



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학박사학위논문

분광법을 이용한 무정란의 부화 중
조기 검출과 저장 중 신선도
측정 기술 개발

Early Detection of Infertile Egg during
Incubation and Determination of Freshness
during Storage using Spectroscopy

2017년 8월

서울대학교 대학원

바이오시스템 · 소재학부 바이오시스템공학전공

김 학 성

분광법을 이용한 무정란의 부화 중 조기 검출과 저장 중 신선도 측정 기술 개발

Early Detection of Infertile Egg during Incubation and
Determination of Freshness during Storage using

Spectroscopy

지도교수 김 용 노

이 논문을 공학박사 학위논문으로 제출함

2017년 5월

서울대학교 대학원

바이오시스템·소재학부 바이오시스템공학전공

김 학 성

김학성의 박사 학위논문을 인준함

2017년 7월

위 원 장 _____ 인

부위원장 _____ 인

위 원 _____ 인

위 원 _____ 인

위 원 _____ 인

국문 초록

부화장에서 정상적인 부화 여부를 판별하기 위한 1차 검란은 일반적으로 5일~7일 이후에 인력에 의해 수행되며, 무정란과 배아가 발생하지 않은 알들은 모두 폐기 처분된다. 미발생란을 보다 더 빠른 시간(3일 이내) 안에 자동 검출할 경우 부화에 소요되는 인력 및 에너지의 감소 효과와 무정란을 다른 용도로 활용할 수 있음을 기대할 수 있다. 본 연구는 기존의 과실을 비롯한 농산물 비파괴 품질 판별에 적용되고 있는 분광분석법과 의료 진단에 사용되는 MRI 기술을 이용하여 무정란(배반의 미발생란 포함)의 조기 판별 기술을 개발하고 나아가서 분광분석법을 이용하여 무정란의 신선도 측정 기술을 개발하는데 목적이 있으며 연구 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 부화 중인 계란을 대상으로 투과 스펙트럼을 측정하기 위해 청색 LED와 녹색 LED로 구성되는 가시광 대역 광원 장치와(광원A) 할로젠램프를 추가한 가시 및 근적외선 대역의 광원 장치(광원B)를 구성하고, 산란계인 하이라인 브라운종의 갈색란을 대상으로 측정한 투과 스펙트럼을 이용하여 유·무정란 판별을 위한 PLS-DA 모델을 개발하였다. 개발된 PLS-DA 판별 모델에서 가시광 영역(440~800nm)의 경우에는 부화 40시간부터, 가시/근적외선(440~950nm) 영역의 경우에는 부화 22시간부터 유·무정란 판별율이 90% 정도로 나타났으며 시간이 지날수록 판별율이 약간 증가하고 모델의 안정성이 향상되었다. 결과적으로 부화 56시간 정도에서 판별율이 92% 이상 되는 것으로 판명되었다. 이와 같은 조기 판별 결과는 광원 장치에서 450nm 대역의 청색 광원을 강화하고, 본 연구에서 개발한 원시 스펙트럼을 이용한 정규화 전처리와 관계가 깊은 것으로 생각된다.

2. 1.0T MRI 장비를 이용하여 TR=14ms, TE=4ms, Flip angle=20°으로 설정하고 축 방향의 64개 슬라이스 영상을 측정하였다. 부화 중 노른자 형상의 변화를 정량화하기 위해 노른자의 윤곽선 추출 및 추출한 영상의 중심(centroid), 원형도, 장단축 비 등을 분석할 수 있는 영상 처리 알고리즘을 개발하였다. 계란 중앙 부위 슬라이스의 평균 영상 정보를 이용하여 노른자의 원형도와 장단축 비 등의 형상 지수를 구하고, 유·무정란을 판별한 결과 판별율은 부화 72시간에서 각각 98.3% 및 95%를 나타내었다.

3. MR 영상 분석에서 구한 노른자의 장단축 비와 가시/근적외선 영역에서 얻은 스펙트럼을 PLSR을 이용하여 예측한 결과 R^2 와 SEP가 각각 0.46132, 0.11634이었다. MR 영상을 이용한 형상 지수 분석 결과와 연계하여 유·무정란 판별을 위한 PLSR 모델 개발에 있어 추가적인 연구는 모델의 성능 향상을 위해 필요할 것으로 판단된다.

4. 무정란의 신선도(호우유닛, HU)를 예측하기 위해 가시/근적외선 광원 장치를 구성하고, 갈색란과 백색란을 대상으로 투과 스펙트럼을 측정하여 PLSR 모델을 개발하였다. 갈색란에서 HU 예측 결과는 $R^2=0.72132$, SEP=8.84, bias=0.11729, 오차 13.63%이었으며, 백색란의 경우 $R^2=0.92162$, SEP=5.27, bias=0.26917, 오차=8.70%이었다.

주요어 : 부화, 근적외 분광분석법, 자기공명영상, 무정란, 신선도

학 번 : 2003-30371

목 차

I. 서론	1
II. 연구사	4
2.1. 계란의 구조 및 생성 과정	4
2.2. 유정란과 부화 과정	7
2.3. 계란의 현행 선별 기술	9
2.4. 가시/근적외선 분광법을 이용한 내부 판별	10
2.4.1. 유정란·혈란 판별	10
2.4.2. 신선도 판별	10
2.5. 자기공명영상(MRI)기술을 이용한 내부 판별	12
2.6. 기타 기술을 이용한 내부 판별	14
III. 가시/근적외선 분광법을 이용한 무정란 조기 검출	15
3.1. 서언	15
3.2. 이론적 배경	17
3.2.1. 가시/근적외선의 흡수 원리 및 특징	17
3.2.2. 가시/근적외선의 흡광도 측정	18
3.2.3. 스펙트럼의 전처리	19
3.2.4. 분광분석 예측 모델 개발과 성능 평가	22
3.3. 재료 및 방법	25
3.3.1. 광원의 선택	25
3.3.2. 공시 재료 및 실험 장치	30
3.3.3. 투과 스펙트럼 측정 및 분석	32

3.3.4. 유·무정란의 판별	34
3.4. 결과 및 고찰	35
3.4.1. 부화 시간에 따른 스펙트럼의 변화	35
3.4.2. 부화 시간에 따른 상관계수의 변화	42
3.4.3. 유·무정란의 판별	46
3.5. 요약 및 결론	52

IV. MR 영상 분석을 이용한 무정란의 조기 검출 및 분광분석법에 의한 형상 지수 예측 54

4.1. 서언	54
4.2. 재료 및 방법	56
4.2.1. 공시 재료	56
4.2.2. MRI 장비	57
4.2.3. 트레이 및 홀더의 제작	58
4.2.4. 부화 과정 모니터링 및 MR 영상의 획득	60
4.2.5. 형상 지수의 설정	67
4.2.6. 형상 지수 예측을 위한 투과 스펙트럼 측정 및 분석	68
4.3. 결과 및 고찰	70
4.3.1. 부화 시간에 따른 MR 영상에서의 형상 변화	70
4.3.2. 정상 부화 판별용 형상 지수 개발	75
4.3.3. PLSR에 의한 노른자 장단축비의 변화 예측	81
4.4. 요약 및 결론	88

V. 가시 근적외선 분광법을 이용한 저장 중 계란의 신선도 (Haugh Unit) 예측 90

5.1. 서언	90
5.2. 이론적 배경	92
5.3. 재료 및 방법	95
5.3.1. 공시 재료 및 실험 장치	95
5.3.2. 실험 및 데이터 획득 방법	96
5.3.3. 스펙트럼 전처리 및 모델 개발	97
5.4. 결과 및 고찰	98
5.4.1. 스펙트럼 파형 및 Haugh Unit의 변화	98
5.4.2. 전처리 효과	100
5.4.3. 모델의 성능 평가	102
5.5. 요약 및 결론	108
VI. 종합 결론	109
VII. 참고 문헌	111
부록	117
Abstract	143

List of Table

Table 2-1 Nutrient of egg as raw and fresh type.	6
Table 3-1 Specification of egg sample and experimental apparatus.	31
Table 3-2 Conditions to measure spectrum data from the egg samples during incubation under different light source.	33
Table 3-3 Discrimination ratio of the infertile and fertile egg.	34
Table 3-4 Effect of preprocessing of spectrum data on performance of validation model in determining fertile and infertile egg at 48 hr incubation.	47
Table 3-5 Effect of preprocessing of spectrum data on performance of validation model in determining fertile and infertile egg at 48 hr incubation.	47
Table 3-6 Calibration and validation results of PLS-DA model in discriminating fertile and infertile egg in VIS range (Light source type A)during incubation.	48
Table 3-7 Validation result of PLS-DA model in discrimination of fertile or infertile in VIS range(Light source type A) after 56hr incubation.	49
Table 3-8 Calibration and validation results of PLS-DA model in discrimination of fertile or infertile in VIS/NIR range (Light source type B) during incubation.	50
Table 3-9 Validation result of PLS-DA model in discriminating the fertile and infertile egg after 56 hour incubation.	51
Table 4-1 Egg samples for analysis of shape index and for prediction of shape index with spectroscopic method.	56
Table 4-2 Specification of MRI system.	58
Table 4-3 Conditions to measure MR image from the egg samples during incubation.	60

Table 4-4 Given values for image processing function provided by MATLAB.	63
Table 4-5 Definitions of shape indices presenting changes in geometrical features of york image during incubation.	68
Table 4-6 Conditions to measure MR image and transmitted energy spectra from the group #2 egg samples during incubation.	69
Table 4-7 Discrimination of fertile and infertile egg by circularity of york ellipse at 72 hr incubation.	77
Table 4-8 Discrimination of fertile and infertile egg by the ratio of major and minor axis of york(RYE) at 72 hr incubation.	80
Table 4-9 Change of mean shape indices of fertile egg.	81
Table 4-10 Change of mean shape indices of infertile egg. ..	82
Table 4-11 Effect of preprocessing of spectrum data on performance of PLSR model in determining Ratio of York Ellipse at 72 hr incubation. (Light source type A)	83
Table 4-12 Effect of preprocessing of spectrum data on performance of PLSR model in determining Ratio of York Ellipse at 72 hr incubation. (Light source type B)	83
Table 4-13 PLS Validation model with shape index, Ratio of York Ellipse at 72 hr incubation. (Light source type A)	87
Table 4-14 PLS Validation model with shape index, Ratio of York Ellipse at 72 hr incubation. (Light source type B)	87
Table 5-1 Change of the Haugh unit during storage period at room temperature.	90
Table 5-2 Specifications of egg sample, light sources and spectrometer.	95
Table 5-3 Time to measure transmitted energy spectra with brown and white eggs, and setting conditions of spectrometer.	96

Table 5-4	Effect of preprocessing of spectrum data on the performance of validation model in predicting Haugh unit of brown egg. ······	101
Table 5-5	Effect of preprocessing of spectrum data on the performance of validation model in predicting Haugh unit of white egg. ······	101

List of Figure

Fig. 2-1 Basic structure of hen's egg.	4
Fig. 2-2 Generative organs of Hen.	5
Fig. 2-3 Germinal disk of Hen's egg.	7
Fig. 2-4 Incubation and hatching of hen's egg.	8
Fig. 2-5 Egg candling.	9
Fig. 2-6 Color 3D image of Japanese quail'egg during the first 5 days of incubation.	26
Fig. 2-7 Changes in the volume of inner material of Japanese quail' egg during incubation.	13
Fig. 3-1 Attenuation of a beam of radiation by an absorbing solution.	18
Fig. 3-2 Absorption spectra of the major carotenoids of the photosynthetic biomembranes of green leaves of higher plants in diethyl ether (pure solvent).	26
Fig. 3-3 Mean transmitted spectra of fertile and infertile egg after 72hr incubation under halogen light source. ..	27
Fig. 3-4 Relative radiation intensity of blue and green LED light sources.	28
Fig. 3-5 Raw transmitted energy spectra using green LED light source with USB4000 spectrometer at 72hr incubation.	29
Fig. 3-6 Raw transmitted energy spectra using blue LED light source with USB2000 spectrometer at 72hr incubation.	29
Fig. 3-7 Array of LED lamps and halogen lamp to make combination light source.	31
Fig. 3-8 Appearance of lighting chamber.	32
Fig. 3-9 Incubator and measuring equipment set.	33

Fig. 3-10 Mean of the transmitted energy spectra of fertile and infertile egg at 0 hour incubation in VIS range.	35
Fig. 3-11 Mean of the transmitted energy spectra of fertile and infertile egg at 40 hour incubation in VIS range ..	36
Fig. 3-12 Mean of the transmitted energy spectra of fertile and infertile egg at 72 hour incubation in VIS range.	36
Fig. 3-13 Mean of the normalized energy spectra of fertile and infertile egg at 40 hour incubation in VIS range.	38
Fig. 3-14 Mean of the normalized energy spectra of fertile and infertile egg at 72 hour incubation in VIS range.	38
Fig. 3-15 Mean of the transmitted energy spectra of fertile and infertile egg at 0 hour incubation in VIS/NIR range.	39
Fig. 3-16 Mean of the transmitted energy spectra of fertile and infertile egg at 72 hour incubation in VIS/NIR range.	40
Fig. 3-17 Mean of the normalized energy spectra of fertile and infertile egg at 40 hour incubation in VIS/NIR range.	41
Fig. 3-18 Mean of the normalized energy spectra of fertile and infertile egg at 72 hour incubation in VIS/NIR range.	41
Fig. 3-19 Change of correlation coefficient obtained with raw energy spectra in visible range (Light source type A) during incubation period.	43
Fig. 3-20 Change of correlation coefficient obtained with the spectra normalized by the raw spectrum in visible range (Light source type A) during incubation period.	43
Fig. 3-21 Change of correlation coefficient obtained with energy spectra in VIS/NIR range (Light source type B) during incubation period.	45

Fig. 3-22 Change of correlation coefficient obtained with the spectra normalized by the raw spectrum in VIS/NIR range (Light source type B) during incubation period.	45
Fig. 3-23 Calibration and validation results of PLS-DA model in VIS range after 56 hr incubation.	49
Fig. 3-24 Calibration and validation results of PLS-DA model in VIS/NIR range after 56 hr incubation.	51
Fig. 4-1 Photo of MRI system.	57
Fig. 4-2 Egg sample and tray.	59
Fig. 4-3 Appearance of sample holder and tray to measure MR image.	59
Fig. 4-4 Measuring direction.	61
Fig. 4-5 MR image process to acquire boundary of egg yolk.	62
Fig. 4-6 Change of image contrast and area of germinal disk due to TR(ms).	66
Fig. 4-7 Measurement variables to define shape index of yolk.	67
Fig. 4-8 Change in the image of fertile egg's yolk during incubation.	71
Fig. 4-9 Extraction of boundaries of yolk and shell with the #34 slice image of a fertile egg and its shape change during incubation.	72
Fig. 4-10 Change of the appearance of infertile egg's yolk during incubation.	73
Fig. 4-11 Extraction of boundaries of yolk and shell with the #34 slice image of an infertile egg and its shape change during incubation.	74
Fig. 4-12 Total number of images having the largest yolk area in each slice.	75

Fig. 4-13 Change in yolk area of fertile and infertile egg during incubation.	76
Fig. 4-14 Change in CYE(Circularity of York Ellipse) of fertile and infertile egg during incubation.	77
Fig. 4-15 Change in YLR(York Length Ratio) during incubation.	78
Fig. 4-16 Change in YSD(York Space Distance) during incubation.	79
Fig. 4-17 Change in RYE(Ratio of York Ellipse) during incubation.	80
Fig. 4-18 Calibration and validation results of PLSR model developed with ratio of major and minor axis of egg yolk image in VIS range.	85
Fig. 4-19 Calibration and validation results of PLSR model developed with ratio of major and minor axis of egg yolk image in VIS/NIR range.	86
Fig. 5-1 Measurement device of the Haugh unit.	93
Fig. 5-2 Mean of the transmitted energy spectra of brown egg during storage in VIS/NIR range.	98
Fig. 5-3 Mean of the transmitted energy spectra of white egg during storage in VIS/NIR range.	99
Fig. 5-4 Change of HU of Brown egg(Red) and White egg(Blue) according to period of storage.	100
Fig. 5-5 Calibration and validation results of PLSR model in predicting Haugh unit of brown egg.	103
Fig. 5-6 Correlation coefficient graph of brown egg indicating correlation between HU and spectrum value at each wavelength.	104
Fig. 5-7 Press curve in developing PLSR model of brown egg.	104
Fig. 5-8 Calibration and validation results of PLSR model in predicting Haugh unit of white egg.	106

Fig. 5-9 Correlation coefficient graph of white egg indicating correlation between HU and spectrum value at each wavelength.	107
Fig. 5-10 Press curve in developing PLSR model of white egg.	107

I. 서론

병아리 생산을 위해서는 종계에서 생산된 유정란을 부화해야 하는데 부화율은 일정하지 않다. 부화기에서 부화가 되지 않는 이유는 크게 두 가지로 수정되지 않은 무정란이거나 부화 중 배자가 폐사한 부화 중지란이 되었기 때문이다. 종계에서 생산된 알의 부화율이 70% 아래로 떨어지면 해당 종계를 도태하는 현재의 경향을 볼 때 부화율은 암탉과 수탉의 나이, 건강 및 영양 상태 등에 큰 영향을 받고 있음을 알 수 있다.

2012년 모 방송 프로그램에서 부화장에서 폐기해야 할 부화 중지란을 식용으로 판매하고 있는 실태를 고발하였다. 그로 인해서 2012년 4월 인천일보, 4월 26일자 수원일보에 의하면 경기도에서만 연간 2억 개가 발생하는 부화 중지란을 비료화 또는 사료화 하는 시설을 도내 32개 전체 부화장에 설치할 계획이었다. 일반적으로 부화기에 있는 계란의 20%가 부화 중지란이 된다고 하였으며 경기도에서 월 100만 개 규모 부화장의 경우 부화중지란 22만 개(9.9t), 부화된 껍질 78만 개(3.9t) 등 총 13.8t의 폐기물이 발생하는 것으로 보고되었다.

조기에 무정란을 선별할 수 있다면 비료화 해야 하는 산업 폐기물을 사료화나 더 가치가 있는 용도로 사용할 수 있어 경제적으로 많은 이익을 얻을 수 있을 것이다. 그래서 유·무정란의 조기 판별을 위해 다양한 비파괴 분석법이 적용되어 시도되고 있지만 실용화할 정도의 성과가 나오지 않고 있다. 현재 가장 확실하게 유정란과 무정란을 판별하는 것은 부화기 내에서 5일~7일간의 부화 과정을 거치며 발생하는 물성 변화와 혈관 형성을 감지하는 것인데 38℃ 내외의 높은 온도에서 보관하는 것이므로 부화 판별 시에 이미 무정란의 신선도가 낮을 것으로 판단된다.

그리고 검란 과정에서 이용하는 고가의 검란 장비를 국산화할 필요가 있다. 우선 국내 대형 부화장에서 사용하는 검란기는 미국, 프랑스 등에서 수입한 제품으로 도입 비용과 운영비용이 비쌀 수밖에 없다. 또한 국내에서 생산하는 다수의 갈색란보다는 외국에서 많이 생산하는 백색란에 초점이 맞춰져 있어 모델이 정확하지 않다. 결국 판별 모델의 정확도를 높이기 위해 현재 국내의 경우 검란을 7일차에 하고 있는데 이때는 무정란도 이미 신선도가 많이 떨어져 있기 때문에 가공품의 좋은 원료로 활용하기가 어려워 부화기에 일단 들어간 무정란은 모두 폐기 처분하도록 규정되어 있다. 따라서 국내에서 생산되는 갈색란에 적합한 조기 검란 기술과 무정란의 신선도 판별 기술이 개발될 경우 폐기되는 무정란을 다른 용도로 사용할 수 있을 것이다.

7일 차가 아닌 3일 이내에 검란을 마칠 수 있다면 에너지의 절감 비용도 상당할 것이다. 간혹 종계 생산이 수요에 따라가지 못하는 경우가 발생한다. 이럴 경우 무정란을 제거한 빈 공간을 다시 정렬하여 만든 여유 공간에 새로운 종란을 입식하도록 하면 에너지 절감 비용뿐만 아니라 병아리의 수급에도 큰 도움이 될 수 있다. 이처럼 값비싼 비파괴 검란 장비를 국산화하여 부화장의 운영비를 줄이고 또한 값싼 종계의 생산을 통한 양계 산업의 안정화에 기여할 수 있다.

이 연구의 궁극적인 목적은 한국에서 많이 생산되는 갈색 산란계인 하이라인 브라운(Hy-line brown)종의 계란을 대상으로 부화기에 입식한 후 3일 이내에 배자, 배아의 발생이 이루어지고 있는 유정란과 아무런 발생의 흔적이 없는 무정란을 구별할 수 있는 기술의 개발과 더불어 무정란의 신선도 예측하는 기술을 개발하는 데 있다.

이와 같은 목적을 달성하기 위해 일차적으로 과실 등 농산물을 대상으로 내부 품질을 비파괴적으로 판별하기 위해 사용되고 있는 가시/근적외(VIS/NIR) 분광분석법을 이용하여 부화 시작 후 3일차 이내에

무정란을 조기에 판별하는 기술을 개발하고(Chapter III), 현재 농산물의 품질 판정 및 성분 분석 연구에 도입되고 있는 자기공명영상(MRI) 처리 기술을 이용하여 부화 중 계란의 변화를 관찰한 뒤 그 결과를 가시/근적외(VIS/NIR) 비파괴 품질 판별 기술과의 연계한 무정란의 판별 기술을 제시(Chapter IV)하며, 무정란을 상온 저장하면서 신선도가 변할 때 신선도를 나타내는 여러 지표 중 호우 유니트(HU; Haugh Unit)를 예측하는 기술을 개발(Chapter V)하고자 한다.

II. 연구사

2.1. 계란의 구조 및 생성 과정

계란은 겉껍질, 흰자(농후 난백, albumin), 노른자(난황, yolk)로 크게 구성되어 있다. 난황은 층에 따라 황색 난황, 백색 난황, 라테브라로 구별된다. 배반(blastoderm, germinal disk)은 분열 세포 덩어리로 부화가 시작되면 배아(embryo)로 발달하게 되며, 라테브라(latebra)는 난황 속의 덩어리로 처음 닭의 생식기에서 난황이 만들어질 때의 중심 덩어리이다. 라테브라 목(NL; Neck of Latebra)은 배반과 라테브라의 연결 구멍으로 라테브라 목의 끝에 팬더핵과 배반이 존재한다.

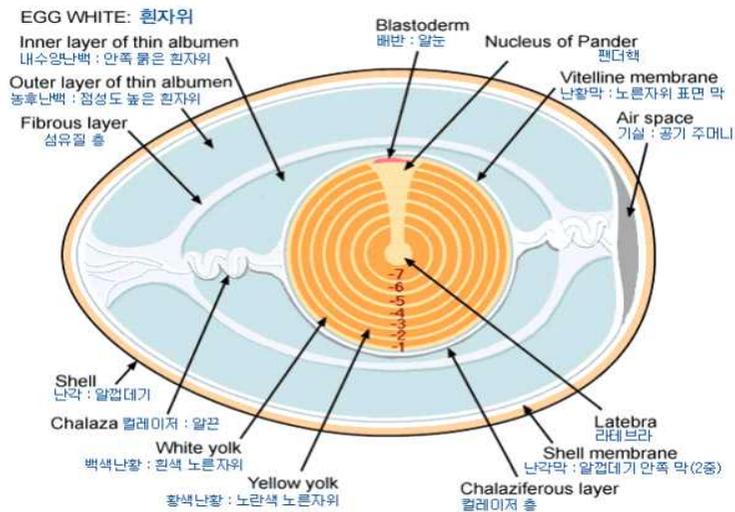


Fig. 2-1 Basic structure of hen's egg. (Source = <http://www.gnfarm.com>)

계란의 생성 과정은 성숙한 노른자인 난소(ovary)가 깔대기 모양의 누두(infundibulum)로 배출되면 이곳에서 정자와 수정이 이루어진다. 매그넘(magnum)에서 알부민이 노른자를 감싸게 되며 이후 협부(isthmus)에서 껍질막을 형성한다. 껍질 샘(shell gland) 또는 자궁(uterus)에서 탄산칼슘을 주성분으로 하여 껍질을 형성한다. 계란을 만드는 마지막 과정은 질(vagina)에서 이루어지는데 얇은 점액을 껍질에 코팅한다. 생성된 계란은 항문(vent)을 통해 닭의 몸 밖으로 배출된다. 보통 암탉이 몸 안에서 계란을 만드는데 걸리는 시간은 약 24~26시간 정도이다.

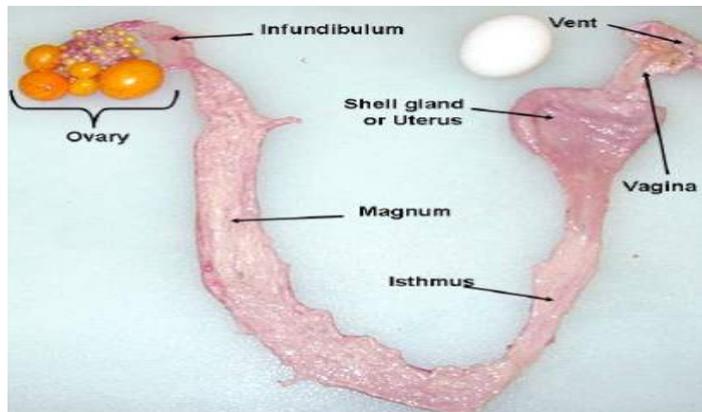


Fig. 2-2 Generative organs of Hen. (Source = <http://freefromharm.org>)

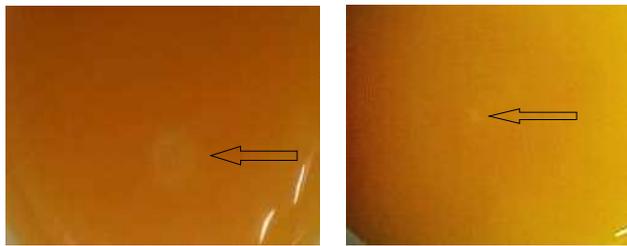
계란은 값싸고 영양가가 높은 식품으로 알려져 있다. 영양 성분을 나타내는 Table 2-1을 보면 100g을 기준으로 하였을 때 계란 전체에서 물이 차지하는 비율은 약 76%이고 나머지 부분을 단백질과 지방 등이 차지하는 것으로 조사되었다. 3대 영양소 중 탄수화물의 비중이 낮은 것이 특징이며 각종 미네랄과 비타민 영양소가 포함되어 있고 상대적으로 흰자보다 노른자에 단백질과 지방의 함유량이 더 많다.

Table 2-1 Nutrient of egg as raw and fresh type. (Source = USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 28)

Nutrient	Unit	Value per 100g		
		whole egg	white	yolk
Proximate				
Water	g	76.15	87.57	52.31
Energy	kcal	143	52	322
Protein	g	12.56	10.90	15.86
Total lipid (fat)	g	9.51	0.17	26.54
Carbohydrate, by difference	g	0.72	0.73	3.59
Fiber, total dietary	g	0.0	0.0	0.0
Sugars, total	g	0.37	0.71	0.56
Minerals				
Calcium, Ca	mg	56	7	129
Iron, Fe	mg	1.75	0.08	2.73
Magnesium, Mg	mg	12	11	5
Phosphorus, P	mg	198	15	390
Potassium, K	mg	138	163	109
Sodium, Na	mg	142	166	48
Zinc, Zn	mg	1.29	0.03	2.30
Vitamins				
Vitamin C, total ascorbic acid	mg	0.0	0.0	0.0
Thiamin	mg	0.040	0.004	0.176
Riboflavin	mg	0.457	0.439	0.528
Niacin	mg	0.075	0.105	0.024
Vitamin B-6	mg	0.170	0.005	0.350
Folate, DFE	μg	47	4	146
Vitamin B-12	μg	0.89	0.09	1.95
Vitamin A, RAE	μg	160	0	381
Vitamin A, IU	IU	540	0	1442
Vitamin E (alpha-tocopherol)	mg	1.05	0.00	2.58
Vitamin D (D2 + D3)	μg	2.0	0.0	5.4
Vitamin D	IU	82	0	218
Vitamin K (phylloquinone)	μg	0.3	0.0	0.7
Lipids				
Fatty acids, total saturated	g	3.126	0.000	9.551
Fatty acids, total monounsaturated	g	3.658	0.000	11.738
Fatty acids, total polyunsaturated	g	1.911	0.000	4.204
Cholesterol	mg	0.038	0	1085

2.2. 유정란의 부화 과정

유정란(fertile egg)과 무정란(sterile egg)을 구별하는 가장 쉬운 방법은 배반의 모양을 확인하는 것이다. 유정란은 둥글고 크며 가운데가 투명한 배반을 가졌지만 무정란은 크기가 매우 작거나 불규칙한 모양의 배반을 가지고 있다.



(a) fertile

(b) infertile

Fig. 2-3 Germinal disk of Hen's egg.

Fig. 2-4에서 보는 바와 같이 부화가 진행됨에 따라 배아의 크기가 점점 커지고 나중에는 배아 주위로 둥근 혈관(blood ring)이 형성된다. 또한 배아에서 둥근 혈관 주변으로 굵은 혈관이 형성되며 배아가 분열을 거듭함에 따라 병아리의 모양으로 바뀌어 간다. 부화 중에는 배반이 난각에 부착하거나 노른자와 요막이 달라붙는 것을 방지하기 위해 알을 수시로 굴러주어야 하는데 이 과정을 전란이라고 한다.

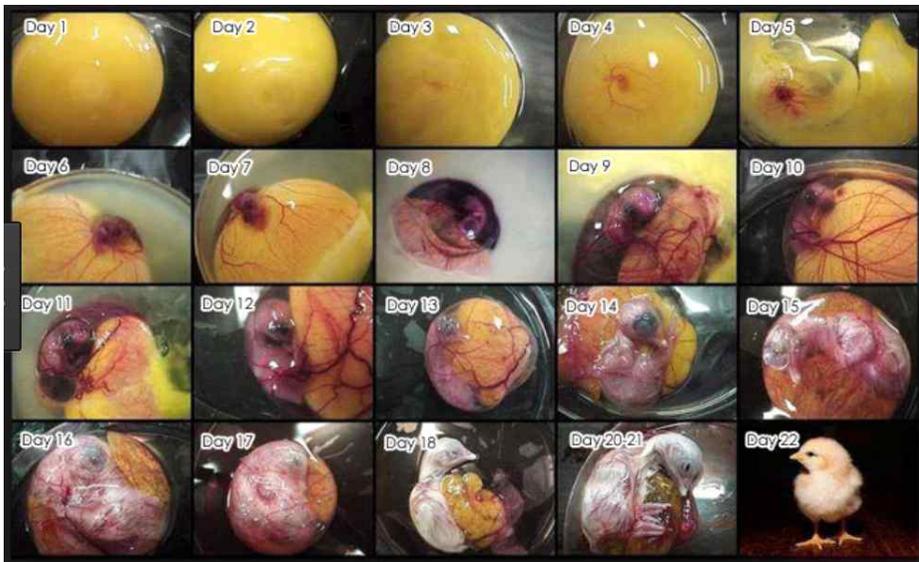


Fig. 2-4 Incubation and hatching of hen's egg. (Source = <https://www.pinterest.se/pin/124341639690202120/>)

2.3. 검란 기술

부화 중에 계란은 촛불이나 LED 등의 가시광을 이용하여 2~3차례의 검란 과정(candling)을 거친다. 갈색란은 백색란에 비해 가시광 영역에서의 투과율이 낮아 내부 상태를 확인하기 어렵기 때문에 1차 검란은 혈청과 혈관이 전체적으로 많이 형성되는 시기(부화 5일차, Fig. 2-5(a))부터 시작된다. 1차 검란에서는 아무런 발생의 흔적이 없는 무정란과 발생이 진행된 유정란의 판별이 이루어지며, 2차 검란에서는 부화 중지란을 검출한다. Fig. 2-5의 (b)에서 보는 바와 같이 부화 중지란은 지렁이 모양의 띠를 이루거나 큰 점 모양의 혈병을 가진다. 3차 검란에서 최종적으로 정상 부화 진행 여부를 판별한 뒤, 병아리가 알을 깨고 나올 때까지 전란을 하지 않고 그대로 놔둔다.

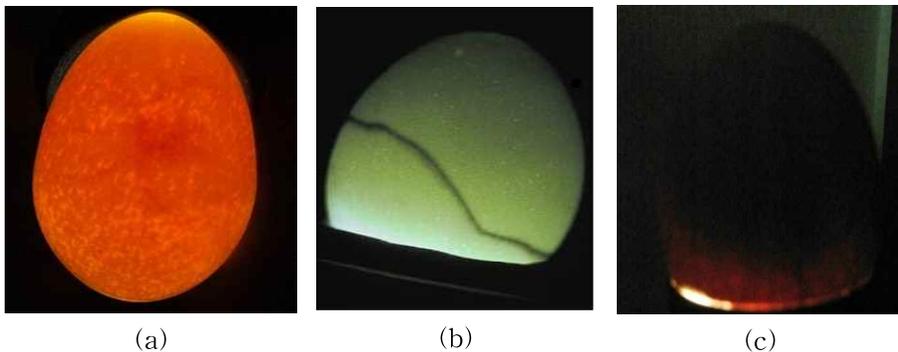


Fig. 2-5 Egg candling. (a) 1st inspection on 5~7th day, (b) 2nd inspection on 12~14th day (c) 3rd inspection on 18th day of incubation

2.4. 가시/근적외선 분광법을 이용한 계란의 내부 판별

2.4.1. 유정란·혈란 판별

Bamelis(2002) 등은 투과 스펙트럼을 측정하였을 때 백색란과 갈색란의 가시광 영역에서 스펙트럼의 형태가 크게 다르다고 하였다. 유정란과 무정란을 구별할 때 백색란은 577/610nm의 흡광비가 헤모글로빈의 생성에 따라 변한다는 것에 기초하여 108시간(4.5일) 이후에 가능하다고 하였다. 그러나 갈색란의 경우 껍질 속의 protoporphyrin이 헤모글로빈과 유사한 광학적 특성을 보여 판별에 어렵다고 하였다.

혈액 성분의 검출을 위한 혈란 판별에서 이홍석(2013) 등은 0.01 mL의 혈액을 계란에 주사기로 삽입하여 얻은 스펙트럼을 PLS-DA 방법으로 판별하였을 때 갈색란의 혈란의 판별 정확도는 95%이었다.

2.4.2. 신선도 판별

조성복(2008)은 계란의 신선도에 따른 스펙트럼의 변화 관찰에서 계란을 가로 방향과 세로 방향으로 하여 스펙트럼을 측정하였다. 이때 동일한 파장에서 피크 봉우리가 생성되었지만 광도(intensity)에서는 약간의 차이가 발생하는 것을 확인하였다.

Nour(2011)는 백색 레그혼종의 알을 대상으로 18℃에서 16일간 보관하면서 350~2,500nm 영역의 VIS/NIR 투과 스펙트럼을 측정하였다. 그 결과 알부민의 신선도를 나타내는 Haugh unit(HU)의 예측 모델에서 SEP는 5.05이었다.

Kemps(2007) 등은 백색 로만종을 대상으로 VIS/NIR 투과스펙트럼과 저해상도 NMR(Low Resolution Proton Nuclear Magnetic Spectroscopy) 분석을 통해 알부민의 Haugh unit를 예측하였다. VIS/NIR의 경우 이용 파장 대역은 200nm~1,000nm 였으며, PLS

분석을 이용한 예측 모델의 SEP는 8.45이었다. NMR의 경주파수는 7.5MHz이었으며 이를 통해 얻은 예측 모델에서 SEP는 12.01이었다.

김상호(2005) 등은 갈색란의 껍질에 있는 색소가 헤모글로빈과 같은 광학적 특성을 보이므로 가시광 영역이 아닌 1,100nm~1,750nm 사이의 근적외선 영역에서 확산식 반사 스펙트럼을 사용하여 PLSR 모델을 개발하였다. 70~100 Haugh unit 사이의 샘플을 가지고 예측 모델을 만들었으며, SEP는 1.35로 오차 범위가 5% 안에 들었다.

Bamels(2005) 등은 VIS/NIR 투과광을 이용하여 계란의 내부 품질을 판정하고자 하였다. 흰색 로만종 600개의 알을 가지고 0일에서 18일까지 18℃에서 보관하면서 HU와 pH를 측정하였다. Unscrambler software(version 7.8, Camo process AS, Norway)에서 제공하는 full MSC (multiplicative scatter correction) 전처리를 하였을 때 Haugh Unit 검증 모델의 상관계수(Correlation coefficient)는 0.816, pH 예측 모델의 검증 모델 상관계수는 0.861이었다. HU와 pH의 변화 예측에서는 570nm와 750nm가 중요한 파장 대역이라고 하였다.

2.5. 자기공명영상(MRI)기술을 이용한 내부 판별

계란을 유정란으로 확실하게 판명하는 것은 선명한 배반을 확인하는 것이다. 이를 위해 Klein(2002) 등은 7T MRI장비를 이용하여 부화 전 백색 레그혼종의 알 속 배반 위치를 x, y, z 좌표계를 이용하여 측정하였다. 계란이 고자기장에 노출되어도 부화율 감소는 크게 발생하지 않았다고 하였다. Falen(1991)등은 백색 레그혼종의 알을 대상으로 노른자의 변화를 부화 시간에 따라 관찰하였다. 노른자의 모양과 구조 관찰을 위해 급냉 후 해동하고 일부 화학 처리하여 흰자를 제거하는 방식을 택하였다. 부화 3일차의 T2 이미지는 부화에 따라 양수가 생기고 이를 보관하는 양막강(AC; Amniotic Cavity)의 생성을 관찰하였다.

Bain(2007) 등은 7T MRI를 이용하여 육계를 37.5°C에서 부화시키면서 뇌, 간, 심장 등 장기의 발달 과정을 12일~21일까지 모니터링하였다. 배아의 계속된 움직임을 억제하기 위해 4°C에서 1시간 정도 냉각하였을 때 가장 선명한 이미지를 얻을 수 있었으며 반복되는 냉각과 MRI 촬영이 배아의 발달을 늦추지 않는다고 하였다.

Suzanne Duce(2011) 등은 메추리(Japanese quail)알의 부화 과정을 7.1T μ MRI를 이용하여 모니터링하고 Fig. 2-6처럼 3D 이미지 처리를 하였다. 0~7일 동안 38°C에서 부화기에서 부화하면서 중간에 꺼내어 배아의 움직임을 줄이기 위해 3분간 냉각시킨 뒤 19°C에서 측정(실내 온도)하였으며 자기장의 영향이 부화에 미치는 영향을 파악하기 위해 0일과 3일에 7시간을 자기장에 방치하였을 때에는 배자의 발달에 큰 지장이 없다고 하였다. 부화가 진행됨에 따라 알부민이 감소하고 배아 외 물질(EEF; Extra Embryonic Fluid)이 증가하지만 노른자의 총 부피는 5일 동안 큰 변화가 없었다고 하였다(Fig. 2-7).

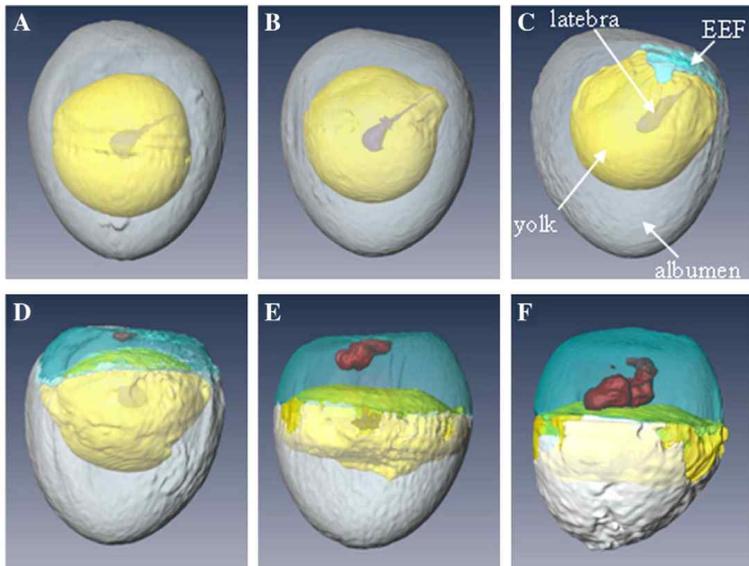


Fig. 2-6 Color 3D image of Japanese quail'egg during the first 5 days of incubation. (A) Day 0, (B) Day 1, (C) Day 2, (D) Day 3, (E) Day 4, (F) Day 5. (Suzanne et al, 2011)

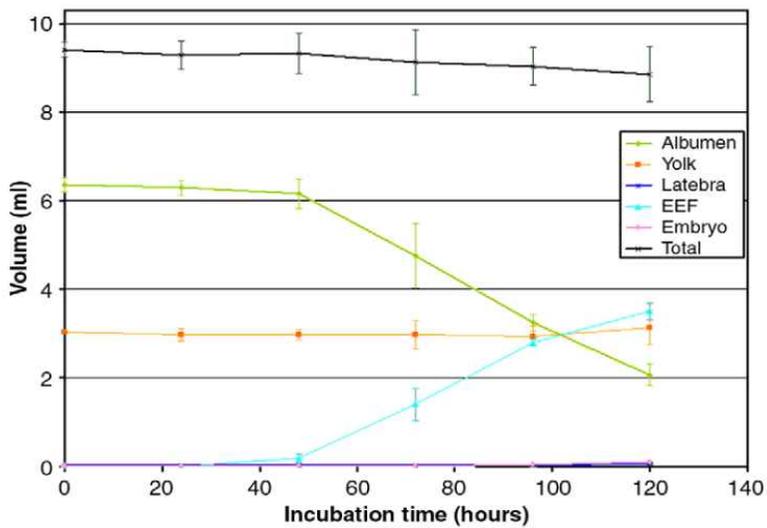


Fig. 2-7 Changes in the volume of inner material of Japanese quail' egg during incubation. (Suzanne et al, 2011)

2.6. 기타 기술을 이용한 내부 판별

Smith(2005) 등은 부화 중지란을 검출하는데 있어 백색 레그혼중의 알을 사용하였으며 각각 576nm, 655nm의 Hyperspectral image를 이용하였다. 3일 경과 후 91%의 정확도를 보였다. 육용 갈색란은 576nm, 682nm(± 13 nm)의 영상을 이용하여 판별하였는데 3일 부화 후 정확도는 83%이었다.

Coucke(1998) 등은 계란의 껍질에 타격을 가하여 발생하는 진동을 관찰하여 배자의 발달 정도를 판별할 수 있다고 하였다. 약 100시간 후에 급격한 변화를 관찰할 수 있었다.

III. 가시/근적외선 분광법을 이용한 무정란 조기 검출

3.1. 서언

현재 검란은 촛불이나 LED를 이용하여 부화 5일 차에 무정란을 판별하고 있으며 주로 검사자의 육안에 의한 경험에 기반하고 있다. 또한 계란 내에 포함되어 있는 혈청을 검출하는 연구가 주로 수행되어 왔으며, 특히 갈색란을 대상으로 발생이 생기지 않은 무정란을 조기에 판별하는 연구는 거의 수행되지 않은 것으로 여겨진다. 유정란이 부화되기 시작할 때 부화 2일 차(48시간)를 전후로 미세한 혈관이 형성되기 시작하는데 갈색란의 경우 껍질의 색깔 때문에 혈관의 생성을 조기에 검출하는 것은 투과광을 이용한 육안 선별이나 카메라를 이용한 영상의 경우에도 쉽지 않을 것으로 판단된다.

그동안 과실을 대상으로 과실의 당도, 내부 결함 등을 비파괴 방법으로 예측하는 분광분석법이 많이 이용되어 왔다. 이 방법을 이용하여 부화 중인 계란을 대상으로 투과 스펙트럼을 측정하여 배반이 배아로 발생하고 있는지를 조기에 판별하는 기술을 개발하고자 한다. 계란을 대상으로 측정한 투과 스펙트럼은 일차적으로 계란 껍질의 색상, 두께, 성분 등과 흰자와 노른자의 성분, 색상, 부피, 무게 등에 대한 정보를 포함하고 있으며, 광원의 종류와 투과광을 측정하는 스펙트로미터의 사양에 따라 스펙트럼의 측정범위가 또한 한정된다.

이 연구의 궁극적인 목적은 무정란을 조기에 검출하는 기술을 개발함으로써 상대적으로 신선도가 높은 계란을 폐기물이 아닌 보다 가치 있는 가공품의 재료로 사용할 수 있도록 하는데 있다. 이에 따

라 조기 검출에 최적화 된 광원과 측정 장치를 구성한 뒤에 투과 스펙트럼을 측정하여 (1) 계란의 초기 부화 시간에 따른 투과 스펙트럼의 형상 변화, (2) 부화 시간에 따른 정상 부화 진행 여부 및 무정란의 판별을 위한 PLS-DA 판별 모델 개발, (3) 판별 모델 개발에 있어 각종 전처리의 영향을 구명하고자 한다.

3.2. 이론적 배경

3.2.1. 가시/근적외선의 흡수 원리 및 특징

전자기파를 물체에 조사하면 물체 내에서 구성 분자의 결합 구조에 따라 여러 가지 형태의 에너지 전이가 발생한다. 이 중에서 적외선은 자체의 에너지가 약하므로 전자의 에너지 준위를 높이지 못하고 통과하는 원자들을 여기시키게 되며 따라서 분자들도 진동한다. 가시광(VIS; Visible light)은 물질에 관계없이 전 범위에서 걸쳐 흡수되지만 적외선에서는 분자 결합의 형태에 따라 고유 진동 에너지에 해당하는 특정 파장의 에너지만 흡수된다.

분자 결합에 따른 고유 진동수가 ν 일 때, 에너지 상태의 변화량 ΔE 에 해당하는 에너지를 흡수하여 양자수 ν 수준으로 에너지가 변하면서 진동하지만 실제로 적외선의 흡수는 쌍극자 모멘트가 변하는 경우에만 발생한다. 따라서 수소와 같은 단원자 분자의 경우는 원자간 진동만 발생하기 때문에 적외선을 흡수하지 못하며 다원자 분자보다는 쌍극자 모멘트 변화를 갖는 이원자 분자에서 흡수가 더 잘 일어난다(류동수, 2001).

근적외선(NIR; Near Infra Red light)은 2,500nm 이상의 중적외선 영역에서 일어나는 C-H, N-H, O-H, C=O 등과 같은 작용기의 기본 흡수(fundamental absorption)의 배진동(overtone vibration)과 결합 진동(combination vibration)이 나타나는 파장 대역이다. 중적외선을 이용할 경우 흡광도가 높아 시료를 희석해야 하지만 근적외선을 이용하면 시료의 전처리 과정이 필요 없기 때문에 신속하게 분광 스펙트럼을 측정할 수 있는 장점이 있어 실시간 분석 등에 사용할 수 있다(류동수, 2001).

3.2.2. 가시/근적외선의 흡광도 측정

가시/근적외선을 여러 가지 성분으로 이루어진 시료에 입사시키면 정반사(Reflectance), 체반사(Body reflectance), 흡수(Absorbance) 및 투과(Transmittance) 등의 여러 가지 형태로 분산된다. 체반사는 입사면을 투과하여 굴절 또는 산란 과정을 거친 후 입사면으로 다시 반사되는 것으로 정반사, 반사율, 반사 스펙트럼과 밀접한 관계가 있다.

Fig. 3-1과 같이 투명한 액상 시료의 경우 체반사와 정반사는 무시할 정도로 작기 때문에 투과율을 측정하여 성분 분석에 이용한다. 또한 투과율은 흡광도(A)가 증가할수록 감소하기 때문에 투과도와 흡광도의 관계를 Beer-Lambert 법칙에 의해 식 3-1과 같이 정의하고, 흡광도(A)를 식 3-2와 같이 표시한다(박기채 역, 1999).

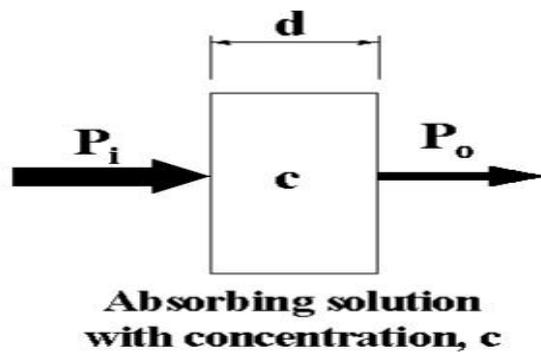


Fig. 3-1 Attenuation of a beam of radiation by an absorbing solution. (Source = Ryu, 2001)

$$T = \frac{P_i}{P_0} = 10^{-A} \quad (3-1)$$

$$A = -\log_{10}\left(\frac{P_i}{P_0}\right) = \log_{10}\left(\frac{1}{T}\right) = \epsilon cd \quad (3-2)$$

ϵ : 분자에 따른 비례 상수, 분자 흡광 계수

c : 분자의 농도

d : 경로 길이(path length)

3.2.3. 스펙트럼의 전처리

근적외선(NIR) 스펙트럼을 측정할 때 시료와의 접촉면에서 광의 산란, 시료와 센서 사이의 거리 차이에 의한 광의 경로 차이, 측정 센서에서의 노이즈 등이 발생하여 영향을 미치는데 이를 외란이라고 한다. 외란은 측정된 스펙트럼의 변이를 일으키는 등 변이에 주요한 영향을 미치며 온라인 측정 장치로 스펙트럼을 측정할 경우에는 더 많은 요인들이 외란으로 작용할 수 있다. 그러므로 스펙트럼에 포함된 외란을 제거하여 보다 안정적인 모델을 만들기 위해 스펙트럼의 전처리를 이용하며 다음과 같은 전처리 방식이 있다.

(1) 평활화(Smoothing)

신호가 기기에 의해 감지되어 측정자에게 전달되면서 발생하는 오차를 일반적으로 잡음(noise)이라 한다. 일반적으로 잡음의 크기는 정규 분포를 따르는 것으로 여겨지고 있으며, 이러한 특성을 이용하여 잡음을 제거하기 위한 방법들이 널리 연구되고 있다. 잡음을 줄이는 간단한 방법은 반복 측정을 통해서 신호 대 잡음 비율을 높이는 것이지만, 실제 기기에서의 반복 수행은 한계가 있고 측정 상태가 지속적으로 유지될 수 없는 환경에서 실시간으로 신호를 받아들이는 경우에는 반복에 의한 재현성이 떨어지므로 오히려 결과가 나빠질 수 있다. 반복 측정이 불가능한 경우에 사용하는 잡음 제거 방법으로는 푸리에 변환, 이동 평균법, 다항 함수법, Savitzky-Golay 평활화 방법 등이 있다(류동수, 2001).

(2) 스펙트럼 미분(Derivative)

스펙트럼을 측정할 때 측정 기기의 변동에 의한 베이스 라인의 이동, 쉬프트로 생긴 오차의 영향을 줄이거나 스펙트럼에 포함되어 있는 미세한 변화를 강조하기 위하여 스펙트럼의 1차, 2차 미분 등이 사용된다. 미분 간격과 차수에 의해 전처리의 효과가 달라질 수 있어 간격 설정에 유의해야 한다. 본 논문에서는 PLS_Toolbox에서 제공하는 Savitzky-Golay 기법을 이용하여 평활화와 미분을 수행하였다.

(3) MSC(Multiplicative Scattering Correction)

시료 표면 혹은 시료 내부의 불균일성 때문에, 동일 시료에 대한 반복 측정에 대해서도 얻어진 스펙트럼은 차이를 보일 수 있으며, 이는 스펙트럼 데이터 변이의 가장 큰 원인이 된다. 또한 산란 정도는 사용된 광원의 종류나 시료 표면의 상태, 그리고 시료의 반사 지수 등에 영향을 받으며 이것은 주로 베이스 라인의 이동이나 기울기 및 곡률의 변화로 나타난다. 이러한 광의 산란이 미치는 영향은 특히 측정된 스펙트럼의 장파장 영역에서 주로 나타난다. MSC의 기본 개념은 모든 스펙트럼을 이상적인 스펙트럼에 의해 보정하는 것이다(류동수, 2001).

(4) SNV(Standard Normal Variate)

MSC와 마찬가지로 광의 산란을 보정하기 위한 방법으로 수학적 인 처리 방법이 MSC와 다르다. SNV는 이상적인 스펙트럼이 필요하지 않으며 대신에 각 스펙트럼을 전체 스펙트럼의 표준 편차로 정규화하여 광의 산란 영향을 제거하는 방법이다. 광의 경로나 광원의 변동에 따른 스펙트럼의 변이 등이 SNV에 의해 보정될 수 있으며, SNV에 의해 보정된 스펙트럼은 무차원이 되는 특징이 있다.

(5) 정규화(Normalization)

스펙트럼 정규화는 특정 파장의 스펙트럼의 값으로 각 파장에서
의 값을 나누는 것을 말한다. 광원의 변화가 심할 경우 특정 파장의
값으로 정규화를 하면 그 영향을 줄일 수 있고 형태의 변화 여부를
확인할 수 있다. 이 연구에서는 부화 중인 계란의 변화를 연속적으
로 분석하는 것이기 때문에 부화기에 들어가기 전의 스펙트럼을 분
모로 하고 부화 도중의 스펙트럼을 분자로 하여 나누는 정규화 방
법을 채택하였다.

(6) 이상치(Outlier) 제거

이상치(outlier)는 전체 데이터의 전반적인 분산 경향에 포함되지
못하고 바깥에 놓여있는 데이터이다(Moore and McCabe, 1993). 이
상치가 제거되지 않은 상태에서 원 데이터로 calibration을 하거나
prediction을 수행하게 되면 많은 오차를 가진 모델이 나오게 된다.
데이터 세트에서 이상치를 제거하기 위해 오차(Martens and Naes,
1991), Euclidian Distance(ED) 및 Mahalanobis distant(MD;
Mahalanobis, 1936) 등의 leverage(De Maesschalck et al., 1999, De
Maesschalck et al., 2000)효과 등을 사용한다(서영욱, 2008). 이 연
구에서 표준편차의 3배(3σ), 평균(average)의 3배와 평균(average)의
 $1/3$ 이 되지 않는 것 등은 이상치로 간주하여 모델 개발에서 제외하
였다.

3.2.4. 분광분석 예측 모델 개발과 성능 평가

근적외 분광분석법에 있어 예측 모델을 개발하는데 일반적으로 사용되는 것은 다중회귀모델(MLR; Multivariate Linear Regression)이다. 이 회귀 모델은 종속 변수와 상관관계가 있는 독립 변수가 2개 이상일 때 우수한 결과를 나타내는 모델로서 여러 가지 통계 패키지를 이용하여 계수와 절편을 구하는 방식이지만 스펙트럼 데이터에 있어 흡수 대역과 관련된 다중공선성(multiple co-linearity)의 문제 때문에 변수 선택에 어려움이 있다(류동수, 2001).

분광분석법에 널리 사용되고 있는 방법에는 주성분 분석(PCA; Principle Components Analysis)이 있다. 이것을 이용한 선형 회귀 모델로는 주성분회귀모델(PCR; Principal Component Regression), 최소자승회귀모델(PLSR; Partial Least Square Regression), 연속회귀모델(CR; Continuum Regression)이 있다. 비선형 문제를 해결하기 위해서는 PLOY-PLS, NN_PLS 등이 사용된다.

본 연구에서는 부화 유무를 판별하기 위해 PLSR 모델과 PLS-DA(Partial Least Square - Discriminant Analysis) 모델을 이용하였다. 농산물의 당도 등의 품질 판정에 많이 쓰이는 PLS 회귀 모델은 당도를 예측하는 실험실에서 농도 정보에 따라 가중치가 주어진 스펙트럼을 통해 인자를 추출하고, 이를 이용하여 만든 모델이다. 그 과정에서 스펙트럼 데이터 형태를 고유벡터 및 스코어 벡터로 분해하고 농도 정보를 이용하여 고농도의 스펙트럼은 저농도의 스펙트럼보다 큰 가중치를 갖게 한다(류동수, 2001).

PLS-DA 모델은 두 개의 선형 그룹으로 나누는 것으로 공간을 두 개의 영역으로 나눌 수 있는 직선을 찾는 것을 목표로 하는 모델이다(Richard et al, 2014).

스펙트럼 데이터(X값) 및 이미 알고 있는 측정 데이터(Y값)는 수학적 방법으로 직접 고유치 벡터 및 스코어 벡터로 분해될 수 없으므로 NIPALS(Nonlinear Iterative Partial Least Square, S. Wold) 알고리즘에 의해 계산된다. 본 연구에서는 PLSR 모델과 PLS-DA 모델 구현을 위해 PLS_Toolbox (ver 2.0, Eigenvector Research, USA) 및 Matlab(ver 5.3 and 2016b, Mathwork, USA)을 사용하였으며, cross-validation법에 의한 최소 PRESS법을 이용하여 최적 factor(Latent variable) 값을 선정하였다. 예측 오차 제곱합(Prediction Residual Error Sum of Squares)은 식 3-3과 같이 계산하였다.

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (3-3)$$

y_i : 측정에 의한 실측값

\hat{y}_i : 개발된 모델에 의한 예측값

정량 분석을 위해 부분최소자승회귀모델을 개발했을 때 검량 표준 오차(SEC; Standard Error of Calibration)와 상관 계수(r, correlation coefficient)를 통해 모델의 정확도와 적합도를 알 수 있으며, 예측 성능은 예측 표준오차(SEP; Standard Error of Prediction), bias, 상관계수를 통해 평가할 수 있다. 표준 오차인 SEC와 SEP는 통계적으로 1σ (standard deviation)에서의 표준 오차를 말하며, 검증 데이터 셋의 68% 정도가 이 오차 범위 내에 속하는 것을 의미한다.

검량 표준 오차, Bias, 예측 표준 오차 및 상관계수는 식 3-4, 3-5, 3-6, 3-7과 같다(류동수, 2001).

$$SEC = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-p-1}} \quad (3-4)$$

$$Bias = \sum_{i=1}^n \frac{(y_i - \hat{y}_i)}{n} \quad (3-5)$$

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(y_i - \hat{y}_i) - Bias]^2}{n-1}} \quad (3-6)$$

$$r = \frac{\sum (y_i - \bar{y})(\hat{y}_i - \bar{\hat{y}})}{\sum \sqrt{(y_i - \bar{y})^2} \cdot \sum \sqrt{(\hat{y}_i - \bar{\hat{y}})^2}} \quad (3-7)$$

n : 시료의 개수

p : 모델에 사용된 인자수

y_i : 측정에 의한 실측값

\hat{y}_i : 개발된 모델에 의한 예측값

\bar{y} : 실측값의 평균

$\bar{\hat{y}}$: 예측값의 평균

3.3. 재료 및 방법

3.3.1. 광원의 선택

투과광을 얻기 위한 실험에서 광원을 선택할 때 대상 물질의 종류와 흡수 특성을 고려하여 선택할 필요가 있다. 일반적인 계란 부화에서 부화 후 48시간(2일)정도 전·후에서 유정란의 경우 혈관이 생성되기 시작하며, 이는 유·무정란의 구별에 단초가 된다. 기존 연구에서 혈청의 헤모글로빈의 흡수 파장 대역이 577nm라는 것이 밝혀졌기 때문에 이 파장 대역의 빛을 집중 조사할 필요가 있다.

또한 계란 노른자의 주요 색상은 카로티노이드 계열의 색소에 의해 발현된다. 노른자의 색은 닭이 섭취하는 사료에 영향을 받으며 황색, 오렌지색, 적색 등으로 나타난다. 일반적으로 카로티노이드 색소가 풍부한 식물 사료를 섭취한 닭이 낳은 계란의 노른자가 흰색 옥수수 사료를 섭취한 닭이 낳은 계란에 비해 색이 진한 경우가 많은 것으로 알려져 있다. Fig. 3-2에서 보는 바와 같이 카로티노이드 색소의 큰 흡수 파장 대역은 430~500nm로 파란색과 청록색 대역이다. 가시적인 노른자의 색상 변화가 부화 1, 2일 차에서 생기므로 이대역에서 스펙트럼 변화를 관찰할 필요가 있다.

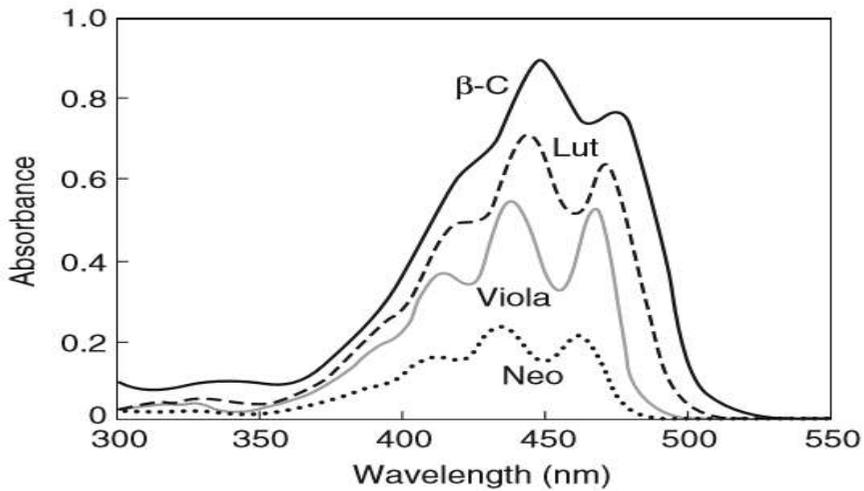


Fig. 3-2 Absorption spectra of the major carotenoids of the photosynthetic biomembranes of green leaves of higher plants in diethyl ether (pure solvent). β -C, β -carotene; Lut, lutein; Neo, neoxanthin; Viola, violaxanthin. (Source = Hartmut et al, 2001)

Fig. 3-3은 예비 실험에서 하이라인 브라운 갈색란의 부화 3일차 투과 스펙트럼으로 본 실험에서 사용한 할로겐 광원을 이용하여 측정한 것이다. 이 그림에서 600nm 이하의 파장에서 투과 광량이 매우 적음을 알 수 있다. 이는 노른자의 흡수에 의한 것으로 판단되며, 이 부분의 투과에너지를 증가시키기 위해 Fig. 3-4처럼 600nm 이전에서 최대 광량이 나오는 청색 LED램프와 녹색 LED램프를 광원으로 선택하였다.

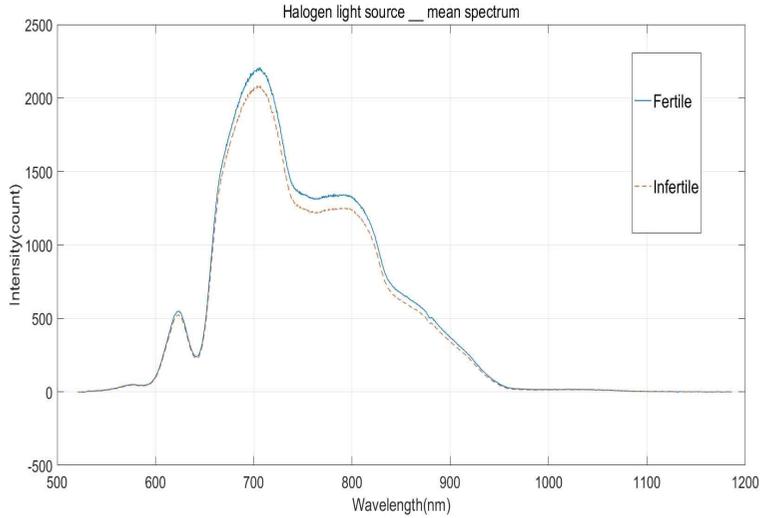


Fig. 3-3 Mean transmitted spectra of fertile and infertile egg after 72hr incubation under halogen light source.

Fig. 3-4에서 보는 바와 같이 청색 LED는 450nm 부근에서, 녹색 LED는 520nm 부근에서 각각 피크가 나타난다. 이 그림은 광원의 피크 파장을 관찰하기 위해 광원의 출력을 낮게 하여 측정한 것으로 실제 실험에서 출력을 높게 하면 피크 파장은 변하지 않지만 전체적으로 복사 에너지 강도가 증가하며, 이들의 배음 대역에서도 복사 에너지가 관찰된다.

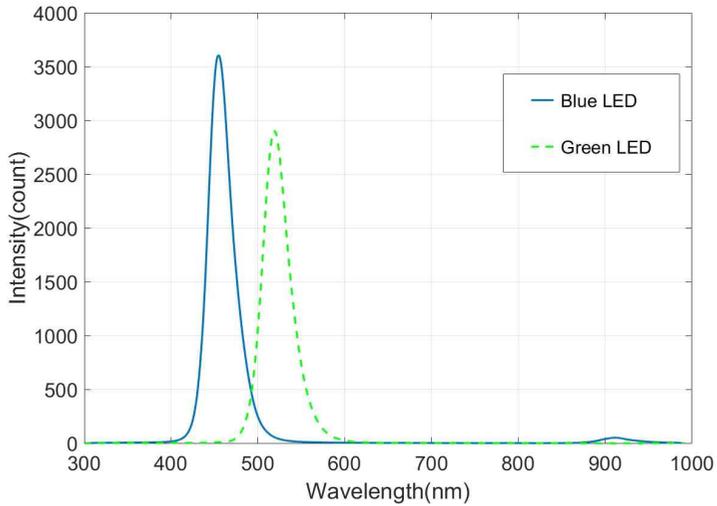


Fig. 3-4 Relative radiation intensity of blue and green LED light sources.

Fig. 3-5는 예비 실험에서 녹색 LED 광원을 이용해 부화 3일 차에서 얻은 투과 스펙트럼을 나타내며 Fig. 3-6은 동일 시료를 대상으로 청색 LED 광원을 이용해 얻은 투과 스펙트럼을 나타낸다. 두 그래프를 비교해 보면 동일 출력을 지닌 녹색 광원과 청색 광원을 계란에 조사하여 얻은 스펙트럼에서 모두 643nm~900nm 파장대에서 비슷한 카운트의 투과량을 얻었으며 최대 수치는 2,000 카운트 내외였다. 차이점은 녹색 광원의 경우 500nm~643nm에서 최대 약 1,800 카운트의 수치를 얻을 수 있었으나, 청색 광원의 경우 최대값이 약 200카운트에 불과할 정도로 투과량이 매우 적게 나왔다. 이와 같은 현상은 노른자가 지니는 색소에 의한 광의 흡수로 판단되며, 이 파장대역에서 변화를 관찰하기 위해 청색광의 조사량을 증가시킬 필요가 있는 것으로 판단되었다.

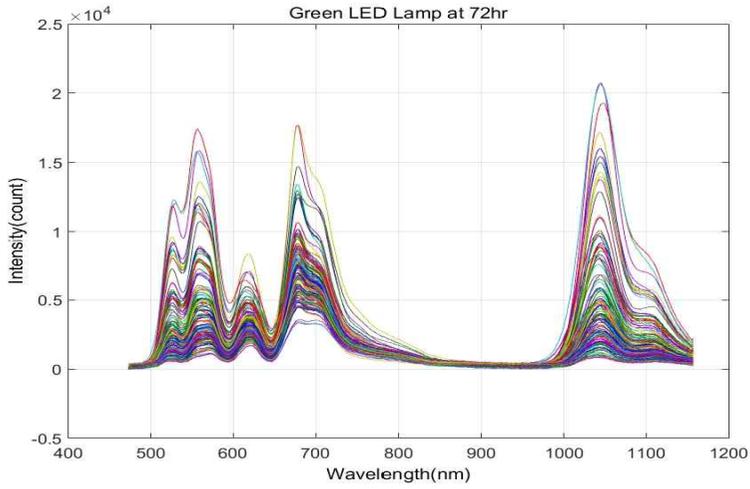


Fig. 3-5 Raw transmitted energy spectra using green LED light source with USB4000 spectrometer at 72hr incubation.

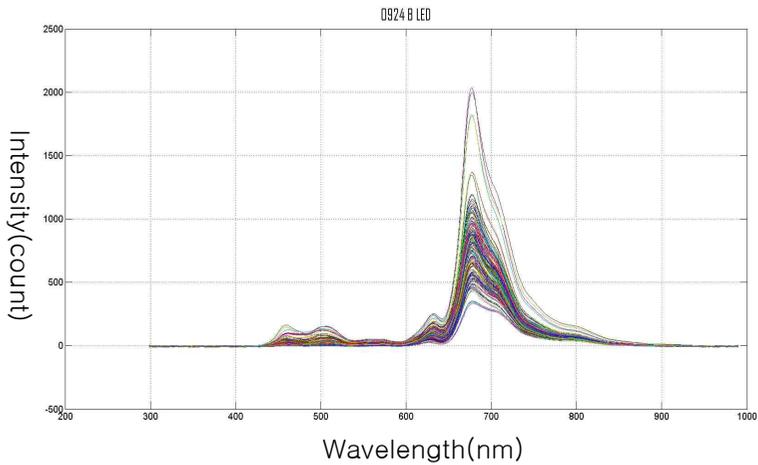


Fig. 3-6 Raw transmitted energy spectra using blue LED light source with USB2000 spectrometer at 72hr incubation.

3.3.2. 공시 재료 및 실험장치

하이라인 브라운 산란계의 유정란 34개와 무정란 20개를 사용하였다. 유정란은 여주의 에덴농장에서 구입한 55주령 산란계의 알이고, 무정란은 평창의 서울대 목장에서 구입한 것으로 53주령의 닭이 낳은 것이다. 모두 산란일로부터 2일이 경과된 것이었고 무게는 58g~62g사이의 것이었다.

투과 스펙트럼을 측정하기 위한 광원 장치는 Fig. 3-7처럼 시중에 판매되는 LED램프와 할로겐램프를 이용하여 제작하였다. 계란 주위에 원형으로 녹색광과 청색광을 발광하는 MR-16 타입의 LED램프(CR, China)를 각각 4개씩 배치하였다. 모두 DC 12V, 4W였으며 500nm 앞부분의 광량 부족을 보완하기 위해 48W의 대형 청색 LED램프(Cree, USA)를 중앙에 배치하였다. 이를 광원A(Light source type A)라고 하였다.

상기 광원A에 근적외선 대역에서의 광량을 증가시키기 위해 DC12V, 20W의 할로겐램프(Phillips, China) 1개를 중앙의 청색 LED램프 옆에 추가로 설치하였다. 이는 근적외선 대역의 스펙트럼 변화를 보다 면밀하게 분석하기 위한 것으로 이와 같은 광원 장치를 광원B(Light source type B)라고 칭하였다.

투과 스펙트럼을 측정하기 위해 USB2000(측정범위 : 300nm~990nm) 스펙트로미터를 사용하였다.

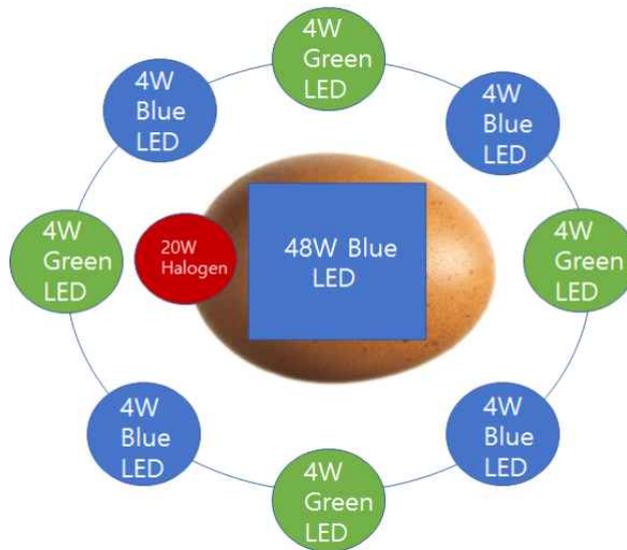


Fig. 3-7 Array of LED lamps and halogen lamp to make combination light source.

Table 3-1 Specification of egg sample and experimental apparatus.

	Specification	
Egg Sample	Breed : Hy-line Brown (layer hen) Total number : Fertile egg (34) Infertile egg (20) Weight : 58~62g	
Light source Composition	Light source type A	Light source type B
	Blue LED(4) + Green LED(4) + Center Blue LED(1)	Blue LED(4)+Green LED(4) + Center Blue + Halogen(1)
Spectrometer	Model name : USB2000 Manufacture : Ocean Optics Range : 300~990nm	



Fig. 3-8 Appearance of lighting chamber.

3.3.3. 투과 스펙트럼 측정 및 분석

시료를 대상으로 스펙트럼을 측정할 때 시료의 자세를 일정하게 유지하기 위해 샘플 트레이를 제작하였다. 가열형 액상 접착제인 글루건으로 계란을 트레이에 고정하였으며, 트레이가 항상 광의 측정 부에서 일정한 자세를 유지하도록 측정부에 가이드를 제작 설치하였다.

샘플 당 2개의 스펙트럼을 측정하였으며, 측정 시기와 카메라 영상 촬영에서 노출 시간에 해당하는 integration time(누적 시간)은 Table 3-2와 같다. 스펙트럼을 측정할 때 잡음을 줄이기 위해 일차적으로 2회 반복 측정한 스펙트럼을 평균하고 또한 평활화를 위해 6개의 인접 스펙트럼을 평균하여 대표치로 사용하였다(Boxcar=6). 광량의 세기를 전기적 신호로 바꾸는 스펙트럼 측정 작업은 Window7(Microsoft, USA) 32bit 기반의 SpectraSuite(Oceanoptics, USA) 프로그램을 이용하였다.

첫 스펙트럼 측정이 끝난 샘플은 부화기(Saesil, Korea)에 넣어 부화를 계속하였으며 72시간 후에 할관하여 노른자의 변형과 혈관이 형성된 시료는 유정란, 아무런 배반의 발생 흔적이 없는 것은 무정

란으로 판별하였다. 부화 중지란은 판별에 고려하지 않았으며 부화기의 습도는 기계의 구조상 대기 중 포화 상태로 하였고, 온도는 평균적으로 약 37.5℃이었다. 배아의 위치가 바뀌지 않도록 하기 위하여 교반 장치는 사용하지 않았다.

Table 3-2 Conditions to measure spectrum data from the egg samples during incubation under different light source. (Light source type A: Combined LED lights, Light source type B: Combined LED+Halogen lamp)

	Number of measurement							
	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	8th
Incubation time(hr)	0	22	32	40	48	56	64	72
Integration time	700msec							
No. of spectrum for average	2							
Boxcar for smoothing	6							

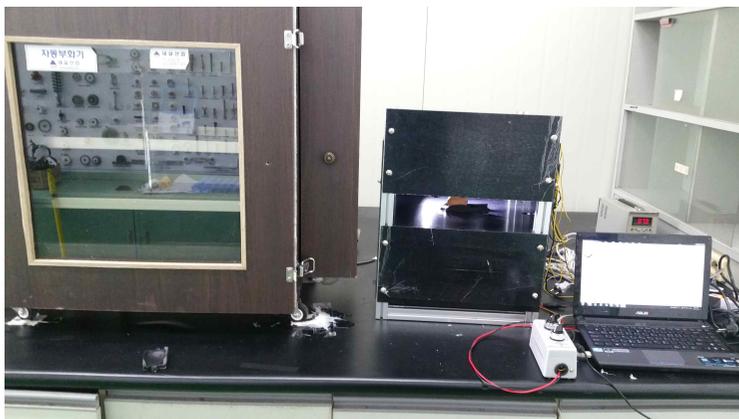


Fig. 3-9 Incubator and measuring equipment set.

3.3.4. 유·무정란의 판별

시간대별로 측정된 투과 스펙트럼은 광원별로 총 108개이며, 이상치를 제거한 뒤 측정 시간대 별로 무작위로 2그룹으로 분류하여 무정란 판별 모델 개발 및 검증에 사용하였다. 스펙트럼이 열 등에 의해 베이스라인이 변화할 경우 스펙트럼의 300nm~400nm의 최저값을 0으로 하여 정렬하였다.

측정한 스펙트럼을 x값으로 하고 부화 시작 후 72시간 경과 후에 할란하여 배아가 발생한 경우 1, 반대의 경우 0을 y값으로 부여하여 PLS-DA 모델을 개발하였다. 유·무정란의 판별을 위한 기준값을 문턱값이라고 하며 예측 결과가 문턱값을 0.5로 하여 이보다 작으면 무정란, 크면 유정란으로 판별하였다.

유·무정란의 판별율(CDR; Correct Discrimination Rate)은 Table 3-3과 같이 구하였다. 시료 중에서 실제 유정란의 개수를 F, 무정란의 개수를 I라고 하고 모델에 의한 판별 결과 유정란(F)을 유정란(D)으로 판별한 결과와 무정란(I)을 무정란(A)으로 판별한 결과를 구하고, 이들을 평균하여 판별율(CDR)로 사용하였다.

Table 3-3 Discrimination ratio of the infertile and fertile egg.

Actual By Model	Class 0 (I) (Infertile)	Class 1 (F) (Fertile)	CDR(%)
Class 0	A	C	$(A/I) \times 100 = R1$
Class 1	B	D	$(D/F) \times 100 = R2$
Average			$(R1+R2)/2$

3.4. 결과 및 고찰

3.4.1. 부화 시간에 따른 스펙트럼의 변화

(1) 가시광 영역 (광원 A : 청색과 녹색의 복합 LED 광원)

Fig. 3-10, Fig. 3-11 및 Fig. 3-12는 각각 부화 0시간, 부화 시작 후 40시간 및 72시간에서 측정된 유·무정란의 평균 투과 에너지 스펙트럼을 나타낸 것이다. 무정란의 경우 40hr에서 투과 강도가 많이 감소하였으나 그 이후에 큰 변화가 없었고, 유정란의 경우 40hr과 72hr에 이르기까지 지속적으로 투과 강도가 감소하는 차이를 보인다. 중앙에 강한 청색 LED 램프를 설치하여 조사하였음에도 불구하고 500nm 이전 영역의 투과 에너지 강도는 크지 않았다. 이는 500nm 이하의 에너지는 대부분 흡수됨을 의미한다.

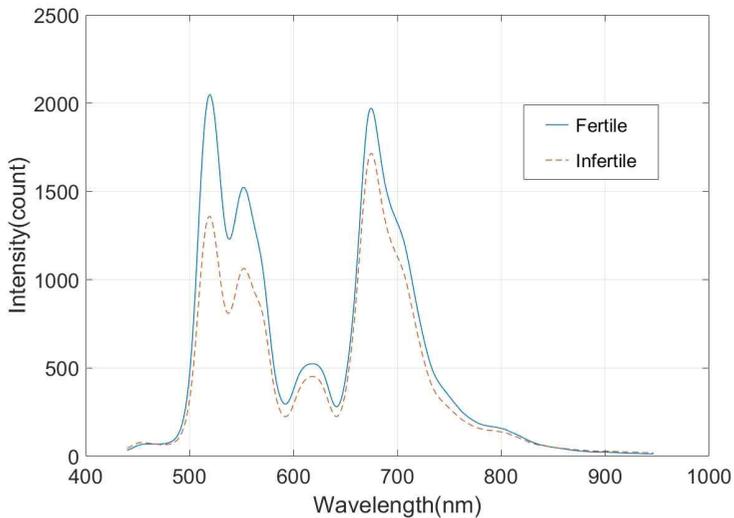


Fig. 3-10 Mean of the transmitted energy spectra of fertile and infertile egg at 0 hour incubation in VIS range. (Light source type A)

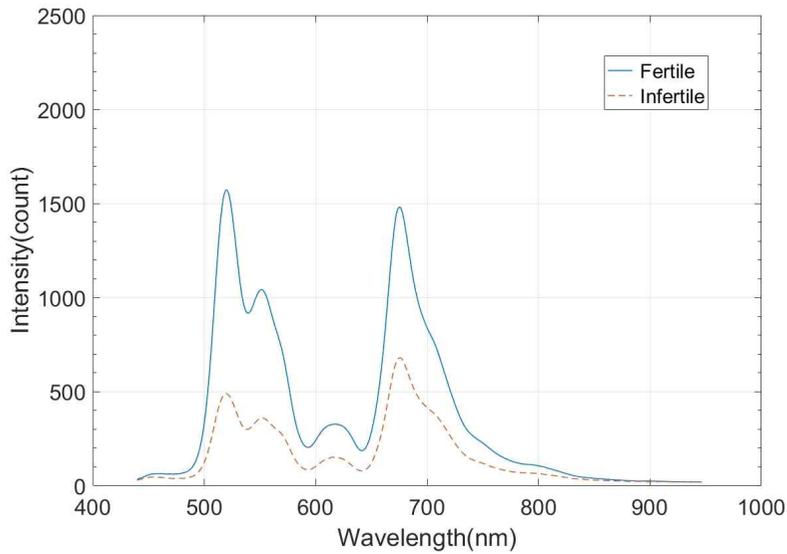


Fig. 3-11 Mean of the transmitted energy spectra of fertile and infertile egg at 40 hour incubation in VIS range. (Light source type A)

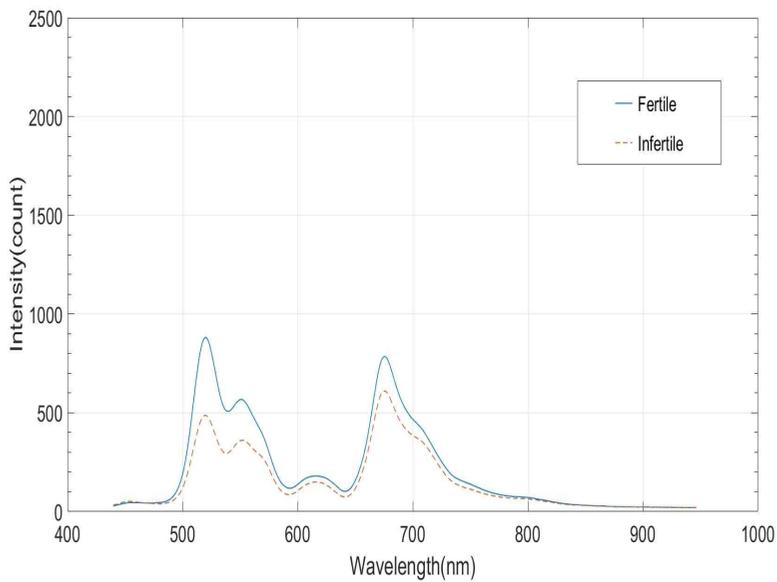


Fig. 3-12 Mean of the transmitted energy spectra of fertile and infertile egg at 72 hour incubation in VIS range. (Light source type A)

부화 초기(Fig. 3-10)에 유정란과 무정란의 평균 스펙트럼에서 카운트의 차이가 크게 나타나고 있는데 이것은 유정란과 무정란이 다른 농장에서 생산되어 색깔, 껍질 등과 같은 물성에 있어 차이를 보이기 때문인 것으로 여겨진다.

스펙트럼의 전처리 또는 정규화의 한 방법으로 부화 중에 측정된 투과 스펙트럼을 부화기에 넣기 직전 투과 스펙트럼(0일차 스펙트럼)으로 나누는 방법이다. 이와 같은 스펙트럼 정규화는 계란의 크기, 색깔, 껍질 두께, 내부 성분 등의 차이로 인한 스펙트럼의 강도와 패턴의 차이를 없애주는 장점이 있다. 그리고 이런 전처리가 가능한 것은 이 연구에서 실험 방법으로 계란의 측정 위치를 고정하고 전란해주지 않는 것을 택했기 때문이며, 이와 같은 정규화는 이 연구의 특징이며 또한 다른 연구와의 차별성이라고 할 수 있다.

부화기에 넣기 전에 측정한 원시 스펙트럼(Primitive spectrum)이 기준이 되며 이 때 정규화 전처리가 수행된 스펙트럼의 모든 파장에서의 값은 1을 가진다. 이 후 부화가 진행되면서 특정 파장 대역에서 변화가 발생할 경우 정규화 된 값은 변화가 생기는데 계란의 스펙트럼을 측정할 때 계란의 자세, 조명의 강도 등이 일정하게 유지되어야 하며, 파장이 좌우로 밀리지 않아야 한다는 전제 조건이 따른다. 값이 1보다 매우 클 경우 누광, 잡음 등 측정이 잘못된 이상치로 간주하고 예측 모델에서 제외해 주어야 한다.

Fig. 3-13과 Fig. 3-14는 원시 스펙트럼으로 정규화한 스펙트럼으로 부화가 진행됨에 따라 광의 투과량이 감소하게 되어 부화 시간이 증가함에 따라 정규화된 값은 1이하로 감소하는 것을 알 수 있다. 부화 40시간에서 유정란과 무정란의 변화 비율이 서로 다르게 나타났으며 72시간에서는 450nm~550nm 영역에서 정규화 값의 차이가 두드러지게 나타났다.

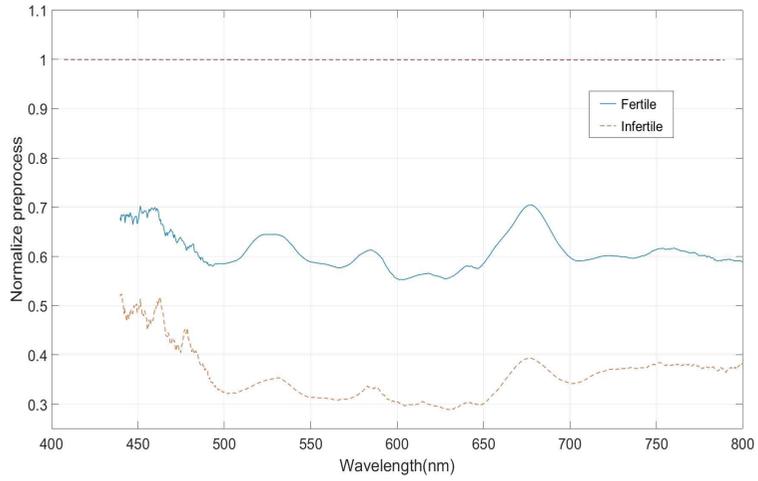


Fig. 3-13 Mean of the normalized energy spectra of fertile and infertile egg at 40 hour incubation in VIS range. (Light source type A)

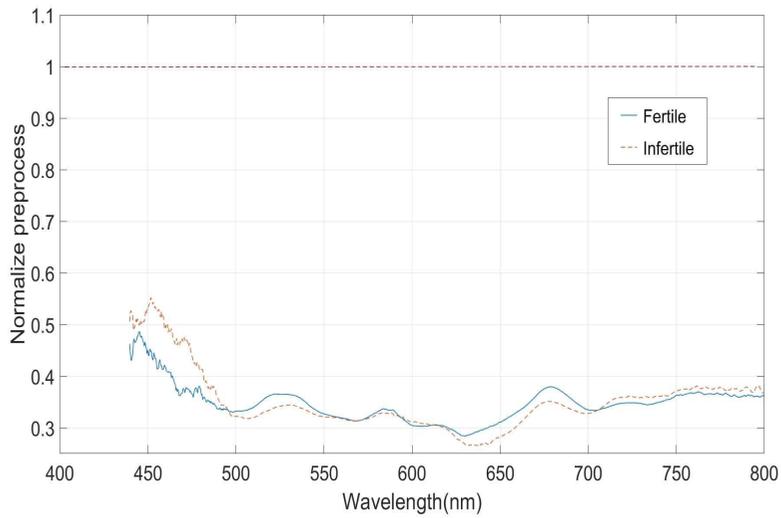


Fig. 3-14 Mean of the normalized energy spectra of fertile and infertile egg at 72 hour incubation in VIS range. (Light source type A)

(2) 가시/근적외선 영역 (광원 B : 복합 LED 및 할로겐램프)

Fig. 3-15는 할로겐램프가 추가된 상태에서 측정한 유·무정란의 평균 스펙트럼이다. 할로겐램프가 없는 Fig. 3-10과 비교할 경우 680nm 부근에서 나오는 봉우리의 카운트 값이 증가하였으며 800nm 부근에서 새로운 봉우리가 생성되었다. 이것은 할로겐 광량이 더해지면서 생기는 입사광의 변화에 의한 것이다. 900nm 이후 영역에서도 광원A를 사용할 때에 비해서 많은 투과광이 발생하였다.

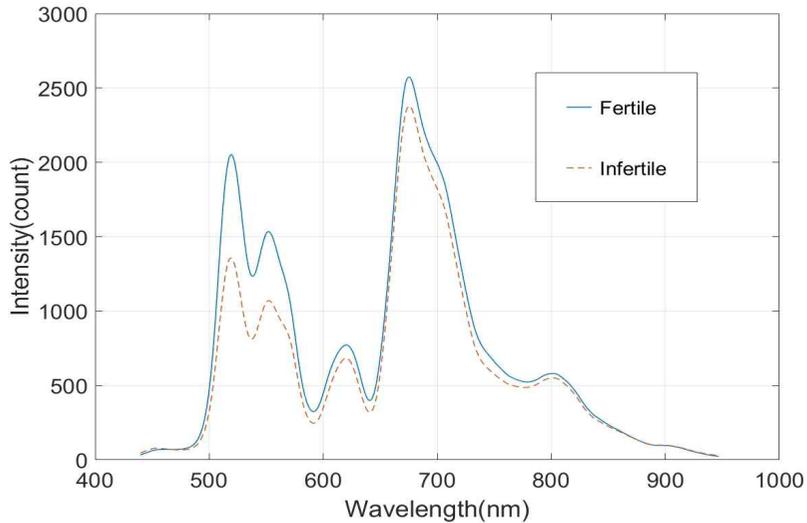


Fig. 3-15 Mean of the transmitted energy spectra of fertile and infertile egg at 0 hour incubation in VIS/NIR range. (Light source type B)

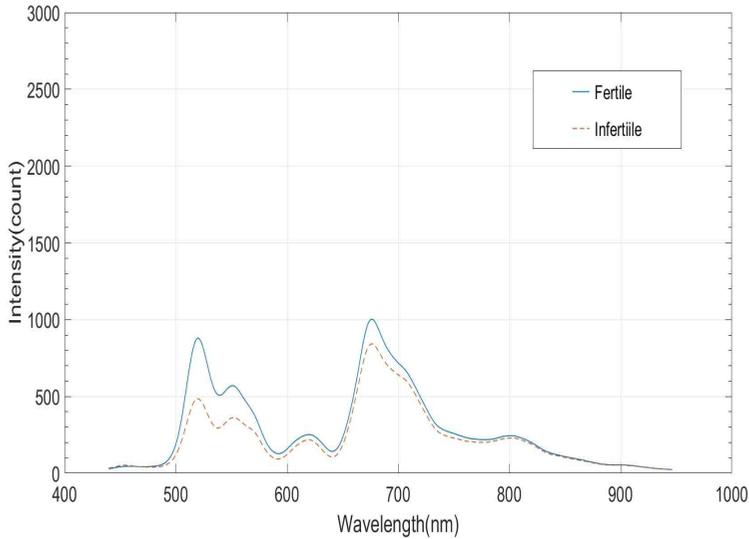


Fig. 3-16 Mean of the transmitted energy spectra of fertile and infertile egg at 72 hour incubation in VIS/NIR range. (Light source type B)

Fig. 3-17과 Fig. 3-18은 원시 스펙트럼으로 정규화한 스펙트럼을 나타낸다. 부화 시작 후 40시간이 경과할 때까지 유정란의 투과량이 무정란의 투과량보다 상대적으로 더 크게 나타나고 있다. 부화 시작 후 72시간이 지난 시점에서 광 투과량의 변화 비율은 0.3~1.0 사이 값을 가지며, 특히, 900nm 이후 파장에서의 값은 광원A를 사용할 경우 Fig. 3-14와는 다르게 1의 값에 근접하게 나타났다. 광원 B가 광원A보다 근적외선 영역의 광량이 풍부하므로 이에 따른 측정 오차가 줄어든 것으로 생각된다.

Fig. 3-18에서 A와 B파장은 Smith(2005) 등이 육용 갈색란의 정상 부화 진행 여부를 초분광 이미지로 검출하는데 있어 사용한 파장 대역이다.

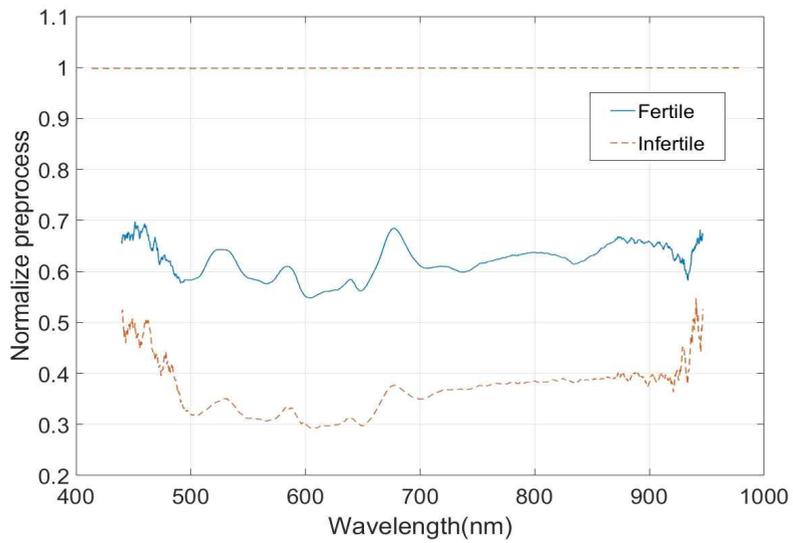


Fig. 3-17 Mean of the normalized energy spectra of fertile and infertile egg at 40 hour incubation in VIS/NIR range. (Light source type B)

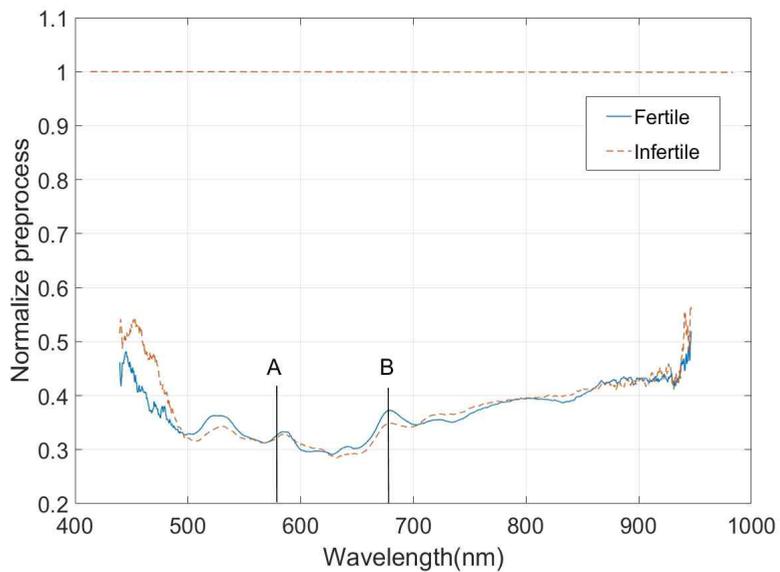


Fig. 3-18 Mean of the normalized energy spectra of fertile and infertile egg at 72 hour incubation in VIS/NIR range. (Light source type B)

3.4.2. 부화 시간에 따른 상관계수의 변화

(1) 가시광 영역 (광원 A : 청색과 녹색의 복합 LED 광원)

상관계수 그래프는 절대 값이 큰 파장일수록 회귀 분석, 즉 유·무정란의 판별에 상대적으로 큰 영향을 줄을 의미한다. Fig. 3-19와 Fig. 3-20은 각각 정규화하지 않은 스펙트럼과 정규화한 스펙트럼을 대상으로 구한 상관계수 그래프이다.

일차적으로 정규화한 스펙트럼의 상관계수(Fig. 3-20)가 정규화하지 않은 경우에 비해(Fig. 3-19) 상관계수 값의 범위가 증가함을 알 수 있다. 이는 정규화가 유·무정란 판별에 보다 유리함을 의미한다. 정규화하지 않은 스펙트럼을 이용하는 경우 450nm 부근의 파장(Fig. 3-19)이 무정란 판별에 상대적으로 큰 영향을 미침을 알 수 있다. 부화 40시간에서 유정란이 본격적으로 부화되기 시작하였고 56시간의 그래프를 보면 500nm이전의 영역에서 상대적으로 높은 음의 상관성이 발생하였다. 이는 노른자가 함유하고 있는 카로티노이드의 변화를 의미하는 것으로 판단된다.

정규화한 스펙트럼의 경우 부화 46시간과 56시간에서 상관계수가 -0.7~+0.7로 광범위한 파장에서 상대적으로 높게 나타나고 있다.

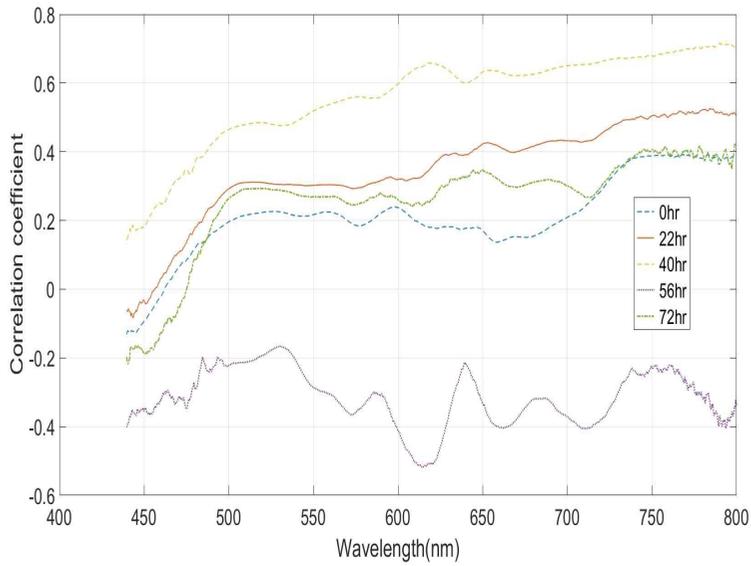


Fig. 3-19 Change of correlation coefficient obtained with raw energy spectra in visible range (Light source type A) during incubation period.

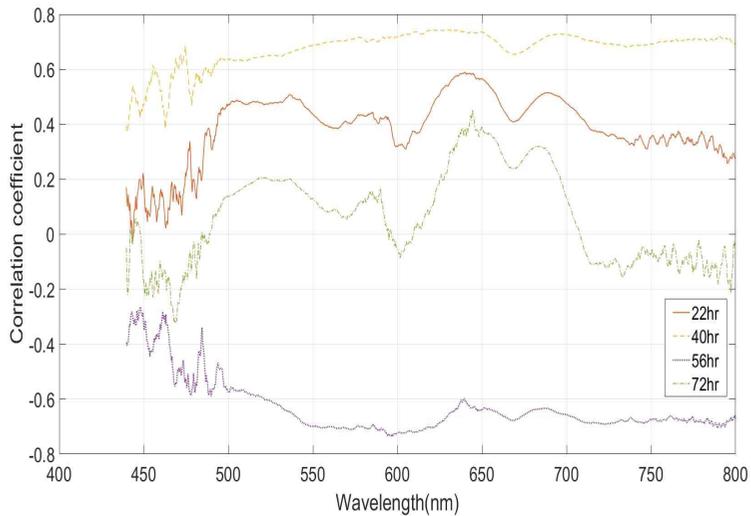


Fig. 3-20 Change of correlation coefficient obtained with the spectra normalized by the raw spectrum in visible range (Light source type A) during incubation period.

(2) 가시/근적외선 영역 (광원 B : 복합 LED 및 할로겐램프)

LED광원에 할로겐램프를 추가해 근적외선 영역의 광량을 높인 광원B를 조사한 실험의 스펙트럼의 분석에서 상관계수의 변화는 Fig. 3-21 및 Fig. 3-22와 같다. 전체적으로 600nm 이전 영역에서의 변화는 광원A를 사용하였을 때와 유사하였으나 600nm 이후에서 상관계수의 절대값이 증가하였다. 정규화를 하지 않은 경우 광원A를 사용한 경우와 마찬가지로 부화 40시간에서 유정란이 본격적으로 부화가 시작되면서 상관계수가 전 파장 대역에서 증가하였고 800nm 이후에서 강한 음의 상관계수가 나타났다. 이것은 Suzanne Duce (2011) 등이 연구한 내용에서 말한 배아 외 물질(EEF; Extra Embryonic Fluid)이 증가하면서 다른 물질이 발생하기 때문인 것으로 여겨진다.

부화 시작하기 전에 측정된 원시 스펙트럼으로 정규화 한 경우에는 450nm 부근에서 보다 900nm 부근에서 상관계수의 절대 값이 크게 나타났다. 500nm 이전과 840nm 이후에서는 증가와 감소의 패턴이 정반대의 경향을 보이고 있다. 이것은 유정란이 부화를 하면서 노른자의 색상과 형태가 바뀌며 또한 액상의 EEF가 만들어지면서 투과량이 많이 바뀐 것으로 여겨진다.

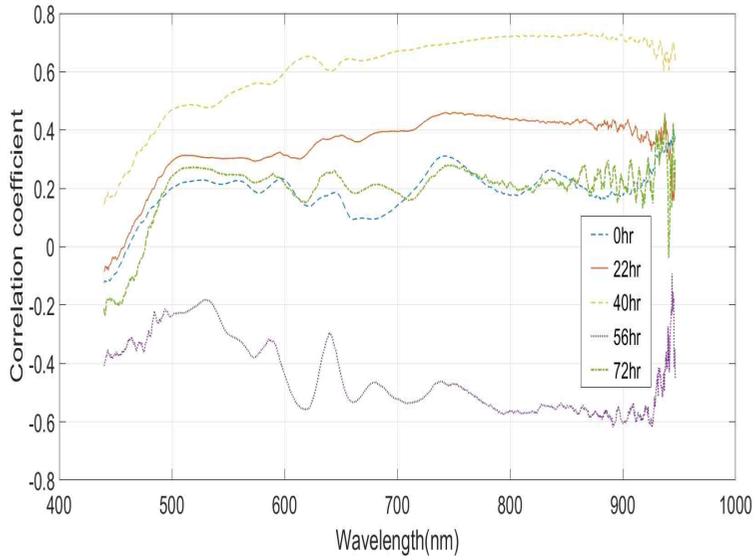


Fig. 3-21 Change of correlation coefficient obtained with energy spectra in VIS/NIR range (Light source type B) during incubation period.

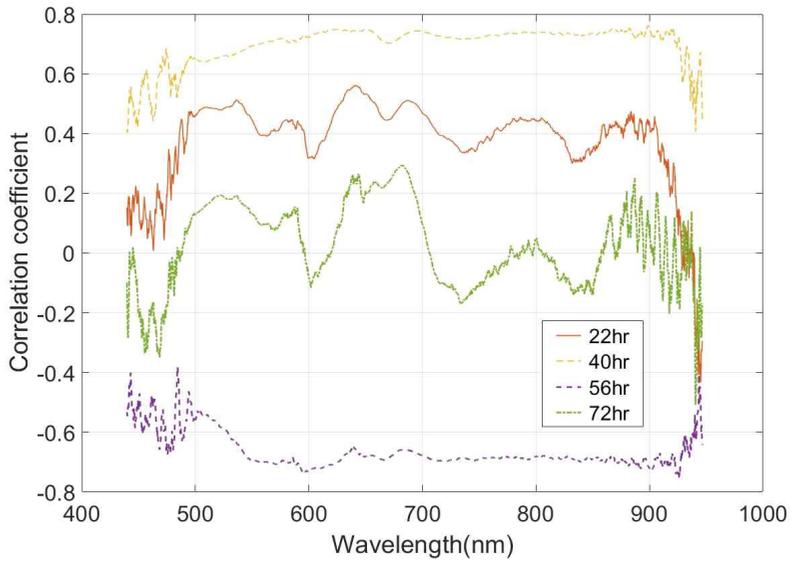


Fig. 3-22 Change of correlation coefficient obtained with the spectra normalized by the raw spectrum in VIS/NIR range (Light source type B) during incubation period.

3.4.3. 유·무정란의 관별

(1) 스펙트럼 전처리 효과

관별 모델(PLS-DA)을 개발할 때 원 스펙트럼(raw spectrum)을 대상으로 평활화, 미분, MSC, SNV, 정규화 등의 전처리를 수행한다. 대표적으로 부화 시작 48시간 후에 가시광 영역(광원A : 440nm~800nm)과 가시/근적외선 영역(광원B : 440nm~946nm)에서 측정된 2개의 스펙트럼 그룹을 대상으로 만든 모델의 전처리 효과를 살펴보면 Table 3-5 및 3-6과 같다. 광원A를 사용한 경우 전처리를 하지 않은 경우보다 전처리를 한 경우에 R^2 와 SEP가 우수한 것으로 나타났다. 전처리는 부화기에 넣기 전에 측정된 원시 스펙트럼으로 나눈 정규화와 MSC만을 수행하는 경우가 가장 좋은 성능을 나타내었다. 광원B를 사용한 경우에도 스펙트럼을 정규화하는 것이 유리하게 나타났으며 Smoothing, MSC, SNV의 전처리가 긍정적으로 나타났으며, 전체적으로 미분 전처리는 사용하지 않는 것이 바람직한 것으로 나타났다.

Table 3-4 Effect of preprocessing of spectrum data on performance of validation model in determining fertile and infertile egg at 48 hr incubation. (Light source type A)

No	Smoothing	Differential	MSC	SNV	Normalization	R^2	SEP	bias
1	-	-	-	-	-	0.44531	0.42301	-0.14772
2	-	-	0	-	-	0.52257	0.34877	-0.07261
3	0	-	0	0	-	0.49941	0.35647	-0.10253
4	0	0	0	0	-	0.59881	0.34287	0.03411
5	-	-	0	-	0	0.68126	0.28554	-0.01840
6	0	-	0	0	0	0.61708	0.3137	0.00393
7	0	0	0	0	0	0.23628	0.4609	0.11293

Table 3-5 Effect of preprocessing of spectrum data on performance of validation model in determining fertile and infertile egg at 48 hr incubation. (Light source type B)

No	Smoothing	Differential	MSC	SNV	Normalization	R^2	SEP	bias
1	-	-	-	-	-	0.27095	0.41955	0.02255
2	-	-	0	-	-	0.45370	0.36622	0.02661
3	0	-	0	0	-	0.40360	0.38098	0.03311
4	0	0	0	0	-	0.61977	0.30308	0.06942
5	-	-	0	-	0	0.65915	0.28841	-0.06587
6	0	-	0	0	0	0.52968	0.34889	-0.08176
7	0	0	0	0	0	0.14638	0.53943	0.10383

(2) 가시광 영역 (광원 A)에서 판별

Table 3-6은 부화가 진행함에 따라 유·무정란의 판별율을 나타내며, Table 3-7과 Fig. 3-26은 부화 56시간 후의 판별 결과 및 분포도이다. Table 3-6에서 부화 시작할 때(0hr) 판별율이 93.8%로 높은 것은 유정란과 무정란의 구별이라기보다는 생산한 농가 차이에 의한 일반 물성의 차이 때문에 발생한 것으로 생각된다. 부화 22시간대부터 판별율이 86.5%정도에 달하며, 부화 시간 56시간과 72시간에서 판별율은 각각 95.5% 및 97.2%로 높게 나타났다(문턱값 0.5). 이와 같이 판별율이 높은 것은 정규화, MSC, SNV 같은 전처리와도 연관이 있는 것으로 판단된다.

Table 3-6 Calibration and validation result of PLS-DA model in discriminating fertile and infertile egg in VIS range during incubation. (Light source type A)

Sample	Incub. Hour	Preprocessing	No. of LV	R ²	SEC	CDR(%)
					SEP	
Fertile vs Infertile	0	MSC SNV	9	0.79366	0.24717	97.2
				0.64595	0.30119	93.8
	22	MSC Normalize	5	0.6687	0.2996	92.0
				0.5018	0.3445	86.5
	40	MSC Normalize	5	0.7666	0.2515	97.2
				0.6455	0.2936	91.7
	56	MSC SNV Normalize	6	0.8226	0.221	97.2
				0.7637	0.2390	95.5
	72	MSC Normalize	7	0.8420	0.2115	97.2
				0.7337	0.2580	97.2

* LV : Latent variable, CDR : Correct Discrimination Rate

Table 3-7 Validation results of PLS-DA model in the discrimination of fertile or infertile in VIS range after 56hr incubation. (Light source type A)

Actual By model	Class 0(18)	Class 1(29)	CDR(%)
Class 0 (Infertile)	17	1	94.4
Class 1 (fertile)	1	28	96.6
Average			95.5

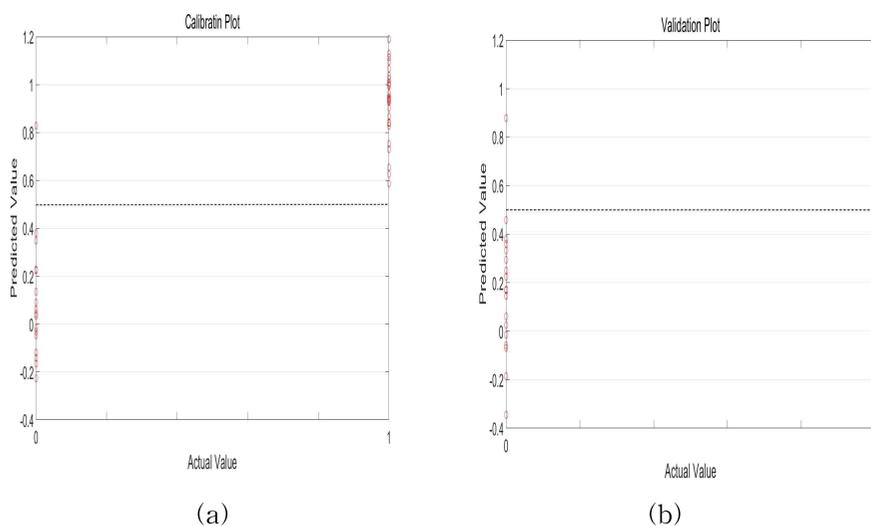


Fig. 3-23 Calibration and validation results of PLS-DA model in VIS range after 56 hr incubation. (Light source type A)

(2) 가시/근적외선 영역(광원 B)에서 판별

Table 3-8은 부화시간 경과에 따른 판별율을 나타내며 부화 40시간부터 판별율이 87.2%로 가시광 영역서의 판별보다 낮은 값을 보여준다. Table 3-9와 Fig. 3-27은 부화 56시간 후의 판별율과 분포도를 나타낸다. 부화 56시간부터 R²는 0.8이상, SEP는 0.3이하를 보이고 판별율이 90% 이상을 보이기 때문에 모델의 안정성이 증가한 것으로 판단된다. 이 분석 결과에서도 Table 3-6에서와 같이 정규화가 전처리에 포함됨을 알 수 있다.

Table 3-8 Calibration and validation results of PLS-DA model in discrimination of fertile or infertile in VIS/NIR range (Light source type B) during incubation.

Sample	Incub. Hour	Preprocessing	No. of LV	R ²	SEC	CDR(%)
					SEP	
Fertile vs Infertile	0	Smoothing MSC SNV	7	0.65668	0.31074	92.8
				0.64182	0.29433	89.3
	22	MSC Normalize	5	0.68470	0.29225	91
				0.64988	0.29419	90.7
	40	MSC Normalize	6	0.86858	0.19103	94.4
				0.59865	0.32640	87.2
	56	MSC Normalize	6	0.88692	0.17615	97.2
				0.6304	0.29987	91.7
	72	MSC Normalize	9	0.93113	0.14378	97.2
				0.81715	0.21745	97.2

* LV: Latent variable CDR: Correct Discrimination Rate

Table 3-9 Validation result of PLS-DA model in discriminating the fertile and infertile egg after 56 hour incubation. (Light source type B)

Actual By Model	Class 0(18)	Class 1(29)	CDR(%)
Class 0 (Infertile)	15	3	83.3
Class 1 (fertile)	0	29	100
Average			91.7

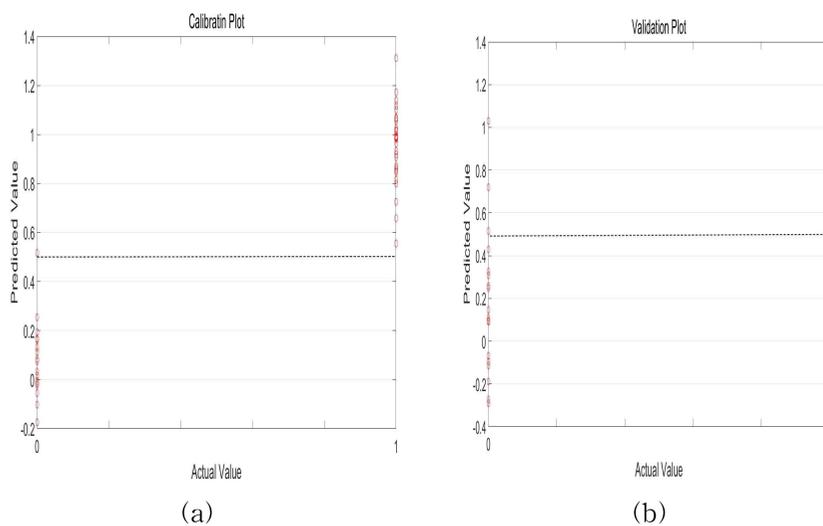


Fig. 3-24 Calibration and validation results of PLS-DA model in VIS/NIR range after 56 hr incubation. (Light source type B)

3.5. 요약 및 결론

우리나라 부화장에서 무정란은 부화 5~7일째 주로 인력에 의해 검출되며, 검출된 무정란은 전량 폐기되고 있다. 이 연구는 무정란을 분광분석법을 이용하여 조기에 자동으로 판별하는 기술을 개발함으로서 소요 에너지와 인력 절감은 물론 상대적으로 신선도가 덜 떨어진 무정란을 다른 목적으로 사용할 수 있도록 하기 위해 수행되었다. 투과 스펙트럼을 측정을 위해 청색 및 녹색 LED로 구성된 가시광 위주의 복합 광원(광원A)과 가시광 및 근적외선을 조사하는 다른 복합 광원(광원B)을 제작하고, 분광분석법을 이용하여 무정란 판별 모델을 개발하고 판별한 결과는 다음과 같다.

1. 부화가 진행되는 초기 72시간 동안 투과 스펙트럼을 측정한 결과 스펙트럼의 강도는 가시 및 근적외선 대역(440~950nm)에서 점차적으로 감소하였으며, 무정란이 유정란보다 부화 초기에 강도 변화가 크게 나타났으며 무정란이 초기 열의 변화에 더 민감한 것으로 생각된다.
2. 유·무정란 판별과 관계되는 파장 대역을 살펴보기 위해 상관계수 스펙트럼을 분석한 결과 가시광 영역의 경우 450nm 부근에서 0.7 정도의 상관계수가, 그리고 가시/근적외선 대역의 경우 900nm 이상에서 0.75 정도의 상관계수가 관찰되었다. 이와 같은 결과는 부화 과정에서 노른자의 색상변화, 혈청 및 수분 생성 등과 관계되는 것으로 판단된다.
3. PLS-DA 판별모델 개발에서 평활화, 1차 미분, MSC, SNV, 스펙트럼 정규화 등의 영향을 분석한 결과 평활화, MSC, SNV, 정규화 등은 판별 모델 성능 향상에 긍정적인 영향을 주었으며, 1차 미분은 부정적인 영향을 주었다. 특히 부화기에 투입하기 전에 각 시료를

대상으로 측정된 원시 스펙트럼을 분모로 하여 각 시료의 스펙트럼을 정규화한 경우에 상관계수가 증가하였으며, 판별 모델의 성능 향상(R^2 , SEC, SEP)에 큰 영향을 미치는 것으로 분석되었다.

4. 개발된 PLS-DA 판별 모델은 광원A(가시광)의 경우 부화 22시간부터 유·무정란 판별율이 86.5% 정도로 나타났으며 시간이 지날수록 판별율이 약간 증가하고 모델의 안정성이 향상되었다. 광원B(가시/근적외선)의 경우 부화 22시간부터 판별율이 90.7% 정도였으며, 부화 시간이 경과함에 따라 가시광에서와 같이 판별율의 안정성이 향상되는 것으로 나타났다. 결과적으로 부화 56시간 정도에서 광원에 상관없이 모두 판별율이 92% 이상 되는 것으로 판명되었다. 이와 같은 조기 판별은 본 연구에서 개발한 원시 스펙트럼을 이용한 정규화 전처리와 관계가 깊은 것으로 생각된다.

5. 본 연구에서는 극히 제한된 시료를 사용하여 조기 판별에 대한 가능성을 제시하였다. 앞으로 부화 초기에 유·무정란 판별이 가능한 자동 부화 장치를 개발하기 위해 보다 다양한 유·무정란 생산 농가로부터 시료를 확보해서 판별율 검증을 위한 추가적인 실험이 필요할 것이다.

VI. MR 영상 분석을 이용한 무정란의 조기 검출 및 분광분석법에 의한 형상 지수 예측

4.1. 서 언

자기공명 영상 기술은 X-ray 단층 영상과 함께 시각적으로 확인할 수 있는 강력한 비파괴 품질 평가 기술로 주로 의학 분야에서 질병 진단용으로 널리 활용되어 왔다. 전기, 전자, 컴퓨터 공학의 발전과 함께 그 관련 장비 가격이 하락하여 최근에는 이용 분야가 식품 공학 및 농학 분야에까지 확대되고 있다. 특히 아직 농산물의 선별 시스템에 적용되어 실용화 되지는 않았지만 현재 식품의 제조 공정에 온라인 센서로서 활용이 되기 시작하여 지금은 상용화 준비 단계에까지 이르렀다. 최근 박수현(2014) 등은 밤의 내부 품질을 예측할 수 있는 기술 개발과 관련하여 자기공명 영상(MRI; Magnetic Resonance Image)을 이용한 내부 결함 조직 검출 알고리즘에 대한 연구를 시도하였다. Zhang(2012) 등은 석류의 black heart 현상을 검출하는 것이 가능하다고 하였다. 국내 연구진들도 마찬가지로 복숭아, 홍삼 및 소고기 등 다양한 농산물의 품질을 계측하는 연구 등과 식품 공정에의 활용에 많은 연구를 시행하고 있다.

2장의 연구사에서 언급한 바와 같이 Klein(2002), Falen(1991), Bain(2007) 등은 분해능이 높은 7T MRI장비를 이용하여 계란의 부화 과정에서 배반의 위치, 부화 시간에 따른 노른자의 모양과 구조를 관찰하고, 뇌, 간, 심장, 등 장기의 발달 과정을 모니터링 한 바 있다. 또한 Suzanne Duce(2011) 등은 메추리(Japanese quail)알을 대상으로 부화 5일 동안 배반과 노른자의 부피 변화를 관찰하는 연구를 수행한 바 있다. 이들 연구의 목적은 유정란의 조기 판별 보다는 부화 시간에 따른 구조 및 형상 변화와 새로운 물질 형성에 초

점을 맞추고 있다.

이 연구에서는 실용화를 목적으로 최근에 이스라엘에서 개발된 저자장인 1.0 Tesla MRI를 이용하여 부화 과정에서 유·무정란을 판별할 수 있는 형상 지수를 개발하는데 있다. 나아가서 이와 같은 형상 지수를 3장에서 수행한 분광분석법을 이용하여 예측 가능한지 그 가능성을 살펴보고자 한다.

일반적으로 MRI는 대상체에서 수분과 같은 특정 성분의 밀도 변화에 기반을 두고 있고, 분광분석법은 복합적인 성분 변화 및 통계 분석에 기반을 두고 있다. 따라서 MRI에서 개발된 형상 지수를 분광분석법에서 목표값(y 값)으로 하여 이를 예측할 수 있다면 분광분석법을 이용하여 무정란을 검출하는 모델 개발 및 이용에 큰 도움이 될 것으로 판단된다.

이 연구에서는 1차적으로 1.0T MRI를 이용하여 부화 과정에서 획득한 영상을 대상으로 (1) 부화 시간에 따라 변화하는 영상의 특징을 관찰할 수 있는 영상 처리 알고리즘을 개발하고, (2) 영상의 특징을 이용하여 유·무정란을 판별할 수 있는 형상 지수를 개발하며, 그 값으로 정상 부화 여부를 판명할 수 있는지 그 가능성을 구명하고, (3) 형상 지수를 3장에서 사용한 분광분석법으로 예측 가능한지 구명하고자 한다.

4.2. 재료 및 방법

4.2.1. 공시 재료

계란의 MR 영상 획득 및 분석을 통한 정상 부화 여부의 판명 가능성을 구명을 위한 형상 지수 설정과, 이 형상 지수를 3장에서 적용한 분광분석법을 이용하여 예측 가능한지 알아보기 위해 실험을 2차례 수행하였다. 각 실험을 위해 사용된 시료는 Table 4-1과 같다. 유정란은 여주의 에텐농장에서 구입하였고, 무정란은 평창의 서울대 목장에서 구입하였으며, 무게는 58g~62g사이의 것이었다.

시료 그룹 #1은 MR 영상을 획득하여 부화 시간에 따른 형상 지수 변화의 분석에 사용하기 위한 실험의 시료이며, 그룹 #2는 MR 영상을 획득하고, 투과스펙트럼을 측정된 다음에 유·무정란의 조기 예측이 가능한 형상 지수에 대하여 그 값을 분광분석법으로 예측 가능한지를 알아보기 위한 실험의 시료이다.

Table 4-1 Egg samples for analysis of shape index and for prediction of shape index with spectroscopic method.

Sample Group	No. of egg sample	Remark
#1 (Shape Index)	Breed : Hy-line Brown No. of fertile : 40 No. of infertile : 10	Measurement of MR images and analysis of shape index
#2 (Prediction of shape index)	Breed : Hy-line Brown No. of fertile: 34 No. of infertile : 3	Measurement of MR images and spectrum data to predict shape index with spectroscopic method

4.2.2. MRI 장비

자기공명 기술은 다양한 농산물의 화학적 성분이나 내부 구조를 고려한 농산물의 품질 평가에 아주 유용하다는 것이 여러 연구자에 의해서 밝혀졌다. 자기공명 기술의 중요한 장점은 계란을 껍질을 파괴하지 않는 비파괴적으로 내부 조직의 변화를 관찰할 수 있고 이에 따라 부화 과정을 모니터링 할 수 있다는 것이다. MR 영상획득 실험은 전북대학교 농업기계 ICT융합 연구소에 설치된 1.0 Tesla 산업용 자기공명영상 시스템을 이용하여 실시하였다. Fig. 4-1은 본 연구에 사용된 장치로 영구 자석을 이용한 소형의 시스템으로 농산물의 물성 파악에 사용할 수 있는 시스템이다.

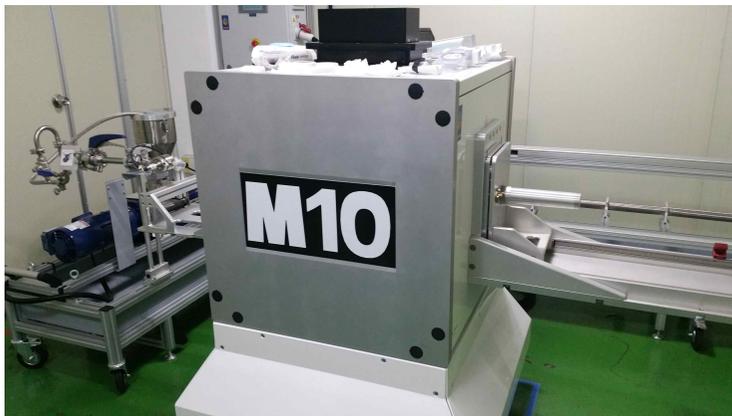


Fig. 4-1 Photo of MRI system. (Aspectimaging, Israel)

Table 4-2 Specification of MRI system.

	specific
Model name	M10
Manufacture	Aspectimaging, Israel
Magnet	1 Tesla permanent magnet
FOV(Flip Of View)	70mm
Maximum bore size	110mm

4.2.3. 트레이 및 홀더의 제작

MR 영상을 측정할 수 있는 샘플의 크기는 홀더의 구경에 따라 다양하며 홀더의 구경에 따라 해상도와 영상의 품질이 좌우된다. 본 실험에서는 제조사의 시퀀스에 맞출 수 있는 80mm 타입을 선택했으며 홀더 안에 계란을 고정할 수 있는 트레이를 별도로 제작하였다.

트레이는 시중에 판매되고 있는 특란 10개의 크기를 측정하여 평균에 가까운 것을 골라 누운 상태로 안착될 수 있도록 모형을 만들었으며(Fig. 4-2) 방향이 바뀌지 않도록 키 홈을 만들어 표시하였다. 트레이 밑면의 길이는 가로, 세로가 각각 47mm, 72mm이었다. 모형을 복제할 수 있는 실리콘 틀을 만든 다음 레진이라고 불리는 폴리우레탄으로 대량 복제하였다. VIS/NIR 투과 스펙트럼 측정할 목적으로 누광 방지를 위해 검정색 무광 고무(주성분 : 이소프로필 부타디엔)로 코팅하였고, 정 중앙 부위에 10mm의 구멍을 뚫어 설치하였다.

80mm 테프론으로 트레이가 안착할 수 있도록 중간에 홈이 파여 있는 반달 기둥 모양의 홀더를 만들었으며, 홀더의 윗부분 끝에 레퍼런스용 오일을 담을 수 있도록 일정한 길이와 깊이를 가지는 홈을 만들었다.



Fig. 4-2 Egg sample and tray.

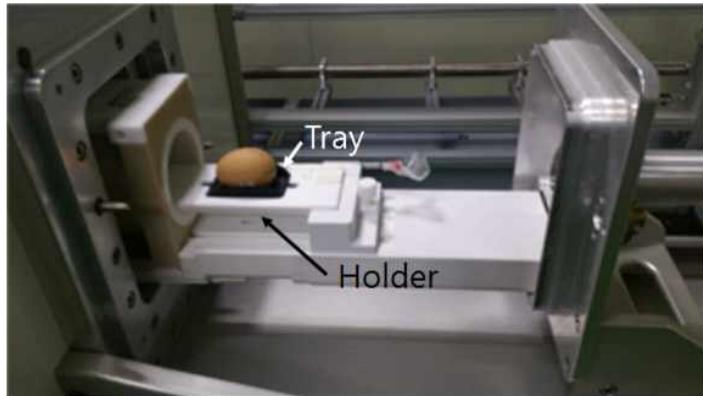


Fig. 4-3 Appearance of sample holder and tray to measure MR image.

4.2.4. 부화 과정 모니터링 및 MR 영상의 획득

시료를 부화기에 넣기 전에 TR=14ms, TE=4ms, flip angle=20°으로 MR 영상을 측정하였다. 부화 시작 후 처음 1일 동안은 큰 변화가 없는 것을 고려하여 부화기에 입란 후 2회 차 측정은 부화 22시간 후에 측정하였으며, 그 이후 측정시간 및 측정 조건은 Table 4-2에서 보는 바와 같다.

Table 4-3 Conditions to measure MR image from the egg sample during incubation.

	Number of measurement							
	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	8th
Incubation time(hr)	0	22	32	40	48	56	64	72
Sequence name	Amos Gradient Ec							
Flip angle	20°							
Slice thickness	1mm							
TR	14ms							
TE	4ms							

MR 영상 획득 시 시료의 단층 두께는 1mm로 총 64개의 분할된 3차원 영상을 얻었다. 이 중에서 이미지 분석에는 트레이에 구멍이 뚫려 있는 부위인 28~37번째 축 방향(axial) 슬라이스만을 이용하였다.

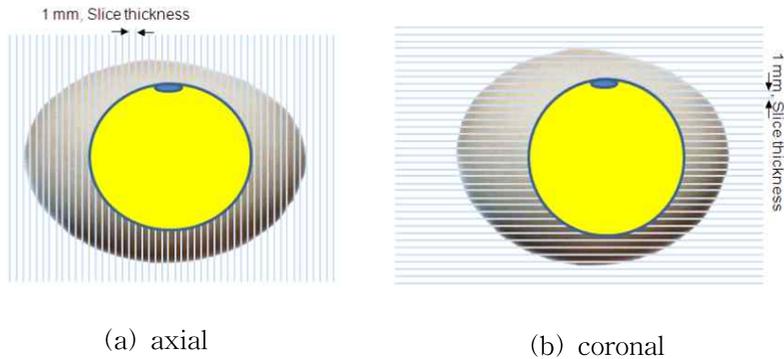


Fig. 4-4 Measuring direction.

부화가 진행되는 것을 확인할 수 있는 지표를 만들기 위해 윤곽선을 추출하는 것이 필요하다. 기초 실험을 통해 노른자의 모양이 변화되는 것을 확인했으며 이에 따라 노른자의 모양을 정상 부화 판정에 사용하기 위해 형상 지표로 사용하였다. 매틀랩으로 디콤 (.Dicom) 파일을 읽어 들인 후 gray scale로 전환하였다(Fig. 4-5 (a)). 오일의 평균 밝기로 전체를 나누어 온도에 의한 상의 변형, 오차를 줄였다. 문턱값을 0.6으로 설정하여 노른자 부분만을 선택하였으며 Fig. 4-5의 (b)처럼 sobel mask를 사용하여 윤곽선을 추출하였다. 윤곽선 내부와 외부의 영역을 없애기 위해 침식과 팽창 작업을 수행하였고 최종적으로 Fig 4-5의 (e)처럼 레퍼런스 오일의 흔적을 없앨 수 있었다.

완성된 외형 추출선을 처음의 gray scale 이미지에 흰색(255값)으로 덧씌워 추출되었음을 확인하였다(Fig. 4-5 (f)).

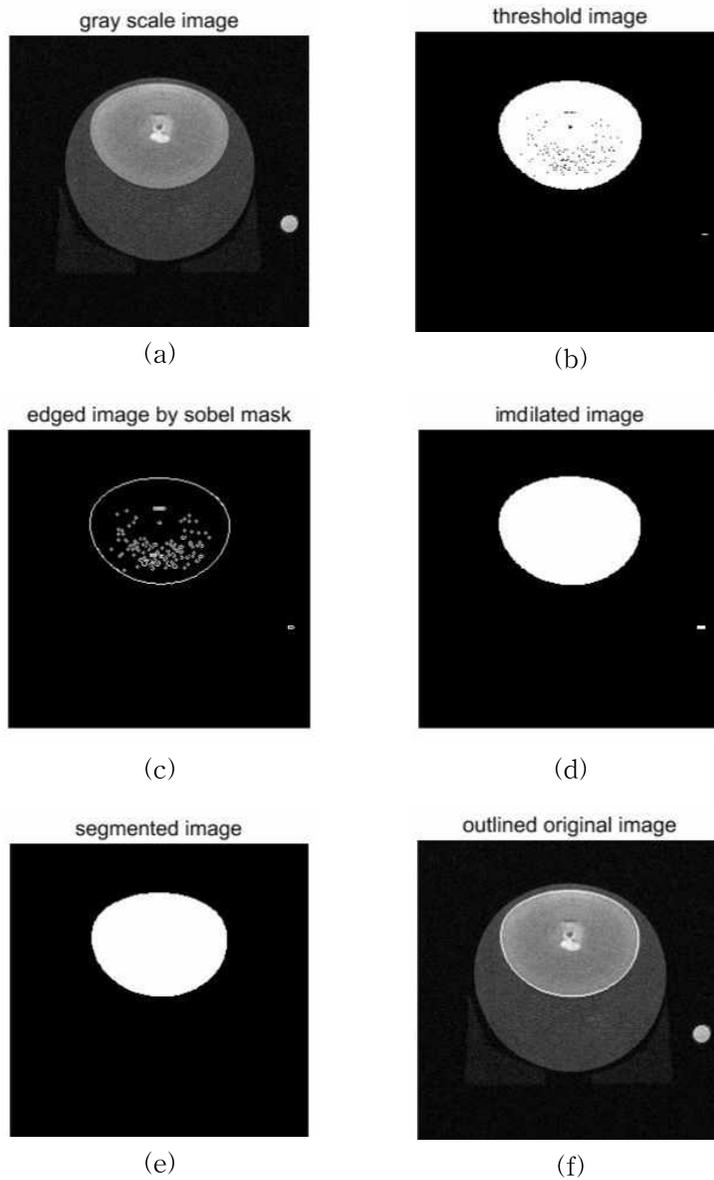


Fig. 4-5 MR image process to acquire boundary of egg yolk. (a) converted to gray scale image, (b) threshold image, (c) edged image, (d) dilated image, (e) segmented image, (f) overlaid image with boundary of yolk

Table 4-4는 윤곽 추출 과정에 사용한 함수와 함수 값을 나타낸 것으로 노른자와 껍질의 경우 문턱값에서 각각 0.6과 0.26으로 차이를 주었다.

Table 4-4 Given values for image processing function provided by MATLAB.

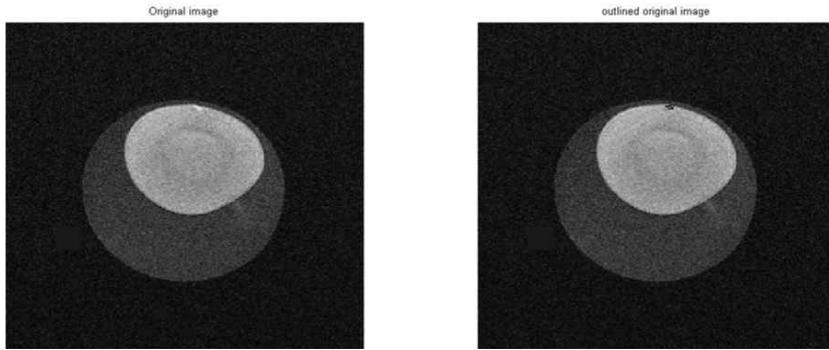
Function	York outline	Egg_white(cell) outline
edge	sobel mask	sobel mask
threshold	0.6	0.26
strel	line, LEN=3, DEG=90	line, LEN=3, DEG=90
imdilate	[se90 se0]	[se90 se0]
imfill	holes	holes
imclearborder	conn=4	conn=4
strel	diamond, R=1	diamond, R=1
imerode	strel	strel
bwboundaries	conn=8, holes	conn=8, holes

부화 전 계란의 신호를 보다 세밀하고 선명한 영상으로 구현하기 위해 예비 영상 획득 실험에서 얻은 영상 분석을 통해 측정 조건을 정하였다. TE(Echo Time)은 4.0ms로 설정하고 신호로는 'Amos Gradient Ec' sequence, 이미지 해상도는 256 x 256 픽셀로 실험을 실시하였다. TR(Repetition Time) 변화를 주면서 노른자의 중심에 대한 배아 부분의 콘트라스트 값과 면적이 어떻게 변하는지 관찰하였다.

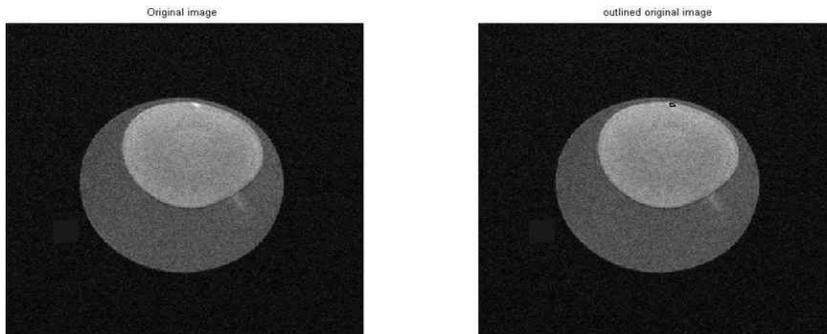
TR의 값을 40ms, 60ms, 90ms, 150ms, 230ms, 500ms으로 변화를 주면서 배아와 팬더핵 부분의 밝기를 계란의 노른자 중앙 부분 (40pixel x 20pixel)으로 나누어 TR값이 증가함에 따라 콘트라스트 값이 1.8에서 3까지 증가하는 것을 확인하였다.

배아 부분의 면적은 배아, 팬더핵, 라테브라 넥의 일부로 구성되어 있다. MRI 원 영상은 256 x 256 정수형(unit 16)의 dicom파일로 되어 있으며 배아 부분이 가장 밝으므로 배아 부분을 1, 가장 어두운 부분을 0으로 하는 256 x 256 실수형(double)으로 변환하여 문턱 값 0.85을 설정한 뒤 Table 4-4에 나타나 있는 함수들로 영상 처리하여 배아 부분의 면적을 구하였다.

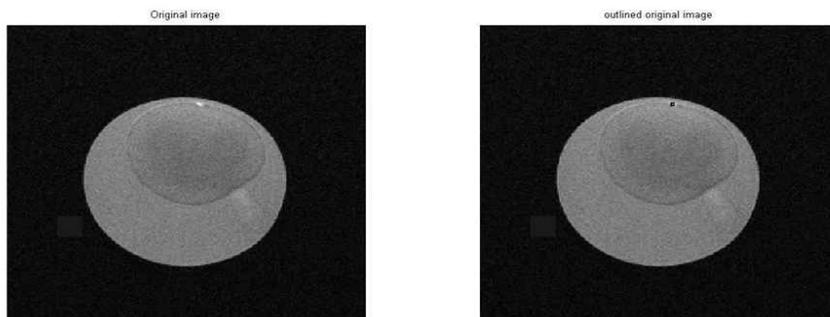
TR 값이 증가함에 따라 콘트라스트의 값은 증가하지만 추출한 면적의 값은 작아지는 경향을 보였다(Fig. 4-6). 특히 230ms을 넘어 설 경우 배반의 밝기 이상인 부분이 다수 존재하여 외형을 추출하기가 어려웠다. 그리고 부화 과정에서 신속하게 영상을 분석해야 하는 제약조건 때문에 가급적 TR 값은 작은 값을 선택하여 본 실험에서 TR=14ms, TE=4ms를 이용하였다.



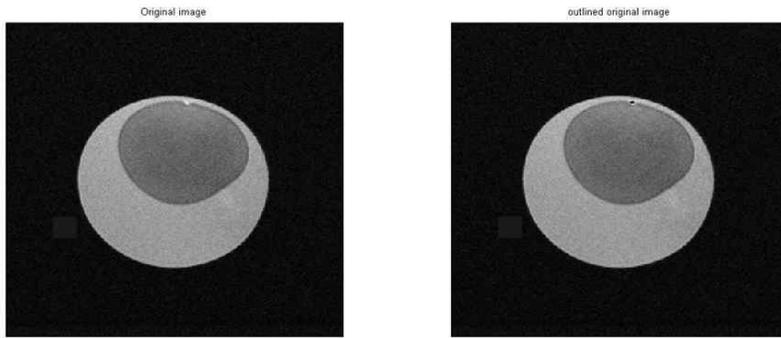
(a) $TR=20ms$, $TE=4ms$



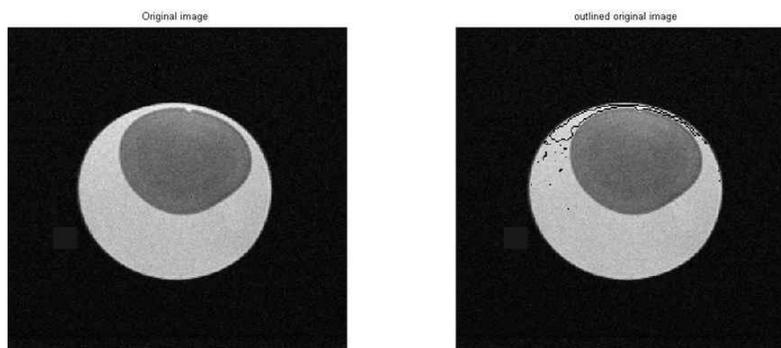
(b) $TR=40ms$, $TE=4ms$



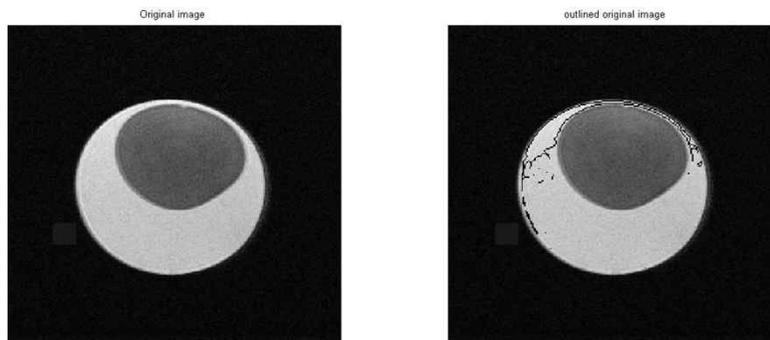
(c) $TR=90ms$, $TE=4ms$



(d) TR=150ms, TE=4ms



(e) TR=230ms, TE=4ms



(f) TR=500ms, TE=4ms

Fig. 4-6 Change of image contrast and area of germinal disk due to TR(ms).

4.2.5. 형상 지수의 설정

부화 과정 중에 노른자의 형상 변화를 계량적으로 표시하기 위해 일차적으로 Fig. 4-7에 나와 있는 것처럼 노른자(난황)의 경계선(검은 실선), 면적(Area), 중심(Centroid), 장축(Maj_Ax)과 단축(Min_Ax) 길이, 경계선 길이(Boundary length) 및 흰자의 외곽 경계선(흰색 실선) 등을 구하였다. 다음으로 형상 변화를 나타내기 위한 지수로 원형도(Circularity), 장단축의 비(Ratio of major axis/minor axis), 노른자 중심에서 상단 및 하단까지의 거리의 비($YLR=NL/SL$), 노른자 중심에서 껍질 및 노른자 상단사이의 거리($LD=NL_C-NL$) 등을 설정하였다. Fig. 4-7에서 노른자의 외곽선 중 흰색으로 나타난 부분은 노른자의 형상이 바뀔에 따라 측정하여 계산하는 영역이다.

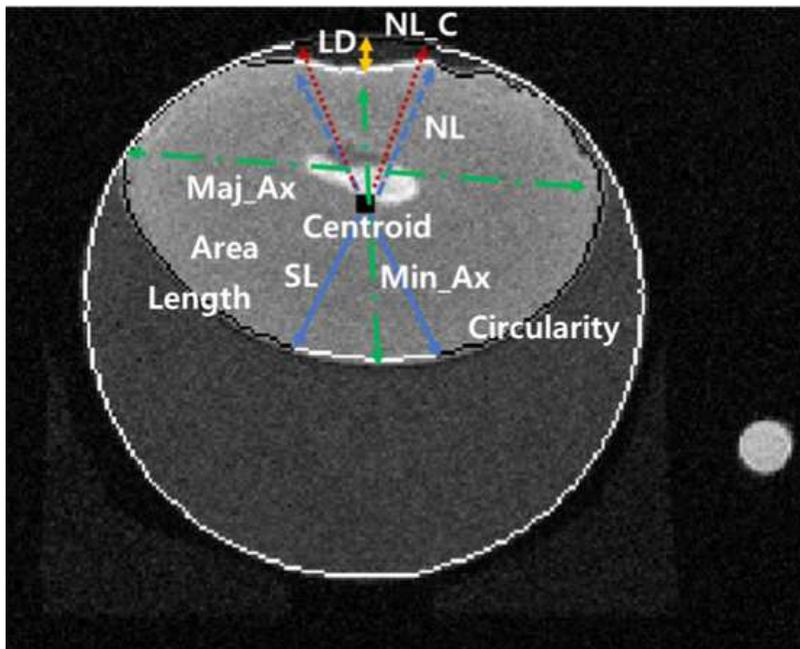


Fig. 4-7 Measurement variables to define shape index of yolk.

각종 측정 변수와 형상 지수에 대한 정의는 Table 4-5와 같다.

Table 4-5 Definitions of shape index presenting changes in geometrical features of yolk image during incubation. (Refer to Fig. 4-7)

No	Shape index	Definition
1	CYE : Circularity of York Ellipse	$\frac{4\pi A}{\ell^2}$: A= area of yolk. ℓ = length of yolk boundary
2	RYE : Ratio of York Ellipse	(Major axis/Minor axis)of yolk image
3	YLR : York Length Ratio	Ratio of the length from the centroid to the top surface and the length to bottom surface of yolk (NL/SL)
4	YSD : York Space Distance	Difference between the distance from the centroid to shell and the distance to the top surface of yolk (NL_C - NL)

4.2.6. 형상 지수 예측을 위한 투과 스펙트럼 측정 및 분석

그룹 #2를 대상으로 투과 스펙트럼을 측정하기 위해 Fig. 4-3에서 제시된 샘플 트레이와 Fig. 3-7, Fig. 3-8에서 제시된 광원과 측정 장치를 사용하였다. 스펙트럼을 이용한 형상 지수 예측은 스펙트럼 측정 당시에 MR 영상 분석 결과 획득한 형상 지수를 목표값으로 하고 PLSR(Partial Least Square Regression)모델을 이용하여 회귀 모델 개발 및 검증을 실시하였다. 스펙트럼 측정 조건과 장비들은 Table 4-6에 나와 있는 것처럼 그룹 #1때와 동일하다.

Table 4-6 Conditions to measure MR image and transmitted energy spectra from the group #2 egg samples during incubation.

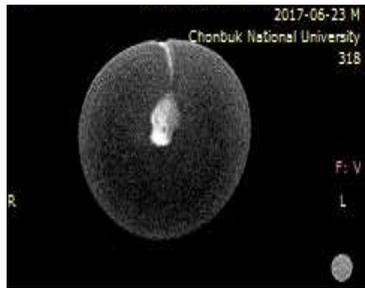
		1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	8th
Incubation time(hr)		0	22	32	40	48	56	64	72
MRI acquisition	Sample No.	fertile 34, infertile 3							
	Sequence	Amos Gradient Ec							
	TR	14ms							
	TE	4ms							
Spectra acquisition	Sample No.	fertile 34, infertile 20							
	Light source	Light source type A Light source type B							
	Spectrometer	USB2000							
	Integration time	700msec							
	No. of spectrum for average	2							
	Boxcar for smoothing	6							

4.3. 결과 및 고찰

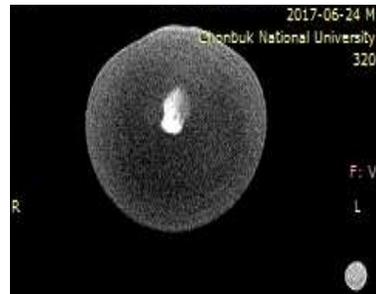
4.3.1. 부화 시간에 따른 MR 영상에서의 형상 변화

(1) 유정란의 형상 변화

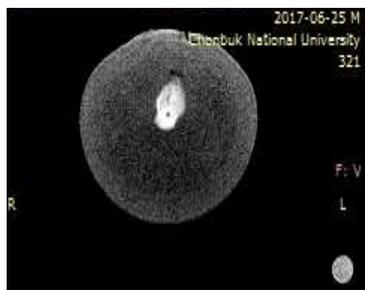
MRI 측정 장치에서 제공하는 이미지 파일은 256×256 해상도를 가지고 있는 DICOM파일이다. Radiant DICOM Viewer(Ver 3.4.3, 64bit, Medixant, Poland)를 이용하여 수동으로 명도를 임의로 조절하여 시각적으로 가장 알아보기 쉬운 상태, 곧 가독성이 제일 좋은 상태로 만들어 Fig. 4-8처럼 노른자의 형상 변화를 관찰하였다. 시각적으로 관찰하였을 때(Fig. 4-8, Fig. 4-9) 부화 22시간에서 노른자 중심의 윗부분이 부풀어 오르고 이후 줄어들기 시작하여 40시간에서 많이 사라짐을 확인할 수 있다. 부화 48시간에서는 윗부분이 아랫부분보다 길이가 줄어들어 있음을 알 수 있다. 노른자의 단면적(Area)은 부화가 진행됨에 점점 감소하는 경향을 나타내었고 원형도(Circularity)도 시간이 진행됨에 따라 원형에서 타원형으로 바뀌에 따라 값이 감소하는 경향을 보였다. 노른자의 중심에서 노른자 윗부분과 아랫부분까지 길이의 비를 의미하는 YLR(York Length Ratio)은 48시간에서 최대였다가 이후 감소하는 경향을 보였다. 이와 반대의 경향을 나타내는 것은 노른자 윗부분과 알 껍질과의 거리를 나타내는 YHD(York Hight Difference)이다. 노른자의 윗부분이 부풀어 오르면서 껍질과의 거리는 줄어들지만 48시간 이후에서 노른자 윗부분이 사라지면서 공간은 늘어나게 되어 결과적으로 YHD값은 증가하였다. 노른자가 옆으로 퍼지면서 장축 값(Maj_Ax)은 증가하고 단축 값(Min_Ax)은 감소하고 두 축의 비율인 YER(York Ellipse Ratio) 값은 증가하였다.



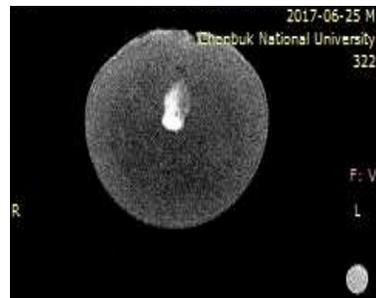
(a) 0hr



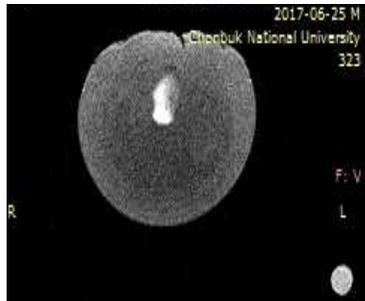
(b) 22hr



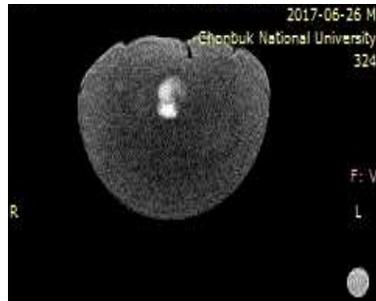
(c) 32hr



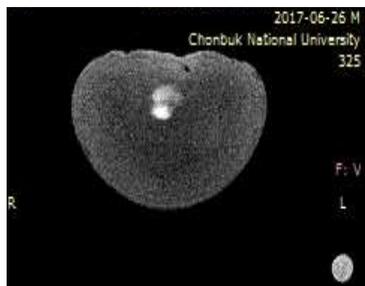
(d) 40hr



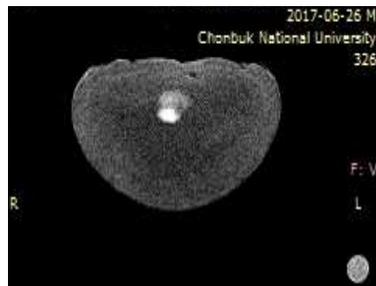
(e) 48hr



(f) 54hr



(g) 64hr



(h) 72hr

Fig. 4-8 Change in the image of fertile egg's yolk during incubation.

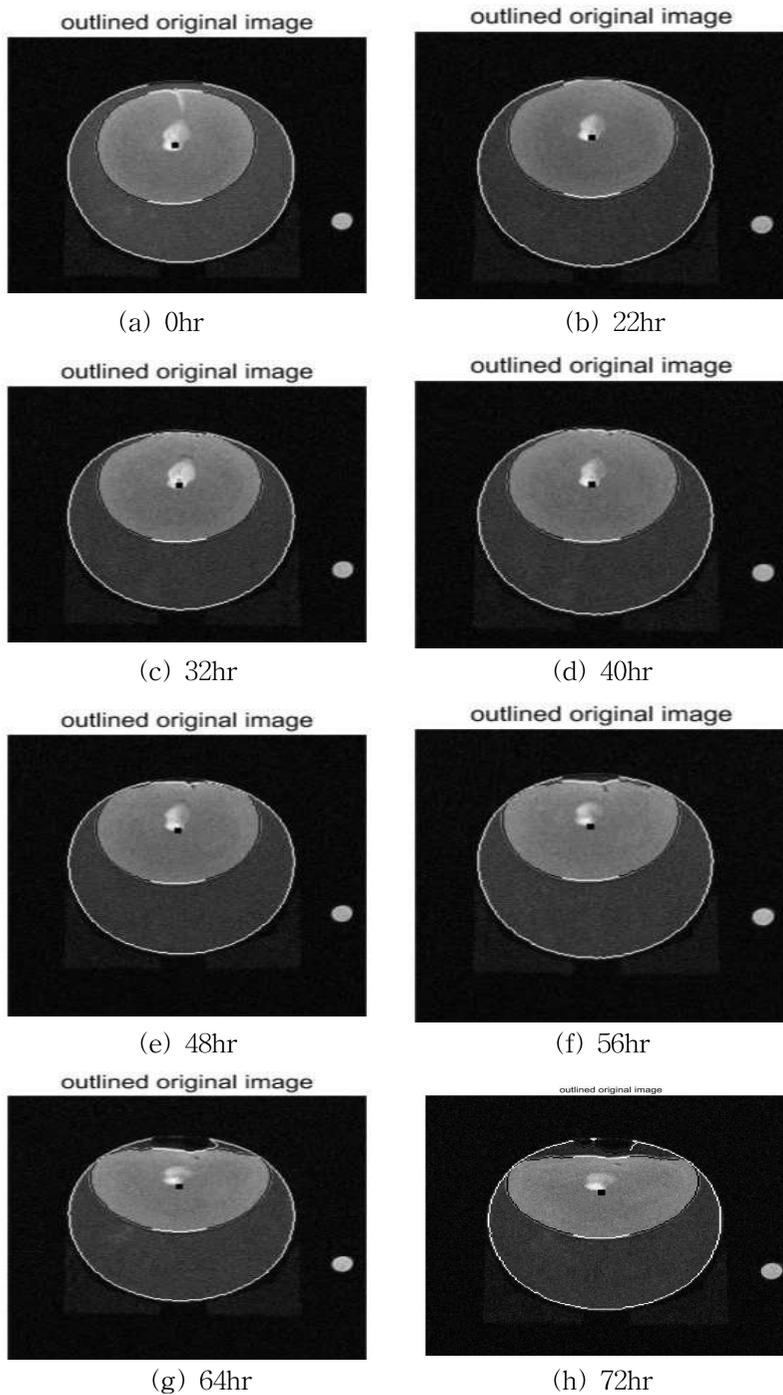


Fig. 4-9 Extraction of boundaries of yolk and shell using the #34 slice image of a fertile egg and its shape change during incubation.

(2) 무정란의 형상 변화

무정란은 부화 시간에 따라 외형상의 큰 변화는 없었다. 고온의 부화기 안에 있는 만큼 수양화가 빨리 진행될 것으로 예상되었으나 신선도의 범위는 부화 시작 후 72시간 동안 31.4~84.2 HU로 예상보다 높게 나왔다. Fig. 4-10을 보면 노른자의 라테브라넥이 점점 없어지는데 신선도 저하에 따라 미약한 노른자의 형상 변화에 기인한 것으로 여겨지며 이에 따른 노른자의 위치 이동에 영향을 받을 것으로 생각된다. 부화 56시간 이후 노른자의 외곽이 뚜렷하게 나오지 않는 경우가 있었다.

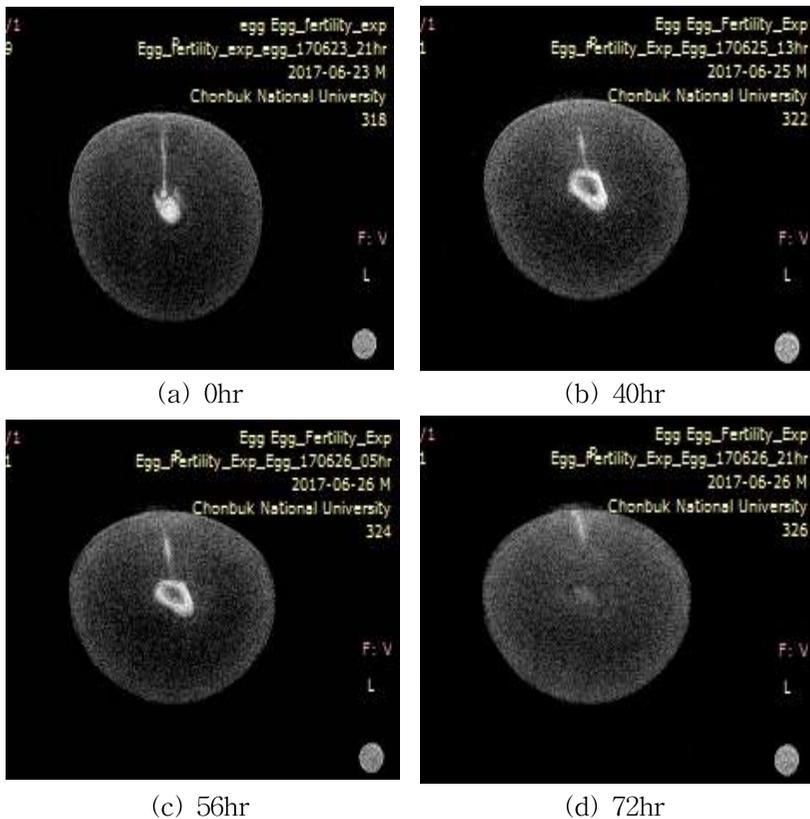


Fig. 4-10 Change of the appearance of infertile egg's yolk during incubation.

외형 추출 프로그램으로 영상 처리하였을 때 Fig. 4-11처럼 처음 측정(0hr)에서 외형에서 폐곡선이 발생하지 않거나 모양이 일정하지 않는 경우가 다수 발생하였다. 외형 추출은 72시간의 부화 상태에서 가장 선명하였다. 부화 56시간 이후 노른자 영상의 외곽 부분이 뚜렷하지 못하여 마치 부화 중인 것으로 보이기도 하였다.

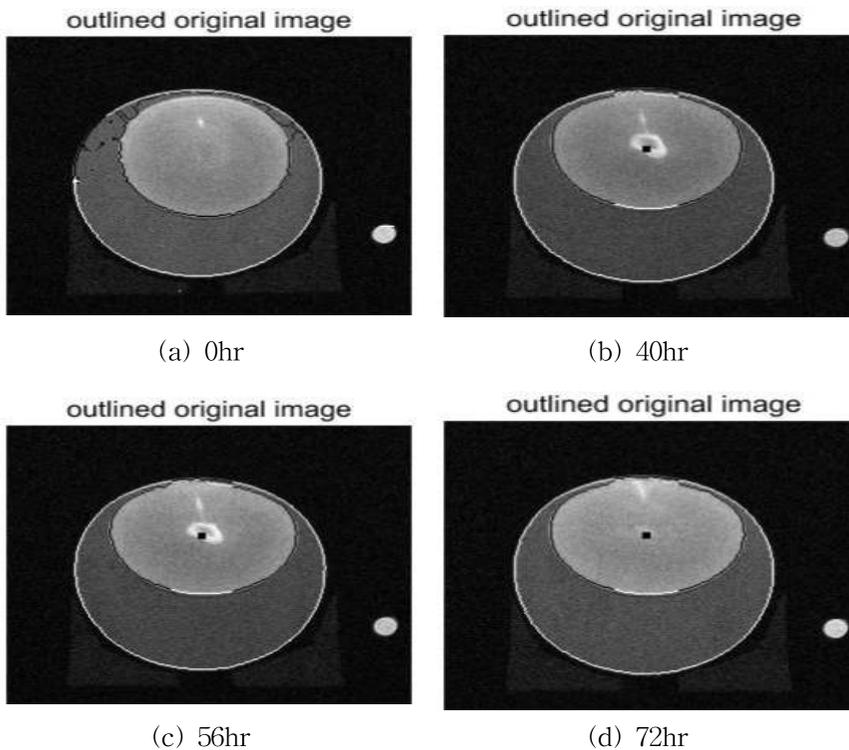


Fig. 4-11 Extraction of boundaries of yolk and shell using the #34 slice image of an infertile egg and its shape change during incubation.

4.3.2. 정상 부화 판별용 형상 지수 개발

(1) 형상 지수의 대푯값

계란이 트레이에 고정되어 있어도 부화, 수양화 등에 의해 노른자의 변형이 발생하고 이에 따라 위치의 변동이 발생할 수 있다. 그러므로 1개의 슬라이스의 이미지만을 가지고 형상 변화를 분석하는 것은 오차를 발생시킬 수 있다. 계란의 중앙 부위에 있는 슬라이스를 대상으로 노른자 영상의 단면적의 크기를 비교하였다. 그 결과 Fig. 4-12에서와 같이 슬라이스 32, 33 및 34번의 노른자 단면적이 상대적으로 큰 것으로 분석되어 정 중앙과 배반이 있는 부위로 여겼다. 이들 3개 대표 슬라이스의 영상을 이용하여 각 형상 지수를 구한 다음, 이들을 평균하여 대푯값으로 사용하였다.

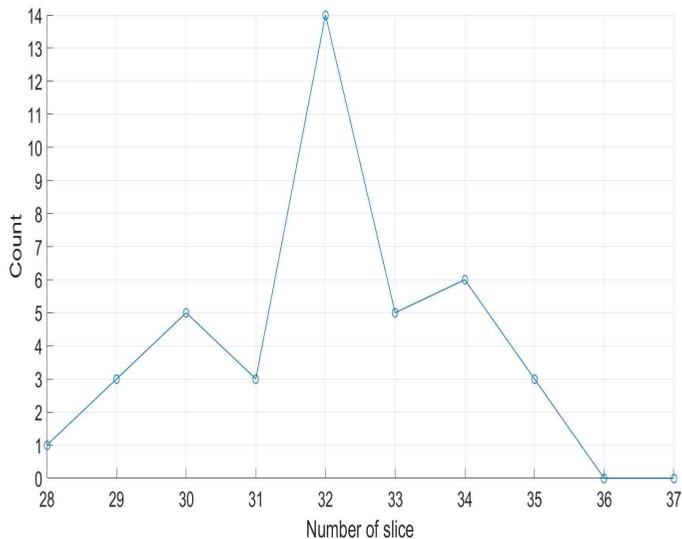


Fig. 4-12 Total number of images having the largest yolk area in each slice.

(2) 노른자의 단면적 변화

부화가 진행됨에 노른자의 단면적은 점점 감소하였다(Fig. 4-13). 부화기에 들어가기 전에 측정된 영상을 분석한 값에 많은 오차가 발생하였으며, 부화기에 들어가기 전에 보관했던 실내 온도와 부화기에 들어가고 난 후인 37.5℃의 온도 차이에 기인한 것으로 여겨진다. 유정란은 부화 48시간 이후 단면적이 급격하게 줄어드는 것을 알 수 있다. 이 값은 절대값을 나타내기 때문에 노른자의 크기에 영향을 받을 것으로 판단된다.

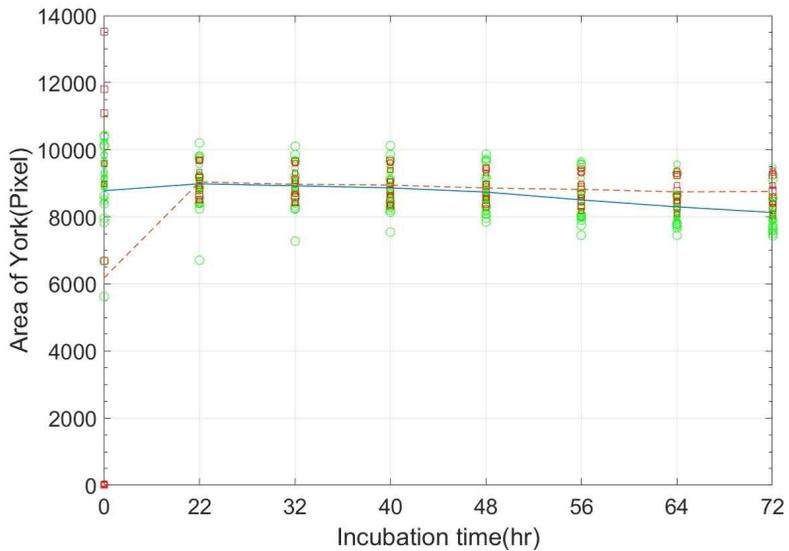


Fig. 4-13 Change in yolk area of fertile and infertile egg during incubation. (Green circle : fertile, Red square : infertile)

(3) 노른자의 원형도 변화(CYE)

노른자의 원형도는 Fig. 4-14에서와 같이 무정란은 거의 변화가 없으나 유정란은 부화 48시간부터 급격하게 변화하는 것을 관찰할 수 있다. 72hr에서 원형도는 0.60~0.96에 분포하였으며 원형도 0.90을 기준으로 유정란과 무정란을 판별한 결과 Table 4-7과 같이 98%이상의 판별율을 나타냈다. 원형도는 유·무정란 판별에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

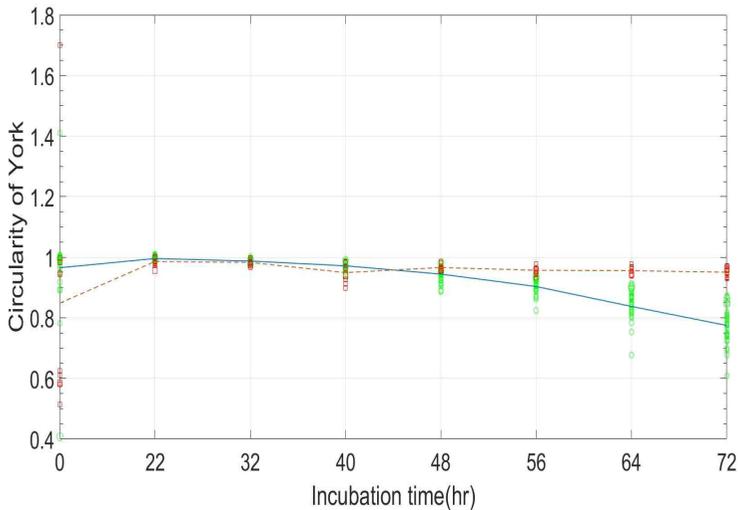


Fig. 4-14 Change in CYE(Circularity of York Ellipse) of fertile and infertile egg during incubation. (Green circle : fertile, Red square : infertile)

Table 4-7 Discrimination of fertile and infertile egg by circularity of york ellipse at 72hr incubation.

By Circularity	Actual		
	Class 0 (10)	Class 1 (30)	CDR(%)
Class 0 (Infertile)	10	0	100
Class 1 (fertile)	1	29	96.7
Average			98.4

(4) 노른자의 반지름 비율 변화(YLR)

계란의 부화 과정에서 Table 4-4에 정의한 노른자의 중심에서 하부 표면까지와 상부 표면까지의 길이의 비(반지름 비율)의 변화는 Fig. 4-15와 같다. 이 지수는 부화가 진행됨에 따라 노른자의 상부 변화를 나타내는 것으로 부화 40시간부터 유정란이 무정란 보다 빠르게 감소하고 있으나 그 분포가 일부 산재됨을 알 수 있다.

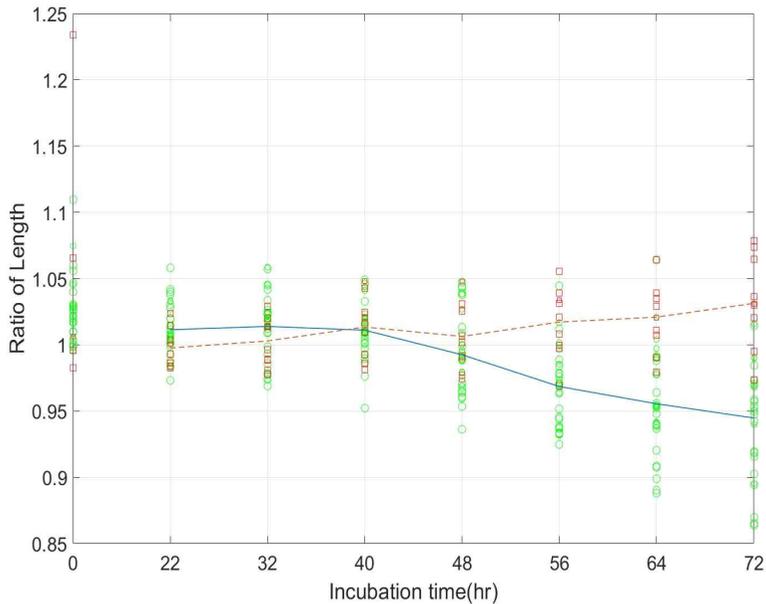


Fig. 4-15 Change in YLR(York Length Ratio) during incubation.
(Green circle : fertile, Red square : infertile)

(5) 노른자 상부 공간의 수직 거리(YSD) 변화

부화가 진행되는 과정에서 노른자 상부에 공간이 발생한다. 노른자 중심에서 껍질까지와 노른자 표면까지의 거리의 차이를 측정한 결과를 보면 부화가 진행됨에 따라 Fig. 4-16과 같은 분포를 나타내었다. 이 결과에 의하면 부화 72시간에도 유·무정란이 다수 혼재되어 있음을 알 수 있다. 이는 절대적인 거리를 나타내기 때문에 계란의 크기에도 영향을 받을 것으로 판단된다.

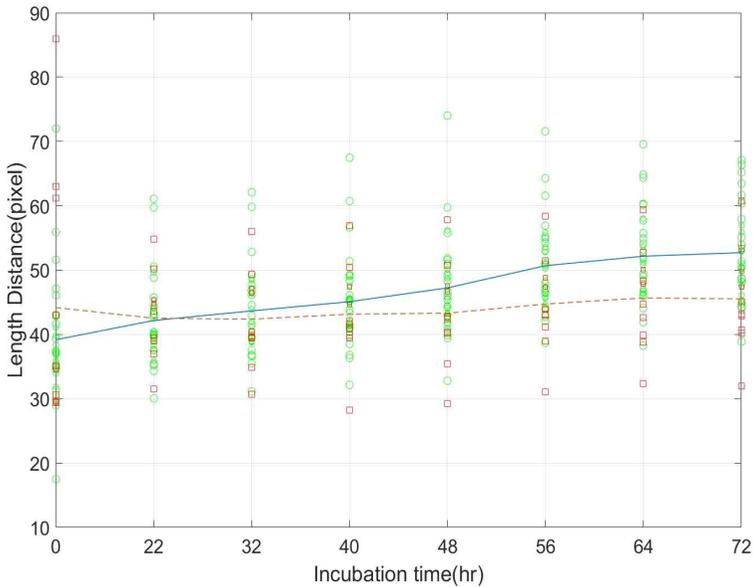


Fig. 4-16 Change in YSD(York Space Distance) during incubation.
(Green circle : fertile, Red square : infertile)

(6) 노른자의 장단축 비의 변화(RYE)

노른자 영상의 장단축비(장축/단축)를 부화 시간에 따라 측정한 결과 Fig. 4-17과 같이 나타났다. 부화 40시간부터 유정란의 장단축비가 점점 증가하였으나 무정란은 1.5이하로 유지되었다. 이 지수를 이용할 경우 부화 72시간에서 유·무정란의 판별율은 문턱값 1.35를 기준으로 Table 4-7과 같이 90%로 나타났다.

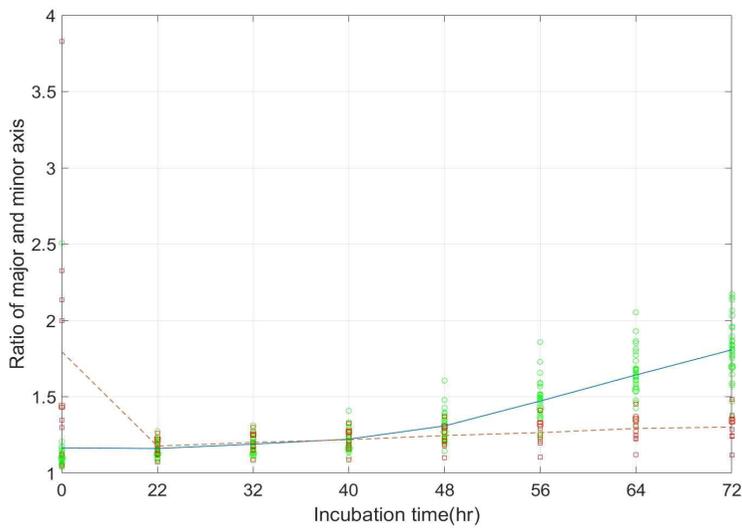


Fig. 4-17 Change in RYE(Ratio of York Ellipse) during incubation. (Green circle : fertile, Red square : infertile)

Table 4-8 Discrimination of fertile and infertile egg by the ratio of major and minor axis of york(RYE) at 72 hr incubation.

Actual \ By model	Class 0 (10)	Class 1 (30)	CDR(%)
Class 0 (Infertile)	8	2	80
Class 1 (fertile)	0	30	100
Average			90

4.3.3. PLSR에 의한 노른자 장단축비의 변화 예측

시료 그룹 #1을 대상으로 형상 지수를 이용한 부화 중 유·무정란의 판별 분석 결과 노른자의 원형도와 장단축 비를 이용할 경우 부화 72시간에서 유·무정란의 판별율이 98.4%와 90%로 분석되었다. 여기서는 시료 그룹 #2를 대상으로 부화 중 형상지수의 변화를 분석하고, 부화 중에 측정된 투과 스펙트럼을 이용하여 장단축의 비를 예측하는 PLSR 모델을 개발하였다.

(1) 시료 그룹 #2를 이용한 형상 지수 분석

Table 4-3에서 제시한 노른자의 형상 지수를 이용하여 분석한 결과는 Table 4-9 및 4-10과 같다.

Table 4-9 Change of mean shape indices of fertile egg.

Time Shape index	22h	40h	54h	72h
Area	9126	8825	8769	8442
CYE	0.995	0.9889	0.9693	0.909
YLR	0.9975	1.0108	1.023	1.001
YSD	46.333	48.439	50.727	56.437
RYE	1.182	1.229	1.267	1.496

Table 4-10 Change of mean shape indices of infertile egg.

Time Shape index	40h	54h	72h
Area	8564	8508	8543
CYE	0.998	0.985	0.978
YLR	0.9820	0.992	1.003
YSD	51.988	57.128	58.108
RYE	1.1825	1.229	1.268

시료 그룹 #1과 비교해 보면 전반적인 부화 진행 속도가 느린 것으로 파악된다. 72hr에서 시료 그룹 #1의 유정란은 RYE의 평균 값이 1.75 이었으나 시료 그룹 #2에서는 1.5에 불과하여 시료 그룹 #1의 40hr과 48hr 사이의 값을 나타내었다. 또한 그룹 #1에서 원형도는 0.78의 평균값을 가졌으며 그룹 #2에서는 0.9에 근접한 값을 가졌다. 시료의 채취 및 탬퍼링 때의 대기 온도가 다르기 때문에 생긴 것으로 여겨진다.

(2) 스펙트럼 전처리의 영향

시료 그룹 #2를 대상으로 측정한 투과스펙트럼을 이용하여 RYE(Ratio of York Ellipse)의 값을 예측하는 PLSR모형을 개발하기 위해 일차적으로 모델에서 각종 전처리 효과를 살펴보았다. Table 4-11과 4-12에서 보는 바와 같이 각종 전처리를 하였을 때 가장 좋은 결과를 보인 것은 정규화와 MSC전처리를 하였을 경우이다. 정규화 전처리를 적용할 경우 스펙트럼 측정 시에 누광이나 스펙트럼 측정 파장의 이동에 주의해야 한다. 이 연구에서는 500nm 이하 파장에서 정규화 값이 1.1 이상인 스펙트럼은 이상 스펙트럼으로 간주하고 제외시켰다.

Table 4-11 Effect of preprocessing of spectrum data on performance of PLSR model in determining Ratio of York Ellipse at 72 hr incubation. (Light source type A)

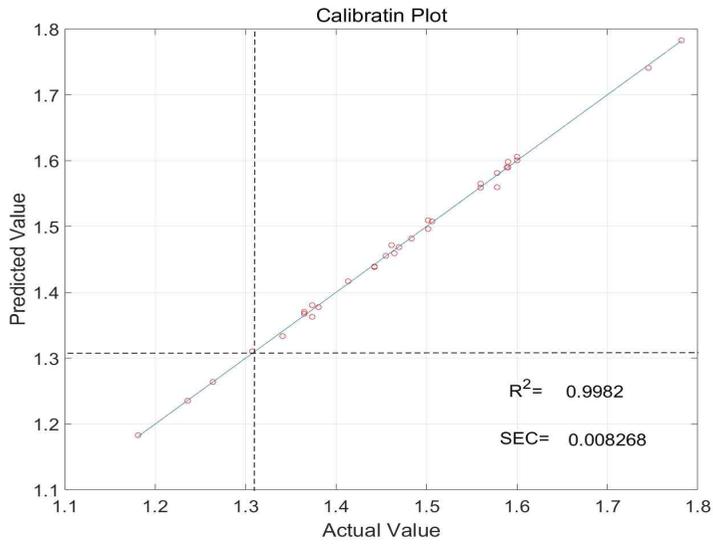
No	Smooth- ing	Different -al_1st	MSC	SNV	Normali- zation	R^2	SEP	bias
1	-	-	-	-	-	0.21883	0.25371	-0.03927
2	-	-	0	-	-	0.47733	0.13313	0.00256
3	0	-	0	0	-	0.32331	0.17902	-0.00057
4	0	0	0	0	-	0.32208	0.17434	-0.00598
5	-	-	0	-	0	0.58516	0.13259	0.03922
6	0	-	0	0	0	0.03519	0.42406	0.05714
7	0	0	0	0	0	0.07952	0.54796	0.22113

Table 4-12 Effect of preprocessing of spectrum data on performance of PLSR model in determining Ratio of York Ellipse at 72 hr incubation. (Light source type B)

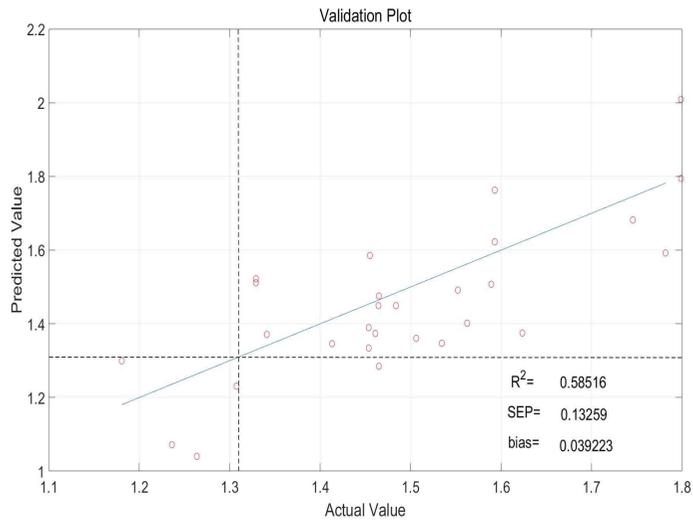
No	Smooth- ing	Different -al_1st	MSC	SNV	Normali- zation	R^2	SEP	bias
1	-	-	-	-	-	0.01107	0.36786	-0.19786
2	-	-	0	-	-	0.45524	0.11289	-0.03264
3	0	-	0	0	-	0.35727	0.12959	-0.03473
4	0	0	0	0	-	0.36059	0.11803	-0.02064
5	-	-	0	-	0	0.46132	0.11634	-0.00712
6	0	-	0	0	0	0.19644	0.33792	0.02201
7	0	0	0	0	0	0.09605	0.67242	0.25069

(3) PLSR에 의한 장단축비 예측

그룹 #1과 그룹 #2 실험에서 부화기 진행됨에 따라 RYE의 값이 부화 과정을 예측하는 형상 지수로 적합하였다. 이 지수의 예측에서 Fig. 4-18은 복합 광원A(가시광 영역)를 이용하여 개발된 모델의 개발된 모델의 회귀 및 검증 결과를 나타낸다.



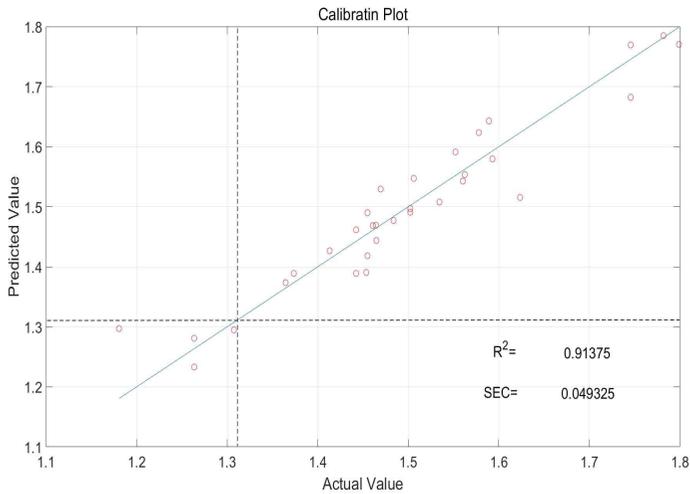
(a) Calibration plot



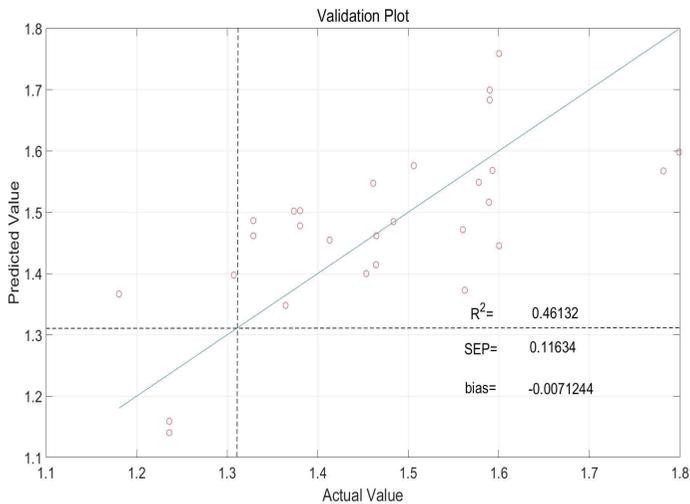
(b) Validation plot

Fig. 4-18 Calibration and validation results of PLSR model developed with ratio of major and minor axis of egg yolk image in VIS range. (Light source type A)

Fig. 4-19는 복합 광원B(가시광/근적외선 영역)를 이용하여 개발된 모델의 회귀 및 검증 결과를 나타낸다.



(a) Calibration plot



(b) Validation plot

Fig. 4-19 Calibration and validation results of PLSR model developed with ratio of major and minor axis of egg yolk image in VIS/NIR range. (Light source type B)

검증한 모델로 문턱값 1.31을 이용하여 유·무정란을 판별한 결과는 Table 4-13 및 4-14와 같다. 가시/근적외선 영역에서 만들어진 모델이 무정란의 검출에 더 적합하다고 볼 수 있으며 색깔에 의한 오차를 줄이기 위해서라도 전처리에서 정규화를 수행하는 것이 바람직한 것으로 생각된다. 그러나 이들 판별과는 검증과정에서 SEP 값(약 0.1)이 전체 장단축 비의 범위(약 0.7)의 14%정도에 해당하기 때문에 안정성이 높지 않고 무정란의 개수가 매우 적어 신뢰성은 높지 않은 것으로 판단된다.

Table 4-13 Discrimination of fertile and infertile egg by the PLS Validation model with shape index, Ratio of York Ellipse at 72 hr incubation. (Light source type A, threshold value = 1.31)

Actual \ By model	Class 0 (4)	Class 1 (24)	CDR(%)
Class 0 (Infertile)	4	0	100
Class 1 (fertile)	1	23	95.8
Average			97.9

Table 4-14 Discrimination of fertile and infertile egg by the PLS Validation model with shape index, Ratio of York Ellipse at 72 hr incubation. (Light source type B, threshold value = 1.31)

Actual \ By model	Class 0(4)	Class 1(24)	CDR(%)
Class 0 (Infertile)	2	2	50
Class 1 (fertile)	0	24	100
Average			75

4.4. 요약 및 결론

이 연구는 1.0T MRI를 이용하여 부화 과정 중인 계란이 홀더에서 누운 상태로 1mm 간격의 단층 영상(Slice image)을 획득하여 (1) 부화 시간에 따라 변화하는 영상의 특징을 관찰할 수 있는 영상 처리 알고리즘을 개발하고, (2) 영상의 특징을 이용하여 유·무정란을 판별할 수 있는 형상 지수를 제시하며, 유·무정란 판별 가능성을 제시하고, (3) 형상 지수를 3장에서 사용한 분광분석법으로 예측가능성 구명하고자 수행되었다. 연구 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. MR 영상 획득을 위해 TR=14msec, TE=4msec, Flip angle=20°로 설정하고 계란 전체를 64등분하여 64개의 축 방향(axial) 슬라이스 영상을 측정하였다. 노른자 형상의 변화를 정량화하기 위해 노른자의 윤곽선 추출, 노른자 영상의 중심(centroid), 원형도, 장단축 비등을 분석할 수 있는 영상 처리 알고리즘을 개발하였다.

2. MR 영상의 관찰 결과 부화가 진행되면서 노른자의 중심 위치가 바뀌는 것을 확인하였다. 부화 22시간에 노른자에서 배아가 있는 부분이 부풀어 오르면서 노른자가 위로 올라가 껍질에 달라붙는 현상을 확인하였다. 이후 노른자가 작아지면서 껍질과 노른자 사이에 공간이 생성되는 것을 확인하였다.

3. 유정란의 경우 배반 부근의 노른자 영상이 48시간 이후부터 원형에서 타원형으로 급격하게 변화하고, 원형도(Circularity)는 감소하고 장축/단축의 비(Ratio of axis)는 반대로 증가하였다. 그러나 무정란은 상대적으로 이들 형상 지수의 변화가 크지 않았다.

4. 64개의 단층 영상 중에서 중앙부 슬라이스(32번, 33번, 34번)의 노른자의 원형도와 장단축 비를 구하고, 이를 평균 내어 유·무정란

을 판별한 결과 부화 72시간에서 판별율은 각각 98.3% 및 95%를 나타내었다.

5. 영상 분석에서 구한 장단축 비를 PLSR을 이용하여 예측한 결과 R^2 와 SEP가 각각 0.46132, 및 0.11634 이었으며 무정란의 시료수를 증가시켜 안정성을 향상시킬 필요가 있다.

6. MR 영상을 이용한 형상 지수 분석 결과와 연계하여 유·무정란 판별을 위한 PLSR 모델 개발을 위한 추가적인 연구는 모델의 성능 향상을 위해 필요하다.

V. 가시 근적외선 분광법을 이용한 저장 중 계란의 신선도(Haugh Unit) 예측

5.1 서언

계란의 상품 가치는 청결도, 크기, 무게, 유·무정란, 혈액의 존재유무, 신선도, 사육 방법 등의 영향을 받는다. 축산물 등급 판정소에서 제시하는 우리나라 계란의 등급판정기준에 의하면 신선도를 나타내는 대표적인 단위로 호우 유니트(HU) 사용을 제시하고 있다. 이 기준으로 A급은 72이상, B급은 72~60, C급은 60~40, D급은 40미만인 것으로 지정하고 있으며, D급 이하는 판매를 금지하고 있다. 현재 신선도를 측정하는 계란을 파괴하여 측정하는 방법 외에 비파괴적으로 측정하는 방법은 갈색란의 경우 상용화되어 있지 않다.

축산과학원의 실험에 의하면 유정란과 무정란 모두 실온에서 보관 시 6일 만에 Haugh unit 값이 72 아래로 내려간 B등급으로 강등되는 것으로 나타났으며 또한 무정란보다 유정란의 변화 속도가 더 빠른 것으로 측정되었다.

Table 5-1 Change of the Haugh unit during storage period at room temperature. (Source = <http://www.nias.go.kr>)

	storage day 1	storage day 6	storage day 11	storage day 15	storage day 19
Fertile egg (HU)	80.0	63.2	58.1	56.1	53.6
Infertile egg (HU)	82.1	69.9	67.6	62.2	60.5

현재까지 비파괴적으로 계란의 신선도를 측정하는 장치는 상용화된 것이 없기 때문에 본 연구에서는 분광분석법을 이용하여 (1) 갈색란의 Haugh unit의 예측 가능성을 구명하고 (2) 복합 광원을 이용하였을 때 백색란의 신선도 예측 모델의 정확도를 할로겐 광원을 이용했던 기존 연구 결과와 비교해 보고자 한다.

5.2. 이론적 배경

계란은 처음에는 난백의 점도와 탄력성이 우수하고 노른자가 중앙에 위치하고 있기 때문에 흔들림도 거의 느껴지지 않지만 계란 껍데기 표면에 있는 미세한 구멍에서 호흡을 하면서 수분과 이산화탄소를 배출한다. 저장 기간이 길어지면 농후 난백의 수분이 노른자나 수양 난백으로 이동하여 할란하였을 때 농후 난백의 높이가 낮아지게 되는데 이를 수양화(水樣化) 현상이라고 한다. 그 과정에서 계란 내부의 수분이 증발하게 되어 시간이 지날수록 계란의 무게가 가벼워지게 되고, 부패하기 시작하면 가스가 생성되어 더욱 가벼워진다. 신선도가 낮아지면 점차 노른자가 계란 내벽 쪽으로 붙게 되면서 조금씩 흔들림이 증가하기 때문에 예전에는 계란을 흔들어 신선도를 판정하기도 하였다.

신선도를 나타내는 지표에는 여러 가지가 있다. 대표적인 것인 난황 계수, 난백 계수, 호우 유니트(HU; Haugh Unit) 등이다. 난황 계수는 달걀을 터트려서 평평한 판 위에 놓고 난황의 최고부의 높이를 난황의 최대 직경으로 나눈 값이다. 일반적으로 0.3 이하는 신선하지 않은 것으로 본다. 난백 계수는 알을 평판위에서 일정 방법으로 깨고 농후 난백의 높이와 퍼진 면적의 최단 지름과 최장 지름의 평균을 구하여 높이를 평균 지름으로 나눈 값이다. 수양화에 따른 농후 난백의 변성과 실험 평가자의 차이에 의한 자체 오차 등으로 잘 쓰이지 않고 있다.

Haugh unit(HU)는 Haugh가 제시한 방법으로 계란 노른자로부터 농후 난백이 넓게 확산되는 방향으로 1cm되는 지점의 농후 난백의 높이를 측정하여 아래와 같은 계산식에 대입하여 계산하며 현재 계란 신선도를 나타내는 지표로 가장 널리 쓰이고 있다.

$$HU = 100 \times \log(h - 1.7w^{0.37} + 7.6)$$

h = observed height of the albumen in millimeters

w = weight of egg in grams



Fig. 5-1 Measurement device of the Haugh unit.

2장에서 언급했던 김상호(2005) 등은 25℃에서 3일간 보관할 경우 HU값이 70이하로 떨어지는 상황에서 유통 계란 중 신선도 측정을 하는 것은 0.01%미만이라고 하였으며 실시간 처리를 위한 기초 연구를 수행하였다. 할로젠 광원을 사용해서 1,100~1,750nm의 근적외선 영역에서 얻은 갈색란 80개의 확산 반사 스펙트럼과 초음파를 이용해 얻은 농후 난백의 높이를 이용하여 HU를 계산하였다. 70~100HU 범위에서 PLS 분석법을 이용한 모델의 잠재 변수는 12, SEP는 1.35는 매우 좋게 나왔다고 하였다.

김남균(2013) 등은 접촉식 측정을 할 때 육안에 따라 측정 위치가 달라질 수 있는 한계를 보완하기 위해 활란 측정에서 CCD영상에 의한 농후 난백의 측정을 시도 하였다. 난황과 난백의 명도와 채도가 다른 점에 착안하여 두 영상의 논리 뺄셈으로 농후 난백의 높이를 구하여 저장 기간에 따른 HU의 변화를 관찰하였다. 30일간 20℃에서 보관하면서 5일 간격으로 측정하였는데 저장 0일차 최대값이 103HU이었고 20일까지 농후 난백의 높이 변화가 지속적으로 이루어졌으며 20일부터 측정된 평균값이 54HU이하로 내려갔다고 하였다.

5.3. 재료 및 방법

5.3.1. 공시 재료 및 실험장치

계란의 상온 저장 중 신선도 측정을 위해 사용한 갈색란은 하이라인 브라운 종의 알이었으며 60개를 사용하였다. 평창의 서울대 목장에서 생산한 것으로 72주령 산란계이 알이었으며 무게는 58g~62g사이의 것이었다. 백색란은 화이트 레그혼종의 알이었으며 36개를 사용하였다. 수원의 서울대 목장에서 생산한 것으로 52주령의 산란계 알이었으며 무게는 54g~62g사이의 것이었다.

유·무정란 조기판별 연구에 사용했던 할로겐광원을 포함하는 가시/근적외선 복합 광원(광원 B)을 사용하였으며 근적외 대역의 측정 범위를 넓히기 위해 USB4000(Ocean Optics, USA)를 사용하였다.

Table 5-2 Specifications of egg sample, light sources and spectrometer.

Item	Egg	
	Hyline Brown	White Leghorn
No. of sample	60	36
Weight	58g~63g	54g~62g
Light source	Combined light source type B(Green LED + Blue LED + Halogen lamp)	
Spectrometer	Model name : USB4000	
	Manufacture : Ocean Optics	
	Range : 480~1,200nm	

5.3.2. 실험 및 데이터 획득 방법

시료의 무게를 측정 한 후 6개의 그룹으로 나누어 온도 25℃ 상대 습도 40%로 설정된 항온항습기에 넣어 저장하였다. 1회 측정 때 마다 갈색란 10개, 백색란 6개씩 사용하였으며 스펙트럼 측정은 3장에서 누워 있는 상태로 90°씩 돌려가며 4곳을 측정하고 이어서 좌우의 방향을 바뀐 뒤 돌려가면서 하였으며 시료 당 8개의 스펙트럼을 획득하였다.

스펙트럼 측정이 끝난 뒤 유리판 위에 할란하여 흰자가 더 이상 퍼지지 않을 때까지 기다린 후, 난백이 가장 많이 퍼져 나간 방향으로 노른자의 경계에서 10mm 되는 곳의 난백 높이를 난질계(FHK, Japan)를 사용하여 측정하였다. 3회 측정하여 평균값을 사용하였다.

Table 5-3 Time to measure transmitted energy spectra with brown and white eggs, and setting conditions of spectrometer.

Measurement Items		1st	2nd	3rd	4th	5th	6th
		Storage period(day)	0	4	5	7	9
Sample No.	Brown egg	10	10	10	10	10	10
	White egg	6	6	6	6	6	6
Storage condition	Brown egg	Temperature : 25℃ Humidity : 40% Relative					
	White egg						
Integration time	Brown egg	200ms					
	White egg	30ms					
No. of spectrum for average	Brown egg	2					
	White egg						
Boxcar for smoothing	Brown egg	6					
	White egg						

5.3.3. 스펙트럼 전처리 및 모델 개발

각 과정에서 측정된 투과 스펙트럼을 x값, 호우 유닛을 y값으로 입력하여 신선도를 예측할 수 있는 PLSR 모델을 개발하였다. 전체 측정된 스펙트럼 데이터 수는 갈색란 480개, 백색란 288개였으나 스펙트럼 측정 후 할란하여 호우 유닛(HU)를 측정하였을 때 0일치의 값이 40HU이하이거나 측정값이 해당 측정일 평균의 1/3이하일 경우 이상치(Outlier)로 간주하고 분석대상에서 제외하였다. 이후 데이터를 무작위로 2그룹으로 구분하여 각각 PLSR 모델 개발(Calibration) 및 검증(Validation)에 사용하였으며 평활화, 미분, MSC, SNV 등의 전처리가 모델 개발에 어떠한 영향을 미치는지를 분석하였다.

또한 개발된 Calibration plot와 Validation plot에서 추세선과 예상값과의 최단 거리가 3σ 를 넘어설 경우 해당 데이터를 이상치로 간주하여 제거하였다.

5.4. 결과 및 고찰

5.4.1. 스펙트럼 파형 및 Haugh Unit의 변화

갈색란의 투과 스펙트럼 평균 모습은 Fig. 5-2와 같다. 3장에서 USB2000 스펙트로미터로 측정된 스펙트럼과 비교할 경우 900nm 이후의 근적외선 영역에서 광량이 상대적으로 높게 나왔고 이것은 스펙트로미터의 센서 특성에 기인한 것으로 생각된다. 700nm 전후로 생기는 봉우리(peak)에서 첨두가 700nm 이전에 생기는 것과 이후에 생기는 것이 있었다. 유정란의 부화 때와 마찬가지로 시간이 지남에 따라 투과 광도가 지속적으로 감소함을 확인할 수 있다.

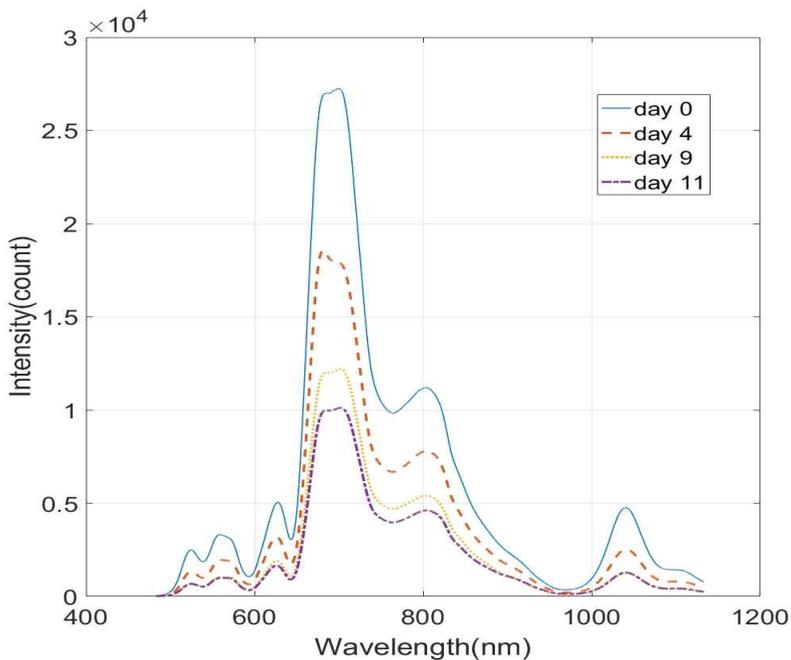


Fig. 5-2 Mean of the transmitted energy spectra of brown egg during storage in VIS/NIR range. (Light source type B)

백색란의 투과 스펙트럼은 Fig 5-3과 같으며 갈색란과 비교해 투과량이 매우 높았다. 특히 집광 시간(integration time)을 갈색란 200ms에서 백색란 30ms로 줄였음에도 투과한 광량은 많았다. 스펙트럼의 파형을 비교해 보면 갈색란은 600~900nm 영역에서 투과량이 많았는데 백색란은 이 부분에서 투과량이 적은 반대 경향을 보였다. 근적외선 영역의 투과량이 많은 것으로 인해 기존 백색란의 신선도 예측 연구에서 결과가 좋았던 것으로 추측되었다. 저장 기간이 증가함에 따라 투과량이 감소하는 경향을 보였으나 9일과 11일에 큰 차이를 보이지 않았다. 시료의 개수가 매우 한정되어 있어 분석에 제한적이다.

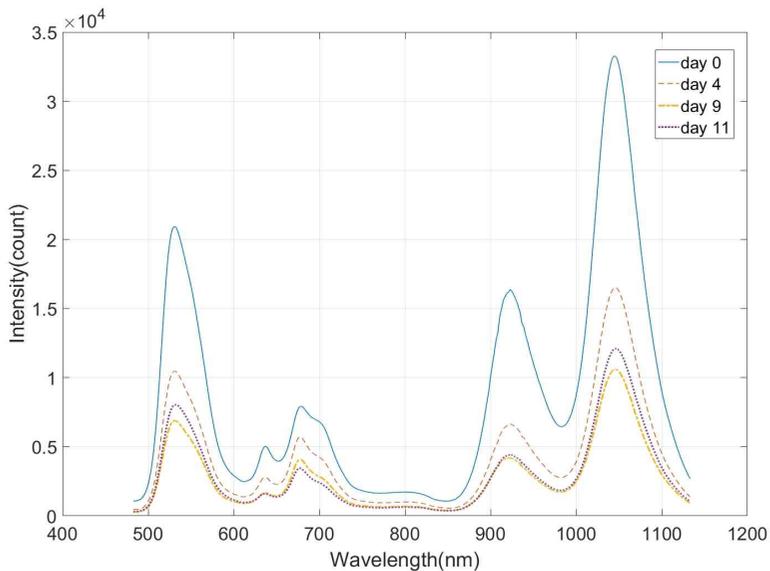


Fig. 5-3 Mean of the transmitted energy spectra of white egg during storage in VIS/NIR range. (Light source type B)

스펙트럼 측정 후 할란하여 얻은 갈색란의 신선도의 값은 13.3~79.02HU이었다. 같은 날 측정 시 평균의 1/3이 되지 않은 낮은 값을 가지는 시료는 제외한 것으로 평균은 41.22이었다. 백색란의 경우 신선도의 값은 10.37~74.07HU이었고 평균은 36.86HU이었다. 초기에 HU값이 낮았는데 전반적으로 산란계의 주령이 높고 여름 더위에 의한 스트레스 등에 의한 것으로 여겨진다.

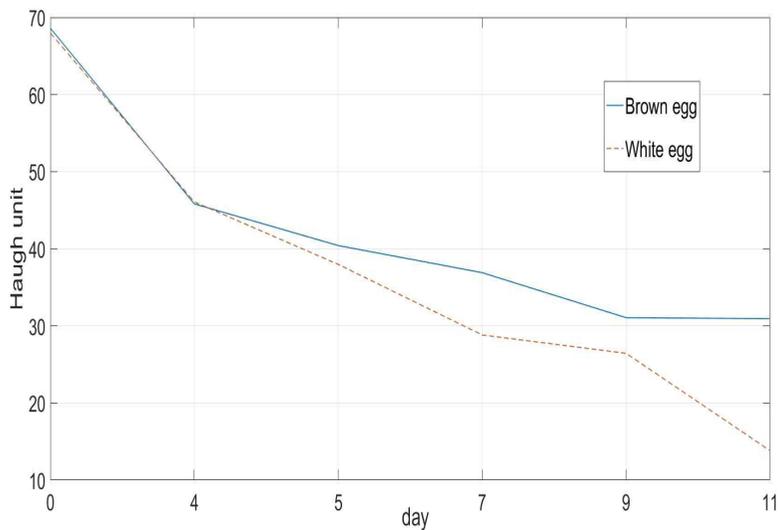


Fig. 5-4 Change of HU of Brown egg(Red) and White egg(Blue) according to period of storage

5.4.2. 전처리 효과

전처리는 Table 5-4, 5-5에서 보는 바와 같이 MSC 전처리만을 하였을 때 R^2 와 SEP의 값이 갈색란과 백색란 모두 가장 좋은 것으로 나타났다. 백색란의 경우 갈색란 보다 전처리 영향이 크지 않았다.

Bamels(2005) 등이 VIS/NIR 투과광을 이용하여 백색 레그혼종의

알을 18℃에서 보관하면서 측정하였을 때도 MSC 전처리를 하였을 때 Haugh unit 검증 모델의 상관계수가 0.861로 높게 나온 것으로 보고하였다. 보관 온도와 시료 개수의 차이가 크기 때문에 직접적인 비교는 어렵지만 이 실험에 사용한 복합 광원B가 백색란의 HU 측정에 사용할 수 있을 것이다.

Table 5-4 Effect of preprocessing of spectrum data on the performance of validation model in predicting Haugh unit of brown egg.

No	Smoothing	Differential _ 1st	MSC	SNV	R^2	SEP	bias
1	-	-	-	-	0.69532	9.7263	0.14986
2	-	-	0	-	0.72132	8.8442	0.11729
3	0	-	0	0	0.68809	9.3674	0.38166
4	0	0	0	0	0.58201	11.4461	-0.23389

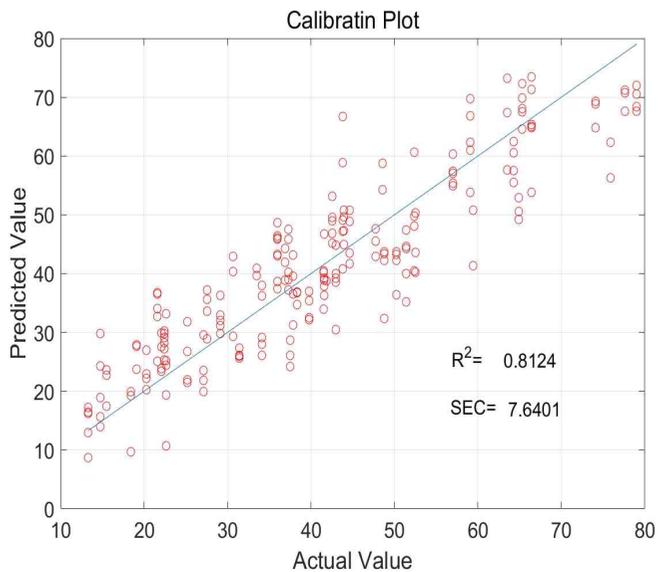
Table 5-5 Effect of preprocessing of spectrum data on the performance of validation model in predicting Haugh unit of white egg.

No	Smoothing	Differential _ 1st	MSC	SNV	R^2	SEP	bias
1	-	-	-	-	0.92125	5.2875	0.27691
2	-	-	0		0.92162	5.2747	0.26917
3	0	-	0	0	0.90178	5.8736	0.48167
4	0	0	0	0	0.85701	7.1495	0.08597

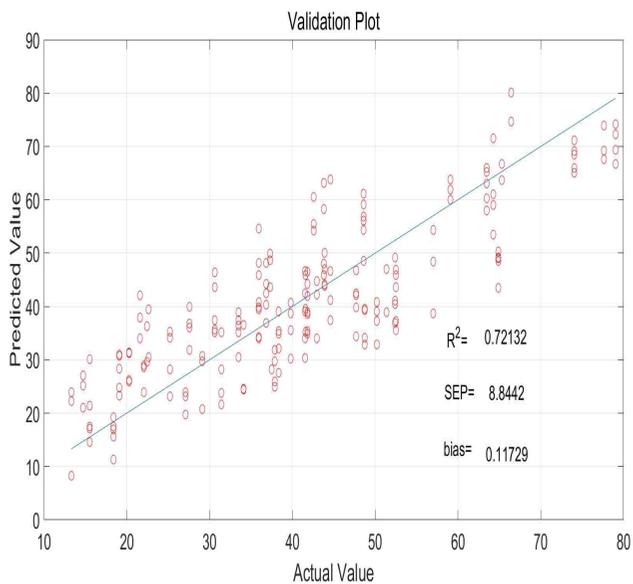
5.4.3. 모델의 성능 평가

(1) 갈색란

Fig. 5-5처럼 갈색란은 MSC만을 전처리한 모델에서 R^2 와 SEP는 각각 0.72132 및 8.8442를 나타냈다. 실측한 HU의 범위가 10에서 80임을 감안할 때 HU 측정오차는 13.63%에 해당한다. 상관계수 스펙트럼(Fig. 5-6)에서 갈색란은 700~900nm 영역에서 0.6 정도의 일정한 상관계수 값을 나타내었으며, 모델 분석과정에서 독립변수에 해당하는 잠정 변수(Latent variable)의 수는 14개로 나타났다(Fig. 5-7). 이와 같은 분석 결과는 갈색란의 경우 신선도와 상관관계가 높은 특정 파장대역은 존재하지 않으며, 신선도 예측과 관계되는 인자가 매우 많고 신선도와 스펙트럼 측정값이 선형적으로 변하지 않음을 의미한다. 따라서 신선도 예측을 위해 비선형성을 감안하는 인공 신경망(ANN; Artificial Neural Network)을 적용하는 것이 보다 효과적일 것으로 판단된다.



(a) Calibration plot



(b) Validation plot

Fig. 5-5 Calibration and validation result of PLSR model in predicting Haugh unit of brown egg.

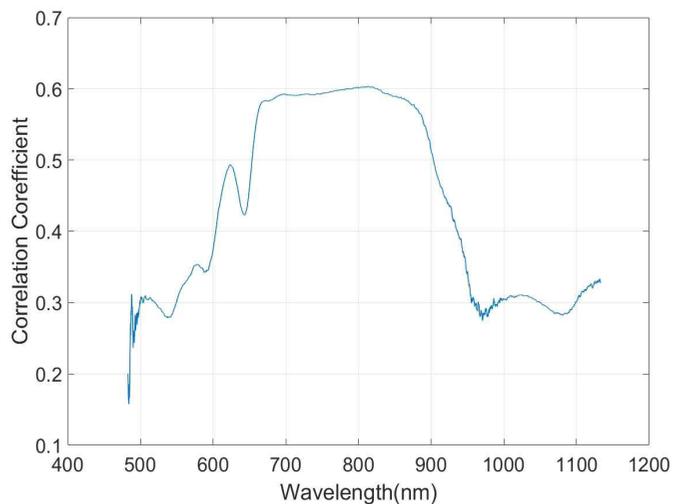


Fig. 5-6 Correlation coefficient graph of brown egg indicating correlation between HU and spectrum value at each wavelength.

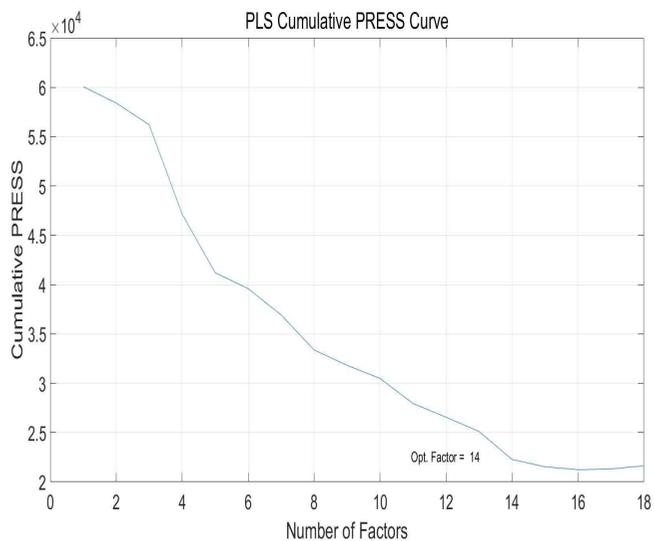
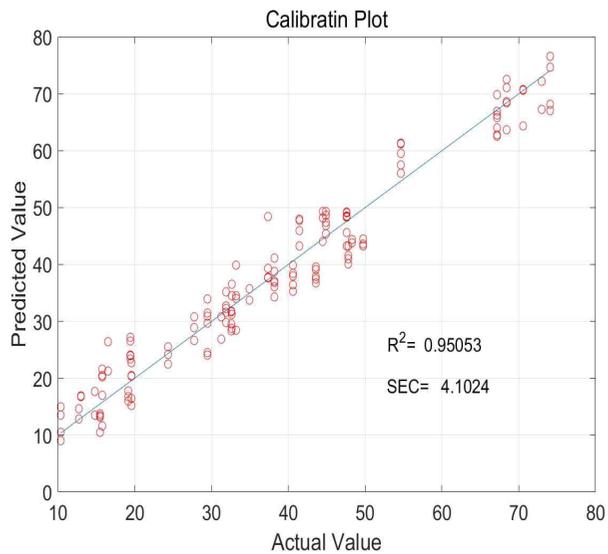


Fig. 5-7 Press curve in developing PLSR model to predict HU of brown egg.

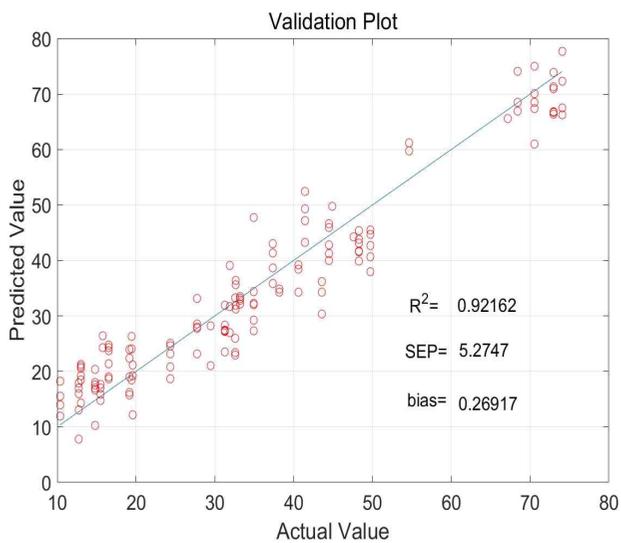
(2) 백색란

백색란은 갈색란과 같은 방법으로 이상치를 제거하였으며 Fig. 5-8처럼 MSC만을 전처리한 모델에서 R^2 , SEP 및 상대 오차가 각각, 0.922, 5.245 및 8.70%이었다. 백색란이 갈색란에 비해 신선도 예측이 용이함을 알 수 있으며, 이와 같은 결과는 상업적으로 이용가능한 신선도 측정 장치 개발이 가능함을 의미한다.

Bamels(2005) 등은 HU의 변화 예측에서는 570nm와 750nm가 중요한 파장 대역이라고 하였으나 Fig 5-9의 상관계수 그래프에 의하면 630nm 및 710nm에서 상관계수 값이 상대적으로 크게 나타나고 있다.



(a) Calibration plot



(b) Validation plot

Fig. 5-8 Calibration and validation result of PLSR model in predicting Haugh unit of white egg.

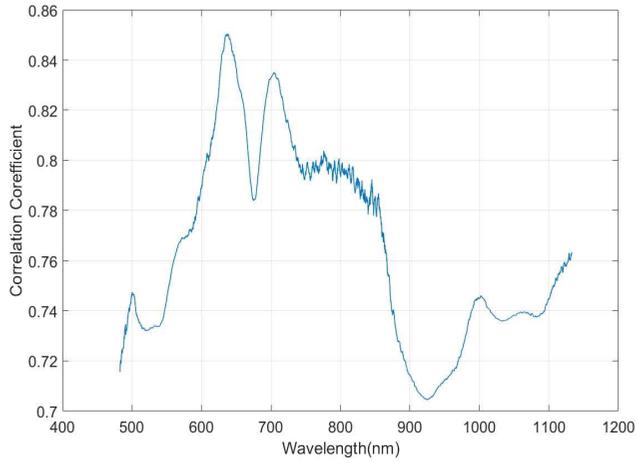


Fig. 5-9 Correlation coefficient graph of white egg indicating correlation between HU and spectrum value at each wavelength.

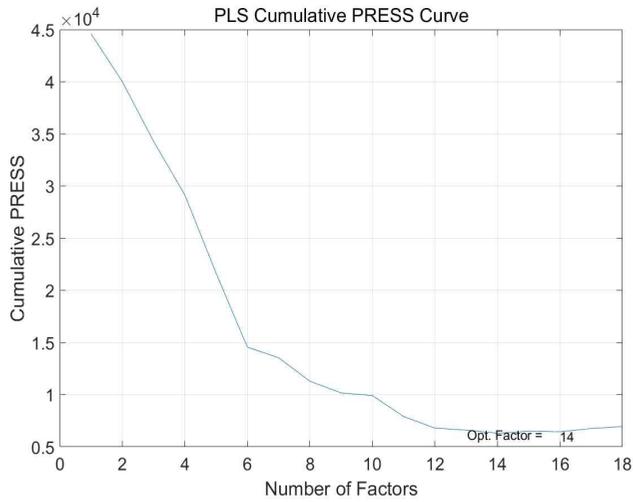


Fig. 5-10 Press curve in developing PLSR model to predict HU of white egg.

5.5. 요약 및 결론

신선도는 계란의 상품가치와 직접적인 관계가 있으나 갈색란의 경우 비파괴적으로 신선도를 측정하는 장치가 개발되어 있지 않다. 이 연구에서는 상온인 25℃에서 11일간 갈색 및 백색의 무정란을 보관하면서 분광분석법을 이용하여 신선도를 예측하는 PLSR 모델을 개발하고 VIS/NIR영역에서 신선도의 측정 가능성, 정밀성 등을 구명하였다.

1. 계란의 투과에너지 스펙트럼의 강도는 저장기간이 증가할수록, 즉 Haugh unit(HU)가 감소할수록 감소하는 것으로 나타났다.
2. 가시/근적외선 대역에서 갈색란 60개를 사용하여 Haugh Unit(HU)를 예측하는 PLSR 모델을 개발한 결과 모델의 R^2 와 SEP는 각각 0.7213 및 8.84이었다. 샘플의 HU 실측값의 범위(65.72)를 고려할 때 측정오차는 약 13.63%로 실용화를 위한 비파괴 신선도 장치 개발을 위해 추가적인 연구가 필요한 것으로 판단된다..
3. 화이트 레그혼 종의 백색란의 경우 HU 예측 모델의 SEP=5.27, $R^2=0.9216$ 이었으며, HU 실측값의 범위에 대한 측정오차는 약 8.70%이었다. 갈색란 보다는 예측 결과가 양호하며, 실용화를 위한 비파괴 신선도 측정 장치 개발이 가능한 것으로 판단된다.
4. 신선도 측정오차를 줄이기 위해 선형성에 기반을 두고 있는 PLSR 분석법 보다 비선형성을 포함하는 인공지능분석법(ANN)을 시도할 필요가 있으며, 결과의 신뢰성과 안정성 향상을 위해 시료를 보다 다양화 할 필요가 있는 것으로 생각된다.

VI. 종합 결론

본 연구는 기존의 과실을 비롯한 농산물 비파괴 품질 판별에 적용되고 있는 분광분석법과 의료 진단에 사용되는 MRI 영상 분석 기술을 이용하여 부화 중에 무정란(배아 미발생란)의 조기 판별 기술을 개발하고 나아가서 분광분석법을 이용하여 무정란의 신선도 측정 기술을 개발하는데 목적이 있으며 연구 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 부화 중인 계란을 대상으로 투과 스펙트럼을 측정하기 위해 청색 LED와 녹색 LED로 구성되는 가시광 대역과 할로겐램프를 추가한 가시 및 근적외선 대역의 조명장치를 구성하고, 하이라인 갈색란을 대상으로 측정한 투과 스펙트럼을 이용하여 유·무정란 판별을 위한 PLS-DA 모델을 개발하였다. 개발된 PLS-DA 판별 모델은 가시광 영역(440~800nm)의 경우에는 부화 40시간부터, 가시/근적외선(440~950nm) 영역의 경우에는 부화 22시간부터 유·무정란 판별율이 90% 정도로 나타났으며 시간이 지날수록 판별율이 약간 증가하고 모델의 안정성이 향상되었다. 결과적으로 부화 56시간 정도에서 판별율이 92% 이상 되는 것으로 판명되었다.

2. 산업용 1.0T MRI를 이용하여 TR=14msec, TE=4msec, Flip angle=20°으로 설정하고 부화란을 대상으로 축 방향의 64개 슬라이스 영상을 측정하고, 가운데 3개의 슬라이드를 영상 분석에 사용하였다. 부화 중 노른자 형상의 변화를 정량화하기 위해 노른자 영상의 윤곽선 추출, 중심(centroid), 원형도, 장단축 비 등을 분석할 수 있는 영상처리 알고리즘을 개발하였다.

2-1. 노른자의 원형도, 장단축 비, 중심에서 상단 및 하단까지의

길이 비율(YLR)), 노른자 상부 공간의 수직거리(YSD)등 형상지수를 구하고, 유·무정란을 판별한 결과 원형도와 장단축 비가 부화 72시간에서 각각 98.3% 및 90%를 높게 나타냈다.

2-2. MR 영상 분석에서 구한 장단축 비를 PLSR 모델을 이용하여 예측한 결과 R^2 와 SEP가 각각 0.46132, 0.11634이었다. 문턱값을 1.31로 하여 유·무정란을 판별한 결과 판별율은 75%이었다. 이 결과는 MR영상의 형상지수를 이용하여 부화 초기 진행단계의 예측이 가능함을 의미 하며, 형상지수 예측을 위한 PLSR모델의 성능 향상을 위해 추가적인 연구가 필요한 것으로 판단된다.

3. 분광분석법을 이용한 유무정란 판별분석과 MR영상을 이용한 부화란의 형상변화를 분석한 결과 부화 40시간부터 노른자의 변화가 급격하게 일어나며, 부화 56시간에 95.0% 이상의 정확도로 무정란을 판별할 수 있을 것으로 판명된다.

4. 무정란의 신선도(호우 유닛 : HU)를 예측하기 위해 가시/근적외선 조광 장치를 구성하고, 갈색란과 백색란을 대상으로 투과 스펙트럼을 측정하여 PLSR 모델을 개발하였다. 갈색란의 HU 예측 결과 $R^2=0.72132$, SEP=8.84, bias=0.11729, 측정 오차 13.63%이었으며, 백색란의 경우 $R^2=0.92162$, SEP=5.27, bias=0.26917, 오차=8.70%이었다. 백색란의 경우 신선도 예측을 위한 실용화 장치 개발이 가능할 것으로 판단되지만 갈색란의 경우 추가적인 필요한 것으로 판단된다.

VII. 참고 문헌

1. 류동수. 2001. VIS/NIR 투과 분광분석법을 이용한 감귤의 비파괴 내부품질 판정 시스템 개발. 서울대학교 박사학위 논문
2. 서영욱. 2008. VIS/NIR 투과 스펙트럼을 이용한 후지 사과와 내부 결함 판정 기술 개발. 서울대학교 박사학위 논문.
3. 박수현. 2014. Vis/NIR 분광법과 MRI를 이용한 밤의 내부 품질 예측 및 Vis/NIR 영상을 이용한 온라인 결함과 검출 시스템 개발. 서울대학교 박사학위 논문.
4. 임중국. 2014. 가시광선 및 근적외선 분광법을 이용한 고춧가루 품질 예측 기술 개발. 서울대학교 박사학위 논문.
5. 이재청 외 6인. 2013. 산란 주령 및 중량 규격에 따른 계란의 주요 성분 내부 품질 비교. 한국가금학회지. 제40권. 제1호. 49-55.
6. 이홍석 외 6인. 2014. 가시광 및 근적외선 전투과 스펙트럼을 이용한 갈색 혈란 비파괴선별 방법 개발. 비파괴검사학회지. 제34권. 제1호. 31-37.
7. 하정기 외 6인. 2002. 계란 농후난백의 높이 측정부에 따른 Albumen exponent와 Haugh Unit의 변화. 한국가금학회지. 제29권. 제3호. 157-170.
8. 김종규, 박정영, 김중순. 2015. 계란의 저장·보관 조건에 따른 위생적 품질 변화. 한국환경보건학회지. 제41권. 제6호.
9. 김상호 등. 2005. 근적외선 분광법을 이용한 새로운 비파괴적 계란 신선도 측정방법의 개발에 관한 연구. 한국화학학회. 제49권. 제6호.
10. 이수홍, 이진순, 김진옥, 이재경, 이지용. 2012. 등급란의 판매 현황과 신선도 변화 연구. 축산물품질평가원. KAPE보고서.

11. 유영모, 채현석, 함준상, 김진형, 김동훈, 안중남, 이종문, 이성기, 이원복, 안성섭. 2004. 계란의 냉장유통 모델 설정 연구. 농촌진흥청 축산기술연구소 축산시험연구보고서. 417-427.
12. 조성복, 황대석, 이영우. 2007. 스펙트럼분석에 의한 식품 신선도 판별. 한국정보기술학회 하계종합학술발표논문집.
13. J. J. Noh, S. Y. Jeon, B. S. Pack, S. M. Kim, H. S. Kim, H. J. Kim and C. Jo. (2013). Investigation of reliability of automatic cracked and bloody egg detector. *Journal of the Korean Society of Food Preservation*, 20(1). 69-75.
14. Min Hee Lee, Eun Jung Cho, Eun Sik Choi and Sea Hwan Sohn. (2016). The Effect of Storage Period and Temperature on Egg Quality in Commercial Eggs. *Korean J. Poult. Sci*, 43(1). 31-38.
15. Bamles, F. R., Tona, K., De Baerdemaker, J. G. and Decuyper, E. M. (2002). Detection of early embryonic development in chicken eggs using visible light transmission. *British Poultry Science*, 43. 922-928.
16. F. R. Bamelis, B. J. Kemps, K. mertens, E. M. Verhoelst, B. Deketelaere, E. M. Decuyper and J. G. DE Baerdemaeker. (2005). VIS-NIR transmission for the assessment of internal egg quality. XI th European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products Doorwerth. The Netherlands. 23-26 May.
17. Coucke, P., Dewil, E., Decuyper, E. and De demaeker, J.. (1999). Measuring the mechanical stiffness of an eggshell using resonant frequency analysis. *British Poultry Science*,

40. 227 - 232.
18. Dutta, R., Hines, E. L., Gardner, J. W., Udrea, D. D. and Bolot, P. (2003). Non-destructive egg freshness determination: an electronic nose based approach. *Measurement Science and Technology*, 14. 190-198.
 19. Giunchi, A., Berardinelli, L., Ragni, A. Fabbri and F. A. Silaghi. (2008). Non-destructive freshness assessment of shell eggs using FT-NIR spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 89, 142-148.
 20. Hartmut, K., Lichtenthaler and Claus Buschmann. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F4.3.1-F4.3.8.
 21. Karoui, R., Kemps, B., Bamelis, F., De Ketelaere, B., Decuyper, E. and De Baerdemaeker, J. (2006). Methods to evaluate egg freshness in research and industry: A review. *European Food Research Technology*, 222, 727 - 732.
 22. Kemps, B. J., De Ketelaere, B., Bamelis, F. R., Decuyper, E. M. and Debaerdemaeker, J. G. (2003). Vibration analysis on incubation eggs and its relation to embryonic development. *Biotechnology Progress*, 19, 1022-1025.
 23. Klein, S., Rokitta, M., Baulain, U., Thielebein, J., Haase, A. and Ellendorff, F. (2002). Localization of the fertilized germinal disc in the chicken egg before incubation. *Poult Science*, 81, 529-536.
 24. Lourens, A., van den Brand H., Meijerhof, R. and Kemp, B.

- (2005). Effect of eggshell temperature during incubation on embryo development, hatchability, and posthatch development. *Poult Sci.*, 84(6). 914-920.
25. Nicolas Abdel-Nour, Michael Ngadi, Shiv Prasher and Yousef Karimi. (2011). Prediction of Egg Freshness and Albumen Quality Using Visible/Near Infrared Spectroscopy. *Food Bioprocess Technology*, 4, 731-736.
26. O. Elibol. and J. Brake. (2006). Effect of Egg Turning Angle and Frequency During Incubation on Hatchability and Incidence of Unhatched Broiler Embryos with Head in the Small End of the Egg. *Poult Sci.*, 85(8), 1433-1437.
27. Richard, G. B. and Gavin, R. L. (2014). Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *Journal of Chemometrics*, 28, 213-225.
28. Smith, D. P., Lawrence, K. C.. (2008). Heitschmidt. Fertility and Embryo Development of Broiler Hatching Eggs Evaluated with a Hyperspectral Imaging and Predictive Modeling System. *International Journal of Poultry Science*, 7, 1001-1004.
29. Smith. D. P.. J. M. Mauldin. K. C. Lawrence. B. Park and G.W. (2005). Heitschmidt. Detection of fertility and early development of hatching eggs with hyperspectral imaging. Proc 11th European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products. 176-180.
30. Smith, D. P., K. C. Lawrence and G. W. Heitschmidt. (2008). Fertility and Embryo Development of Broiler Hatching

- Evaluated with a Hyperspectral Imaging and Predictive Modeling System. *International Journal of Poultry Science*, 7, 1001-1004.
31. Smith, D. P., Lawrence, K. C., Heitschmidt, G. W. (2006). Detection of hatching and table egg defects using hyperspectral imaging. (Proceedings/Symposium).
 32. Smith, D. P., J. M. Mauldin, K. C. Lawrence, B. Park and G. W. Heitschmidt. (2005). Detection of fertility and early development of hatching eggs with hyperspectral imaging. Proc. 11th European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products. 176-180.
 33. Steven, W. F., Nikolaus, M. S., David, S. P. Jr. and Martin, J. R. (1991). Magnetic Resonance Image Study of the Structure of the Yolk in the Developing Avian Egg. *Journal of Morphology*, 209. 331-342.
 34. R. Meijerhof. (1992). Pre-incubation holding of hatching eggs. *World's Poultry Science Journal*, 48.
 35. Changyeun Mo et al. (2013). Determination of Germination Quality of Cucumber (*Cucumis Sativus*) Seed by LED-Induced Hyperspectral Reflectance Imaging. *J. of Biosystems Eng.*, 38(4). 318-326.
 36. http://www.mfds.go.kr/jsp/common/download.jsp?fileinfo=S*1*%B0%E8%B6%F5%20%B0%FC%B7%C3%20QA.hwp*1c3f6911d2d241dc2a93181cf9847b0a*hwp*/files/upload/1/TB_O_NOTIFY/35415/

1c3f6911d2d241dc2a93181cf9847b0a*81920*2017:01:25%2019:11:

54.

37. 민정례(2012.06.02.). 경기도 ‘부화중지 저질 계란’ 유통 차단 실시간 관리 시스템 구축·일제 정비 실시키로. 인터넷 인천일보. <http://www.incheonilbo.com/news/articleView.html?idxno=4562950><http://www.incheonilbo.com/news/articleView.html?idxno=456295>.
38. Gnfarm homepage. http://www.gnfarm.com/technote/read.cgi?board=ora_egg_info&y_number=10.
39. Skoog 등. 1999. 기기분석의 원리(5판). 박기채 외 역. 자유아카데미.

부록(Appendix)

A. 원 스펙트럼

<chapter 3. 관련>

A-3.1 정규화 전처리 스펙트럼

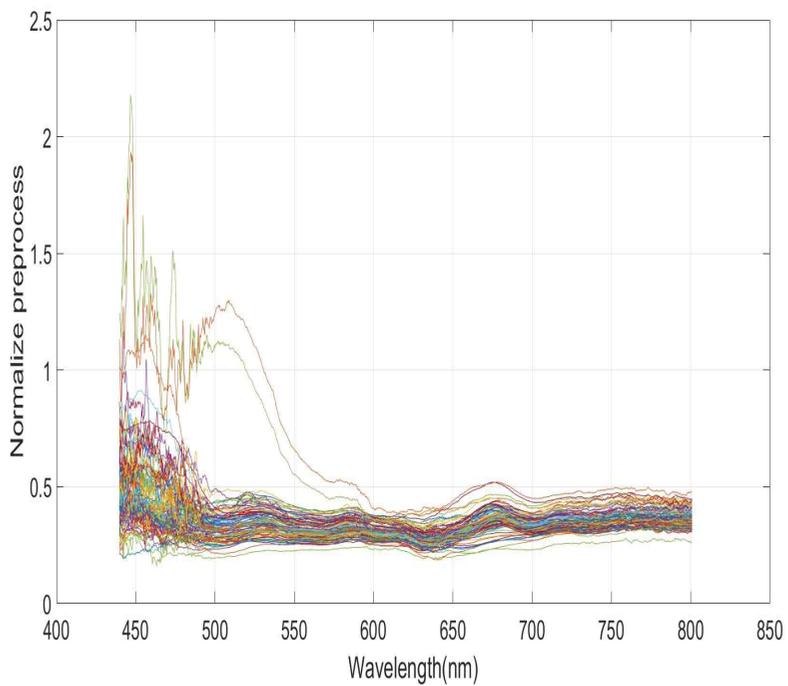


Fig. A-3.1. Raw spectrum with normalize preprocessing at 72 hr under light source type A.

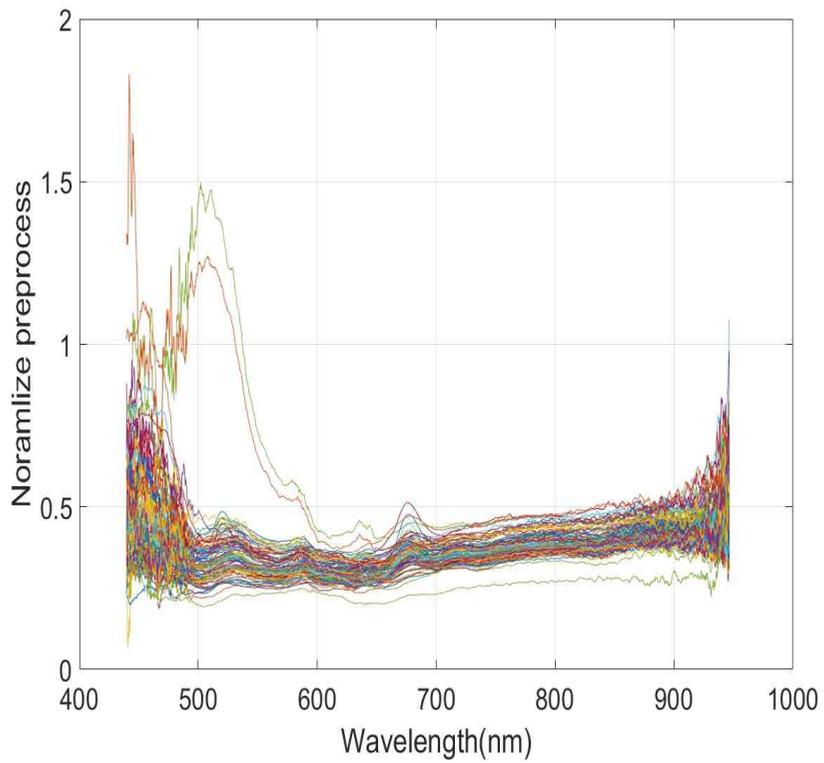


Fig. A-3.2. Raw spectrum with normalize preprocessing under light source type B.

<chapter 5. 관련>

A-5.1. 갈색란 원 투과 스펙트럼

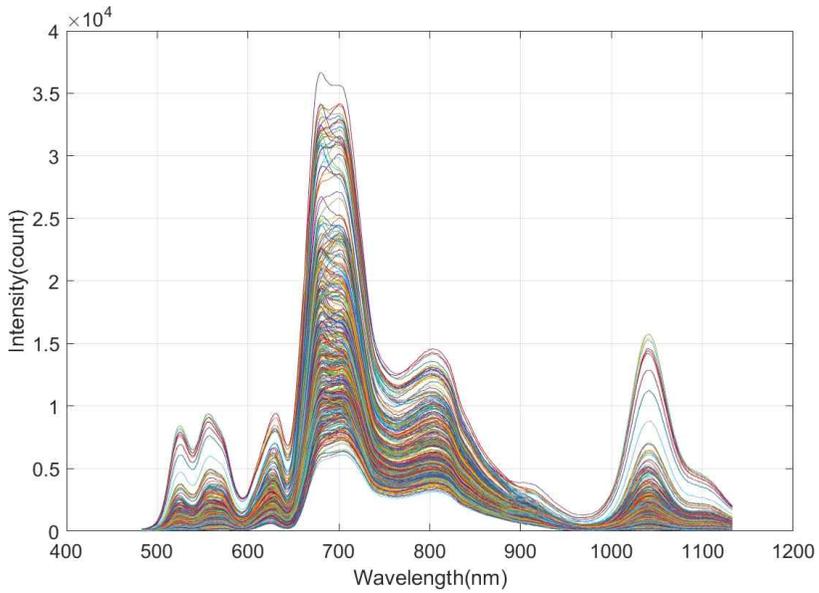


Fig. A-5.1. Transmitted energy spectra of brown egg during storage in VIS/NIR range. (Light source type B)

A-5.2. 백색란 원 스펙트럼

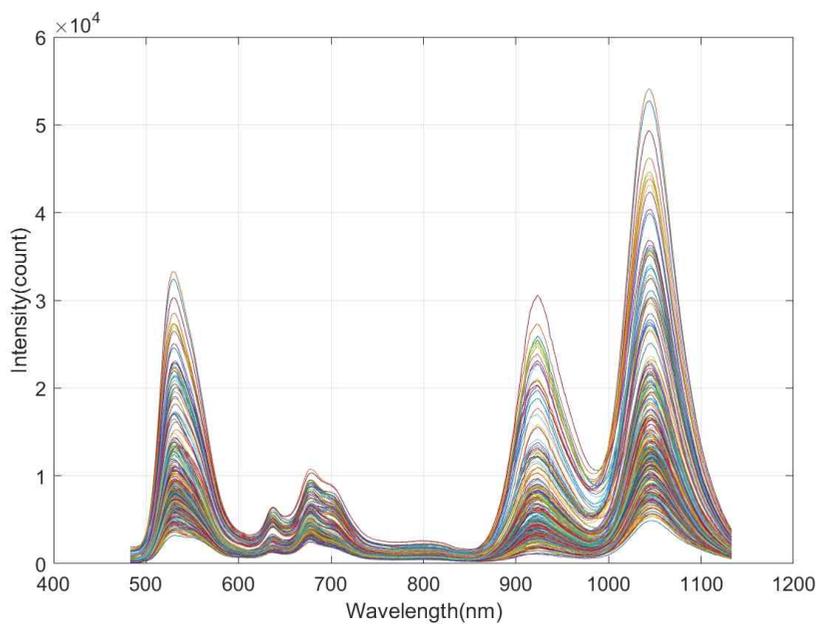


Fig. A-5.2. Transmitted energy spectra of white egg during storage in VIS/NIR range. (Light source type B)

B. 통계 분석(PLSR, PLS-DA)을 위한 매트랩 프로그래밍 코드

<루틴 과정> % 복합 광원 A

```
load 'result_incubation_03.txt'% % 무정란 0, 발생란 1로 정리한  
y값 표
```

```
SI=(1:1:100)';
```

```
spectrum=[ABS_LED(:,380:1428)]; % VIS 스펙트럼 범위 지정 501  
~916nm
```

```
% ABS_LED =전처리한 광원 A 스펙트럼
```

```
concent=result_incubation_03; % 판별값(y)
```

```
%%%%%%%%%데이터 혼합%%%%%%%%%
```

```
data=[SI concent spectrum];
```

```
data1=data(1:63,:);
```

```
data_u=data1;
```

```
data_u(40,:)=[]; % 무정란 이동
```

```
data_u(7,:)=[]; % 무정란 이동
```

```
mean_u=mean(data_u(:,3:end)); % 유정란 평균 스펙트럼
```

```
Anorm_u = (mean_u - min(mean_u))/(max(mean_u)
```

```
-min(mean_u)); % [0,1]정규화
```

```
index643_u=mean(mean_u(:,570:576)); % 643nm
```

```
normal_mean643_u=mean_u./index643_u; %643nm로 정규화
```

```

sdata1=shuffle(data_u); % 유정란 무작위 혼합
x1=sdata1(:,3:end);
y1=sdata1(:,2);
SI1=sdata1(:,1);
ratio=0.5;
[xc1,xv1,yc1,yv1]=PrepareDataSet(ratio,x1,y1);

data2=data(64:100,:); % 무정란
data_mu=[data1(7,:); data1(40,:); data2];
mean_mu=mean(data_mu(:,3:end)); % 무정란 평균
Anorm_mu=(mean_mu - min(mean_mu))/(max(mean_mu) - min
(mean_mu)); % 정규화
index643_mu=mean(mean_mu(:,570:576));
normal_mean643_mu=mean_mu./index643_mu;

sdata2=shuffle(data_mu);
x2=sdata2(:,3:end);
y2=sdata2(:,2);
SI2=sdata2(:,1);
ratio=0.5;
[xc2,xv2,yc2,yv2]=PrepareDataSet(ratio,x2,y2);
xc=[xc1;xc2];
xv=[xv1;xv2];
yc=[yc1;yc2];
yv=[yv1;yv2];
SI=[SI1;SI2];

graph=1;
%상관계수 그래프
wave=[400 1200]; %freq2=Xlabel';

```

```

x=spectrum;
y=concent;
graph=1;
load 'freq2000.txt';
freq2=freq2000(380:1428,:); %그래프 X축 레이블
save freq2.txt freq2 -ascii;

x=data(:,3:end);
y=data(:,2);
[corr]=CorrCalc(x,y,wave,'freq2.txt',graph); % 상관계수 그래프

%수무딩 및 미분 전처리
xc=savgol(xc,31,2,0);
xv=savgol(xv,31,2,0);

%MSC
[xc,xref,alpha,beta]=MSCData(xc);
xv=MSCDataApply(xv,xref);

%SNV
mc=0;
[xc]=SNVData(xc,mc);
[xv]=SNVData(xv,mc);

%PLS 모델 구하기
maxfactor=10;
mc=0;
conc=1;
optfact=8; %팩터수는 매뉴얼로 조정

```

```
[optfactor,R2C,SEC,R2V,SEP,bias,cumpress,b]=PLSCalc(xc,xv,yc,yv,
maxfactor,mc,graph,conc,optfact);
```

이하 함수 코드는 류동수(2001)로부터 제공받은 것으로 본 논문의 통계 분석을 위해 사용되었다.

<PLS 알고리즘 루틴>

function

```
[optfactor,R2C,SEC,R2V,SEP,bias,cumpress]=PLSCalc(xc,xv,yc,yv,maxfacto  
r,mc, graph,conc,optfact)
```

```
%PLS routine by NIPALS algorithm
```

```
%
```

```
%I/O Format :
```

```
[optfactor,R2C,SEC,R2V,SEP,bias,cumpress]=PLSCalc(xc,xv,yc,yv,maxfactor,mc,gra  
ph,conc,optfact)
```

```
%
```

```
%[INPUT]
```

```
%xc : Calibration Spectrum, xv : Validation Spectrum
```

```
%yc : Calibration Concentration, yv=Validation Concentration
```

```
%maxfactor : Max. No. of PLS factors
```

```
%mc : Mean Centering Flag (0=no,1=yes)
```

```
%[OUTPUT]
```

```
%optfactor : Optimal Factor No. by Cross-Validation(leave-one-out)
```

```
%R2C : Determination of Calibration, R2V : Determination of Validation
```

```
%SEC : Standard Error for Calibration,SEP : Standard Error for Validation
```

```
%bias : Validation bias
```

```
%
```

```
% received from Dongsoo Ryu(2001)
```

```
[m1,n1]=size(xc);
```

```
[m2,n2]=size(xv);
```

```
%Mean Centering
```

```
if mc == 1
```

```
    [xc,mx] = mncn(xc);
```

```
    [yc,my] = mncn(yc);
```

```

    xv=scale(xv,mx);
    yv=scale(yv,my);
end
%PLS Routine
b = pls(xc,yc,maxfactor,0);
%Cross Validation : via SIMPLS algorithm, leave-one-out
[press,cumpress,rmsecv,rmsec] = crossval(xc,yc,'sim','loo',maxfactor,[],[],0,0,[]);
%Optimal Factor Selection
[pressmin,optfactor]=min(cumpress);
if nargin < 9
    optfactor = optfactor;
else
    optfactor=optfact;
end
%Calibration
if mc == 1
    ycal = rescale(xc*b(optfactor,:)',my);
elseif mc == 0
    ycal = xc*b(optfactor,:);
end
%Validation
if mc == 1
    yval = rescale(xv*b(optfactor,:)',my);
elseif mc == 0
    yval = xv*b(optfactor,:);
end
if mc == 1
    %Rescaling of scaled(mc) yc,yv
    yc=rescale(yc,my);
    yv=rescale(yv,my);
end

%Calulation of R^2, SEC, SEP
%%For Calibration
R2C_temp= corrcoef(yc,ycal);
R2C=(R2C_temp(1,2)).^2;
%rmsec=sqrt(mean((yc-ycal).^2));

```

```

SEC=sqrt(sum((yc-ycal).^2,1)/(m1-optfactor-1));
%%For Prediction
R2V_temp= corrcoef(yv,yval);
R2V=(R2V_temp(1,2)).^2;
%rmsep=sqrt(mean((yv-yval).^2));
bias=sum((yv-yval),1)/m2;
SEP=sqrt(sum(((yv-yval)-bias).^2,1)/(m2-1));

R2C_str=num2str(R2C);
SEC_str=num2str(SEC);
R2V_str=num2str(R2V);
SEP_str=num2str(SEP);
bias_str=num2str(bias);

if graph == 1
    if conc==0 %for Acidity
        %Plotting Results
        %Press Curve
        figure;
        plot(cumpress);
        xlabel('Number of Factors');
        ylabel('Cumulative PRESS');
        title('PLS Cumulative PRESS Curve');
        optfactor_str=num2str(optfactor);
        text(optfactor,pressmin+10,'Opt. Factor = ');
        text(optfactor+10,pressmin+10,optfactor_str);

        xmin=min(yc);
        xmax=max(yc);
        xaxis_range = [xmin xmax];
        yaxis_range = xaxis_range;
        textx_pos = xmin+(xmax-xmin)*2/3;
        texty_pos = xmin+(xmax-xmin)*1/4;

        %Calibraion Plot
        figure;
        plot(yc,yval,'ro');
    end
end

```

```

line(xaxis_range',yaxis_range');
xlabel('Actual Value')
ylabel('Predicted Value');
title('Calibratin Plot');
text(textx_pos,texty_pos,'R^2=');
text(textx_pos+1,texty_pos,R2C_str);
text(textx_pos,texty_pos-0.2,'SEC=');
text(textx_pos+1,texty_pos-0.2,SEC_str);
%Validation Plot
figure;
plot(yv,yval,'ro');
line(xaxis_range',yaxis_range');
xlabel('Actual Value')
ylabel('Predicted Value');
title('Validation Plot');
text(textx_pos,texty_pos,'R^2=');
text(textx_pos+1,texty_pos,R2V_str);
text(textx_pos,texty_pos-0.2,'SEP=');
text(textx_pos+1,texty_pos-0.2,SEP_str);
text(textx_pos,texty_pos-0.4,'bias=');
text(textx_pos+1,texty_pos-0.4,bias_str);
else % for SSC
%Press Curve
figure;
plot(cumpress);
xlabel('Number of Factors');
ylabel('Cumulative PRESS');
title('PLS Cumulative PRESS Curve');
optfactor_str=num2str(optfactor);
text(optfactor,pressmin+0.1,'Opt. Factor = ');
text(optfactor+10,pressmin+0.1,optfactor_str);

xmin=min(yc);
xmax=max(yc);
xaxis_range = [xmin xmax];
yaxis_range = xaxis_range;
textx_pos = xmin+(xmax-xmin)*2/3;

```

```

texty_pos = xmin+(xmax-xmin)*1/4;

%Calibraion Plot
figure;
plot(yc,ycal,'ro');
line(xaxis_range',yaxis_range');
xlabel('Actual Value')
ylabel('Predicted Value');
title('Calibratin Plot');
text(textx_pos,texty_pos,'R^2=');
text(textx_pos+0.1,texty_pos,R2C_str);
text(textx_pos,texty_pos-0.05,'SEC=');
text(textx_pos+0.1,texty_pos-0.05,SEC_str);
%Validation Plot
figure;
plot(yv,yval,'ro');
line(xaxis_range',yaxis_range');
xlabel('Actual Value')
ylabel('Predicted Value');
title('Validation Plot');
text(textx_pos,texty_pos,'R^2=');
text(textx_pos+0.1,texty_pos,R2V_str);
text(textx_pos,texty_pos-0.05,'SEP=');
text(textx_pos+0.1,texty_pos-0.05,SEP_str);
text(textx_pos,texty_pos-0.1,'bias=');
text(textx_pos+0.1,texty_pos-0.1,bias_str);
end
end

```

< 전처리 알고리즘 - 평활화 >

```

function [xt,cm]=SmoothData(x, width, order)
%Smooth the spectral data by Savitzky-Golay Method
%
%I/O Format : [xt,cm]=SmoothData(x, width, order);
%
% received from Dongsoo Ryu(2001)

```

```
[m,n]=size(x);
[xt, cm]=savgol(x,width,order,0);
```

```
function [xt]=SmoothDataApply(x, cm)
%Smooth the spectral data by Savitzky-Golay Method
%
%I/O Format : [xt]=SmoothData(x, cm)
%
% received from Dongsoo Ryu(2001)
```

```
[m,n]=size(x);
xt=x*cm;
```

<전처리 알고리즘 - 미분>

```
function [xt,cm]=DerivativeData(x, width, order, derive)
%Derivative the spectral data by Savitzky-Golay Method
%
%I/O Format : [xt]=DerivativeData(x, width, order, derive);
%
%x : mXn, m=No. of Samples, n=No. of lambda
%xt : transformed data
%
% received from Dongsoo Ryu(2001)
```

```
[m,n]=size(x);
[xt,cm]=savgol(x,width,order,derive);
function [xt]=DerivativeDataApply(x,cm)
%Derivative the spectral data by DerivativeData function
%
%I/O Format : [xt]=DerivativeDataApply(x,cm)
%
%x : mXn, m=No. of Samples, n=No. of lambda
%xt : transformed data
%
% provided by Dongsoo Ryu(2001)
```

```
[m,n]=size(x);
xt=x*cm;
```

<전처리 알고리즘 - MSC>

```
function [xt,xref,alpha,beta]=MSCData(x,mc)
%Transforms the spectral data by MSC method
%
%I/O Format : [xt,xref,alpha,beta]=MSCData(x,mc)
%
%x : mXn, m=No. of Samples, n=No. of lambda
%xt : transformed data
%mc : 1=Mean Centering, 0=No(default)
%
%Modified from PLS_Toolbox by Dongsoo Ryu
% received from Dongsoo Ryu(2001)
```

```
if nargin <2, mc=0;end
```

```
[m,n]=size(x);
xref=mean(x);
[xt,alpha,beta] = mscorr(x,xref,mc);
```

```
function [xt]=MSCDataApply(x,xref,mc)
%Apply the MSC transformation to new data
%
%I/O Format : [xt]=MSCDataApply(x,xref,mc)
%
%x : mXn, m=No. of Samples, n=No. of lambda
%xt : transformed data
%xref : from MSCData function
%mc : 1=Mean Centering, 0=No(default)
%
% preceived from Dongsoo Ryu(2001)
```

```
if nargin<3, mc = 0; end
[xt]=mscorr(x,xref,mc);
```

<전처리 알고리즘 -SNV>

```
function [xt]=SNVData(x,mc)
%Transforms the spectral data by SNV method
%
%I/O Format : [xt]=SNVData(x,mc)
%
```

```

%x : mXn, m=No. of Samples, n=No. of lambda
%xt : transformed data
%mc : 1=Mean Centering, 0=No(default)
%
% received from Dongsoo Ryu(200

if nargin <2, mc=0;end

[m,n]=size(x);
for i=1:1:m
    xm(i)=sum(x(i,:),2)/n;%mean of wavelength-direction
end

if mc == 1
    [x,alpha]=mncn(x);
    for i=1:1:m
        xt(i,:)=(x(i,:)-xm(i))/sqrt(sum( (x(i,:)-xm(i) ).^2,2)/(n-1));
    end
elseif mc == 0
    for i=1:1:m
        xt(i,:)=(x(i,:)-xm(i))/sqrt(sum( (x(i,:)-xm(i) ).^2,2)/(n-1));
    end
end
end

```

C. MR image

< MRI 측정 조건 >

Example : 그룹 #2 실험의 6회차 5번 샘플 34슬라이스의 측정 조건(매틀랩에서 Dicominfo('60534.dcm') 실행)

Filename: 'D:\논문 데이터 파일\File_Numbering\Egg_170321_08
\60534.dcm'
FileModDate: '21-3-2017 08:11:36'
FileSize: 132948
Format: 'DICOM'
FormatVersion: 3
Width: 256
Height: 256
BitDepth: 16
ColorType: 'grayscale'
FileMetaInformationGroupLength: 186
FileMetaInformationVersion: [2×1 uint8]
MediaStorageSOPClassUID: '1.2.840.10008.5.1.4.1.1.4'
MediaStorageSOPInstanceUID: '1.2.826.0.1.3680043.8.1276.1732175925.305.1000.5.34'
TransferSyntaxUID: '1.2.840.10008.1.2'
ImplementationClassUID: '1.2.826.0.1.3680043.8.1276'
ImplementationVersionName: 'Aspect1.0'
SpecificCharacterSet: 'ISO_IR 100'
ImageType: 'ORIGINAL\PRIMARY\OTHER'
SOPClassUID: '1.2.840.10008.5.1.4.1.1.4'
SOPInstanceUID: '1.2.826.0.1.3680043.8.1276.1732175925.305.1000.5.34'
StudyDate: '20170321'
SeriesDate: '20170321'
AcquisitionDate: '20170321'
ContentDate: '20170321'
StudyTime: '075925.000000'

SeriesTime: '080717.000000'
AcquisitionTime: '080717.000000'
ContentTime: '081135.070763'
AccessionNumber: ''
Modality: 'MR'
Manufacturer: 'Aspect'
InstitutionName: 'Chonbuk National University'
ReferringPhysicianName: [1×1 struct]
StationName: 'Empty'
PerformingPhysicianName: [1×1 struct]
OperatorName: [1×1 struct]
ManufacturerModelName: 'M3'
PatientName: [1×1 struct]
PatientID: 'Egg_exp_170321_2'
PatientBirthDate: '20170321'
PatientSex: 'M'
BodyPartExamined: 'BODY'
ScanningSequence: 'GR'
SequenceVariant: 'SP'
ScanOptions: ''
MRAcquisitionType: '3D'
SequenceName: 'Amos Gradient Ec'
SliceThickness: 1
RepetitionTime: 14
EchoTime: 4
NumberOfAverages: 1
ImagingFrequency: 44.5215
ImagedNucleus: 'H1'
EchoNumber: 1
MagneticFieldStrength: 1
SpacingBetweenSlices: 1
NumberOfPhaseEncodingSteps: 256
EchoTrainLength: 1
PercentSampling: 100

PercentPhaseFieldOfView: 100
PixelBandwidth: 156.3000
ProtocolName: 'egg test 170319'
ReconstructionDiameter: 70
AcquisitionMatrix: [4×1 uint16]
InPlanePhaseEncodingDirection: 'ROW'
FlipAngle: 20
VariableFlipAngleFlag: 'NO'
SAR: 0
dBdt: 22.5314
PatientPosition: 'FFP'
KSpaceFiltering: 'NONE'
AcquisitionDuration: 232.9880
MRFOVGeometrySequence: [1×1 struct]
MRIImageFrameTypeSequence: [1×1 struct]
StudyInstanceUID: '1.2.826.0.1.3680043.8.1276.1732175925.305.1000'
SeriesInstanceUID: '1.2.826.0.1.3680043.8.1276.1732175925.305.1000.5'
StudyID: '305'
SeriesNumber: 5
InstanceNumber: 34
ImagePositionPatient: [3×1 double]
ImageOrientationPatient: [6×1 double]
FrameOfReferenceUID: '1.3.76.9.1.2.1.1.1001.110'
Laterality: 'L'
ImagesInAcquisition: 64
PositionReferenceIndicator: ''
SliceLocation: 1.5000
SamplesPerPixel: 1
PhotometricInterpretation: 'MONOCHROME2'
Rows: 256
Columns: 256
PixelSpacing: [2×1 double]
PixelAspectRatio: [2×1 double]
BitsAllocated: 16

BitsStored: 16
HighBit: 15
PixelRepresentation: 0
WindowCenter: 8388
WindowWidth: 16399
RealWorldValueMappingSequence: [1×1 struct]

< MRI 3차원 이미지 >



Fig. C-1. The coronal MR image of hen's egg.



Fig. C-2. The sagittal MR image of of hen's egg.



Fig. C-3. The axial MR image of hen's egg.

< 윤곽선 추출 및 형상 지수 계산 >

```
CC=[]; %계란의 물성 정보
st=8;

for b=1:40 % 읽어 들일 파일의 범위
    new_b=800+b;
    s=['cd D:\egg06\',num2str(new_b),'\Dicoms'];
    eval(s); % 폴더 열기 문자열 실행
    for q=1:10; % 읽어 들일 슬라이드의 범위
        k1=27+q;
        if b < 10
            filename=[num2str(st),'0',num2str(b),num2str(k1),'.dcm'];
;            else
                filename=[num2str(st),num2str(b),num2str(k1),'.dcm'];
            end;

f=dicomread(filename);
g=mat2gray(f);
h=flipud(g); % 상하 뒤집기
ho=flipud(g); %원이미지 출력용
%레퍼런스로 나누기
r=h(158:167,234:244);
%레퍼런스 위치
R=r(:); %하나의 열
M=mean(R);
h=h/M; %레퍼런스로 나눠주기
h(155:175,232:252)=0.1;

h1=(h>=0.6);% 문턱값 1
h2=(h>=0.26); % 문턱값 2

e1=edge(h1,'sobel');
e2=edge(h2,'sobel');
```

```

se90 = strel('line', 3, 90);
se0 = strel('line', 3, 0);
BWsdil1 = imdilate(h1, [se90 se0]);
BWsdil2 = imdilate(h2, [se90 se0]);

%imshow(BWsdil);
BWdfill1 = imfill(BWsdil1, 'holes');
BWdfill2 = imfill(BWsdil2, 'holes');

%figure, imshow(BWdfill);

BWnobord1 = imclearborder(BWdfill1, 4);
BWnobord2 = imclearborder(BWdfill2, 4);

%figure, imshow(BWnobord), title('cleared border image');

seD = strel('diamond',1);

BWfinal1 = imerode(BWnobord1,seD);
BWfinal2 = imerode(BWnobord2,seD);

BWfinal1= imerode(BWfinal1,seD);
BWfinal2 = imerode(BWfinal2,seD);

% 좌표값
[b1,L1]=bwboundaries(BWfinal1,8,'holes'); % 노른자 윤곽선 좌표
[b2,L2]=bwboundaries(BWfinal2,8,'holes'); % 껍질 윤곽선 좌표

P=regionprops(BWfinal1,'area', 'centroid', 'Perimeter'); %면적, 중심,
둘레길이
P2=regionprops(BWfinal1,'convexhull', 'majoraxislength',
'minoraxislength');

```

```

Area(q)=P.Area; %노른자 면적
A1=P.Area;
Outline_length(q)=P.Perimeter; % 노른자 윤곽선 길이
Out1=P.Perimeter;
Circularity(q)=(A1*4.0*pi)/((Out1).^2); % 원형도 계산
MajorAxisLength(q)=P2.MajorAxisLength;
MinorAxisLength(q)=P2.MinorAxisLength;
%ConvexHull{q}=cat(1,P2.ConvexHull);

C1=P.Centroid;
Centroid=fix(C1); % 중심을 정수값으로 변환

x_Cen=Centroid(1,1); % 중심 x값
y_Cen=Centroid(1,2); % 중심 y값

BWoutline = bwperim(BWfinal1);
BWoutline2 = bwperim(BWfinal2);

Segout = ho;
Segout(y_Cen-2:y_Cen+2,x_Cen-2:x_Cen+2)=0; % 화면에 무게 중심
검정색으로 표시
Segout(BWoutline) = 0; % 화면에 윤곽선 검정색으로 표시
Segout(BWoutline2) = 255;

N1=[];
N2=[];
S=[];
x1=b1{1,1}; % 노른자 둘레의 좌표
x2=b2{1,1}; % 계란 둘레의 좌표

xx1 =x1(:,2); %x좌표
xx2 =x2(:,2);
xy1=x1(:,1); %y좌표
xy2=x2(:,1);

```

```

j=0;
e=0;
for i=1:length(xx1)
    % if 100<x(i,1)<160 && x(i,2)>Centroid(1,2);
    if x_Cen-20<xx1(i,1) & xx1(i,1)<x_Cen+20; % 중심 X좌표
        픽셀부터 -10, +10픽셀 하여 범위 설정
        if xy1(i,1) < y_Cen;
            j=j+1;
            Segout(xy1(i),xx1(i))=255;
            N1(j)=sqrt((xx1(i)-x_Cen).^2+(xy1(i)-y_Cen).^2); %
중심에서 북쪽 방향으로 윤곽선까지의 길이
        else
            Segout(xy1(i),xx1(i))=255;
            e=e+1;
            z(e,:)=[xx1(i) xy1(i)];
            S(e)=sqrt((xx1(i)-x_Cen).^2+(xy1(i)-y_Cen).^2); %
중심에서 남쪽 방향으로 윤곽선까지의 길이
        end;
    end;
end;
end;

m=0;
n=0;
for m=1:length(xx2)
    if x_Cen-20<xx2(m,1) & xx2(m,1)<x_Cen+20
        if xy2(m,1)<y_Cen;
            n=n+1;
            Segout(xy2(m),xx2(m))=0;
            N2(n)=sqrt((xy2(m)-x_Cen).^2+(xx2(m)-y_Cen).^2); %
중심에서 북쪽 방향으로 꺾질 윤곽선까지의 길이
        end;
    end;
end;
end;

```

```

% 판별식
    max_N1(q)=max(N1); % 노른자 중심점에서 노른자 위쪽
방향(북쪽)으로 외곽까지 최단 거리 Min(N1)
    min_S(q)=min(S); % 노른자 중심점에서 노른자 아래쪽
방향(남쪽)으로 외곽까지 최단 거리
    ratio_D_1(q)=max(N1)/min(S); % 노른자 중심에서 노른자
외곽선으로 위/아래 방향 거리 비
    length_D(q)=max(N2)-max(N1); % 노른자 중심에서 (껍질까지의
최대 거리(N2)-노른자 외곽 까지의 최대거리 Max(N1)
    ratio_Length_D(q)=length_D(q)/max(S); % (중심에서 북쪽
껍질까지 거리 - 중심에서 북쪽 노른자까지의 거리)/ (중심에서 노른자
남쪽까지의 거리)
    ratio_Axis(q)=MajorAxisLength(1,q)/MinorAxisLength(1,q); %
장축과 단축의 비
end;
result_Area(b,:)=Area; % 선택한 개수만큼 행렬로 표기
result_Circularity(b,:)=Circularity;
result_ratio_D_1(b,:)=ratio_D_1;
result_length(b,:)=length_D;
result_ratio_Length_D(b,:)=ratio_Length_D;
result_MajorAxisLength(b,:)=MajorAxisLength;
result_MinorAxisLength(b,:)= MinorAxisLength;
result_ratio_Axis(b,:)= ratio_Axis;
end;

```

Abstract

Early Detection of Infertile Egg during Incubation and Determination of Freshness during Storage using Spectroscopy

Hak Sung, Kim

Biosystem engineering

The Graduate School

Seoul National University

The first inspection which is called candling to pick out the embryo-free and infertile eggs is generally carried out by manpower between 5 and 7 days during incubation, and all the embryo-free eggs are discarded. If an automatic technology is developed to discriminate the embryo-free within a shorter time (3 days), manpower and energy required for incubation can be reduced and the embryo-free eggs can be utilized for other purposes.

The purpose of this study is to develop a technique for early detection of infertile egg by using spectroscopic analysis method which has been applied to evaluate quality of agricultural products nondestructively and by using 1.0 tesla MRI which was

recently developed for industrial use, and furthermore to develop a freshness measurement technique of the egg in storage. The results of this study are summarized as follows.

1. The transmitted energy spectra were measured from the egg samples with illumination devices which is composed of blue and green LEDs (Light source type A) and which is of halogen lamp in addition to the LEDs (Light source type B). and a PLS-DA model was developed to discriminate the embryo-free (infertile) egg. The developed PLS-DA model shows discrimination rate as high as 90% from the incubation time of 40 hours under the light source type A and from 22 hours of incubation under light source type B. As the time passed, the discrimination rate increased slightly and the stability of the model improved. As a result, the detection rate was found to be 92% or more at about 56 hours of incubation.

The result of this early detection is believed due to the enhancement of the blue light source near the 450nm band in the illumination device and due to the normalization using the original spectrum in preprocessing of spectrum data which is developed in this study.

2. Sixty four(64) slices of each egg in the axial direction were obtained using 1.0T MRI with TR=14msec, TE=4msec and Flip angle=20° during incubation. In order to quantify the change of the yolk shape during incubation, an image processing algorithm was developed to analyze contour, centroid, circularity, ratio of major and minor axes and shape indices of the yolk image. Average image information of the three central slices was used to calculate shape indices which are useful for discrimination of

fertile and infertile egg. Among them circularity and ratio of major and minor axes of yolk showed discrimination rates of 98.3% and 90.0% respectively at 72 hours of incubation

The ratio of major–minor axes of yolk image obtained by MR image analysis was predicted by a PLSR model of spectroscopic analysis. The result presented that R^2 and SEP were 0.46132 and 0.11634, respectively. Further studies are recommended to improve the relationship between the two methods.

3. PLSR models were developed to predict the freshness(Haugh Unit) of the infertile eggs with the transmitted energy spectra measured from Hy-line brown and white Leghorn eggs in VIS/NIR range(Light source type B). The results of HU prediction presented that $R^2=0.72132$, $SEP=8.84HU$ and measurement error=13.63% for the brown and $R^2=0.9216$, $SEP=5.27$ and measurement error=8.70% for the white. Further study is recommended for practical use in case of the brown.

4. According to the shape analysis of the MR image of the embryo development in egg and the discrimination analysis of infertile egg by spectroscopic method, the shape of the yolk began to change rapidly from about 40 hour incubation, and it was found to discriminate the infertile at about 56 hour incubation.

**Keyword : Incubation, MR image, VIS/NIR Spectroscopy,
Infertile hen's egg, Haugh unit**

Student Number : 2003-30371