

316080-04

나노바이오 기술을 활용한 농산물 유해물질 초기감도 판별기술 개발 최종보고서

2020

농림축산식품부

농림수산식품기술기획평가원

보안 과제(), 일반 과제(✓) / 공개(✓), 비공개() 발간등록번호(✓)

첨단생산기술개발사업 제4차 연도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003115-01

나노바이오 기술을 활용한 농산물 유해물질 초고감도 판별기술 개발 최종보고서

2020.02.14.

주관연구기관 / 재료연구소
협동연구기관 1 / 부산대학교
협동연구기관 2 / 나노스코프시스템

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “나노바이오 기술을 활용한 농산물 유해물질 초고감도 판별기술 개발”(개발기간 : 2016. 08. 01 ~ 2019. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020 . 02 . 14 .

| | | |
|-------------|------------------|-------|
| 주관연구기관명 : | 재료연구소 | (김동호) |
| 협동연구기관명 1 : | 부산대학교 | (오진우) |
| 협동연구기관명 2 : | 나노스코프시스템 | (이승우) |
| 위탁연구기관명 1 : | 중앙대학교 | (주재범) |
| 위탁연구기관명 2 : | 국립농산물품질관리원 시험연구소 | (문지영) |



문지영

주관연구책임자 : 김동호
협동연구책임자 : 오진우, 이승우
참여기관책임자 : 주재범, 문지영

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

| | | | | | |
|----------------------|---|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|---|
| 과제고유번호 | 316080-04 | 해 당 단 계 연 구 기 간 | 2016. 08. 01 ~ 2019. 12. 31 | 단 계 구 분 | (4)/(4) |
| 연구사업명 | 단 위 사 업 | 농식품기술개발사업 | | | |
| | 사 업 명 | 첨단생산기술개발사업 | | | |
| 연구과제명 | 대 과 제 명 | (해당 없음) | | | |
| | 세 부 과 제 명 | 나노바이오기술을 활용한 농산물 유해물질 초고감도 판별기술 개발 | | | |
| 연구책임자 | 김동호 | 해당단계 참여연구원 수 | 총: 20 명 내부: 15 명 외부: 5 명 | 해당단계 연구개발 비 | 정부: 400,000 천원 민간: 133,500 천원 계: 533,500 천원 |
| | | 총 연구기간 참여연구원 수 | 총: 25 명 내부: 20 명 외부: 5 명 | 총 연구개 발비 | 정부: 1,333,000 천원 민간: 445,500 천원 계: 1,778,500 천원 |
| 연구기관명 및 소 속 부 서 명 | 재료연구소, 부산대학교, 중앙대학교, 국립 농산물품질관리원 시험연구소 | | | 참여기업명 (주)나노스코프시스템즈 | |
| 국제공동연구 | 상대국명: | | | 상대국 연구기관명: | |
| 위 탁 연 구 | 연구기관명: 중앙대학교 | | | 연구책임자: 주재범 | |
| | 연구기관명: 국립농산물품질관리원 시험연 구소 | | | 연구책임자: 문지영 | |

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

| | |
|--------------------------|----------------------|
| 연구개발성과 의 보안등급 및 사유 | 일반, 보안조치가 필요한 과제가 아님 |
|--------------------------|----------------------|

9대 성과 등록·기탁번호

| 구분 | 논문 | 특허 | 보고서 원문 | 연구시설 ·장비 | 기술요약 정보 | 소프트 웨어 | 화합물 | 생명자원 | | 신품종 | |
|-------------|----|----|-----------|-------------|------------|-----------|-----|----------|----------|-----|----|
| | | | | | | | | 생명 정보 | 생물 자원 | 정보 | 실물 |
| 등록·기탁 번호 | ○ | ○ | ○ | | | | | | | | |

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

| 구입기관 | 연구시설· 장비명 | 규격 (모델명) | 수량 | 구입연월일 | 구입가격 (천원) | 구입처 (전화) | 비고 (설치장소) | NTIS 등록번호 |
|------|--------------|-------------|----|-------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| | | | | | | | | |

보고서 면수
101쪽

| | | | | | |
|------------------------------------|---|-------------------------------------|----------------|----------------------|---------|
| <p>연구의 목적 및 내용</p> | <ul style="list-style-type: none"> ○ 연구 목적 <ul style="list-style-type: none"> - 나노바이오 소재기술을 활용하여 농산물내 유해물질을 현장에서 초고감도로 판별할 수 있는 라만기반 센서 칩과 검출기기를 세계최초로 개발 ○ 농산물 유해물질 검출용 분자라만신호증폭 나노소재 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 초고밀도 나노구조화 및 다중 SPR 계면기술을 통한 고성능 라만신호증강기판소재(SERS) 제조기술 확보 - SERS기판소재의 기능성 부여를 위한 초분자 표면개질 기술 개발 - 유해물질 선택검출용 나노프로브 입자 부착 및 집적화 어레이 기술 개발 ○ 나노바이오소재를 활용한 유해물질 선택검출 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - WHO 선정 맹독성 농약 3종, 개별분석대상 잔류농약 5종 및 곰팡이독소 3종을 타겟 - 박테리오파지 작용기 발현을 통한 잔류농약 검출 용 바이오리포터 개발 - 다중 독소검출용 박테리오파지-라만 프로브 제작 - 유해곰팡이독소 검출용 바이오나노 센서 칩 개발 ○ 고감도 휴대용 라만분광검출 시스템 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 농산물 유해물질 DB구축 및 S/W 개발 - 나노바이오 센서 칩과 라만리더기 통합 기술 ○ 농산물내 잔류농약/유해독소 판별기술 실증시험 <ul style="list-style-type: none"> - 검출대상 농산물에 대한 전처리 기술 개발 - 비선형 판별법을 적용한 품목별 최적의 유해물질 판별법 개발 | | | | |
| <p>연구개발성과</p> | <ul style="list-style-type: none"> ○ 과제수행기간 내, 특허 출원 7건, 등록 4건 완료 ○ 과제 수행기간 내, 기술실시 2건, 기술료 4천만원 계약, 제품화 1건 완료 ○ SCI급 논문 10편 게재, 학술발표 20건 완료 ○ 초고감도 라만분석 검출분야 인력양성 10명 및 관련기술 홍보 7건 완료 | | | | |
| <p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p> | <ul style="list-style-type: none"> ○ 적용 범위 <ul style="list-style-type: none"> - 수입 농산물내 맹독성 잔류농약 및 곰팡이 독소성분의 실시간 현장진단을 통한 국내 유통 차단 - 고부가가치 유기농 농식품에 대한 유통 인증 수단으로 활용 가능 - 학교, 군부대 등 단체급식 식자재의 먹거리 안전수단으로 활용 ○ 기대 효과 <ul style="list-style-type: none"> - 고위험군 농약의 무분별한 사용에 대한 인식 제고 및 원천 차단 - 국산 농식품의 소비자 신뢰 및 국제적 안전인식 고취 - 환경 모니터링, 의료·헬스케어용 바이오센서 산업으로의 기술 발전 | | | | |
| <p>국문핵심어 (5개 이내)</p> | 분자감지소재 | 표면증강라만분광 | 박테리오파지 | 농산물 유해물질 | 센서 |
| <p>영문핵심어 (5개 이내)</p> | molecule sensing materials | surface enhanced Raman spectroscopy | bacterio-phage | hazardous substances | sensors |

< 목 차 >

| | |
|-----------------------------|-----|
| 1. 연구개발과제의 개요 | 5 |
| 2. 연구수행 내용 및 결과 | 9 |
| 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 | 91 |
| 4. 연구결과의 활용 계획 등 | 98 |
| 붙임. 참고 문헌 | 100 |

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 현장에서 농산물 유해물질을 판별할 수 있는 초고감도 휴대형 라만센서기기 세계 최초 개발



1-2. 연구개발의 필요성

○ 사회적 · 경제적 필요성

- 안전한 먹거리에 대한 국민적 관심과 요구가 지속적으로 높아지고 있고, 이는 농산물 중 잔류농약의 위험성에 대한 소비자들의 우려로 나타나고 있는 실정임. 대부분의 농약은 합성된 화학물질로 전세계적으로 농산물에 대한 잔류농약의 안정성을 평가하고 잔류허용기준을 설정하여 관리하고 있음.
- 우리나라는 식품위생법에 따라 규제 위주로 유해인자 검출을 실시해 왔으나, 국가차원의 농산물 잔류 농약 및 유해인자 검출기술 개발 연구지원이 부족한 상태임.
- 식품 및 농산물 안전검출기 세계시장은 2014년 약 2조원에서 연평균 8.6%의 성장률로 2021년에는 약 3.5조원 시장으로 지속적으로 성장할 것으로 예측됨. 관련 검출기 시장은 복합 시료를 분리하는 크로마토그래피 장비와 분리된 시료를 분석하는 고가의 고정형 질량분석기가 40%정도를 차지하고 있음. 광학기반의 IR 및 라만 분광기 시장도 10% 정도를 유지하고 있음. 최근에는 초소형 handheld IR 및 라만 분광기가 상용화되어 시판 중에 있어, IR 및 라만 분광기 시장 점유율이 높아질 것으로 예상하고 있음.

식품 안전 검출기 시장 및 검출기별 시장 점유율

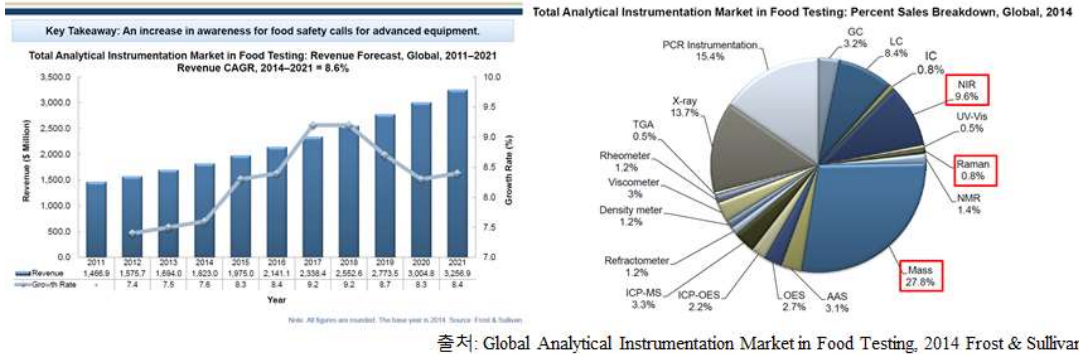
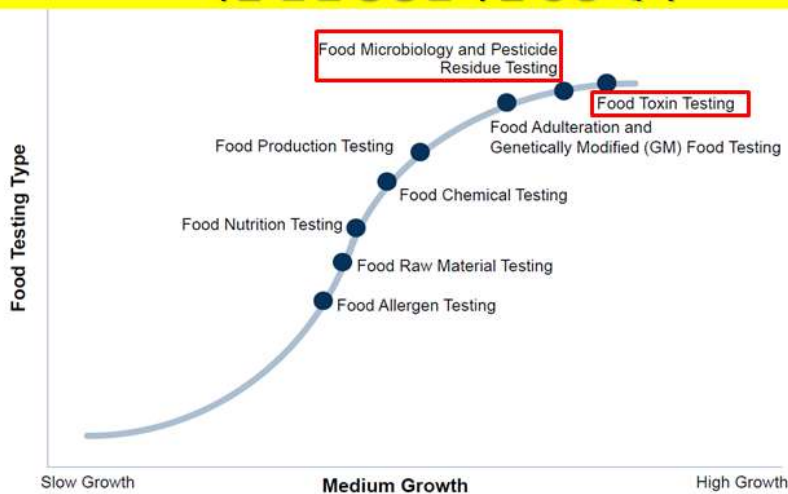


그림 1-1. 식품 안전 검출기 시장 및 검출기별 시장 점유율

- 식품 및 농산품 안전센서는 3M, Biomerieux, Dupont, ThermoFisher Scientific, BioRad 등 다국적 기업이 주도를 하고 있으나, 현장진단 유해물질 판별센서는 정성적 분석에 제한되어 있어 정량분석이 가능한 현장진단 센서는 상용화되어 있지 않은 실정임.
- 응용시장별 성장예측을 살펴보면, 식품 내 독소(Microtoxin 등) 검출과 잔류농약 검출 분야가 가장 큰 성장률을 보일 것으로 예측됨. 식중독균 및 잔류농약 검출이 가능한 나노바이오센서 현장검사 시장은 현재까지는 형성되지 않았지만, 이를 필요로 하는 기관은 국내에만 현재 대형급식소(28,000 여개), HACCP의무 적용 업체(8,300 여개) 등 상당히 큰 규모의 신산업 시장이 잠재함.
- 현장에서 상시 측정이 가능한 잔류농약 및 식품 안전 바이오센서가 개발된다면, 농식품의 생산, 유통, 소비 전반에 적용 가능하여, 농식품의 신뢰성 강화, 안전한 농산물 소비의 인식 제고로 인하여 사회안전 및 국민 보건향상에 크게 기여할 것으로 기대함.

식품 안전 응용분야별 성장 예측



출처: Global Analytical Instrumentation Market in Food Testing, 2014 Frost & Sullivan

그림 1-2. 식품 안전 응용분야별 성장 예측

○ 기술적 필요성

- 잔류농약을 검출해야하는 농산품의 양이 매우 많고 서로 다른 전처리 과정을 거쳐야 하는 어려움 때문에, 현장에서 간단하게 잔류 농약 및 유해물질을 검출하고 유통 이후에도 소비자가 쉽게 잔류농약을 검출할 수 있는 휴대용 농산물 유해물질 판별기술 개발이 시급함.
- 시료를 현장에서 분석 가능하도록 기존 실험실용 정밀분석기기(질량분석기 및 크로마토그래피)도 최근 소형화 개발이 활발히 진행 중에 있으나, 이러한 기기들은 여전히 가격, 소모전력 및 전문성 측면에서 일반인이 보편적으로 사용 가능한 시스템으로는 활용 불가능함.
- 최근 광학 기술의 발달로 전 세계적으로 초소형 Handheld 분광기가 개발되어 시판 중에 있으며, 초소형 라만분광기를 활용하여, 현장에서 고순도 마약검출, 제약 및 광물 분석 등에 활용되고 있으나, 고농도의 벌크시료의 분석에만 제한적으로 사용되고 있는 실정임. 소형화에 따른 감도 저하와 복합 시료에서 특정 분자의 선택적인 포집 및 검출에는 한계가 있음.
- 초고감도 라만신호증폭(SERS) 기관과 초소형 라만 분광기를 융합하면 초소형 라만분광기의 한계인 민감도를 향상시킬 수 있기 때문에 검출한계를 ppb수준으로 낮출 수 있음. 이를 통한 현장진단 초고감도 라만 센서 시스템의 구현이 가능함.
- 또한 SERS 기관의 표면처리기술(리셉터, 박테리오파지, 분자각인 고분자 등)을 통한 선택성 향상 기술을 통해 복합시료 중에 특정 잔류농약의 검출이 가능할 것으로 판단함.

1-3. 연구개발 범위

○ 주요 기능

- WHO기준 맹독성 잔류농약 초고감도 검출성능 구현(3종 이상)
- 농산물품질관리원 개별분석대상 고위험군 잔류농약성분 초고감도 검출 (제초제, 살충제, 살균제 계열)
- 농산물 내 유해 곰팡이독소(3종 이상) 동시분석이 가능한 라만기반 면역분석법 개발
- 현장에서 15분 이내 농산물 유해물질 판별 가능

○ 주요 성능치

| | 농약성분 | 잔류허용기준 | 검출 목표 | 비고 |
|-----------------------|------------------|----------|----------|-------------------------------|
| WHO 맹독성 농약 | Parathion-methyl | 0.05 ppm | 0.01 ppm | PAN list of HHPs (2015) 기준 |
| | Azinphos-methyl | 0.1 ppm | | |
| | Methamidophos | 0.05 ppm | | |
| 농관원 개별분석대상 잔류농약 | Difenzoquat | - | 0.01 ppm | Bipyridylum계 제초제 |
| | Diquat | 0.02 ppm | | |
| | Paraquat | 0.05 ppm | | |
| | Nereistoxin | 0.1 ppm | 0.01 ppm | 곤충신경계 교란물질 |
| | Thiabendazole | 0.2 ppm | 0.01 ppm | Benzimidazole계 살균성 농약 |
| 곰팡이독소 | Aflatoxin B1 | 10 ppb | 1 ppb | |
| | Fumonisin | 2 ppm | 0.1 ppm | |
| | Ochratoxin A | 5 ppb | 1 ppb | |

○ 핵심 기술

1) 유해물질 검출용 분자라만신호증폭 나노소재 개발

- 초고밀도 나노구조화 및 다중 SPR 계면기술을 통한 고성능 라만신호증강기판소재(SERS) 제조기술 확보 (특허 5건 이상)
- 분자검출 기판소재의 라만신호증강지수 > 10^7 (기판지름 4인치 이상)
- SERS 기판소재의 기능성 부여를 위한 초분자 표면개질 기술
- 선택검출용 나노프로브 입자 부착 및 집적화 어레이 기술 개발

2) 나노바이오소재를 활용한 유해물질 선택검출 기술 개발

- 박테리오파지 작용기 발현을 통한 유해물질 바이오리포터 개발(3종 이상)
- 다중 독소검출용 박테리오파지-라만 프로브 제작
- 유해곰팡이독소 검출용 바이오나노 센서 칩 개발

3) 고감도 휴대용 라만분광검출 시스템 개발

- 라만리더기 시제품 개발 사양

| | 항목 | 사양 | 비고 |
|---|--------|-----------------------------|---------------|
| 1 | 레이저 파장 | 785nm 또는 633 nm | 최적 레이저 파장 선정 |
| 2 | 분광파장대역 | 200 ~ 2400 cm^{-1} | |
| 3 | 파장분해능 | 12 cm^{-1} | 스펙트럼 FWHM 측정 |
| 4 | 스캔 영역 | 10 mm | 1축 포인트 스캔 기준 |
| 5 | 디텍터 크기 | 280 x 200 x 100 mm 이내 | 전체 시스템 최외곽 크기 |

- 농산물 유해물질 DB구축 및 S/W 개발
- 나노바이오 센서 칩과 라만리더기 통합 기술
- 극미량의 유해물질 현장판별이 가능한 초고감도 진단기기 상용화

4) 농산물 내 잔류농약/유해독소 판별기술 실증시험

- 검출대상 농산물에 대한 전처리 기술 개발
- 비선형 판별법을 적용한 품목별 최적의 유해물질 판별법 개발
- 기존 고성능 정밀실험분석법(질량분석 외)과의 비교분석 평가

○ 적용 범위

- 수입 농산물 내 맹독성 잔류농약 및 곰팡이 독소성분의 실시간 현장진단을 통한 국내 유통 차단
- 고부가가치 유기농 농식품에 대한 유통 인증 수단으로 활용 가능
- 학교, HACPP 인증시설 등 단체급식 식자재의 먹거리 안전수단으로 활용
- 고위험군 농약의 무분별한 사용에 대한 인식제고 및 원천 차단

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구개발 내용 및 결과

가. 1차년도

1) 개발 목표

- 주관연구기관(재료연구소) : 나노표면구조화기술을 이용한 라만신호증폭 분자센싱 기관소재 개발/선택성 초분자 유도체 합성 및 목표 잔류 농약 종류 선정
- 협동연구기관 1(부산대학교) : 농산품 유해물질과 특이결합 할 수 있는 펩타이드서열 확보
- 협동연구기관 2(나노스코프시스템) : 소형 라만 분광 분석기 요소기술 개발
- 위탁연구기관 1(중앙대학교) : 고감도 라만신호 증폭용 나노입자 제작 및 독소 검출용 나노 프로브 개발
- 위탁연구기관 2(농관원 시험연구소) : 농산물 유해물질 검체 선정 및 기본 특성 확보

2) 내용 및 결과

(1) 주관연구기관 (재료연구소)

○ 플라즈몬 금속의 초고밀도 나노갭 형성 기술 개발

- PET 고분자 기관에 Ar 플라즈마 표면처리 조건을 조절하여 나노 돌기를 가지는 기관 구조체를 형성.

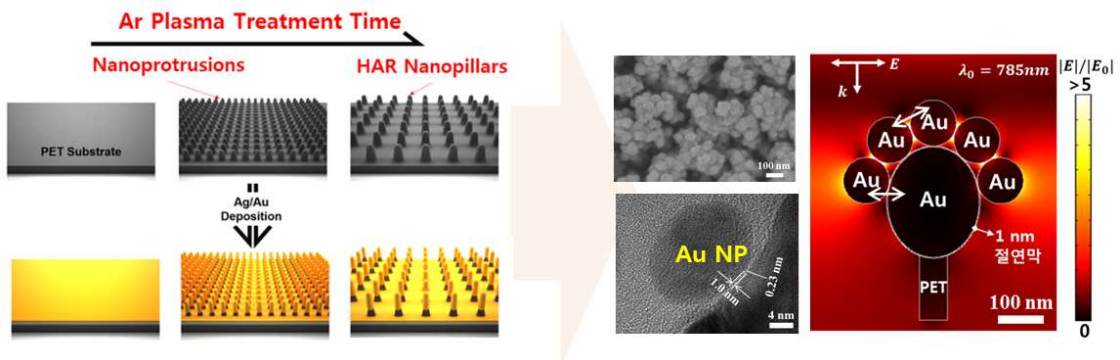


그림 2-1. 표면플라즈몬 나노갭 형성 과정

- 나노돌기 구조체에 귀금속인 Au/Ag 를 증착하여 라만 신호 증강 효과를 가지는 SERS 기관 제작.

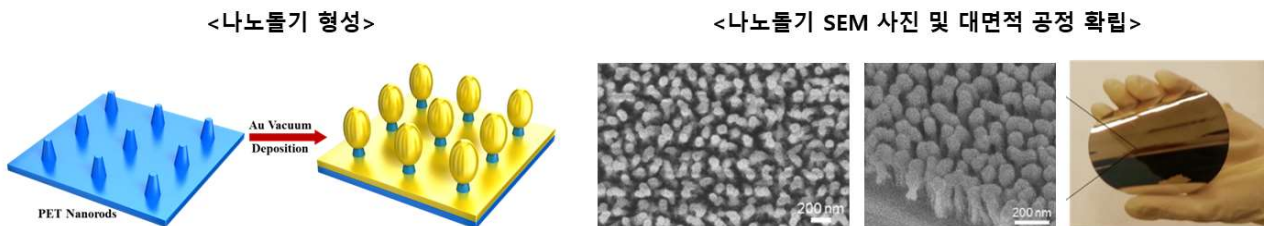


그림 2-2. 나노돌기 대면적 공정 확인 및 나노구조 SEM 이미지

- 상기 그림과 같이 4인치 대면적 기관소재 개발에 대한 공정기술을 확보하였음.

- Au 증착 두께와 돌기의 형태에 따라 라만신호 증강 효과 조절 가능성을 확인하고 연구 계획서 상 라만증강지수 목표 10^7 보다 10배 이상 높은 10^8 승의 Enhancement Factor를 달성 하였음.

<금 증착 두께에 따른 라만 신호 증폭 변화 >

<돌기 형태에 따른 라만신호 증폭 변화 >

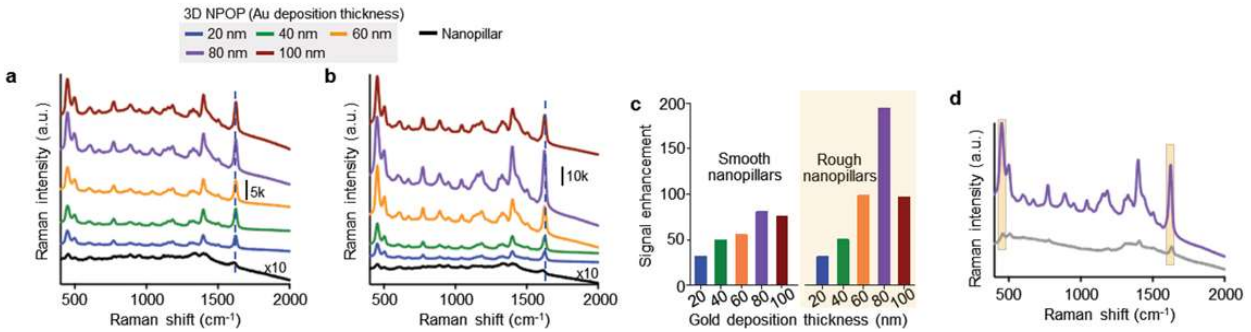


그림 2-3. 금증착 두께와 돌기 형태에 따른 라만신호 관찰 결과

- 나노이미징 기술을 이용하여 나노갭에서의 전자기장 증폭 특성을 평가함. Electrostatic Force Microscopy를 이용하여 전자기장 증폭 분포를 이미징 하였고 균일한 신호 증폭 특성을 확인하였음.

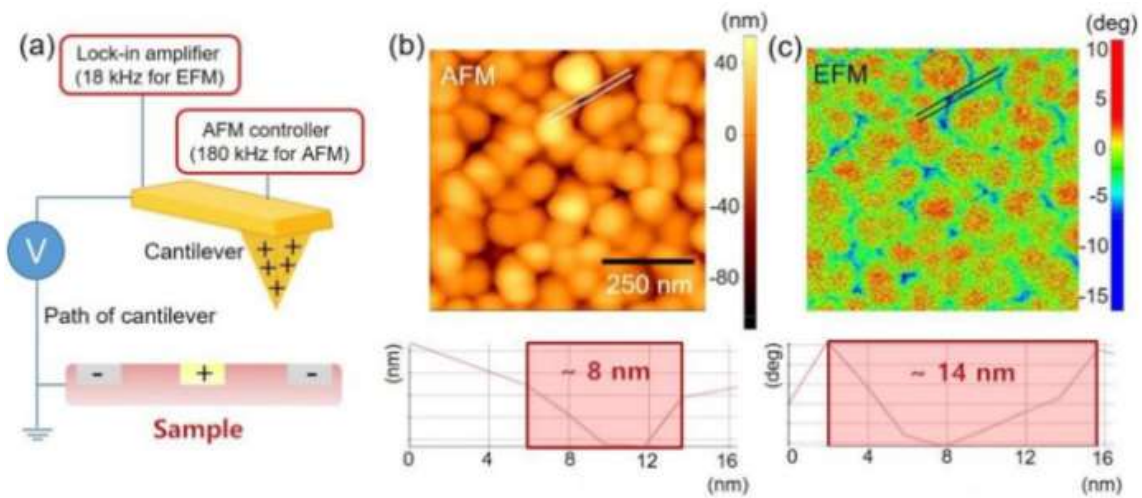


그림 2-4. Electrostatic Force Microscopy를 이용한 전자기장 이미징

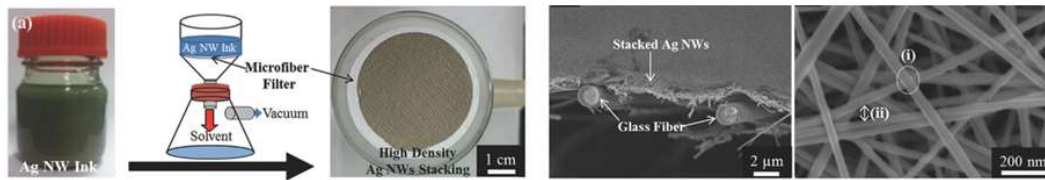
○ 3차원 다공성 SERS 멤브레인 기관 제작

- 다공성 멤브레인 상에서 SERS효과를 나타낼 수 있도록 은 나노선을 진공여과하여 준비하였음.
- SERS 민감도 향상을 위해 3차원 다공성 SERS 멤브레인을 제작하였음.
- 은 나노선을 이용한 다공성 SERS 멤브레인은 Swab형식의 기관으로 활용할 수 있음. 농약에 오염된 농식품의 표면을 흡습성 SERS 멤브레인으로 닦아내어 잔류 농약을 검출할 수

있도록 응용 가능함.

- 본 과제에서는 은 나노선 표면에 선택성을 나타내는 수용체를 표면개질하여 선택적 잔류 농약 검출 센서로 개발하였음 (수용체 표면개질 연구 결과는 2-3차년도에 제시함).

<진공 여과법을 이용한 다공성 SERS 멤브레인 제작 >



<3차원 구조 제작 >

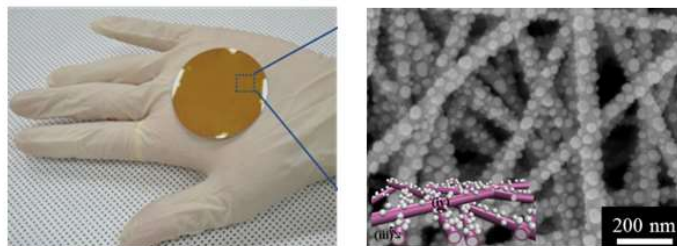


그림 2-5. 다공성 멤브레인 상 은나노선 SERS기판 개발 결과

○ 초분자-잔류농약 결합 효율성 평가 및 후보군 선정

- 농약과 초분자체의 주인-손님 결합 연구 사례를 조사한 결과 초분자 core 내부에 농약의 소수성 구조가 위치하고 core 외부에 친수성 작용기들이 위치해야 안정할 것으로 조사됨.
- 문헌조사를 실시한 결과 초분자에는 Paraquat, Diquat, Difenzoquat, Thiabendazole 등의 농약이 선택적으로 결합할 것으로 예상함. 본 과제를 통해 확보한 초분자체는 아래와 같음.

| | 초분자 이름 | 제조사 | 작용기 |
|---|--|---------------|----------|
| 1 | Carboxymethyl-beta-Cyclodextrin | Sigma Aldrich | COOH |
| 2 | Succinyl-beta-Cyclodextrin | Sigma Aldrich | Succinyl |
| 3 | Succinyl-alpha-Cyclodextrin | Sigma Aldrich | Succinyl |
| 4 | Mono-(6-deoxy-6-mercapto)-alpha-Cyclodextrin | Cosmobio | Thiol |
| 5 | Mono-(6-deoxy-6-mercapto)-beta-Cyclodextrin | Cosmobio | Thiol |
| 6 | Mono-(6-deoxy-6-mercapto)-gamma-Cyclodextrin | Cosmobio | Thiol |

그림 2-6. 초분자 유도체 확보 목록

- Carboxymethyl, Succinyl 작용기를 가지고 있는 초분자체를 SERS 기판 표면에 도입하기 위해서는 linker 물질이 필요함. Linker 분자의 한쪽은 thiol, 반대쪽은 amine group이 있는 Cysteamine과 같은 물질을 도입하여 EDC 결합을 유도하였음.

- Thiol-terminated-Cyclodextrin의 경우 현재 국내에서 구할 수 있는 종류는 단일 thiol 그룹 형태뿐이었지만, 다른 linker물질을 추가로 도입하지 않아도 되는 장점이 있어 본 과제에 사용할 초분자 후보로 선택하였음.

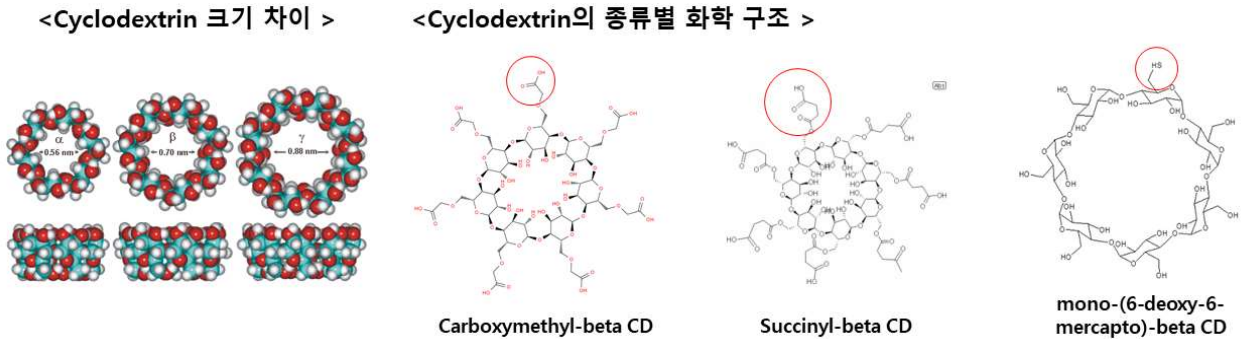


그림 2-7. 초분자 특성 및 본 과제 확보 초분자 작용기 형태

(2) 협동연구기관1 (부산대학교)

○ 파지-디스플레이 기법을 통한 유해물질 선택성 펩타이드 서열 발굴

- 농관원에서 제시한 잔류농약 개별분석 대상 농약 중 Difenzoquat, Diquat, Paraquat 타겟 선택적 결합 펩타이드 서열을 발굴함.
- M13 박테리오파지의 표면 단백질 중 하나인 pIII 부분에 랜덤으로 발현시킨 염기서열 종류가 10^6 개 이상인 키트를 이용하여 잔류 농약 (Difenzoquat, Diquat)과 같은 유해물질과 반응성이 높은 펩타이드 서열 확보를 위해 피지디스플레이 기법을 이용하여 펩타이드 서열을 확보하였음.

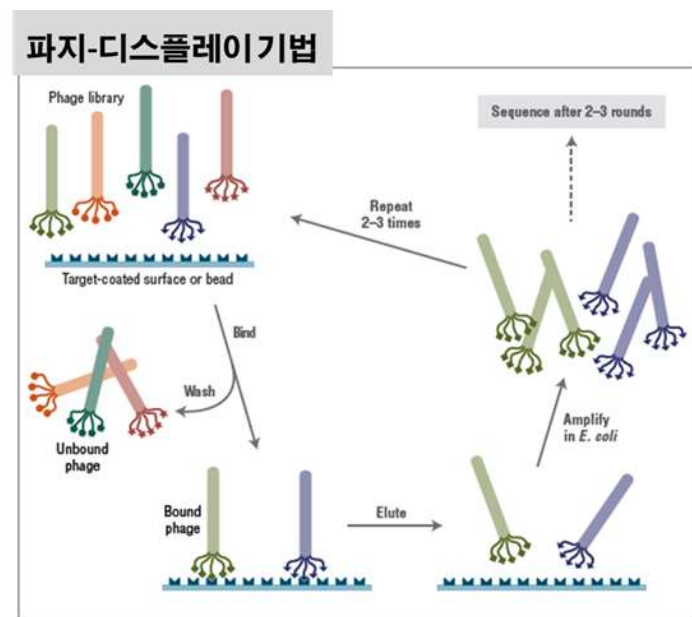


그림 2-8. 파지디스플레이 방법 설명

- 1×10^6 개 이상의 박테리오파지 라이브러리 키트를 이용하여 결합→세척→결합→세척을 3회 반복을 통해 유해 농약 물질 (Difenzoquat, Diquat) 선택적으로 결합하는 펩타이드 서열 확보를 위한 실험을 수행함.

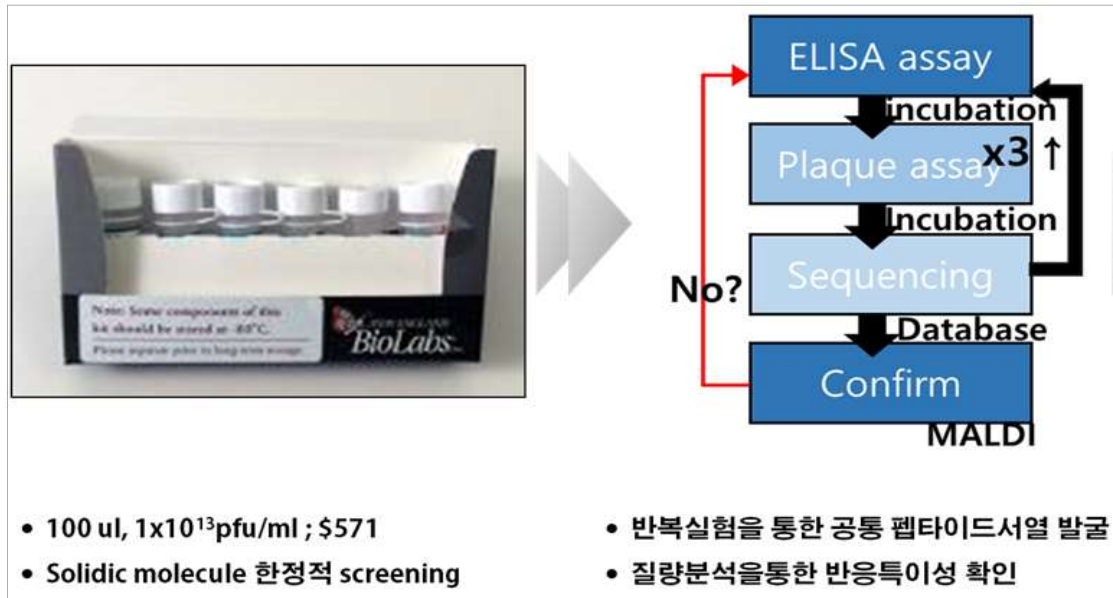


그림 2-9. 펩타이드서열 발굴 과정

- 파지 디스플레이법 수행을 통해 Difenzoquat, Diquat 선택적 결합 펩타이드 F, S, Y, K, Q 5종 서열 확보함.
- Difenzoquat (DIF) 선택적으로 결합하는 발굴된 펩타이드 3F, 3S, 3Y 서열은 아래 그림에 제시함.

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Phenylalanine/F | A | A | G | F | F | F | D | P | A | K | A | A | F | N | S | L |
| Serine/S | A | A | G | S | S | S | D | P | A | K | A | A | F | N | S | L |
| Tyrosine/Y | A | A | Y | Y | Y | E | G | D | D | P | A | K | A | A | F | N |

그림 2-10. Difenzoquat에 결합하는 펩타이드 서열

- Diquat (DQ) 선택적으로 결합하는 발굴된 펩타이드 3K, 3Q 서열은 아래 그림에 제시함.

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Lysine/K | A | A | G | K | K | K | D | P | A | K | A | A | F | N | S | L |
| Glutamine/Q | A | A | G | Q | Q | Q | D | P | A | K | A | A | F | N | S | L |

그림 2-11. Diquat에 결합하는 펩타이드 서열

- 아미노산의 각기 다른 특성(Hydrophobic, Hydrophilic, Aliphatic, Sulfur, Hydroxyl, Acidic, Basic, Hydroxyl, polar, Charge)을 분류하여 박테리오파지가 가지는 특정 대상 물질과의 특이 반응성을 나타내도록 분자적 기법을 이용하여 기능성 박테리오파지를 구축함.

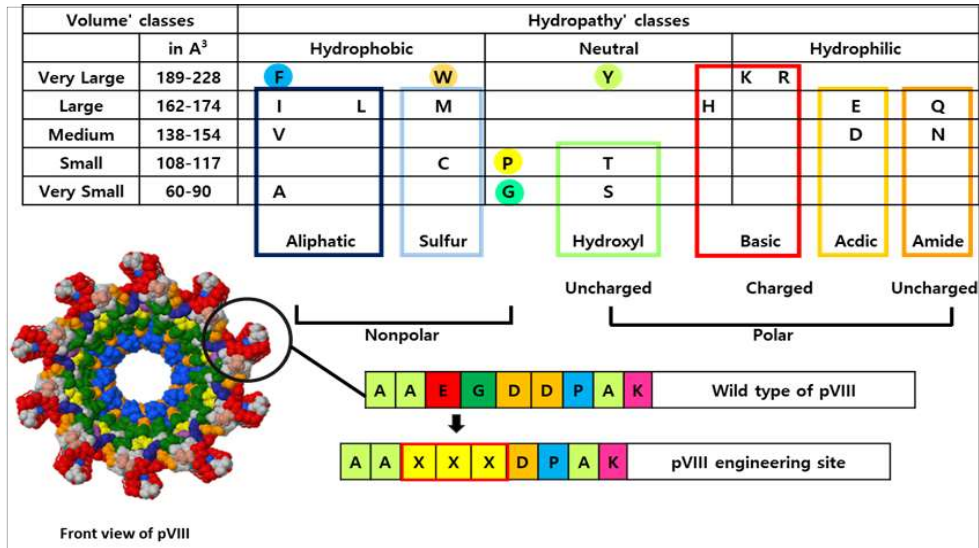


그림 2-12. 발굴 펩타이드 서열 분자 특성과 발현 위치 확인

- 아미노산 특성 분석을 통해 Difenzoquat에 선택성을 나타내는 펩타이드 서열 3W (WWW)을 추가 확보하였음.



그림 2-13. 분자기법을 통한 추가 Difenzoquat 서열 확보

- WHO에서 선정된 맹독성 농약 중 Parathion-methyl 성분과 선택적 결합하는 펩타이드 서열 발굴을 위한 문헌조사를 수행함.

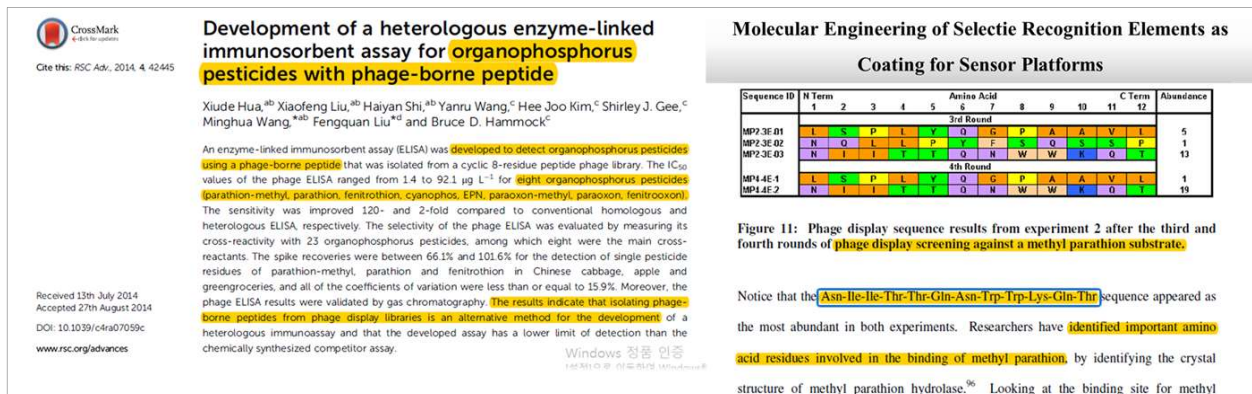


그림 2-14. Parathion-methyl 선택적 파지 시퀀스 정보 문헌

- 문헌 조사를 통해 확인한 parathion-methyl 펩타이드 서열은 다음과 같음.

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SPPWPPRP | S | H | S | P | P | W | P | P | R | P | S | A | E | E |
| PWP | M | L | S | F | A | A | D | P | W | P | E | G | D | D |
| PRP | M | L | S | F | A | A | D | P | R | P | E | G | D | D |
| WRP | M | L | S | F | A | A | D | W | R | P | E | G | D | D |

그림 2-15. Parathion-methyl 선택적 펩타이드 서열

(3) 협동연구기관2 (나노스코프시스템즈)

○ 소형 레이저 조명 모듈 및 컨트롤러 개발

- 나노미터 이하 선폭 관리와 안정화된 출력 특성이 유지되는 레이저 조명 개발, 이를 위한 레이저 출력 제어 모듈 설계함.
- 소형 레이저 모듈을 구성하기 위한 레이저 다이오드 칩 기반 모듈 회로 및 컨트롤러 개발을 실시함.

○ 파장 안정화 레이저 광원 광학계 설계 및 제작

- 안정적인 레이저 파장 선폭과 출력을 바탕으로 광원을 시편에 조사할 수 있는 조명을 개발함.
- 레이저와 시편까지의 거리를 고려하고, 집광력을 최대화 한 레이저 조명 광학계 설계 완료함.
- 시편단에서 레이저 조명이 한 점으로 모아짐으로써 라만신호가 극대화되기 위한 조건을 가지는 집광 렌즈 설계를 수행함.
- 레이저의 단 파장성을 보강하기 위한 레이저 전용 필터인 Laser cleaning optic 설계, 공간 효율성을 위해 레이저 광축을 전환하면서 검출부 광축 방향과 일치시키기 위한 광진행 방향 변환 광학계 설계 완료함.
- 레이저 광축을 타겟 샘플 방향으로 전환 가능하고, 검출부 광축 방향과 일치시키기 위한 광진행 방향 변환 광학계인 Beam turning optics를 설계함.

○ 하드웨어 디자인에 적합하게 설계된 레이저 드라이버 모듈과 전용 컨트롤러 확보

- 소형 레이저 모듈 구동을 위한 드라이버 및 컨트롤러 모듈을 제작함.
- 다수의 파장에 대해서 레이저 다이오드 칩이 호환될 수 있는 드라이버와 컨트롤러로 구성된 레이저 출력 제어 모듈을 제작하여, 레이저가 출력되는 것을 확인함.

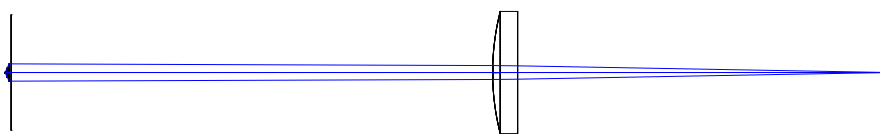


그림 2-16. 넓은 영역의 라만신호를 받기위한 레이저 조명 광학계

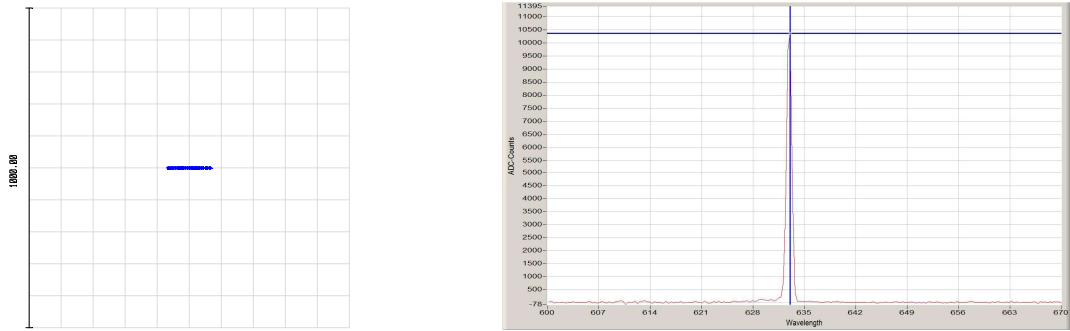


그림 2-17. 1mm x 1mm 의 영역에서 빔 사이즈 (좌), 633nm 파장 안정화 레이저의 FWHM (우)



그림 2-18. 다이오드 레이저 드라이버와 컨트롤러 모듈, 제작된 광원부

(4) 위탁연구기관1 (중앙대학교)

○ 농산물 독소 검출용 나노 프로브 입자 제조

- 국내외 공급 가능한 상용화 표준 항체의 스크리닝 과정을 통해 항원과 강한 결합능력을 가지는 표준 항체를 확보하였으며 에세이 최적화를 위한 항체 스크리닝 실험을 수행하였음. 상용화 표준항체에 대하여 ELISA assay를 수행하여 표준 항체의 결합능력을 평가하였으며 재현성 있는 면역분석 결과를 확보하였음.
- 곰팡이독소 3종(아플라톡신, 오크라톡신, 푸모니신)에 대한 표준항체를 구매하여, 아래와 같은 표준 검출법에 따라 곰팡이 독소의 ELISA 에세이를 수행하였음. 오크라톡신(곰팡이독소)의 표준물질을 희석하여 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 ppb 농도 용액을 준비한 다음 경쟁면역 분석법을 이용하여 면역 분석을 수행하였음.

Competitive ELISA

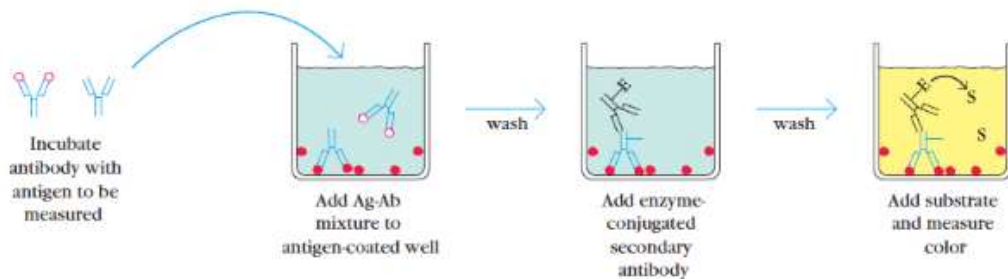


그림 2-19. 경쟁면역분석법 (Competitive ELISA) 방법

- 항체 및 오크라톡신-HRP 희석배수, 항체 코팅버퍼, 코팅 반응 조건, 경쟁반응 시간 등의 조건을 최적화 후 오크라톡신을 검출하기 위한 ELISA 표준곡선을 결정하였음. 최저 검출한계는 0.72 ppb로 현재 우리나라에서 곡류 및 곡류가공품에 적용되는 최대허용 기준치 수준과 유사한 결과를 보임. 그러나 ELISA분석 시 matrix effect에 의한 교차반응에 의하여 위양성 또는 위음성의 결과가 나타났으며, 분석 소요시간이 장시간 소모된다는 단점이 있음. 본 연구에서는 기능성 나노프로브와 표면 플라즈몬 증강 기관을 활용한 면역분석법을 이용하여 상기 문제점을 해결하고자 함.

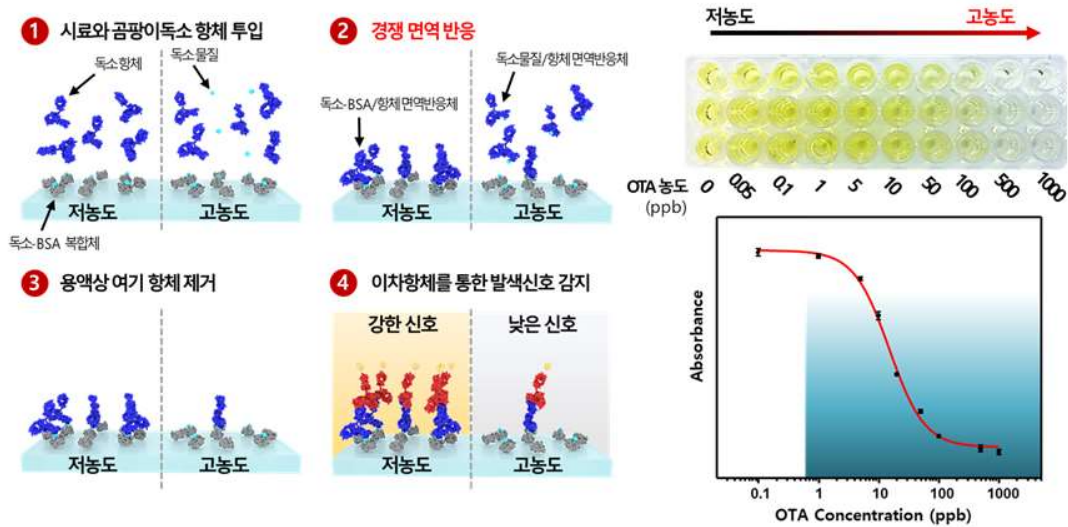


그림 2-20. 곰팡이독소 경쟁면역 반응 개념도, 오크라톡신 ELISA 정량 곡선

○ 재료연구소에서 개발된 라만 기관의 성능평가 및 이를 이용한 3종 독소단백질의 다중 검출 기술 개발 (1세부 협력)

- 해당 연구 결과는 2차년도 연구수행 내용 및 결과에 제시되었음.

○ 기술 재현성 확보를 위한 과정

- 농산물에 미량으로 포함된 곰팡이 독소를 정량검출하기 위해 사용되는 기능성 나노구조체는 우수한 분산성, 안정성, 강한 광 신호 증폭 등의 물리적 특성이 요구됨. 제조된 기능성 나노 구조체의 물리적, 광학적 특성을 UV/Vis 분광법, dynamic light scattering (DLS), 투과전자현미경 (TEM), 라만 분광기 등의 장비를 이용하여 분석하였음.
- 표면 플라즈몬 증폭 나노 기관을 이용한 고감도 바이오센서 시스템을 구현하기 위하여 경쟁면역분석법을 이용한 실험 계획을 수립함. 표면증강 라만 분석용 나노소자에 곰팡이 독소-BSA복합체를 고정화 한 후, 곰팡이 독소를 도포하여 순차적으로 곰팡이 독소 항체와의 경쟁반응을 유도함. 이후 이차 항체가 고정화된 나노 프로브로 곰팡이독소 면역 복합체를 탐지함으로써 저농도의 곰팡이 독소를 짧은 시간에 정량적으로 분석할 수 있는 에세이 기술을 개발함. 이를 구현하기 위하여 탐지 프로브로 사용할 이차항체가 고정된 기능성 나노입자를 합성하였음.

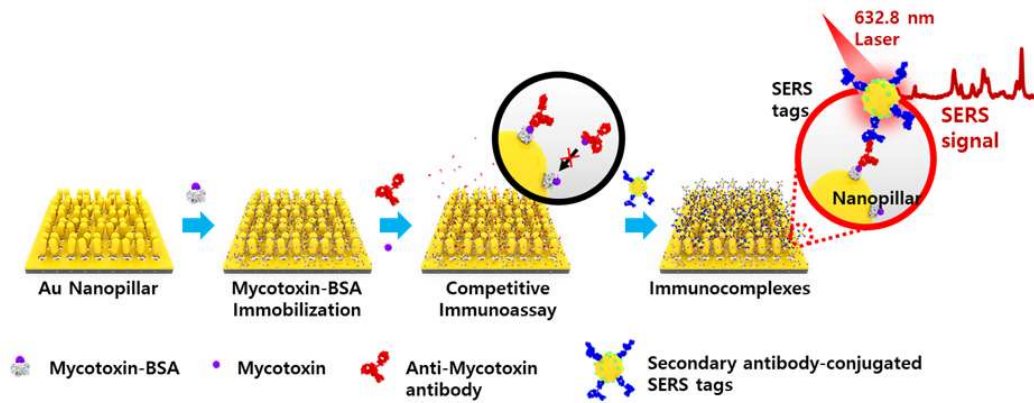


그림 2-21. 곰팡이 독소 SERS 면역분석 방법

- 제작된 라만 신호 증폭용 나노입자에 이차항체를 고정화하여, 곰팡이독소-BSA 복합체와 항체 결합 효율을 극대화함으로써 검출 재현성을 확보하였음. 이차항체의 고정화 방법으로 DHLA-EDC/NHS 화학결합법을 이용하였으며 곰팡이독소-BSA 고정화 결과는 UV/Vis 스펙트럼에서 red shift 현상 여부와 DLS를 이용한 입자의 분포도로 확인함.

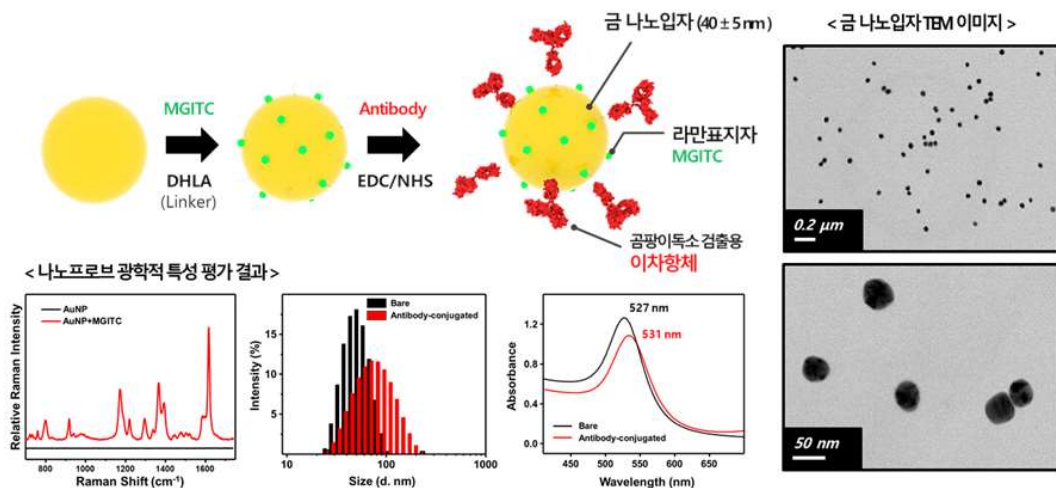


그림 2-22. 곰팡이독소 검출용 기능성 나노프로브 제작 과정,
SERS 신호 측정, DLS, UV-VIS, TEM imaging

(5) 위탁연구기관2 (국립농산물 품질관리원 시험연구소)

○ 국립농산물품질관리원의 연구대상 농약에 대한 기본 자료 제공

- 본 과제 대상 농약에 대한 기본 정보와 검출 방법 자료를 공유하였음

| 파라치온 메칠 (Parathion-methyl) | 아진포스 메칠 (Azinphos-Methyl) | 메타미도포스 (Methamidophos) |
|---|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - 유기인계살충제 - 접촉독 및 식독작용, 흡입 독작용 - 살충 및 살용애효과를 보이는 비침투성 약제이나 심달성(translocation)이 있는 것으로 알려져 있음 - 본제의 급성경구독성 LD50 (rat)은 3.6mg/kg, 급성경피 독성 LD50(rat)은 6.8mg/kg으로 포유동물에 대한 독성이 매우 강함 - 농관원 320 동시분석법 포함 성분 | <ul style="list-style-type: none"> - 유기인계 살충제 - 고독성 농약이므로 사용 및 보관에 특별히 주의 - 잎말이나방 : 꽃이 피기전 및 꽃이 진후 20일부터 6월말경과 7월말 ~ 8월초순액이 충분히 묻도록 살포 - 굴굴나방 : 여름순과 가을순이 왕성하게 자라는 기간중 피해일 발생초기에 약액이 충분히 묻도록 살포 - 농관원 320 동시분석법 포함 성분 | <ul style="list-style-type: none"> - 유기인계 살충제 - 고독성 농약 - 농관원 320 동시분석법에 미포함 |
| <p>디펜조콧, 디콧, 파라콧 (Difenzoquat, Diquat, Paraquat)</p> | <p>네레이스톡신 (Nereistoxin)</p> | <p>치아벤다졸 (Thiabendazole)</p> |
| <ul style="list-style-type: none"> - Bipyridyllium계 제초제 - 광합성의 전자 전달계에서 전자를 탈취하여 생성된 자유기 (free radical)가 과산화물을 생성하여 살초 - 따라서 광의 조도(照度), 즉 광의 강도와 살초 활성과는 밀접한 관계가 있음 - 이 계통에 속하는 제초제의 종류는 적으나 매우 적은 양으로 강력한 속효성 살초활성을 보이며 비선택성 접촉형 제초제 - 농관원 320 동시분석법에 미포함 | <ul style="list-style-type: none"> - 곤충신경계 살충제 - Nereistoxin의 유도체인 cartap과 bensultap은 충체 내에서 일차 대사 산물인 nereistoxin으로 전환되어 독작용을 나타냄 - 증상은 허탈상태를 거쳐 긴장손실을 동반한 마비가 오게 되며, 처리약량이 적으면 재회복이 가능하나 한계치이상이면 치사 - 농관원 320 동시분석법에 미포함 | <ul style="list-style-type: none"> - Benzimidazole계 침투성 유기 살균제 - 고효성이며 광범위한 병해에 효력이 있는 약제로 대부분 물관으로 이동하여 과실 보다 잎과 생장점으로 이행, 효과를 나타냄 - 농관원 320 동시분석법 포함 성분 |

○ 초고감도 라만분광분석기법에 적합한 타겟농약 성분 시료 분석

- 잔류농약 분석 및 분석법 교육 - 대상 : 공동연구 참여연구원, 전처리법, 기기(GC/MS/MS, LC/MS/MS)분석법 실습
- 곰팡이독소 분석 및 분석법 교육 - 대상 : 공동연구 참여연구원, 전처리법, 기기(HPLC, LC/MS/MS)분석법 실습
- 상기 교육건에 대한 결과 자료는 IPET상에 교육성과 자료로 등록완료하였음

나. 2차년도

1) 개발 목표

- 주관연구기관(재료연구소) : 다중 SPR계면 센서 기판을 통한 민감도 향상 연구/센서 기판의 초분자체 표면개질 실증 및 초분자체-농약 결합 특성 검증
- 협동연구기관 1(부산대학교) : 유해물질검출 박테리오파지 수용체 개발, 유해물질 전처리 방법 확립 및 전처리용 분자각인 고분자 제조
- 협동연구기관 2(나노스코프시스템즈) : 라만 분광 광학헤드 프로토타입 제작
- 위탁연구기관 1(중앙대학교) : 곰팡이독소 검출용 나노프로브/집적화 어레이 기반 면역분석법 개발 (1세부 협력)
- 위탁연구기관 2(농관원 시험연구소) : 농산물 유해물질 검체 전처리 기술 개발, 검체 제공

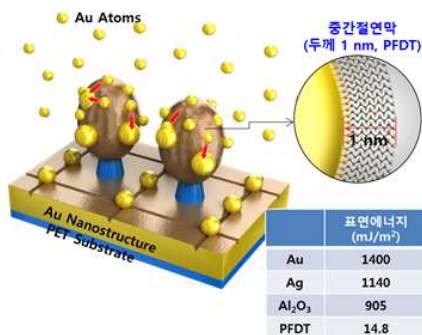
2) 내용 및 결과

(1) 주관연구기관 (재료연구소)

○ 다중 SPR 계면 구조 분자센싱소재 개발

- 금속나노구조/나노절연막/금속 나노입자 형성을 통해 플라즈모닉 커플링 극대화 기술을 개발하였음.
- 1차년도에 개발한 나노돌기 SERS기판 표면에 표면에너지가 낮은 PFDT물질의 절연막을 도입한 이후 진공증착법을 이용한 나노입자 형성을 통하여 3차원 SPR 계면구조를 형성하였음.

<3차원 다층 SPR소재 모식도 >



<나노돌기/절연막/나노입자 구조의 SEM 이미지 >

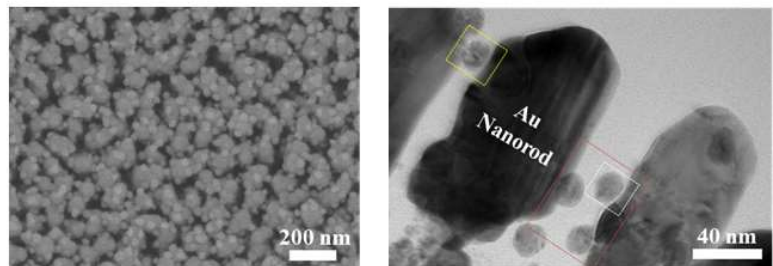


그림 2-23. 3차원 다층 계면 구조 개발 및 나노형상 SEM 관찰 결과

- FDTD 시뮬레이션 결과 3차원 다층 SPR 계면 기판에서의 플라즈모닉 커플링 효과가 단일 층 플라즈모닉 기판에 비해 3.4 배 증가됨을 확인함.
- 플라즈모닉 커플링 현상은 추가 도입된 나노입자와 근처의 나노입자 사이, 돌기 나노구조와 추가 도입 나노입자 사이에서 극대화 된다는 것을 확인함.

<TEM 이미지 기반 FDTD 시뮬레이션 결과 >

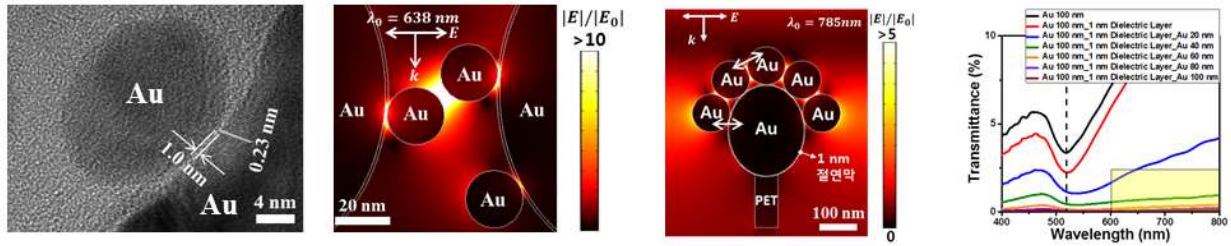


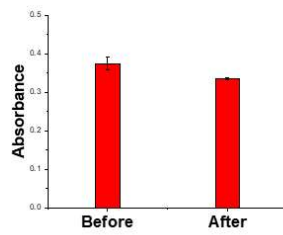
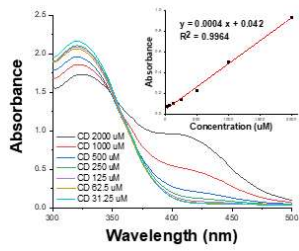
그림 2-24. 개발 SPR소재의 FDTD시뮬레이션 결과 및 투과도 결과

- 투과도 측정을 통해 추가 도입된 나노입자의 크기가 커질수록 전 파장 영역에서 투과도가 감소하는 것을 확인함으로써 라만산란 효과가 극대화되는 초 고민감도 SERS기판을 개발 하였음을 확인.
- 민감도뿐만 아니라, 다중 SPR 계면형성에 따른 SERS 핫 스팟 밀도증가에 따른 신호 균일도 신호 오차가 6.6% 이내로 매우 우수함을 확인하였음.
- 2차년도에는 3차원 다중 SPR구조를 형성함으로써 420 cm^{-1} 에서 8.3×10^8 , 1625 cm^{-1} 에서 4.3×10^8 의 라만증강지수를 확인하였음.

○ SERS기판의 초분자 표면개질

- SERS기판 표면에 Cyclodextrin 초분자를 표면개질하기 위해 화학반응을 유도하였음. Carboxymethyl 작용기와 succinyl 작용기를 가지는 Cyclodextrin은 amine 작용기와 amide bond를 형성할 수 있어 EDC 반응을 유도하였음.
- 표면 링커 물질로 Cysteamine을 SERS 기판 표면에 먼저 도입하여 amine group이 표면에 노출되도록 self assembled mono-layer (SAM)를 형성하였음. 이후 Carboxymethyl group과 succinyl group을 가지는 cyclodextrin을 EDC와 NHS 촉매를 이용하여 고정하는 공정을 확립하였음.
- 연구 초기에는 상기 Cyclodextrin 고정법을 이용하였으나, linker물질의 라만신호 존재, EDC, NHS 촉매를 사용함에도 고정 효율이 높지 않다는 것을 확인한 이후에 mono-(6-deoxy-6-mercapto)-cyclodextrin을 이용하여 SERS기판 표면에 초분자를 1 step으로 고정하였음.
- SERS 기판상 초분자체 고정 전/후 Ellman's assay를 통해 thiolated cyclodextrin의 thiol 양을 정량 분석하였음. 측정 결과 약 $6.56 \mu\text{g}$ 의 cyclodextrin이 기판 1 cm^2 기판에 흡착되었음. 또한 소수성 특징이 있던 SERS기판이 친수성 cyclodextrin이 고정된 이후 친수성으로 변화함으로써 SERS기판상 초분자 고정 공정을 최종 확립하였음.

<Ellman's Assay 결과 >



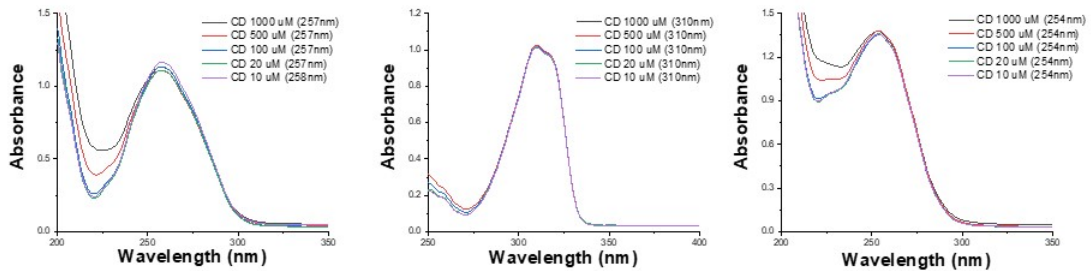
<초분자 개질 전/후 접촉각 테스트 >



그림 2-25. 초분자 표면개질 정량평가 및 접촉각 테스트 결과

- 초분자와 농약 간 결합 특성을 확인하기 위해 UV-Vis spectroscopy 분석과 circular dichroism 분석을 실시하였음. 농약은 Bipyridyl 농약군에 해당하는 Paraquat, Diquat, Difenzoquat에 대해 실험하였음.
- 초분자 내에 농약이 결합되게 되면 농약분자보다 cyclodextrin이 결합된 분자의 size가 증가하는 원리에 의해 흡광이 shift하는 결과를 얻을 수 있었음.
- 초분자와 농약간 결합에 의해 농약분자의 symmetry가 변화하는 원리에 의해 circular dichroism 신호가 변화하는 결과를 얻을 수 있었음. 용액 내 농약/Cyclodextrin 비율이 증가함에 따라 theta/mdeg값이 줄어드는 것을 확인하였음.

<초분자 - 농약 흡광도 변화 >



<초분자 - 농약 Circular Dichroism 신호 변화 >

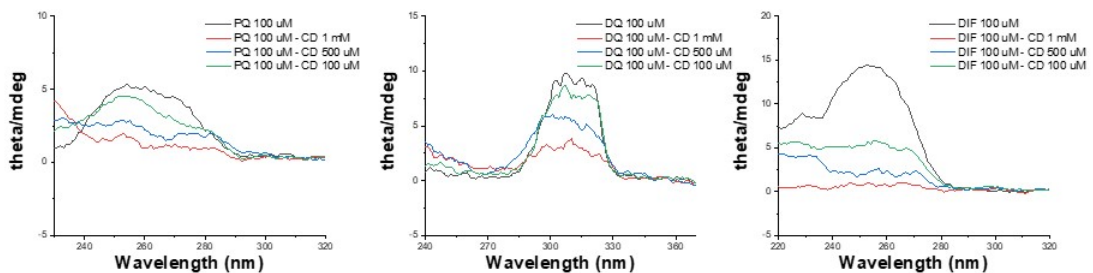
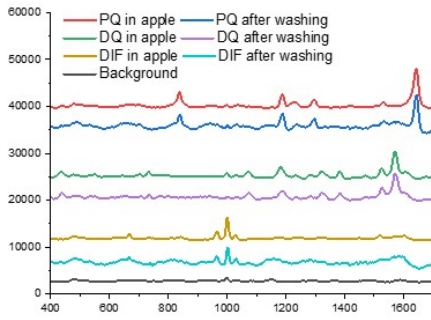


그림 2-26. 초분자 농약 결합 흡광도 및 Circular Dichroism 신호 변화 결과

- 초분자 표면개질 SERS기판이 잔류농약을 선택적으로 검출하는지 확인하기 위해 3종의 농약을 기판에 용적 후 라만신호 측정, washing과정 후 라만신호를 비교하여 초분자 수용체의 농약 결합력을 측정하였음.

<농약의 초분자 결합 후 라만신호 변화>



<Recovery 효율 계산>

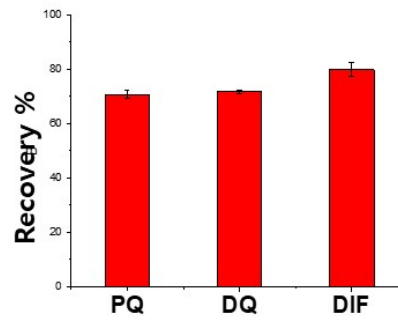


그림 2-27. 초분자 표면개질 SERS기판상 농약 선택성 실험결과, 포집 효율 계산 결과

- 초분자 표면개질 SERS기판 상 3종 농약의 라만신호가 washing 후에도 유지되는 것을 확인하였고 recovery rate 또한 70% 이상을 유지하는 결과를 얻게 되었음.
- 초분자 표면개질 SERS기판은 Paraquat, Diquat, Difenzoquat 3종 농약에 대해 선택성이 있음을 최종 확인함.

(2) 협동연구기관1 (부산대학교)

○ 잔류 농약 및 곰팡이독소의 고감도 검출을 위한 선택성 박테리오파지 개발

- 1차년도에 발굴한 펩타이드 서열을 박테리오파지 표면단백질로 발현 및 증식.
- 유해물질에 따른 유전자 프라이머(primer)를 설계하고 inverse PCR 기법을 통하여 다양한 종류의 특이성 바이러스 DNA를 재구성, 이를 기반으로 유해물질 선택성 박테리오파지를 개발함.

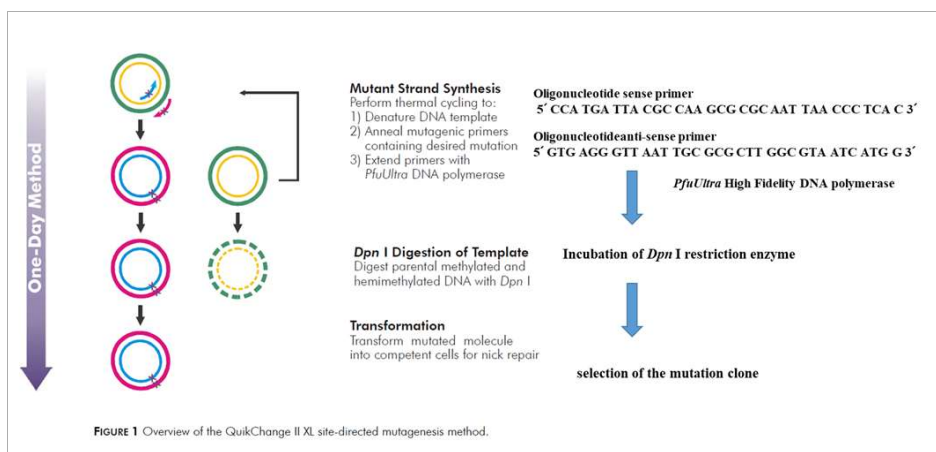


그림 2-28. 기능성 박테리오파지 개발을 위한 site-directed PCR 개요도

- 확보된 서열을 기반으로 기능성 박테리오파지 제작을 위해 DNA sample, primer, nucleotide, taq polymerase, mix buffer를 이용하여 PCR 수행함 .

- PCR 기기에서 Denaturation, annealing, extension 단계가 반복하여 진행되면서 원하는 DNA 부분을 증폭함.
- 1% agarose gel을 이용하여 박테리오파지기반 발굴된 펩타이드 F, S, Y, K, Q, W, SPPWPPRP, PWP, PRP, WRP 서열이 탑재된 기능성 박테리오파지의 PCR 산물을 전기영동법으로 확인함.

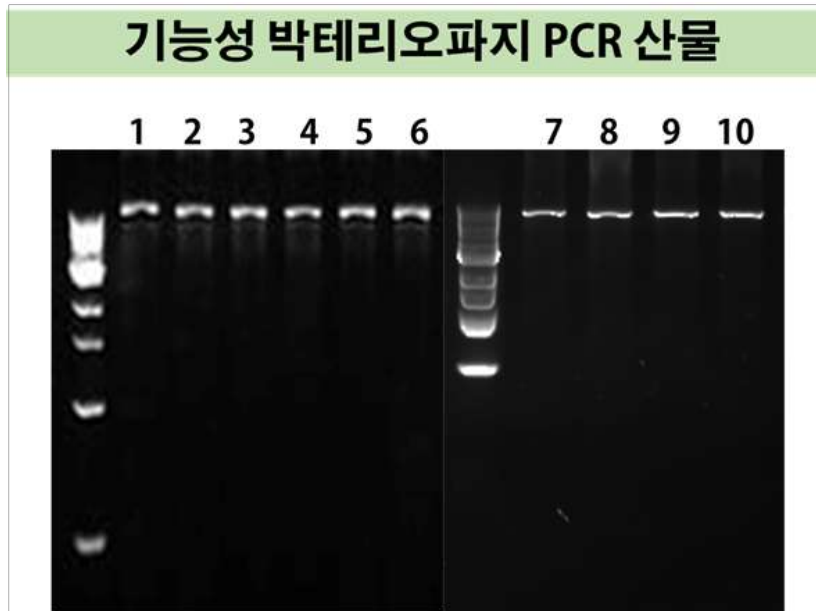


그림 2-29. 발굴된 선택적 결합 펩타이드 서열을 탑재한 PCR 수행 결과물; #1:F, #2: S, #3: Y, #4: K, #5: Q, #6: W, #7: SPPWPPRP, #8: PWP, #9: PRP, #10: WRP

- PCR product는 대장균을 이용하여 형질전환 후 X-gal/IPTG가 포함되어 있는 LB agar plate에 도말하여 배양함.
- 고체 배지에 기능성 박테리오파지로 예상되는 파지인 Blue plaque을 10종 선택함.

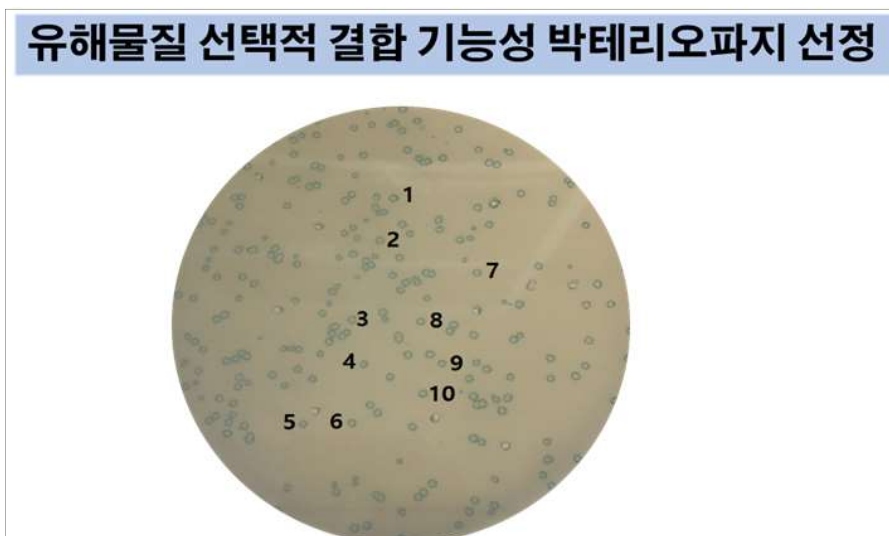


그림 2-30. 형질 전환을 통한 기능성 박테리오파지 선정

- 액체 배지에 예상되는 파지를 소량 배양하여 펩타이드 서열 분석을 위해 DNA 추출을 통한 염기서열 분석을 진행함.
- 각 각의 3F, 3S, 3Y, 3K, 3Q, WWE, SPPWPPRP, PWP, PRP, WRP 타입의 기능성 박테리오파지는 유전자 조작을 통해 결합력이 높은 서열을 탑재시켜 표면에 증폭시켜 선택적 결합력 향상시킴.

○ 박테리오파지 표면 엔지니어링

- 잔류 농약 및 곰팡이 독소 검출과 관련된 펩타이드 서열은 M13 박테리오파지의 표면단백질 중 가장 많은 부분을 차지하는 pVIII 부분에 삽입하여 민감도 및 선택성을 증진.
- Mutagenesis PCR법을 이용하여 M13 박테리오파지의 minor protein인 p3번 위치에 M13 pIII-SPPWPPRP 및 major protein 위치에 pVIII- 3F, 3S, 3Y, 3K, 3Q, PWP, PRP, WRP의 특이 펩타이드가 발현되는 기능성 박테리오파지 라이브러리를 구축함.

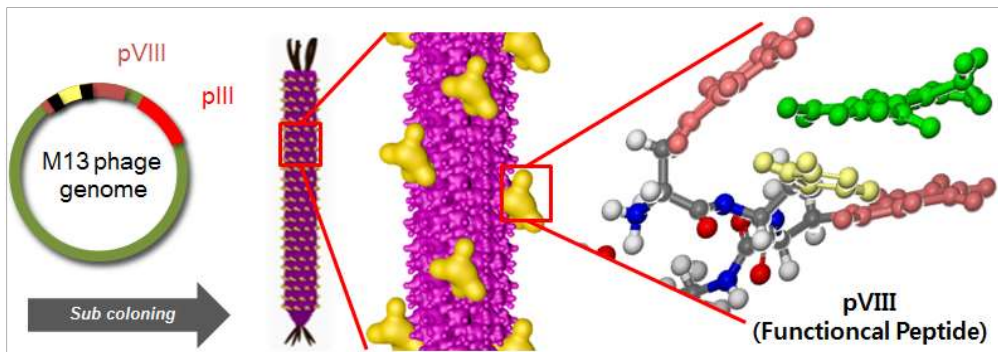


그림 2-31. PCR을 활용한 박테리오파지 기반 기능성 펩타이드의 발현 모식도

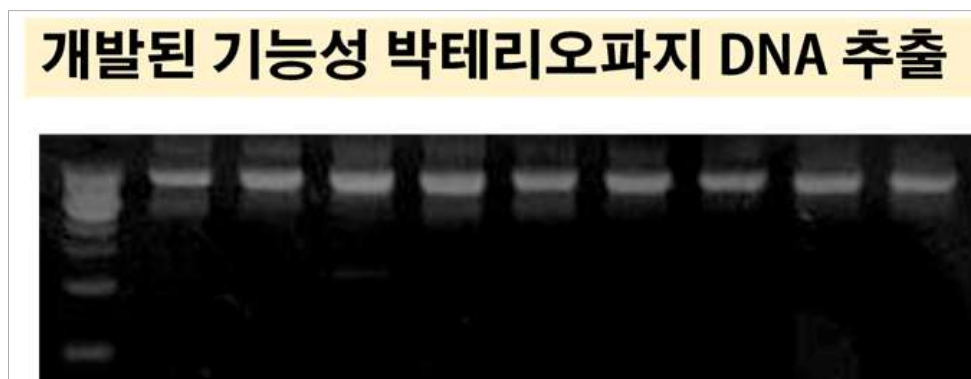


그림 2-32. 기능성 박테리오파지 DNA 추출 후 확인 사진

- 형질 전환을 통해 얻어진 phage plaque 분석하기 위해 얻어진 기능성 박테리오파지 산물을 증폭하여 소량의 액체 배지에 배양 후 각각의 기능성 박테리오파지의 DNA를 추출함.
- M13 박테리오파지 pVIII 위치에 탑재된 KKK, FFF, QQQ, SSS, YYY, WWE 기능성 박테리오파지의 펩타이드의 서열 확인을 위해 DNA 추출로 염기서열 분석을 진행 후 chromase 데이터 분석 과정을 거쳐 탑재된 펩타이드 서열의 정확도를 다음과 같이 검토함.

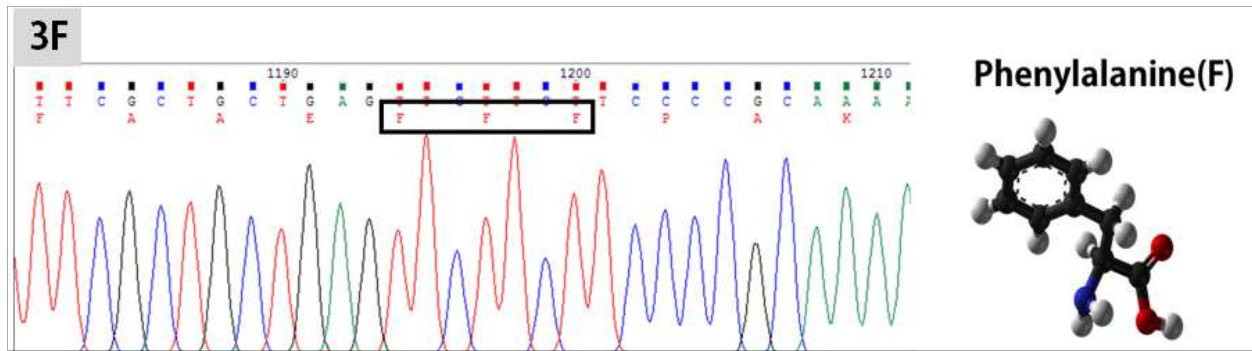


그림 2-33. FFF 펩타이드의 염기서열 분석 chromas 결과

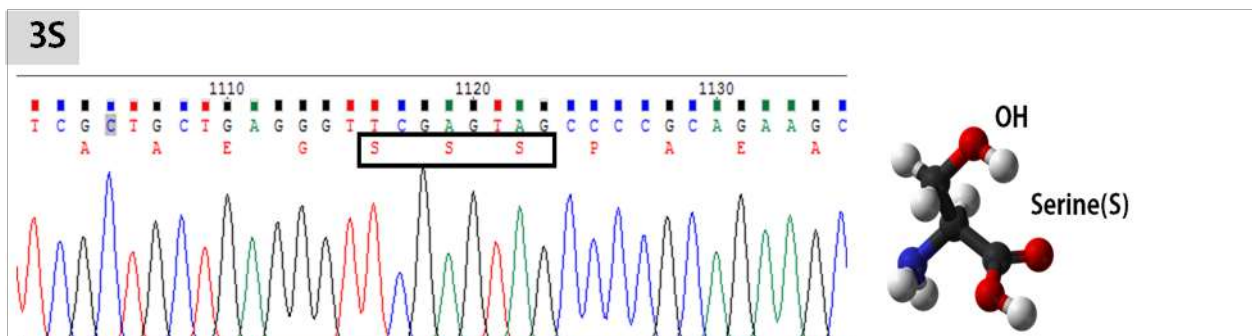


그림 2-34. SSS 펩타이드의 염기서열 분석 chromas 결과

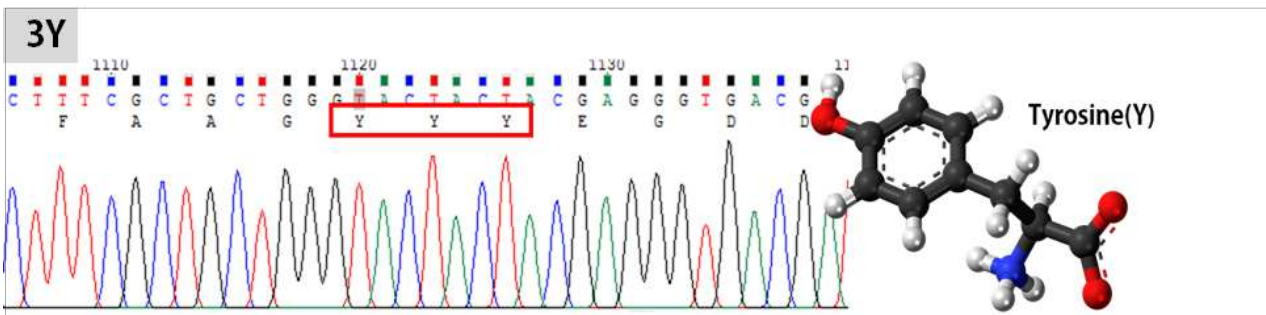


그림 2-35. YYY 펩타이드의 염기서열 분석 chromas 결과

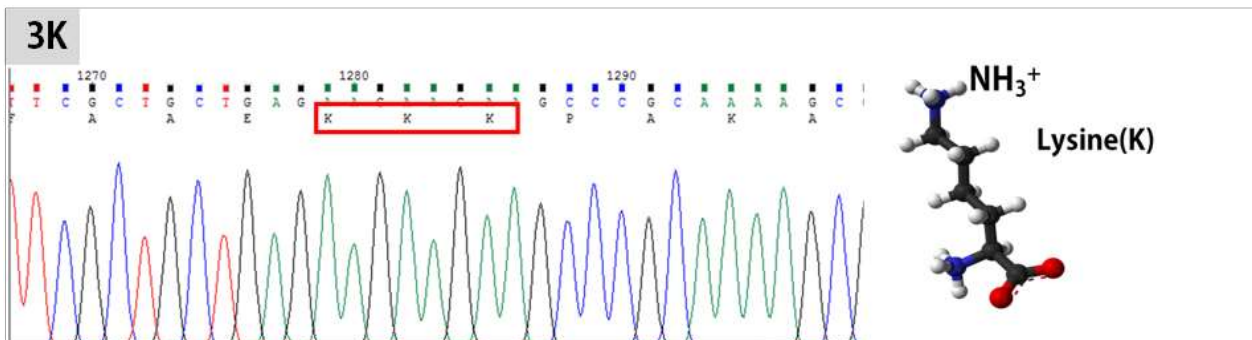


그림 2-36. KKK 펩타이드의 염기서열 분석 chromas 결과

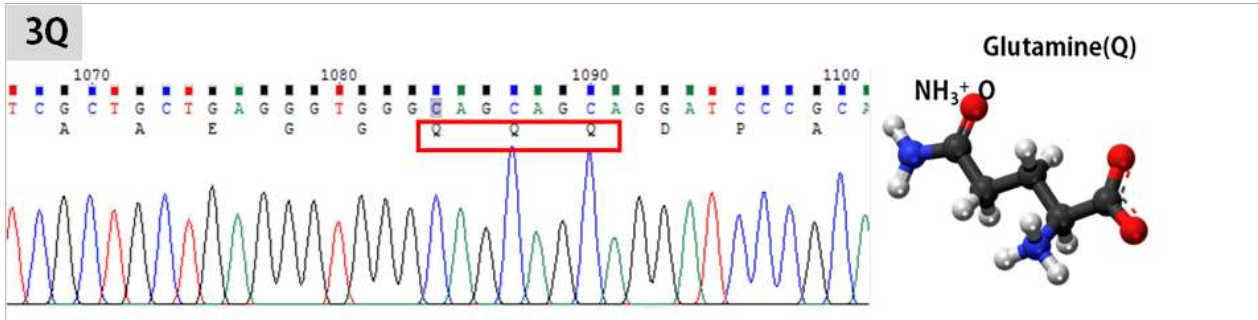


그림 2-37. QQQ 펩타이드의 염기서열 분석 chromas 결과

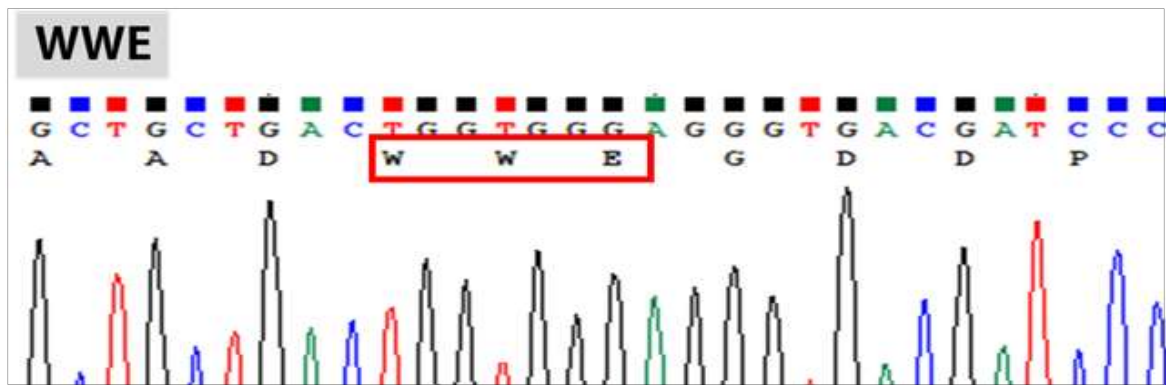


그림 2-38. WWE 펩타이드의 염기서열 분석 chromas 결과

- Parathion-methyl 농약을 선택적으로 결합할 수 있는 펩타이드 서열 SPPWPPRP, PWP, PRP, WRP를 발현하는 기능성 박테리오파지를 다음과 같이 개발하였음

M13p3-SPPWPPRP

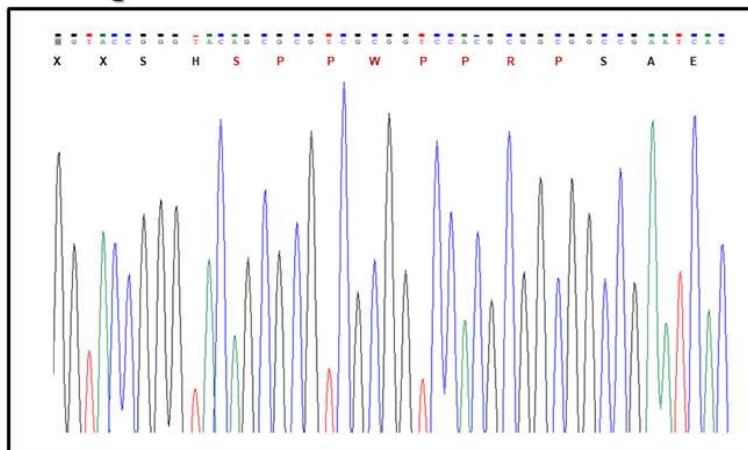


그림 2-39. SPPWPPRP 펩타이드의 염기서열 분석 chromas 결과

M13 p8-PWP

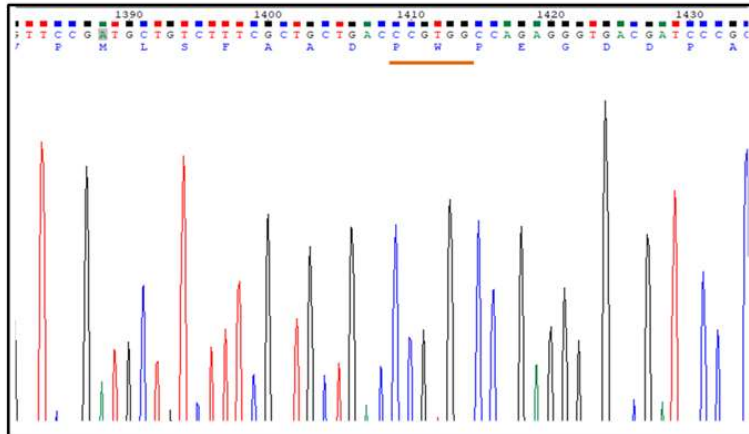


그림 2-40. PWP 펩타이드의 염기서열 분석 chromas 결과

M13 p8-PRP

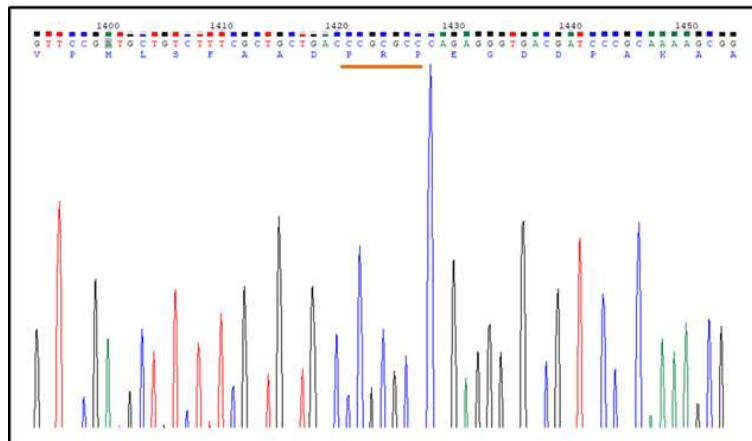


그림 2-41. PRP 펩타이드의 염기서열 분석 chromas 결과

M13p8-WRP

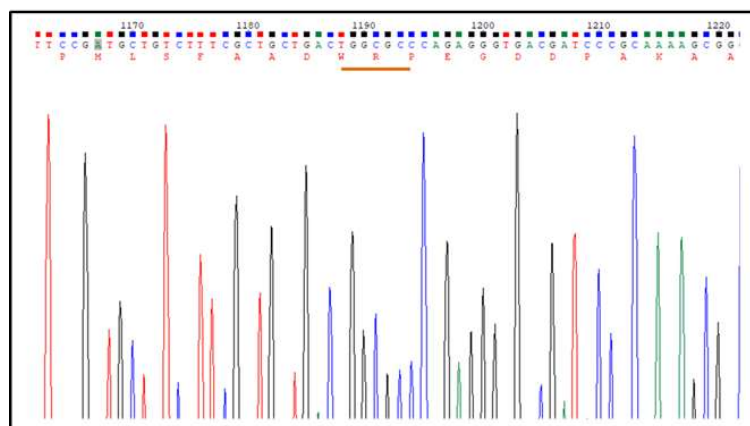


그림 2-42. WRP 펩타이드의 염기서열 분석 chromas 결과

○ 박테리오파지의 선택 특성 평가

- 표면플라스몬공명(SPR) 분석법, 효소결합 면역흡착분석법(ELISA), Dot-blotting 분석법 중 표면플라스몬공명을 통해 선별한 박테리오파지와 유해물질 성분 간의 결합정도 분석함.

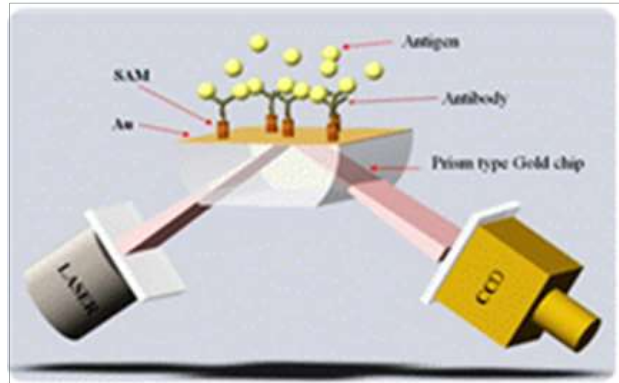


그림 2-43. SPR 방법을 이용한 박테리오파지의 성능 테스트 모식도

- SPR측정 장치를 이용하여 Paraquat 농약에 선택성을 가지는 파지검출 방법에 대한 검증을 실시함.
- PQ 100 ppb의 낮은 농도에서 반응하기 시작한 파지 필름의 SPR 신호는 실험을 진행함에 따라 손상됨, 더 높은 농도의 PQ가 투입되었을 때 이상 반응을 나타냄, SPR 측정은 액상뿐 아니라 기상에서도 수행할 수 있으나 본 과제에서 사용하는 PQ, DQ 등 농약 물질들을 기체 상태에서 안정적으로 다루는 것은 어려움.
- 본 과제에서 사용하는 PQ (Paraquat), DQ (Diquat) 등 농약 물질들을 기체 상태에서 안정적으로 측정하는 것은 효율이 낮으며 측정의 어려움을 확인 후 다른 효과적인 방법 구축을 계획함.

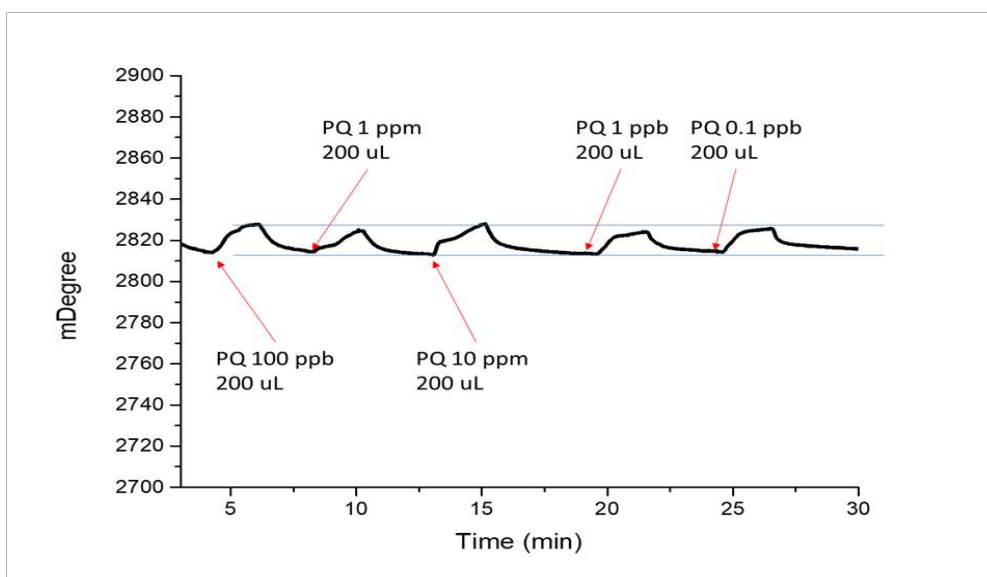


그림 2-44. SPR 측정 및 Wild-type 파지 필름을 기반으로 PQ의 Binding affinity 측정

○ 유해물질 전처리 방법 확립 및 전처리용 분자각인 고분자 제조

- 농관원 개별분석 대상 잔류농약인 Thiabendazole(이하 TBZ)을 분석대상 농약으로 선정하여 해당 유해물질에 대한 분자각인 고분자 기반 전처리시스템을 개발함.
- TBZ를 각인할 수 있는 분자각인 고분자의 합성을 위해 최적의 기능성 모노머, 가교제, 개시제, 용매를 선정 후 합성을 진행함. 분자각인 고분자의 수득률 및 합성 성능을 평가하기 위해 아래와 같은 방법으로 비각인 고분자를 함께 합성함.

| | Chemical reagent | Amount |
|--------------------------|------------------------------|----------------------|
| Target sample | Thiabendazole | 1 mmol |
| Functional monomer | Methacrylic acid | 4 mmol |
| Cross-linker | Divinylbenzene | 20 mmol |
| Initiator | Azobisisobutyronitrile | 1.47 mmol |
| Porogen solvent | Acetonitrile:Toluene | 100 mL (75:25 (v:v)) |
| Temperature | 60°C | |
| Method of polymerization | Precipitation polymerization | |

그림 2-45. TBZ의 분자각인 고분자 합성 시 사용했던 화학시약 및 질량 및 부피

- 합성된 분자각인 고분자의 TBZ를 추출하기 위해 soxhlet 추출법을 이용하여 각인된 TBZ를 제거하였으며, solid phase extraction(SPE) tube를 사용하여 TBZ-분자각인 고분자 카트리지를 제작. 이와 같은 방법으로 비각인 고분자 카트리지도 함께 제작함.

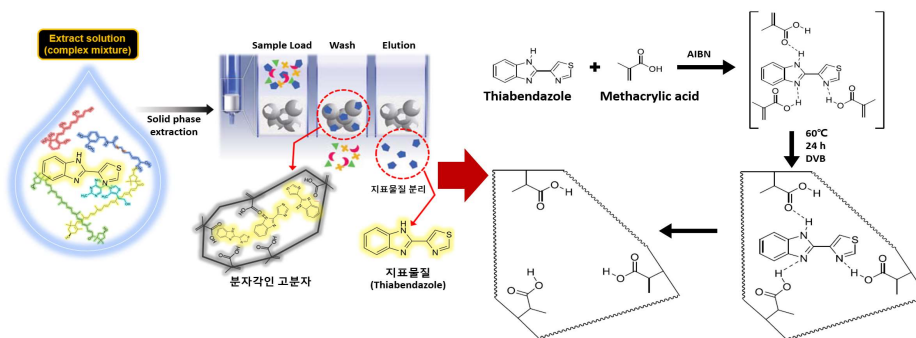


그림 2-46. 분자각인 고분자 전처리 시스템 합성 과정



그림 2-47. 제작한 분자각인 고분자/비각인 고분자 카트리지 이미지

- TBZ 100ppm 표준용액으로 분자각인 고분자의 성능을 액체 크로마토그래피로 확인하였으며, 분석대상 농약에 선택적인 분자각인 고분자가 합성되었음을 크로마토그래피의 peak area로 계산하였고, 처음 elution 단계에서 97%를 각인하는 것으로 확인하였음.

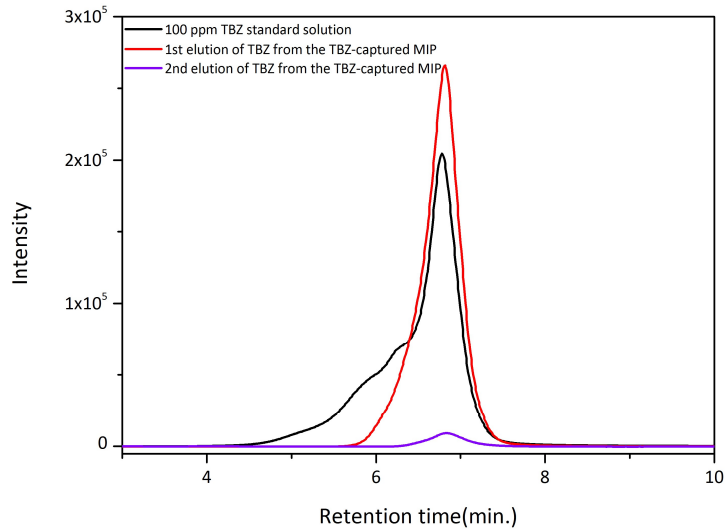


그림 2-48. TBZ 100ppm 표준용액의 피크와(검) 분자각인 고분자 카트리지를 통과한 첫 번째, 두 번째 단계 용리 단계(빨강,보라) 크로마토그램

- TBZ 100 ppm 표준용액을 비각인 고분자 카트리지에 통과시켰을 때 크로마토그래피 결과는 TBZ가 잔여하고 있음을 확인하였고, 이를 분자각인 고분자 크로마토그래피 결과와 비교하였음.

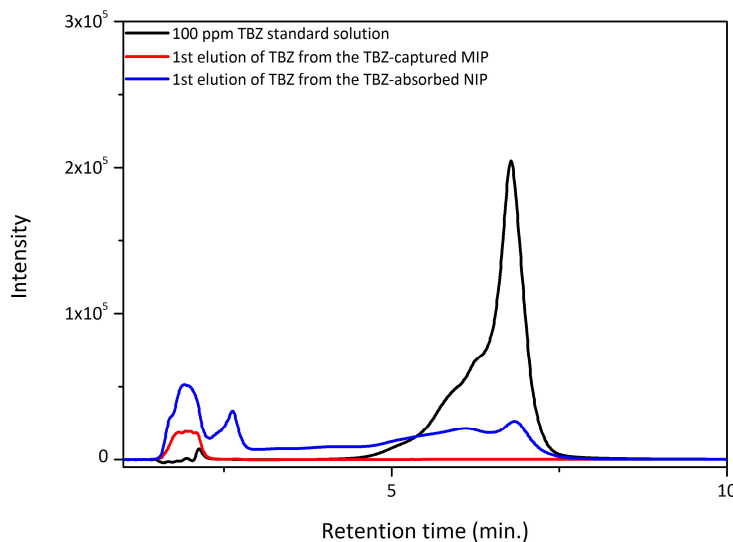


그림 2-49. TBZ 표준용액의 피크와(검)과 용리 단계에서 분자각인 고분자(빨강)와 비각인 고분자(파랑)의 비교 크로마토그램

- 분자 각인 고분자를 잔류 농약 전처리 과정에 용이하게 사용 될 수 있도록 카트리지 형태로 제작하여 최종 시스템에 적용하고자 함.
- 농관원에서 농산물(파프리카)의 TBZ 잔류농약 분석법을 위한 QuEChERS 전처리 및 LC-MS/MS와 GC-MS/MS를 이용한 다성분 동시분석법 교육을 실시하여 개발 카트리지의 활용 가능성을 확인하였음.

(3) 협동연구기관2 (나노스코프시스템즈)

○ 시그널 분석 알고리즘과 라이브러리 구축 실험을 착수할 수 있는 라만 분광 광학헤드를 개발

- Focusing optics를 설계, 노이즈 차단을 위해 반사광 시그널 차단용 Rayleigh filter 광학계, 노치 필터(notch filter)와 에지 필터(edge filter) 배치를 설계함.
- 어레이 형태로 배치된 시편을 투입하면 라만 분광 광학 헤드가 지정된 좌표의 위치로 이동하면서 스펙트럼을 측정하는 시스템을 구축함.
- 시편이 손상되지 않는 최대 레이저 파워를 설정 후 레이저 조사 방법, 레이저 파장, 스펙트로미터 변경 후 측정, 비교하여 실험 조건 수립함.

○ 스펙트로미터부 최적 디텍터 선정

- 스펙트로미터를 설계하고 그레이팅(grating)에 의해 분산된 시그널을 읽어 스펙트럼을 얻기 위한 CCD 디텍터 선정, 파수 범위와 분해능에 따라 유연하게 사양 변경할 수 있는 설계 기법을 확립함.
- 여러 상용 디텍터를 장착하고, 농약의 농도를 변경하며 LOD 수준을 측정하여 스펙트로미터의 성능을 평가함으로써 최적 디텍터를 선정함.
- 고사양 분광을 위한 소형 냉각(cooling) 시스템 구성 기술 확보.

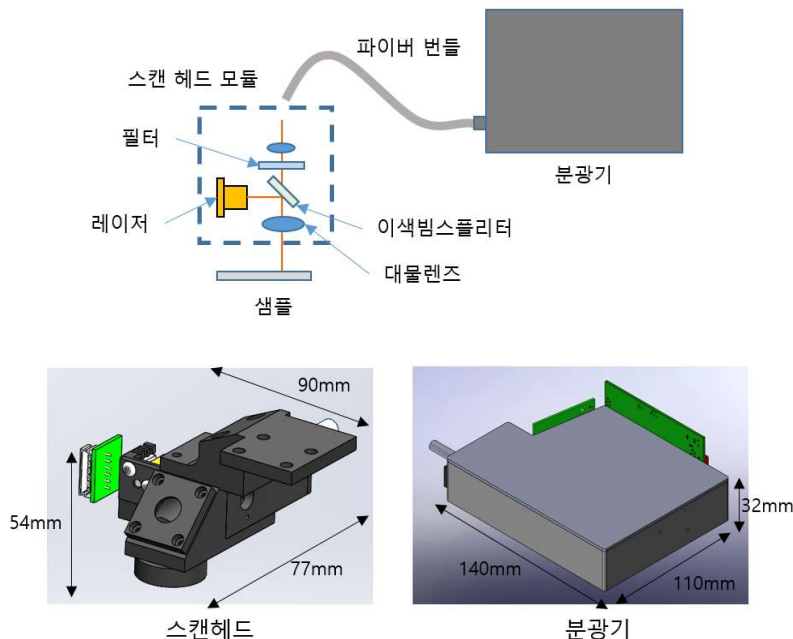


그림 2-50. 소형 분광 광학헤드 (위), 구성도 및 스캔헤드와 분광기 모듈 (아래)

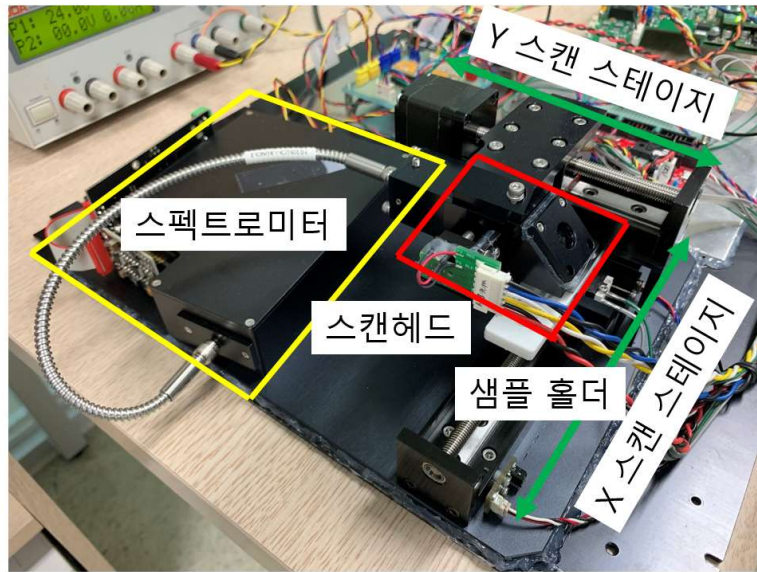


그림 2-51. 인테그레이션 및 개별 모듈 테스트

○ 목표사양 달성

- 시편 로딩방식의 1차 프로토타입을 제작하여 테스트 수행함.
- 스캔헤드는 레이저, 이색빔스플리터, 대물렌즈, 필터, 미러, 포커싱 렌즈 등이 포함되며, 부피 및 무게를 최소화할 위해 최적화된 크기로 제작됨. 제작된 스캔헤드는 스텝모터에 의해 Y방향으로 스캔샘플은 X방향의 스텝 모터에 의해 이송되어 결과적으로 특정 영역에 대한 라만 분광신호를 획득함.
- 시편에 조사되는 레이저 스폿의 형태를 입사각도 및 디포커스에 의해서 변화를 주면서 시편이 손상되지 않는 레이저 조사법에 의해 헤드 설계 및 제작을 실시함.



그림 2-52. 1차 프로토타입 테스트

(4) 위탁연구기관1 (중앙대학교)

○ (1세부 협력) 표면플라즈몬 증폭 나노 기판을 이용한 고감도 바이오센서 시스템 구현

- 라만 표지자 (MGITC) 100 nM을 sputter, thermal evaporation 방식으로 제작한 나노필라 기판에 도포하고 라만 매핑 이미지를 측정하여 두 기판의 표면증강라만 신호 세기와 균일성을 비교 분석함.
- Sputter, thermal evaporation 공정 방식으로 제작된 나노필라 기판 7 개에 대한 라만 매핑 이미지를 측정하여 균일도용 평가하였음. Sputter 방식으로 제작된 기판에서는 모든 기판에서 불균일한 라만 신호가 관측 되었지만, thermal evaporation 방식으로 제작된 기판에서는 모든 영역에서 균일하고 강한 라만 신호가 관측됨.

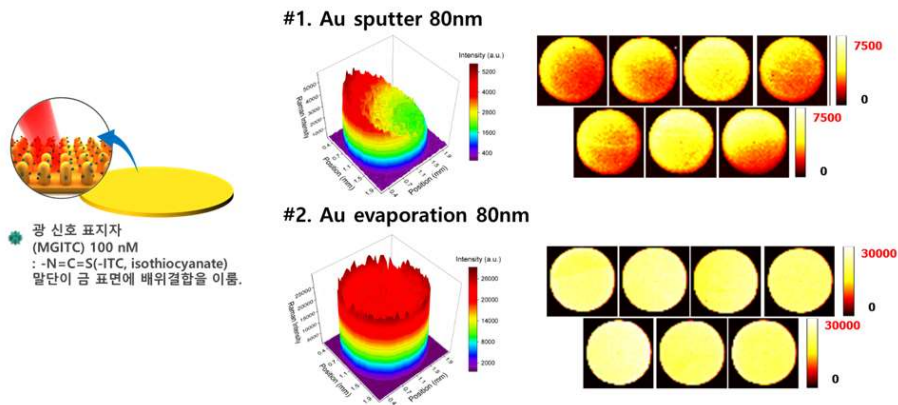


그림 2-53. Sputter, thermal evaporation 공정방식으로 제작된 나노필라기판의 라만신호 세기 및 균일성 평가

- 나노필라 기판의 증착 방식 차이에서 의하여, 라만신호의 균일성이 차이가 난다는 사실을 확인하였음. Sputter 방식 기판의 라만신호 불균일성은 금 입자들이 45도 각도로 증착되어 기판 영역 일부가 masking shadow에 의해 가려지기 때문에 나타나는 현상임을 규명하였음. 반면, thermal evaporation 방식에서는 금 입자들이 기판에 수직방향으로 증착되기 때문에 전체적으로 균일한 라만 이미지를 얻을 수 있다는 사실을 확인하였음.

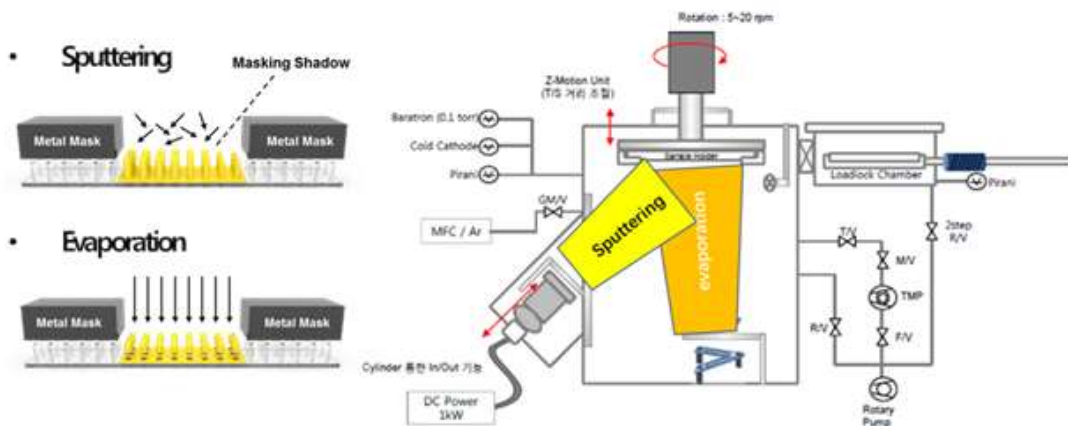


그림 2-54. 나노필라기판 제작 방법. Sputter, thermal evaporation

- Thermal evaporation 방식으로 제작된 기판에서는 나노필라들이 유연하기 때문에 wet condition에서 필라들이 서로 기대어 나노갭을 형성하는 leaning effect가 나타남. 전자주사현미경으로 관측한 결과 필라들 사이에 좁은 나노 갭을 많이 형성하여 hot spot들이 형성되고, 이로 인하여 강한 라만 신호가 발생한다는 사실을 확인함.

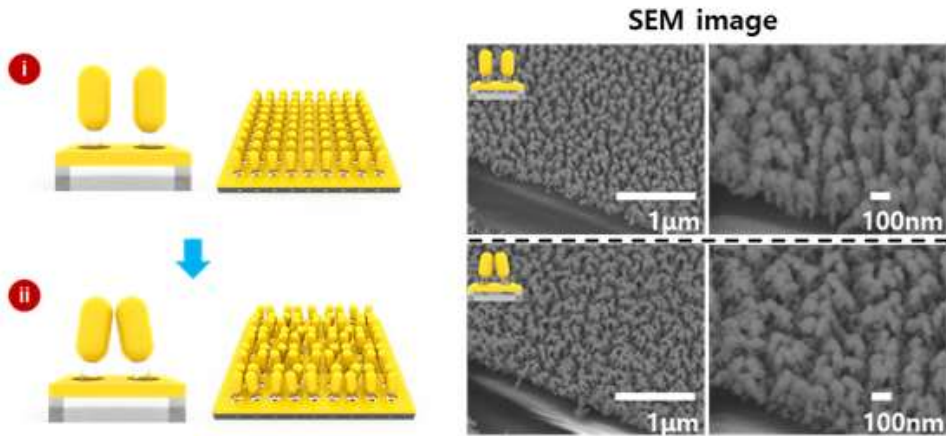


그림 2-55. Thermal evaporation 나노필라 기판의 leaning effect를 관측한 나타내는 전자주사현미경 이미지

- 표면 플라즈모닉 증폭 나노필라 기판을 활용한 고감도 곰팡이 독소 면역 분석법 개발
 - 표면 플라즈모닉 증폭 나노필라 기판에 곰팡이독소-BSA 복합체를 고정한 다음, 곰팡이독소 검출용 나노프로브와 항체 간의 경쟁면역반응을 통해 곰팡이 독소의 정량 분석을 수행함.

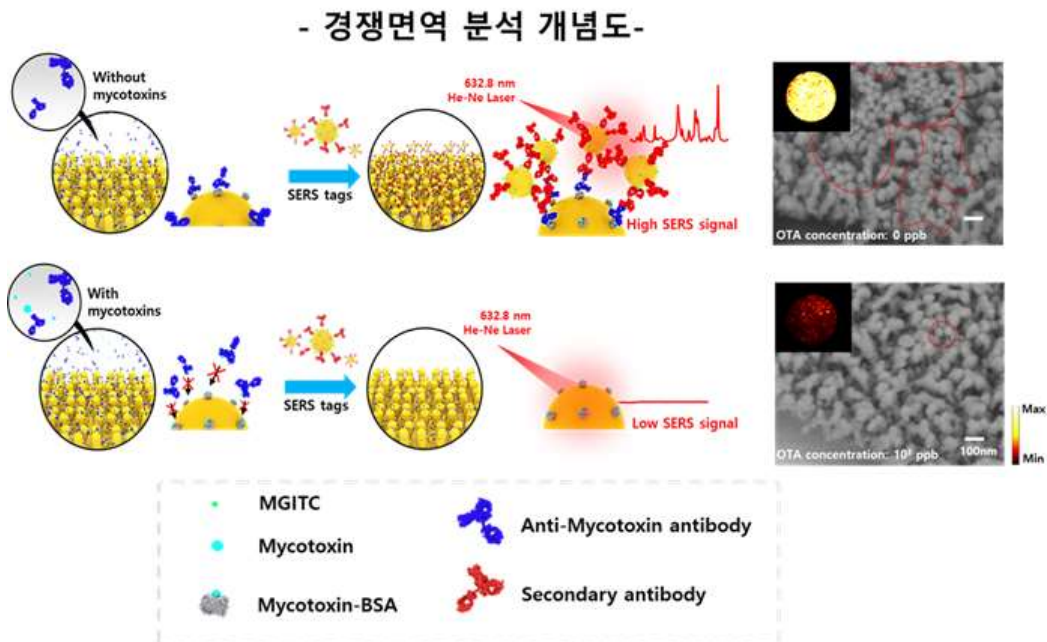


그림 2-56. 곰팡이독소 검출용 나노프로브/집적화 어레이 곰팡이독소 면역 분석 방법

- 곰팡이 독소의 정량 분석은 나노필라 기판을 이용한 경쟁면역분석반응을 이용하여 진행함. 먼저, 오크라톡신-BSA 복합체를 나노필라 기판에 고정함 다음, 나노프로브의 농도, 반응시간, 측정시간을 최적화하였음. 경쟁 면역 분석법에서는 곰팡이 독소의 농도가 감소할수록 라만 신호의 세기가 증가함. 곰팡이 독소의 농도가 낮을 때는 나노프로브들이 나노필라 기판에 고정되어 있는 곰팡이 독소-BSA 복합체와 결합하여 강한 라만 신호 세기를 나타내는 반면, 곰팡이 독소의 농도가 높아지면 나노프로브와 기판에 고정되어 있는 곰팡이 독소-BSA 복합체보다 곰팡이 독소가 나노프로브와 먼저 결합하기 때문에 라만 신호 세기가 감소함.
- SERS 기판과 및 곰팡이 독소 검출용 나노프로브를 이용한 면역 분석을 수행하여 오크라톡신 농도 변화에 따른 라만 매핑 이미지와 정량 곡선을 확보함. 오크라톡신의 검출한계는 0.0041 ppb로 ELISA assay로 검출한 0.72 ppb 보다 100배 가량 민감도가 우수한 분석 결과를 얻었으며, 이 수치는 목표로 세운 검출 농도 1 ppb 보다 약 1000 배 낮은 값임.

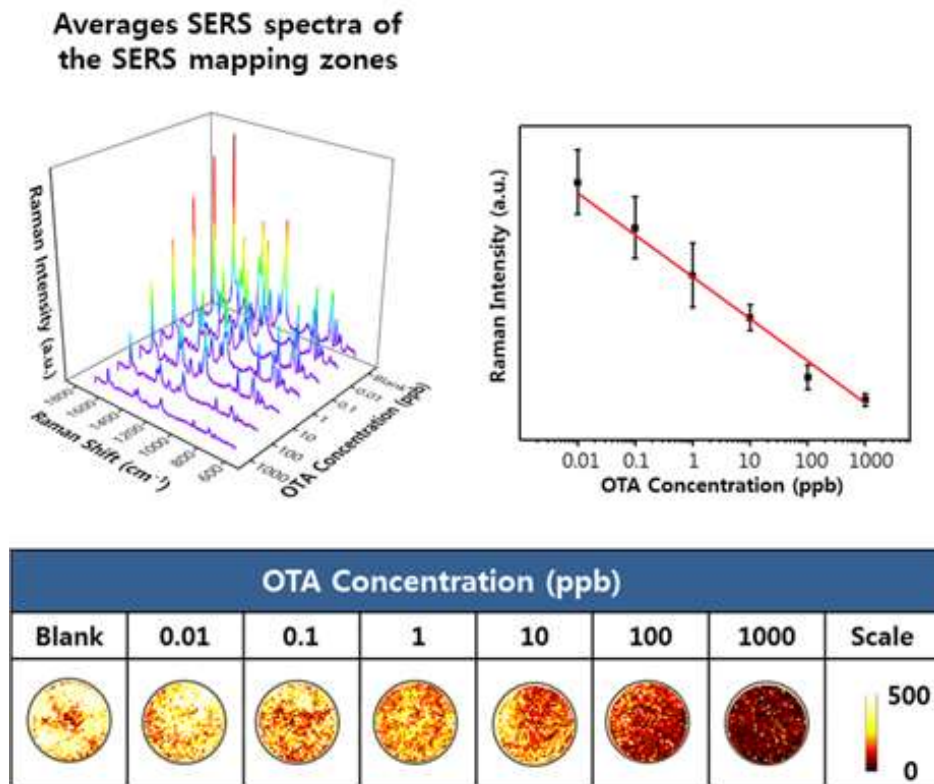


그림 2-57. 곰팡이독소 면역 분석법을 이용한 오크라톡신의 농도에 따른 SERS 스펙트럼 변화, 정량 곡선, 라만 매핑 이미지

- SERS 이미징 기판을 이용한 곰팡이 독소의 선택성 실험도 수행하였음. 동일한 SERS 기반의 이미지 분석법을 이용하여 아플라톡신, 푸모니신, 오크라톡신 및 3종의 독소 혼합물의 면역 분석을 수행한 결과 오크라톡신에 대해서만 특이적 검출결과를 얻음.

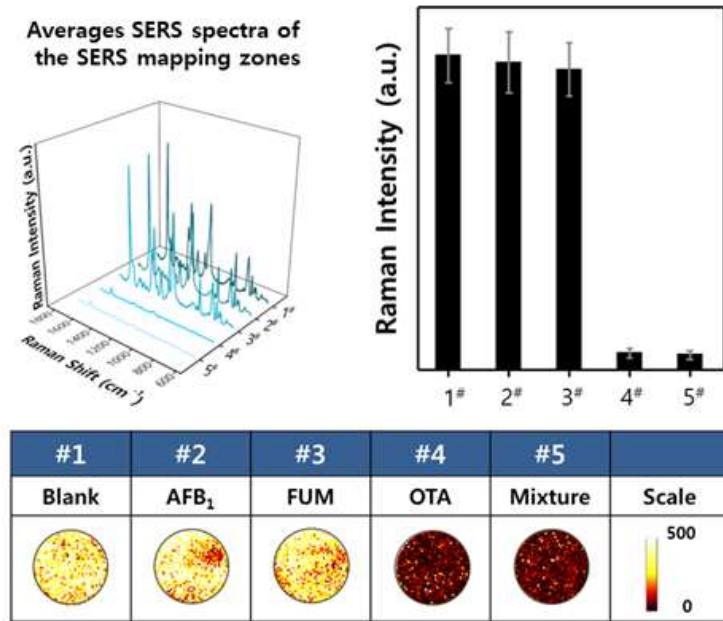


그림 2-58. 오크라톡신 면역 분석의 특이적 검출 결과

(5) 위탁연구기관2 (국립농산물 품질관리원 시험연구소)

- 농산물 유해물질 검체에 따른 최적의 전처리 기술 개발
 - 기존 정밀분석장비 분석을 위한 전처리 방법 적용 가능여부 검토
 - 유해물질 전처리 방법에 따른 농산물 품목별, 성분별 검출결과 비교
 - 품목 : 사과, 배, 토마토, 파프리카 등
 - 성분 : Diquat, Parathion- methyl, Paraquat
 - 복잡한 Matrix에 의한 SERS 신호 증가 현상 검토 등

- 라만분광분석용 검체 제공 및 기존 정밀분석결과 확보
 - 라잔류농약 및 곰팡이독소가 인위적으로 오염된 시료 제공(CRM, spiked 시료 등)
 - 성분 : Cyantraniliprole, Bistrifluron, Cyflumetofen, Pyribencarb 등
 - 농산물 안전성조사 및 탐색조사 시료에서 잔류농약 및 곰팡이독소 부적합 및 검출시료 제공.

다. 3차년도

1) 개발 목표

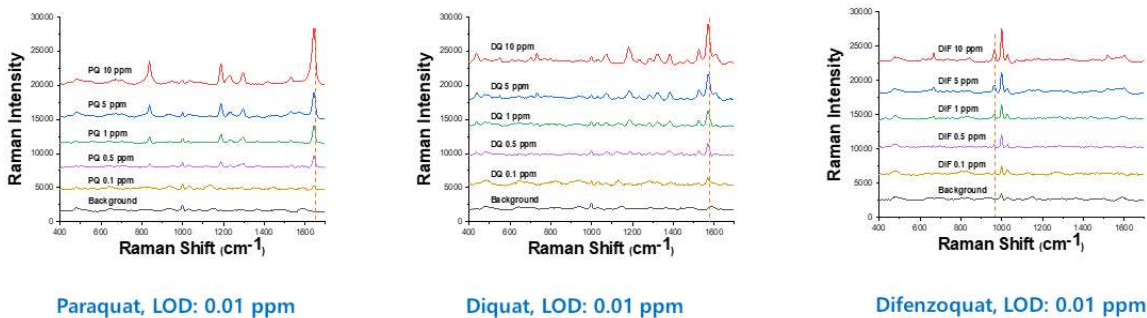
- 주관연구기관(재료연구소) : SERS기판상에 선택성 박테리오파지 수용체 및 초분자체가 표면개질 된 센서 칩 개발, 선택적 잔류 농약 검출 및 검출 한계 분석
- 협동연구기관 1(부산대학교) : 박테리오파지 수용체의 평가 및 선택성 통계분석 수행
- 협동연구기관 2(나노스코프시스템즈) : 시스템 통합 프로토타입 제작, S/W 및 DB확립, 휴대형 라만리더기 성능 검증
- 위탁연구기관 1(중앙대학교) : SERS기판 고품광이 독소 검출 면역분석법 개발
- 위탁연구기관 2(농관원 시험연구소) : 라만분광분석결과 비교분석 및 실증평가 수행

2) 내용 및 결과

(1) 주관연구기관 (재료연구소)

○ 초분자 표면개질 센서기판의 잔류 농약 스크리닝 및 분별 능력 최적화

- 초분자가 표면개질된 SERS기판의 농약에 대한 선택적 민감도를 확인하였음. Paraquat, Diquat, Difenzoquat가 spiking된 물에 초분자 표면개질 기판을 넣고 10분 후 꺼내어 washing, 건조하였음. 3종 잔류농약에 대해 0.1 ppm 까지 검출할 수 있음을 확인하였음.



Paraquat, LOD: 0.01 ppm

Diquat, LOD: 0.01 ppm

Difenzoquat, LOD: 0.01 ppm

그림 2-59. 초분자 표면개질 SERS기판 농약 검출 감도 결과

- 실제 농산품인 사과를 갈아낸 즙에 농약을 농도별로 spiking 하여 위와 동일하게 초분자가 표면개질된 SERS기판을 넣고 10분 후 꺼내어 washing, 건조 후 라만신호를 측정하였음. 사과즙에서 꺼낸 후 SERS기판은 사과의 matrix에 의해 라만신호가 나타나지 않다가 washing 후 선택적으로 결합된 농약만 기판상에 존재하게 되어 0.5 ppm까지 검출하였음.

<3종 농약에 대한 사과즙 내 농약 검출 결과>

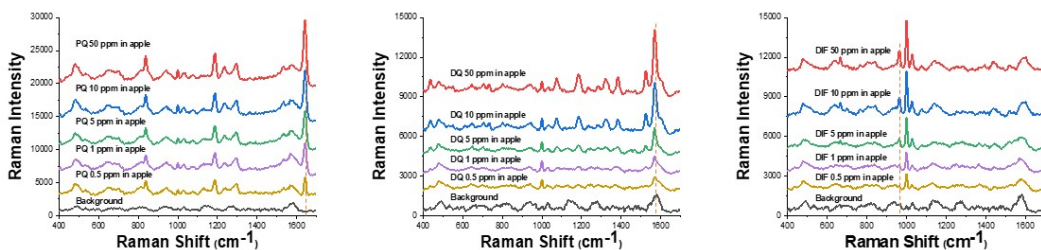


그림 2-60. 실 농산물 내 3종 농약에 대한 SERS검출 감도 결과

○ 박테리오파지 수용체 융합 SERS센서 칩 개발

- 농약에 선택성이 있는 박테리오파지를 합성하여 SERS센서칩의 수용체로 활용하는 연구를 수행하였음.

<박테리오파지 표면개질 SERS기판 모식도>

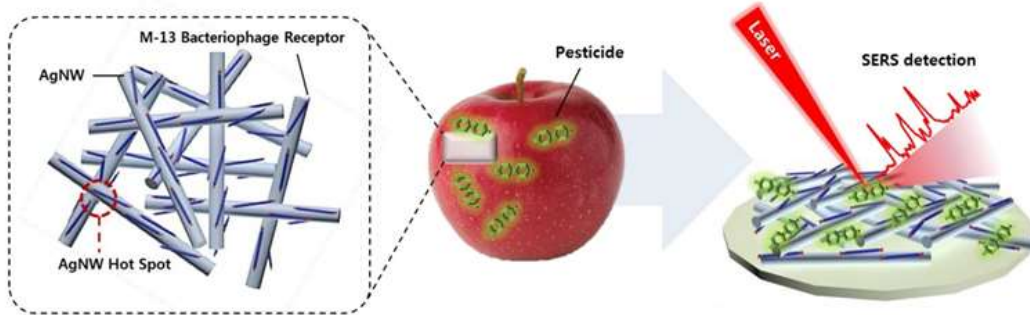
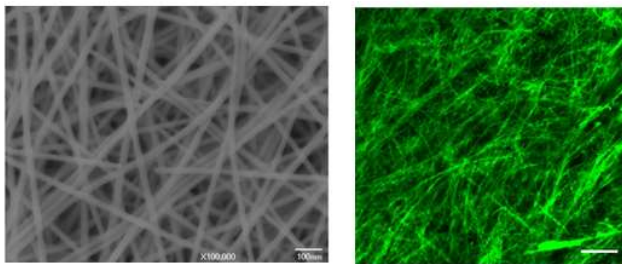


그림 2-61. 박테리오파지가 결합된 SERS기판 개발 모식도

- 박테리오파지의 표면에 아미노산 서열 WHW를 발현하는 샘플군을 부산대로부터 제공받아 은나노와이어 표면에 수용체로 표면개질 하였음.
- 박테리오파지가 표면개질된 은나노선에 면역형광분석법을 통해 형광신호를 확인하였음. 박테리오파지가 은나노선을 따라 코팅되어 은나노선 형상과 동일한 형광신호 패턴을 얻게 되었음.
- Atomic Force Microscopy (AFM)을 이용하여 박테리오파지가 코팅된 은 나노와이어 표면의 morphology변화를 확인하였음.

<박테리오파지 표면개질 형광분석>



<박테리오파지 표면개질 AFM분석>

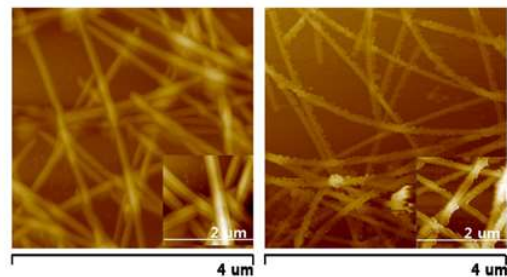


그림 2-62. 박테리오파지 표면개질 SERS기판의 표면 특성 분석 결과

- 박테리오파지가 선택적으로 결합할 것으로 예상한 paraquat 농약에 대한 검출한계 (LOD) 평가를 진행하였고, 개발된 박테리오파지 표면개질 SERS기판은 단위면적 1 cm² 당 20 ng의 paraquat 농약을 검출할 수 있었음.

<Paraquat LOD test>

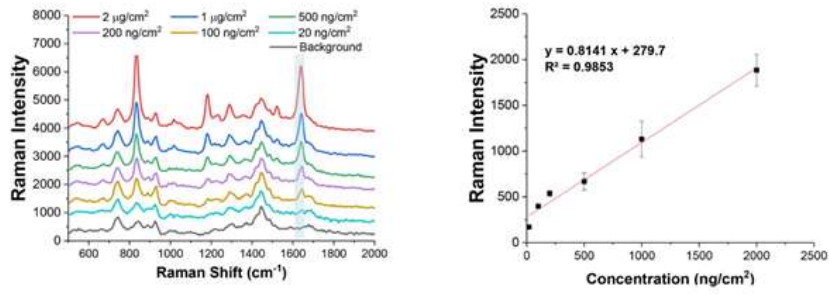
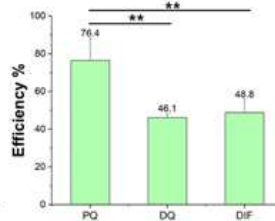
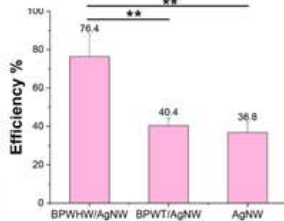
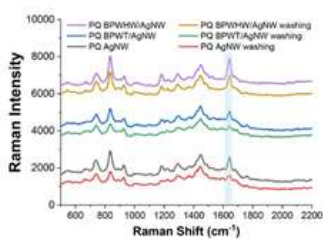


그림 2-63. 박테리오파지 표면개질 SERS기판의 Paraquat 농약 검출 한계

- 박테리오파지가 표면개질된 SERS기판을 이용한 농약 선택성 실험을 실시하였음. 박테리오파지가 표면개질된 은나노선 기판, 농약 선택성이 없는 박테리오파지가 표면개질된 은나노선 기판, bare 은 나노선에 대해 paraquat 농약 용적 후 washing 전/후 라만신호를 비교한 결과 WHW sequence를 발현하는 박테리오파지 기판 표면에서만 paraquat신호가 78% 정도 남아있었음.

<박테리오파지 표면개질 SERS기판의 선택성 테스트>



<라만 매핑 결과>

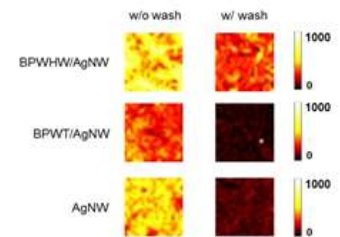


그림 2-64. 박테리오파지 표면개질 SERS기판의 농약 선택성 확인 결과

- Bipyridilium 계 농약 Diquat, Difenzoquat에 대한 선택성 실험을 진행한 결과 WHW sequence발현 박테리오파지는 50 %이하의 선택성을 나타내었음.
- 라만 매핑을 통한 기판상 10,000 point의 라만측정 결과 WHW sequence를 발현하는 박테리오파지 수용체가 washing 후에도 paraquat신호를 강하게 나타냄을 확인하였음.
- 박테리오파지의 발현 아미노산 sequence는 유전자 engineering기술을 이용하여 조절할 수 있으므로 다양한 농약을 선택적으로 검출하는 수용체 및 SERS기술 융합을 시도할 수 있을 것으로 기대함.

(2) 협동연구기관1 (부산대학교)

○ 선택성이 높은 기능성 박테리오파지와 SERS기관 결합 및 유해물질 검출한계 분석

- 표면 플라즈몬 공명 방법을 이용하여 박테리오파지와 유해물질 간의 결합역학상수를 구하여 선택성 지표를 정량화.
- 개발된 유해물질 선택성 박테리오파지를 SERS기관과 융합평가하고 합성 조건을 최적화
- 최초 제안서에는 SPR (surface plasmon resonance) 측정 방법을 통해 박테리오파지의 binding affinity를 측정하는 것이 목표였음. 그러나 파지 필름의 경우 수용성이기 때문에 액체에 노출되었을 때 구조가 망가지는 어려움이 있으며 물 분산 물질에 대하여 사용하는데 적합하지 않음.
- SPR 방법은 필름의 굴절률 변화를 바탕으로 binding affinity를 측정하기 때문에 파지 필름에 나타나는 굴절률 변화는 큰 오차를 가져옴. 실제로 파지 필름으로 SPR 측정을 수행하면 지속적으로 변하는 파지 필름의 상태 때문에 정밀한 측정에 한계가 있음을 확인
- 이를 극복하기 위해 용액 상태에서 두 분자 사이의 흡착 거동을 정확히 측정 가능한 ITC (isothermal titration calorimetry: 등온적정열량계)를 사용하여 binding affinity를 얻어내는 것으로 계획을 수정함.

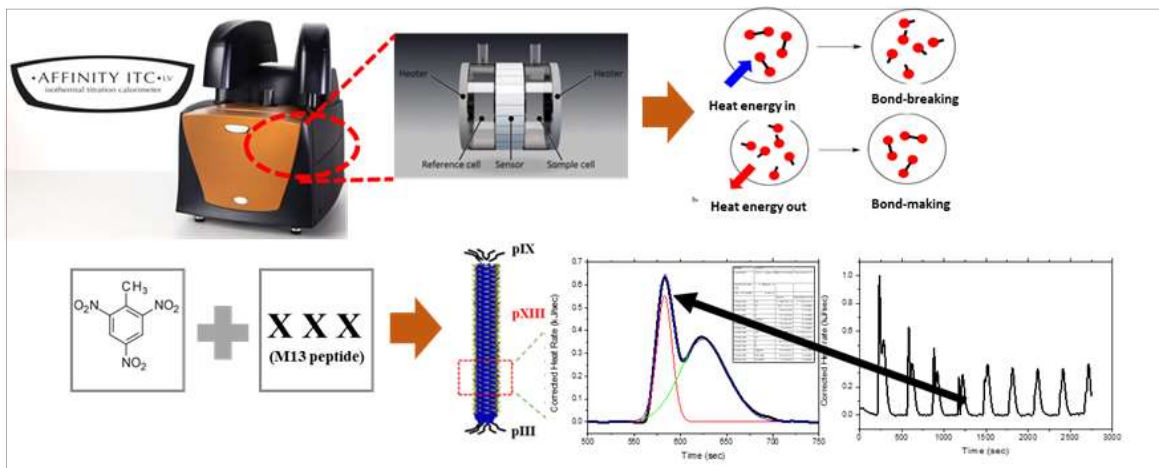


그림 2-65. 등온적정열량계를 통한 결합력 확인 모식도

- ITC는 용액 상태에서 직접적으로 열량 변화를 통해 흡착 거동을 측정하기 때문에 더 직접적이며 정확함.
- ITC측정 방법의 원리는 다음과 같음. 물질과 물질이 흡착 거동에 의해 안정화 되는데 그 값을 binding affinity라 부름. 두 물질이 흡착하여 안정화되면 전체 에너지가 감소하기 때문에 반드시 에너지를 방출해야 함. 이 때 분자-분자 상호작용에서는 에너지를 방출할 때 열대로 방출하기 때문에 열량계를 사용하면 분자-분자 상호작용 특성을 분석할 수 있음, 반대로 분자-분자 결합이 깨져서 분리될 때는 외부에서 에너지를 끌어와야 하기 때문에 흡열 반응이 나타남.

- Paraquat과 Diquat에 선택적으로 흡착하는 파지 수용체의 binding constant를 ITC로 측정하였음.
- p3에 SPPWPPRP 기능성 펩타이드가 탑재된 기능성 파지를 개발하여 SPPWPPRP 기능성 파지와 PQ, DQ, DIF 농약 사이의 binding affinity를 ITC를 통해 측정하면 PQ 및 DQ와는 선택적으로 반응함.

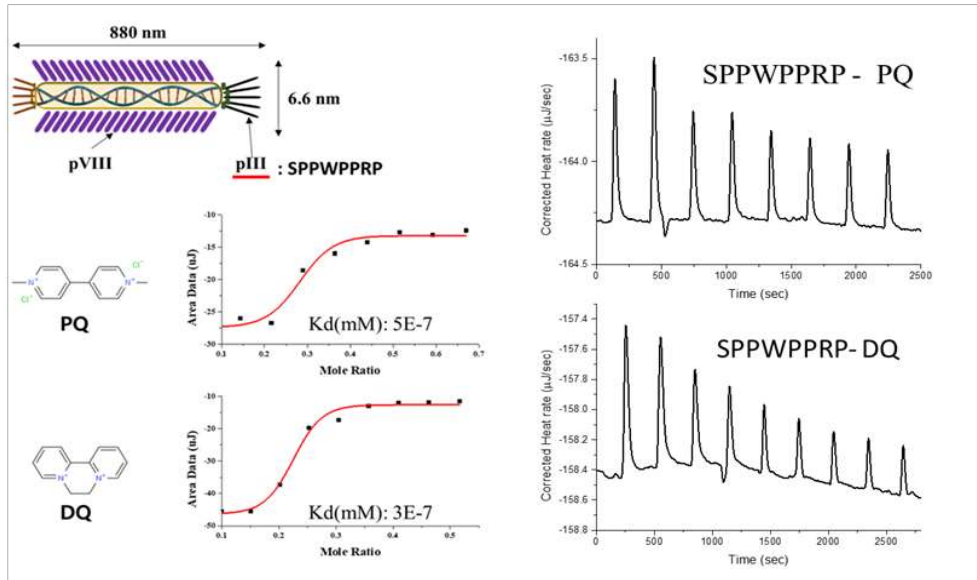


그림 2-66. SPPWPPRP 파지 수용체의 PQ, DQ에 대한 ITC결과

- 선택적 반응은 열량 변화 그래프에서 주로 발열 반응을 나타내는 것으로 확인 가능함. 처음 큰 발열반응이 관찰된 이후 지속적으로 반응열이 줄어들다가 마지막에는 반응열이 안정화됨을 확인함.

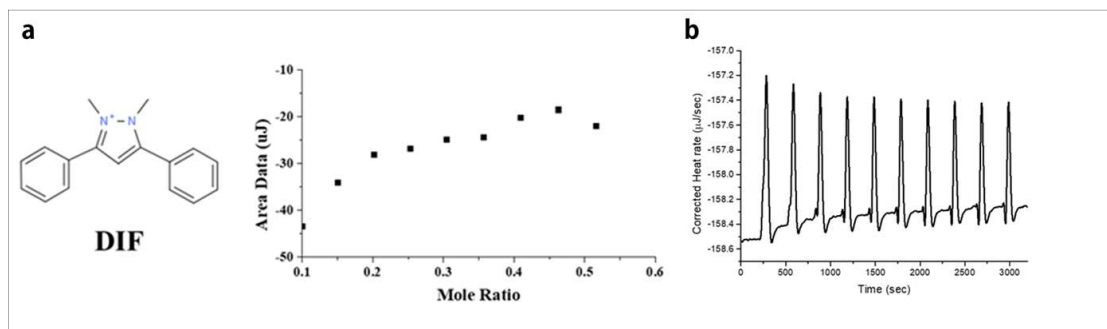


그림 2-67. SPPWPPRP 파지 수용체의 DIF에 대한 ITC결과

- DIF와는 비선택적으로 반응하는 것을 확인함, 이는 ITC결과상 열량이 안정되지 못하고 흡열반응과 발열반응을 반복하는 것으로 확인 가능함. 이는 대상 물질과 기능성 파지가 안정적인 결합을 이루지 못하고 흡착과 분리를 반복적으로 나타내는 것으로 이해 가능함.

| | PQ | DQ | DIF |
|-----------------------|------|------|-----|
| Binding affinity (Kd) | 5E-7 | 3E-7 | - |

그림 2-68. SPPWPPRP 기능성 파지와 대상 농약 사이의 binding affinity 값

- 실험 결과들을 바탕으로 보면 SPPWPPRP 기능성 파지는 PQ, DQ와 선택적으로 흡착하나 DIF와는 비선택적 반응을 나타냄.
- SPPWPPRP 기능성 파지 흡착 반응의 선택성을 검증하기 위해 기능성 파지를 SERS 기판에 소량 첨가하여 대상 농약에 대한 라만을 측정함.
- 기능성 파지가 없으면 측정이 불가능한 낮은 농도에서 (80 ng/cm²) PQ, DQ, DIF의 라만 신호를 분석하면 binding affinity가 비슷한 PQ, DQ는 높은 라만 신호 세기를 보여주지만, DIF는 상대적으로 매우 낮은 신호 세기를 관찰할 수 있음.

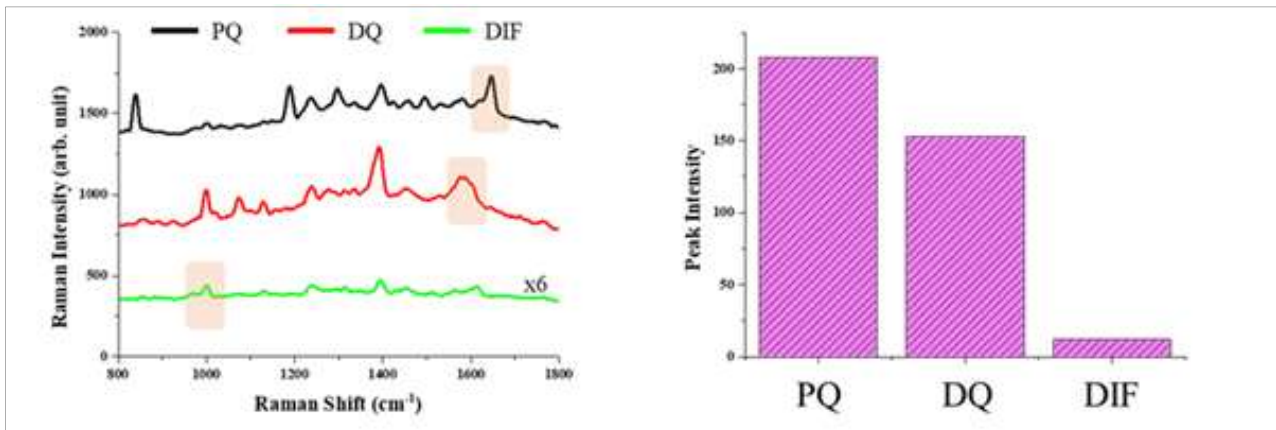


그림 2-69. SPPWPPRP 기능성 파지를 사용한 SERS 측정

- 본 연구에서는 파지디스플레이법으로 개발된 SPPWPPRP에서 3개 시퀀스를 분리하여 PWP, PRP, WRP 이렇게 3개의 기능성 파지를 개발함, 이를 ITC 법을 사용한 binding affinity 측정을 수행한 결과 PRP 그리고 WRP는 대상 물질에 대한 선택성이 나타나지 않아 사용될 수 없음을 확인함.
- Binding Affinity의 경우 SPPWPPRP 파지 수용체는 DQ에서 강한 결합을 나타내지만, PWP 파지 수용체의 경우 DIF에서 더 강한 결합을 나타냄을 확인함.
- 흥미롭게도 SPPWPPRP 기능성 파지는 PQ와 DQ 측정에 사용할 수 있고, PWP 기능성 파지는 DQ, DIF 측정에 사용할 수 있음.
- Binding affinity 측정을 통해 2종의 파지 수용체로 3종 농약 (PQ, DQ, DIF)을 선택적으로 분간 가능함을 확인함.

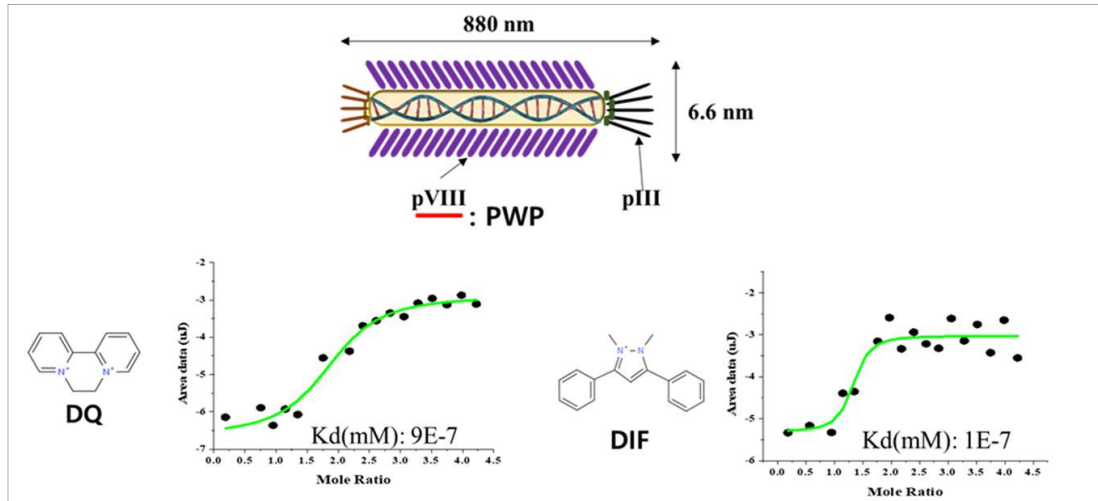


그림 2-70. PWP 파지 수용체의 DQ, DIF에 대한 ITC결과

| | PQ | DQ | DIF |
|-----------------------|----|------|------|
| Binding affinity (Kd) | - | 9E-7 | 1E-7 |

그림 2-71. PWP 기능성 파지와 대상 농약 사이의 binding affinity 값

○ 유해물질 종류에 따른 분자각인 고분자 중합체 선정 및 설계

- 분자각인고분자 기반의 전처리 시스템 성능 평가를 위해 TBZ 50 ppm 표준용액과 농산물 matrix 용액(파프리카)에 25ppm TBZ를 스파이킹한 실제 시료의 선택적 분리 성능 실험을 진행함.
- 액체 크로마토그래피의 최적화 조건(그림 2-72))과 분자각인 고분자 전처리 시스템 사용 시 최적화된 용액의 조건을 적용하고(그림 2-73), 전처리 순서도 (그림 2-74)에 따라 실험을 설계하였으며 이와 같은 실험 방법으로 비각인 고분자 카트리지도 함께 실험을 진행해 분자각인 고분자의 각인 능력을 확인함.

| | Type | Condition |
|----------|------------------|---|
| LC | Column | Athena C18-WP(pH1.5-10) 100Å, 4.6mm x 150mm, 5µm |
| | Column condition | 40 °C |
| | Flow rate | 1.0 mL/min |
| | Mobile phase | Methanol : Water : Acetic acid (1 : 1 : 0.001) |
| | Injection Vol. | 10 µℓ |
| Detector | Range | 290 nm UV extinction |

그림 2-72. 액체 크로마토그래피 측정 조건

| | Step | Solvent | Volume |
|---|--|------------------------------|----------------|
| 1 | Activation of MIP cartridge | Acetic acid : Methanol (1:1) | 2 mL x 3 times |
| 2 | Passing sample through MIP | Standard solution | 2 mL x 1 times |
| 3 | Washing TBZ-captured MIP | Acetonitrile | 2 mL x 1 times |
| 4 | 1st elution of TBZ from the TBZ-captured MIP | Methanol | 2 mL x 1 times |
| 5 | 2nd elution of TBZ from the TBZ-captured MIP | Methanol | 2 mL x 1 times |

그림 2-73. 분자가인 고분자 전처리 시스템의 단계별 사용 용액 및 사용량

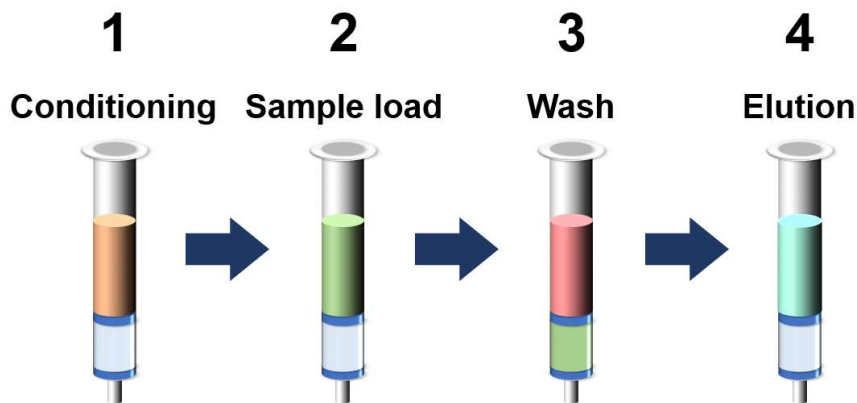


그림 2-74. 분자가인 고분자 전처리 순서도

- 시료를 주입하기 전 고분자의 binding site를 활성화하여 분자인식을 높이고, 고분자 내 잔여 물질을 제거하여 interference를 최소화하기 위해 conditioning 단계를 진행함.
- 시료(TBZ 50 ppm 표준용액과 실제 시료)를 주입한 후 분자가인 고분자 카트리지를 통과시키면 분석대상 물질인 TBZ는 분자가인 고분자 내에 각인이 되고 그 외 물질은 고분자에 흡착이 되거나 일부는 통과함. 분자가인 고분자를 통과한 용액을 크로마토그래피 결과를 통해 확인하였으며 분자가인 고분자를 통과한 용액은 TBZ 피크가 나타나지 않았으나, 비각인 고분자를 통과한 용액은 3.8분에서 TBZ의 피크가 나타남 (그림 2-75 (a), 2-76 (a))
- 분자가인 고분자에 흡착된 물질을 씻어내기 위해 acetonitrile 용액을 통과시켜 분자가인 고분자를 헹굼. 시료 주입 단계와 같은 결과로 분자가인 고분자를 통과한 용액은 TBZ 피크가 나타나지 않았으나, 비각인 고분자를 통과한 용액은 3.8분에서 TBZ의 피크를 확인함(그림 2-75 (b), 2-76 (b)).
- MeOH 용액을 이용해 각인된 TBZ를 용리시켰으며, 같은 방법으로 두 번 용리하여 통과된 용액들을 액체크로마토그래피로 측정하였으며, 분자가인 고분자를 통과한 용액의 크로마토그램에서 TBZ의 피크가 나타났으며, 비각인 고분자를 통과한 용액에서도 TBZ의 피크를 확인 (그림 2-75 (c, d), 2-76 (c, d)).
- TBZ 50ppm 표준용액으로 실험한 액체 크로마토그래피의 peak area를 계산한 결과, 첫 번째 용리액에서 분자가인 고분자는 97%, 비각인 고분자는 39%의 수득률을 확인함.

- 실제 농산물 matrix로 실험한 액체 크로마토그래피의 peak area를 계산한 결과, 첫 번째 용리액에서 분자각인 고분자는 91%, 비각인 고분자는 21%의 수득률을 확인함.

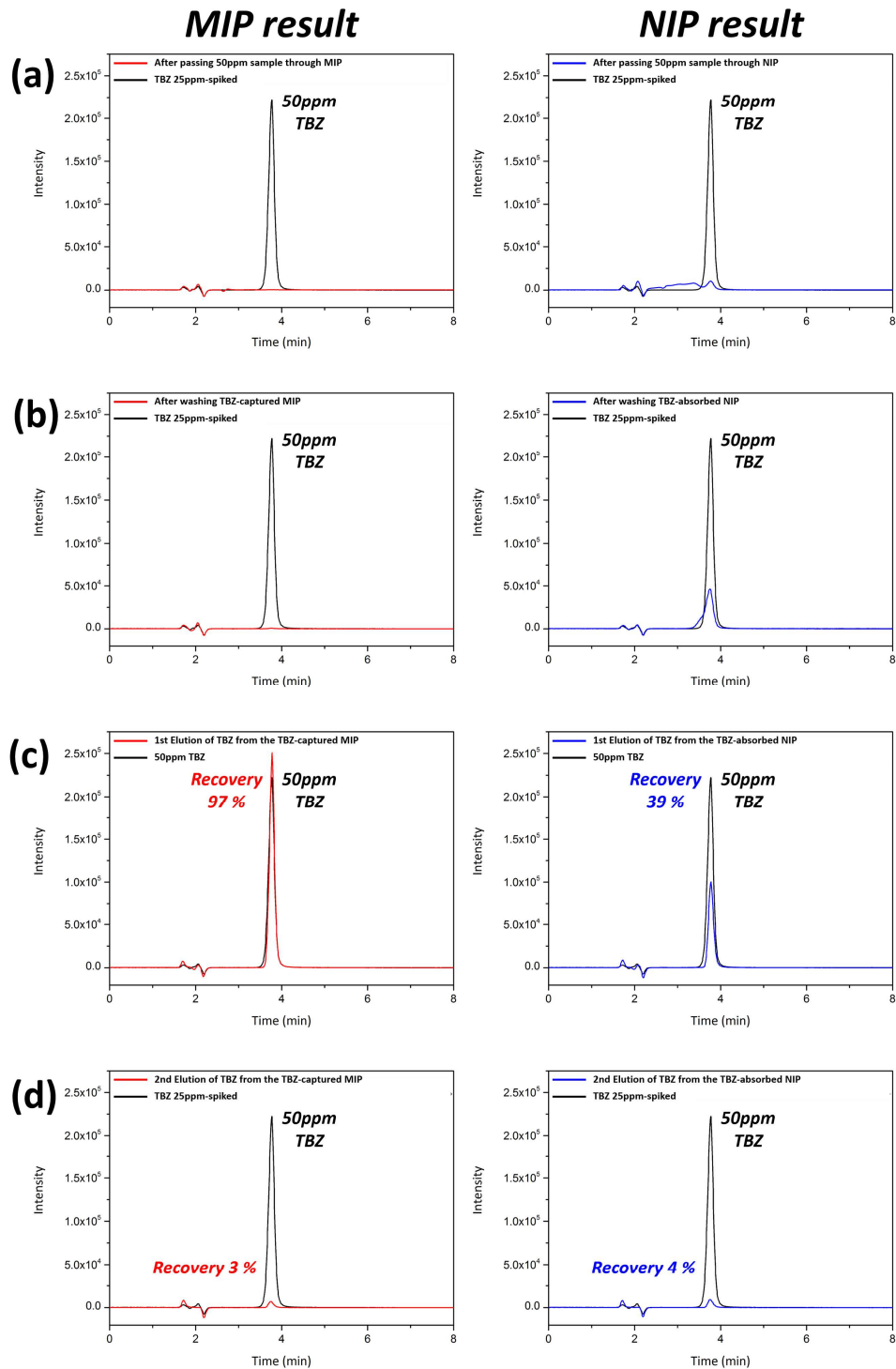


그림 2-75. 표준용액을 통과시킨 분자각인 고분자 카트리지(왼)/비각인 고분자(오)의 크로마토그램 결과. 위에서 아래로 시료 주입, 행균, 용리 단계를 통과한 용액을 측정함

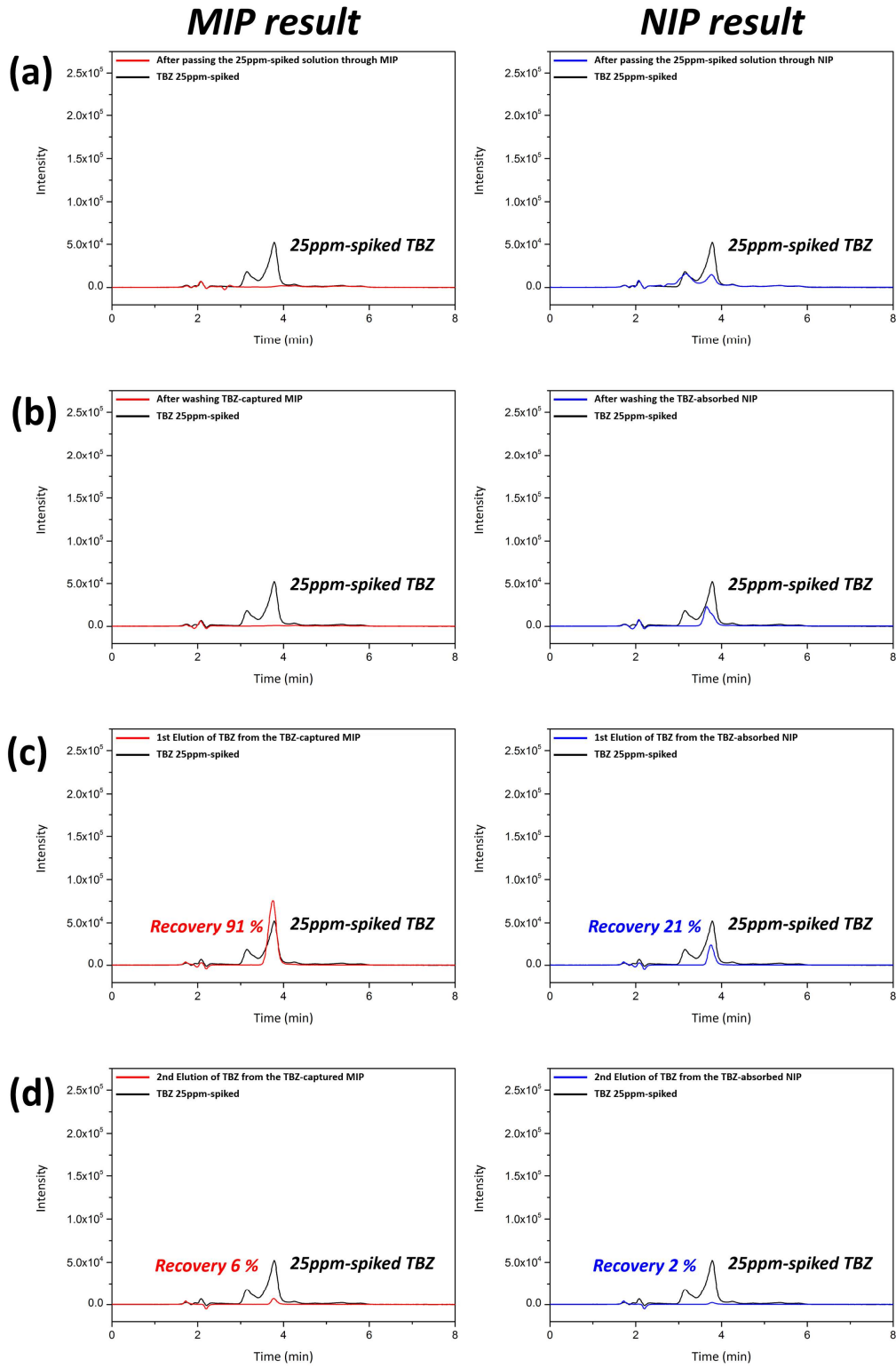


그림 2-76. 실제 시료를 통과시킨 분자각인 고분자 카트리지(왼)/비각인 고분자(오)의 크로마토그램 결과. 위에서 아래로 시료 주입, 행굼, 용리 단계를 통과한 용액을 측정함

- 분자각인 고분자 카트리지를 통과한 용액들로 표면증강라만을 측정하였으며, 액체크로마토그래피의 결과와 비교할 때 라만 측정 결과가 일치함을 확인함.

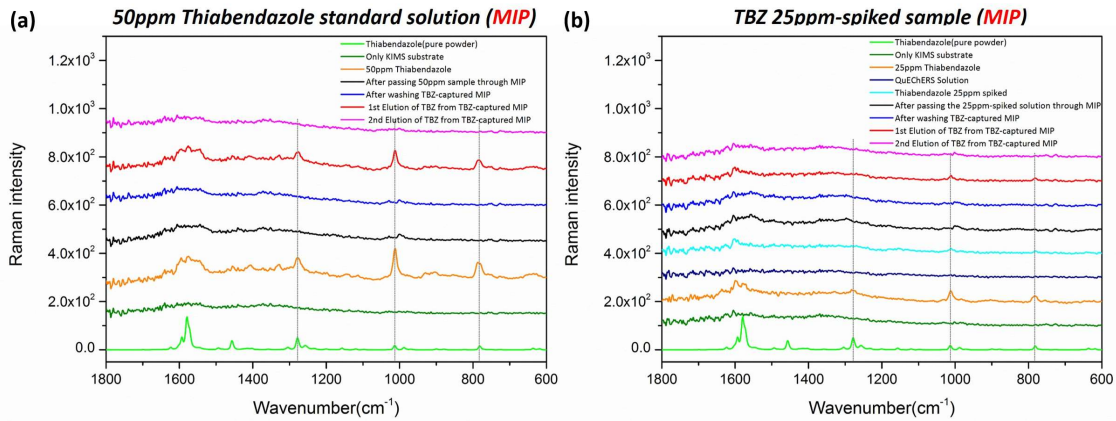


그림 2-77. 표(a)와(b)는 각각 표준용액 및 실제 샘플을 이용하여 분자각인 고분자를 통과한 용액들을 SERS 측정한 라만 스펙트럼

(3) 협동연구기관2 (나노스코프시스템즈)

○ 시스템 통합 하드웨어 플랫폼 제작 및 하드웨어 시그널 취득 성능 검증

- 스트립 스캐너부가 일체화, 스트립 장착 후 자동으로 관심 영역 좌표를 스캔 및 유효 시그널을 제공하는 통합 하드웨어 구현.
- 스트립 스캐너부는 스텝 모터 구동에 의한 1축 스캔을 기본으로 하고 필요시 미리 스캔에 의해 스펙트럼 취득 영역을 확장.

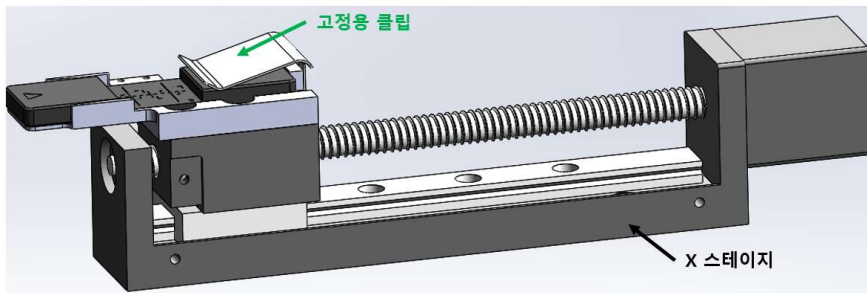


그림 2-78. 안정적인 시스널 취득을 위한 샘플 홀더 및 스캐닝 스테이지 개발

○ 스트립 스캐너 구동과 라만 스펙트럼의 취득이 동기화되고 기본적인 맵핑을 할 수 있도록 컨트롤러 구성, 유해 물질 검출을 위한 특징 판별 알고리즘을 구축

- 모든 전원은 노트북 전원으로부터 활용할 수 있도록 전력 최적화된 컨트롤러부 구성.
- 결과까지 원클릭으로 진행될 수 있는 현장용 프로그램을 개발, 일반인도 사용할 수 있도록 개발.
- 제작된 기준 샘플 이외에 여러 가지 샘플 신호를 획득하고, 타 라만 분광 시스템을 이용한 결과와 비교하여 개발된 현장 검출 시스템의 성능 평가 수행.
- 다음의 기본 구성도를 갖는 분광시스템을 구축. 개선 사항을 반영한 2차 프로토타입 제작



그림 2-79. 휴대용 PC기반 시스템 운용 플로우 차트

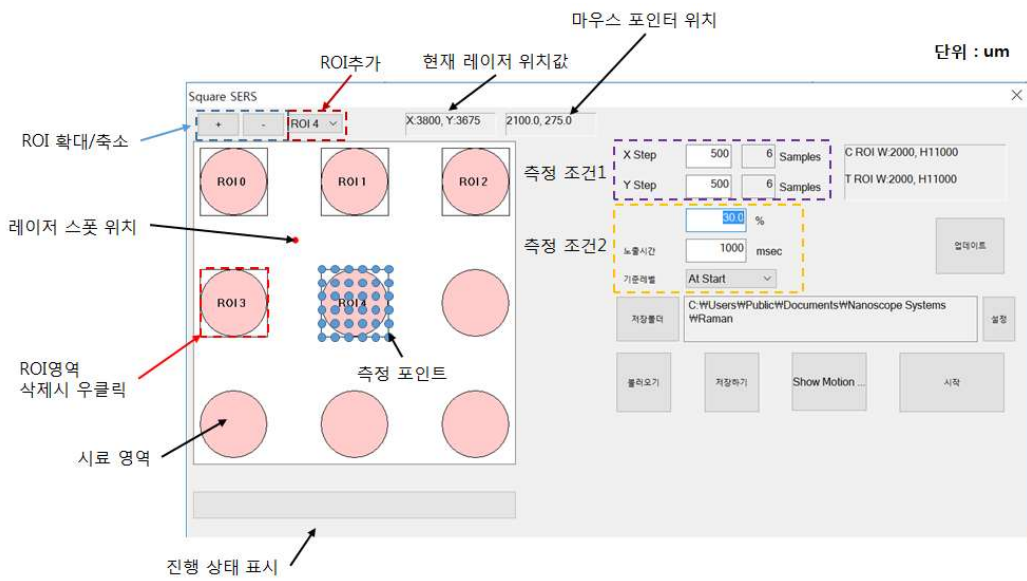


그림 2-80. 유저 인터페이스 화면

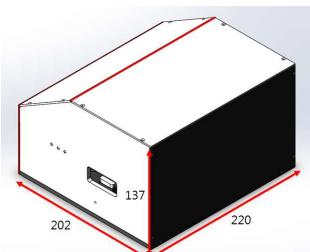
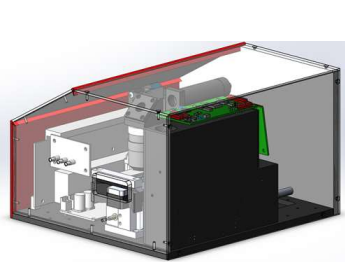


그림 2-81. 2차 프로토타입

(4) 위탁연구기관1 (중앙대학교)

○ 표면 플라즈몬 증폭 필라 기판을 이용하여 3종 곰팡이 독소에 대한 고감도 라만 면역 분석법 개발

- 나노 필라기판과 SERS 분석법을 이용하여 곰팡이 독소 3종(아플라톡신, 오크라톡신, 푸모니신)에 다중 검출을 수행함. 먼저, 아플라톡신과 푸모니신에 대한 최적의 항원/항체를 찾기 위하여, 경쟁면역 방법으로 각각에 대한 ELISA assay를 수행함. 이 결과 아플라톡신과 푸모니신에 대한 최적의 항원/항체를 확보하였으며, 이에 대한 ELISA 정량 곡선을 산출한 결과 각각 0.84, 0.7 ppb의 검출한계를 얻음.

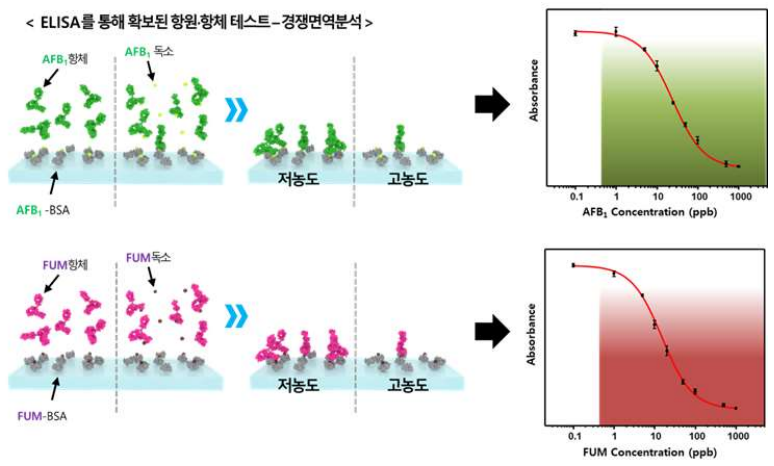


그림 2-82. 아플라톡신, 푸모니신 2종 곰팡이 독소에 대한 경쟁면역 ELISA assay 개념도와 정량 곡선

- 곰팡이 독소 3종 오크라톡신, 아플라톡신, 푸모니신을 동시에 검출하기 위해 나노필라 어레이 기판 위에 각 라인 별로 각각 해당 곰팡이 독소-BSA 복합체를 고정하고 다음 3종 곰팡이 독소들에 대한 면역분석을 수행함.

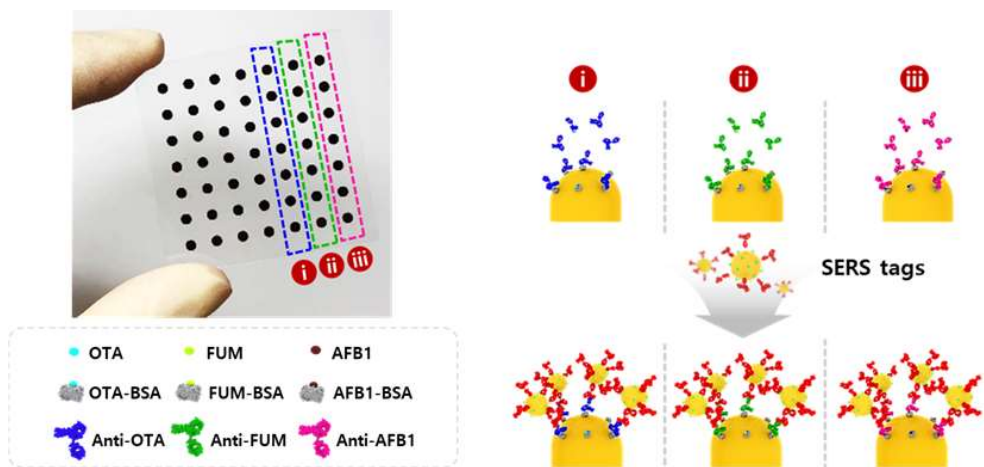


그림 2-83. 3종 곰팡이독소 동시 면역 분석 방법

- 3종 곰팡이독소에 대한 다중 면역분석을 위하여 각 곰팡이 독소 농도별 라만 매핑 이미지와 라만 스펙트럼을 측정하였음. 나노필라 기관에서 경쟁면역분석반응 결과로 나타나는 라만 신호 세기는 위에서 언급한 바와 같이 곰팡이 독소의 농도에 반비례하기 때문에 3종 곰팡이 독소에 대하여 고농도에서 저농도로 갈수록 라만 신호가 점점 강해지는 경향성을 확인하였음. 이러한 경향은 라만 매핑이미지에서도 뚜렷하게 관측되었으며, 정량 곡선을 통해 오크라톡신, 푸모니신, 아플라톡신의 검출한계는 각각 0.005, 0.005, 0.006 ppb로 검출한계 목표치인 1 ppb, 0.1 ppm, 1 ppb 보다 약 1000배 가까운 좋은 민감도 결과를 얻음. 즉, 빠른 라만 매핑 기술을 이용하여 3종 곰팡이 독소를 빠르게 육안으로 확인할 수 있는 분석 기술을 개발하였음.

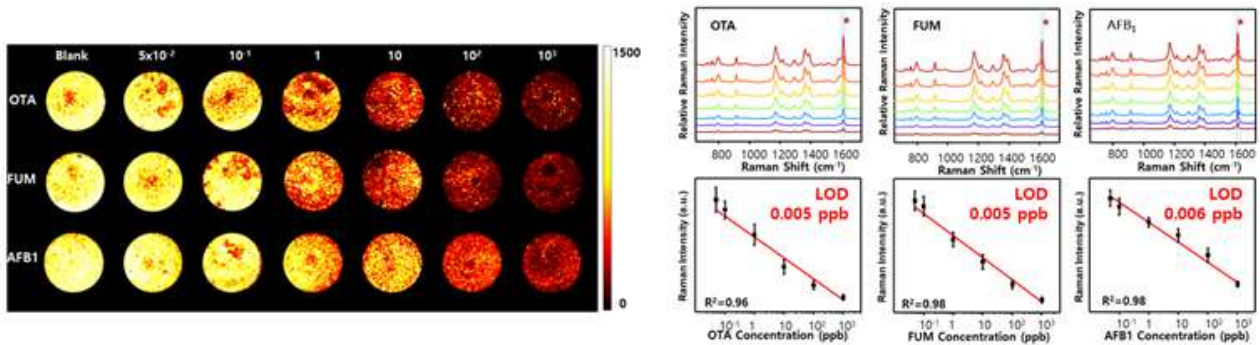


그림 2-84. 3종 곰팡이 독소에 대한 다중-면역 분석 결과. 농도별 곰팡이독소 라만 매핑이미지, 농도별 곰팡이 독소 라만 스펙트럼, 곰팡이 독소 정량 곡선

- 본 라만 이미징 기반의 면역분석법의 선택성 평가를 위하여 각 곰팡이 독소를 서로 다른 농도로 혼합하여 3가지 유형의 샘플을 만들고 각기 다른 곰팡이 독소-BSA 복합체가 고정화된 기관에서 면역 분석을 수행함. 아래의 그림에서 보듯이 본 라만 이미징 분석법은 각 곰팡이 독소들에 대하여 우수한 선택성을 보여줌. 본 연구 결과는 2019년 Small 저널에 표지 논문으로 보고 됨.

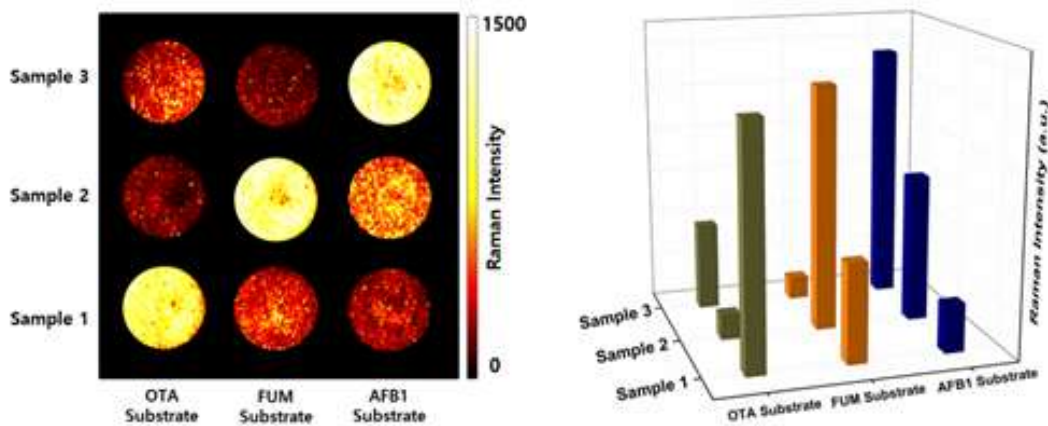


그림 2-85. 3종 곰팡이 독소들에 대한 선택성 평가

(5) 위탁연구기관2 (국립농산물 품질관리원 시험연구소)

○ 농산물 검체에 라만분광분석결과 비교분석 및 실증평가 수행

- 라만분광분석과 농산물 유해물질 분석 결과의 비교, 검토
- 기존 잔류농약/곰팡이독소 분석을 위하여 사용되는 정밀실험 분석법(질량분석) 결과와 선택성, 민감도, 정확성, 검출시간 등의 비교 검토를 통하여 개발 장비의 효용성 평가함.

○ 농산물 검체시료 적용분야 확대방안 마련

- 농산물 전처리를 위하여 널리 사용되는 Quechers 전처리 방법을 검체에 적용하고 제조된 샘플은 기관에 제공함.
- 유기용매(ACN)를 사용하여 target 성분을 추출하고 상등액을 취하여 분석을 위한 전처리 샘플로 사용.
- 샘플 matrix에 의하여 검출 민감도가 1/10으로 저해됨.
- 검출 민감도 향상을 위한 전처리로 효소반응 이용 등 도입 검토.
- 기관에서 해당 샘플을 사용하여 라만분광 분석 결과를 검토하고 개선방안 모색.

라. 4차년도

1) 개발 목표

- 주관연구기관(재료연구소) : 초고감도 분자센서 시스템 현장검증 및 검출성능 최적화
- 협동연구기관 1(부산대학교) : 다중 동시분석을 위한 통계기반 정량분석 알고리즘 개발
- 협동연구기관 2(나노스코프시스템즈) : 휴대 및 편의성 강화된 현장 검출용 시제품 제작
- 위탁연구기관 1(한양대학교) : 휴대용 라만리더기와 독소검출용 집적화 어레이의 통합
- 위탁연구기관 2(농관원 시험연구소) : 농산물 유해물질 SERS검출시험 인증평가 실시

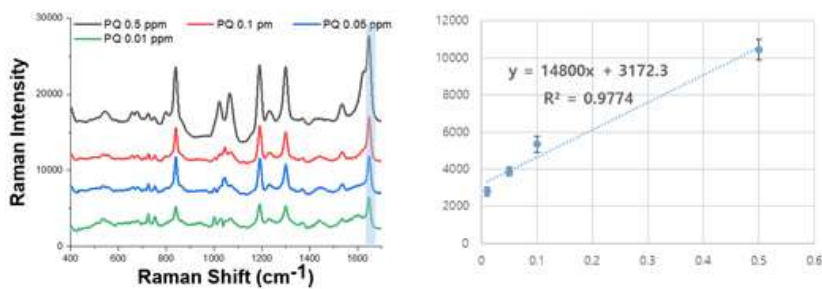
2) 내용 및 결과

(1) 주관연구기관 (재료연구소)

○ 농작물 내 잔류농약 현장측정 및 시험인증 평가

- 본 과제에서 목표로한 농약의 검출감도를 다음과 같이 달성함. 농약의 화학구조 특성에 의해 라만 레이저 785 nm와 633 nm 각각에 더 검출이 효과적으로 나타나는 농약을 구분 하였음. Paraquat, Diquat, Difenzoquat, Azinphos-methyl의 경우 785 nm 레이저에 강하게 신호를 나타내었고, Parathion-methyl, Thiabendazole, Bensultap (Nereistoxin계), Mancozeb 의 경우 633 nm 레이저에서 강하게 신호를 나타내었음.
- 본과제를 수행하면서, 처음 제시하였던 methamidophos의 경우 고유 라만 신호가 매우 작아 연차별 보고서에 농약 타겟 변경을 요청하였고, 국립농산물 품질관리원으로부터 Mancozeb 농약을 추천 받아 검출 농약에 포함하였음.
- 본 과제에서 기 목표로 설정하였던 검출감도 목표치 0.01 ppm을 모두 성공적으로 달성하였음.

<Paraquat, LOD: 0.01 ppm>



<Diquat, LOD: 0.01 ppm>

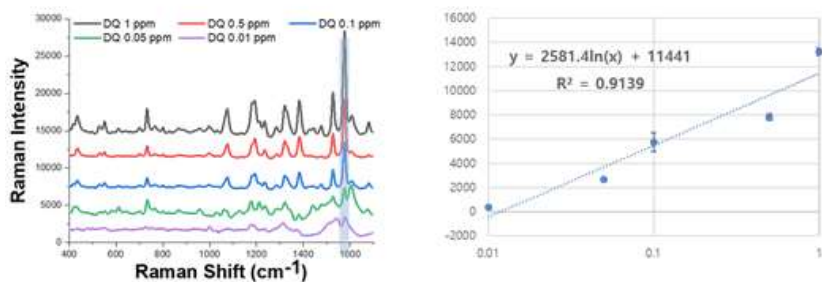
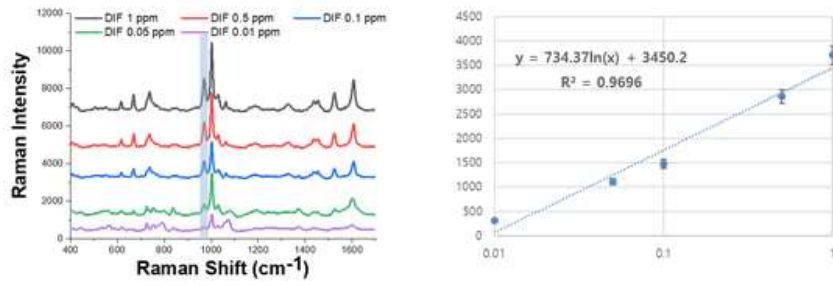


그림 2-86. Paraquat, Diquat 라만 검출 결과

<Difenzoquat, LOD: 0.01 ppm>



<Azinphos-methyl, LOD: 0.01 ppm>

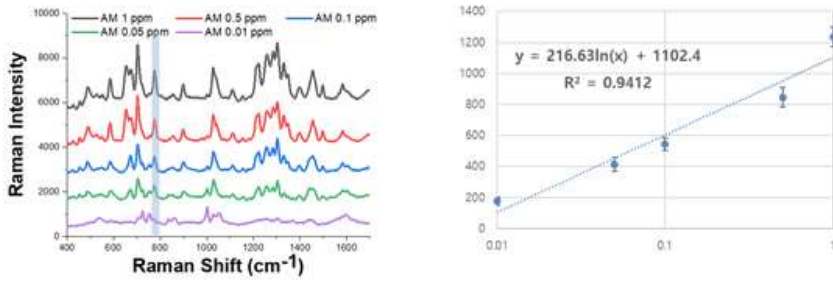
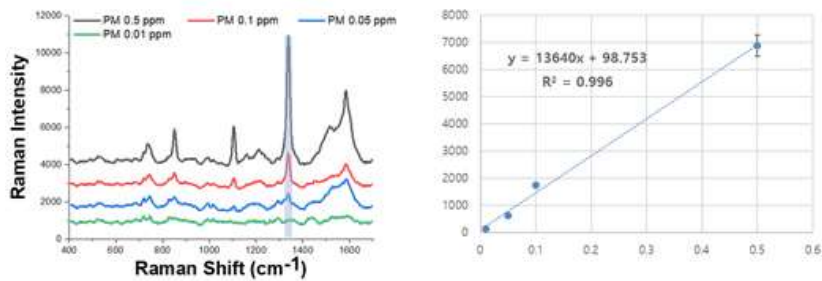


그림 2-87. Difenzoquat, Azinphos-methyl 라만 검출 결과

<Parathion-methyl, LOD: 0.01 ppm>



<Thiabendazole, LOD: 0.01 ppm>

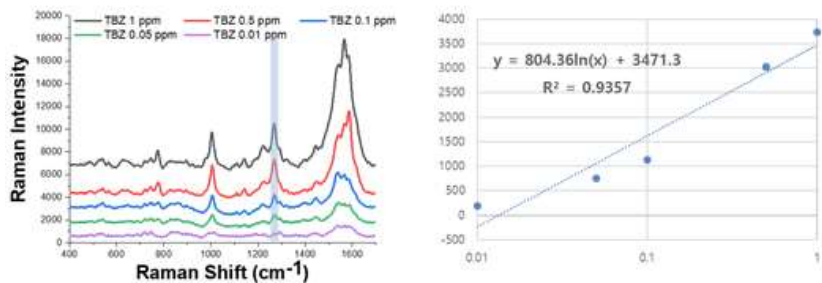
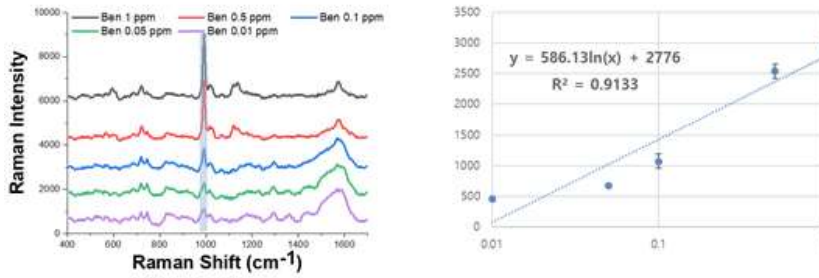


그림 2-88. Parathion-methyl, Thiabendazole 라만 검출 결과

< Bensultap, LOD: 0.01 ppm >



< Mancozeb, LOD: 0.01 ppm >

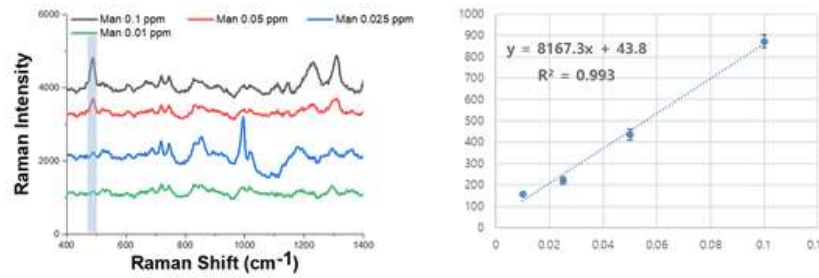


그림 2-89. Bensultap, Mancozeb 라만 검출 결과

- 라만 검출 결과는 표준 시료를 이용한 농도별 검출 결과임. 객관성 확보를 위해 동일 시료를 이용하여 LC/MS법과 비교하였음. Parathion-methyl, Azinphos-methyl, Paraquat, Diquat, Thiabendazole에 대해 농도별 standard curve를 얻고, 1 ppb까지 검출 가능함을 확인하였음. 동일 시료에 대한 농도 결과가 일치함을 확인함으로써 라만 측정 결과의 객관성을 확보함. 나머지 3종 농약에 대해서는 추가적인 LC/MS분석 법 개발 후 실시할 예정임. 특히, Bensultap, Mancozeb의 경우 개별 분석법 개발 대상 농약들에 해당함.

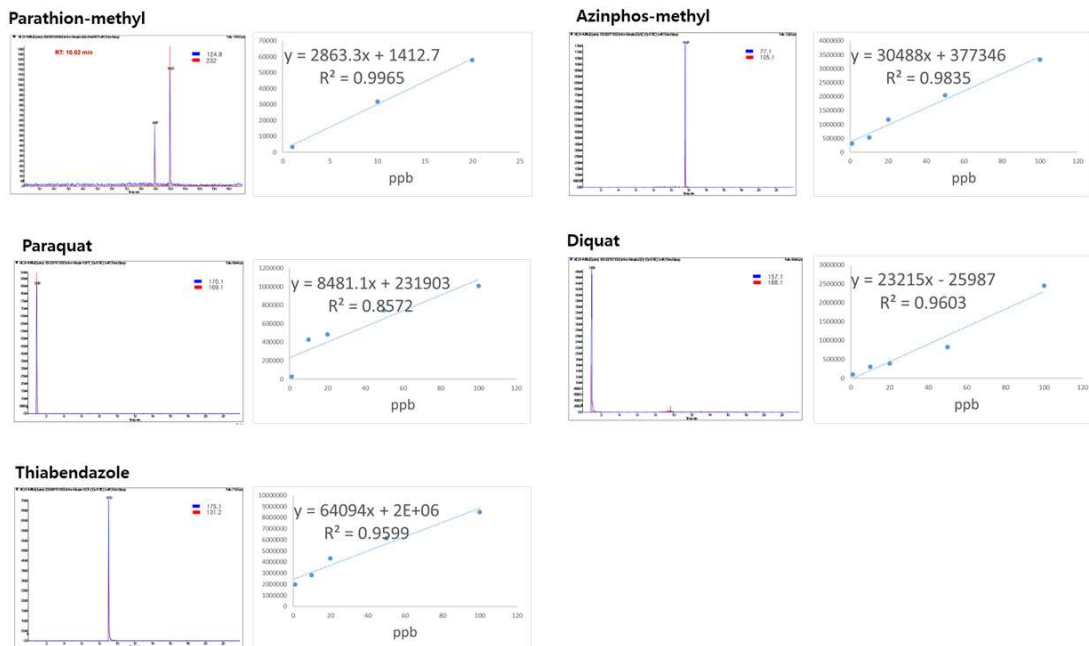


그림 2-90. 라만 측정 표준시료를 이용한 LC/MS 비교 평가

- 개발 표면증강라만산란 기관 소재와 휴대용 라만리더기를 현장측정 시험 평가를 위해 국립농산물 품질관리원 시험연구소에 방문하여 기기 시연을 실시하였음, 실 농산물 사과에 대해 초분자 표면개질 SERS기관의 라만검출 성능을 평가하였음.

<국립 농산물 품질관리원 시험연구소 방문, 사과를 이용한 개발 기술 시연회>



참석기관: 시험연구소 안전성분석과, 재료연구소, (주) 나노스코프시스템즈

그림 2-91. 본 과제 개발 기술 현장 인증 평가 실시 사진

<KBS 호모사이언스 출연, 농산물 잔류농약 검출 기술 소개 >



망고 전처리 과정

센서칩 용적

SERS 측정

그림 2-92. 본 과제 개발 기술 시연 KBS 방송 홍보

- 본 과제 대상농약 8종에 대해 질량분석기로 검출 가능한 검출한계 (limit of detection; LOD) 와 개발한 SERS기술의 LOD, 식약처 잔류 허용기준 (Maximum Residue Limit; MRL) 을 비교하여 그림 2-93에 나타내었음.
- 질량분석기는 현재 국립농산물 품질관리원 시험연구소에서 잔류농약 성분 분석 및 정량 평가를 위한 방법으로 ppt 수준의 잔류농약을 검출할 수 있는 장점이 있음. 한편, 크로마토그래피-질량분석기는 고가의 장비로 크기가 크고, 사용 시 숙려된 전분 분석관이 필요한 단점이 있어 현장적용에 용이하지 않음.
- 본 과제를 통해 개발한 SERS 기관과 휴대용 라만기기를 이용하여 농약 검출한계 10 ppb 까지 잔류농약검출을 성공하였음. 질량분석기보다는 감도가 떨어지지만 현재 식약처 잔류 허용기준을 고려하였을 때 농산물 유통 현장에서 검출하기에는 충분한 감도를 나타내고 있다고 판단함.

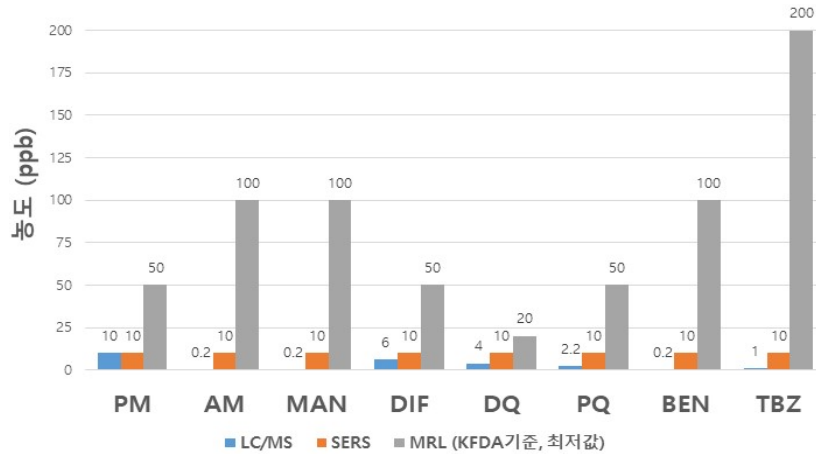
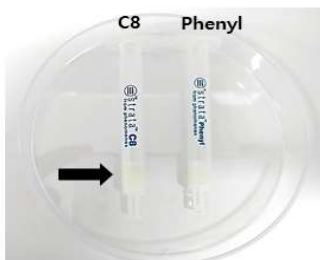


그림 2-93. LC/MS 및 개발 SERS기술 농약 검출 감도 비교

- 표면증강라만산란 신호는 표준기관의 공인성적을 받을 수 있는 기준과 기관이 없음. 농식품 유해물질 검출 목적의 표면증강라만산란 기관과 휴대용 라만분광기를 본 과제를 통해 세계 최초로 개발하였기 때문에 기술 인증에 대한 국내기준 도입이 선행되어야 함.
- 본 기술 제품화 출시를 위해 국내 인증 가능 방안을 지속적으로 모색하겠음.
- 재료연구소는 식품공전에서 권장하는 LC/MS용 QuEChERS법 전처리를 이용하여 동일하게 라만분석에 적용하였으나 감도가 10배 이상 감소하는 것을 확인하였고, QuEChERS법 또한 전처리에 수십분 정도 소요되어 현장 형 전처리법에는 적합하지 않다고 판단하였음.
- 상용화 되어 있는 16종의 Column을 이용하여 농약의 전처리 회수율을 확인하였고, 최종적으로 Column 구성성분이 C8, Phenyl로 이루어진 레진의 경우 농약 전처리에 사용 가능함을 확인하였음.
- 농약의 C8, Phenyl Column 주입 전/후의 흡광 크기 비교를 통해 제시된 표와 같은 회수율을 얻게 되었음. 수용성 농약인 Paraquat, Diquat, Difenzoquat의 경우 회수율이 50% 이하로 감소하고 사과 matrix에 혼합하여 걸러낸 경우 검출이 불가능 할 정도로 수율이 감소하였음. 수용성 농약의 경우 QuEChERS법에서도 용매를 통한 분리가 쉽지 않아 회수율이 낮은 것으로 알려져 있음. 한편, 유기계 농약인 Parathion-methyl, Azinphos-methyl, Thiabendazole의 경우 ACN에 분산하여 수율을 계산하였고, 두 종의 column 모두에서 100%의 회수율, 사과 matrix와 혼합된 경우에도 100% 효율을 나타내었음. 결론적으로 유기계 농약의 경우 간편한 카트리지 형태의 전처리법을 도입할 수 있을 것으로 기대함.

<사과 Matrix의 전처리 후 column>



<흡광을 통한 컬럼 elution 후 농도 전후 비교 - 효율%>

| Pesticide | Phenyl | C8 | Apple Phenyl | Apple C8 |
|------------------|--------|-------|--------------|----------|
| Paraquat | 40 % | 27 % | 0 | 0 |
| Diquat | 40 % | 21 % | 0 | 0 |
| Difenzoquat | 20 % | 21 % | 0 | 0 |
| Parathion-methyl | 100 % | 100 % | 100 % | 100 % |
| Azinphos-methyl | 100 % | 100 % | 100 % | 100 % |
| Thiabendazole | 100 % | 100 % | 100 % | 100 % |

그림 2-94. 상용화 column을 이용한 전처리 키트 회수율 검증 결과

- 재료원은 국립농산물 품질관리원 시험연구소에 방문하여 농약 전처리 과정에 대한 교육을 받고, 상기 Column 이용 전처리법 보다 간편하면서 라만 분광법에 이용 가능한 형태의 전처리 법을 고안하였음.
- 농약은 화학 구조상 polarity에 따라 수용성과 비수용성 농약으로 나눌 수 있는데, 수용성 농약의 경우 기존 QuChERS법에서도 100% 전처리가 어려워 QuPPE 법을 사용함. 본 과제에서는, 유기계 농약의 경우 ACN 유기용매를 농약에 오염된 농산물 균질액에 넣고 섞은 후 농약의 용매에 대한 용해도 차이로 추출할 수 있음을 발견함. 이후 유기용매는 농산물에 존재하는 물보다 비중이 낮아 층 분리가 일어나고, 농약은 유기용매에 녹아 있어 추출이 가능함. 상층액 유기용매를 색소제거제에 넣어 라만 신호에 영향을 줄 수 있는 색소들을 제거하고, 다시 분리하여 라만을 측정하면 10분 내에 라만측정용 전처리를 실시할 수 있음.
- 수용성 농약의 경우 3차년도 결과에서 제시한 바와 같이, 초분자 Cyclodextrin을 표면개질된 SERS기판을 사용하면 전처리 없이 0.1 ppm 수준까지 농약이 검출 가능하므로 이를 사용하고자 함. 아래는 유기계 농약과 수용성 농약에 대해 전처리 법을 제안한 모식도를 나타내고, 농약에 오염된 사과를 예시로 작성하였음.

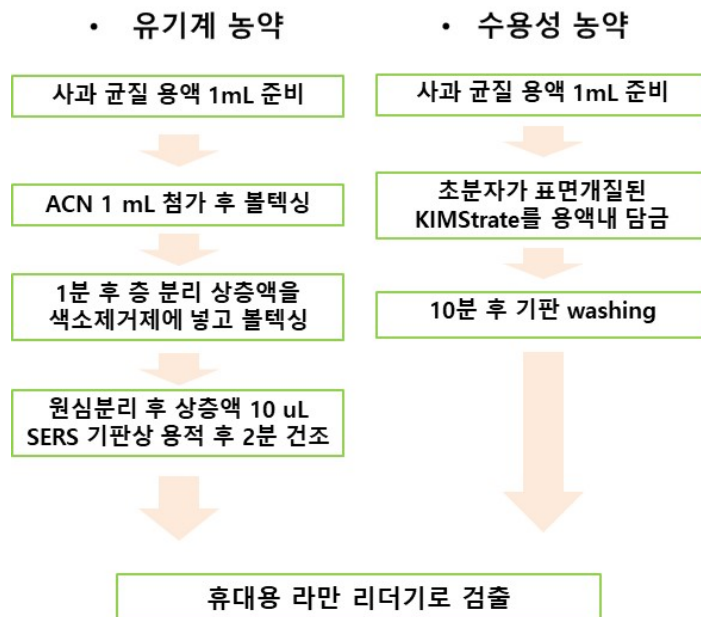


그림 2-95. 라만 검출용 농약 전처리 프로코틀 제안



그림 2-96. 사과 내 유기계 농약 전처리 테스트 실시예

- 한편, 대상 농산물이 곡류인 경우 수분이 존재하지 않아 상기 제시한 유기용매 추출법 적용이 더욱 용이함. 곡류의 경우 상기 제시 전처리 프로토콜에서 증분리 없이 오염된 농약을 ACN으로 추출하고 SERS기판상에 용적 하여 라만 측정이 가능함. 콩, 귀리, 보리, 쌀에 Azinphos-methyl를 오염시키고 해당 전처리법을 통해 추출 후 라만검출한 결과 아래 결과와 같이 15분 내에 1 ppm 수준의 Azinphos-methyl를 성공적으로 검출할 수 있었음
- 제안 전처리법은 본 과제 대상 농약뿐 아니라 유기계 농약에 대해 확대 적용할 수 있을 것으로 기대되며 특히 대상 농산물중 곡류에서 효과적임을 확인함.

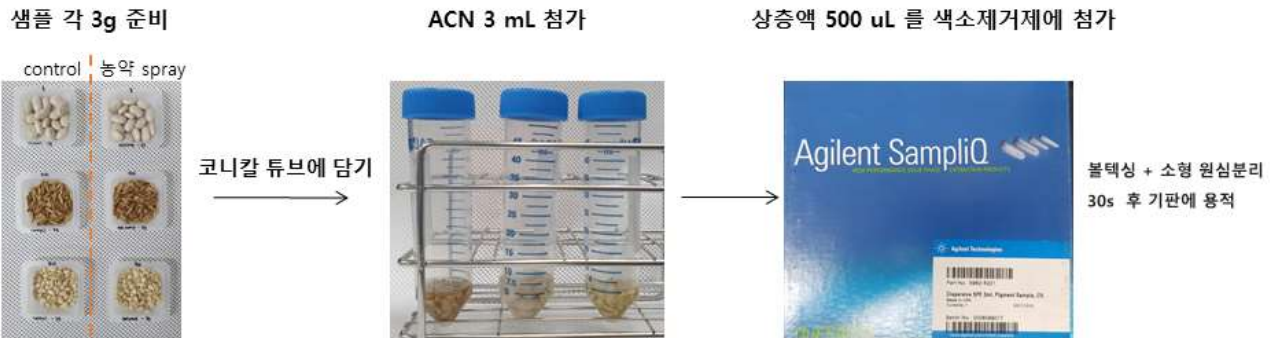


그림 2-97. 곡류에 대한 농약 전처리법 제안

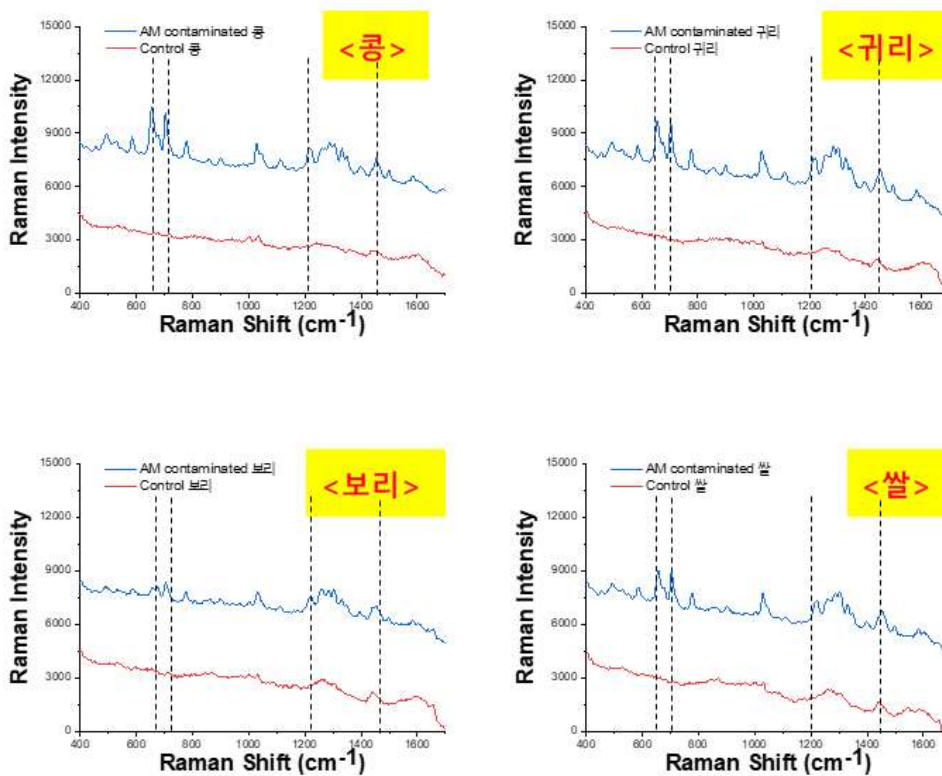


그림 2-98. 4종 곡류에서 추출한 Azinphos-methyl 라만 검출 결과

○ 잔류농약 SERS센서 칩 성능 최적화

- 본 과제에서 개발한 휴대용 라만 리더기와 SERS기판을 일체화하기 위한 최적화 작업을 실시하였음. 휴대용 라만 리더기 내에서 재료연 SERS기판을 샘플 제작 날짜별로 구분하

여 통계적으로 5종 농약에 대해 결과를 도출하였고 기기 내 농약 정량화를 위한 검정곡 선을 확정하였음.

- 본 과제에서 휴대용 라만 리더기와 일체화 할 수 있는 농약은 목표 농약 8종 중 5종으로 정하였음. 이는 휴대용 라만기기의 레이저 파장이 785 nm 로 제작되어 선택되었음. 앞서 785 nm에서 검출 가능한 농약은 4종이었지만, Thiabendazole의 경우 633 nm, 785 nm 양 쪽에서 검출 가능하므로 시제품 라만 리더기에서 검출 가능한 농약 후보군으로 포함함.

<휴대용 라만 리더기 내 농약별 정량화 검정 곡선>

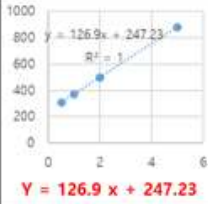
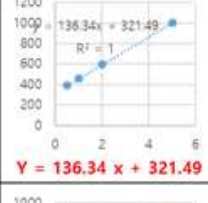
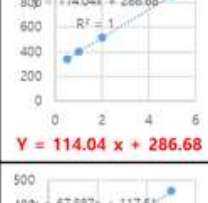
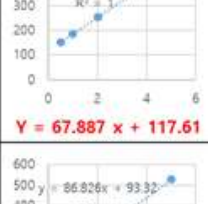
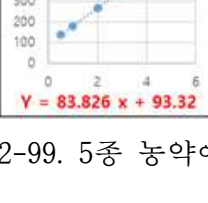
| 농약 | 평균 Standard curve (Y=ax+b) | 날짜 별 5ppm 측정 값 (Y) | 평균 Standard curve 에 대입한 계산 값 (ppm) | 계산 값 평균 (ppm) | 계산 값 Standard deviation |
|-----|---|--------------------|------------------------------------|---------------|-------------------------|
| PQ |  $Y = 126.9x + 247.23$ | 953.42 | 5.565001 | 5 | 2.094717 |
| | | 922.91 | 5.324572 | | |
| | | 510.03 | 2.070935 | | |
| | | 1140.53 | 7.039492 | | |
| DQ |  $Y = 136.34x + 321.49$ | 1507.78 | 8.701179 | 4.999999 | 3.299825 |
| | | 643.97 | 2.365321 | | |
| DIF |  $Y = 114.04x + 286.68$ | 914.68 | 5.50691 | 5 | 2.135744 |
| | | 1092.4 | 7.065324 | | |
| | | 515.11 | 2.003109 | | |
| | | 905.3 | 5.424657 | | |
| AM |  $Y = 67.887x + 117.61$ | 512.03 | 5.810024 | 4.999999 | 1.089577 |
| | | 373.91 | 3.775452 | | |
| | | 521.261 | 6.019653 | | |
| | | 415.96 | 4.394868 | | |
| TBZ |  $Y = 83.826x + 93.32$ | 581.81 | 5.626077 | 5.433162 | 1.570578 |
| | | 368.075 | 3.164429 | | |
| | | 670.375 | 6.646105 | | |
| | | 639.98 | 6.296037 | | |

그림 2-99. 5종 농약에 대한 라만 리더기내 검정곡선 입력식 결과

- 정량화 검정곡선을 소프트웨어에 저장 후 휴대용 라만분광기를 이용하여 5종 농약 분석을 실시함. 각 농약의 특정 라만 peak을 지정하여 소프트웨어에 적용하여 5종 농약을 동시에 분석할 수 있음.
- MRL기준 0.1 ppm 이하는 “미검출” 로 표시, 0.1 ppm 이상 5 ppm 이하는 “정밀 분석

대상”으로 분류, 5 ppm 이상은 “유통 불가”로 3단계 구간을 나누어 현장에서 잔류농약에 오염된 농산물을 스크리닝 할 수 있도록 개발하였음.

- 현재 구현 가능한 농약은 5종이지만 농약별로 고유 라만 신호가 서로 다르기 때문에 휴대용 라만 분광기 소프트웨어에 미리 입력해 놓으면 수십~수백종의 농약을 검출할 수 있는 검출기기로 활용 가능함.



휴대용 라만 분광기

그림 2-100. 휴대용 라만 분광기를 이용한 농약 검출 테스트 결과

(2) 협동연구기관1 (부산대학교)

○ 다중 동시분석을 위한 통계기반 정량분석 알고리즘 개발

- 세 종류의 저 농도 농약 성분(Paraquat, Diquat, Thiabendazole)과 두 가지의 농약이 1:1로 섞인 혼합물(Paraquat+Diquat, Paraquat+Thiabendazole, Diquat+Thiabendazole)에 대하여 SERS 스펙트럼을 이용한 주성분 분석(PCA)을 진행(그림 2-101, 2-102).
- 혼합물의 주성분 분석 정확도 향상을 위해 스펙트럼 표준화 기법 및 라만스펙트럼 내 잡음제거(de-nosing)인 Savitsky-Golay 기법을 적용하였음 (그림 2-103).
- 스펙트럼 표준화 기법 및 라만스펙트럼 내 잡음제거(de-nosing) 기법을 적용한 결과 라만 피크가 중첩되는 혼합물 분석에 대하여 분석 정확도가 향상되는 것을 확인할 수 있었음.

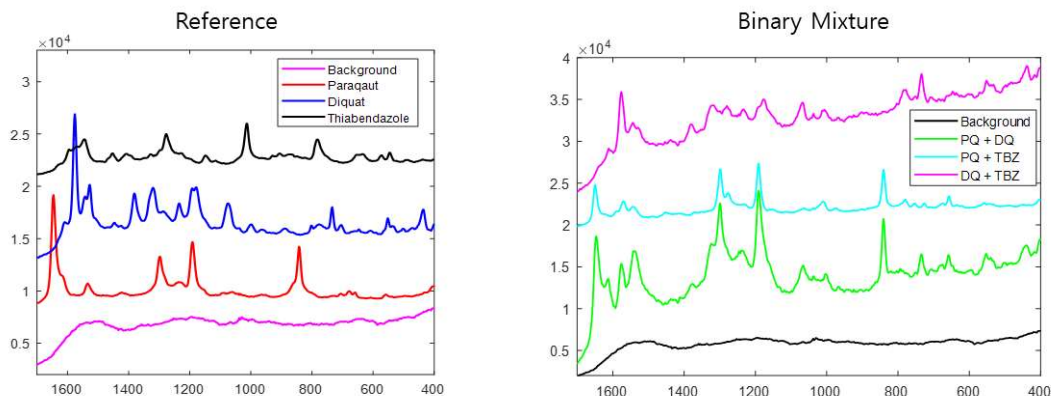


그림 2-101. 세 종류의 농약 성분과 두 가지의 농약의 혼합물 SERS 스펙트럼 (0.1ppm)

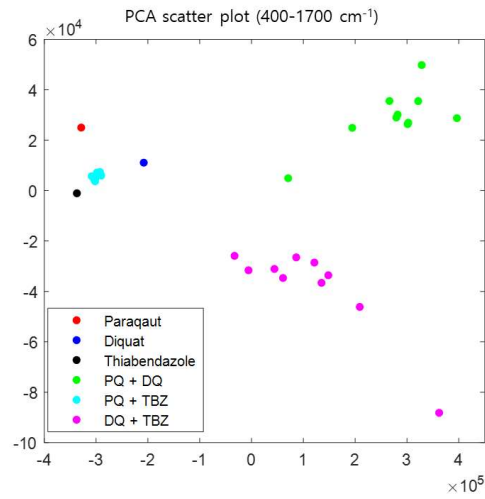


그림 2-102. 그림 2-97의 SERS 스펙트럼을 이용한 주성분 분석(PCA) 결과

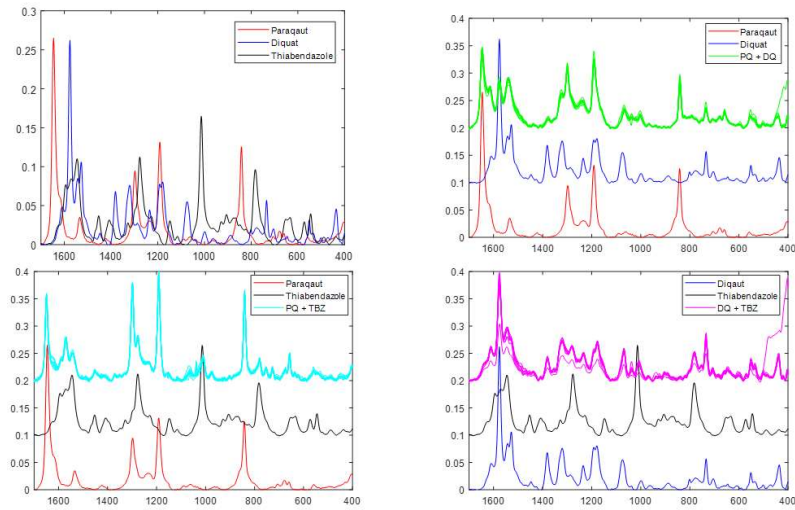


그림 2-103. 표준화 기법과 잡음제거 기법(Savitsky-Golay)을 적용한 SERS 스펙트럼

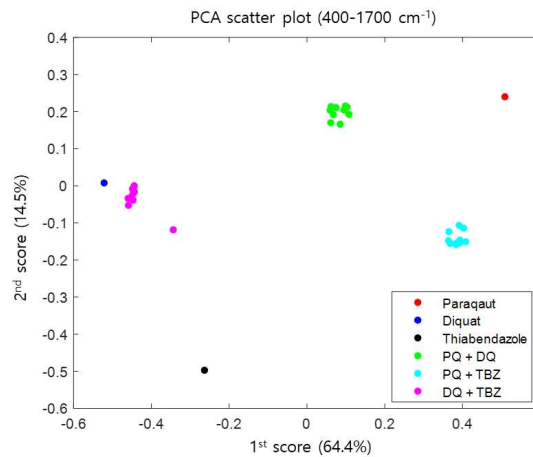


그림 2-104. 그림 2-99의 SERS 스펙트럼을 이용한 주성분 분석(PCA) 결과

(3) 협동연구기관2 (나노스코프시스템즈)

○ 현장 검출용 라만 분광기의 양산 시제품을 제작

- 3차년도의 시제품을 기반으로 양산형 시제품을 설계 제작함. 양산형 시제품은 PC를 별도로 연결해야하는 3차년도의 시제품과는 달리 휴대성을 강화하기 위해 디스플레이 및 요소 모듈의 컨트롤러가 통합된 일체형 시스템으로 제작함.



측정 시스템과 별도의 PC로 구성

디스플레이가 통합된 일체형 시스템

그림 2-105. 일체형 시스템 제작, 3차년도 시제품(좌), 당해연도 시제품(우)

- 양산형 시제품의 디자인은 7인치 정전식 터치스크린을 내장하고 있으며, 자체 개발된 내장 소프트웨어에 의해 구동됨. 전체크기는 250mm x 274mm x 172mm이며, 무게는 4kg이하로 휴대에 용이함. 화면 터치방식으로 운용되며, 샘플 투입 후 내부에서 측정이 이루어지며 진행과정은 화면에 표시됨. 상부에 설치된 내장형 프린터를 이용해서 결과를 출력할 수 있음.

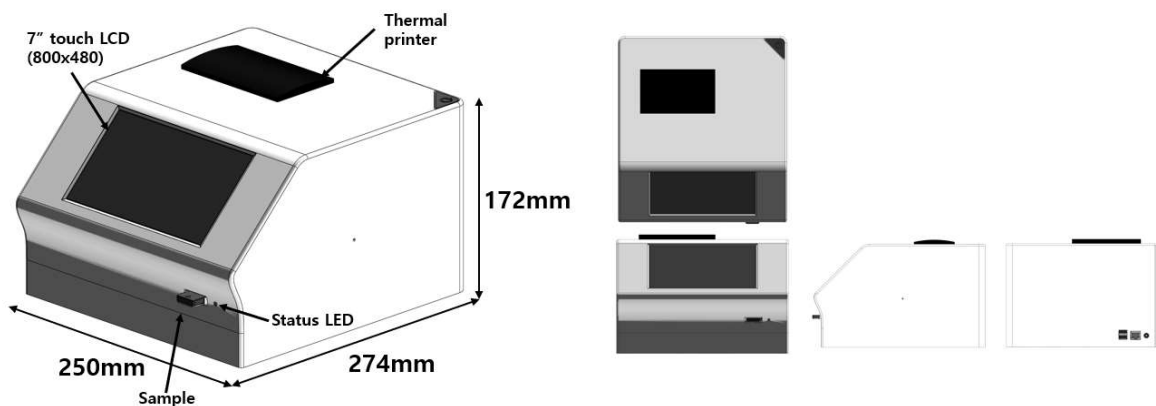


그림 2-106. 양산형 시제품의 외관

○ 현장용 컨트롤러 및 운영 소프트웨어 개발

- 통합된 시스템은 공간 배치의 효율성과 전기적인 안정성을 위해 컨트롤 보드와 프로세싱 보드 두 개로 분리해서 설계함. 컨트롤 보드는 레이저 모듈, 스텝모터 제어, 각종 센서 신호를 제어하며, 프로세싱 분광기로부터 데이터를 전달받아 알고리즘을 수행하며, 사용자와의 인터페이스를 담당함.

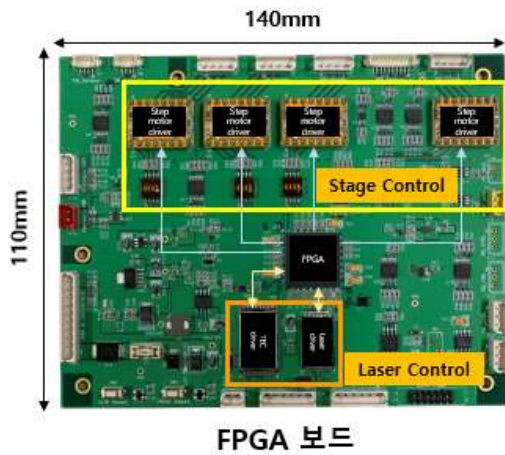
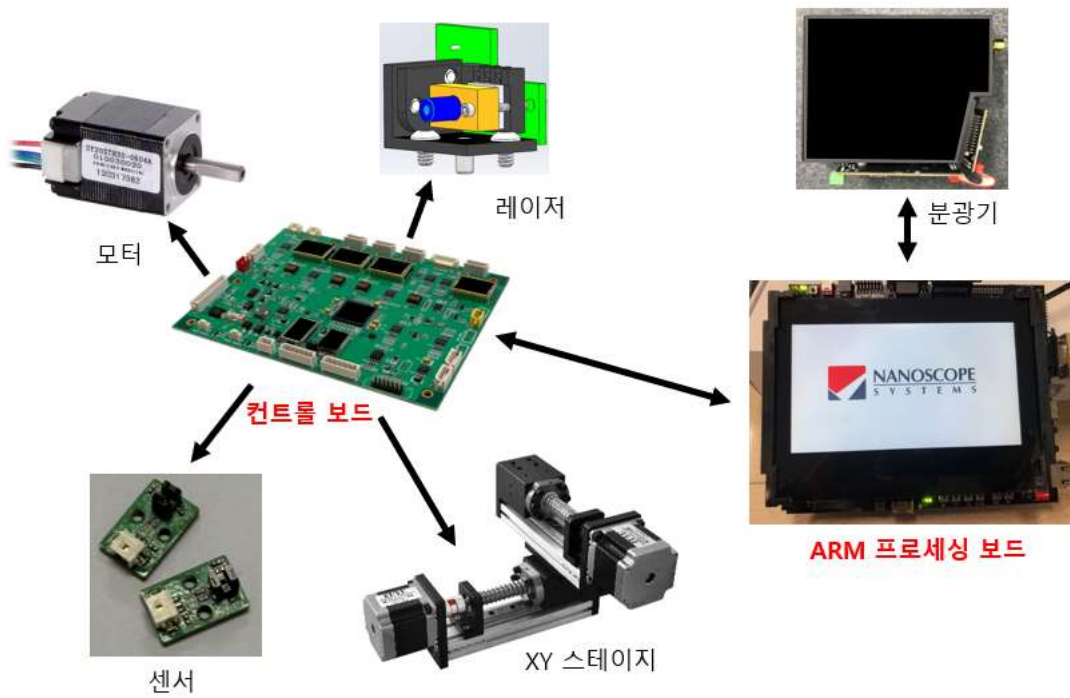


그림 2-107. 내부 컨트롤 보드 제작

- 안정적인 시그널 취득을 위해서 샘플을 투입하면 샘플이 고정되고 자동으로 내부로 삽입되어 측정될 수 있도록 사이드 가이드와 클립으로 구성된 샘플홀더를 제작함. 샘플홀더는 X스테이지에 부착되어 샘플 투입/배출시 외부로 돌출되어 사용자가 샘플을 투입할 위치와 시점을 확인할 수 있도록 함.

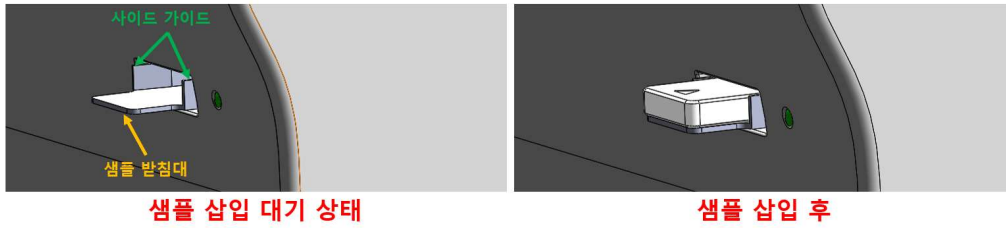


그림 2-108. 샘플 투입/배출 메커니즘

- 시제품에 포함된 운영 소프트웨어는 신규 검사 조건 설정, 데이터 분석 등이 가능한 개발자 모드와 원클릭으로 현장에서 검사가 가능한 사용자 모드 두 가지 모드로 구성됨.



그림 2-109. 내장 소프트웨어 초기 화면: 개발자모드와 사용자모드 선택

- 개발자 모드에서는 테스트레시피 개발, 검량선 설정, 테스트 레시피 시험, 테스트 레시피 결과 확인 등의 기능을 수행함.



그림 2-110. 개발자모드 화면

- 테스트레시피 개발에서는 검사항목, 검사조건 등을 설정하며, 테스트레시피 시험을 통해 검사의 유효성을 확인 가능함. 이전 테스트레시피의 결과는 내장메모리에 자동으로 누적 저장되며, 아이디로 검색이 가능하며, 외부USB로 원본데이터의 추출이 가능함.

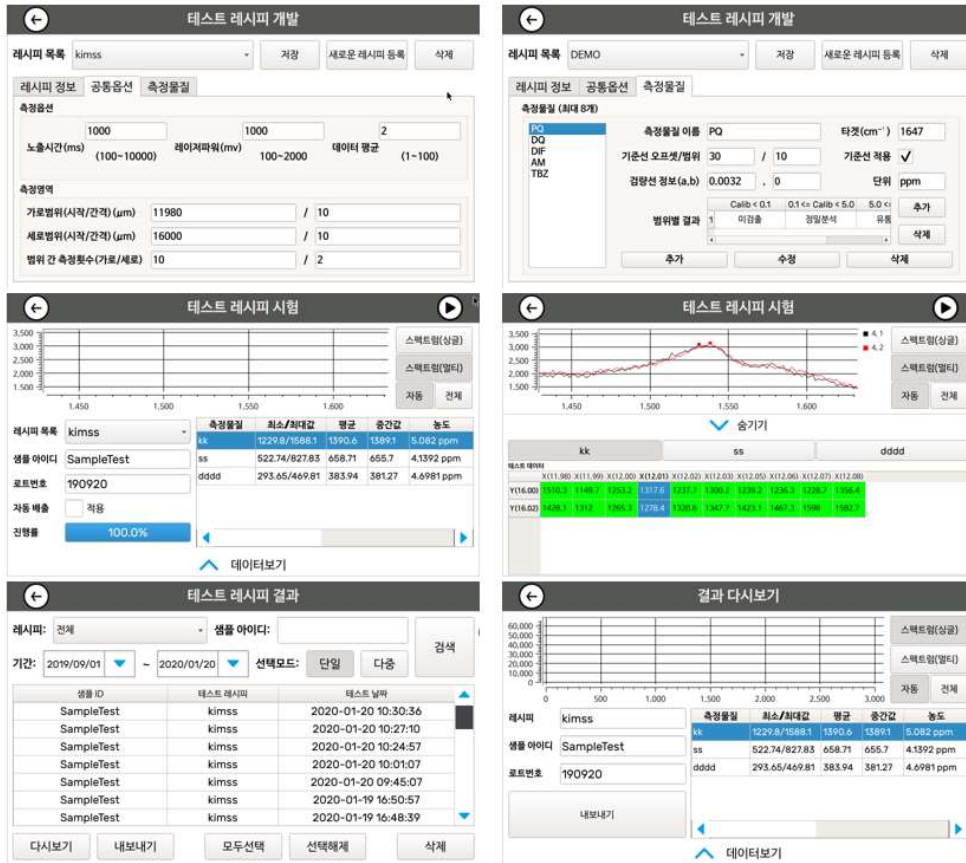


그림 2-111. 테스트레시피 개발/시험/결과 페이지

- 테스트레시피 개발에서 최대 8개의 농약을 판별할 수 있는 각 농약의 고유한 라만 피크를 설정하고, 검량선 정보, 판별 기준 등을 설정할 수 있음. 개발자는 테스트레시피 개발 과정을 통해 판별 알고리즘에 최적의 값을 찾아 설정해야 함.



그림 2-112. 대상농약 파라미터 설정

- 사용자 모드에서는 테스트, 이전 결과 확인, 설정 등의 기능을 포함하고 있음. 사용자는 테스트 기능에서 단순히 테스트레시피를 선택하고, 샘플 아이디를 입력한 후 [시작] 버튼을 누르는 것으로 테스트 결과를 얻게 됨.

- 테스트 결과는 내부의 저장매체에 자동으로 누적 저장되며, 다시보기를 통해 이전 결과를 확인할 수 있음.



그림 2-113. 사용자 모드 결과 화면

- 또한 현장에서 내장프린터를 통해서 결과지를 출력할 수 있음

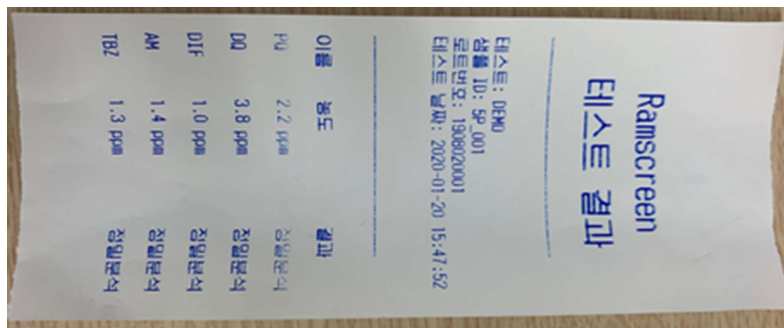


그림 2-114. 결과지 출력

- 개발완료된 분석기기는 양산형 프로토타입 개념으로 완성되어 장비 간 성능 편차 및 전기안정성 등 안전성 평가를 충분히 고려하여 제작되어 인증시험성적서를 받을 수 있는 상태로 판단하고 있으나, 분석기기 자체만으로는 시장에 진출할 수 있는 제품이 아니며, SERS 칩을 이용한 잔류 농약 검사 실험을 보다 다양한 조건에서 수행하는 등 출시전 추가 테스트의 필요가 있으므로, 이러한 과정에서 분석기기의 회로도나 시편제어장치 등, 하드웨어의 디테일이 변경될 수 있음.
- 인증 후 설계 변경 시 또다시 인증을 받아야하는 비용적인 문제가 있어, 잔류 농약 검사기 용도의 실제품으로서 보다 구체적으로 검토되는 시점에서 인증시험성적서를 확보할 계획임. 본 과제 목표에서도 인증시험성적서를 받는 것을 목표로 하지 않아 별도 예산을 책정하여 않았으며, 현재 연구 용도로서의 제품 사용에는 문제가 없음.

(4) 위탁연구기관1 (중앙대학교)

○ 곰팡이 독소 현장 검출 프로토콜 개발

- 곰팡이독소 추출용 면역친화 칼럼인 Myco6in1+는 곰팡이 독소에 선택적으로 반응할 수 있는 6종의 항체가 고정화된 비드들이 칼럼에 내부에 패키징되어 있음. 본 곰팡이 독소 전처리 키트는 농산물품질관리원에서 곰팡이 독소 검출용 전처리 단계에서 사용되고 있음. 본 라만 이미징 기반의 곰팡이 독소 검출에서도 본 키트는 현장에서 농산물을 갈아 용매에 녹여 면역친화칼럼으로 추출하는 전처리 용도로 활용하는 것이 가능함. 본 과제에서는 이 칼럼을 이용한 독소 전처리 방법을 개발하였음.

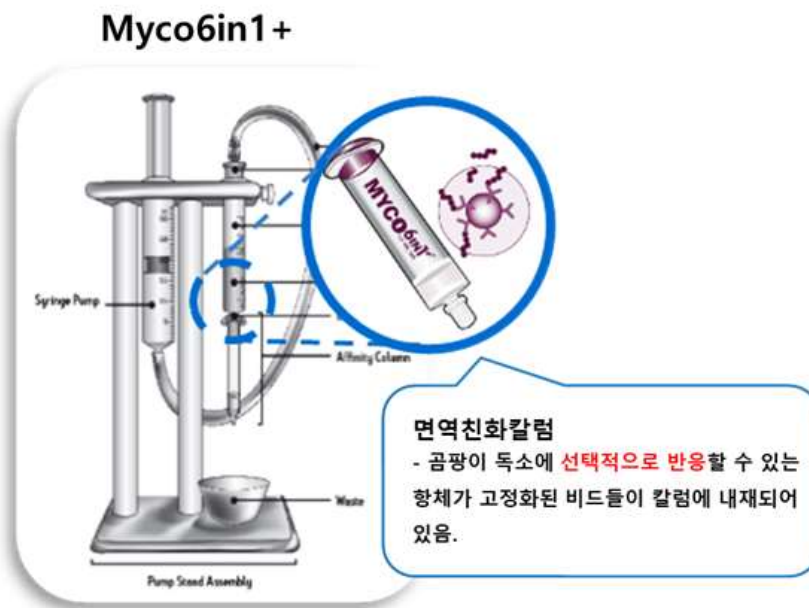


그림 2-115. Myco6in1+ 곰팡이독소 추출용 면역 친화 칼럼

- 4차년도 연구에서는 면역친화 칼럼 Myco6in1+와 휴대용 라만 리더기를 이용하여 여러 곰팡이 독소를 현장에서 분석할 수 있는 현장 분석 기술을 개발함. 이 경우 가장 중요한 이슈는 휴대용 라만분광기의 저분해능 문제와 분석 시간을 단축할 수 있는 데이터 분석 기술이 중요함.
- 본 과제에서는 라만 매핑 포인트 개수를 조절하여 전체적인 매핑 시간을 줄이고 신뢰성 있는 정량 분석 결과를 도출할 수 있는 데이터가 유효화 기술을 개발함. 즉 최소한의 라만 매핑 측정 포인트를 이용하여 신뢰할 수 있는 표준 정량곡선을 획득하는 측정 및 데이터 처리기술을 개발함. 최소한의 라만 매핑시간 조건을 잡아 패스트 매핑이 가능하기 때문에 이는 현장 검출 시 소요되는 분석시간을 크게 줄일 수 있었음.

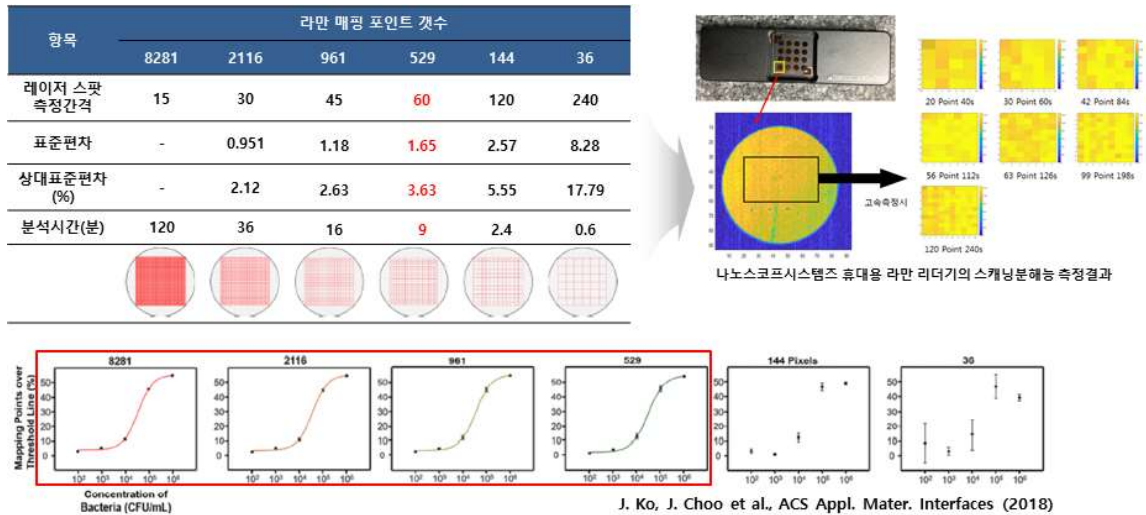


그림 2-116. 나노필라기판 패스트 매핑 분석

(5) 위탁연구기관2 (국립농산물 품질관리원 시험연구소)

- 휴대형 라만검출기 현장 검증 수행(주관 및 협동2기관 공동)
- 농산물 유해물질 검출시험 인증을 위한 비교성능 평가

| | |
|------|-------------------------|
| 간편성 | 장비사용방법, 휴대용이성 등 |
| 선택성 | 특이적 타겟 물질 검출 여부 |
| 감도 | 허용기준치의 1/10이상의 감도 발휘 여부 |
| 검출항목 | 검출가능 성분 수 |
| 검출시간 | 기존의 분석시간과 비교 등 |

- 15분 이내의 현장 진단을 위한 진행 과정 확립

| | |
|-------------|--|
| 최초 전처리 | 유기용매(예, 70% 메탄올) 처리 (5분) |
| 추출 전처리 | 분자각인 고분자 카트리지를 통한 타겟 잔류농약 추출 (3분) |
| 라만 신호 측정 준비 | 추출액을 SERS스트립상에 용적 후 건조. 휴대용 라만 장치에 삽입 (5분) |
| 유해물질 검출 | 휴대용 라만 장치를 이용한 라만 신호 분석 및 잔류 농약 농도 분석 (2분) |

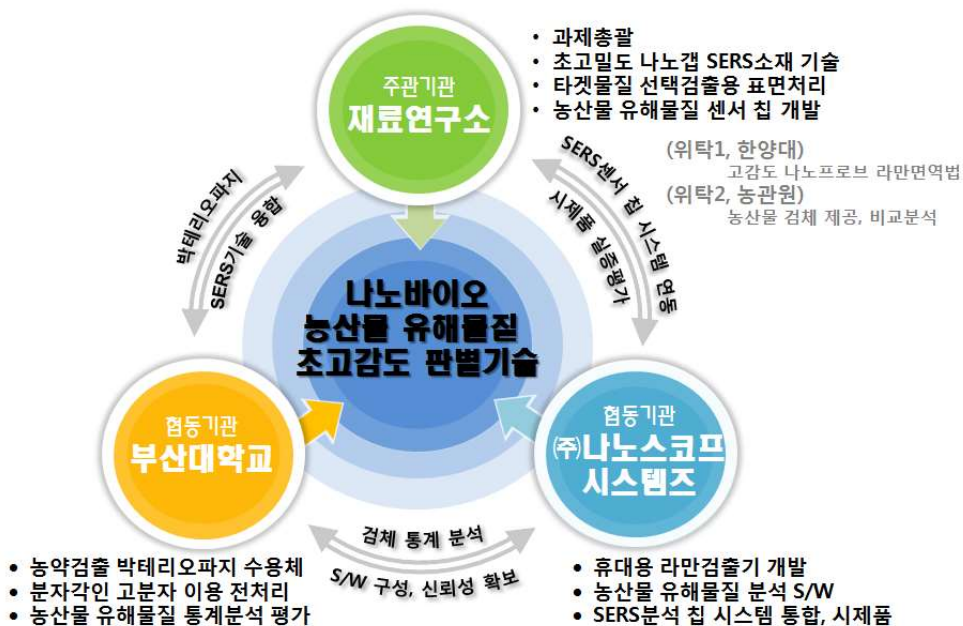
- 본 과제 목표 성능 수치를 만족하는 것으로 판단함

2-2. 연구개발 추진전략 및 방법

<연구개발 추진전략>

- 주관기관과 협동기관은, 기 보유한 나노바이오소재기술을 기반으로 서로의 강점기술을 융합함으로써 농산물 유해물질을 초고감도로 판별할 수 있는 센서 칩과 휴대형 라만검출 시스템 개발을 추진
 - 재료연구소(주관기관)는 분자의 라만신호를 수백만배 이상 증폭시킬 수 있는 초고밀도 나노갭 기관소재(SERS소재)와 센서 칩 제작과 관련한 주요 핵심기술 개발을 담당
 - 부산대학교(협동기관1)는 박테리오파지의 표면작용기 발현기술을 이용하여 농산물내 유해물질에 대한 SERS소재의 선택성을 부여하는 기술 개발을 담당
 - 나노스코프시스템즈(협동기관2,산업체)에서는 휴대용 라만검출기 제작과 연구결과의 상용화 및 테스트를 담당

- 연구개발의 성공 가능성을 높이고 연구성과의 실용성 확보를 위해, 주관기관에서는 요소기술 확보와 실증테스트를 담당하는 전문연구기관에 위탁연구과제를 부여
 - 중앙대학교(위탁기관1)는 나노프로브 기술과 라만면역분석 기술 개발을 담당
 - 농산물품질관리원(위탁기관2)은 농산물 검체 선정, 시료 공급 및 기존 정밀분석법에 기반한 검출결과를 제공



<연구개발 추진방법>

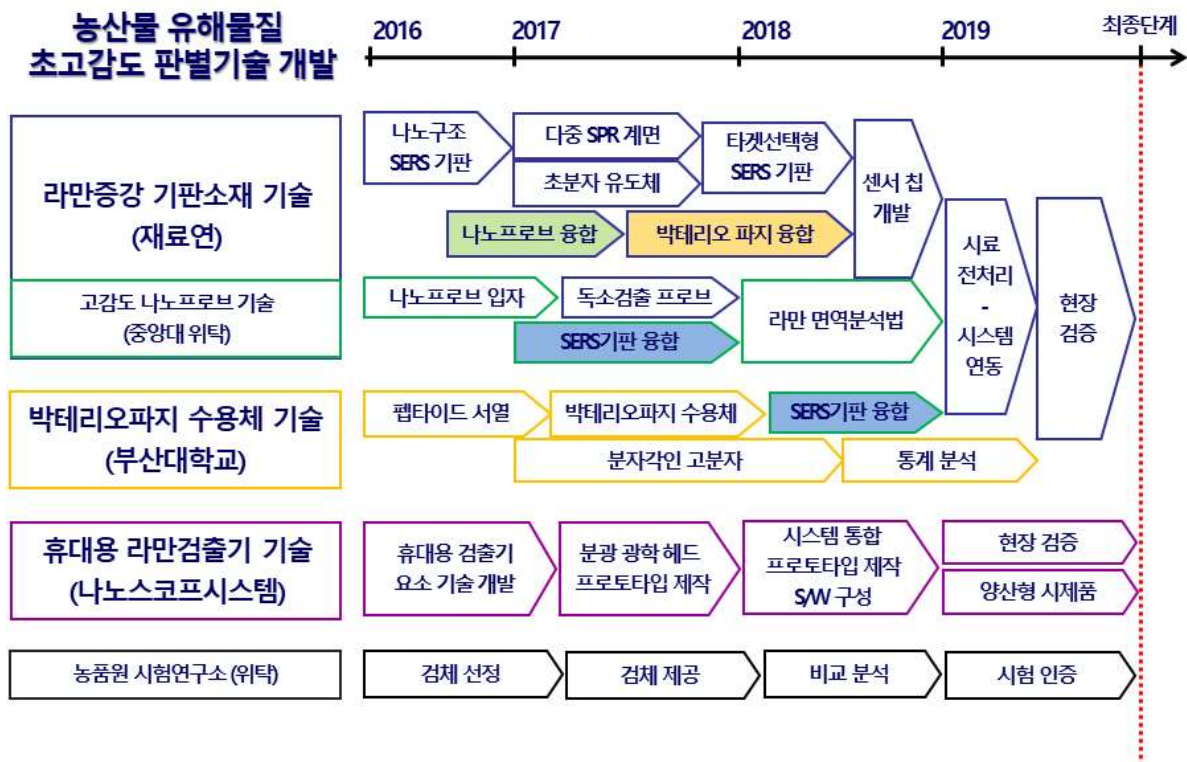
- 정보수집, 전문가확보, 타기관 협조방안
 - 재료연구소(주관기관)는 유해물질 검출용 SERS소재기술에 대한 특허동향조사활동을 통해 주요 출원인 및 핵심특허 분석을 수행
 - 분광분석기술 및 바이오센서 분야 국제학술대회(ICAVS9, IEEE Sensors 등) 참석을 통한

국내외 연구개발 동향을 파악하고 국제공동연구 파트너 및 해외시장 발굴 도모

- 농산물품질관리원 시험연구소의 농산물 유해성분 검출분야 전문가 풀을 활용하여, 분기별 세미나 혹은 참여기관 전체 워크숍을 개최하여 연구방향 설정 및 실용적 연구성과 창출을 위한 자문을 수행
- (주)나노스코프시스템즈(협동2,산업체)는 농약 정밀검출기와 관련한 국내외 산업동향을 파악하고, 국내외 라만분광기 개발업체의 기술현황을 파악하기 위한 전시회 참가를 통해, 사업화 루트를 지속적으로 발굴

<연구개발 로드맵>

- 각 세부기술별 기술개발 로드맵에 근거하여 연차별 목표달성과 유기적 협동연구가 진행될 수 있도록 연구개발 진척도를 관리
- 2차년도 종료시점까지 각 세부과제의 요소기술 개발을 완료하고, 3차년도에는 기술융합을 통한 센서 칩과 라만시스템 통합을 구현
- 최종 4차년도에는 시제품을 이용한 현장검증 및 시험 인증테스트를 통해 실용화 추진



2-3. 연구개발 추진일정

| 1차년도 | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|-------------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|--------------------------|-------------------|------------------------|
| 일련 번호 | 연구내용 | 월별 추진 일정 | | | | | | | | | | | | 연구 개발비 (단위: 천원) | 책임자 (소속 기관) | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | | |
| 1 | 나노구조 SERS기판 제조 | | | | | | | | | | | | | | 33,000 | 김동호 (재료연구소) |
| 2 | 초분자 유도체 개발 | | | | | | | | | | | | | | 26,000 | 김동호 (재료연구소) |
| 3 | 나노 프로브 입자 개발 | | | | | | | | | | | | | | 17,000 | 주재범 (중앙대학교) |
| 4 | 잔류농약 선택성 펩타이드 서열 검색 | | | | | | | | | | | | | | 26,000 | 오진우 (부산대학교) |
| 5 | 소형 라만광원 및 컨트롤러 개발 | | | | | | | | | | | | | | 72,000 | 이승우 (나노스코프시 스템즈) |
| 6 | 검체 선정 | | | | | | | | | | | | | | 4,000 | 문지영 (농품원 시험연구소) |
| 2차년도 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 일련 번호 | 연구내용 | 월별 추진 일정 | | | | | | | | | | | | 연구 개발비 (단위: 천원) | 책임자 (소속 기관) | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | | |
| 1 | 다중 SPR계면 기판 제조 | | | | | | | | | | | | | | 79,000 | 김동호 (재료연구소) |
| 2 | 초분자 유도체 개발 및 기판 표면개질 | | | | | | | | | | | | | | 50,000 | 김동호 (재료연구소) |
| 3 | 선택성 수용체의 기판 융합 | | | | | | | | | | | | | | 50,000 | 김동호 (재료연구소) |
| 4 | 독소 검출 프로브 개발 | | | | | | | | | | | | | | 51,000 | 주재범 (중앙대학교) |
| 5 | 박테리오파지 수용체 개발 | | | | | | | | | | | | | | 50,000 | 오진우 (부산대학교) |
| 6 | 분자각인 고분자 개발 | | | | | | | | | | | | | | 40,000 | 오진우 (부산대학교) |
| 7 | 광학 헤드 프로토타입 개발 | | | | | | | | | | | | | | 201,500 | 이승우 (나노스코프시 스템즈) |
| 8 | 검체 제공 | | | | | | | | | | | | | | 12,000 | 문지영 (농품원 시험연구소) |

| 3차년도 | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|------------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|--------------------------|--|
| 일련 번호 | 연구내용 | 월별 추진 일정 | | | | | | | | | | | | 연구 개발비 (단위: 천원) | 책임자 (소속 기관) |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | |
| 1 | 선택성 수용체의 SERS기판 융합 최적화 | | | | | | | | | | | | | 100,000 | 김동호 (재료연구소) |
| 2 | 센서 칩 개발 | | | | | | | | | | | | | 79,000 | 김동호 (재료연구소) |
| 3 | 라만 면역분석법 개발 | | | | | | | | | | | | | 51,000 | 주재범 (중앙대학교) |
| 4 | 박테리오파지 평가 및 선택성 통계분석 | | | | | | | | | | | | | 55,000 | 오진우 (부산대학교) |
| 5 | 분자각인고분자 전처리 기술 | | | | | | | | | | | | | 25,000 | 오진우 (부산대학교) |
| 6 | 시스템 통합 S/W 구성 | | | | | | | | | | | | | 100,000 | 이승우 (나노스코프시 스템즈) |
| 7 | 휴대형 라만리더기 시제품 제작 | | | | | | | | | | | | | 111,500 | 이승우 (나노스코프시 스템즈) |
| 8 | 개발 기술과 기존 기술의 비교 분석 | | | | | | | | | | | | | 12,000 | 문지영 (농품원 시험연구소) |
| 4차년도 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 일련 번호 | 연구내용 | 월별 추진 일정 | | | | | | | | | | | | 연구 개발비 (단위: 천원) | 책임자 (소속 기관) |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | |
| 1 | 시료 전처리 - 시스템 연동 | | | | | | | | | | | | | 75,000 | 김동호 (재료연구소) |
| 2 | SERS 센서 칩 성능 최적화 | | | | | | | | | | | | | 100,000 | 김동호 (재료연구소) 주재범 (중앙대학교) |
| 3 | 농산물 유해물질 현장검출 검증 | | | | | | | | | | | | | 55,000 | 김동호 (재료연구소)이 승우 (나노스코프시 스템즈) |
| 4 | 데이터 통계분석 최적화 | | | | | | | | | | | | | 70,000 | 오진우 (부산대학교) |
| 5 | 휴대형 라만검출기 H/W, S/W 보완 | | | | | | | | | | | | | 50,000 | 이승우 (나노스코프시 스템즈) |
| 6 | 휴대형 라만검출기 양산형 시제품 | | | | | | | | | | | | | 111,500 | 이승우 (나노스코프시 스템즈) |
| 7 | 휴대형 라만검출기 현장 검증 | | | | | | | | | | | | | 50,000 | 이승우 (나노스코프시 스템즈) |
| 8 | 농산물 유해물질 검출시험 인증 | | | | | | | | | | | | | 12,000 | 문지영 (농품원 시험연구소) |
| 9 | 최종보고서 작성 성과 정리 | | | | | | | | | | | | | 10,000 | 김동호 (재료연구소) |

2-4. 연구개발 성과

2-4-1. 연구개발성과 지표

| 성과 목표 | 사업화지표 | | | | | | | | | | 연구기반지표 | | | | | | | | | |
|----------------|-----------|----------|----------|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------|------------------|----------|---------|--------------|------------------|------------------|----------|----------|------------------|------------------------|----------------------------|
| | 지식 재산권 | | | 기술 실시 (이전) | | 사업화 | | | | | 기술 인증 | 학술성과 | | | | 교육 지도 | 인력 양성 | 정책 활용·홍보 | | 기타 (타 연구 활용 등) |
| | 특허 출원 | 특허 등록 | 품종 등록 | 건 수 | 기술 료 | 제 품 화 | 매 출 액 | 수 출 액 | 고 용 창 출 | 투 자 유 치 | | 논문 | | 학 술 발 표 | 정 책 활 용 | | | 홍 보 전 시 | | |
| | | | | | | | | | | | | SC I | 비 SC I | | | | | | 논 문 평 균 IF | |
| 단위 | 건 | 건 | 건 | 건 | 백 만 원 | 건 | 백 만 원 | 백 만 원 | 명 | 백 만 원 | 건 | 건 | 건 | 건 | 명 | 건 | 건 | | | |
| 가중치 | 10 % | 10 % | 0 | 10 % | 10 % | 10 % | 5% | 5% | 5% | 0 | 5% | | | 5% | 5% | 5% | 5% | 0 | 10 % | 0 |
| 최종목표 | 7 | 3 | | 1 | 50 | 1 | | | | | | 9 | | | 15 | 3 | 10 | | 4 | |
| 1차 년도 | 목 표 | 1 | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | |
| | 실 적 | 1 | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | |
| 2차 년도 | 목 표 | 3 | | | | | | | | | | 2 | | | 4 | | 2 | | | |
| | 실 적 | 3 | | | | | | | | | | 0 | | | 5 | | 2 | | | |
| 3차 년도 | 목 표 | 2 | 1 | | | | | | | | | 4 | | | 5 | 1 | 4 | | 2 | |
| | 실 적 | 2 | 1 | | | | | | | | | 6 | | | 9 | 1 | 4 | | 2 | |
| 4차 년도 | 목 표 | 1 | 2 | | 1 | 50 | 1 | | | | | 3 | | | 5 | 2 | 4 | | 2 | |
| | 실 적 | 1 | 3 | | 2 | 44. 52 | 1 | | | | | 4 | | | 5 | 2 | 4 | | 5 | |
| 소 계 | 목 표 | 7 | 3 | | 1 | 50 | 1 | | | | | 9 | | 3 | 15 | 3 | 10 | | 4 | |
| | 실 적 | 7 | 4 | | 2 | 44. 52 | 1 | | | | | 10 | | 6.4 | 20 | 3 | 10 | | 7 | |
| 종료 1차 년도 | | 2 | | | | | 15 0 | - | 1 | | 1 | 2 | | | 3 | 2 | 2 | | 1 | |
| 종료 2차 년도 | | 1 | | | | 1 | 30 0 | 60 | 1 | | | 1 | | | 2 | 2 | | | 1 | |
| 종료 3차 년도 | | 1 | | 1 | 50 | | 60 0 | 12 0 | 1 | | | | | | | | | | | |
| 종료 4차 년도 | | | | | | | 75 0 | 24 0 | 1 | | | | | | | | | | | |
| 소 계 | | 4 | | 1 | 50 | 1 | 180 0 | 42 0 | 4 | | 1 | 3 | | | 5 | 4 | | | 2 | |
| 합 계 | 7 | 7 | | 2 | 10 0 | 2 | 18 00 | 42 0 | 4 | | 1 | 12 | | | 20 | 7 | 12 | | 6 | |

2-4-2. 연구성과

가. 국내외 논문 게재

| No | 논문명 | 학술지명 | 주저자명 | 호 | 국명 | 발행기관 | SCI여부 (SCI/비SCI) | 게재일 |
|----|--|------------------------------------|---------------------------|----------|------|------------------|------------------|------------|
| 1 | Culture-Free Detection of Bacterial Pathogens on Plasmonic Nanopillar Arrays Using Rapid Raman Mapping | ACS Applied Materials & Interfaces | 고주희 | 10 | 미국 | ACS Publications | SCI | 2018.02.06 |
| 2 | M13 Bacteriophage/Silver Nanowire Surface-Enhanced Raman Scattering Sensor for Sensitive and Selective Pesticide Detection | ACS Applied Materials & Interfaces | 고은혜 | 10 | 미국 | ACS Publications | SCI | 2018.03.28 |
| 3 | 3D-assembled Ag nanowires for use in plasmon-enhanced spectroscopic sensors | APPLIED SPECTROSCOPY REVIEWS | 박성규 | 54 | 미국 | Taylor & Francis | SCI | 2018.05.10 |
| 4 | Holographic Fabrication of 3D Nanostructures | Advanced Materials Interfaces | 전태윤 | 1800330 | 미국 | Wiley | SCI | 2018.06.10 |
| 5 | Sensitive and Reproducible Immunoassay of Multiple Mycotoxins Using Surface-Enhanced Raman Scattering Mapping on 3D Plasmonic Nanopillar Arrays | Small | Xiaokun Wang | e1801623 | 미국 | Wiley | SCI | 2018.07.30 |
| 6 | SERS-Active-Charged Microgels for Size- and Charge-Selective Molecular Analysis of Complex Biological Samples | Small | 김동재 | 41 | 미국 | Wiley | SCI | 2018.08.20 |
| 7 | Improvement of High Affinity and Selectivity on Biosensors Using Genetically Engineered Phage by Binding Isotherm Screening | Viruses | 이종민 | 11(3) | 스위스 | MDPI | SCI | 2019.03.12 |
| 8 | Direct visualization of a surface-enhanced Raman spectroscopy nano-gap via electrostatic force microscopy: Dependence on charge transfer from the underlying surface nano-gap distance | Applied Surface Science | 박원화 | 479 | 네덜란드 | ELSEVIER | SCI | 2019.06.15 |
| 9 | Modifying Plasmonic-field Enhancement and Resonance Characteristics of a Spherical Nanoparticle on Metallic Film An Effect of Faceting Spherical Nanoparticles Morphology | Coatings | VasanthanDevaraj, 정혁, 김춘태 | 9(6) | 스위스 | MDPI | SCI | 2019.06.15 |
| 10 | A facile low-cost paper-based SERS substrate for label-free molecular detection | Sensors and actuators. B, Chemical | Vo Thi Nhat Linh | 291 | 네덜란드 | ELSEVIER | SCI | 2019.06.19 |

나. 국내 및 국제학술회의 발표

| No | 회의명칭 | 발표자 | 발표일시 | 장소 | 국명 |
|----|--|--|------------|--|------|
| 1 | Plasmonic Nanopillar Arrays for Highly sensitive Detection of Food Poisoning Bacteria | 고주희, 박성규, 이상엽, 주재범 | 2016.10.14 | 부산 BEXCO | 대한민국 |
| 2 | High-performance SERS Nanopillar Arrays for the Sensitive Detection of Food-borne Bacteria | 고주희, 박성규, 이상엽, 주재범 | 2017.02.22 | 제주컨벤션 센터 | 대한민국 |
| 3 | A facile detection of pathogenic bacteria using high throughput SERS-based imaging | 고주희, 황준기, 이상엽, 주재범 | 2017.05.07 | 중국 Haikou | 중국 |
| 4 | Highly Sensitive Detection of Food poisoning bacteria using Plasmonic Nanopillar arrays | 고주희, 이상엽, 황준기, 주재범 | 2017.05.18 | 제주 칼호텔 | 대한민국 |
| 5 | M13 bacteriophage/ Silver Nanowire Surface Enhanced Raman Scattering Biosensor for Sensitive and Selective Pesticide Detection | 고은혜, 문채원, 김춘태, 박성규, 오진우, 김선호, 김동호, 정호상 | 2017.11.09 | 창원 컨벤션센터 | 대한민국 |
| 6 | M13 bacteriophage decorated AgNW SERS sensor for sensitive and selective pesticide detection | 고은혜, 문채원, 김춘태, 박성규, 오진우, 김선호, 김동호, 정호상 | 2017.11.16 | 경주 현대호텔 | 대한민국 |
| 7 | M-13 virus-based structural colourimetric sensor for detecting endocrine disrupting chemicals | 이유진 | 2018.04.06 | 대전 컨벤션센터 | 대한민국 |
| 8 | Development of highly reproducible SERS imaging-based immunosensor using three-dimensional plasmonic nanopillar substrates | Xiaokun Wang | 2018.04.18 | Technology and Innovation Centre, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland | 영국 |
| 9 | Structural color Based High Selective Sensor Using Genetically engineered M13 Bacteriophage | 이유진 | 2018.05.17 | 평창 알펜시아 리조트 | 대한민국 |
| 10 | Improving Accuracy of a Virus-Based Color Sensor in Discrimination among Similar Phthalate and Chlorobenzene Derivatives | 설다운 | 2018.06.10 | 강원도 | 대한민국 |

| | | | | | |
|----|---|-------------------------|------------|------------------------------|------|
| | by Analyzing Full Time-Varyin | | | | |
| 11 | Development of highly sensitive SERS imaging-based immunosensor using three-dimensional plasmonic nanopillar substrates | Xiaokun Wang, 주재범 | 2018.06.27 | 부여 롯데리조트 | 대한민국 |
| 12 | Development of SERS imaging-based immunosensor using three-dimensional plasmonic nanopillar substrates | Xiaokun Wang | 2018.08.31 | 제주 ICC | 대한민국 |
| 13 | High sensitive surface-enhanced Raman scattering sensor based on an integrated M13 bacteriophage and silver nanowire | 이종민 | 2018.09.05 | Nagaragawa Convention Center | 일본 |
| 14 | Virus-decorated AgNWs as a Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) Biosensor for Selective Pesticide Detection | 고은혜 | 2018.10.11 | 경주 화백컨벤션 센터 | 대한민국 |
| 15 | M13 박테리오파지의 선택적 흡착 특성과 표면증강라만센서로의 응용 | 이종민 | 2018.10.25 | 창원 컨벤션센터 | 대한민국 |
| 16 | Improving identification accuracy of geographical origins of sapphires using Raman spectroscopy and Laser-induced breakdown | 음창환, 정희일 | 2019.05.16 | 강릉 | 대한민국 |
| 17 | Perfluorocarbon (PFC) medium as a means to improve accuracy for spectroscopic quantitative analysis of powder samples | 이윤정, 정희일 | 2019.05.16 | 강릉 | 대한민국 |
| 18 | Study of variable selection method for analysis of LIBS spectra of Sapphire samples | 음창환, 설다운, 최지훈, 차경준, 정희일 | 2019.06.27 | 무창포 비체펠리스 | 대한민국 |
| 19 | Discrimination of gallbladder diseases using Infrared and Near-Infrared spectroscopy | 장은진, 정희일 | 2019.11.04 | 제주 부영호텔 | 대한민국 |
| 20 | Development of ultra-sensitive plasmonic sensing platforms using Au nanoparticles-internalized nano-dimple templates | 당하준, 박성규, 김경연, 주재범 | 2019.11.14 | 제주 신화월드 랜딩 호텔 | 대한민국 |

다. 생명자원(생물자원)/화합물

| No | 생명자원(생물자원)/화합물명 | 등록/기탁번호 | 등록/기탁기관 | 발생년도 |
|----|-----------------|---------|---------|------|
| | | | | |

라. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

| No | 지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재) | 국 명 | 출원 | | | 등 록 | | | 기여율 |
|----|--|------|-----------------|------------|---------------|-----------------|------------|---------------|-----|
| | | | 출원인 | 출원일 | 출원번호 | 등록인 | 등록일 | 등록번호 | |
| 1 | 타겟 물질 검출용 표면증강 라만 분광용 기관, 및 이의 제조방법 | 대한민국 | 한국기계연구원 | 2016.12.15 | 1020160171924 | | | | 100 |
| 2 | 분광분석용 기관 및 이의 제조방법 | 대한민국 | 한국기계연구원 | 2017.04.18 | 1020170049870 | | | | 50 |
| 3 | M13 박테리오파지를 이용한 형광공명에너지전이 기반의 광학적 검출 시스템 및 이를 이용한 타겟 물질의 검출 방법 | 대한민국 | 부산대학교 산학협력단 | 2017.04.28 | 1020170055504 | | | | 50 |
| 4 | 저농도 분석물질 농축 및 검출용 필터, 및 이의 제조방법 | 대한민국 | 한국기계연구원 | 2017.10.23 | 1020170137778 | | | | 100 |
| 5 | 미끄럼 절연막을 포함하는 기관 및 이의 제조방법 | 대한민국 | 한국기계연구원 | 2018.04.26 | 1020180048785 | | | | 50 |
| 6 | 분광분석용 기관 및 이의 제조방법 | 대한민국 | | | | 한국기계연구원 | 2018.10.30 | 1020180117250 | 50 |
| 7 | 레이저 출력조정기를 가지는 라만 분광기 | 대한민국 | 나노스코프 시스템즈 주식회사 | 2018.10.30 | 1020180131292 | | | | 100 |
| 8 | M13 박테리오파지를 이용한 형광공명에너지전이 기반의 광학적 검출 시스템 및 이를 이용한 타겟 물질의 검출 방법 | 대한민국 | | | | 부산대학교 산학협력단 | 2019.03.07 | 101958084 | 33 |
| 9 | 레이저 출력조정기를 가지는 라만 분광기 | 대한민국 | | | | 나노스코프 시스템즈 주식회사 | 2019.03.29 | 101965803 | 100 |
| 10 | 종이기반 분광분석용 기관 및 이의 제조방법 | 대한민국 | 한국기계연구원 | 2019.08.06 | 1020190095463 | | | | 50 |
| 11 | 미끄럼 절연막을 포함하는 기관 및 이의 제조방법 | 대한민국 | | | | 한국기계연구원 | 2019.11.13 | 102046436 | 50 |

마. 저작권(소프트웨어, 서적 등)

| No | 저작권명 | 창작일 | 저작자명 | 등록일 | 등록번호 | 저작권자명 | 기여율 |
|----|------|-----|------|-----|------|-------|-----|
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

바. 전문연구 인력양성

| No | 분류 | 기준 년도 | 현 황 | | | | | | | | | | | |
|----|--------------|----------|-----|----|----|----|----|---|-----|-----|-----|-----|----|--|
| | | | 학위별 | | | | 성별 | | 지역별 | | | | | |
| | | | 박사 | 석사 | 학사 | 기타 | 남 | 여 | 수도권 | 충청권 | 영남권 | 호남권 | 기타 | |
| 1 | 고주희 | 2017 | | | | ○ | | ○ | ○ | | | | | |
| 2 | 팜각두이 | 2017 | ○ | | | | ○ | | ○ | | | | | |
| 3 | 류동현 | 2018 | | ○ | | | ○ | | ○ | | | | | |
| 4 | Xiaokun Wang | 2018 | ○ | | | | | ○ | ○ | | | | | |
| 5 | 고은혜 | 2018 | | ○ | | | | ○ | | | ○ | | | |
| 6 | Rui Wang | 2018 | ○ | | | | ○ | | ○ | | | | | |
| 7 | 설다운 | 2019 | ○ | | | | | ○ | ○ | | | | | |
| 8 | 김춘태 | 2019 | ○ | | | | ○ | | | | ○ | | | |
| 9 | 최남현 | 2019 | ○ | | | | ○ | | ○ | | | | | |
| 10 | 전진혁 | 2019 | ○ | | | | ○ | | ○ | | | | | |

사. 산업기술 인력양성

| No | 프로그램명 | 프로그램 내용 | 교육기관 | 교육 개최회수 | 총 교육시간 | 총 교육인원 |
|----|-------|---------|------|---------|--------|--------|
| 1 | | | | | | |
| 2 | | | | | | |

아. 기술거래(이전) 등

| No | 기술이전 유형 | 기술실시계약명 | 기술실시 대상기관 | 기술실시 발생일자 | 기술료 (당해연도 발생액) | 누적 징수현황 |
|----|---------|----------------------|----------------|------------|----------------|--------------|
| 1 | 직접실시 | 표면증강 라만시그널 증폭기술 | 나노스코프 시스템즈 (주) | 2020.01.14 | 4,522,222 원 | 4,522,222 원 |
| 2 | 통상실시권 | SERS기판 제조기술 (나노와이어형) | 나노스코프 시스템즈 (주) | 2020.01.23 | 40,000,000 원 | 20,000,000 원 |

자. 사업화 투자실적

| No | 추가 R&D 투자 | 설비 투자 | 기타 투자 | 합계 | 투자자금 성격 |
|----|-----------|-------|-------|----|---------|
| | | | | | |

차. 사업화 현황

(단위 : 명, 년)

| No | 사업화 방식 | 사업화 형태 | 지역 | 사업화명 | 내용 | 업체명 | 매출액 | | 매출 발생년도 | 기술 수명 |
|----|--------|----------------|----|--------------------------|--|----------------|-----------------|----|---------|-------|
| | | | | | | | 국내 | 국외 | | |
| 1 | 상품화 | 기술보유자직접사업화(제품) | 대전 | 유해물질 초고감도 판별기술 분광장치 및 부품 | 나노바이오기술을 활용한 농산물 유해물질 초고감도 판별기술 개발 과제의 성과물인, 라만기반 분광장치 및 관련부품(광센서, 광원장치)에 대한 제품을 출시함. 국내 매출액 합계 124백만원임. | 나노스코프 시스템즈 (주) | 2,229,000,000 원 | - | 2018 | 10년 |

카. 표준화

| No | 수행기관명 | 표준화 주제 | 표준화 기구 | 표준화 단계 | 관련번호 | 제출(채택)일 | 국가 |
|----|-------|--------|--------|--------|------|------------|----|
| | | | | | | yyyy.mm.dd | |

타. 기술요약정보

| 연도 | 기술명 | 요약내용 | 기술완성도 | 등록번호 |
|----|-----|------|-------|------|
| | | | | |

파. 보고서 원문

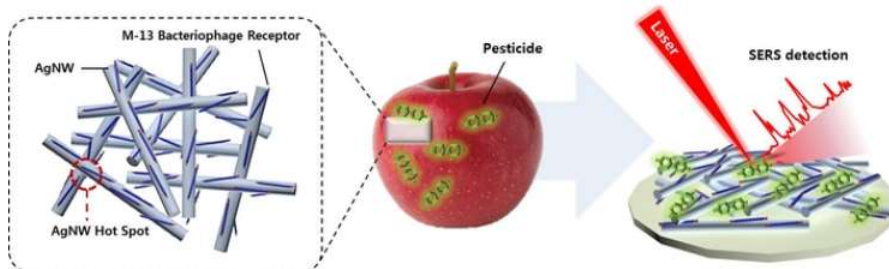
| 연도 | 보고서 구분 | 발간일 | 등록번호 |
|----|--------|-----|------|
| | | | |

하. 홍보전시 실적

- 초 고감도 잔류농약 검출 기술에 대한 언론 홍보 1건 (2018.03.14.)

재료연구소, 잔류농약 고감도 선택적 검출기술 개발

▽ 강종효 기자 입력 : 2018.03.14 12:52:02 | 수정 : 2018.03.14 19:53:51



앞으로 농식품 내 잔류농약을 현장에서 바로 확인할 수 있게 됐다.

재료연구소(소장 이정찬, KIMS) 표면기술연구본부 정호상 박사 연구팀은 부산대, 한양대, 국립농산물 품질관리원 시험연구소와 함께 M13 박테리오파지 수용체를 은 나노선 표면에 개질하는 방법으로 농식품 내 잔류농약을 선택적으로 검출하는 기술을 개발했다고 14일 밝혔다.

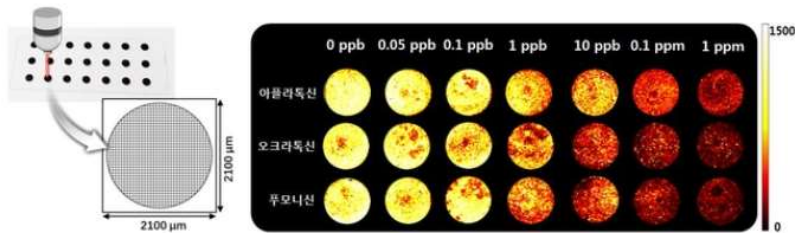
- 곰팡이독소 검출기술 개발에 대한 언론 홍보 1건 (2018.09.17.)

재료연구소, 곰팡이 독소 민감도 100배 향상 검출기술 개발

▽ 강종효 기자 입력 : 2018.09.17 17:17:11 | 수정 : 2018.09.17 17:58:56

앞으로 농식품 내 유해독소를 현장에서 바로 확인할 수 있다.

근 살모넬라균에 의한 케이크 식중독 사태가 전국적으로 이슈가 되는 가운데, 농식품 내 유해독소를 현장에서 검출할 수 있는 기술이 개발돼 주목을 받고 있다.



재료연구소(KIMS)는 나노표면연구실 박성규 박사 연구팀이 한양대 주재범 교수 연구팀과 함께 농식품 내 존재하는 여러 종의 곰팡이 독소를 0.01ppb 이하로 검출하는 기술을 개발했다고 14일 밝혔다.

- KBS 다큐멘터리 <호모사이언스> ‘먹거리에 안심을 더하다’ 편 방송 (2019.6.25.)



- 나노피아 2019.11.7 - 8, 장소: 창원컨벤션센터, 내용: 경상남도청, 밀양시, 나노 관련 기업들이 모인 자리에서 재료연구소 개발 SERS기술과 휴대용 라만리더기 설명



- 나노코리아 2019.7.3. - 5, 장소: 일산킨텍스, 내용: (주)나노스코프시스템즈에서 개발한 현장형 유해물질 검출 라만 리더기 홍보 전시



나노코리아 2019, 킨텍스, 2019.7.3~5



- Highly-Functional Materials OSAKA Show 2019.05.22. - 24, 장소: 일본 오사카, 내용: 재료연구소 SERS기관 및 휴대용 라만 리더기, 농식품에서 유해물질 검출할 수 있는 시스템 전시 홍보



- 바이오코리아 2019.4.17. - 19, 장소: 서울 코엑스, 내용: (주)나노스코프시스템즈에서 개발한 휴대용 라만 리더기 홍보 전시



바이오코리아 2019, 코엑스, 2019.4.17~19

※기술실시 성과

- 재료연구소는 (주)나노스코프시스템즈에 “SERS기관 제조기술(나노와이어형)” 에 대한 기술 실시를 계약하고 정액기술료 40,000,000원을 계약함, 2020년 2월 기준 기술료 20,000,000원을 기 징수함.

기술실시 계약서

- ◆ 기 술 명 : SERS기관 제조기술(나노와이어형)
- ◆ 계약 당사자 :
(연구소) 한국기계연구원 부설 재료연구소
(실시자) 나노스코프시스템즈(주)
- ◆ 기술실시 기간 : 2020.1.23. ~ 2025.1.22.
- ◆ 기 술 료 : 정액기술료_40,000,000원
(부가가치세 별도) 경상기술료_본 계약제품 매출액 x 10%

한국기계연구원 부설 재료연구소(이하 “연구소”라고 한다)와 나노스코프시스템즈(이하 “실시자”라 한다)는 “SERS기관 제조기술(나노와이어형)”에 관한 실시권 설정에 관하여 다음과 같이 합의하고 기술실시계약을 체결한다.

제 1 조(“기술” 및 “용어”의 정의)

- ① 본 계약에서 “기술”이라 함은 “SERS기관 제조기술(나노와이어형)”의 구현을 위한 특허 실시권허여 및 노하우 제공을 말하며, 본 “기술” 이외의 파생기술이나 개량기술 또는 관련된 다른 특허권은 포함되지 아니한다.

- 특허 리스트 -

| 특 허 명 | 출원번호 |
|-------------------------|-----------------|
| 다중분석용 플라즈모닉 칩 및 이의 제조방법 | 10-2020-0006029 |

- 노하우 리스트 -

| |
|--|
| 은(Ag) 나노와이어 기반 플라즈모닉 칩(SERS 기관 및 라만센서 칩) 자체 생산 제작 기술 |
| 은(Ag) 나노와이어 기반 SERS 센서 칩 품질관리 기술 |
| 은(Ag) 나노와이어 기반 SERS 센서 칩 라만 리더기 일체화 및 활용기술 자문 |

- ② 본 계약에서 “계약제품”이라 함은 “계약기술”을 적용하여 실시자가 실시한 기관 및 기관을 포함한 판매품을 말한다.
- ③ 본 계약에서 “매출액”이라 함은 실시자가 국내외에 판매를 목적으로 생산하는 “계약제품”의 해당년도 총 매출액을 말한다.

제 2 조(실시권의 내용 및 노하우 제공)

- ① “연구소”는 실시자가 본 계약의 조건에 따라 대한민국내에서 “기술”을 실시하는데 동의하여 “실시자”에게 통상실시권을 설정한다. 단, 국외실시의 경우 제3조에 따른다.
- ② 제1항의 실시권은 “기술”을 이용한 제품개발, 제품생산, 원가절감(생산성 향상), 판매, 품질향상 등의 권리를 말한다.

- (주)나노스코프시스템즈는 자체 기술실시를 완료하고 최종 기술료 4,522천원을 농림식품기술 기획평가원에 납부하였음. 당초 기술료 32,300천원 (정부출연금: 323,000천원 기준)중 기술료를 감면 받아 최종 기술료 4,522천원을 승인 받았음.



농림식품기술기획평가원



수신자 한국기계연구원 부설 재료연구소(주관연구책임자)

(경유)

제목 기술료 감면 승인 알림

1. 귀 기관의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. 관련 : 기술료 감면 신청(한국기계연구원 부설 재료연구소, 연구운영613-1364(2019. 12. 16.))
3. 귀 기관에서 요청한 기술료 감면 건에 대해 아래와 같이 승인하오니 불일의 후속 조치 사항을 참조하시어 기술실시보고서 제출 및 기술료 납부에 차질이 없도록 진행해 주시기 바랍니다.

가. 승인내역

| 사업명 | 과제명 | 주관연구기관/ 실시기업 | 정부출연금 | 당초기술료 | 최종 기술료 |
|------|---|----------------------------------|-----------|----------|---|
| 첨단생산 | 나노바이오 기술을 활용한 농산물 유해물질 초고감도 판별기술 개발 (농산물 유해물질 현장 검사를 위한 휴대용 라만 분광장치 개발) | 한국기계연구원 부설 재료연구소/ ㈜나노스코프 시스템즈 | 323,000천원 | 32,300천원 | 4,522천원 (복스기업 80% 감면, 일시납 추가감면 30%) |

나. 계좌내역

- 은행명 및 계좌번호 : 신한은행,
- 예금주 : 농림식품기술기획평가원

다. 기술실시 이후 제출 서류 및 기한

- 기술실시보고서(감면승인 통보 후 15일 이내), 전문기관에 납부한 기술료 입금증
- 영리법인이 전문기관에 일시납 한 경우, 기술료 징수 및 사용현황 보고서를 별도 작성할 필요 없음

불 입. 농식품 R&D 과제 기술실시 계약 체결 후 조치사항 1부. 끝.

우리은행 이체결과조회



출력일시 : 2020.01.14 15:59:33

| | | | |
|-------------|----------------------------|-----------|-----------------|
| 처리일시 | 2020.01.14 15:59:17 | | |
| 출금계좌번호 | <input type="text"/> | 보내는분(예금주) | 나노스코프시스템즈(|
| 입금은행 | 신한은행 | 받는분(예금주) | 농기평 (I P E T) |
| 입금계좌번호 | <input type="text"/> | | |
| 이체금액 | 4,522,000원 (금 사백오십이만이천원) | | |
| 수수료 | 0원 | | |
| 받는분 통장표시내용 | 나노스코프시스템즈 (| | |
| 보내는분 통장표시내용 | 농기평 (I P E T | | |
| 전문(타행)번호 | 020IF80210905 | 집금(CMS)번호 | |
| 이체결과 | 정상 | 처리내용 | 정상 처리되었습니다. |

보내는분통장표시내용 표시여부

알아두세요!



- 이체결과조회는 고객 편의를 위해 제공되는 것으로, 거래의 참고용으로만 사용될 수 있습니다.
- 본 명세서 내용을 임의로 수정하여 행사할 경우 법에 저촉될 수 있습니다.

- (주)나노스코프시스템즈의 과제 연구기간 내 사업화실적 확인서를 아래와 같이 첨부함

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

| 과제명 | | 나노바이오기술을 활용한 농산물 유해물질 초고감도 판별기술 개발 | | | | | | |
|--------------------------------------|-----------------|---|--------|---------------------------------------|----|-----------------------------|-----|----------------|
| 주관연구기관 | | 재료연구소 | | 참여기관 | | 나노스코프시스템즈(주) | | |
| 책임자 | | 김동호 | | 연구기간 | | 2016년 9월-2019년 12월 (총 3.3년) | | |
| 정부출연금 | | 323,000,000원 | 기업부담금 | 373,500,000원 | 총계 | 696,500,000원 | | |
| 기술이전명 | | (직접 실시) | | 기술실시대상기관 | | 나노스코프시스템즈(주) | | |
| 기술료 | | - | | 기술실시일 | | - | | |
| 구분 | | 기술실시 실적 계산액 (단위: 백만원) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성 | | 해당기술을 통한 사업화 실적 | | | | |
| 실적 | 자산 총계 | | | 제품건수 | | 1건 | | |
| | 자본 총계 | | | 기술개발성과 활용 총 매출액 (국내매출액 + 해외수출액) | | 12% 백만원 | | |
| | 부채 총계 | | | | | | | |
| | 매출액 총계 | | | | | | | |
| 제품별 실적 | | | | | | | | |
| 구분 | 제품명 | 제품사진 | 제품출시일 | 매출액 (백만원) | | 해당기술의 매출액 기여율 (%) | 원산지 | 품질 인증 여부 |
| | | | | 국내 | 해외 | | | |
| 1 | 관련부품 (광원장치) |  | 2017.2 | 국내 | 70 | 30% | 한국 | 부 |
| | | | | 해외 | 0 | | | |
| 2 | 관련부품 (장ense) |  | 2018.4 | 국내 | 34 | 50% | 한국 | 부 |
| | | | | 해외 | 0 | | | |
| 3 | 분광장치 |  | 2018.4 | 국내 | 20 | 70% | 한국 | 부 |
| | | | | 해외 | 0 | | | |
| * 첨부 : 매출액 확인이 가능한 자료(세금계산서, 매출원장 등) | | | | | | | | |

2020년 1월 23일

연구책임자 : 나노스코프시스템즈(주) 전병선 (서명 또는 인)



매출액 확인 자료 정리 내용

| | 매출계산서 일자 | 금액 | 관련 부품 구분 |
|------|------------|------------|-------------|
| 1차년도 | 2017-02-22 | 18,000,000 | 관련부품 (광원장치) |
| | 2017-08-18 | 9,363,637 | 관련부품 (광원장치) |
| | 2017-09-21 | 6,540,000 | 관련부품 (광원장치) |
| | 2017-10-24 | 2,370,000 | 관련부품 (광원장치) |
| 2차년도 | 2018-04-06 | 20,000,000 | 분광장치 - 메인 |
| | 2018-04-27 | 7,000,000 | 관련부품 (광센서) |
| | 2018-07-31 | 2,600,000 | 관련부품 (광센서) |
| | 2018-09-05 | 17,500,000 | 관련부품 (광원장치) |
| 3차년도 | 2019-10-01 | 17,545,455 | 관련부품 (광센서) |
| | 2019-10-01 | 17,000,000 | 관련부품 (광원장치) |
| | 2019-12-03 | 4,996,550 | 관련부품 (광센서) |
| | 2020-12-30 | 2,566,000 | 관련부품 (광센서) |

| | |
|------------------|--------------------|
| 관련부품 (광원장치) (소계) | 70,773,637 |
| 관련부품 (광센서) (소계) | 34,708,005 |
| 분광장치 메인 (소계) | 20,000,000 |
| 합계(원) | 125,481,642 |

2-5. 연구의 기술적/경제적 성과

2-5-1. 연구의 기술적 성과

- 세계최고 수준의 고감도 기관형 표면증강라만산란 센서 소재를 개발
- 센서칩과 휴대용 장비가 일체화된 형태의 시스템 기술개발 완료
- 잔류 농약을 0.01 ppm 수준까지 검출할 수 있는 라만증강 기술 실증 완료
- 분자 및 기능성 박테리오파지를 기반으로 한 선택형 유해물질 판별기술 개발
- 현장에서 간단하게 잔류 농약 및 유해물질을 검출하고 유통 이후에도 소비자가 쉽게 잔류농약을 검출할 수 있는 휴대용 농산물 유해물질 판별기술 개발
- SERS 기관의 표면처리기술(리셉터, 박테리오파지, 분자각인 고분자 등)을 통한 선택성 향상 기술을 통해 복합시료 중에 특정 잔류농약의 검출 성능 향상
- 다중 동시분석을 위한 스펙트럼 표준화 기법 및 잡음제거(de-noising) 기법 개발 완료
- SERS 스펙트럼을 이용한 저 농도 농약의 다중 동시 분석 알고리즘 개발
- Thiabendazole 농약의 검출을 위한 분자각인 고분자 기반 전처리 시스템 개발
- 라만 맵핑 분석법을 이용한 나노필라 센서 기관의 물리화학적 특성 평가기술 개발
- 경쟁면역 분석 반응을 위한 고폴이 독소 복합체의 나노 필라센서 기관 고정화 기술 개발
- 3종 고폴이독소에 대한 다중 라만 이미지기반의 고감도 분석기술 개발
- 면역친화칼럼과 휴대용 라만 리더기를 이용한 고폴이 독소 현장 검출 기술 개발

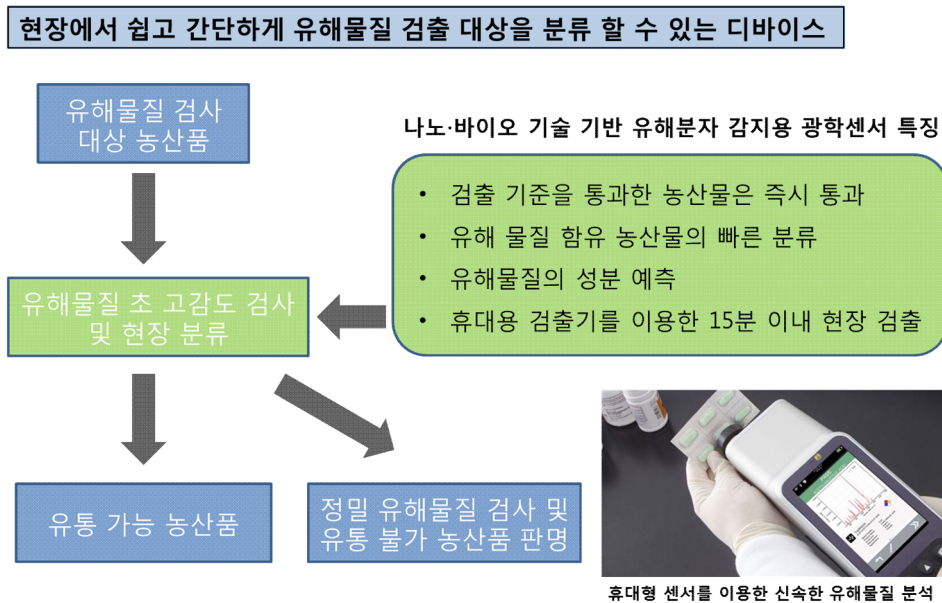


그림 2-112. 개발 기술의 현장 적용 형태

2-5-2. 연구의 경제적 성과

- 현장에서 상시 측정이 가능한 잔류농약 및 식품 안전 바이오센서가 개발된다면, 농식품의 생산, 유통, 소비 전반에 적용 가능.
- 농·식품의 신뢰성 강화, 안전한 농산물 소비의 인식 제고로 인하여 사회 안전 및 국민 보건향상에 크게 기여함.
- 식품 내 독소(Microtoxin 등) 검출과 잔류농약 검출 분야가 가장 큰 성장률을 보일 것으로

예측됨.

- 세계 바이오센서 시장은 2016년 기준 14조로 추정되고 연 평균 성장률 10%를 나타내고 있음. 그 중 잔류 농약과 같은 유해물질 검출과 관련된 시장은 2조 3천억 정도로 파악됨.
- 개발 기술을 확대하여 질병 진단, 환경 모니터링산업, 바이오·헬스케어산업 등으로 발전할 경우 2019년 20조 정도의 세계시장에 진입할 수 있을 것으로 기대됨.



그림 2-113. 개발 기술의 응용분야

- 전 세계적으로 Raman spectroscopy 시장 규모는 2016년 기준 약 1조3,000억원으로 추산되며, 2021년에는 약 2조1,000억원으로 예상됨. 이 중 아시아-태평양 지역 시장이 차지하는 규모는 2,500억원이며 (BCC Research, Global Market for Raman Spectroscopy, Sep 2016), 그 중에서도 국내 시장은 약 4~500억원으로 추정됨.
- 이러한 추정치는 여러 가지 형태의 라만 분광기, 즉, probe-based Raman, FT-Raman, handheld type Raman, micro-Raman 등을 모두 합산한 규모이며, 이 중 본 개발 기술에 해당되는 제품군은 probe-based Raman 에 해당됨. Probe-based Raman spectroscopy 만의 세계 시장 규모는 2016년 기준 약 3,900억원이며, 2021년에는 약 6,200억원으로 늘어날 것으로 예상됨. 아시아-태평양 지역 시장의 경우 2016년에는 810억원, 2021년에는 1,420억원으로 추정되며, 국내 시장 규모는 약 100~150억원으로 추산됨. 이것은 라만 분광기 하드웨어만의 시장으로, 향후 SERS 스트립의 활용이 본격화되는 시점에서는, 그 파급효과는 매우 커질 수 있으며, 라만 분광 리더기도 선도적인 기술적인 준비가 필요함.
- 특히 SERS 기판을 활용한 다양한 저농도 감지 응용 연구에 대한 관심이 많아지고 있음. SERS 기판을 활용하면 고가의 라만 분광기가 없이도 충분한 시그널을 확보할 수 있어 부피가 적은 포터블 라만 리더기의 성능으로도 다양한 연구 수행이 가능함. 개발된 라만 분광 리더기는 현재 본 과제 용도로 최적화 되어 있으나, 다른 어플리케이션으로도 확장 가능하여, SERS 관련 기술 연구를 촉진시킬 것으로 기대됨.

- SERS와 라만 분광 리더기를 패키지화 한 제품화 기술은 아직까지 국내외 업체에 의해 출시된 사례가 없어, 고감도 검출이 요구되는 분야에서 차별화된 성능 구현이 가능한 분석 기법으로 선도적인 역할을 할 수 있을 것임.

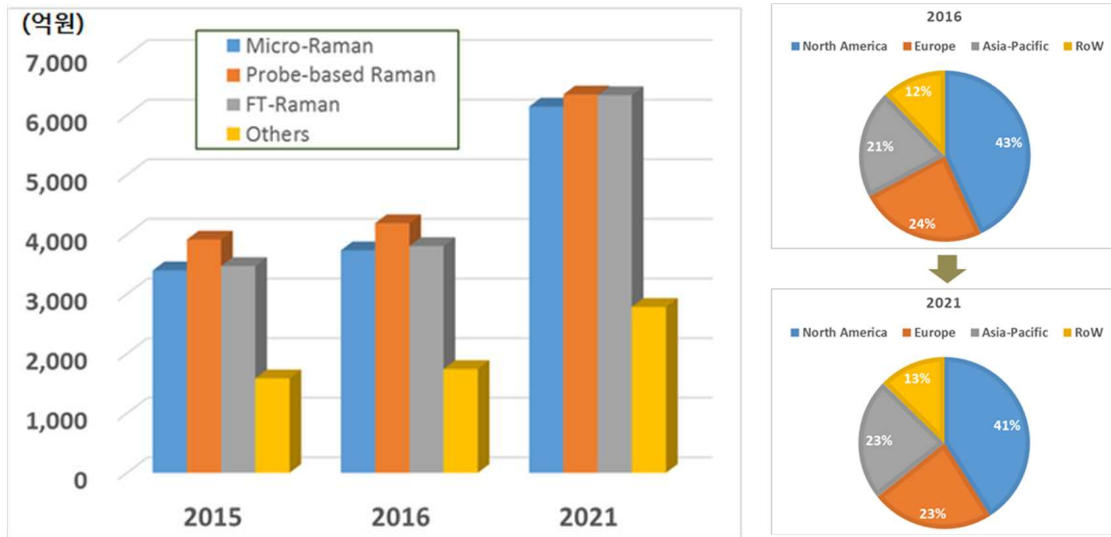


그림 2-114. Instrument type별 Raman spectroscopy 시장 구분 : BCC Research, Global Market for Raman Spectroscopy, Sep 2016 (환율 : 1USD = 1200원 계산)

2-6. 종합 결론 (총괄기관)

- 본 과제는 농산물 내 미량으로 존재하는 유해물질을 초고감도로 검출하기 위해, 나노바이오소재기술을 융합하고 휴대형 라만분광리더기와 일체화하는 것으로 세계최초의 개발 목표를 성공적으로 달성하였음. 라만분광신호증폭기술인 SERS기술은 40여년간 학술연구의 단계에 머물러 있었으나 본 개발과제를 통해 실제 현장에서 사용가능한 수준으로 기술을 일진보시킨 것은 기술적으로나 산업적으로 매우 큰 의미를 지니고 있음. 과제 수행결과 핵심기술 및 주요성능치에 기술목표는 모두 초과달성하였으며, 사업화지표(특허, 기술실시)와 연구기반지표(학술성과, 홍보 등) 측면에서도 당초 계획한 실적을 초과달성하였음. 실제 농식품 물류현장에서 본 기술을 적용함에 있어, 특정 농산물에 특화된 시료 전처리기술의 발굴한다면 그 활용도가 높을 것으로 기대함.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

| 구분 | 내용 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|---|-----------------|----------|----------------------------|----------|----|------------|------------------|----------|----------|----------------------------|-----------------|---------|---------------|----------|-----------------|-------------|---|----------|------------------|--------|----------|----------|----------|-------------|---------|----------|------------|---------------|---------|----------|-----------------------|-------|--------------|--------|-------|--|-----------|-------|---------|--|--------------|-------|-------|--|
| 최종목표 | 나노바이오 소재기술을 활용하여 농산물 내 유해물질을 현장에서 초고감도로 빠른 시간 내에 판별할 수 있는 센서 칩과 검출기기를 개발 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 세부목표 | <p>○ 주요 기능</p> <ul style="list-style-type: none"> - WHO기준 맹독성 잔류농약 초고감도 검출성능 구현(3종 이상) - 농산물품질관리원 개별분석대상 고위험군 잔류농약성분 초고감도 검출 (제초제, 살충제, 살균제 계열) - 농산물 내 유해 곰팡이독소(3종 이상) 동시분석이 가능한 라만기반 면역분석법 개발 - 현장에서 15분 이내 농산물 유해물질 판별 가능 <p>○ 주요 성능치</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>농약성분</th> <th>MRL(식약청 잔류허용기준)</th> <th>검출감도 목표치</th> <th>비고</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="3">WHO 맹독성 농약</td> <td>Parathion-methyl</td> <td>0.05 ppm</td> <td rowspan="3">0.01 ppm</td> <td rowspan="3">PAN list of HHPs (2015) 기준</td> </tr> <tr> <td>Azinphos-methyl</td> <td>0.1 ppm</td> </tr> <tr> <td>Methamidophos</td> <td>0.05 ppm</td> </tr> <tr> <td rowspan="5">농관원 개별분석대상 잔류농약</td> <td>Difenzoquat</td> <td>-</td> <td rowspan="3">0.01 ppm</td> <td rowspan="3">Bipyridylum계 제초제</td> </tr> <tr> <td>Diquat</td> <td>0.02 ppm</td> </tr> <tr> <td>Paraquat</td> <td>0.05 ppm</td> </tr> <tr> <td>Nereistoxin</td> <td>0.1 ppm</td> <td>0.01 ppm</td> <td>곤충신경계 교란물질</td> </tr> <tr> <td>Thiabendazole</td> <td>0.2 ppm</td> <td>0.01 ppm</td> <td>Benzimidazole계 살균성 농약</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">곰팡이독소</td> <td>Aflatoxin B1</td> <td>10 ppb</td> <td>1 ppb</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Fumonisin</td> <td>2 ppm</td> <td>0.1 ppm</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Ochratoxin A</td> <td>5 ppb</td> <td>1 ppb</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>○ 핵심 기술</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 유해물질 검출용 분자라만신호증폭 나노소재 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 초고밀도 나노구조화 및 다중 SPR 계면기술을 통한 고성능 라만신호증강 기관소재(SERS) 제조기술 확보 (특허 5건 이상) - 분자검출 기관소재의 라만신호증강지수 > 10⁷ (기관지름 4인치 이상) - SERS 기관소재의 기능성 부여를 위한 초분자 표면개질 기술 - 선택검출용 나노프로브 입자 부착 및 집적화 어레이 기술 개발 | | 농약성분 | MRL(식약청 잔류허용기준) | 검출감도 목표치 | 비고 | WHO 맹독성 농약 | Parathion-methyl | 0.05 ppm | 0.01 ppm | PAN list of HHPs (2015) 기준 | Azinphos-methyl | 0.1 ppm | Methamidophos | 0.05 ppm | 농관원 개별분석대상 잔류농약 | Difenzoquat | - | 0.01 ppm | Bipyridylum계 제초제 | Diquat | 0.02 ppm | Paraquat | 0.05 ppm | Nereistoxin | 0.1 ppm | 0.01 ppm | 곤충신경계 교란물질 | Thiabendazole | 0.2 ppm | 0.01 ppm | Benzimidazole계 살균성 농약 | 곰팡이독소 | Aflatoxin B1 | 10 ppb | 1 ppb | | Fumonisin | 2 ppm | 0.1 ppm | | Ochratoxin A | 5 ppb | 1 ppb | |
| | 농약성분 | MRL(식약청 잔류허용기준) | 검출감도 목표치 | 비고 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WHO 맹독성 농약 | Parathion-methyl | 0.05 ppm | 0.01 ppm | PAN list of HHPs (2015) 기준 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Azinphos-methyl | 0.1 ppm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Methamidophos | 0.05 ppm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 농관원 개별분석대상 잔류농약 | Difenzoquat | - | 0.01 ppm | Bipyridylum계 제초제 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Diquat | 0.02 ppm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Paraquat | 0.05 ppm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Nereistoxin | 0.1 ppm | 0.01 ppm | 곤충신경계 교란물질 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Thiabendazole | 0.2 ppm | 0.01 ppm | Benzimidazole계 살균성 농약 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 곰팡이독소 | Aflatoxin B1 | 10 ppb | 1 ppb | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Fumonisin | 2 ppm | 0.1 ppm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Ochratoxin A | 5 ppb | 1 ppb | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

2) 나노바이오소재를 활용한 유해물질 선택검출 기술 개발

- 박테리오파지 작용기 발현을 통한 유해물질 바이오리포터 개발(3종 이상)
- 다중 독소검출용 박테리오파지-라만 프로브 제작
- 유해곰팡이독소 검출용 바이오나노 센서 칩 개발

3) 고감도 휴대용 라만분광검출 시스템 개발

- 라만리더기 시제품 개발 사양

| | 항목 | 사양 | 비고 |
|---|--------|-----------------------------|---------------|
| 1 | 레이저 파장 | 785nm 또는 633 nm | 최적 레이저 파장 선정 |
| 2 | 분광과장대역 | 200 ~ 2400 cm^{-1} | |
| 3 | 과장분해능 | 12 cm^{-1} | 스펙트럼 FWHM 측정 |
| 4 | 스캔 영역 | 10 mm | 1축 포인트 스캔 기준 |
| 5 | 디텍터 크기 | 280 x 200 x 100 mm 이내 | 전체 시스템 최외곽 크기 |

- 농산물 유해물질 DB구축 및 S/W 개발
- 나노바이오 센서 칩과 라만리더기 통합 기술
- 극미량의 유해물질 현장판별이 가능한 초고감도 진단기기 상용화

4) 농산물 내 잔류농약/유해독소 판별기술 실증시험

- 검출대상 농산물에 대한 전처리 기술 개발
- 비선형 판별법을 적용한 품목별 최적의 유해물질 판별법 개발
- 기존 고성능 정밀실험분석법(질량분석 외)과의 비교분석 평가

○ 적용 범위

- 수입 농산물 내 맹독성 잔류농약 및 곰팡이 독소성분의 실시간 현장진단을 통한 국내 유통 차단
- 고부가가치 유기농 농식품에 대한 유통 인증 수단으로 활용 가능
- 학교, HACPP 인증시설 등 단체급식 식자재의 먹거리 안전수단으로 활용
- 고위험군 농약의 무분별한 사용에 대한 인식제고 및 원천 차단

3-2. 목표 달성여부

| 구분 (연도) | 세부과제명 | 세부연구목표 | 연구 내용 | 평가 방법 | 달성도 (%) |
|--------------------|---------------------------------------|---|---|---|------------|
| 1차 년도 (2016) | 나노 바이오 기술을 활용한 농산물 유해물질 감도 판별 기술 개발 | ○ 나노표면구조화 기술을 이용한 라만 신호 증폭 분자센싱 기관소재 개발 / 선택성 초분자 및 유도체 합성 목표 잔류 농약 종류 선정 | ○ 고분자 표면 나노돌기 형성 및 귀금속 증착을 통한 고감도 분자센싱 기관 소재 개발 ○ 초분자 유도체를 확보하고 잔류농약에 대한 선택성 검증 | ○ 분자센싱 기관 나노 구조 이미징, 라만 증강 지수 평가, 라만 신호 균일도 평가 ○ 초분자 유도체 - 농약 간 선택성 문헌조사 | 100 |
| | 바이오 화학 유해물질 선택기 개발 및 통계 분석 방법 개발 | ○ 농산품 유해물질과 특이 결합 할 수 있는 펩타이드 서열 확보 | ○ 파지-디스플레이 기법을 통한 유해물질 선택적 결합 펩타이드 서열 발굴 ○ WHO에서 선정한 맹독성 농약 중 Parathion-methyl 및 농관원에서 제시한 잔류농약 개별 분석 대상 농약 중 Difenzoquat, Diquat, Paraquat 선택적 결합 서열 문헌 조사 | ○ pIII 부분에 랜덤으로 발현 된 염기서열 종류가 10 ⁶ 개 이상인 파지 디스플레이 키트를 이용하여 잔류 농약 등 유해물질과 반응성이 높은 펩타이드 서열 확보 유무 ○ 문헌을 통한 Parathion-methyl 특이 결합 서열 구축 유무 | 100 |
| | 농산물 유해물질 검사장 위한 휴대용 라만 분광 장치 개발 | ○ 소형 라만 분광 분석기 요소기술 개발 | ○ 선풍 관리와 안정화된 출력 특성이 유지되는 레이저 출력 제어 모듈 설계 ○ 레이저와 타겟 시편까지의 거리를 고려하고, 집광력을 최대화 한 레이저 조명 광학계 설계 ○ 레이저의 단 파장성을 보강하기 위한 레이저 전용 필터인 Laser cleaning optic 설계 ○ 소형 레이저 모듈 구동을 위한 드라이버 및 컨트롤러 모듈 제작 | ○ 소형 레이저 조명 모듈 및 컨트롤러 개발 여부 ○ 파장 안정화 레이저 광원 광학계 설계 및 제작 여부 ○ 하드웨어 디자인에 적합하게 설계된 레이저 드라이버 모듈과 전용 컨트롤러 확보 여부 | 100 |
| | 독소 단백질 검출용 나노구조체/집적화 어레이 기반 나노바이오 광센서 | ○ 고감도 라만 신호 증폭용 나노입자 제작 및 독소 검출용 나노프로브 개발 | ○ 균일도와 안정성 높은 다중 분석용 나노프로브 제작 ○ 농산물 유해인자 독소에 대한 특이적 결합능을 갖는 표준 항체 확보 및 효율성 평가 (경쟁 면역 분석법 기반) | ○ 2-3개월 이상 보관 나노프로브 균일도 측정 및 안정성 광학 측정 ○ 주사전자현미경 평가 ○ 농산물 유해인자 독소 검출에 대한 ELISA 수행 | 100 |
| | 농산물 유해물질 초고감도 판별 기술 검증 및 현장 적용 연구 | ○ 농산물 유해물질 검체 선정 및 기본 특성 확보 | ○ 국립농산물품질관리원의 연구대상 농약에 대한 기본 자료 제공 | ○ 목표로 하고 있는 유해물질의 특성 파악 여부 | 100 |

| | | | | | |
|--------------------|---------------------------------------|---|---|--|-----|
| 2차 년도 (2017) | 나노기술을 활용한 유해물질 감도 기술 개발 | <ul style="list-style-type: none"> 다중 SPR계면 센서 기판을 통한 민감도 향상 연구/센서 기판의 초분자체 표면개질 실증 및 초분자체-농약 결합 특성 검증 | <ul style="list-style-type: none"> 나노돌기 상 3차원 다층구조 형성을 통한 세계최고 민감도 분자센싱 필름 형성 초분자 유도체의 표면개질 공정 확립 초분자 - 농약 결합력 광학적 평가 실시 | <ul style="list-style-type: none"> 3차원 다층구조 플라즈몬릭 효과 시뮬레이션 라만증강지수, 균일도 평가 초분자-농약 결합 후 흡광 변화, Circular Dichoroism 변화 확인 | 100 |
| | 바이오화합물의 유해물질 선택기 개발 및 분석 방법 | <ul style="list-style-type: none"> 유해물질검출 박테리오파지 수용체 개발, 유해물질 전처리 방법 및 전처리용 각인 고분자 | <ul style="list-style-type: none"> 잔류 농약 및 곰팡이독소의 고감도 검출을 위한 기능성 박테리오파지 개발 박테리오파지 표면 및 외각부 엔지니어링 기능성 박테리오파지의 선택적 특성 평가 분석대상 물질 선정(TBZ) 및 전처리용 분자각인 고분자 합성과 카트리지 제작 | <ul style="list-style-type: none"> 유전자 조작을 통해 기능성 박테리오파지 구축 선택성 높은 기능성 박테리오파지 구축 유무 선택적 결합력 측정 기술 구축 (SPR 구축) 유무 액체크로마토그래피로 분자각인고분자와 비각인 고분자의 성능평가 진행 및 분자각인 고분자의 binding site를 확인 | 100 |
| | 농산물 유해물질 장검사를 위한 휴대용 분광장치 개발 | <ul style="list-style-type: none"> 라만 분광 광학헤드 프로토타입 제작 | <ul style="list-style-type: none"> Focusing optics를 설계, Rayleigh filter 광학계, 노치 필터와 에지 필터 배치 설계 목표 성능 사양의 스펙트럼미터를 설계하고 파수범위와 분해능에 따라 유연하게 사양 변경할 수 있는 설계 기법 확립 여러 상용 디텍터를 장착하고, 농약의 농도를 변경하며 LOD 수준을 측정하여 스펙트로메터의 성능을 평가함으로써 최적 디텍터 선정 | <ul style="list-style-type: none"> 시그널 분석 알고리즘과 라이브러리 구축 실험을 착수할 수 있는 라만 분광 광학헤드를 개발 여부 스펙트럼미터부 최적 디텍터 선정 여부 | 100 |
| | 독소 단백질 검출용 나노구조체/집적화 어레이 기반 나노바이오 광센서 | <ul style="list-style-type: none"> 곰팡이독소 검출용 나노프로브/집적화 어레이 기반 면역분석법 개발 (1세부 협력) | <ul style="list-style-type: none"> 라만신호 매핑 분석을 통한 표면플라즈몬 증폭 나노필라 센서기판의 표면증강라만 산란 신호 특성 평가 경쟁면역분석법을 이용한 표면플라즈몬 증폭 나노프로브/나노필라 센서기판을 이용한 곰팡이 독소 면역분석법 개발 및 정량분석 기술 개발 | <ul style="list-style-type: none"> 서로 다른 두 반도체 공정에 의해 제작된 나노필라 기판의 라만 신호 매핑 비교 Evaporation 나노필라 기판의 강한 신호증폭(7배 증폭) 및 균일성 확인 고감도 나노프로브/나노필라 직접화 어레이 기반의 곰팡이 독소 면역 분석법 개발, 특이성 평가 및 표준정량곡선 확보 | 100 |
| | 농산물 유해물질 초고감도 판별기술 검증 및 현장 적용 연구 | <ul style="list-style-type: none"> 농산물 유해물질 검체 전처리 기술 개발, 검체 제공 | <ul style="list-style-type: none"> 농산물 유해물질 검체에 따른 최적의 전처리 기술 개발 | <ul style="list-style-type: none"> 기존 정밀분석장비를 분석을 위한 전처리 방법 적용 가능여부 검토 | 100 |

| | | | | | |
|--------------------|-----------------|--|---|---|-----|
| 3차 년도 (2018) | 나노기술을 활용한 산물질감기 | <ul style="list-style-type: none"> ○ SERS기판상에 선택성 박테리오파지 수용체 및 분자체가 표면개질된 센서 칩 개발, 선택적 잔류 농약 검출 및 한계 분석 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 은나노선 기판 표면에 기능성 박테리오파지 표면개질 후 선택성 농약 검출 특성 확인 ○ 초분자 표면개질 SERS기판의 잔류 농약 선택성 검증 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 박테리오파지가 표면개질된 SERS기판의 농약 용적 후 세척 전후 신호 비교, 라만 이미징, 분광분석 실시 ○ 초분자 표면개질 SERS기판의 타겟 농약 용적 후 세척 전후 신호 비교, 사파 내 잔류 농약 라만신호 검출 확인 | 100 |
| | 바이오화학유해물질선택기 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 박테리오파지 수용체의 평가 및 선택성 통계분석 수행 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 선택성이 높은 기능성 박테리오파지와 SERS기판 결합 및 유해물질 검출한계 분석 ○ 새로운 파지 수용체인 SPPWPPRP, PWP, PRP, WRP 개발에 따른 기능성 박테리오파지의 PQ, DQ, DIF에 대한 흡착 특성 분석 ○ 분자각인 고분자 전처리 시스템 적용을 ndl한 최적의 실험조건 탐색 및 실제 시료, 표준용액을 이용한 분자각인 고분자의 성능 실험 진행 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 결합력 분석 검증 기술 구축 (ITC 분석법) ○ ITC 법을 사용한 binding affinity 측정 결과 유무 ○ SPPWPPRP 파지 수용체: 주요 농약인 PQ와 DQ에 선택적으로 흡착파지 수용체 개발 유무 ○ SPPWPPRP 기능성 파지 흡착 반응의 선택성을 검증하기 위해 기능성 파지를 SERS 기판에 소량 첨가하여 대상 농약에 대한 라만을 측정 유무 ○ SPPWPPRP 기능성 파지를 사용한 SERS 측정 유무 ○ 농관원에서 제공 받은 실제 시료 용액으로 분자각인 고분자 카트리지를 통과시키고 통과한 용액을 HPLC, 표면증강라만 측정 | 100 |
| | 농산물유해물질장기감시위장기 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 시스템 통합 프로토타입 제작, S/W 및 DB확립, 휴대형 라만리더기 성능 검증 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 실행하면 자동으로 미리 지정된 관심 영역 좌표를 스캔하여 유효 시그널을 디스플레이하는 포터블 통합 하드웨어 시제품 구현 ○ 규정된 스트립을 삽입 후 실행 버튼을 클릭하면 최종적인 맵핑 결과가 디스플레이 되는 소프트웨어 개발 ○ 다수의 원형 SERS 어레이 형태를 스캐닝할 수 있는 컨트롤러를 구현. 특징 피크 밴드를 설정하여, 이에 대한 컬러 맵핑을 수행하여 시각적인 판별이 가능한 결과 도출 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 시스템 통합 하드웨어 플랫폼 제작 및 2차 시제품 제작 여부 ○ 스트립 스캐너 구동과 라만 스펙트럼의 취득이 동기화되고 기본적인 맵핑을 할 수 있도록 동작 여부 ○ 유해 물질 검출을 위한 특징 판별 알고리즘 적용 여부 | 100 |

| | | | | | |
|--------------------|---|-----------------------------------|--|--|-----|
| | 독소 단백질 검출용 나노구조체/집적화 어레이 기반 나노바이오 광센서 | ○ SERS기반 독소 검출 석법 개발 | ○ 경쟁면역분석법을 이용한 표면 플라즈몬 증폭 나노 프로브/나노필라 센서 기반 고품광이 독소 면역 분석법 개발 | ○ 3중 고품광이 독소의 경쟁면역반응체인 독소-BSA 복합체를 각각의 나노필라기판에 고정화 진행 ○ 고품광이 독소 고감도 검출용 나노 프로브와 직접화 어레이를 통해 고품광이 독소 면역 분석법 구현 ○ 고품광이 독소 오크라톡신, 아플라톡신, 푸모니신에 대해서 각각의 정량평가결과 0.006 ppb, 0.005 ppb, 0.005 ppb의 검출감도 확인 ○ 혼합물을 통한 분석법 특이성 평가 및 단일 고품광이 독소의 농도에 따른 정량 평가 | 100 |
| | 농산물 유해물질 초고감도 판별기술 검증 및 현장적용 연구 | ○ 라만분광분석결과 비교분석 및 실증 평가 수행 | ○ 라만분광분석과 농산물 유해물질 분석 결과의 비교, 검토 | ○ 정밀실험 분석법(질량 분석) 결과와 선택성, 민감도, 정확성, 검출 시간 등의 비교 검토를 통한 효용성 평가 | 100 |
| 4차 년도 (2019) | 나노 바이오테크놀로지를 활용한 농산물 유해물질 초고감도 판별 기술 개발 | ○ 초고감도 분자센서 시스템 현장검증 증 및 검출성능 최적화 | ○ 검출 목표 잔류농약 검출 한계 검증 ○ 휴대용 라만 리더기와 일체화 하여 농관원에서 실증 평가 실시 | ○ 검출 목표 잔류농약의 농도별 라만신호를 휴대용 라만 리더기로 평가, 검정 곡선 획득 후 소프트웨어 적용 ○ 농관원 잔류농약 검출 전문가를 대상으로 기술 시연 실시 | 100 |
| | 바이오 화학기반의 유해물질 선별 기술 및 통계 분석 방법 개발 | ○ 다중 동시분석을 위한 통계기반 정량분석 알고리즘 개발 | ○ 스펙트럼의 표준화 기법과 잡음처리 기법을 적용하여 다중 동시분석의 정확도를 향상시킴 | ○ 주성분 분석을 통한 두 종류의 농약 혼합물의 정성분석 평가 | 100 |
| | 농산물 유해물질 현장 검사를 위한 휴대용 라만 분광 장치 개발 | ○ 휴대 및 편의성 강화된 현장 검출용 시제품 제작 | ○ 움직이는 분광 측정 모듈 부분의 소형화를 통해서, 양산형 시제품을 설계 제작함. 휴대성을 강화하기 위해 디스플레이 및 요소 모듈의 컨트롤러가 통합된 일체형 시스템으로 제작 ○ 양산형 시제품 디자인은 터치스크린을 내장하고 있어, 화면 터치방식으로 운용되며, 상부에 설치된 내장형 프린터를 이용해서 결과를 출력할 수 있음 ○ 현장용 컨트롤러 및 운영 소프트웨어 개발 | ○ 현장 검출용 라만 분광기의 양산형 시제품 제작 여부 ○ 디스플레이 통합된 일체형, 원버튼 동작 방식으로 구동하는지 여부 ○ 알려진 시료에 대한 적절한 구동 확인 여부 | 100 |
| | 독소 단백질 검출용 나노구조 | ○ 휴대용 라만리더기와 독소검출용 집적화 어레이의 | ○ 현장 검출에 적합한 고품광이 독소 전처리 모색 | ○ 농산물 품질관리원에서도 사용하는 Myco6in1+ 고품광이독 | 100 |

| | | | | |
|--|------------------------------------|--|---|-----|
| 체/집적화 어레이 기 반 나노바 이오 광센 서 | 통합 | | 소 면적 친화 칼럼은 사용법이 간편하고 소요되는 시간이 짧 아 현장에서 곰팡이 독소 전처리에 적합 함 | 100 |
| | | ○ 곰팡이 독소 현장 검출에 소요되는 시간을 줄이기 위한 라만 신호 패스트 매 핑 기술 개발 | ○ 라만 매핑 포인트 수 를 8281개에서 529개 로 축소하여 분석할 경우, 분석 소요시간 이 120분에서 9분으 로 짧아졌으며 이때 의 분석 표준편차는 ±3으로 신뢰할 수 있는 결과를 얻었음. | |
| 농산물 유해 물질 초고감 도 판별기술 검증 및 현 장적용 연구 | ○ 농산물 유해물질 SERS검출시험 인 증평가 실시 | ○ 본 과제 개발 시스템과 기 존 농약 검출법 비교 평가 | ○ 휴대용 라만 리더기 의 잔류농약 검출 성 능 확인 | 100 |

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 연구개발 계획서 상의 연구 목표를 모두 달성하였음

4. 연구결과의 활용 계획 등

○ 원천기술 활용

- 본 과제의 참여기관이 각기 확보하고 있는 나노바이오소재분야 강점기술들(재료연구소-초고밀도 나노갭 분자센싱소재, 부산대-박테리오파지 바이오소재, 한양대-면역분석용 나노프로브소재)을 서로 융합함으로써, 농산물 유해물질 검출판별뿐만 아니라 환경분야, 의료헬스케어산업분야에 폭넓게 적용될 수 있는 분자센싱 플랫폼 원천기술을 확보함.
- 공동 특허출원을 통해 지적재산권 확보를 완료하였고 본 과제 기술이전 건을 포함하여 과제 종료 후 기술이전의 수단으로 활용할 예정임.

○ 현장적용 방안

- 현재 시중에 상용화 되어 현장 진단 목적 유해물질 검출기기는 검출 성능이 다소 떨어짐. 본 과제 수행을 통해 KFDA에서 권고하는 농약 잔류허용치 (MRL)를 검출 할 수 있는 기술개발을 성공함.
- 개발 기술은 수입 농산물 통관 및 국내 농산품 유통 현장에서 실시간으로 인체에 치명적인 유해성분(잔류농약, 곰팡이독소 등)을 검출하고 해당 식자재를 선별 제거함으로써 국민 먹거리 안전 확보방안으로 활용될 수 있음.
- 학교, 군부대 등 전국 43,000여 단체급식소 현장에서 조리 전 식자재의 안전성 평가에 활용함으로써 단체 급식사고를 미연에 방지할 수 있는 수단으로 활용 가능함.

○ 제품화 및 사업화 방안

- 현재 상용화된 휴대용 라만리더기는 저농도 유해성분검출이 가능한 SERS기판 및 센서 칩과 통합될 수 없는 한계가 있음. 본 과제를 통해 센서 칩과 일체화될 수 있는 라만리더기를 제작하였고 판매가를 기존 수입제품의 1/3선으로 낮추어 공급하고자 함.
- 수익창출 모델로는 일회용인 센서 칩(스트립)을 공급함으로써 지속적인 매출 발생과 수익성 확보가 가능할 것으로 판단함.
- 본 사업에서 개발된 초고감도 휴대용 농산물 유해물질 검출시스템은 선진국에서도 아직 상용화되지 않음. 초고감도 화학센서 산업분야에서 국내 시장은 물론 해외시장 개척을 이룰 수 있을 것으로 기대함.

○ 상용화 시 측정 항목 확대 계획

- 검출 이후 각각의 농약의 정보는 고유 라만 신호로 분석하여 구분 가능.
- 잔류농약 : 8종 → 현장에서 활용할 수 있는 수준으로 성분 수 확대.
- 곰팡이독소 : 3종(아플라톡신, 푸모니신, 오크라톡신A → 5종(아플라톡신, 푸모니신, 오크라톡신A, 제랄레논, 데옥시니발레놀)

○ 기술이전, 후속연구

- 농산물 유해물질 검출 대상물질을 확대하고, 축산물 및 수산물에 포함된 유해성분 검출에 활용함으로써 농림축산식품부 산하 시험검사기관에 응용처를 확대하고자 함.

- 본 과제의 연구성과물은 농산물 유해물질 판별뿐만 아니라, 환경 측정 모니터링 분야에 바로 적용될 수 있으므로 해당 기업체에 기술이전이 가능할 것으로 기대함.
- 나아가, 초고감도 분자센싱 플랫폼 기술은 바이오의료센서로 활용 가능함.

○ 신산업 창출 방안

- 유해물질 초고감도 센서기술을 바탕으로 바이오 의학 분야에 확대 적용하여 질병 조기 진단 및 체외 진단기기 시스템 개발에 활용될 수 있음. 한편, 환경오염 물질을 판별할 수 있는 센서로 개발하여 대기, 수질, 토양 등의 환경 모니터링 시스템 개발에 활용 가능함
- 국민 먹거리 안전 뿐만 아니라, 테러방지 및 마약검출차단에 이용되어 사회 보건·안전분야 신사업 창출에 기여할 수 있음.

<실시간 현장진단 라만기반 센서 응용분야>

| 응용분야 | 표지물질 |
|--------|--|
| 환경/식품 | <ul style="list-style-type: none"> • 수질 내 환경호르몬, 녹조 등과 같은 인체유해 물질 검출 • 식품에 포함되어 있는 잔류농약, 항생제, 병원균, 독소 등의 유해물질 및 부패촉진 물질검출 |
| 의학 | <ul style="list-style-type: none"> • 뉘스 분석을 통한 질병 진단 센서 • 혈액/타액 분석을 통한 바이오마커 검지 센서 |
| 산업공정 | <ul style="list-style-type: none"> • 화학공장, 정유공장, 제약회사 등 각 공장에서 배출되는 특정 화학물질에 대한 분석 |
| 군사/법의학 | <ul style="list-style-type: none"> • 사린, 탄저균, 라이신 등 대량 살상용 무기로 사용될 수 있는 생화학 테러물질 검출 • TNT, RDX와 같은 대량 살상 폭발물 검출 및 테러 방지 • 마약 검출 |

붙임. 참고문헌

- 1) Culture-Free Detection of Bacterial Pathogens on Plasmonic Nanopillar Arrays Using Rapid Raman Mapping, ACS Applied Materials & Interfaces, 10, 2018, 6831-6840
- 2) M13 Bacteriophage/Silver Nanowire Surface-Enhanced Raman Scattering Sensor for Sensitive and Selective Pesticide Detection, ACS Applied Materials & Interfaces, 10, 2018, 10388-10397
- 3) 3D-assembled Ag nanowires for use in plasmon-enhanced spectroscopic sensors, Applied Spectroscopy Reviews, 54, 2018, 325-347
- 4) Holographic Fabrication of 3D Nanostructures, Advanced Materials Interfaces, 5, 2018, 1800330
- 5) Sensitive and Reproducible Immunoassay of Multiple Mycotoxins Using Surface-Enhanced Raman Scattering Mapping on 3D Plasmonic Nanopillar Arrays, Small, 5, 2018, 1801623
- 6) SERS-Active-Charged Microgels for Size- and Charge-Selective Molecular Analysis of Complex Biological Samples, Small, 14, 2018, 1802520
- 7) Improvement of High Affinity and Selectivity on Biosensors Using Genetically Engineered Phage by Binding Isotherm Screening, Viruses, 11, 2019, 248
- 8) Direct visualization of a surface-enhanced Raman spectroscopy nano-gap via electrostatic force microscopy: Dependence on charge transfer from the underlying surface nano-gap distance, Applied Surface Science, 479, 2019, 874-878
- 9) Modifying Plasmonic-field Enhancement and Resonance Characteristics of a Spherical Nanoparticle on Metallic Film An Effect of Faceting Spherical Nanoparticles Morphology, Coatings, 9, 2019, 387
- 10) A facile low-cost paper-based SERS substrate for label-free molecular detection, Sensors and actuators. B, Chemical, 291, 2019, 369-377
- 11) Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for the Chemical Analysis of Food, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13, 2014, 317-328
- 12) Standing Gold Nanorod Arrays as Reproducible SERS Substrates for Measurement of Pesticides in Apple Juice and Vegetables, Journal of Food Science, 80, 2015, N450-N458
- 13) SERS-based pesticide detection by using nanofinger sensors, Nanotechnology, 26, 2015,

15502

- 14) Sensitive surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) detection of organochlorine pesticides by alkyl dithiol-functionalized metal nanoparticles-induced plasmonic hot spots, *Analytical Chemistry*, 87, 2015, 663-669
- 15) Self-assembly of silver nanoparticles and bacteriophage, *Sensing and Bio-Sensing Research*, 7, 2016, 146-152
- 16) Self-assembly Ag nanoparticle monolayer film as SERS Substrate for pesticide detection, *Applied Surface Science*, 270, 2013, 292-294
- 17) Rapid simultaneous detection of multi-pesticide residues on apple using SERS technique, *Analyst*, 139, 2014, 5148-5154
- 18) Preparation and Properties of Pesticide/Cyclodextrin Complex Intercalated into ZnAl-Layered Double Hydroxide, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 55, 2016, 1550-1558
- 19) Portable SERS-enabled Micropipettes for Microarea Sampling and Reliably Quantitative Detection of Surface Organic Residues, *Analytical Chemistry*, 87, 2015, 9217-9224
- 20) Observing Single Molecules Complexing with Cucurbit[7]uril through Nanogap Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Journal of Physical Chemistry Letters*, 7, 2016, 704-710
- 21) Highly sensitive SERS-based immunoassay of aflatoxin B1 using silica-encapsulated hollow gold nanoparticles, *Journal of Hazardous Materials*, 285, 2015, 11-17
- 22) Fe₃O₄@Graphene Oxide@Ag Particles for Surface Magnet Solid-Phase Extraction Surface-Enhanced Raman Scattering (SMSPE-SERS): From Sample Pretreatment to Detection All-in-One, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8, 2016, 14160-14168
- 23) Extraction of pesticides from contaminated soil via cyclodextrin complexation, *Chemosphere*, 91, 2013, 912-920
- 24) Cyclodextrins as complexation and extraction agents for pesticides from contaminated soil, *Chemosphere*, 91, 2013, 912-920
- 25) Beta-cyclodextrin decorated nanostructured SERS substrates facilitate selective detection of endocrine disruptor chemicals, *Biosensors and Bioelectronics*, 42, 2013, 632-639
- 26) A novel paper rag as 'D-SERS' substrate for detection of pesticide residues at various peels, *Talanta*, 128, 2014, 117-124

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 나노바이오기술을 활용한 농산물 유해물질 초고감도 판별기술 개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 나노바이오기술을 활용한 농산물 유해물질 초고감도 판별기술 개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.