

# PC카메라와 일반광학현미경을 이용한 빵효모 배양액의 효모세포 자동계수

이형춘

## Automatic Counting of Yeast Cells in Baker's Yeast Culture Using PC Camera and Conventional Light Microscope

Hyeong-Choon Lee

접수: 2010년 8월 5일 / 게재승인: 2011년 1월 22일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract** Automatic counting of yeast cells in baker's yeast culture was tried using a conventional light microscope equipped with a pc camera. Relatively good binary image was obtained by using white LED as microscope light source, but uneven brightness distribution in original image hindered counting accuracy. A block binarization method using local thresholds proportional to local brightnesses was used to get improved binary images. The brightnesses of the blocks were expressed as the value component in HSV color model. Good quality binary images were obtained by binarization on  $8 \times 6$  blocks of original images and connected-component labelling of the binarized images produced reliable counting results in the concentration range  $1.4 \times 10^5/\text{mL} \sim 1.4 \times 10^7/\text{cells/mL}$ .

**Keywords:** automatic-counting, yeast, PC-camera, light-microscope

### 1. 서론

효모 배양액의 효모세포를 자동으로 계수할 수 있으면, 수동 계수에 비하여 시간과 노력이 절약된다. 뿐만 아니라, 배양액 자동 채취 장치와 자동계수 장치를 연결한 시스템을 사용

하면 배양액의 실시간 모니터링이 가능해져서 효모 증식의 실시간 자동 제어와 같은 고급 작업이 가능해진다. 효모 세포를 자동계수하기 위해서는 보통 카메라와 현미경을 사용하여 효모 영상을 얻는다. Zalewski와 Buchholz [1]는 *Saccharomyces cerevisiae* 배양액의 자동 채취 및 자동계수 시스템을 사용하여 효모수를 실시간 자동계측하였는데 효모 영상을 얻기 위하여 CCD카메라와 도립현미경을 사용하였다. Rehbock 등 [2]은 CCD카메라와 위상차현미경으로 추정되는 현미경으로 구성된 시스템을 사용하여 *Saccharomyces cerevisiae*를 자동계수하였다. 자동계수외의 다른 목적을 위하여 효모영상을 취득한 연구들도 있다. Puchkov [3]는 알콜 발효시 *Saccharomyces cerevisiae* 세포의 생존성을 판단하기 위하여 형광염료로 염색한 효모의 영상을 디지털카메라와 형광현미경으로 얻었으며, Wei 등 [4]은 *Saccharomyces cerevisiae* 세포의 생존성을 실시간으로 결정하기 위한 효모 영상 취득에 암시야현미경을 사용하였다. Cahill 등 [5]은 알콜발효시 *Saccharomyces cerevisiae* 세포의 글리코젠 함량을 자동결정하기 위하여 루골액으로 염색한 효모세포의 영상을 칼라비디오 카메라와 일반광학현미경을 사용하여 얻었다. 자동계수 또는 다른 목적으로 효모 영상을 취득할 경우 염색 등의 전처리과정이 없을 경우에는 거의 대부분 특수현미경을 사용하거나 보조장치가 장착된 일반광학현미경을 사용하였다. 효모 영상 취득에 보조장치 없는 일반광학현미경이 사용되지 않은 이유는 영상의 질이 낮기 때문이라 생각되었다. 그러나, 보조장치 없는 일반광학현미경으로 효모 영상을 취득하여 자동계수 등을 수행할 수 있다면 더 간단하고 경제적인 시스템을 구성할 수 있으며, 관련분야의 연구에 도움이 된다. 이러한 생각으로 예비실험을 수행한 결과,

서원대학교 식품영양학과  
Department of Food and Nutrition, Seowon University, Cheongju 361-742, Korea  
Tel: +82-43-299-8744, Fax: +82-43-299-8744  
e-mail: hclee@seowon.ac.kr

최근 사용이 증가하고 있는 백색 LED 조명을 사용할 경우 가장 단순한 일반광학현미경으로도 비교적 우수한 이진영상을 얻을 수 있었으며, 영상처리기법으로 이진영상을 개선할 경우 효모 자동계수가 가능하다고 판단되었다.

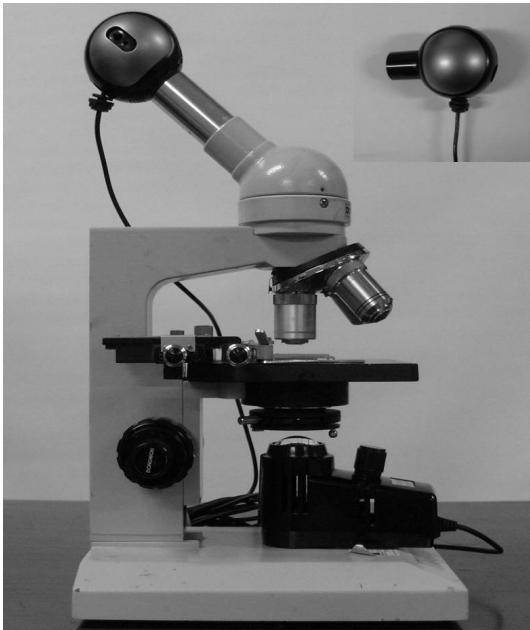
PC카메라는 다른 영상입력장치에 비하여 저렴 [6]하고, 성능이 많이 향상되었으며, 개인용 컴퓨터의 주변기기로 많이 보급되어 있으므로 PC카메라를 시스템 자동화에 응용할 수 있으면 다른 영상입력장치를 이용하는 것보다 유리하다. 따라서, 현재 영상처리 연구에의 응용이 증가하고 있으며, 수치 제어 (numerical control)에 응용한 예 [7,8], 가정보안시스템을 구성한 예 [9] 및 적정의 자동화에 응용한 예 [10-12]가 있다.

이러한 관점에서 본 연구에서는 가장 단순한 일반광학현미경과 PC카메라와 컴퓨터로 구성된 영상처리시스템을 이용하여, 빵효모 배양액의 효모세포 자동계수의 가능성을 알아보았다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 효모 배양액 시료

제빵용 인스턴트이스트 (제니코식품주식회사) 분말을 Yeast extract-malt extract broth (difco)배지에 현탁시키고, 이 현탁액을 취하여 Yeast extract-malt extract agar (difco)배지에 희석도말하여 30°C, 48시간 배양하였다. 그 다음 고체배지상에 형성된 집락 한 개를 취하여 Yeast extract-malt extract broth배지에 접종하여 30°C, 24시간 배양한 원액과 원액을 멸균한 Yeast extract-malt extract broth배지로 희석한 희석액을 혈구계산판 (Neubauer improved)에 주입하여 영상 획득용 시료로 사용하였다.



**Fig. 1.** A conventional light microscope equipped with a pc-camera and an LED illuminator. In the upper right side of the photo, there is the pc-camera separated from the body tube of the microscope.

### 2.2. 영상 획득 장치

일반광학현미경 (동원시스템즈정밀, DM15CM)과 PC카메라 (Logitech, QuickCam S5500)와 개인용 컴퓨터 (삼성전자(주), DM-V70)를 조합하여 영상 획득에 사용하였다. 현미경 배율은 100배였으며, 조명기는 LED조명기 (동원시스템즈정밀) 또는 텡스텐램프 조명기 (동원시스템즈정밀)를 사용하였다.

PC카메라를 현미경 경통에 삽입한 방법은 다음과 같다. 즉, 접안렌즈에서 현미경 경통으로 들어가는 원통 부분을 분리한 것을 렌즈를 제거한 PC카메라 센서 둘레에 접착제로 부착하여 경통에 삽입하였다 (Fig. 1).

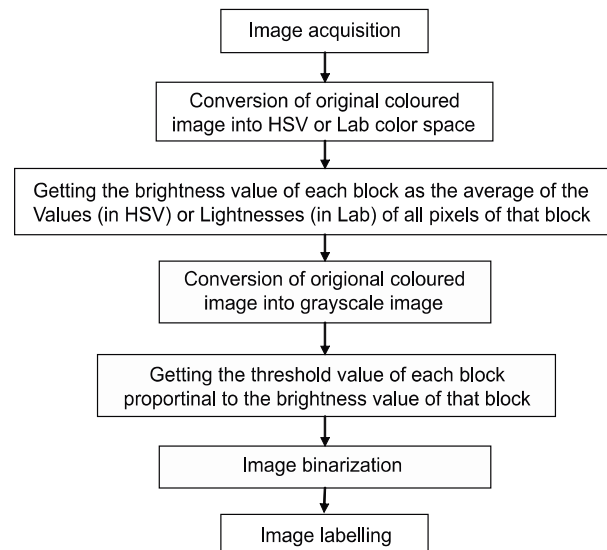
### 2.3. 영상처리방법

PC카메라로 640 × 480픽셀의 크기로 획득한 영상을 흑백영상으로 변환하고 이진화한 후 라벨링하는 과정으로 처리하여 효모 세포를 계수하였다.

이진화 방법은 전체 영상에 대하여 한개의 역치를 사용하는 (global thresholding) 단순이진화 방법과 블록이진화 방법을 사용하였다. 블록이진화 방법에서는 전체 영상을 12블록 또는 48블록으로 나누고, 각 블록의 밝기값 (brightness value)을 산출한 후 밝기값 (brightness value)에 비례한 역치를 설정하여 이진화를 수행하였다. 한 블록의 밝기값은 해당 블록의 모든 픽셀의 Value값 (HSV컬러공간의 경우) [13] 또는 Lightness값 (Lab 컬러공간의 경우) [13]의 평균치로 나타내었다. 밝기값으로부터 각 블록의 역치를 산출하는 식은 다음과 같다.

$$\text{역치} = \{(\text{역치최대치} - \text{역치최소치}) / (\text{블록밝기값최대치} - \text{블록밝기값최소치})\} \times \text{블록밝기값} + \text{역치최소치}$$

식에서 역치최대치와 역치최소치는 임의로 설정한 값이며, 블록밝기값최대치와 블록밝기값최소치는 각각 해당 블록의 모든 픽셀들의 밝기값들 중 최대치와 최소치이다.



**Fig. 2.** Flowchart of the image processing for the automatic counting of yeast cells in yeast cultures.

라벨링에서는 50픽셀이상의 연결된 영역을 하나의 효모 세포로 취급하였으며, 라벨링 프로그램은 OpenCV KOREA 커뮤니티 홈페이지의 ‘OpenCV 강좌와 팁’ 게시판에 업로드된 프로그램 [14]을 참고하여 작성하였다. 빵효모 배양액의 효모세포 자동계수 프로그램의 흐름도를 Fig. 2에 나타내었다. 프로그래밍 언어는 Visual C++ 2005를 사용하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 단순이진화

빵효모 배양원액 시료에 대하여 텅스텐램프 조명기를 사용한 현미경으로 획득한 영상을 단순이진화 방법으로 처리한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 역치값 50일 경우 (Fig. 3(a)) 상대적으로 밝은 가운데 부분의 효모세포 영상이 제대로 나타나지 않았으며, 밝은 부분의 영상을 확보하기 위하여 역치값을 150으로 올릴 경우 (Fig. 3(b)) 상대적으로 어두운 주변의 음영이 짙어져서 자동계수에 적합하지 않았다.

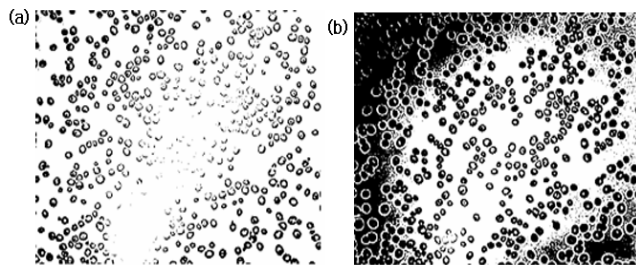


Fig. 3. Binarized microscopic images resulted from using tungsten lamp as a light source. Global threshold values for binarization were 50 (a) and 150 (b).

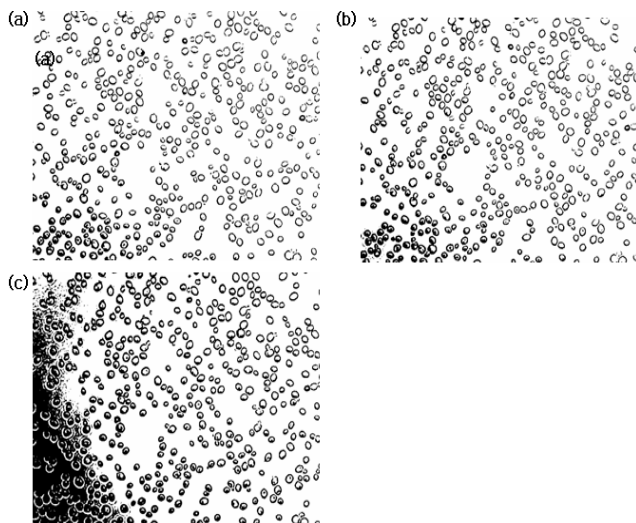


Fig. 4. Binarized images resulted from using LED as a light source. Global threshold values for binarization were 30 (a), 50 (b) and 150 (c).

백색 LED 조명기를 사용하여 획득한 영상을 단순이진화 방법으로 처리한 영상을 Fig. 4에 나타내었다. 텅스텐램프 조명기보다는 밝기가 더 균일한 영상이 얻어졌다. 그림

에서와 같이 역치값 30 (Fig. 4(a))에서는 왼쪽 밑부분인 가장 어두운 부분은 세포 둘레가 진하게 연결되어 있으나, 오른쪽 밝은 부분은 세포 둘레의 연결이 끊어지는 것이 나타나므로 이 부분에서는 자동계수시 세포 한개가 여러개로 계수될 수 있다고 생각되었다. 밝은 부분의 영상을 개선하기 위하여 역치값을 올릴 경우, 역치값 50 (Fig. 4(b))에서 이미 가장 어두운 부분에서 음영에 의한 영상 잡음이 나타나기 시작하였으며, 역치값을 150 (Fig. 4(c))으로 올릴 경우 어두운 부분의 음영이 짙어져서 자동계수에 적합하지 않았다.

이상의 결과로 백색 LED 조명기를 사용할 경우 텅스텐 램프 조명기에 비하여 우수한 영상을 얻을 수 있었다. 예비실험에 의하면 백색 LED의 경우가 텅스텐 램프뿐만 아니라 할로겐 램프에 비해서도 이진영상의 품질이 더 우수하였다. 이것은 다른 광원에 비하여 백색 LED 방출광의 파장범위가 카메라 센서의 감지 파장 범위와 더 잘 부합되기 때문이라 생각되었다. 그러나, LED 조명기를 사용할 경우에도 이진 영상을 더욱 개선하여야 자동계수 오차를 최소화할 수 있다고 생각되었으므로 여러 가지 방법을 사용한 결과 블록이진화 방법으로 유의한 결과를 얻을 수 있었다.

#### 3.2. 블록이진화

HSV 색공간의 명도 (value)로 나타난 밝기값에 근거하여 블록 이진화를 수행하여 얻은 영상들 중 전체영상을 12블록으로 나누어 이진화한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 역치값 최소치와 최대치를 각각 30과 150으로 설정하여 처리한 경우 (Fig. 5(a))를 보면 효모세포들이 전체적으로 비슷한 음영으로 나타나고 거의 모든 세포 둘레가 잘 연결되어 있는 것으로 얻어져서 단순이진화에 비하여 더 개선된 영상을 얻을 수 있었다. 역치값 최대치가 160일 경우 (Fig. 5(b)) 제일 아래 왼쪽에서 2번째 블록에서 영상 잡음이 나타나기 시작하여 최대치가 200일 경우 (Fig. 5(c)) 더 짙어졌다.

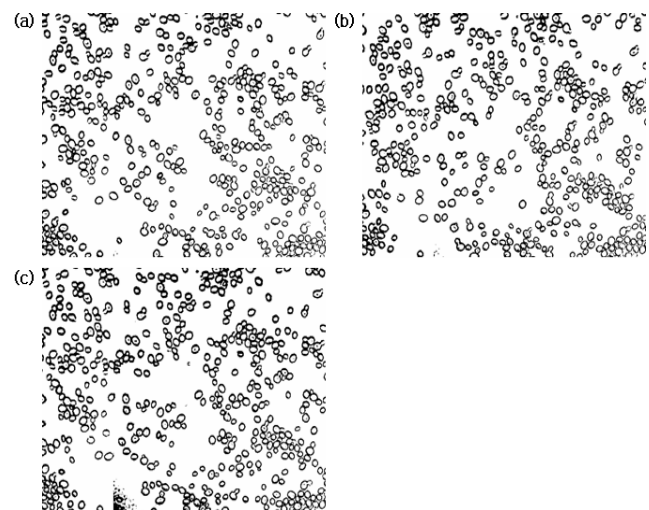
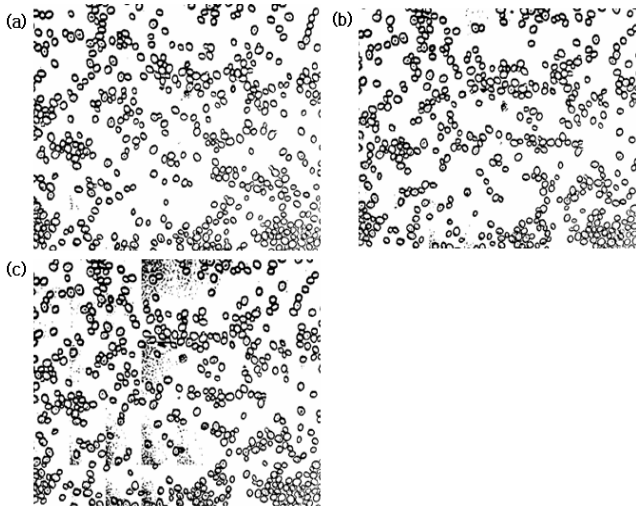


Fig. 5. Binarized images using a local thresholding method. Entire image was divided into 4 × 3 regions having threshold values of 30~150 (a), 30~160 (b) and 30~200 (c). The threshold values were linearly correlated with the degrees of brightness expressed as value component in HSV color model.

역시 명도 (value)로 나타낸 밝기값에 근거하여 블록 이진화를 수행하되 전체영상을 48블록으로 나누어 이진화한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 그림에서와 같이 역치값 최대치 200정도까지 영상잡음이 나타나지 않았다. 최대치를 150정도까지 설정할 수 있는 12블록이진화의 경우보다 역치값의 범위를 더 넓게 설정할 수 있으므로 세포둘레의 음영이 전체적으로 더 고르게 어둡고 둘레 음영의 연결상태도 더 우수한 영상을 얻을 수 있었다.



**Fig. 6.** Binarized images using a local thresholding method. Entire image was divided into  $8 \times 6$  regions having threshold values of 30~200 (a), 30~220 (b) and 30~250 (c). The threshold values were linearly correlated with the degrees of brightness expressed as value component in HSV color model.

밝기값을 Lab 색공간의 명도 (Lightness)로 나타내고 48블록으로 나누어 이진화할 경우 역치값 최대치 150 이상에서 영상 잡음이 발생하였으므로 밝기값을 HSV 색공간의 명도 (value)로 나타내는 경우보다 열등하였다.

**3.3. 자동계수**

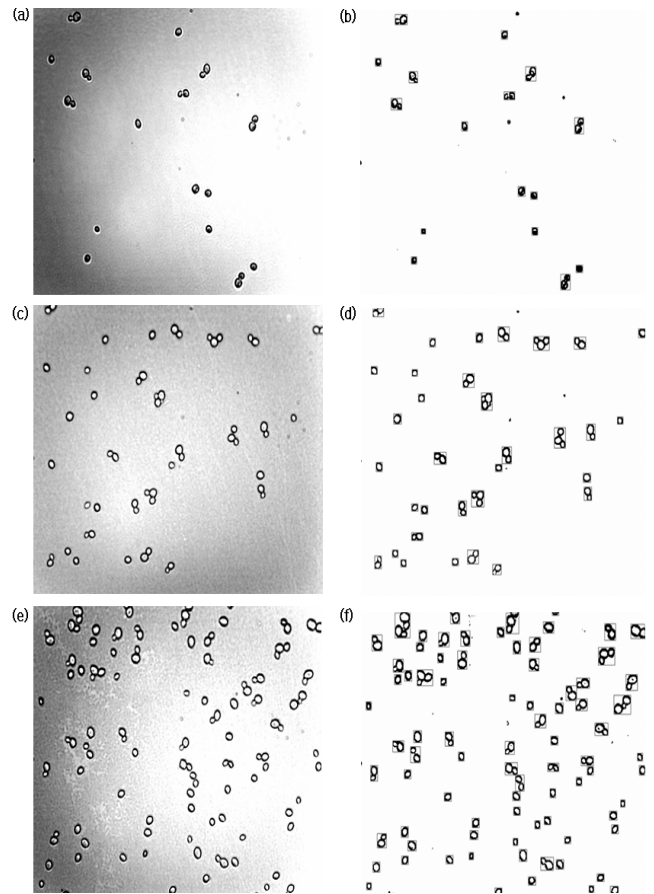
PC카메라와 LED조명기를 장착한 현미경을 사용하여 얻은 효모배양액 희석액 원영상의 48블록에 대한 역치값을 명도 (value)로 나타낸 밝기값에 근거하여 최소 30에서 최대 200까지의 값으로 구한 다음 영상을 이진화한 후 50픽셀 이상의 연결영역을 라벨링하는 방법으로 효모세포를 자동계수한 결과와 원영상 (original image)인 컬러영상을 보고 효모세포를 육안으로 계수한 결과를 서로 비교한 것을 Table 1에 정리하였다. 표에서와 같이 50배 희석액에 대하여 10회에 걸쳐 육안계수 및 자동계수한 결과 9회 일치하였고 일치하지 않은 한 번의 경우도 계수의 차이가 1개에 불과하였으며, 피어슨상관계수는 0.994였다. 10배 희석액의 경우에는 10회 중 7회가 일치하였고, 일치하지 않은 3회의 경우에도 전부가 1개였으며, 상관계수는 0.996이었다. 5배 희석액의 경우에는 10회중 2회만 일치하였으나, 불일치한 8회에서 차이가 1개인 경우가 3회, 2개가 1회, 3개가 3회, 4개가 1회로 오차가 비교적 작았으며, 상관계수는 0.987이었다.

**Table 1.** Comparison of manual<sup>1)</sup> and automated cell counts in baker's yeast culture

repetition	dilution <sup>2)</sup> factor					
	50		10		5	
	manual	automated	manual	automated	manual	automated
1	16	16	35	34	94	96
2	8	8	36	36	76	77
3	10	10	34	33	95	99
4	8	7	25	24	76	73
5	9	9	40	40	84	81
6	12	12	32	32	90	90
7	11	11	33	33	75	74
8	13	13	38	38	60	60
9	12	12	26	26	68	67
10	11	11	35	35	76	73

<sup>1)</sup> yeast cell counts in unprocessed color image of yeast culture.  
<sup>2)</sup> original culture fluid was diluted with sterilised yeast extract-malt extract broth.

시료의 효모 농도가 증가할수록 계수오차가 증가하였으나, 50배와 10배의 경우 상관계수가 1에 거의 일치하고 5배의 경우도 1에 거의 가깝게 얻어져서 본 논문의 자동계수방법이 육안계수를 대체할 수 있다고 생각되었다.



**Fig. 7.** Examples of grey images and their labelled images of yeast cells in yeast cultures diluted 5 : 1 (a, b), 10 : 1 (c, d) and 50 : 1 (e, f) with sterilized medium.

전체 영상에 효모가 1개 존재하는 경우의 효모 농도를 전체영상의 부피로부터 환산하면 약  $1.4 \times 10^5$  cells/mL가 되므로, 자동계수 가능한 농도범위는 대략  $1.4 \times 10^5$  cells/mL~ $1.4 \times 10^7$  cells/mL일 것으로 추정되었다. 자동계수 가능한 농도범위의 최대치는 5배 희석액 자동계수 데이터 중 최대치로부터 산출하였다. 혈구계산판의 계수가능 농도범위는  $1.0 \times 10^4$  cells/mL~ $1.0 \times 10^7$  cells/mL이고 적정농도범위는  $1.0 \times 10^6$  cells/mL~ $3.0 \times 10^6$  cells/mL이므로 [15] 본 연구의 자동계수방법과 육안계수방법의 계수가능 농도범위가 큰 차이가 없다고 생각되었다.

50배, 10배 및 5배 희석시료 각각 10개 결과들 중 한 개씩의 결과에 대하여 흑백영상과 라벨링된 영상을 Fig. 7에 나타내었다. 그림에서와 같이 효모농도가 낮은 50배 (Fig. 7(a), (b)) 및 10배 (Fig. 7(c), (d)) 희석시료에서는 효모 세포들이 충분한 공간을 확보하고 잘 분리되어 존재하기 때문에 자동계수 오차가 발생할 여지가 적으나, 농도가 큰 5배 (Fig. 7(e), (f)) 희석시료에서는 서로 다른 효모세포가 붙어있을 확률이 커지기 때문에 자동계수시 연결영역으로 처리되어 오차도 커지게 된다.

#### 4. 결론

PC카메라를 개조하여 장착한 일반광학현미경을 이용하여 빵효모 배양액의 효모세포를 자동계수하였다. 백색 LED조명기를 사용할 경우 텡스텐램프 조명기에 비하여 우수한 영상을 얻을 수 있었으나, 밝기의 차이에 의해서 생기는 문제 때문에 단순이진화방법으로는 효과적인 이진 영상을 얻을 수 없었다. 그러나, 명도 (value)값에 근거한 블록이진화방법으로 영상을 이진화할 경우 영상 전체에 걸쳐서 효모세포를 효과적으로 분리할 수 있었다. 효모배양액 희석시료에 대한 원영상을 48블록으로 나누어 이진화하고 라벨링한 결과, 약  $1.4 \times 10^5$ /mL~ $1.4 \times 10^7$ /mL의 효모농도범위에서 자동계수가 육안계수를 대체할 수 있다고 판단되었다.

#### References

1. Zalewski, K. and R. Buchholz (1996) Morphological analysis

of yeast cells using an automated image processing system. *J. Biotechnol.* 48: 43-49.

2. Rehbock, C., D. Riechers, T. Hopfner, A. Bluma, P. Lindner, B. Hitzmann, S. Beutel, and T. Scheper (2010) Development of a flow-through microscopic multitesting system for parallel monitoring of cell samples in biotechnological cultivation processes. *J. Biotechnol.* 150: 87-93.

3. Puchkov, E. O. (2006) The viability assessment of ethanol-producing yeast by computer-aided fluorescence microscopy. *Microbiology* 75: 154-160.

4. Wei, N., E. Flaschel, A. Saalbach, T. Twellmann, and T. W. Nattkemper (2005) Reagent-free automatic cell viability determination using neural networks based machine vision and dark-field microscopy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the 2005 IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference*. September 1-4. Shanghai, China.

5. Cahill, G., P. K. Walsh, and Dan Donnelly (2000) Determination of yeast glycogen content by individual cell spectroscopy using image analysis. *Biotechnol. Bioengin.* 69: 312-322.

6. Ritacco, H. (2006) Wetting experiments with a "web cam" in an undergraduate student laboratory. *J. Chem. Educ.* 83: 114-116.

7. Song, S. Y., K. H. Ko, and B. K. Choi (2006) PC-camera based monitoring for unattended NC machining. *IE Interfaces* 19: 43-52.

8. Lee, J. W. (2003) *Development of PC camera-based monitoring system for NC milling*. M.S. Thesis. Kaist, Daejeon, Korea.

9. Hagiwara, K., Y. Chigira, N. Yoshiura, and Y. Fujii (2004) Proposal for a world wide home security system using PC-cameras. The e-Vigilante Network Project. *SICE 2004 Annual Conference*. August 4-6. Sapporo, Japan.

10. Lee, H. C. (2005) Automatic titration using PC camera in volatile basic nitrogen analysis by microdiffusion method. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 135-137.

11. Lee, H. C. (2007) Automatic titration using PC camera in acidity analyses of vinegar, milk and Takju. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36: 1583-1588.

12. Lee, H. C. (2007) Automatic titration for KMnO<sub>4</sub> consumption test of tap water using PC camera. *J. of Environ. Health Sci.* 34: 95-100.

13. Russ, J. C. (1999) *The Image Processing Handbook*. 3rd ed., pp. 49-51. CRC Press, Boca Raton, Florida.

14. Martin. OpenCV Lecture 05. Blob Labelling. OpenCV KOREA. [\(2009\). http://www.opencv.co.kr](http://www.opencv.co.kr)

15. Nalge Nunc International Corp. Tech note. Cell counting and dye exclusion viability assays using a hemacytometer. [\(2000\). http://www.nuncbrand.com/files/fr-625.pdf](http://www.nuncbrand.com/files/fr-625.pdf)