

발간등록번호

11-1543000-001726-01

비파괴 바이오 센싱 기반 이병종자 신속·전수검사기술 개발 및 상용화 최종보고서

2016. 12. 03

주관연구기관 / 충남대학교 산학협력단
협동연구기관 / 경희대학교 산학협력단

농림축산검역본부

(주)제노레버코리아

(주)빌리언21

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “비파괴 바이오 센싱 기반 이병종자 신속·전수검사기술 개발 및 상용화”
(개발기간 : 2013. 12. 04 ~ 2016. 12. 03)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 12. 03.

주관연구기관명 : 충남대학교 산학협력단

협동연구기관명 : 경희대학교 산학협력단
농림축산검역본부

참여기관명 : (주)제노레버코리아
(주)빌리언21

주관연구책임자 : 임현섭

협동연구책임자 : 조병관, 오창식, 김상목

참여기관책임자 : 홍석명, 조보현

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	113044-3	해 당 단 계 연구 기 간	2013.12.04.~ 2016.12.03.	단 계 구 분	1/1
연구사업명	중 사업명	기술사업화지원사업			
	세부 사업명				
연구과제명	대 과제명	비파괴 바이오 센싱 기반 이병종자 신속·전수검사기술 개발 및 상용화			
	세부 과제명	제1세부 : 바이러스 감염 종자 신속·전수검사 기반 기술 개발 제2세부 : 이병종자 신속·전수검역을 위한 복합 초분광 영상시스템 개발 제1협동 : 병원성세균 감염 종자 신속·전수검사 기반기술 개발 제2협동 : 신속·전수검역기술 현장 적용 모델링 기술 개발 제3협동 : 이병종자 신속·전수검사용 컨베이어형 고속 자동 선별 시스템 개발 제4협동 : 이병종자 비파괴 범용 선별모델 개발을 소프트웨어 구축			
연구책임자	임현섭	해당단계 참여 연구원 수	총: 104명 내부: 101명 외부: 3명	해당단계 연구개발 비	정부: 1,410,000천원 민간: 470,001천원 계: 1,880,001천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 104명 내부: 101명 외부: 3명	총 연구개발 비	정부: 1,410,000천원 민간: 470,001천원 계: 1,880,001천원
연구기관명 및 소속부서명	충남대학교 응용생물학과 충남대학교 바이오시스템기계공학과 경희대학교 원예생명공학과 농림축산검역본부 식물검역부			참여기업명	(주)제노레버코리아 (주)빌리언21
(1) CGMMV 감염농도별 수박, 참외 이병종자 생산라인 구축완료 (1만개 이병종자/년생산가능) (2) 병원세균의 인공접종방법(진공접종법)을 확립하고 병원세균의 감염 농도별 이병종자 확보 (3) SWIR 초분광영상 비파괴 선별 시스템 확립 - PLS-DA 분석모델을 적용한 Raman과 SWIR 초분광 판별 시스템 확립 (SWIR _{PLS-DA} : 96.8% , Raman _{PLS-DA} : 79.1% 정확도) - 판별성능 (Speed): 14 seeds/sec - 현장적용: blind test (N=400립)를 통하여 92.9% 정확도 산출 (4) 고속 종자선별 라만 초분광 시스템 개발(14 seed/sec) 및 DB 모델 개발 (5) 종자선별 하드웨어 설계 및 개발 (호퍼, 진동 이송부, 컨베이어 벨트, 센서부, 선별부로 구성) (6) 이병종자 검사 소프트웨어 시뮬레이션 및 통계자료 프로그램 성 능 검사 - Push 방식의 기본 프로토콜 정의를 통한 시스템 운영속도 향 상 및 전산 소모 비용 절감 - 실시간 데이터 전송에 소요되는 통신 패킷량 DB :50%, WAS:60%, WEB:60%, Client:60% 감소 (7) 5년 이내 수출 및 국내 판매 전략 수립				보고서 면수	240

〈국문 요약문〉

		코드번호	D-01		
연구의 목적 및 내용	<p>연구 목적: 수출·입(특히, 수입) 종자의 비파괴·신속·전수·사전검사가 가능한 바이오 센싱 관련 특허기술(특허번호 제10-1203990)을 활용한 초분광 영상기술기반의 신규 검역시스템을 개발 및 상용화</p> <p>연구 내용: 병원성 미생물(바이러스, 세균)에 감염된 의심 농산물 및 종자를 신속 검역하기 위한 적외선(Infrared-Ray, IR) 및 라만분광 융합 기술 적용 연구 복합 초분광 영상분석 시스템 및 비파괴 선별시스템 제작 및 현장적용</p>				
연구개발성과	<p>1. 이병종자 신속·전수 검사를 위한 기술 개발 (제1, 2 세부, 제 1, 2 협동 연구)</p> <p>(1) CGMMV 감염농도별 수박, 참외 이병종자 생산라인 구축완료(1만개 이병종자/년생산가능)</p> <p>(2) 병원세균의 인공접종방법(진공접종법)을 확립하고 병원세균의 감염 농도별 이병종자 확보</p> <p>(3) SWIR 초분광영상 비파괴 선별 시스템 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - PLS-DA 분석모델을 적용한 Raman과 SWIR 초분광 판별 시스템 확립 (SWIR_{PLS-DA}: 96.8% , Raman_{PLS-DA}: 79.1% 정확도) - 판별성능 (Speed): 14 seeds/sec - 현장적용: blind test (N=400립)를 통하여 92.9% 정확도 산출 <p>2. 이병종자 신속·전수 검사를 위한 하드웨어, 소프트웨어 개발 (제 3, 4 협동 연구)</p> <p>(1) 고속 종자선별 라만 초분광 시스템 개발(14 seed/sec) 및 DB 모델 개발</p> <p>(2) 종자선별 하드웨어 설계 및 개발 (호퍼, 진동 이송부, 컨베이어 벨트, 센서부, 선별부로 구성)</p> <p>(3) 이병종자 검사 소프트웨어 시뮬레이션 및 통계자료 프로그램 성능 검사</p> <ul style="list-style-type: none"> - Push 방식의 기본 프로토콜 정의를 통한 시스템 운영속도 향상 및 전산 소모 비용 절감 - 실시간 데이터 전송에 소요되는 통신 패킷량 DB :50%, WAS:60%, WEB:60%, Client:60% 감소 <p>(4) 5년 이내 수출 및 국내 판매 전략 수립</p>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> - 비파괴바이오 센싱 기술을 이용하여 다양한 종류의 바이러스 감염종자 검출 - 초분광 복합 영상분석 관련 기술(하드웨어 및 디바이스 기술, 데이터 해석기술·데이터 보정 기술·실시간 진단 모듈 등 소프트웨어기술) 확보와 상용화를 통해 활용도 높은 부가가치를 창출 - 생산단계 및 검역단계에서의 이병종자 신속검정 실현으로 안전 및 신뢰도 높은 농산물 생산 및 판매가 가능 - 비파괴 검정기술로서 대상물의 변형 없이 선별 및 고품질 관리가 가능 - IT융합을 통한 데이터 해석·보정기술 개발, DB 및 통합시스템 구축이 가능 - 개별 농산물 및 병원체별로 체계적인 DB 확립 및 업데이트를 통해 검정의 정확도 향상 				
중심어 (5개 이내)	검역	신속·전수검사	식물병원성 미생물	비파괴검사	초분광영상

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose & Contents	<p>Purpose: Developing and commercializing a nondestructive/rapid/total inspection sensing method (related to previous patent no. 10-123990) to detect virus transmitted seeds for the import/export agricultural products quarantine measures using hyperspectral imaging techniques.</p> <p>Contents: Hybrid technique with Infrared-Ray and Raman spectroscopy to develop a rapid detection method for the seeds contaminated with plant pathogens (Virus and Bacteria). Application of combined nondestructive detection system using hyperspectral short wave infrared (SWIR) imaging technique and decision making support techniques based multivariate analysis methods to file the field-collected plant tissue and seed companied to detect viral disease-infected seeds.</p>				
Results	<ol style="list-style-type: none"> 1. Developed a rapid detection system for virus infected seeds (Specifically focused in Melon and Watermelon) (1st and 2nd subteam) <ol style="list-style-type: none"> (1) CGMMV infected seeds with various virus concentrations were collected from watermelon and melon (Produced more than 10000 seeds) fruits (2) Established synthetic inoculation of plant pathogenic bacteria to watermelon seeds using vacuum infiltration. (3) Developed prediction model based PLS-DA algorithm (Raman and SWIR hyperspectral imaging prediction model showed 79.1%, 96.8% accuracy, respectively) (4) Completed SWIR hyperspectral imaging system and field application (Blind test (N=400) showed 92.9% discriminant accuracy with 14 seeds/sec) 2. Developed hardware and software to be used for rapid plant pathogen detection in contaminated seeds (3rd and 4th subteam) <ol style="list-style-type: none"> (1) Constructed a rapid and manageable speeds conveyor system connected to Raman hyperspectral imaging spectrometer with DB model (2) Developed specialized hardware selected for use with seeds selected specialized hardware (feed hoper, vibratory conveyor, conveyor belt, sorting sensor, and ejector) (3) Completed the sorting software simulation test for the contaminated seeds with plant pathogens and the collected information analysis using statistical methods (4) Establish export and sales strategy within 5 years 				
Expected Contribution	<ol style="list-style-type: none"> 1. Developing rapid and nondestructive assessment system for various virus infected seeds 2. Potential value added values profits resulted from commercialized techniques of Raman hyperspectral imaging technique and software for data analysis, modification, and real-time assessment system 3. Able to produce and sell highly safe quality agricultural products in industry for seed production and quarantine at initial stage before going to market 4. Able to sort and control highly qualified products without any destructive pretreatment 5. Able to establish combined system of data analysis, modification, and to construct DB with IT and hybrid sorting system 6. Able to enhance the assessment accuracy for agricultural products, and to construct database for pathogenic species 				
Keywords	Quarantine	Rapid and total inspection	Plant pathogen	Non-destructive inspection	Hyperspectral imaging

< Contents >

1. Summary of research	7
2. Search for related technique	10
3. Contents and development results of perform research	12
4. Goal achievement and contribution to the relevant field	169
5. Research and development results and performance utilization plan	177
6. International scientific and technological information gathered from the research and development process	178
7. Security level of the research	182
8. Status of research facility and equipment registered in the National Science and Technology Information System	183
9. Safety measure of the research laboratory	184
10. Major research capabilities and performance	186
11. Miscellaneous	187
12. References	188

< 목 차 >

제1장. 연구개발과제의개요	7
제2장. 국내외 기술개발 현황	10
제3장. 연구수행 내용 및 결과	12
제4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	169
제5장. 연구결과의 활용계획	177
제6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	178
제7장. 연구개발성과의 보안등급	182
제8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	183
제9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	184
제10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적	186
제11장. 기타사항	187
제12장. 참고문헌	188

<별첨> 사업화 전략 계획서((주)제노레버코리아(제3협동) 1-3차년도 연구개발)

제1장 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

제1절 연구개발 목적

수출·입(특히, 수입) 종자의 비파괴·신속·전수·사전검사가 가능한 바이오 센싱 관련 특허 기술(특허번호 제10-1203990, 형광영상을 이용한 방울토마토 열과 검출 방법)을 활용한 초분광 영상기술기반의 신규 검역시스템을 개발 및 상용화하는 것으로서, 이를 통해 기존의 파괴·샘플링·사후검사를 비파괴·전수·사전검사로 대체하고, 보다 정확하고 신속하게 상용화 기술을 현장에 적용하여 유해 식물병원미생물의 국내유입과 이로 인한 농가피해를 원천적으로 차단

제2절 연구개발의 필요성

- 기후와 농업생태계 변화, 농산물 교역 확대로 인한 신규 작물 및 품종 도입으로 신규 병원체, 특히 바이러스 유입이 증가하고 유전자변형작물 등이 수입 농산물과 함께 유입될 가능성이 매우 높아지고 있으며 해외로부터 수입된 종자 및 원예작물로 인하여 바이러스, 세균 등 다양한 병원체가 국내에서 검출되어 국내 농산물에 대한 감염 위험도 상당히 증가하고 있음.(파프리카, 고추, 토마토, 엔젤트럼펫, 멜론, 호박, 무, 배추, 콩 등).
- 그 동안 이를 예방하기 위하여 종자 또는 작물 sample을 무작위로 선별하여 생물화학적 검정(DNA 및 RNA 추출·정제·증폭·분리·검출·분석 등, 성분분석 등)을 다단계로 복잡하게 수행해 왔으나, 이 방법은 신속검정과 전수검정이 불가능하고 노동집약적이며 시간 및 비용이 상대적으로 많이 소요되는 경제성의 문제가 있어 샘플링 횟수와 시료 개수가 적어 신·변종 바이러스 선별 및 유입 차단에 한계를 나타내고 있음.
- 현재 식물검역은 현장에서 검역관이 검사대상 물품의 일부를 샘플링(sampling)한 후 해당 시료에 대한 실험실 정밀검사를 통하여 병해충 검출여부를 확인하는 방식으로, 현장검사가 아닌 격리재배검사 대상 품목의 경우 국가포장에서 관리·검사하는 품목은 전수검사(실험실 정밀검사)인 반면, 지정포장에서 관리되는 품목은 샘플링 후 실험실 정밀검사를 통하여 병해충 검출여부를 확인하고 있는 상황임. 이러한 검역과정상의 문제점이 몇 가지 나타나는데, 첫째, 정밀검사 대상이 되는 시료가 검사 후에는 이용할 수 없을 정도로 파괴된다는 점, 둘째, 샘플링시에 검사자가 육안검사를 실시하여 시료를 채취하지만 혐의 증상이 없을 시에는 임의로 시료를 채취하므로 병해충 검출 효율이 떨어진다는 점, 셋째, 샘플검사이므로 검사대상 전체에 대한 대표성을 나타내기엔 한계가 있다는 점 등이 그것임.
- 또한 해외종자회사 및 국내종자생산회사의 생산지에서 직접 병원체감염 확인은 불가하여 바이러스가 감염된 종자를 직접 판매 또는 수출하는 경우에 많은 피해를 유발시킨 예가 다수. 기업의 피해를 줄이며 안정된 농산물 공급이 절실히 필요해 현장에서 직접 비파괴 신속 전수검사 방법이 필요함.
- 검역과정에서 샘플링 검사를 하는 이유는 물리적인 한계 때문이기도 한데, 많은 수량을 전

수검사하고자 할 경우 인력, 시간, 비용이 천문학적으로 소요되고, 만약 전수검사를 수행한다 하더라도 현재 검역방법의 특성상 시료를 파괴(마쇄)한 후 유전자 및 단백질에 대한 분석을 수행하게 되므로 검사가 완료된 시료는 이용할 수 없게 됨.

- 국내에서 재식용 또는 식용으로 사용하기 위해 수입하는 종자를 전수검사하기 위해 파괴검사 방법으로 전량 소진할 수는 없으므로, 이러한 시간·비용·기술적 문제로 샘플링 검사를 수행할 수밖에 없는 것이 현실임. 검역이라는 측면에서는 최대한 많은 수량을 검사해야 하나 수입자(민원인) 입장에서는 최소한의 검사가 경제적 손실을 줄이는 것이 되므로 이해관계가 상충되어 항상 민원 발생의 소지가 있고, 특히 우편물 형태로 수입하는 종자의 경우 대부분 고가이며 소량으로 수입되는데 비해 전수검사를 위해서는 대부분이 소모 또는 파괴될 수 있어 민원인의 불만이 상존하고 있음.
- 또한, 지속적으로 증가하는 검역수요에 비해 검역 인력 및 예산이 뒷받침되지 못하고 있는 상황이므로, 검사효율성(물품 손실 최소화, 검사기간 단축, 투입 인력 최소화 등)을 향상시킬 수 있는 검역시스템의 보완·개선 필요성이 높게 요구되는 상황임.
- 상기 문제점을 극복하기 위한 핵심기술로서 비파괴 바이오 센싱 기술(분광분석기술, 초분광 영상분석기술 등)이 관심을 모으고 있으며, 대상 시료를 파괴하지 않고 실시간으로 품질 및 안전성을 측정(분석)할 수 있는 비파괴 분광분석기술 개발이 최근 활발하게 진행되고 있음.
- 국내에서는 박과 및 무 종자의 활력도를 근적외선 분광을 이용하여 높은 정확도로 분석할 수 있음이 보고되었음. 근적외선 분광기술은 상기한 다양한 장점으로 인해 종자 비파괴 선별을 위한 기존방법의 강력한 대안기술로 활발히 연구되고 있으나, 개별 종자를 각각 검사해야 하므로 대량으로 전수검사를 하기에는 시간과 노동력이 많이 소요되는 한계가 있음.
- 따라서, 실용적인 비파괴 신속·전수 종자선별을 위해서는 대량의 종자를 동시에 검사할 수 있는 기술적 접근이 이루어져야 하는데, 최근 농산물 비파괴 검사에서 활발하게 연구되고 있는 초분광 영상분석기술이 이에 가장 적합한 기술이라 할 수 있음.
- 초분광 영상정보 획득을 위해 근적외선 신호를 감지할 수 있는 센서와 렌즈를 통해 들어오는 대상물의 영상정보를 분광시켜 분광정보를 포함하게 하는 이미징 스펙트로미터, 그리고 대상물을 스캔하기 위한 라인 스캔용 이송장치 등을 그림 1과 같이 구비하면 신속·전수검사가 필요한 현장 적용이 가능해 짐.
- 또한, 충분한 연구를 통하여 목표로 하는 측정인자를 검출할 수 있는 복합 분광분석 모델을 개발하고 초분광 영상분석 시스템을 통합하면 성능이 우수한 장치구성이 가능할 것으로 판단됨.

제3절 연구개발 범위

- 병원성 미생물(바이러스, 세균)에 감염된 의심 농산물 및 종자를 신속 검역하기 위한 초분광 영상기술 적용 연구
- 분자 진동특성 파악에 상보적으로 이용되는 적외선(Infrared-Ray, IR) 및 라만분광 융합 기술 적용 연구
- 각종 바이러스 및 병원성 미생물의 감염에 의한 종자 내 물리적·생화학적 특성 변화와 초분광 영상분석과의 상관관계 분석 및 비파괴 선별시스템 개발
- 복합 초분광 영상분석 시스템 및 비파괴 선별시스템 시제품 제작
- 개발된 융합 초분광 영상분석 시스템의 현장 적용(검역소 및 종자품질관리센터)
- 초분광 영상분석 정보 정확도 향상을 위한 센싱 정보 보정 시스템 및 DB 구축, 소프트웨어 기술 개발 및 상용화

제2장 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

- 비파괴 측정기술 중 근적외선 분광기술은 780~2500 nm의 광파장 영역에서 대상물질의 원자결합 특성을 이용하여 화학 및 물리적 성질을 신속하고 간편하게 비파괴 정량, 정성 분석할 수 있어 농업뿐만 아니라 식품, 화학, 제약 등 다양한 분야에 응용되고 있음.
- 또한, 바이러스 및 세균 감염에 의하여 종자 내 탄수화물, 단백질, 지질의 구성 및 막 구조의 변화가 진행되고 이러한 변화가 건전종자와의 분광도의 차이를 유발하여 분광분석기술로서 이병종자를 용이하게 검사할 수 있는 기술 개발이 가능해 짐.
- 근적외선 분광기술은 1960년대부터 종자 비파괴 측정에 적용되기 시작하였는데, 최근까지 곡물의 수분 및 단백질 등의 성분함량 측정, 곡물의 품종 분류, 종자 내부의 바이러스 병 및 충해 여부 진단 등에 관한 연구가 보고되고 있으며, 특히 종자의 활력도 비파괴 측정과 관련해서는 내부 퇴화 및 공동에 의한 불량종자 등을 선별할 수 있음이 보고되고 있음.
- 초분광 영상기술은 분광정보와 영상정보를 융합하여 근적외선 영역의 연속적인 파장에 대한 영상을 획득할 수 있고, 정교한 모델링을 통해 대상물의 물리적·생화학적 특성을 대량 및 고속으로 분석 가능함. 최근 해외에서 옥수수과 밀의 초기 발아여부, 진균 감염진단, 충해여부, 효소 활성도 등을 분석하기 위해 초분광 영상기술 응용을 위한 기초연구를 진행하고 있지만, 아직까지 고속·대량으로 종자의 감염 여부 등을 검사할 수 있는 실용화 단계까지는 진행하지 못하고 있음.
- 현재까지는 비파괴 분광분석기술로서 곡물의 수분 및 단백질 등의 성분함량 측정, 곡물의 품종 분류, 종자 내부의 바이러스병 및 식물병원체 감염 여부 진단이 가능하지만, 전수검사를 위해서는 초분광 영상분석기술의 개발이 반드시 필요하며, 각 병원체(바이러스, 세균 등)에 대한 종자 및 검역대상 식물 감염 인자의 DB가 확보되면 비파괴 신속·전수검사기술로서 개발을 완료할 수 있을 것으로 예상됨. 본 기술개발이 완료를 바탕으로(그림 1) 식량·채소·원예종자 등을 대상으로 이병(罹病)·건전(健全)종자를 신속하게 전수검사하여 종자의 고품질관리를 실현하고 수입 종자 및 작물과 함께 유입되는 신·변종 바이러스 등 신규 병원체 유입을 원천적으로 차단할 수 있을 것으로 기대됨.
- 본 연구팀의 선행연구결과를 기반으로 초분광 영상분석기술을 적용할 경우 비파괴·신속·전수검사기술로서 바이러스 및 세균 감염 종자의 선별이 매우 용이하게 수행될 수 있을 것으로 판단되며, 기술개발 및 상용화가 완료될 경우 검역기관(농림축산검역본부), 종자 보급 및 관리기관(국립종자원 등), 농업 관련 기관(농촌진흥청, 농업기술원, 농업기술센터 등), 종자회사 등 관련 기관으로의 파급효과도 매우 높을 것으로 기대됨.

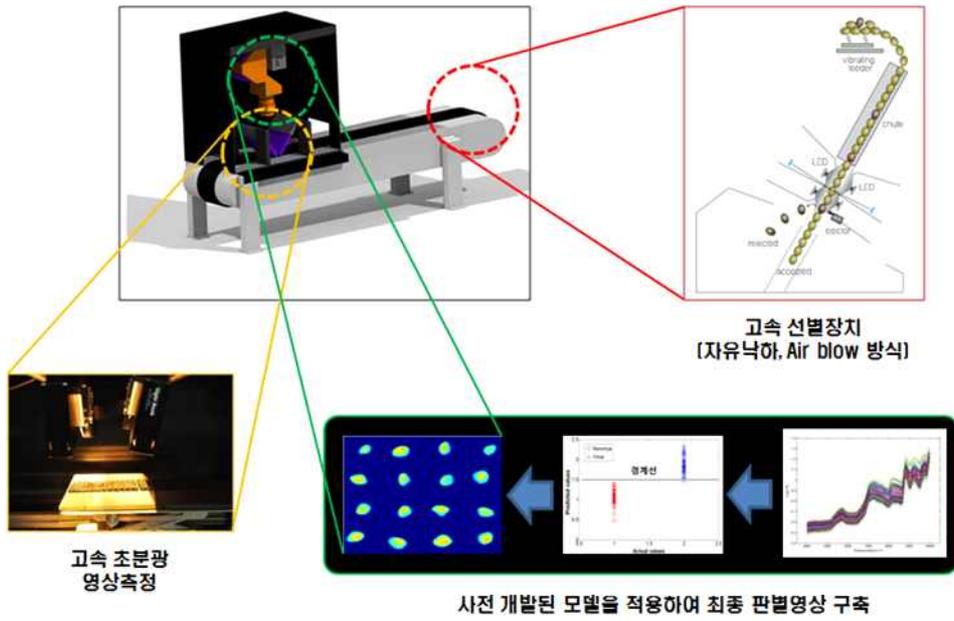


그림 1. 이병종자 선별용 초분광 영상기술 복합 전수검사 System

제3장 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

제1절 바이러스 감염 종자 신속전수 검사 기반 기술 개발 (제1세부)

제1세부과제는 종자전염 중 가장 큰 피해를 발생시키는 바이러스 병을 대상으로 초분광 영상기술에 적용할 종자를 제2세부 연구기관에 공급함. 제2세부과제는 재식용 검역대상 바이러스에 관한 분광값을 측정하고 모델식물 및 목표작물 (참외, 수박, 고추, 토마토)의 바이러스 종류에 따라 발생하는 다양한 분광정보를 산출이 목표. 또한 기 보고된 바이러스 감염이 종자 내 구조 및 성분 변화가 분광차이를 발생하는 원리를 바탕으로 바이러스 종류에 따라 종자의 물리/생화학적 변화 차이를 분광값으로 산출하고자 하였음. 다양한 분광값이 종자 내 감염된 바이러스 종류 판정이 가능한 기술인 복합 초분광 영상기술에 적용하는 것이 목표로 바이러스 감염 종자 획득, 바이러스 종류별 분광값의 변화, 바이러스 감염 종자 생산이 제1세부 연구내용의 주가 됨. 바이러스 감염종자 생산 및 감염에 의한 종자 변화를 제2세부와 연계되어 진행하였음.

따라서 연구 진행은

- 모델 식물을 통한 종자 감염 및 바이러스별 종자 전염율 산출 및 종자 생산
- 주요 재식용 종자 생산을 위한 바이러스 감염 및 바이러스 감염 종자 선별 후 제2세부 공급
- 바이러스 감염 식물로부터 종자 생산 후 제2세부 전달 → 제2 세부의 분광 스크린 → 분광 측정 후, 제1세부에서 바이러스 농도 측정 → 바이러스 농도 대비 분광값 산출로 연구 진행함

1. 모델 식물을 통한 종자 감염 및 바이러스 농도 확인

Alternanthera mosaic virus(AltMV), *Cucumber green mottle mosaic virus*(CGMMV) 접종 시킨 *Nicotiana benthamiana*(담배)에서 종자를 수확하였으며 바이러스당 6,000~8,000개의 종자를 얻었음. 담배종자 크기가 매우 작아 직접 RNA를 얻기가 어려웠으며 아래의 그림과 같이 종자를 발아시켜 발아된 유묘로부터 바이러스 감염여부를 확인하였음.

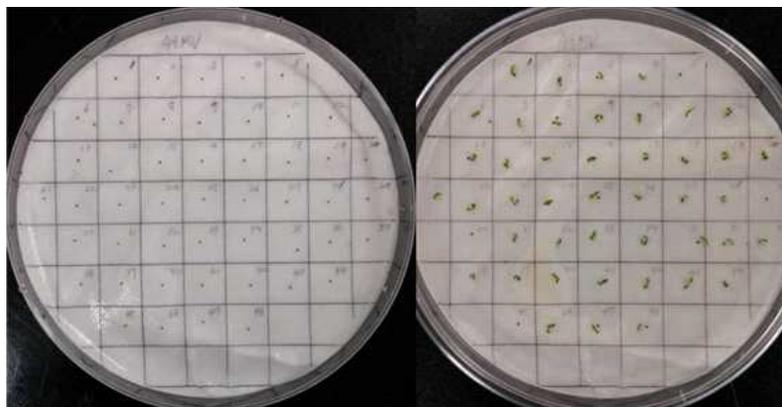


그림 1-1. 담배종자의 발아

가. 담배종자 발아 후 바이러스 검출

- 본 연구팀이 최초로 실시한 방법으로 그 과정은 다음과 같음.
- 실험한 종자들의 번호가 바뀌지 않도록 유의하며 발아시킨 종자들은 모두 2ml tube에 옮겨 담음. 분광법에서 측정할 자료와 RNA추출을 통해 진행되는 정량적인 실험의 자료를 비교하기 위함.
- 튜브에 옮겨 담은 종자들은 Deep freezer (-72℃)에서 보관. RNA추출 시에는 액체질소를 부어 발아한 담배종자를 얼리고, 마쇄봉을 이용하여 갈아줌. 마쇄된 종자는 RNA extraction kit과 Trizol, Chloroform을 이용한 manual방법으로 RNA를 추출함.
- 추출한 total RNA를 이용하여 바이러스 감염 정도를 측정하기 위한 정량적인 실험을 위해 (Realtime-qPCR) cDNA제작을 실시. cDNA 제작에는 TOYOBO사의 Revertra Ace- α -를 사용. 제작된 cDNA는 바이러스 특이 프라이머를 이용한 Realtime qPCR 진행하였으며 바이러스 RNA의 정량을 위하여 TOPO vector에 각 바이러스의 CP를 클로닝하여 농도별 Standard curve를 제시하여 감염된 종자의 바이러스와 비교하였음.

나. 모델식물 담배 종자의 Potexvirus(AltMV), CGMMV, Tobacco rattle virus(TRV) 감염 농도 확인

- AltMV(192), CGMMV(96), TRV(96)를 감염시킨 후 생산된 종자 바이러스별 약 400개를 제2세부에 보낸 후 분광값 측정이 된 종자의 Seedling 발아 후 RNA를 추출하여 종자전염 및 바이러스 RNA 농도를 측정함.
- 다음의 바이러스 (AltMV, CGMMV, TRV) 감염 식물로부터 얻어진 종자는 각각 200개씩 제2세부에 전달되어 분광값을 측정한 후 바이러스 농도를 Total RNA를 600개의 종자로부터 추출하여 측정하였으며 측정된 값을 분광값과 비교하여 모델값을 산출하였음 (제 2세부 결과 참조)

- (1) 담배- AltMV 감염: AltMV CP를 클로닝하여 좌측의 Standard curve를 제작하였으며 표준값을 근거로 하여 담배 Seedling 의 바이러스 RNA copy 수를 측정하였다. Total RNA μg 당 1.82×10^4 에서 10^6 범위에 존재하였음. 감염된 종자는 196개중 88개. 분광값 측정 (제2세부 참조)

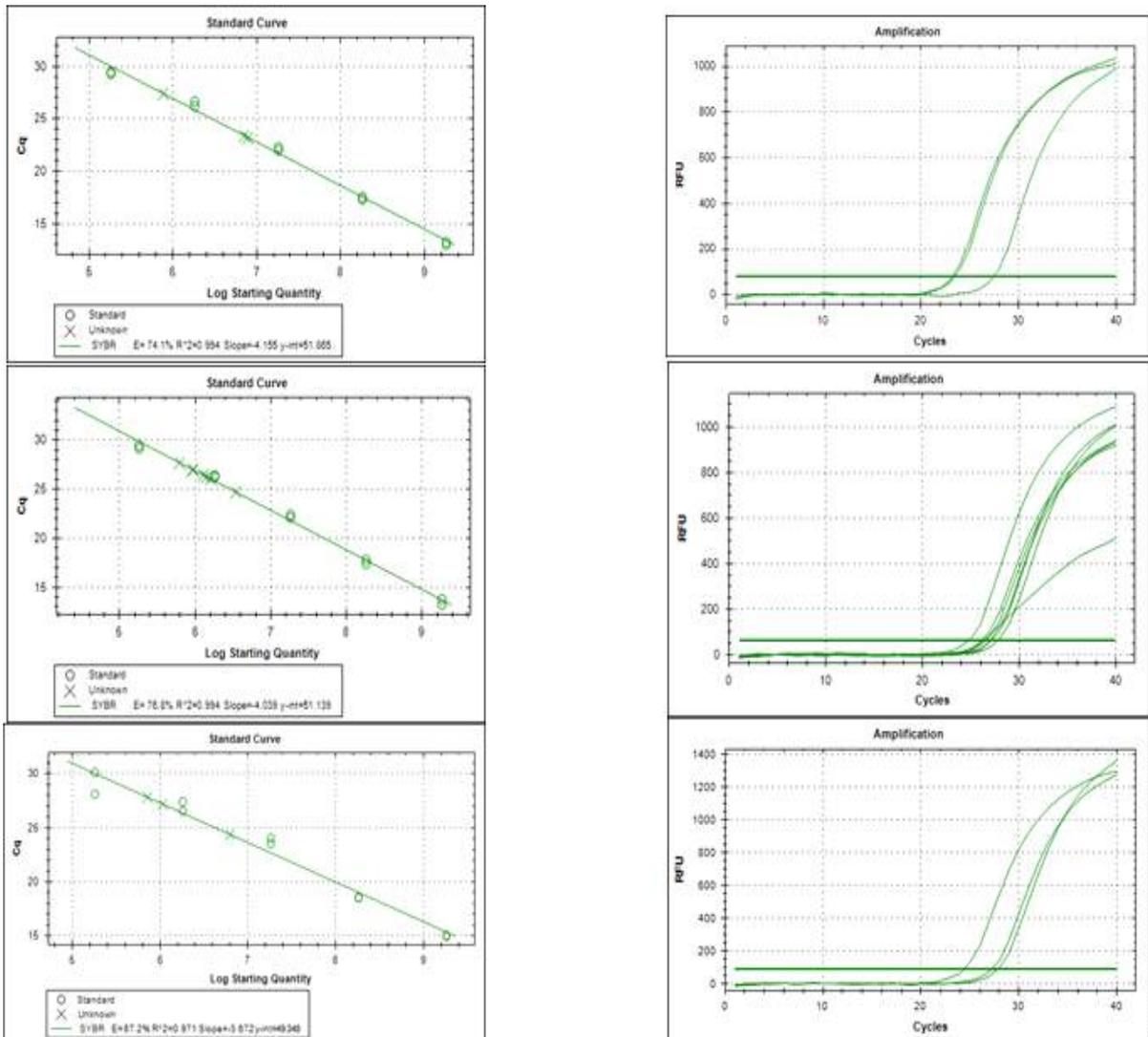


그림 1-2. AltMV RNA copy 수 측정

(2) 담배- CGMMV 감염: CGMMV CP를 클로닝하여 최적의 Standard curve를 제작하였으며 표준값을 근거로 하여 담배 Seedling 의 바이러스 RNA copy 수를 측정하였다. Total RNA μg 당 74.79×10^3 에서 10^3 범위에 존재하였음. 감염된 종자는 96개중 24개. 분광값 측정 (제2세부 참조)

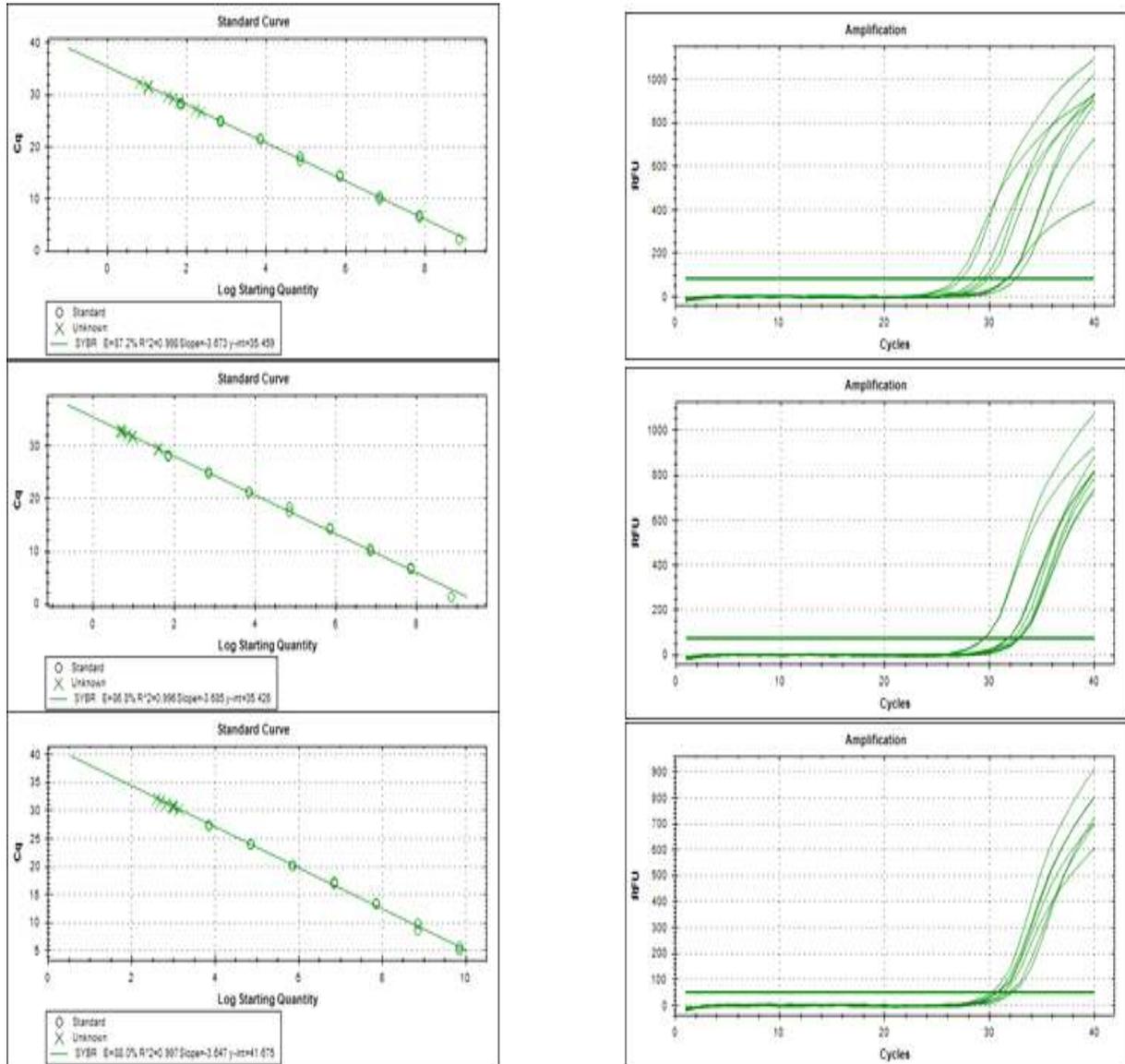


그림 1-3. CGMMV RNA copy 수 측정

- (3) **담배- TRV 감염:** TRV CP를 클로닝하여 좌측의 Standard curve를 제작하였으며 표준값을 근거로 하여 담배 Seedling 의 바이러스 RNA copy 수를 측정하였다. Total RNA 1ug 당 범위에 존재하는 바이러스값 측정되지 않음 존재하였음. 감염된 종자는 96개중 0개. 분광값 측정 (제2세부 참조)

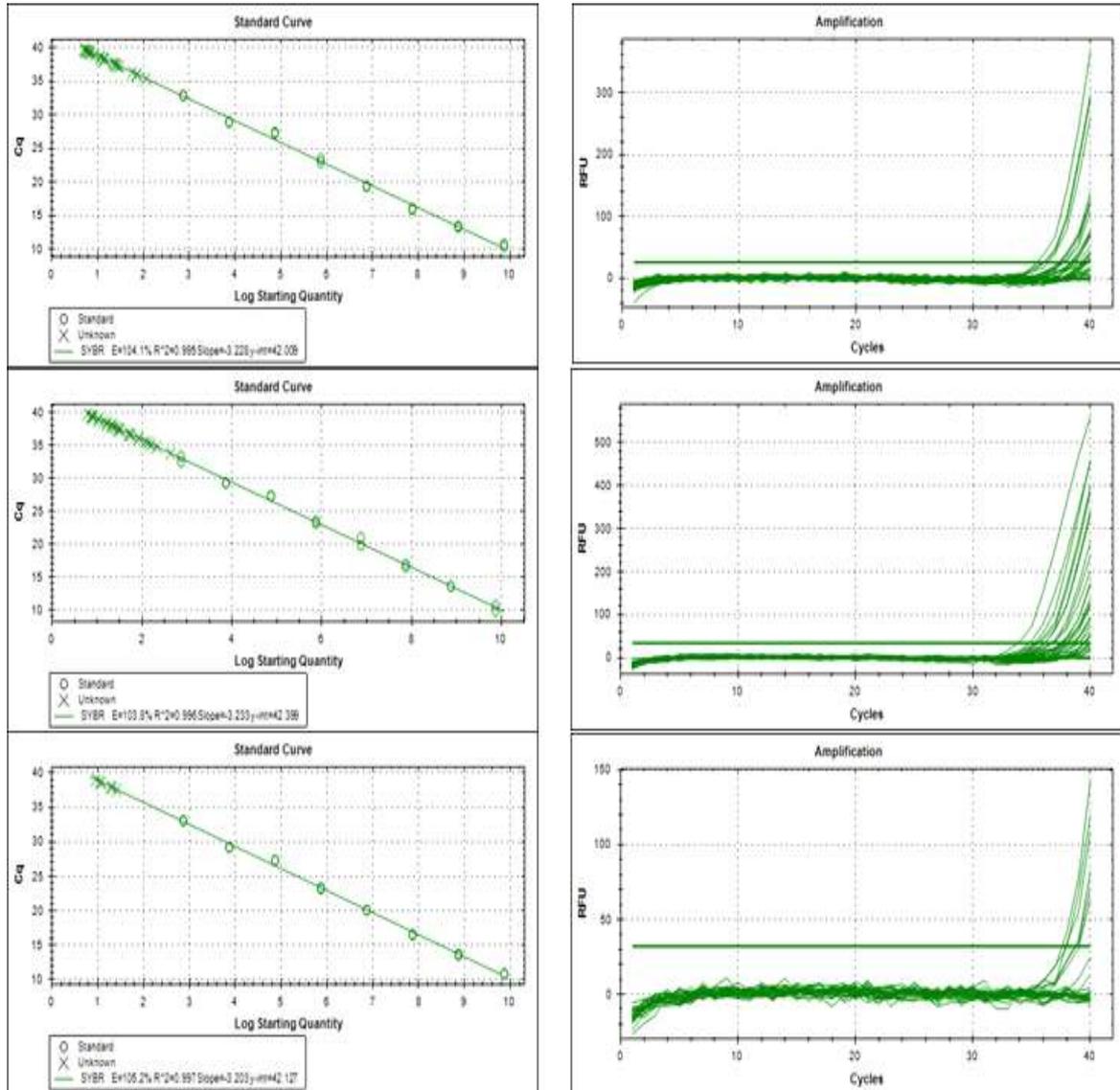


그림 1-4. TRV RNA copy 수 측정

2. 주요 재식용 종자 생산을 위한 바이러스 감염 및 바이러스 감염 종자 생산 - 제2협동연구기관 (농림축산검역본부)와 공조하여 바이러스 감염종자 생산

- 주요 재식용 종자(참외, 수박, 고추, 토마토)의 바이러스 감염 종자를 생산하기 위하여 2014년 4월부터 2016년 10월까지 태안에 있는 일부 농지(비닐하우스)(1~2차년도) 및 충남대학교 농업생명과학대학 농업실습포장(비닐하우스)(3차년도)를 대여하여 대상 작물을 재배하였으며 Potato virus X(PVX), TRV, Cucumber mosaic virus(CMV), CGMMV를 접종하여 종자 수확하였음(표 1-1, 1-2, 1-3)
- 접종은 유묘기에 바이러스를 즙액 접종하였으며(4월), 성장이 정상적인 유묘를 선발하여 그린하우스 재배지로 옮김(5월)
- 정식한 식물은 육안으로 각 바이러스의 병징을 확인하였으며, 바이러스에 따른 특이 프라이머를 이용, RT-PCR을 수행하여 진단(6월)
- 1차년도의 경우 고추(TRV), 토마토(AtIMV), 수박(CGMMV)의 열매에서 약 7,000개의 종자를 확보하였으며, 2, 3차년도는 표 1-4에서와 같이 종자를 수확, 실험에 사용하였음

표 1-1. 바이러스 감염 종자 채종을 위한 식물 관리 일정(1차년도)

시기	식물			
	수박 (삼복 꿀 수박) [동부팜한농]	방울토마토 (텐텐) [(주)코레콘종묘]	고추 (천년약속) [농우바이오]	
3월 7일	파종	파종	파종	
4월 11일	CGMMV 접종	AtIMV, PVX, TRV 접종	TRV 접종	
5월 9일	정식	정식	정식	
5월 23일	멸칭, 슈아내기	멸칭, 슈아내기	멸칭	
6월 2일	접종 식물 진단 가지 슈아내기	접종 식물 진단 가지 슈아내기	접종 식물 진단 가지 슈아내기	
6월 13일	꽃 슈아내기	꽃 슈아내기	꽃 슈아내기	
8월 8일	수확	수확	수확	
8월 11일	채종	채종	채종	
8월 18일~				
9월 ~30	Real time-qPCR 시행	Real time-qPCR 시행	Real time-qPCR 시행	

표 1-2. 바이러스 감염 종자 채종을 위한 식물 관리 일정(2차년도)

시기	식물	수박 (삼복 꿀 수박) [동부팜한농]	참외		고추 (천년약속) [농우바이오]
			(스마트꿀) [PPS]	(금노다지 온천) [농우바이오]	
3월	7일 11일	1차 파종	1차 파종		파종
4월	6일 20일	2차 파종 CGMMV 1차 접종	2차 파종 CGMMV 1차 접종		PMMoV 접종
5월	1일 18일 22일 27일	1차 정식 2차 정식 멀칭 CGMMV 2차 접종 1차 접종 식물 진단 가지 솎아내기	1차 정식 2차 정식 멀칭, 솎아내기 CGMMV 2차 접종 1차 접종 식물 진단 가지 솎아내기		정식 멀칭 PMMoV 2차 접종 1차 접종 식물 진단
6월	15일	꽃 솎아내기	꽃 솎아내기		
7월	1일	2차 접종 식물 진단	2차 접종 식물 진단		2차 접종 식물 진단
8월	7일 12일 13일 19일	수확 채종 Real time-qPCR 시행	수확 채종 Real time-qPCR 시행		수확 채종 Real time-qPCR 시행

표 1-3. 바이러스 감염 종자 채종을 위한 식물 관리 일정(3차년도)

시기	식물	수박 (삼복 꿀 수박) [동부팜한농]
4월	25일	CGMMV 1차 접종
5월	14일 17일 18일 30일	비닐하우스 환경정리 비닐하우스 내 살충제, 살균제 살포 정식 2차 파종 및 1차 접종 식물 진단
6월	15일	순지르기 및 CGMMV 2차 접종
7월	1일	2차 접종 식물 진단
8월	26일	수확
9월	5일	채종
10월	22일	RT-PCR 진단

표 1-4. 2, 3차년도 3월부터 9월까지 재배 및 수확된 종자의 개수와 바이러스 감염율

	2015년 수박	2015년 참외	2015년 고추	2016년 수박
수확된 종자	5417	4863	4129	4500
진단 사용 종자	715	400	0	1296
바이러스 감염율	238 (33.3%)	146 (36.5%)	-	925 (71.4%)



그림 1-5. 바이러스 접종 유묘(참외, 수박, 고추) 및 포장 정식



그림 1-6. 식물 성장 상태(포장) 및 수박과 참외의 CGMMV 병징

3. 수박 및 참외 종자에서서의 Total RNA 추출 (제2세부 분광값 측정 후 진행)

- 2차년도 삼복 꿀수박, 금노다지 온천 참외, 스마트꿀 참외에 CGMMV를 접종시킨 수박과 참외에서 각 작물 당 약 5,000개, 3차년도 CGMMV를 접종시킨 삼복 꿀수박에서 약 4,500개의 종자를 얻음.
- 분광법으로 종자내 바이러스 유무를 측정한 후(제2세부 수행), 실제 종자 내 바이러스 감염 여부를 확인하고자 종자 내 RNA추출 및 바이러스 진단을 수행.
- 참외종자는 종자에서 직접 RNA를 얻었으며 수박종자는 RNA의 순도가 매우 낮아 직접 RNA를 얻기가 어려웠으며 아래의 그림과 같이 낮은 온도에서 휴면타과 시킨 종자를 발아시켜 발아된 유묘로부터 RNA를 추출하여 바이러스 감염여부를 확인하였음.
- 수박종자의 발아 시, 오염을 배제하고자 3차년도에는 공간이 분리된 플레이트를 실험에 사용

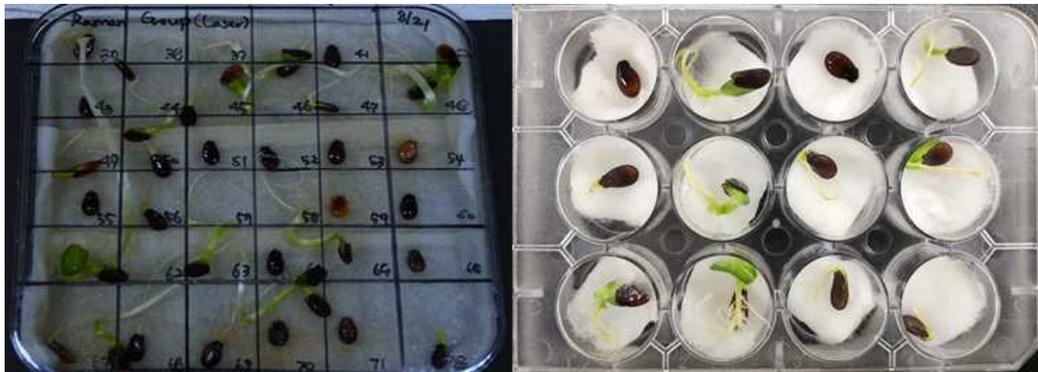


그림 1-7. 수박종자 휴면타과 및 발아 (좌: 2차년도, 우: 3차년도)

- 발아된 수박종자에서의 바이러스 검출 방법은 본 연구팀이 최초로 실시한 방법임.
- 바이오센싱 기법을 통해 종자 내 바이러스 유무 측정을 마친 종자는 발아시켜 2ml tube에 옮겨 담음.
- 튜브에 옮겨 담은 종자들은 Deep freezer (-72°C)에서 보관. RNA추출 시에는 액체질소를 이용하여 참외종자 및 발아한 수박종자를 얼리고, 마쇄봉을 이용하여 마쇄함. 마쇄한 종자는 RNA extraction kit.과 Trizol, Chloroform을 이용한 방법으로 RNA를 추출함.
- 추출한 total RNA를 이용하여 cDNA를 제작하고, 종자내 바이러스 copy 수 확인을 위한 정량적인 실험(Q-RT-PCR) 수행. cDNA 제작에는 TOYOBO사의 Revertra Ace qPCR RT kit.를 사용하였으며, 제작된 cDNA는 바이러스 특이적 프라이머를 이용하여 Q-RT-PCR을 진행. 바이러스 RNA의 정량을 위하여 TOPO vector에 CGMMV의 CP를 클로닝하여 농도별 Standard curve를 제시하여 감염된 종자의 바이러스와 비교함.
- 종자의 마쇄 등 모든 실험과정에는 박사과정 1명, 석사과정 7명, 학부생 4명 등 총 12명의 숙련된 연구원이 참여함.

4. 종자 내 바이러스 copy수 측정을 위한 Quantitative Real-Time PCR (Q-RT-PCR) 수행 (제2세부 분광값 측정 후 진행)

- (1) 참외 CGMMV 감염 의심 종자 분광(SWIR 초분광 시스템) 측정 후 CGMMV 감염 조사 (2차년도): CGMMV CP를 클로닝하여 우측의 Standard curve를 제작하였으며 표준값을 근거로 하여 알아시키지 않은 참외 종자 내부 바이러스 RNA copy 수를 측정하였다. 감염유무는 Real time-qPCR결과에서 Ct value를 기준으로 측정값 없음, 25cycle 이하, 26~30cycle, 31~35cycle, 36 cycle 이상까지 다섯개로 나누었으며 그중 30cycle이하만 감염으로 확정하였다. Total RNA 1ug 당 1.87×10^6 에서 1.94×10^{10} 범위에 존재하였음. 감염된 종자는 200개중 59개(29.5%). 분광값 측정 (제2세부 참조)

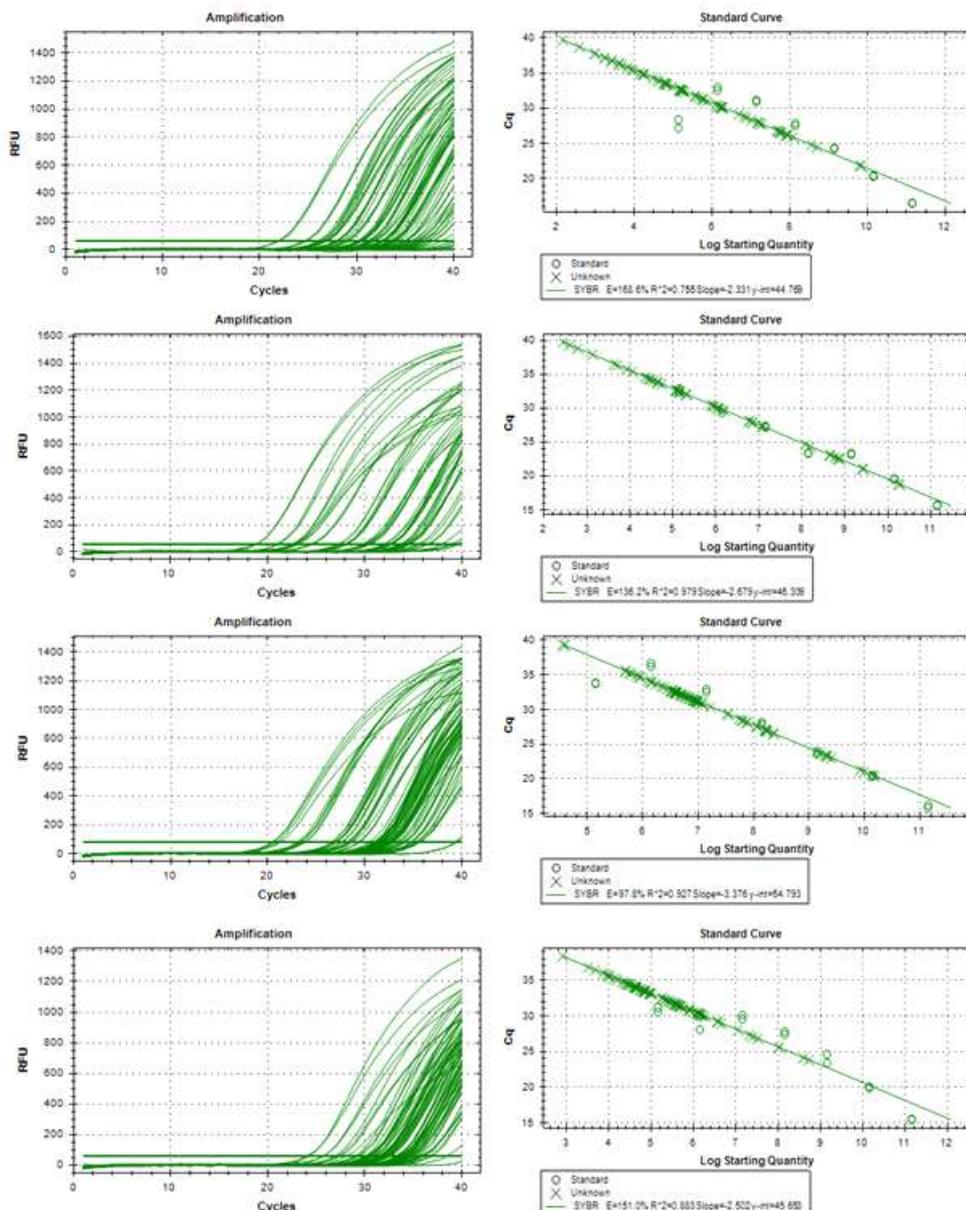


그림 1-8. Q-RT-PCR을 이용한 참외종자(SWIR 초분광 시스템 측정) 바이러스 copy수 측정

(2) 참외 CGMMV 감염 의심 종자 분광(Raman spectroscopy & Raman 초분광 시스템) 측정 후 CGMMV 감염조사 (2차년도): CGMMV CP를 클로닝하여 우측의 Standard curve를 제작하였으며 표준값을 근거로 하여 발아시키지 않은 참외 종자 내부 바이러스 RNA copy 수를 측정하였다. 감염유무는 Real time-qPCR결과에서 Ct value를 기준으로 측정값 없음, 25cycle 이하, 26~30cycle, 31~35cycle, 36 cycle 이상까지 다섯개로 나누었으며 그중 30cycle이하만 감염으로 확정하였다. Total RNA 1ug 당 1.16 X 10⁷에서 4.52 X 10¹⁰ 범위에 존재하였음. 감염된 종자는 200개중 87개(43.5%). 분광값 측정 (제2세부 참조)

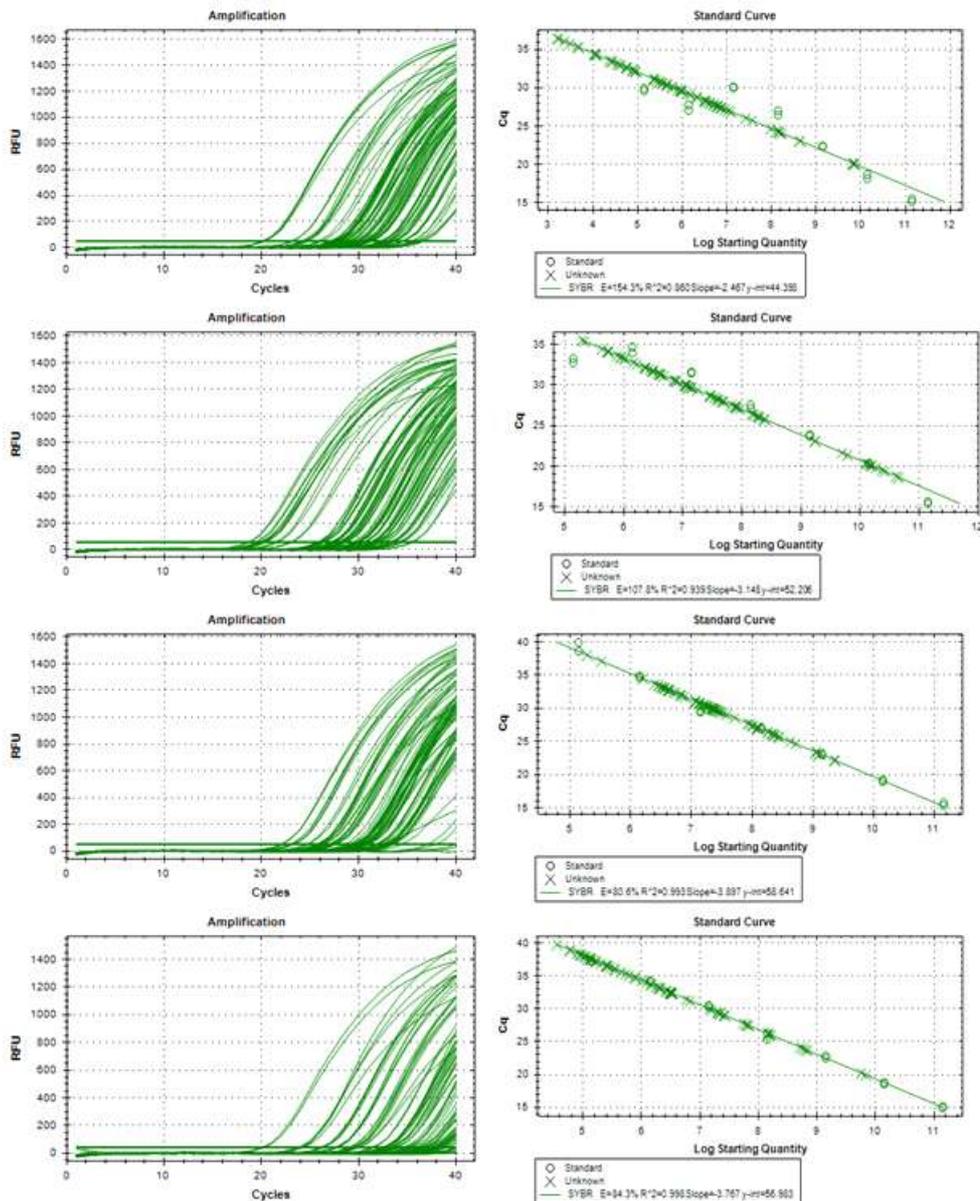


그림 1-9. Q-RT-PCR을 이용한 참외종자(Raman spectroscopy & Raman 초분광 시스템 측정) 바이러스 copy수 측정

(3) 수박 CGMMV 감염 의심 종자 분광(SWIR 초분광 시스템) 측정 후 CGMMV 감염조사 (2차년도): CGMMV CP를 클로닝하여 우측의 Standard curve를 제작하였으며 표준값을 근거로 하여 발아시킨 수박 종자 내부 바이러스 RNA copy 수를 측정하였다. 감염유무는 Real time-qPCR결과에서 Ct value를 기준으로 측정값 없음, 25cycle 이하, 26~30cycle, 31~35cycle, 36 cycle 이상 까지 다섯개로 나누었으며 그중 30cycle이하만 감염으로 확정하였다. Total RNA 1ug 당 4.27×10^7 에서 3.40×10^9 범위에 존재하였음. 감염된 종자는 405개중 167개(41.2%). 분광값 측정 (제2세부 참조)

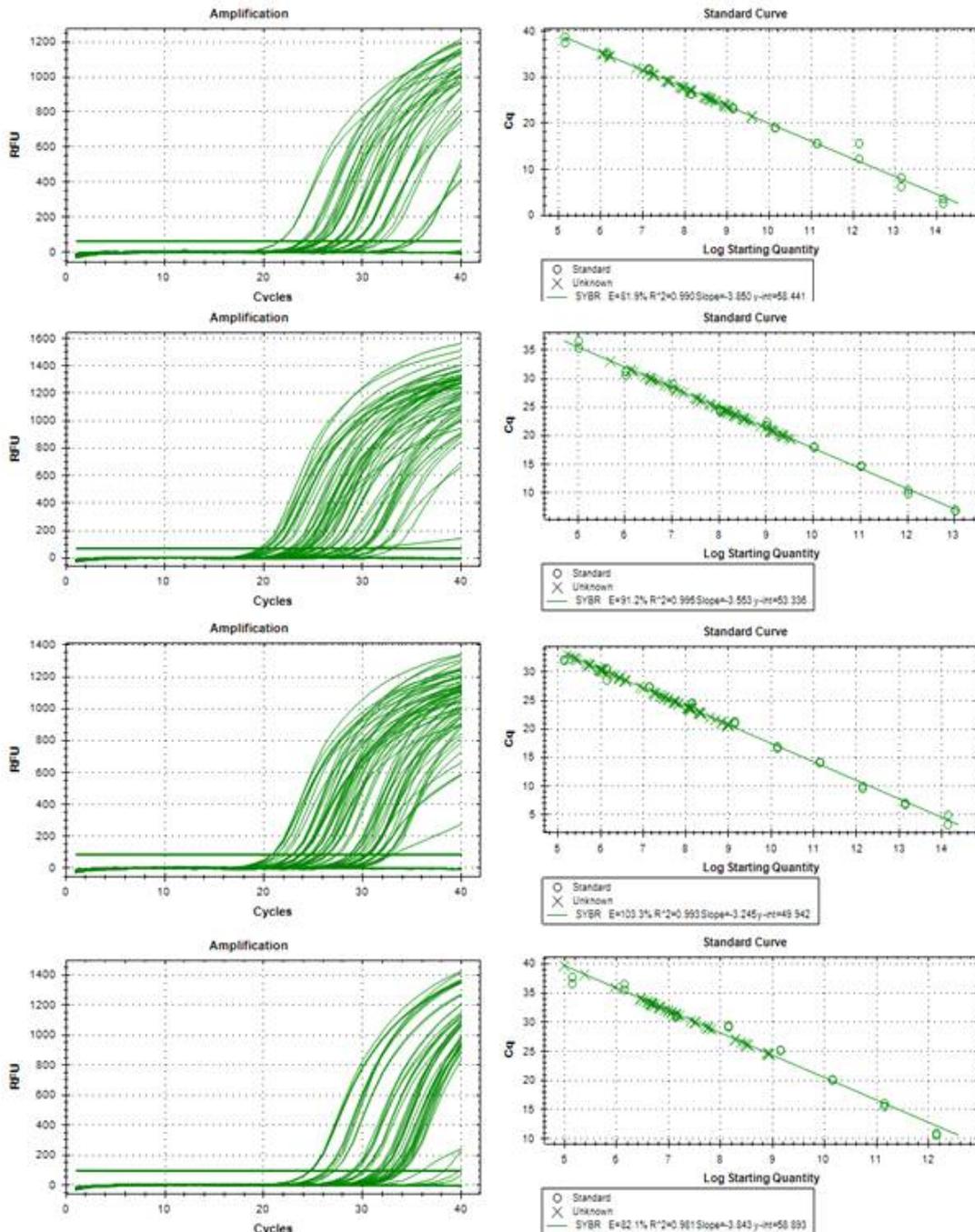


그림 1-10. Q-RT-PCR을 이용한 수박종자(SWIR 초분광 시스템 측정) 바이러스 copy수 측정

(4) 수박 CGMMV 감염 의심 종자 분광(Raman spectroscopy & Raman 초분광 시스템) 측정 후 CGMMV 감염조사 (2차년도): CGMMV CP를 클로닝하여 우측의 Standard curve를 제작하였으며 표준값을 근거로 하여 발아시킨 수박 종자 내부 바이러스 RNA copy 수를 측정하였다. 감염유무는 Real time-qPCR결과에서 Ct value를 기준으로 측정값 없음, 25cycle 이하, 26~30cycle, 31~35cycle, 36 cycle 이상까지 다섯개로 나누었으며 그중 30cycle이하만 감염으로 확정하였다. Total RNA 1ug 당 1.87×10^6 에서 1.73×10^9 범위에 존재하였음. 감염된 종자는 214개중 57개 (26.6%). 분광값 측정 (제2세부 참조)

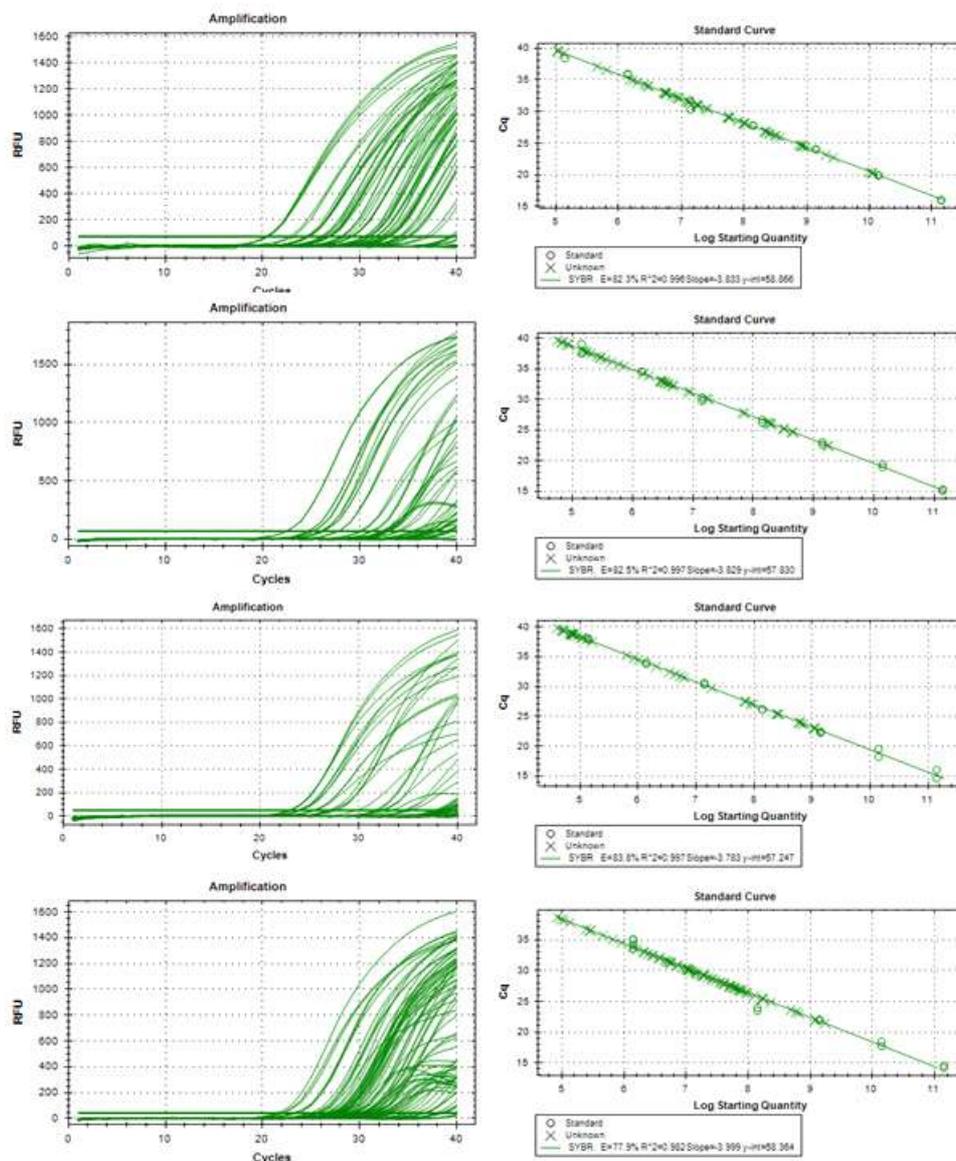


그림 1-11. Q-RT-PCR을 이용한 수박종자(Raman spectroscopy & Raman 초분광 시스템 측정) 바이러스 copy수 측정

(5) 수박 CGMMV 감염 의심 종자 분광(Raman 초분광 시스템) 측정 후 CGMMV 감염 조사 (2차년도): CGMMV CP를 클로닝하여 우측의 Standard curve를 제작하였으며 표준값을 근거로 하여 받아시킨 수박 종자 내부 바이러스 RNA copy 수를 측정하였다. 감염유무는 Real time-qPCR결과에서 Ct value를 기준으로 측정값 없음, 25cycle 이하, 26~30cycle, 31~35cycle, 36 cycle 이상까지 다섯개로 나누었으며 그 중 30cycle이하만 감염으로 확정하였다. Total RNA 1ug 당 6.03×10^5 에서 1.75×10^7 범위에 존재하였음. 감염된 종자는 96개중 14개(14.6%). 분광값 측정 (제2세부 참조)

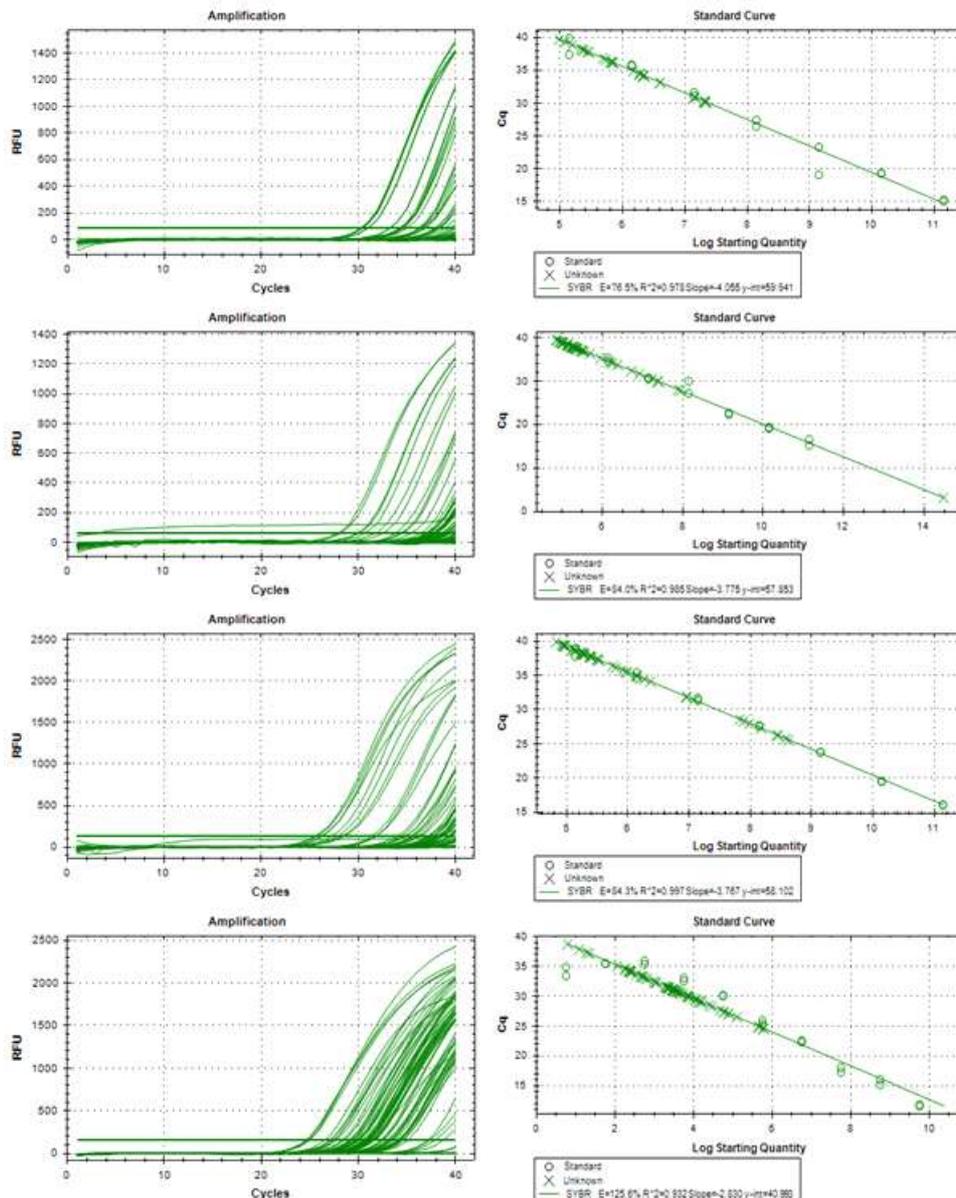


그림 1-12. Q-RT-PCR을 이용한 수박종자(Raman 초분광 시스템) 바이러스 copy수 측정

(6) **참외(Total)- CGMMV 감염 (분광측정을 위하여 공급된 모든종자) (2차년도):** CGMMV CP를 클로닝하여 Standard curve로 사용하여 종자 내부 RNA의 양을 측정하였다. 감염유무는 Real time-qPCR결과에서 Ct value를 기준으로 다섯가지로 나누었으며 그중 30cycle이하만 감염으로 확정하였다. 참외에서 Total RNA 1ug 당 1.87×10^6 에서 4.52×10^{10} copy의 CGMMV가 존재하였음. 감염된 종자는 **400개중 146개(36.5%)**.

표 1-5. 광원 차이에 따른 참외 종자 내 바이러스 Ct 값 분포

	SWIR 초분광 시스템	Raman Spectroscopy & Raman 초분광시스템	Total
측정값 없음	3 (1.5%)	3 (.5%)	6 (1.5%)
Ct < 25	20 (10%)	24 (12%)	44 (11%)
26 ≤ Ct < 30	39 (19.5%)	63 (31.5%)	102 (25.5%)
31 ≤ Ct < 35	108 (54%)	77 (38.5%)	185 (46.25%)
35 ≤ Ct	30 (15%)	33 (16.5%)	63 (15.75%)
Total	200 (100%)	200 (100%)	400 (100%)

(7) **수박(Total)- CGMMV 감염(분광측정을 위하여 공급된 모든종자) (2차년도):** CGMMV CP를 클로닝하여 Standard curve로 사용하여 종자 내부 RNA의 양을 측정하였다. 감염유무는 Real time-qPCR결과에서 Ct value를 기준으로 다섯가지로 나누었으며 그중 30cycle이하만 감염으로 확정하였다. 수박에서 Total RNA 1ug 당 1.87×10^6 에서 3.40×10^9 copy의 CGMMV가 존재하였음. 감염된 종자는 **715개중 238개 (33.3%)**.

표 1-6. 광원 차이에 따른 수박 종자 내 바이러스 Ct 값 분포

	SWIR 초분광 시스템	Raman Spectroscopy & Raman 초분광시스템	Raman 초분광시스템	Total
측정값 없음	92 (22.7%)	45 (21%)	8 (8.3%)	145 (20.3%)
Ct < 25	43 (10.6%)	14 (6.5%)	2 (2.1%)	59 (8.3%)
26 ≤ Ct < 30	124 (30.6%)	43 (20.1%)	12 (12.5%)	179 (25%)
31 ≤ Ct < 35	116 (28.6%)	48 (22.4%)	56 (58.3%)	220 (30.8%)
35 ≤ Ct	30 (7.4%)	64 (29.9%)	18 (18.8%)	112 (15.7%)
Total	405 (100%)	214 (100%)	96 (100%)	715 (100%)

(8) **수박 및 참외 - CGMMV감염 (2차년도):** 실험을 진행한 참외 및 수박에서 Ct value 30 이하로 Real time-qPCR에서 진단되어 감염 확정된 샘플은 참외 36.5%, 수박 33.3%로 각 작물 모두 감염율이 30%를 상회함. 바이러스감염 최소값과 최대값은 RNA copy 수 256배 차이가 남

- (9) 수박 CGMMV 감염 의심 종자 분광(SWIR, 초분광 단파적외선 시스템) 측정 후 CGMMV 감염조사(3차년도): CGMMV CP의 염기서열을 이용해 진단용 프라이머를 제작했고 RT-PCR 방법을 이용해 감염된 수박 종자를 확인했다. 감염유무는 RT-PCR을 진행한 후 전기영동을 실시해 Agarose gel상에 CGMMV CP 크기의 밴드 (486bp)가 관찰되는 샘플만을 감염된 종자라 판단했다. 감염된 종자는 412개중 338개(82.0%). 분광값 측정 (제2세부 참조)

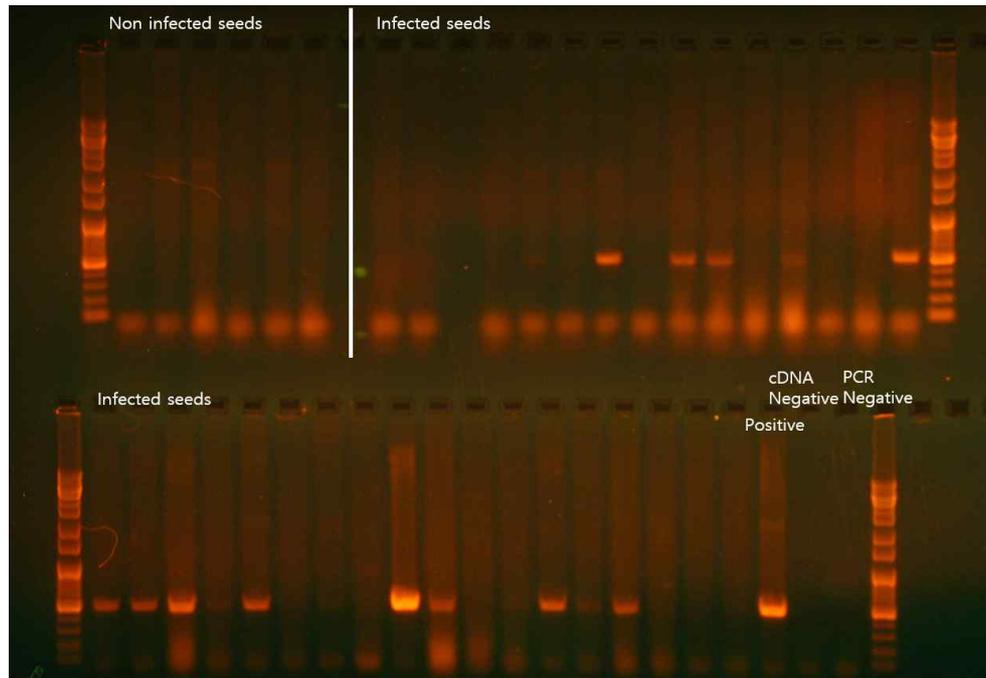


그림 1-13. RT-PCR과 전기영동을 이용한 수박종자(SWIR 측정) 바이러스 감염여부 확인

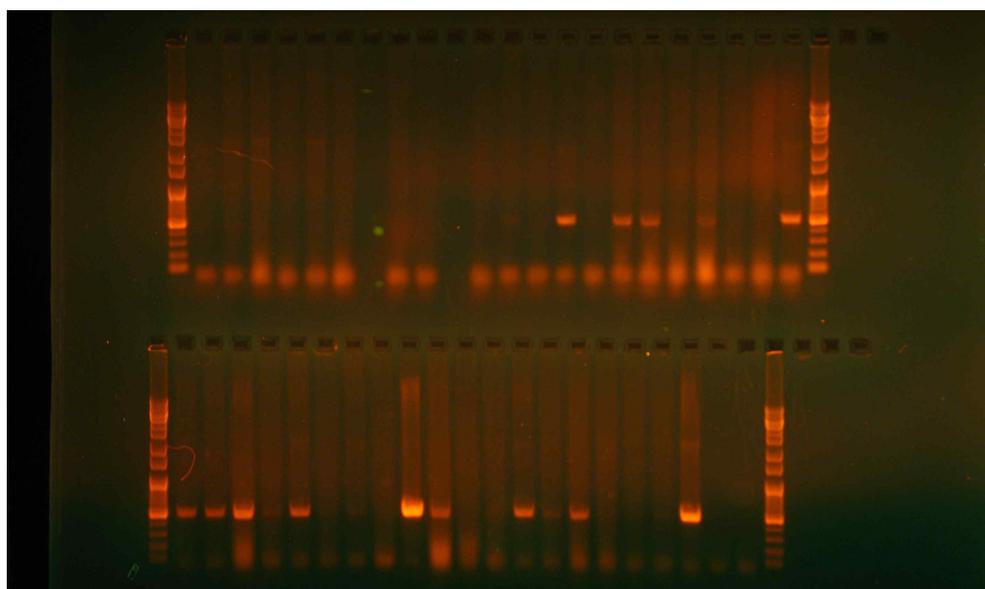


그림 1-14. RT-PCR과 전기영동을 이용한 수박종자(SWIR 측정) 바이러스 감염여부 확인

(10) 수박 CGMMV 감염 의심 종자 분광(Raman, 초분광 라만 시스템) 측정 후 CGMMV 감염조사(3차년도) : CGMMV CP의 염기서열을 이용해 진단용 프라이머를 제작했고 RT-PCR 방법을 이용해 감염된 수박 종자를 확인했다. 감염유무는 RT-PCR을 진행한 후 전기영동을 실시해 Agarose gel상에 CGMMV CP 크기의 밴드 (486bp)가 관찰되는 샘플만을 감염된 종자라 판단했다. 감염된 종자는 725개중 587개(81.0%).

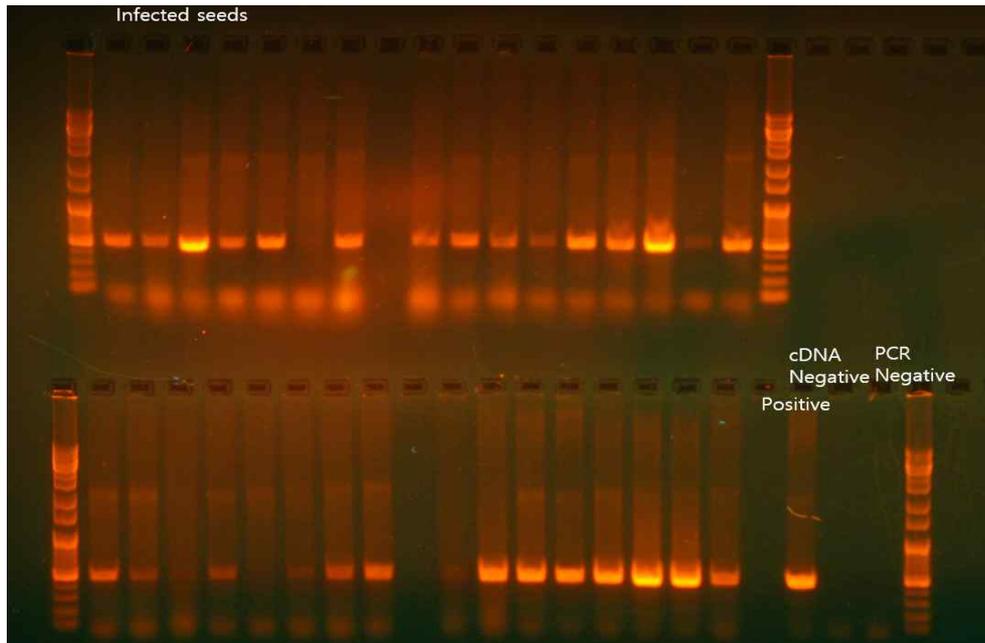


그림 1-15. RT-PCR과 전기영동을 이용한 수박종자(Raman 측정) 바이러스 감염여부 확인

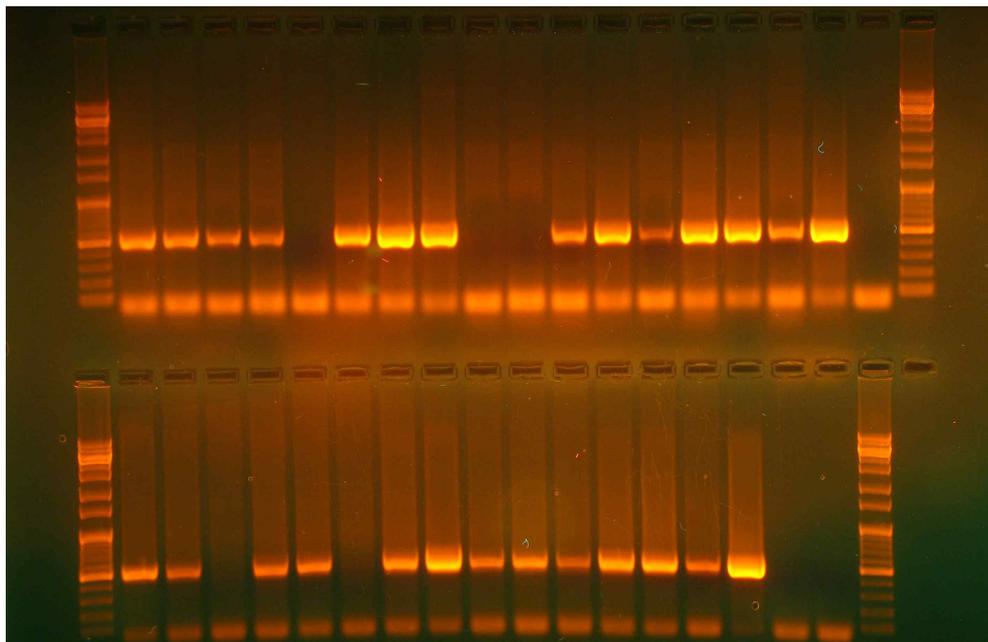


그림 1-16. RT-PCR과 전기영동을 이용한 수박종자(Raman 측정) 바이러스 감염여부 확인

(11) 수박 CGMMV non-infected 종자 분광(Raman, 초분광 라만 시스템 / SWIR, 초분광 단파적외선 시스템) 측정 후 CGMMV 감염조사 (3차년도): CGMMV CP의 염기서열을 이용해 진단용 프라이머를 제작했고 RT-PCR 방법을 이용해 감염된 수박 종자를 확인했다. 감염유무는 RT-PCR을 진행한 후 전기영동을 실시해 Agarose gel상에 CGMMV CP 크기의 밴드 (486bp)가 관찰되는 샘플만을 감염된 종자라 판단했다. 감염된 종자는 123개중 0개(0%).

(12) CGMMV 감염 수박종자 총합 (분광측정을 위하여 공급된 모든종자) (3차년도): CGMMV CP의 염기서열을 이용해 진단용 프라이머를 제작했고 RT-PCR 방법을 이용해 감염된 수박 종자를 확인했다. 감염유무는 RT-PCR을 진행한 후 전기영동을 실시해 Agarose gel상에 CGMMV CP 크기의 밴드 (486bp)가 관찰되는 샘플만을 감염된 종자라 판단했다. 감염된 종자는 분광측정을 마친 총 1296개중 925개 (71.4%).

5. 수박종자와 참외종자의 바이러스 감염에 따른 변화 (물리적변화관찰 및 생화학적변화 연구위한 기초자료 수집)

가. 수박종자 길이와 바이러스 양의 상관관계: CGMMV CP로 virus를 측정하고, A-tubulin으로 수박의 reference gene으로 사용하여 종자 내부 RNA의 양을 측정하였음. virus 중 30cycle이하만 감염으로 확정함. del ct(CGMMV CP - A-tubulin) 값을 기준으로 종자길이와의 상관관계를 이변량 상관계수로 분석함(IBM SPSS statistics 22를 이용). 수박에서 종자의 세로 길이는 del ct값과 음의 상관관계(Pearson 상관계수 : -.020)를 나타내는 것을 알 수 있음. 종자 내 reference gene 대비 바이러스가 많이 존재할수록(del ct값이 낮을수록) 종자의 크기가 큰 상관관계를 나타냄.

표 1-7. 이변량 상관계수

	Δct	종자길이
Pearson 상관계수	1	-.242
유의수준(양쪽)		.020
N	92	92

*. 상관이 0.05 수준에서 유의합니다(양쪽).

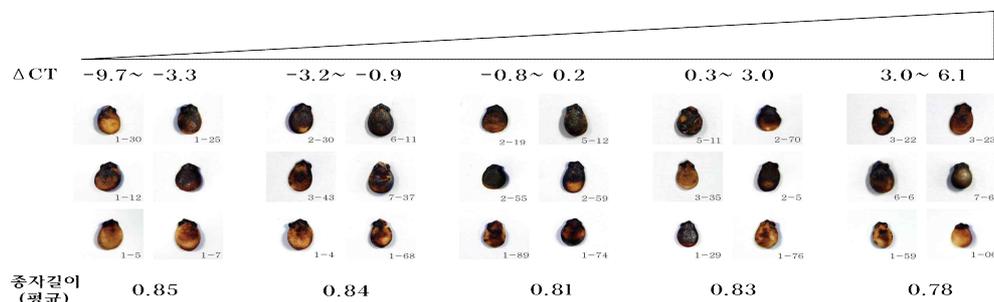


그림 17. 수박종자 길이와 바이러스 양(ΔCT 값)간의 상관관계

표 1-8. 수박종자의 길이와 Q-RT-PCR을 이용한 바이러스 측정

No.	CGMMV Ct	α -tubulin Ct	del ct	종자 길이	No.	CGMMV Ct	α -tubulin Ct	del ct	종자 길이
수박 1-01	26.49	23.87	2.62	0.80	수박 1-66	24.17	25.00	-0.83	0.80
수박 1-02	15.49	24.57	-9.08	0.80	수박 1-67	22.91	24.25	-1.34	0.80
수박 1-03	17.08	23.18	-6.10	0.74	수박 1-68	23.93	25.07	-1.14	0.84
수박 1-04	21.56	23.59	-2.03	0.82	수박 1-70	25.42	25.27	0.15	0.90
수박 1-05	19.15	25.23	-6.08	0.98	수박 1-71	25.61	26.41	-0.80	0.90
수박 1-06	24.05	18.26	5.80	0.79	수박 1-72	25.88	25.07	0.81	0.90
수박 1-07	19.85	23.76	-3.91	0.98	수박 1-73	26.36	23.89	2.47	0.85
수박 1-08	20.37	24.61	-4.24	0.82	수박 1-74	24.31	24.23	0.08	0.68
수박 1-09	26.59	23.91	2.67	0.90	수박 1-76	29.98	27.81	2.17	0.90
수박 1-10	19.20	24.17	-4.98	0.88	수박 1-77	28.39	30.25	-1.86	0.78
수박 1-11	21.91	22.67	-0.76	0.80	수박 1-79	27.39	27.49	-0.10	0.91
수박 1-12	17.45	23.07	-5.62	0.87	수박 1-80	26.93	27.80	-0.87	0.82
수박 1-13	17.16	23.07	-5.91	0.78	수박 1-81	27.96	28.05	-0.09	0.80
수박 1-14	20.48	23.75	-3.28	0.95	수박 1-82	28.94	27.65	1.29	0.78
수박 1-15	19.44	23.99	-4.55	0.80	수박 1-84	25.94	28.40	-2.46	0.72
수박 1-16	20.48	24.21	-3.73	0.95	수박 1-85	29.44	29.42	0.02	0.80
수박 1-17	24.49	26.61	-2.12	0.85	수박 1-88	26.95	28.53	-1.58	0.85
수박 1-18	23.88	25.19	-1.31	0.85	수박 1-89	29.47	29.70	-0.23	0.80
수박 1-19	24.09	25.35	-1.27	0.84	수박 1-94	28.11	36.94	-8.83	0.68
수박 1-20	23.90	25.01	-1.11	0.90	수박 1-97	26.78	27.48	-0.70	0.70
수박 1-22	23.36	24.41	-1.05	0.90	수박 1-99	28.23	35.20	-6.97	0.78
수박 1-23	23.11	23.43	-0.32	0.85	수박 2-01	29.05	33.82	-4.77	0.90
수박 1-24	24.14	23.91	0.24	0.90	수박 2-05	29.79	32.02	-2.24	0.85
수박 1-25	18.95	23.28	-4.33	0.93	수박 3-21	29.12	25.20	3.9	0.80
수박 1-26	27.57	27.26	0.30	0.85	수박 3-22	28.93	24.70	4.2	0.80
수박 1-27	22.18	26.46	-4.28	1.00	수박 3-23	29.36	23.76	5.6	0.80
수박 1-28	25.72	26.29	-0.56	0.80	수박 3-28	25.42	31.74	-6.3	0.70
수박 1-29	29.27	28.96	0.31	0.78	수박 3-34	27.53	24.36	3.2	0.70
수박 1-30	24.01	33.68	-9.67	0.85	수박 3-35	25.66	23.07	2.6	0.65
수박 1-31	25.63	29.49	-3.86	0.98	수박 3-43	22.72	23.74	-1.0	0.80
수박 1-32	25.13	29.40	-4.27	0.90	수박 5-04	26.93	22.13	4.8	0.69
수박 1-33	22.62	27.99	-5.37	0.95	수박 5-09	23.93	24.22	-0.3	0.81
수박 1-39	28.98	30.37	-1.39	0.97	수박 5-11	23.98	23.39	0.6	0.77
수박 1-41	29.54	27.87	1.66	0.95	수박 5-12	22.07	22.57	-0.5	0.87
수박 1-51	27.10	25.20	1.89	0.90	수박 5-19	19.87	21.04	-1.2	0.82
수박 1-53	24.84	25.18	-0.35	0.80	수박 5-22	23.16	22.47	0.7	0.85
수박 1-54	25.87	24.06	1.82	0.89	수박 5-23	23.22	22.23	1.0	0.82
수박 1-55	29.43	24.52	4.91	0.80	수박 5-28	27.02	21.87	5.1	0.78
수박 1-56	24.09	24.57	-0.48	0.85	수박 6-06	25.57	22.24	3.3	0.82
수박 1-57	29.41	25.33	4.09	0.88	수박 6-11	19.63	20.58	-0.9	0.83
수박 1-58	22.29	24.19	-1.90	0.70	수박 6-24	29.93	21.31	8.6	0.70
수박 1-59	27.96	23.80	4.15	0.73	수박 6-37	29.55	21.97	7.6	0.83
수박 1-62	22.73	25.91	-3.18	0.89	수박 6-42	29.28	23.17	6.1	0.77
수박 1-63	25.95	26.59	-0.64	0.76	수박 7-06	28.68	21.96	6.7	0.69
수박 1-64	28.71	25.23	3.47	0.80	수박 7-35	20.71	21.08	-0.4	0.75
수박 1-65	20.40	24.83	-4.43	0.72	수박 7-37	20.96	21.65	-0.7	0.82

나. 참외종자 길이와 바이러스 양의 상관관계: CGMMV CP로 virus를 측정하고, Beta-Actin을 참외의 reference gene을 사용하여 종자 내부 RNA의 양을 측정함. virus 값이 측정되지 않은 것은 결과에서 제외함. del ct(CGMMV CP - Beta-Actin) 값을 기준으로 종자길이와 발아 후 길이의 상관관계를 이변량 상관계수로 나타냄(IBM SPSS statistics 22를 이용). 참외에서 종자의 세로 길이는 del ct값과 양의 상관관계(Pearson 상관계수 : .251)를 나타내는 것을 알 수 있음. 종자 내 reference gene에 대비하여 바이러스가 많이 존재할수록(del ct값이 낮을수록) 종자의 크기가 작은 상관관계를 나타냄.

표 1-9. 이변량 상관계수

		Δ ct	종자길이
	Pearson 상관계수	1	.251*
Δ ct	유의수준(양쪽)		.016
	N	91	91

*. 상관이 0.05 수준에서 유의합니다(양쪽).

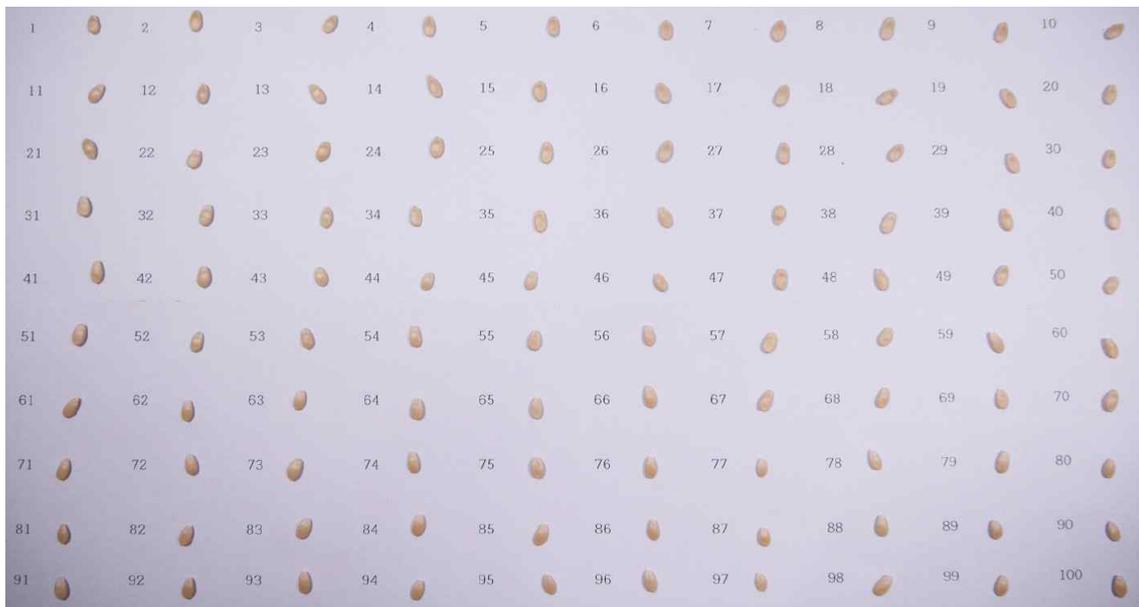


그림 1-18. 참외종자 길이 측정 및 외관 관찰

표 1-10. 참외종자의 길이와 Q-RT-PCR을 이용한 바이러스 측정

	CGMMV Ct	Beta -Actin Ct	del ct	종자 길이		CGMMV Ct	Beta -Actin Ct	del ct	종자 길이
참외 1-01	35.35	24.53	10.82	0.50	참외 1-91	34.04	24.16	9.9	0.60
참외 1-02	35.71	21.73	13.98	0.60	참외 1-92	38.47	21.53	16.9	0.61
참외 1-03	35.57	21.86	12.71	0.50	참외 1-93	33.10	24.91	8.2	0.60
참외 1-04	38.10	23.57	14.53	0.60	참외 1-94	38.83	24.29	14.5	0.55
참외 1-05	33.06	25.03	8.03	0.60	참외 1-95	34.47	23.07	11.4	0.55
참외 1-06	38.47	24.46	14.01	0.60	참외 1-96	34.33	22.62	11.7	0.55
참외 1-07	38.11	22.77	15.34	0.65	참외 1-97	34.40	22.35	12.1	0.50
참외 1-08	38.24	24.97	13.27	0.70	참외 1-98	33.31	23.47	9.8	0.60
참외 1-09	35.43	24.67	10.76	0.60	참외 1-99	34.32	23.24	11.1	0.55
참외 1-10	33.79	24.30	9.49	0.60	참외1-100	34.42	24.23	10.2	0.60
참외 1-11	34.40	24.82	9.58	0.60	참외 2-01	29.91	22.84	7.1	0.64
참외 1-12	35.79	22.81	12.98	0.60	참외 2-02	32.04	22.71	9.3	0.59
참외 1-13	36.35	26.32	10.03	0.60	참외 2-03	29.57	22.22	7.3	0.65
참외 1-14	38.89	23.16	15.73	0.70	참외 2-04	23.09	21.77	1.3	0.50
참외 1-15	35.99	24.30	11.69	0.60	참외 2-05	33.92	21.28	12.6	0.58
참외 1-16	37.44	23.45	13.99	0.60	참외 2-07	29.46	22.03	7.4	0.62
참외 1-17	34.16	25.17	8.99	0.70	참외 2-08	31.65	21.71	9.9	0.61
참외 1-18	36.54	28.13	8.41	0.60	참외 2-09	34.78	22.03	12.7	0.62
참외 1-19	35.11	25.31	9.80	0.60	참외 2-10	32.04	22.40	9.6	0.57
참외 1-20	27.76	25.74	2.02	0.60	참외 2-13	35.63	22.66	13.0	0.61
참외 1-21	33.35	25.11	8.24	0.65	참외 2-14	33.83	22.43	11.4	0.56
참외 1-22	32.34	22.84	9.50	0.60	참외 2-15	34.36	21.84	12.5	0.57
참외 1-23	36.45	24.74	11.71	0.60	참외 2-18	29.76	22.17	7.6	0.91
참외 1-24	35.18	25.24	9.94	0.60	참외 2-19	24.06	21.85	2.2	0.54
참외 1-25	36.53	27.30	9.23	0.70	참외 2-20	32.92	21.39	11.5	0.53
참외 1-53	25.07	24.39	0.7	0.50	참외 2-21	36.54	22.12	14.4	0.63
참외 1-55	38.82	21.33	17.5	0.50	참외 2-22	35.70	22.40	13.3	0.60
참외 1-56	27.26	25.80	1.5	0.50	참외 2-23	33.46	21.55	11.9	0.60
참외 1-57	38.76	21.84	16.9	0.60	참외 2-24	36.19	22.14	14.1	0.64
참외 1-60	34.37	27.55	6.8	0.55	참외 2-25	30.62	22.23	8.4	0.63
참외 1-61	29.11	23.23	5.9	0.60	참외 2-26	24.22	22.09	2.1	0.53
참외 1-64	34.97	27.99	7.0	0.50	참외 2-27	32.09	23.23	8.9	0.61
참외 1-66	29.83	29.47	0.4	0.55	참외 2-28	34.16	22.66	11.5	0.51
참외 1-67	36.94	26.34	10.6	0.60	참외 2-29	28.44	21.70	6.7	0.56
참외 1-68	27.78	25.13	2.7	0.60	참외 2-30	36.61	23.58	13.0	0.55
참외 1-70	35.40	24.22	11.2	0.60	참외 2-31	30.41	23.20	7.2	0.58
참외 1-71	25.40	23.71	1.7	0.55	참외 2-32	35.13	22.92	12.2	0.60
참외 1-72	19.76	32.84	-13.1	0.50	참외 2-33	32.19	21.87	10.3	0.59
참외 1-81	33.34	28.19	5.1	0.50	참외 2-34	26.12	22.93	3.2	0.51
참외 1-82	31.04	25.62	5.4	0.55	참외 2-37	31.95	22.85	9.1	0.58
참외 1-84	34.75	22.90	11.9	0.60	참외 2-39	32.04	22.20	9.8	0.58
참외 1-85	34.59	23.36	11.2	0.60	참외 2-41	26.65	22.45	4.2	0.55
참외 1-86	27.99	24.82	3.2	0.65	참외 2-43	34.03	22.26	12.8	0.52
참외 1-87	35.21	20.88	14.3	0.60	참외 2-44	23.68	22.33	1.3	0.53
참외 1-88	26.62	25.21	1.4	0.60	참외 2-45	31.67	24.08	7.6	0.60
참외 1-90	34.97	23.03	11.9	0.60					

6. Cucumber green mottle mosaic virus(CGMMV) Infectious clone 제작

- 국내 분포된 CGMMV의 생물학적 특성 및 종자내 발현 특성을 규명하기위하여 CGMMV의 검출방법에 기초 데이터로 사용하고자 함 (CGMMV에 의한 종자 내 생화학적 변화연구 및 CGMMV의 isolate별 종자전염양상 차이 확인연구에 이용)
- 본 내용은 Virus Genes 에 게재될

가. CGMMV 샘플 채집 및 진단

- CGMMV Infectious clone 제작에 사용된 샘플은 경상북도 성주군과 칠곡군에서 채집된 CGMMV에 감염된 참외, 수박, 멜론 잎을 사용하였음. CGMMV의 병징이 나오는 작물의 잎들 중에서, PCR 진단을 통해 단독감염 된 잎을 선별하여 사용함.

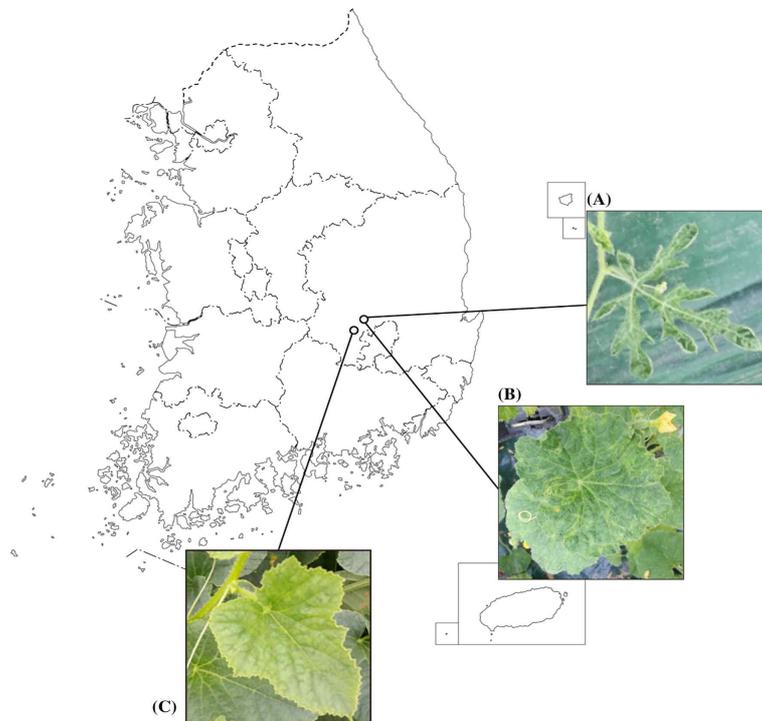


그림 1-19. CGMMV 채집 지역

나. RNA의 추출과 cDNA 합성

- 채집한 잎에서 RNA추출 시에는 액체질소를 사용하여 잎을 얼리고, 쇠구슬을 이용하여 마쇄. 마쇄한 잎은 RNA extraction kit.과 Trizol(Life technologies, Carlsbad, CA, USA), Chloroform을 이용한 방법으로 RNA를 추출함. 추출한 RNA는 Deep freezer (-70℃)에서 보관. 추출한 total RNA 는 LeGene Express 1st Strand cDNA Synthesis System (LeGene Bioscience, San Diego, CA, USA)사용하여 cDNA를 제작.
- 프라이머 제작과정 중, pJY vector를 만드는 데에는 3' 말단에 t-RNA 구조를 가진 CGMMV에 Agroinfiltration방법을 적용하기 위해 Ribozyme site를 다른 vector에서 가져와 사용할 수 있도록 했고, In vitro transcription을 위해서 CGMMV의 앞부분에는 T7 promoter의 서열을 추가하였음.

다. Full-length cDNA clone 제작 과정

- CGMMV cDNA clone을 제작하기 위해 Ribozyme site를 가진 pJY vector를 새로 제작.
- 만들어진 CGMMV cDNA clone은 pJY vector에 완전한 한 조각의 CGMMV PCR product만을 이용하여 완성.
- cDNA clone 제작에 사용한 cDNA에서 한 조각의 CGMMV PCR product를 증폭하는 PCR과정에는 한 세트의 프라이머를 사용하였고, 증폭된 PCR product의 길이는 CGMMV의 원 길이인 6.4kb임.
- 프라이머 제작과정 중, In vitro transcription을 위해서 CGMMV의 앞부분에는 T7 promoter의 서열을 추가하였음.

표 1-11. CGMMV infectious clone 제작에 사용된 프라이머

Primer name	Sequence of primer	Length (bp)
CGMMV Fw Xho I T7 F	5`-AAACTCGAGTAATACGACTCACTATAGGGGTT TTAATTTTTATAATTAACAACAACAAC-3`	61
CGMMV B BamH I R	5`-AAAGGATCCTGGGCCCTACCCGGGGAAA-3`	29

- 제작된 PCR product를 pJY vector에 넣을 수 있도록 사용된 제한효소는 XhoI과 BamHI 임.
- PCR은 KOD FX Neo (TOYOBO, Osaka, Japan)을 사용해 진행하였음. 6.4kb PCR product와 pJY vector를 T4 DNA Ligase (Promega, Madison, USA)를 이용해 Ligation 을 하였고 Escherichia coli(DH5 α)에 Transformation 실시한 뒤 제한효소 XhoI과 BamHI을 이용해 Cloning된 것을 확인.

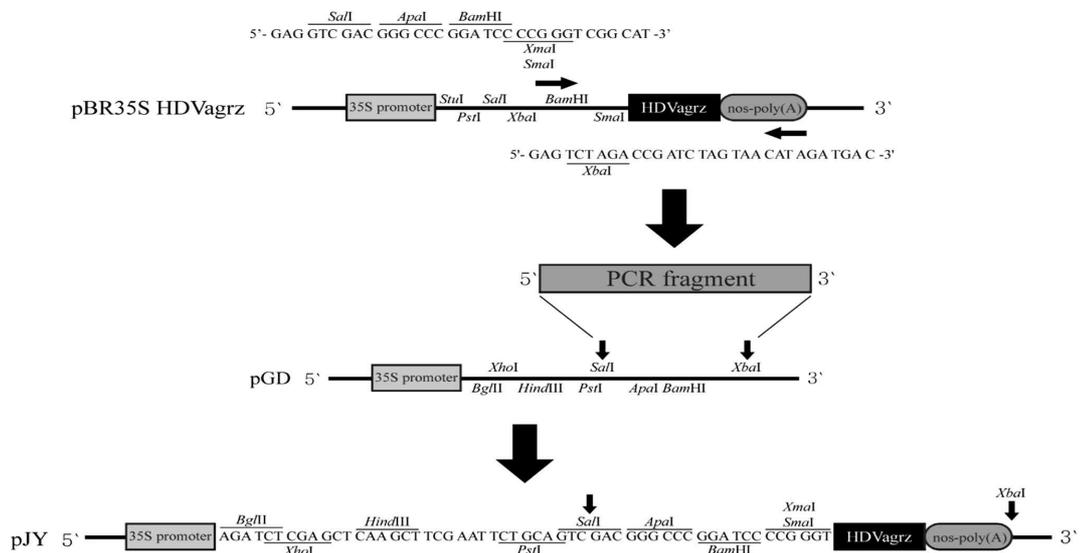


그림 1-20. pJY vector의 제작과정 모식도

- CGMMV cDNA clone 제작에는 참외, 수박, 멜론 세 가지 샘플 모두 동일한 조건과 프라이머를 이용하여 진행했음.
- 완성된 CGMMV Infectious clone의 모식도는 다음과 같음. CGMMV 앞부분에 Agroinfiltration을 실시할 수 있는 35S promoter와 In vitro transcription을 진행할 수 있는 T7 promoter를 포함한 구조를 가지고 있으며, 뒷부분에는 Agroinfiltration시 t-RNA 구조를 가지는 CGMMV도 기능을 가질 수 있게 도와주는 구조인 Rybozyme site (HDVagrz)를 가지고 있음.

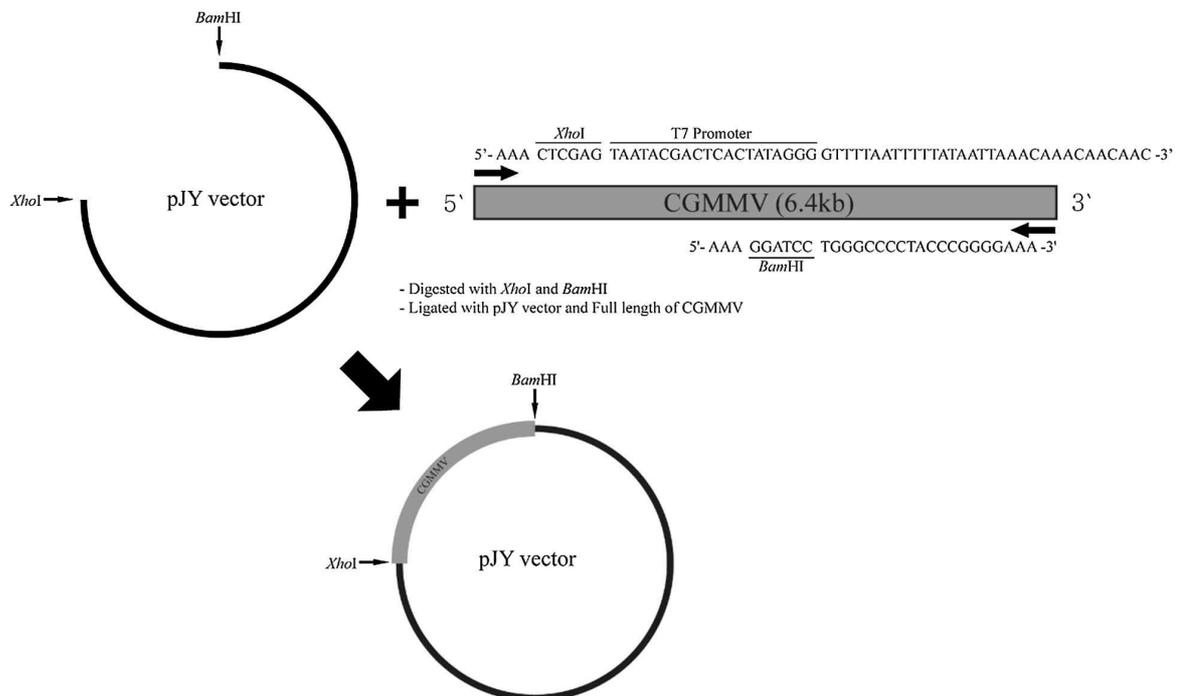


그림 1-21. CGMMV cDNA clone 제작과정 모식도



그림 1-22. 완성된 CGMMV cDNA clone의 모식도

라. 제작된 CGMMV Infectious clone의 병원성 검증

- 채집된 참외, 수박, 멜론 앞에서 추출한 CGMMV로 제작한 CGMMV Infectious clone은 CGMMV OMpj, CGMMV Wpj, CGMMV Mpj 각각 하나씩, 총 3개가 완성되었음. 세 개의 Infectious clone 모두 In vitro transcription과 Agroinfiltration을 이용해 두 방법으로 모두 작동을 확인함. In vitro transcription에는 Ribo m7G Cap analog와 T7 RNA polymerase (Promega, Madison, USA)를 사용하였다. Agroinfiltration에는 Agrobacterium tumefaciens strain GV2260을 이용했음. 두 실험 방법 모두 3회 반복 실험을 진행했고, 모델식물로는 담배인 *Nicotiana benthamiana*를 이용함. 접종 후 병징이 육안으로 확인 된 15일차에 사진촬영 함.

표 1-12. CGMMV Infectious clone의 병원성 검증

	CGMMV-OMpj	CGMMV-Wpj	CGMMV-Mpj
In vitro transcription			
Agro infiltration			
병징	세 isolate의 CGMMV 중 가장 강한 병징을 보임. 앞에 강한 모자이크와 뒤틀림 증상, 강한 생장의 위축을 보임.	세 isolate의 CGMMV 중 가장 약한 병징을 보임. 앞에 약한 모자이크 증상을 보임.	세 isolate의 CGMMV 중 중간정도의 병징을 보임. 앞에 강한 모자이크와 약한 뒤틀림 증상, 약한 생장의 위축을 보임.

마. 제작된 CGMMV Infectious clone 아미노산 서열 확인

- 병징이 다르게 나타나는 세 가지 CGMMV Infectious clone의 아미노산 서열상의 차이를 확인하기 위하여 아래 표에 작성한 프라이머를 이용하여 sequencing을 실시하였음.

표 1-13. CGMMV sequencing primers

Primer name	Sequence of primer	Length (bp)
CGMMV Seq Bw 0	5'-TCTCAGCCCTAGCGGCTG-3'	18
CGMMV Seq Fw 1	5'-TTATGACATCGGCGGTA ACT-3'	20
CGMMV Seq Bw 1	5'-GATTGTAAGCCATCTTCAAA-3'	20
CGMMV Seq Fw 2	5'-AAGGTGTTGATACCCAAGTTT-3'	21
CGMMV Seq Bw 2	5'-CAACGAGTTCTCGACTGAC-3'	19
CGMMV Seq Fw 3	5'-GAGATGGGTGCTTCTGTTG-3'	19
CGMMV Seq Bw 3	5'-TGGGAAGAGAGATCTGAGAA-3'	20
CGMMV Seq Fw 4	5'-TTGTGGAAGACCGCCGAG-3'	19
CGMMV Seq Bw 4	5'-CATTAATTGCTATTTGGTAGG-3'	21

- Full sequencing에 사용된 프라이머는 총 9개이며, CGMMV OMpj는 6,423bp, CGMMV Wpj는 6,424bp, CGMMV Mpj는 6,424bp의 길이를 보였음. 아미노산 서열이 프라이머 제작에 사용된 CGMMV-SH strain (M. Ugaki et al., 1991/GenBank : NC_001801)과 차이가 나타나는 것을 확인하였으며 제작된 세 가지 Infectious clone 내에서도 차이점을 나타내었음.

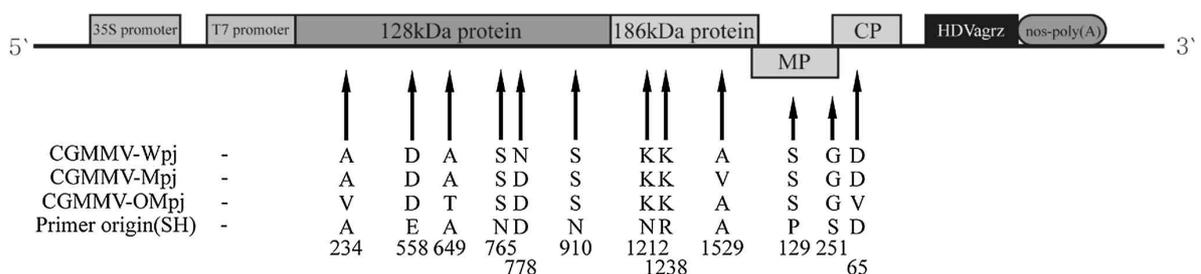


그림 1-23. CGMMV-OM1, CGMMV-OM2 infectious clone 간의 아미노산 서열 차이

바. CGMMV Infectious clone full-length Phylogenetic tree

- 제작한 CGMMV Infectious clone과 국내·외에서 보고된 CGMMV 서열과 차이점을 확인하기 위해 모든 길이의 CGMMV염기 서열을 이용하여 Phylogenetic tree를 작성하였으며 국내발생 CGMMV 는 중국과 타이완 등이 속해있는 Asian group에 속하며 중국과 타이완 등지에서 생산된 종자수입 시 국내 유입되었을 것으로 추측됨.

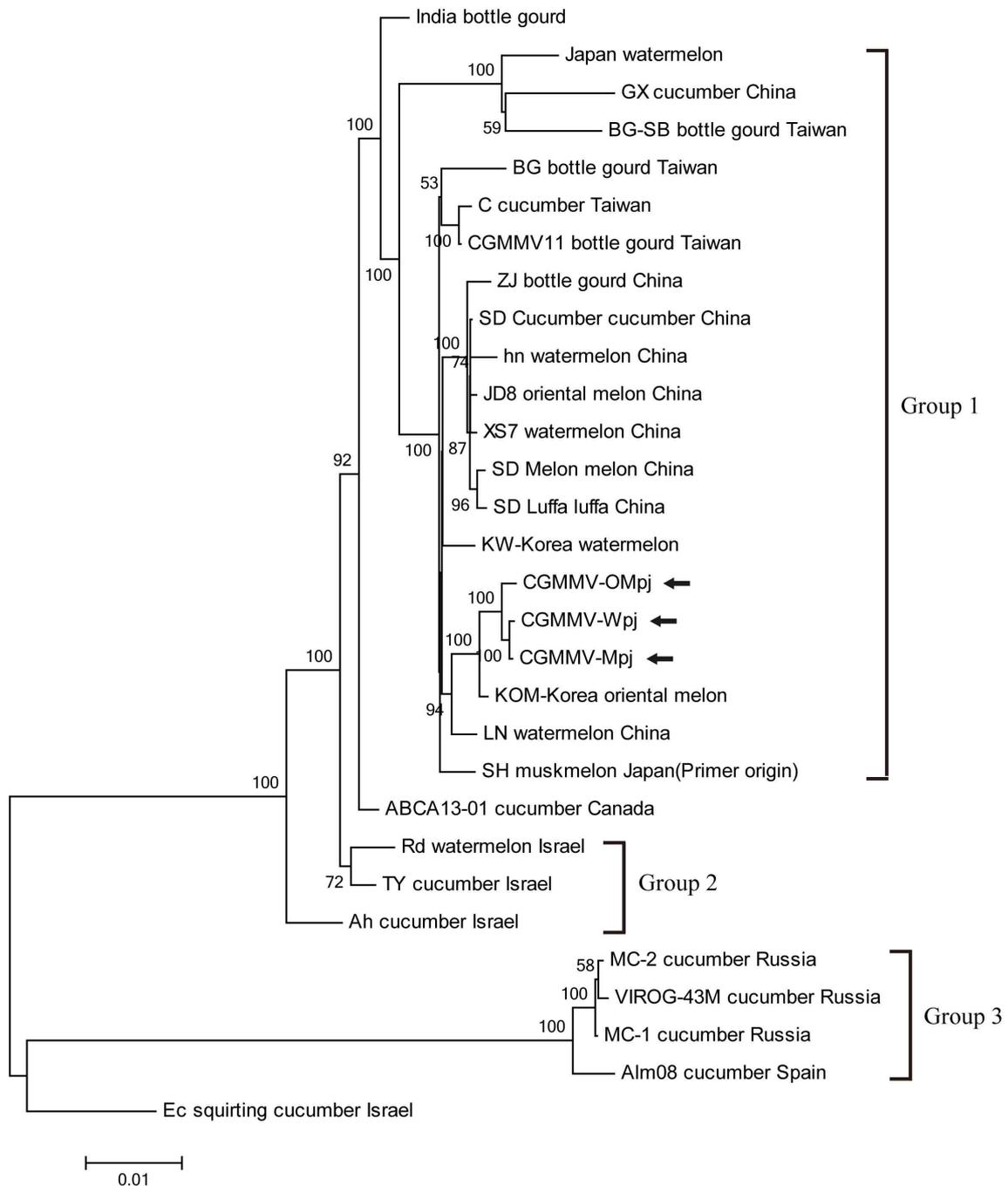


그림 1-24. CGMMV Infectious clone의 phylogenetic analysis

7. 종자전염률이 높은 PMMoV Infectious clone 제작 (향후 고추종자 바이러스 검출 시스템 개발과 연계된 연구를 위하여 개발하였음)

가. S-47 과 J-76의 분리 및 Infectious clone 제작

- 2015년 전국 고추밭의 바이러스 감염 조사를 실시하였으며, 그 결과 진주와 상천에서 PMMoV를 분리하였으며 Infectious clone을 제작함 (그림 1-25)
- Infectious clone을 제작 후 전체 염기 서열을 분석하였으며, 염기서열 중 126 kDa 와 Movement Protein (MP)에서 아미노산 차이를 보였으며 R(142)K, D(583)K, V(931)I 가 126 kDa에서 K(134)R, V(192)A, N(226)D, L(250)S 가 MP 에서 차이가 나타남 (그림 1-25).
- Full length infectious clone 은 각각 isolate에 따라 S-47 과 J-76으로 명명 하였으며 전체염기서열은 T7 promoter 과 Ribozyme site를 사이에 클로닝 되어 in vitro RNA transcription 이 매우 용이하여 RNA transcript 로 담배, 고추에 접종이 가능함. 또한 전체 염기서열은 각각 Genbank에 보고되었으며 PMMoV S-47 KX399390과 PMMoV J-36 KX399389로 등록함.

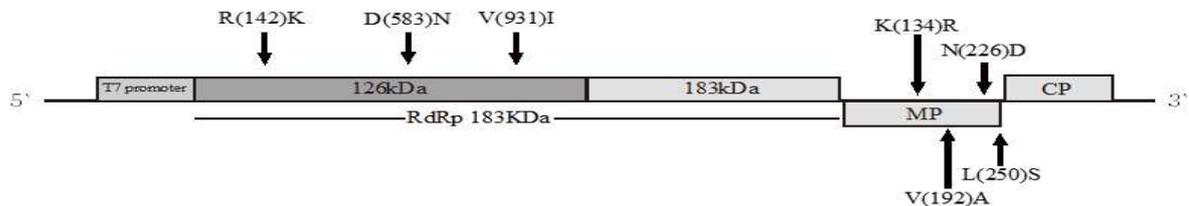


그림 1-25. PMMoV S-47와 J-76 Infectious Clone 제작 및 아미노산 서열 비교

나. PMMoV S-47과 J-76의 유전학적 분류 의미 및 생물학적 기능 차이

- S-47과 J-76의 계통분석 결과로 볼 때 일본과 중국에서 보고된 isolates와 매우 근접함 (PMMoV-J AB000709, C1421 AB069853, HN1 KP345899)
- S-47과 J-76은 *Nicotiana benthamiana*에서 병징 차이를 보였으나 *Capsicum annuum*에서는 병징 차이가 없었으며 병징이 심하지 않았음(그림 1-26).
- 고추에서 병징 차이는 발생하지 않았지만 고추 종자 내 종자 품질, 수량의 차이를 보임. 바이러스가 접종된 고추 10주에서 각각 50개 종자를 건열처리 후 발아시킨 유묘에서 바이러스 감염률은 총 500개 종자에서 22%(S-46) vs 55%(J-76)로 유의하게 차이를 보였음. 또한 담배에 접종 후 수확된 종자로부터 발아 후 유묘에서도 비슷한 양상을 보임(표 1-14). 건열처리 없이 처리된 종자는 두 isolate 간 종자전염률은 유사하게 나타남. 이는 종자외피가 아닌 배아 내 바이러스의 감염 차이로 해석할 수 있음.

표 1-14. 국내 분리 PMMoV isolate S-47과 J-76비교

	PMMoV S-47 (Genbank number KX399390)	PMMoV J-76 (Genbank number KX399389)
유전자 크기 (size of RNA genome)	6.4 kb	6.4 kb
Symptom in <i>C. annuum</i>	Mild	Mild
Symptom in <i>N. benthamiana</i>	Mild	Severe
Seed transmission in <i>C. annuum</i>	55% a (500 seeds)	64% a
Seed transmission after heat treatment in <i>C. annuum</i>	22% a (500 seeds)	55% b
Seed transmission in <i>N. benthamiana</i>	65%	70%
Seed transmission after heat treatment in <i>N. benthamiana</i>	18% a	62% b
Amino acid sequence difference in 126 kDa	R(142)K, D(583)K, V(931)I	
Amino acid sequence difference in 180 kDa	126kDa 이후 readthrough 부분 모든 서열 동일	
Amino acid sequence difference in MP	K(134)R, V(192)A, N(226)D, L(250)S	
Amino acid sequence difference in CP	모든 서열 동일	

- S-47과 J-76의 RNA 복제량을 측정하기 위하여 각각의 isolate가 감염된 고추로부터 10개의 꽃을 수확하여 PMMoV RNA량을 측정하였으며 RNA의 양은 S-47이 12배가량 높게 나왔음. 흔히 종자전염률은 바이러스의 양에 비례한다고 예측하였으나 본 연구 결과는 반대로 RNA의 복제량과는 일치하지 않음을 보임(표 1-15).

표 1-15. Real-time qPCR comparison of levels of PMMoV isolates S-47 and J-76 in flowers of *C. annuum*

	S-47 Flowers (10)			J-76 Flowers (10)		
Ct of PMMoV	12.75±0.45	13.42±0.34	14.20±0.98	11.94±0.43	12.01±0.97	13.47±0.63
Ct of Actin	-7.09±0.23	-5.80±0.89	-2.29±0.45	-7.51±0.28	-7.39±0.78	-4.74±0.67
Ct PMMoV -Ct tubulin	18.51			22.2		
$2^{\Delta\Delta Ct}$ S-47 - $\Delta\Delta Ct$ J-47)				12.9		

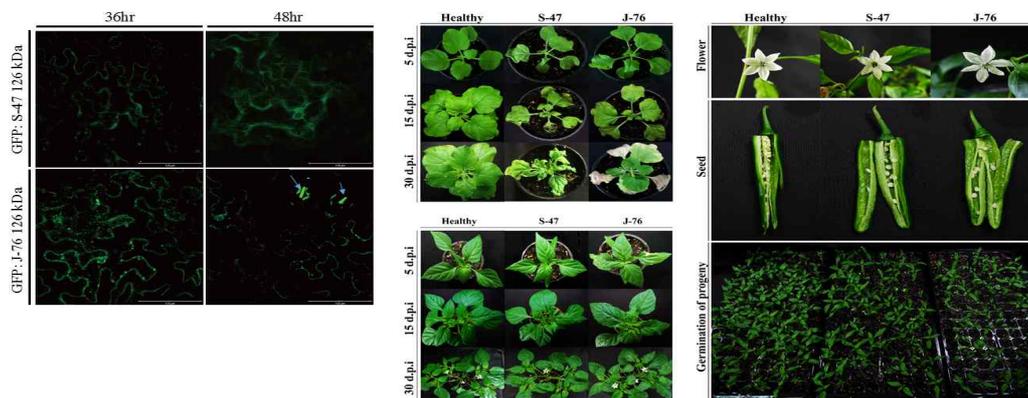


그림 1-26. PMMoV S-47과 J-76 isolate 간 세포내 Localization, 병징, 종자생성 비교

- S-47과 J-76의 126kDa(3개의 아미노산 차이)와 MP(4개의 아미노산 차이) 각각을 GFP fusion binary vector를 통하여 Subcellular localization을 관찰하였으며 J-76 126kDa 단백질은 S-47과 달리 Aggregation(그림 1-26 화살표) 일어남을 확인 하였고, 이는 helicase와 methlylase 기능이 있는 126kDa 의 homologous interaction에 의한 것으로 추측됨 (그림 1-26).
- 4개의 아미노산의 차이가 있는 MP의 Subcelluar localization에서는 차이를 찾을 수 없음. Coat Protein은 두 isolate가 100% 동일한 염기서열을 갖고 있어 큰 의미를 부여 하지 않았음.

다. 생물학적 기능 차이를 통한 배아 내 이동/복제/소멸 기능 바이러스 단백질 규명

- 상기의 선행연구 결과를 바탕으로 판단할 때 PMMoV 바이러스 종자전염률은 배아 내 바이러스의 양에 비례하지 않으며 바이러스가 종자 내 이동방법 또는 배아 내 환경 (다양한 protease 발현)을 극복하는 방법에 따라 종자 전염률 차이가 나타난다는 가설을 수립하게 됨.
- S-47과 J-76 isolates는 126kDa와 MP에 존재하는 총 7개의 아미노산의 차이에 의하여 생식기관 내 바이러스 RNA량, 126kDa localization pattern, 종자전염률, 생식기관의 생육상태, 병징의 차이를 고추와 담배에서 확인 할 수 있으며, 두 isolate 간 7개 아미노산의 substitution을 통하여 배아 내 필요한 단백질을 구성하는 핵심 아미노산 탐색 가능.
- 126kDa이 복제에 관여하는 효소로 예측 되나 안정된 복제를 통한 RNA 량의 증가는 종자전염률과 관계가 없다고 판단 됨. 즉 바이러스 RNA량이 많아도 소멸(RNA degradation)은 별개의 기작으로 예측. 126kDa 와 MP 의 상호작용이 배아 내 안정적으로 존재 가능할 것으로 예측되며 특히 MP의 4개의 아미노산이 종자전염률 또는 배아 내 생존에 중요한 역할을 할 것으로 예측됨.
- Isolates 간 4개의 아미노산이 차이가 있는 MP은 subcellular localization에서의 차이는 발견하지 못하였으나 배아 내 이동 및 배아 내 각종 효소에 대한 방어 기작 차이가 있을 것으로 사료되어 생화학적 분석이 필요한 연구 분분으로 판단됨. 또한 126kDa 의 상호작용에 따른 종자전염률의 차이가 나타날 수 있음.
- 바이러스 RNA의 안정성에 매우 중요한 역할을 하는 CP에 대한 추가 연구를 통하여 RNA 소멸 관계 등을 규명하고자 함. 최소한의 CP 기능(long distance movement)을 유지시켜 RNA의 소멸을 용이하게 할 수 있을 것으로 판단됨.

8. CGMMV 와 PMMoV Infectious clone 제작의미

- 종자 생산업체에서 가장 경계되는 바이러스 임
- 바이러스 감염 종자를 수확하기 위하여 Infectious clone 으로 접종 관리가 매우 용이하므로 Infectious clone 제작 필요
- 향후 PMMoV 검출 시스템 개발을 위해 이용 계획

제2절 이병종자 신속·전수검역을 위한 복합 초분광 영상시스템 개발 (제2세부)

1. 종자 측정용 SWIR 초분광 영상시스템 구축

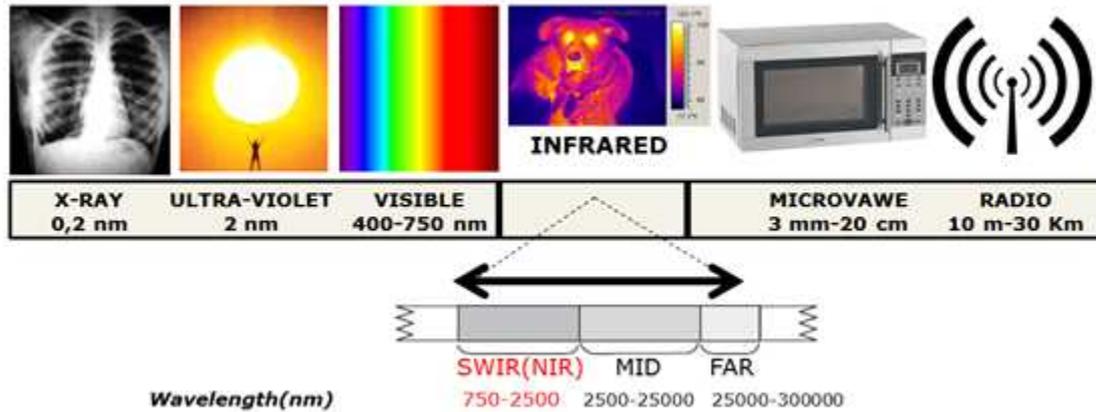


그림 2-34. 전자기파의 스펙트럼

- 최근 농산물 내부품질 측정에 사용되는 비파괴 방식 중 근적외 분광법은 사용의 편의성, 결과의 신뢰성, 광선의 안전성으로 많은 분야에서 실제 상품화, 산업화되고 있는 실정임. 분광분석법은 기존의 기기분석과 달리 대상물의 전처리가 불필요하며, 고체, 액체, 분말 등 원래 대상체 형태를 유지한 채 측정이 가능함. 이런 편의성으로 농산물, 제약, 화학 등 신속품질측정에 사용되고 있음.
- 그림 2-1에서 나타내었듯이 근적외선은 적외선(750nm이후)보다 긴 파장 대역을 나타내며, SWIR은 short wave infrared 의 약자로 가시광선(visible)보다는 파장이 길고 중적외선(MID-IR)보다는 파장이 짧은 750 ~ 2500 nm의 파장대역을 말함. SWIR 영역의 특징은 물질의 분자진동 현상이 (-CH, -OH, -NH 작용기) 결합대(combination band)와 배음대(overtone band)의 형태로 나타남. 이는 물질의 화학적 구조에 따라 서로 다른 형태의 흡수현상을 나타내므로 측정하고자 하는 물질의 정성 및 정량분석이 가능하게 됨. 특히, SWIR 영역은 농식품 분야에서 이물질의 검출이나 품질 판정 등 다양한 형태로 적용되어 왔음.
- 초분광 영상시스템은 기존의 분광분석장비와 카메라를 결합한 것으로 일반적으로 불리는 분광분석장비는 대상물에 대한 국지적인 분광정보만을 파악할 수 있음. 하지만, 영상장비가 결합된 초분광 영상시스템은 대상물의 전 영역에 대한 분광정보를 모두 획득할 수 있어 공간영역에 대한 분석 및 해석이 가능하게 됨. 또한, 기존 분광분석법의 point by point 형식의 측정방식보다 신속·대량 측정이 가능함으로써 새로운 차세대 측정법으로 주목받고 있음.

- 초분광 영상은 각 파장별 연속적으로 획득된 영상을 말하며, 획득원리는 그림 2-2와 같음. 렌즈에 투사된 영상은 slit을 통과 하면서 1차원 정보가 되고 imaging spectrograph에 의해 각 파장별로 분광이 생성되며 1차원 정보가 분광정보를 포함한 2차원 정보로 변환. 이러한 영상들은 그림 2-3에서 보는 것과 같이 3D hypercube라는 대용량 정보를 구성하게 되며 2차원의 영상 정보와 각 픽셀별 스펙트럼 정보를 동시에 가지게 됨. 따라서 초분광 영상 기술은 분광에 영상을 융합한 기술로 기존의 분광기술이 대상물 전체의 분광정보를 제공하는 것과는 달리 대상물 세부 공간 영역에 대한 미세 영역별 분광정보를 제공하므로 대상물의 공간영역별 물리, 화학적 분석이 가능.

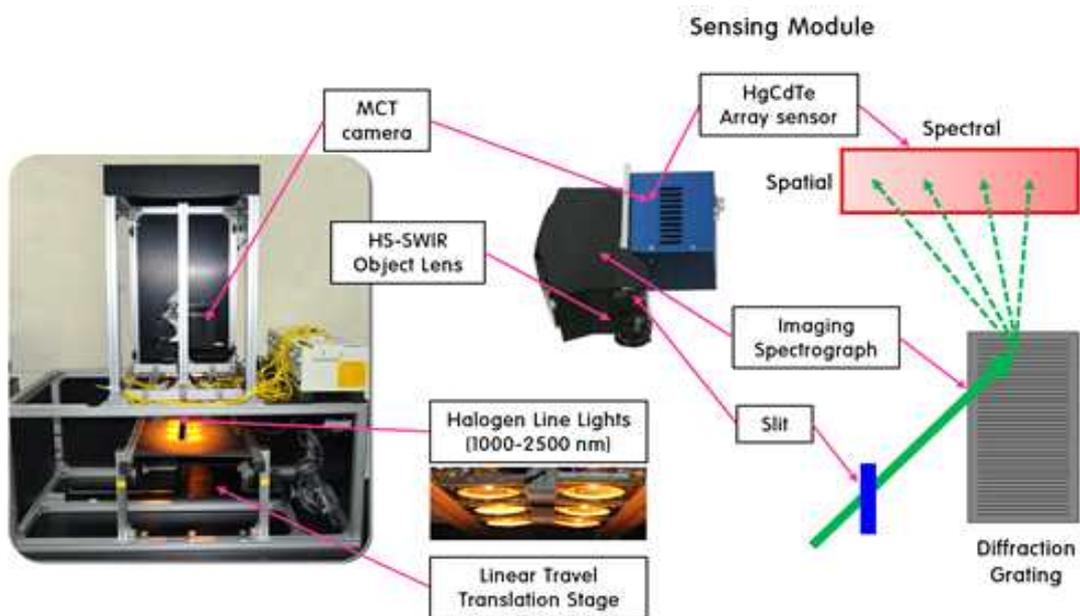


그림 2-35. SWIR 초분광 영상 장비의 개략도 그림

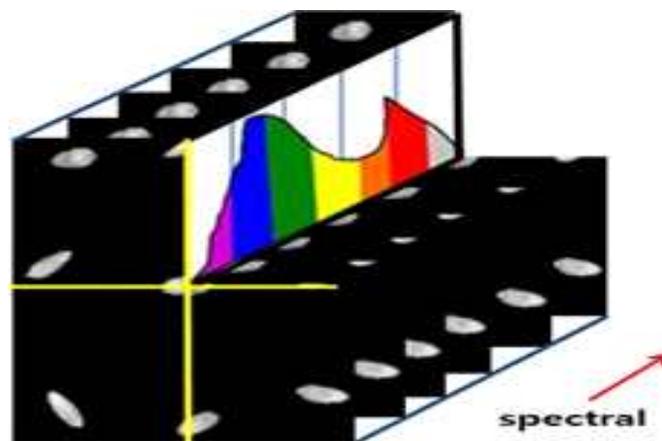
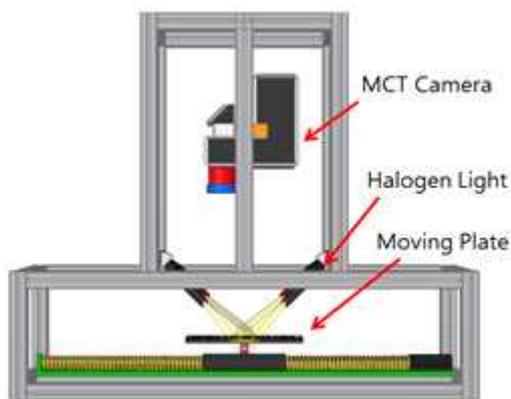


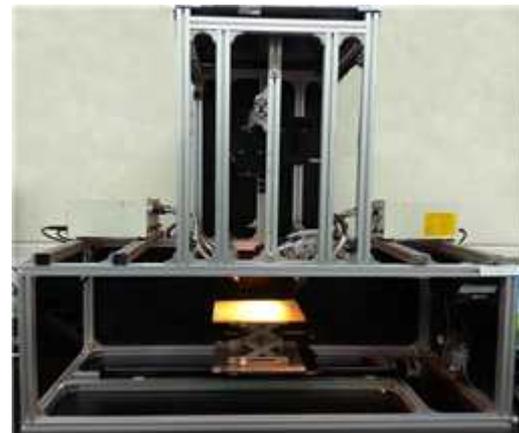
그림 2-36. 초분광 데이터의 구조

가. SWIR 영상 시스템 프로토타입 구축

- 본 연구진이 구축한 SWIR 영상 시스템의 설계 도안과 개발된 장비는 그림 2-4와 같음. 초분광 영상시스템의 주요부는 MCT(Mercury cadmium telluride)센서, 초점 조절이 가능한 C-Mount 렌즈가 구비된 Imaging Spectrograph와 스텝 모터로 구동되는 시료 이송부, 광량 조절이 가능한 텅스텐-할로겐 광원으로 구성되었음. 제어 시스템 소프트웨어는 Visual Basic 6.0을 이용하여 구축하였으며, 렌즈의 노출시간을 설정하면 카메라에서 자동으로 step motor의 이송속도 및 촬영시간을 계산하여 구동할 수 있도록 함. 렌즈에 투사된 영상은 slit을 통과하면서 line-scan이 되고 spectrograph에 의하여 각 파장별로 분광이 생성되며, 분광된 정보는 HgCdTe (MCT) Array sensor에 맺히게 되고 3차원 이미지로 저장.
- 또한 광원은 광량 조절이 가능하고 가시광선 영역대는 물론 2500 nm의 적외선 영역까지 조사가 가능한 100 W급 halogen lamp를 이용. Line light 가이드를 설치하여 조사폭 조절이 가능하도록 설계하였으며, 가이드는 3개를 1 set로 하였고, 종자에 조명을 최적화하기 위해 수직 방향으로 약 15°, 가이드와 가이드 사이는 약 30° 정도 기울어지도록 설치하여 반사광의 공간에 따른 불균일성을 최소화함.



(a)



(b)

그림 2-4. SWIR 초분광 영상 장비 설계도(a) 및 개발된 시스템(b)

나. IR 초분광 영상 및 이송장치 인터페이스 개발

- 개발된 초분광 영상장비를 이용한 이병종자의 분광스펙트럼은 Line scan 방식으로 획득. Line scan 방식이란 측정하고자 하는 시료를 시료이송부에 놓고 일정한 간격으로 시료를 이동시키며 데이터를 획득하는 방식. 이송부를 일정한 간격으로 이동시키는 것은 스텝모터(PK296, Velmex, Inc., NY, USA) 와 구동드라이버를 이용하였고, 초분광 카메라를 통해 획득된 분광신호의 획득 및 저장은 Visual basic으로 운영 소프트웨어를 개발하여 사용함.

다. 광원 등 시스템 파라미터 최적화

- 시료에 대한 최적의 분광신호 획득을 위해서는 광원의 종류, 광원의 조사각, 광원과 시료의 거리, 시료와 카메라의 거리, 렌즈의 F number, 시료이송부의 이동간격 등, 다양한 변수를 조절해야 함. 이번 연구에서는 종자별 최적의 시스템 파라미터를 아래와 같이 설정.

(1) 담배종자

- (가) Lens to sample distance : 95 mm
- (나) Light to sample distance : 70 mm
- (다) Light guide angle: 10 ~ 30°
- (라) Field of view : 9.5 mm
- (마) Exposure time : 7.5ms
- (바) Pixel resolution: 25 μ m
- (사) Number of scan: 1400 steps
- (아) 11 to 16 line using: 6 holes
- (자) AD voltages: 1890/1830

(2) 수박 / 토마토 / 고추종자

- (가) Lens to sample distance : 285 mm
- (나) Light to sample distance : 110 mm
- (다) Light guide angle: 10 ~ 30°
- (라) Field of view : 110 mm
- (마) Exposure time : 7.5ms
- (바) Pixel resolution: 340 μ m
- (사) Number of scan: 320 steps

2. 이병종자 분광정보 DB화 및 스펙트럼 분석

- 최적의 이병종자 검출 모델을 개발하기 위해서는 다양한 바이러스 및 세균에 감염된 종자가 요구됨과 동시에 분광장비별로 획득된 신호의 DB화가 요구됨. 당해 연도에 획득한 분광정보는 표 2-1과 같음. 총 4가지의 바이러스 감염 종자, 2종류의 세균 감염 종자의 분광정보는 2가지의 분광장비를 이용하여 획득되었다.

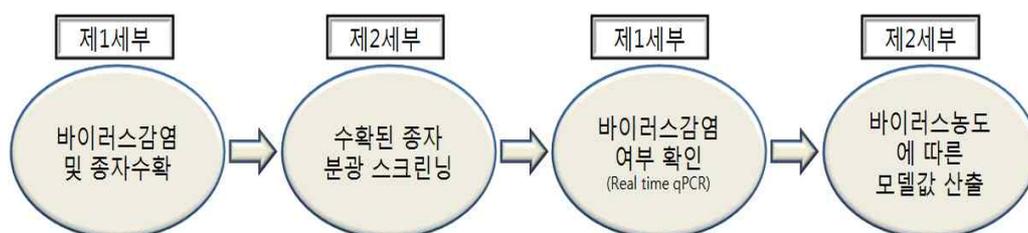


그림 2-5. 바이러스 종자의 선별 방식

가. 시료

- 바이러스 감염종자 및 세균 감염종자는 표 2-1과 같이 담배, 수박, 고추, 토마토 종자를 사용하였고, 바이러스 종자는 제1세부 연구기관으로부터, 그리고 세균감염 수박 및 고추 종자는 1협동 연구기관으로부터 획득. 당해 연도 연구에서는 총 2026개의 종자에 대한 분광데이터를 획득하였고, 그 중 571개의 시료는 감염종자로 판정되었음을 제1세부 연구기관 및 제1협동 기관으로부터 확인. 이 결과는 각 종자별 이병종자 판별 모델 개발에 활용.

표 2-1. 실험에 사용된 감염 종자 현황

감염종류	종자	감염 종류	측정갯수	감염시료	건전시료	비고
		Alternanthera mosaic virus(AltMv)	192	88	114	
		Arabis mosaic virus (ArMV)	96	-	96	본래 샘플이 바이러스에 감염되지 않은 것으로 확인
	담배	Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	96	24	72	
바이러스		Lettuce mosaic virus (LMV)	192	-	192	본래 샘플이 바이러스에 감염되지 않은 것으로 확인
		Tobacco rattle virus (TRV)	96	-	96	진단안됨
		Healthy seed	192	-	192	
	수박	Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	96	45	51	
	고추	Tobacco rattle virus (TRV)	96	74	22	
	토마토	Alternanthera mosaic virus(AltMv)	96	3	93	
	수박	Acidovorax citrulli	592	337	255	
세균	토마토	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis	282	-	282	
		총계	2026	571	1465	

나. FT-NIR 분광분석기

- 이병종자 판별 예측 모델 개발을 위해서는 SWIR 영상장비보다 정밀한 장비를 이용하여 이병종자와 건전종자의 스펙트럼 분석이 요구됨. 즉, 이병종자와 건전종자간의 이화학적 차이가 어떤 변화를 스펙트럼으로 나타나는지를 FT-NIR spectroscopy(Antaris II FT-NIR Analyzer, Thermo, USA)를 이용하여 분석하였으며 (그림 2-6) 시스템의 세부 사항은 표 2-2와 같음.



그림 2-6. FT-NIR spectroscopy.

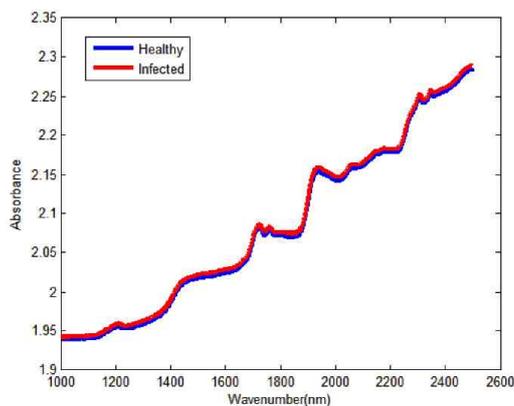
표 2-2. FT-NIR 분석기의 시스템 세부 사항

Detection	High-sensitivity, high-estability, Matched InGaAs
Instrument	Dimensions 40.6 cm (width) × 68.5 cm (depth) × 33 cm (height)
Weight	47.7 Kg
Source	Halogen NIR source
Spectral Range	12000 ~ 3800 cm ⁻¹ (833 ~ 2630 nm)
Resolution	4 cm ⁻¹ across spectral range (6nm at 1250 nm)

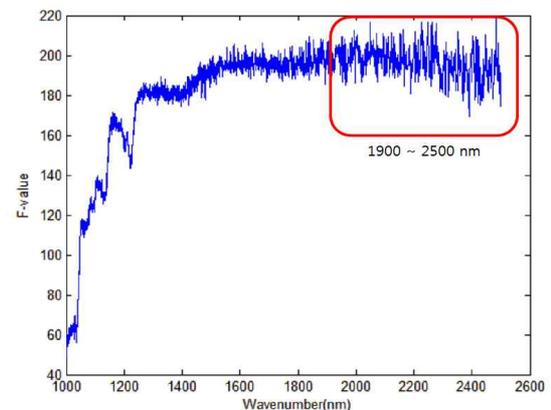
다. 바이러스 감염종자의 FT-NIR 스펙트럼 분석

- 감염 담배종자와 건전 담배종자의 평균 스펙트럼은 그림 2-7(a)과 같음. 그림 2-7(a)에서 보이듯이 두 종자의 평균 스펙트럼 간 뚜렷한 차이를 확인하기 어려웠음. 따라서 두 그룹의 주된 차이를 나타내는 고유한 스펙트럼을 찾기 위해 분산분석(Analysis of variance, ANOVA)을 이용.
- 그림 2-7(b)는 분산분석을 통해 얻어진 파장별 F-값을 나타낸 것으로 전 영역에서 유의 수준 0.001 이하의 값을 나타내어 통계적으로 유의함을 확인. 이는 감염 담배종자와 건전 담배종자의 전파장에서 뚜렷한 차이가 나타났음을 말함. 상대적으로는 1900 nm ~ 2500 nm 사이의 영역에서 다른 파장 영역보다 다소 높은 F-값이 나타남을 확인할 수 있었음.

- 감염종자와 건전종자간의 스펙트럼 차이가 나타나는 이유를 크게 5가지로 정리하면 다음과 같음.
- 첫째 이유는 식물이 바이러스에 감염되면 가장 먼저 자신을 보호하기 위한 방어물질을 생성함. 이 과정에서 생성되는 phenolic compounds(페놀계 화합물), salicylic acid, jasmonic acid로 인한 차이가 나타났을 가능성 있음.
- 둘째는, 식물체내에서 바이러스의 공격에 의해 기존의 대사과정이 영향을 받게 되고, 이로 인해 물질대사 과정에서 생성되는 대사물질의 함량차이로 인한 가능성을 들 수 있음.
- 세번째로는 바이러스가 증식을 하며 종자의 내외부에 포자가 형성되는데, 이 포자의 분광신호차이에 의한 가능성을 염두에 둘 수 있음.
- 네 번째는, 종자가 생성되는 과정에서 바이러스의 공격이 세포를 사멸시키고, 이에 따라 세포내 물질이 손실됨으로 인한 가능성을 들 수 있음.
- 마지막 다섯 번째는, 종피 안쪽에 위치하는 호분층이 바이러스로 인해 비정상적으로 형성됨으로써 호분층의 두께 차이가 발생했을 가능성이 있음.
- 이러한 다양한 변화들이 복합적으로 영향을 미치게 되고 결국 건전종자와 감염종자의 분광신호차이로 발생한 것으로 판단됨.



(a)



(b)

그림 2-7. 바이러스 감염 담배종자 및 건전종자 평균 스펙트럼(a), ANOVA 분석 결과(b)

라. 세균 감염종자의 FT-NIR 스펙트럼 분석

- 세균 감염 담배종자와 건전 담배종자의 평균 스펙트럼은 그림 2-8과 같음. 그림상으로는 두 종자사이의 평균 스펙트럼 차이를 확인하기 어려웠음. 그림 2-8은 분산분석을 통해 얻어진 파장별 F-값을 나타낸 것으로 전 영역에서 가장 높은 유의 수준 ($p < 0.3$)을 나타낸 영역은 1900 nm ~ 2500 nm 사이의 영역이었고, 바이러스 감염종자와 건전종자와의 차이를 나타내는 구간과 유사함을 확인할 수 있었음.
- 결국, 다른 종류의 병증이지만 건전종자와의 스펙트럼 차이가 유사하다는 결과로 비추어, 세균에 감염된 종자도 바이러스에 감염된 종자가 나타내는 이화학적 변화와 유사하리라 사료됨.

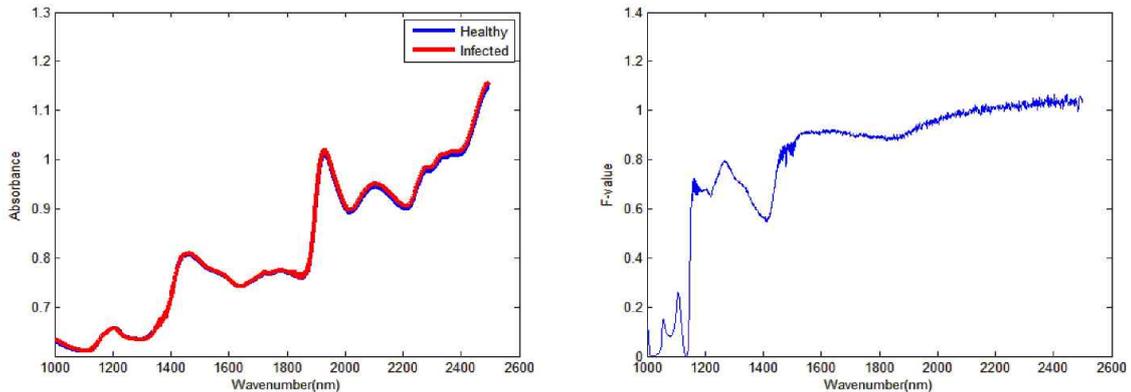


그림 2-8. 세균 감염 수박종자 및 건전종자 평균 스펙트럼(a), ANOVA 분석 결과(b)

3. 다변량 통계모델을 이용한 이병종자 판별 모델 개발

- FT-NIR Spectroscopy과 SWIR 초분광 영상시스템을 이용하여 획득한 이병종자와 건전종자의 분광정보는 이병종자의 판별 모델 개발을 위해 사용됨. 모델 개발은 정량분석(감염농도)모델 개발과 정성분석(감염여부)모델 개발로 구분하여 실시함.
- 분광정보는 측정당시의 광원의 세기, 각도, 측정센서의 감도, 주변온도 등의 다양한 요인에 의해 동일한 시료의 반복 측정에도 스펙트럼의 차이가 발생함. 따라서 이러한 기기조건 및 외부환경에 의해 변화된 데이터의 수치적 보정과정이 요구되는데, 이를 전처리방법이라 부름. 전처리 방법에는 일반적으로 smoothing, 정규화 방법(normalization), MSC (multiplicative scattering correction), SNV (standard normal variate), Savitzky-Golay법 등이 있음. 본 실험에서는 최적 모델 개발을 위해 총 8가지의 전처리 방법을 사용하였고, 원본데이터와 비교분석.

가. Multiplicative Scatter Correction (MSC)

- MSC 방법은 고체 시료를 측정할 때 주로 사용함. 고체시료는 특히 빛의 산란(Scattering)으로 스펙트럼에 많은 변화가 일어나는데 산란정도는 파장에 따라 다르며, 파장이 길수록 크게 영향을 받음. 산란현상은 파장에 따라 일정하지 않아 바탕선의 이동, 기울기 변화, 그리고 심할 경우 곡선 형태의 바탕선도 발생함. MSC는 데이터세트의 평균 스펙트럼을 계산한 후 이를 이용하여 보정함. 데이터세트 내 각 스펙트럼의 파장별 흡광도와 평균 스펙트럼 흡광도와와의 상관관계를 구하기 위해 회귀분석을 이용하여 기울기와 절편을 구함. 데이터세트 내 각각의 스펙트럼에 구해진 기울기를 빼주고 절편을 나누어 주어 스펙트럼을 보정하게 됨. MSC방법은 스펙트럼 변화와 농도간에 선형관계가 존재할 때만 사용하여야 하고, 시료들이 화학적으로 유사할 경우 좋은 결과를 얻을 수 있음.

(1) SNV (Standard Normal Variate)

- SNV는 MSC와 같이 광산란 보정을 위한 전처리 방법으로 수학적 모형의 차이가 있음. 각 스펙트럼을 전체 스펙트럼의 표준편차로 정규화하여 광산란의 영향을 제거하는 방법으로, 광 경로 및 광원의 변동의 영향을 보정할 수 있음.

(2) 미분법

- 스펙트럼을 미분하게 되면 스펙트럼의 변화는 증폭되고 동시에 변화되는 부분만 고려가 되기 때문에 바탕선이 상하로 움직여도 큰 문제가 없음. 결국 바탕선의 변화를 미분을 통하여 제거할 수 있음. 하지만 잡음이 많은 스펙트럼에 미분법을 사용할 경우 잡음을 증폭시켜 정량성에 나쁜 영향을 줄 수 있음.

나. 모델 개발 방법(Calibration Method)

- 근적외선에서의 흡수는 결합대와 배음대에서 발생되므로 띠나비가 증가되어, 흡수대 끼리 심하게 중첩됨. 따라서 기존의 흡수대 면적이나 흡광도를 이용하는 단순한 회귀 분석으로는, 단순한 화학조성일 경우를 제외하고는 검량이 불가능함. 결국, 검량을 위한 모델 개발을 위해서는 다변량(Multivariate) 회귀분석법을 이용해야 함. 다변량 회귀분석은 여러 변수(다양한 파장)를 이용하여, 스펙트럼과 조성·물성간의 상호관계를 만들어 주는 방법으로 검량 방법에는 MLR(Multiple Linear Regression), PCR(Principal Component Regression), 그리고 PLS(Partial Least Squares) 방법이 널리 활용되나, 그 중 흡수들의 중첩으로 스펙트럼이 복잡하고 분석이 어려운 경우 널리 사용되는 PLS 방법이 모델 개발에 사용되었음.

(1) PLS (Partial Least Squares)

- PLS 방법은 입출력 변수값들을 그대로 사용하는 MLR과는 달리 새로운 잠재 변수(latent variable)들을 찾아내 회귀에 사용하는 비교적 새로운 다변량 통계분석법. PLS 회귀분석을 통해 생성된 잠재변수들은 서로 선형적으로 독립이며 입력 잠재 변수와 출력 잠재 변수 사이에는 매우 높은 상관관계를 갖게 되며 입력 변수 중에 분산(variance) 값이 큰 순서대로 잠재변수로 채택됨. PLS에 관련된 이론을 정리하면 다음과 같음.
- 입력 변수 데이터 블록(X)은 score vector $t_h(h=1, \dots, a)$ 와 load vector $p_h(h=1, \dots, a)$ 의 곱으로 나타내어지고, 출력 변수 데이터 블록(Y)은 score vector $u_h(h=1, \dots, a)$ 와 load vector $q_h(h=1, \dots, a)$ 의 곱으로 표시된다.

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

$$Y = \sum_{h=1}^a u_h q_h^T + F \quad (2)$$

$$u_h = \sum_{h=1}^a b_h t_h + r_h \quad (3)$$

- 위 식에서 a 는 채택될 잠재변수의 개수를 나타내며, b_h 는 입력 변수의 scores vector $t_h (h=1, \dots, a)$ 간의 회귀계수임. 행렬 Y 의 한 열을 선택하여 u_1 의 초기값으로 놓은 후, 다음 식들을 수행함.

$$w_1 = \frac{X^T u_1}{\|X^T u_1\|} \quad (4)$$

$$t_1 = X w_1 \quad (5)$$

$$q_1 = \frac{Y^T t_1}{\|Y^T t_1\|} \quad (6)$$

$$u_1 = Y q_1 \quad (7)$$

- 식 (7)에서 계산된 u_1 값이 일정 오차범위 내에 수렴하면 다음 식들을 수행하고, 그렇지 않으면 식 (4)로 되돌아감.

$$p = \frac{X^T t_1}{t_1^T t_1} \quad (8)$$

$$p_1 = \frac{p}{\|p\|} \quad (9)$$

$$t_1 = t_1 \|p\| \quad (10)$$

- 위와 같이 t_1 과 u_1 이 구해지면 다음 식으로 두 score vector간의 회귀계수를 구함.

$$b_1 = \frac{u_1^T t_1}{t_1^T t_1} \quad (11)$$

- 첫 번째 잠재변수가 결정되면 다음 식으로 데이터 블록 X 와 Y 의 오차행렬 E 와 F 를 구함.

$$E_1 = X - t_1 p_1^T \quad (12)$$

$$F_1 = Y - b_1 t_1 q_1^T \quad (13)$$

- 또 다른 잠재변수가 필요한 경우에는 행렬 X 와 Y 를 각각 E_1 와 F_1 으로 바꾸어서 위 알고리즘을 다시 수행함. 이때 아래 첨자는 1씩 증가함. PLS 모델에 사용되는 잠재변수의 개수 a 는 일반적으로 독립변수의 개수보다는 적으며 보통 cross-validation 방법으로 결정됨. 잠재변수의 개수가 독립변수의 개수와 같아질수록 오차행렬 E 와 F 는 점점 0에 가까운 값을 갖게 됨. 식 (1), (13)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 데이터 블록 Y 의 예측값을 계산하려면, 먼저 식 (1) ($E \cong 0$)를 만족하는 t_h ($h = 1, \dots, a$)를 다음 식으로 구함.

$$t_h = \frac{X p_h}{p_h^T p_h} \quad (h = 1, \dots, a) \quad (14)$$

- t_h ($h = 1, \dots, a$)가 계산되어지면 b_h ($h = 1, \dots, a$)와 식 (3) ($r_h \cong 0$)을 이용하여 u_h ($h = 1, \dots, a$)를 구한 후, 최종적으로 q_h ($h = 1, \dots, a$)와 식 (1)을 이용하여 Y 의 예측값을 구함.
- 스펙트럼 전체를 MLR 알고리즘에 적용하면 회귀 모델을 만들기 위해 사용된 학습 데이터에 대해서는 뛰어난 회귀 성능을 보이지만, 학습에 사용되지 않은 새로운 데이터에 대해서는 좋은 예측 결과를 보여주지는 못함. 이는 너무 많은 입력 변수들에 대해서 모델이 과적합(over-fitting)되었기 때문임. PLS 방법은 출력 변수값에 큰 영향을 미치는 몇몇 잠재변수들만을 이용하는 다변량 통계 분석법으로서 MLR 보다 학습 데이터에 대한 회귀성능은 떨어질 가능성은 있지만 새로운 데이터에 대해서는 뛰어난 예측 성능을 나타냄.

(2) PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis)

- PLS-DA는 종속변수로 연속적인 값이 아닌 판별하고자 하는 그룹들을 가상 변수로 설정하여 이를 판별하기 위해 적용되는 회귀분석법임. 본 연구에서는 이병종자와 건전종자를 판별하기 위해 임의변수로 1과 0을 각각 적용하여 모델을 개발. 모델 개발에 사용한 데이터 수는 DB에 저장된 각 종자별 총 개수에서 75%를 사용하였고, 나머지 25%는 개발된 모델의 검증에 사용.
- 모든 데이터 분석은 MATLAB(version 7.0.4, The Mathworks, Natick, MA, USA) 프로그램을 이용하여 수행.

다. 감염농도별 최적 모델 개발 결과

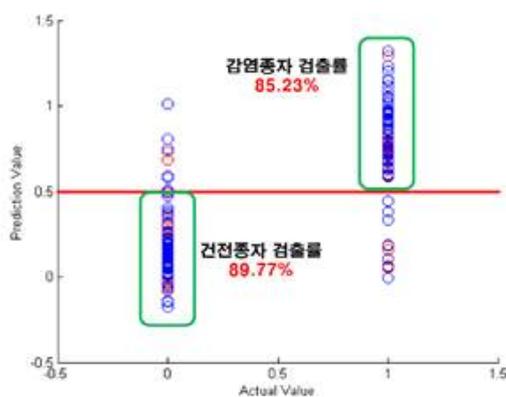
- FT-NIR 분광정보를 이용한 감염농도 예측 모델 결과
- 4종류의 바이러스 감염종자와 1종류의 세균 감염종자에 대한 농도별 모델 예측 결과는 표 2-3과 같음. 개발된 총 5종류의 모델의 R_c^2 값은 수박종자를 제외한 모든 값이 0.1이하의 상당히 낮은 결정계수 값을 나타내었음. R_p^2 값 역시 0.21 이하의 값을 나타냄. 이는 최적모델개발을 위한 기본조건인 데이터의 수가 적었고, 또한 종자 내 바이러스 분포의 편차가 커서 정확한 감염농도 예측 모델을 개발하기가 어려웠을 것으로 판단됨.

라. 감염여부 판별 모델 개발 결과

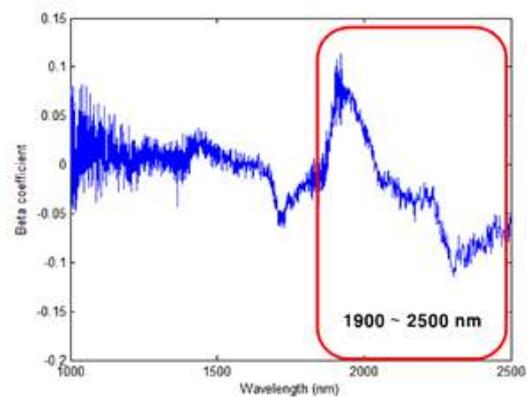
- FT-NIR 분광정보를 이용한 예측 모델 결과
- 바이러스의 감염여부를 판별할 수 있는 모델 개발은 바이러스의 감염농도에는 관계 없이 종속변수를 감염된 종자는 '1', 건전종자는 '0'으로 설정하여 모델을 개발. 세균의 감염여부는 1000마리 이상이 검출된 시료를 감염된 것으로 하였고, 감염여부 판별 모델의 정확도 향상을 위해 총 8가지의 전처리 방법이 적용. 최적 모델 선정은 가장 낮은 SEP값을 갖고, calibration과 prediction 의 R^2 값의 편차가 적은 모델을 선정. 표 2-3은 종자별 감염여부를 가장 잘 판별할 수 있도록 개발된 최적 모델 결과임.
- AltMV 바이러스에 감염된 담배종자의 최적 PLS-DA 모델은 Range-normalization의 전처리가 이용되었을 때 가장 높은 정확도를 나타냄. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 89.39%, 이병종자는 86.39%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 87.88%의 분류 정확도를 나타냄.
- 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 90.91% 그리고 이병종자는 81.82%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 86.36%의 분류 정확도를 나타내었다 (그림 2-9(a)). 그림 2-9(b)는 AltMv 바이러스 감염 담배종자와 건전 담배종자를 판별할 수 있는 최적의 PLS-DA 모델의 파장별 가중치를 나타낸 것으로 감염종자와 건전종자의 주된 스펙트럼의 차이가 나타나는 영역은 1900 nm ~ 2500 nm으로 분산분석(ANOVA) 결과와 유사함. 이 영역의 1940 nm는 O-H 작용기, 2,310 nm는 CH_2 구조의 C-H stretch + C-H deformation 진동모드에 의한 영향으로 보이며, 감염종자와 건전종자간의 화학성분 차이가 존재하는 것으로 판단됨.

표 2-3. FT-NIR 스펙트럼을 이용한 종자별 감염여부 최적 판별 모델 결과

Sample	Pre-processing	Data Divide	Class	Correct	Incorrect	Accuracy
Tobacco -AltMV-	Range normalization	Calibration	Healthy	59	7	89.39
			Infected	57	9	86.36
			Total	116	16	87.88
		Prediction	Healthy	20	2	90.91
			Infected	18	4	81.82
			Total	38	6	86.36
Tobacco -CGMMV-	Savitzky_ golay_2nd	Calibration	Healthy	16	0	100
			Infected	18	0	100
			Total	34	0	100
		Prediction	Healthy	5	1	83.33
			Infected	4	2	66.67
			Total	9	3	75
Watermelon -CGMMV-	SNV	Calibration	Healthy	21	2	91.30
			Infected	24	1	96
			Total	45	3	93.75
		Prediction	Healthy	8	0	100
			Infected	6	2	75
			Total	14	2	87.5
Pepper -TRV-	Mean_ normalization	Calibration	Healthy	14	0	100
			Infected	14	0	100
			Total	28	0	100
		Prediction	Healthy	4	1	80
			Infected	4	1	80
			Total	8	2	80
Watermelon -Acidovora x citrulli-	Mean_ normalization	Calibration	Healthy	16	3	84.21
			Infected	14	7	66.67
			Total	30	10	75
		Prediction	Healthy	6	1	85.71
			Infected	4	3	57.14
			Total	10	4	71.43



(a)



(b)

그림 2-9. (a) FT-NIR 스펙트럼을 이용한 AltMv 감염 담배종자 감염 여부 판별, (b) 판별 모델의 파장별 가중치(beta coefficient)

- 표 2-4에서는 AltMV, CGMMV, TRV 및 *Acidovorax citrulli* 바이러스에 이병된 담배 (AltMV, CGMMV), 고추(TRV), 및 수박 (*Acidovorax citrulli*) 종자를 SWIR초분광 영상 장치를 이용하여 판별한 결과를 최적 전처리방법과 함께 나타냄. CGMMV 바이러스에 감염된 담배종자와 TRV 바이러스에 감염된 고추종자의 calibration 결과는 100%로 확인됨. 또한, 모델 검증 결과도 75%와 80%로 나타나 높은 분류 정확도를 나타냄.
- CGMMV에 감염된 수박종자와 TRV에 감염된 고추종자의 calibration 분류 결과가 93.75%와 100%로 각각 나타남. 또한, 모델 검증 결과도 87.5%와 80%로 calibration 결과와 큰 차이를 보이지 않음. 그림 2-9(b)는 CGMMV에 감염된 수박종자와 건전종자의 판별 모델의 파장별 가중치를 나타냄. 2100nm ~ 2400nm 의 영역에서의 가중치가 다른 영역에 비교하여 상대적으로 높음. 이 영역은 starch, protein의 구조에서 O-H, N-H, C-C, C-O 진동모드에 의한 영향으로 사료됨.

표 2-4. SWIR 스펙트럼을 이용한 종자별 감염여부 최적 판별 모델 결과

Sample	Pre-processing	Data Divide	Class	Correct	Incorrect	Accuracy
Tobacco -AltMv-	SNV	Calibration	Healthy	65	2	97.01
			Infected	67	1	98.53
			Total	132	3	97.78
		Prediction	Healthy	19	3	86.36
			Infected	22	1	95.65
			Total	41	4	91.11
Tobacco -CGMMV-	Savitzky_ golay_1st	Calibration	Healthy	13	3	81.25
			Infected	7	11	38.89
			Total	20	14	58.82
		Prediction	Healthy	5	1	83.33
			Infected	4	2	66.67
			Total	9	3	75
Watermelon -CGMMV-	Maximum_ normalizati on	Calibration	Healthy	25	7	78.13
			Infected	27	7	79.41
			Total	52	14	78.79
		Prediction	Healthy	10	1	90.91
			Infected	8	3	72.73
			Total	18	4	81.82
Pepper -TRV-	Savitzky_ golay_1st	Calibration	Healthy	9	7	56.25
			Infected	12	4	75
			Total	21	11	65.63
		Prediction	Healthy	2	4	33.33
			Infected	4	2	66.67
			Total	6	6	50
Watermelon -Acidovora x citrulli-	Range_ normalizati on	Calibration	Healthy	15	4	78.95
			Infected	18	3	85.71
			Total	33	7	82.5
		Prediction	Healthy	6	1	85.71
			Infected	4	3	57.14
			Total	10	4	71.43

마. SWIR 영상정보를 이용한 예측 모델 결과

- 그림 2-10(a)는 AltMV 감염 담배종자와 건전 담배종자를 판별할 수 있는 최적의 PLS-DA 모델을 SNV 전처리를 이용하여 개발한 결과를 나타냄. 고추종자의 검증 판별 정확도가 50%인 것을 제외한 나머지 종자의 검증 판별은 71.43% 이상으로 나타남. 특히, AltMV 감염 담배종자의 분류 정확도는 FT-NIR의 정확도보다 높은 91.11%를 나타내었고, SNV 전처리가 이용되었을 때 가장 높은 분류 정확도를 나타내었으며 그 결과는 Calibration 97.78%, Validation 91.11% 임.
- 그림 2-10(b)는 AltMV 감염 담배종자와 건전 담배종자를 판별할 수 있는 최적의 PLS-DA 모델의 파장별 가중치를 나타냄. 감염종자와 건전종자의 주된 차이가 나타나는 영역은 1600 nm ~ 1700 nm으로 CH₃구조의 C-H 결합에 의한 결과로 판단됨.

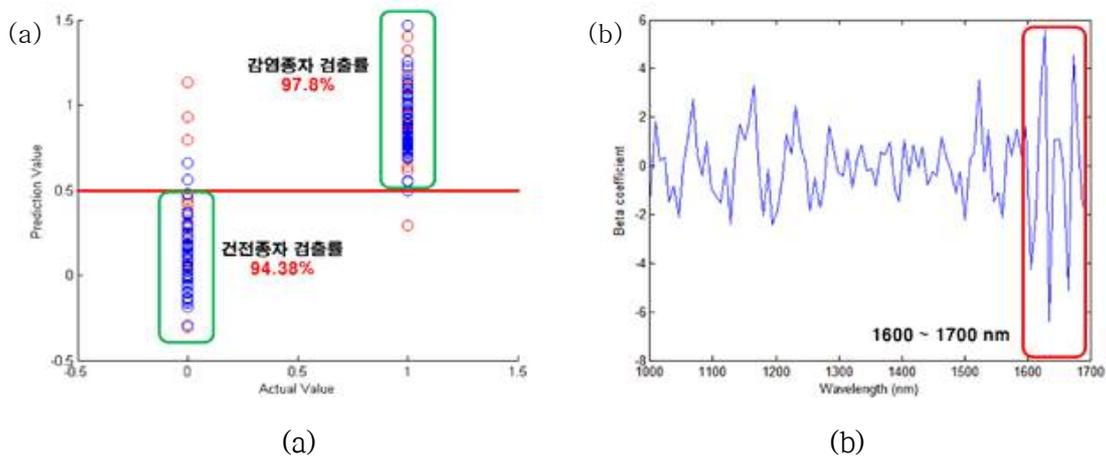


그림 2-10. SWIR 영상정보를 SNV전처리 이용한 (a) AltMV 감염 담배종자 감염 여부 판별, (b) 판별 모델의 파장별 가중치(beta coefficient)

- 그림 2-11(a)는 SWIR초분광영상 데이터를 이용하여 PLS-DA와 Maximum normalization 전처리를 이용하여 CGMMV에 감염된 수박종자와 건전종자의 판별한 결과를 나타냄.

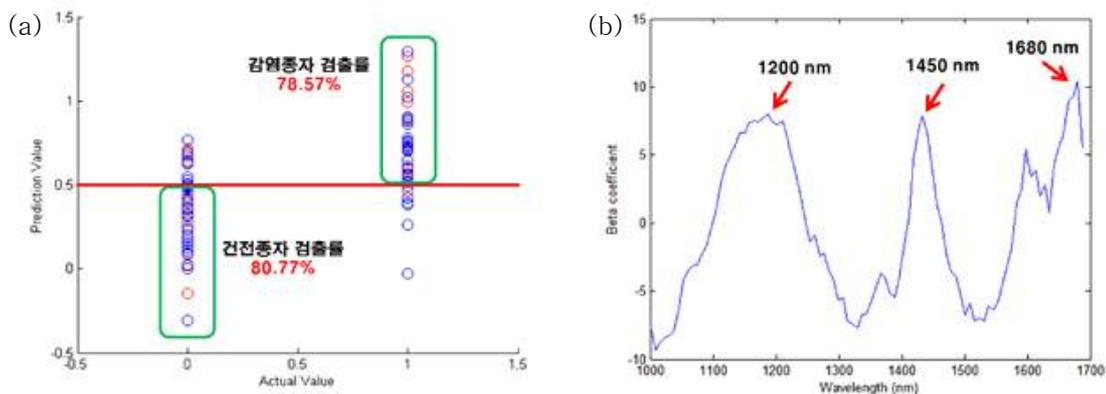


그림 2-11. SWIR 영상정보를 Maximum normalization 전처리 적용하여 (a) CGMMV 감염 수박종자 감염 여부 판별, (b) 판별 모델의 파장별 가중치(beta coefficient)

- CGMMV에 감염된 담배종자의 calibration 결과는 58.82%로 나타남. 건전 종자의 판별은 81.25%로 높았지만, 감염종자의 검출 정확도가 38.89%로 낮아, 총 calibration 분류 정확도가 58.82%를 나타냄.
- CGMMV에 감염된 수박종자의 최적 모델은 Maximum normalization 전처리가 적용됨. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 78.13%, 이병종자는 79.41%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 78.79%의 분류 정확도를 나타내었음. 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 90.91% 그리고 이병종자는 72.73%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 81.82%의 분류 정확도를 나타내었음.
- 그림 2-11(b)는 CGMMV에 감염된 수박종자와 건전종자의 판별 모델의 파장별 가중치를 나타낸 그림임. 1200nm, 1450nm, 1690nm의 영역에서의 가중치가 다른 영역에 비교하여 상대적으로 높았음. 이 영역은 지방의 CH₃ 구조의 C-H stretch 진동모드의 1,2차 배음대, 수분의 O-H 진동모드에 의한 영향으로 판단됨.
- 그림 2-12(a)에서는 SWIR초분광영상 데이터를 이용하여 PLS-DA와 Range normalization 전처리를 이용하여 *Acidovorax citrulli* 균에 감염된 수박종자의 검출결과를 나타냄. 그림에서 PLS-DA를 이용한 이병된 종자의 판별율은 77.78%, 건전종자의 검출률은 81.4%로 확인. 바이러스에 감염된 수박 종자의 판별 정확도와 유사한 결과를 줌.

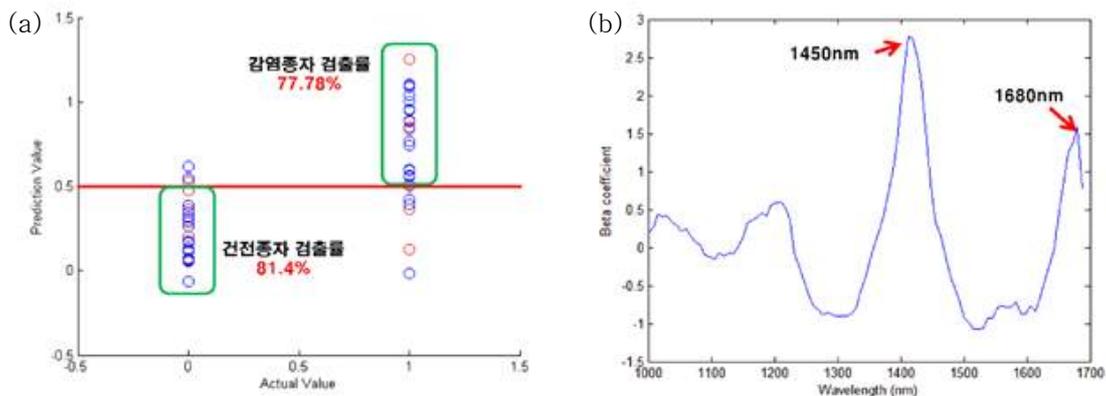


그림 2-12. (a) SWIR 영상정보를 이용한 *Acidovorax citrulli* 감염 수박종자 감염 여부 판별, (b) 판별 모델의 파장별 가중치(beta coefficient)

- 그림 2-12(b)에서는 1450 nm와 1680 nm 영역에서 주된 피크를 확인할 수 있었음. 이 영역은 바이러스에 감염된 종자를 검출하기 위해 개발되었던 모델의 가중치와 유사한 결과를 보여줌. 1450nm에서 가장 큰 가중치를 나타내었고, 이는 종자를 구성하는 다양한 물질의 O-H 작용기에 의한 영향으로 판단됨.
- 따라서, 본 실험을 통해 얻은 결과는 고추종자를 제외한 3종류의 바이러스 감염종자와 1종류 세균감염종자는 SWIR 영상을 이용하였을 때 건전종자로부터 감염종자의 판별이 최소 71.43% 이상으로 가능함을 확인할 수 있었음.

바. 감염농도별 최적 모델 개발 결과

(1) FT-NIR 분광정보를 이용한 감염농도 예측 모델 결과

- 표 2-5에서는 4종류의 바이러스 감염종자와 1종류의 세균 감염종자에 대한 농도별 모델 예측 결과를 나타냄. 개발된 총 5종류의 모델의 R_c^2 (calibration accuracy) 값은 수박종자를 제외한 모든 값이 0.1이하의 결정계수 값을 나타냄. R_p^2 (prediction accuracy) 값 역시 0.21 이하의 값을 나타냄. 이는 최적모델개발을 위한 기본조건인 데이터의 수가 적었고, 또한 종자 내 바이러스 분포의 편차가 커서 정확한 감염농도 예측 모델을 개발하기가 용이하지 않은 것으로 판단됨.

표 2-5. FT-NIR 스펙트럼을 이용한 감염농도 모델 개발 결과

감염종류	종자	Calibration		Prediction		
		R_c^2	SEC (%)	R_p^2	SEP (%)	
바이러스	담배	AltMV	0.0056	65299	0.0298	67712
		CGMMV	0.0293	30.3	0.2133	20.4
	수박	0.795	19678	0.0023	48744	
	고추	0.0204	1317	0.081	1392	
세균	수박	0.0021	152.36	0.0107	169.22	

(2) SWIR 분광정보를 이용한 예측 모델 결과

- 표 2-6에는 4종류의 바이러스 감염종자와 1종류의 세균 감염종자에 대한 농도별 모델 예측 결과를 나타냄. SWIR 초분광분석법을 이용하여 바이러스 감염된 고추의 판별 결과는 $R_c^2=0.42$, $R_p^2=0.02$ 를 나타내었으며, CGMMV에 감염된 담배 종자의 판별 결과의 경우 $R_p^2=0.05$ 로 가장 좋은 결과를 나타냄. 이 때 SEP=14%를 나타내었음.

표 2-6. SWIR 스펙트럼을 이용한 감염농도 모델 개발 결과

감염종류	종자	Calibration		Prediction		
		R_c^2	SEC (%)	R_p^2	SEP (%)	
바이러스	담배	AltMV	0.0033	206190	0.0366	113590
		CGMMV	0.0765	30	0.0538	14
	수박	0.0594	42155	0.0012	33789	
	고추	0.4243	224	0.0209	334	
세균	수박	0.0018	253	0.03	204	

4. 라만 초분광 영상시스템 구축

가. 라만 초분광 영상 시스템 프로토타입 구축

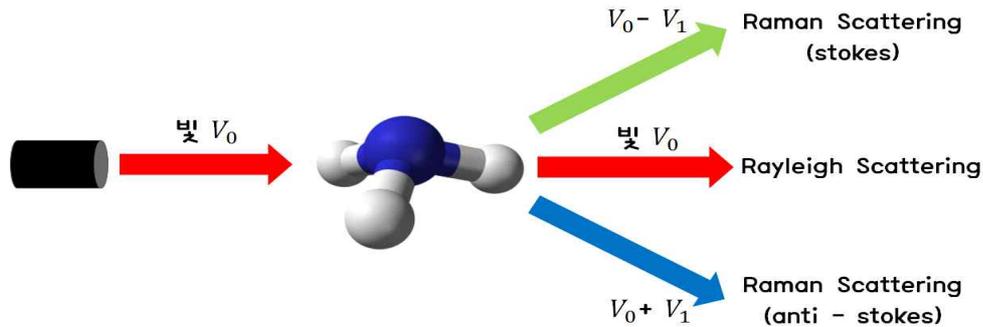


그림 2-13. 레일리 산란(Rayleigh scattering)과 라만 산란(Raman scattering).

V_0 , 입사광의 진동수; V_1 , 분자의 진동수.

- 라만분광법(Raman spectroscopy)은 인도의 과학자 C. V. Raman이 발견한 분광법으로 빛이 분자와 충돌 후 산란되는 다양한 모습을 그림 2-13에 나타냄. 단일 진동수의 입사광을 물질에 조사하면 입사광과는 다른 에너지를 갖는 산란광이 관측되며 이때의 에너지 차는 그 물질의 특성에 의해 결정되는 라만산란현상을 이용한 분광법.
- 분자 및 결정의 진동과 그 구조에 관한 정보를 제공해주는 분석수단으로 널리 사용되고 있으며, 의약, 생물학, 환경과학, 지질학, 광물학, 고고학, 농업분야 등에 광범위하기 응용되고 있음.
- 초분광 영상시스템의 경우 기존의 분광분석장비와 카메라를 결합한 장비로서 기존의 분광분석 장비가 대상물의 국지적인 부분만의 측정이 가능했다면, 카메라를 결합한 초분광 영상시스템의 경우 대상물의 전체적인 영역의 측정이 가능함. 이는 대량의 샘플을 신속하게 측정할 수 있다는 장점이 있음.
- 초분광 영상은 각 파장별 연속적으로 획득된 영상을 말하며 렌즈에 투사된 영상은 slit을 통과 하면서 1차원 정보가 되고 imaging spectrograph에 의해 각 파장별로 분광이 생성되며 1차원 정보가 분광정보를 포함한 2차원 정보로 변환됨. 이러한 영상들은 3D hypercube라는 대용량 정보를 구성하게 되며 2차원의 영상 정보와 각 픽셀 별 스펙트럼 정보를 동시에 가지게 됨. 기존의 분광기술이 대상물 전체의 분광정보를 제공하는 것과는 달리 대상물 세부 공간 영역에 대한 미세 영역별 분광정보를 제공하므로 대상물의 공간영역별 물리, 화학적 분석이 가능함.
- 라만 초분광 영상 시스템은 본연구팀이 국내에서 최초로 구축한 장비임. 이는 기존의 라만 분광분석 장비와 카메라를 융합시킨 신기술로써, 분광과 영상의 융합을 통해 대상물 세부 공간 영역에 대한 미세 영역별 분광정보를 제공함. 이에 기존의 분광장비가 제공하는 point by point 방식의 한계를 벗어나 많은 샘플을 신속하게 측정할 수 있다는 장점이 있음.

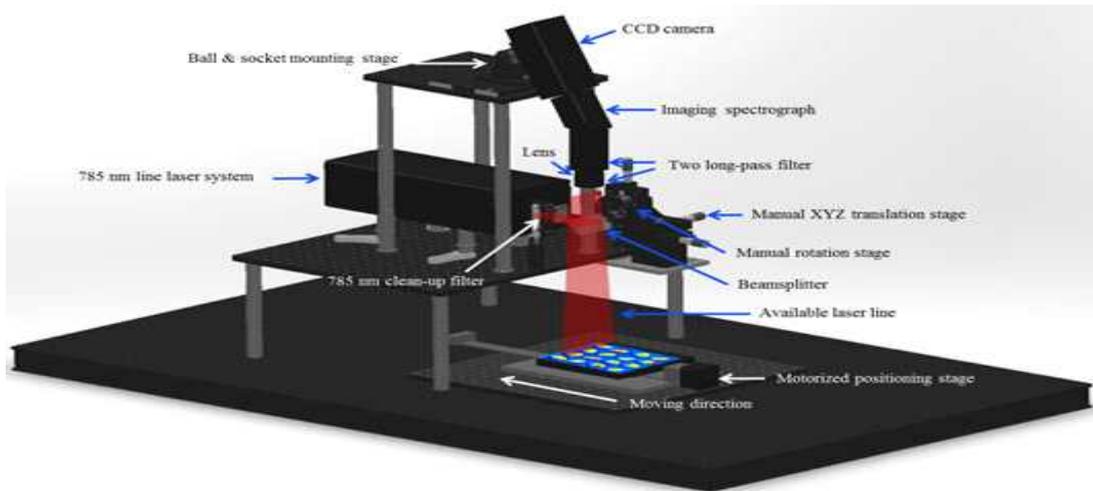


그림 2-14. 라만 초분광 영상 시스템의 전체 계략도 및 주요 부품 구성도

- 그림 2-14은 라만 초분광 영상 시스템의 전체 계략도 및 주요 부품 구성도를 나타낸 것으로 CCD Camera, Spectrograph, Laser module, beam splitter 및 Moving stage로 구성되어 있음.
- 광자가 여자되며 Scattering되는 라만신호의 경우 매우 작기(약 1천만분의 1) 때문에 고성능의 CCD카메라가 필요함. 이에 고성능의 The Andor's iKon-M 934 series camera (iKon-M 934, Andor Technology, South Windsor, Conn.)가 라만신호의 수집을 위해 사용됨, CCD의 경우 dark noise의 최소화를 위해 -65°C 로 설정되었으며, 800 nm영역에서 1024×1024 pixel array로 90% 이상의 spectral response를 나타내었음.
- 카메라 센서의 dynamic range의 경우 16 bit로 작동되며, Ball-type regulator을 이용하여 카메라를 고정. Raman imaging spectrograph (ImSpector R10E, Specim, Oulu, Finland)는 카메라에 부착되어 라만신호를 획득하며, 카메라에 부착된 C-mount lens (Schneider Optics, XENOPLAN 1.4/23 mm compact lens, Hauppauge, NY, USA)를 통해 대상물과의 포커스를 조정. 렌즈와 spectrograph사이에 장착된 785 nm long-pass filters (Semrock, LP02-785RE-25, NY, USA)를 통해 샘플에서 발생하는 노이즈를 제거.

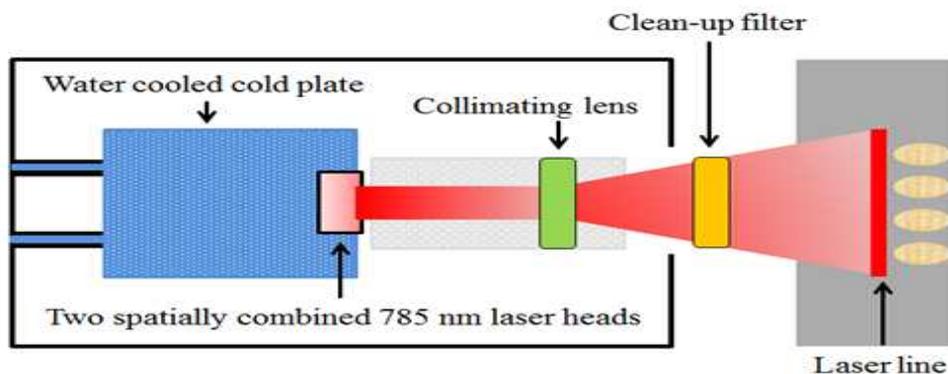


그림 2-15. 라만 초분광 영상 시스템에 사용된 레이저 시스템

- 고출력의 레이저 시스템도 라만신호의 획득에 필요한 중요한 요소. 본 연구에서는 spin-exchange optical-pumping laser system이 사용되었으며 그 원리는 그림 2-15와 같음. 이 시스템은 water-cooled cold plate위에 설치된 두 개의 785 nm laser head와 laser-diode power supply, system chiller, collimating lens, 그리고 clean-up filter로 구성되어 있음.
- 두 개의 Laser head에 의해 발생되어 합쳐진 레이저는 collimating lens를 통과하여 결과적으로 레이저에 의한 라인들이 형성됨. 785 nm laser clean-up filter (Semrock, LL01-785-25, NY, USA)는 collimating lens의 앞에 세팅하여, signal to noise비를 향상시키는 역할을 함.

나. 라만 초분광 영상 및 이송장치 인터페이스 개발

- 그림 2-16은 라만 초분광 시스템의 구동 및 이미지 획득을 위한 소프트웨어의 화면. 구동 소프트웨어의 경우 MATLAB (version 7.14, Mathworks, Natick, MA, USA)을 이용하여 제작되었으며, 최적의 라만 초분광 영상을 획득하기 위해 카메라(cooling temperature, exposure time, pre-amplifier gain and accumulation)와 스텝 모터(size of step, number of scan)의 구동이 가능함.

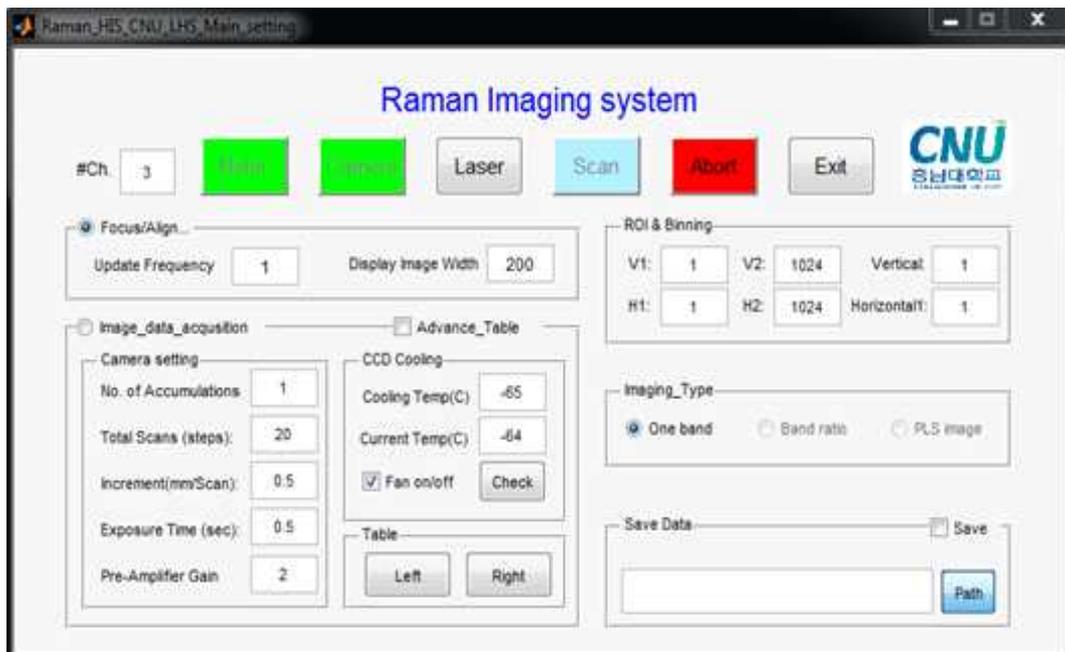


그림 2-16. 라만 초분광 이미지 획득 및 시스템 구동을 위한 소프트웨어

다. 라만 분광신호 재현성 확인 및 광원 등 시스템 파라미터 최적화

- 라만 초분광 시스템의 파라미터의 최적화를 위해 라만 스펙트럼의 calibration을 실시. 라만 스펙트럼의 calibration을 위해 널리 알려진 물질인 나프탈렌과 아세트아미노펜 그리고 폴리스타이렌을 이용함. 이 물질들을 라만 초분광 이미징 시스템을 이용하여 스캔을 실시한 뒤에, 초분광 영상 데이터의 100여개의 픽셀의 평균값을 구한 뒤, 15개의 라만 피크를 선택하여 standard wavenumber의 raman shift 스펙트럼값과 비교.
- 스펙트럼은 2차 함수를 이용한 회귀분석을 이용하여 분석을 실시하였으며, regression coefficient의 경우 0.9999값으로 결정되었음. residual errors의 경우 2차식의 경우 0.12 cm^{-1} 보다 작은 것으로 추정되었음. Raman shift의 경우 $-724.4 \text{ cm}^{-1} - 2879.3 \text{ cm}^{-1}$ (742.8 nm - 1014.2 nm) 영역에서 2차 회귀 모델을 이용하여 계산하였으며 평균 구간 값의 경우 3.52 cm^{-1} (0.19 nm)이었음.
- 라만 레이저의 출력의 높을 경우 종자가 손상을 입을 가능성이 있기 때문에 기존의 레이저의 높은 고출력을 낮추고자 Beam attenuator를 설치하였음. 이는 기존의 라만 레이저 시스템이 종자에 끼치는 영향을 보완한 최적화 작업으로, 레이저 시스템 본체의 출력을 높여 안정성을 높이고, 샘플의 손상을 입지 않도록 Attenuator를 통해 발생된 레이저를 분산시켜 출력을 낮춤으로써, 광원을 최적화했음. 이를 통해 샘플의 손상을 최소화하면서 신호 대 잡음비(Signal to Noise)가 높은, 안정적인 raman scattering 신호의 획득이 가능함.

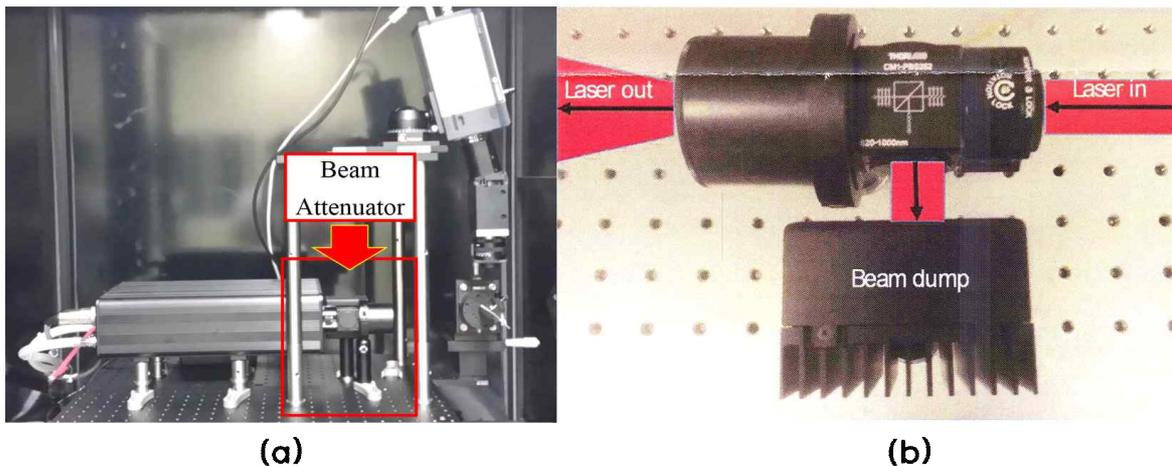


그림 2-17. 라만 초분광 영상 시스템에 장착된 beam attenuator.

(a), beam attenuator가 장착된 모습; (b), beam attenuator의 실제 모습.

- Beam attenuator가 장착된 라만 레이저 시스템을 이용하여 수박종자에 어떤 영향을 미치는지 사전연구를 실시하였음. 레이저가 수박종자의 발아력과, 바이러스의 감염율에 영향을 끼치는지를 알아보기 위해 무작위로 수박 감염종자 192 립을 선택하여 96립은 라만 초분광 영상 시스템을 이용하여 측정하고, 나머지 96 립은 측정하지 않은 두 그룹을 비교함.

- 측정 시 레이저의 출력은 45 A로 설정하였으며, exposure time의 경우 0.3 second로 400 step을 측정하였음. 측정결과 발아율은 라만 레이저 노출그룹의 경우 71.9% (69/96 립)를 나타내었으며 비노출 그룹은 73.9% (71/96 립)으로 비슷한 차이를 보였음.
- 감염율의 경우 라만 레이저 노출그룹의 경우 77.1% (74/96 립)를 나타내었으며 비노출 그룹은 79.1% (76/96 립)으로 비슷한 차이를 보였음. 위 실험을 통해 라만 레이저가 발아율과 감염율에 거의 영향을 끼치지 않는 것으로 확인함.

5. 이병종자 분광정보 DB화 및 스펙트럼 분석

- 최적의 이병종자 검출 모델을 개발하기 위해서는 바이러스에 감염된 종자와 동시에 분광장비별로 획득된 신호의 DB화가 필요함. 총 2종류의 바이러스 감염 종자를 측정하였으며, 당해연도에 획득한 분광정보는 표 2-7과 같음.

가. 시료

- 표 2-7에는 본 연구에 사용된 시료의 구성 및 측정 분광방식을 나타냄. 사용된 종자는 수박, 참외 종자를 사용하였고, 감염 바이러스는 CGMMV를 공통적으로 사용함. 바이러스 이병종자는 제1세부 연구기관으로부터 획득함. 당해년도 연구에서는 총 1,115개의 종자에 대한 분광데이터를 획득하였고, 그 중 32%인 364립 종자는 정상, 33%인 367개의 시료는 감염종자로 판정되었음을 제1세부 연구기관에서 확인함. 비발아 종자는 156립, 기타 22립으로 확인됨. 이 결과는 각 종자별 이병종자 판별 모델 개발에 활용됨.

표 2-7. 당해연도 실험에서 획득한 감염 종자의 분광데이터 현황 (제1세부과제로부터 공급받은 종자)

측정기기	종자	감염 종류 (바이러스)	측정 갯수	감염 시료	건전 시료	비발아 시료	비고
* Raman Spectroscopy & Raman 초분광 시스템	수박	Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	214	55	99	60	
	참외	Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	200	84	106		10
단파적외선 초분광 시스템 (SWIR)	수박	Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	405	152	157	96	
	참외	Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	200	59	137	0	4
Raman 초분광 시스템	수박	Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	96	14	74		8
총계			1,115	364	573	156	22

*동일 종자에 대해 두 가지 측정방법(Raman Spectroscopy, Raman 초분광시스템) 적용

나. 측정기기

(1) 단파적외선(short wave infrared :SWIR) 초분광 영상 시스템

- SWIR 초분광 영상 시스템은 Raman 초분광 영상 시스템과 마찬가지로 분광분석 장비와 카메라를 융합시킨 신기술로써, 분광과 영상의 융합을 통해 대상물 세부 공간 영역에 대한 미세 영역별 분광정보를 제공함
- 초분광 단파적외선 영상 시스템은 그림 2-18과 같으며, 단파적외선 영역(1000 ~ 2500 nm)을 사용하며 MCT(Mercury cadmium telluride sensor)센서(Xeva-2.5-320, Xenics, Belgium)와 Image spectrograph 탑재된 카메라(SWIR, Headwall photonics, Fitchburg, MA, USA), 초점 조절이 가능한 C-Mount 렌즈가 구비된 Imaging Spectrograph와 스텝 모터로 구동되는 시료 이송부, 광량 조절이 가능한 텅스텐-할로겐 선광원으로 구성되었음
- 초분광 영상 획득은 제작사에서 제공된 소프트웨어 개발 킷을 활용하여 개발된 Visual Basic 6.0 프로그램으로 구축하여 사용되었음. 자세한 스펙은 표 2-8과 같음

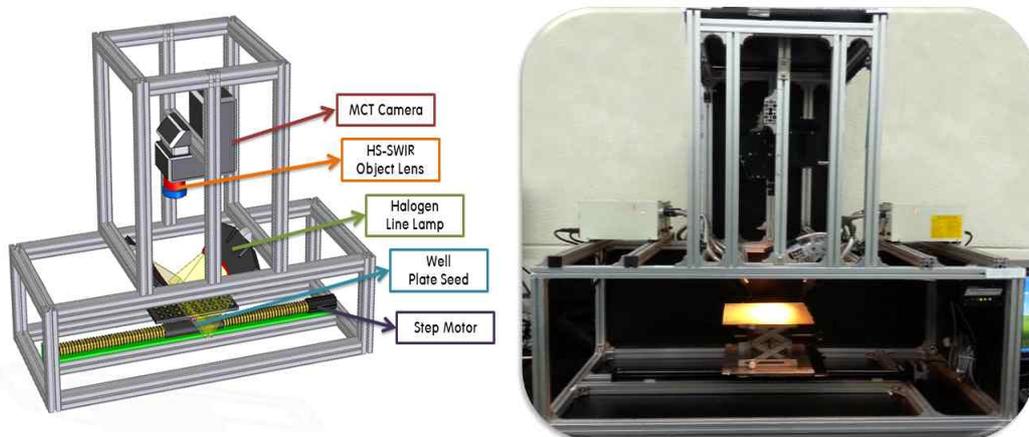


그림 2-18. SWIR 초분광 영상 시스템의 계략도

표 2-8. SWIR 초분광 영상 시스템의 특성

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

(2) Raman spectroscopy

- Raman spectroscopy는 Raman 초분광 영상 시스템과 마찬가지로 라만 산란 현상을 이용함. 입사된 광원과 물질간의 에너지 교환을 통해 물질이 흡수 혹은 방출하는 에너지를 이용하여 물질을 분석하는 방법을 이용한 분광기기임. 라만산란은 각 물질을 구성하는 분자 구조와 밀접한 관계가 있고 각 물질에 따라 고유하므로 산란광을 분석하면 물질의 분자구조를 추론할 수 있음.

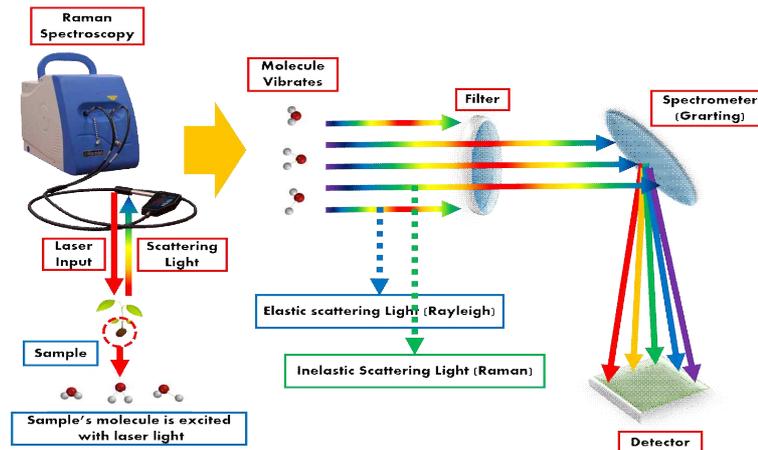


그림 2-19. Raman spectroscopy의 원리

- Raman spectroscopy의 원리는 그림 2-19과 같음. 분자가 자외선이나 가시광선을 받았을 때 분자는 여기 상태(excited vibrational state)로 들뜨게 되고 이 여기상태의 분자는 세 가지 기전을 거쳐 다시 바닥 상태(ground state)로 내려오게 됨. 이때 분자가 복사선의 에너지가 입사된 광원보다 낮은 에너지나 높은 에너지를 방출하게 됨.
- 이러한 산란광을 분석하면 물질의 분자구조의 추론이 가능하게 되는데, Raman spectroscopy는 기존의 에너지와 같은 레일리산란을 제거하고, 라만 산란만을 획득하여 측정된 물질의 분자구조 정보를 제공함.
- Raman spectroscopy는 BWTEK사의 I-Raman Plus(i-Raman Plus, B&W Tek, Inc. 19 Shea Way Newark, DE 19713, USA)를 사용하여 측정하였으며(그림 2-20) 같으며 자세한 특징은 표 2-9와 같음.



그림 2-20. Raman spectroscopy

표 2-9. Raman spectroscopy 특징

Lasers		
785 Excitation	< 300mW	
Spectrometer	Range	Resolution*
BWS465-532H	175cm ⁻¹ - 3300cm ⁻¹	~ 3.0cm ⁻¹ @ 614nm
Detector		
Detector Type	High quantum efficiency CCD array	
Pixel Number	2048 Effectice Detector Elements	
Effective Pixel Size	14μm x ~ 0.9 mm	
CCD Cooling Temperature	-2°C	
Dynamic Range	50,000:1 (Typical)	
Digitization Resolution	16-bit or 65,535:1	
Integration	100ms - 30 mins	
Electronics		
Computer Interface	USB 3.0 / 2.0	
Trigger	Yes (Compatible with BWTek Probes)	
Power Options		
DC Power Adaptor	12V DC @ 6.6 Amps	
Battery	Optional	
Physical		
Dimensions	6.7x13.4x9.2in (17x34x23.4cm)	
weight	~6.6 lbs (~3kg)	
Operation Temperature	0°C - 35°C	
Storage Temperature	-10°C - 60°C	
Humidity	10% - 85%	

*Typical Resolution Measured Using Pen Lamp Emission

6. 다변량 통계모델을 이용한 이병종자 판별 모델 개발

- 단파적외선(SWIR) 초분광 영상시스템, Raman spectroscopy와 Raman 초분광 영상시스템 이용하여 획득한 이병종자와 건전종자의 분광정보는 이병종자의 판별 모델 개발을 위해 사용되었음. 모델 개발은 정성분석(감염여부)모델 개발로 실시함
- 분석 작업의 전제가 되는 것은 정확한 스펙트럼 데이터임. 그러나 광원의 세기, 각도, 측정센서의 감도, 주변온도 등의 다양한 요인에 의해 동일한 시료의 반복 측정에도 스펙트럼의 차이가 발생함. 이런 경우 데이터의 보정을 위해 데이터의 전처리(preprocessing)를 이용함
- 스펙트럼 전처리(preprocessing)는 광학 측정상의 노이즈를 제거하고 그 영향에 따른 오차를 줄이는 중요한 방법으로서 보다 안정적인 광학 spectrum을 구하는 데 사용 되는데, 이를 이용하면 원본 스펙트럼 데이터에서 기기 조건의 변화에 따른 영향을 제거하고 불규칙한 대상물의 형상에 의한 광산란을 보정하여 우수한 판별예측모델을 개발이 가능함.

- 전처리 방법에는 일반적으로 MSC (multiplicative scattering correction), SNV (standard normal variate), Savitzky-Golay법 등이 있음. 종자의 불규칙한 형상에 의한 광산란 영향을 제거하기 위해 MSC(Multiplicative Scatter Correction), SNV(Standard Normal Variate) 전처리를 실시하였음. 또한 광경로의 차이나 측정환경의 변화 등에 기인한 베이스라인의 이동을 제거하거나 미소성분의 스펙트럼 특성을 강조하기 위해 Savitzky-Golay 1차, 2차 미분법을 사용하였음.

가. 정규화(Normalization)

- 정규화 방법은 일반적으로 광세기, 외부환경 등의 조건변화를 보정하거나 많은 양의 데이터를 처리할 때 데이터의 범위를 일치시키거나 분포를 유사하게 만들어 주는 등의 작업에 주로 사용되는 방법임. 데이터 정규화는 평균값을 이용한 정규화, 중간값을 이용한 정규화, 최대값을 이용한 정규화가 있음.

나. Multiplicative Scatter Correction (MSC)

- MSC 방법은 고체 시료를 측정할 때 주로 사용함. 고체시료는 특히 빛의 산란(Scattering)으로 스펙트럼에 많은 변화가 일어나는데 산란정도는 파장에 따라 다르며, 파장이 길수록 크게 영향을 받음. 산란현상은 파장에 따라 일정하지 않아 바탕선의 이동, 기울기 변화, 그리고 심할 경우 곡선 형태의 바탕선도 발생함. MSC는 데이터세트의 평균 스펙트럼을 계산한 후 이를 이용하여 보정함. 분광데이터의 데이터세트 내 각 스펙트럼의 파장별 흡광도와 평균 스펙트럼 흡광도와 상관관계를 구하기 위해 회귀분석을 이용하여 기울기와 절편을 구함. 이후 각각의 스펙트럼에 구해진 기울기를 빼주고 절편을 나누어 주어 스펙트럼을 보정하게 됨. MSC방법은 스펙트럼 변화와 농도간에 선형관계가 존재할 때만 사용하여야 하고, 시료들이 화학적으로 유사할 경우 좋은 결과를 얻을 수 있음.

다. SNV (Standard Normal Variate)

- SNV는 MSC와 같이 광산란 보정을 위한 전처리 방법으로 수학적 모형의 차이가 있음. SNV는 각 스펙트럼을 전체 스펙트럼의 표준편차로 정규화하여 광산란의 영향을 제거하는 방법으로, 광 경로 및 광원의 변동의 영향을 보정할 수 있음.

라. 미분법

- 스펙트럼을 미분하게 되면 스펙트럼의 변화는 증폭되고 동시에 변화되는 부분만 고려가 되기 때문에 바탕선이 상하로 움직여도 큰 문제가 없음. 결국 바탕선의 변화를 미분을 통하여 제거할 수 있음. 하지만 잡음이 많은 스펙트럼에 미분법을 사용할 경우 잡음을 증폭시켜 정량성에 나쁜 영향을 줄 수 있음.

마. 모델 개발 방법(Calibration Method)

(1) PLS (Partial Least Squares)

- 부분최소제곱(Partial Least Squares : PLS) 회귀 분석법은 주성분(PCA) 분석법을 보완한 방법으로 스펙트럼(독립변수) 데이터의 주성분을 구하고 그 주성분을 이용하여 회귀식을 구하는 방법임. 주성분분석과는 다르게 스펙트럼뿐만 아니라 실제 측정된 종속변수 값을 동시에 고려하여 새로운 변수를 찾고 이를 이용하여 회귀식을 구하는 방법임. 이는 입력력 변수값들을 그대로 사용하는 MLR과는 달리 새로운 잠재 변수(latent variable)들을 찾아내 회귀에 사용하는 비교적 새로운 다변량 통계 분석법임. PLS 회귀분석을 통해 생성된 잠재변수들은 서로 선형적으로 독립이며 입력 잠재변수와 출력 잠재변수 사이에는 매우 높은 상관관계를 갖게 됨. 입력 변수 중에 분산(variance) 값이 큰 순서대로 잠재변수로 채택됨.
- 스펙트럼 전체를 MLR 알고리즘에 적용하면 회귀 모델을 만들기 위해 사용된 학습 데이터에 대해서는 뛰어난 회귀 성능을 보이지만, 학습에 사용되지 않은 새로운 데이터에 대해서는 좋은 예측 결과를 보여주지는 못함. 이는 너무 많은 입력 변수들에 대해서 모델이 과적합(over-fitting)되었기 때문임. PLS 방법은 출력 변수값에 큰 영향을 미치는 몇몇 잠재변수들만을 이용하는 다변량 통계 분석법으로서 MLR 보다 학습 데이터에 대한 회귀성능은 떨어질 가능성은 있지만 새로운 데이터에 대해서는 뛰어난 예측 성능을 나타냄

(2) PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis)

- PLS-DA는 종속변수로 연속적인 값이 아닌 판별하고자 하는 그룹들을 가상 변수로 설정하여 이를 판별하기 위해 적용되는 회귀분석법임. 본 연구에서는 이병종자와 건전종자를 판별하기 위해 임의변수로 1과 0을 각각 적용하여 모델을 개발함
- 모델개발에 사용한 데이터 수는 DB에 저장된 각 종자별 총 개수에서 70%를 사용하였고, 나머지 30%는 개발된 모델의 검증에 사용하였음
- 모든 데이터 분석은 MATLAB(version 7.0.4, The Mathworks, Natick, MA, USA) 프로그램을 이용하여 수행되었음

(3) LS-SVM(Least Squares-Support Vector Machine)

- 서포트 벡터기계(support vector machine; SVM)은 MIT 인공지능 연구실에서 개발되어 통계학, 생물정보학, 금융정보학, 데이터마이닝, 컴퓨터 과학 및 정보과학 등의 분야에서 분류 및 회귀함수추정을 위한 우수한 성능의 기법으로 많이 활용되고 있음. SVM은 원래 집단이 두 개인 경우 통계학적 이론을 배경으로 오분류율(misclassification rate)을 최소화 시키는 최적분리 초평면(hyperplane)을 제공함으로써 다양한 응용분야의 분류 및 회귀문제에서 우수한 성능이 입증되고 있음

- 최소제곱 서포트 벡터기계(least squares-SVM; LS-SVM)는 Suykens와 Vandewalle (1999)에 의해 제안된 분석방법으로 능형회귀 개념을 도입하여 SVM의 부등식 제한조건을 등식 제한조건으로 변환함으로써 수행됨. LS-SVM은 수행 능력이 SVM에 비슷할 뿐만 아니라 이차프로그래밍 문제를 선형방정식 (linear equations)문제로 해결하여 훈련 시간을 상당히 줄일 수 있는 장점이 있음

(4) 분산분석법 (Analysis of variance)

- 분산분석(Analysis of variance, ANOVA)은 통계학에서 두 개 이상 다수의 집단을 비교하고자 할 때 집단 내의 분산, 총 평균과 각 집단 평균의 차이에 의해 생긴 집단 간 분산의 비교를 통해 만들어진 F분포를 이용하여 가설검정을 하는 방법임. 분산분석의 종류는 일원분산분석(one-way ANOVA), 이원분산분석(two-way ANOVA), 다원변량분산분석(MANOVA), 공분산분석(ANCOVA) 등이 있음. 본 연구에서는 일원분산분석을 사용하였는데 독립변수는 1개이며 독립변수 내의 집단이 2개 이상인 경우에 사용되는 방법임. F 값을 구하는 과정은 표 2-10에 나타냄
- 표 2-10에 의해 F값을 구할 수 있으며, F값은 그룹 간의 제곱평균(MSA)과 그룹 내 제곱평균(MSE)에 의해 크게 영향을 받음. 그룹 간 제곱평균이 커지거나 그룹 내 제곱평균이 작아지면 F값이 커지므로 F값이 크다는 의미는 그룹 간에 차이가 크다는 의미로 각 그룹을 구별하기 쉽다는 의미를 가지게 됨. 이를 이용하여 감염종자와 건전 종자를 구분하는 최적의 과장조합을 조사하였음. 차이가 크다는 의미로 각 그룹을 구별하기 쉽다는 의미를 가지게 됨. 이를 이용하여 감염종자와 건전 종자를 구분하는 최적의 과장조합을 조사하였음.

표 2-10. One-way ANOVA

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of square	Mean square	F0
Factor A (between groups)	a-1	$SSA = \sum_{i=1}^a n_i (\bar{y}_i - \bar{y})^2$	$MSA = \frac{SSA}{(a-1)}$	$\frac{MSA}{MSE}$
Error (within groups)	N-a	$SSE = SST - SSA$	$MSE = \frac{SSE}{(N-a)}$	
Total	N-1	$SST = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y})^2$		

바. 감염여부 판별 모델 개발 결과

(1) Raman spectroscopy

- 감염종자와 비감염 종자간의 그룹을 설정하기 위해, 제1세부기간에서 제공받은 분석 싸이클 수를 기준으로 감염종자와 비감염종자 그룹을 설정하였음. 감염의심 그룹을 제거한, 감염그룹과 비감염그룹, 이 2그룹을 이용하여 데이터 분석에 사용함.
- Raman spectroscopy를 통해 획득한 라만신호는 강한 레이저 강원에 의해 발생하는 형광신호 때문에 원래의 측정된 데이터를 사용하여 모델을 개발하는 것은 많은 어려움이 있음. 이에 형광신호를 제거하고 라만신호 만을 획득하기 위해 Polynomial 전처리 과정을 실시하였음. 이는 베이스라인을 맞추어 피크값을 계산하는 효과도 포함됨. Polynomial fitting의 경우 4, 5, 8, 12 그리고 16과 같은 다양한 차수의 분석방법이 존재함. 이 연구에서는 8th - order polynomial fitting을 이용하여 스펙트럼 데이터에 적용함.

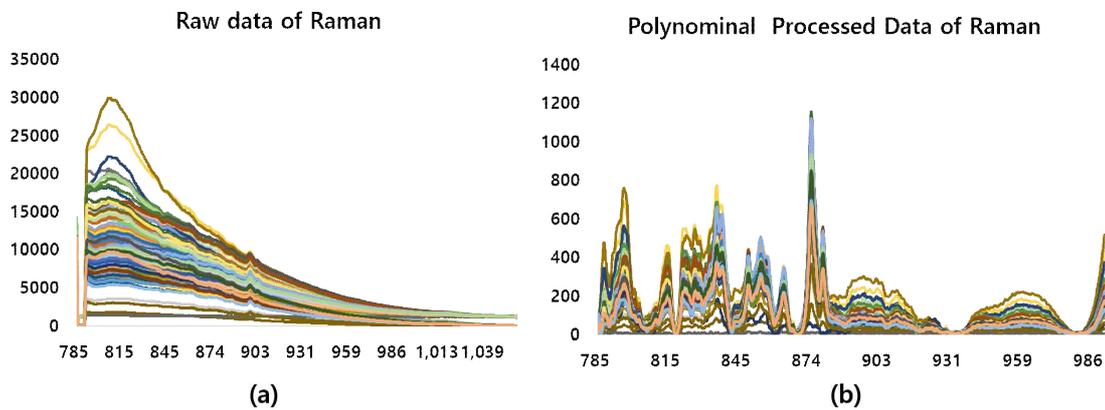


그림 2-21. Raman spectroscopy를 이용하여 측정된 데이터(a)와 8th-order Polynomial processing을 이용하여 형광신호를 제거한 데이터(b)

- Polynomial processing을 이용하는 경우 그림 2-21과 같이 형광신호가 제거된, 깨끗한 peaks 데이터의 획득이 가능함. 하지만 Polynomial processing 만으로는 감염종자와 비감염종자를 구분하는 것은 불가능함. 이에 감염종자와 비감염종자의 판별 모델을 구축하기 위해, 분산분석, PLS-DA, LS-SVM 과 같은 분석통계 방법을 이용함.
- 또한 감염여부 판별 모델의 정확도 향상을 위해 총 8가지의 전처리 방법이 적용되었음. 이는 기기 및 외부환경의 간섭을 통해 발생하는 노이즈를 제거하고 깨끗한 신호를 획득하는 효과가 있음. 최적 모델 선정은 Accuracy가 높고, calibration과 prediction 의 R2값의 편차가 적은 모델을 선정하였음. 표 2-11은 종자별 감염여부를 가장 잘 판별할 수 있도록 개발된 최적 모델 결과임.

표 2-11. Raman spectroscopy 스펙트럼을 이용한 PLS-DA와 LS-SVM 종자별 감염여부 최적 판별 모델 결과.

Analysis	Sample	Pre-processing	Data Divide	Class	Accuracy(%)
PLS-DA	Watermelon -CGMMV-	SNV	Calibration	Healthy	100
				Infected	100
				Total	100
			Prediction	Healthy	100
				Infected	75
				Total	87.5
	Muskmelon -CGMMV-	Savitzky_golay_1st	Calibration	Healthy	90.9
				Infected	81.8
				Total	86.4
			Prediction	Healthy	71.4
				Infected	85.7
				Total	78.6
LS-SVM	Watermelon -CGMMV-	Range normalization	Calibration	Healthy	63.6
				Infected	100
				Total	81.8
			Prediction	Healthy	75
				Infected	75
				Total	75
	Muskmelon -CGMMV-	Savitzky_golay_1st	Calibration	Healthy	95.5
				Infected	77.3
				Total	86.4
			Prediction	Healthy	85.7
				Infected	85.7
				Total	85.7

- 표 2-11에서 나타내었듯이 CGMMV 에 감염된 수박종자의 경우는 SNV전처리 방법과 PLS-DA로 획득한 calibration과 prediction 분류 결과가 100%와 87.5%로 확인됨. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 100%, 이병종자는 100%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 100%의 분류 정확도를 나타냄. 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 100% 그리고 이병종자는 75%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 87.5%의 분류 정확도를 나타내었으며 그림 2-22(a)에 판별결과를 나타냄.

- 그림 2-22(b)는 CGMMV 감염 수박종자와 건전 수박종자를 판별할 수 있는 최적의 PLS-DA 모델의 파장별 가중치를 나타낸 것임. 감염종자와 건전종자의 주된 스펙트럼의 차이가 나타나는 영역은 $380\text{ cm}^{-1} \sim 1600\text{ cm}^{-1}$ 으로 ratio of starch(437 cm^{-1}) 영역의 영향과 pentosan(1076.8 cm^{-1})의 영향으로 사료됨

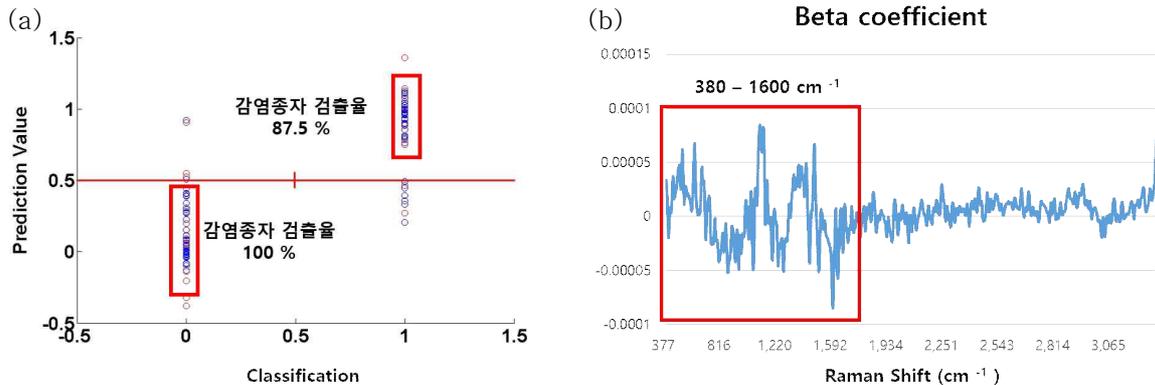


그림 2-22. (a) PLS-DA 이용한 수박종자의 Raman spectroscopy 스펙트럼의 CGMMV 바이러스 감염 여부 판별, (b) 판별 모델의 파장별 가중치(beta coefficient)

- 표 2-11에서는 CGMMV에 감염된 수박종자 데이터를 Range normalization 전처리와 LS-SVM의 calibration과 prediction 분류 결과가 81.8%와 75%로 확인됨. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 63.6%, 이병종자는 100%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 81.8%의 분류 정확도를 나타내었음. 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 75% 그리고 이병종자는 75%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 75%의 분류 정확도를 나타냄.
- 그림 2-23(a)에서는 CGMMV에 감염된 참외종자의 결과는 86.4%, 모델 검증 결과의 경우 78.6%로 나타남. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 90.9%, 이병종자는 81.8%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 86.4%의 분류 정확도를 나타냄. 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 71.4% 그리고 이병종자는 85.7%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 78.6%의 분류 정확도를 나타냄.
- 그림 2-23(b)는 CGMMV에 감염된 수박종자와 건전종자의 판별 모델의 파장별 가중치를 나타낸 그림. 건전종자의 주된 스펙트럼의 차이가 나타나는 영역은 380 cm^{-1} 의 경우 ratio of starch 영향, 1272 cm^{-1} 의 경우 ferulic-acid derivative의 영향으로 사료됨. 그리고 1300.9 cm^{-1} 의 경우 pentosan과 ferulic acid의 영향으로 사료됨.

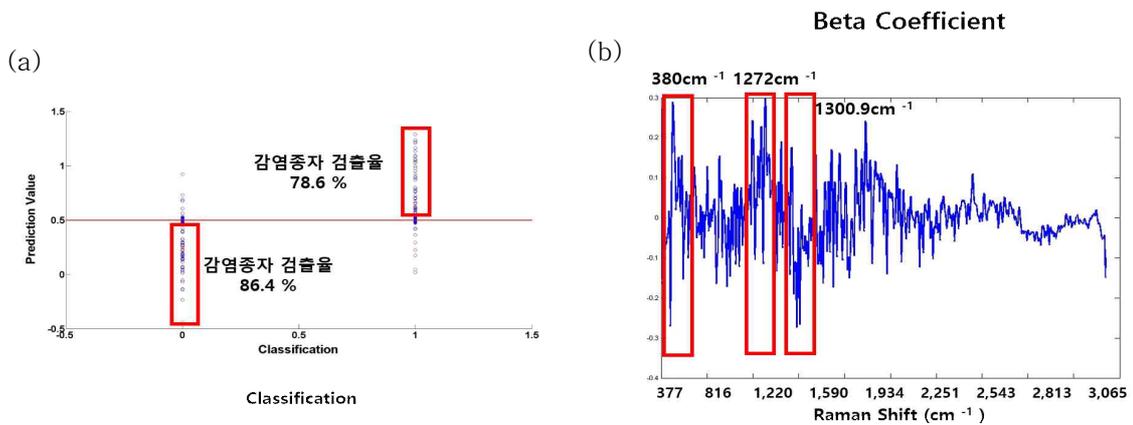


그림 2-23. (a) PLS-DA 이용한 참외종자의 Raman spectroscopy 스펙트럼의 CGMMV 바이러스 감염 여부 판별, (b) 판별 모델의 과장별 가중치(beta coefficient)

- 표 2-11에서는 CGMMV 에 감염된 참외종자의 라만 스펙트럼을 1차미분 전처리와 LS-SVM으로 개발한 판별모델로 판별한 calibration과 prediction 분류 결과가 86.4%와 85.7%로 확인됨. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 95.5%, 이병종자는 77.3%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 86.4%의 분류 정확도를 나타냄. 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 85.7% 그리고 이병종자는 85.7%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 85.7%의 분류 정확도를 나타냄.

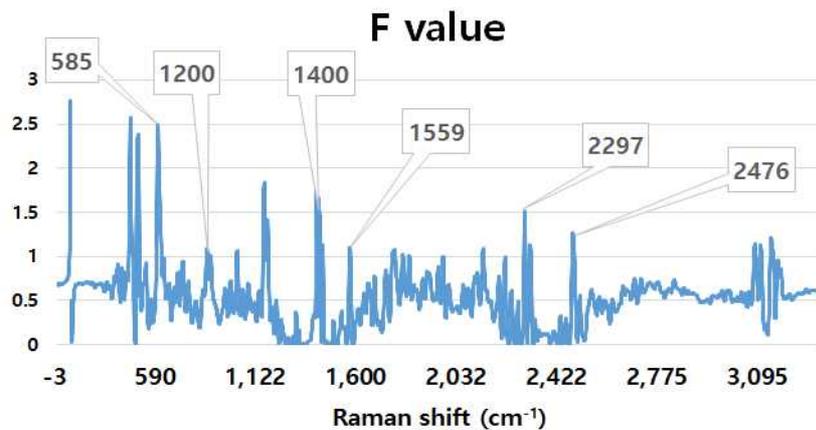


그림 2-24. Raman spectroscopy로 측정된 CGMMV 감염 수박종자와 비감염 스펙트럼을 이용한 ANOVA 분석결과

- 그림 2-24은 CGMMV에 감염된 수박종자와 비감염 종자의 라만 스펙트럼 데이터를 이용하여 수행한 ANOVA 분석결과를 나타냄. ANOVA분석을 통해 획득한 F value 는 분석에 많은 영향을 끼친 가중치가 높은 스펙트럼을 보여줌. 분석결과 585 cm⁻¹(S-S stretching), 1200 cm⁻¹(pentosan), 1400 cm⁻¹(C-S stretching), 1559 cm⁻¹(C-S Stretching), 2297 cm⁻¹(C-N Stretching), 2476 cm⁻¹(C-H Streching) 영역이 영향을 끼친 것으로 사료됨.

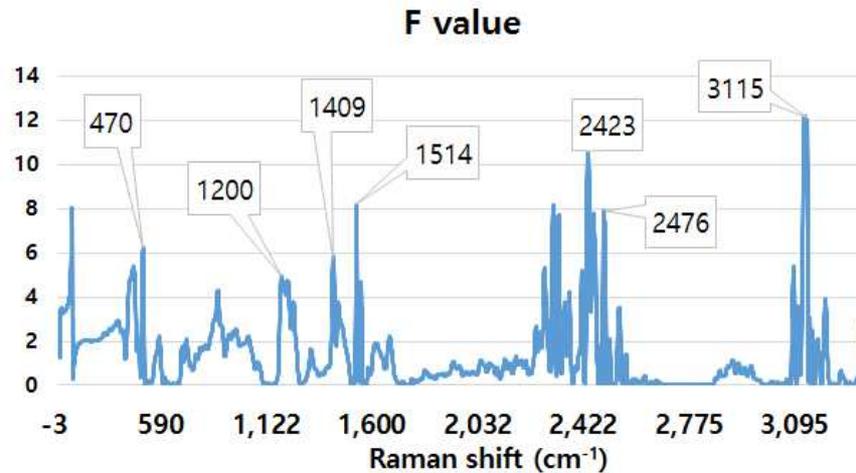


그림 2-25. Raman spectroscopy로 측정된 CGMMV 감염 참외종자와 비감염 스펙트럼을 이용한 ANOVA 분석결과

- 그림 2-25는 CGMMV에 감염된 수박종자와 비감염 종자의 데이터를 이용하여 수행한 ANOVA 분석결과를 나타냄. ANOVA분석을 통해 획득한 F value는 분석에 많은 영향을 끼친, 가중치가 높은 스펙트럼을 보여줌. 470 cm^{-1} (S-S stretching), 1200 cm^{-1} (pentosan), 1409 cm^{-1} (C-S stretching), 1514 cm^{-1} (C-S stretching), 2423 cm^{-1} (C-H Streching) 2476 cm^{-1} (C-N Stretching), 3115 cm^{-1} (O-H Stretching) 영역이 영향을 끼친 것으로 사료됨.

(2) Raman 초분광 영상정보를 이용한 예측 모델 결과

- Raman 초분광 영상시스템으로 측정한 시료 역시, Raman spectroscopy와 마찬가지로 제1세부기간에서 제공받은 분석 싸이클 수를 기준으로 감염종자와 비감염종자 그룹을 설정. 감염의심 그룹을 제거한, 감염그룹과 비감염그룹 등 총 2그룹을 이용하여 데이터 분석에 사용.
- Raman 초분광 영상 시스템을 통해 획득한 라만신호도 spectroscopy와 마찬가지로, 강한 레이저 강원에 의해 발생하는 형광신호 때문에 원래의 측정된 데이터를 사용하여 모델을 개발하는 것은 많은 어려움이 있음. 이에 형광신호를 제거하고 라만신호만을 획득하기 위해 Polynomial 전처리 과정을 실시하였음. 이는 베이스라인을 맞추어 피크값을 계산하는 효과도 포함됨. Polynomial fitting의 경우 4, 5, 8, 12 그리고 16과 같은 다양한 차수의 분석방법이 존재함. 이 연구에서는 8th - order polynomial fitting을 이용하여 스펙트럼 데이터에 적용함.
- 또한 감염여부 판별 모델의 정확도 향상을 위해 총 8가지의 전처리 방법이 적용됨. 이는 기기 및 외부환경의 간섭을 통해 발생하는 노이즈를 제거하고 깨끗한 신호를 획득하는 효과가 있음. 최적 모델 선정은 Accuracy가 높고, calibration과 prediction 의 R²값의 편차가 적은 모델을 선정함.
- 표 2-12는 종자별 감염여부를 가장 잘 판별할 수 있도록 개발된 최적 모델 결과임.

표 2-12. Raman 초분광 영상 스펙트럼을 이용한 PLS-DA와 LS-SVM 종자별 감염 여부 최적 판별 모델 결과.

Analysis	Sample	Pre-processing	Data Divide	Class	Accuracy(%)
PLS-DA	Watermelon -CGMMV-	Mean normalization	Calibration	Healthy	94.0
				Infected	98.5
				Total	96.3
			Prediction	Healthy	95.7
				Infected	95.7
				Total	95.7
	Muskmelopl -CGMMV-	SNV	Calibration	Healthy	77.3
				Infected	68.2
			Prediction	Healthy	71.4
				Infected	85.7
LS-SVM	Watermelon -CGMMV-	SNV	Calibration	Healthy	94.0
				Infected	97.0
				Total	95.5
			Prediction	Healthy	95.7
				Infected	95.7
				Total	95.7
	Muskmelon -CGMMV-	Mean normalizatio n	Calibration	Healthy	68.2
				Infected	68.2
			Prediction	Healthy	71.4
				Infected	71.4

- 표 2-12에서는 라만초분광영상으로 획득한 CGMMV 바이러스에 감염된 수박종자의 데이터를 Mean normalization 전처리와 PLS-DA의 calibration과 prediction 판별 결과가 96.3%와 95.7%로 확인됨. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 94.0%, 이병종자는 98.5%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 96.3%의 분류 정확도를 나타냄.

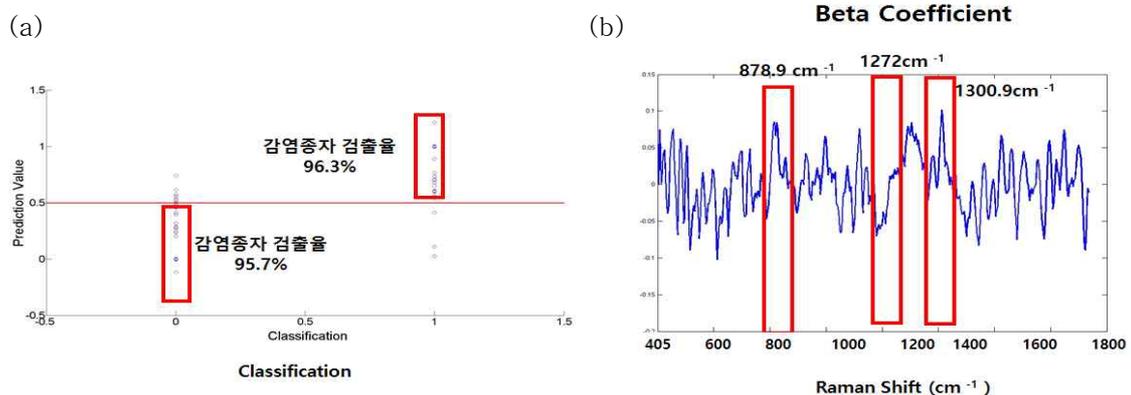


그림 2-26. (a) PLS-DA 이용한 수박종자의 Raman 초분광 영상 스펙트럼의 CGMMV 바이러스 감염 여부 판별, (b) 판별 모델의 파장별 가중치(beta coefficient)

- 그림 2-26(a)는 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 95.7% 그리고 이병종자는 95.7%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 95.7%의 분류 정확도를 나타냄.
- 그림 2-26(b)는 CGMMV에 감염된 수박종자와 건전종자의 판별 모델의 파장별 가중치를 나타냄. 879.9 cm^{-1} , 1272 cm^{-1} , 1300.9 cm^{-1} 영역에서의 가중치가 다른 영역에 비교하여 상대적으로 높았음. 이 영역은 지방의 CH₃ 구조의 C-H stretch 진동모드의 1, 2차 배음대, 영향으로 사료됨.
- 표 2-12에서는 라만초분광영상장치로 획득한 CGMMV 바이러스에 감염된 수박종자의 데이터를 SNV전처리와 LS-SVM의 calibration과 prediction 분류 결과가 95.5%와 95.7로 확인. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 94%, 이병종자는 97%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 95.5%의 분류 정확도를 나타냄.

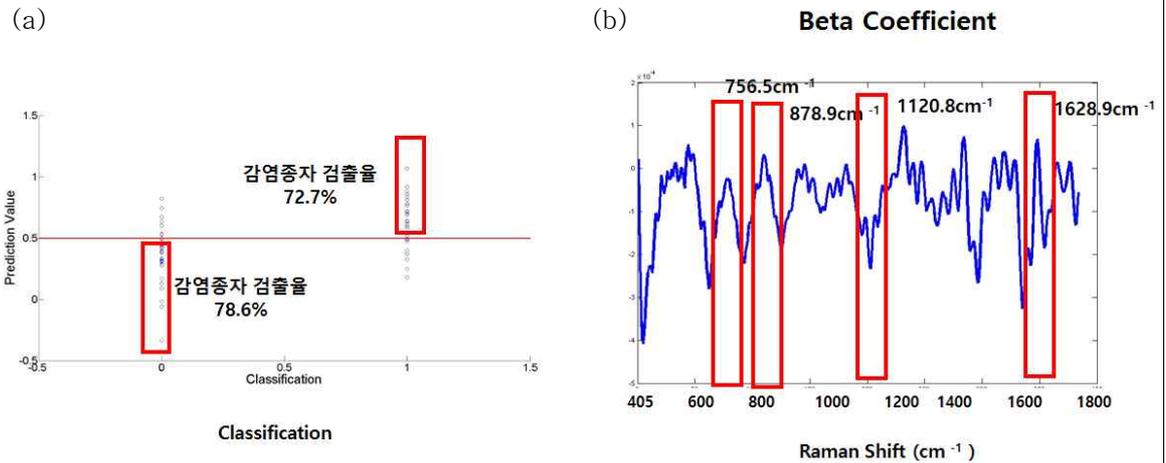


그림 2-27. (a) PLS-DA 이용한 참외종자의 Raman 초분광 스펙트럼의 CGMMV 바이러스 감염 여부 판별, (b) 판별 모델의 파장별 가중치(beta coefficient)

- 그림 2-27(a)에서는 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 95.7% 그리고 이병종자는 95.7%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 95.7%의 분류 정확도를 나타냄.
- CGMMV에 감염된 참외종자는 calibration과 prediction 분류 결과가 72.7%와 78.6%로 확인됨. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 77.3%, 이병종자는 68.2%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 72.7%의 분류 정확도를 나타냄. 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 71.4% 그리고 이병종자는 85.7%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 78.6%의 분류 정확도를 나타냄(그림 2-27(a))
- 그림 2-27(b)에서는 PLS-DA의 756 cm^{-1} , 879 cm^{-1} , 1120.8 cm^{-1} , 1628.9 cm^{-1} 영역에서 주된 피크를 확인할 수 있었음. 756 cm^{-1} 영역과 878.9 cm^{-1} 영역의 경우 tryptophane와 관련이 있는 영역임. 1272 cm^{-1} 영역과 1628.9 cm^{-1} 영역은 pentosan과 ferulic acid 영역과 관련이 되어 있는 것으로 사료됨.

- 표 2-12에서는 CGMMV 에 감염된 참외종자의 라만초분광 데이터를 Mean normalization 전처리와 LS-SVM으로 개발한 모델로 판별한 calibration과 prediction 분류 결과가 68.1%와 71.4%로 확인됨. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 68.1%, 이병종자는 68.1%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 68.1%의 분류 정확도를 나타냄. 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 71.4% 그리고 이병종자는 71.4%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 71.4%의 분류 정확도를 나타냄.

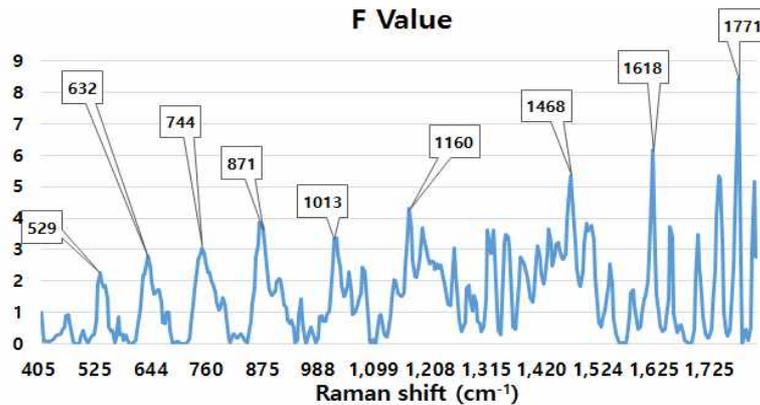


그림 2-28. Raman 초분광 영상 시스템으로 측정된 CGMMV 감염 수박종자와 비감염 스펙트럼을 이용한 ANOVA 분석결과

- 그림 2-28은 CGMMV에 감염된 수박종자와 비감염 종자의 데이터를 이용하여 수행한 ANOVA 분석결과를 나타냄. ANOVA 분석을 통해 획득한 F value는 분석에 많은 영향을 끼친 가중치가 높은 스펙트럼을 보여줌. 분석결과 529 cm^{-1} (S-S stretching), 632 cm^{-1} (tyrosion), 744 cm^{-1} (tryptophane), 871 cm^{-1} (tryptophane), 1013 cm^{-1} (phenylalanine), 1160 cm^{-1} (phenylalanine), 1468 cm^{-1} (ferulic acid), 1618 cm^{-1} (ferulic acid) 그리고 1771 cm^{-1} (C-O Streching) 영역이 영향을 끼친 것으로 사료됨.

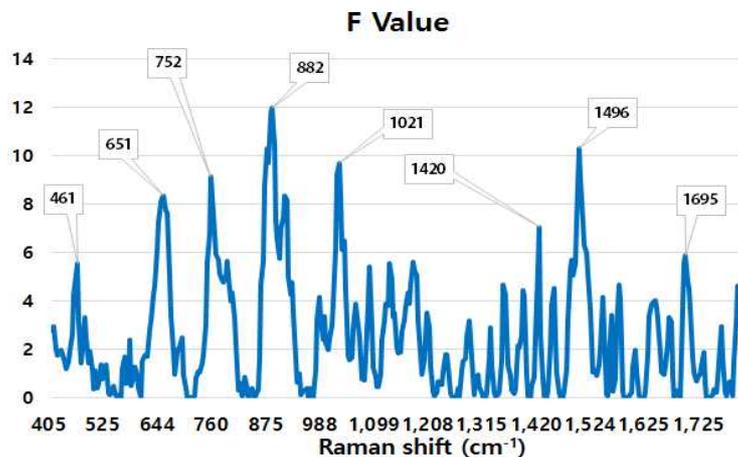


그림 2-29. Raman 초분광 영상 시스템으로 측정된 CGMMV 감염 참외종자와 비감염 스펙트럼을 이용한 ANOVA 분석결과

- 그림 2-29은 CGMMV에 감염된 수박종자와 비감염 종자의 데이터를 이용하여 수행한 ANOVA 분석결과를 나타낸 것임. ANOVA분석을 통해 획득한 F value는 분석에 많은 영향을 끼친 가중치가 높은 스펙트럼을 보여줌. 분석결과 461 cm^{-1} (S-S stretching), 651 cm^{-1} (tyrosion), 752 cm^{-1} (tryptophane), 882 cm^{-1} (tryptophane), 1021 cm^{-1} (phenylalanine), 1420 cm^{-1} (phenylalanine), 1496 cm^{-1} (ferulic acid), 그리고 1695.5 cm^{-1} (ferulic acid) 영역이 영향을 끼친 것으로 사료됨.

(3) SWIR 초분광 영상정보를 이용한 예측 모델 결과

- SWIR 초분광 영상시스템으로 측정된 시료는 제 1세부기간에서 제공받은 분석 싸이클 수를 기준으로 감염종자와 비감염종자 그룹을 설정하였음. 감염의심 그룹을 제거한, 감염그룹과 비감염그룹, 총 2그룹을 이용하여 데이터 분석에 사용.
- 감염종자와 비감염종자의 평균스펙트럼은 미세한 차이가 발견되었지만, 두 그룹의 평균 스펙트럼만으로는 감염종자와 비감염종자를 구분하는 것은 불가능했음. 이에 감염종자와 비감염종자의 판별 모델을 구축하기 위해, PLS-DA, LS-SVM 다변량분석 방법을 이용하였으며 개발된 판별 모델의 결과를 비교.
- SWIR초분광 데이터는 Raman 데이터와는 달리 노이즈 제거를 위해 Polynominal은 사용하지 않았지만 감염여부 판별 모델의 정확도 향상을 위해 총 8가지의 전처리 방법이 적용됨. 이는 기기 및 외부환경의 간섭을 통해 발생하는 노이즈를 제거하고 깨끗한 신호를 획득하는 효과가 있음. 최적 모델 선정은 Accuracy가 높고, calibration과 prediction 의 R^2 값의 편차가 적은 모델을 선정.
- 표 2-13은 종자별 감염여부를 가장 잘 판별할 수 있도록 개발된 최적 모델 결과를 나타냄.
- 표 2-13에서는 CGMMV 에 감염된 수박종자의 SWIR 초분광 영상데이터를 Mean normalization 전처리와 PLS-DA로 개발한 판별모델의 calibration과 prediction 분류 결과가 97.9%와 91.6%로 확인됨. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 95.8%, 이 병종자는 100%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 97.9%의 분류 정확도를 나타냄.

표 2-13. SWIR 초분광 스펙트럼을 이용한 PLS-DA와 LS-SVM 종자별 감염여부 최적 판별 모델 결과.

Analysis	Sample	Pre-processing	Data Divide	Class	Accuracy
PLS-DA	Watermelon -CGMMV-	Mean normalization	Calibration	Healthy	95.8
				Infected	100
				Total	97.9
			Prediction	Healthy	91.6
				Infected	91.6
				Total	91.6
	Muskmelopl n -CGMMV-	무처리	Calibration	Healthy	93.3
				Infected	93.3
			Prediction	Total	93.3
				Healthy	80
LS-SVM	Watermelon -CGMMV-	Savitzky_ golay_1st	Calibration	Healthy	91.6
				Infected	91.6
				Total	91.6
			Prediction	Healthy	100
				Infected	66.6
				Total	83.3
	Muskmelon -CGMMV-	Mean normalizatio n	Calibration	Healthy	80
				Infected	93.3
			Prediction	Total	86.7
				Healthy	60
Infected	60				
Total	60				

- 그림 2-30(a)에서는 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 91.6% 그리고 이병종자는 91.6%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 91.6%의 분류 정확도를 나타냄.
- 그림 2-30(b)는 CGMMV에 감염된 수박종자와 건전종자의 판별 모델의 파장별 가중치를 나타낸 그림임. 1411 nm, 1456 nm의 영역에서의 가중치가 다른 영역에 비교하여 상대적으로 높았음. 이 영역은 지방의 CH₃ 구조의 C-H stretch 진동모드의 1,2차 배음대 영향으로 사료됨.

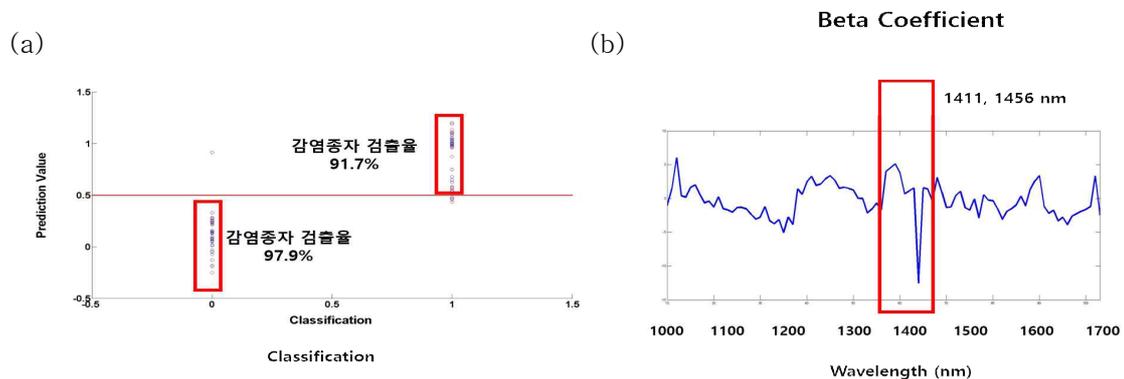


그림 2-30. (a) PLS-DA 이용한 수박종자의 SWIR 초분광 영상 스펙트럼의 CGMMV 바이러스 감염 여부 판별, (b) 판별 모델의 파장별 가중치(beta coefficient)

- 표 2-13에서는 CGMMV 바이러스에 감염된 수박종자의 SWIR 초분광 영상데이터를 1차미분 전처리와 PLS-DA로 개발한 판별모델의 calibration과 prediction 분류 결과가 91.6%와 91.6%로 확인됨. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 91.6%, 이병종자는 91.6%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 91.6%의 분류 정확도를 나타냄. 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 100% 그리고 이병종자는 66.6%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 83.3%의 분류 정확도를 나타냄.
- 표 2-13에서는 CGMMV 바이러스에 감염된 참외종자의 SWIR 초분광영상 데이터의 PLS-DA모델로 판별한 calibration과 prediction 분류 결과가 93.3%와 80%로 확인됨. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 93.3%, 이병종자는 93.3%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 93.3%의 분류 정확도를 나타냄.
- 그림 2-31(a)에서는 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 80% 그리고 이병종자는 80%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 80%의 분류 정확도를 나타냄.
- 그림 2-31(b)는 CGMMV에 감염된 참외종자와 건전종자의 판별 모델의 파장별 가중치를 나타내었다. 두 개의 파장 1,450 nm, 1,691 nm의 영역에서의 가중치가 다른 영역에 비교하여 상대적으로 높았음. 이 영역은 지방의 CH₃ 구조의 C-H stretch 진동모드의 1,2차 배음대, 수분의 O-H 진동모드에 의한 영향으로 판단됨.

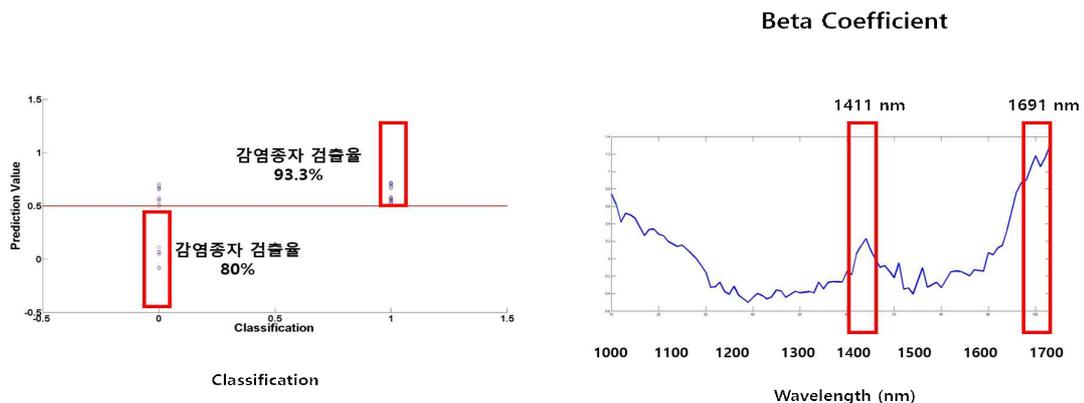


그림 2-31. (a) PLS-DA 이용한 참외종자의 SWIR 초분광 스펙트럼의 CGMMV 바이러스 감염 여부 판별, (b) 판별 모델의 파장별 가중치(beta coefficient)

- 표 2-13에서는 CGMMV에 감염된 참외종자의 LS-SVM의 calibration과 prediction 분류 결과가 86.4%와 60%로 확인되었음. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 80%, 이병종자는 93.3%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 86.7%의 분류 정확도를 나타내었음. 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 60% 그리고 이병종자는 60%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 60%의 분류 정확도를 나타냄.

7. 실시간 이병종자 검사를 위한 융합 초분광 영상 시스템 구축

가. 개발된 이병종자 예측 모델을 장착한 초분광 IR 및 라만영상 시스템 구축

- 본 연구에서는 실시간 이병종자 검사를 위해 융합 초분광 데이터를 구성하였다. 이는 융합 초분광 시스템의 구성을 위한 기초 데이터 조사로, 융합 초분광 시스템의 구성 전에 데이터를 이용하여 미리 결과를 알아보고자 함.
- 두 시스템은 1차년도와 2차년도에 개발된 초분광 시스템을 사용하였으며, 단파적외선 영역의 측정이 가능한 SWIR 초분광 데이터와, Raman의 영역이 측정이 가능한 Raman 초분광 데이터를 활용하였다. 라만초분광 시스템의 구조는 그림 2-32과 2-33와 같음.

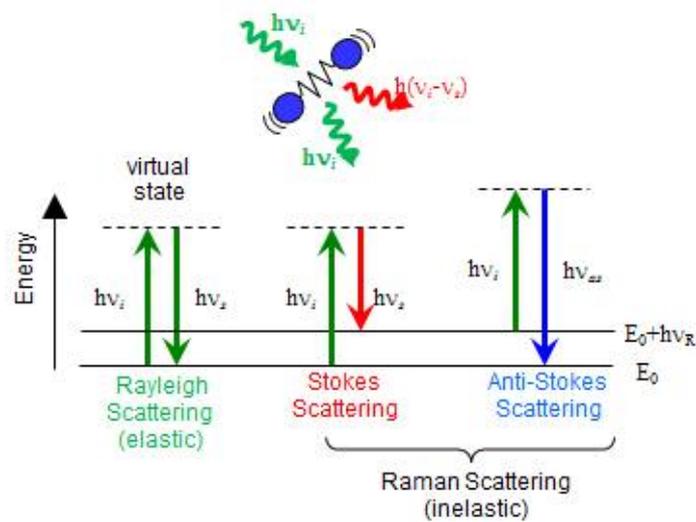


그림 2-32. 라만 산란현상의 원리

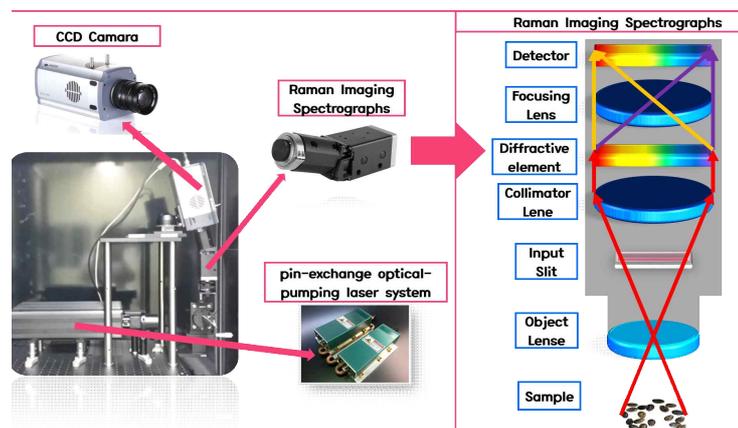


그림 2-33. 라만 초분광 카메라의 원리 및 구조

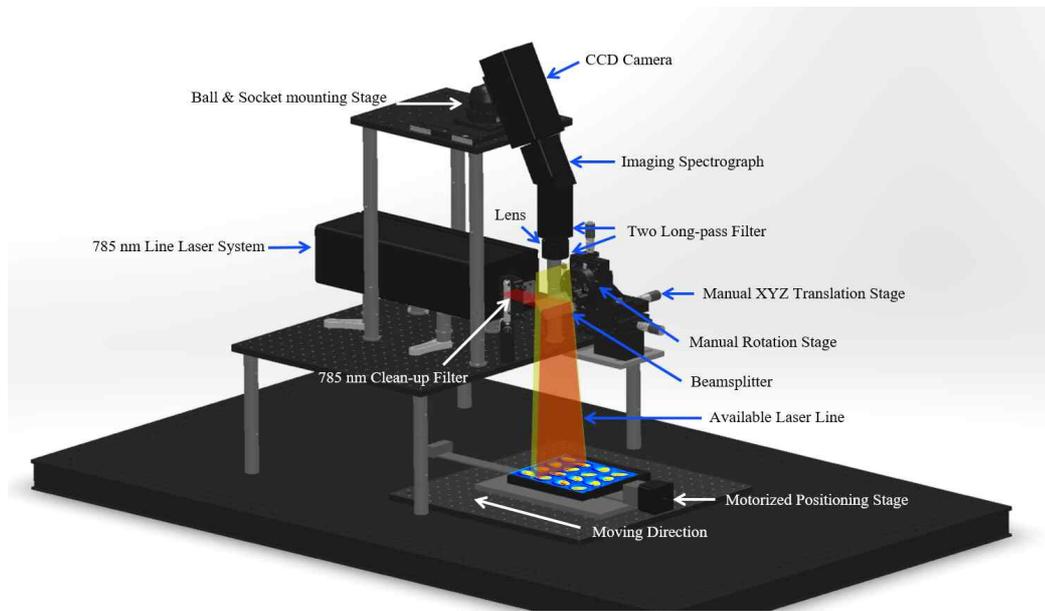


그림 2-34 라만 초분광 시스템의 계략도

- 그림 2-31은 탄성적 산란과 비탄성적 산란의 원리를 나타내었다. 라만분광법은 라만 산란(Raman scattering)현상을 이용한 것으로 빛이 매질을 통과하게 되면 산란(scattering)현상이 일어나게 됨. 라만분광법은 이러한 산란현상중 라만산란현상을 이용한 것으로, 레이저 광과 같은 단색광을 쬐어주면 분자가 들뜸으로 인해 단색광의 파장과 같거나 차이가 나는 파장이 산란되어 나타남. 라만분광법은 이 산란되는 신호 중에서 그 분자의 전자의 에너지준위의 차이만큼 에너지를 흡수하는 라만산란현상을 이용하여 분자의 종류를 나타내는 방법임.

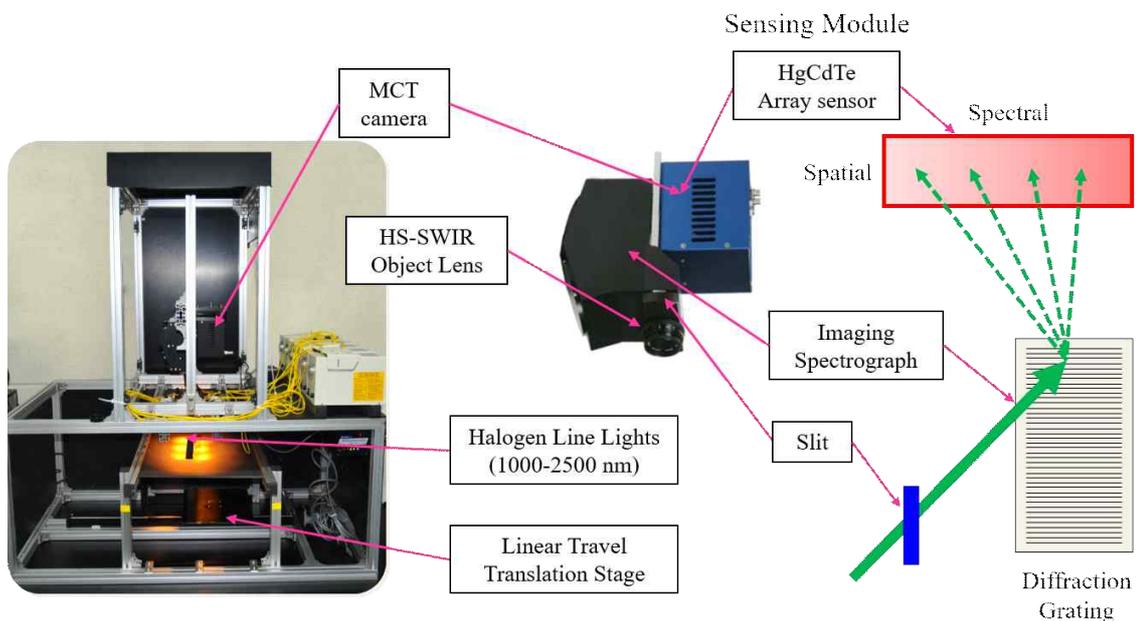


그림 2-35. SWIR 초분광 카메라의 원리 및 구조

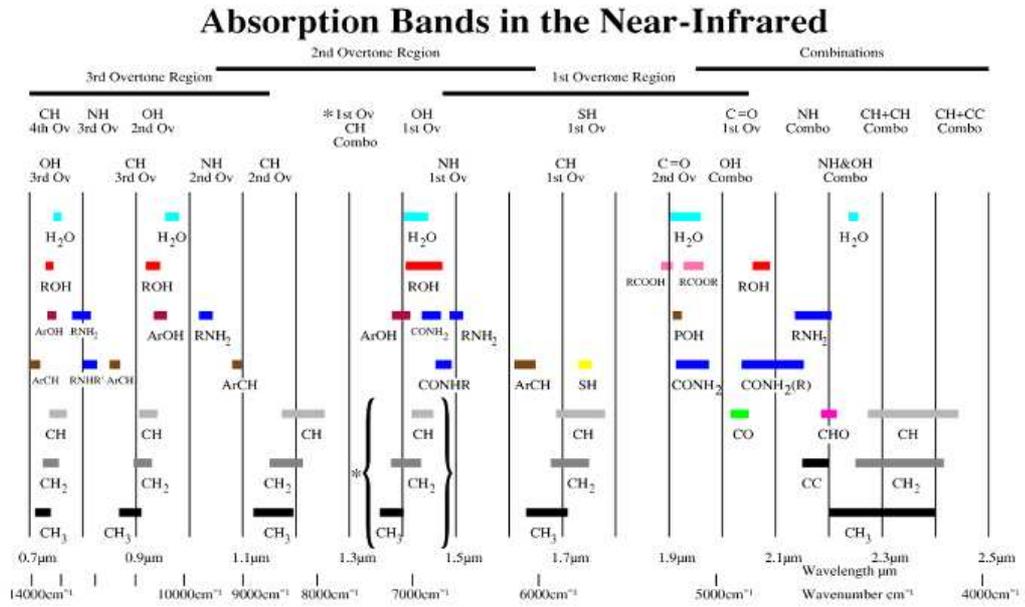


그림 2-36. 근적외선 흡수띠(Spectrum)

- 그림 2-36에서는 근적외선(NIR) 분광법은 적외선 대역 중 가시광 쪽의 750 nm ~ 2500 nm 파장대역을 이용한 것으로, 주로 중적외선에서 유래되는 CH, OH, NH 작용기 분자진동의 결합대(combination band)와 배음대(overtone band)로 나타냄. 근적외선은 흡광도가 낮고, 에너지가 중적외선보다 높아 투과도(transmission)가 크다는 장점이 있어 시료의 두께에 큰 영향 없이 스펙트럼의 측정이 가능.
- 또한 반복 및 재현성이 우수하고 매기기가 매우 안정적이기 때문에, chemometrics를 이용한 검량식만 완벽하게 만들면 정확한 판별분석이 가능함. 하지만 이렇듯 낮은(중적외선에 비해 10 ~ 1000배) 흡광도로 인해 정량적인 분석이 어렵다는 단점이 있었으나, 80년대 이후 chemometrics 검량기법과 컴퓨터 연산속도의 발달이 근적외선과 접목되며 이러한 단점의 극복이 가능하게 됨. 이에 현재 농업, 음료, 석유화학, 정유, 섬유, 고분자, 제약, 생의학 분야 등의 다양한 분야에서 활용됨.

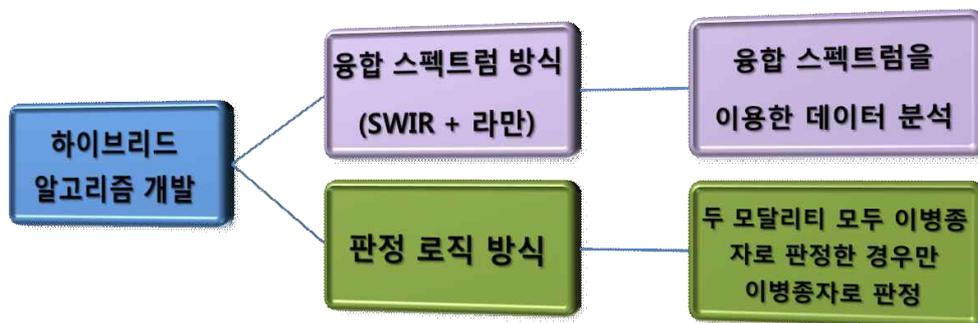


그림 2-37. 하이브리드 알고리즘 개발 전략

- 이에 3차년도의 연구에서는 각각의 시스템을 이용해 측정된 데이터를 융합하여 건전 중자와 발아중자를 판별하고자 함. 2개의 다른 파장대의 데이터를 융합하기 위해 두 가지 방법을 융합한 하이브리드 알고리즘을 개발함 (그림 2-37)
- 첫 번째로 2개의 스펙트럼을 융합하여 분석을 실시 (융합 스펙트럼 방식). 이는 스펙트럼간의 융합과 chemometrics 분석이 판별정확도에 어떤 영향을 미치는지 분석하고, 기존의 각각 스펙트럼을 통한 분석방법과 어떠한 차이가 있는지 알아보하고자 함.
- 두 번째로는 2개의 모델의 결과를 AND연산하는 방식 (판정 로직 방식). 이는 2개의 시스템이 각각 내린 판별을 추합하고 최종적으로 2개의 모델의 융합이 기존의 결과와 어떠한 차이점이 있는지 알아보하고자 함.

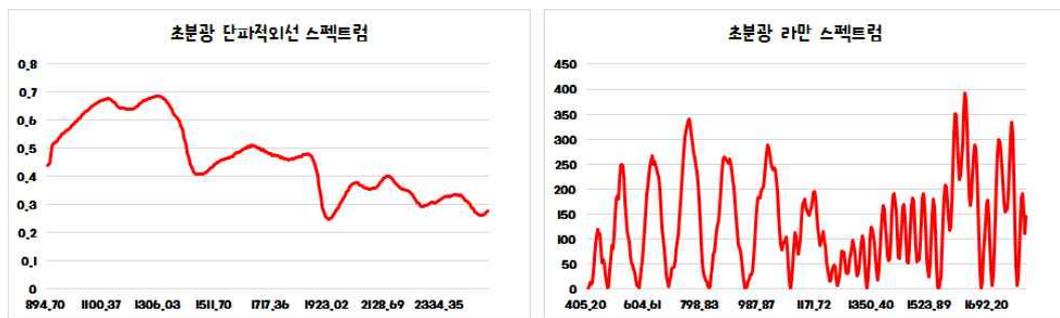


그림 2-38. 초분광 융합(단파적외선 + 라만)스펙트럼 시스템

- 그림 2-38은 샘플의 SWIR 스펙트럼과 Raman 스펙트럼을 융합한 스펙트럼을 나타냄. 기존의 2개의 스펙트럼을 융합한 것으로, Raman 스펙트럼은 형광신호를 제거하기 위해 Polynomial 전처리 과정을 실시한 후 융합(그림 2-38). Raman spectroscopy를 통해 획득한 라만신호는 강한 레이저 광원에 의해 발생하는 형광신호 때문에 원래의 측정된 데이터를 사용하여 모델을 개발하는 것은 많은 어려움이 있음. 이에 형광신호를 제거하고 라만신호만을 획득하기 위해 Polynomial 전처리 과정을 실시. 이는 베이스라인을 맞추어 피크값을 계산하는 효과도 포함. Polynomial fitting의 경우 4, 5, 8, 12 그리고 16과 같은 다양한 차수의 분석방법이 존재하나, 이 연구에서는 8th - order polynomial fitting을 이용하여 스펙트럼 데이터에 적용.

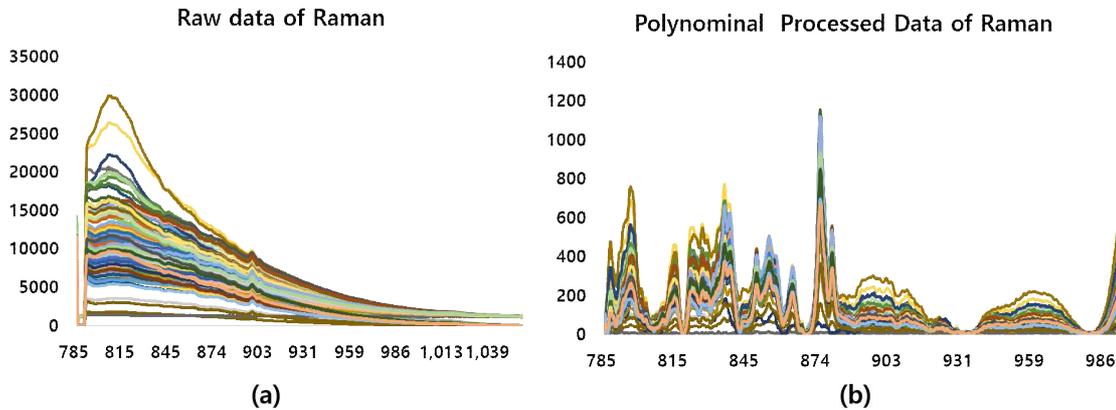


그림 2-39. Raman spectroscopy를 이용하여 측정된 데이터(a)와 8th-order Polynominal processing을 이용하여 형광신호를 제거한 데이터(b)

- Polynominal processing을 이용하는 경우 그림 2-39과 같이 형광신호가 제거된, 깨끗한 peaks 데이터의 획득이 가능함. 하지만 Polynominal processing 만으로는 감염종자와 비감염종자를 구분하는 것은 불가능했음. 이에 감염종자와 비감염종자의 판별 모델을 구축하기 위해, ANOVA, PLS-DA, LS-SVM 과 같은 분석통계 방법을 이용함.
- 또한 감염여부 판별 모델의 정확도 향상을 위해 총 8가지의 전처리 방법이 적용됨. 이는 기기 및 외부환경의 간섭을 통해 발생하는 노이즈를 제거하고 깨끗한 신호를 획득하는 효과가 있음. 최적 모델 선정은 Accuracy가 높고, calibration과 prediction의 R2값의 편차가 적은 모델을 선정함.

(1) 스펙트럼 전처리

- 스펙트럼 전처리(preprocessing)는 광학 측정상의 노이즈를 제거하고 그 영향에 따른 오차를 줄이는 중요한 방법으로서 보다 안정적인 광학 spectrum을 구하는 데 사용됨. 또한 전처리된 spectrum을 사용하면 보다 안정적이고 정확도가 높은 예측 모델을 만들 수 있는데 전처리 방법에는 일반적으로 MSC (multiplicative scattering correction), SNV (standard normal variate), Savitzky-Golay법 등이 있음.
- 분석 작업의 전제가 되는 것은 정확한 소스 데이터임. 그러나 현실에서는 원 데이터의 품질이 불완전하고, 오염된 (잡음이 있는) 경우 또는 서로 모순된 내용을 담고 있어서 일관성을 잃은 데이터의 경우가 많음. 데이터의 전처리 (Preprocessing)란 이러한 요소를 제거 또는 수정하여 최대한 소스 데이터의 정확성을 높이는 것을 말함. 뿐만 아니라 중요성이 현저히 낮은 데이터를 과도하게 많이 포함한 경우 이들을 적절히 축소 조절하여 관리와 사용에 용이한 형태로 변경시켜 주기도 함.
- 데이터 전처리에는 데이터 정제, 데이터 통합, 데이터 변환, 데이터 축소등이 포함됨. 데이터 정제는 결측치를 채워넣고, 잡음있는 데이터를 평활화(smoothing) 하고, 이상치를 식별하고, 데이터 불일치를 교정하는 것임. 주요한 전처리 작업으로는 다음과 같음.

표 2-14. 전처리 방법의 종류

전처리	전처리 효과
평활화(Smoothing)	노이즈 제거
정규화(Normalization)	광세기 등 조건변화 보정
MSC(Multiplicative Scatter Correction)	광산란 보정
SNV(Standard Normal Variate)	광산란 보정
1차 or 2차 미분(Savitzky-Golay)	베이스 라인 이동 제거, 미소성분 강조

(가) 정규화(Normalization)

- 많은 양의 데이터를 처리함에 있어 여러 이유로 정규화, 즉 데이터의 범위를 일치시키거나 분포를 유사하게 만들어 주는 등의 작업은 꼭 필요한 일임. 일반적으로 데이터 정규화는 평균값을 이용한 정규화, 중간값을 이용한 정규화, Quantile 정규화 정규화가 있음. 정규화 전처리를 식으로 표현하면 다음과 같음.

$$X = \frac{x_i}{x_{mean}} \quad (15)$$

Where : x_i : ith spectrum

$$x_{mean} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad n : \text{mean of } i\text{th spectra}$$

n : number of spectra

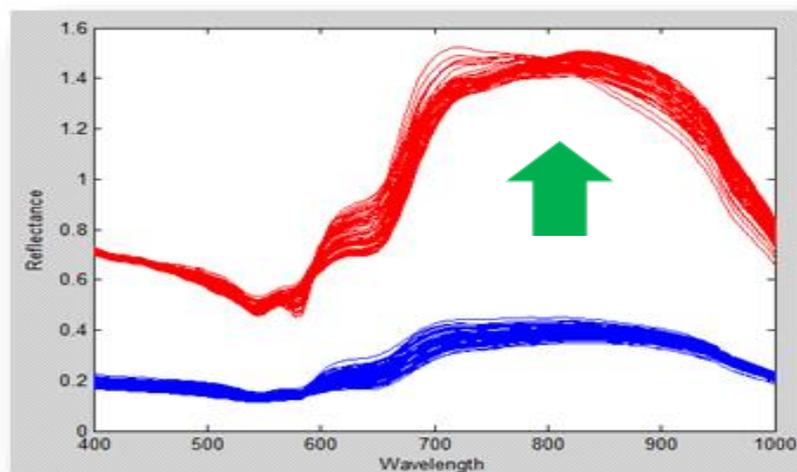


그림 2-40. 정규화 전처리 방법

(나) MSC(Multiplicative Scatter Correction)

- 산란현상은 파장에 따라 일정하지 않아서 바탕선이 이동하거나, 바탕선의 기울기가 변화하고, 그리고 심할 경우 바탕선이 곡선 형태로도 나타날 수 있음. 이를 보완하기 위해 MSC를 이용하여 평균 spectrum을 계산한 후 이를 이상적인 spectrum으로 간주하고 보정함. 시료 표면 혹은 시료 내부의 불균일성 때문에 동일 시료에 대한 반복 측정에 대해서 측정된 스펙트럼의 차이를 보일 수 있으며, 이는 스펙트럼 데이터 변이의 가장 큰 원인이 됨. 또한 산란 정도는 사용된 광원의 종류나 시료 표면의 상태, 그리고 시료의 반사지수 등에 영향을 받으며, 이것은 주로 베이스라인의 이동이나 기울기 및 곡률의 변화로 나타남. 이러한 광 산란의 영향은 특히 측정된 스펙트럼의 장파장 영역에서 주로 나타나며, MSC의 기본 개념은 모든 스펙트럼을 이상적인 스펙트럼에 의해 보정하는 것임.

$$x_i = a_i + b_i \bar{x}_j + e_i \quad (16)$$

$$x_{i,msc} = (x_i - a_i) / b_i \quad (17)$$

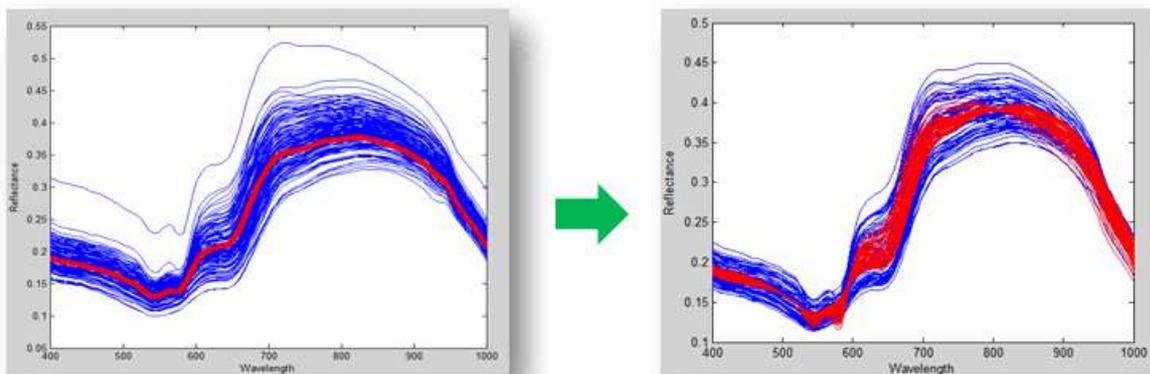


그림 2-41. MSC 전처리 방법

(다) SNV(Standard Normal Variate)

- SNV 역시 MSC와 마찬가지로 광산란 보정을 위한 전처리 기법중 하나이나 다른 수학적 방법을 사용함. SNV는 각 spectrum을 샘플 spectrum의 평균과 표준편차로 정규화하여 광산란의 영향을 제거하는 방법이며 이상적인 spectrum이 필요하지 않다. SNV에 의해 광경로나 광원의 변동에 따른 spectrum의 변화 등이 보정될 수 있으며, SNV로 보정된 spectrum은 무차원이 됨.

$$\bar{x}_i = \frac{\sum_{j=1}^n x_{i,j}}{n}, \quad w_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (x_{i,j} - \bar{x}_i)^2}{(n-1)}} \quad (18)$$

Where, \bar{x}_i : 샘플 i의 모든 파장에서 흡광도

w_i : 샘플 i의 평균과 표준편차.

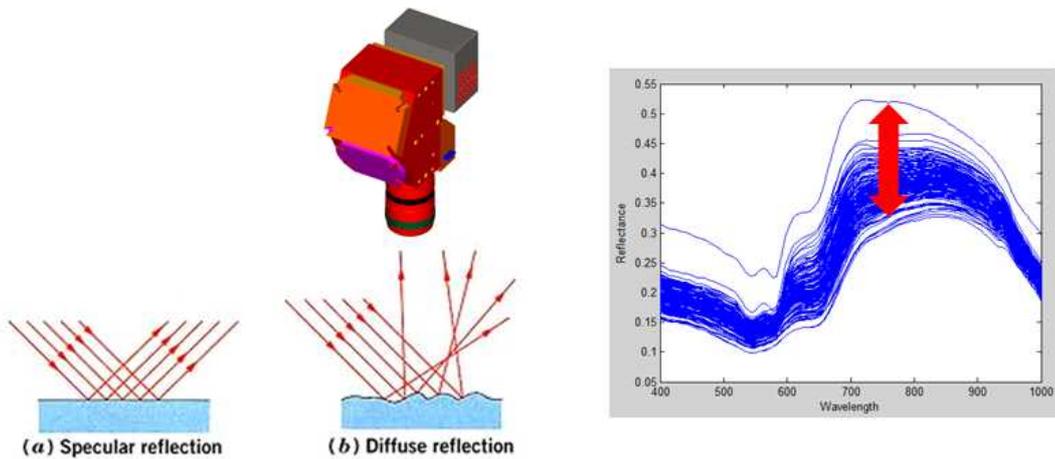


그림 2-42. 샘플의 표면에 따른 광산란 현상

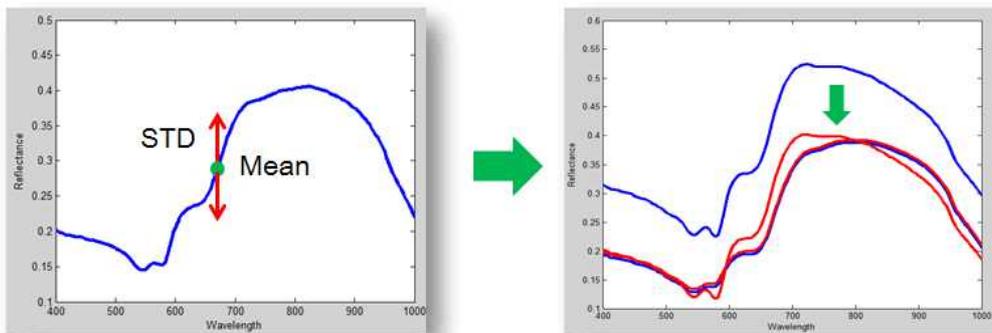


그림 2-43. SNV 전처리 방법

(라) 1차 or 2차 미분(Savitzky-Golay)

- 다차방정식 평활화방식을 사용하며, 미분법을 이용하여 중첩된 스펙트럼의 미소 성분에 의한 차이 극대화 시킴. Savitzky-Golay 방법에 의한 신호 평활법은 다음과 같은 식에 의해서 스펙트럼 측정시스템에서 기인되는 노이즈를 감소시킴

$$Y_i^* = \frac{\sum_{j=1-n}^{i+n} Y_j c_j}{N} \quad (19)$$

- 위 식에서 n 은 1 이상의 값을 가지며 이는 Savitzky-Golay의 방법의 적용에 있어서 이동 창의 크기($2n+1$)를 결정함. 이식은 어느 한 측정값의 잡음 신호를 제거하기 위하여 그 측정값을 중심으로 이동 창 내의 이전과 이후에 측정된 측정값들을 참조하는 방법을 취하게 함. 식에서 Y_i^* 은 잡음이 제거된 i 번째 측정값이 되고, Y_i 는 Y_i^* 를 구하기 위해서 사용된 잡음을 제거하기 전의 측정값들을 의미하며, c_j 는 Savitzky-Golay의 방법의 적용에 있어서 잡음의 제거를 위해 기준이 되었던 함수관계와 최소자승의 원리에 따라 구해진 convolution integer임. 식에서 N 은 일종의 scaling 상수임.

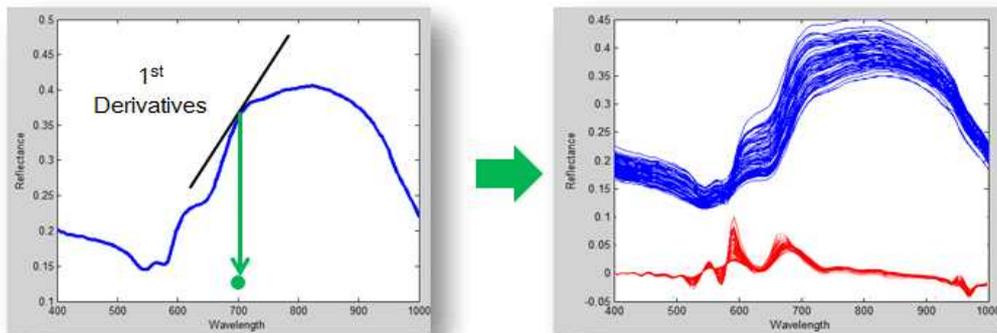


그림 2-44. 1차미분 전처리 방식

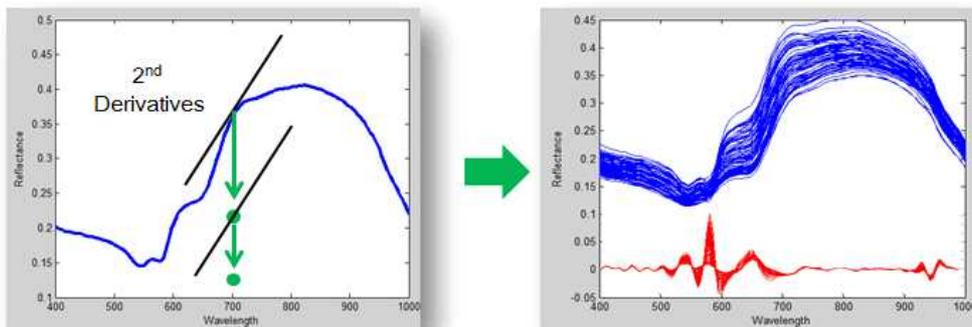


그림 2-45. 2차미분 전처리 방식

(마) 부분최소제곱(Partial Least Squares : PLS) 회귀 분석법

- 주성분(PCA) 분석법을 보완한 방법으로 스펙트럼(독립변수) 데이터의 주성분을 구하고 그 주성분을 이용하여 회귀식을 구하는 주성분분석과는 다르게, 스펙트럼뿐만 아니라 실제 측정된 종속변수 값을 동시에 고려하여 새로운 변수를 찾고 이를 이용하여 회귀식을 구하는 방법임. 이와 같이 독립변수와 종속변수를 모두 고려하기 때문에 독립변수만을 고려하는 주성분 모델보다 더 안정적인 특징을 보임.
- 부분최소제곱 회귀분석법의 기초인 부분최소자승법은 응답 변수 행렬 Y와 입력 변수 행렬X 사이의 선형관계를 모델링하는 투영법으로써, 두 행렬은 다음과 같이 나뉜다.

$$X \cong \sum_{a=1}^A t_a p_a = |TP^T \quad (20)$$

Builds a model between X and Y thru the latent space

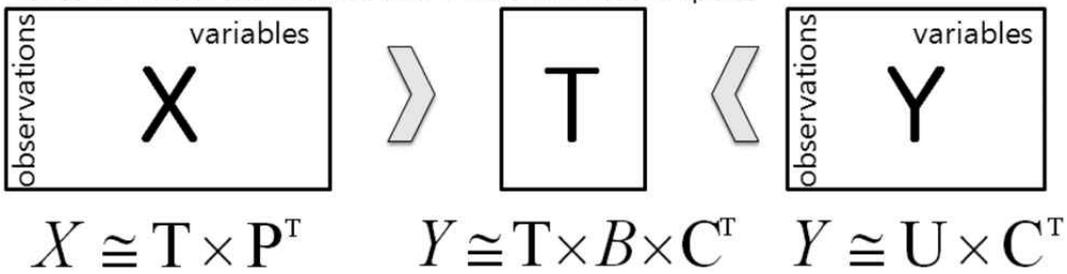


그림 2-46. PLS 모델링

$$Y \cong \sum_{a=1}^A u_a c_a^T = |UC^T \quad (21)$$

- T와 U 는 score 행렬, P 와 C 는 loading 행렬임. A개의 잠재변수(latent variables)를 갖는 모델은 cross validation을 이용하여 결정됨. 그리고 x-scores t_a 는 X 행렬(a = 1 일 때) 또는 X의 잔차 행렬(a > 1일 때)의 선형 조합이 됨.

$$t_a = X_{a-1} w_a, \quad X_a = X_{a-1} - t_a p_a^t \quad (22)$$

- 여기서 w_a 는 a 번째 잠재변수의 가중치 벡터임. 이는 다음과 같은 내적관계를 T와 U 사이의 공분산이 최대가 되도록 수행됨.

$$U \cong TB \quad (23)$$

- 여기서 B는 diagonal 행렬을 나타낸다. 결과적으로 PLS를 다음과 같은 예측모델로 나타낼 수 있음. PLS 예측 모델에 대한 모델링 절차는 그림 2-46를 참조할 수 있음.

$$Y \cong TBC^t = XW(P^T W)^{-1} BC^T \quad (24)$$

- PLS 방법은 정량적 분석 외에 정성적 분석법도 활용이 되는데 대표적인 방법이 PLS-DA(Partial Least Squares-Discriminant Analysis) 방법임. 기존의 PLS 모델과는 달리 PLS-DA는 종속변수로 연속적인 값 대신 판별하고자 하는 그룹들을 가상 변수로 설정하여 이를 판별 하는 회귀모델임. 본 연구에서는 건전종자와 퇴화종자를 판별하기 위해 PLS-DA 모델을 이용하였음. 또한 스펙트럼 X의 score 행렬 T와 측정된 농도 Y의 score 행렬 U의 관계식으로 구한 beta coefficient를 이용하여 초분광 영상에서 PLS 영상을 구성하고 이를 건전종자와 감염종자를 선별하는 영상 구성에 이용하였음. PLS 영상을 구하는 식은 아래와 같음. 모든 데이터 분석은 MATLAB(version 7.0.4, The Mathworks, Natick, MA, USA) 프로그램을 이용하여 수행됨.

$$PLS_image = \sum_{i=1}^n W_i H_i + constant \quad (25)$$

where, W_i : beta coefficients

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

Constant : beta coefficients constant

(바) LS-SVM(Least Squares-Support Vector Machine)

- 서포트 벡터기계(support vector machine; SVM)은 MIT 인공지능 연구실에서 개발되어 통계학, 생물정보학, 금융정보학, 데이터마이닝, 컴퓨터 과학 및 정보과학 등의 분야에서 분류 및 회귀함수추정을 위한 우수한 성능의 기법으로 많이 활용되고 있음. SVM은 원래 집단이 두 개인 경우 통계학적 이론을 배경으로 오분류율 (misclassification rate)을 최소화 시키는 최적분리 초평면 (hyperplane)을 제공함으로써 다양한 응용분야의 분류 및 회귀문제에서 우수한 성능이 입증되고 있음
- 최소제곱 서포트 벡터기계(least squares-SVM; LS-SVM)는 Suykens와 Vandewalle (1999)에 의해 제안된 분석방법으로 능형회귀 개념을 도입하여 SVM의 부등식 제한조건을 등식 제한조건으로 변환함으로써 수행됨. LS-SVM은 수행 능력이 SVM에 비슷할 뿐만 아니라 이차프로그래밍 문제를 선형방정식 (linear equations)문제로 해결하여 훈련 시간을 상당히 줄일 수 있는 장점이 있음

나. Raman 초분광 영상정보를 이용한 예측 모델 결과

- Raman 초분광 영상시스템으로 측정된 시료는 제1세부기간에서 제공받은 분석결과를 이용.
- Raman 초분광 영상 시스템을 통해 획득한 라만신호는 강한 레이저 강원에 의해 발생하는 형광신호 때문에 원래의 측정된 데이터를 사용하여 모델을 개발하는 것은 많은 어려움이 있음. 이에 형광신호를 제거하고 라만신호 만을 획득하기 위해 Polynomial 전처리 과정을 실시하였음. 이는 베이스라인을 맞추어 피크값을 계산하는 효과도 포함됨. Polynomial fitting의 경우 4, 5, 8, 12 그리고 16과 같은 다양한 차수의 분석방법이 존재함. 이 연구에서는 8th - order polynomial fitting을 이용하여 스펙트럼 데이터에 적용.
- 또한 감염여부 판별 모델의 정확도 향상을 위해 총 8가지의 전처리 방법이 적용됨. 이는 기기 및 외부환경의 간섭을 통해 발생하는 노이즈를 제거하고 깨끗한 신호를 획득하는 효과가 있음. 최적 모델 선정은 Accuracy가 높고, calibration과 prediction의 R2값의 편차가 적은 모델을 선정.
- 표 2-15는 종자별 감염여부를 가장 잘 판별할 수 있도록 개발된 최적 모델 결과를 나타냄.

표 2-15. Raman 초분광 시스템 스펙트럼을 이용한 PLS-DA와 LS-SVM 종자별 감염여부 최적 판별 모델 결과.

Analysis	Sample	Pre-processing	Data Divide	Class	Accuracy(%)
PLS-DA	Watermelon -CGMMV-	Savitzky_ golay_1st	Calibration	Healthy	99.8
				Infected	98.9
				Total	99.4
			Prediction	Healthy	99.8
				Infected	98.5
				Total	99.2
LS-SVM	Watermelon -CGMMV-	Savitzky_ golay_1st	Calibration	Healthy	98.8
				Infected	97.5
				Total	98.0
			Prediction	Healthy	98.7
				Infected	97.9
				Total	98.1

- 표 2-15에서는 CGMMV 에 감염된 수박종자의 라만 초분광영상 데이터를 1차 미분과 PLS-DA로 개발한 판별모델의 calibration과 prediction 분류 결과가 99.5%와 99.2%로 확인되었다. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 99.8%, 이병종자는 98.9%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 99.5%의 분류 정확도를 나타냄.
- 그림 2-47(a)에서는 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 99.8% 그리고 이병종자는 98.5%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 99.2%의 분류 정확도를 나타냄.
- 그림 2-47(b)는 CGMMV에 감염된 수박종자와 건전종자의 판별 모델의 파장별 가중치를 나타냄. 541 cm⁻¹, 779 cm⁻¹, 806 cm⁻¹, 879.9 cm⁻¹, 1272 cm⁻¹, 1300.9 cm⁻¹, 1406 cm⁻¹, 1708 cm⁻¹, 1754 cm⁻¹ 영역에서의 가중치가 다른 영역에 비교하여 상대적으로 높았음. 이 영역은 지방의 CH₃ 구조의 C-H stretch 진동모드의 1, 2차 배음대, 영향으로 사료됨.

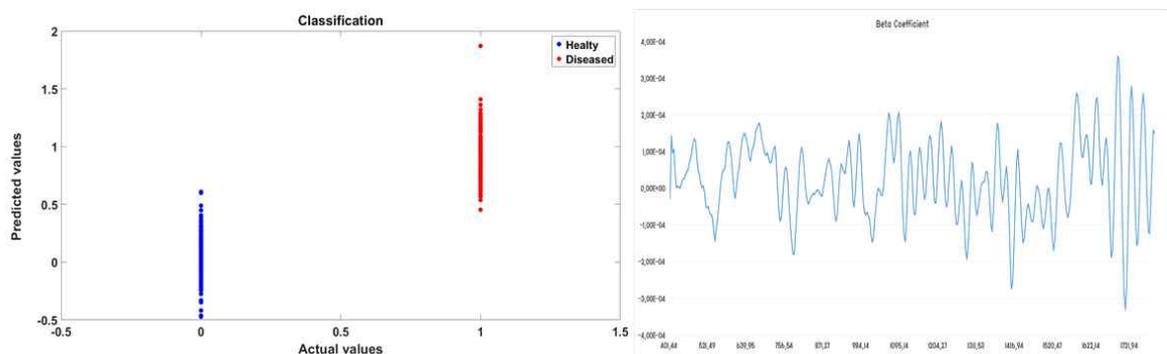


그림 2-47. (a) PLS-DA 이용한 수박종자의 Raman 초분광 영상 스펙트럼의 CGMMV 바이러스 감염 여부 판별, (b) 판별 모델의 파장별 가중치(beta coefficient)

- 표 2-15에서는 CGMMV 에 감염된 수박종자의 라만 초분광영상 데이터를 1차 미분과 LS-SVM로 개발한 판별모델의 calibration과 prediction 분류 결과가 98.0%와 98.1%로 확인됨. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 98.8%, 이병종자는 97.5%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 98.0%의 분류 정확도를 나타냄. 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 98.7% 그리고 이병종자는 97.9%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 98.1%의 분류 정확도를 나타냄.

다. SWIR 초분광 영상정보를 이용한 예측 모델 결과

- SWIR 초분광 영상시스템으로 측정된 시료는 제 1세부기간에서 제공받은 분석결과를 이용하여 데이터 판별분석(이병종자 및 정상종자)에 사용.
- 감염종자와 비감염종자의 평균스펙트럼은 미세한 차이가 발생하긴 했지만, 평균 스펙트럼만으로는 감염종자와 비감염종자를 구분하는 것은 불가능했음. 이에 감염종자와 비감염종자의 판별 모델을 구축하기 위해, PLS-DA, LS-SVM 분석통계 방법을 이용.

- SWIR 초분광영상은 Raman 데이터와 달라서 Polynominal은 사용하지 않았지만 감염 여부 판별 모델의 정확도 향상을 위해 총 8가지의 전처리 방법이 적용. 이는 기기 및 외부환경의 간섭을 통해 발생하는 노이즈를 제거하고 깨끗한 신호를 획득하는 효과가 있었음. 최적 모델 선정은 Accuracy가 높고, calibration과 prediction 의 R2값의 편차가 적은 모델을 선정함.
- 표 2-16은 종자별 감염여부를 가장 잘 판별할 수 있도록 개발된 최적 모델 결과를 나타냄.

표 2-16. SWIR 초분광 시스템 스펙트럼을 이용한 PLS-DA와 LS-SVM 종자별 감염 여부 최적 판별 모델 결과.

Analysis	Sample	Pre-processing	Data Divide	Class	Accuracy(%)
PLS-DA	Watermelon -CGMMV-	Savitzky_ golay_1st	Calibration	Healthy	99.8
				Infected	99.2
				Total	99.5
			Prediction	Healthy	99.8
				Infected	98.9
				Total	99.4
LS-SVM	Watermelon -CGMMV-	Savitzky_ golay_2nd	Calibration	Healthy	98.8
				Infected	97.3
				Total	98.1
			Prediction	Healthy	98.9
				Infected	97.9
				Total	98.4

- 표 2-16에서는 CGMMV 에 감염된 수박종자의 SWIR 초분광영상 데이터를 1차 미분 전처리와 PLS-DA로 개발한 판별모델의 calibration과 prediction 분류 결과가 99.5%와 99.4%로 확인됨. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 99.8%, 이병종자는 99.2%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 99.5%의 분류 정확도를 나타냄.
- 그림 2-48(a)에서는 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 99.8% 그리고 이병종자는 98.9%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 99.4%의 분류 정확도를 나타냄.
- 그림 2-48(b)는 CGMMV에 감염된 수박종자와 건전종자의 판별 모델의 파장별 가중치를 나타낸 그림이다. 1036 nm, 1153 nm, 1347 nm, 1424nm, 1664nm 영역에서의 가중치가 다른 영역에 비교하여 상대적으로 높았음. 이 영역은 CH, OH, and NH의 작용기에 의해 나타난 것으로 사료되며, 지방의 CH₃ 구조의 C-H stretch 진동모드의 1, 2차 배음대, 영향으로 사료됨.

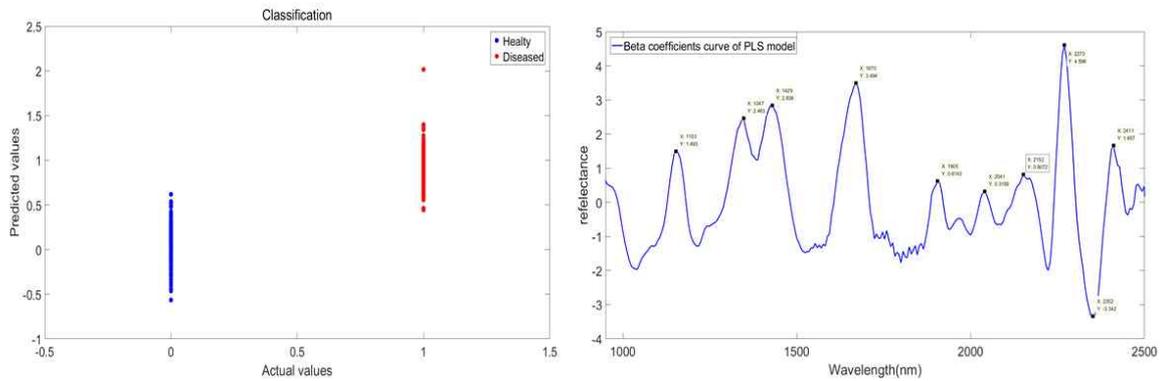


그림 2-48. (a) PLS-DA 이용한 수박종자의 Raman 초분광 영상 스펙트럼의 CGMMV 바이러스 감염 여부 판별, (b) 판별 모델의 파장별 가중치(beta coefficient)

- CGMMV 에 감염된 수박종자의 LS-SVM의 calibration과 prediction 분류 결과가 98.1%와 98.4로 확인됨. Calibration 결과에 따르면 건전종자는 98.8%, 이병종자는 97.3%의 정확도를 나타내었으며 전체적으로 98.1%의 분류 정확도를 나타냄. 모델 개발 검증 결과에 따르면 건전종자는 98.9% 그리고 이병종자는 97.9%의 정확도로 분류되었고 전체적으로 98.4%의 분류 정확도를 나타냄.

라. Raman 및 SWIR 초분광 영상정보의 융합 데이터를 이용한 판별

- Raman 초분광 영상 시스템과 SWIR 초분광 영상 스펙트럼을 융합하여 스펙트럼 분석을 실시함. 이는 2개의 시스템을 융합 시 판별결과를 알아보기 위해 실시함.

(1) 융합 스펙트럼 방식

- 두 개의 초분광 데이터 융합의 경우 두 가지 방법으로 진행. 첫 번째로 두 초분광 장치로부터 획득한 스펙트럼을 융합하여 분석을 실시. 이는 두 개의 장치로부터 획득한 스펙트럼의 융합을 통해 두 개의 장비가 융합되었을 때 기존의 방식대로 각각의 장비의 판별분석 결과와 차이가 있는지 알아보고자 함.

(2) 판별 로직 방식

- 두 번째 방법의 경우 각각의 장비에서 나온 데이터를 취합하여 최종결과를 도출, 판별을 진행. 라만 초분광 영상 시스템의 판별결과와, SWIR 시스템의 판별 결과를 병합하여 두 모델이 모두 감염종자라는 결과를 도출했을 경우 감염종자로 판별하고자 함.

- 표 2-17에서는 두 분광장치로 획득한 CGMMV 이병 수박종자의 초분광 데이터를 융합하여 PLS-DA와 LS-SVM으로 판별한 결과를 나타냄. 판별정확도의 경우 스펙트럼을 융합한 방법의 경우 1차미분을 전처리 방법으로 적용한 경우가 가장 높은 결과를 나타냈으며, PLS-DA 모델로 획득한 calibration과 prediction 분류 결과가 99.3%와 99.1%로 확인됨. LS-SVM의 모델의 경우 calibration과 prediction 분류 결과가 98.1%와 98.3%로 확인됨.

- 또한 표 2-18에서는 두 판별결과를 융합한 모델의 판별결과를 나타내었음. 역시 1차 미분 전처리가 가장 좋은 전처리 방법으로 나타났으며, PLS-DA의 경우 99.2%, LS-SVM의 경우 98.2%의 판별성능을 나타냄.
- 이는 표 2-15에서 나타낸 Raman 초분광영상 데이터의 판별결과 (PLS-DA(99.3%), LS-SVM(98.1%))와 표 2-16에 실은 SWIR 초분광영상 데이터의 판별결과 (PLS-DA(99.5%), LS-SVM(98.3%))에 비해 조금 낮은 정확도를 나타내는 결과임.
- 융합 데이터를 이용한 판별결과와 자세한 내용은 표 2-17, 2-18에 나타내었음.

표 2-17. SWIR 및 Raman 초분광영상 융합 스펙트럼 방식을 이용한 판별결과

Analysis	Sample	Pre-processing	Data Divide	Class	Accuracy(%)
PLS-DA	Watermelon -CGMMV-	Savitzky_ golay_1st	Calibration	Healthy	99.3
				Infected	99.1
				Total	99.2
			Prediction	Healthy	98.1
				Infected	98.3
				Total	98.2
LS-SVM	Watermelon -CGMMV-	Savitzky_ golay_1st	Calibration	Healthy	99.3
				Infected	99.1
				Total	99.2
			Prediction	Healthy	98.1
				Infected	98.3
				Total	98.2

표 2-18. SWIR 및 Raman 초분광영상 판정로직을 이용한 판별결과

Analysis	Sample	Pre-processing	Data Divide	Class	Accuracy(%)
PLS-DA	Watermelon -CGMMV-	Savitzky_ golay_1st	Calibration	Healthy	99.3
				Infected	99.1
				Total	99.2
			Prediction	Healthy	98.1
				Infected	98.3
				Total	98.2
LS-SVM	Watermelon -CGMMV-	Savitzky_ golay_1st	Calibration	Healthy	99.3
				Infected	99.1
				Total	99.2
			Prediction	Healthy	98.1
				Infected	98.3
				Total	98.2

- 두 개의 초분광 데이터 융합의 경우 스펙트럼을 융합한 방법이 두 개의 초분광 데이터 융합의 경우 스펙트럼을 융합한 방법 (99.2%)과 판정로지 방법(99.2%)이 개별 파장 사용 모델정확도 (SWIR : 99.4%, Raman : 99.3%)와 비슷한 정확도를 나타내는 것으로 나타남.
- 라만 및 SWIR 초분광시스템의 융합시스템과, 개별시스템이 유사한 판별결과를 보임. 이는 융합시스템(융합 스펙트럼, 판별로지방식)의 상이한 획득원리(산란을 이용하는 라만, 반사광을 획득하는 SWIR), 이중 스펙트럼의 상이한 인텐서티 및 피크 영역대로 인하여 정확도의 향상에 한계가 있었던 것으로 판단됨. 따라서, 두 판별방식을 융합하는 하이브리드 알고리즘의 사용은 높은 생산비용과, 정확도 향상을 기대하기 어려울 것으로 판단됨. 또한 Raman 초분광 방식의 경우 SWIR 초분광영상 방식보다 높은 설계비용으로 인하여, 상업화를 목적으로 한 설계에는 한계가 있음을 확인함
- 이에 본 연구에서는 SWIR 초분광영상 장치가 이병종자의 판별에 가장 적합한 장치로 판단, 실시간 종자 선별 시스템의 모델 및 시스템 설계를 실시함

마. 파장별 가중치의 선형모델을 활용한 병원체 맵핑 및 판별결과 디스플레이

- 추출한 각 픽셀에 대한 분석은 PLS-DA를 적용하여 판별 모델을 개발하였음. 또한 최적으로 제안된 모델의 beta coefficient를 이용하여 PLS 영상을 구성하였고 PLS 영상은 아래의 식에 의해 구할 수 있음.

$$PLS_image = \sum_{i=1}^n W_i H_i + constant \quad (4)$$

where W_i : beta coefficients

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

constant : beta coefficients constant

- PLS 영상에 영상처리를 이용하고 임계값을 적용하여 감염종자 검출 알고리즘을 개발하였음. 감염된 수박종자를 검출하는 영상처리 과정은 그림 2-49과 같음. 832 nm의 파장영상을 이용하여 종자를 제외한 나머지 배경을 제거한 마스킹 이미지를 만들고, 마스킹 영상은 종자 영역은 '1' 이고 종자를 제외한 나머지 영역은 '0' 값을 가지도록 설정함. 이치화된 마스킹 이미지에 건전종자와 퇴화종자를 판별하는 PLS 모델의 beta coefficient를 전사(projection)연산을 이용한 PLS 영상을 곱하기 연산하여 새로운 데이터의 판별결과를 영상으로 확인하도록 처리함.
- 이후 PLS 모델의 결과값을 도출, 건전종자와 퇴화종자를 판별하는 기준을 임계값으로 적용하여 퇴화종자만 검출하는 최종 결과 영상을 얻을 수 있었음. 또한 픽셀수를 고려한 영상처리로 정확도를 높였음. 판별정확도와 종자의 평균 크기(픽셀수)또한 고려하여 검출 알고리즘을 개발하였으며, 퇴화종자 판별식을 나타내면 아래와 같음.

$$Y = (X - 3\sigma) \times A \quad (5)$$

where X : Mean of seed size

σ : Standard deviation of seed size

A : Classification accuracy of PLS model

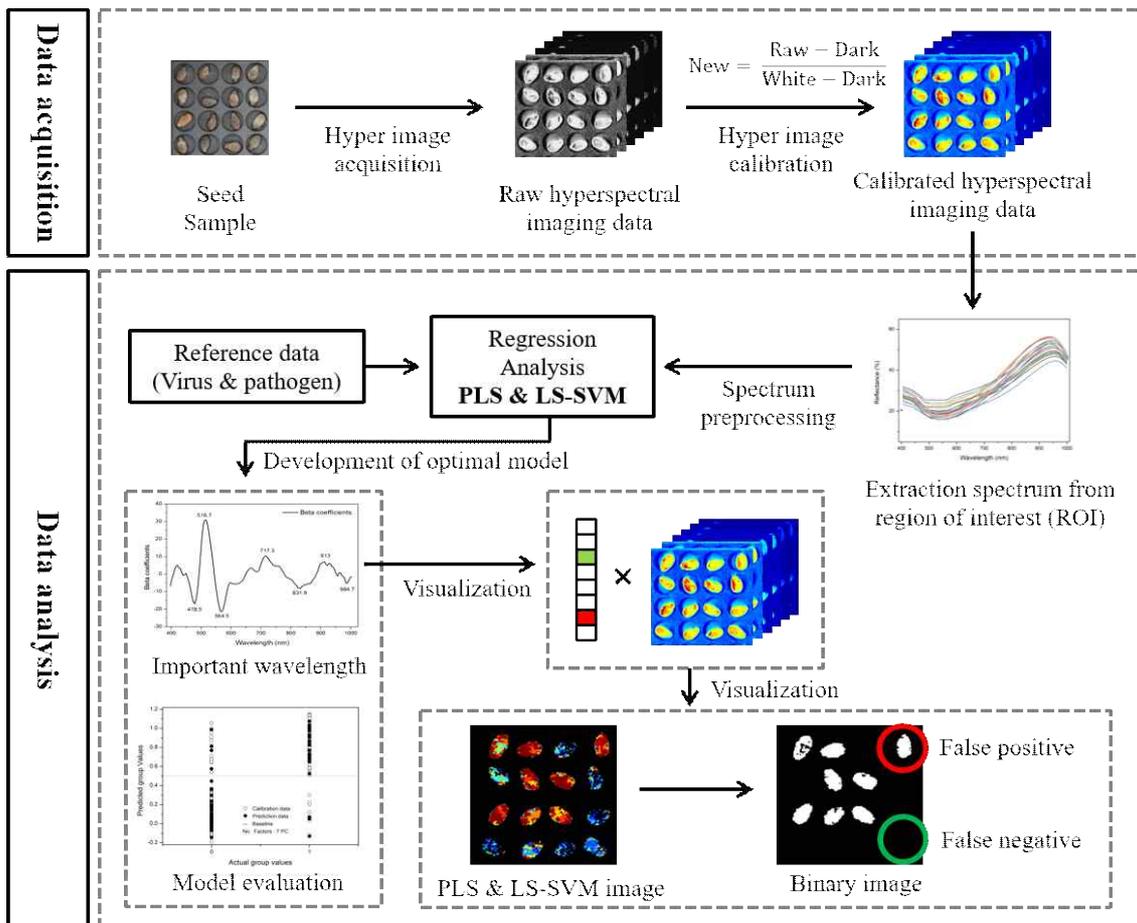


그림 2-49. 초분광 영상 시스템을 이용한 초분광 이미지의 분석과정

- PLS-DA(Partial Least Squares-Discriminant Analysis) 방법을 이용하여 영상에 적용하였음. PLS-DA는 기존의 PLS와 달리 종속변수로 연속적인 값 대신 판별하고자 하는 그룹들을 가상 변수로 설정하여 이를 판별할 수 있는 다변량분석모델.
- 본 연구에서는 건전종자와 퇴화종자를 판별하기 위해 PLS-DA 모델을 개발하고 이용하였음. 또한 스펙트럼 X의 score 행렬 T와 측정된 농도 Y의 score 행렬 U의 관계식으로 구한 beta coefficient를 이용하여 초분광 영상에서 PLS 영상을 구성하고 이를 발아종자와 불발아 종자를 선별하는 영상 구성에 이용.
- 본 연구에서는 수박의 건전종자와 감염종자를 판별하기 위한 PLS-DA 모델 개발 시 불발아 종자의 스펙트럼 그룹을 가상변수 '0' 로, 발아 종자의 스펙트럼 그룹을 가상변수 '1' 로 설정하여 모델을 개발.

- 두 그룹을 판별하기 위한 문턱값은 두 그룹의 가상변수의 중간값인 0.5를 기준으로 하였다. 개발된 모델에 의한 예측 결과값이 0.5보다 낮으면 불발아 종자, 0.5보다 높으면 발아 종자로 판단하였음(Johan et al., 2008). 따라서 불발아종자의 예측 결과값이 '0'에 가깝고 발아 종자의 스펙트럼 예측 결과 값이 '1'에 근접할수록 모델의 판별 성능이 우수하다고 볼 수 있음.
- 이에 PLS-DA 분석을 통한 최적의 파장을 선정하여 배경을 제거한 Masking image를 구성하였으며 PLS-DA 모델을 이용하여 문턱값 0.5를 사용, 건전종자와 감염종자 분류(그림 2-50, 2-51, 2-52).
- 이후 이미지의 픽셀값의 면적값을 이용하여 설정된 픽셀 이미지보다 큰값은 통과시키고 작은값은 통과시키는 필터를 이용하여 최적화된 도출영상을 획득할 수 있었음.

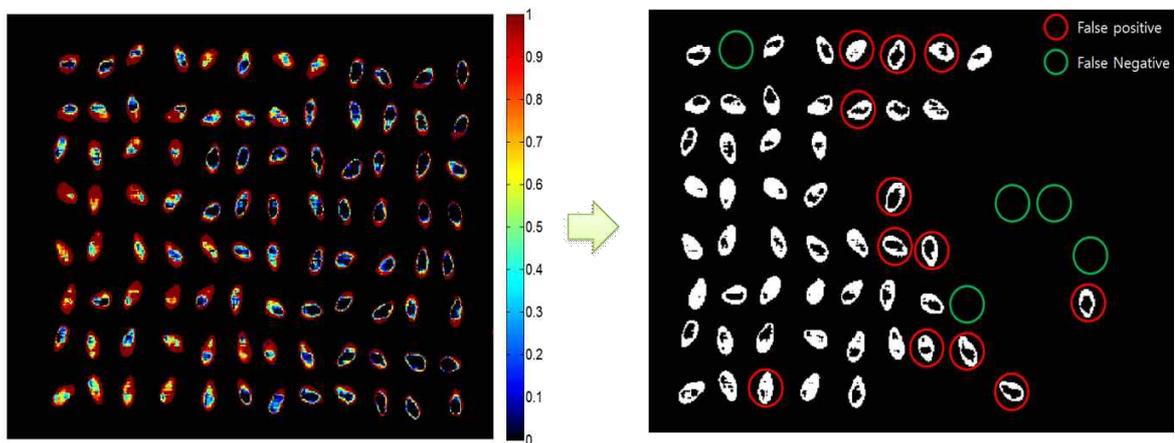


그림 2-50. Raman 초분광 스펙트럼의 영상분석결과

- Raman 초분광 시스템의 스펙트럼의 샘플종자의 경우 96립의 샘플을 적용하였으며, 정확도는 전체 96립 중 오검출 20립으로 79.1%의 정확도를 보였음. 검출 결과 영상 및 발아시험 결과는 그림 2-50과 같음.

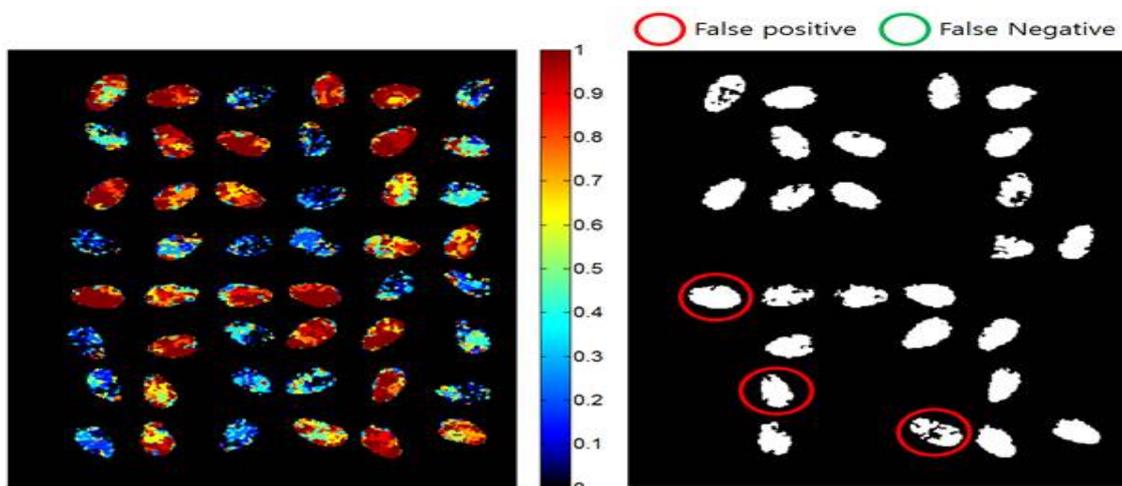


그림 2-51. SWIR 초분광 스펙트럼의 영상분석결과

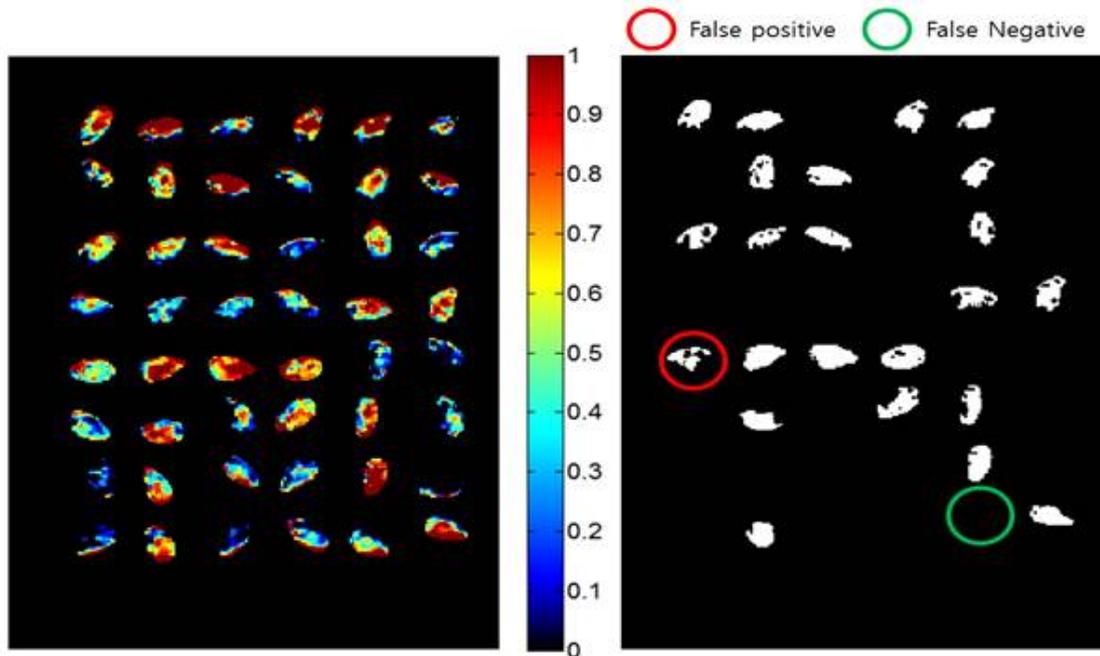


그림 2-52. SWIR 초분광 스펙트럼의 영상분석결과

- 그림 2-51과 2-52에서 좌측 칼라영상은 사용된 샘플 49립의 PLS영상. 우측 이치화영상은 판별결과를 나타내었으며, 녹색원은 false positive 적색원은 false negative를 나타냄. SWIR 초분광 시스템의 스펙트럼의 샘플종자의 경우 종자별로 48립씩 2개의 Plate를 적용하였으며 (그림 2-51, 2-52), 첫 번째 plate의 경우 (그림 2-51) 정확도는 전체 48립 중 오검출 3립으로 95.8%의 정확도를 보였음. 두 번째 plate의 경우 (그림 2-52) 전체 96립중 오검출 2립으로 전체 97.9%의 정확도를 보였으며, 두 결과 평균 96.8%의 판별 정확도를 확인함.

바. 실시간 이병종자 판별시스템 구축

- 위에서 수행한 기초 연구를 바탕으로 개발한 이병종자 판별모델을 온라인 시스템에 적용하였으며 온라인 시스템의 운영방식은 다음과 같음 (그림 2-53).
- 오른쪽에 위치한 호퍼를 통해 판별할 종자를 투입하고, 바이브레이터를 통과하면서 정렬됨. 개발된 판별시스템의 전장은 100 cm이며, 길이는 변경이 가능함.
- 정렬된 종자는 8열로 설계된 컨베이어 벨트를 통해 이송되며, 이송 속도는 1.4cm/s로 운영됨.
- 이송된 종자를 100 와트의 할로젠 램프가 장착된 초분광 카메라 시스템으로 촬영. 초분광 영상시스템은 950-2500 nm의 파장과 320 x 256 의 영상을 갖추고 있으며, 촬영된 영상은 MCT센서로 감지. 개발된 선별 모델을 이용하여 솔레노이드와 블로어로 구성된 배출단에서 선별된 종자를 분리 배출.

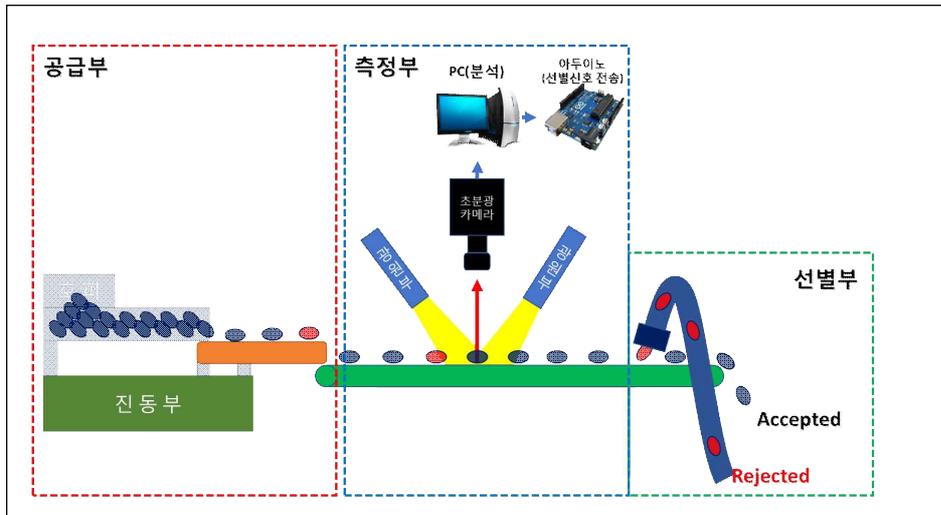
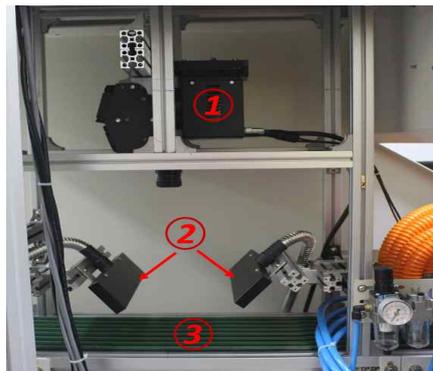


그림 2-53. 온라인 판별시스템 구성 및 운영도

- 그림 2-54에서는 개발된 온라인 이병종자 판별시스템 구성 및 실제 적용 과정을 나타냄.
- 컨베이어 벨트를 따라 이송된 종자는 초분광 카메라와 100와트 조명장치를 거치면서 반사 이미지를 획득. 획득된 초분광 종자 영상을 이용하여 배경 제거 및 ROI설정을 위한 영상처리 알고리즘을 적용하여 종자영상만 획득. 개발된 PLS-DA beta coefficient를 종자 영상에 적용하여 바이러스 이병종자를 판별. 설정된 문턱치에 따라 정상종자와 이병종자를 구분하는데 말단에서는 솔레노이드로 판별된 이병종자를 흡입.



1. 초분광카메라
2. 선형조명
3. 컨베이어벨트
4. 할로겐 광원 (100W)

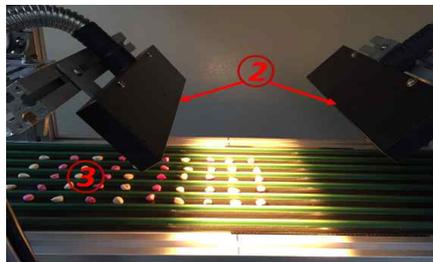


그림 2-54. 온라인 이병종자 판별시스템 카메라 및 조명 시스템

사. PLS 영상을 이용한 실시간 판별 소프트웨어 개발

- SWIR 초분광 영상과 PLS-DA모델을 이용하여 모델값을 영상에 적용하여 개발된 판별모델을 이용하여 실시간 판별 소프트웨어를 개발하였음. 사용자 편의성을 고려하여 만들어진 이 소프트웨어는 실시간으로 초분광 영상의 획득이 가능하며, 판별된 결과 영상을 실시간으로 디스플레이함.
- 컨베이어 벨트의 7라인에 맞추어 세팅되었으며, 컨베이어의 위의 샘플의 이미지를 획득하고 PLS-DA판별분석을 실시, 결과값을 계산하여 건전종자와 감염종자를 판별하고 사용자에게 판별결과를 디스플레이 해줌 (그림 2-55). 초당 14 종자의 선별이 가능하며, 카메라와 모델값의 교환을 통해 원하는 영역대와 샘플의 선별이 가능함.
- 단파적외선 초분광 시스템의 통합 시스템의 경우, 제어창을 통해 카메라의 노출시간과 스텝수와 스텝간격, 컨베이어 벨트, 카메라 센서와의 연동 및 측정영상의 프레임 크기 설정이 가능하며, 측정된 이미지가 표시되는 결과표시창을 통해 측정되는 초분광 이미지의 확인이 가능함.
- 또한 측정되는 샘플의 판별결과를 실시간으로 확인해줌. 초분광 영상의 정확도를 향상시키기 위해 Bad pixel를 제거하기 위한 Pixel Correction 기능을 개발하여 획득되는 초분광 이미지의 정확도를 향상시켰으며, 초분광 이미지의 저장 기능을 통해 획득한 이미지를 원하는 경로에 저장이 가능함.

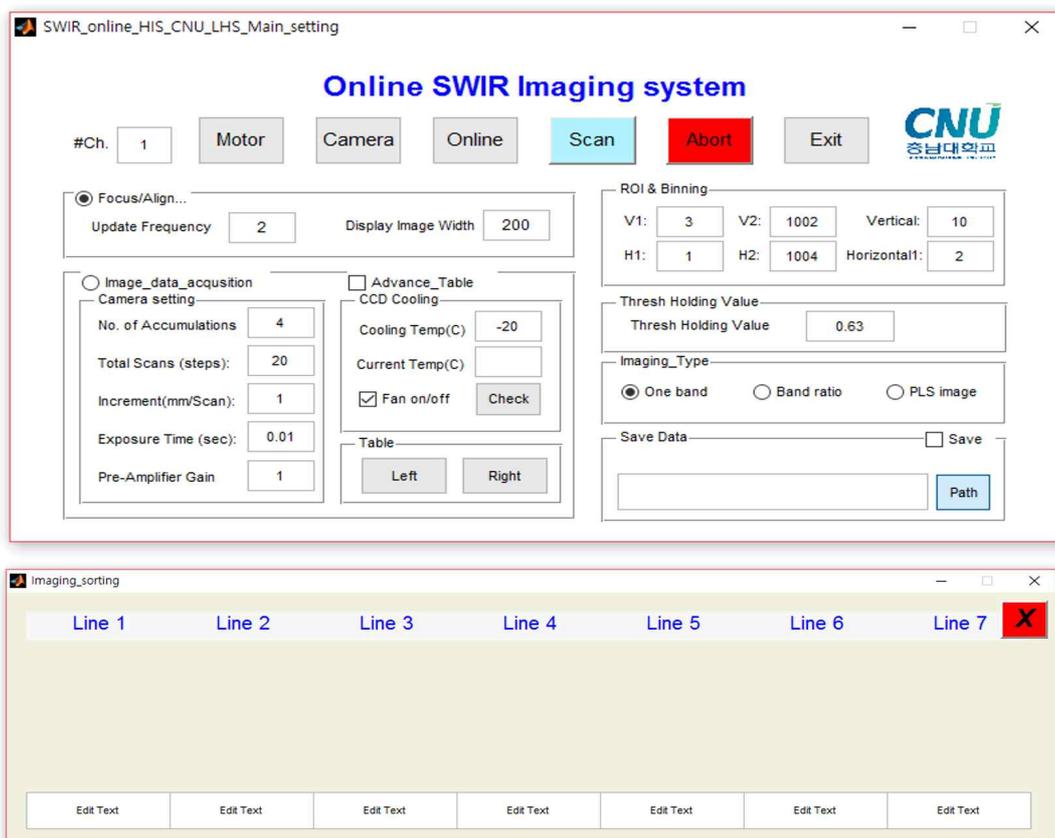


그림 2-55. PLS 영상을 이용한 실시간 판별 소프트웨어

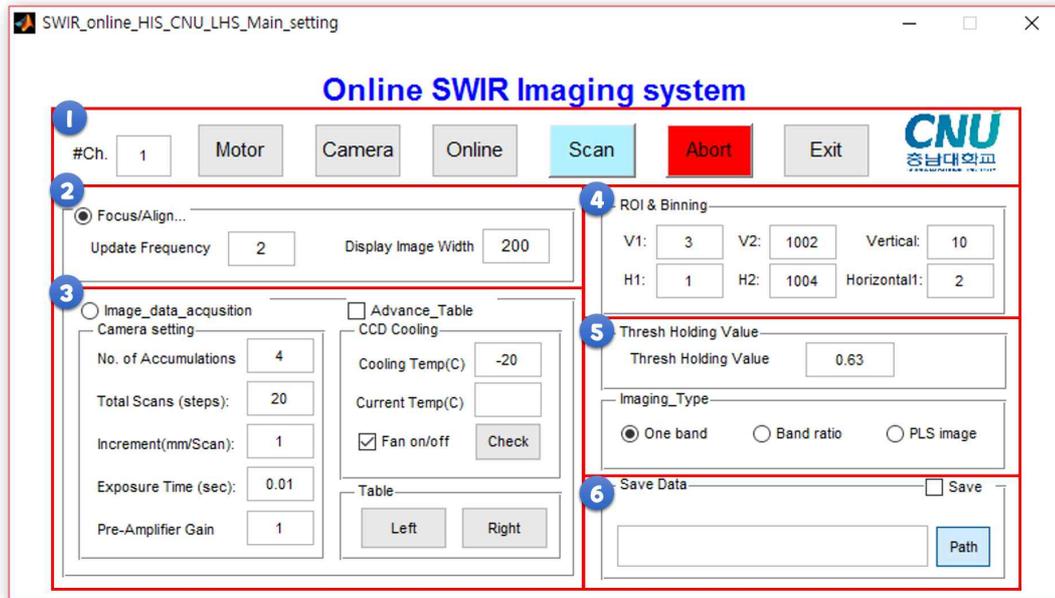


그림 2-56. PLS 영상을 이용한 실시간 판별 소프트웨어 메뉴

- 개발된 소프트웨어의 기능은 다음과 같음(그림 2-56).

- ① 메뉴창 : 초분광 카메라, 컨베이어 벨트와의 연결을 관리하는 메인메뉴. 카메라의 포트설정, 실시간 초분광 영상 확인 및 판별분석의 실행이 가능.
- ② 카메라 제어 : 카메라의 신호 및 영상의 크기의 설정이 가능.
- ③ 이미지 설정 : 획득되는 영상을 관리하는 세부메뉴. 영상의 스캔수와 컨베이어의 속도 그리고 Exposure time과 Gain의 설정값의 입력이 가능. 또한 최적의 영상획득을 위해 카메라의 온도설정이 가능.
- ④ 이미지설정2 : 초분광 영상의 관심영역의 추출이 가능. 이는 초분광 전체의 영역중 샘플영역만의 추출을 통한 샘플의 데이터 획득 및 처리량의 감소를 통한 선별속도의 증가가 가능.
- ⑤ 판별분석 설정 : 판별분석의 모델선택 및 선별을 위한 문턱값의 설정이 가능.
- ⑥ 데이터 저장 : 초분광 이미지 및 판별결과를 저장 가능.

아. 배출부 시스템 개선

- 위의 결과에서처럼 온라인 판별 시스템을 통하여 판별된 결과를 바탕으로 종자를 처리별로 선별하기 위해 배출구를 아두이노를 이용하여 솔레노이드를 제어하도록 제작. 기존 배출구의 설계는 air-blow방식이었지만 온라인 시스템에는 suction방식을 도입하였으며 본 연구에 사용된 아두이노의 형식은 다음과 같음.

- 표 2-19는 사용된 아두이노의 형식을 나타내며, 그림 2-57는 온라인 판별 시스템의 컨트롤 박스에 설치한 아두이노를 나타냄. 아두이노의 작동 방식은 다음과 같음.

표 2-19. Technical specification of Arduino

Micro controller	ATmega328P
Operating voltage	5V
Input voltage (recommended)	7-12V
Input voltage (limit)	6-20V
Digital I/O Pins	14(of which 6 provide PWM output)
PWM Digital I/O Pins	6
Analog input Pins	6
DC Current per I/O Pin	20 mA
DC Current for 3.3V Pin	50 mA
Flash Memory	32 KB (ATmega328P) of which 0.5KB used by bootloader
SRAM	2 KB (ATmega328P)
EEPROM	1 KB (ATmega328P)
Clock speed	16 MHz
Length	68.6 mm
Width	53.4 mm
Weight	25 g



그림 2-57. 제어판에 설치된 임베디드 아두이노의 실제 모습

- 그림 2-58에는 종자의 영상획득과 판별의 결과를 하드웨어 상에 적용하는 과정을 나타내고 있음. 컨베이어 벨트에 정렬된 종자가 초분광 영상분석장치로 투입되고, 획득한 초분광 영상을 처리 후 판별식으로 각 종자별 판별 결과를 아두이노에 전달. 0과 1로 전달된 판별결과를 릴레이모듈에 연결된 솔레노이드에 전달. 우선 위의 전달 과정을 통해 신호 변조를 통해 판별식으로 판별된 종자는 펌프를 통해 최종적으로 선별. 솔레노이드를 통해 펌프를 작동시키면 대조구(정상종자)는 배출구를 통해서 선별되고, 처리구(이병종자)는 자유낙하하도록 배출구를 나눔.

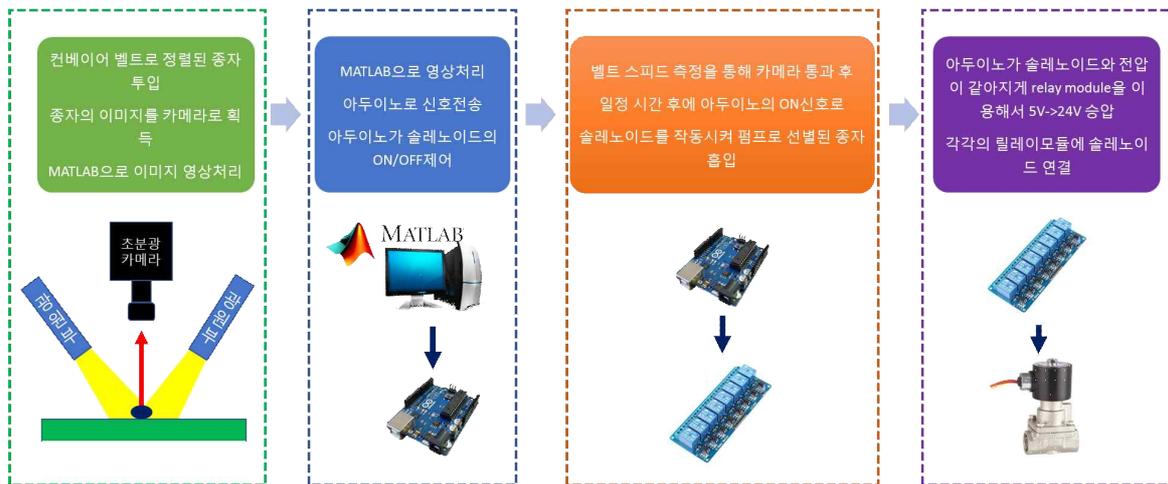


그림 2-58. 아두이노의 신호전달 체계도

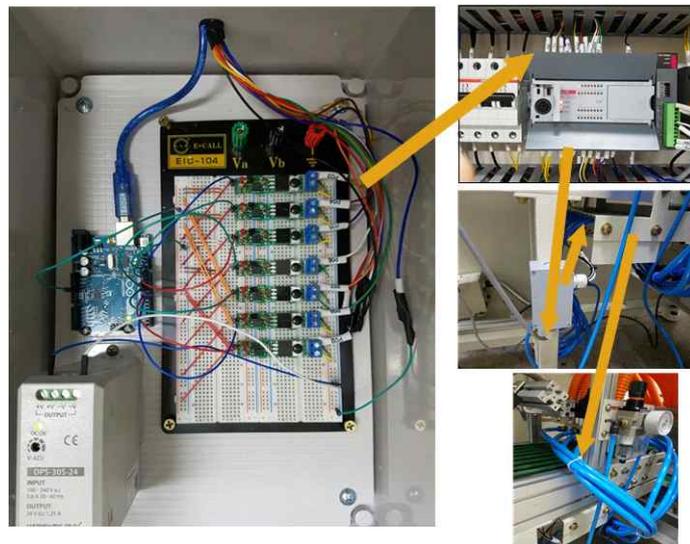


그림 2-59. 아두이노를 이용한 배출부의 실제 신호전달 순서

- 그림 2-59에는 그림 2-58의 순서로 신호전달과정을 통해 판별된 종자를 펌프로 흡입하는 과정을 실제 시스템에 부착된 장비간의 전달과정을 나타냄. 노란 선은 장비간 신호전달과정을 나타내며 마지막 청색 파이프를 통해서 선별 종자를 흡입하게 됨.
- 그림 2-58에는 판별 시스템의 사진과 신호 전달과정을 나타냄. 아두이노에 전달된 신호는 릴레이모듈로 솔레노이드에 전달되고 펌프에 신호를 보내어 목표 종자를 파이프를 석션하여 최종 배출하게 됨. 컨베이어 벨트의 이송속도에 맞추어 최종판별결과가 아두이노에 전달될 수 있도록 이송속도의 모니터링을 계속 진행하게 됨.

자. 개발 시스템 현장 적용시험 및 성능분석

- 개발 시스템의 성능분석을 위해 이병종자를 무작위로 선정하여 blind test를 실시함. 샘플의 경우 총 400립을 이용하여 분석을 실시하였으며, 바이러스의 감염 유무의 경우 시스템을 통한 선별 후, 제1세부 연구기관으로부터 결과를 확인함. 분석결과의 경우 총 400립중 295립이 바이러스에 감염되었으며 105립이 건전 종자임을 확인함.
- 개발 시스템으로 측정된 결과와 분석 결과값을 비교하여 시스템의 성능분석을 실시한 분석결과는 시스템 정확도는 감염종자의 경우 295립중 273립이 정분류되어 92.5%를 나타내었으며, 건전종자의 경우 105립중 98립이 정분류 되어 93.3%의 정확도를 나타냄. 이는 전체적으로 92.9%의 정확도를 나타내었으며, 결과는 표 2-20에 나타냄.

표 2-20. SWIR 개발 시스템의 blind test를 이용한 분석결과 (N=400)

Analysis	Sample	Data Divide	Class	Accuracy(%)
SWIR 선별시스템	Watermelon -CGMMV-	Calibration	Healthy	92.5
			Infected	93.3
			Total	92.9

차. 초분광 SWIR장치를 이용한 이병종자판별기의 시연회 시행

- 개발 시스템의 성능점검 및 성능 향상을 위한 토론을 위해 시연회를 2017년 1월 8일 충남대학교 농생대에서 개최. 농림축산검역본부, 농우바이오, 경희대학교, (주)빌리언 21, 충남대학교에서 참석하여 실시한 이 시연회는 종자 선별기의 전체적인 원리와 알고리즘에 대해 설명하고, 직접 종자를 선별하는 과정을 시연(그림 2-60).
- 시연 후에는 개발된 종자판별기 향상을 위한 의견을 듣기위해 설문지를 이용하여 의견을 수렴하였으며, 설문지의 경우 작업편리성, 작업속도, 장치크기, 보급필요성, 보급시기의 항목을 ①매우그렇다 ~ ④그렇지않다, 의 4가지 항목으로 응답을 받았다. 이후 각각의 항목의 설문응답을 평균과, ① ~ ④까지 25 ~100점까지 가중치를 곱하여 종합. 설문지의 항목과 종합점수는 표 2-21과 같음.



그림 2-60. 초분광 SWIR장치를 이용한 이병종자판별기의 시연회 시행

표 2-21. 초분광 SWIR장치를 이용한 이병종자판별기의 시연회 설문지 결과

설문지 항목	평균	가중치
작업 편리성은 어떠하다고 생각하십니까? ①매우편리 ②편리 ③보통 ④불편	1.63	81.3
작업속도는 어떠하다고 생각하십니까? ①매우신속 ②신속 ③보통 ④느림	2.63	59.4
장치의 크기는 어떠하다고 생각하십니까? ①매우적합 ②적합 ③보통 ④부적합	2.25	68.8
보급필요성은 어떠하다고 생각하십니까? ①매우필요 ②필요 ③보통 ④불필요	1.13	96.9
보급시기는 어떠하다고 생각하십니까 ①지금당장 ②1~2년후 ③3~4년후 ④기타	2.25	68.8

- 표 2-21은 초분광 SWIR장치를 이용한 이병종자판별기의 시연회 후에 설문지를 통하여 획득한 결과를 종합하여 나타냄. 항목의 경우 보급필요성은 96.9점으로 가장 높은 점수를 나타냈으며, 작업 편리성 또한 81.3점으로 높은 점수를 나타냄. 보급시기의 경우 1~2년후의 항목을 선택한 사람이 가장 많았으며, 장치의 크기의 경우 68.8점으로 적합쪽에 조금 더 가까웠음. 장비의 속도의 경우 59.4점으로 신속에 조금 더 가까웠으나 속도증가의 필요성이 요구됨. 기타 건의사항으로는 대형기기와 휴대형 소형기기의 형태의 이분화와, 묘목이나 해충에 대한 적용항목이 있었음. 향후 개발 진전을 이루어 공인인증시험서를 제출할 계획임

제3절 병원성세균 감염 종자 신속·전수 검사 기반 기술 개발 (제1협동)

1. 병원성 세균 종자감염 및 이병종자 공급

가. 인공접종에 사용할 균주선정 및 항생제 마커 도입

- 인공접종 후 접종균주의 수를 판별하기 위해 필수적임.
- 수박 종자전염성세균: rifampicin(50ug/ul)에 저항성인 *Acidovorax citrulli* (수박과실썩음병원균) 제작
- 토마토 종자전염성세균: spectinomycin(25ug/ul)에 저항성인 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm, 토마토퀘양병) 제작, GFP로 tagging된 Cmm 제작 (neomycin 저항성)



그림 3-1. Rifampicin 저항성 *A. citrulli*(좌)와 GFP로 tagging된 neomycin 저항성 Cmm(우)

나. 인공접종 실험에 쓰일 종자 확보

- 수박종자는 국내 농가에서 많이 쓰이고 있는 농우바이오의 “스피드플러스” 종자로 선정
- 토마토종자는 토마토모자이크바이러스, 시들음병, 뿌리혹선충, 반점병 등에 다양한 내병성을 지녔다고 알려진 농협종묘의 “슈퍼에이스” 토마토 종자로 선정



그림 3-2. 사용한 수박종자(왼쪽)와 토마토종자 모습(오른쪽)

다. 기존에 보고된 채소종자에 병원세균 인공접종법 조사

- 진공접종법이 25년 전부터 간간히 사용되어져 왔는데, 아래 표 3-1 참조.

표 3-1. 기존에 보고된 종자 병원세균 진공접종법 비교

No.	저자	발행년	대상작물	접종농도 (CFU)	vacuum 방법	접종균주
1	J. Tsiantos et al.	1986	Tomato	1~3*10 ⁹	30min.	<i>Cmm</i>
2	K. E. Bett & T. E. Michaels	1990	Navy bean	48시간	10min.	<i>X. campestris pv. phaseoli</i>
3	G. Kritzman	1991	Tomato	1*10 ⁸	30min.	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>X. campestris pv. vesicatoria</i> , <i>Cmm</i>
4	A. Darrasse et al.	2010	Bean	1*10 ⁶	2min after 30min. Soaking	<i>Xanthomonas sp.</i>
5	W. P. Wechter et al.	2011	Melon	4~5*10 ⁸	30s 3times and 5min. Holding	<i>Acidovorax citrulli 200-6</i>
6	K. L. Johnson et al.	2011	Watermelon	1*10 ⁸	20min.	<i>Acidovorax sp.</i>

- 모든 경우 균주 접종을 위해 해당 시간만큼 1회씩 진공 처리

라. 진공을 이용한 인공접종법 확립

(1) 수박종자 진공접종 방법

- 왼쪽에 있는 용기에 접종원 60ml(OD₆₀₀ = 0.1, 대략 10⁸ cfu/ml)을 넣고 수박종자를 침지시킨 Petri dish(150mm x 20mm)를 넣고 아래의 진공 펌프(오른쪽 그림; Rocker410, SPARMAX, Taiwan)를 작동함.



그림 3-3. 진공펌프(왼쪽)와 진공접종 용기(오른쪽)

- 진공펌프의 압력이 최대(760 mmHg)에 도달한 후 5, 15, 30분씩 유지시킨 후 펌프의 작동을 멈추고, 빨간색 밸브를 열어서 공기압을 생성시켜서 세균을 종자내로 유입시킴. 또한 펌프의 작동을 1회에서 10회까지 변화를 주어 접종효율도 측정함.
- 종자를 균액으로부터 건져내어 10% 락스 희석액에 30초 소독 및 증류수에 1분씩 두 번 세척하여 표면 살균 후 filter paper 위에서 2일 정도 건조시킴.
- 건조 후 병원세균 검정을 진행함.

(2) 이병종자의 병원세균 검정 방법

- 앞의 그림에서처럼 유산지 위에 접종 후 건조시킨 종자 1립을 올려놓고, 유산지를 대각선 방향으로 말아 올림.
- 말아 올린 유산지 위를 망치 등을 통하여 살짝 두들겨 주어 종자를 마쇄한 후 1.5ml centrifuge tube에 마쇄된 종자를 떨어 넣고 10mM MgCl₂ buffer 500ul 첨가함.
- 30분 동안 진탕배양한 후 항생제가 들어있는 고체배지에 100ul의 혼탁액을 도말하여 26도에 배양함.
- 배양 후 2일 정도 후에 세균수를 측정함.

(3) 진공접종 결과

- 기존 진공처리 예시들과 예비실험 결과 5분 진공처리가 1분 처리보다 좋았고, 5분씩 여러 번 반복하는 것보다 1번 처리하는 것이 효과가 좋은 것으로 나타남. 이를 바탕으로 수박종자에 병원성 세균을 5분, 15분, 30분씩 한 번 진공처리 하였음(대조군은 세균액에 30분간 침종 후 동일과정을 진행한 종자들임).

표 3-2. 진공접종 효율 검정을 위한 진공처리시간, 종자수 및 반복수

진공처리시간	Control (30min)	5min	15min	30min
실험횟수				
1차	10개, 1반복	40개, 2반복	40개, 2반복	40개, 2반복
2차	40개, 2반복	40개, 2반복	40개, 2반복	40개, 2반복

- 진공처리시간이 증가할수록 개별종자별 접종 병원세균 수도 평균적으로 증가하였는데, 5분 정도의 진공처리로도 검정용 이병종자 확보가 가능하였음.

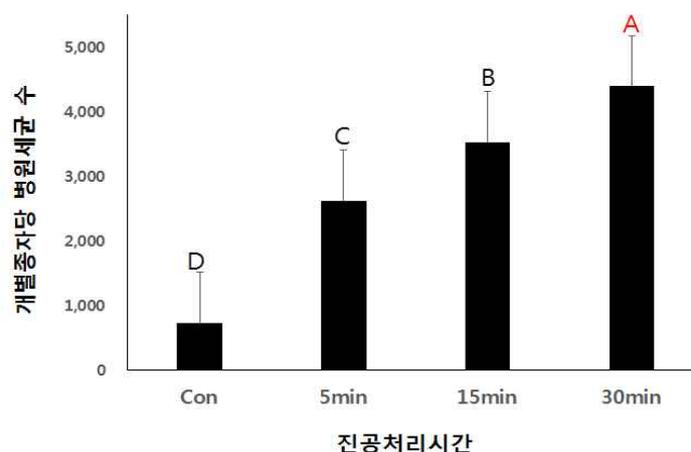


그림 3-4. 진공처리시간에 따른 개별종자별 접종된 병원세균 수. 세균수 평균값을 표시하였고, error bar는 standard error를 의미함.

- 접종된 개별종자들의 병원세균수에 따른 분포를 보면 아래 그림과 같음.

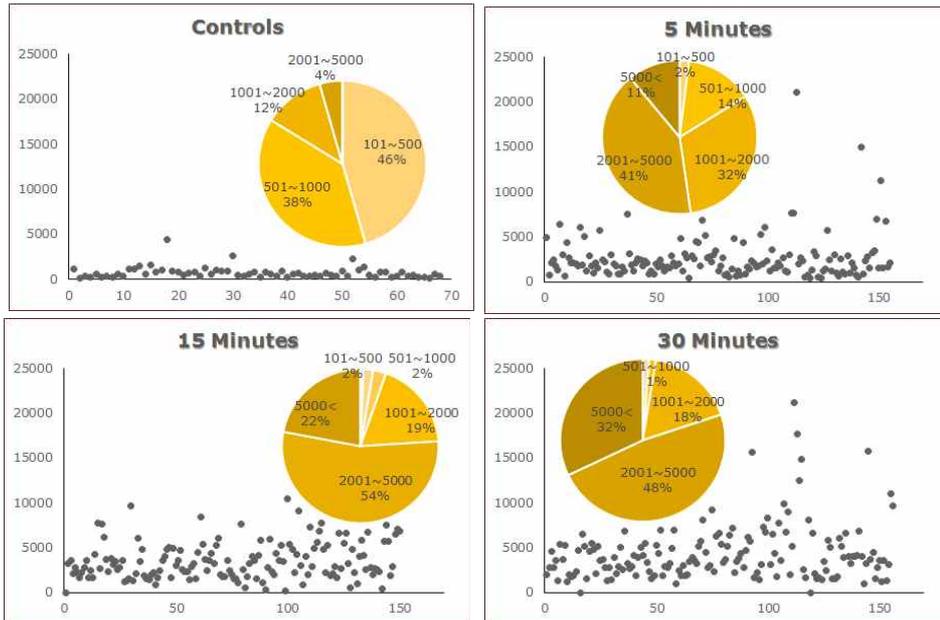


그림 3-5. 개별종자들에서 접종된 병원세균수의 분포 및 비율.

* 분포도의 x축은 종자 당 유입된 병원성 세균의 개체 수를, y축은 각 종자의 번호를 의미함.

* 원형그래프는 해당 유입된 세균 개체 수당 종자의 수를 비율적으로 나타낸 것임.

- 결과적으로 5분 접종보다 30분 접종에서 접종률이 더 좋았고, 이 이상 길게 접종하는 것은 시간 지체 및 기기 과부하 등의 부작용이 있어 효율이 떨어질 것으로 예상됨.
- 같은 방법으로 토마토종자에서의 조건을 확립하는 중에 있음. 수박 종자와 같이 사전 조사를 실시하였는데 종자 간의 특성 차이가 크에 따라 접종 조건 또한 매우 상이 할 것으로 예상됨.

(4) 진공접종된 수박종자들의 발아율과 발병을 검정

- 아래의 표에서 보여주는 것처럼 접종된 수박종자들 일부를 일반적인 수박종자 발아조건에서 발아시켜서 발아율을 조사하였고, 이들 중 떡잎에 병징이 보이는 종자들의 비율도 조사하였음.

표 3-3. 발아율 실험을 위한 진공처리시간, 종자수 및 반복수

진공처리시간 횟수	Control (30min)	5min	15min	30min
1차	10개, 1반복	20개, 2반복	20개, 2반복	20개, 2반복
2차	20개, 2반복	20개, 2반복	20개, 2반복	20개, 2반복

- 결과적으로 접종종자들은 거의 모두 정상적으로 발아하였고, 그 중 발병이 된 종자들도 56~78%에 달하였음 (표 3-4와 그림 3-6).

표 3-4. 진공 접종 수박종자들의 발아율과 발병율

진공처리시간	Con	5min	15min	30min
발아율(%)	100	100	100	95
발병율(%)	55.6	77.5	60	77.5



그림 3-6. 진공 접종 수박종자들의 발아와 발병 모습. 왼쪽, 건전종자; 오른쪽 이병종자.

- 동일한 방법으로 토마토종자에 병원성세균을 인공접종하여도 발아에 영향을 미치지 않음을 증명하는 실험을 진행 중

2. 진공처리에 따른 감염 종자 초분광 분석(제2세부연구팀과 협동으로)

- 진공 접종 병원세균 감염 수박종자 초분광 분석 및 모델 개발

- 위에서 언급한 것처럼 진공 처리를 5분 동안 한 수박종자를 대량으로 생산하여 초분광을 이용한 분광값 측정을 위해 제2세부연구팀으로 보냄. 총 접종종자 297개, 건전종자 226개.
- 분광값 측정 후 분석 결과는 제2세부팀 결과를 참조바람

- 개별종자의 분광값과 병원세균 오염 여부에 따라 총 감염종자 207립, 비감염종자 158립을 이용하여 calibration 모델을 개발하였고, 모델 검정을 위해 모델 개발 시 미사용된 감염종자 90립과 비감염종자 68립을 가지고 검증을 진행함. 그 결과는 아래 그림 3-7에 있음.

	Non-infection			Infected			Accuracy
	Total	correct	Incorrect	Total	Correct	Incorrect	
Calibration	158	140	18	207	207	0	95.1%
Prediction	68	54	14	90	90	0	91.1%

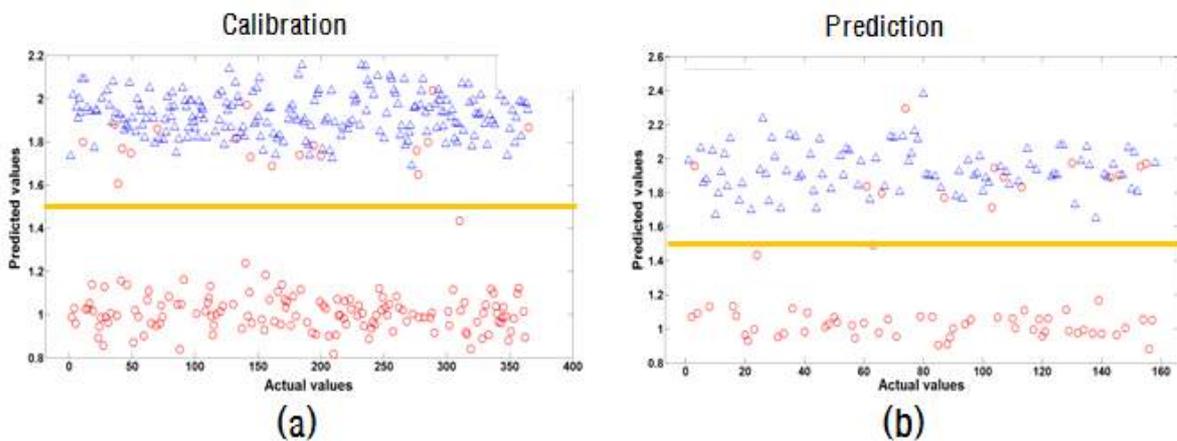


그림 3-7. 위의 표는 모델 개발 시와 검정 후 정확도를 표시해줌. 아래 (a)는 모델 개발 시 사용된 종자들의 분광값과 감염예측 결과. 아래 (b)는 모델개발 후 검정 결과. 감염종자는 2 근처에, 비감염종자는 1근처로 grouping이 됨. 빨간색 동그라미는 비감염종자, 파란색 삼각형은 감염종자를 나타냄.

- 1차적으로 개발된 모델은 감염종자는 100% 검출이 가능하였음. 하지만, 비감염종자의 일부(12~20% 정도)도 false positive 결과를 얻음.
- 병원세균 농도별 감염에 따른 calibration 모델의 경우 정확도가 예상보다 낮게 나왔는데, 이는 샘플수가 너무 적어서 생긴 결과로 보임.
- 현재 농도별 충분한 감염종자의 확보와 복합 감염된 종자의 확보를 위해 진공접종법을 계속 보완하고 있는 중임.

3. 1년차 연구를 통해 확립한 인공접종법

- 접종원 60ml (병원세균 배양액 OD600 = 0.1, 대략 10^8 cfu/ml)을 계면활성제 역할을 하는 0.02% silwet과 함께 넣고, 수박종자를 침지시킨 Petri dish(150mm x 20mm)를 진공접종기에 넣어 진공 펌프(Rocker410, SPARMAX, Taiwan)를 작동함.



그림 3-8. 접종원에 잠긴 수박종자(좌)와 진공접종기(우)

- 필요에 따라 종자를 접종원에 충분히 잠길 수 있도록 화분망으로 종자를 가라앉혀 줌.
- 진공펌프를 작동시키고 30분 후 펌프의 작동을 멈추고, 빨간색 밸브를 열어 공기압을 생성시켜서 세균을 종자 내로 유입시킴.
- 종자를 균액으로부터 건져내어 증류수에 1분씩 두 번 세척하여 표면 살균 후 filter paper 위에서 2일 정도 건조시킴.
- 이와 같은 방법으로 한 Peri dish에 수용할 수 있는 종자의 개수가 많으므로, 접종 효율이 좋다고 할 수 있음.

4. 다양한 농도로 접종된 이병종자 확보

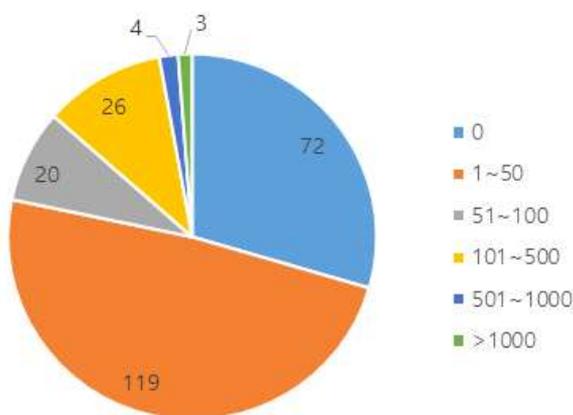


그림 3-9. 1차 대량 접종 (312립)

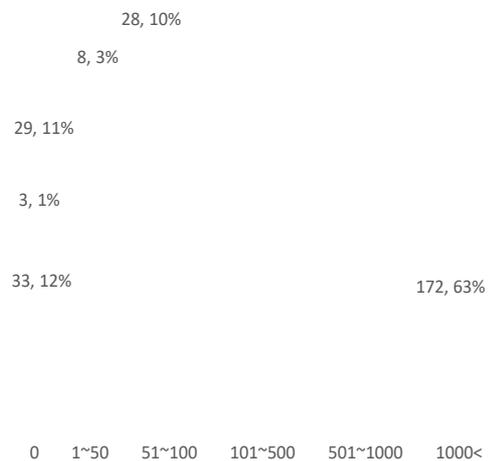


그림 3-10. 2차 대량접종 (280립)

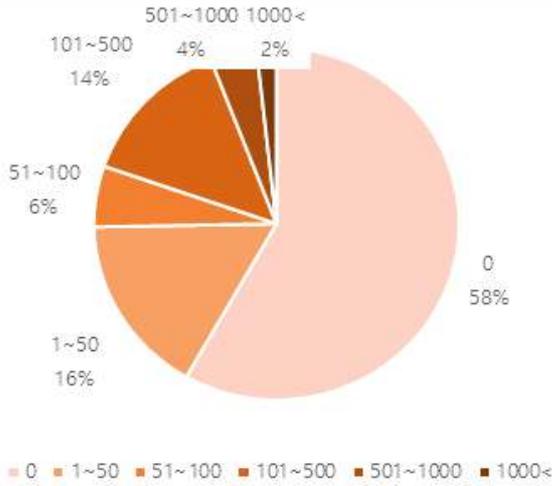


그림 3-11. 3차 대량접종 (340립)

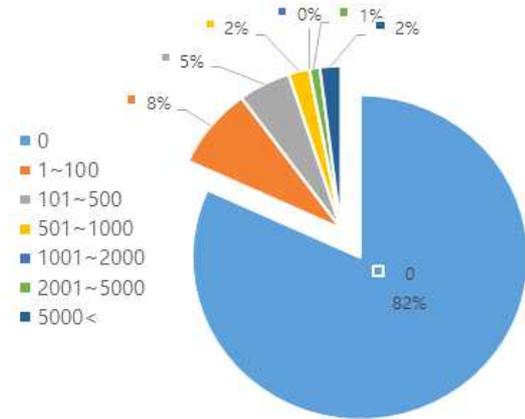


그림 3-12. 4차 대량접종 (100립)

- 위의 그림 3-9~12 의 그래프는 대량으로 이병종자를 같은 조건으로 감염시켰을 때, 개개별 종자에 실제로 접종된 병원세균 수를 검수하여 등급을 매긴 것이다.
- 연구에 사용하고 있는 병원세균은 특정 항생제에 내성이 있어 인공접종된 종자를 buffer에 마쇄하고 그것을 항생제 배지에서 배양하여 개개별 종자에 실제로 접종된 병원세균 수를 검수 할 수 있음.
- 검수 결과, 같은 조건으로 접종해도 통제할 수 없는 요건에 의해 접종되는 균의 양에 차이가 남과 종자별로 접종되는 병원세균의 양에 격차가 있는 것을 알 수 있었음.
- 초분광 영상기기를 통해 모델링을 하기 위해서는 건진종자부터 고도로 접종된 종자까지 다양한 농도로 접종된 종자가 필요한데, 1년차 연구를 통해 확립한 진공접종법이 그에 있어서 적합한 조건으로 대량의 종자를 만들 수 있음을 확인함.

5. 진공접종 시 접종원의 종자 내 접종 부위 확인

- 진공접종 후 접종원이 접종되는 부위를 종자 내에서 확인하기 위해 접종원 접종과 동일한 방법으로 1% 잉크희석액을 접종함.

	Seed coat Outside	Seed coat Inside	Cotyledon surface	Seed coat Inside	Seed cross section
10mM MgCl ₂ (0.02% silwet)					
1% ink solution (0.02% silwet)					

그림 3-13. 1%잉크희석액을 30분 동안 접종한 수박종자

- Buffer를 접종한 종자에 비하여 1%인크 희석액을 접종한 종자가 전체적으로 거뭇해진 것을 확인할 수 있었음.
- 그러나 1% 인크희석액은 떡잎 내부로까지 침투하지는 못했음.
- 1% 인크희석액은 외종피의 바깥쪽을 물들였고, 종자의 배꼽을 통해 내부로 침투한 듯한 양상을 보였음.



그림 3-14. 종피를 제거한 1%인크희석액 접종종자

- 가장 유의하게 접종원의 병원세균이 포진해있을 것으로 예상되는 공간은 종피와 떡잎 사이의 막으로 보임.

6. 종자 내에서 병원세균의 생존기간 조사

- 접종 후 오랜 시간이 지나면 점차 검출 병원세균 수가 줄어드는 것을 현상학 적으로 확인함.
- 이에 대략적인 종자 내에서의 병원세균 생존기간을 조사하기 위해, 인공접종 직후부터 7일 동안 같은 날 접종한 종자들을 대상으로 저장 기간 동안 병원 세균의 생존 수를 조사함.

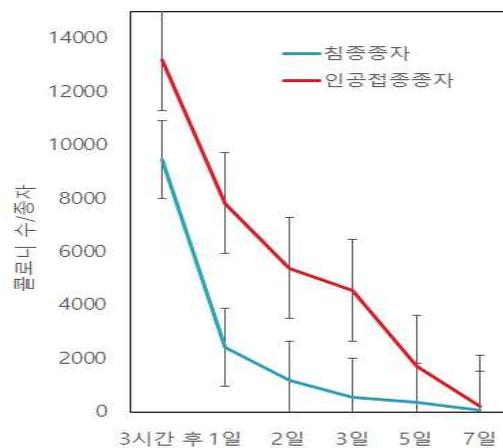


그림 3-15. 접종종자 내에서의 병원세균 생존기간

- 30분 동안 접종원에 침종한 종자와 같은 시간동안 인공접종기기를 통해 인공접종시킨 종자를 일주일동안 검수한 결과, 현상학적으로 확인했던 가설처럼 종자 내에서 병원세균은 시간이 지남에 따라 현저히 감소하는 현상을 보임.

- 위 현상은 최근 B. Dutta (2014)가 종자의 떡잎 안까지 균이 침투하지 못하면 오래 생존하지 못한다고 발표한 논문 내용과 일치함.
- 따라서, 제2세부연구팀과 접종종자를 교류할 시, 접종 후 가능한 한 빠른 시일 내에 초분광 영상 기기 스크리닝을 마치고 병원세균 검수를 진행해야 함.

7. 제2세부연구팀과 초분광 영상 기기를 이용한 이병종자 검수 기술 개발

- 초분광 영상 기기를 통해 이병종자와 건전종자를 구별하기 위해서는 PLS (Partial least squares regression) Model을 구축해야함.
- PLS Model을 구축하기 위해서는 적어도 200개의 건전종자와 다양한 농도로 접종된 이병종자가 필요함.
- 그러나 이번 과제에서는 보다 정교한 모델링을 위해, 1000개 이상의 건전종자와 이병종자를 공급하고 검수하는 중.

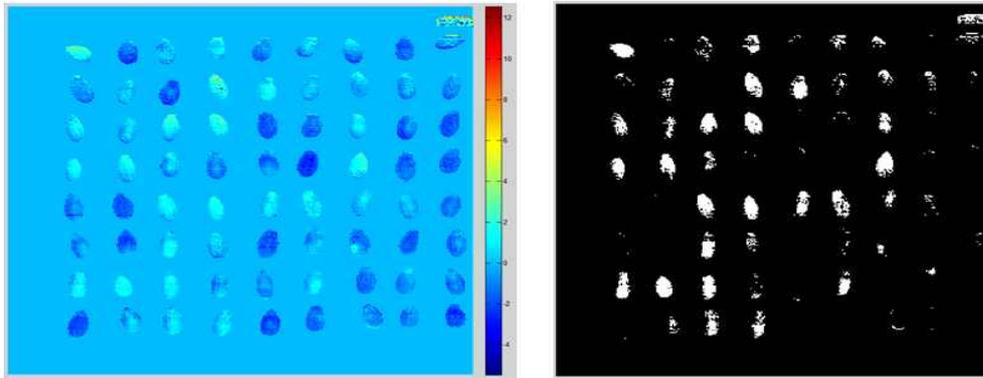


그림 3-16. 초분광 영상 기기를 통해 이병 수박종자를 검수하는 이미지의 예.

8. 병원세균 자체의 분광 분석 결과

- 이병종자와 건전종자의 가장 큰 차이점은 병원세균의 존재 유무라고 판단하여, 초분광 기기가 세균 간의 차이를 구분 할 수 있는지 검사를 진행함.
- 그람음성인 병원세균 외의 그람음성 세균과 그람양성 세균을 배양하여 초분광 기기로 분석하고 그 차이가 발견되는지 조사함.
- 세균들을 배지에 배양한 자체로는 빛반사 및 번짐으로 인해 초분광 기기로 분석하기에 적합한 환경이 아니었음.
- 따라서 수박종자에 병원세균을 포함한 8종의 세균을 다량으로 직접 묻혀 초분광 기기로 분석, 종자간의 차이가 나타나는지 검사하였으나 뚜렷한 차이는 발견할 수 없었음.
- 그러나 그 간의 이병종자 검수 데이터로 구축한 PLS 모델을 적용하여 분석했더니, 아직은 다른 세균들과 병원세균을 구별할 수 있을 정도는 아니었으나 병원세균이 세 반복 실험에서 모두 검출되는 결과를 낼 수 있었음.

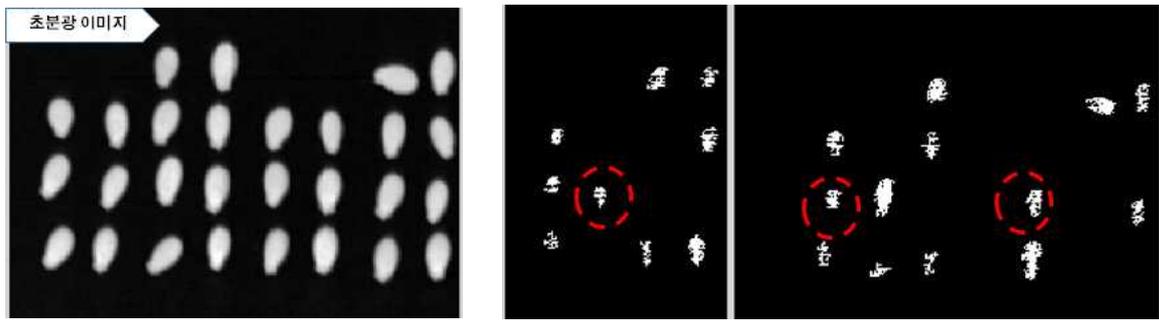


그림 17. 각 기 다른 세균을 묻힌 수박종자 초분광 분석이미지(좌)와 PLS적용 시 검출되는 종자(우)

9. 복합 감염 이병 종자 생산 및 분광 분석

- 시판되는 수박종자에는 병원세균 이외에도 다양한 세균이 존재할 수 있으므로 초분광 분석은 다른 세균과 공존하는 병원세균의 존재 유무를 파악할 수 있어야 함.
- 따라서 실험실 환경에서 검사 가능한 다른 세균과 병원세균을 한 종자에 함께 감염시킨 것과, 각각 다른 세균과 병원세균을 감염시킨 종자가 섞여 있을 때, 초분광 기기를 통해 병원세균이 존재하는 종자들을 선별할 수 있는지 조사함.
- 아직까지는 PLS 모델이 완전하지 못하여, 병원세균에 감염된 종자와 복합감염된 종자, 다른세균에 감염된 종자를 구별해 내지 못하고 있음.
- 좀 더 이병종자에 대한 정보가 쌓여 정교한 PLS 모델을 구축해 내면, 오류를 줄이고 병원세균이 존재하는 종자를 찾아 낼 수 있을 것.

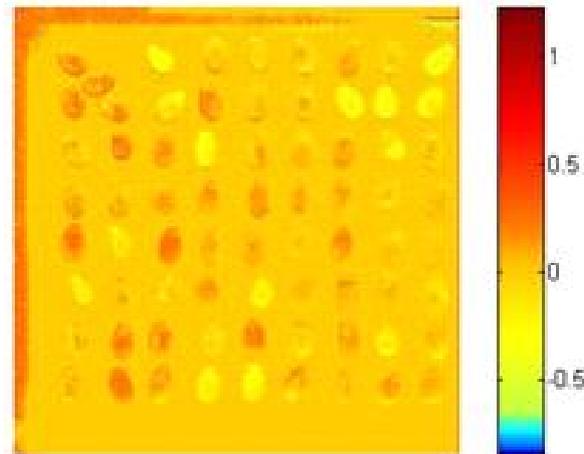


그림 3-18. 복합감염된 종자, 다른 세균을 접종한 종자, 병원세균에 감염시킨 종자를 초분광 기기로 분석한 이미지

※ 3차년도 제1협동 연구내용과 연구비를 제1세부로 통합, 제1협동 참여연구원 2명은 제1세부 연구원으로 참여하여 공동연구 수행.

제4절 신속·전수 검역기술 현장 적용 모델링 기술개발 (제2협동)

1. 바이러스 감염 이병종자 생산 (1-3차년도)

- 제1세부연구기관(충남대학교 분자식물바이러스 연구실)과 공조하여 바이러스 감염 이병종자 생산을 위해 기술 및 재료(바이러스 시료, Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), Tobacco mosaic virus (TMV), Tobacco streak Virus (TSV)) 공급
- 참외, 수박, 고추, 토마토를 태안 및 충남대학교 포장에 정식 한 후, 지속적인 재배지 모니터링을 통해, 바이러스병징의 발달 및 과실 확인
- 토마토, 고추 종자를 과실로부터 과육이 없는 상태로 분리하고, 이러한 기술을 충남대학교 분자식물바이러스 연구실 연구원들과 공유하여 다량의 바이러스 감염 종자를 확보

2. 전수·검역 현장 조사

가. 주요 재식용 종자의 수입 현황

(1) 2011년 주요 재식용 종자 수입 현황

번호	품목명	단위	검사		소독		폐기	
			건수	수량	건수	수량	건수	수량
1	고추종자	kg	1,524	60,576	2	1	62	758
2	무종자	kg	1,024	963,292	1	4	33	2,009
3	호박종자	kg	898	133,807	1	3	41	4,025
4	토마토종자	kg	799	7,945	5	133	53	65
5	양배추종자	kg	729	72,311	1	1	5	1
6	오이종자	kg	581	31,933	1	1,000	30	200
7	배추종자	kg	562	116,719	0	0	34	7
8	화훼종자기타	kg	514	25,166	0	0	54	14
9	향채종자	kg	475	247	0	0	466	243
10	수박종자	kg	442	15,110	1	4	11	405
11	양상추종자	kg	340	48,885	0	0	21	7
12	브로콜리종자	kg	318	19,976	0	0	0	0
13	양파종자	kg	295	71,321	2	12	1	0
14	표고버섯종균	kg	278	7,922,726	0	0	1	602
15	당근종자	kg	276	152,192	0	0	35	32,018
16	시금치종자	kg	256	431,762	0	0	5	1
17	대파종자	kg	255	112,708	7	78	6	81
18	메론종자	kg	223	2,002	0	0	15	149
19	두류종자기타	kg	19	3	0	0	4	0
20	파프리카종자	kg	217	112	0	0	13	4
21	수목종자기타	kg	176	8,386	0	0	2	9
22	꽃양배추종자	kg	171	3,797	1	80	0	0
23	청경채종자	kg	158	77,815	0	0	11	1
24	콩종자	kg	155	252	0	0	107	30
25	박종자	kg	139	18,644	0	0	8	230
26	옥수수종자	kg	136	268,069	0	0	37	30
27	가지종자	kg	124	232	0	0	9	1
28	패랭이종자	kg	123	23,965	0	0	1	0
29	호밀종자	kg	115	9,373,151	1	80,000	3	191,002
30	혼합채소종자	kg	113	76	0	0	29	56
31	부추종자	kg	102	37,372	0	0	4	26
32	페튜니아종자	kg	100	23	0	0	0	0

(2) 2012년 주요 재식용 종자 수입 현황

번호	품목명	단 위	검사		소독		폐기	
			건수	수량	건수	수량	건수	수량
1	고추종자	kg	1,752	68,591	0	0	68	433
2	화훼종자기타	kg	1,539	7,266	0	0	55	925
3	무종자	kg	1,313	1,125,053	0	0	45	5,120
4	호박종자	kg	1,160	127,562	0	0	49	1,113
5	토마토종자	kg	1,031	9,194	0	0	88	87
6	양배추종자	kg	810	77,769	0	0	10	103
7	배추종자	kg	762	222,130	0	0	54	561
8	수박종자	kg	672	24,546	0	0	15	135
9	오이종자	kg	650	30,001	0	0	29	136
10	당근종자	kg	451	191,275	0	0	39	13,281
11	양상추종자	kg	442	44,594	0	0	21	15
12	양파종자	kg	431	58,463	0	0	7	2
13	표고버섯종균	kg	423	11,336,426	1	69,300	5	49,005
14	수목종자기타	kg	411	4,670	0	0	17	19
15	브로콜리종자	kg	403	43,657	0	0	5	8
16	향채종자	kg	362	143	0	0	317	142
17	대파종자	kg	289	90,542	2	22	6	5
18	파프리카종자	kg	274	218	0	0	20	15
19	시금치종자	kg	261	341,589	0	0	6	0
20	메론종자	kg	260	3,159	0	0	8	2
21	공심채종자	kg	255	151	0	0	99	72
22	청경채종자	kg	250	53,658	0	0	9	2
23	가지종자	kg	243	539	0	0	11	0
24	바질종자	kg	232	24	0	0	18	18
25	강낭콩종자	kg	213	9,064	0	0	31	106
26	고수풀종자	kg	207	3,338	0	0	36	19
27	옥수수종자	kg	203	399,693	0	0	42	103,097
28	박종자	kg	200	28,833	0	0	8	3
29	꽃양배추종자	kg	187	2,465	0	0	2	0
30	엽경채종자기타	kg	178	6,430	0	0	31	108
31	케일종자	kg	170	1,356	0	0	4	1
32	근대종자	kg	165	53,876	0	0	1	0
33	호밀종자	kg	156	11,648,680	0	0	11	912,500
34	콩종자	kg	127	163,201	0	0	87	30
35	여주종자	kg	124	258	0	0	21	5
36	패랭이종자	kg	118	20,096	0	0	3	0
37	페튜니아종자	kg	108	22	0	0	1	0
38	과꽃종자	kg	101	4,055	0	0	3	375

(3) 2013년 주요 재식용 종자 수입 현황

번호	품목명	단 위	검사		소독		폐기	
			건수	수량	건 수	수량	건수	수량
1	고추종자	kg	1,749	56,685	1	60	58	36
2	무종자	kg	1,555	1,556,659	4	458	46	8,308
3	화훼종자기타	kg	1,426	6,242	0	0	46	61
4	토마토종자	kg	958	11,415	1	263	87	37
5	호박종자	kg	899	110,817	5	68	36	916
6	옥수수종자	kg	894	217,961	0	0	713	16,811
7	양배추종자	kg	860	76,830	9	305	3	1
8	배추종자	kg	848	176,651	1	1	61	342
9	오이종자	kg	684	41,838	0	0	44	63
10	표고버섯종균	kg	525	13,617,082	0	0	3	5
11	양상추종자	kg	523	58,368	0	0	29	43
12	향채종자	kg	522	241	0	0	489	240
13	수박종자	kg	510	14,861	0	0	15	355
14	당근종자	kg	483	186,565	1	150	25	9,975
15	양파종자	kg	389	90,480	1	10	8	7
16	대파종자	kg	327	152,552	0	0	7	1
17	수목종자기타	kg	327	991	0	0	6	2
18	바질종자	kg	316	393	0	0	21	3
19	브로콜리종자	kg	305	34,780	0	0	3	25
20	공심채종자	kg	290	183	0	0	95	148
21	시금치종자	kg	281	374,566	0	0	11	13
22	메론종자	kg	257	1,538	0	0	3	0
23	청경채종자	kg	244	77,605	0	0	19	5
24	고수풀종자	kg	227	3,176	0	0	50	19
25	가지종자	kg	225	369	0	0	17	1
26	강낭콩종자	kg	214	17,767	37	2	21	1,046
27	파프리카종자	kg	208	288	0	0	4	7
28	여주종자	kg	189	920	0	0	61	23
29	근대종자	kg	188	59,027	0	0	1	2
30	꽃양배추종자	kg	187	4,254	2	405	2	18
31	엽경채종자기타	kg	179	601	0	0	27	16
32	케일종자	kg	172	938	0	0	8	2
33	박종자	kg	168	17,858	0	0	4	0
34	호밀종자	kg	158	11,053,342	2	440,000	1	0
35	벼종자	kg	156	9,396	0	0	86	1,477
36	콩종자	kg	149	346	0	0	121	69
37	두류종자기타	kg	124	11	0	0	3	1
38	페튜니아종자	kg	117	30	0	0	0	0
39	콜라비종자	kg	113	53,335	0	0	1	150
40	참외종자	kg	111	1,868	0	0	3	0
41	갯종자	kg	110	49,990	0	0	4	3,083
42	매리골드종자	kg	105	274	0	0	1	0
43	백일초종자	kg	103	879	0	0	1	0
44	부추종자	kg	102	40,792	0	0	5	2
45	리시안샤스종자	kg	102	18	0	0	1	0

나. 재식용 종자의 검역 현장 조사

(1) 재식용 종자 보관 및 검역용 지정 보세 창고

- 재식용 종자는 공항만에 도착 즉시 검역장소로 지정된 보세 창고로 이동해야 함
- 재식용 종자류 검역은 창고 단위로 이루어지며 규정에 의하여 검역 가능한 창고를 지정



재식용 종자 검역을 위한 보세 창고1



재식용 종자 검역을 위한 보세 창고2



재식용 종자 검역을 위한 보세 창고3



재식용 종자 검역을 위한 보세 창고4



재식용 종자 검역을 위한 보세 창고5



재식용 종자 검역을 위한 보세 창고6

(2) 재식용 종자에 대한 전수검사 모델 예측

- 현재 검역장소는 여러 지점의 창고에서 이루어지고 있어 전수검사 체계를 도입하기 위해서는 권역별 검역장소 지정
- 지역본부별로 3~5개의 권역을 나누어 전수검사 시스템을 도입하고 재식용 종자류를 모두 지정 검사장소로 이동
- 전수검사이므로 검사가 끝난 종자류에 대하여 수입 당시의 포장상태와 유사한 상태로 재포장할 수 있는 설비 필요

3. 전수 검사시 전국 검역소 가능한 공간 조사

가. 규정에 따른 검역 전용구역 등의 기준

(관련: 식물방역법 시행규칙 제20조, 농림축산검역본부 고시 제2013-50호)

- (1) 식물검역 전용구역 면적: 165m² 이상
- (2) 검역실 면적: 6m² 이상
- (3) 검사대 규격(1대 이상 설치)
 - 크기: 가로 1.8m × 세로 1m × 높이 0.6~0.7m,
 - 재질: 스테인레스 강철
 - 다리 및 보강대 : 40×40mm 각파이프
 - 이동이 가능하도록 다리에 바퀴 부착
 - 검역장소의 특성에 따라 크기의 조정이 가능하며, 검역대상품목의 종류 등에 따라 테이블형 등으로 변형 가능
- (4) 조명시설
 - 식물장치구역: 지상 1~1.5m 높이에서 200lux 이상 또는 반사판이 부착된 이동식 조명기구인 경우에는 전구로부터 3m 전방에서 200lux 이상
 - 검사대: 검사대 상단면의 중앙부위에서 500lux 이상의 형광등

나. 전수 검사에 필요한 공간 산출: 규정된 검역실 면적 이외에 공간이 필요

- 작업의 특성상 시료준비실, 검사실(기기설치공간), 재포장실 공간이 필요
- 시료준비실은 식물검역 전용구역이 확보되면 추가 면적이 필요 없음
- 기기설치공간은 검사실 면적 기준인 6m² 이상 확보 필요
- 재포장이 가능한 기기 설치에 요구되는 추가 면적 필요



벌크(포대) 단위로 포장된 품목



소량(캔) 단위로 포장된 품목

4. Feasibility Test 및 표준작업지침서(SOP) 확립

수출입 종자를 위한 현장 및 실험실 정밀검역 방법

1. 종자류

가. 적용품목

곡류·채소·화훼·목초·수목류 종자 및 기타종자

나. 검역방법

1) 현장검역

- ① 수입금지식물, 잡초, 격리재배 대상식물 여부 및 종자의 소독처리 적합여부(캔·은박지 등으로 밀봉되어 수입되는 종자 제외)를 확인한다.
- ② 조명이 갖추어진 검사대 등에 검사용 시트를 깔고 포장단위별로 균핵·반점·변색·감부기 등의 병징과 벌레구멍·상대적으로 가벼운 종자 등을 대상으로 해충 유무 및 잡초 등을 확대경·선별체 등으로 검역한다.
- ③ 선충검사 대상종자는 무게가 상대적으로 가벼운 것, 불건전종자 등 선충 피해가 의심되는 시료를 채취한다.
- ④ 별표1의 실험실정밀검역 시료채취기준에 따라 실험실정밀검역용 시료를 채취하되 병해충 감염립, 감염 의심이 되는 시료 위주로 채취하고, 현장검역시 병해충 등이 발견되지 않은 종자에 대해서는 검역할 수량의 포장단위에서 골고루 채취하여 혼합한다.

2) 실험실정밀검역

가) 병

(1) 진균검사

- ① 대상: 수입되는 모든 건의 종자류
- ② 방법: 습지배양검사법·한천배양검사법·초분광분석법 등

(2) 세균검사

- ① 대상: 종자전염 하는 규제세균병의 기주식물인 종자
- ② 방법: 한천배양검사법·혈청학적검사법·세균검사기검사법·유전자진단법·초분광분석법 등

(3) 바이러스 및 바이로이드검사

- ① 대상: 규제병원체 중 종자전염 하는 바이러스병 또는 바이로이드병의 기주식물인 종자
- ② 방법: 혈청학적검사법·유전자진단법·생물학적검사법·초분광분석법 등

나) 해충

(1) 직접검경검사

- ① 대상: 벌레구멍 또는 벌레 먹은 흔적 등이 있는 시료
- ② 방법: 시료를 칼등으로 찌개서 현미경 등 실험장비를 이용하여 검사·초분광분석법 등

(2) 침지 및 파쇄검사

- ① 대상: 핵과류 종자 등 대립 경실종자
- ② 방법: 물에 침지하여 뜨는 종자는 파쇄검사 등

(3) 선충분리검사

- ① 대상: 벼·밀·호밀·보리·톨웨스큐 등의 화분과 종자. 다만, 옥수수종자를 제외한다.
- ② 방법: 깔때기법·직접검경법·체법·원심분리법·침지법·변형베르만깔때기법·초분광분석법 등

다) 잡초

(1) 잡초종자의 분리

- ① 대상: 재식용으로 수입된 종자류
- ② 방법: 의뢰시료를 잡초선별체로 치거나 체로 치기 어려운 시료는 직접 검사대 위에서 펼쳐가며 현미경 등으로 잡초종자를 분리한다.

(2) 현미경검사

분리된 종자의 외부적 특징(모양·크기·색깔·표면조직·부착물의 모양과 위치 등)을 현미경하에서 관찰하여 잡초종자의 표본과 대조하거나 도감, 검색표 등을 이용 분류동정하여 검역잡초 여부를 검사한다.

2. 곡 류

가. 적용품목

쌀·보리·수수·조·옥수수·콩·녹두·동부·땅콩·아주까리·아마인·코푸라 등으로서 유효·양조·제분·비료·사료·식량 등으로 이용될 식물

나. 검역방법

1) 서류검역

- ① 대상: 별표 1의 분말류 중 녹두가루·메밀가루·백미가루 등 곡류를 가공한 분말류를 대상으로 한다.

2) 현장검역

가) 전용선박으로 수입한 곡류

- (1) 선상검역: 선상에서 다음에 의거 실시한다.

(가) 산물로 적재된 곡류

- ① 선창을 열어 해충의 비산 및 이동여부를 관찰하고 선창내 벽면과 곡류의 표면 등에 해충의 유충, 번데기 등 부착여부와 곡류에 혼입된 잡초종자 및 흙의 혼입 여부를 검역한다.
- ② 검역할 수량을 선창수로 나누어(예 250kg÷5선창=50kg) 선창당 검역수량을 정하여 검역부위(5개소)별로 균등하게 나누어 검역한다.
- ③ 선창별로 중앙과 네모서리 등 5개 부위에서 표층으로부터 30~50cm 깊이까지 선별체로 쳐서 해충과 잡초종자를 검역하며, 해충과 잡초종자가 많을 것으로 예상되는 부위를 중심으로 검역한다.
- ④ 중점적으로 검역할 부위
 1. 온도가 높은 기관실 및 선실 쪽의 화물과 벽체
 2. 벽체의 접합부, 선체벽 내부의 테두리
 3. 수침된 곳, 습기가 많은 부분, 곡물가루가 덮인 곳, 부패된 곳
 4. 거미줄 등 해충의 서식 흔적이 있는 곳, 벌레 먹은 곡물
 5. 곡류가 뭉쳐 있는 곳, 곡류의 줄기, 껍질, 깎지 및 옥수수의 속대, 잎 등의 잔재물 등
 6. 상층부에 국화과 잡초의 관모가 몰려 있는 곳 등

(나) 포장된 곡류

- ① 선창문을 열어 해충의 비산 및 이동여부를 관찰하고 선창내 벽면과 포장물의 표면 및 이음새 등에 붙어있는 유충과 번데기 등을 면밀히 검역한다.
- ② 검역할 수량을 선창수로 나누어 선창 당 검역할 수량을 정하여 5개소(네모서리, 중앙부위)로 나누어 상층부에서 2-3열까지 균일하게 검역시료를 채취 후 선별체로 쳐서 협잡물 속의 해충과 잡초종자 및 흙의 혼입여부를 검역하고, 해충의 서식 흔적이 있는 곡물은 쪼개어 해충을 검역한다.

(2) 본검역

(가) 하역되지 않은 곡류

선상검역 방법에 준하여 실시한다.

(나) 하역된 곡류

네모서리와 지표면의 둘레에서 벌레 먹은 곡물, 협잡물 등을 검역한 다음, 시료를 채취하여 선별체로 쳐서 해충과 잡초종자 및 흙의 혼입여부를 검역한다.

- (3) 검역결과 병해충 부착 의심이 되는 경우 별표 1의 실험실정밀검역 시료채취기준에 따라 시료를 채취하여 실험실정밀검역을 의뢰한다.

나) 전용선박이 아닌 수단으로 수입된 곡류

(1) 적재곡물의 중앙과 네모서리 등 5개 부위에서 상층, 중간층과 지표면의 들레, 포장물의 들레, 틈사이 봉합부 등과 벌레 먹은 곡물, 협잡물 등을 철저히 검역한 다음 시료를 선상검역에 준하여 채취하여 선별체로 쳐서 해충과 잡초종자 및 흙의 혼입여부를 검역한다.

(2) 실험실정밀검역용 시료 채취는 ‘전용선박으로 수입한 곡류’를 준용한다.

3) 실험실정밀검역

실험실정밀검역은 생략한다. 다만, 병해충의 부착이 의심되어 실험실정밀검역을 의뢰한 시료에 대해서는 실험실 장비(초분광분석법 등)를 활용하여 의심 시료를 정밀하게 검사한다.

3. 해외채종 수출용 종자류

가. 적용품목

- 1) 「해외채종 수출용종자 검역요령(고시)」에 따라 수입한 무·고추·양배추·토마토·오이·수박·호박·메론·브로콜리·컬리플라워·시금치·배추·파·양파·당근·여주 등의 적용 종자
- 2) 특정병해충의 무발생증명 등 수입국의 요구조건을 충족하기 위하여 식물검역관이 해외에 출장하여 재배지검역을 실시한 종자

나. 검역방법

1) 현장검역

- ① 조명이 갖추어진 검사대 등에 검사용 시트를 깔고 포장단위별로 해충, 벌레구멍, 벌레 먹은 부위 등을 확대경, 선별체 등으로 검역한다.
- ② 실험실정밀검역 의뢰는 생략한다. 다만, 해충이 감염되었거나 감염이 의심되는 경우는 시료를 채취하여 의뢰한다.

2) 실험실정밀검역

가) 병

실험실정밀검역은 초분광분석법 등으로 수행한다.

나) 해충

(1) 직접검경검사

- ① 대상: 해충에 감염된 시료 및 감염이 의심되는 시료
- ② 방법: 대상시료를 칼등으로 쪼개어 현미경 등 실험장비를 이용하여 검사·초분광분석법 등

다) 잡초

실험실정밀검역은 생략한다.

[별표 1]

실험실정밀검역 시료채취기준

1. 일반기준

구분	종류	시료채취기준
과종 및 재식용	○ 종자류 - 1kg 이상 수입 · 대립종 · 중·소립종 · 선충검사 대상(대·중·소립종) - 1kg 미만 수입 - 수분용 화분	200g 50g 500g 실험실정밀검역에 필요한 최소량 10g
비재식용	○ 곡류 (병해충 감염·부착이 의심되는 경우)	1kg

2. 보충기준

가. “1. 일반기준”에 없는 종류는 유사한 종류의 시료채취기준을 적용한다.

나. 시료의 개체 크기에 따라 채취하고자 하는 수량이 시료채취기준의 무게와 정확히 일치될 수 없는 경우 시료채취기준 이상의 무게로서 시료채취기준과 가장 근접한 무게가 될 수 있는 만큼의 개수를 채취한다.

다. 시료채취기준량이 전체 수입 수량보다 많거나 과종 및 재식용식물이 아닌 식물로서 10%를 초과하는 경우에는 검사에 필요한 최소량을 채취할 수 있다.

라. 캔, 은박지 등으로 밀봉포장 된 시료의 채취 기준은 kg, 캔 또는 봉지 등으로 할 수 있다.

마. 종자는 벼·소맥종자를 중립종으로 하되, 종자의 크기 구분이 육안으로 판단이 어려운 경우는 포장단위 별로 골고루 시료를 채취하여 혼합 한 후 종자 20립에 대한 장축을 기준으로 평균 5mm부터 7mm까지를 중립종으로 하고 이들보다 큰 종자는 대립종, 작은 종자는 소립종으로 한다.

아. 종자별 배양 및 항혈청검사 등의 시료량

1) 배양검사: 400립 이상

2) 항혈청검사: 200립이상(박과류의 CGMMV검사는 300립이상)

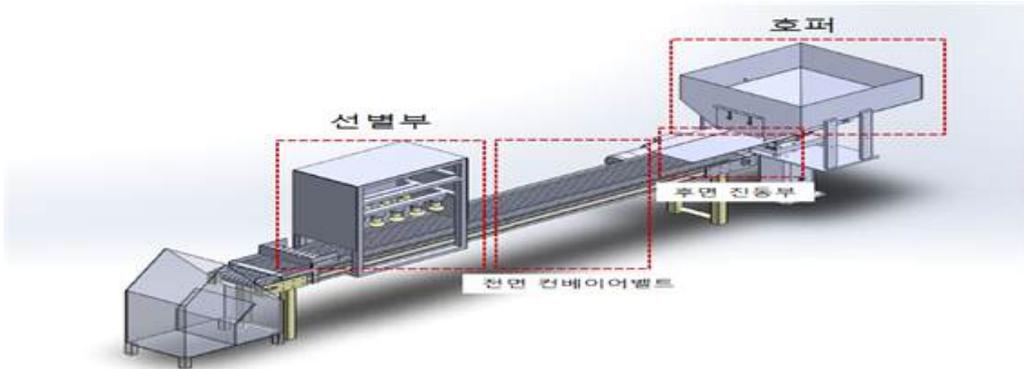
3) 1)2)에 불구하고 수입량이 10립 이하일 경우에는 배양 및 항혈청검사를 생략할 수 있다. 다만, 분자생물학적검사(PCR검사) 또는 혈청학적검사(ELISA검사)로 검사가 가능한 경우에는 검사에 필요한 수량으로 검사한다.

바. “1. 일반기준”의 시료채취기준에도 불구하고 현장검역결과 과종 및 재식용식물의 여러 개체에 다양한 병해충의 부착·오염이 의심되고 한정된 시료채취 기준으로 인해 이들 일부가 누락될 우려가 있는 경우 기준량을 초과하여 시료를 채취할 수 있다.

제5절 고속 컨베이어형 종자 자동 선별 시스템 하드웨어 기술 개발 (제3협동)

1. 컨베이어의 종자 적용성 확대 기술 개발

- 컨베이어의 종자 적용성을 확인하기 위해서는 종자의 크기와 형태 및 각 종자별 선별 속도 및 Air분사노즐의 압력을 조절함.
- 이에 각 종자의 무게 및 크기와 형태를 사전 조사해야 함.
- 설계한 도면은 그림 5-1(a)와 같이 선별부, 전면 컨베이어벨트, 후면 진동부, 호퍼로 구성되어 있음. 선별 라인은 총 7개 라인을 두었으며, 동시선별이 가능하도록 설계.



(a) 종자 자동 선별 시스템 도면



(b) 종자 자동 선별 시스템 사진

그림 5-1. 종자 자동 선별 시스템 도면 및 사진.

가. 종자 크기·형태별 컨베이어 구조 및 형태 최적화

- 종자 자동 선별 시스템에 사용될 종자는 표 5-1과같이 7종류(옥수수, 콩, 수박, 고추, 토마토, 오이, 참외)를 택함.
- 비교적 중량과 크기가 작은 4종류(고추, 토마토, 오이, 참외)를 제외한 3종류(옥수수, 콩, 수박)의 종자를 우선적으로 종자 자동 선별 시스템에 적용하여 도면 설계 및 제작.

- 표 5-1에서 보듯이 모든 종자의 중량이 1g을 넘지 않기 때문에 강한 압력의 Air분사 방식으로 선별할 때 탈락된 종자가 공기의 저항을 받아 천천히 낙하하거나 의도하지 않은 곳에 착륙하는 현상이 발생됨. 각각의 종자의 중량과 형태를 확인하여 각 종자별 Air분사노즐의 압력을 다르게 하여야 함.

표 5-1. 종자 자동 선별 시스템에 사용될 종자의 중량 및 사진

종자	중량	사진	종자	중량	사진
옥수수	233mg		고추	21mg	
콩	195mg		참외	12mg	
수박	150mg		토마토	10mg	
오이	23mg				

- 압력은 압력 조절게이지를 통하여 조절. 7개 라인의 Air 분사노즐은 하나의 관에서 분산되었으며, 그 관을 하나의 Compressor에 연결하여 공압력 조절게이지를 설치하여 압력을 조절할 수 있도록 설계.
- 또한 전면 컨베이어 벨트는 고무로 이루어진 회전식 컨베이어 벨트이기 때문에 종자의 중량 및 형태에 영향을 받지 않지만 후면의 호퍼와 진동부의 경우 낙차와 진동수에 따라 이동하기 때문에 표 5-2에서 보듯이 종자별 이동속도가 차이가 발생.

표 5-2. 종자 별 진동수에 따른 속도

종자	속도	진동수
옥수수	147 mm/sec	60 Hz
콩	173 mm/sec	
수박	120 mm/sec	
오이	104 mm/sec	
고추	98 mm/sec	
참외	98 mm/sec	
토마토	98 mm/sec	

- 이에 컨베이어 벨트의 설계 및 각 종자별 시스템을 다르게 설정. 현재 설계 중인 자동 선별 시스템 하드웨어 기술의 경우 다양한 종자를 하나의 기계에서 선별하기 때문에 이동속도 및 압력을 하나의 시스템으로 통일 한다면 문제가 생길 것으로 판단됨. 하여 위와 같은 각 종자별 시스템을 설계하여 사용자가 원하는 종자를 선택 시에 자동으로 시스템이 변경할 수 있도록 설계할 예정.
- 실험을 통하여 각 종자별 이동속도를 표 5-2와 같이 확인. 각 종자별 중량과 형태에 따라 동일 진동수에서 속도가 다름을 확인하였으며, 이를 통해 각 종자에 맞는 속도를 조절할 수 있음을 확인.

나. 타이밍 최소화 시스템 개발

- 선별 시스템에서 센서와 이송부와 선별시스템의 타이밍이 오류가 발생한다면 정확한 시간에 선별이 불가능하게 됨. 그림 5-2와 같이 초기 프로토타입을 이용하여 스펙트럼 전 영역의 종자를 측정하였을 때 50 mm/sec 일 때 가장 정확한 수치를 얻을 수 있음.
- 차후에 연구가 진행되어 일정한 패턴을 통한 부분 영역의 스펙트럼을 이용하여 선별하게 되었을 경우 300 mm/sec 까지 선별이 정확하다는 것을 CCD 카메라를 통해 실험하여 확인.
- 선별부와 센싱부의 거리는 85 mm 로 하였으며 컨베이어 벨트를 컨트롤하는 스피드미터를 이용하여 딜레이를 주어 선별. 스피드미터를 이용하여 Air 분사노즐을 컨트롤하여 더욱 정밀하게 선별이 가능 함.
- 차후년도에 개발예정인 100 mg 이하의 종자는 Air 흡입식으로 설계함. Air 흡입식 종자선별기의 컨베이어 벨트는 흡입식으로 설계되어 일정 시간에만 작동하도록 설계되어 더욱 정밀한 측정이 가능하도록 함.

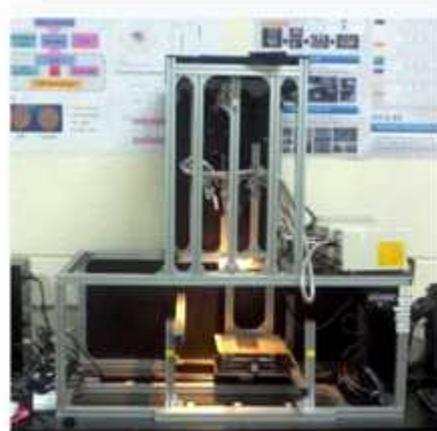
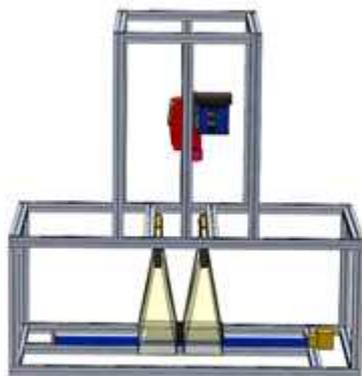


그림 5-2. SWIR 초분광 영상 시스템 프로토타입

2. 고속 컨베이어 시스템 개발

종자 자동 선별 시스템에서 선별의 경제성, 효율성이 높이기 위해서는 빠른 시간에 많은 종자를 선별해야 함. 또한 종자 이송 중에 벨트위에서 탈락하는 현상을 잡아줘야 함. 종자 자동 선별 시스템은 다양한 종자가 컨베이어벨트를 통해 호퍼에서 선별부로 이송하므로 이송 시에 종자와 종자가 겹치는 현상을 컨베이어 벨트에서 해결해야 선별시의 정확도를 높일 수 있음.

가. 종자 선별량 극대화를 위한 고속 컨베이어 기술 개발

- 이송부는 전면부의 컨베이어 벨트와 후면부의 호퍼 및 후면 진동부로 구성. 이송부를 세분하여 속도 조절 및 컨트롤을 쉽게 조절할 수 있도록 함.
- 전면 컨베이어 벨트의 폭은 IR카메라에 맞추어 200 mm로 하였으며, 컨베이어 벨트의 속도는 10~300 mm/sec 로 조절가능하게 설계. 사용된 종자가 100 mg이상의 3종류의 종자를 사용하여 Air분사식으로 설계하였기에 그림 5-3에서 보듯이 현재는 라인선별 방식으로 설계 및 제작.

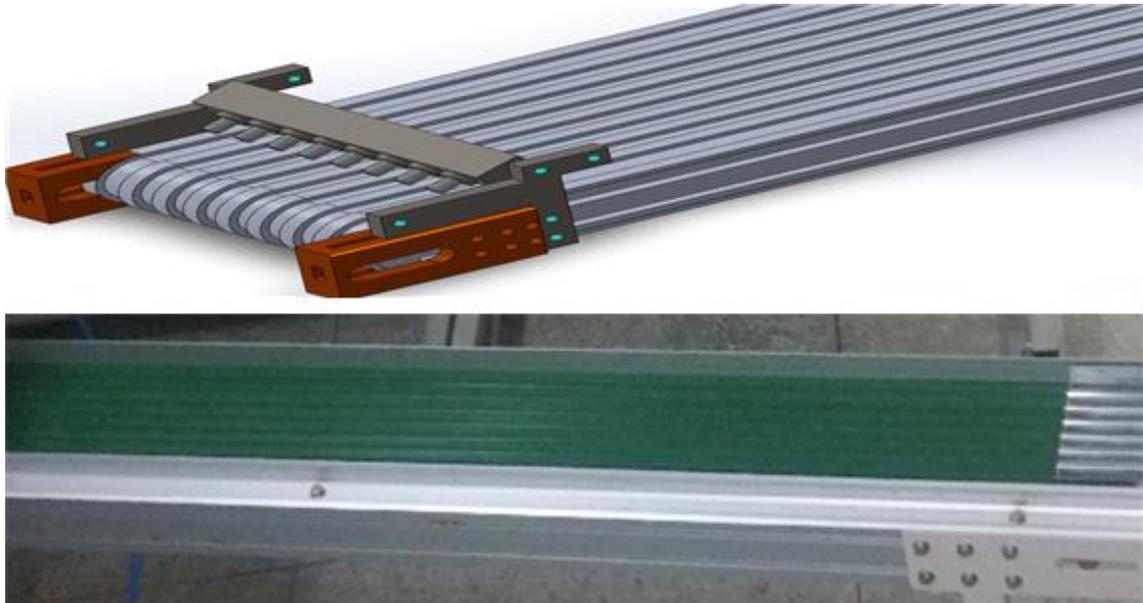


그림 5-3. Air 분사식 컨베이어 벨트의 도면 및 사진

- 컨베이어 벨트는 고무재질로 사용하였으며, 차후에 Air흡입식으로 설계할 시 벨트의 교체가 원활하도록 설계하여 벨트의 교체가 가능하도록 함. 그림 5-4와 같은 컨베이어 벨트는 중량 100 mg 이상의 종자를 선별하기에 최적화 된 설계 방식.
- 중량 100 mg 이하의 종자를 선별하기 위해 그림 5-4와 같이 컨베이어 벨트에 구멍을 만들어 Air흡입식으로 선별 후 분류할 때 용이하도록 함. Air흡입식 컨베이어 벨트의 경우 후면부에서 전면 이송부로 이동할 때 롤러와 브러시를 이용하도록 설계하여 종자가 구멍 외부로 탈락되는 현상을 제거하도록 함.

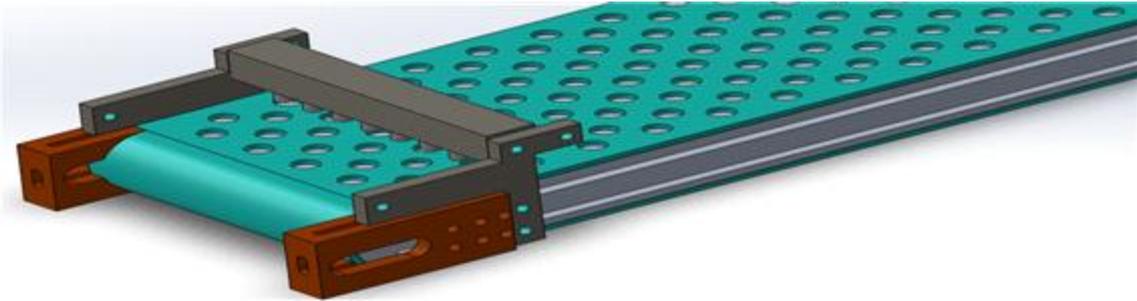


그림 5-4. Air 흡입식 컨베이어 벨트의 설계 도면

- 종자와 종자의 간격을 맞추지 않는다면 선별 시에 종자가 연결되어 선별부에 들어가게 되며 종자가 연결되어 들어가면, IR카메라에서 연결된 종자를 하나의 종자로 인식하여 불량 처리될 확률이 높음. 또한 간격이 넓다면, 종자 선별 시스템의 효율이 떨어지기 때문에 종자 사이의 간격을 조절하는 것은 필요.
- 각 이송부마다 컨트롤러를 설치하여 간편하고 알기 쉽게 원버튼 방식의 스피드미터를 그림 5-5와 같이 설치.

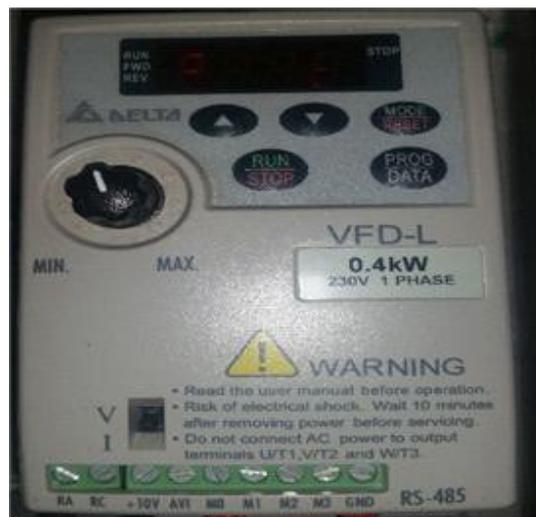


그림 5-5. 전면부 컨베이어 벨트의 스피드미터

- 후면 진동부는 진동과 낙차를 이용하여 이송이 가능하도록 함. 그림 5-6과 같이 후퍼의 진동판과 후면 진동부의 진동을 각기 컨트롤할 수 있도록 설계. 각각의 진동판 및 진동부를 컨트롤하여 대량으로 들어오는 종자를 간격이 일정하게 이송부로 이동하게 설계.

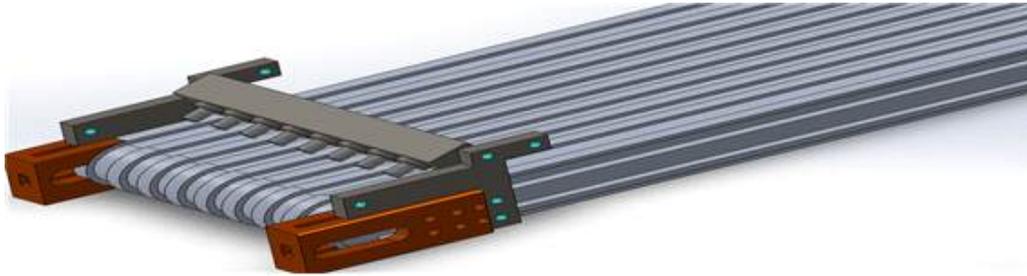


그림 5-6. 후면 이송부 및 컨트롤러 사진

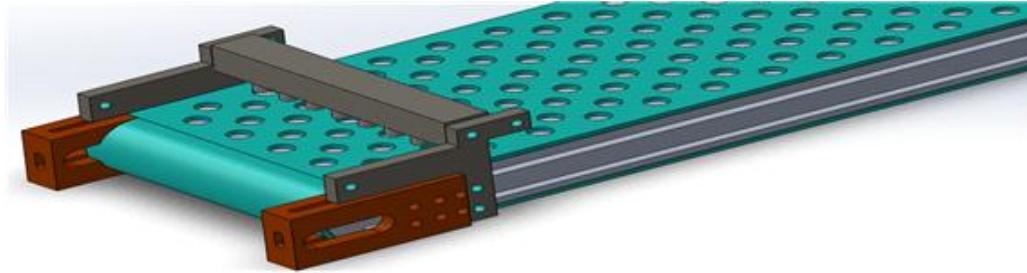
- 낙차와 진동을 이용하여 종자가 이동하기 때문에 각 종자의 특성에 따라 진동수를 조절할 필요가 있음. 각 종자에 따라 중량 및 형태의 차이가 있기 때문에 실험을 통하여 각 종자 별 진동 수를 조사.
- 표 5-2에서 보듯이 대체적으로 중량의 증가함에 따라 속도도 증가함 확인. 콩의 경우 옥수수보다 중량은 적지만 원형의 형태로 있어 더욱 빠른 속도로 이동함.
- 그림 5-6와 같이 후퍼의 진동과 후면 이송부의 진동을 다르게 하여 종자와 종자가 겹치지 않게 하며, 먼지 등 미세한 이물질은 제외한 선택한 종자 중량만 이동하게 하여 선별 정확도를 높일 수 있음. 또한 진동수가 높을수록 낙차에 따른 종자의 이송속도가 올라가기 때문에 진동의 떨림을 다르게 하여 속도를 조절 가능하도록 함.

나. 종자의 중량, 형태 등에 대한 영향을 최소화 할 수 있는 고속화 기술 개발

- 기존의 연구개발의 목표로 종자의 수분, 형태에 대한 영향을 고려하였지만 실제 종자의 경우 수분이 거의 없고 선별에 무시할 정도의 영향을 미치기에 고려대상에서 제외. 허나 종자의 중량의 이송, 선별에 많은 영향을 주기에 종자의 중량과 형태에 대한 영향을 고려.
- 종자의 중량과 형태에 따라 Air를 불었을 때 공기의 저항으로 인해 원하는 낙하운동을 하지 않음. 또한 실험결과 형태에 비해 중량이 차지하는 비중이 크에 따라 중량 100 mg을 기준으로 그림 5-5와 같이 전면 컨베이어 벨트는 2가지를 채택하도록 함.
- 100 mg이상의 종자의 경우 그림 5-7(a)와 같이 라인 선별을 하여도 각 종자의 간격이 나뉘는 반면에 100 mg이하의 종자의 경우 종자와 종자의 간격이 붙어있거나, 넓게 분포. 이와 같은 현상은 종자 자동 선별 시스템을 설계함에 있어 비효율적이므로 그림 5-7(b)와 같이 홈 형식의 컨베이어 벨트를 이용하여 효율을 높임과 동시에 선별 정확도를 높일 수 있도록 함.



(a) 라인 선별이 가능하도록 설계된 컨베이어 벨트(Air분사식)



(b) 홉 선별이 가능하도록 설계된 컨베이어 벨트(Air흡입식)

그림 5-7. 종자중량에 따른 컨베이어 벨트의 종류

- 농장에서 종자 자동 선별 시스템을 이용할 때에는 다량의 종자를 호퍼에 투입하여 분류하기 때문에 호퍼에서 이송부로 이동시에 적당량이 투입될 수 있도록 조절해야 함.
- 그림 5-8과 같이 호퍼에 진동을 주어 적당량의 종자가 이송부로 이동할 수 있도록 한 후 멩쳐져서 내려온 종자를 후면 이송부에서 진동을 이용하여 넓게 분포할 수 있도록 강한 진동줌.
- 그림 5-9과 같이 2단계의 진동부를 컨트롤하여 정확도를 높일 수 있으며 동시에 종자의 형태에 따라 다른 진동수를 입력하여 종자의 중량 형태에 맞춰서 선별할 수 있도록 설계.



그림 5-8. 호퍼 및 후면 진동부 사진



그림 5-9. 진동부 컨트롤러

다. 이동 중 종자의 탈락(튀는 현상) 최소화 기술 개발

- 현재 곡물 선별기 및 농산물 선별기의 경우 종자의 탈락 현상이 호퍼와 이송부에서 가장 많이 발생. 개발된 종자 자동 선별 시스템은 그림 5-8에서 보는 바와 같이 호퍼에서 이송부로 가는 부분을 2개의 진동판을 이용하여 순차적으로 보내고 있으며 10 mg의 토마토 종자로 실험했을 때에도 탈락하는 현상을 발견하지 못함. 컨베이어 벨트는 선별시의 정확도 및 종자의 탈락을 방지하기 위해 마찰력이 좋은 고무로 이루어져 있어서 종자의 탈락 현상을 최소화 함.

라. 내구성 강화를 위한 요소 기술 개발

- 기존의 과실류에 많이 사용되고 있는 선별 시스템은 대부분 물리적인 방법으로 선별. 물리적인 방법으로 설계된 선별 시스템은 부품의 마모 및 물리적 타격으로 인해 잦은 수리 필요. 개발된 종자 자동 선별 시스템은 기존의 물리적인 방법에서 Air 분사를 이용하여 부품의 마모 및 물리적 타격이 없으며 각 Air 분사노즐에 들어가는 밸브역시 그림 5-10과 같이 전자식 솔레노이드 밸브를 이용하여 반영구적으로 사용할 수 있음. 또한 고무로 이루어진 컨베이어 벨트는 장기간 사용하면 변색 또는 변형이 이루어질 수 있어 컨베이어 벨트만 교체하는 방식을 사용하기 위하여 교체가 용이하도록 설계.



그림 5-10. 선별부에 사용하는 전자식 솔레노이드 밸브

3. Air분사 기술 개발 및 최적화

- 종자의 경우 선별대상이 매우 작고 중량이 적기 때문에 물리적인 분류로는 선별하기에 어려움. Air분사의 경우 압력의 조절에 따라 여러 형태의 종자를 선별할 수 있기 때문에 종자 자동 선별 시스템에 적합할 것으로 생각됨.
- 따라서 Air분사를 통하여 종자를 분류하도록 설계하고, 원터치 고속·고효율 에어분사 기술 개발.
- 설계된 종자 자동 선별 시스템은 총 7개의 라인으로 형성되어 있으며, 그에 따라 선별 포트역시 그림 5-11과 같이 7개로 구성. 각 포트별로 전자식 솔레노이드 밸브를 이용하여 반영구적으로 사용가능하도록 하였으며 하나의 Air를 이용하여 7개 포트 전부 사용하도록 함.
- 전체 포트는 컨베이어 벨트의 끝에 위치하여 정확도를 높였으며, 프로그램을 이용하여 인식된 종자를 자동선별이 가능하도록 설계. 각각의 Air분사 포트는 그림 5-12와 같이 CUBLOC을 이용하여 자동 선별이 가능하도록 제작.



그림 5-11. 선별부 Air분사장치



그림 5-12. 선별부 컨트롤러

4. 고효율 집진 기술 개발 및 조명시스템 구축

가. 먼지 등 선별 방해요소에 대응 가능한 고효율 집진 기술 개발

- 종자 자동 선별 시스템의 경우 IR카메라를 이용하여 선별하기 때문에 먼지 등 선별 방해요소에 방해 받지 않고 측정이 가능해야 함. 카메라와 렌즈와의 거리는 200~500 mm 조절가능하게 설계.
- 200~500 mm 떨어진 거리의 카메라 렌즈에 먼지하나로 인하여 라인 하나의 종자 선별이 오류가 생길 염려가 있기 때문에 그림 5-13과 같이 조명시스템 및 카메라를 밀실에 배치하여 카메라 및 조명 보호. IR 카메라의 경우 흑백 밀실이 필요하지 않아서 그림 5-13과 같이 백색판과 프로파일을 이용하여 구축.



(a) 측정부 앞면사진

(b) 측정부 뒷면 사진

그림 5-13. 종자 선별 측정부 앞, 뒷면 사진

나. 조명시스템 구축

- IR카메라의 경우 강한 빛이 필요하기에 표 5-3과 같이 100W 할로겐 램프 4개와 각각의 옵티컬파이버를 이용하여 조명시스템을 구축.

표 5-3. 조명시스템 구축 장비

장비명	비 고
할로겐 램프	LS-F100HS-IR, Seokwang Optical Co., LTD, Korea
옵티컬 파이버	QP1000-2, Ocean Optics Inc., USA



그림 5-14. 할로겐 램프 및 옵티컬파이버 사진

5. 고속 컨베이어형 종자 자동선별 시스템 설계

- 초분광 단파적외선 카메라와 선별 시스템과 선별 알고리즘을 이용하여 선별 시스템을 제작하였음. 본 연구에서 사용된 선별 시스템은 그림 5-15과 같으며, 초분광 카메라와 광원으로 구성된 측정부, 종자를 호퍼에서 벨트까지 이송하는 파트 피더와 종자를 이송하는 컨테이너 벨트로 이루어진 이송부 그리고 에어 컴프레셔와 에어 제킷으로 이루어진 선별부로 구성되어 있음.

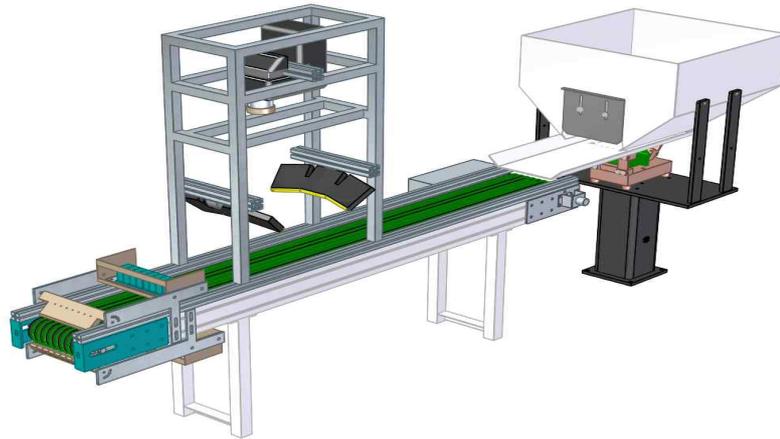


그림 5-15. 종자 선별 시스템

가. 호퍼

- 선별기의 호퍼는 그림 5-16과 같으며, 종자가 선별기에 투입되기 전에 종자의 저장 및 배출을 담당하는 부분임. 종자를 선별기에 투입시 많은양의 종자가 한꺼번에 유입 되면 선별부의 정확도가 떨어지게 됨. 이에 정확한 선별을 위해서는 최적의 양이 배출되도록 양의 조절이 필수적임. 이에 최적의 양을 배출할 수 있게 배출구에 막을 설치함.



그림 5-16. 종자 선별기의 호퍼

나. 진동이송부

- 컨베이어 벨트까지 이송을 담당하는 부분으로, 경사(5°)진 플랫폼에 진동을 이용하여 종자를 이송하는 방식을 채택하였음. 호퍼에 연결되어 있는 1단계 진동관은 플랫폼에 전체적으로 고르게 진동을 전달하여 국부적으로 균집되어 있는 종자를 균일하게 퍼트리는데 역할을 수행함. 2단계 진동관은 1단계 진동관에서 이송되어 오는 종자를 7개의 라인으로 나누어 컨테이너 벨트로 이송하는 역할을 수행함. 또한 종자가 균일하게 퍼트리는 역할 및 최적의 속도로 컨테이너 벨트로 이송하는 역할을 담당함. 2개의 진동관 모두 제어기를 통해 진동의 세기의 제어를 통해 최적의 속도로 조정이 가능하며 그림 5-17와 같음.



그림 5-17. 종자선별기의 진동관

다. 컨베이어 벨트

- 컨베이어 벨트의 폭은 사용되는 영상처리 카메라에 맞추어 200 mm로 설계되었으며, 컨베이어 벨트의 속도는 10 ~ 300 mm/sec로 조절이 가능함. 벨트의 속도를 측정하기 위한 엔코더 장치가 설치되어 있으며, PC와의 통신을 통해 컨베이어 벨트의 속도 측정이 가능함. 총 7개의 라인으로 이루어져 있으며, 초분광 카메라의 영상처리 정확도의 향상을 위해 라인의 골에 무광검정 처리를 하여 종자의 영상 측정 시 배경의 스펙트럼을 제거하였음.

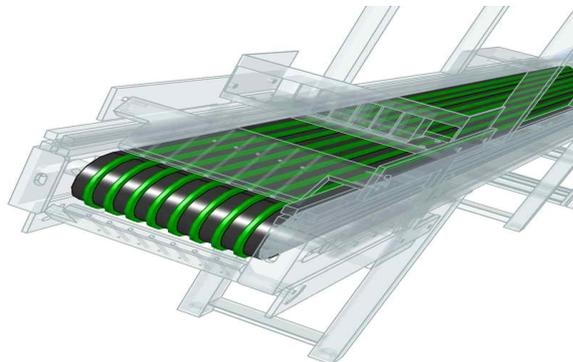


그림 5-18. 종자선별기의 컨베이어 벨트

라. 센서부

- 센서부는 종자의 측정을 위한 초분광 카메라, 영상처리와 에어노즐의 구동신호의 전송을 담당하는 소프트웨어, 에어노즐의 구동 및 컨베이어 벨트의 속도의 측정과 엔코더를 구동하는 CUBLOC 마이크로프로세서로 이루어져 있음.
- 컨베이어 벨트를 통해 이송된 종자가 초분광 카메라의 측정위치를 지나며 이미지와 스펙트럼을 획득하게 되며, Matlab을 이용해 작성된 소프트웨어가 초분광 이미지의 PLS-DA분석을 통해 및 이미지 선별이 이루어진다. 초분광 이미지를 통한 선별이 끝난후, RS-232 통신을 이용하여 이진신호로 CUBLOC 마이크로프로세서에 보내어 선별 등급에 따라 선별장치를 구동하게 됨. 선별장치의 구동은 릴레이 회로를 작동시켜 정상 시료가 통과할 때는 릴레이 회로가 구동되지 않게 하고, 불량 시료가 통과할 때는 릴레이 회로를 작동시켜 공기분사로 시료를 분리시키게 됨.
- 사용된 초분광 카메라는 단파적외선 영역(1000 ~ 2500 nm)을 사용하며 MCT(Mercury Cadmium Telluride sensor)센서(Xeva-2.5-320, Xenics, Belgium)와 Image spectrograph 탑재된 카메라(SWIR, Headwall photonics, Fitchburg, MA, USA), 초점 조절이 가능한 C-Mount 렌즈로 구성되어 있으며, 초분광 카메라와 Vision Controller를 연결할 수 있는 Frame grabber(Cronos plus, Matrox, Cannada)를 이용하였음.

마. 선별부

- 종자의 대량선별과 고속선별을 위해, CUBLOC 마이크로프로세서, 솔레노이드 밸브와 릴레이(SSR) 회로로 선별부를 구성하였음. 선별장치로 설계된 공기분사장치는 그림 5-19와 같이 7개의 포트로 구성하였으며 이를 제어할 수 있는 회로를 설계하였음. 설치된 릴레이는 기계식이 아닌 전자식을 채택하였는데 이는 기계식 릴레이는 사용 횟수가 많아지면 쉽게 마모되어 수명이 짧아지는 단점이 있기 때문임. 전체 포트는 컨베이어 벨트의 끝에 위치시켜 정확도를 높였음.

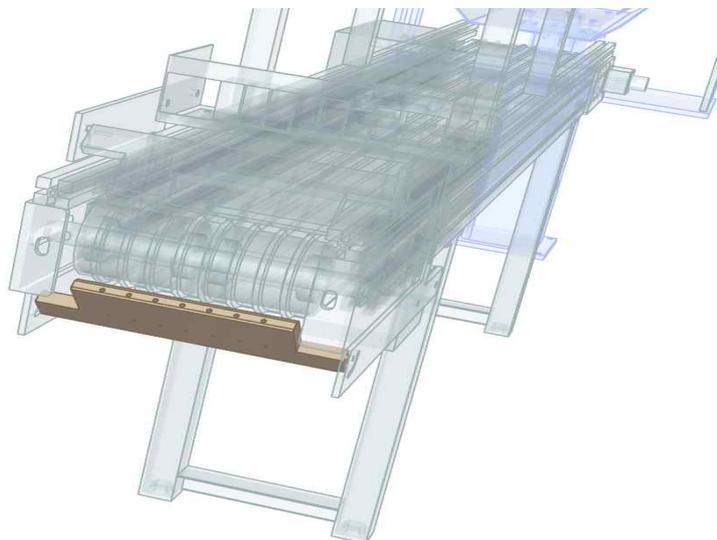


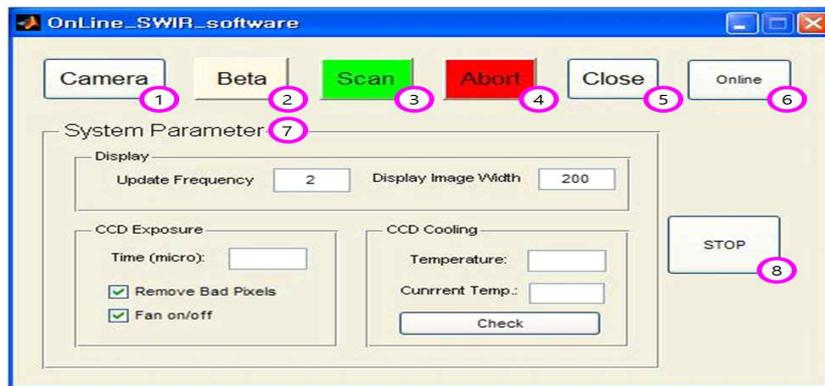
그림 5-19. 종자선별기 선별파트의 공기분사장치

6. 자동제어 시스템 및 소프트웨어 기술 개발

- 개발된 하드웨어 및 소프트웨어 기술을 적용한 종자 자동 선별 시스템 설계

가. 소프트웨어 및 알고리즘 개발

- 감염종자와 건전종자의 선별을 위한 초분광 영상처리 알고리즘과 이를 실시간으로 동작시키기 위한 소프트웨어를 개발하였음. 소프트웨어는 Microsoft Windows 환경에서 MATLAB(version 7.0.4, The Mathworks, Natick, MA, USA)을 이용하여 개발하였음. 소프트웨어의 운영방법은 그림 5-20과 같음.



- ① Camera Connection: 초분광 단파적외선 신호를 획득하기 위해 필요한 CCD 카메라와 연결함.
- ② Beta: 위에서 얻은 최적모델의 β 계수를 적용함.
- ③ Scan: 장치를 구동할 수 있음.
- ④ Abort: 기기의 작동을 멈출 수 있음.
- ⑤ Close: 프로그램을 종료하기 위해 설계함.
- ⑥ Online: 이미지 분석을 이용한 분류창을 나타냄.
- ⑦ System Parameter: 시스템의 파라미터를 입력하기 위해 개발되었음.
- ⑧ STOP : 시스템을 정지한다

그림 5-20. 종자 선별 시스템의 소프트웨어 개발

나. 초분광 영상처리 알고리즘 개발

- 감염종자와 건전종자의 선별을 위한 초분광 영상처리 알고리즘의 경우, 초분광 단파적외선 영상의 고속 측정 방법을 개발하기 위해 PLS-DA(Partial Least Squares-Discriminant Analysis) 분석방법을 이용하였음. 이는 기존의 PLS 모델과는 달리 종속변수로 연속적인 값이 아닌, 판별하고자 하는 그룹들을 가상 변수로 설정하여 이를 판별 하는 회귀모델임
- 분석 모델의 경우 스펙트럼 X 의 score 행렬 T 와 측정된 농도 Y 의 score 행렬 U 의 관계식으로 구한 beta coefficient를 이용하여 초분광 영상에서 PLS 영상을 구성함. 이를 감염종자와 비감염 종자를 선별하는 영상 구성에 이용하였음. Beta coefficient를 통해 최적모델을 선정하는데 활용하였으며, 카메라의 Exposure time과 선별부, 카메라 센서와의 연동 및 측정영상의 프레임크기를 최적으로 설정하여 고속(초당 2개)으로 초분광 영상을 획득 가능하도록 하였음

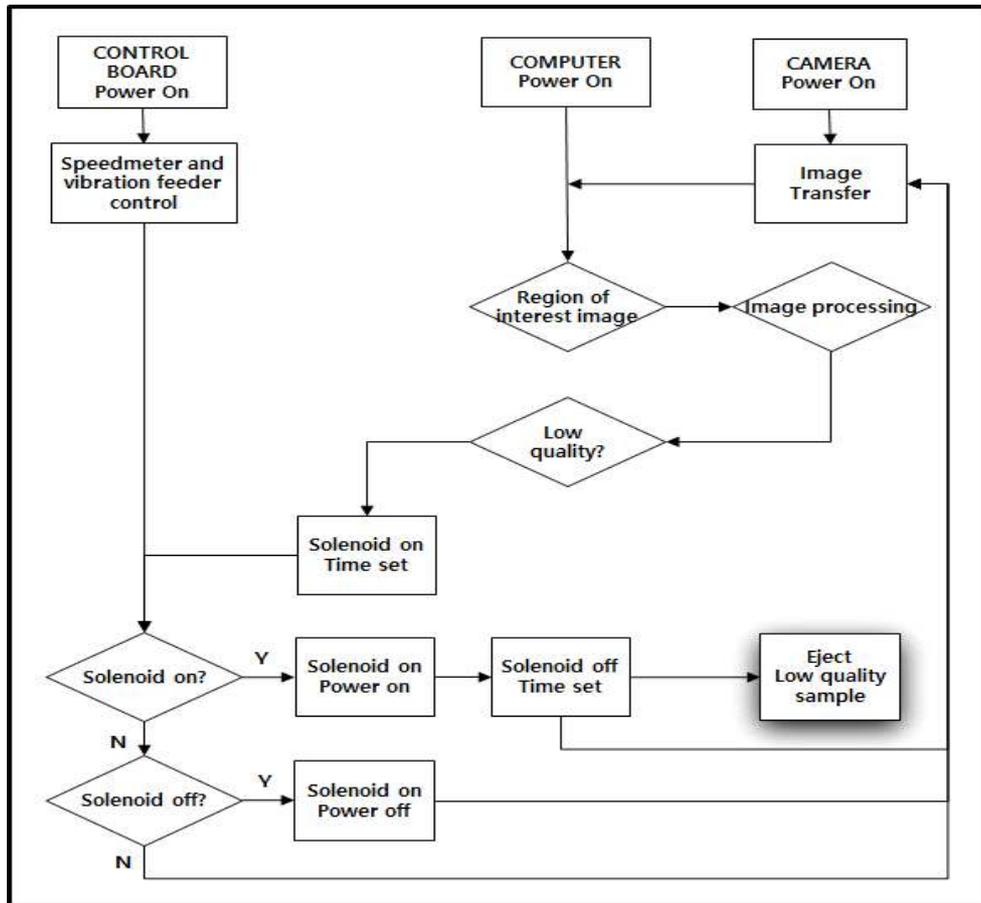


그림 5-21. 종자 선별기의 알고리즘 개발

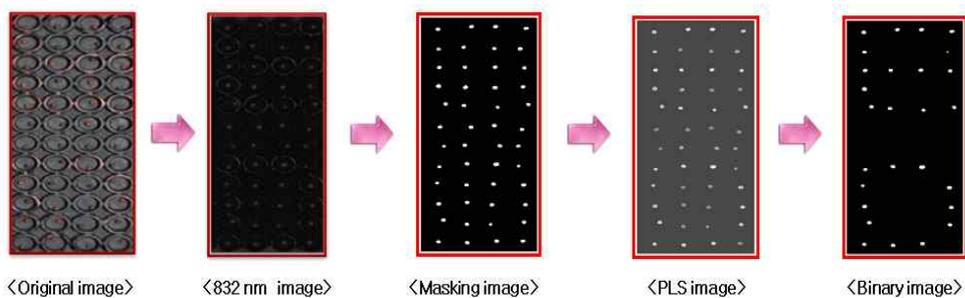


그림 5-22. PLS 영상을 이용한 종자선별 영상 알고리즘

- PLS-DA를 적용하여 영상처리의 자세한 순서는 그림 5-21과 같음. 최적의 파장영상을 이용하여 종자를 제외한 나머지 배경을 제거한 마스킹 이미지를 만듦. 마스킹 영상은 종자 영역은 '1' 이고 종자를 제외한 나머지 영역은 '0' 값을 가지게 됨. 이 마스킹 이미지에 PLS 판별모델의 beta coefficient와 PLS 영상을 곱하기 연산하여 종자 이외의 배경부분을 제거함. 마지막으로 PLS 모델에 의한 건전종자와 퇴화종자를 판별하는 기준을 임계값으로 적용하여 퇴화종자만 검출하는 최종 결과 영상을 얻을 수 있음.

7. 이병종자의 판별 실시간 검사 센싱장치 개발

가. 개발된 판별 모델이 장착된 실시간 비파괴 자동 전수검정용 초분광 영상 시스템 구축

- 1-2차년도에 수행한 기초 연구를 바탕으로 2차년도에 설계한 것과 같은(그림 5-15) 온라인 이병종자 시스템을 개발.
- 호퍼를 통해 판별할 이병 종자를 투입하고, 진동 정렬판을 통과하면서 정렬됨. 개발된 판별시스템의 전장은 100 cm이며, 투입부 및 배출부 등을 포함한 전장은 240 cm임. 이 길이는 변경이 가능.
- 정렬된 종자는 8열로 설계된 컨베이어 벨트를 통해 이송. 이송 속도는 0.014m/s로 운영. 향후 속도 조절이 가능하도록 변경할 예정.
- 이송된 종자를 100 와트의 할로겐 램프가 장착된 초분광 카메라 시스템으로 촬영. 초분광 영상시스템은 950-2500 nm의 파장과 320 x 256 의 영상을 갖추고 있으며, 촬영된 영상은 MCT센서로 감지. 개발된 선별 모델을 이용하여 솔레노이드와 블로어로 구성된 배출단에서 선별된 종자를 분리 배출.

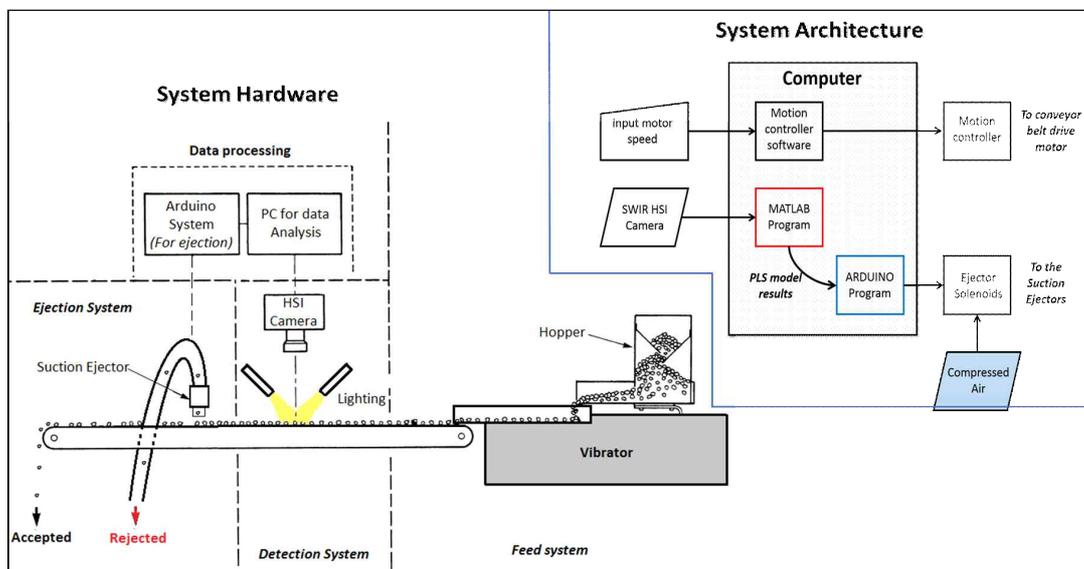


그림 5-23. 온라인 판별시스템 구성 및 운영도

- 그림 1에서는 개발된 온라인 이병종자 판별시스템 구성 및 실제 적용 과정을 구성한 모습을 나타냄.
- 호퍼에 종자를 투입하면 진동판을 거치면서 일렬로 정렬이 되고 벨트를 따라 이송된 종자는 초분광 카메라와 조명장치를 거치면서 이미지를 획득하게 됨. 획득된 초분광 영상에서 배경 제거 및 ROI설정 영상처리 알고리즘을 적용하여 종자영상만 획득하고 개발된 PLS-DA beta coefficient를 적용하여 바이러스 이병유무를 판별하게 됨. 설정된 문턱치에 따라 정상종자와 이병종자를 구분하는데 말단에서는 솔레노이드로 판별된 이병종자를 흡입하게 됨.

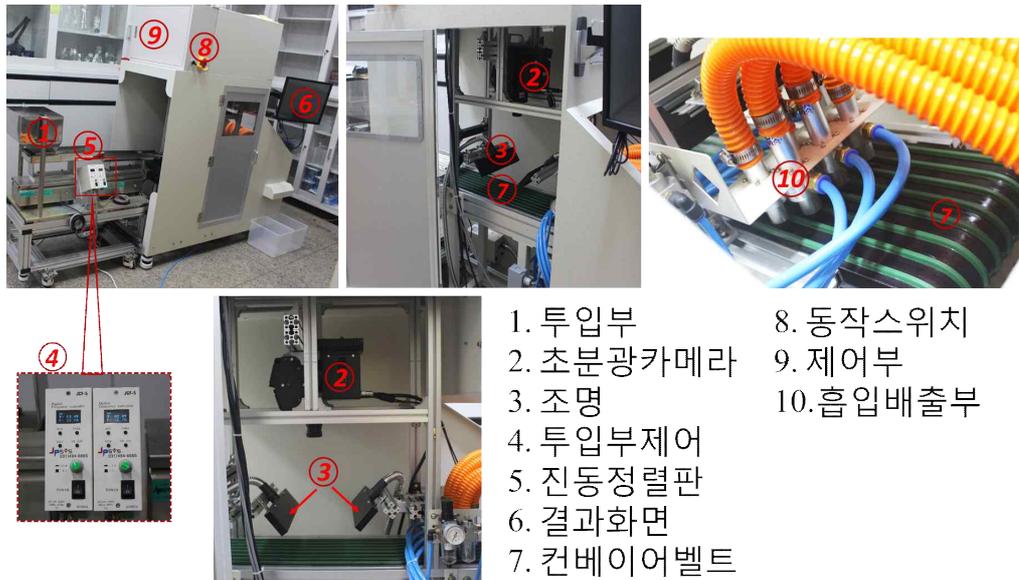


그림 5-24. 온라인 초분광영상 이병종자 판별시스템 주요 부위

- 그림 5-24에서는 실제 제작한 초분광영상을 이용한 온라인 이병종자 판별시스템의 외관과 주요 부위를 나타냄.
- 시스템의 좌측 (1번)에는 시료 투입부, 중앙 (2, 3번)에는 시료의 영상을 획득하는 카메라와 조명, 우측 (10번)에는 흡입 배출부가 위치하고 있음. 본 시스템은 속도 조절이 가능하며 시료의 양과 카메라 성능에 따라 최대 50rpm (7.15cm/s)으로 컨베이어 벨트 이송 및 판별이 가능함.

나. 배출부 성능향상 시스템 개선

- 온라인 판별 시스템을 통하여 판별된 결과를 바탕으로 종자를 선별하기 위해 배출구를 아두이노를 이용하여 솔레노이드를 제어하도록 제작. 기존 배출구의 설계는 blow out 방식이었지만 온라인 시스템에는 흡입 방식을 도입하였으며 본 연구에 사용된 아두이노의 형식은 다음과 같음.
- 표 5-4은 사용된 아두이노의 형식을 나타내며, 그림 5-25는 온라인 판별 시스템의 컨트롤 박스에 설치한 아두이노와 릴레이 모듈을 나타냄.

표 5-4. 아두이노 형식 주요 특징

Micro controller	ATmega328P
Operating voltage	5V
Input voltage (recommended)	7-12V
Input voltage (limit)	6-20V
Digital I/O Pins	14(of which 6 provide PWM output)
PWM Digital I/O Pins	6
Analog input Pins	6
DC Current per I/O Pin	20 mA
DC Current for 3.3V Pin	50 mA
Flash Memory	32 KB (ATmega328P) of which 0.5KB used by bootloader
SRAM	2 KB (ATmega328P)
EEPROM	1 KB (ATmega328P)
Clock speed	16 MHz
Length	68.6 mm
Width	53.4 mm
Weight	25 g



그림 5-25. 제어판에 설치된 임베디드 아두이노의 실제 모습

- 그림 5-26에는 종자의 영상획득과 판별의 결과를 하드웨어 상에 적용하는 과정을 나타냄.
- 컨베이어 벨트에 정렬된 종자가 초분광 영상분석장치로 투입되고, 획득한 초분광 영상을 처리 후 판별식으로 각 종자별 판별 결과를 아두이노에 전달. '0' 과 '1' 로 전달된 판별결과를 릴레이모듈에 연결된 솔레노이드에 전달. 위의 전달 과정을 통해 신호 변조를 통해 판별식으로 판별된 종자는 펌프를 통해 최종적으로 선별. 솔레노이드를 통해 펌프를 작동시키면 대조구(정상종자)는 배출구들 통해서 선별되고, 처리구(이병종자)는 자유낙하하도록 배출구를 나눔.

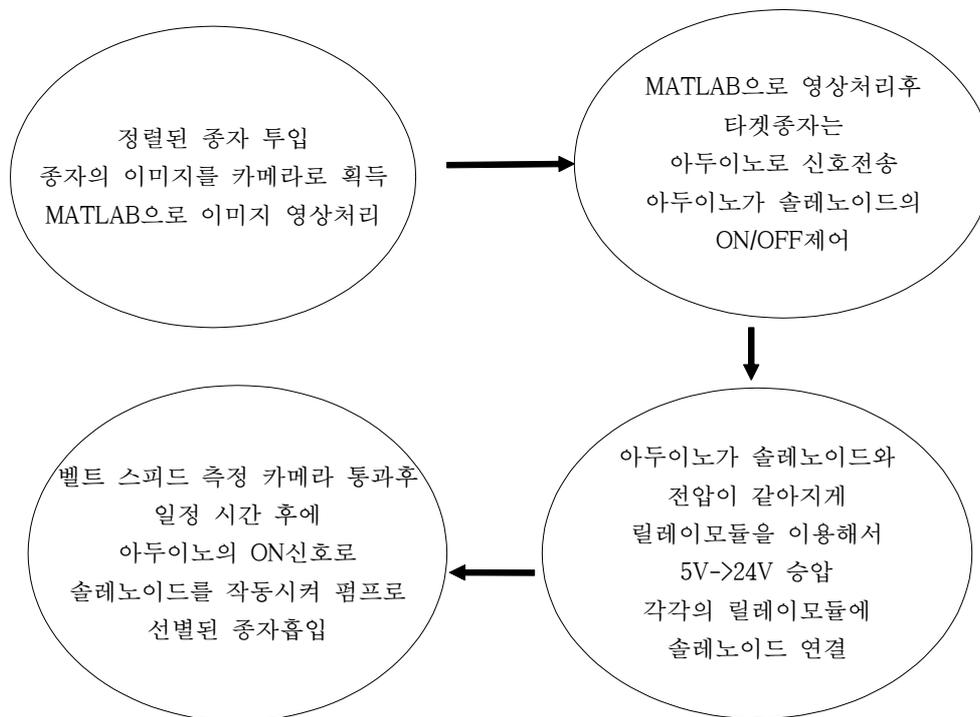


그림 5-26. 아두이노의 신호전달 체계도



그림 5-27. 아두이노를 이용한 배출부의 실제 신호전달 순서

- 그림 5-27에는 그림 5-26의 순서로 신호전달과정을 통해 판별된 종자를 펌프로 흡입하는 과정을 실제 시스템에 부착된 장비간의 전달과정을 나타냄.
- 노란 선은 장비간 신호전달과정을 나타내며 마지막 청색 파이프를 통해서 선별 종자를 흡입하게 됨. 아두이노에 전달된 신호는 릴레이모듈로 솔레노이드에 전달되고 펌프에 신호를 보내어 목표 종자를 파이프로 석선하여 최종 배출. 컨베이어 벨트의 이송속도에 맞추어 최종판별결과가 아두이노에 전달될 수 있도록 이송속도의 모니터링을 계속 진행하게 됨.

제6절 이병종자 비파괴 검사용 Java 기반 프로그램 개발, 검사패턴 및 결과정보 Data 관리 체계 구축 (제4협동)

1. 홈페이지 개발

구축된 자료를 향 후 OpenAPI 형태로 원격(타 기관시스템)에서 접근 할 수 있는 서비스 형태를 마련하기 위하여 REST 기술을 기반으로 Remote Access 가 가능한 형태로 개발

가. Spring Framework 기술 기반 개발

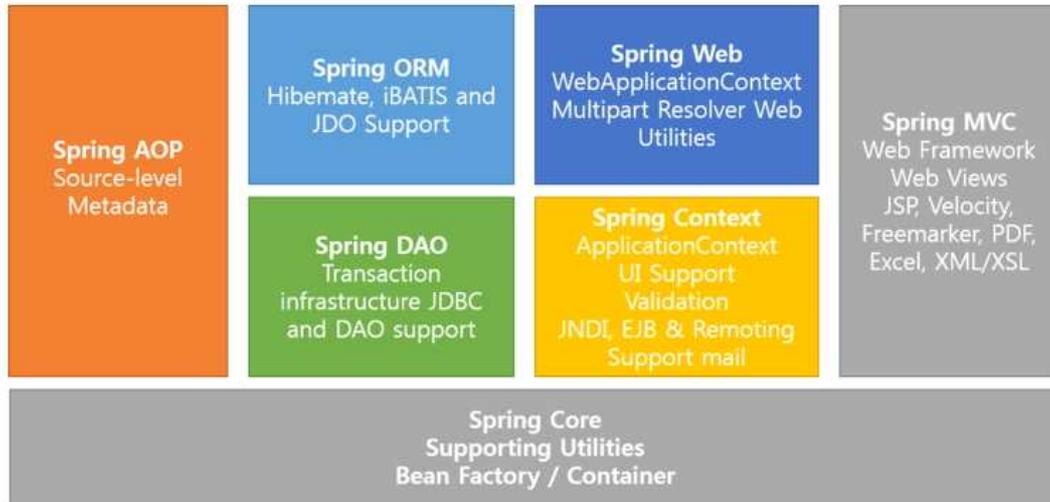


그림 6-1. Spring Framework 기술 기반 개발

- (1) Spring Framework은 자바 객체를 담고있는 경량 컨테이너(Light Weight Container)로서 자바 객체의 생성, 소멸과 같은 라이프 사이클을 관리하며 스프링으로부터 필요한 객체를 가져와 사용할 수 있습니다.
- (2) Spring Framework는 DI(Dependency Injection) 패턴을 지원함으로써 설정 파일을 통해서 객체간의 의존 관계를 설정 할 수 있습니다.
- (3) Spring Framework는 AOP(Aspect Oriented Programming)을 지원합니다.
- (4) Spring Framework는 POJO(Plain Old Java Object)를 지원합니다.
POJO란 객체 지향적인 원리에 충실하면서, 환경과 기술에 종속되지 않고 필요에 따라 재활용 될 수 있는 방식으로 설계된 Object를 말합니다.
- (5) Spring Framework는 트랜잭션 처리를 위한 일관된 방법을 제공 합니다.
- (6) Spring Framework는 영속성과 관련된 다양한 API를 제공합니다.
JDBC를 비롯하여 iBATIS, 하이버네이트 등 데이터 베이스 처리와 관련하여 사용되는 라이브러리와 연동을 지원합니다.
- (7) Spring Framework는 다양한 API에 대한 연동을 지원합니다.
- (8) Spring Framework는 자체적으로 MVC Framework를 제공합니다.

나. 비파괴 바이오센싱 홈페이지 콘텐츠 구성

표 6-1. 비파괴 바이오센싱 홈페이지 메뉴 구성

메뉴	서브 메뉴
연구소개	인사말
	연구소개
	연구일정
	조직도
연구개발정보	연구진 구성체계
	특허현황
정보마당	보도자료
	자료실
	갤러리
알림마당	공지사항
	자유게시판
	FAQ
검사현황	자료취합
	통계

다. 홈페이지 화면

(1) 메인화면

- 총 5가지 메뉴들을 마우스 오버하면 각자의 서브 메뉴가 나옴.
- 홈페이지의 주요 일정을 알려주는 POPUP ZONE과 게시판의 게시물(공지사항, 보도자료, 자유 게시판), 규정 및 서식을 메인화면에 노출.



그림 6-2. 비파괴 바이오센싱 홈페이지 메인화면

(2) 게시판 리스트 화면

- 보도자료, 자료실, 공지사항, 자유게시판 등 리스트 화면과 동일하게 구성
- 순번, 제목, 등록일, 조회수 노출
- 제목을 클릭하면 상세보기 페이지로 이동



그림 6-3. 비파괴 바이오센싱 게시판 리스트 화면

(3) 게시판 상세 화면

- 보도자료, 자료실, 공지사항, 자유게시판 등 상세 화면과 동일하게 구성
- 게시자, 등록일, 제목, 출처, 내용 등을 노출
- 목록을 클릭하면 리스트 페이지로 이동
- 모든 페이지에 홈페이지 콘텐츠 평가 기능을 넣어 사용자의 콘텐츠 평가 사항 확인 가능



그림 6-4. 비파괴 바이오센싱 게시판 상세 화면

(4) FAQ 화면

- 사용자가 자주할 수 있는 질문들을 작성하여 보다 편리하게 홈페이지를 이용할 수 있게 함
- FAQ 리스트의 질문을 클릭하면 답변이 하단으로 노출 됨

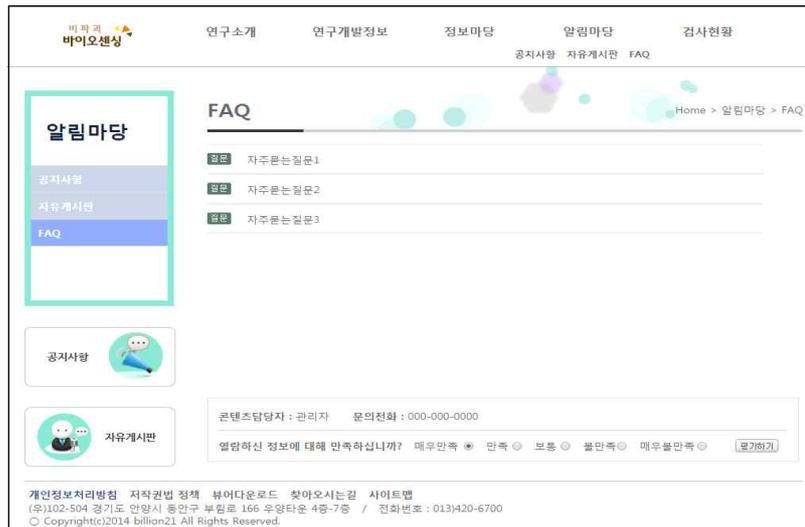


그림 6-5. 비파괴 바이오센싱 홈페이지 FAQ 화면

(5) 사이트맵 화면

- 이용안내 메뉴 : 개인정보 처리방침, 저작권법 정책, 사이트맵, 찾아오시는길, 뷰어 다운로드
- 각 메뉴를 클릭하면 해당 페이지로 이동

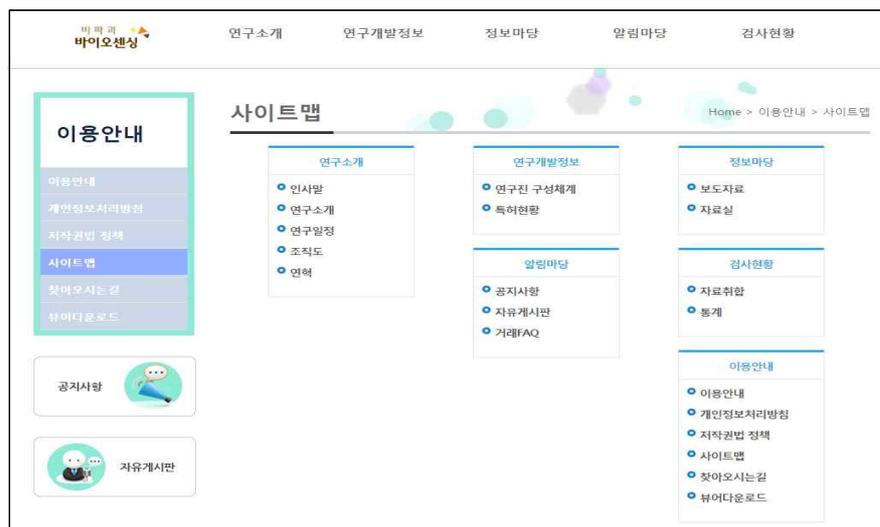


그림 6-6. 비파괴 바이오센싱 홈페이지 사이트맵 화면

2. DB 구축 알고리즘 개발

가. TCP/IP 기반 원격지 자료 송·수신 모듈 개발

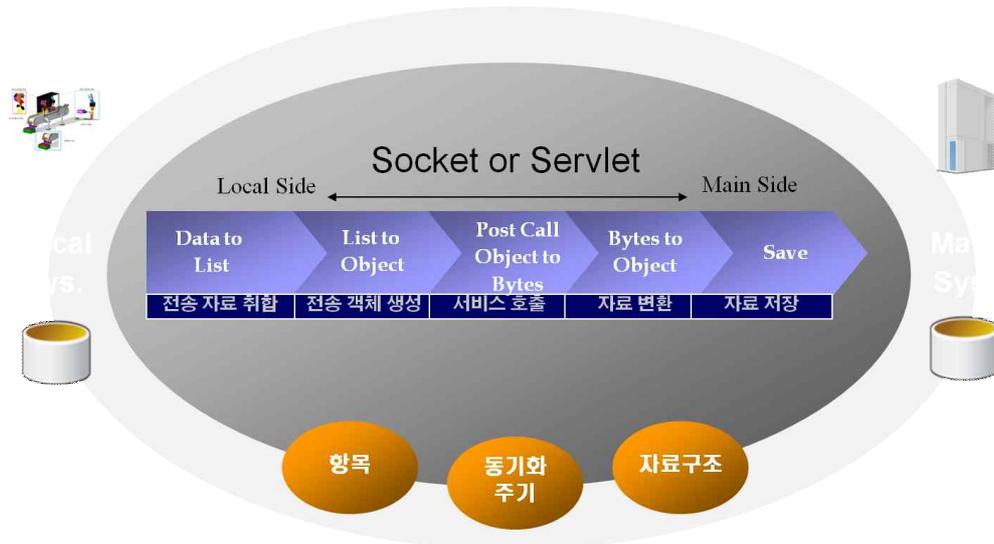


그림 6-7. TCP/IP 기반 원격지 자료 송·수신 모듈

나. 이 기종간 자료 호환 프로토콜 개발

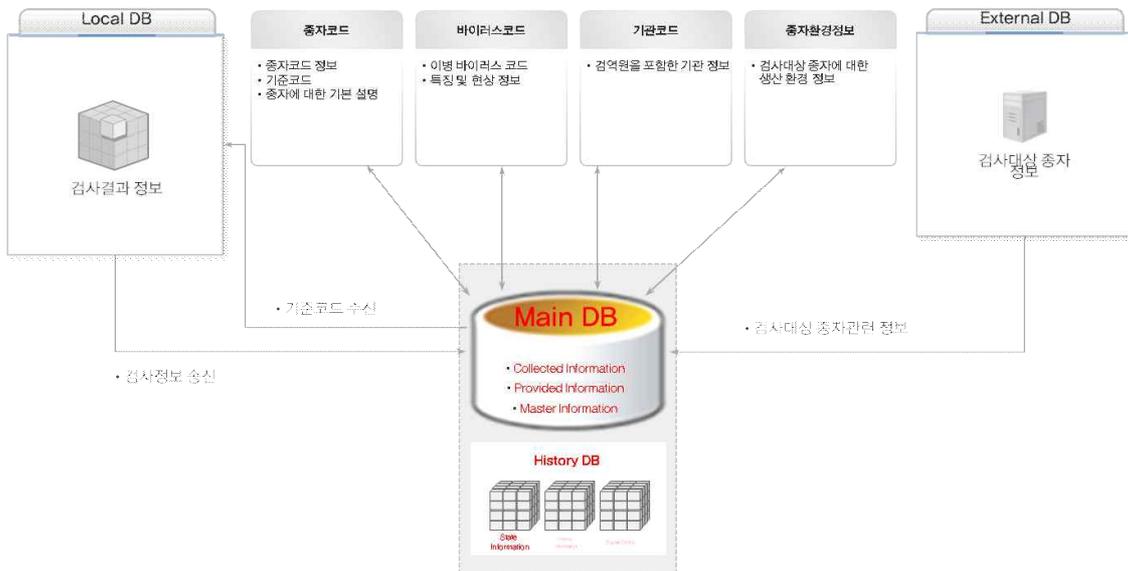


그림 6-8. 이 기종간 자료 호환 프로토콜

3. 검사결과 자료 통계기능 개발

- Java Chart Free 기반 통계기능 개발: 크로스브라우징 즉, 모든 브라우저에서 동작하는 클라이언트 사이트의 자바스크립트(jQuery)를 사용하여 Chart 구성
- 이병종자 검출 일자별 총수량, 건전종자 수량, 이병종자 수량을 나타내도록 구성
- 목록을 클릭하면 리스트 페이지로 이동



그림 6-9. 비파괴 바이오센싱 홈페이지 통계 화면

4. 홈페이지 보완

가. 메인화면 변경

- 메인 색상 및 메인 이미지 변경
- 메인화면 레이아웃 변경
- 팝업과 공지사항, 보도자료, 이병종자 통계, 바로가기 노출을 통해 사용자가 보다 편리하게 이용할 수 있도록 구성



그림 6-10. 비파괴 바이오센싱 홈페이지 메인화면 변경

나. 서브화면 변경

- 모든 서브페이지 메인 색상 및 메인 이미지 변경
- 모든 서브화면 레이아웃 변경



그림 6-11. 비파괴 바이오센싱 홈페이지 서브화면 변경

5. 비파괴 바이오센싱 자료취합 화면

- 각 메뉴를 클릭하면 해당 페이지로 이동
- 검사원이 직접 데이터를 입력할 수 있는 자료 등록 화면
- 자료를 등록하고 리스트로 관리하며 통계기능과 연동됨



그림 6-12. 비파괴 바이오센싱 홈페이지 자료 취합 화면

6. 비파괴 바이오센싱 관리자 페이지 개발

- 각 메뉴를 클릭하면 해당 페이지로 이동
- 회원관리(수정, 등록, 삭제) 가능



그림 6-13. 비파괴 바이오센싱 관리자 페이지



그림 6-14. 비파괴 바이오센싱 관리자 페이지_게시판 관리 화면

7. 단위시험 결과 도출

- 하나의 소프트웨어 모듈이 정상적으로 기능을 수행하는지 여부를 시험하는 최소 수준의 시험
- 각각의 케이스별로 설계서 상에 정의된 기능을 제대로 수행하는지 검증

단위시험ID	D11_UT_001					
설명	인사말, 연구소개, 연구일정, 조직도 등의 정보를 제공한다.					
케이스ID	케이스명	작업권한	시험데이터	시험항목 및 처리절차	예상결과 및 검증방법	시험결과
UT_001	메뉴목록	전체	메뉴ID	1.메뉴에서 화면 선택 2.초기화면에 메뉴목록 확인	화면에 목록 디스플레이 SQL로 DB확인	적합
UT_002	콘텐츠	전체	데이터없음	1.메뉴에서 화면 선택 2.화면에 관련 콘텐츠 확인	화면에 목록 디스플레이 SQL로 DB확인	적합

단위시험ID	D11_UT_002					
설명	각 연구진들의 구성체계, 특허현황 등의 정보를 제공한다.					
케이스ID	케이스명	작업권한	시험데이터	시험항목 및 처리절차	예상결과 및 검증방법	시험결과
UT_001	메뉴목록	전체	메뉴ID	1.메뉴에서 화면 선택 2.초기화면에 메뉴목록 확인	화면에 목록 디스플레이 SQL로 DB확인	적합
UT_002	콘텐츠	전체	데이터없음	1.메뉴에서 화면 선택 2.화면에 관련 콘텐츠 확인	화면에 목록 디스플레이 SQL로 DB확인	적합

그림 6-15. 단위시험 결과서

8. 통합시험 결과 도출

- 소프트웨어 프로그램의 데이터 및 기능의 인터페이스가 정상적으로 작동하는지 검증

시험시나리오명	연구소개			
시험시나리오설명	인사말, 연구소개, 연구일정, 조직도 등의 정보를 제공한다.			
시험케이스 ID	시험케이스 설명	시험 절차	시나리오 설명	비고
D10_TC_001	연구소개 조회	1.메뉴리스트 조회 2.연구소개 콘텐츠 조회	메뉴리스트 및 콘텐츠 조회	

시험시나리오명	연구개발정보			
시험시나리오설명	각 연구진들의 구성체계, 특허현황 등의 정보를 제공한다.			
시험케이스 ID	시험케이스 설명	시험 절차	시나리오 설명	비고
D10_TC_002	연구개발정보 조회	1.메뉴리스트 조회 2.연구개발정보 콘텐츠 조회	메뉴리스트 및 콘텐츠 조회	

그림 6-16. 통합시험 결과서

9. 시스템시험 결과 도출

- 소프트웨어 프로그램의 모듈이 하나의 시스템으로 동작함으로써 시스템 성능에 문제가 없는지 또는, 요구사항이 완벽히 수행되는지 검증

시험 유형		비기능			
관련 요구사항ID					
시험시나리오 ID	시험시나리오	시험절차	만족기준	시험결과	비고
D7_TS_001	비파괴 바이오센싱 사업에 적합한 창의적이고 독창적인 디자인과 사용자의 접근성을 고려한 링크 제공 및 체계적인 카테고리 별로 구성된 맞춤형 기능을 설계한다.	비파괴 바이오센싱 사업에 적합하고 창의적이고 독창적인 디자인으로 홈페이지가 구성되었는지 확인한다.	비파괴 바이오센싱 사업에 적합하고 창의적이고 독창적인 디자인으로 홈페이지가 구성된다.	디자인 관련 회의 결과에 따라 홈페이지 디자인을 구성하였다.	

시험 유형		비기능			
관련 요구사항ID					
시험시나리오 ID	시험시나리오	시험절차	만족기준	시험결과	비고
D7_TS_002	국내 및 국외 시장 개척 및 비파괴 바이오센싱 기반 이병종자 신속 전수검사기술 개발 및 상용화라는 정체성을 확립할 수 있는 디자인 및 고객 편의를 위한 다양한 콘텐츠를 개발한다.	비파괴 바이오센싱 홈페이지의 콘텐츠가 적절한지 확인한다.	비파괴 바이오센싱 홈페이지의 콘텐츠가 적절한지 확인한다.	회의결과에 따라 콘텐츠가 구성되었다.	

그림 6-17. 시스템시험 결과서

10. H/W 오차 보정용 S/W 개발

가. 실시간 자동화 측정을 위한 고속 초분광 영상처리 기술 개발

- 초당 100 프레임(320×256, 1002×1004 pixels) 이상의 고속으로 획득되는 대용량(약 100 MB/sec)의 초분광 영상데이터를 실시간 영상처리하기 위해서는 데이터의 압축 또는 특정 스펙트럼의 추출이 요구됨.
- 획득되는 모든 분광대역이 검출, 판별, 예측을 위한 데이터 분석에 활용되는 것이 아니므로 데이터의 압축 및 특정 스펙트럼 추출 기술은 고속 초분광 영상처리를 위한 필수 요건임. 실시간 획득되는 line-scan 데이터를 이용하여 실시간 영상DB를 구축할 수 있음. 실시간 초분광 영상처리(SWIR 기준)를 과정을 요약하면 아래와 같음.

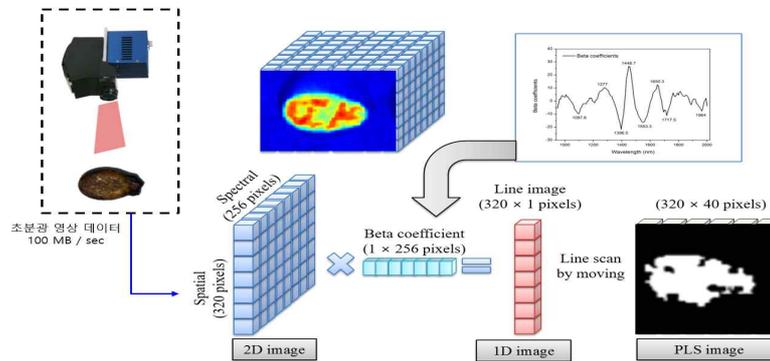


그림 6-18. 실시간 초분광 영상처리 과정

- 실시간 검사를 위하여 대상물의 이송속도로 설정하여 유효 파장 해상도를 적용하여 라인스캔으로 하나의 라인에 대한 파장 데이터를 획득함.
- 대상체만 분석이 될 수 있도록 영상 마스크를 적용함.
- 모델링된 PLS-beta coefficient를 픽셀별로 적용하여 PLS 영상을 획득함.
- PLS 영상에 문턱값을 적용하여 타깃 인자를 시각화하고 분석결과를 출력함.

나. 초분광영상 장치 캘리브레이션 알고리즘 개발

- 실제 현장에서 이병종자의 실시간 판별을 수행하기 위해 개발된 모델과 과년도에 획득한 데이터DB를 적용하기 위하여 판별 시스템의 캘리브레이션을 수행함.
- 일반적인 초분광 카메라의 캘리브레이션을 다음과 같은 순서를 따름.
- 먼저 99%의 반사성능을 가진 teflon white 패널을 이용하여 white reference를 획득함.
- Dark reference 는 센서 렌즈부에 덮개를 씌워 빛을 완전히 차단한 상태로 촬영함.
- 이상의 방식으로 획득한 white 및 dark reference를 이용하여 다음과 같은 식을 이용하여 상대반사값(%)을 구함.

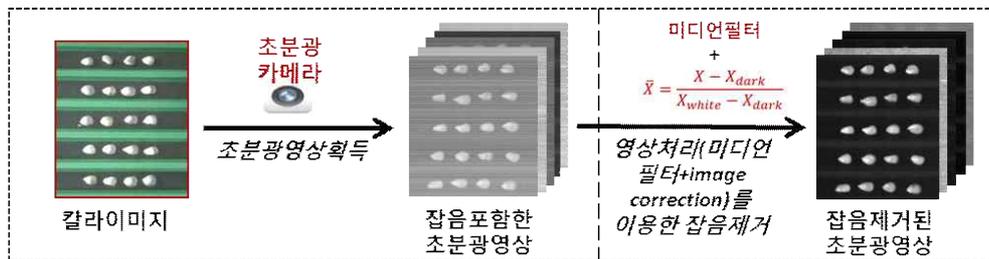
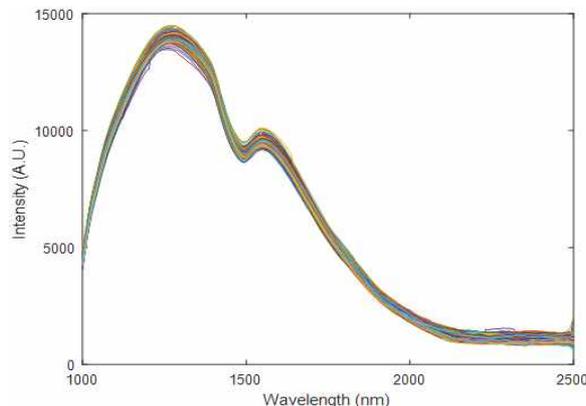


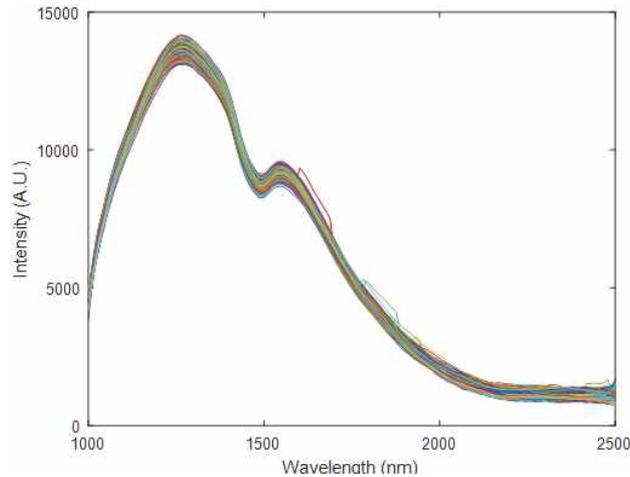
그림 6-19. 카메라 캘리브레이션 및 잡음제거

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

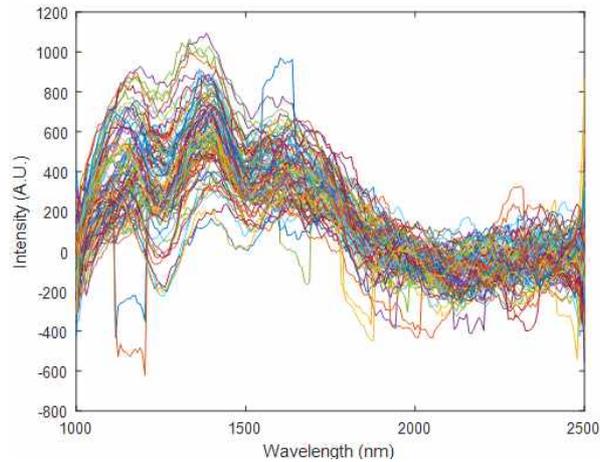
- 여기서, R 은 상대반사값, R_i 는 샘플을 측정된 실제 반사값, D 는 dark reference 값, W 는 white reference 값임.
- 다음 그래프는 실제로 획득한 white reference 데이터임.



- 다음은 반복 촬영한 white reference 스펙트럼임.



- 다음은 두 스펙트럼의 차이를 나타낸 그래프임.



다. 동일 제품군 카메라 캘리브레이션 방식 개발

- 상기 절에서 제시한 동일 카메라에서 다수 획득한 white reference의 스펙트럼 비교 방식에서도 언급하였지만 동일 브랜드의 영상획득장치라 하더라도 미세한 차이가 발생할 수 있다. 본 절은 동일 제품군의 두 카메라의 캘리브레이션 방식임.
- 본 과제에서는 스펙트럼 전처리 방법 중 하나로 널리 사용되는 standard normal variate (SNV)와 range normalization을 이용하여 동일 제품군의 카메라 스펙트럼 차이를 효과적으로 제거할 수 있는 방법을 개발하였음.
- SNV는 평균이 0, 분산이 1인 확률밀도함수를 나타내는 함수로서, 확률밀도함수 $f(x)$ 와 구간 $[a,b]$ 에 대해서 확률변수 X 가 구간에 포함될 확률 $P(a \leq X \leq b)$ 을 가질 함수는

$$f(x) = \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi}}\right)e^{-x^2/2}, \quad -\infty < x < \infty$$

- 이 표준화률분포를 이용하여 개별 스펙트럼을 중앙으로 이동시키고 (mean centering) 개별 스펙트럼의 스케일은 표준편차로 변형시킴

$$S_{ij}(SNV) = \frac{S_{ij} - \overline{M}_i}{SDev}$$

- 여기에서, i =스펙트럼 번호, j = i 번째 스펙트럼의 intensity, S_{ij} 는 측정된 스펙트럼 데이터, \overline{M}_i 는 i 번째 스펙트럼의 평균값, $SDev$ 는 i 번째 스펙트럼의 표준편차를 나타냄.
- Range normalization은 스펙트럼의 최대값과 최소값의 차이로 개별 스펙트럼을 나눈 값으로 설정하였음.

$$S_i(RN) = \frac{x_i}{\max(x) - \min(x)}$$

- 여기에서, x_i 는 측정된 스펙트럼, $\max(x)$ 는 스펙트럼의 최대치, $\min(x)$ 는 최소치를 나타냄.
- 본 과제에서는 두 방식을 이용하여 동일 제품군으로 획득한 스펙트럼의 차이를 최소화할 수 있는 효과적인 캘리브레이션 방식을 제시함.
- 다음 그림은 SNV와 Range normalization를 통해서 노이즈를 제거한 두 데이터군의 차이를 비교한 그림임.

SNV	Range Normalization

- 위의 두 그림에서 볼 수 있듯이 SNV에 비해서 Range normalization 방식이 약 20%의 성능 향상을 보인 것을 확인할 수 있음.

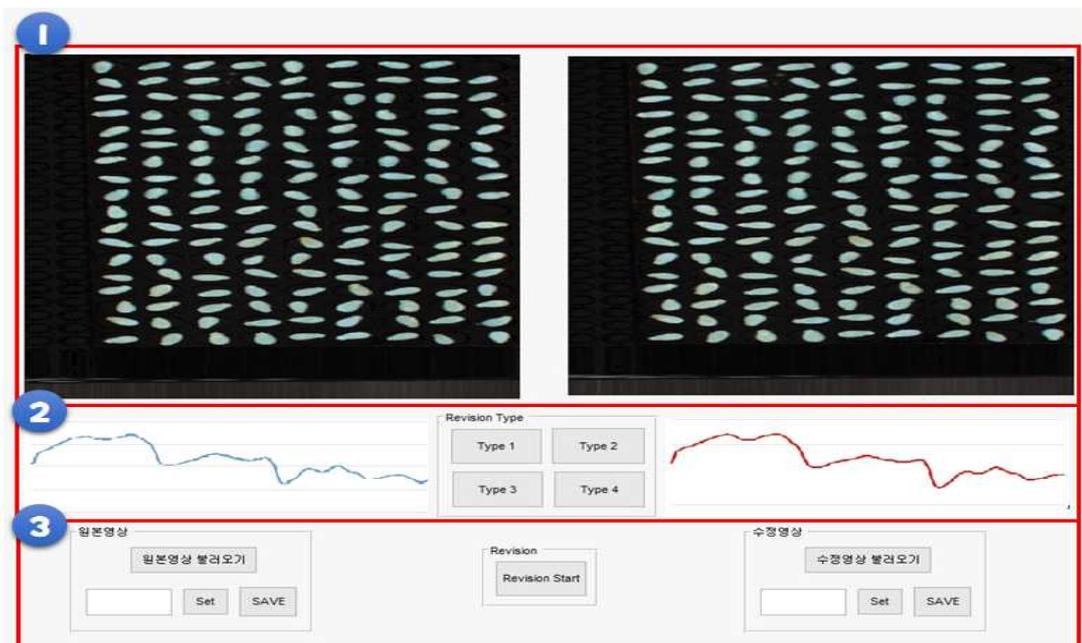
라. 타사 제품군 카메라 캘리브레이션 방식

- 이미 획득한 수박 종자의 DB를 이용하여 제작한 모델을 타 기종의 카메라를 이용하여 사용할 경우는 interpolation방식의 캘리브레이션이 요구됨.
- 다음은 파장범위나 resolution이 다른 이종의 두 카메라의 스펙트럼을 캘리브레이션 하는 방정식임.

$$y = y_1 + (x - x_1) \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

- 여기에서, x_1, x_2 는 기존의 스펙트럼에서 획득한 두 파장의 값, y_1, y_2 는 x_1, x_2 에 대응되는 intensity, x 는 x_1, x_2 사이의 다른 resolution을 가진 카메라의 파장, y 는 파장 x 일 때 얻게되는 intensity값.
- 따라서 타사 제품의 캘리브레이션을 위해서는 interpolation을 사용하면 효과적인 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단됨.

마. 카메라 캘리브레이션 GUI



- 위 GUI는 H/W 오차 보정용 S/W 개발 의 화면임. 이는 이미 획득한 수박 종자의 DB를 이용하여 제작한 모델을 타 기종의 카메라의 스펙트럼과 비교하여 스펙트럼의 보정을 실시함. 전처리별로(SNV, range Normalization, 미분법, MSC)의 전처리를 type별로 제공하며 DB와 스펙트럼을 비교, 보정을 실시하게 됨. 소프트웨어의 자세한 설명은 다음과 같음.

- ① 이미지창 : 로드된 이미지를 표시함. 초분광 이미지 파일을 로드하여 픽셀의 선택이 가능
- ② 스펙트럼창 : 로드된 이미지에서 선택한 영역의 스펙트럼을 표시함. Type별로 전처리를 선택하여 이미지의 보정이 가능.
- ③ 초분광 이미지 로드 및 보정 : 이미지를 로드하여 ①의 이미지창에 로드, 영역의 선택이 가능. 또한 ②에서 선택한 type을 통해 이미지의 보정을 실시함. 보정된 설정은 자동으로 설정되어 카메라의 보정작업실 실시.

11. Push형 자료 동기화 기술 개발

- 일반적인 Web 통신 방식인 Request & Response 기술은 반드시 Client에서 요청을 전송해야 서버가 응답함
- 즉, 최신의 정보를 취득하기 위하여 내부 javascript timer 등을 이용한 지속적인 요청이 필수적으로 요구되어 서버와 클라이언트 영역에 불필요한 패킷이 발생하여 시스템의 전반적인 속도를 저하시킴
- 이를 해결하기 위하여 비동기적 처리 기술은 Ajax 기술도 개발되었지만 전통적인 Request & Response 범위 내에서 동작하므로 시스템의 속도 개선에는 한계를 지님
- 따라서, 본 연구에서는 C/S(Client/Server) 프로그램에서 사용하는 Socket 통신 기술 기반으로 개발된 WebSocket 기술(Web 환경에서도 유사 기능을 수행할 수 있는 기술)을 적용하여 Pull 방식이 아닌 Push 방식의 기술을 개발함

가. Websocket 기술

- 실시간 정보를 빠른 속도로 client로 전송하는 방식
- Client의 요청에 관계없이 서버는 모든 클라이언트로 정보 송신
- 모든 Client로 정보를 송신하는 것은 보안 및 불필요한 정보의 송수신이 발생하는 문제점을 지님
- 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 Oracle 그룹에서 제공하고 있는 Websocket 라이브러리를 본 연구의 목적에 적합한 형태로 재가공하여 사용함
- Websocket 재가공
 - (1) Connection Class 영역에 FarmID (사용자 농장 또는 검사장 고유코드)
 - (2) Connection Class 영역에 DeviceID (종자 중량송수신장치 고유코드)
 - 위 두 가지 요소를 추가하여 Connection Thread 그룹에서 FarmID와 DeviceID가 일치 하는 장치와 Client에만 정보를 송신할 수 있는 기술을 개발함

- 나. Push형 자료 동기화 기술은 Server, Client 및 End Point인 중량송수신장치의 변화된 환경을 실시간으로 동기화하여 현재 상태의 비동기화로 인한 중복명령 실행 등에 의한 시스템의 오동작을 방지할 수 있도록 개발함

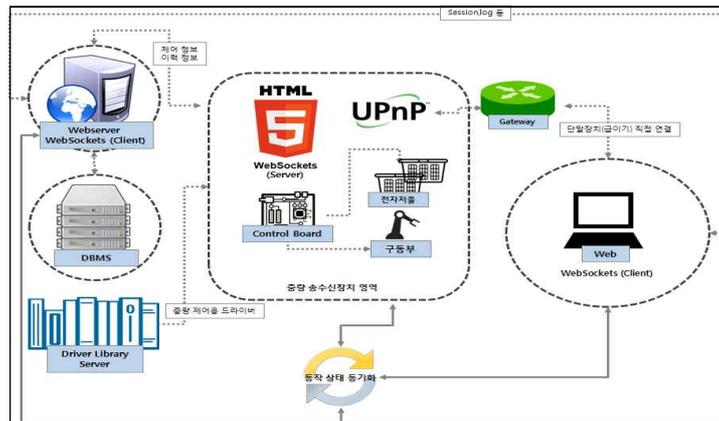


그림 6-20. 검사대상 종자 중량송수신 장치 운영 개념도

12. 실시간 자료 수집 시스템 개발

가. 장치의 핵심인 메인보드는 Linux 기반의 RaspberryPi를 사용하여 Java 기술을 기반으로 개발한 프로그램을 firmware 방식으로 개발

나. Load Cell을 이용한 종자중량송수신장치 전자저울 개발

- 검사 대상 종자의 중량을 계측하는 전자저울
- 감염된 종자의 중량을 계측하는 전자저울

다. 검사 총량을 계측하는 장치는 전동모터를 부착하여 상하(180°)로 회전하는 구동부를 부착하여 검사기로 종자를 이동시킬 수 있도록 개발

- 구동부는 종자의 검사 총량을 계측하여 서버로 전송하며 감염량을 계측하는 장치는 동작중의 중량 변화를 실시간으로 Push 방식으로 서버와 클라이언트로 전송

라. 데이터 송수신에는 Socket 통신 기술을 사용하였으며 장치 설치 위치의 네트워크가 out bound로 사용되는 port가 열리면 모든 인터넷 환경에서 사용 가능하도록 개발



그림 6-21. 검사대상 종자 중량송수신 장치 운영화면

13. 빅데이터 분석을 위한 GIS 기반 종자 이력관리시스템 개발

- GIS 엔진은 GeoServer, 뷰어는 OpenLayers 기술 적용
- Java 기술 기반으로 Web 서비스 개발
- 실시간 종자중량 송수신장치로부터 저장된 자료를 GIS 기반으로 지역별, 시기별 현황 통계 표출
- 기본 레이어와 토양관련 레이어는 V-World에서 제공하는 레이어를 WMS 방식으로 호출 하여 삽입하였고, 생산시설과 검사시설 위치는 PostgreSQL과 PostGIS를 이용하여 WFS 형태로 삽입하여 마우스의 동작 이벤트에 동적으로 반응할 수 있도록 개발

가. 종자 공급처 및 검사시설

- 생산시설과 검사시설을 심볼로 구분하여 지도에 표시하여 각 시설간의 위치적 관계성을 직관적으로 이해할 수 있도록 표기

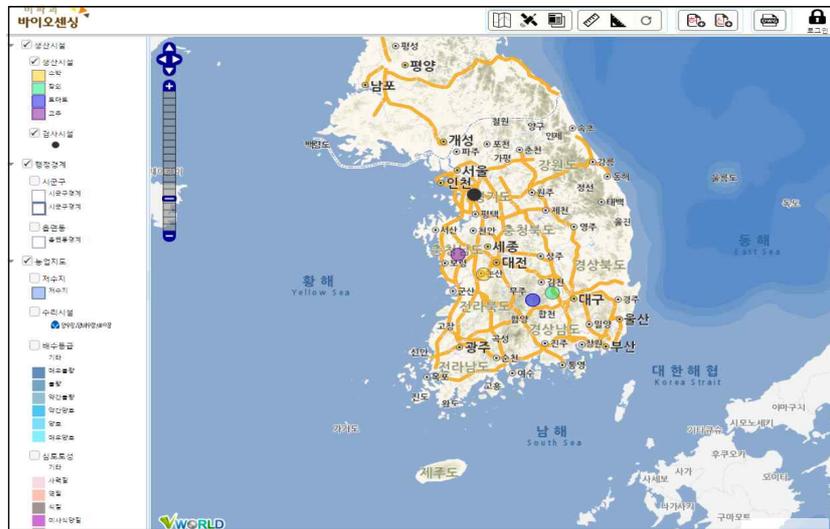


그림 6-22. 종자 공급처 및 검사시설

나. 위성영상 및 기본도

- 기본도를 위성영상과 벡터지도 및 위성영상에 Poi를 합성한 합성영상을 제공하여 세밀한 지역 현황을 파악할 수 있는 기본도를 선택적으로 운영할 수 있도록 제공

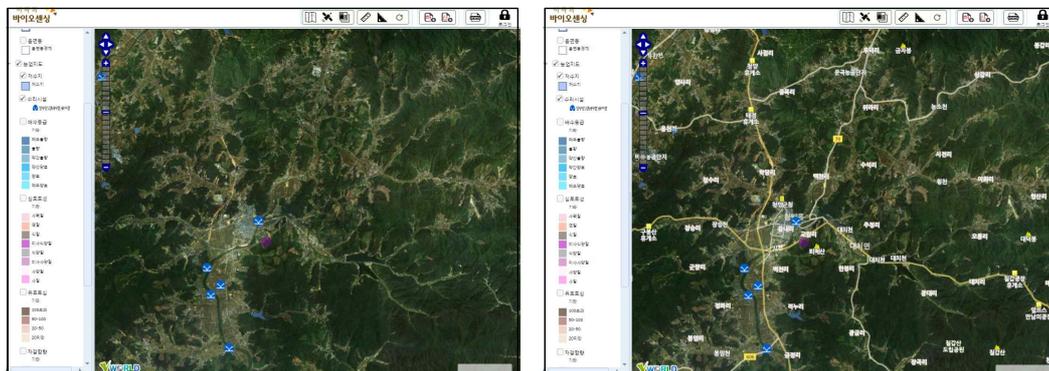


그림 6-23. 위성영상, 기본도

다. 배수 등급

- 생산시설의 종자생산에 영향을 줄 수 있는 토성인자 중 배수등급을 제공하여 종자의 상태와 배수 등급 간의 관계성을 파악할 수 있는 용도로 활용
- 배수등급은 v-world의 WMS 서비스를 통해 지도에 표기하며 범례는 v-world에서 제공하는 style 서비스를 이용하여 이미지로 표기함

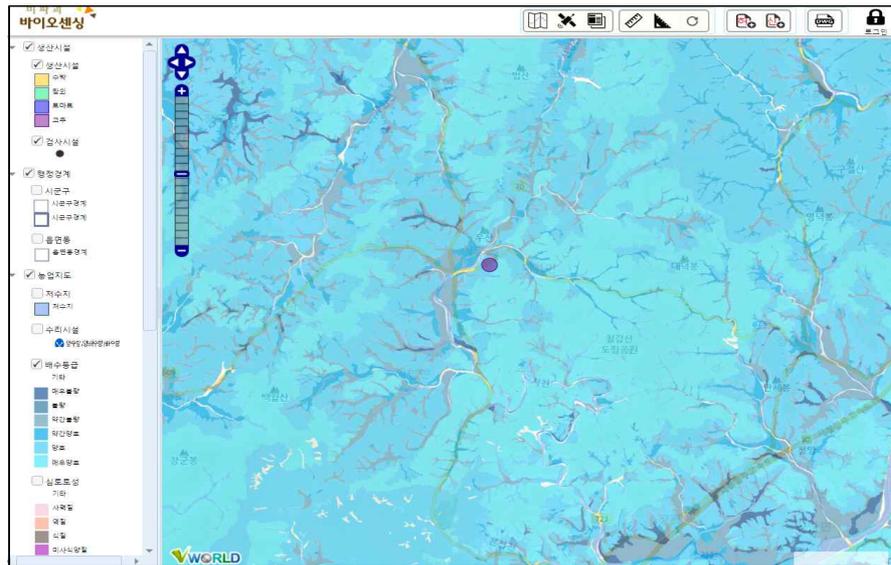


그림 6-24. 배수 등급

라. 심토토성

- 생산시설의 종자생산에 영향을 줄 수 있는 토성인자 중 심토토성을 제공하여 종자의 상태와 심토 토성간의 관계성을 파악할 수 있는 용도로 활용
- 심토토성은 v-world의 WMS 서비스를 통해 지도에 표기하며 범례는 v-world에서 제공하는 style 서비스를 이용하여 이미지로 표기함

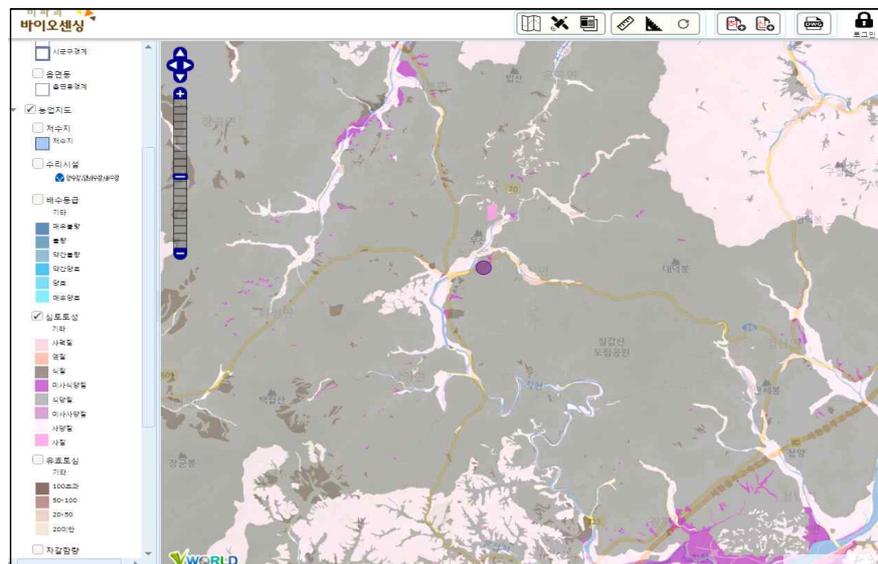


그림 6-25. 심토토성

마. 유효토성

- 유효토심은 종자생산에 영향을 줄 수 있는 중요한 인자 중 하나로 종자의 상태와 유효토심과의 관계성을 파악할 수 있는 용도로 활용
- 유효토심은 v-world의 WMS 서비스를 통해 지도에 표기하며 범례는 v-world에서 제공하는 style 서비스를 이용하여 이미지로 표기함

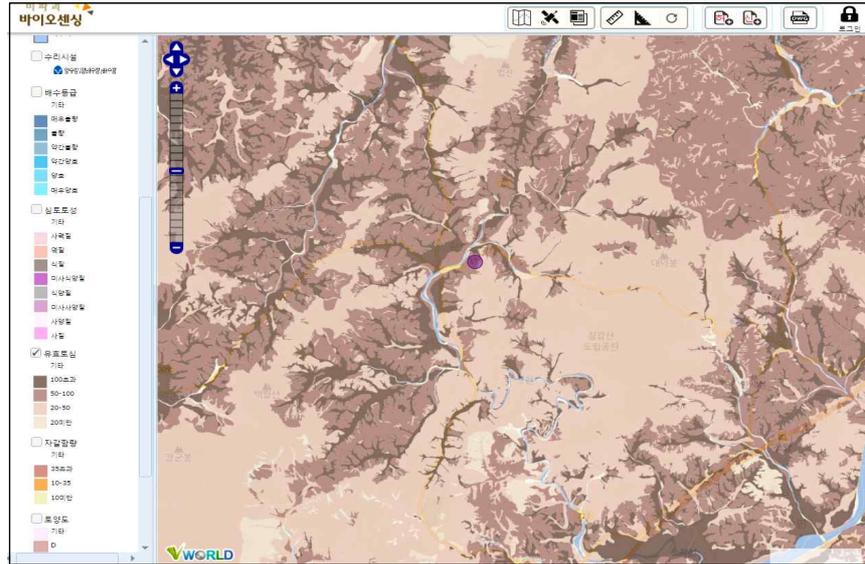


그림 6-26. 유효토성

바. 자갈함량

- 자갈함량은 배수등급과 직접적인 영향을 가진 항목으로 종자 생산과정에서 발생할 수 있는 근권부의 환경에 영향을 줄 수 있는 인자 중 하나로 종자의 상태와 자갈함량 간의 관계성을 파악할 수 있는 용도로 활용
- 자갈함량은 v-world의 WMS 서비스를 통해 지도에 표기하며 범례는 v-world에서 제공하는 style 서비스를 이용하여 이미지로 표기함

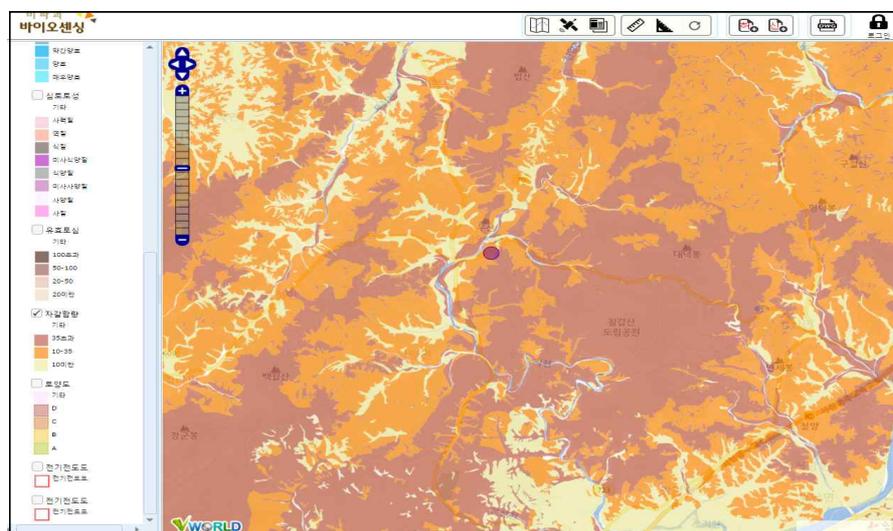


그림 6-27. 자갈함량

사. 토양도

- 토양형상에 따른 재배 종자의 관계성과 이를 바탕으로 지역별(토양별) 최적의 종자를 판단하기 위한 보조적 수단으로 활용
- 토양도는 v-world의 WMS 서비스를 통해 지도에 표기하며 범례는 v-world에서 제공하는 style 서비스를 이용하여 이미지로 표기함

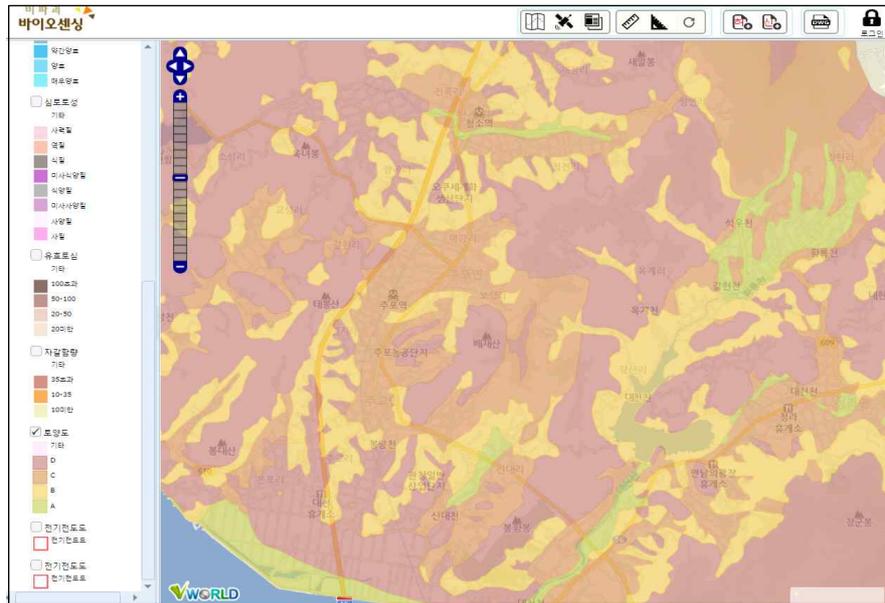


그림 6-28. 토양도

제4장 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
제1절 목표달성도			
1. 제1세부: 바이러스 감염 종자 신속·전수 검사 기반 기술 개발			
구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	○ 모델식물을 이용한 바이러스검정 방법 개발	100	- 주요 수입 재식용 종자 바이러스 대상 : 바이러스 종류별 농도별 물리 생화학적 변화 관찰 및 분광법적용 - 모델식물 기주 변화 및 바이러스 종류 변화 분광 변이값 측정
	○ 주요 과실 및 채소류(참외, 오이, 고추) 바이러스 감염 후 종자전염 유도	100	- 참외, 오이, 고추 외 수박, 토마토에 바이러스 감염 후, 종자 수확, 종자 점염 유무 확인
2차 년도 (2014)	○ 초분광 영상을 이용한 통한 개별 이병 종자 센싱 시스템 확립	100	- 이병종자(수박, 참외, 고추) 생산 및 바이러스 감염 판별 - 과채류별 바이러스 접종 다양화 (CGMMV, TMV, TSV, TRV, PMMoV, CMV, TRSV) 및 종자 획득: CGMMV 로 집중하여 수박, 참외 이병종자 생산
	○ 바이러스 종류 및 재배환경에 따른 종자의 이화학적 변화 도출	100	- CGMMV 감염 수박, 참외종자의 물리적변화 측정 - 바이러스감염 대비 종자 size 변화측정 - 수확된 건전종자의 분광값 측정 및 측정후 받아들 산출 - 접종시기변화에 따른 종자생산 후 제2세부 공급
	○ 감염 농도별 이병종자 검출 모델개발	100	- 단일 복합감염 이병종자 확보어려움(복합감염시 식물괴사) - CGMMV 감염종자의 Real time PCR를 이용한 바이러스 RNA copy 수 측정 - RNA copy 수에 따른 분광값 산출 - 초분광 결과와 비교분석을 통한 모델링 자료 제공
3차 년도 (2015)	○ 신규 비파괴 초분광 영상 센싱 시스템 현장 적용 및 병원 바이러스 검정	100	- 재식용 종자(수박)에 산출값 직접 적용 - 현장 결과 바탕으로 모델링 보완

2. 제2세부: 이병종자 신속·전수검역을 위한 복합 초분광 영상시스템 개발

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	○ SWIR 초분광 영상시스템 구축	100	- SWIR 초분광 영상시스템 구축완료
	○ 감염 농도별 이병종자 검출 모델개발	100	- 감염 여부 및 농도별 이병종자 검출 모델개발 완료
2차 년도 (2014)	○ 라만 초분광 영상시스템 구축	100	- 라만 영상 시스템 프로토타입 구축 - 라만 초분광 영상 및 이송장치 인터페이스 개발 - 광원 등 시스템 파라미터 최적화 - 라만 분광신호 재현성 확인(6회반복)
	○ 이병종자 검출 모델 개발	100	- 감염 및 건전종자의 라만 스펙트럼 분석 (ANOVA) - 이병종자 라만 분광정보 DB화 - 다변량 통계모델을 이용한 이병종자 판별 모델 개발 : LS-SVM, PLS - SWIR 이병종자 검출 모델 결과와 비교분석
3차 년도 (2015)	○ 통합 초분광 영상시스템 구축	100	- 라만 및 IR 초분광 영상시스템 통합 구축 - 실용화를 위한 시스템 성능검증
	○ 감염 농도별 이병종자 검출 성능검증	100	- 최종 시제품을 이용한 blind test 수행

3. 제1협동: 병원성세균 감염 종자 신속·전수 검사 기반 기술 개발

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	○ 병원성 세균 종자감염 및 이병종자 공급	100	- 수박종자와 토마토종자를 대상으로 대상 병원세균을 진공을 이용해 인공적으로 접종하는 방법 확립 - 진공접종을 통하여 생산된 감염종자를 제2세부연구팀에 공급
	○ 진공처리에 따른 감염 종자 초분광 분광값 측정	100	- 진공접종을 통하여 생산된 감염종자들 및 미감염 종자들의 초분광 분광값 측정 - 분광값 측정 후 개개 종자에 감염된 세균 수 측정 - 분광값과 세균 수를 이용하여 2제2세부연구팀과 공동으로 상관관계 분석
2차 년도 (2014)	○ 초분광 영상을 이용한 통한 개별 이병 종자 센싱 시스템 확립	100	- 병원세균 자체 초분광 분석 - 최적화된 방법으로 병원세균 농도별 이병종자 자체 확보 - 자연감염 이병종자 생산 및 확보 후 분광법 적용 및 개별 종자 병원세균 검정 - 초분광 영상결과와의 비교 분석을 위한 모델링 자료 제공
	○ 단일 혹은 복합 감염 등 다양한 상황에 따른 센싱 정확도 향상을 위한 종자 제공 및 병원세균 검정	100	- 원하는 농도별 충분한 수의 병원세균 단일 혹은 복합 감염 수박과 토마토 종자 확보 및 공급 - 초분광 분석 후 개별 종자의 병원세균 검정
3차 년도 (2015)	- 제1세부와 공동연구		

4. 제2협동: 신속·전수 검역기술 현장 적용 모델링 기술개발

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	○ 바이러스 감염 이병종자 생산	100	- 수박·토마토·고추 종자감염 바이러스 감염 후 이병종자 생산
	○ 전수·검역 현장 조사	100	- 현장조사를 통한 전수검역 모델작성
	○ 전수 검사시 전국 검역소 가능한 공간 조사	100	- 공간 조사 후 전수검사 시스템 최소 규격 산 출
2차 년도 (2014)	○ 바이러스 감염 이병종자 생산 및 공급	100	- 대표적 재식용 검역대상 바이러스 감염 종 자 생산 - 고추, 토마토, 참외, 수박 각 3품종 이상 포 장 재배 및 바이러스(제1세부 협조) 접종 후 수확(건전종자 포함) - 국내 종자 전염도 실태 조사 및 국내 유입 가능성이 높은 해외 병원성 미생물 조사
3차 년도 (2015)	○ 신규 비파괴 센싱 시스템 현장 적용	100	- 비파괴 센싱 기술의 현장(종자류 대상) 적용
	○ Feasibility Test 및 표준작 업지침서(SOP) 확립	100	- 현장적용 결과를 토대로 실용 가능성 확인 및 SOP 작성

5. 제3협동: 고속 컨베이어형 종자 자동 선별 시스템 하드웨어 기술 개발

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	○ 컨베이어의 종자 적용성 확대 기술 개발	100	- 컨베이어의 종자 적용성 확대 기술 개발 완료
	○ 고속 컨베이어 시스템 개발	100	- 고속 컨베이어 시스템 개발 완료
	○ Air 흡입(또는 분사) 기술 개발 및 최적화	100	- Air 분사 기술 개발 및 최적화 완료
	○ 고효율 집진 기술 개발 및 조명시스템 구축	100	- 고효율 집진 기술 개발 및 조명시스템 구축 완료
2차 년도 (2014)	○ 자동제어 시스템 및 소프트웨어 기술 개발	100	- 고속·자동 종자 선별을 위한 Embedded Automatic Control System 개발 - 센싱부와 융합 가능한 통합 소프트웨어 적용
	○ 고속 컨베이어형 종자 자동 선별 시스템 설계	100	- 개발된 하드웨어 및 소프트웨어 기술을 적용한 종자 자동 선별 시스템 설계 - Compact System 설계 구축
	○ 이병종자 신속·전수 검사 시스템 상용화를 위한 사전 조사·분석 및 전략 수립	100	- 제품 수요 조사·분석 및 수요량 파악 (검역본부 등 검역관리기관, 국립종자원·농업기술원 원종장 등 보급·관리기관, 국내·외 종자 생산기업 등을 대상으로 기술적 요구사항 및 수요(량) 조사·분석) - 제품 가격 및 사업화 전략 검토(시장 및 사업성 분석·검토, 가격경쟁력 확보, 국내·외 시장 진입전략, 단계별 시장개척 전략 등 분야별 사전 조사 실시)(이후 3차년도에 최종적인 사업화 전략 확정)
3차 년도 (2015)	○ 종자 검역 현장 시험 적용	100	- 시스템의 현장 검증
	○ 종자 자동 선별 시스템 상용화	100	- 현장 검증 결과 Feedback을 통한 시스템 보완 - 최종 설계 확정 - Operation Manual 확립

3차 년도 (2015)	○ 이병종자 신속·전수 검사 시스템 상용화를 위한 추가 조사·분석 및 전략 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> - 수요기관(기업)별 세부조사 및 분석(국내 종자 생산기관(기업)을 중심으로 종자 생산기업, 종자 검역기관, 종자 보급기관 등에 개한 세부 정보 조사 및 해외 기관 정보 수집) - 제품 사업화 전략 확립(시장 및 사업성 분석·검토, 가격경쟁력 확보 방안, 국내·외 시장 진입전략, 단계별 시장개척 전략 등 분야별 사업화 전략 확립, 농우바이오 등 국내 대표 종자 생산기업을 대상으로 한 Pre Target Marketing 실시)
--------------------	--	-----	---

6. 제4협동: 이병종자 비파괴 검사용 Java 기반 프로그램 개발 및 검사패턴 및 결과정보 Data 관리 체계 구축

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	○ 이병종자 비파괴 검사용 Java 기반 프로그램 개발 및 검사패턴 및 결과정보 Data 관리 체계 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> - 데이터베이스 논리, 물리설계 화면설계 - Class,Interface 설계
		60	<ul style="list-style-type: none"> - Java 기반 Web 시스템 개발 - 자료 송수신 모듈개발 - DB 구축 알고리즘 개발 - 검사결과 자료 통계기능 개발
2차 년도 (2014)	○ 개발 소프트웨어 성능검증	100	<ul style="list-style-type: none"> - 개발 소프트웨어 시뮬레이션 실시 - 개발 소프트웨어 컨텐츠 수정 - 개발 소프트웨어 레이아웃 수정
	○ 통계 프로그램 개발 서비스 성능검증	100	<ul style="list-style-type: none"> - 통계자료 프로그램 성능검증 - 검사결과 통계자료 DB 수정
3차 년도 (2015)	○ 센서 H/W 오차 보정용 S/W 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 동일한 기능을 수행하는 다른 센서 H/W에서 발생 할 수 있는 오차에 대한 보정기능을 개발하여 동일한 종자는 동일한 검사결과가 나오도록 프로그램 기능 개발 - 검사정보 자동수집을 위한 Loadcell 기반 계측기 개발

제2절 관련분야 기여도

연구개발의 목표	관련분야 기여도
<p>제1세부 바이러스 감염 종자 신속·전수 검사 기반 기술 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 바이러스 RNA 량에 따른 종자 내 검출방법을 확립하였으며, 국내 대표 종자전염바이러스인 Tobamovirus 속 CGMMV와 PMMoV에 대한 기초 연구 데이터가 확보되었음. - 바이러스 검출방법의 간소화 (nondestructive) 하여 향후 종자 내 바이러스 검출 시간 및 노동력 대폭 감소 기여. 종자 내 바이러스 생활사를 연구함으로써 바이러스 예방 및 검출에 대한 전수검사 SWIR 개발이 가능하였음. - 또한 기반기술을 확보하게 되어 박과식물이 아닌 가지과식물의 종자 전염 바이러스 검사 기술 개발을 지속적으로 가능하게 하였음.
<p>제2세부 이병종자 신속·전수검역을 위한 복합 초분광 영상시스템 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 현재까지 개발되지 않았던 바이러스 이병 종자의 비파괴적 신속 전수 검사가 가능하게 됨으로써 신뢰도 높은 검역 및 안전한 이병종자 유통 기반이 확립됨 - 전수검사가 가능해 이병종자 유통에 대한 엄격한 검수절차가 마련되며 결과 왜곡이 근본적으로 차단됨 - 이병종자의 생태계에 유출을 원천 차단함으로써 국민보건 증진 및 자연생태환경 보전이 가능함 - 고비용 검정기술을 현장 적용형 비파괴 신속검사기술로 대체하여 검정에 소요되는 시간, 비용, 인력을 대폭 절감할 수 있음 - 이병종자 비파괴 검사 원천기술의 확보는 농산물 안전성 측정분야는 물론 식품, 의료, 제약분야 등의 실시간 검사기술 개발로도 응용이 가능함 - 농산물 안전에 대한 비파괴 측정기술의 수요는 국내뿐만 아니라 해외에서도 수요가 높으므로 사업화가 이루어질 경우 수출유망 기술로 성장이 가능함
<p>제1협동 병원성세균 감염 종자 신속·전수 검사 기반 기술 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 수박종자와 토마토종자를 대상으로 대상 병원세균을 진공을 이용해 인공적으로 접종하는 방법 확립하여 종자감염 병원세균 검사 기술 개발을 가능하게 하는 기반기술을 확보함

연구개발의 목표	관련분야 기여도
제2협동 신속·전수 검역기술 현장 적용 모델링 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> - 현장조사를 통한 전수검역을 작성하고, 현장적용 결과를 토대로 실용 가능성 확인 및 SOP를 작성하여 피하피 센싱 시스템의 현장 적용을 용이하게 함
제3협동 고속 컨베이어형 종자 자동 선별 시스템 하드웨어 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 고속·자동 종자 선별을 위한 Embedded Automatic Control System을 개발, 센싱부와 융합 가능한 통합 소프트웨어를 적용하여 종자 자동 선별 시스템 하드웨어 기술 개발을 완료하고, 현장 검증을 통해 비파괴 바이오 센싱 기법을 이용한 종자선별 기술을 현장 적용 함
제4협동 이병종자 비파괴 검사용 Java 기반 프로그램 개발 및 검사패턴 및 결과 정보 Data 관리 체계 구축	<ul style="list-style-type: none"> - 전통적인 Web시스템의 기본적 방식은 Request & Response로 구성되며, 이러한 기술은 데이터의 실시간 전송요구 발생 시, 서버와 클라이언트 전 영역에 걸쳐 불필요한 통신패킷을 발생시키고 있음. - 따라서 본 연구에서는 Pull 방식이 아닌 Push 방식을 기본 프로토콜로 정의하여 실시간 데이터 전송에 소요되는 통신패킷량을 DB:50%, WAS:60%, WEB:60%, Client: 60%로 감소시켜 전반적인 시스템의 운영속도를 개선하였으며, 서비스 환경구축을 위한 서버영역의 전산 비용을 절감할 수 있는 기술을 개발하여 향후 시스템의 본격적인 보급 시 가격경쟁력을 확보할 수 있는 영역에 기여하였음.

제5장 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
<ul style="list-style-type: none"> ○ 종자 내 바이러스 감염 확인을 위한 초분광적외선 영상법을 본 연구에서는 박과식물(수박, 참외)에 집중하여 가능성을 확인하였음. 따라서 박과식물 외 종자전염이 심한 작물과 다양한 바이러스 검출방법 개발로 확대 가능함. ○ 종자전염바이러스의 대표적인 Tobamovirus (CGMMV)의 검출 모델이 확립됨에 따라 토마토, 고추, 가지종자 감염 Tobacco mosaic virus (TMV), Tomato mosaic virus (ToMV), Pepper mild mottle virus 검출 가능하여 종자생산 산업체에 적용 가능. ○ 초분광법을 이용한 바이러스 감염 선별을 위한 하드웨어적 시스템은 구축이 되어 향후 바이러스 및 작물에 따라 나오는 모델 값만을 업데이트하여 사용 할 수 있음. ○ 국내 종자생산업체에 설치를 통하여 개발된 소프트웨어와 연계되어 전국적인 병 발생 모니터링이 가능하여 빅데이터 구축 구축 가능함. ○ 본 연구에서 개발한 이병종자의 실시간 SWIR초분광 영상을 이용한 판별기술로 다양한 농식품의 발아억제 및 품질판정에 활용이 가능할 것으로 보임. ○ 특히, 지금까지 분광분석을 이용한 농식품 품질 측정 기술에 초분광 기술을 접목하여 기존의 단일 지점 스펙트럼으로만 측정하던 분광분석으로는 측정하기 어려웠던 대상체의 전체 면적에서 특정 부위만 선택적으로 신호를 추출하거나 전체 부위를 사용해야 판별성능을 담보할 수 있는 안전성 검사 등에 확대 적용이 가능할 것으로 보임. ○ 또한, 현재까지는 수작업을 통하여 연구실에서만 가능하던 초분광 영상을 이용한 판별 시스템을 상용화하여 실시간으로 전수검사가 필요한 곳에 적용이 가능할 것으로 보임 ○ 본 연구를 통하여 개발된 push방식의 실시간 데이터 송수신 기술은 종자검사 시 발생하는 데이터를 적은 양의 통신용량으로 전송할 수 있는 기술로 비파괴검사를 포함한 컨베이어 벨트식 연속동작이 요구되는 산업현장에 적용할 수 있어 그 활용범위가 다양하고, MCU기반의 자동계측시스템은 저가격 정책으로 시장에 보급할 수 있는 원격 센싱과 제어모듈이며, 따라서 비파괴 산업을 포함한 실시간 수집과 제어가 요구되는 시설농업 분야에 적극적으로 활용할 계획임 	

제6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

		코드번호	D-08
제1절 특허정보			
1	특허명	Method and detection system for detection of aflatoxin in corn with fluorescence spectra	
	보유국	USA	
	개발기술명	초분광 영상을 이용한 식자재 위해성분 검출	
	유사점	초분광 영상을 이용하여 식재료에 잔류하고 있는 위해성 물질을 검출	
	차이점	기존 유사 특허는 형광 반응을 이용하기 때문에 현장에서 사용 시 광원의 문제를 해결해야 하는 단점이 있음. 초분광 영상이라는 부분은 유사하나 파장, 광원, 검출 마커 등이 본 연구와 많은 차이점을 나타냄.	
2	특허명	Method for classifying wine and coffee	
	보유국	USA	
	개발기술명	초분광 영상을 이용한 식품의 영양성분 함량 측정	
	유사점	분광 기술을 이용하여 커피, 와인의 성분을 예측하여 원산지, 소재의 종류, 숙성도를 예측하여 등급을 분류	
	차이점	기존의 특허는 대상물을 한 점으로 인식하고 개체의 평균개념을 이용하기 때문에 대상물 전체 평가가 아닌 점에서 신뢰도가 떨어짐. 초분광 영상데이터는 제품의 공간적 정보에 대한 이화학적 구성 성분의 맵핑이 가능하므로 신뢰성이 높음.	
3	특허명	Raman spectral analysis of pathogens(US 7,623,232 B2)	
	보유국	USA	
	개발기술명	초분광 영상을 이용한 바이러스검출	
	유사점	Raman Lazer 방법을 이용하여 미생물 유무를 판단하는 기술	
	차이점	Raman Lazer를 일반적인 표면에 미생물이 존재여부를 적용 방법 개발로 의미가 있으나 본 연구팀의 개발하는 종자내 다양한 미생물을 존재를 확인하는 전수검사 system 개발과 차이가 있음.	
4	특허명	<i>Method for analysis of pathogenic microorganisms using raman spectroscopic techniques(US 8,395,769 B2)</i>	
	보유국	USA	
	개발기술명	초분광 영상을 이용한 식품의 영양성분 함량 측정	
	유사점	US 7,623,232 B2 선 특허의 Raman 방법의 적용 특허임. 병원성 미생물을 선별할 수 있는 device 개발임.	
	차이점	상기의 특허는 Raman 방법으로 표면에 붙어있는 병원성 미생물을 선별하는 방법으로 본 연구팀에서 개발하고자 하는 종자내 미생물 종류를 파악하는 기술 개발과 차이가 있음.	

5	특허명	<i>Detection of Pathogenic Microorganisms Using Fused Raman, SWIR and LIBS Sensor Data</i>
	보유국	USA
	개발기술명	초분광 영상을 이용한 바이러스검출
	유사점	미생물을 다양한 방법(Raman 포함)을 이용하여 선별
	차이점	다양한 spectrum 방법을 통한 같은 종류의 미생물에 대한 emission 값의 차이를 이용하여 Raman 방법특허를 확장하였음. 하지만 본 연구팀이 개발하고자 하는 Raman 방법은 종자내 바이러스의 종류 및 초고속 검정 기술개발과 차이가 있음.
6	특허명	<i>METHOD FOR IDENTIFYING INDIVIDUAL VIRUSES IN A SAMPLE(US 2011/0237446 A1)</i>
	보유국	USA
	개발기술명	초분광 영상을 이용한 바이러스검출
	유사점	미생물 선별 방법
	차이점	ELISA를 변경하여 손쉽게 병원미생물을 선별하는 방법으로 분광법과는 큰 차이가 있음.
7	특허명	<i>Identification and quantification of a plurality of biological (micro)organisms or their components(2011016558)</i>
	보유국	USA
	개발기술명	초분광 영상을 이용한 바이러스검출
	유사점	미생물 선별방법
	차이점	세포를 파괴하여 PCR를 사용하여 미생물을 선별하는 방법은 본 연구팀이 개발하는 비파괴전수검사 차이점

제2절 논문정보

1	논문명	Optical sensing method for screening disease in melon seeds by using optical coherence tomography (2011 11. 9467-9477)
	학술지명	Sensors
	개발기술명	초분광 영상을 이용한 바이러스검출
	유사점	Optical sensing 으로 비파괴방법으로 멜론종자내에 바이러스 감염 (CGMMV) 후 종자내 변화를 관찰하며 emission 값에 따라 바이러스 감염 여부를 선별할 수 있음.
	차이점	본 논문의 Optical sensing 기술 적용은 본 연구팀 개발목표인 초고속 분광 Raman 법을 이용하며 바이러스 종류별 종자별 전수검사 system 개발과 차이가 있음. 논문에 제시하는 기술은 단일종자/한 종류바이러스에 대한 변화를 선별하는 기술이며 본 연구팀의 기술개발 목표는 수입되는 재식용 종자 대부분을 전수검사 system 으로 바이러스 감염 및 종류를 파악하는 기술 개발임.
2	논문명	Hyperspectral imaging for small-scale analysis of symptoms caused by different sugar beet diseases (2012, 8:3)
	학술지명	Plant methods
	개발기술명	초분광 영상을 이용한 바이러스검출
	유사점	병원성 미생물 감염에 따른 조직 변화를 Hyperspectral image 로 전환
	차이점	병원성 미생물이 감염된 잎(leaf)과 정상적인 잎에 반사된 spectrum의 차이를 통하여 식물병 검정방법임. 본 연구팀의 연구개발 목표인 종자내 바이러스 및 세균 검정과는 차이가 있음.
3	논문명	Detecting Food- and Waterborne Viruses by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy(Vol. 75)
	학술지명	Journal of Food Science
	개발기술명	초분광 영상을 이용한 바이러스검출
	유사점	Raman 분광법으로 세균과 바이러스 검정
	차이점	유해 미생물, 특히 음용수에 존재하는 동물 바이러스를 검정하기 위한 Raman 분광법을 적용하였음. 하지만 본 연구팀이 개발하고자 하는 Raman 방법은 수입 종자내 식물 바이러스 검정방법과 검역 전수검사 목적에 차이가 있음.
4	논문명	Quantitation of virus using laser-based scanning of near-infrared fluorophores replaces manual plate reading in a virus titration assay(2010, V 168. 57-62)
	학술지명	Journal of Virological Methods
	개발기술명	초분광 영상을 이용한 바이러스검출
	유사점	분광법을 이용한 세포내 바이러스 감염 확인
	차이점	분광법을 이용하여 조직 세포내에 바이러스 감염을 확인하였으나 본 연구팀이 개발하고자 하는 종자내 바이러스 검정 방법과 차이가 있음.

5	논문명	Line-Scan Hyperspectral Imaging Platform for Agro-food Safety and Quality Evaluation : Ststem Enhancement and Characterization
	학술지명	ASABE
	개발기술명	초분광 영상을 이용한 식자재 위해성분 검출
	유사점	초분광 영상을 사용하여 농산물의 안전성 및 품질 평가
	차이점	본 논문에서는 현재 많이 사용하고 있는 400~1000 nm의 파장영상을 이용함. 본 연구와 활용 파장의 범위가 다르며, 대상물과 검출목표물이 상이함
6	논문명	Investigation of Frying Oil Quality Using VIS/NIR Hyperspectral Analysis
	학술지명	Journal of the American Oil Chemists' Society
	개발기술명	초분광 영상을 이용한 식품의 영양성분 함량 측정
	유사점	초분광 영상을 이용하여 기름의 품질 평가에 이용
	차이점	액체시료인 기름의 품질평가를 비파괴적으로 수행함. 본 연구는 여러 가지 검량식을 이용하여 분말, 고형체의 영상을 맵핑하여 영상화하는 것이 목적이므로 연구내용이 상이함
7	논문명	Feasibility Study for Detection of Turnip yellow mosaic virus (TYMV) Infectionof Chinese Cabbage Plants Using Raman Spectroscopy (29: 105-109)
	학술지명	The Plant Pathology Journal
	개발기술명	초분광 영상을 이용한 바이러스검출
	유사점	Raman 방법을 이용한 TYMV 검정
	차이점	Raman 방법을 이용하여 배추잎에서 TYMV를 검정방법을 제시함. 본 연구팀의 개발목표의 종자별 바이러스 종류 선별 검정 시스템과 차이가 있으며, 바이러스 감염 앞에서는 Raman 방법을 이용할 필요 없이 육안으로 선별이 가능함으로 본 조사 논문의 발표내용은 적용가치가 없음.

- 종자선별의 경우 종자의 크기(Deleuran et al), 종자의 중량(Himanen et al)과 같은 물리적 특성 판별을 이용한 선별방법이 주를 이루고 있음
- 종자의 품질항목의 경우 종자의 발아력, 즉 viability(Daneshvar et al, Farhadi et al) 가장 많은 연구가 진행되고 있으며, 활력도(vigour)(Morris et al, Eggert et al), 질병(Vrešak et al, Dube et al)이 진행되고 있음
 - 질병의 경우 곰팡이(Pearson et al, Dube et al)에 감염된 종자의 선별, 바이러스(Fabre et al)에 감염된 종자의 선별에 대한 연구가 이루어지고 있음
 - 다른 기관의 경우 식물의 잎을 초분광 이미징 시스템을 이용하여 측정, 판별(Mahlein et al, Baranowski et al, Berdugo et al)하는 연구가 이루어지고 있으며, 분광법을 이용하여 조직 세포내에 바이러스의 검사(Weldon et al)연구가 이루어지고 있음. 또한 초분광 형광 이미징 시스템을 이용하여 밀의 Fusarium균의 감염여부를 검사(Bauriegel et al)하는 연구가 이루어지고 있음.
 - 이렇듯 대부분 종자 자체의 스펙트럼을 획득하여 바이러스의 유무를 검사하는 연구는 거의 이루어지지 않고 있으며, 실시간 판별시스템 연구는 전무한 상황임

제7장 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
<p>○ 종자 생산 산업체에 신속하게 공급하여 바이러스 병 예방을 최고 목표로하기 때문에 보안등급은 중요하지 않음.</p>	

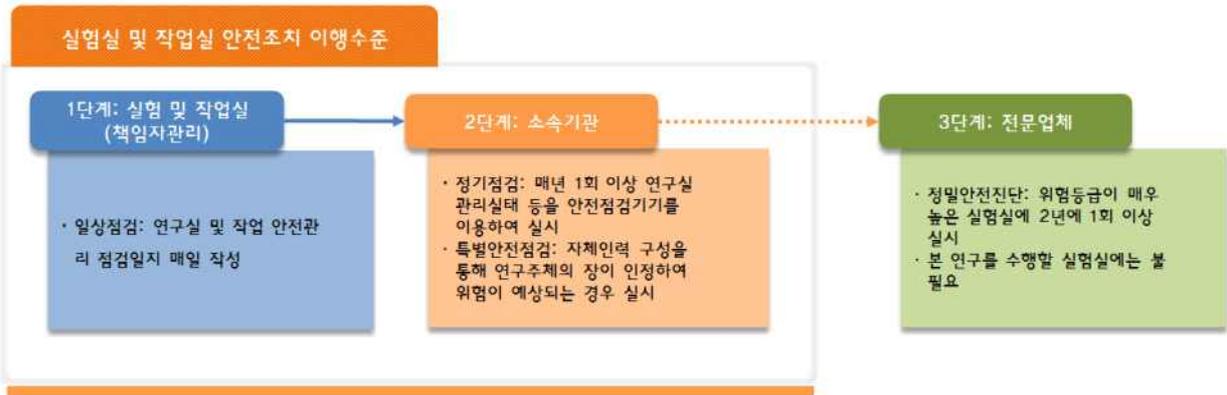
제8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황 (해당사항 없음)

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

제9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행 실적

코드번호 D-11

1. 안전관리 점검체계



[안전관리 점검체계]

2. 안전관리 계획

- 연구실 및 작업실 안전 확보를 위한 안전점검
 - 안전점검 및 정밀안전진단 지원 및 기술지도, 안전장비 구축 등 환경개선 지원 등
- 연구작업 및 실험실 안전 취약분야의 발굴·제도 개선
 - 안전관리 실태조사 및 현장지도 점검 등을 실시하여 취약분야에 대한 개선·보완 조치
- 안전관리 교육활동 강화
 - 안전 인식 제고 및 안전문화 확산
 - 연구활동 종사자에 대한 연구실험실 안전의식 강화 및 안전관리 행동매뉴얼 작성·보급
 - 교육·훈련계획 수립을 통한 안전성 확보 및 사고예방
- 안전관리규정 작성
 - 안전관리조직체계 및 그 직무에 관한 사항
 - 연구실 및 작업실별 안전관리담당자의 지정 및 그 책임과 권한의 부여
 - 주기적 안전교육의 실시에 관한 사항
 - 안전표식의 설치 또는 부착
 - 사고발생시 긴급대처방안과 행동요령에 관한 사항- 사고조사 및 후속대책 수립에 관한 사항

- 안전관리위원회 구성·운영
 - 운영위원 섭외 및 임명
 - 안전점검 및 정밀안전진단계획의 수립, 시행세칙 심의, 업무보고 등
- 연구실 사고피해에 대한 보험 마련보상방법 마련
 - 상해·사망에 대비하여 연구활동 종사자를 피보험자 및 수익자로 하는 보험에 가입

3. 연구 및 작업실 점검 계획(연구 안전환경 조성에 관한 법률 시행령 제7조 및 9조)

- 일상점검: 연구활동 종사자가 연구개발 활동에 사용되는 기계, 기구, 전기, 약품, 병원체 등의 보관상태 및 보호장비의 관리상태 등을 육안으로 실시하는 점검으로서 연구개발 활동을 시작하기 전에 매일 1회 실시 (연구실 안전관리 점검 일지 매일 작성)
- 정기점검: 연구개발 활동에 사용되는 기계, 기구, 전기, 약품, 병원체 등의 보관상태 및 보호장비의 관리상태 등을 안전점검기기를 이용하여 실시하는 세부적인 점검으로서 매년 1회 이상 실시
- 특별안전점검: 자체인력을 구성하여 폭발사고, 화재사고 등 연구활동 종사자의 안전에 치명적인 위험을 야기할 가능성이 있을 것으로 예상되는 경우에 실시하는 점검(연구주체의 장이 필요하다고 인정하는 경우에 실시)
- 정밀안전진단: 외부전문기관을 통해 위험등급이 높은 연구실험실에 2년에 1회 이상 실시

제10장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1		Optimal Fluorescence Waveband Determination for Detecting Defective Cherry Tomatoes Using a Fluorescence Excitation-Emission Matrix	충남대학교	교신	Sensors	2.033	2014.11.14	단독사사	SCI
2		A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration	충남대학교	교신	Trends in Food Science & Technology	5.150	2015.11.01	단독사사	SCI
3		Detection of cucumber green mottle mosaic virus-infected watermelon seeds using a near-infrared (NIR) hyperspectral imaging system: Application to seeds of the "Sambok Honey" cultivar	충남대학교	교신	Biosystems engineering	1.997	2016.05.15	중복사사	SCI
4	논문	Complete nucleotide sequences and construction of full-length infectious cDNA clones of cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) in a versatile newly developed binary vector including both 35S and T7 promoters	충남대학교	교신	Virus Genes	1.285	2016.12.02. (Published online)	단독사사	SCI
5	특허	세균감염 수박종자의 선별을 위한 단파 적외선 초분광 영상 시스템 및 선별 방법	충남대학교		대한민국		2016.04.29	단독사사	

제11장 기타사항

코드번호	D-13
<input type="radio"/> 없음.	

제12장 참고문헌

	코드번호	D-14
Apte-Sengupta S, Sirohi D, Kuhn RJ (2014) Coupling of replication and assembly in flaviviruses. <i>Current opinion in virology</i> 9:134-142		
A. Del Fiorea, M. Reverberib, A. Ricellic, F. Pinzarid, S. Serrantie, A.A. Fabbrib, G. Bonifazie, C. Fanellib, 2010, Early detection of toxigenic fungi on maize by hyperspectral imaging analysis, <i>International Journal of Food Microbiology</i> . 144(1):64-71		
Albajes, R., Lumbierres, B., & Pons, X. (2009). Responsiveness of arthropod herbivores and their natural enemies to modified weed management in corn. <i>Environmental-Entomology</i> 38, 944-954.		
Andersen, C. M. and Bro, R. 2010. Variable selection in regression. <i>Journal of Chemometrics</i> , 24:728-737.		
Beyenbach K.W., & Wieczorek, H. (2006). The V-type H ⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. <i>Journal of Experimental Biology</i> 209, 577-589.		
Blanco, M. and I. Villarroya. 2002. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. <i>Trends Anal. Chem.</i> , 21:240-250.		
C.B. Singh, D.S. Jayas, J. Paliwal, N.D.G. White, 2007, Fungal detection in wheat using near-infrared hyperspectral imaging, <i>Transactions of the ASABE</i> , 50(6):2171-2176		
Chandra B. Singha, Digvir S. Jayasa, Jitendra Paliwala, Noel D.G. Whiteb, 2010, Detection of midge-damaged wheat kernels using short-wave near-infrared hyperspectral and digital colour imaging, <i>Biosystems Engineering</i> . 105(3):380-387		
Chrenkova, M., Sommer A., Ceresnakova, Z., Nitrayova, S., & Prostedna, M. (2002). Nutritional evaluation of genetically modified maize corn performed on rats. <i>Archiv Für Tierernd maiz</i> 56, 229-235.		
Christensen N, Tilsner J, Bell K, Hammann P, Parton R, Lacomme C, Oparka K (2009) The 5' cap of tobacco mosaic virus (TMV) is required for virion attachment to the actin/endoplasmic reticulum network during early infection. <i>Traffic (Copenhagen, Denmark)</i> 10:536-551		
Collum TD, Padmanabhan MS, Hsieh YC, Culver JN (2016) Tobacco mosaic virus-directed reprogramming of auxin/indole acetic acid protein transcriptional responses enhances virus phloem loading. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</i> 113:E2740-2749		
Diaz A, Wang X (2014) Bromovirus-induced remodeling of host membranes during viral RNA replication. <i>Current opinion in virology</i> 9:104-110		
Domingo, J.L., & Bordonaba, J. G. (2011). A literature review on the safety assessment of genetically modified plants. <i>Environment International</i> 37, 734-742.		
Ellstrand, N.C., Prentice, H. C., & Hancock, J. F. (1999). Gene flow and introgression from		

- domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30, 539–563.
- Gautam, R., S. Vanga., Ariese, F. and S. Umapathy. 2015. Review of multidimensional data processing approaches for Raman and infrared spectroscopy. *EPJ Techniques and Instrumentation*, 2(8):1–38
- Goicoechea, H. C. and A. C. Olivieri. 2001. A comparison of orthogonal signal correction and net analyte preprocessing methods. Theoretical and experimental study. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 56:73–81
- Grassi, S., J. M. Amigo, C. B. Lyndgaard. R. Foschino and E. Casiraghi. 2014. Beer fermentation: Monitoring of process parameters by FT-NIR and multivariate data analysis. *Food Chemistry*, 155:279–286.
- H. Buddenbaum, M. Steffens, 2012, The effect of spectral pretreatments on chemometrics analyses of soil profile using laboratory imaging spectroscopy, *Applied and Environmental Soil Science*, Article ID 274903 pp. 1–12
- H. Sveinsdóttir, F. Yan, Y. Zhu, T. Peiter-Volk., S. Schubert, Seed ageing-induced inhibition of germination and post-germination root growth is related to lower activity of plasma membrane H⁺-ATP in maize roots, *Journal of plant physiology* 166(2009):128–135.
- H. Zhang, J. Paliwal, D.S. Jayas, N.D.G. White, 2007, Classification of fungal infected wheat kernels using near-infrared reflectance hyperspectral imaging and support vector machine, *Transactions of the ASABE*, 50(5):1779–1785
- H. Yao, Z. Hruska, R.L. Brown, T.E. Cleveland, 2006, Hyperspectral Bright Greenish–Yellow Fluorescence (BGYF) imaging of aflatoxin contaminated corn kernels, *Proceedings of SPIE – The International Society for Optical Engineering* p. 6381 art. no. 63810B
- Han JY, Chung J, Kim J, Seo EY, Kilcrease JP, Bauchan GR, Lim S, Hammond J, Lim HS (2016) Comparison of helper component–protease RNA silencing suppression activity, subcellular localization, and aggregation of three Korean isolates of Turnip mosaic virus. *Virus genes* 52:592–596
- International Seed Testing Association. (1985). *International rules for seed testing*. *Seed Science and Technology* 13, 300–520.
- J. Jin, L. Tang, Z. Hruska, H. Yao, 2009, Classification of toxigenic and atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* with hyperspectral imaging, *Computers and Electronics in Agriculture*, 69(2):158–164
- J. Xing, S. Symons, D. Hatcher, M. Shahin, 2011, Comparison of short-wavelength infrared (SWIR) hyperspectral imaging system with an FT-NIR spectrophotometer for predicting alpha-amylase activities in individual Canadian Western Red Spring (CWRS) wheat kernels, *Biosystems Engineering*, 108(4):303–310
- J.A.F. Pierna, P. Vermeulen, O. Amand, A. Tossens, P. Dardenne, V. Baeten, 2012, NIR hyperspectral imaging spectroscopy and chemometrics for the detection of undesirable

substances in food and feed, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 117:233-239

James, C. (2012). Global status of commercialized biotech/GM crops: 2012. ISAAA brief no. 44. Ithaca, New York, USA: ISAAA.

Jang C, Seo EY, Nam J, Bae H, Gim YG, Kim HG, Cho IS, Lee ZW, Bauchan GR, Hammond J, Lim HS (2013) Insights into Alternanthera mosaic virus TGB3 Functions: Interactions with Nicotiana benthamiana PsbO Correlate with Chloroplast Vesiculation and Veinal Necrosis Caused by TGB3 Over-Expression. *Frontiers in plant science* 4:5

Khraisheh, M. A. M., Cooper, T. J. R., & Magee, T. R. A. (1997). Microwave and air drying I. Fundamental considerations and assumptions for the simplified thermal calculations of volumetric power absorption. *Journal of Food Engineering* 33, 207-219.

Kim, G., Kim, G-H., Lohumi, S., Kang, J-S., & Cho, B-K. (2014). Viability estimation of pepper seeds using time-resolved photothermal signal characterization. *Infrared Physics & Technology* 67, 214-221.

Komoda K, Mawatari N, Hagiwara-Komoda Y, Naito S, Ishikawa M (2007) Identification of a ribonucleoprotein intermediate of tomato mosaic virus RNA replication complex formation. *Journal of virology* 81:2584-2591

L. Scudiero, and F.C. Morris, Field emission scanning electron and atomic force microscopy, and Raman and X-ray photoelectron spectroscopy characterization of near-isogenic soft and hard wheat kernels and corresponding flours, *Journal of Cereal Science*, 52 (2010) 136-142.

Lee, B., Kim, C.-G., Park, J.-Y., Park, K.W., Kim, H.-J., Yi, H., Jeong, S.C., Yoon, W. K., & Kim, H.M. (2009). Monitoring the occurrence of genetically modified soybean and maize in cultivated fields and along the transportation routes of the Incheon Port in South Korea. *Food Control* 20, 250-254.

Li MJ, Kim JK, Seo EY, Hong SM, Hwang EI, Moon JK, Domier LL, Hammond J, Youn YN, Lim HS (2014) Sequence variability in the HC-Pro coding regions of Korean soybean mosaic virus isolates is associated with differences in RNA silencing suppression. *Archives of virology* 159:1373-1383

Lim HS, Vaira AM, Bae H, Bragg JN, Ruzin SE, Bauchan GR, Dienelt MM, Owens RA, Hammond J (2010) Mutation of a chloroplast-targeting signal in Alternanthera mosaic virus TGB3 impairs cell-to-cell movement and eliminates long-distance virus movement. *The Journal of general virology* 91:2102-2115

Lim HS, Vaira AM, Domier LL, Lee SC, Kim HG, Hammond J (2010) Efficiency of VIGS and gene expression in a novel bipartite potyvirus vector delivery system as a function of strength of TGB1 silencing suppression. *Virology* 402:149-163

Lim HS, Vaira AM, Reinsel MD, Bae H, Bailey BA, Domier LL, Hammond J (2010) Pathogenicity of Alternanthera mosaic virus is affected by determinants in

- RNA-dependent RNA polymerase and by reduced efficacy of silencing suppression in a movement-competent TGB1. *The Journal of general virology* 91:277-287
- Lim HS, Lee MY, Moon JS, Moon JK, Yu YM, Cho IS, Bae H, deBoer M, Ju H, Hammond J, Jackson AO (2013) Actin Cytoskeleton and Golgi Involvement in Barley stripe mosaic virus Movement and Cell Wall Localization of Triple Gene Block Proteins. *The plant pathology journal* 29:17-30
- Lim HS, Nam J, Seo EY, Nam M, Vaira AM, Bae H, Jang CY, Lee CH, Kim HG, Roh M, Hammond J (2014) The coat protein of Alternanthera mosaic virus is the elicitor of a temperature-sensitive systemic necrosis in *Nicotiana benthamiana*, and interacts with a host boron transporter protein. *Virology* 452-453:264-278
- Lim S, Nam M, Kim KH, Lee SH, Moon JK, Lim HS, Choung MG, Kim SM, Moon JS (2016) Development of a new vector using Soybean yellow common mosaic virus for gene function study or heterologous protein expression in soybeans. *Journal of virological methods* 228:1-9
- Liu C, Nelson RS (2013) The cell biology of Tobacco mosaic virus replication and movement. *Frontiers in plant science* 4:12
- Mas P, Beachy RN (1999) Replication of tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA. *The Journal of cell biology* 147:945-958
- Meulen, R.M, Lamers G. E. M., Caspers, M. P. M., Heistek, J. C., deBoer, A. H., VanDuijn, B., & Wang, M. (2000). Effects of fusico-ccin and gibberellic acid on the germination of embryos from dormant barley grains: roles of starch degradation and external pH. *Seed Science Research* 10, 171-82.
- N. Reis, A.S. Franca, L.S. Oliveira, Discrimination between roasted coffee, roasted corn and coffee husks by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy, *LWT - Food Science and Technology*, 50 (2013) 715-722
- Nam J, Nam M, Bae H, Lee C, Lee BC, Hammond J, Lim HS (2013) AltMV TGB1 Nucleolar Localization Requires Homologous Interaction and Correlates with Cell Wall Localization Associated with Cell-to-Cell Movement. *The plant pathology journal* 29:454-459
- Nishikiori M, Dohi K, Mori M, Meshi T, Naito S, Ishikawa M (2006) Membrane-bound tomato mosaic virus replication proteins participate in RNA synthesis and are associated with host proteins in a pattern distinct from those that are not membrane bound. *Journal of virology* 80:8459-8468
- Novella IS, Presloid JB, Taylor RT (2014) RNA replication errors and the evolution of virus pathogenicity and virulence. *Current opinion in virology* 9:143-147
- Osman TA, Hemenway CL, Buck KW (2000) Role of the 3' tRNA-like structure in tobacco mosaic virus minus-strand RNA synthesis by the viral RNA-dependent RNA polymerase In vitro. *Journal of virology* 74:11671-11680

- Panavas T, Serviene E, Brasher J, Nagy PD (2005) Yeast genome-wide screen reveals dissimilar sets of host genes affecting replication of RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:7326-7331
- Park CH, Ju HK, Han JY, Park JS, Kim IH, Seo EY, Kim JK, Hammond J, Lim HS (2016) Complete nucleotide sequences and construction of full-length infectious cDNA clones of cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) in a versatile newly developed binary vector including both 35S and T7 promoters. *Virus genes*
- Park, K.W., Lee, B., Kim, C.-G, Kim, D. Y., Park, J.-Y., Ko, E.-M., Jeong, S.-C., Choi, K.-H., Yoon, W.K., & Kim, H.M. (2010). Monitoring the occurrence of genetically modified maize at a grain receiving port and along transportation routes in the Republic of Korea. *Food Control* 21, 456-461.
- Ph. Vermeulen, J.A.F. Pierna, H.P. Van Egmond, P. Dardenne, V. Baeten, 2011, Online detection and quantification of ergot bodies in cereals using infrared hyperspectral imaging, *Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 29(2):232-240
- Powles, S.B. (2008). Evolution in action: glyphosate-resistant weeds threaten world crops. *Outlooks on Pest Management* 19, 256-259.
- Prod'homme D, Jakubiec A, Tournier V, Drugeon G, Jupin I (2003) Targeting of the turnip yellow mosaic virus 66K replication protein to the chloroplast envelope is mediated by the 140K protein. *Journal of virology* 77:9124-9135
- R. M. Meulen, G.E.M. Lamers, M.P.M. Caspers, J.C. Heistek, A.H.deBoer, B.VanDuijn, et al., Effects of fusico-ccin and gibberellic acid on the germination of embryos from dormant barley grains: roles of starch degradation and external pH, *Seed Sci Res* 10 (2000) 171-82.
- Ravikanth, L. , Singh, C.B. , Jayas, D.S., 2016, Performance evaluation of a model for the classification of contaminants from wheat using near-infrared hyperspectral imaging, *Biosystems Engineering* 147:248-258
- S. H. Gordon, R.W. Jones, J.F. McClelland, D.T. Wicklow, R.V. Greene, 1999, Transient infrared spectroscopy for detection of toxigenic fungi in corn: potential for on-line evaluation, *J. Agric. Food Chem.*, 47:5267-5272
- S. Kaliramesh, V. Chelladurai, D.S. Jayas, K. Alagusundaram, N.D.G. White, P.G. Fields, 2013, Detection of infestation by *Callosobruchus maculatus* in mungbean using near-infrared hyperspectral imaging, *Journal of Stored Products Research*, 52:107-111
- S. Majumdar, D.S. Jayas, 2000, Classification of cereal grains using machine vision: I. Morphology models, *Transactions of the ASAE*, 43(6):1669-1675
- S.R. Delwiche, I.C. Yang, M.S. Kim, 2009, Hyperspectral imaging for detection of black tip damage in wheat kernels, *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering* 7315. art. no. 73150K

- Seo EY, Nam J, Kim HS, Park YH, Hong SM, Lakshman D, Bae H, Hammond J, Lim HS (2014) Selective Interaction Between Chloroplast beta-ATPase and TGBIL88 Retards Severe Symptoms Caused by Alternanthera mosaic virus Infection. *The plant pathology journal* 30:58-67
- Seo EY, Lim S, Hammond J, Moon JS, Lim HS (2016) Complete genome sequence of a novel potyvirus, callistephus mottle virus, identified in *Callistephus chinensis*. *Archives of virology* 161:3281-3283
- Sveinsdóttir, H., Yan, F., Zhu, Y., Peiter-Volk, T., & Schubert, S. (2009). Seed ageing-induced inhibition of germination and post-germination root growth is related to lower activity of plasma membrane H⁺-ATPase in maize roots. *Journal of Plant Physiology* 166, 128-135.
- Swain, M.J., Spinassou, A., & Swain, M. V. L. (2007). A test procedure to characterize the heating performance of domestic microwave ovens.
- T.A. Lestander, Per C. Oden, 2002, Separation of viable and non-viable filled scots pine seeds by differentiating between drying rates using single seed near infrared transmittance spectroscopy, *Seed Science and Technology* 30(2):383-392
- Tai-Gi Min and Woo-Sik Kang, 2008, Nondestructive Classification of Viable and Nonviable Radish (*Raphanus sativus* L.) Seeds Using Single Seed Near Infrared Spectroscopy, *Hort. Environ. Biotechnol.* 49(1):42-46
- Vaira AM, Lim HS, Bauchan GR, Owens RA, Natilla A, Dienelt MM, Reinsel MD, Hammond J (2012) *Lolium* latent virus (Alphaflexiviridae) coat proteins: expression and functions in infected plant tissue. *The Journal of general virology* 93:1814-1824
- Van De Wiel, C. C. M., Groeneveld, R. M. W., Dolstra, O., Kok, E. J., Scholtens, I. M. J., Thissen, J. T. N. M., Smulders, M. J. M. & Lotz, L. A. P. (2009). Pollen-mediated gene flow in maize tested for coexistence of GM and non-GM crops in the Netherlands: effect of isolation distances between fields. *NJAS - Wageningen. Journal of Life Sciences* 56, 405-423.
- Vijayakumar, K.R., Martin, A., Gowda, L. R., & Prakash, V. (2009). Detection of genetically modified soya and maize: impact of heat processing. *Food Chemistry* 117, 514-521.
- C. F. Ridenour, J. Xiong, and G. E. Maciel, 1996, Investigation of germination and aging in Moravian III barley grain by nuclear magnetic resonance, *Biophys J.* 70(1):511-31
- Xu K, Nagy PD (2014) Expanding use of multi-origin subcellular membranes by positive-strand RNA viruses during replication. *Current opinion in virology* 9:119-126
- 안치국, 모창연, 강점순, 조병관, 2012, 초분광 반사광 영상을 이용한 무종자의 발아와 불발아 비파괴 판별, *Journal of Biosystems Engineering.* 37(6):411-419

〈별첨〉

농림축산식품 기술사업화지원사업

비파괴 바이오 센싱 기반
이병종자 신속·전수검사기술 개발 및 상용화



**비파괴 바이오 센싱 기반 이병종자
신속·전수검사기술 개발 및 상용화
사업화 전략 계획서**

2016. 12.

제 출 문

농림수산식품기술기획평가원장 귀하

본 계획서를 농림축산식품 기술사업화지원사업 「비파괴 바이오 센싱 기반 이병종자 신속·전수검사기술 개발 및 상용화」 과제의 사업화 전략 계획서로 제출합니다.

2016년 12월

주관연구기관 :	충남대학교
주관연구책임자 :	임현섭
세부연구기관 :	충남대학교
세부연구책임자 :	조병관
협동연구기관 :	경희대학교
협동연구책임자 :	오창식
협동연구기관 :	농림축산검역본부
협동연구책임자 :	김상목
협동연구기관 :	(주)제노레버코리아
협동연구책임자 :	홍석명
협동연구기관 :	(주)빌리언이십일
협동연구책임자 :	조보현

목 차

I. 개요	1
1. 분석배경 및 목적	2
1-1. 분석배경	2
1-2. 분석목적	2
2. 사업화 대상 기술 분석	2
2-1. 기술개요	2
2-2. 연구개발 기술에 대한 사업화 분석	4
2-3. 사업화 대상 기술의 범위 및 계층 분석	5
II. 시장조사 · 분석	7
1. 종자시장분석	8
1-1. 종자시장개요	8
1-2. 종자산업의 중요성 재평가 배경	9
1-3. 해외 종자시장 현황과 전망	10
1-4. 국내 종자시장 현황과 전망	12
1-5. 종자산업을 둘러싼 최근의 변화	17
1-6. 시사점	19
2. 비파괴검사시장분석	20
2-1. 비파괴검사시장개요	20
2-2. 비파괴검사시장 현황과 전망	23
3. 기술개발 성과의 시장적용 및 응용분야 분석	32
3-1. 시장적용 분석	32
3-2. 응용시장 분석	32

III. 개발기술의 기술사업화 계획 33

1. 개발기술의 차별화 34

1-1. 종자검사(검정)기술 비교 34

1-2. 주요 핵심기술 및 차별화 전략 35

2. 기술사업화 로드맵(TBRM) 및 기술사업화 전략 36

2-1. 시장 니즈 분석 36

2-2. SWOT 분석 37

2-3. 비즈니스 모델 분석(Nine Blocks) 37

2-4. 기술사업화 로드맵(TBRM) 38

2-5. 기술사업화 추진전략 38

2-6. 사업화성과 및 매출실적(계획) 40

I. 개요

1. 분석배경 및 목적
2. 사업화 대상 기술 분석



1. 분석배경 및 목적

1-1. 분석배경

- (1) 상용화를 목표로 하는 기술사업화지원사업의 성공적 목표달성을 위해 연구개발성과에 대한 사업화전략 수립이 필요함.
- (2) 변화하는 시장의 요구를 반영하여 사업화 초기단계부터 매출과 수익 등 기술사업화 성과를 극대화하기 위한 기술사업화로드맵 구축이 필요함.

1-2. 분석목적

「비파괴 바이오 센싱 기반 이병종자 신속·전수검사기술」 개발 성과에 대한 체계적인 활용·확산을 위한 기술사업화 전략 수립

2. 사업화 대상기술 분석

2-1. 기술개요

(1) 기술개발 목표

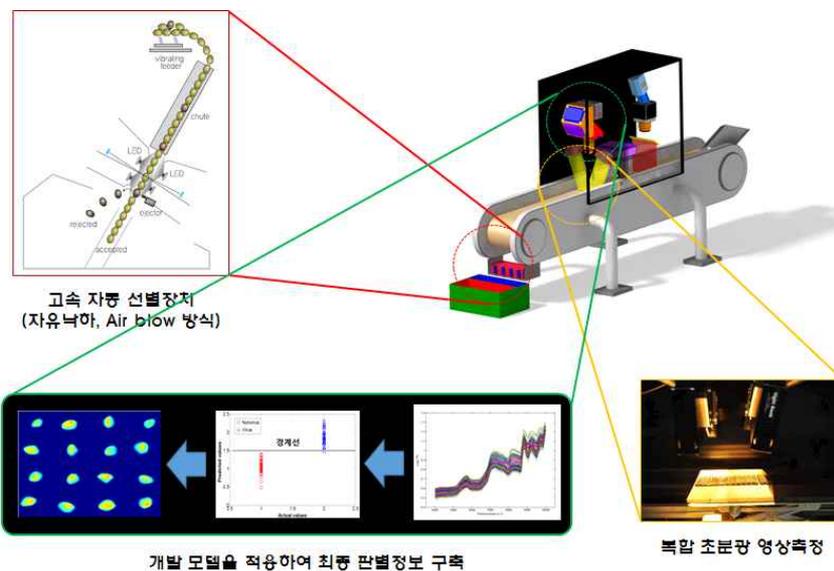
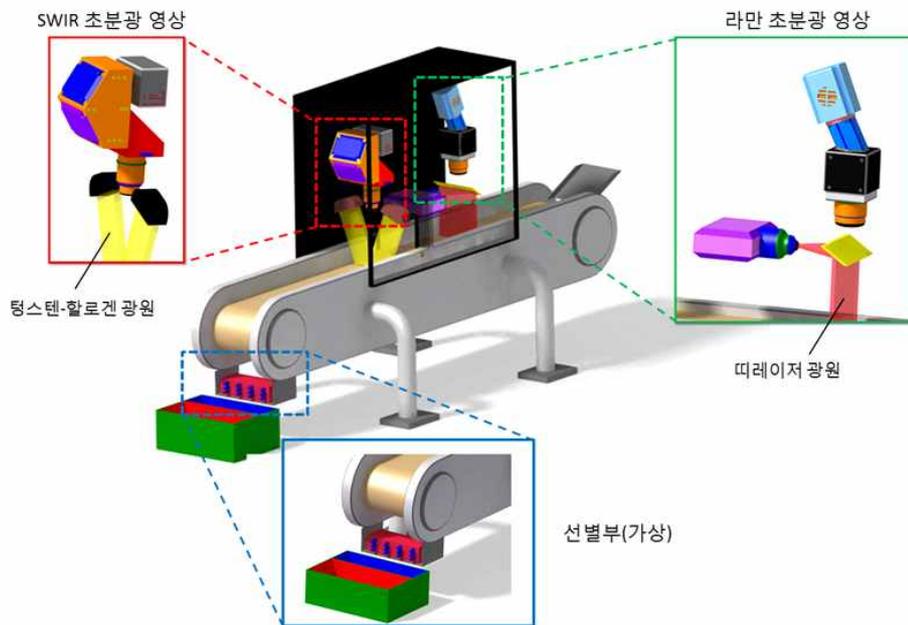


본 기술개발사업의 개발목표는 비파괴 바이오 센싱 기술을 기반으로 이병종자를 현장에서 신속하게 전수 검사하는 다차원 복합 초분광 시스템을 개발하고 이를 상용화하는 것임.

(2) 기술개요

1) 다차원 복합 초분광 시스템

단파적외선(Short Wave Infra-Red, SWIR) 및 라만분광에 공간 정보를 융합한 첨단 기술인 복합 초분광 영상분석기술을 활용하여 기존의 1차원적인 분광정보로는 분석이 어려웠던 종자 내 유해 미생물(병원체) 함유 여부를 신속·정확하게 비파괴 검사할 수 있는 현장 적용형 이병종자 검사(검역) 기술로서 이화학 및 미생물학적 분석기술을 대체할 수 있는 종자의 현장형 비파괴 신속·전수·사전분석 기술임.



2) 세부기술

가) 바이러스 감염 종자 신속전수검사 기반 기술

- 재식용 검사 대상 바이러스에 관한 분광수치를 측정하며 모델식물을 이용하여 바이러스 종류에 따라 발생하는 다양한 분광정보 산출
- 바이러스 감염이 종자 내 구조 및 성분 변화가 분광차이를 발생하는 원리를 바탕으로 바이러스 종류에 따라 종자의 물리/생화학적 변화 차이를 분광수치로 산출
- 다양한 분광수치가 종자 내 감염 바이러스 종류 판정이 가능한 기술인 복합 초분광 영상기술에 적용

나) 이병종자 신속전수검사를 위한 복합 초분광 영상시스템

- 단파근적외선(Short Wave Infrared-Ray, SWIR) 및 라만분광에 공간 정보를 융합한 복합 초분광 영상기술을 활용하여 기존의 평균적인 분광정보로는 측정이 어려웠던 종자 내 유해 미생물 함유여부를 신속, 정확하게 비파괴 검출할 수 있는 현장 적용형 이병종자 판별 기술
- 현재의 이화학 및 미생물적 분석체계를 대체할 수 있는 효과적인 현장적용형 비파괴 측정 기술

다) 신속·전수검사 모델링 기술

라) 이병종자 신속전수검사용 컨베이어형 고속 자동 선별 시스템

- 바이오 센싱부에서 확인된 정보를 바탕으로 이병종자를 자동으로 선별하고 분리하는 고속 컨베이어형 종자 자동 선별 시스템

마) 이병종자 비파괴 범용 선별모델 적용 소프트웨어 기술

- 센싱부 H/W에서 발생할 수 있는 오차를 보정하고, 동일 종자는 같은 기능을 수행하는 다른 센싱부에서도 같은 패턴으로 인지되도록 H/W적 편차를 정상적으로 보정
- 측정되는 초분광 영상 정보를 지속적으로 DB화하여 검사 모델을 자동으로 업데이트 하는 임베디드(Embedded) 시스템

2-2. 연구개발 기술에 대한 사업화 분석

- (1) 본 개발기술은 비파괴 바이오 센싱 기술을 기반으로 이병종자를 현장에서 신속하게 전수 검사하는 다차원 복합 초분광 시스템으로서, 현재 종자 검사에 주로 활용되고 있는 이화학 및 미생물학적 분석기술을 대체할 수 있는 신규 기술임.
- (2) 종자 관련 시장은 꾸준히 성장하고 이익률이 높은 분야이지만 품질관리 리스크와 종자 교역 증가로 인한 병원체의 이동 및 신규 유입 가능성이 높은 분야임.

- (3) 품질관리 및 종자 검역을 위한 종자검사기술은 이화학적 방법과 미생물학적 방법 등이 활용되고 있지만 비용과 시간이 많이 소요되고 비파괴·신속·전수검사가 불가능해 현재의 종자검사는 파괴·사후·샘플검사 방식으로 진행되어 새로운 기술에 대한 수요가 높게 형성되어 있음.
- (4) 따라서 본 개발기술은 현재의 기술수준을 극복할 수 있는 새로운 대안기술로서 사업화 가능성이 매우 높다고 볼 수 있음.

2-3. 사업화 대상 기술의 범위 및 계층 분석

(1) 사업화 대상기술의 범위

- 본 개발기술은 단파적외선(Short Wave Infra-Red, SWIR) 및 라만분광기술과 공간 정보를 융합한 첨단기술인 복합 초분광 영상분석기술을 활용하여 기존의 1차원적인 분광정보로는 분석이 어려웠던 종자 내 유해 미생물(병원체) 함유 여부를 신속·정확하게 비파괴 검사할 수 있는 현장 적용형 이병종자 검사(검역) 기술로서, 이화학·미생물학적 분석기술을 대체할 수 있는 종자의 현장형 비파괴 신속·전수·사전분석 기술임.
- 사업화 대상기술은 본 기술개발을 통해 창출되는 다차원 복합 초분광 종자검사 시스템 관련 지식재산권(IP : Intellectual Property) 및 관련 노하우로서, 기술이전·tftl/mf 통한 사업화를 핵심 기반으로 진행해 나감.

(2) 계층분석

- 1) 사업화 대상기술을 계층적으로 분석하면 다음 그림과 같음.



- 2) 초분광영상기술(센싱부로서 단파적외선(Short Wave Infra-Red, SWIR), 라만분광기술 적용), 고속 종자 자동선별 시스템(고속 컨베이어 벨트 시스템), S/W 기술(데이터 보정기술, 임베디드 운영 시스템, DB 시스템) 등이 주요한 장치 구성기술이고, 이화학적·미생물학적 분석을 병행한 바이러스 감염 종자 적용기술이 기초기술로서 구성됨.
- 3) 상용화 효과를 강화하기 위해서 기초기술인 바이러스 감염 종자 적용기술분야는 향후 대상 종자와 바이러스를 확대해 나가고, S/W 기술도 DB 구축 등 관련 데이터를 보완하여 적용 가능 이병종자를 지속적으로 확대해 나가야 함.

II. 시장조사·분석

1. 종자시장분석
2. 비파괴검사시장분석
3. 기술개발 성과의 시장적용 및
응용분야 분석



1. 종자시장분석

1-1. 종자시장개요

- (1) 종자는 그동안 농산물 생산을 위해 필요한 씨앗 정도로만 인식되어 왔으며, 종자산업의 가치를 각인하지 못한 채, 오히려 산업 발전의 기반인 국내 종자기업이 외국계 종자기업에 인수·합병 되었음. 더욱이 대표적인 상업용 종자인 채소종자는 농업부문의 축소 등의 영향으로 시장규모가 지난 10여 년간 정체 상태였음.
- (2) 이처럼 국내 종자산업이 저평가되고 있는 사이, 종자강국과 글로벌 종자기업들은 종자산업이 막대한 이익의 창출이 가능한 고부가가치 산업임을 인지하여 우수한 유전자원을 선점하기 위해 경쟁적으로 투자를 확대하고 있음. 또한, 의학이나 재료산업 등과의 융복합화로 종자산업의 외연도 크게 확장되고 있음.
- (3) 최근 들어 우리나라도 종자산업의 가치를 재평가하기 시작하였으며, 정부 주도로 종자산업 발전을 위한 다양한 대응책을 마련하여 추진하고 있음.



자료: 정용동(2015), GSP 채소종자사업단 세미나 발표 자료.

1-2. 종자산업의 중요성 재평가 배경

(1) 농기업화 진전으로 종자의 대량 소비

- 1) 종자산업은 농작물 생산의 성패를 좌우하는 결정 요소 중의 하나로서 우량종자를 확보하지 못할 경우 농작물 수급에 막대한 영향을 미칠 수밖에 없는 원천산업임. 과거의 농업은 자급자족 개념으로 종자를 자가 채종하여 소규모로 소비하는 구조였지만, 농업의 발전 과정에서 생산규모는 확대되었고 판매 중심의 상업농이 주류를 형성하게 되었음. 이 때문에 세계적으로 농기업화가 진전되어 종자의 대량 구매가 필요해짐에 따라 우량종자의 생산 확대가 반드시 필요하게 되었음.
- 2) 더욱이 종자는 농작물 생산은 물론, 생산 이후의 유통, 가공, 저장 방향을 결정하는 특성으로 인해 농자재산업과 가공·유통산업에도 큰 영향을 미치는 중요한 산업으로 재평가되고 있음. 이로 인해 미국을 비롯한 농업 강국들은 우량종자를 안정적으로 확보하려는 노력을 지속적으로 전개하고 있음.

(2) 식량주권과 연계

- 1) 최근 세계적인 기상이변 속출, 신흥경제국의 도시화와 소득 향상에 따른 농작물 소비 증대, 바이오에너지 수요 증가 등으로 국제곡물 수급의 불안정 기조가 확대되고 있음. 대표적인 사례가 2008년의 이른바 애그플레이션이었으며, 당시 곡물 수출국들은 급등하는 국제 곡물가격으로 인해 수출을 통제하기도 하였음. 2012년에도 기상이상 현상 등으로 국제곡물 선물가격이 최고치를 갱신하여 국내 식품 가격의 급등을 유발하였음.
- 2) 이처럼 식량수급의 불안정한 기조 속에서 자국의 식량공급 안정을 위한 다양한 전략과 함께 우량종자 확보를 위한 국가 간 경쟁도 치열해지고 있음. 종자산업은 국민의 먹을 거리를 지속적으로 제공해 주는 중요한 산업이자 식량주권을 굳건히 지켜내는 소중한 자산이라는 인식이 범세계적으로 확산하게 된 것임.

(3) 종자산업의 영역 확산

- 1) 종자산업은 그동안 새로운 종자 개발을 위한 교배육종 기술이 주류를 형성하였으나, 이제는 의약·재료산업이나 나노기술과 접목하는 등 융복합산업화로 영역이 확대되고 있음. 특히, 선진국과 글로벌기업들은 생명공학 기술을 활용하여 기후변화에 대응한 내재해성(Climat ready) 유전자 개발에 박차를 가하면서 막대한 부를 축적하고 있

음. 대표적인 글로벌 종자기업인 Monsanto의 2014년 종자 판매액은 107억 달러, Syngenta는 3,160억 달러에 달하고 있음.

- 2) 종자산업은 첨단생명과학기술산업으로 영역이 확대되어 막대한 이득의 창출이 가능한 산업으로 급부상하고 있음.

1-3. 해외 종자시장 현황과 전망

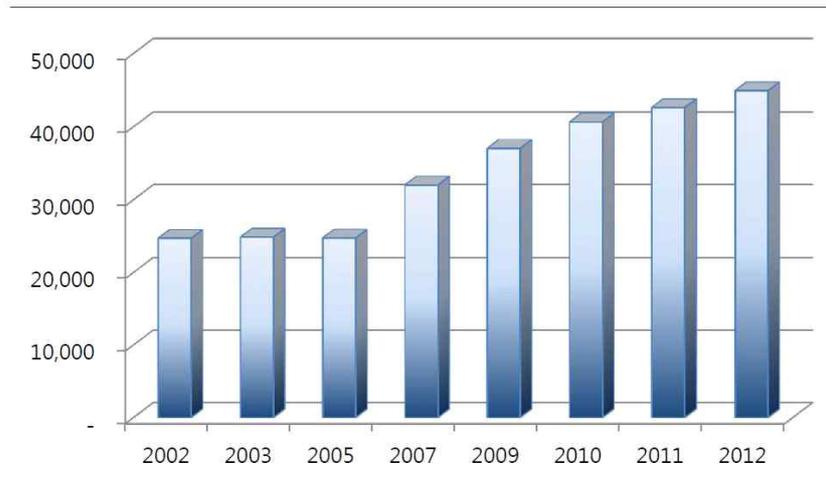
- (1) 세계종자연맹(ISF)의 발표에 의하면, 세계 종자시장 규모는 2002년 247억 달러에서 2005년까지 다소 정체하다가 이후 지속적으로 성장하고 있는 추세임. 2012년의 시장 규모는 449억 달러로 2002년에 비해 82.1%나 증가한 것으로 나타남. 세계 종자시장을 주도하는 지역은 2000년대 초반까지 유럽이 가장 높은 비중을 차지하였으나, 2000년대 중반부터는 아시아/중동 지역의 확대가 두드러지기 시작하면서 아시아/중동의 비중이 가장 큰 구조로 변화하였음. 국별로는 미국과 중국이 1~2위를 기록하고 있는 가운데, 다음이 프랑스, 브라질, 캐나다 등의 순이며, 이들 상위 5개국이 전 세계 종자시장 규모의 65.7%를 차지하고 있음.
- (2) 세계 종자수출은 2005년 48억 달러에서 2012년 105억 달러로 2.2배 신장되었으며, 주요 종자 수출국으로는 글로벌 종자기업을 보유하고 있는 프랑스, 네덜란드, 미국, 독일 등임. 이들 4개국이 전 세계 종자수출의 53.5%, 상위 10개국은 71.8%의 비중을 차지할 정도로 특정국가의 점유율은 상당히 높음. 세계 종자수입액은 같은 기간 49억 달러에서 97억 달러로 2배 증가하였음. 미국, 독일, 프랑스, 네덜란드 등이 주요 종자 수입국인데, 이들 국가는 종자의 최대 수출국이자 수입국이기도 함.

〈 세계 종자 수출입 추이 및 종자시장 규모 〉

	2005	2010	2012
수 출	4,804	8,256	10,543
상위 10개국 비중(%)	75.0	71.0	71.8
수 입	4,863	7,842	9,749
상위 10개국 비중(%)	59.4	56.1	53.0

자료: ISF(International Seed Federation).

세계 종자시장 규모



- (3) 대표적인 글로벌 종자기업은 몬산토, 듀폰, 신젠타 등으로서 종자 관련 매출액이 매년 지속적으로 성장하고 있음. 세계 최대 종자기업인 몬산토의 종자 매출액은 2010년 76억 달러에서 2014년 107억 달러로 41.1% 신장하였으며, 아시아 종자기업 중에서는 사카타가 세계 10대 종자기업에 포함되어 있음. 한편, 세계 10대 종자기업의 시장 점유율은 1995년 26.8%에서 2009년 74.0%로 급증하여 집중화가 심화되고 있는 상황임.
- (4) 세계 종자시장은 규모나 교역이 신장하고 있으며, 글로벌 종자기업의 매출도 확대되는 추세임. 이에 따라 세계 종자시장 규모는 연평균 5% 성장하여 2020년에는 615억 달러로 2012년 대비 40.0% 증가할 것으로 전망되고 있음(CONTEXT). 특히, 세계 채소종자 시장규모는 2012년 50억 달러에서 2025년 133억 달러로 2.7배나 확대될 것으로 예상되는 등 향후에도 지속적으로 시장규모가 확대될 것으로 전망됨.

〈 글로벌 종자기업 매출액 및 시장 점유율 추이 〉

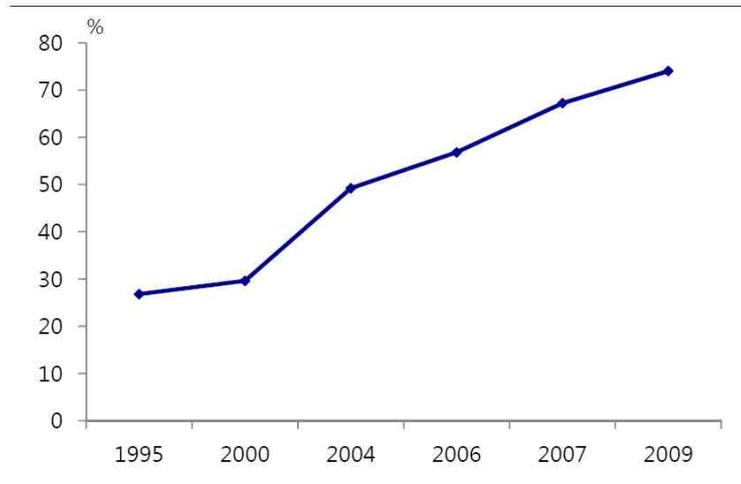
글로벌 종자기업의 종자관련 매출액

단위: 백만 달러

	2010	2011	2012	2014
Monsanto	7,611	8,582	9,789	10,740
Du Pont	7,845	9,166	9,500	n.a.
Syngenta	2,479	2,850	3,273	3,156
Limagrain	1,618	2,005	2,301	n.a.
Sakata	465	471	469	n.a.

자료: 각사의 Annual Report; 농촌진흥청·한국종자협회(2011), 「종자산업 시장 현황 조사 보고서」에서 재정리.

세계 10대 종자기업의 시장 점유율



1-4. 국내 종자시장 현황과 전망

- (1) 우리나라 종자산업은 ① 일본의 영향을 받았던 태동기(1950년 이전), ② 우장춘 박사의 활동으로 육종 기반이 마련된 기반 구축기(1950~1961년), ③ 농산종묘법이 제정된 발달 초창기(1962~1973년), ④ 종묘관리법 개정을 통한 성장기(1973~1985년), ⑤ 종묘관리법 후기와 수입자유화 이후로 구분되는 활성화기(1985~1997년), ⑥ 종자산업법 개정을 통해 품종보호제도가 정착되고 다국적 종자기업의 국내진출 등이 이루어진 국제화시대(1998~현재) 등의 과정을 거쳐 현재에 이르고 있음.

- (2) 종자는 품목부류에 따라 육종과 생산 및 보급체계가 다름. 채소류의 경우 완전민간주도형으로서 육종은 물론, 생산·보급을 전적으로 민간이 담당하는 대표적인 상업용 종자임. 반면, 5대 식량작물(벼, 보리, 콩, 옥수수, 감자)은 국민의 먹거리와 직결되기 때문에 일체의 과정은 정부가 주도하여 담당하는 완전관주도형임. 기타 식량작물과 특용작물, 전매작물, 과수와 화훼의 경우 관민혼합주도형으로 정부와 민간이 육종이나 생산·보급을 공동 담당하거나 역할을 나누어 담당하는 형태임.
- (3) 상업용 채소종자는 과거에 서울종묘, 흥농종묘, 중앙종묘 등 아시아권에서도 상당히 규모가 컸던 기업들이 신품종을 활발히 육종하여 생산·판매하였으나, IMF 관리체제 이후 이들 기업은 해외 글로벌 종자기업에 인수·합병되었음. 글로벌 종자기업의 M&A는 신기술 도입으로 종자품질 향상을 촉진하는 긍정적 효과도 있었지만, 종자주권의 심각한 침해와 국내 유전자원의 유출, 구조조정으로 육종 전문가 양성 차질 등 많은 부작용도 노출하였음.
- (4) 국내 종자시장 규모는 공식적인 데이터가 구축되어 있지 않아 자료에 따라 6,000억 원대에서 9,000억 원대에 이르기까지 상당한 차이가 있음. 최근 한국종자협회에서 추정한 바에 의하면, 종자시장 규모는 약 9,700억 원에 달하며, 이중 채소종자 규모가 가장 큰 것으로 나타났음. 그럼에도 불구하고 세계 종자시장 규모에서 우리나라가 차지하는 비중은 1% 미만에 불과한 실정임.
- (5) 상업용 채소종자의 경우 수출을 제외한 국내시장 규모가 농업부문의 축소 등으로 인해 1,600~1,800억 원 내외로 정체하다가 최근 들어 신품종 확산 등을 통해 2,000억 원대로 증가세를 보이고 있음. 그러나 주요한 채소종자 생산품목은 고추, 배추, 무 중심이며, 글로벌 종자품목이라 할 수 있는 파프리카나 양채류 등의 생산 비중은 낮은 편임. 특히, 종자업으로 등록된 1,368개 업체 가운데 채소종자는 16.6%인 227개 업체(2014년 11월 기준)이지만, 상위 10개 업체가 전체 시장의 83%를 점유하고 있어 업체 규모가 상당히 영세한 구조임. 이처럼 채소종자는 업체가 난립되어 있어 종자가격 덤핑, 종자 사고에 대한 불명확한 책임 소재와 배상 능력 부족 등의 문제가 지속적으로 발생하고 있음.

〈 종자 생산·보급 체계 및 종자기업 동향〉

종자 생산 및 보급 체계

	부류	육종	생산	보급
완전 민간 주도형	채소	민간	민간	자유시장
완전 관 주도형	5대식량 작물	관	관	관
관민 혼합 주도형	기타 식량 작물	관	관	자유교환
	특용작물	관	관	조합
	전매작물	관,공사	공사	조합
	과수	도입,관	민간	자유시장
	화훼	도입,관	민간	자유시장

국내 종자기업 M&A 동향

	합병이전	1차M&A	2차M&A	업체명
M&A	청원종묘	사카타	-	사카타 코리아
	서울종묘	노바티스	신젠타 (2000)	신젠타 종묘
	흥농종묘	세미니스	몬산토 (2008)	몬산토 코리아
	중앙종묘			
씨덱스	-	바이엘 크롭 사이언스 (2007)	바이엘 크롭 사이언스	
비M&A	한국 다끼이 법인 설립(2011)			

자료: 한국채소종자산업발달사 편찬위원회(2008)『한국채소종자산업발달사』, 서울대출판부; 박기환(2010)『종자산업의 동향과 국내 종자기업 육성 방안』, 한국농촌경제연구원, 에서 재질리.

[국내 주요 종자기업 현황]

(FY 2011 기준)

(단위 : 억원)

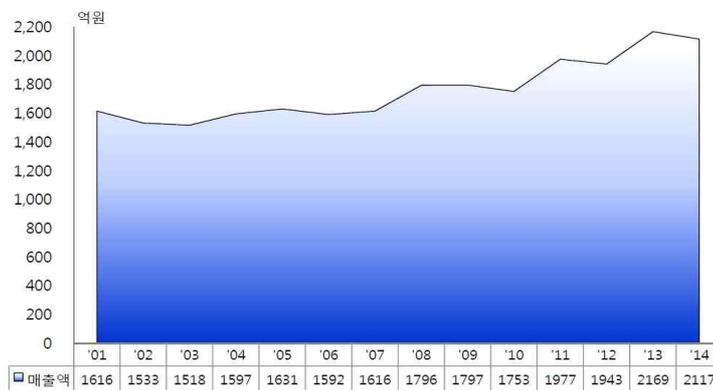
	총자산	자본금	매출액	영업익	비고
농우바이오	1,291.9	71.5	555.9	108.4	코스닥/대기업
사카타코리아	309.3	185.4	164.8	25.0	외감/중소기업/외투기업
신젠타종묘	269.3	200.5	164.2	-28.8	외감/중소기업/외투기업
몬산토코리아	819.0	81.2	521.2	35.3	외감/대기업/외투기업
아시아종묘	200.5	30.3	145.0	31.9	외감/중소기업
한국다끼이	224.0	50.0	157.2	14.1	외감/중소기업/외투기업

자료: NICE 산용평가정보(isisline)

주: 종자 및 묘목 생산업(01123) 해당업체, 한국다끼이는 종자 및 묘목 도매업(G46202)

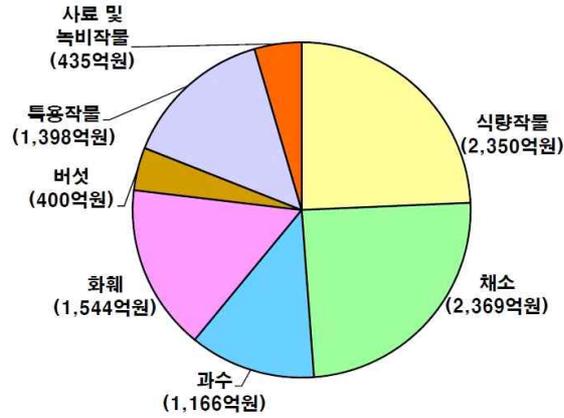
〈 전체 종자시장 및 상업용 채소종자 국내시장 규모 〉

상업용 채소종자 국내시장 규모



자료: 한국종자협회.

종자시장 규모



연도별 채소종자 매출 추이

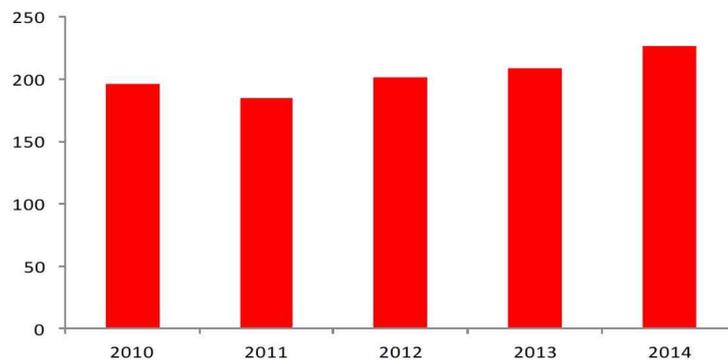
(단위: 백만원)

연도	총 매출	%	국내	%	수출	%
2015	264,760	4.4%	213,240	0.7%	51,520	22.9%
2014	253,600	-2.9%	211,666	-2.4%	41,934	-5.4%
2013	261,251	9.1%	216,908	11.6%	44,343	-1.8%
2012	239,451	2.4%	194,311	-1.7%	45,139	25.3%
2011	233,728	15.8%	197,710	12.8%	36,018	35.3%
2010	201,901	12.3%	175,287	13.3%	26,614	6.6%
2009	179,717	0.1%	154,747	-2.4%	24,970	18.8%
2008	179,593	11.1%	158,584	11.7%	21,010	6.6%
2007	161,647	1.5%	141,943		19,704	100
2006	159,236	-2.3%				
2005	163,056					

자료: 한국종자협회 홈페이지

채소종자기업 현황

(단위: 개)



자료: 농우바이오 국립종자원 인용

2015년 채소종자 작물별 수입현황

(단위: kg1 천달러)

작물	총수입 (A+B)			순수입 (A)			해외채종 (B)		
	수량	금액	%	수량	금액	%	수량	금액	%
계	2,061,359	68,770	100	273,397	14,561	100	1,787,962	54,209	100
고추	46,504	7,273	11	1	2	0	46,503	7,271	13
단고추	240	5,202	8	189	4,875	31	51	327	1
당근	53,191	2,871	4	4,420	633	3	48,771	2,238	4
무	1,144,005	9,604	14	166,602	1,187	7	977,402	8,417	16
배추	101,912	1,359	2	40	16	0	101,872	1,343	2
브로콜리	19,976	1,951	3	7,569	618	6	12,407	1,333	2
상추	31,782	566	1	325	70	1	31,457	496	1
수박	13,039	1,545	2	152	211	1	12,887	1,333	2
시금치	212,609	2,702	4	66,392	1,081	7	146,218	1,622	3
양배추	148,920	3,843	6	4,842	163	0	144,078	3,680	7
양파	55,606	11,722	17	7,972	2,182	17	47,634	9,540	18
오이	52,471	3,468	5	5	2	0	52,466	3,465	6
참외	587	110	0	0	0	0	587	110	0
토마토	4,748	8,620	13	235	2,552	18	4,513	6,068	11
파	40,375	1,527	2	11,877	504	2	28,498	1,023	2
호박	135,394	6,408	9	2,776	464	6	132,618	5,944	11

자료: 한국종자협회

2015년 채소종자 작물별 매출액

(단위: 백만원)

작물	총 매출	비중%	국내	비중%	수출	비중%
고추	50,416	19	39,753	19	10,663	21
무	45,926	17	30,480	14	15,446	30
양파	26,680	10	25,761	12	919	2
토마토	23,869	9	21,720	10	2,148	4
배추	17,384	7	13,302	6	4,082	8
수박	12,764	5	12,660	6	104	-
호박	9,377	4	7,710	4	1,666	3
양배추	7,929	3	2,042	1	5,887	11
시금치	7,923	3	7,874	4	49	-
오이	6,673	3	3,913	2	2,760	5
상추	5,687	2	5,642	3	45	-
파	5,403	2	5,118	2	284	1
당근	5,239	2	3,013	1	2,227	4
참외	4,773	2	4,764	2	9	-
브로콜리	3,991	2	3,487	2	504	1
기타	20,439	8	15,709	7	4,729	9
대목용	10,290	4	10,290	5	-	-
계	264,760	100	213,240	100	51,520	100

자료: 한국종자협회

주: 한국종자협회 회원사 제출자료(57사 중 47사), 대목용 종자의 수출액은 집계하지 않음. '-'는 1 미만, '0'은 수치 없음

1-5. 종자산업을 둘러싼 최근의 변화

- (1) 최근 들어 종자산업을 둘러싼 대내외적인 환경이 변화하고 있는데, 글로벌 종자기업들은 시장을 선점하기 위해 치열한 경쟁을 벌이면서 인수·합병을 활발히 전개하고 있음. 이 때문에 상위 10대 글로벌 종자기업의 매출액은 급속히 확대되고, 시장점유율이 70%대 이상으로 급증하는 등 세계 상업용 종자시장은 과점화되는 추세임. 그러나 한편으로는 독과점 금지 규제 영향으로 글로벌 기업들이 파트너십을 통해 협력관계도 유지하고 있음. 예컨대 세계 최대 종자회사인 몬산토의 경우 세미니스를 인수·합병했지만, BASF와 내재해성 유전자 특허를 등록하고 공동으로 품종을 개발하기도 함.
- (2) 최근 종자에서 성분을 추출하여 신약을 개발하여 커다란 이득을 취고 있는 등 종자산업은 의약·재료산업이나 나노기술 등과 접목하는 융복합 산업화가 급속히 확산되고 있음. 이와 같이 종자산업이 외연 확대를 통해 고부가가치산업으로 각광받게 되자 글로벌 종자기업은 원천기술 선점을 위해 연구개발에 막대한 예산을 투입하고 있음. 몬산토의 R&D 투자금액은 우리나라 전체 종자시장 규모의 2배 이상인 17억 달러(2014년)에 달하며, 신젠타와 일본의 사카타도 상당액을 R&D에 투자하고 있음.
- (3) 현 단계 우리나라 종자산업은 종자 강국과 비교하면, 시장이나 기업규모가 미약한 수준임. 그렇지만 최근 종자산업이 첨단생명과학기술의 접목이 가능한 고부가가치산업이라는 인식 전환이 사회적으로 확산되면서 정부가 적극적인 육성 정책을 추진하기 시작하였음. 정부는 「2020 종자산업 육성대책」을 마련하여 R&D 투자확대와 효율성 제고는 물론, 민간역량 강화를 위해 민간육종연구단지를 조성하였음. 또한, 육종된 품종의 보호를 위해 「종자산업법」을 개정하여 「식물신품종보호법」을 제정하기도 하였음. 최근에는 글로벌 종자강국으로 도약하기 위해 이른바 금값보다 비싼 종자 개발을 목표로 약 5,000억 원이 투입되는 Golden Seed 프로젝트가 시행되고 있음.

정부의 주요 종자산업 육성과제

가. Golden Seed 프로젝트

- 전략적 종자개발
- 2021년 수출 2억달러 달성, 종자자급률 향상
- 총 투자규모 4,911억원(정부 3,985+민간 926억원)
- *수출대상품목: 고추, 배추, 무, 수박, 벼, 감자, 옥수수 등
- *수입대상품목: 양배추, 양파, 토마토, 버섯, 파프리카, 백합, 감귤 등

나. 민간육종단지 조성

- 민간업체의 육종연구에 필요한 연구인프라 지원
- 2011~2016년, 20여개 기업 입주
- 전북 김제시, 542ha
- 총사업비 733억원(국비 716억원+지방비 17억원)

자료: 농림축산식품부, 종자산업 거센 파고를 헤치며 순항 중 2015.5.12

(4) 국내시장 확대와 더불어 종자수출도 적극 도모하면서 1990년 610만 달러에 불과했던 종자 수출액은 2014년에 4,000만 달러까지 큰 폭으로 확대되어 종자의 수출산업화 기반을 다져가고 있음. 여기에 GSP 사업을 통해 개발된 우수품종이 수출될 경우 우리나라의 종자 수출은 더욱 크게 증가할 것으로 예상됨. 이 뿐만 아니라 최근 우수품종의 종자가 속속 개발되면서 해외 품종 중심이었던 작물이 국내품종으로 대체되어 해외로 유출되는 로열티를 절감하고 있음. 딸기의 경우 그동안 일본품종이 재배되었으나, 매향이나 설향 등과 같은 국내 우수품종이 개발되면서 현재 국내품종의 재배 비중이 불과 9% 정도에서 86%까지 대폭 확대되고 있음.

< 종자산업의 융복합산업화 사례와 글로벌 종자기업 투자액 >

종자산업의 융복합화 사례



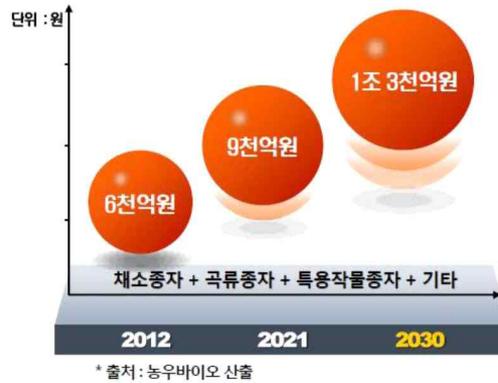
글로벌기업의 종자 R&D 투자액

단위: 백만 달러

	2009	2010	2011	2014
몬산토	1,098	1,205	1,386	1,725
신젠타	364	410	1,191 (이중 40% 내외)	1,430 (이중 40% 내외)
바이엘그룹 사이언스	227	327	n.a.	n.a.
사카타	42	42	45	n.a.

자료: 임용표, 희망제작소 농어촌 희망 기리기 포럼 발표 자료; 각사의 Annual Report.

한국 채소종자, 곡류종자 등 합계 추이



자료 농우바이오

1-6. 시사점

- (1) 종자산업은 식량주권 확보를 위한 중요한 출발점이자, 첨단기술이 접목된 수출지향적 미래성장동력산업으로 자리잡고 있음. 종자강국과 글로벌 종자기업들은 향후 지속적으로 확대될 것으로 예상되는 종자시장을 선점하고자 투자를 아끼지 않고 있음. 우리나라도 GSP사업을 실시하는 등 종자산업의 발전을 위해 정부가 주도적인 역할을 담당하고 있음.
- (2) 그럼에도 불구하고 대내외적인 트렌드에 역행하는 사안들도 발생하고 있음. 2012년 몬산토코리아를 인수하였던 동부팜한농이 최근 LG화학에 매각되었으며, 종자업계 1위인 농우바이오도 2014년 매각되었음. 그나마 다행인 것은 외국계 회사로 인수·합병되어 심각한 종자주권 문제를 야기했던 과거의 경험을 타산지석으로 삼아 농우바이오는 농협경제지주가 인수하였다는 점임.

최근 국내 종자산업 관련 주요 이슈

종목명	관련그룹	내용
팜한농 출범	LG화학	2015년 매출액 5,882억원 중에서 사업비중은 작물보호제 40.15%, 비료 46.0%, 기타 13.86%로 종자사업 비중은 상대적으로 작음. 그린바이오사업 육성인지 표명
노루기반 종자사업 시작	노루페인트	농생명사업 육성
C브리딩 종자사업 진입	C그룹	쌀, 콩, 녹두, 고추, 배추, 참깨 등 7개의 우수종자 확보 목표 산학협력으로 햇반, 큰눈영양쌀밥 상품화, 콩나물 콩 종자 C행복한콩 1호 상품화 예정

2. 비파괴검사시장분석

2-1. 비파괴검사시장개요

(1) 개요

- 1) 측정 및 시험기기란 측정대상물의 측정 결과를 수량화하기 위해 광원을 이용한 각종 센서 및 측정결과를 수치적으로 변환하는 것을 의미하며 이를 위해 IT 기술 및 전술한 기술과의 결합된 기구물 등을 포함.
- 2) 측정기기는 측정 대상에 따라 다양한 측정기기가 존재하며, 특히, 3차원 측정기, 광학 측정기, 거리 측정기, 연비 측정기, 수압 측정기, 비파괴 측정기, 측정공구 등이 있음. 측정방법에 의한 3차원 측정기는 접촉식 측정기, 비접촉식 측정기, 멀티 센서 측정기로 분류하며 실험용 분석기기, 전자계측기기, 물성 측정기기를 포함

(2) 정의 및 필요성

- 1) 분석 및 측정기기는 측정시스템 산포가 관측된 프로세스 산포에 얼마나 많은 영향을 미치는가를 분석이라고 하며 측정기기는 측정하는 목적의 기계만을 의미하는 것이 아니라 측정기와 측정자, 측정재료 및 측정 환경 등을 모두 포함하는 개념
- 2) 측정(measurement)이란 사물의 성질을 구체화하기 위하여 수를 부여하는 절차라고 정의함. 측정대상은 직접 측정이 가능한 것과 직접 측정이 불가능하여 간접 측정만이 가능한 대상으로 구분함. 측정은 가능한 한 측정의 결과를 수량화하는 것으로 어떤 양(측정량)이 그 기준이 되는 양(기준량)의 몇 배가 되는가를 결정하는 것임. 여기서 측정기기라 함은 IT, 광학 등 이종기술이 결합하여 측정하는 산업용 기기로 정의
 - 가) 3차원 측정이란 입체적인 물체의 측정위치를 프로브가 3차원 공간 즉, x,y,z 축으로 이동하여 측정된 공간 값을 컴퓨터가 처리하여 물체의 형상과 치수를 측정
 - 나) 정밀측정이란 기계 및 가공된 물품은 사용목적에 따라 치수, 형상, 가공방법, 재료 상태 등이 적합하여야 하며 이러한 가공전후의 상태를 측정하는 것을 의미
 - 다) 광학측정기로는 투영기, 현미경, 확대경/루페, 검사거울, 카메라, 영상측정기, 톨프 리세트, 내시경, 변위측정기, 왜곡검사기, 레이저스캐너 등이 존재
 - 라) 일반적으로 비파괴검사(NDT: Nondestructive Testing)란 재료나 제품의 원형과 기능에 변화를 주지 않고 실시하여 원하는 것을 알 수 있는 검사를 말함. 즉 재료나 제품의 물리적 현상을 이용한 특수방법으로 검사 대상물을 파괴, 분리 또는 손

상을 입히지 않고 결함의 유무와 상태 또는 그것의 성질, 상태, 내부구조 등을 알아내는 모든 검사를 의미

- 3) 측정공구는 버니어 디지털 캘리퍼, 다이얼 캘리퍼, 마이크로미터, 인디게이터, 하이트 게이지, 게이지 블록, 내/외경 파스, 미라클 포인트, 토크렌치, 토크드라이버, 줄자, 직각자/철자, 각도기/분도기 등으로 분류
- 4) 현재 또는 새로운 측정 시스템을 평가하고 하나 또는 그 이상의 측정 시스템 능력을 비교하고 조정이나 수리 후의 측정 시스템을 비교하여 측정오차에 의해 발생하는 변동수준을 파악해서 실제 프로세스 능력을 결정
- 5) 실험용 분석기기의 가장 대표적인 기술 트렌드는 기존의 Stand-alone 제품이 다른 제품과 결합하는 복합 제품화
- 6) 전자 계측기기 가용 주파수 자원의 부족에 따라 고주파 대역에서의 계측이 가능한 제품개발이 필요
- 7) 물성 측정기기
 - 가) 측정 데이터의 효율적 관리와 데이터 처리를 위한 디지털화 제품의 개발과 상용화가 진행
 - 나) 자동차, 항공산업 등 대형 산업에 적용될 경우 측정의 자동화와 공정상의 다른 기계와의 연동을 위한 기술 개발이 진행
 - 다) 측정의 편의성을 높이는 소프트웨어를 탑재한 제품개발이 진행

(3) 범위 및 분류

- 1) (제품 분류 관점) 실험용 분석기기, 전자 계측기기, 물성 측정기기로 분류
 - 가) 실험용 분석기기 : 분자 분석장치, 분리 분석장치, 원소 분석장치 등의 범위이며 물리 또는 화학 분석 용의 기기 기술
 - 나) 전자 계측기기 : Multimeter, Power meter, Frequency counter, Universal counter 등의 범위이며, 오실로스코프, 스펙트럼 분석기와 기타 전기적 양의 측정 또는 검사용 기기 기술
 - 다) 물성 측정기기 : 비파괴 검사 장비와 기계적 특성 측정장치의 범위이며, 재료의 강도, 항장력, 압축성, 탄성 또는 기타 기계적 성질의 시험용 기기 기술

[측정 및 시험기기 제품분류 관점의 범위]

대분야	중분야	세부 기술 및 제품
측정 및 시험기기	실험용 분석기기	분리 분석장치, 분자 분석장치, 원소 분석장치, 물리 또는 화학 분석용 기기
	전자 계측기기	Multimeter, Power meter, Frequency counter, Universal counter, 오실로스코프, 스펙트럼 분석기와 기타 전기적 양의 측정 또는 검사용 기기
	물성 측정기기	비파괴 검사장비, 기계적 특성 장치, 재료의 경도, 항장력, 압축성, 탄성 또는 기타 기계적 성질의 시험용 기기

2) (공급망 관점) 분석 및 측정기기는 IT(IT, IT-BT), NT(NT, IT-NT), BT(BT, NT-BT) 그리고 제어 시스템 및 최적 알고리즘과 융·복합된 시스템으로 구성되며 시스템의 공급망 단계로 분류할 수 있으며 여기에서 제어시스템을 위한 최적 알고리즘이 포함

가) IT-BT 융합 기술의 범위는 생물학적 현상을 전자적으로 해석하거나 생물체가 가진 형태 및 특징을 이용하여 IT 산업에 활용하는 기술. Bioelectronics, Bioinformatics 기술

나) NT-BT 융합 기술의 범위는 나노 스케일로 정의되는 물리, 화학, 생물학적 구조 및 현상을 토대로 새로운 융합 영역을 만들어 내는 기술

다) IT-NT 융합 기술의 범위는 물질을 나노 단위로 처리하여 생기는 새로운 전기적, 자기적, 광학적 특성을 IT 제품에 활용하는 기술

[측정 및 시험기기 공급망 관점의 범위]

대분야	중분야	세부 제품 및 기술	
측정 및 시험기기	IT	IT	컴퓨터(H/W, S/W), 반도체, 유·무선 통신, 정보보호 등
		IT-BT	바이오 인포메틱스, 바이오 전자, 생체 정보 보호, 바이오 컴퓨터 등
	NT	NT	나노 신소재, 나노 구조체, 나노 공정, 정보 저장 등
		IT-NT	나노 센서, 나노 일렉트로닉스, 나노 포토닉스, 양자컴퓨터 등
	BT	BT	유전공학, 바이오 장기, 분자 생물학, 신약 등
		BT-NT	나노 바이오 센서, 인공 조직, 약물 전달, 신생체 물질

2-2. 비파괴검사시장 현황과 전망

(1) 개요

- 1) 국내 측정 및 분석기기의 연도별 장비 구축 현황(2000~2012)을 보면 3천만 원 이상 장비 약 2만대를 구축하였으며, 매년 약 2천대의 장비를 신규 구축(자료: 한국산업기술평가관리원)
- 2) 용도별 장비구축 현황은 분석장비(26%), 시험장비(25%), 가공장비(15%), 계측장비(14%), 교육장비(1%), 기타(19%)
- 3) 분석 및 계측기기의 주요 사용 목적은 연구개발(61.2%), 신제품 개발(18.3%), 제품 납품시 신뢰성 있는 데이터 첨부(11.1%), 공인 시험 성적서 획득(6.2%), 제품별 샘플 제작(7.2%), 기타(1.2%)
- 4) 국내 분석 및 측정기기의 연도별 장비 구축 현황(2000~2012)을 보면 3천만 원 이상 장비 약 2만대를 구축하였으며 매년 약 2천대의 장비를 신규 구축(자료: 한국산업기술평가관리원)

(2) 니즈분석

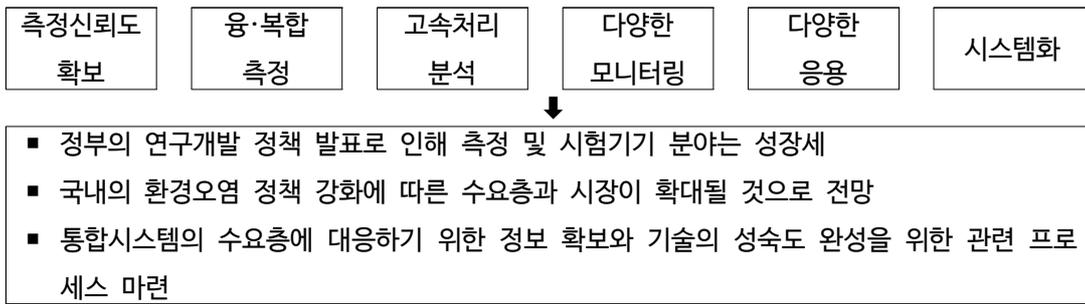
- 1) 민간시장 창출을 위해 수입 제품과의 경쟁(시장 니즈 1) : 저렴한 가격과 신뢰성 높은 기기 요구(초기 구입비용이 저렴한 분석 및 계측기기)
현재 국내 제품 가격과 수입제품 가격의 경쟁력 면에서 국내제품 분석 및 계측기기의 가격이 수입제품보다 적게는 2배, 크게는 4배 정도 저렴하지만 분석 및 계측기기의 신뢰도 문제로 인하여 일반 □ 소비자들의 구매 욕구를 미충족
- 2) 측정 및 시험기기에서 분석항목의 다양화에서 복합 기능화로 요구(시장 니즈 2) : 분석 항목의 다양화 → 복합 기능화 요구
- 3) 기존 단일 분석 항목의 시험기기에서 여러 항목을 분석할 수 있는 시험기기의 개발이 진행(시장 니즈 3) : 고 난이도의 분석 및 측정기술로 사용 편의성 증대
 - 가) 정밀 분석이 요구됨에 따라 분석기기의 사용이 정밀하고 복잡해짐에 따라 분석자의 높은 숙련도와 기술적인 이해가 필요
 - 나) 측정 및 시험기기는 기술자 확보의 어려움과 분석 결과의 균질성을 위하여 분석기기의 사용 편의성 증대가 요구
- 4) 측정 및 시험기기의 고속·연속 측정 자동화가 요구(시장 니즈 4) : 측정 및 시험기기의 수요 증대로 측정·분석 시간의 단축 및 연속 측정

- 5) 분석 대상의 증대와 공정 모니터링 수요의 증대로 분석 시간의 단축과 자동화에 의한 연속 측정 기술이 요구(시장 니즈 5) : 측정 및 시험기기의 접촉방식에서 비접촉 방식의 기술 요구

비접촉식 3차원 정밀 측정 장비인 테오드라이트 측정 시스템(theodolite measurement system) 측정시스템, 사진 측정 시스템 (photogrammetry system) 및 레이저 측정 시스템 (laser scanning system) 등의 사용이 점차 증가하고 있는 추세

[측정 및 시험기기 분야의 PEST 분석]

구분	촉진요인	저해요인
정책	<ul style="list-style-type: none"> ○ 창조경제를 기반으로 하는 R&D 정책 반영 ○ 해외 의존도가 높았던 환경 오염물질 측정장비의 핵심부품을 국산화하기 위한 사업단이 출범하여 환경계측장비 핵심부품의 국산화율을 높이고 수출형 제품을 개발하기 위해 발족 ○ 다중이용시설 또는 민감계층 이용시설의 소유자 등은 실내공기질 측정기기를 부착·운영하고 운영·관리 기준 준수 필요 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 중소기업의 투자 관심도 부족 ○ 환경관련 측정 및 시험기기 규제완화 ○ 기관의 공동 측정 및 시험장비 활용 방안
경제	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개방형 혁신, 융합, 창조 경제를 바탕으로 측정 시험기기 시장의 활성화 예상 ○ 환경오염 측정기기의 부착 의무화 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 세계적 경기 침체에 따라 기술개발 투자 감축 ○ 다양한 제품 분야에서의 중소기업과 대기업의 협력을 통한 국내 자체 기술 개발이 요구
사회	<ul style="list-style-type: none"> ○ 공인기관의 검증된 측정 및 시험기기 사용 의무화 ○ 측정 및 시험기기 분야 중 정책 이슈를 사전에 발굴하여 정책 주도권 확보 ○ 기술개발 관련한 측정 및 시험기기 도입은 국가의 주요 성장 동력 산업 ○ 사회적 안전 요소의 중요성을 인식하여 측정 및 시험기기의 중요성 인식 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 중소기업의 진출이 용이한 전략제품으로 관련분야 육성 및 제품화 전략이 필요
기술	<ul style="list-style-type: none"> ○ 첨단기술의 개발과 관련한 측정 및 시험기기 투자 연구개발 세제 혜택 ○ 신기술 전략인 IT, BT, NT의 상호 융합화 필요 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 측정 및 시험기기의 높은 수입 의존도 ○ 측정 및 시험기기의 고속측정, 융합측정, 신뢰도 확보의 한계



(3) 산업특징 및 구조

- 1) 산업 기술별 측정 및 시험기기에 대한 투자는 특정 산업 기술 분야(기계·소재, 전기·전자, 환경)에 집중(약 50%) 투입되는 경향을 보이며, 일부 용도에서 지속적인 증가 양상
- 2) 측정 및 시험기기의 관련 산업은 국가간·기업간 경쟁이 치열한 분야로 아직까지 정부 정책의 의존성이 높은 사업이며 세계 각국 정부의 R&D 및 지적 재산권 확보 정책에 따라 시장이 빠르게 증가
- 3) 측정 및 시험기기는 R&D와 기술 개발 측면에서 시장이 형성되며 주로 중소기업 혹은 외국기업의 한국지사 등과 밀접하게 관련
- 4) 측정 및 분석 항목의 다양화, 분석 수요 증대, 분석의 어려움, 고가의 장비로 인하여 분석 기기의 복합 기능화, 분석의 고속화, 사용 편의성 증대, 저비용화의 수요를 도출
- 5) 측정 및 시험기기의 시장규모
 - 가) 세계시장의 경우 연평균 성장률이 5% 미만이지만 지속적인 수요가 있을 것으로 전망됨. 국내의 경우 시험 및 분석기기의 중요성을 인식
 - 나) 국내 시장규모가 소규모이므로, 대부분의 필요한 측정 및 시험 분석기기는 수입에 의존
- 6) 측정 및 분석 시험기기의 경쟁력
 - 가) 세계적인 유통망을 지닌 대기업이 시장을 장악하고 있으며, 지역적으로는 전문기업이 지역의 사용자에게 적합한 제품으로 대기업과 경쟁
 - 나) 국내에서는 일부중소기업이 시장에 참여하고 있으나 영세한 업체가 대부분으로 수입 제품과 경쟁 중
- 7) 측정 및 분석기기의 기술력
 - 가) 기술측면에서 볼 때 측정과 분석능력 향상 및 분석 자동화, 디지털화, 소량 경량화 연구가 진행

[측정 및 시험기기 분야의 연관 산업 구조]

후방산업	측정 및 시험기기	전방산업
IT, BT, NT 산업 나노 산업	실험실용 측정 분석기기 전자 계측기기 물성 측정 시험기기	PC·방송·통신 산업 정보 산업 바이오 산업, 화학, 금속, 1차산업, 2차산업

[측정 및 시험기기 분야의 SWOT분석]

강점(Strength)	약점(Weakness)
<ul style="list-style-type: none"> ○ 반도체 및 IT 기술 대국 ○ 세계 최고의 디스플레이·모바일 기기 기술력 ○ 삼성, LG 등 반도체 브랜드를 이용한 해외 국가 인지도 상승 ○ 국가 R&D 정책과 창조 경제를 기반으로 한 지식재산권 확보 지원 신재생에너지원 소재, 제조공정 및 설계 기반기술 확보 ○ 질적으로 우수한 연구인력 및 연구 성과 증가 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 측정 및 시험기기의 원천기술 및 관련 기술 부족 ○ 해외 대형 회사의 국내 법인 또는 수입 대리점의 경쟁 ○ 선진국의 기술 우위와 중국의 저가 공세 ○ 중소기업 위주의 산업 자생력 부족 ○ 업체별 차별화된 제품개발, 공급망 확보 및 마케팅 전략 미비로 인한 시장 지출의 어려움 존재 ○ 중소기업의 전문기술인력 부족 및 기술개발 정보 부족
기회요인(Opportunity)	위협요인(Threat)
<ul style="list-style-type: none"> ○ 반도체 및 모바일 기술과 연계한 시장 확보 ○ 전 세계의 지식재산권 확보 경쟁 ○ 정부적 차원에서 기술력 강화를 위한 중소·중견기업 주도의 기술개발 및 국산화 지원 ○ 안전 관련 측정 및 시험기기의 중요성과 산업 분야의 관심 증대 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선진국 기업들의 시장선점에 의한 높은 진입장벽 존재 ○ 대만과 중국의 협력에 의한 추격 심화 ○ 원천특허 무기화 및 특허마찰 심화 ○ 자국 산업 보호 및 육성을 통한 해외 국가의 적극적인 자국 업체 지원책 추진 정부 정책에 부합된 대기업의 기술개발 및 홍보 전략에 의한 중소기업 소외 위험 ○ 중소기업의 제품 공급망 및 시장 판로의 비용증가로 인한 제품 가격 경쟁력 약화 ○ 기술개발시, 외국산업의 대규모 물량 유입에 의한 시장 보호막 부재 ○ 중소기업 기술력 및 인력 유출이 위협요인으로 작용 ○ 신기술, 신공법의 안정성 검증단계의 다양한 위협요인 존재

(4) 시장현황 및 전망 분석

- 1) 실험실용 측정 및 분석기기 시장의 경우, 연평균 5.1%의 성장이 예상되며, 바이오, 환경, 화학산업에서 시장이 성장할 것으로 예상됨. 또한, 분리 분석기기류(HPLC, GC 등)의 시장이 상대적으로 크게 증가할 것으로 예상
- 2) 전자 측정기기 시장의 경우, 연평균 2%의 성장으로 비교적 정체되어 있었으나 유·무선 통신 및 이동통신에 대한 수요 증대가 예상되어 향후 3.6% 이상의 성장을 나타낼 것으로 예상
- 3) 물성 측정기기 시장의 경우 연평균 5.2% 이상의 성장이 예측되며, 제품 품질관리와 국제 품질규격 강화가 성장 요인으로 작용할 것으로 예상
- 4) 정책 및 사회적 여건으로 인해 측정 및 시험기기 분야의 시장이 증가함에 따라 이와 관련된 기업들의 매출이 전반적으로 증가할 것으로 보이나, 제품화 및 판매망을 선점한 기업에 유리한 시장 형성이 예상
- 5) 산업통상자원부가 지원한 산업기술개발장비 및 연구장비의 활용실적을 조사하고 현장 실태조사를 통해 활용실태를 파악하여 유휴장비를 재배치하여 장비의 활용도를 높이는 계획을 추진 중(2015.12.16.)
- 6) 특히 공동활용장비를 보유한 대학, 정부출연연구소, 전문생산기술연구소, 테크노파크, 지역특화센터, 협회, 조합, 기업 등의 일제 조사를 통해 중복투자 방지제도를 감안하면 투자가 감소할 것으로 예상
- 7) 측정 및 시험기기 분야에서 중소기업이 진입할 수 있는 부분은 하드웨어 구축, 소프트웨어 구축 및 진단기술 분야로의 진입이 수월할 것으로 예상됨. 산업체 및 연구소의 기술개발의 지속적인 성장에 발맞추어 중소기업의 세계시장의 참여가 가능하도록 정부의 중소기업 기술개발의 지원이 요구됨. 시스템 통합제어부분의 상품화 및 측정 시험기기의 신뢰도 확보를 위한 전략 수립이 필요

[측정 및 시험기기 시장 현황 및 전망]

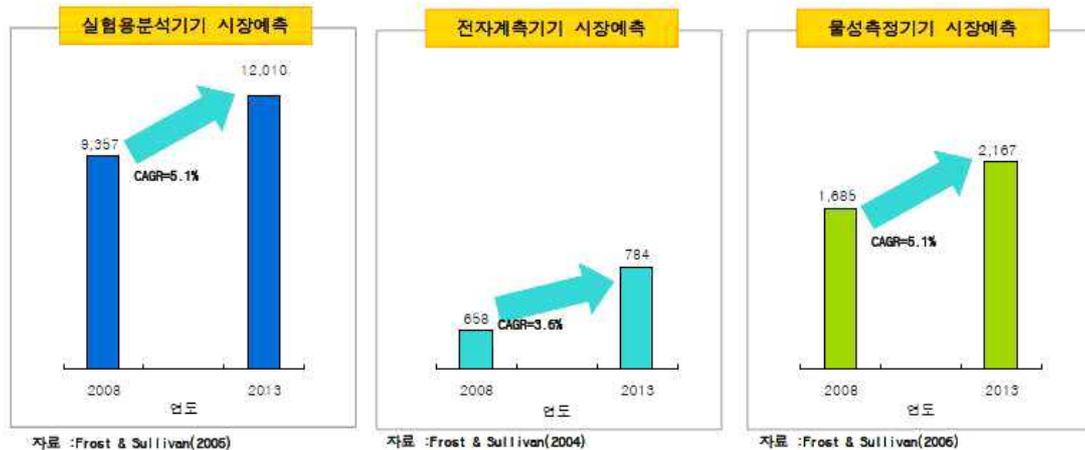
(단위: 억원/백만달러)

구분		시장규모						성장률(%) (2012~2017)
		2013	2014	2015	2016	2017	2018	
국내 시장	실험용 측정시험기기	9,729	8,347	12,598	12,975	13,364	13,764	5.1%
	전자 측정기기	2,859	2,333	3,521	3,626	3,735	3,847	3.5%
	물성 측정기기	6,823	5,570	8,407	8,659	8,918	9,186	5.1%
세계 시장	실험용 측정시험기기	9,729	10,225	10,747	11,295	11,871	12,475	5.1%
	전자 측정기기	2,859	2,962	3,069	3,179	3,294	3412	3.6%
	물성 측정기기	6,823	7,171	7,537	7,921	8,325	8,750	5.1%

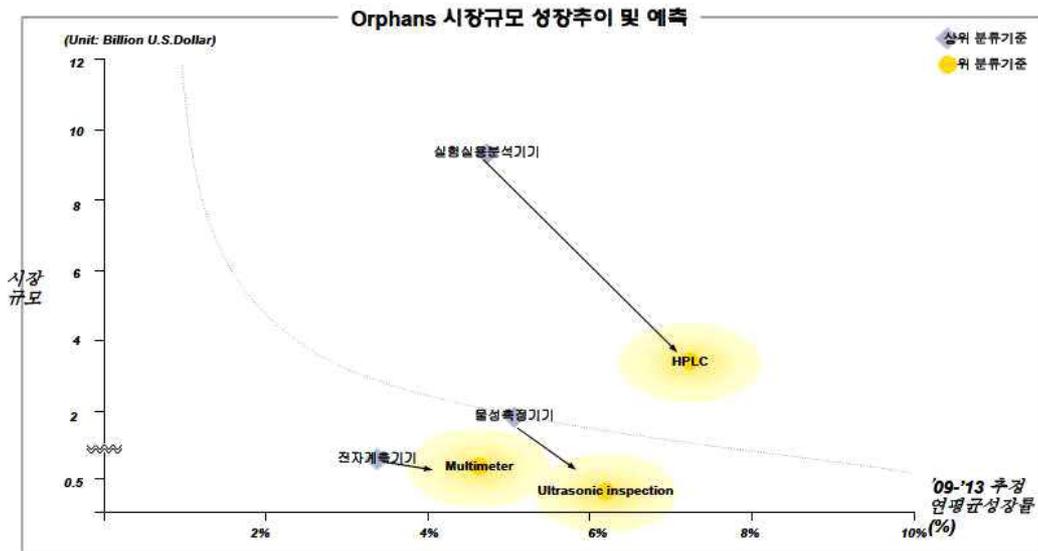
※ 자료 : 한국과학기술기산업협회(2012.8.12.), 한국산업기술평가관리원(2013.11.21.), 산업통산자원부 산업 R&D 장비투자현황(2015.12.16.)

□ 참조 1 : 2017년 추정치는 성장률을 기준으로 기술하였음.

□ 참조 2 : 2012년 국내시장은 억 원 세계시장은 백만 달러를 적용



[측정 및 시험기기 품목별 시장 전망]



(5) 공급망(분류)에 따른 분석

측정 및 시험기기는 실험용 분석기기, 전자 계측기기, 물성 측정기기 등으로 공급망이 이루어지며 대기업과 중소기업이 존재하는 분야임.

1) 해외업체 및 제품 현황

가) 실험실용 측정 시험 분석기기

- 전세계 130여 개의 기업이 참여하고 있으며, 시장에서의 경쟁강도는 강한 수준
- 전세계적으로 생산 및 판매에 참여하는 주요기업은 PerkinElmer, Varian, Thermo Electron, Agilent, Waters 및 Shimadzu 등이 있으며, 또한 아이템마다 전문기업들이 시장에 참여하여 경쟁
- 단일 품목으로 비중이 큰 것은 HPLC로 관련 회사는 20여 개에 이르며, 그 중 Waters가 전세계 시장의 27%, Agilent 19%, Shimadzu 18%로 상위 3사가 64% 시장을 점유

나) 전자 측정 및 시험기기

- 전세계 30여 개의 주요업체가 활동하고 있으며, 시장의 경쟁강도는 강한 수준
- 글로벌 대기업으로는 Fluke, Agilent, Anritus, Racal Instruments, Rohde & Schwarz, Tektronix 등이 있으며, 각 아이템 또는 지역마다 전문기업이 시장에 참여
- 이들은 물질 및 가격에서의 경쟁 뿐만 아니라 공급망 확보, 소비자 지원(교육, A/S) 면에서도 경쟁

- 단일 품목으로 가장 비중이 큰 것은 Multimeter로서 이 분야에서는 Agilent가 전 세계의 46%를 차지하고 있으며, 이후 Rohde & Schwarz 11%, Anritsu 8%의 시장을 차지
 - 다) 물성 측정기기
 - 전세계 200여 개 업체가 각각의 아이템에서 치열한 경쟁
 - 글로벌 대기업으로는 비파괴검사기 분야에는 Foerster, GE, Gould-Bass, Olympus 등이 있으며, 기계적 특성 측정장치에는 Instron, MTS, Zwick, Shimadzu 등이 참여하고 있으며, 지역별로는 현지 전문업체들과 경쟁
 - 품질 가격 이외에도 소비자의 니즈 파악은 물론 컨설팅을 실시하는 등 소비자에 밀착된 경쟁 전략을 사용
- 2) 국내업체 및 제품 현황
- 가) 산업통상자원부 R&D 장비투자 현황(2015.12.16.)을 보면 R&D 예산 대비 장비 투자비율은 10.6%
 - 나) 국내시장은 중소기업 위주의 국내기업과 해외 대형 회사의 국내 법인 또는 수입 대리점이 경쟁을 벌이고 있는 상황이지만, 대기업이나 연구소 등 고정밀 제품을 요하는 고가제품 시장은 해외 제품이 대부분을 차지
 - 다) 국내 실험실용 분석기기 제조업체로는 GC, HPLC, AAS, ICP-MS 등을 생산하는 영림기기와 UV-Vis 분광기를 생산하는 메카시스, 신코 등이 있으며, 한국 퍼킨엘머, 동일 시마츠 등 외국 주요기업의 국내 법인과 수입 대리점과 경쟁
 - 라) 전자 계측기기 제조업체는 이지디지털, 이디, 지에스 인스트루먼트, 믹스윈 퓨처 등이 있으나, 매출규모가 100억 미만으로 국내 업체의 시장 점유율은 10% 미만
 - 마) 물성 측정기기 제조업체로는 서울 베스텍, 경도 케이디피, 경진 계측기 등이 기계적 특성장치 등을 생산·판매하고 있으며, 경도양행, 동명엔지니어링 등이 비파괴 검사 장비를 판매하고 있지만, 최근에는 대만 및 중국 제품과도 경쟁
 - 바) 측정 및 시험기기 산업은 연구 기술개발과 밀접한 관계가 있으므로 시장규모가 급속도로 증가함. 이에 따라, 중국, 독일, 미국 등 해외 주요기업이 세계시장에 진출하여 규모를 확장하고 있으며, 국내시장은 대기업과 일부 기술력을 확보한 중소기업이 시장 확보를 위한 경쟁 구도를 형성하고 있음. 대다수 중소기업의 경우 기술력 및 공급망 부족으로 인해 일부 기술개발 단계에 참여하고 있는 수준
 - 사) 최근 국내 분석 및 측정기기 시장은 서로 다른 업체에서 각각 생산하고 있어 신뢰성 및 가격 경쟁력 확보에 난항
 - 아) 중소기업의 기술력 및 시장확보를 위해서는 시스템 구축에 참여할 수 있는 기술개발, 제품화 및 상용화, 공급망 및 판매망 확보를 위한 체계적 전략 수립이 요구

[공급망 종합 분석]

공급망 단계 주요내용	측정 및 시험기기	
	일반 분석 및 측정기기	고정밀 분석 및 측정기기
주요 제품/기술	물리·화학 분석용 기기, 오실로스 코프, 스펙트럼 분석기, 전기적 양 의 측정, 검사용 기기, 재료의 경 도, 항장력, 압축성, 합성 또는 기 계적 성질의 시험기기	물리·화학 분석용 기기, 오실로스 코프, 스펙트럼 분석기, 전기적 양 의 측정, 검사용 기기, 재료의 경 도, 항장력, 압축성, 합성 또는 기 계적 성질의 시험기기
해외기업	PerkinElner, Varian, Thermo Electron, Agilent, Waters, Shimadzu, Fluke, Anritus, Racal Instruments, Rohde & Schwarz, Tektronix Foerster, GE, Gould-Bass, Olympus, Instron, MTS, Zwick	PerkinElner, Varian, Thermo Electron, Agilent, Waters, Shimadzu, Fluke, Anritus, Racal Instruments, Rohde & Schwarz, Tektronix Foerster, GE, Gould-Bass, Olympus, Instron, MTS, Zwick
국내기업	영림기기, 메카시스, 신코, 한국 퍼 킨엘머, 동일 시마츠, 이지 디지털, 이디, 지에스 인스트로먼트, 경도 케이디피, 경진 계측기, 경도 양행, 동명엔지니어링 등	
중소기업 참여정도	◐	○
중소기업 시장점유정도	◑	○

※ 참여정도는 주요제품 시장에 참여하는 중소기업의 참여규모와 정도(업체수, 비율 등)을 고려하여 5단계로 구분 (낮은 단계: ○, 중간 단계(◐, ◑, ◒), 높은 단계: ◓)

3. 기술개발 성과의 시장적용 및 응용분야 분석

3-1. 시장적용 분석

- (1) 본 개발기술은 비파괴 바이오 센싱 기술을 기반으로 이병종자를 현장에서 신속하게 전수 검사하는 다차원 복합 초분광 시스템으로서, 현재 종자 검사에 주로 활용되고 있는 이화학 및 미생물학적 분석기술을 대체할 수 있는 비파괴검사 기술임.
- (2) 종자 관련 시장은 꾸준히 성장하고 이익률이 높은 분야이지만 품질관리 리스크와 종자 교역 증가로 인한 병원체의 이동 및 신규 유입 가능성이 높은 분야임.
- (3) 품질관리 및 종자 검역을 위한 종자검사기술은 이화학적 방법과 미생물학적 방법 등이 활용되고 있지만 비용과 시간이 많이 소요되고 비파괴·신속·전수검사가 불가능해 현재의 종자검사는 파괴·사후·샘플검사 방식으로 진행되어 새로운 기술에 대한 수요가 높게 형성되어 있음.
- (4) 따라서, 본 개발기술은 현재의 기술수준을 극복할 수 있는 새로운 대안기술로서 사업화 가능성이 매우 높다고 볼 수 있고, 타겟을 구체화하여 사업화 가능성을 극대화시키는 방향으로 기술사업화 전략을 수립하는 것이 중요함.

3-2. 응용시장 분석

- (1) 본 기술은 현재 토마토, 수박 종자 등의 바이러스병 감염여부를 확인하는 사전·신속·전수 비파괴검사기술로서, 재식용종자 적용범위를 확대하고 대상 바이러스의 종류 및 대상 병원체(곰팡이, 세균 등)도 지속적으로 확대해 나갈 수 있음. 이 과정에서 획득한 정보를 DB로 구축하여 빅데이터 기술로서 활용할 수 있음.
- (2) 기술 확대 적용을 위해서는 추가 기술개발 및 시장 및 경쟁기술 조사 등 사전분석을 선행하는 것이 중요함.

III. 개발기술의 기술사업화 계획



1. 개발기술의 차별화
2. 기술사업화 로드맵(TBRM) 및 기술사업화 전략

1. 개발기술의 차별화

1-1. 종자검사(검정)기술 비교

구분	기존 기술		신규 개발 기술
	물리적 기술	생물·화학적 기술	비파괴 바이오 센싱(분광학적) 기술
원리 및 내용	·비중, 모양, 크기 등 물리적 특성을 이용한 검사	·이병종자 검정 : 특정 병원체 유전자 Marker확인, 배지 등에서 발아 후 병원체 검사	·복합분광분석기술 ·물리·화학적 변화 동시 측정 ·감염종자 및 종자 품질 동시 검사 ·조작 단순화 및 자동화 가능
검사대상	물리적 특성	화학적·생물학적 특성	물리·화학·생물학적 특성
이병종자 검사	극히 일부 가능	가능	가능
다중검사	불가능	불가능	가능
전수검사	불가능	불가능	가능
IT 연계 및 자동화	불가능	불가능	가능
정확도	저정확도	고정확도	고정확도
실시간(신속) 검사	불가능	불가능	가능
특징	·이병종자 판별 한계 ·기초적 품질측정기술 ·신속검사 및 전수검사 불가능 ·생산 및 검역 이후 결과 확인(사후검사)	·파괴검사 ·검사 기간 길고 고급 인력 필요(고비용) ·신속검사 및 전수검사 불가능 ·생산 및 검역 이후 결과 확인(사후검사)	·비파괴검사 ·전수검사 가능 ·On-site 현장 전수검사(사전 검사) ·IT융합을 통한 DB 구축 및 확대

1-2. 주요 핵심기술 및 차별화 전략

(1) 핵심기술

- 1) 본 기술은 단파적외선(Short Wave Infra-Red, SWIR) 및 라만분광기술에 공간 정보를 융합한 복합 초분광 영상분석기술을 활용하여 기존의 1차원적인 분광정보로는 분석이 어려웠던 종자 내 유해 미생물(병원체) 함유 여부를 신속·정확하게 비파괴 검사할 수 있는 현장 적용형 이병종자 검사(검역) 기술로서 이화학 및 미생물학적 분석 기술을 대체할 수 있는 종자의 현장형 비파괴 신속·전수·사전분석 기술임.
- 2) 본 기술은 바이러스 감염 종자 신속전수검사 기반 기술, 이병종자 신속전수검사를 위한 복합 초분광 영상시스템, 신속·전수검사 모델링 기술, 이병종자 신속전수검사용 컨베이어형 고속 자동 선별 시스템, 이병종자 비파괴 범용 선별모델 적용 소프트웨어 기술 등의 요소기술로 구성된 융복합 기술임.

(2) 차별화 전략

- 1) 본 기술은 바이오 센싱 기반의 비파괴 검사기술로 기존 종자검사기술과 달리 적용성과 경제성이 향상된 다차원 복합 초분광 종자검사기술임.
 - 가) On-site 신속검사기술로서 현장에서 즉시 결과를 확인할 수 있음.
 - 나) 전수검사기술로서 결과의 신뢰성을 극대화할 수 있음.
 - 다) 비파괴검사기술로서 검사 후 종자를 그대로 이용할 수 있음.
 - 라) 종자 생산라인에서의 사전 검사가 가능하여 품질관리 효율화 및 비용 절감 효과를 향상시킬 수 있음.
 - 마) 기존 검사기술과 유사한 정확도를 유지해 기존 기술의 안정적 대체가 가능함.
 - 바) 비용 대비 효용성이 높아 경제성을 향상시키고 종자 검역·생산·관리비용을 절감할 수 있음.
 - 사) 이병종자 및 퇴화종자의 동시 검정이 가능해 병원체 전파 차단 및 재고관리 효율화를 추구할 수 있음.
 - 아) 플랫폼 기술로서 DB 확대 및 추가 개발을 통해 모든 종자 및 병원체로 확대 적용할 수 있음.

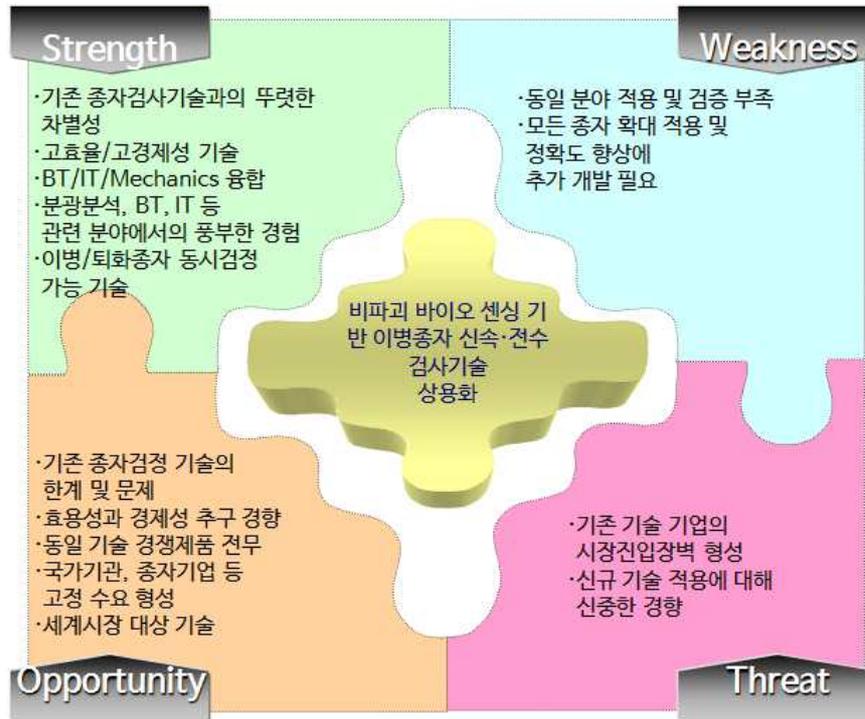


2. 기술사업화 로드맵(TBRM) 및 기술사업화 전략

2-1 시장 니즈 분석



2-2 SWOT 분석



2-3 비즈니스 모델 분석(Nine Blocks)

주요 파트너	핵심활동	제공가치	고객관계관리	고객세분화 및 목표고객
<ol style="list-style-type: none"> 1. 종자 생산기업 <ul style="list-style-type: none"> - 국내 종자기업 (주요 10여개) - 해외 종자기업 (주요 10개) 2. 종자 검역기관 <ul style="list-style-type: none"> - 농림축사검역본부 (본부 및 5개 지역검역소) - 해외 검역기관 3. 종자 보급·관리기관 <ul style="list-style-type: none"> - 국립종자원 및 자원 (8개소), 농업기술원 원종장 (8개소), 농업기술센터 (155개소) - 해외 종자 보급·관리기관 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 기술/제품 마케팅 2. 기술개발 3. 기술 표준화 4. A/S <p>핵심역량 및 자원</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 우수한 기술 및 연구자원 2. 핵심기술에 대한 특허 보유 3. 기술적 차별화 4. 기술응용능력 5. 풍부한 경험 및 시장이해력 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 종자검사에서의 편의성 및 경제성 향상 <ul style="list-style-type: none"> - 비파괴바이오 센싱 기술 도입 - 신속검사 - 전수검사 2. 적용분야확대를 통한 새로운 가치 및 사업기회 제공 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 기술/제품 적용에 대한 지속적인 모니터링 및 A/S 2. 제품 업그레이드 및 데이터 업데이트 등을 통한 제품성능 향상 <p>유통채널 및 접근전략</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 종자생산기업 및 관련기관과의 전략적 파트너십 2. 박람회/전시회 참가를 통한 새로운 수요처 발굴 3. 인적네트워크 활용 4. 홍보매체 활용 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 고객 세분화 <ul style="list-style-type: none"> - 종자 생산기업 - 종자 검역기관 - 종자 보급·관리기관 2. 목표고객 <ul style="list-style-type: none"> - 국내·외 주요 재식용 종자 생산기업 - 검역본부 - 종자원, 농업기술원, 농업 기술센터
<p>비용구조</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 추가 R&D 비용 2. 생산시설 구축비용 (대지, 설비) 3. 운영비, 유통망, A/S 체계 구축비용 <p>* 비용조달: 기업의 가용 자금, 기업 출자자, VC 투자 유치, 추가 정부과제 등</p>	<p>매출 (수익) 구조</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 제품 상용화에 따른 판매수익 2. 기술라이선싱에 따른 기술료 3. 상장을 통한 주식가치 향상 			

2-4 기술사업화 로드맵(TBRM)

구분	1단계(~2019년)	2단계(~2021년)	3단계(~2026년)
보유 기술	기술 플랫폼	다차원비파괴 복합 초분광 종자검정 시스템	
	개발기술	센싱 기술 다변화, 적용종자 및 대상 병원체 확대 종자검정 시스템	
	융합기술 플랫폼	모델링 보정 및 기본 DB 구축	센싱부 다변화, DB 업데이트를 통한 빅데이터 활용기술
시장 및 환경	기본 종자검사(검정)기술의 한계 노출	신속검사, 전수검사 및 비파괴 검사 기술 적용을 통한 한계 극복	
	효율성 및 경제성 추구	정확도 향상을 통한 품질문제 최소화·병원체 유입 차단 및 추가 피해 예방	
	다기능 복합 검사 니즈 증가	이병종자 및 퇴화종자 동시 검사(검정)	
	종자 관련 시장의 확대	종자 생산 및 교역량 증가로 인한 신규 기술 적용 필요성 확대	
시장 진입 전략	<ul style="list-style-type: none"> 국내 종자 생산기업을 중심으로 한 기술(제품) 적용 및 안정적 시장 진입 	<ul style="list-style-type: none"> 글로벌 마케팅을 통한 해외 종자 생산기업으로의 기술(제품) 확대 적용 추가 기술개발 및 DB 확대 	<ul style="list-style-type: none"> 국내·외 종자 검역기관 및 보급기관으로의 확대 적용 연관 기술 개발 및 융복합화
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 국내 종자기업을 대상으로 품질관리 기술(제품)로 초기 적용 ✓ 기술(제품) 안정화 ✓ 기술보완 및 해외시장 진출 전략 수립 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 해외주요 종자 생산기업으로의 기술(제품) 적용 확대 ✓ 기술 표준화 ✓ 적용 대상 종자, 병원체 및 DB 확대 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 국내·외 종자 검역기관 및 보급기관으로의 확대 적용 ✓ IT, NT, 바이오 센싱 기술 접목을 통한 연관 기술(제품) 개발

2-5 기술사업화 추진전략

(1) 주요 추진전략



(2) 기업 추진전략



사업화 계획



(3) 분야별 실행전략

기술 차별화	<ul style="list-style-type: none"> • 종자의 비파괴·신속·전수·사전 검사가 가능한 다차원 복합 초분광 분석기술 • 이병종자 검사 및 자동선별 이외에 추가적으로 퇴화종자 검사가 가능한 다기능 자동화 시스템 • 저비용 고효율 종자검사를 위한 플랫폼 기술로서 모든 종자로의 확대 적용 가능
신뢰성 확보	<ul style="list-style-type: none"> • 개발결과의 특허 획득을 통한 사업화 기반 구축 및 국내·외 시장 개척 초석 확보 • 기술보완 및 후속·관련 기술 개발을 통한 기술 업그레이드 • 국내 신기술(NET) 인증 및 국제 표준화 추진
마케팅 전략	<ul style="list-style-type: none"> • 특허기술로서 기술성과 경제성을 바탕으로 종자 생산(품질관리) 분야에서 종자 검역·보급 분야로 확대 • 국내 적용 실적을 바탕으로 해외시장 개척을 위해 주요 종자 생산기업, 미국, 중국 등 주요 국가 검역기관, 종자관리·보급기관 등을 대상으로 집중 마케팅
제품생산 전략	<ul style="list-style-type: none"> • 개발 후 사업화 초기에는 전략적 제휴기업을 통한 입가공 또는 OEM(주문자상표부착방식) 방식으로 양산체계 구축 • 향후 제품의 마케팅 및 판매추이에 따라 투자계획, 자체 생산체계 구축 여부 등 중장기 전략 수립

2-6 사업화성과 및 매출실적(계획)

(1) 사업화 성과

항목	세부항목			성과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발 후 현재까지	-
			향후 3년간 매출	5억 원
		관련제품	개발 후 현재까지	-
			향후 3년간 매출	-
	시장 점유율	개발제품	개발 후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 0.8% 국외 : 0%
		관련제품	개발 후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 0% 국외 : 0%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		30위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		15위

(2) 사업화 계획 및 매출실적(계획)

항목	세부항목	성과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	기술개발 1년 후 사업화 (기술수명주기 : 25년)			
	소요예산(백만원)	6,800 (기술개발 후 10년간)			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		-	8	65	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	0.8	3
국외		-	< 0.1	0.5	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	·적용 종자 확대 모델(재식용종자 및 곡물종자로 확대) ·검사 대상 병원체 확대 모델(바이러스, 곰팡이 등) ·검사 DB 확대 및 빅데이터 활용 S/W 기술 확대 모델			
무역수지 개선효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	-	-	
	수 출	-	3	50	

판매처		국가명	판매 단가 (억원)	예상 연간 평균 판매량 (대)	예상 판매기간 (년)	예상 총매출액 (억원)	관련 제품
국내	종자검역· 관리기관	대한민국	1.5	1	20	30	종자 검사용 다차원 복합 초 분광 분석시스템
	종자 생산기업	대한민국	1	1	20	20	종자 검사용 다차원 복합 초 분광 분석시스템
해외	종자검역· 관리기관	미국, 중 국, EU, 인도, 브 라질 등	4	3	25	300	종자 검사용 다차원 복합 초 분광 분석시스템
	종자 생산기업	미국, 일 본, 프랑 스, 스위 스, 덴마 크 등	3	2	20	120	종자 검사용 다차원 복합 초 분광 분석시스템
합계						470	

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.