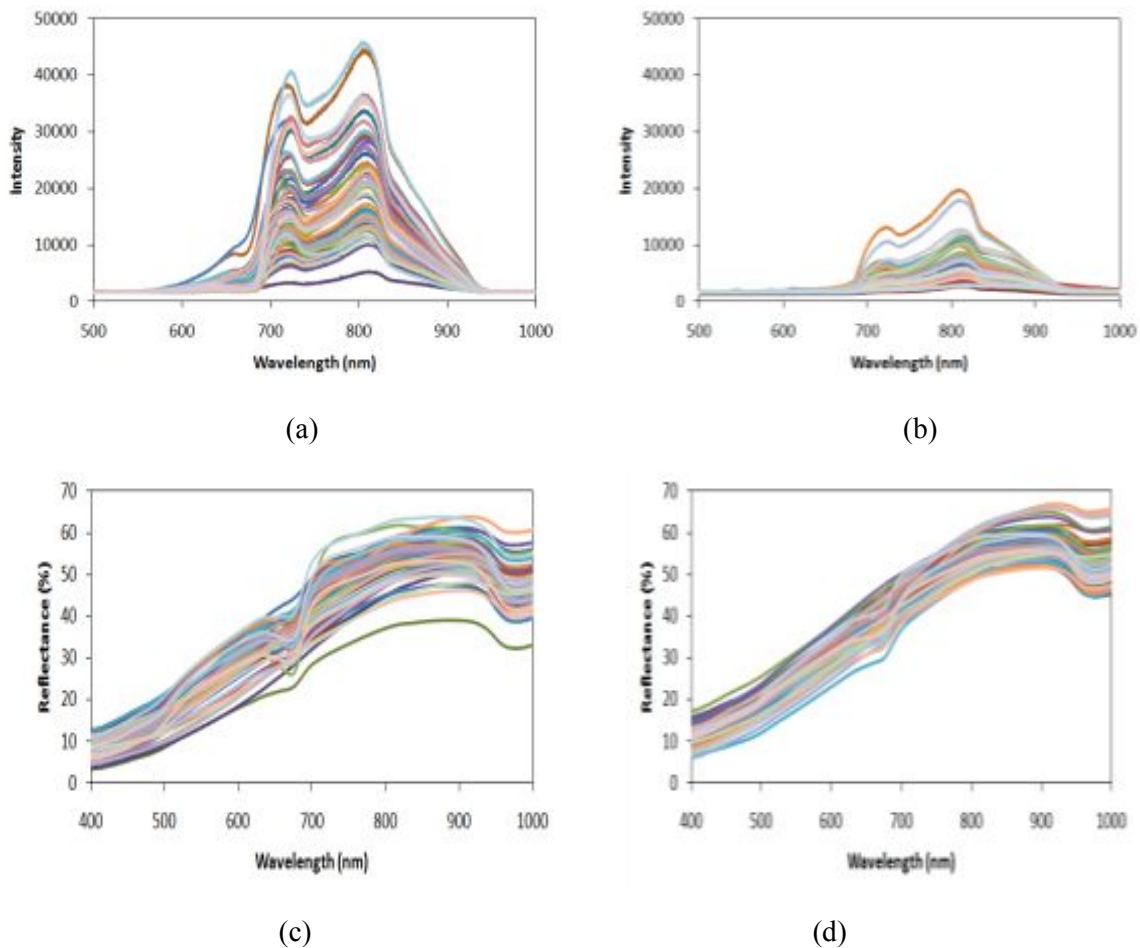


Fig. 19. Transmittance (a, b) and reflectance (c, d) spectra of seed potatoes infected by *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* after 1 day (left side) and (right side) 10 days storage.


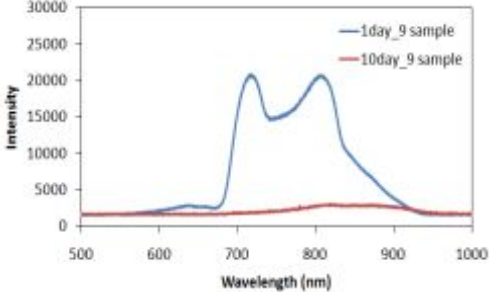


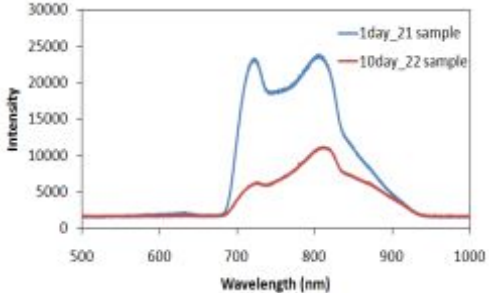


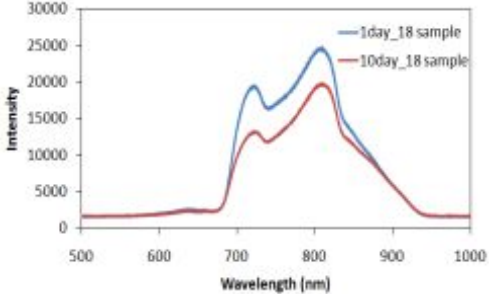

병증 등급	저장 기간	병증 발현 모습 (둘레썩음병)	스펙트럼 변화
상	1 day		
	10 day		
중	1 day		
	10 day		
하	1 day		
	10 day		

Fig. 20. Photos and representative spectra of seed potatoes infected by *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* after 1 day and 10 days storage.

*S. scabiei*는 감자더듬이병을 유발하는 병원균으로 주로 표면에서 발생되며 그림 21과 같이 감자종자진흥원에서 더듬이병에 걸린 씨감자를 가져와 측정을 하였다. 그림 22는 *S. scabiei*에 감염된 씨감자의 투과 및 반사 스펙트럼을 나타낸다. 특히 감자 더듬이병이 발현된 감염 씨감자의 반사 스펙트럼에서는 클로로필의 영향으로 알려진 680 nm 영역의 흡수 valley가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었으며 수분의 영향으로 알려진 960 nm 영역의 흡수 valley도 몇몇의 시료에서는 잘 나타나지 않는 것으로 관찰되었다.



Fig. 21. Seed potatoes infected by *S. scabiei*.

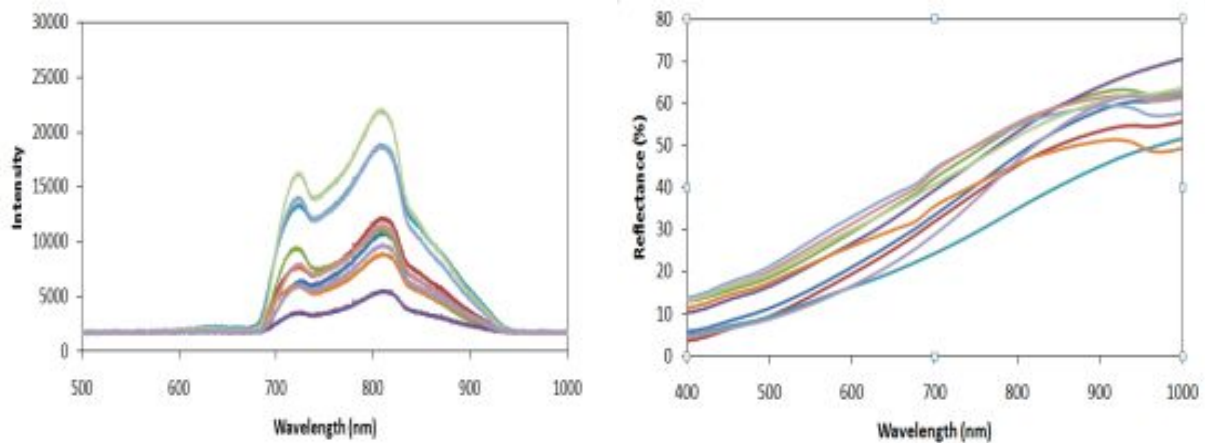


Fig. 22. Transmittance and reflectance spectra of seed potatoes infected by *S. scabiei*.

*Verticillium albo-atrum*을 접종한 투과 및 반사 스펙트럼은 그림 23과 같다. *Verticillium albo-atrum*는 곰팡이균으로 저온에서 최적의 생육조건을 가지며 병증의 진행이 다른 병원체보다 느리게 진행되는 특징이 있다. 따라서 씨감자에 접종할 경우 병증이 나타나는데 다른 병원균보다 오랜 시간이 소요될 것으로 판단하였다. 그림 23(b)와 같이 접종 10일 후 측정된 씨감자의 스펙트럼에서 뚜렷한 변화가 확인되었다. 그림 24는 병증의 발현 정도를 상, 중, 하로 나누어 측정된 투과 스펙트럼의 변화와 함께 나타내었다. 그림 25는 *Rhizoctonia solani*의 투과 및 반사 스펙트럼을 나타낸 것이며 접종 10일 후 병증의 발현으로 씨감자의 투과 스펙트럼이 전체적으로 약해지는 현상이 확인되었다. 그림 26은 병증의 발현 정도를 상, 중, 하로 나누어 측정된 투과 스펙트럼의 변화와 함께 나타내었다.

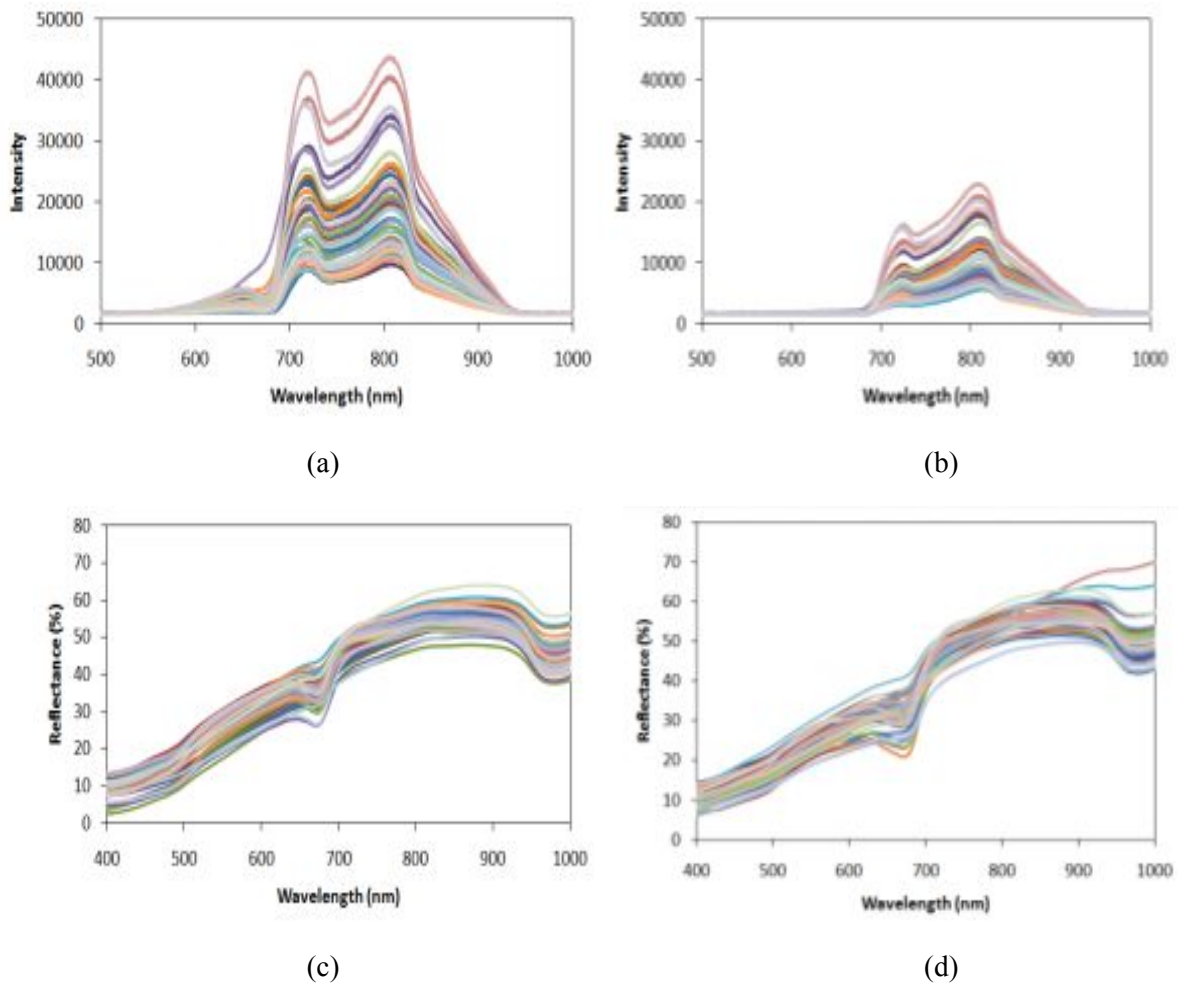


Fig. 23. Transmittance (a, b) and reflectance (c, d) spectra of seed potatoes infected by *Verticillium albo-atrum*. after 1 day (left side) and (right side) 10 days storage.


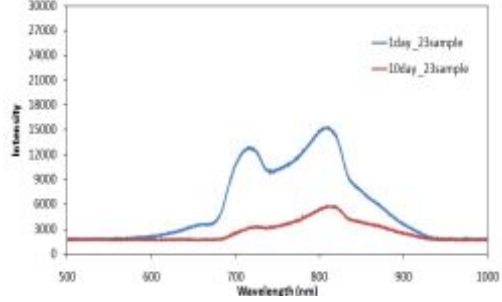


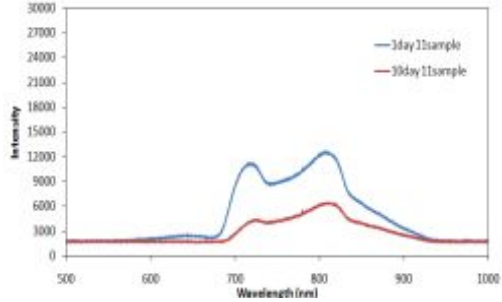
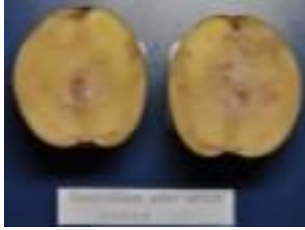

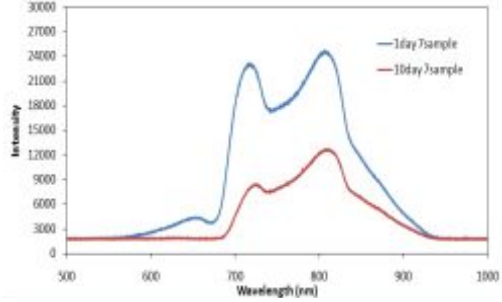

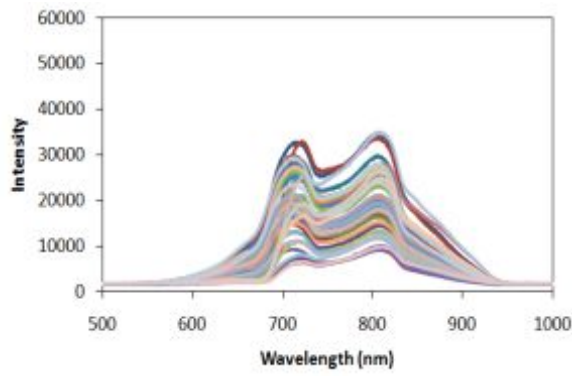
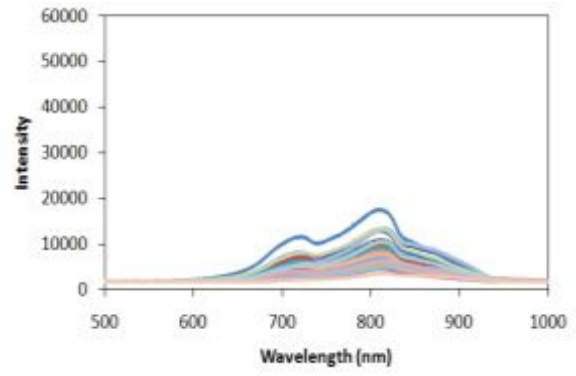
병증 등급	저장 기간	병증 발현 모습 (감자위조병)	스펙트럼 변화
상	1 day		
	10 day		
중	1 day		
	10 day		
하	1 day		
	10 day		

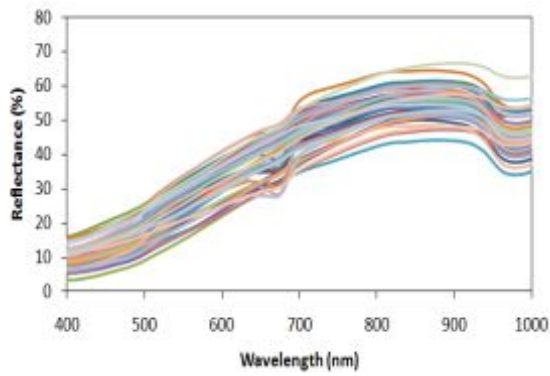
Fig. 24. Photos and representative spectra of seed potatoes infected by *V. albo-atrum* after 1 day and 10 days storage.



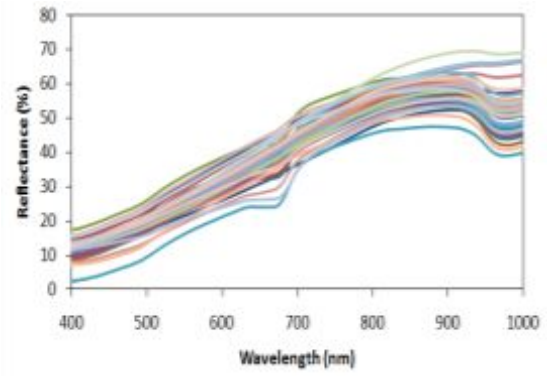
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 25. Transmittance (a, b) and reflectance (c, d) spectra of seed potatoes infected by *Rhizoctonia solani*. after 1 day (left side) and (right side) 10 days storage.


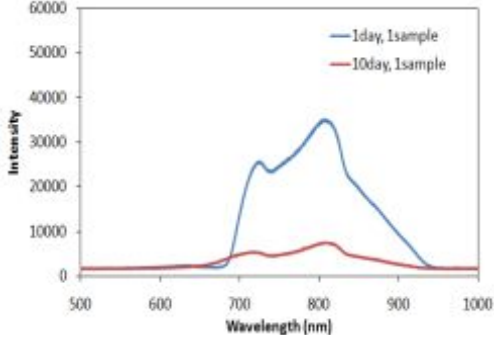


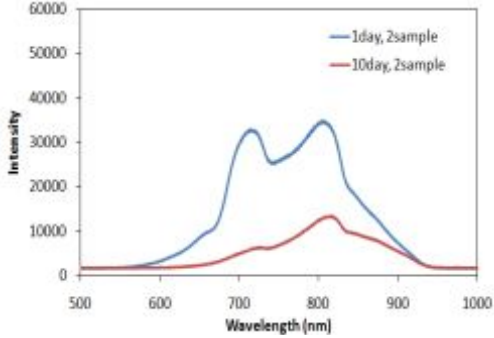


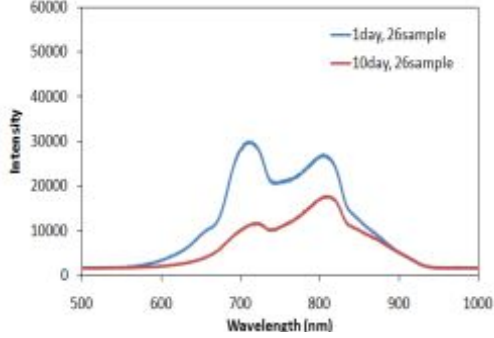

병증 등급	저장 기간	병증 발현 모습 (검은 무늬 썩음병)	스펙트럼 변화
상	1 day		
	10 day		
중	1 day		
	10 day		
하	1 day		
	10 day		

Fig. 26. Photos and representative spectra of seed potatoes infected by *Rhizoctonia solani* after 1 day and 10 days storage.

다. 투과 및 반사스펙트럼을 이용한 판별 부분 최소 자승법(PLS-DA)

정상 및 감염 씨감자의 투과 및 반사 스펙트럼을 이용하여 판별 부분최소 자승법(PLS-DA)을 수행하였다. 각각의 세균과 곰팡이가 접종된 감염 씨감자를 정상 씨감자와 구분하기 위해 접종 후 씨감자의 저장 날짜별로 분석을 수행하고 정확도를 비교하였다.

PLS-DA는 데이터를 training set과 test set의 일정한 비율로 나눈 후 training set에 의해 학습된 모델을 개발한 다음 test set에 개발된 모델을 적용하여 정확도를 예측하게 된다. 분석 툴은 다변량 분석 소프트웨어(Unscrambler 9.7, CAMO, Norway)를 사용하였다. 본 연구에서는 training set과 test set의 비율을 50:50으로 하여 모델식의 개발과 검증에 사용하였다. 표 3은 투과방식을 적용한 정상 씨감자와 감염 씨감자의 스펙트럼에 PLS-DA를 적용한 결과이며 표 4는 반사방식으로 측정된 씨감자의 스펙트럼에 PLS-DA를 적용한 결과이다. 투과방식을 이용한 PLS-DA의 결과는 1일차에서부터 높은 결정계수가 확인되었으며 병증이 진행될수록 결정계수가 높아져 정상 씨감자와 감염 씨감자의 판별 정확도가 향상되었다. 접종 10일째의 분석결과를 비교하면 감염된 병증들 중에서 가장 높은 예측은 0.969의 결정계수를 가지는 *P. atrosepiticum*였다.

투과방식으로 측정된 스펙트럼에서 곰팡이 균인 *V. albo-atrum*의 경우는 저온에서 생육하게 되며 병증의 진행이 천천히 진행되며 이러한 현상이 감염 씨감자를 판별하는 결정계수에서 반영됨을 확인할 수 있었다. 감염 1일차에서 7일차까지는 결정계수의 증가가 미미하게 나타나다가 7일차 이후에는 결정계수가 급격히 높아짐을 확인할 수 있었다.

Table 3. Results of calibration, validation and prediction of PLS discriminant analysis for sound and disease-infected seed potatoes with the transmittance spectra.

seed potato during storage period		Transmittance					
		Calibration		Validation		Prediction	
		R_c^2	SEC	R_v^2	SEP	R_c^2	SEC
<i>P. atrosepticum</i>	1 day	0.970	0.084	0.893	0.163	0.881	0.167
	3 day	0.941	0.117	0.523	0.344	0.662	0.281
	5 day	0.987	0.055	0.775	0.236	0.865	0.165
	7 day	0.996	0.027	0.910	0.149	0.929	0.128
	10 day	0.992	0.043	0.905	0.154	0.969	0.083
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	1 day	0.987	0.055	0.819	0.211	0.848	0.188
	3 day	0.962	0.094	0.796	0.224	0.811	0.201
	5 day	0.864	0.180	0.784	0.234	0.874	0.169
	7 day	0.988	0.051	0.965	0.093	0.944	0.107
	10 day	0.999	0.010	0.937	0.124	0.962	0.089
<i>R. solani</i>	1 day	0.944	0.118	0.788	0.236	0.819	0.212
	3 day	0.804	0.221	0.721	0.271	0.833	0.202
	5 day	0.925	0.136	0.814	0.220	0.884	0.162
	7 day	0.970	0.085	0.880	0.177	0.940	0.119
	10 day	0.996	0.030	0.904	0.159	0.962	0.093
<i>V. albo-atrum</i>	1 day	0.751	0.242	0.689	0.277	0.763	0.234
	3 day	0.988	0.051	0.657	0.291	0.850	0.186
	5 day	0.938	0.120	0.794	0.226	0.876	0.170
	7 day	0.988	0.051	0.969	0.086	0.875	0.165
	10 day	0.997	0.022	0.900	0.157	0.937	0.120
<i>S. scabiei</i>		0.992	0.038	0.681	0.268	0.827	0.187

Table 4. Results of calibration, validation and prediction of PLS discriminant analysis for sound and disease-infected seed potatoes with the reflectance spectra.

seed potato during storage period		Reflectance					
		Calibration		Validation		Prediction	
		R_c^2	SEC	R_v^2	SEP	R_c^2	SEC
<i>P. atrosepticum</i>	1 day	0.990	0.048	0.867	0.181	0.880	0.166
	3 day	0.977	0.072	0.855	0.189	0.882	0.163
	5 day	0.996	0.030	0.923	0.138	0.966	0.088
	7 day	0.994	0.034	0.903	0.153	0.922	0.135
	10 day	0.994	0.035	0.867	0.179	0.950	0.108
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	1 day	0.954	0.103	0.867	0.181	0.840	0.194
	3 day	0.980	0.068	0.796	0.224	0.843	0.191
	5 day	0.981	0.065	0.887	0.167	0.850	0.187
	7 day	0.948	0.110	0.821	0.210	0.903	0.147
	10 day	0.993	0.039	0.917	0.143	0.928	0.125
<i>R. solani</i>	1 day	0.962	0.094	0.895	0.160	0.796	0.218
	3 day	0.990	0.047	0.898	0.159	0.933	0.120
	5 day	0.995	0.031	0.851	0.192	0.867	0.170
	7 day	0.995	0.031	0.917	0.142	0.918	0.126
	10 day	0.999	0.006	0.810	0.217	0.919	0.136
<i>V. albo-atrum</i>	1 day	0.952	0.108	0.895	0.166	0.841	0.189
	3 day	0.983	0.064	0.846	0.201	0.917	0.142
	5 day	0.999	0.015	0.856	0.195	0.933	0.128
	7 day	0.999	0.015	0.905	0.158	0.955	0.104
	10 day	0.985	0.060	0.862	0.190	0.918	0.142
<i>S. scabiei</i>		0.875	0.159	0.832	0.195	0.512	0.304

표 4의 반사방식을 이용한 PLS-DA의 분석결과에서 결정계수는 투과방식에 비하여 낮은 수치를 나타내었다. 또한 병증의 발현이 가장 많이 진행된 10일차의 결정계수보다 다른 날짜에서 간혹 높은 결정계수가 나타났다. 이것은 내부의 병증 보다는 표면이나 표면에 가까운 내부의 변화에 영향을 많이 받아 병증 예측에 일관성이 떨어지는 것으로 판단되었다. 투과방식과 반사방식의 분석결과를 비교하면 투과 스펙트럼은 전체의 씨감자를 투과하는 광을 이용하는 반면

반사 스펙트럼은 씨감자 일부분(주로 가장자리)에서의 반사광을 주로 이용하게 되므로 투과광을 통해 얻어지는 스펙트럼이 반사광에 의해 얻어지는 스펙트럼보다 더 신뢰성 있는 내부병증에 대한 정보를 제공하게 된다.

그림 27은 10일차 되는 시료들의 투과 스펙트럼에 대한 PLS-DA 예측결과를 나타낸다. 예측 결과에 따르면 잘못 판별되거나 불확실한 결과를 나타내는 경우는 발견되지 않았으며 7일째 이상의 측정결과에서는 모두 정확도가 100 %로 확인되었다. 정상 씨감자보다 감염 씨감자에서 보다 균일한 정확도를 나타내는 것으로 확인되었다.

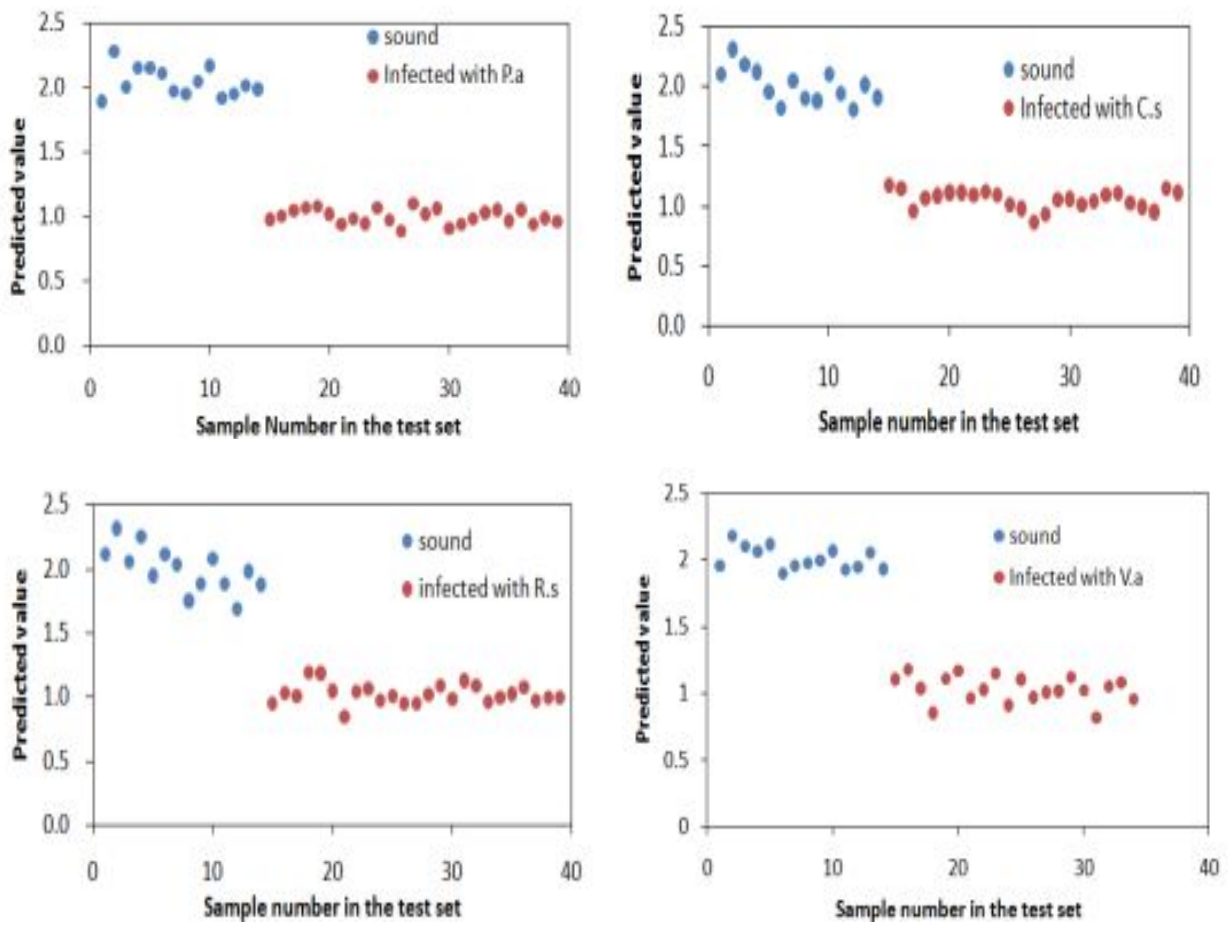


Fig. 27(a). PLS-DA prediction results of sound and infected seed potatoes stored for 10 days

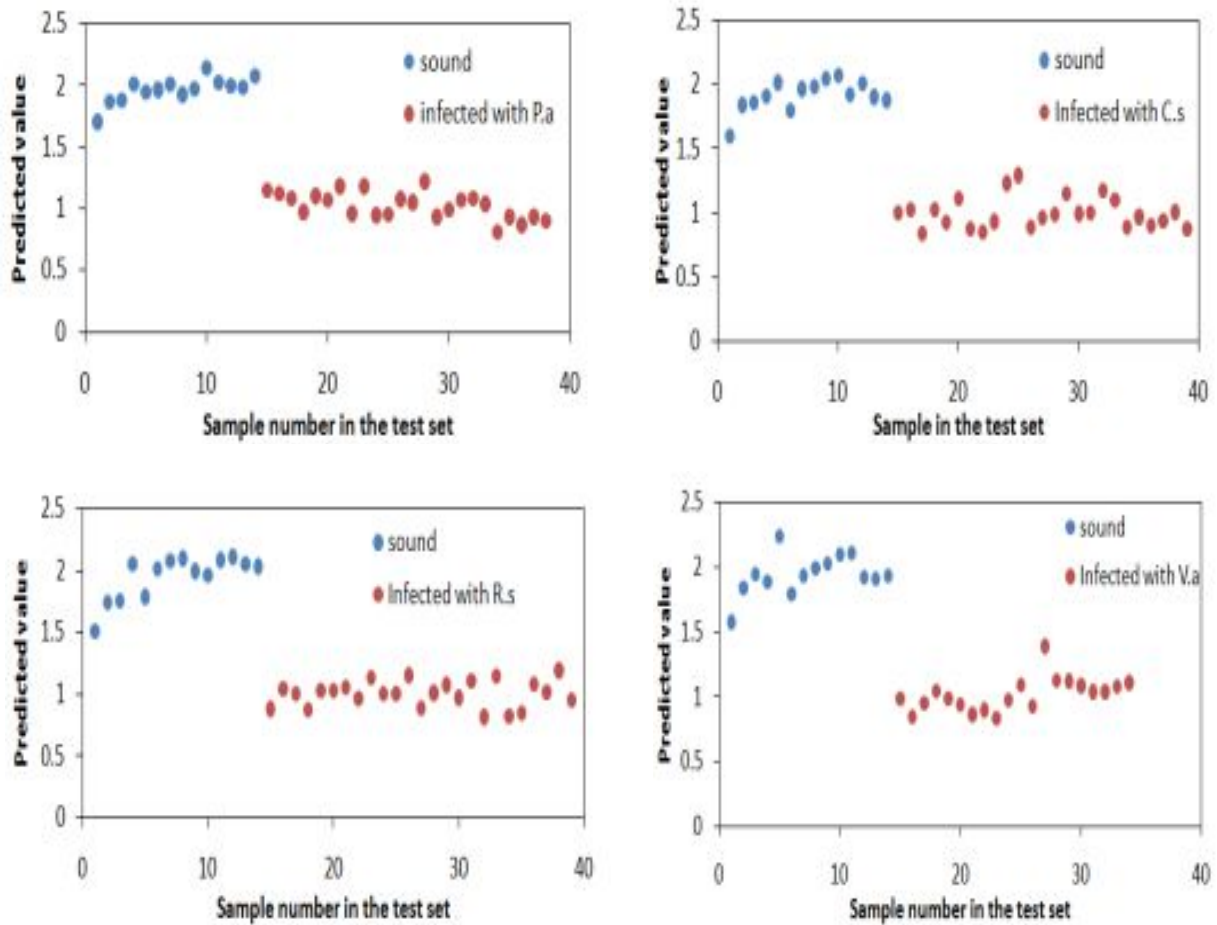


Fig. 27(b). PLS-DA prediction results of sound and infected seed potatoes stored for 10 days

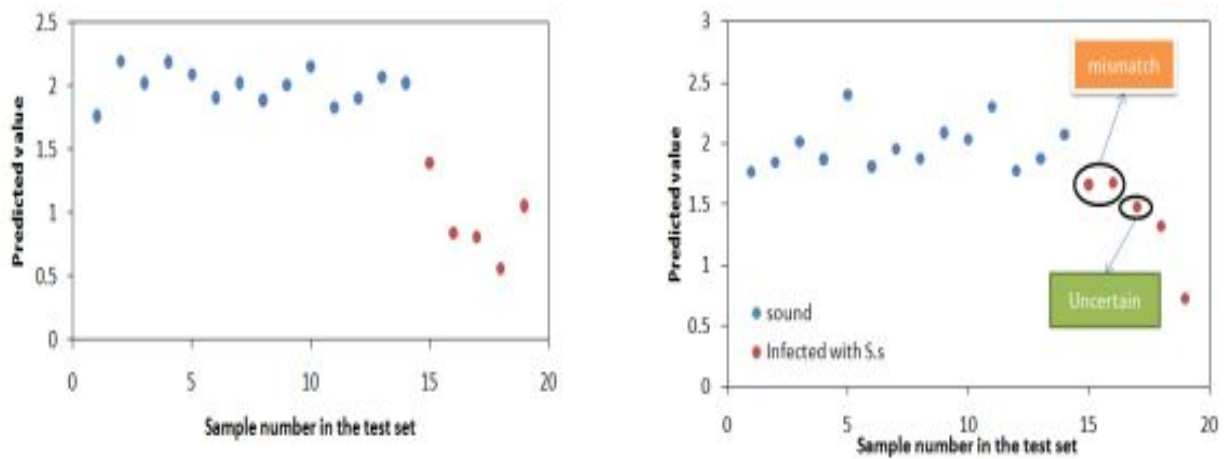


Fig. 28. PLS-DA prediction results for the transmittance and reflectance spectra of the sound and infected seed potatoes by *S. scabiei*.

그림 28은 *S. scabiei*에 감염된 씨감자의 투과 및 반사 스펙트럼에 PLS-DA 분석법을 적용한 결과이다. *S. scabiei*에 감염된 씨감자 역시 반사방식보다 투과방식이 더욱 높은 결정계수를 나타내었다. 그림 28에서 투과방식의 경우 변위 폭이 컸지만 정상 씨감자와 감염 씨감자의 구분이 명확했다. 그러나 반사방식의 경우 잘못 판단된 데이터나 불확실한 데이터가 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로 투과에 의한 측정방식이 반사에 의한 측정방식보다 더 신뢰성 있는 예측결과를 제공한다는 것을 보여주었다.

본 연구에서는 씨감자의 병증이 육안으로 관찰되지 않는 내부에서 발생하는 경우와 표면에서 발생하는 두 가지 경우에 대하여 투과 스펙트럼과 반사 스펙트럼으로 검출여부를 조사하였다. 반사의 경우 광투과가 제한적으로 이루어져 내부 병증의 측정에 한계가 있는 것으로 나타났으며 높은 정확도를 기대하기 어려웠다. 투과방식을 이용하는 분광분석방법이 씨감자의 내부 감염여부에 대한 보다 신뢰성 있는 예측결과를 제공하는 것으로 판단되었다.

제 2 절 초분광 영상을 이용한 감염 씨감자 선별 연구

1. 내·외부 감염 씨감자 제작

가. 씨감자 시료의 전처리 과정

강원도 감자종자진흥원으로부터 확보한 씨감자는 포장 재배되어 바이러스나 다른 병원균으로부터 감염이 거의 없는 상태이다. 그러나 다양한 경로에 의해 곰팡이, 세균 등이 미세하게 발생되어 실험이 진행 중인 씨감자에 영향을 줄 수 있으므로 시료로 준비한 씨감자를 그림 29와 같이 세척, 살균 등의 전처리 과정을 거쳐 사용하였다.

씨감자는 표면에 묻어있는 세균 및 곰팡이 등에 의해 병증이 유발되거나 교차오염이 발생할 수 있으므로 평평한 표면뿐 아니라 씨눈 주변 등 흠이 있는 부분을 주의하여 여러 번 세척하였다. 깨끗한 물을 이용하여 1차로 세척한 다음 증류수를 이용하여 재차 세척하였다. 그림 29에 나타낸 바와 같이 세척 후 물기를 일부 제거한 다음 무균실에 넣고 UV 램프를 이용하여 5분간 아래위 방향을 바꿔주며 살균을 한 다음 씨감자 표면의 수분을 완전히 제거한 후 감염 씨감자 제작을 위한 시료로 사용하였다.



Fig. 29. Washing process and Sterilizing seed potatoes using UV lamps.

나. 씨감자 병원체 접종 방법

시료 제작에 사용된 각각의 균주는 4 종류로 세균병 균주인 *Pectobacterium atrosepticum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*와 곰팡이병 균주인 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp.는 Korean Agriculture Culture Collection (KACC)에서 분양받아 사용하였다(표 5). 무름병 균주인 *P. atrosepticum*은 NB (Nurient Broth)배지에서 28°C, 압조건에서 진탕배양 하였으며, 감자 둘레썩음병 균주인 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*는 배양온도가 26°C 이상이 되면 생육 저하 현상이 나타나기 때문에 TSB (Tryptic Soy Broth)배지 24°C에서 진탕배양 하였다. 또한 곰팡이병 균주인 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp. 균주는 PDB (potato Dextrose Broth)배지를 사용하여 26°C에서 14일간 진탕배양 하여 포자현탁액을 만들어 접종 하였다.

Table 5. Plant pathogens used in this study and their host plant.

Pathogen	Name of the diseases	KACC accession No.
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Soft rot	KACC 10532
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	Ring rot	KACC 20123
<i>Rhizoctonia solani</i>	Rhizoctonia canker	KACC 40137
<i>Fusarium</i> sp.	Fusarium dry rot	KACC 40050

다. 최적 시료 제작을 위한 최소발병농도 확인

세균병의 최소발병농도를 확인하기 위해 강원도 감자종자진흥원에서 분양 받은 건전한 씨감자에 *Pectobacterium atrosepticum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*를 각각 5.0×10^8 cell/ml와, 6.2×10^6 cells/ml 농도로 배양하여 1배, 2배, 4배, 8배로 희석하여 접종하였다. *P. atrosepticum*은 감자의 중앙에 50 μ l 접종하였고 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*은 감자 표피의 조금 안쪽에 pipet의 tip으로 구멍을 뚫어 100 μ l를 접종하였다. 이때 희석은 증류수를 이용하여 배수희석법으로 실시하였다. 또한 곰팡이병 균주인 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp.는 배양원액과 그 2배 희석액, 4배 희석액, 8배 희석액 각각, 2.5×10^8 cells/ml, 1.2×10^8 cells/ml, 6.2×10^7 cells/ml 그리고 3.1×10^7 cells/ml의 4 처리구로 나누어 접종하였다. 곰팡이 균주의 접종은 포자현탁액을 만들어 12시간 침지하여 표면접종 하였다.

그림 30은 다양한 방법으로 접종한 사진을 나타내었는데 이는 농도별로 접종한 병원균의 감

염 상태 및 최적의 감염 씨감자 제작을 위한 것이다. 그림 30(a)는 slice 형태이며 그림 30(b)는 씨감자의 half cut한 사진이고 마지막의 그림 30(c)는 conical 모양의 도구를 이용하여 접종하는 3 가지 방법을 나타낸 것인데, 각각은 병반의 크기를 확인할 수 있어 최소 농도를 나타낼 수 있었으며 시료로 이용할 최적의 감염 씨감자를 확인할 수 있었다.



Fig. 30. Different inoculation methods of bacterial pathogen *P. atrosepticum* on seed potatoes ;(A) slice cut, (B) half-cut and (c) conical shape tool.

표 6과 그림 31과 32에 나타난 바와 같이 무름병의 원인균인 *P. atrosepticum*은 배양 원액으로 접종하였을 때, 1일 만에 3.2 mm 의 병반이 발생함을 관찰할 수 있었으며, 7일 경과 후에는 접종한 감자 전체로 병반이 확대되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 증류수로 8배 희석한 배양액을 접종하였을 때 3일 경과 후 육안으로 병증을 관찰할 수 있었으며, 9일 경과 후에도 13.1 mm의 병반크기를 보임을 확인할 수 있었다. 또한 *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*는 증류수로 4배 희석하였을 때 7일 경과 후 병증을 육안으로 관찰할 수 있었다. 또한 식물 병원 진균인 *R. solani*와 *Fusarium* sp.는 4배 희석액에서 각각 7일과 3일 경과 후 병증을 육안으로 관찰할 수 있었다.

Table 6. Ring rot lesion size in diameter caused by bacterial pathogens *p. atrosepticum* on seed potato.

Concentration	Days after inoculation						
	Control	1	3	5	7	9	
5×10^8 cells/ml	Original	0	3.2 ^a	5.4	10.7	whole	whole
	2 fold dilution	0	1.5	4.2	7.1	11.2	19.7
	4 fold dilution	0	0	3.1	4.5	7.6	14.5
	8 fold dilution	0	0	2.0	4.2	6.9	13.1

^a Unit : mm

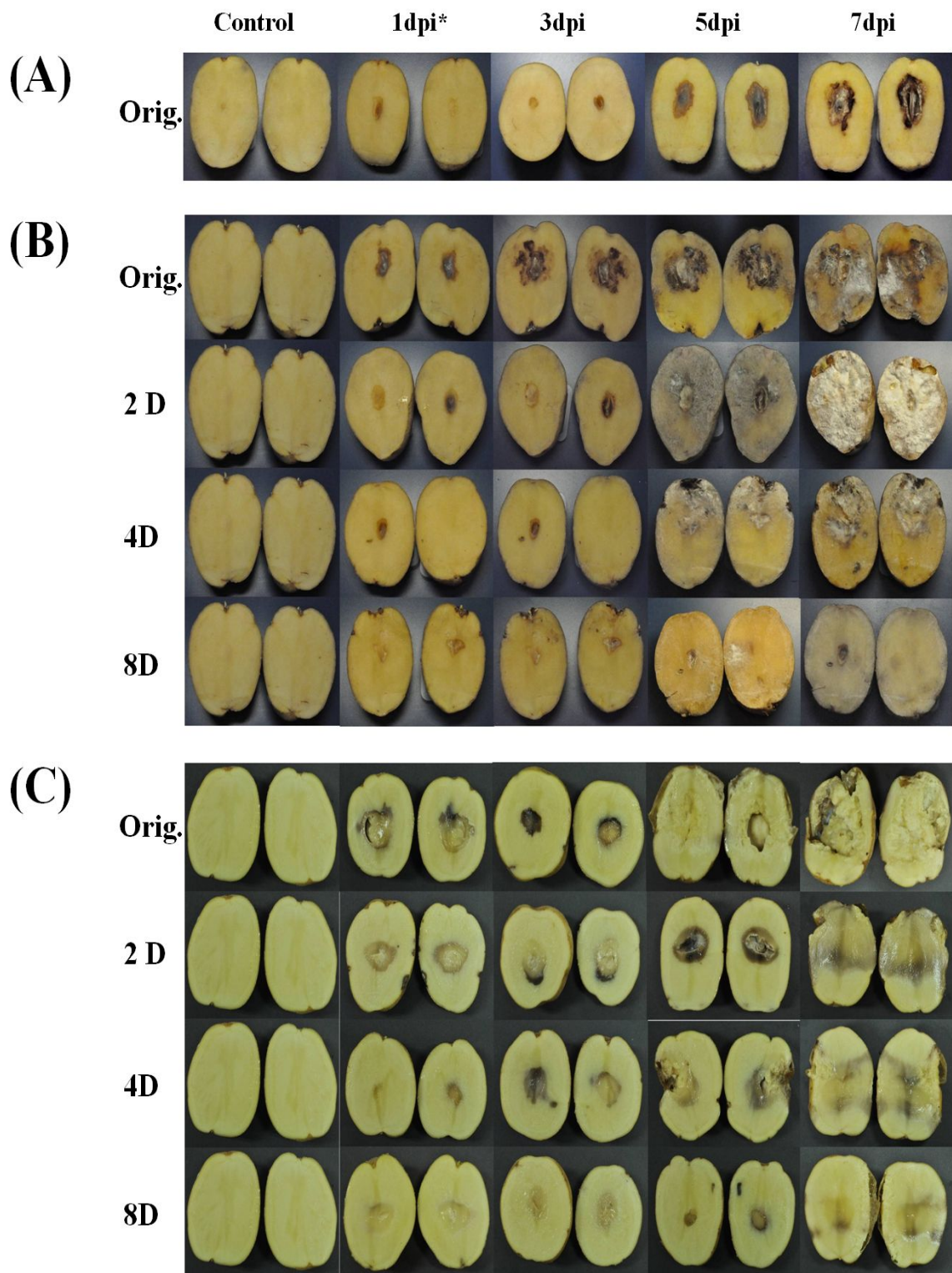


Fig. 31. Comparison of symptom development of bacterial pathogen *P. atrosepticum*(C) inoculated with different methods on potatoes in two days of interval; (A) slice, (B) half-cut, and (C) conical shape cut.

*dpi; days per inoculation of bacterial pathogen

*(Orig.) Original, (2D) 2 folds dilution, (4D) 4 folds dilution and (8D) 8 folds dilution.

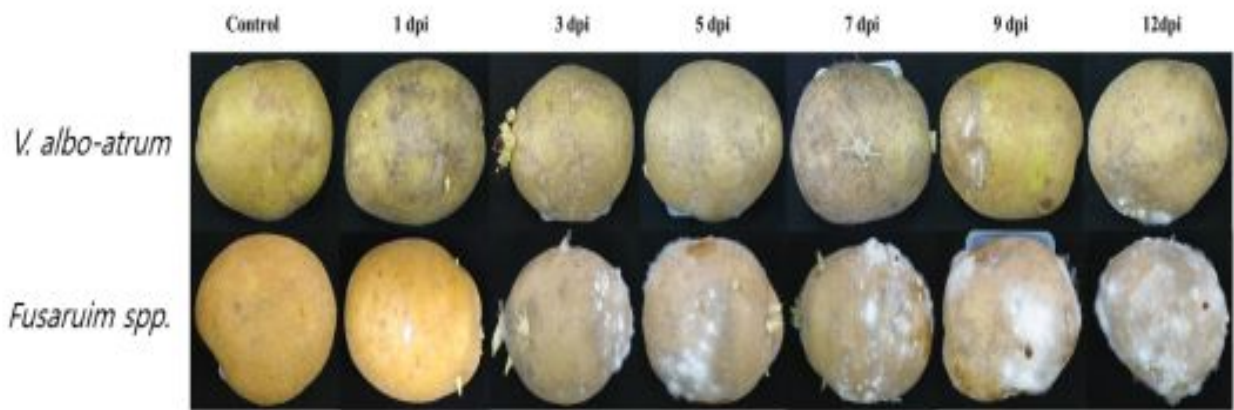
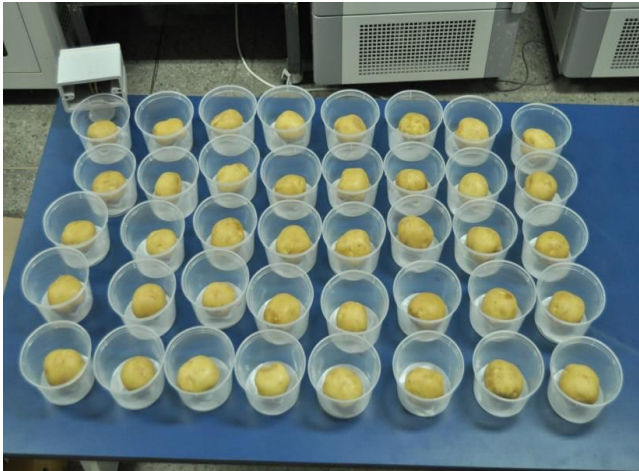


Fig. 32. Representative infected potatoes by fungal pathogens, *V. albo-atrum* and *Fusarium* spp. inoculated on potatoes.

씨감자 병해의 비파괴 신속진단을 위하여 인위적으로 씨감자에 병원균을 효율적으로 접종하기에 적합한 방법을 결정하기 위하여 3가지 방식으로 비교한 결과 괴경 내부에 접종하는 것은 세균 및 다른 진균에 의한 교차오염의 위험이 큰 반면 표면살균 후 포자현탁액을 만들어 감자의 표면에 포자 형태로 접종하는 것이 가장 효율적이고 적합한 접종 방법이었으며, 세균균주의 접종 방법으로 가장 효율적인 것은 conical shape cutting으로 감자의 중심부까지 도려낸 다음 접종하여 덮는 것이 노출면적의 최소화로 가장 적합한 방법이었다. 특히 이러한 방법은 다른 균의 오염율이 적고 감자 내부의 수분 유지에 효과적이었다. 특히 위의 실험은 씨감자를 병원체에 감염 시키는 최소 농도를 확인할 수 있었을 뿐만 아니라 자연발생과 가까운 시료 제작에 중요하게 활용되었다.

라. 최적 접종 확인 후 시료 제작

위의 감염 씨감자의 병증에 대한 최소 농도를 확인한 후 각각의 시료로 총 240개의 감염 씨감자를 제작하였다. 그림 33(a)은 접종 씨감자를 보관하기 위한 용기의 바닥에 거름종이를 놓은 다음 충분한 수분을 공급하고 씨감자를 보관하는 사진이며 그림 33(b)는 배양된 곰팡이 균을 일정하게 씨감자 표면에 접종하기 위해 씨감자를 침지시킨 사진이다. 각각의 감염 씨감자는 병원균별 최적의 온·습도 조건으로 설정시킨 항온항습 장치를 이용하여 보관하였다.



(a)



(b)

Fig. 33. Infected seed potatoes by (a) bacterial and (b) fungi pathogen.

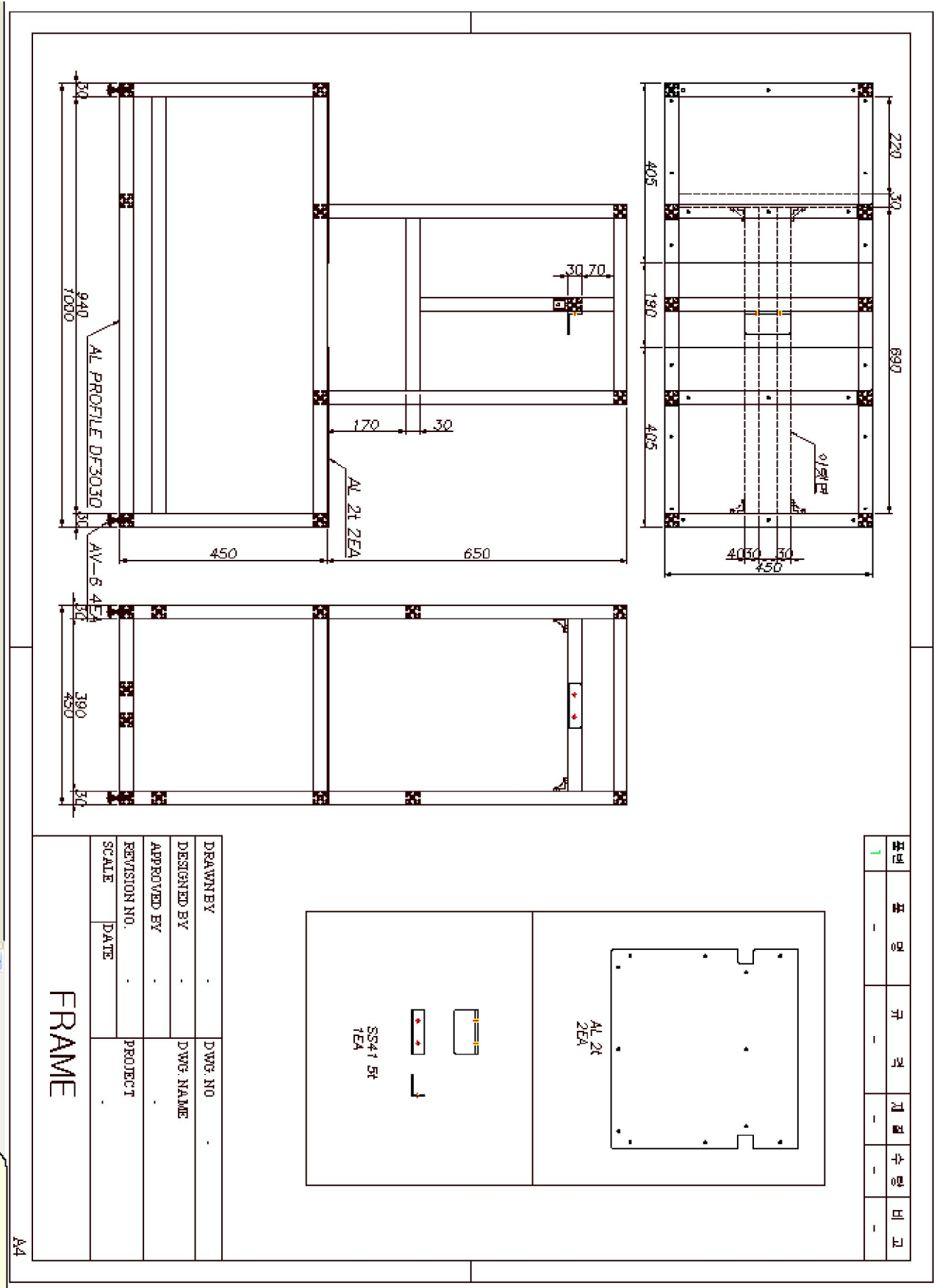
2. 실험에 이용된 분광분석 시스템 및 초분광 영상시스템 구축

가. 반사 및 형광영상 획득을 위한 다목적 초분광 영상시스템 구축

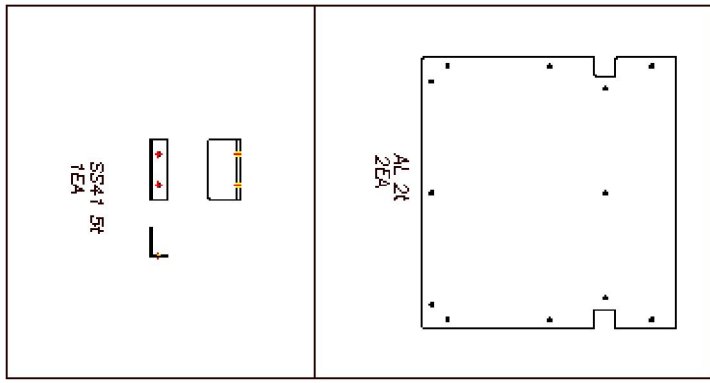
그림 34과 35는 초분광 영상 획득 시스템의 기본 골격이 되는 프레임의 설계도와 전체적 시스템의 개략적 구조를 나타낸다. 그림 36은 제작된 초분광 영상 획득 시스템을 나타낸 사진이며 이 시스템은 크게 영상획득부와 시료이송부로 나눌 수 있다. 영상획득부는 EMCCD 카메라, Spectrograph, Slit, Lens, 광원, 영상처리부로 구성되며 시료이송부는 Step motor, Slide Assembly, 컨트롤러 등으로 구성된다. 각 요소의 세부사양은 표 7과 8에 나타낸 바와 같다.

초분광 영상은 시료의 물리적 정보와 스펙트럼 정보를 동시에 측정할 수 있는 측정장치로 초분광 영상시스템 제어 프로그램은 Visual Basic 6.0으로 작성하였으며 초분광 영상획득을 위하여 카메라 노출시간(exposure time)과 시료의 거리를 설정하게 되면 자동으로 이송속도 및 촬영시간을 계산하여 스테핑 모터를 구동하게 된다.

3D cube의 형태로 영상과 스펙트럼의 정보를 가지고 있는 초분광 영상의 원리는 렌즈에 투사된 라인영상은 1차원의 영상정보가 생성되고 slit($25\mu\text{m} \times 18\text{mm}$)을 통과하면서 1차원의 정보가 분광정보를 포함한 2차원 정보로 변환된다. 이 2차원의 정보는 EMCCD에 카메라에 이미지로 저장된다. 스테핑모터의 이동에 따라 라인영상과 분광정보를 반복적으로 획득하여 2차원의 이미지와 스펙트럼의 정보가 결합된 3D cube 다른 말로는 Hypercube를 구성하게 된다. 초분광 영상은 스펙트럼의 정보가 연속적이고 그 수가 많아 다양한 정보를 포함하고 있어 기초 연구에 매우 유용한 기술이나 대용량의 정보를 처리할 수 있는 기술 개발이 수반되어야 한다.



구분	항목	규격	수량	비고
1				



DRAWN BY	-	DWG. NO.	-
DESIGNED BY	-	DWG. NAME	-
APPROVED BY	-	PROJECT	-
REVISION NO.	-	SCALE	-
DATE	-		

FRAME

A4

Fig. 34. Drawing of the frame made of aluminum profiles.

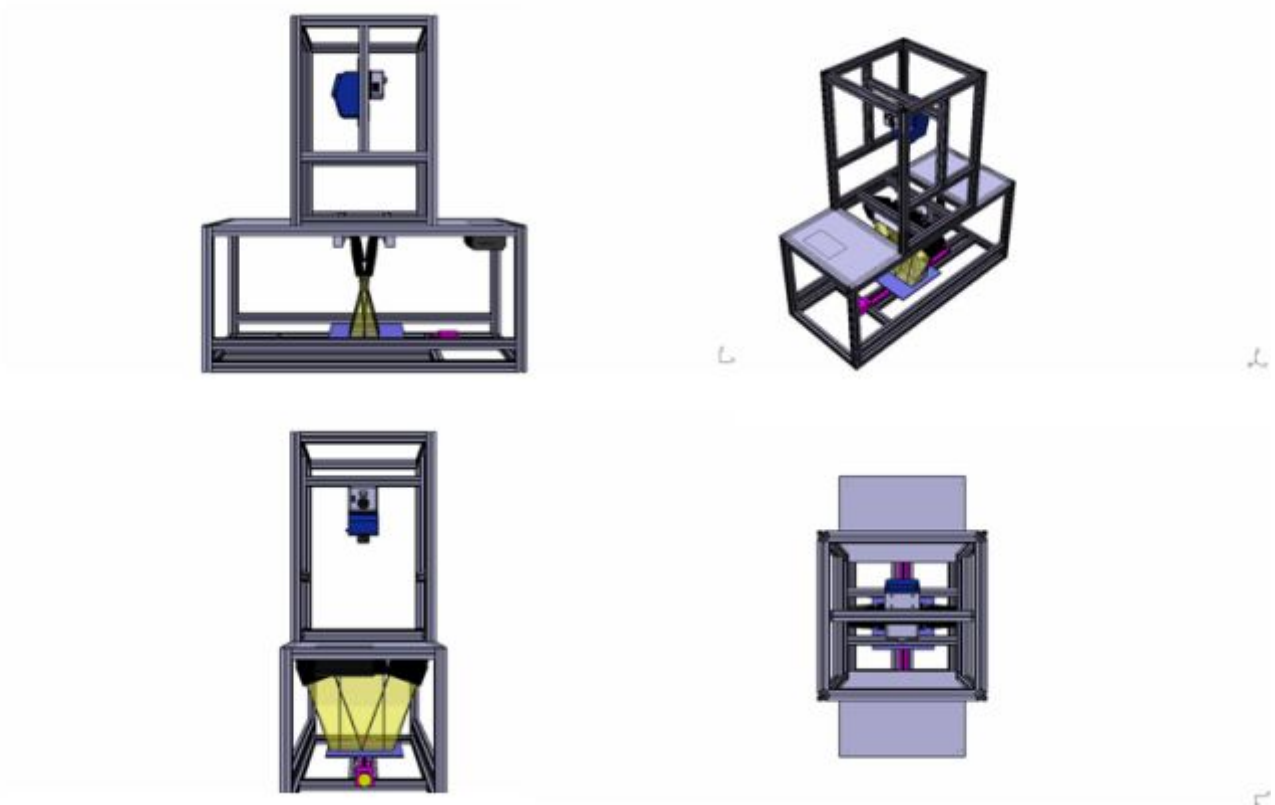


Fig. 35. Schematic of the hyperspectral imaging system.

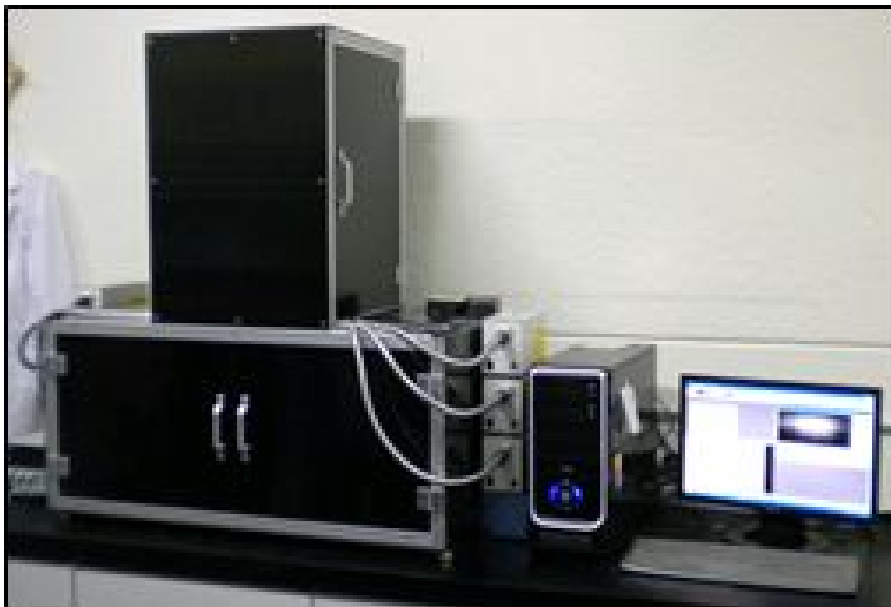


Fig. 36. Hyperspectral imaging system.

Table 7. Specification of the hyperspectral imaging system.

Part	Item	Specification
Vision System	EMCCD camera	Active pixels : 1004 x 1002 Pixel Size : 8 x 8 μ m Image area : 8 x 8mm Max readout rate : 13.5 MHz Frame rate : 12.4 fps Pixel readout rate : 13.5 MHz Digitization : true 14bit Peak quantum efficiency : 65% Cooling : -20C @ Air-cooled
	Spectrograph	Spectral range = 400-1000nm dispersed over 6mm Spectral dispersion = 100nm/mm Aperture = F/2*1 Includes the choice of one slit assembly (12,25,40 or 60micron x 18mm)
	Lens	Lenses are designed for 400 - 1000 μ m precision imaging and are useful while prototyping.
	Lighting	UV-A(SPECTROLINE, XX-15A) 100 W Halogen Lamp \times 3 (2Set)
	Slit	25 μ m slit
	Vision Controller	Quad core(2.4GHz) CPU, 2 Gbyte main memory
	Conveying Unit	Motor
Controller		operation : RS-232 interface, 9600, 19200, 38400 baud rate settable Weight : 2.6lbs (1.2kg) Electrical requirements : 24VDC 2.5A
Slide Assembly		Repeatability (short term) : 0.0001" (0.0025mm) Straight line accuracy : 0.001"/10" (0.025mm/25cm) Screw lead accuracy : 0.003"/10" (0.76mm/25cm)

Table 8. Specification of the conveying unit

Part	Item	Specification
Conveying Unit	Motor	Step : 0.9° Torque required : 18kg · mm
	Controller	Operation : RS-232 interface, 9600, 19200, 38400 baud rate settable Weight : 1.2kg Electrical requirements : 24VDC 2.5A
	Slide Assembly	Repeatability (short term) : 0.0025mm Straight line accuracy : 0.025mm/25cm Screw lead accuracy : 0.76mm/25cm

씨감자는 평면이 아닌 곡면으로 되어 있어 대상체 전체를 골고루 비출 수 있는 새로운 조명 장치의 설계가 필요하다. 조명장치는 광량 조절이 가능한 100 W급 할로겐램프(LS-F100HS-IR, Seokwang Optical Co., LTD, Hwaseong, Korea)에 광섬유를 이용하여 가이드를 설치하고 조명의 각도조절이 용이하도록 제작하였다. 조명장치는 그림 37과 같이 가이드 3개를 1 세트로 구성하였으며 가이드와 가이드 사이가 약 30°정도 기울어지도록 설치하여 곡면인 대상체에 빛을 최적으로 조사할 수 있도록 설치하였다.

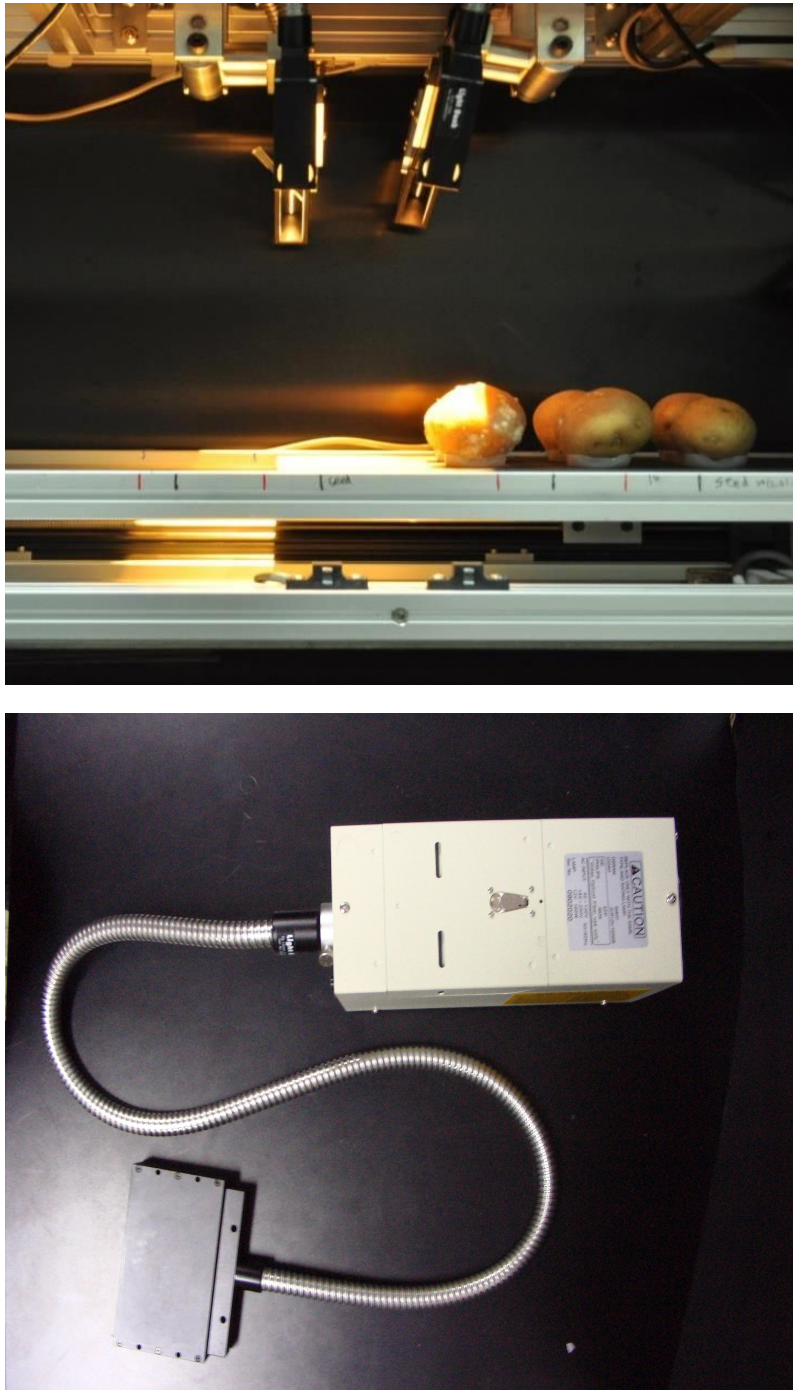


Fig. 37. Photo of halogen lamp controller and guide.

형광영상을 획득하기 위한 광원으로는 365 nm 중심파장의 자외선을 방출하는 UV-A(SPECTROLINE, XX-15A) 램프를 사용하였다. UV-A 램프는 씨감자에 조사할 경우 광원과 장보다 높은 파장대에서 형광 반응이 유도되어 초분광 형광 영상을 획득할 수 있게 된다. UV-A 램프는 그림 38과 같이 씨감자 표면 위를 조사하게 되는데 일반적으로 형광의 세기가 약하므로 최대한 형광세기를 향상시키기 위해 양쪽의 광원이 서로 겹치도록 하고 광원을 시료에 최대한으로 가깝게 위치하도록 구성하였다.

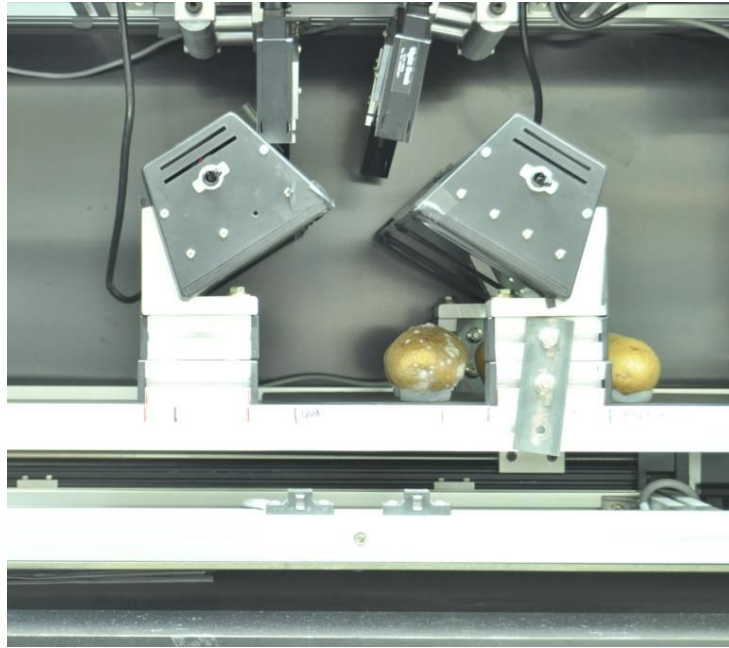


Fig. 38. An UV-A lighting unit.

나. 반사 스펙트럼 측정용 시스템

실험에 이용된 반사 스펙트럼 측정장치는 그림 39와 같이 씨감자 측정 공간을 암실로 제작하여 외부 광의 영향을 받지 않도록 하였다. 구축된 장치에는 시료부를 설치하여 씨감자의 형상을 고려하여 optic fiber sensor와 일정한 거리가 유지되도록 하였다. 정상 및 감염 씨감자의 반사 스펙트럼 측정에는 반사방식의 스펙트로미터(S-3100, sinco)와 적분구를 이용하여 400 ~ 1100 nm 영역의 반사광 스펙트럼을 1 nm의 해상도로 획득하였다.

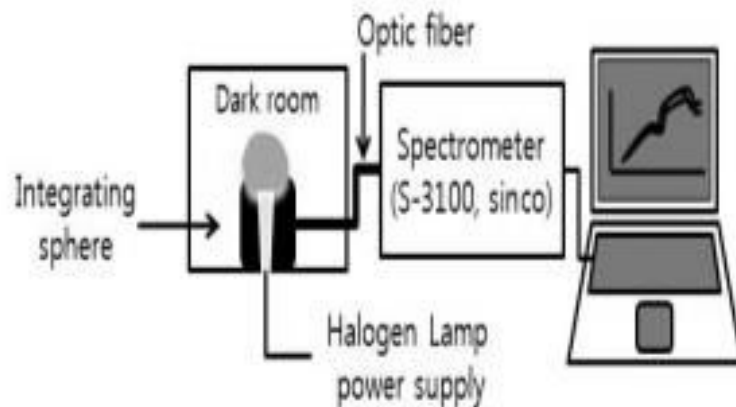
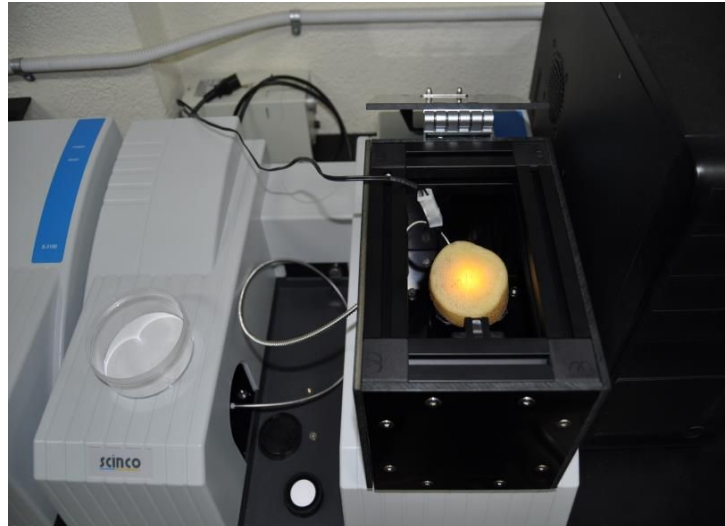


Fig. 39. The seed potato quality measurement system using a reflectance spectroscopy.

다. 형광 스펙트럼 측정용 시스템

형광 스펙트럼 측정장치는 시료에 특정 파장대의 빛을 투사하면 시료가 가지고 있는 형광물질에서 고유 진동주파수에 상응하는 빛이 방출되는 원리를 이용하여 시료에 함유된 형광물질의 양을 측정하는 장치이다. 특정한 파장의 광이 물질에 조사되면 Stokes's shift 원리에 따라 조사된 파장보다 긴 파장의 형광이 방출되게 되고 방출되는 형광은 구성 물질에 따라 다른 파장에서 다른 광도를 가지고 방출되므로 각 조사파장에 대한 방출스펙트럼이 형성된다. 본 실험에서는 조사광을 200 nm에서 700 nm까지 5 nm 간격으로 시료에 조사를 한 후 방사되는 230 nm에서 900 nm까지의 스펙트럼을 2 nm 간격으로 측정하였다. 측정된 형광 조사 및 방출스펙트럼은 상대 형광광도값(Relative Fluorescence Intensity, RFI)과 함께 3차원 그래프로 나타낼 수 있다. 본 연구에서 측정된 형광광도값은 photomultiplier tube (PMT)로 유입되는 광자

(photon)의 수를 측정한 절대 형광값이 아니라 PMT를 통해 증폭된 후 검출된 광자의 수를 측정한 상대 형광광도값이다. 곰팡이가 접종된 감염 씨감자에서 시료를 채취한 후 형광스펙트럼을 측정하였다.

실험에 사용된 형광스펙트로미터(FluoreMate FS-2, Scinco Co., Seoul, Korea)는 그림 40과 같으며 측정 강도를 높여주는 PMT(photo multiplier tube)와 200-900 nm영역을 조사하는 xenon-arc 램프, excitation monochromator, emission monochromator로 구성되어 있다. xenon-arc 램프에서 조사된 광은 90°로 반사되어 emission monochromator를 통과하여 시료의 형광 특성을 강도로 표현한다.

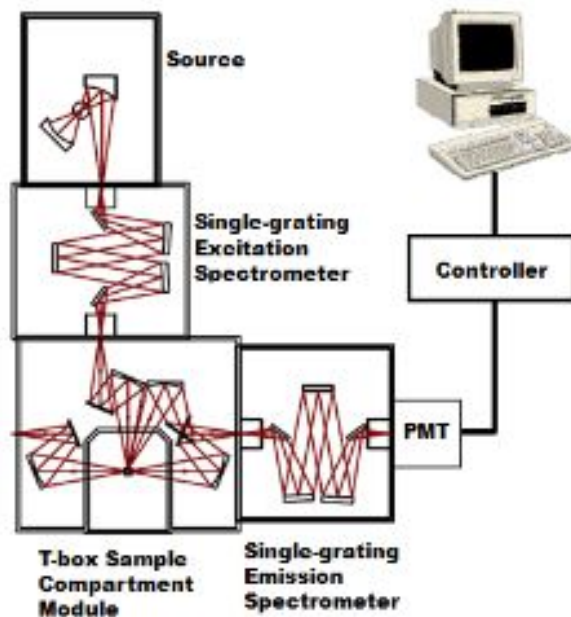


Fig. 40. Fluorescence spectrometer system.

라. 초분광 영상 획득 과정

초분광 영상의 획득은 일반적인 영상 획득 방법과 달리 동시에 많은 파장별 영상 획득이 가능해야 하므로 step motor(XN10-0180-M02-21, VELMEX INC, USA)를 제어하여 씨감자를 0.5 mm씩 이동시키면서 line-scan하는 방식을 채택하였다. Line-scan으로 대상체에서 광정보를 획득하여 spectrograph를 통과시키면 1차원의 라인이 분광되어 2차원의 분광정보로 변환되게 된다. 이러한 방식으로 복수의 라인을 스캔하면 전체 면적에 대한 분광정보, 즉 3D Hyper cube를 획득할 수 있게 된다. 초분광 영상을 획득하기 위하여 그림 41과 같이 해상도, step motor의 거리, 획득 영상 등의 획득과정을 제어할 수 있는 프로그램(Visual Basic ver. 6.0, Microsoft, USA)을 제작하여 이용하였다.

초분광 영상획득 과정은 그림 42와 같이 렌즈에 투사된 라인 영상이 spectrograph에 의하여 각 파장별 분광으로 변환된다. 라인의 분광된 정보는 2차원이 되어 EMCCD (Electron Multiplying Charge Coupled Device) 카메라에 의해 증폭되어 전기적 신호로 변환되어진다. 렌즈와 spectrograph 사이에 400 nm high pass filter를 설치하여 반사광이나 형광방출 영역에서 분석에 활용되지 않은 400 nm 이하의 자외선영역은 차단되도록 하였다. 획득된 초분광 영상정보는 컴퓨터에 영상 및 스펙트럼 정보로 저장되도록 하였다.

할로젠을 이용한 초분광 반사광 영상은 exposure time을 0.07초로 하였고, 공간해상도는 0.5 mm로 설정하였다. UV-A를 이용한 초분광 형광영상은 exposure time을 0.5초로 하였고 획득되는 영상 신호는 gain을 50으로 설정하여 증폭된 영상을 획득하여 사용하였다. 초분광 반사광의 경우, 영상 촬영 전에 white reference와 dark reference를 촬영하여 대상체의 반사광 영상을 반사율로 변환하여 분석에 활용하였다. White reference는 99%의 광 반사율을 갖는 teflon white board를 사용하였고, dark reference는 빛을 완전히 차단한 암실내부에 조명 없이 촬영한 값을 사용하였다. 반사율 식은 아래의 식 1과 같다.

$$R = \frac{R_i - D}{W - D} \times 100(\%) \text{-----} (1)$$

R : calculated relative reflectance values

R_i : raw intensity values of each pixel

D : intensity values of dark current image

W : intensity values of white reference image

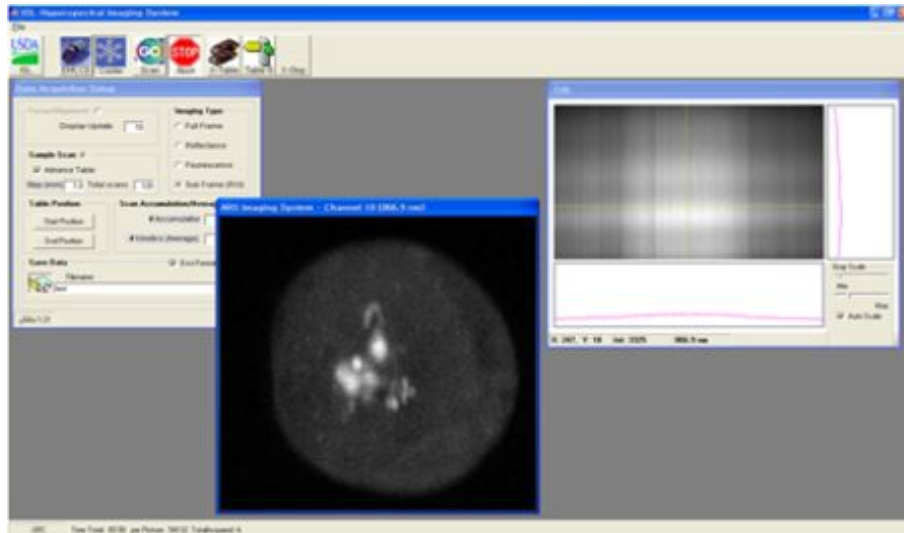


Fig. 41. Program for hyperspectral image acquisition.

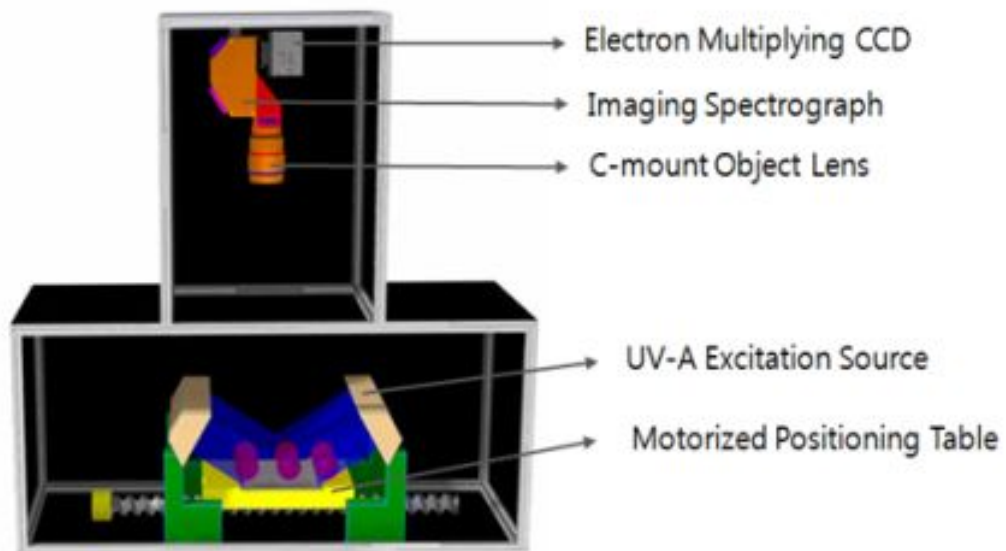


Fig. 42. Schematic of the hyperspectral imaging system.

3. 감염 씨감자 검출 알고리즘 개발

가. ANOVA 및 PCA 분석기법

정상 씨감자 및 감염 씨감자로 부터 할로겐램프를 이용한 초분광 반사 영상을 획득하고 또한 UV-A 램프를 이용하여 초분광 형광영상을 획득한 후, 감염 부위의 검출에 적합한 알고리즘들을 ANOVA와 PCA 분석 기법을 이용하여 구명하였다. 연구에 활용된 분석기법은 이전 연구를 통해 초분광 영상에서 목표 물질을 선택적으로 검출할 수 있는 최적 파장을 구명하는데 효과적인 기법으로 선정되었으며, 분석된 최적 파장 조합을 이용하여 목표 대상물(감염 씨감자)을 신속하게 선별할 수 있는 다분광 영상 시스템의 개발에 핵심적으로 이용할 수 있다.

ANOVA를 이용한 감염 씨감자 검출 알고리즘 개발은 두 가지 단계로 나눌 수 있는데, 첫 번째는 정상 씨감자와 감염 씨감자의 스펙트럼을 비교하여 최적 파장을 조사하고 두 번째 단계는 영상처리 기법을 사용하여 감염부위를 정확히 표시하는 단계이다. 알고리즘의 과정은 그림 43의 흐름도로 나타내었다.

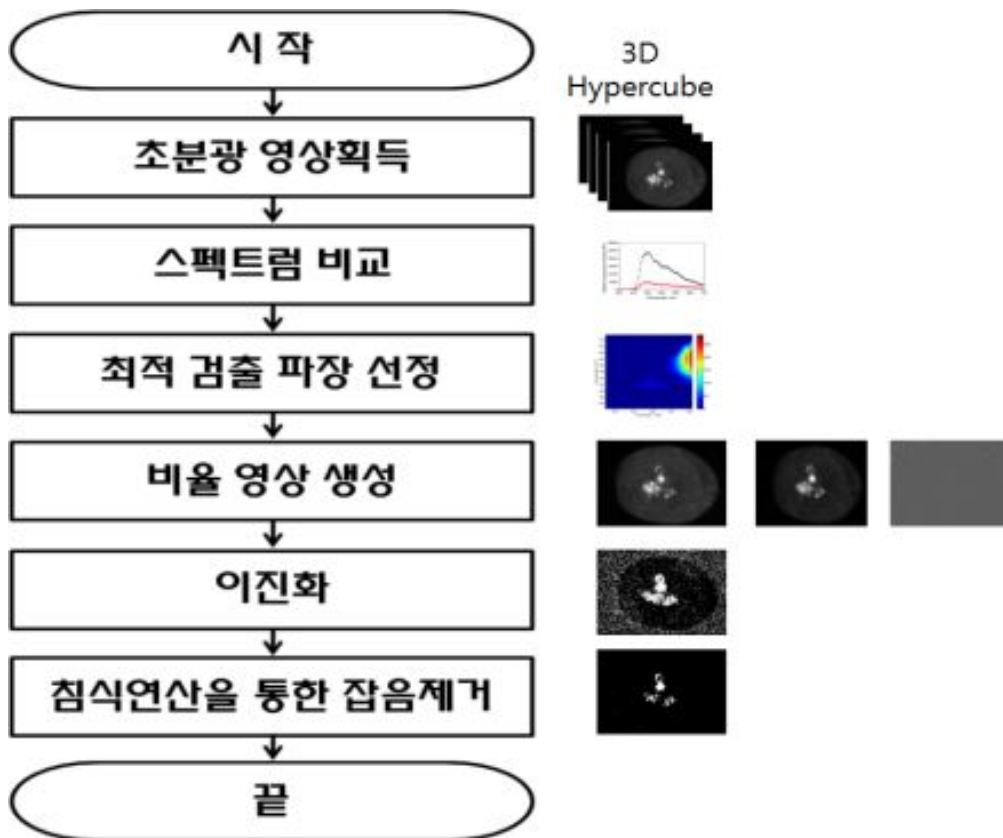


Fig 43. Flow chart for detecting disease-infected seed potatoes.

주성분 분석법(principal component analysis, PCA)은 고차원 특징 벡터들의 정보를 유지하면서 낮은 차원으로 차원을 축소할 수 있는 다변량 데이터 처리 방법 중의 하나이다. 초분광 영상은 고차원으로 이루어진 스펙트럼 영상이므로 주성분 분석법을 적용하게 되면 차원 축소로 스펙트럼의 변이에 영향을 많이 미치는 과장을 분석할 수 있게 되며, 이는 정상부위와 스펙트럼 변이가 상대적으로 많이 발생하는 감염부위를 잘 반영하는 과장을 구명할 수 있게 해준다. 주성분 분석은 원래의 변수들이 가지고 있는 변위를 최대한으로 표현할 수 있는 새로운 변수를 변수들의 선형결합을 이용하여 순서대로 계산해 나가는 과정이다. 주성분 분석은 다중영상 분석에 이용된 사례가 많은데 이는 불필요한 다중영상을 제거하여 처음 영상이 가진 모든 정보를 보다 적은 수의 복합 영상들로 표현하기 위해서이다. 초분광 영상에서 주성분 영상은 아래의 식 2에 의해 구할 수 있다.

$$PC_{image} = \sum_{i=1}^n W_i H_i \text{-----} (2)$$

W_i : weighing coefficient

H_i : the image at ith wavelength of a total of n spectral images

식 (2)에서 변환 행렬인 고유벡터 W는 영상들의 공분산의 통해서 구할 수 있다. 주성분은 고유치가 큰 고유 벡터의 순서로 제1주성분, 제2주성분, ... 제n주성분으로 나누어진다. 각각의 고유치가 큰 순서를 구하는 방법은 식 3과 같다.

$$Var_i = \frac{\lambda_i}{\sum_{j=1}^M \lambda_j} \times 100 \text{-----} (3)$$

Var_i : variance which is described by the eigenvector

λ_i : the ith eigenvalue

나. PLS-DA 기법

본 연구에서는 근적외선 분광분석 장치로 반사스펙트럼을 분석하여 감염 씨감자를 검출하는 기법으로 부분최소 자승 판별 분석(partial least square discriminant analysis, PLS-DA)를 이용하였다. 이는 스펙트럼 분석에 적합하고 개발된 예측 모델식을 이용하여 정상 씨감자와 감염 씨감자를 판별할 수 있어 감염 씨감자 검출용 선별 시스템에 적합하다.

PLS-DA는 부분최소자승 회귀식(partial least square regression, PLSR)과 동일한 기법이나 독립변수 Y의 값이 임의의 값(digital value, dummy value)으로 지정하는 차이뿐이다. PLSR은 PCA를 토대로 응용된 주성분 회귀식(principal component regression, PCR)에서 스펙트럼으로만 회귀식을 구하는 것과는 달리 독립변수인 Y의 값을 반영하여 X score vector와 Y score vector 들 간의 inner relation을 만들어 변수 Y의 값을 잘 설명할 수 있는 데이터 공간을 회전시키는 의미가 되므로 PLSR과 PLS-DA는 PCR 보다 정확도가 높은 예측이 가능한 것으로 알려져 있다.

PLS-DA는 스펙트럼 변수(X)는 식 (4)와 같이 score vector $t_h (h=1, \dots, a)$ 와 load vector $p_h (h=1, \dots, a)$ 의 곱으로 나타내어지고, 임의의 값으로 지정된 dummy 변수(Y)는 식 (5)와 같이 score vector $u_h (h=1, \dots, a)$ 와 load vector $q_h (h=1, \dots, a)$ 의 곱으로 표시되어 진다. 식 (6)은 score vector u_h 를 나타낸다.

$$X = \sum_{h=1}^a t_h p_h^T + E \quad (4)$$

$$Y = \sum_{h=1}^a u_h q_h^T + F \quad (5)$$

$$u_h = \sum_{h=1}^a b_h t_h + r_h \quad (6)$$

위 식에서 a는 채택될 잠재변수의 개수를 나타내며, b_h 는 입력 변수의 scores vector $t_h (h=1, \dots, a)$ 간의 회귀계수이다. 행렬 Y의 한 열을 선택하여 u_1 의 초기값으로 놓은 다음 식 (7)부터 식 (10)까지 수행한다.

$$w_1 = \frac{X^T u_1}{\|X^T u_1\|} \text{-----} (7)$$

$$t_1 = X w_1 \text{-----} (8)$$

$$q_1 = \frac{Y^T t_1}{\|Y^T t_1\|} \text{-----} (9)$$

$$u_1 = Y q_1 \text{-----} (10)$$

식 (10)에서 계산된 u_1 값이 일정 오차범위 내에 수렴하면 다음 식 (11)과 (12), (13)을 수행하고, 그렇지 않으면 식 (7)로 되돌아간다.

$$p = \frac{X^T t_1}{t_1^T t_1} \text{-----} (11)$$

$$p_1 = \frac{p}{\|p\|} \text{-----} (12)$$

$$t_1 = t_1 \|p\| \text{-----} (13)$$

위와 같이 t_1 과 u_1 이 구해지면 식 (14)에서 두 score vector간의 회귀계수를 구한다.

$$b_1 = \frac{u_1^T t_1}{t_1^T t_1} \text{-----} (14)$$

첫 번째 잠재변수가 결정되면 다음 식으로 데이터 블록 X와 Y의 오차행렬 E와 F를 식 (15)와 (16)으로 부터 구한다.

$$E_1 = X - t_1 p_1^T \text{-----} (15)$$

$$F_1 = Y - b_1 t_1 q_1^T \text{-----} (16)$$

또 다른 잠재변수가 필요한 경우에는 행렬 X 와 Y 를 각각 E_1 와 F_1 으로 바꾸어서 위 알고리즘을 다시 수행한다. 이때 아래 첨자는 1씩 증가한다. PLS 모델에 사용되는 잠재변수의 개수 a 는 일반적으로 독립변수의 개수보다는 적으며 보통 cross-validation 방법으로 결정된다. 잠재변수의 개수가 독립변수의 개수와 같아질수록 오차행렬 E 와 F 는 점점 0에 가까운 값을 갖게 된다. 식 (4), (16)으로 계산된 load vector p_h, q_h ($h=1, \dots, a$)와 회귀계수 b_h ($h=1, \dots, a$)를 사용하여 학습에 사용되었거나 혹은 사용되지 않은 입력변수 데이터 블록 X 에 대한 출력변수 데이터블록 Y 의 예측값을 계산하려면, 먼저 식 (4) ($E \cong 0$)를 만족하는 t_h ($h=1, \dots, a$)를 식 (17)으로 부터 구해야한다.

$$t_h = \frac{X p_h}{p_h^T p_h} \quad (h=1, \dots, a \text{-----} (17)$$

t_h ($h=1, \dots, a$)가 계산되어지면 b_h ($h=1, \dots, a$)와 식 (6) ($r_h \cong 0$)을 이용하여 u_h ($h=1, \dots, a$)를 구한 후, 최종적으로 q_h ($h=1, \dots, a$)와 식 (4)를 이용하여 Y 의 예측값을 구한다.

4. 정상 및 감염 씨감자 형광특성(EMEX) 분석

형광스펙트로미터로 형광특성을 분석하기 위하여 정상부위와 감염부위를 그림 44와 같이 시료를 채취하여 cell에 담았으며 각각 3개씩의 정상부위와 감염부위의 시료를 제작하였다. 형광스펙트로미터의 측정에서 excitation range는 200 - 700 nm 영역으로 하였고 emission range는 230 - 900 nm 영역으로 설정하여 형광 3D EmEx matrix를 획득하였다. 그림 45와 46은 3D EmEx matrix를 측정한 결과를 나타낸다. 그림 45는 정상 씨감자의 3D EmEx matrix의 contour plot과 입체 그래프이며 그림 46은 감염 부위의 contour plot과 입체 그래프이다. Contour plot으로 작성된 그래프는 정상부위와 감염부위에서 획득한 각각의 3D EmEx matrix를 평균한 값이다. 그림 46에서 정상부위와는 달리 감염부위의 emission 스펙트럼의 경우 270 - 300 nm 영역에서 큰 형광반응이 나타났다. 그리고 이 영역보다는 작은 형광반응이 450 nm 주변에서 관찰되었다.

형광특성 상 전반적으로 정상부위 및 감염부위의 emission 스펙트럼의 강도 차이가 크게 나타남을 확인할 수 있었다. 따라서 두 그룹 간의 구별이 가능한 270 - 450 nm 영역의 범위에 속하는 365 nm 영역을 이용하는 초분광 형광영상을 이용할 시 정상 씨감자와 감염 씨감자의 구분이 가능함을 확인할 수 있었다.

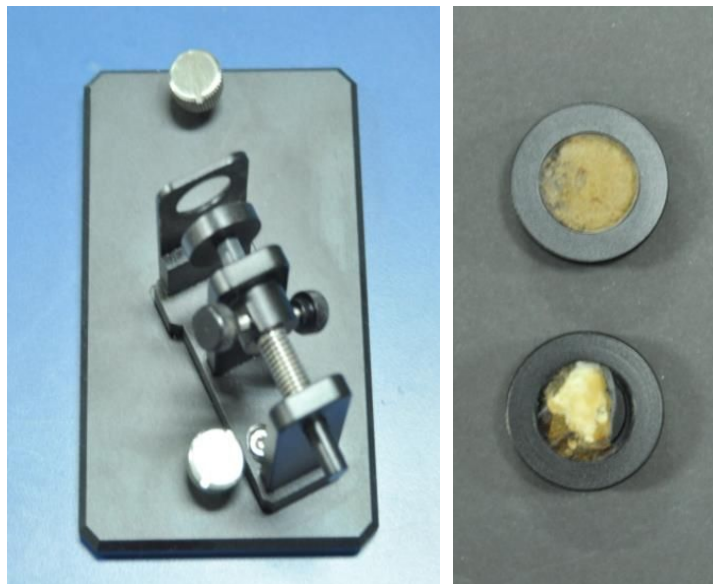


Fig. 44. Measurement unit and precision cell of sound (upper) and disease- infected (lower) seed potato samples.

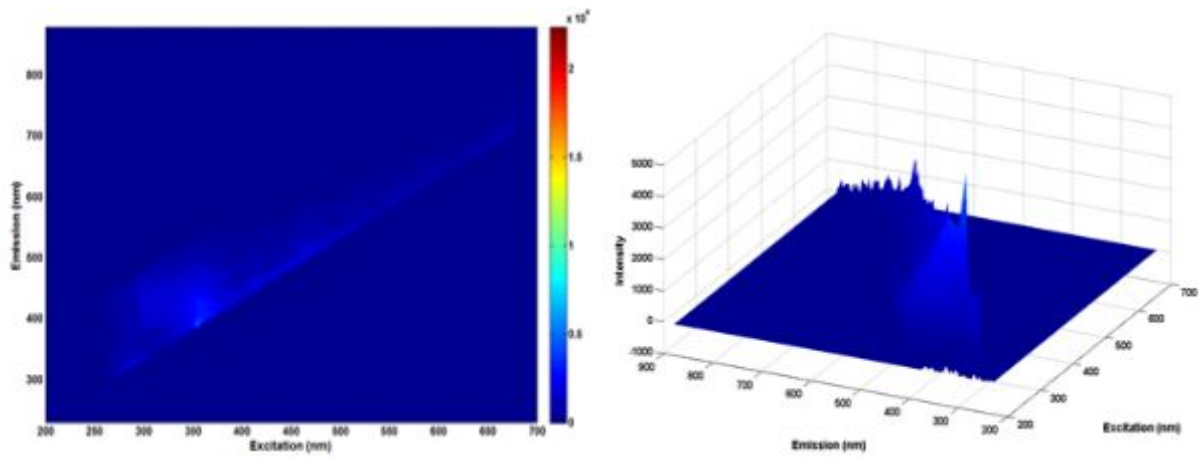


Fig. 45. Contour plot and 3D fluorescence EmEx matrix of sound seed potatoes.

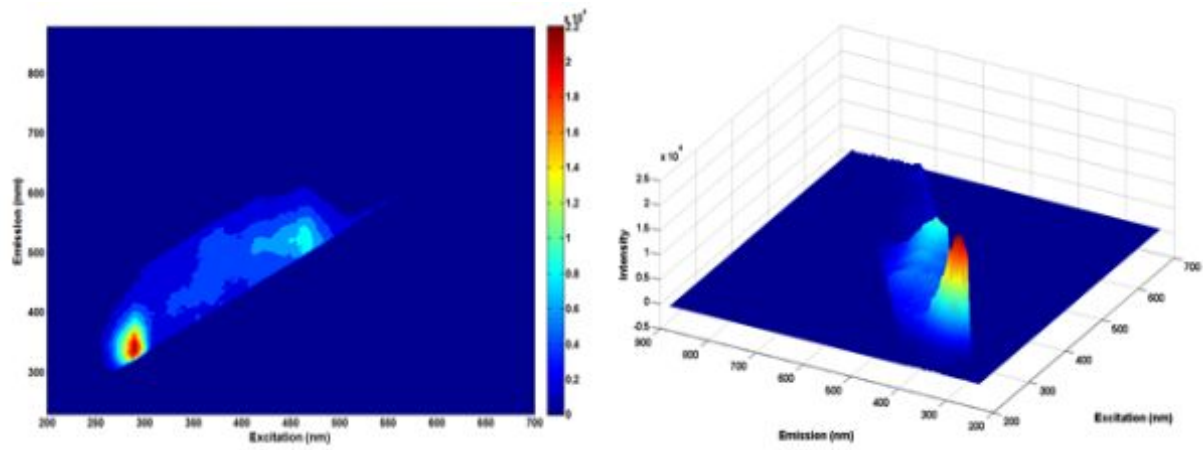


Fig. 46. Contour plot and 3D fluorescence EmEx of disease-infected seed potatoes.

5. 초분광 영상을 이용한 최적 반사 및 형광 파장분석

반사 및 형광 초분광 영상에서 감염 씨감자 검출을 위한 최적파장을 구하기 위하여 정상 씨감자와 감염 씨감자의 스펙트럼을 두 그룹으로 나누고 두 개의 파장값을 비율로 계산한 다음, 전체 파장 조합에 대한 두 그룹의 F값을 구하였다. F값이 큰 값이면 두 그룹의 분리정도가 크다는 것을 나타내므로 그 비율 값을 최적 검출파장으로 선정할 수 있게 된다.

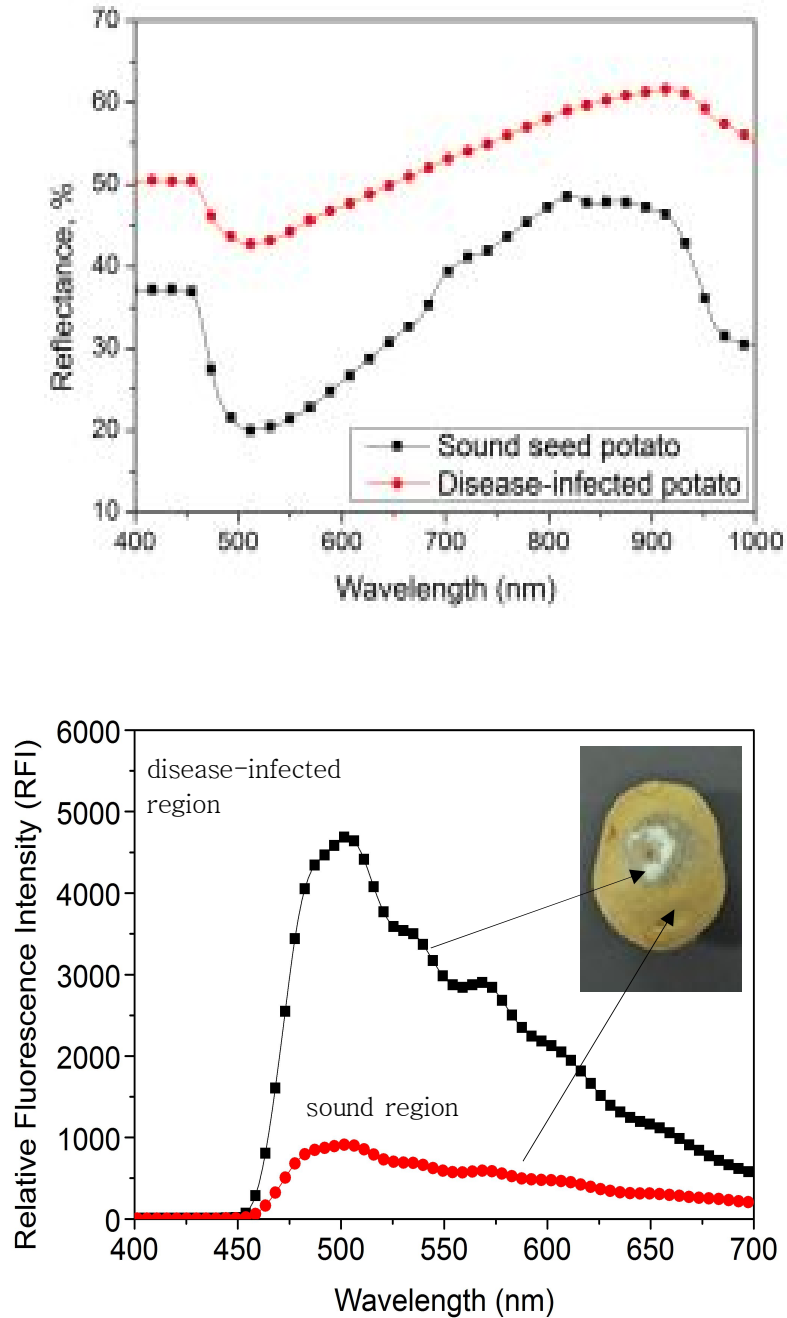


Fig. 47. Mean reflectance and fluorescence emission spectra of sound and disease-infected seed potatoes upon excitation by halogen lamp (left) and UV-A light (right).

그림 47은 반사광 영상을 이용한 정상 씨감자와 감염 씨감자에서 추출한 평균 스펙트럼 데이터와 형광영상을 이용한 정상 씨감자와 감염 씨감자에서 추출한 형광 스펙트럼을 나타낸 것이다. 형광 초분광 영상에서 추출한 스펙트럼에서는 blue-green 영역인 500 nm에서 정상과 감염 씨감자의 형광 강도가 뚜렷한 차이를 보였는데 이는 chlorophyll b의 흡수에서 차이가 발생하기 때문이다.

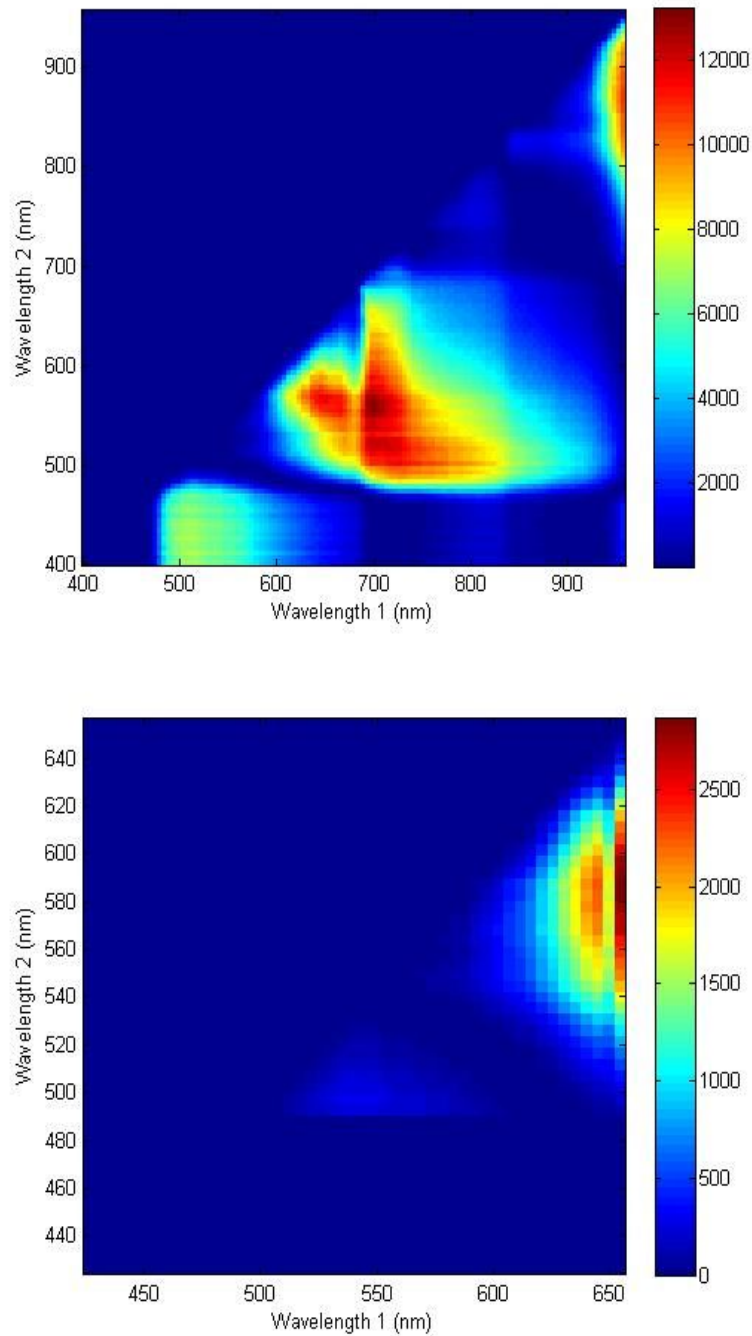


Fig. 48. Selection of optimized waveband ratio using F value using reflectance images (left) and fluorescence images (right).

그림 48은 최적파장을 구하기 위해서 정상부위와 감염부위의 스펙트럼에 대한 파장 비율값의 F값을 전체 파장조합에 대해 구한 결과이다. 초분광 반사영상의 경우, 감염부위와 정상부위의 최적 구분은 554 nm 와 698 nm의 파장비를 이용할 경우이며, 초분광 형광 영상에서는 549 nm 와 649 nm의 파장 비가 가장 크게 나타나 두 그룹을 구분하는데 가장 적합한 것으로 나타났다.

그림 49과 50은 위의 방법으로 구명된 최적 검출 파장을 이용하여 초분광 영상을 처리한 결과이다. 획득한 비율 영상은 최적 문턱값을 이용하여 이진화하여 감염 부위를 부각시켰다. 잡음에 의한 오검출 부위는 영상처리 기법 중 침식연산 기법을 사용하여 오검출 부위를 최소화 하였다.

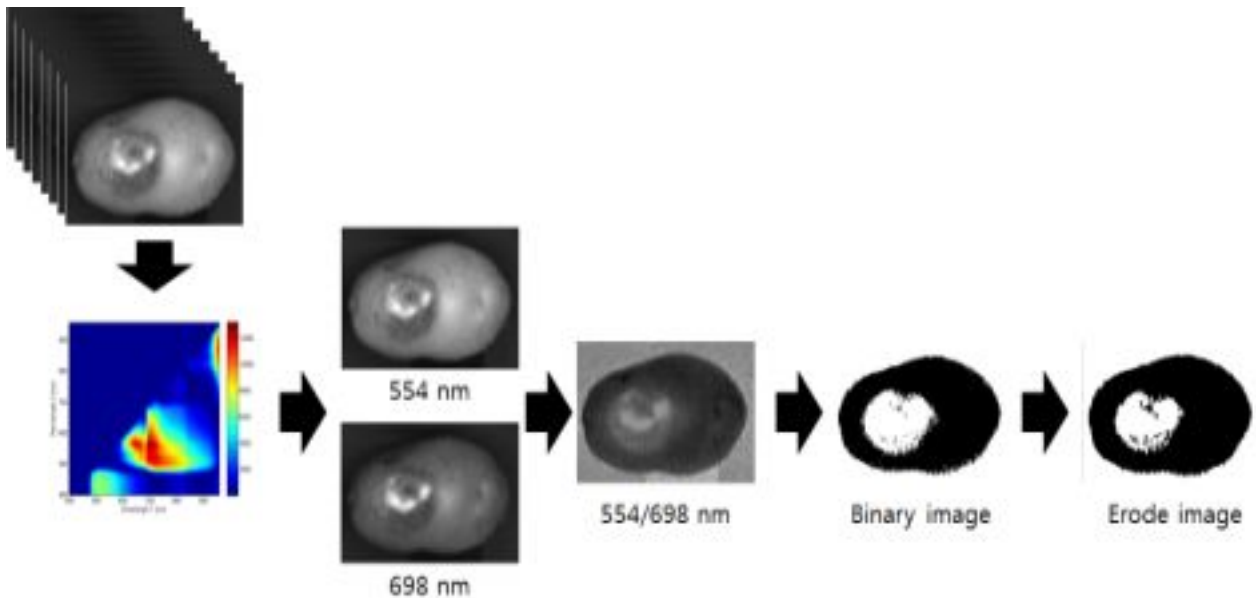


Fig. 49. Result of image processing for disease-infected seed potato using hyperspectral reflectance images.

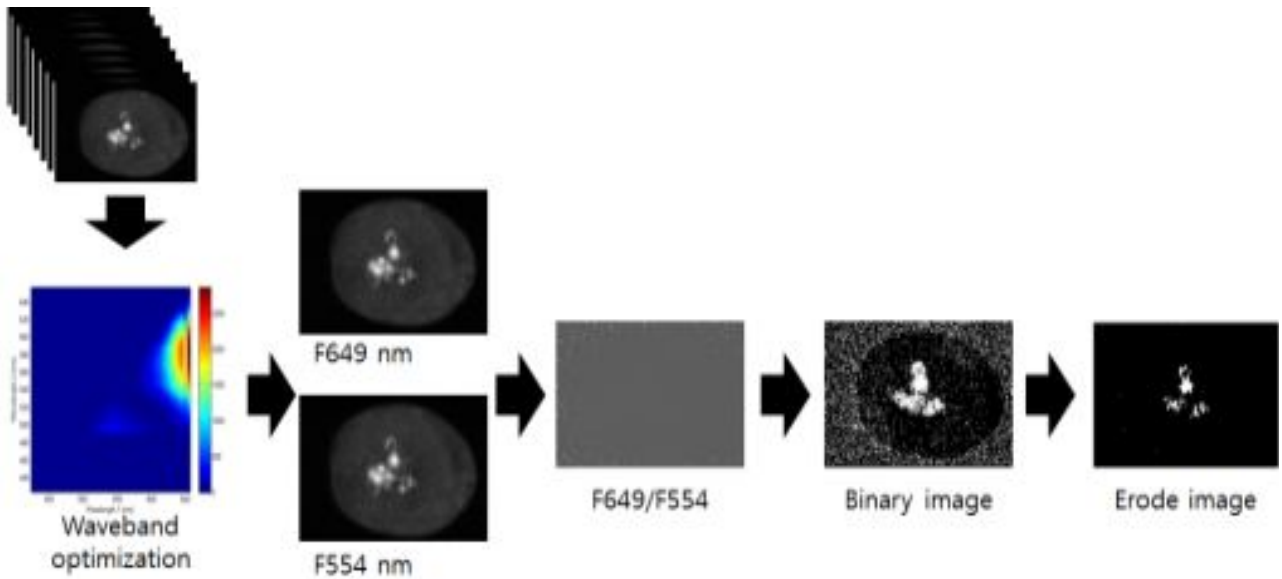


Fig. 50. Result of image processing for disease-infected seed potato using hyperspectral fluorescence images.

초분광 영상에 주성분 분석법을 적용하여 구할 수 있는 주성분 영상의 개수는 파장의 밴드 수만큼 생성이 된다. 그러나 고유값이 작아지면 기여도가 감소하여 분석에 불필요한 영상이 되므로 weight coefficients가 가장 큰 순으로 하여 PC images의 PC1, PC2, PC3, PC4까지만 분석에 이용하였다. 그림 51과 52는 반사영상과 형광영상을 분석한 weight coefficients를 그래프로 나타낸 것이며 오른쪽은 큰 고유값 순으로 PC 영상 4개를 나타낸 것이다. 분석에 의해 계산된 PC 영상은 곰팡이 부위와 정상부위가 잘 대비되는 것을 확인할 수 있었다. 이 중 PC1 영상만으로도 구분이 명확하여 초분광 영상에서는 반사광 및 형광 모두 PC1 영상만을 이용하여 영상 처리를 수행하였다. 반사광 영상의 주성분 분석으로 구하여진 특이 파장은 530 nm, 710 nm, 810 nm, 980 nm 이었다. PC1의 weight coefficients는 530 nm, 810 nm 영역에서 피크가 발생되었다. 형광 영상의 경우, 특이 파장은 490 nm, 500 nm, 520 nm, 570 nm, 600 nm, 640 nm 이었다. 특히 PC1의 weight coefficient에서 확인된 파장은 500 nm 영역으로 감염부위의 평균 스펙트럼과 유사함을 알 수 있었다.

그림 53와 54는 반사영상 및 형광영상을 주성분 분석으로 영상처리를 수행하여 씨감자의 감염부위를 나타낸 결과이다. 반사영상 및 형광영상 모두 감염부위만을 잘 나타냈다. 반사영상의 경우 636 nm의 영상을 이용하여 배경제거 마스크를 제작하였고 활용하였고 PC1 영상을 이용하여 적절한 임계값을 적용하여 목표영역을 검출하였다. 이진화 및 침식 연산을 통해 잡음을 제거하고 최종적으로 감염부위만 이미지로 나타내었다. 형광영상의 경우 634 nm의 영상을 이용

하여 배경제거 마스크를 제작하여 적용하였고 반사영상과 동일한 과정을 수행하였다. 주성분 분석을 통해 나타낸 결과에서는 반사광 영상의 결과가 형광영상보다 감염부위를 보다 정확하게 표현할 수 있는 것으로 확인되었다. 형광의 경우가 반사광의 경우보다 정확도가 낮은 것은 UV-A 램프에 의한 형광영상의 강도가 약하여 상대적으로 잡음에 노출이 쉽게 되기 때문이라 판단된다.

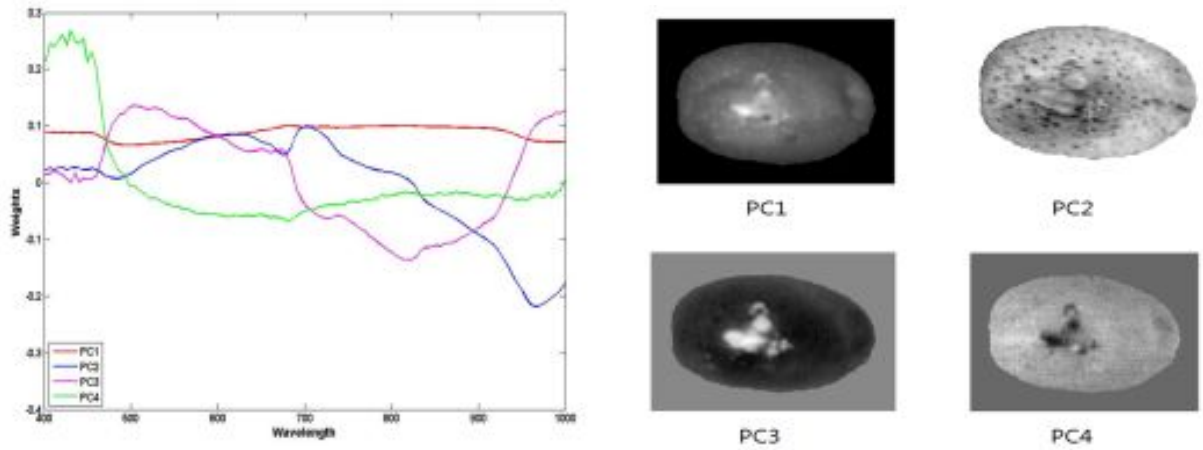


Fig. 51. Spectral weighing coefficients and first, second, third, and fourth Principal component images from hyperspectral reflectance images.

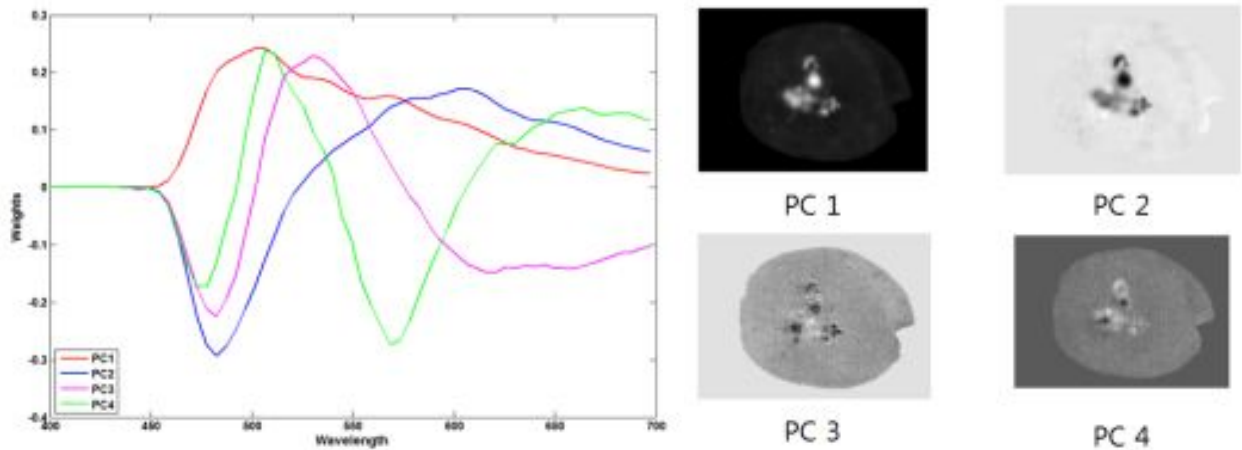


Fig. 52. Spectral weighing coefficients and first, second, third, and fourth Principal component images from hyperspectral fluorescence images.

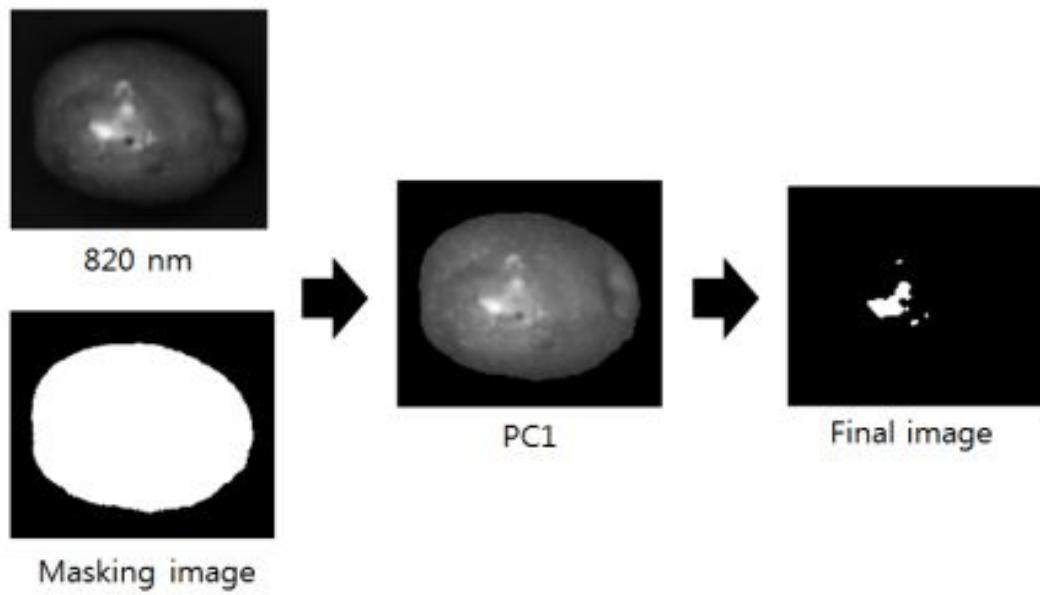


Fig. 53. Image processing for detecting disease-infected seed potatoes using hyperspectral reflectance image.

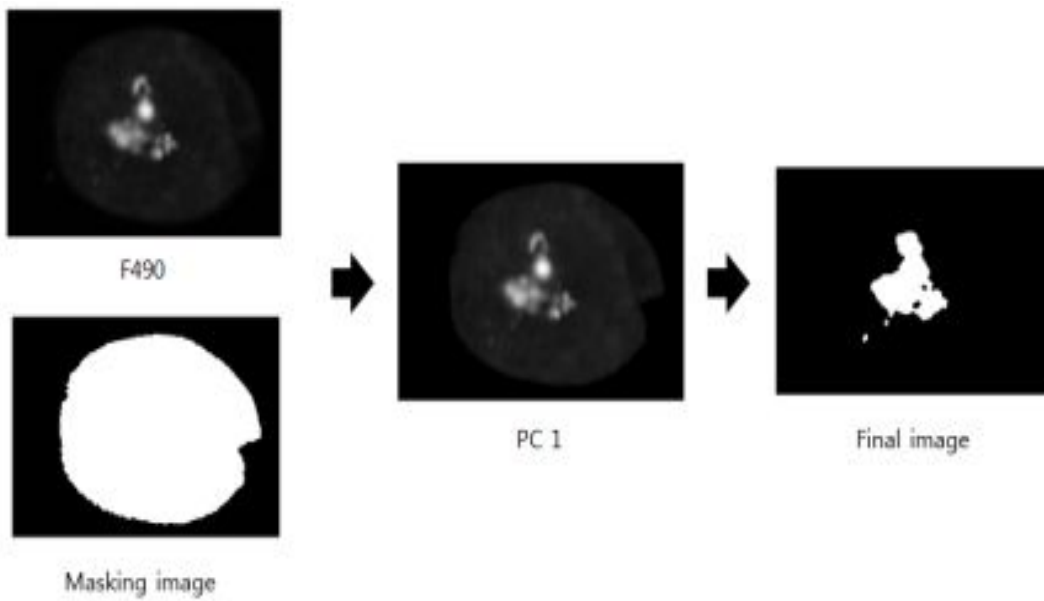
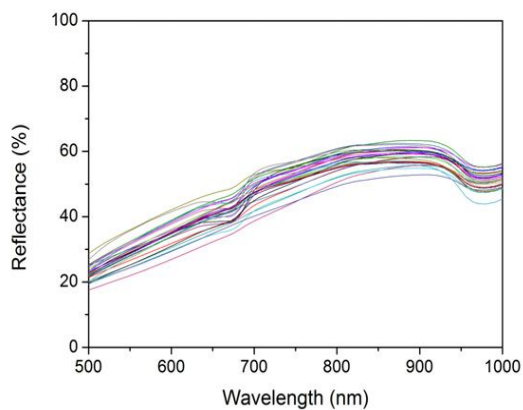


Fig. 54. Image processing for detecting disease-infected seed potatoes using hyperspectral fluorescence image.

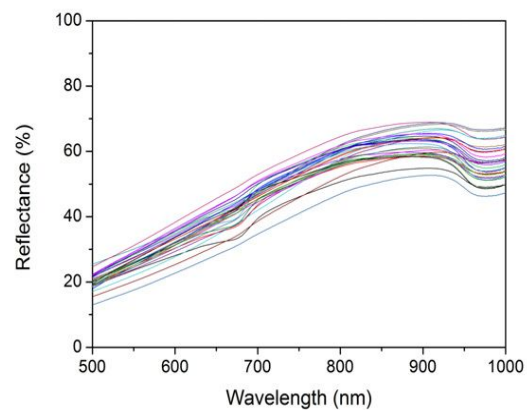
6. 반사스펙트럼의 PLS-DA 예측 결과

획득한 반사 스펙트럼영역에서 처음과 끝부분의 노이즈와 관련된 영역을 제외하고 500-1000 nm를 분석에 이용하였다. 정상 및 감염 씨감자의 반사 스펙트럼은 주성분분석(principal component analysis, PCA)을 적용하고 outlier를 제거한 후 분석을 실시하였다.

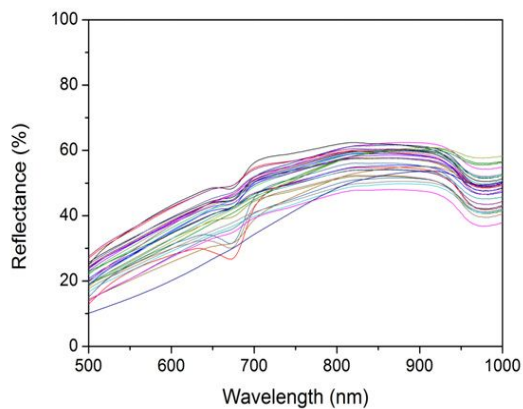
그림 55는 정상 및 감염 씨감자의 저장기간에 따른 스펙트럼의 변화를 분석하기 위하여 세균과 곰팡이 균의 모든 경우에서 접종 후 1일차와 세균의 경우 접종 후 10일차 반사 스펙트럼, 곰팡이 균의 경우 접종 후 15일차의 반사 스펙트럼을 나타낸 것이다. 측정된 반사 스펙트럼에는 클로로필의 영역으로 알려진 680 nm 영역의 흡수가 확인되었으며 960 nm 수분흡수 영역이 관찰되었다(EIMary 등, 2008). 특히 저장 기간의 경과에 따라 스펙트럼의 변화가 관찰되는데 클로로필의 영역이 사라지면서 기울기가 가파른 형태의 반사 스펙트럼으로 변화됨을 확인할 수 있었다. 이러한 변화는 감염 부위를 중심으로 갈변 현상이 관찰되고 함몰 현상이 발생하면서 스펙트럼의 흡수율이 증가하기 때문인 것으로 판단된다.



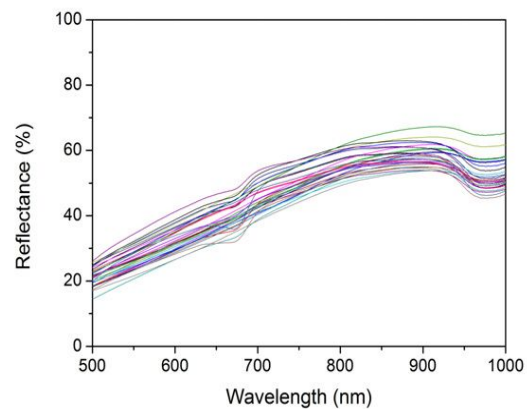
(a)



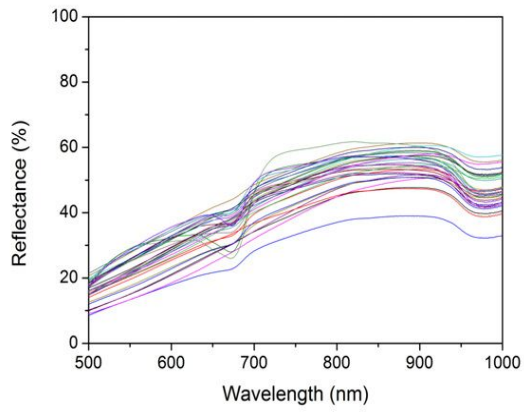
(b)



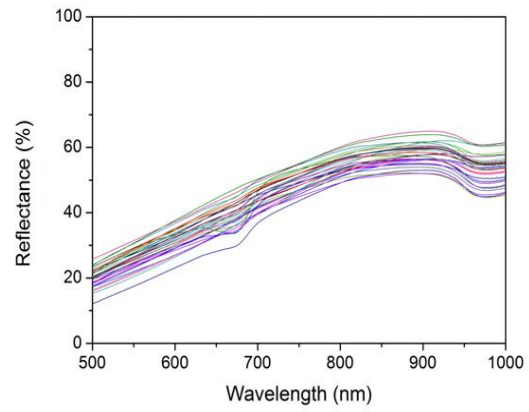
(c)



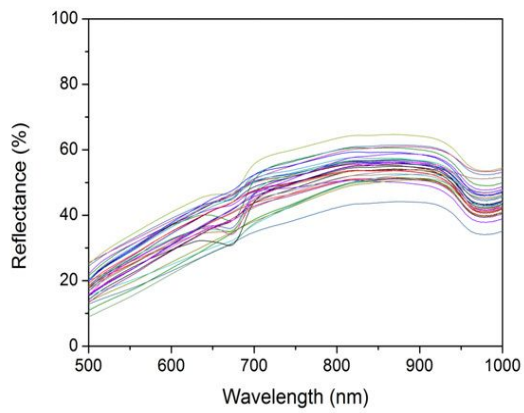
(d)



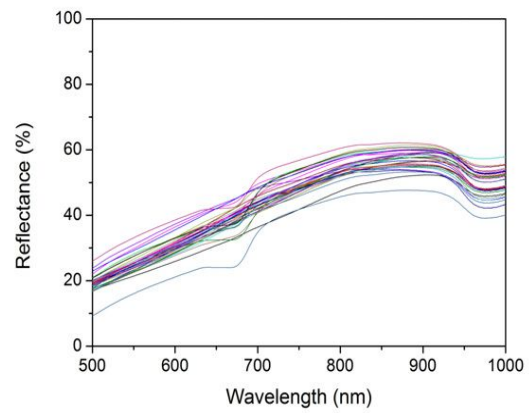
(e)



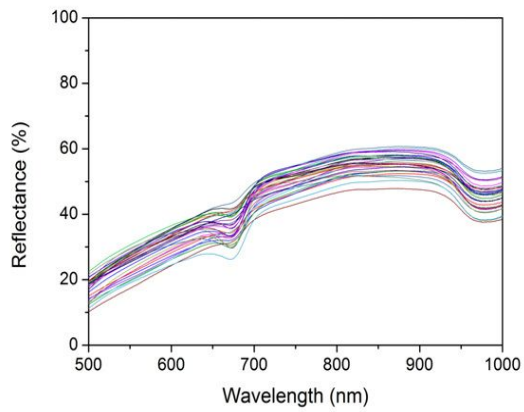
(f)



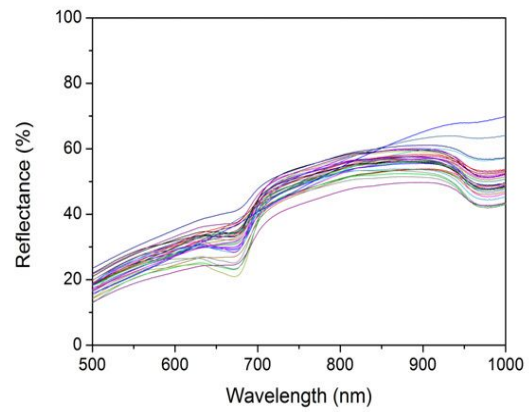
(g)



(h)



(i)



(j)

Fig. 55. Spectra of seed potatoes acquired by the reflectance spectroscopy after 1 day(a, c, e, g, i), 10 days(b, d, f), and 15 days(h, j), (a, b : control; c, d : *P. atrosepticum*; e, f : *C. michiganensis* subsp. *sepedunicus*; g, h : *Fusarium* spp.; i, j : *V. albo-atrum*).

표 9부터 표 12까지는 정상 씨감자와 감염 씨감자의 반사스펙트럼을 이용하여 PLS-DA를 적용한 결과이다. 각각의 표에는 전처리 별로 개발된 모델의 결정계수와 SEC(standard error of calibration)를 나타내었으며, 모델의 검증 결과의 결정계수와 SEP(standard error of prediction)를 나타내었다. 또한 각각의 정상 및 감염 씨감자의 판별 정확도를 나타내었다.

표 9는 정상 씨감자와 *P. atrosepticum*에 감염된 씨감자를 분석한 결과이며, 표 10은 정상 씨감자와 *C. michiganensis* subsp. *sepedunicus*에 감염된 씨감자를 분석한 결과이다. 표 11은 정상 씨감자와 *Fusarium* spp.에 감염된 씨감자를 분석한 결과이며, 표 12는 정상 씨감자와 *V. albo-atrum*에 감염된 씨감자를 분석한 결과이다.

표 9에 나타난 바와 같이 정상과 *P. atrosepticum*에 감염된 씨감자의 분석결과는 평균을 이용한 정규화 전처리에서 가장 좋은 예측 결과를 확인할 수 있었는데 이때의 결정계수는 0.919이고 SEP는 0.141이었다, 표 10에서도 가장 우수한 예측 결과는 평균을 이용한 정규화 전처리한 분석에서 확인되었으며, 0.922의 결정계수와 0.138의 SEP가 확인되었다. 표 11의 PLS-DA의 결과는 2차 미분의 전처리에서 검증 결과가 가장 우수하였으며 이때의 결정계수는 0.867이고, 0.173의 SEP가 확인되었다. 표 12에서는 최대값을 이용한 정규화에서 가장 좋은 검증 결과가 확인되었고 결정계수는 0.888이고, SEP는 0.167이었다. 예측 결과의 결정계수로 볼 때 정상 씨감자와 *C. michiganensis* subsp. *sepedunicus*에 감염된 씨감자의 판별 성능이 가장 우수하였다.

그림 56은 각각의 검증 결과에서 우수한 검증 결과를 그래프로 나타내었다. 그래프에는 예측된 결과값과 함께 오차막대를 표시하였다. 표시된 오차 막대에서 정상 씨감자를 감염 씨감자로 판단하는 false positive 부분을 원형으로 표시하였다. 표 9 ~ 표 12에서 검증된 결과의 판별 정확도는 *V. albo-atrum*을 접종한 씨감자가 97.6%인 것을 제외하고 모두 100%이었다. 오차를 포함한 판별 정확도의 경우 1 ~ 3개 정도의 false positive와 false negative가 나타났으며 모든 경우에서 감염 씨감자의 판별 정확도는 90%이상이었다.

Table 9. Calibration and prediction results of sound and *P. atrosepticum* disease-infected seed potatoes using PLS-DA models with several preprocessing.

Processing	Calibration						Prediction			
	$*R_C^2$	SEC	$*R_V^2$	SEP	*DR (%)		$*R_P^2$	SEP	DR (%)	
					con	Pa			con	Pa
Raw data	0.962	0.095	0.881	0.170	100	100	0.918	0.142	100	100
Mean	0.957	0.101	0.876	0.174	100	100	0.919	0.141	100	100
*Nor										
Maximum	0.979	0.070	0.893	0.162	100	100	0.894	0.160	97.5	100
Range	0.957	0.101	0.874	0.175	100	100	0.900	0.157	100	100
1st Derivative	0.980	0.068	0.884	0.168	100	100	0.902	0.155	100	100
2nd Derivative	0.972	0.081	0.890	0.164	100	100	0.882	0.170	100	96.7

R_C^2 : determination of coefficient of calibration

R_V^2 : determination of coefficient of validation

R_P^2 : determination of coefficient of prediction

Nor : normalization

DR : discrimination rate (%)

Table 10. Calibration and prediction results of sound and *C. michiganensis* subsp. *sepedunicus* disease-infected seed potatoes using PLS-DA models with several preprocessing.

Processing	Calibration						Prediction			
	R_C^2	SEC	R_V^2	SEP	DR (%)		R_P^2	SEP	DR (%)	
					con	Cs			con	Cs
Raw data	0.954	0.106	0.904	0.155	100	100	0.900	0.158	100	100
Mean	0.967	0.089	0.912	0.148	100	100	0.922	0.138	100	100
Nor										
Maximum	0.969	0.086	0.912	0.149	100	100	0.917	0.143	100	100
Range	0.962	0.097	0.904	0.155	100	100	0.912	0.148	100	100
1st Derivative	0.959	0.100	0.902	0.157	100	100	0.908	0.151	100	100
2nd Derivative	0.915	0.145	0.875	0.177	100	100	0.865	0.183	97.5	100

Table 11. Calibration and prediction results of sound and *Fusarium* sp. disease-infected seed potatoes using PLS-DA models with several preprocessing.

Processing	Calibration						Prediction			
	R_C^2	SEC	R_V^2	SEP	DR (%)		R_P^2	SEP	DR (%)	
					con	Fs			con	Fs
Raw data	0.973	0.081	0.911	0.148	100	100	0.831	0.203	92.5	100
Mean	0.974	0.079	0.910	0.149	100	100	0.832	0.203	92.5	100
Nor										
Maximum	0.975	0.077	0.909	0.149	100	100	0.815	0.213	92.5	100
Range	0.957	0.102	0.890	0.165	100	100	0.822	0.209	90.0	100
1st Derivative	0.967	0.089	0.902	0.155	100	100	0.806	0.218	90.7	98.1
2nd Derivative	0.964	0.093	0.889	0.166	100	100	0.867	0.173	100	100

Table 12. Calibration and prediction results of sound and *V. albo-atrum* disease-infected seed potatoes using PLS-DA models with several preprocessing.

Processing	Calibration					Prediction				
	R_C^2	SEC	R_V^2	SEP	DR (%) con	Va	R_P^2	SEP	DR (%) con	Va
Raw data	0.965	0.092	0.896	0.162	100	100	0.882	0.172	100	97.6
Mean	0.961	0.098	0.889	0.167	100	100	0.885	0.169	100	97.6
Nor										
Maximum	0.964	0.094	0.889	0.167	100	100	0.888	0.167	100	97.6
Range	0.964	0.094	0.887	0.169	100	100	0.886	0.168	100	97.6
1st Derivative	0.956	0.104	0.889	0.167	100	100	0.845	0.196	97.5	97.6
2nd Derivative	0.945	0.117	0.869	0.182	100	100	0.865	0.183	100	100

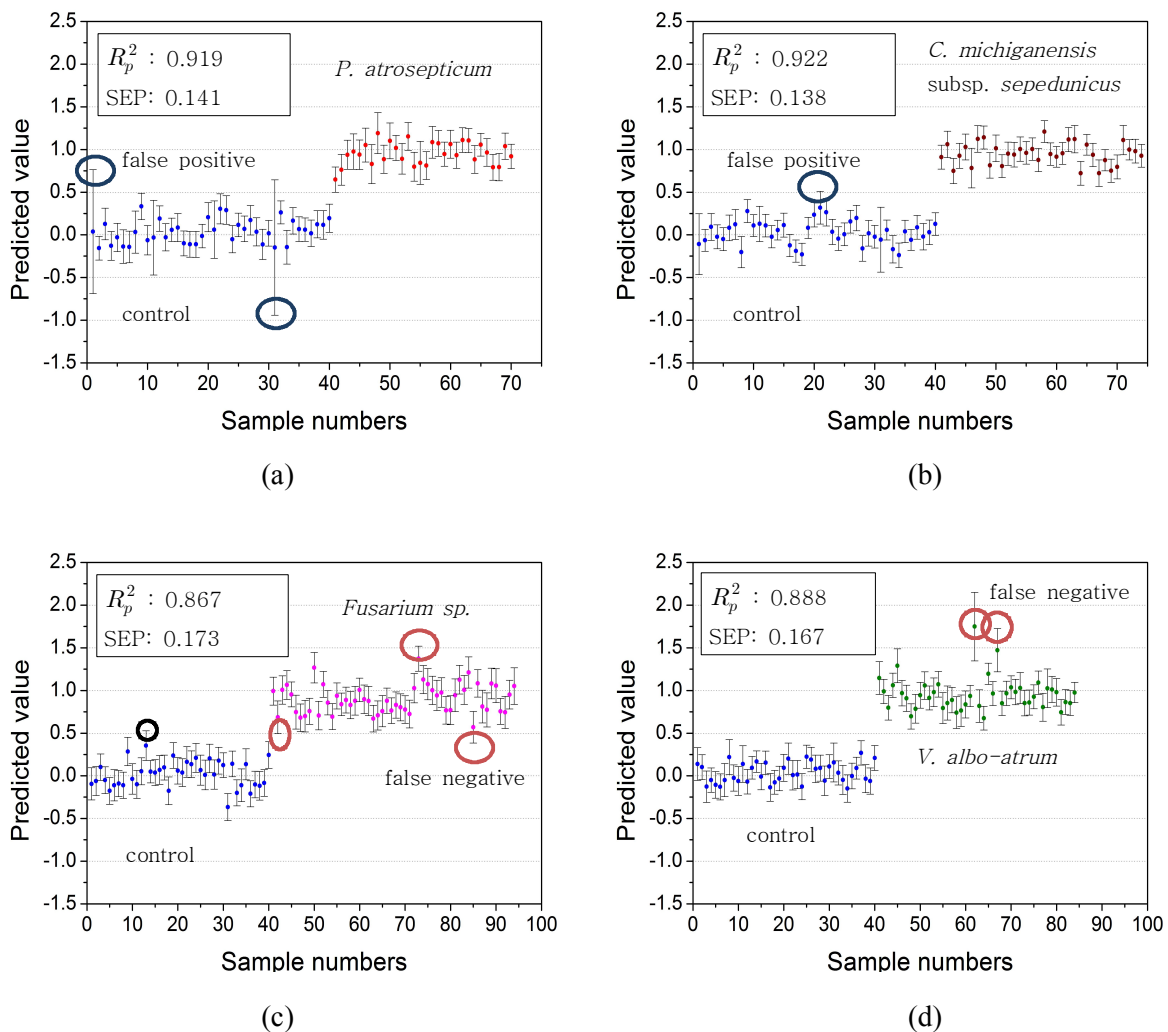



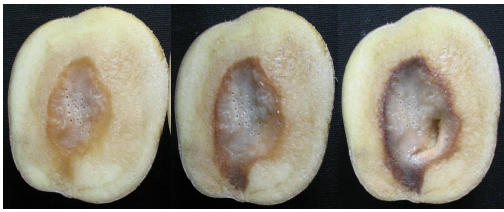

Fig. 56. Predicted results of the best models of PLS-DA with (a) *P. atrosepticum*-infected seed potatoes, (b) *C. michiganensis* subsp. *sepedunicus*-infected seed potatoes, (c) *Fusarium* spp.-infected seed potatoes, and (d) *V. albo-atrum*-infected seed potatoes.

제 3 절 현장 적용형 온라인 비파괴 선별 시스템 개발

1. 온라인용 감염 씨감자 시료 제작

온라인 비파괴 선별 시스템 개발에 적용할 시료 제작은 앞장의 방법과는 달리 수행하였다. 기존의 감염 씨감자 제작은 세균병을 절단면에 접종한 다음 일정기간 동안 저장하면서 3일마다 스펙트럼을 획득하였으나 이는 절단 부위의 병증 확인 및 스펙트럼 획득을 위한 외부 노출로 인하여 표면 및 절단 부위의 급격한 노화가 발생하고 이는 스펙트럼의 획득과 분석에 영향을 미치는 것으로 판단하였다. 따라서 우선 세균을 배양하여 씨감자에 세균을 접종한 후 표 13에 나타낸 바와 같이 일정 동안 병증의 진행 상황을 확인하였다. 최소 범위의 병증 발생을 확인한 후 적합한 병증 씨감자를 제작하고 스펙트럼 획득 후 분석하였다.

Table 13. Description of infected pathogen for seed potato.

병원체	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>		희석 배수	1×10^8 cfu/ml
배양조건	배지	온도		습도
	NB	28°C		80%
배양 기간	7 days			
특징	무름병			
자연발생 병원균 이미지				
씨감자 접종 경과 사진				
				

매뉴얼을 통해 확인된 병증은 가장 작은 범위의 병증을 나타내는 단계에서 온라인용 감염 씨감자 시료로 사용하고자 제작하였다. 제작한 시료는 세균병 중에서 가장 활성이 좋고 자연상태와 거의 동일한 *Pectobacterium atrosepticum*을 선택하고 그림 56과 같이 최소 농도 결정 후 시료로 사용하였다. 세균병의 최소발병농도는 이전 연구 결과에 의거하여 접종 후 12 ~ 24시간 내에 병증이 가장 빠르게 나타나는 4배 희석 배양액 1×10^8 cfu/ml 농도를 접종하였으며, 각각 20 ul, 50 ul씩 접종 하여 접종 후 시간에 따른 변화 및 접종량에 따른 병 발생 양상을 관찰하였다. 그림 57과 같이 균주의 접종량을 달리하여 접종한 결과 20 ul를 접종하였을 때 병증이 중심부로부터 서서히 진행됨을 확인 하였고, 50 ul를 접종한 경우 넓은 면적으로 퍼지는 것으로 확인 되었다. 이는 접종량이 많아 배양액이 퍼지면서 넓은 면적으로부터 병증이 나타나는 것으로 확인 되었다. 병증이 나타나는 시기 역시 접종한 후, 50 ul의 경우 1일차에 병증이 나타나는 것을 확인 하였고, 20 ul의 경우 2일차부터 육안으로 확인되는 병증이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 총 80개의 정상 씨감자를 절단하여 20 ul을 접종하고 2일 저장 후 스펙트럼 획득에 이용하였다. 정상씨감자와 판별 가능성을 온라인 선별 장치를 통하여 실험하였다.

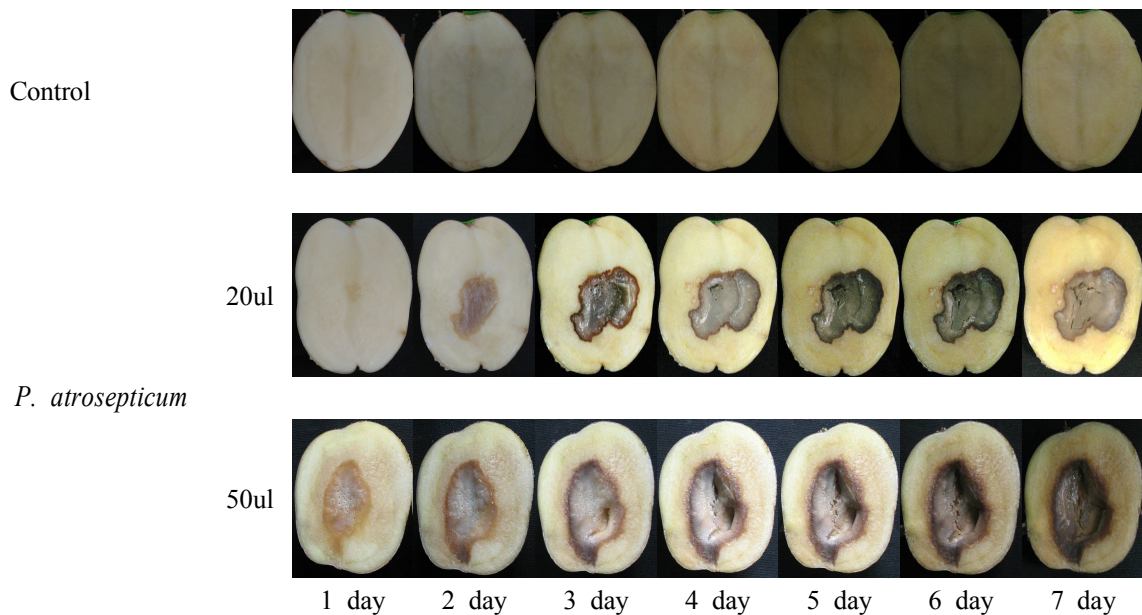


Fig. 57. Photo of sound and *P. atrosepticum*-infected seed potato during 7 days

2. 온라인 적용을 위한 기초용 분광분석 장치 구축

가. 실험용 투과식 분광분석 장치 구축

실험용 투과식 분광분석 장치를 구축한 이유는 온라인 선별 시스템에 적용할 투과스펙트럼이 투입부에 의해 자동으로 씨감자가 이송컵에 투입될 때 다양한 형태로 위치할 수 있으므로 적합한 광원의 위치를 고려하기 위해서이다.

우선 정상 씨감자를 이용하여 그림 58에 나타난 바와 같이 시스템 개발에 사용된 분광분석 장치는 최종 개발된 온라인 시스템에 적용이 용이한 휴대용 분광분석 장치(USB4000, Ocean Optics Inc., USA)를 이용하였으며, 수광부 옵틱 파이버(QP1000-2-VIS-NIR, Ocean Optics Inc., USA), 발광부 옵틱파이버, 할로겐램프(LS-F100HS-IR, Seokwang Optical Co., LTD, Korea), 광원세기 조절장치(RC232C-10C-USB)를 사용하여 구성하였다.



Fig. 58. Components of a prototype for nondestructive spectral measurements.

그림 59에 나타난 바와 같이 기초용 시작기는 암실로 제작하기 위하여 외형을 구성하였고 내부에 시료부를 설치하였으며 시료부 아래에 스펙트럼을 획득할 수 있도록 설계하였다. 광원의 구성이 중요한데 그림 59와 같이 지름 40 cm인 반원구를 구입하고 위쪽에 4 개의 홀을 만들어 광원의 발광부 옵틱파이버를 고정하였다. 4개의 발광부 옵틱파이버간의 각도는 90° 이며 위에서 아래 방향으로 시료와 45° 에서 조명하도록 위치하도록 하였다. 동일한 샘플을 이용하여 여러 방향으로 획득한 각각의 스펙트럼은 평균을 이용한 정규화 전처리로 그림 60에 그래프로 나타내었다. 그래프는 거의 동일한 형태를 나타내므로 온라인 선별 시스템 개발에 활용이 가능할 것으로 판단하였다.

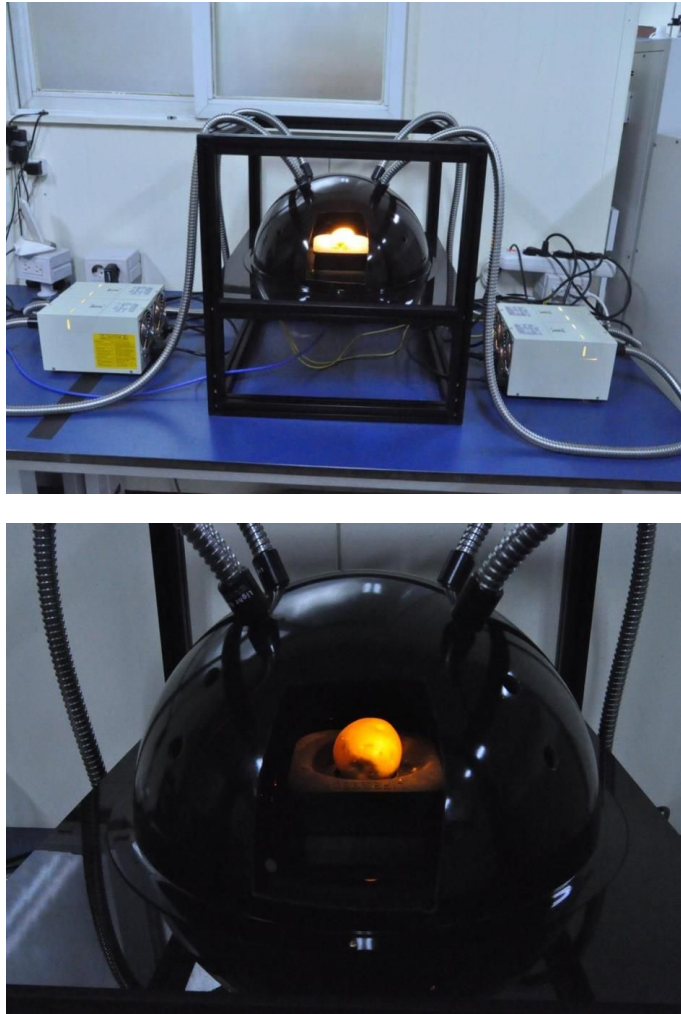


Fig. 59. The fundamental system to acquire transmittance spectra from sound and pathogen-infected seed potatoes.

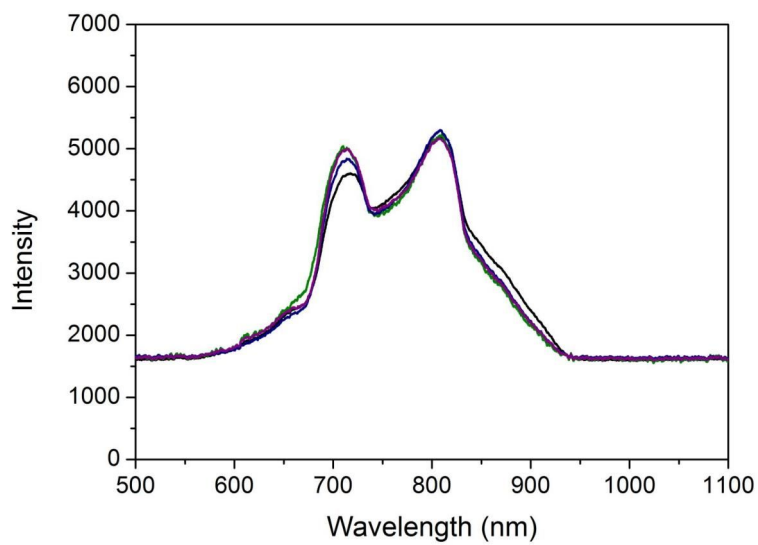


Fig. 60. Graph of same intensity of several directed transmittance spectra from seed potato.

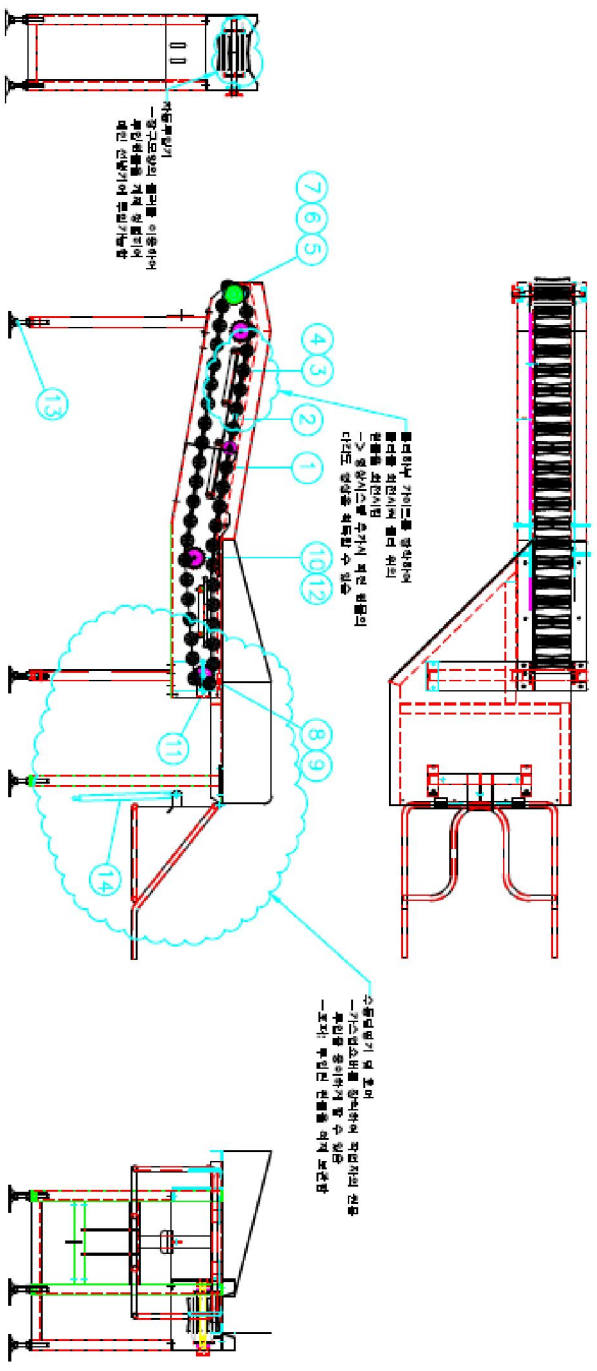
나. 온라인 비파괴 선별 장치 개발

참여기업인 (주)생명과기술에서 감염 씨감자 선별에 필요한 시작기를 그림 61에 나타낸 바와 같이 설계하였다. 그림 62(a, b, c)는 설계 도면을 바탕으로 실제 개발된 시작기 사진이다.

반자동 투입방식은 작업자의 편의성을 고려하여 그림 62(a)와 같이 플라스틱 혹은 박스 단위로 적재한 후 리프팅하여 작은 힘으로 씨감자를 투입부의 높은 위치로 옮길 수 있도록 하였으며 쏟아진 씨감자는 계단식으로 배열된 롤러에 올려놓을 수 있도록 하였다. 올려놓은 씨감자는 투입부를 지나 62(b)에 나타낸 바와 같이 이송컵으로 옮겨지게 되고 이송컵 아래의 위치한 두 개의 솔레노이드 밸브가 있어 감염 씨감자와 정상 씨감자를 분류할 수 있도록 구축하였다. 씨감자는 선별부로 이동되고 이송컵은 62(b)와 같이 회전하여 아래로 이동하도록 구축하였다.

그림 62(c)에 나타낸 바와 같이 선별 시스템은 반자동 투입방식으로 제작된 투입부와 씨감자를 이동시키는 이송컵부 그리고 솔레노이드 밸브를 제어하여 정상씨감자와 감염 씨감자를 나누는 선별부를 표기하였으며 본 장치에서 분광분석을 적용할 부분은 이송컵이 지나가는 라인에 위치하도록 설치하여 스펙트럼 획득 및 판별 알고리즘 적용 후 정상 및 감염 씨감자를 선별할 수 있도록 하였다.

NO	DATE	REVISION & DESCRIPTION	SIGNATURE DRAWN / APPROVED
----	------	------------------------	-------------------------------



1 EA	13	볼트	볼트	2 EA	7	볼트(수동동반기용)	
8 EA	13	볼트	볼트	1 EA	8	볼트(모터용)	
8 EA	13	볼트	볼트	1 EA	3	볼트(모터, 베어링)	
2 EA	11	볼트	볼트	2 EA	4	볼트	
2 EA	12	볼트	볼트	2 EA	3	볼트	
8 EA	8	볼트	볼트	2 EA	2	볼트	
1 EA	8	볼트	볼트	4 EA	1	볼트	
QTY	NO.	PART NAME	PART NO.	QTY	NO.	PART NAME	PART NO.

DeaTech LIFE & TECHNOLOGY CO., LTD.

수동동반기

DESIGNER: 수동동반기-내선민

DRAWN: NS

CHECKED: NS

DATE: / /

SCALE: NS

REVISION: MM

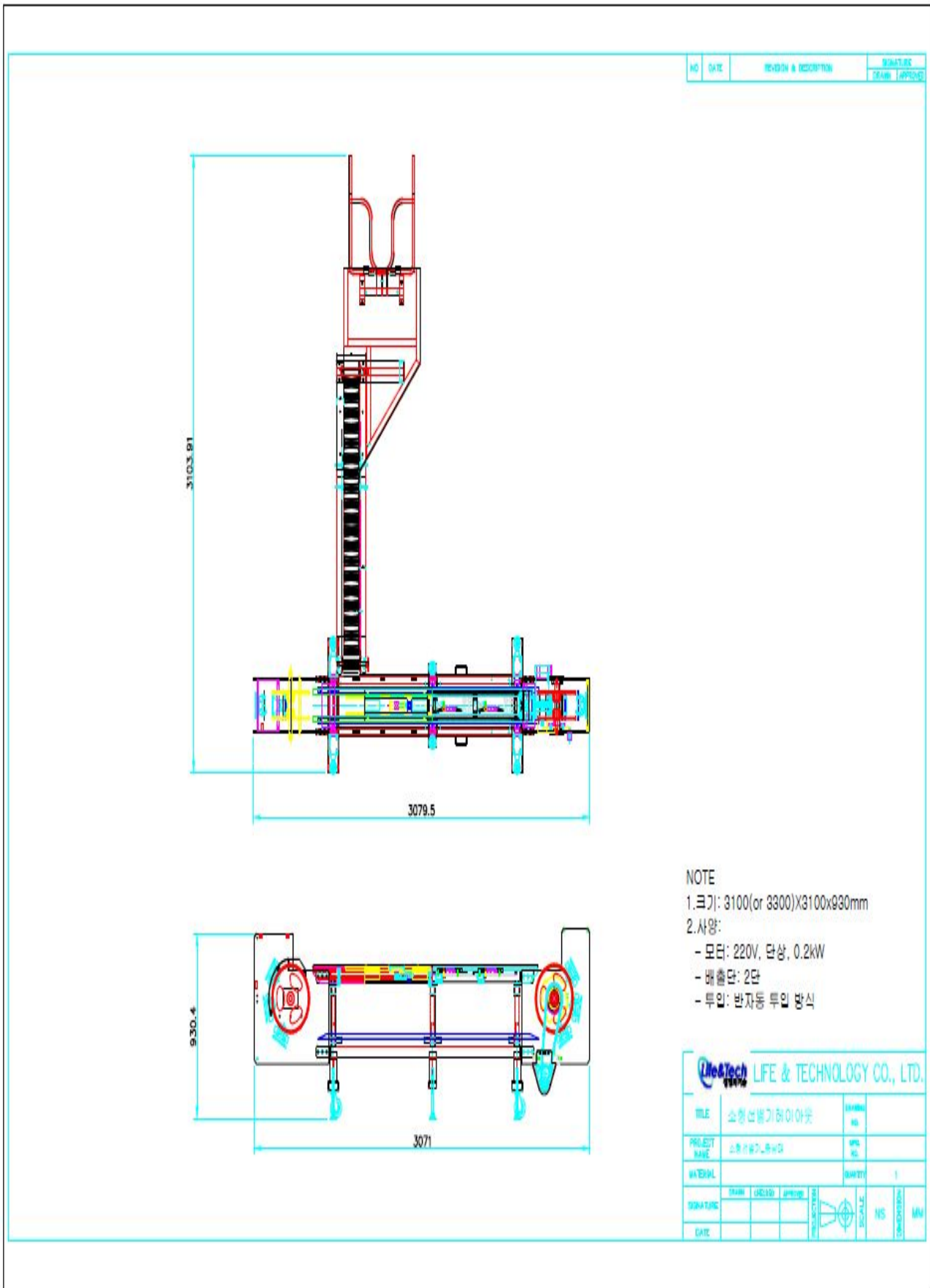


Fig. 61. Drawing of designed sorting machine for seed potatoes.



Fig. 62(a). Insert part of the developed sorting machine of seed potatoes.

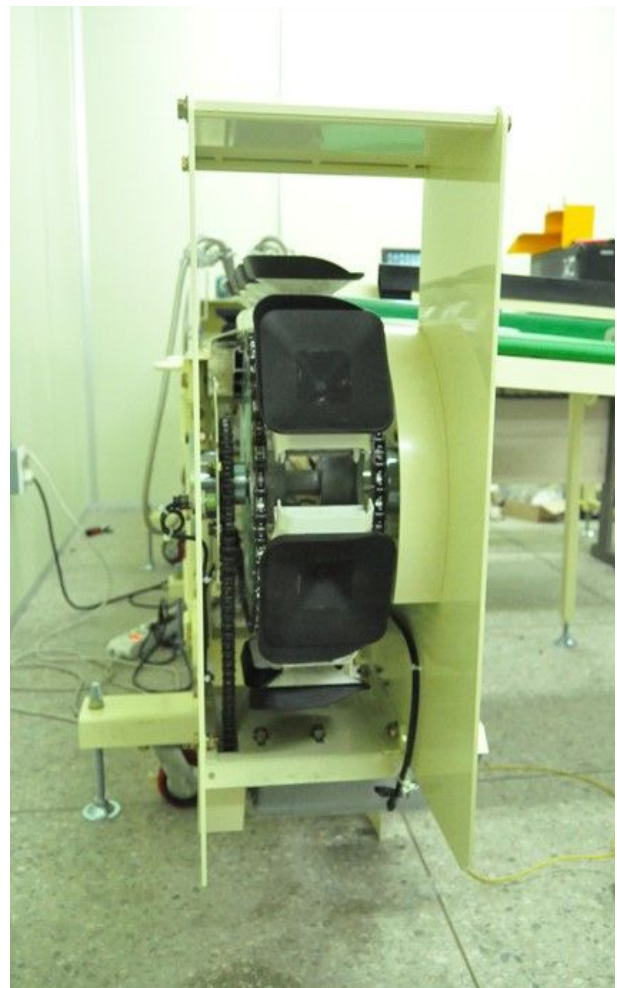
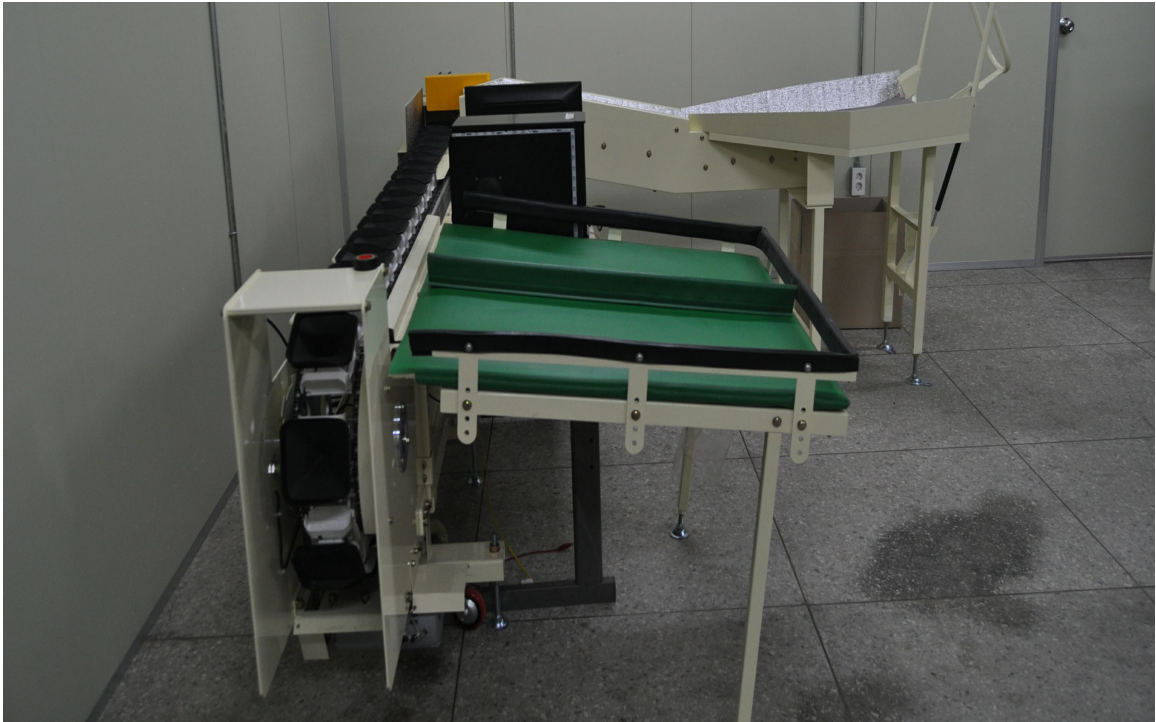


Fig. 62(b). Seed potato transfer container and solenoid valve of the developed sorting machine of seed potatoes.

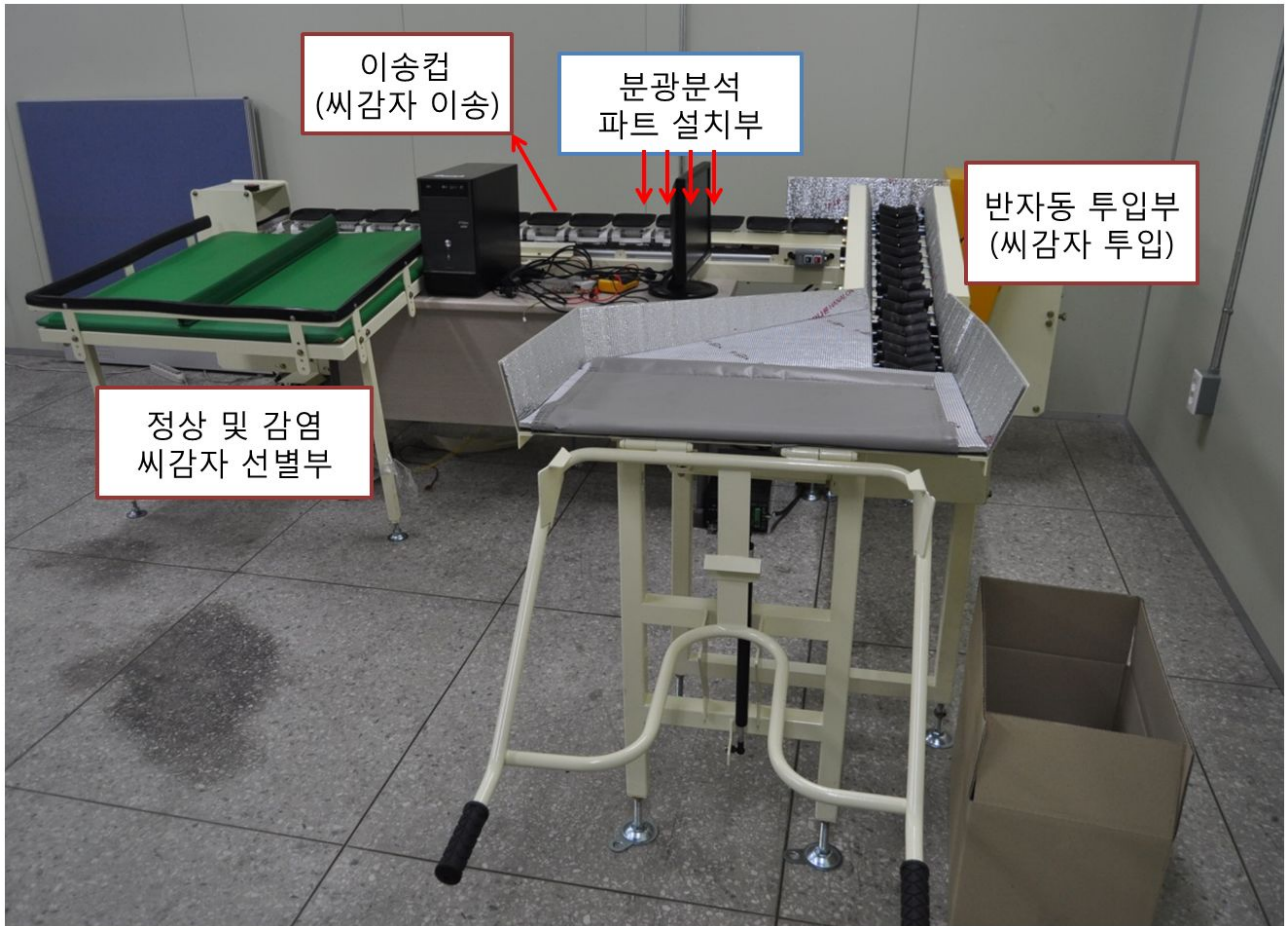


Fig. 62(c). The whole developed sorting machine of seed potatoes.

다. 이송컵에 적합한 분광분석 장치 구축

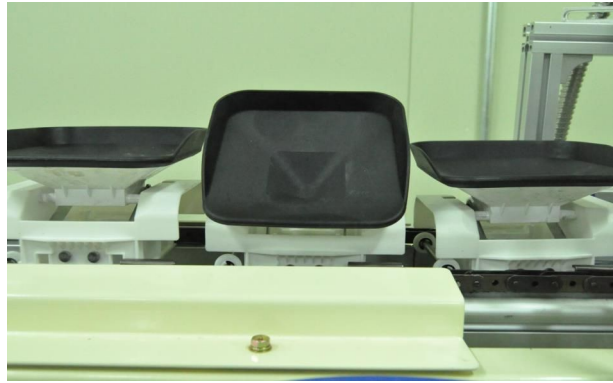
이송컵의 사진은 그림 63(a)에 나타내었다. 씨감자의 크기 및 형태가 균일하지 않으므로 완전한 기울기를 가진 이송컵을 선택하였다. 이송부는 그림 63(b)에 오른쪽에 나타난 바와 같이 선별 시스템에서 솔레노이드벨브에 의해 이송부를 기울여 시료를 낙하시키게 되도록 구성되어 있다.

본 연구의 기초실험에서 투과스펙트럼을 획득할 때 시료부의 아래에 수광부 옵티카이버가 위치하였으나 온라인 시스템에서는 이송컵의 아래 부분에 스프링 장치가 있어 다른 위치에 수광부 옵티카이버를 설치하는 것이 필요하였다. 따라서 그림 63(c)와 같이 이송부의 중심쪽으로 향하게 일정한 간격의 구멍을 제작하였다. 구멍의 주변에는 이송컵의 색상이 흰색이므로 스펙트럼 획득 당시 Intensity가 높아지는 영향을 고려하여 무광택의 검은색으로 도색을 하였다. 그림 63(d)는 구멍의 위치에 수광부 옵티카이버를 위치시킨 사진이다. 스펙트럼의 획득에 특별한 영향을 없음을 확인한 후 모든 이송컵을 동일하게 구멍을 제작하고 무광택 검은색으로 도색 처리하였다.

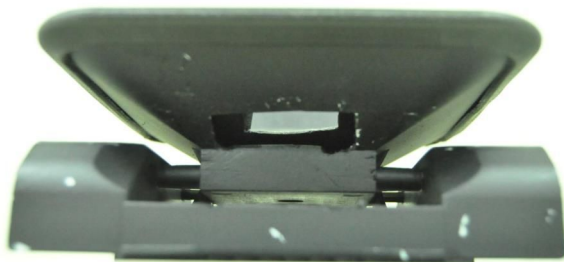
위에서 언급한 바와 같이 광원의 위치는 형상이 불규칙한 씨감자를 고르게 조사할 수 있도록 광원을 설치하는 것이 중요하므로 그림 58에 나타낸 발광부 옵티카이버를 사용하여 씨감자 위에 지지대를 이용한 광원 소켓을 이용하였다. 이는 반원구의 홀과 동일한 효과를 나타내었다. 설계는 그림 64(a)에 나타낸 바와 같다. 그림 64(b)는 프로파일과 함께 발광부 옵티카이버 소켓을 4개 제작하여 씨감자와 광원의 거리가 일정하게 되도록 설치한 모습이다.



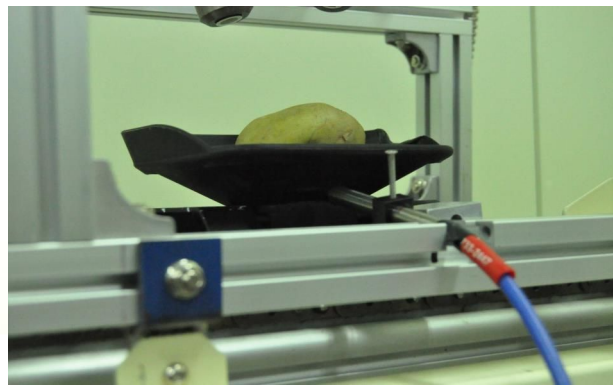
(a)



(b)

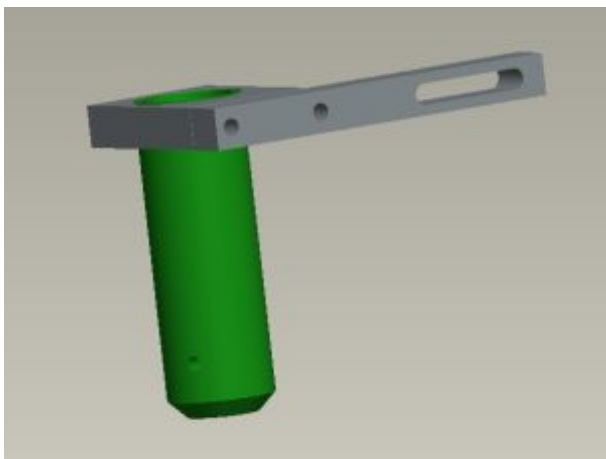


(c)

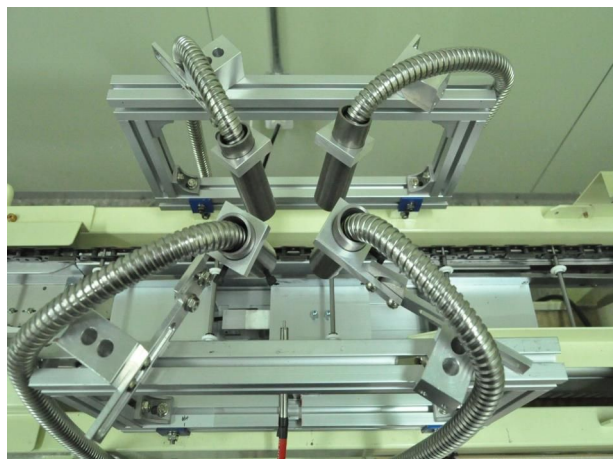


(d)

Fig. 63. Photo of cup holder used for sorting machine



(a)



(b)

Fig. 64. Photo of Installing (a) socket and (b) optic fiber to make the spectroscopy part.

라. 제어 시스템 및 프로그램 구축

온라인 선별 시스템에서의 제어는 이송되고 있는 씨감자를 일정한 간격과 동일한 위치에서 시료의 스펙트럼이 획득되도록 하는 것이 필요하며 알고리즘 연산 후 정상 및 감염 씨감자를 판별한 후 정해진 위치에서 씨감자를 선별해내는 작동이 필요하다. 따라서 제어의 두 파트를 동시에 제어할 수 있도록 전기회로를 그림 65와 같이 제작하였다. 첫 번째는 2개의 솔레노이드밸브를 제어할 수 있도록 데이터 수집 디바이스(USB-6008, NI)와 2개의 무접점 릴레이(Solid State relay; SSR)에 연결하여 각각의 솔레노이드 밸브를 제어하도록 구성하였다. 두 번째는 체인 주변에 이송컵 1개의 간격과 근접센서를 설치하여 근접센서가 작동할 때 릴레이가 접합되도록 하였고 이 때 스펙트럼을 획득할 수 있도록 하였다. 그리고 톱니 원형을 미세하게 조절하여 분광분석 파트에서 씨감자가 이송부의 정중앙에서 도착하였을 때 씨감자의 스펙트럼을 측정할 수 있도록 하였다.

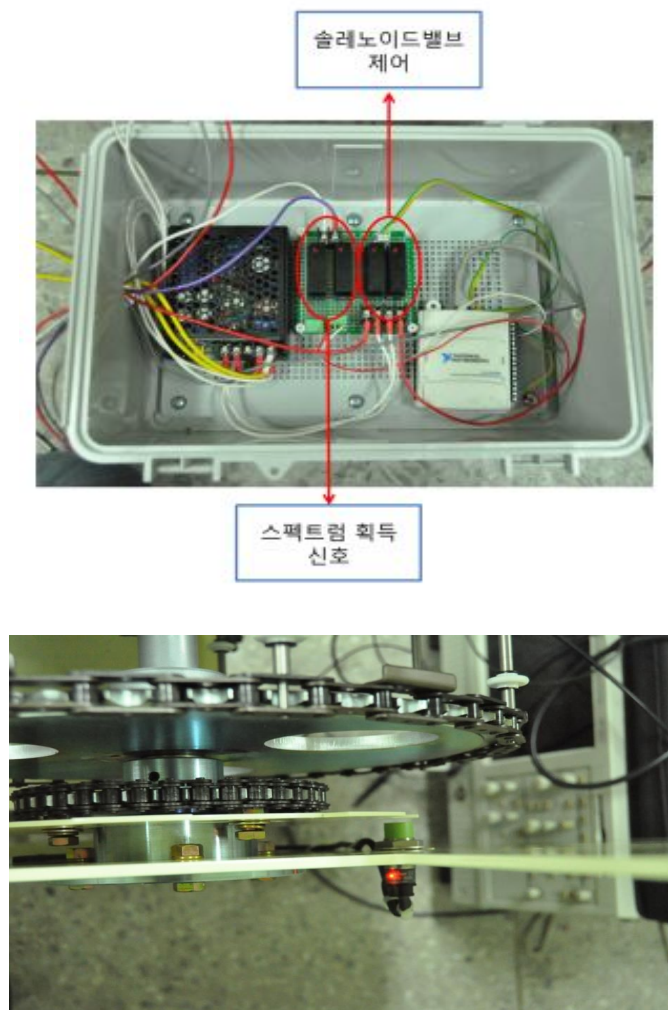


Fig. 65. Photo of electrical circuit and proximity sensor to control spectra measurement and solenoid valve motion.

위의 회로를 제어하기 위하여 프로그램을 개발하였다. 그림 66에 나타난 바와 같이 투과스펙트럼을 획득하기 위하여 integration time, scan number, moving average를 조절하여 최적의 스펙트럼을 획득할 수 있도록 하였고 획득한 스펙트럼을 확인할 수 있도록 그래프를 사용하였다. 또한 솔레노이드밸브와 통신을 위하여 아래쪽에 검은색 6칸은 스펙트럼 획득한 순간부터 메모리에 할당하고 씨감자가 알고리즘을 거쳐 감염 및 정상을 판단한 다음 first와 second 솔레노이드밸브 중 하나가 작동되도록 하였고 모니터링 할 수 있도록 하였다.

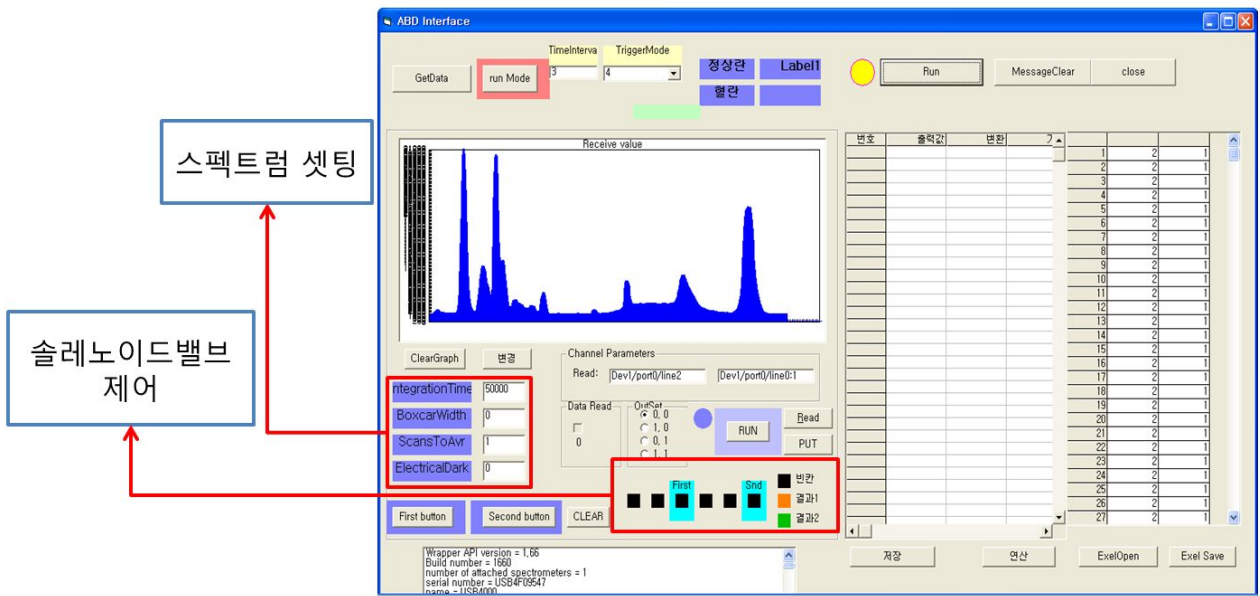


Fig. 66. The developed software to classify sound and pathogen seed potato using spectroscopy and PLS-DA.

3. 온라인 선별을 위한 알고리즘 개발

가. 온라인 선별 시스템에서의 감염 씨감자 판별 실험

온라인 선별 시스템에 제어를 위한 프로그램 개발, 분광분석 장치를 구축한 후 온라인 선별 시스템과 PLS-DA를 활용한 선별 모델 개발 및 정확도 분석을 실시하였다. 세균 및 곰팡이들 중에서 감염의 피해가 가장 크고 병증의 진행이 빠르며 무엇보다도 자연 발생된 병증과 가장 유사한 병증을 나타내는 *P. atrosepticum*을 온라인 선별 시스템의 모델 개발용으로 시료를 제작하였다. 정상 씨감자에 접종하여 80개의 감염 씨감자를 제작하였다. 대조군으로 정상 씨감자도 80개를 준비하였다. 감염 씨감자와 정상씨감자는 판별 모델 개발을 위해 그림 67과 같이 이송부에 올려놓고 온라인 상태에서 투과스펙트럼을 획득하였다.

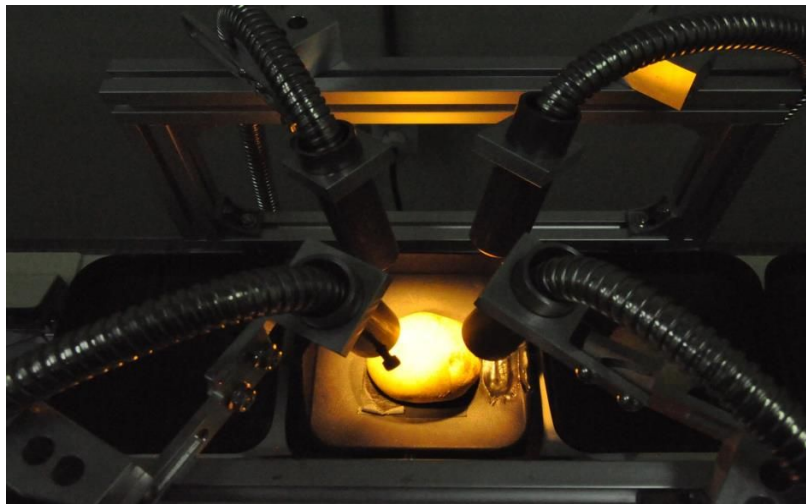
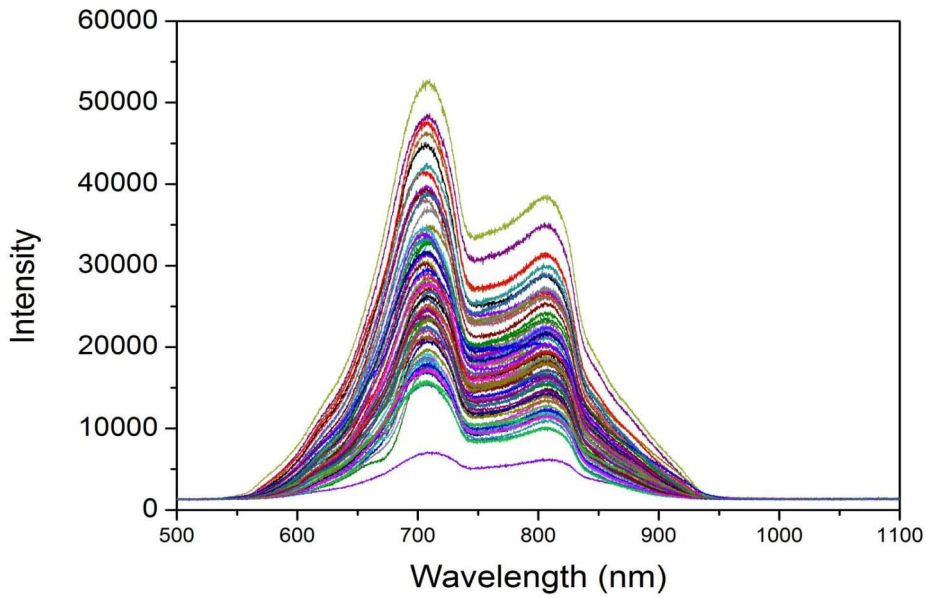


Fig. 67. Nondestructive spectroscopy measurement form sound and *P. atrosepticum* seed potatoes.

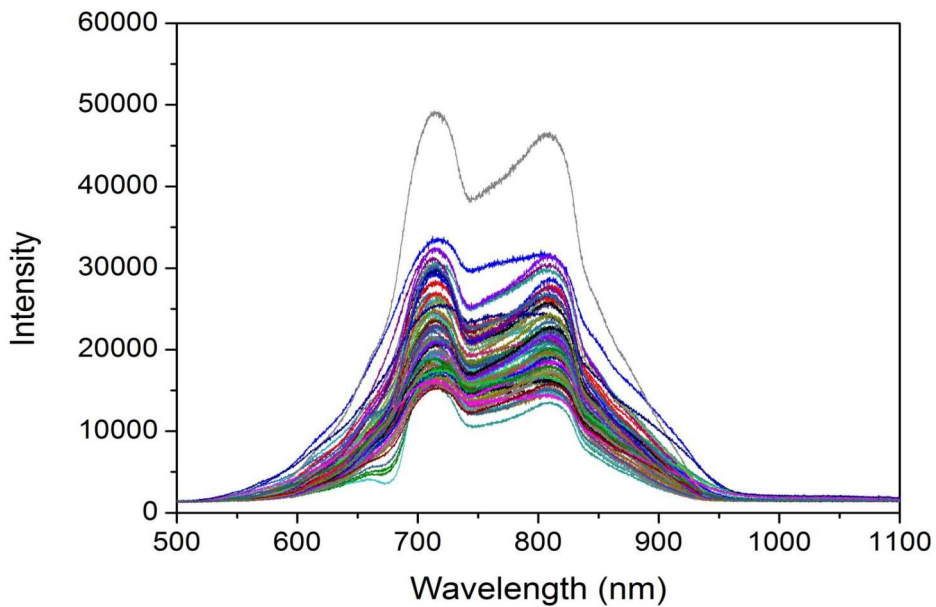
나. 획득한 감염 씨감자 투과스펙트럼 분석

정상씨감자와 감염 씨감자의 획득한 투과스펙트럼을 그림 68(a, b)에 나타내었으며 씨감자의 스펙트럼은 600 ~ 950 nm 사이에서 주요한 변화들이 관찰되었으며 주요 특징적인 영역으로는 700 nm, 750 nm, 820 nm에서 뚜렷하였다. 획득한 스펙트럼을 평균 스펙트럼으로 나타내고 분석한 결과, 정상 씨감자와 감염 씨감자의 스펙트럼의 비교해본 결과 정상씨감자에서는 700 nm 파장영역에서 감염 씨감자보다 피크점이 높게 나타났으며 반면에 820 nm 파장영역에서는 정상씨감자의 피크점이 감염 씨감자의 피크점보다 상대적으로 낮게 나타났다. 정상씨감자는 700

nm, 820 nm 파장영역의 스펙트럼 피크 변화가 크게 나타나는 반면 감염 씨감자는 피크점의 변화가 거의 없는 것으로 확인되었다. 그림 69는 정상 및 감염 씨감자의 평균 스펙트럼을 나타낸 것이다.



(a)



(b)

Fig. 68. Raw transmittance spectra acquired from (a) sound and (b) *P. atrosepticum* seed potatoes, respectively.

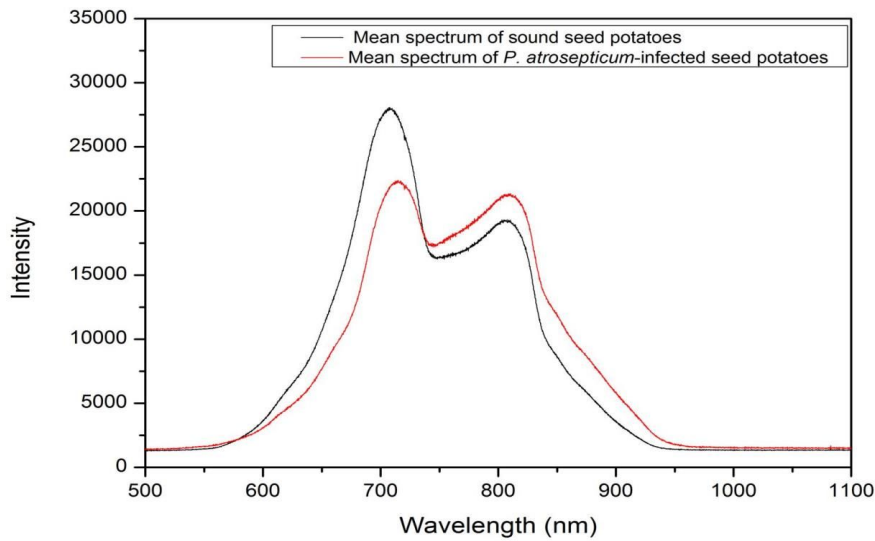


Fig. 69. Transmittance mean spectra acquired from sound and *P. atrosepticum* seed potatoes.

다. PLS-DA 결과 고찰

본 연구에서 정상씨감자와 감염 씨감자로 획득한 스펙트럼의 모델 개발 및 검증을 위하여 160개의 스펙트럼 데이터를 8:2의 비율로 나누어 모델 개발과 검증을 하였다. 즉, 총 128개의 데이터가 PLS-DA의 모델 개발에 사용되었고 32개의 데이터가 검증에 사용되었다. 우수한 모델의 평가 기준은 각 전처리에 의해 개발된 모델의 성능을 평가하였는데 결정계수가 높고 SEC(Standard error of calibration) 및 SEP(standard error of prediction)가 작아야 하며 PC의 수등을 고려한다. 본 연구에서는 첫 번째로 개발된 모델의 결정계수와 cross validation의 결정계수의 차이가 적고, 둘째로 PC의 수가 낮으며 마지막으로 SEC, SEP가 낮은 모델 순으로 고려하여 우수한 모델로 평가하였다.

표 14는 개발된 모델의 결과이며 정상씨감자와 감염 씨감자의 PLS-DA 결과이다. 분석결과를 볼 때 정확도는 모두 100%이었고 결정계수는 모든 전처리에서 0.9 이상이 확인되었다. 가장 높은 결정계수는 아무런 전처리를 하지 않은 모델에서 0.989로 높은 결정계수가 확인되었으나, 우수 모델 판정 기준을 고려해 볼 때 이동평균을 이용한 평활화 전처리에서 가장 좋은 모델이 확인되었는데 이때 개발된 모델(Calibration)의 결정계수는 0.967이며 SEC는 0.091이었다. 검증(validation)의 결정계수는 0.943이고 SEV는 0.121이다. 그림 70은 가장 우수한 모델의 개발된 결과를 그래프로 나타내었으며, 감염 씨감자를 새로 제작하여 온라인 선별시스템을 성능을 검증하는데 사용하기로 하였다.

Table 14. Calibration results of the sound and *P. atrosepticum* seed potato using PLS-DA models with several preprocessing.

Preprocessing	PC no.	Calibration		Validation		Accuracy (%)		
		R_c^2	SEC	R_v^2	SEV	Sound	Infection	
Raw	10	0.989	0.053	0.938	0.125	100	100	
Moving average smoothing	10	0.967	0.091	0.943	0.121	100	100	
Normalization	Mean	10	0.958	0.103	0.913	0.149	100	100
	Range	11	0.959	0.101	0.920	0.143	100	100
MSC	9	0.955	0.107	0.910	0.107	100	100	

R_c^2 : Coefficient of determination for calibration

R_v^2 : Coefficient of determination for validation

SEC : Standard error of calibration

SEV : Standard error of validation

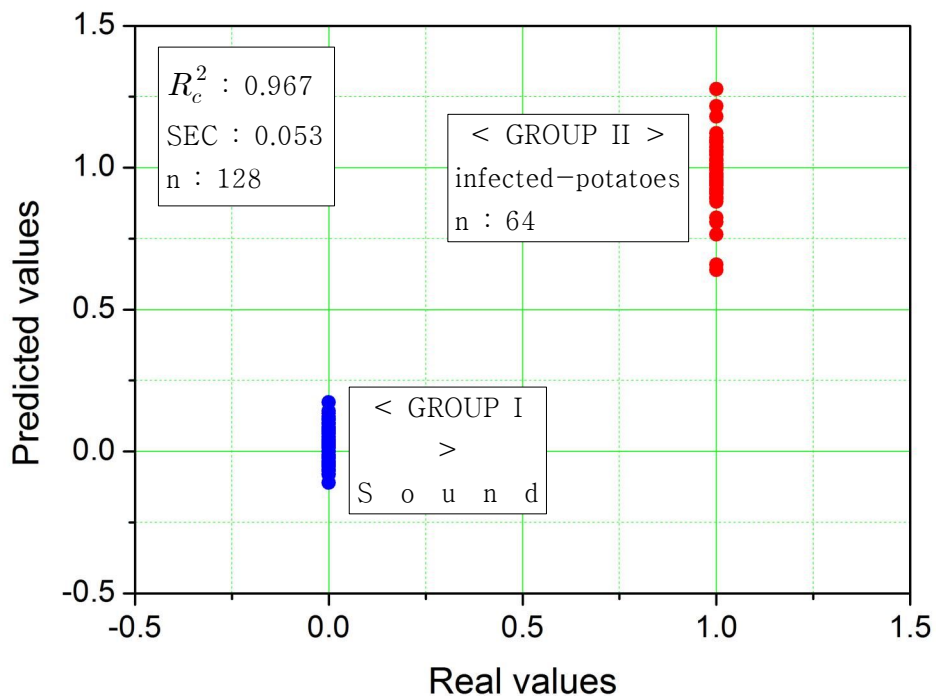


Fig. 70. PLS-DA calibration algorithm for sound and infected seed potato to use online sorting machine.

표 15는 전처리별 모델을 적용하여 확인한 결과이며 이동평균을 이용한 평활화 전처리에서 0.950의 결정계수와 0.109의 SEP가 확인되었으며 이때 정확도는 정상 및 감염 씨감자 모두 100%이었다. 그림 71은 이동평균을 이용한 평활화 전처리의 예측결과를 나타내었으며 각각의 예측결과 값에 오차값을 적용한 경우에도 다른 그룹으로 속하는 경우는 없었다.

Table 15. Predicted results of the sound and *P. atrosepticum* seed potato using PLS-DA models with several preprocessing.

Preprocessing	Prediction		Accuracy (%)	
	R_p^2	SEP	Sound	Infection
Raw	0.948	0.111	100	100
Moving average smoothing	0.950	0.109	100	100
Normalization	Mean	0.907	100	100
	Range	0.915	100	100
MSC	0.901	0.158	100	100

R_p^2 : Coefficient of determination of prediction

SEP : Standard error of prediction

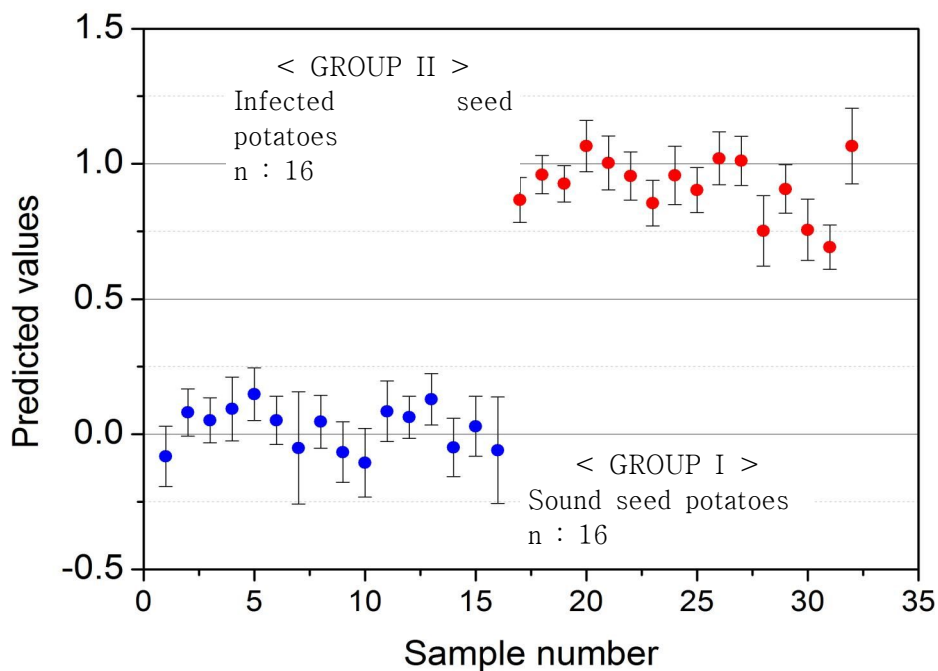


Fig. 71. The predicted results at the best models of PLS-DA with sound and infected seed potatoes.

라. 온라인 선별 시스템에서의 성능 평가

위에서 가장 우수한 모델을 이용하여 실제 온라인 선별 시스템에 전처리와 판별 모델을 씨감자 스펙트럼 획득한 후 계산되도록 프로그램화 하였다. 이는 현장에서 실시간 적용 가능성을 평가하는 것과 동일한 효과를 나타내는 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단하였기 때문이다. PLS-DA를 통해 개발된 판별 모델로 연산하여 예측값을 얻기 위해서는 하나의 스펙트럼의 크기가 동일한 벡터값과 상수 값이 필요하다. 이는 β -coefficient, β_0 라 한다. 즉, 예측 값은 획득한 씨감자 스펙트럼의 벡터와 β -coefficient 벡터의 곱으로 표현되며 일정한 상수값 β_0 의 연산에 의해 정상 및 감염 씨감자로 판별되어진다. 아래의 식 18과 같이 나타낼 수 있다. 그림 72는 표 13의 이동평균을 이용한 평활화 전처리의 우수한 모델의 β -coefficient 그래프이다.

$$\hat{Y} = \beta_i \times X_i^n + \beta_0 \quad \text{----- (18)}$$

where,

i : Vector size (3648)

\hat{Y} : Predicted result (0 : Sound seed potato, 1 : infected seed potato)

β_i : β -coefficient Calculated by optimal developed PLS-DA

X_i^n : Each sample spectrum

β_0 : Constant (value : -7.247)

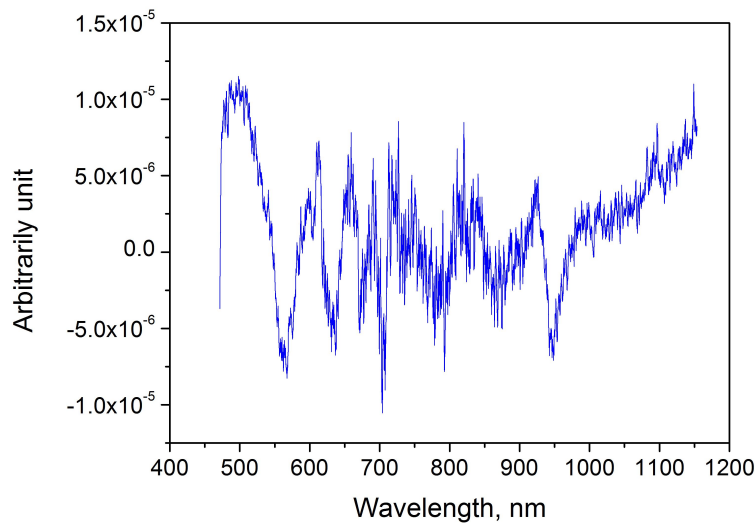


Fig. 72. Spectrum of beta coefficient of optimal developed PLS-DA



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Fig. 73. Real process of sorting machine using sound and infected seed potatoes with the best PLS-DA model.

그림 73은 개발되어진 모델을 이용하여 성능을 평가하고자 감염 씨감자와 정상 씨감자를 제작하고 실험한 사진이다. 특히 그림 73(f)은 판별된 감염 씨감자의 대표적인 사진을 나타내었다. 씨감자는 정상과 감염 상태를 확인할 수 없도록 무작위로 투입부에 넣고 장치를 가동하였

다. 각각의 시료는 정상 씨감자 30개와 감염 씨감자 50개이며 실험이 완료된 후 정상 및 감염 씨감자를 분석하고 확인한 결과를 그림 74에 나타내었다. 그림 74에 나타낸 바와 같이 에러값을 포함할 경우 다른 그룹에 속할 수 있는 샘플들이 일부 존재하였으나 각각의 정상 및 감염 씨감자는 정확하게 두 그룹으로 분류되었다.

특히 에러값의 범위가 일부의 샘플에서 높게 나타나는 이유는 투입부에서 이송부로 옮겨질 때 병중의 부위가 정확하게 가운데로 이송컵에 위치하는 경우보다는 바깥쪽이나 다른 곳에 위치하여 병중 스펙트럼의 강도가 약한 경우 발생하는 것으로 판단되었다. 향 후 이러한 문제를 해결하기 위하여 투입부에서 이송부로 옮겨진 후 분광분석 장치까지의 거리동안 이송컵에 진동을 발생시켜 씨감자가 정위치에 놓일 수 있도록 하는 장치로 해결 가능할 것이다.

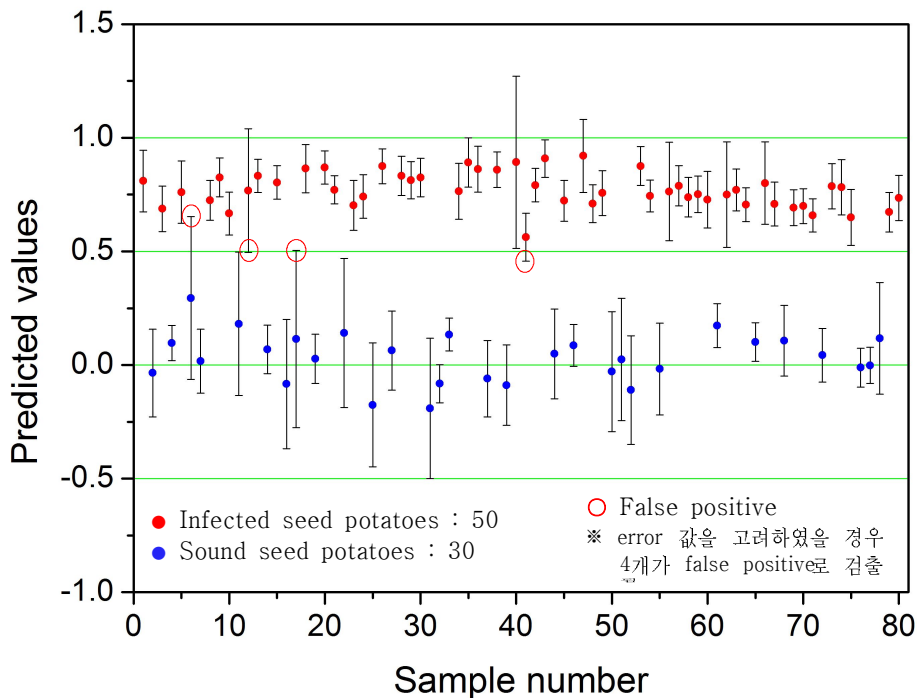


Fig. 74. Predicted result of online sorting machine using developed software with discriminant model.

4. 연구개발 최종 목표 달성 요약

본 연구는 현장에서 감염 씨감자의 비파괴 신속진단을 수행할 수 있는 온라인 선별 시스템 개발을 목표로 수행되었다. 선별시스템에 장착될 감염 씨감자 판별모델 개발을 위해 내부에 발생하는 감염 씨감자를 다양한 농도로 제작하고 기초용 분광분석 시스템을 이용하여 PLS-DA의 판별 모델을 개발하였다. 또한 외부에 발생할 수 있는 병증의 신속한 검출을 위해 초분광 영상 및 형광 영상 시스템으로 영상을 획득하고 ANOVA, PCA, PLS-DA 등의 판별 알고리즘으로 감염 부위의 검출 가능성을 평가하였다. 온라인 선별시스템의 모델 개발을 위해서는 감염 씨감자 중 자연 감염에 가장 가까운 *P. atrosepticum* 병원균을 대상으로 농도별 감염 씨감자를 제작하여 온라인 선별 시스템의 판별모델 개발 및 감염여부 판별 정확도를 분석하고 시스템의 성능 검증을 실시하였다. 현장 검증을 위한 방안으로 씨감자 저장 중에 가장 빈번하게 발생하는 흑색심부병에 감염된 씨감자를 실제 농가로부터 확보하고 온라인 선별 시스템의 현장 적용 가능성을 평가하여 본 연구과제의 목표인 기술 개발의 달성 가능성을 높였다. 개발된 선별시스템은 기존의 씨감자 감염여부 진단과 비교하였을 경우 수분 이내로 비파괴 측정이 가능하며, 전수조사, 다양한 병증에 따른 선별 가능, 노동력 및 전문 인력의 절감효과를 기대할 수 있으며 나아가 안정적인 씨감자의 공급으로 농가의 소득 증대에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구 개발 목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2011)	비과괴 신속진단을 위한 병원균 감염 씨감자 제작 및 감염 최적수준 제어	씨감자 감염 병원균 농도 수준 제어 방법 개발	100	- 병원체 확보 및 배양
			100	- 씨감자에 병원체 감염 및 재배
			100	- 감염 수준 제어 및 감염 단계별 시료제작
	투과광 및 반사광 스펙트럼을 이용한 씨감자 내부 병증 검사 시스템 구축	투과광을 이용한 스펙트로미터의 획득부 시작기 구축	100	- 스펙트로미터 획득부 구축 - 시료의 홀더 제작
			100	- 투과광 스펙트럼 획득 - 반사광 및 적분구 이용 스펙트 럼 획득
			100	- 병증 진행에 따른 투과 및 반사 스펙트럼 분석 - 다변량 분석기법을 이용한 감염 씨감자 검출 및 정확도 분석

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2012)	씨감자 주요 감 자 병원균을 대 상으로 한 비파 괴 진단을 위한 시료 제작	병원체 확보 및 배양 씨감자 병원체 감염 연구	100	- 씨감자에 심각한 피해를 발생 시키는 세균 및 곰팡이 선정
				- 균주 확보 및 최적 배양 연구
				- 감염 씨감자 제작을 위한 최 적 방안 도출
	감염 씨감자 검 출을 위한 초분 광 영상 기술 적 용 및 최적 검출 모델 개발	초분광 영상 시스템 구축	100	- 시료 전체면 조사를 위한 조 명의 적정 위치 및 광량 구명
				- Step motor를 이용한 line-scan 제어 방식(온라인 선별기반) 구현
				- 초분광 자동 영상획득을 위한 소프트웨어 개발
		다분광 형광 영상을 이용한 씨감자 표면감염 검출 기술 개발	100	- 형광특성 분석을 통한 검출 최적 파장 구명
				- 검출 알고리즘 개발(ANOVA, PC image, PLS-DA)
		다분광 반사광 영상을 이용한 씨감자 표면감염 검출 기술 개발	100	- 반사광 분광특성 분석을 통한 검출 최적 파장 선정
				- 검출 알고리즘 및 분광 특성 별 검출 성능 분석
		반사스펙트럼을 이용한 감염 씨감자 신속 검출 기술 개발	100	- 병원체 감염 씨감자의 반사스 펙트럼 획득
				- 스펙트럼 분석기법을 적용한 예측모델 개발
- 스펙트럼 검출 성능 분석				

구분 (년도)	세부과제명	연구개발의 내용	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차년도 (2013)	[제 1 세부과제] 현장 적용형 병원균 감염 씨감자 실시간 검출 시스템 개발	○ 현장 실증 시험을 통한 감염 씨감자 검출 정확도 분석	100	제작된 시작기를 이용한 감염 씨감자 검출 실험
		○ 사용자 편의성 향상을 위한 설계/보완	100	사용자 프로그램 개발
		○ 개발 제품 상품성 향상을 위한 검출성능 안정화	100	시작기 성능평가를 통한 전처리 기법 보완하여 개선함
	[협동과제] 비파괴 신속 진단을 위한 병원균 감염 씨감자 제작 및 감염 최적수준 제어	○ 검증시험을 위한 시료확보	100	시작기 성능평가용 감염 씨감자 제작
		○ 비파괴 신속진단 기술의 검증시험	100	시작기를 이용하여 감염 씨감자의 판별 정확도 평가

제 2 절 대외기여도

1. 학술적 기여도

- 스펙트럼 및 다분광 이미지와 관련해서 기존 논문은 주로 과실류 및 과채류의 품질 및 안전성에 관련된 연구에 집중되어 있으나 식물병원균에 관련된 연구결과는 아직 보고되지 않고 있음.
- 본 연구과제에서는 다양한 병원균에 의한 품질저하 감자의 비파괴 측정 연구를 실시하고 수확 후 처리공학 관련 독자들이 많은 Postharvest Biology and Technology, 한국원예과학회지 등의 학술지에 결과를 게재할 준비를 하고 있음.

2. 사회적·경제적 측면

- 육안으로 관측이 불가능한 감염 씨감자의 내부 병증을 비파괴 방법으로 실시간 검출이 가능한 선별시스템 개발하므로 씨감자 저장효율 향상 및 교차 감염 위험성 최소화가 기대됨
- 감염 씨감자의 제거 및 맞춤형 방제로 재배기간 동안에 필요한 농약 등이 절감되어 친환경 농업이 가능하게 됨
- 씨감자 감염 병원균의 비파괴 신속진단으로 생산단계 및 저장 유통단계에서 발생하는 고질적 병해의 광범위한 감염피해를 최소화할 수 있으며 양질의 씨감자를 안정적으로 공급할 수 있어 재배 농가의 소득증대에 기여함
- 저가 현장 보급형으로 개발함으로써 소규모 농가 및 업체에서도 구입하여 활용할 수 있음
- 감자 병원균 진단시스템의 기술선점을 통한 새로운 시장창조 및 시스템의 국외 수출이 가능함

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구 개발 성과

1. 논문 게재 및 발표

국내논문 게재 8 건

해외 학술지 게재 2 건

2. 인력양성 효과

석사 3 명

박사 1 명

제 2 절 활용 계획

□ 연구 종료 후 연구 결과 활용 목표

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	1	1			1	

1. 기술실시(이전)

비파괴 신속진단 온라인 선별 시스템의 핵심 사항인 씨감자 스펙트럼 획득에 적합한 분광분석 센싱부와 개발된 PLS-DA 예측모델을 기술이전의 목표로 삼고 있으며 향후 병원체별 스펙트럼 획득으로 보다 다양한 농·식품 감염진단 프로그램 개발도 계획하고 있다.

2. 상품화

감염 씨감자는 씨감자뿐만 아니라 식용으로 판매되는 감자에도 적용할 수 있고 또한 개발된 시작기는 농가에서도 사용할 수 있는 소규모이므로 빠른 시일 내에 상품화가 가능할 것으로 판단된다.

3. 언론홍보

현재 개발된 진단킷과 숙련된 전문가에 의해 진단하는 전통적인 분석 기법보다는 비용, 노동력, 시간 등의 절감효과가 있는 비파괴 신속진단 시스템을 언론에 홍보할 계획이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 본 연구관련 국외 기술수준 비교

개발 기술명	관련기술 최고보유 국	현재 기술 수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
Non destructive detection of Internal Brown Spot in Potato tubers by time-resolved reflectance spectroscopy	이탈리아	70 %	60 %	85 %	
Non-destructive detection of Hollow Heart in Potatoes Using Hyperspectral Imaging	스페인	80 %	65 %	95 %	
Common scab detection on potatoes using an infrared hyperspectral imaging system	스페인	80 %	70 %	95 %	