

RS-2021
-321107

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업
2024년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004600-01

원예작물
의
생산성
향상을
위한
잣빛곰팡이병
조기
진단
기술
개발

2024

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

원예작물의 생산성 향상을 위한 잣빛곰팡이병 조기 진단 기술 개발

2024.06.11

주관연구기관 / 서울대학교
공동연구기관 / (주)나노베이스

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “원예작물의 생산성 향상을 위한 잣빛곰팡이병 조기 진단 기술 개발”
(개발기간 : 2021.04.01 ~ 2023.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

납본일자 2024.06.11

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 (대표자) 김재영 (위)

공동연구기관명 : (주)나노베이스 (대표자) 송경수



주관연구책임자 : 정대홍

공동연구책임자 : 홍정택

국가연구개발혁신법 제17조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

| 최종보고서 | | | | | | 보안등급 | | | | | | |
|-------------------------|----------------|---------------------------------|--|--------------------|----------------------------------|---------------------------|---------------|---------------|-------------------|--------|---------|--|
| | | | | | | 일반[√], 보안[] | | | | | | |
| 중앙행정기관명 | 농림축산식품부 | | 사업명 | 사업명 | | 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업 | | | | | | |
| 전문기관명 (해당 시 작성) | 농림식품기술기획평가원 | | | 내역사업명 (해당 시 작성) | | 진단기술 산업화 | | | | | | |
| 공고번호 | 농축2021-55호 | | 총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성) | | | | | | | | | |
| | | | 연구개발과제번호 | | 321107-3 | | | | | | | |
| 기술분류 | 국가과학기술 표준분류 | 작물보호 (식물병리/해충방제) (LB0304) | 30% | 바이오센서 (LA0702) | 40% | 원예작물 시설/재배 (LB0203) | 30% | | | | | |
| | 농림식품과학기술분류 | 생물보호 (RA0304) | 30% | 나노소재 (CA0104) | 40% | 원예작물 재배·생산 (AA0203) | 30% | | | | | |
| 총괄연구개발명 (해당 시 작성) | | 국문 | | | | | | | | | | |
| | | 영문 | | | | | | | | | | |
| 연구개발과제명 | | 국문 | 원예작물의 생산성 향상을 위한 잿빛곰팡이병 조기 진단 기술 개발 | | | | | | | | | |
| | | 영문 | Development of early diagnosis technology for gray mold disease to improve productivity of horticultural crops | | | | | | | | | |
| 주관연구개발기관 | | 기관명 | 서울대학교(서울대학교 산학협력단) | | 사업자등록번호 | 119-82-03684 | | | | | | |
| | | 주소 | (우:08826) 서울특별시 관악구 관악로 1 | | 법인등록번호 | 114371-0009224 | | | | | | |
| 연구책임자 | | 성명 | 정대홍 | | 직위 | 교수 | | | | | | |
| | | 연락처 | 직장전화 | 02-880-8012 | | 휴대전화 | 010-9008-7354 | | | | | |
| | | | 전자우편 | jeongdh@snu.ac.kr | | 국가연구자번호 | 10093352 | | | | | |
| 연구개발기간 | | 전체 | 2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2년 9개월) | | | | | | | | | |
| | | 단계 (해당 시 작성) | 1단계 | 1년차 | 2021. 04. 01 - 2021. 12. 31(9개월) | | | | | | | |
| | | | | 2년차 | 2022. 01. 01 - 2022. 12. 31(1년) | | | | | | | |
| | | | 2단계 | 1년차 | 2023. 01. 01 - 2023. 12. 31(1년) | | | | | | | |
| 연구개발비 (단위: 천원) | | 정부지원 연구개발비 | 기관부담 연구개발비 | 그 외 기관 등의 지원금 | | | | 합계 | 연구개발비 외 지원금 | | | |
| | | 현금 | 현금 | 현물 | 현금 | 현물 | 현금 | 현물 | 현금 | 현물 | 합계 | |
| 총계 | | 900,000 | 5,250 | 26,750 | 0 | 0 | 0 | 0 | 905,250 | 26,750 | 932,000 | |
| 1단계 | 1년차 | 245,000 | 3,000 | 7,000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 248,000 | 7,000 | 248,000 | |
| | 2년차 | 328,000 | 1,300 | 11,700 | 0 | 0 | 0 | 0 | 329,300 | 11,700 | 329,300 | |
| 2단계 | 1년차 | 327,000 | 950 | 8,050 | 0 | 0 | 0 | 0 | 327,950 | 8,050 | 336,000 | |
| 공동연구개발기관 등 (해당 시 작성) | | 기관명 | 책임자 | 직위 | 휴대전화 | 전자우편 | 비고 | | 역할 | 기관유형 | | |
| 공동연구개발기관 | | (주)노베이스 | 홍정택 | 과장 | 010-2935-7660 | jithong@hanobase.co.kr | | | 공동 | 중소기업 | | |
| 위탁연구개발기관 | | | | | | | | | | | | |
| 연구개발기관 외 기관 | | | | | | | | | | | | |
| 연구개발담당자 실무담당자 | | 성명 | 손원기 | | 직위 | | 대학원생 | | | | | |
| | | 연락처 | 직장전화 | 02-880-9258 | | 휴대전화 | | 010-3383-2019 | | | | |
| | | | 전자우편 | sownz24@snu.ac.kr | | 국가연구자번호 | | 11695257 | | | | |

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024년 2월 25일

연구책임자: 정대홍

주관연구개발기관의 장: 김재영 (직인)

공동연구개발기관의 장: 송경슈 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

| | | | | | | | |
|------------------------|----------------|--|--------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------|-----|
| 사업명 | | 작물바이러스 및 병해충대응 사업화 기술개발 사업 | | 총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성) | | | |
| 내역사업명 (해당 시 작성) | | | | 연구개발과제번호 | | 321107-3 | |
| 기술 분류 | 국가과학기술 표준분류 | 작물보호 (식물병리/해충방제) (LB0304) | 30 % | 바이오센서 (LA0702) | 40 % | 원예작물 시설/재배 (LB0203) | 30% |
| | 농림식품 과학기술분류 | 생물보호 (RA0304) | 30 % | 나노소재 (CA0104) | 40 % | 원예작물 재배·생산 (AA0203) | 30% |
| 총괄연구개발명 (해당 시 작성) | | | | | | | |
| 연구개발과제명 | | 원예작물의 생산성 향상을 위한 잿빛곰팡이병 조기 진단 기술 개발 | | | | | |
| 전체 연구개발기간 | | 2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2년 9개월) | | | | | |
| 총 연구개발비 | | 총 936,000 천원 (정부지원연구개발비: 900,000 천원, 기관부담연구개발비 : 32,000 천원) | | | | | |
| 연구개발단계 | | 기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[] | 기술성숙도 (해당 시 기재) | | 착수시점 기준(3) 종료시점 목표(6) | | |
| 연구개발과제 유형 (해당 시 작성) | | | | | | | |
| 연구개발과제 특성 (해당 시 작성) | | | | | | | |
| 연구개발 목표 및 내용 | 최종 목표 | ○ 나노광학 기반 원예작물 진균 감염 조기 현장 진단 기술 개발 • 원예작물 내 초기 감염 메커니즘과 형태학적 변화 모니터링을 통한 표적 물질 선정 • 표적 물질에 대해 단분자 검출 민감도를 갖는 나노광학 센서 개발 • 나노센서의 원예작물 적용 최적화 및 검증 • 이동형 측정 장비 개발 및 신뢰성 시험 데이터 확보 및 검증 | | | | | |
| | 전체 내용 | <정의한 난제> • 진균류 감염으로 식물 체내 면역 반응이 일어나는 동안은 육안으로 변화를 관찰할 수 없고, 식물의 형태적 변화가 관찰되었을 때는 이미 시설 내 감염이 확산된 상태임 • 조기 진단이 가능하면 대처는 환기 등 매우 간단하고, 예방을 위한 약제 과용 부작용을 막을 수 있음 <기술적 도전> • 기술 숙련도의 요구수준이 낮은 현장 진단 기술 (비파괴, 실시간) • 형태적 변화 이전의 식물 면역반응 산물을 직접 측정 (매우 낮은 농도) • 다수의 표적물질에 대해 지속적 모니터링이 가능해야 함 <해결 전략> • 진균류 감염시 식물 체내에서 일어나는 면역 반응의 산물(Salicylic acid, Indole-3-acetic acid, adenosine triphosphate 등)을 표적물질을 식물 체내에서 검출 • 식물 체내 낮은 농도의 표적물질을 실시간 검출할 수 있는 고민감도 나노광학 센서로 SERS 나노센서 개발 • 식물 체내 다중 표적물질에 대한 선택성과 민감도를 높이고 지속적 모니터링이 가능한 나노센서 표면 개질 | | | | | |

| | | |
|--|------|---|
| | | <ul style="list-style-type: none"> • 이동형 현장 측정이 가능한 국내 기술 기반 측정 장치 <p><연구 내용></p> <p>(1) 고감도 나노광학 센서 개발 및 신호 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> • 식물 진균병 조기 진단에 적합한 고감도 SERS 나노센서 개발 및 합성 프로토콜 확보 • 식물 체내 SERS 신호 검출 및 데이터베이스 확보 • 나노광학 센서 활용 진균 감염 조기 판별 알고리즘 개발 • 나노센서의 준양산화 기술 개발 연구 <p>(2) 식물체 내 효율적 전달과 지속적인 모니터링을 위한 나노센서 표면 개질 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> • 딸기 식물 내 효율적 도입 및 선택적 국지화를 위한 나노센서 • 식물 스트레스 및 SERS 신호 관계 (시간, 공간) 분석 • 식물 체내 지속적인 모니터링을 위한 나노센서 표면 개질 <p>(3) 딸기 잣빛곰팡이 초기 감염 메커니즘과 형태적 변화 모니터링을 통한 표적 물질 선정 및 진단기술 지속성·확장성 위한 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> • 딸기 잣빛곰팡이병 감염 초기 시·공간적 변화 모니터링 및 초기 진단용 표적물질 선정 연구 • 농가 현장에서의 딸기 잣빛곰팡이병 조기 진단 분석을 통한 시험데이터 확보 • 다양한 잣빛곰팡이병균의 기주를 이용한 개발기술의 확장성 탐색 <p>(4) 실시간 원예작물 측정용 이동형 고감도 라만 분광기 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> • 식물체 현장 진단을 위한 이동형 라만 분광기 광학계 구성 • 안정적인 라만 측정을 위한 시료 고정용 라만프로브 개발 • 농가 현장에서의 라만 분광기 측정 안정성 확보 및 최적화 |
| | 1 단계 | <p>1차년도</p> <ul style="list-style-type: none"> • 고감도 SERS 나노센서 개발 및 최적화 • 딸기 잣빛곰팡이 병 진단을 위한 표적 물질 선정 • 체내 선택적 국지화 및 효율적 도입 위한 나노센서 최적화 • 실시간 측정이 가능한 이동형 라만 분광기 광학계 설계 <p>2차년도</p> <ul style="list-style-type: none"> • 감염 식물 체내 SERS 신호 검출 및 데이터베이스 확보 • 식물 스트레스 및 SERS 신호 관계 시공간 분석 • 제작된 나노센서 민감도 및 정확도 검증 • 안정적인 라만 측정을 위한 식물 고정용 라만프로브 개발 <p>1차년도</p> <ul style="list-style-type: none"> • 근적외선 영역에서 높은 활성을 갖는 고감도 나노센서 개발 • 표적 물질에 대하여 1 nM 이하 최소 검출 농도 확보 • 잣빛곰팡이균이 유발하는 표적 물질 선정 및 감염 초기 반응과 상관관계 분석 • 나노센서의 표면 전하 및 크기 등의 변수 조절을 통한 나노센서의 식물 내 효율적인 도입 및 선택적 국지화 설계 • 병원시스템 기반의 딸기 조직 별 감염에 따른 형태학적·생리학적 변화를 시·공간적으로 모니터링 • 잣빛곰팡이 감염 초기의 방어반응 유전자의 발현량 측정 및 생리화학적 변화 비교 분석 • 고해상도 마이크로라만 장비와 이동형 매크로라만 장비의 장점을 결합한 기본 광학계 설계 |

| | | | |
|--|-----|--|---|
| | | | 2차년도 <ul style="list-style-type: none"> • 식물 체내 도입된 나노센서 SERS 신호 측정 및 신호 분리 • 식물체 신호의 시·공간 특성별 분석 및 데이터베이스 구축 • 식물체 내에 나노센서 도입으로 유발될 수 있는 식물면역반응 영향 정밀 분석 • 표적물질의 상호작용 분석 및 시간에 따른 동역학 분석 • 기존 기술 대비 진균병 민감도 비교 분석 • 생존한 식물 잎의 안정적인 라만 측정을 위한 시료 고정용 라만 프로브 및 거치대 개발 |
| | 2단계 | 1차년도 <ul style="list-style-type: none"> • SERS 신호를 통한 진균 감염 판별 알고리즘 개발 및 나노센서 준양산화 공정 연구 • 식물체 내 지속적인 모니터링을 위한 나노센서 표면 개질 • 딸기 잣빛곰팡이병 조기 진단 현장 적용을 통한 신뢰성 확보 및 지속성·확장성을 위한 기술 고도화 • 농가 현장에서의 라만 분광기 측정 안정성 확보 및 최적화 | <ul style="list-style-type: none"> • SERS 데이터베이스 기반으로 다변량 분석법을 활용하여 진균감염과 SERS 신호간의 상관관계 연구 및 진균병 조기 진단 알고리즘 개발 • 실제 농업 현장 활용을 위한 나노센서 준양산화 수준 합성 프로토콜 확보 • 지속적 진균병 감염 모니터링을 위한 나노센서 표면 최적화 • 다양한 원예작물에 대한 나노센서 적용 및 유효성 확인 • 실험실 수준의 딸기 잣빛곰팡이병 감염 조기 진단 수행 • 농가 현장 시험 데이터 확보를 통한 측정 재현성 획득 및 사용시 불편사항 반영 • 딸기 이외 잣빛곰팡이병 주요 기주에 대한 진단 기술 적용가능성 시험 검증 |

| | |
|--------|---|
| 연구개발성과 | 식물체 내 분자 검출용 고감도 SERS 나노센서 개발 및 신호분석 <ul style="list-style-type: none"> • 식물 체내의 신호전달 물질에 대해 최대 1 nM 검출 수준의 고민감도 SERS 나노분광센서를 개발함 • 총 22 종의 신호전달물질 후보군에 대한 표준 SERS 스펙트럼 라이브러리 구축 및 판별 머신러닝 알고리즘 개발 • SERS 나노분광센서를 이용하여 공기 중 휘발성 신호전달물질 극미량(100 ppm)을 검출 성공 |
| | 식물체 내 효율적 전달과 지속적인 모니터링을 위한 나노센서 표면개질 <ul style="list-style-type: none"> • 식물체에 도입된 나노광학센서의 국지화를 통해 세포 간의 정보전달에 사용되는 신호전달물질을 포착 • 다양한 폴리머의 처리를 통해 신호전달물질의 포착에 최적화된 나노광학센서의 표면개질을 수행하고 성공적으로 신호전달 물질을 검출 • 식물체에 도입된 나노분광센서가 최대 2 주간 유의미한 생물적 스트레스의 징후가 나타나지 않음을 확인 |
| | 딸기 잣빛곰팡이의 초기 감염 메커니즘과 형태학적 변화 모니터링을 통한 표적 물질 선정 및 진단기술 지속성·확장성을 위한 연구 <ul style="list-style-type: none"> • 딸기 잣빛곰팡이의 감염 메커니즘 분석을 통해 광학나노센서로 검출할 신호전달물질의 후보군을 선정 • 형태학적으로 아무런 변화가 없어 육안으로 구별되지 않음에도 불구하고 신호전달물질의 검출을 통해 진균병의 감염을 진단할 수 있음을 확인 • 딸기 이외에 토마토, 인삼 등의 경제작물에 나노광학센서를 도입, SERS 스펙트럼을 통한 진균병 진단의 적용 가능성을 확인 |

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|--|----------|---|----------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|-----|----|--|
| | 실시간 원예작물 측정이 가능한 이동형 고감도 라만 분광기 개발 <ul style="list-style-type: none"> • 현장 진단용 이동형 라만 분광기 개발을 위해 광학계 구성 및 시작품 제작 • 실제 농가 현장에서의 시험 측정을 통해 추가적인 구조의 개선 | | | | | | | | | | | | |
| 연구개발성과 활용계획 및 기대 효과 | <활용 계획> <ul style="list-style-type: none"> • 나노기술 및 생명공학기술 융합을 통한 식물병 조기진단 핵심기술 역량 확보 • 딸기 이외 식량 및 원예작물 진균병 조기진단 기술 개발에 활용 • 실제 농산업 현장 조기진단을 통해 신뢰성 있는 진단 민원 해결에 활용 • 국내 시장 뿐만 아니라 해외 시장 진출 • 국제저명학술지에 발표하여 과학기술 공유가치를 실현 <기대 효과> <ul style="list-style-type: none"> • 나노기술을 활용한 식물병 조기진단 원천 기술 확보 및 표준화 기여 • 딸기 잿빛곰팡이병 예방 및 피해 완화로 농가의 피해 경감 | | | | | | | | | | | | |
| 연구개발성과의 비공개여부 및 사유 | | | | | | | | | | | | | |
| 연구개발성과의 등록·기탁 건수 | 논문 | 특허 | 보고서 원문 | 연구 시설·장비 | 기술 요약 정보 | 소프트 웨어 | 표준 | 생명자원 | | 화합 물 | 신품종 | | |
| | 5 | 4 | | | | | | 생명 정보 | 생물 자원 | | 정보 | 실물 | |
| 연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황 | 구입 기관 | 연구시설·장비명 | 규격 (모델명) | 수량 | 구입 연월일 | 구입가격 (천원) | 구입처 (전화) | 비고 (설치장소) | ZEUS 등록번호 | | | | |
| 국문핵심어 (5개 이내) | 원예 작물 | | 진균류 감염병 조기진단 | | 광학센서 | | 잿빛곰팡이병 | | 표면증강라만산란 | | | | |
| 영문핵심어 (5개 이내) | Horticultural crop | | Early stage detection of fungal disease | | Optical sensor | | Gray mold | | SERS | | | | |

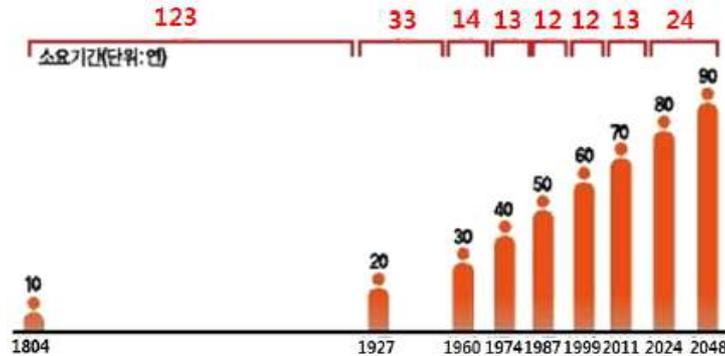
< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

1. 연구개발과제의 개요

1.1. 최신 동향 분석

○ UN에서 발행한 “2017년 세계 인구 예측”에 따르면 세계 인구는 현재 78억에서 2050년까지 98억 명으로 급격하게 늘어날 것으로 전망. 전 세계 식량자원 문제를 해결하기 위해서는 2050년까지 2005-2007년 수확량 대비 60-100% 증가가 필요하지만 기존 농업방식으로는 생산량의 증대가 한계에 이르렀으며, 기후 변화와 환경오염의 증가로 주요 작물 수확량이 오히려 감소하고 있는 추세임.



<그림 3. 세계 인구 성장 추이 (단위: 억명)/ 유엔인구기금 헤럴드경제 재편집>

○ 작물 생산량 증가의 원동력이 되었던 화학비료와 살충제의 사용은 토양과 지하수 오염으로 이어져 오히려 식량 생산 규모가 감소하는 **녹색혁명의 역설**을 맞음. 생산량 증가폭이 감소함에 따라 **지속가능한 농업**에 대한 필요성이 제기되었으며, 환경과 공존하는 지속적이면서도 단위 면적당 생산량을 극대화할 수 있는 **정밀농업**이 당면 위기를 극복하기 위한 대책으로 부상함.

○ 현대 농업은 첨단 과학기술의 접목으로 **새로운 혁신성장동력**으로 인식되고 있음. 최근 ICBM (IoT, Cloud, Big Data, Mobile) 및 AI기술의 발전, 네트워크 이용 대중화가 농업기술 투자 확대와 맞물려, 정밀농업의 경제적·기술적 제약을 벗어나고 있음. **스마트팜의 세계 시장규모**는 2016년 1,960억 달러였으며, 연평균 약 16.4%의 고성장을 이루어 **2020년까지 약 4,080억 달러에 이를 것으로 전망됨**. 미국과 유럽 등 주요 선진국들은 농업을 미래 성장 산업으로 인식하고, 구글 등 글로벌 IT 기업들을 중심으로 농업 분야에서 새로운 기회를 모색 중임. Agtech 벤처기업에 대한 글로벌 펀드 투자가 미국, 유럽 등을 중심으로 약 102억 달러가 이뤄지면서 정밀농업에 대한 기대와 투자 환경이 조성되었음.

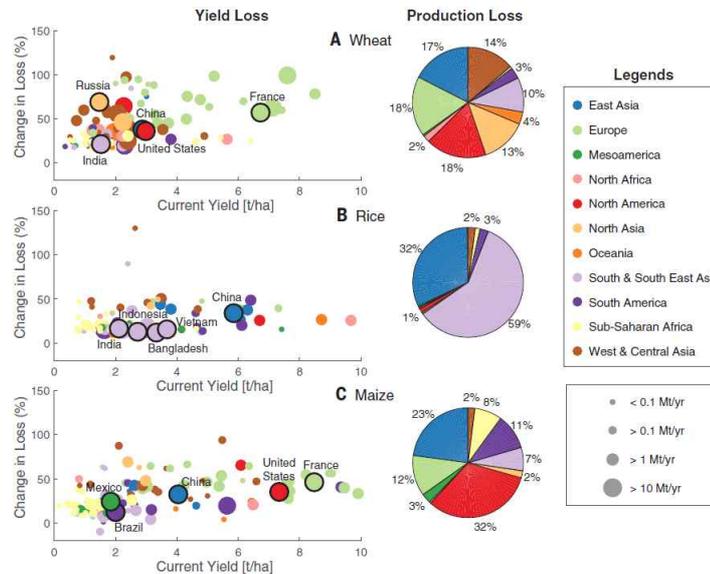
○ 우리나라는 정부 주도의 기술 중심 연구개발을 추진하고 있으며, 정밀농업 제반 기술은 선진국 대비 약 70% 수준임.

| 구 분 (단위 %) | 센서기술 | 지리정보기술 | 변량시비기술 | 정보처리기술 |
|------------|------|--------|--------|--------|
| 미 국 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 영 국 | 83 | 87 | 81 | 88 |
| 한 국 | 72 | 73 | 45 | 81 |

<표 1. 정밀농업 제반기술 수준 비교/ LG Global Challenger 최종보고서 (2016)>

○ 지구 온난화의 영향으로 기존 병해충의 증가뿐 아니라 새로운 병해충의 지속적인 출현으로 인한 위해요소 관리 강화의 필요성이 대두되고 있음. 기후변화로 인한 해충의 대사와 번식률의 급증으로 전 세계 주요 식량 자원 수확량이 50%까지 손실될 것으로 추정됨.

최근 우리나라도 전국적으로 외래 병해충이 급격히 확산되어, 2000년 이후로 국내로 유입된 식물병은 21종에 달하고 (농촌진흥청, 2017 농작물 병해충 예찰 보고서), 상당수는 이미 '상시 발생' 단계임.

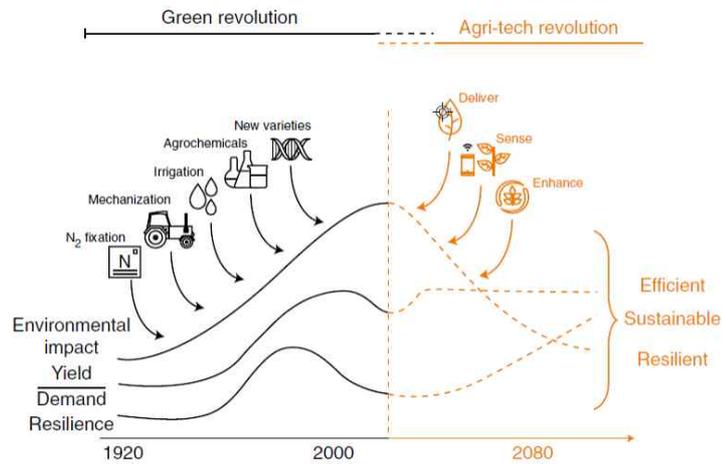


<그림 2. 평균 기온 2도 상승에 따른 병해충에 의한 농작물 수확량 손실을 예측/ Science (2018)>

○ 한편, 소득증대에 따라 삶의 질에 대한 요구 수준이 높아지고 그 중에서도 **식품 안전**에 대한 소비자들의 기대가 높아지고 있음. 하지만, 국가 간 농산물 교역이 지속적으로 증가됨에 따라, 외래 식물 병원균의 국내 유입 위험이 증가하고 있음. 안전한 식품에 대한 수요와 글로벌 무역체제에 의한 위험에 대응하고자 **식품 안전성 향상, 식품 안전법 제정 및 가이드라인 마련**이 세계적인 추세임. 미국은 2011년 식품안전현대화법(FSMA) 개정으로 사전예방 중심으로 식품 안전기준을 높이고 수입식품안전관리기준을 강화하고 있음. 중국은 2015년 식품 안전법 개정을 통해 중국산 농식품의 안전성 강화 및 수입 농식품 안전성 관리기준 향상을 꾀함. 우리나라는 농산물 소비자에게 안전한 소비를 보장하고자 2019년부터 농약 잔류허용기준을 강화하는 농약허용물질목록제도(Positive List System, PLS)를 시행하고 있음.

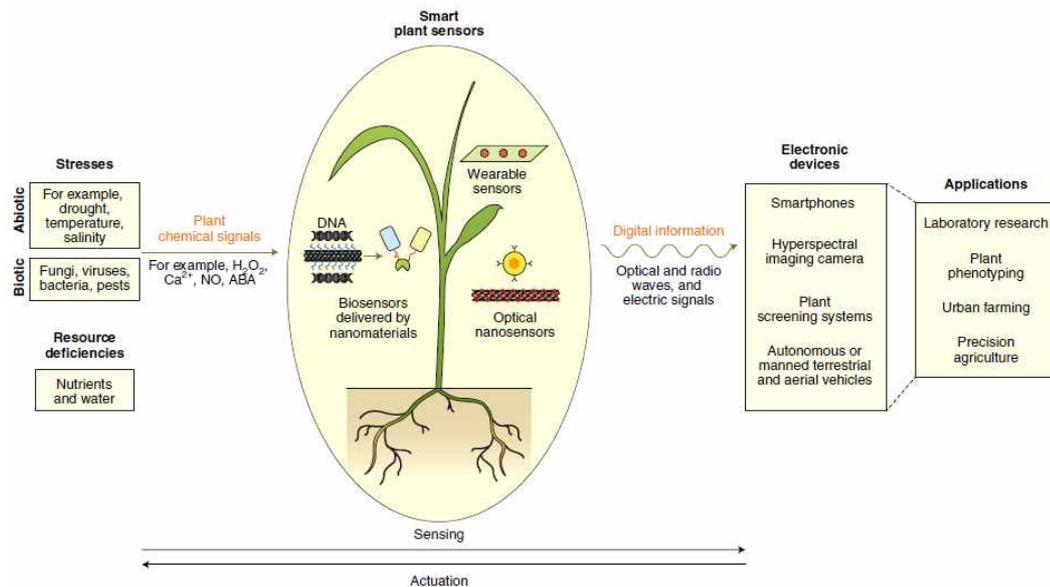
○ 한정된 자원 내에서의 단위 면적당 작물 수확량 증진을 도모하고, 무분별한 방제로 인한 부작용을 막기 위한 방책으로서 **작물 병충해 조기 진단 및 작물 건강 모니터링 기술**이 그 대안으로 떠오르고 있음. 식물 질병의 신속하고 정확한 조기 진단은 질병의 확산으로 인한 경제적 피해를 최소화하고, 농약의 남용을 방지하며, 농약 잔류량에 의한 안전성 문제를 해결할 수 있음.

○ 식물 질병의 조기 진단을 위해 바이오 및 의료 분야에서 질병 조기 진단 및 치료에 활발히 응용되고 있는 **나노바이오기술을 농업분야에 접목**시키려는 노력이 요구됨. 나노소재는 나노미터 크기에서 형성되는 새로운 특성을 이용하여 기존 소재의 한계를 극복할 수 있어, 미래 산업의 기반이 되는 기술로서 6T 산업 전반에 걸쳐 융합되어 활용되고 있음. 농업과 학과 융합된 나노기술의 영향력은 현대농업발전의 근간을 이룬 농업 기계화와 녹색 혁명을 능가할 것으로 전망됨.



<그림 3. 녹색혁명과 나노기술이 이끄는 새로운 농업기술 혁명/ Nature Nanotechnology (2019)>

○ 최근 광학나노센서 및 웨어러블 나노기술기반 센서를 식물에 도입하여 식물의 화학 신호를 디지털 신호 (광학신호 혹은 전파)로 변환하여 식물 상태를 실시간으로 모니터링하려는 연구가 시도되고 있음. 나노센서가 도입된 식물로부터 얻은 정보를 바탕으로 정상 상태와 스트레스를 받은 식물의 화학 신호의 시공간 패턴을 분석함. 질병 등에 인한 스트레스가 발생했을 경우, 민감하게 이를 인지하고, 농업 장치를 작동시켜, 작물 재배를 위한 최적의 환경을 신속하게 조성할 수 있음. 나노바이오텍놀의 식물에의 적용은 실험실 단위의 연구 기술 개발, 특수 재배 시설에서의 화학적 표현형, 도시 농업 및 정밀 농업을 위한 작물 건강 모니터링, 질병의 조기 진단, 자동화 등에 이르는 다양한 분야에 활용 가능성을 가짐.



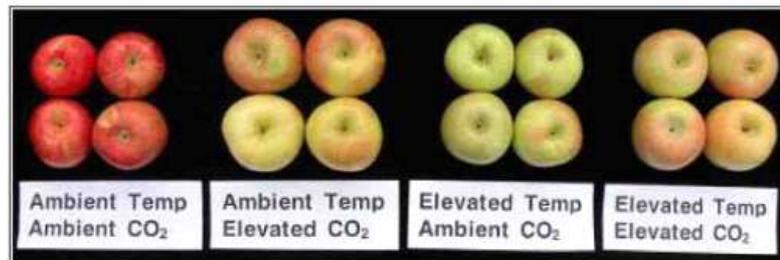
<그림 6 나노바이오텍놀을 적용한 스마트 식물 센서/ Nature Nanotechnology (2019)>

1.2. 기후변화가 원예작물 생산성에 미치는 영향

○ 대기 중 이산화탄소 농도 상승은 식물 광합성 효율을 향상시키지만, 기온상승은 식물 세포 내 물 부족현상을 일으켜, 긍정적인 효과를 상쇄하고 오히려 생산성에 악영향을 미침. 대기 오염 물질 중 오존은 기공을 통해 식물 세포 내로 들어가서 활성 산소를 만들어냄

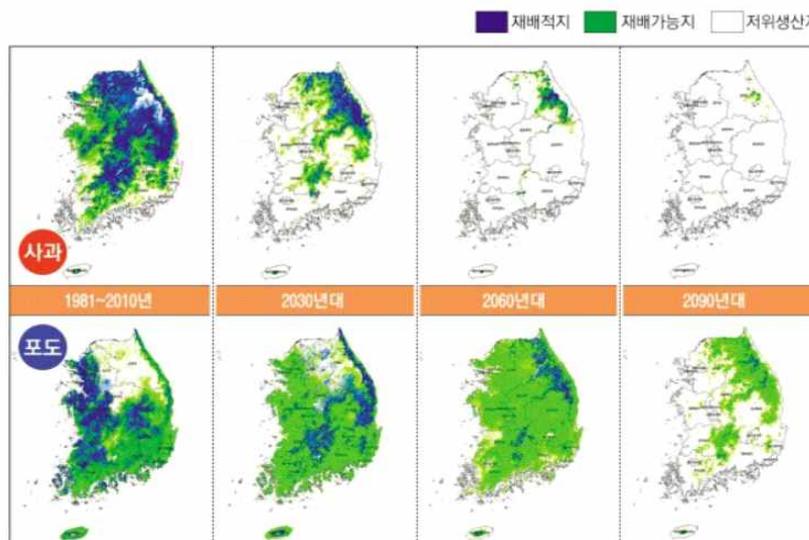
으로써 광합성 효율을 감소시키고 결과적으로 **작물 생산량을 감소**시킴.

○ 원예작물은 그 종류가 매우 다양하여, **기온 상승**이 일부 작물에는 긍정적인 영향을 주기도 하고, 시설 재배의 경우 기후 변화에 의한 직접적 영향이 다른 농업분야에 비하면 비교적 적은 편임. 그럼에도 불구하고, 원예작물의 성장과 발육이 전반적으로 촉진되어, **최종 수확물의 품질과 저장력을 저하시킨다**는 보고가 있음. 특히, 생육기의 기후요소는 **과실의 발육과 특성(과실비대 및 과형변화)에 변화**를 주어 품질에 큰 영향을 미침.



<그림 7 재배온도 및 이산화농도 증가에 따른 사과 착색 비교/
기후변화와 제주농업 발전방안 제4회 기후변화와 미래 포럼 발표자료>

○ 기온상승 외에도 미세 먼지에 의한 태양에너지 감소, 일조시간 감소, 이상기상의 빈도 증가 등이 원예작물의 품질에 영향을 주고 있음. 과수의 경우 동절기와 봄철 이상기온에 따른 동상해와 과실 착색, 초기 고온에 의한 착색불량 등으로 생산효율 악화가 예상됨. 또한, 우리나라 주요 과수 및 채소의 재배적지가 줄어들거나 재배적지의 복상이 예측됨.



<그림 8. 기후변화에 따른 과수별 재배 지역 변동 예측도/ 농촌진흥청>

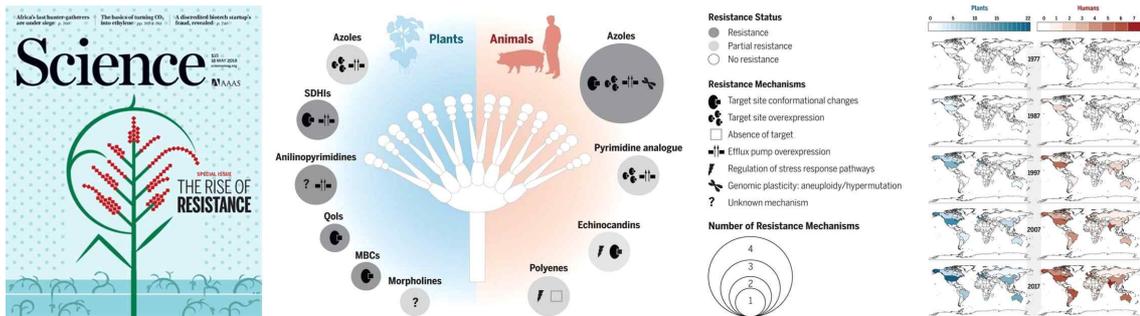
○ 기후변화로 인해 번식에 유리한 환경조건이 형성됨에 따라, 외래 감염병균 및 해충들이 서식하게 되어 새로운 해충과 질병이 나타나고 있음. 1~2 ℃의 평균기온 상승은 작은 변화인 것 같지만, 진균, 해충, 세균의 번식이 활성화될 수 있는 역치로 작용하여 원예작물 생산량에 큰 피해를 입히기도 함. **발생 가능한 병해충 세대수 증가** 가능성이 있어, 작물 수확량 감소 및 농약 사용량의 증가가 우려됨.

○ 우리나라는 2015년 12월 파리협정 채택 이후 신 기후체제에 대응을 위한 중장기 기후 변화 전략 및 활동계획을 발표하였으며, 이에 “식물병해충 질병의 예방과 방제” 등 농업부문의 대응 정책이 다수 포함되어 있음. 그러나 여전히 원예작물 생산 현장에서의 실제적이고 종합적인 관리 계획이 절실히 요구되고 있으며, 이를 위해 관련 기초 데이터의 생성, 수

집, 표준화가 필수적임.

1.3. 원예작물의 진균류 감염병 조기 진단의 중요성

- 시설원예의 경우 계절, 지역, 사회적 여건에 관계없이 작물에 적합한 환경 조건을 제공 해줌으로써 고품질, 높은 생산성 확보가 가능하나, 시설 내 진균류 감염 발생 시 급속하게 확산되는 위험이 있음. 따라서 식물의 형태학적 변화가 관찰되었을 시점에는 이미 시설 내 에 감염이 확산되었을 가능성이 높음.
- 화학적 방제는 진균류 감염병으로부터 작물 보호와 생산량 확보에 기여하는 면이 있으나, 과용, 오용으로 인한 환경오염을 야기하고, 약제에 대한 저항성 병원균 출현 등에 의한 부작용으로 인해 부정적 시각이 점차 증대되고 있음.
- 난방제성 식물 진균병에 대한 화학적 방제의 한계
 - 지금까지 진균에 의한 식물병 방제는 대부분 농약 살포 등 화학적 방제 방법에 의존하였지만, 대표적 약제인 아즐계통 항균제의 광범위한 사용으로 약제 내성 균주의 출현이 전 세계적으로 보고되고 있음. 이로 인해 농약 살포를 통한 식물병 방제 효율이 급격히 떨어지고 있음.
 - 작물병의 80% 이상은 진균에 의해 발생하고 있으므로 농산물 안전성 및 친환경 등의 시대적 요구에 부응하는 새로운 주요작물에 대한 난방제성 식물진균병 방제전략 및 진단기술 개발이 요구됨.



<그림 9. 식물 및 동물곰팡이병원균의 화학적 방제제 저항성 출현의 문제/ Science (2018)>

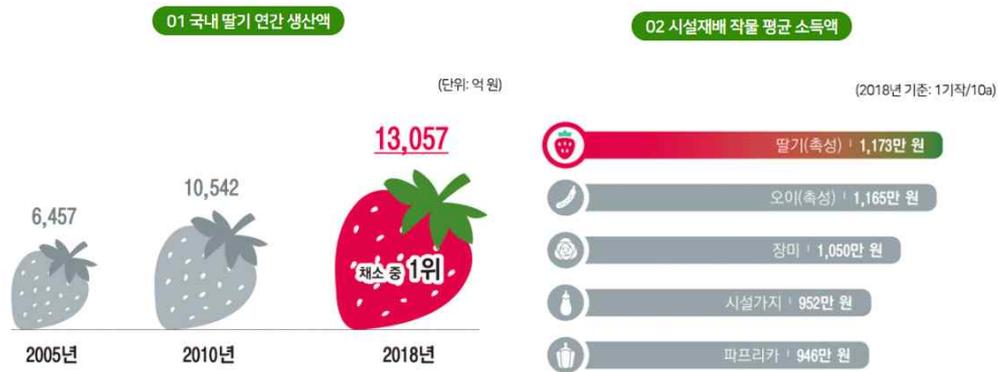
○ 원예작물의 진균류 감염병 조기 진단의 중요성

대부분의 원예작물은 연중 출하되며, 신선식품이므로 맛 뿐 아니라 외형이 품질에 미치는 영향이 지대함. 이를 위해서는 식물체의 건강한 생육이 필수적인데, 원예작물의 품질을 낮추고 생산성을 급감시키는 가장 큰 위협 중 하나가 진균류 감염병임. 원예작물에 병을 일으킬 수 있는 진균은 8000 여종으로 알려져 있음. 진균은 원예작물에 기생하면서, 국부적인 부패, 식물 조직 파괴 등을 유발함. 진균류에 감염된 식물은 초기단계에 식물체 내부에서 다양한 면역관련 화학반응을 일으키나 육안으로는 관찰이 불가함. 병이 점진적으로 진행되고 확대되었을 때에야 육안으로 병증을 확인할 수 있음. 조기 진단이 어려워, 결과적으로 수량 감소, 외형, 맛 등의 품질이 저하되어 막대한 경제적 손실이 발생함. 병징이 나타나기 전 조기 진단이 가능할 경우에는 환기 등으로 간단하게 관리가 가능하기 때문에, 원예작물의 진균류 감염병 조기 진단 기술 개발이 절실히 요구됨.



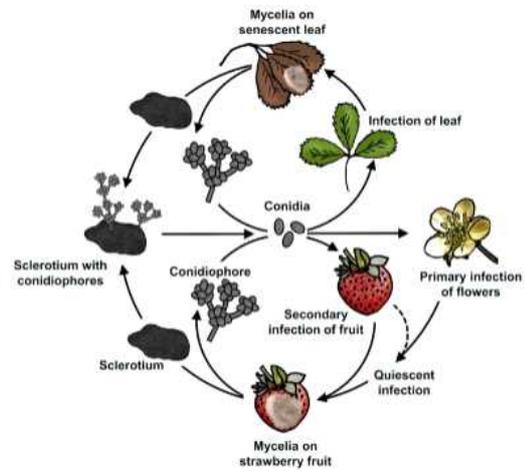
<그림 10. 주요 시설원예작물 곰팡이병/ 농촌진흥청>

○ 국내 원예작물 중에서 딸기 생산액은 2018년 기준 약 13,057억 원이며, 이는 2005년 6,457억 원에 대비 202% 증가한 수치로 국내 과채류 중 생산액이 가장 높은 품목임. 국내 시설재배 작물 소득액 중 딸기의 소득액이 동일 면적 대비 가장 높으며, 2017년 기준으로 연 4700톤, 420 억불에 달하는 막대한 양이 수출되고 있는 주요 경제 원예작물임(농산수출부, 2017 딸기 국내 생산 및 해외 시장 동향).



<그림 11. 국내 딸기 생산 현황, 농촌진흥청>

○ 딸기 잿빛곰팡이병(Gray mold of strawberry)을 일으키는 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)은 원예 작물 재배에 가장 큰 피해를 주는 병원균 중의 하나임. 2007년 농촌진흥청이 발표한 자료에 따르면, 잿빛곰팡이병에 의해 연간 814~1,100 억원의 경제적 피해가 추정됨. 주로 지상부위에 피해가 나타나고, 특히 어린과실에 침입하여 잿빛곰팡이의 병원균이 발생함으로써 과실에 큰 피해를 줌. 작물의 생육 과정 뿐 아니라 수확 후 저장 또는 수출 과정 중에 발생되어 경제적으로 매우 큰 손실을 초래함(Jarvis, 1977). 물리적 손상과 함께 잿빛곰팡이병에 의한 수출 피해가 50%에 달함(Hwang and Ku, 2004).



<그림 12. 딸기 잿빛곰팡이병 진행과정>

○ 딸기 잿빛곰팡이병은 농약 살포에 의한 방제효과가 낮고, 약제 저항성이 쉽게 나타남. 병반이 보이기 시작할 때는 이미 포자가 시설 내에 만연한 상태이므로 화학적 방제 실시 효과가 미미하기 때문에, 예방적 차원에서 각종 화학 방제제를 살포하고 있는 실정임. 무분별하게 살포된 화학 방제제는 토양에 축적되어 환경오염 문제를 일으킬 수 있고, 상품 안전성 문제와도 직결됨.

○ 딸기 잿빛곰팡이병은 재배 시설 내 과습 조건이 오래 지속될 때 발생하는 경우가 많으므로, 병징이 나타나기 전 조기 진단이 가능한 경우 환기 등으로 간단하게 관리가 가능함. 잿빛곰팡이균은 딸기 뿐 아니라 대표적으로 고추, 오이, 토마토, 인삼을 포함하는 약 86종의 원예 작물에 감염되는 광범위한 기주범위를 지닌 병원균임(The Plant Pathology Journal, 2009).

1.4. 기존 원예작물의 진균류 감염병 진단 연구 현황

○ 통상적으로 원예작물의 진균병 감염 진단은 (1) 식물의 감염 부위를 현미경 등으로 분석하는 시각적 검사(형태학적 검사), (2) 식물로부터 진균을 분리하고 배양하여 균사와 포자의 형태, 포자 형성 패턴 등을 분석하는 배양 분석, (3) 동질효소를 이용하여 진균의 근연종 간 형태학적인 유사성을 비교·대조하는 동질효소 분석 등으로 이루어짐. 최근에는 분자생물학적 및 면역학적 진단방법이 도입되고 있으며 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), 진단 마커를 이용한 quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) 방법과 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)법 등의 방법들을 이용하는 연구가 수행되고 있음.

시각적 검사 방식과 배양 분석 방식의 경우 비용이 적게 들고 간단하다는 장점이 있으나, 현미경의 시각적 정보에 의존하는 방식이기 때문에 분석자의 숙달 정도에 따라 영향을 많이 받으며, 특히 배양 분석의 경우 배양에 시간이 오래 걸려 실시간 진단에는 적합하지 않다는 단점을 가지고 있음.

동질 효소 분석 방식의 경우, 진균의 단백질 다형성(polymorphism)을 통해 진균의 유전적 정보를 얻을 수 있다는 점에서 유용하지만, 다형성에 대한 알려진 정보가 한정되어 분석법을 적용할 수 있는 진균 종 역시 한정적이라는 단점을 가짐. ELISA 방법은 많은 양의 시료를 쉽게 검사하는 장점을 가지지만 검출한계의 문제와 검사결과 판독의 오류 가능성이 존재하고, qPCR 진단방법은 진단 시료수가 많아질수록 진단비용과 기술 숙련도 및 별도의

장비들이 많이 필요하며 식물병 별 사용 가능한 진단 마커들이 제한적이라는 단점이 있음.

최근 이러한 한계점들을 극복하기 위하여 새로운 방식들이 도입되고 있으며, 그 중에서 이미징·분광법 방식은 비파괴적이며 실시간 분석에 용이하여 진균 감염 진단 방법으로 주목받고 있음.

1.4.1. 기존 이미징·분광 기술 분석

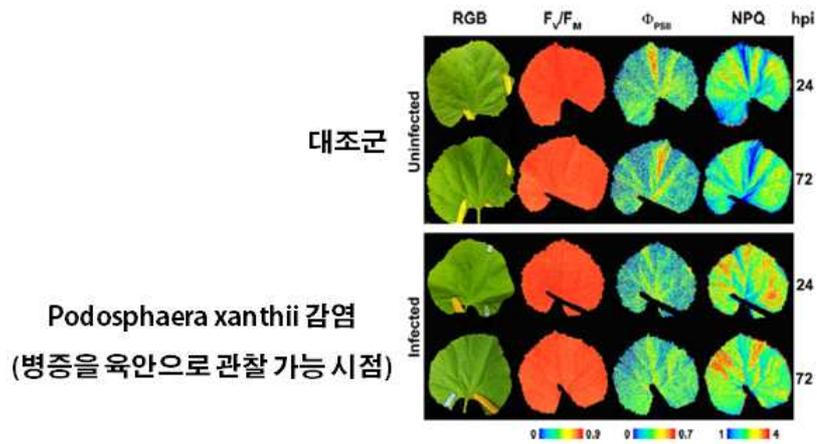
이미징·분광 기술을 사용한 식물 분석 기법들은 형광 분광법, 적외선 분광법, 초분광 기법, 열화상 기법들이 있으며, 대략적인 장단점은 아래와 같다.

○ 형광 분광법

형광을 이용한 분석방법들은 그 신호 세기가 매우 강하여 단분자 수준까지 검출하는 것이 가능하며 정량적 분석에도 용이하다는 장점이 있음. 형광 기반 분석법은 크게 두 가지 방식으로 나뉘는데, 첫 번째 방식은 분석하고자 하는 분자 혹은 그 분자와 결합하는 분자에 형광 표지를 붙여 그 신호를 관찰하는 방식임. 대표적으로 녹색 형광 단백질 (Green Fluorescence Protein, GFP) 등을 생산하는 유전자를 특정 진균이나 박테리아 등에 삽입하여 그 신호를 관찰하는 연구들이 진행된 바 있음. 이러한 표지 방식들은 병원체의 유전체를 표지하기 때문에 직접적으로 병원체를 특정하여 관찰이 가능하다는 장점을 갖지만, 전처리 과정이 필요하기 때문에 번거롭고 시간이 지남에 따라 신호의 세기가 약해지는 광분해(Photobleaching) 현상이 일어난다는 단점을 가짐. 두 번째 방식은 식물체 내에 존재하는 엽록소의 형광 신호를 관찰하는 방식으로, 질병 감염이 발생하면 식물이 병변에 영양공급을 제한하기 위해서 광합성 활동이 감소하는 것을 이용하여 엽록소의 형광 신호 이미지를 통해 분석하는 방식임. 이 방식의 경우 세포뿐만 아니라 넓게는 잎과 식물 전체까지 손쉽게 분석한다는 장점을 가짐. 그러나 간접적으로 식물의 병변을 확인하는 방식이기 때문에 진균, 바이러스로 인한 질병이나 환경 스트레스 등 다양한 원인 중 특정하기 어렵다는 치명적인 단점을 가짐. 더불어 실용적인 측면에서 형광 신호를 측정하기 위해서는 측정 조건이 빛이 전혀 없는 암실 조건이어야 한다는 한계가 있음.

선행 연구 예시

- 폴리에틸렌글리콜과 CaCl_2 기반의 DNA 통합기술을 이용하여, 참나무의 사망을 유발하는 *Phytophthora ramorum*에 녹색 형광 단백질을 생산하는 유전자를 삽입함. 이를 통해 진균에 형광표지를 하는데 성공하였으며, 형광 이미지를 촬영함.
- 멜론 잎을 *Podosphaera xanthii*이 감염시키고 병증이 육안으로 관찰될 시점에 엽록소 기반의 형광을 측정하고, 이에 기반한 파라미터를 계산함. 감염된 잎과 대조군의 잎의 형광 파라미터의 비교를 통해 유의미한 차이가 있음을 확인함.



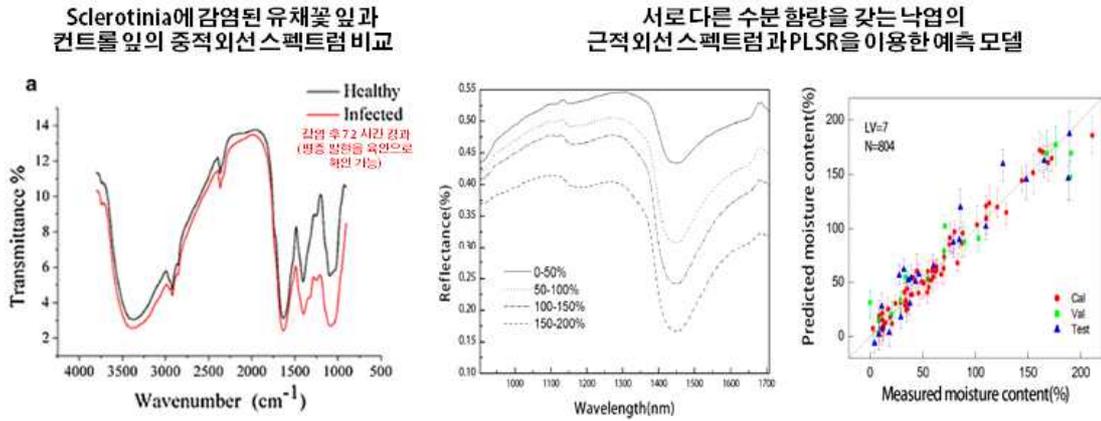
<그림 13. 멜론 잎 형광 촬영 및 분석 영상/ Scientific Report (2019)>

○ 적외선 분광법

측정 대상에 적외선 영역대의 파장을 갖는 광선을 투사하여 파장별 투과된 신호의 스펙트럼을 얻는 방식으로, 흡수한 파장을 통해 식물체 내부의 분자 구조를 분석할 수 있다는 것이 가장 큰 장점임. 식물 연구에 활용되는 적외선 분광법은 중적외선 (Mid-infrared) 분광법과 근적외선(Near infrared) 분광법으로 두 가지임. 중적외선 분광법은 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 영역의 신호를 분석하며 물질의 고유한 스펙트럼 패턴을 얻을 수 있으므로 물질의 구조와 종류를 판단할 수 있음. 하지만 생체 시료에서는 물의 흡수 스펙트럼이 이 영역에서 매우 강하게 나타나기 때문에 물질의 스펙트럼이 묻혀서 구별하기 어려운 단점을 가짐. 반면, 근적외선 분광법의 경우 $25000\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ 영역의 신호를 분석하며, 대부분의 물질에 비해 투과성이 좋아 in vivo 분석에서 물 등으로 인한 신호간섭을 최소화할 수 있고 특히 유리나 석영과 같은 값 싼 재료들을 근적외선이 투과하므로 렌즈나 광섬유를 사용하는데 유리하다는 장점이 있음. 그러나 근적외선 영역대의 흡수 파장이 주로 중적외선 영역의 기본적인 밴드의 중첩 간섭을 받고, 물질 고유의 구별 가능한 지문 스펙트럼이 존재하지 않기 때문에 물질 종류를 식별하는 분석에 여전히 한계도 있음.

선행 연구 예시

- 유채꽃의 잎을 *Clerotinia sclerotiorum*에 감염시키고 고습도 환경에서 72 시간 경과 후, **병증이 육안으로 관찰되는 시점에** 중적외선 분광법으로 감염된 잎과 대조군 잎의 신호를 비교함. 그 결과 두 스펙트럼간의 유의미한 차이가 있었으며 PCA (Principal Component Analysis), PLS-DA (Partial Least Square-Discriminant Analysis) 등의 분석기법을 통해 두 그룹간의 차이를 유효하게 구별함.
- 다양한 수분함량을 갖는 낙엽 샘플로부터 근적외선 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 PLSR(Partial Least Square Regression) 기법을 통해 낙엽의 수분함량과 스펙트럼과의 선형적 예측모델을 개발함.



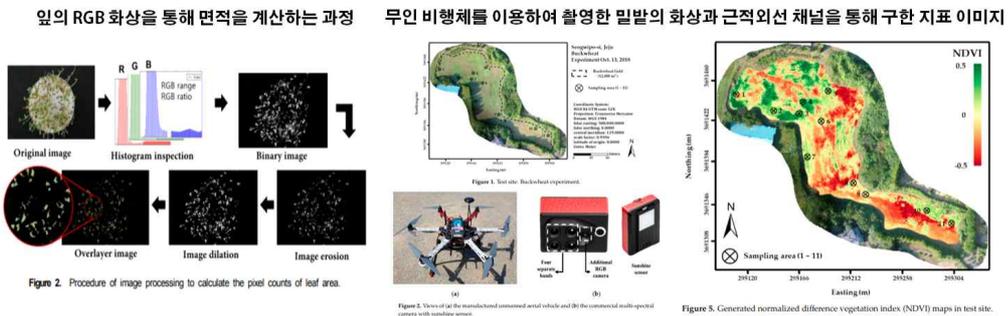
<그림 14. (좌측) 중적외선을 활용한 진균 감염 분석 / Plant Methods (2017)
(중앙, 우측) 근적외선을 활용한 진균 감염 분석 / Remote Sensing (2017)>

○ 초분광 기법

초분광(Hyperspectral) 기법은 $n \times m$ 픽셀 형태로 촬영되는 일반 이미징 기법과는 달리, 한 픽셀이 각각 길이 λ 의 스펙트럼과 대응되어 $n \times m \times \lambda$ 형태 이미지를 촬영하는 기법을 의미한다. 주로 가시광선 영역에서 식물의 표현형(Phenotype)을 분석하는데 사용되는 기법으로, 머신러닝, 딥러닝 등의 인공지능 기법과 결합하여 진균이나 바이러스 등의 생물학적 스트레스 진단부터 식물의 성장 수준, 노화 정도 등을 분석하는데도 활용됨. 가시광선 영역대를 분석하는 경우, 형광이나 근적외선 분광법에 비교하여 특별한 광원이 필요하지 않고 측정이 간편하다는 장점이 있으나, 분석 대상이 식물의 표현형에 국한되어 분석 가능한 정보량에 한계점을 가짐.

선행 연구 예시

- 브로콜리, 클로버와 무의 잎의 RGB 화상을 촬영하고 처리하고, 식물 잎의 RGB 비율과 범위를 통해 식물 잎 면적을 픽셀 단위로 계산함. 이와 싹의 성장 기간 및 과육의 무게에 대한 상관관계가 높음을 밝혀냄.
- 무인 비행체에 저해상도 4가지 센서(Green, Red, Red edge, 근적외선)과 RGB 영상 모듈을 달아 상공에서 밀밭의 화상을 촬영함. 엽록소의 근적외선 흡수 파장대를 이용하여 식물의 엽록소 지표를 계산하고 이를 RGB 영상과 합침. 이를 통해 밭의 작물 중 질소 부족 현상이 일어나는 위치를 특정함.



<그림 15. 초분광 기법 활용 예시/ Journal of Biosystems Engineering (2019),
Environmental Research and Public Health (2019)>

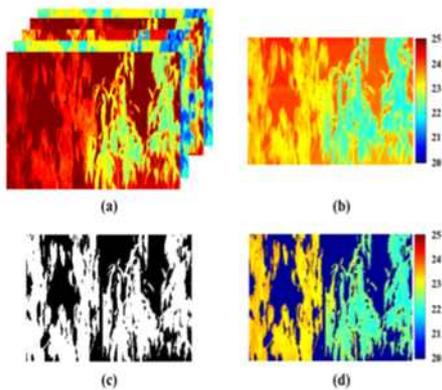
○ 열화상 기법

열적외선 카메라를 통해 식물의 온도를 측정하는 분석방식으로, 특히 잎의 온도는 식물 잎에 조사되는 빛, 수분 함량, 식물의 증산 작용, 식물 주변의 온습도, 풍량 등에 의해서 결정되므로 식물의 상태를 분석하는데 활용 가능함. 또한 빛으로 열을 가한 후 그 온도 변화 추이를 관찰하는 광열(Photothermal) 분석법도 있는데, 이를 통해 분석 물질의 대략적인 물리적 화학적 특징을 분석할 수 있고 신호의 균일성을 통해 식물 샘플 내에서 세포 생존능(Cell Viability) 등을 판별하는 등에 활용됨. 열화상 기법 역시 초분광 기법과 유사하게 특별한 광원이 필요하지 않고 측정이 간편하나, 식물의 표현 형에 의존해 체내 환경을 자세하게 분석할 수 없다는 한계가 있음.

선행 연구 예시

- 과일 작물의 열화상 영상을 통해 온도를 측정하고 이를 기반으로 작물 수분 스트레스 지표(Crop Water Stress Index, CWSI)를 계산함. 그리고 실제 식물에 물이 부족한 상황에서 시간에 따른 열화상 이미지를 측정하여, 열화상 영상이 식물의 물 부족 스트레스를 식별 가능함을 확인함.
- 후추 씨앗에 5초간 할로겐 램프로 열을 가한 후, 적외선 열화상 카메라로부터 씨앗으로부터 나오는 신호를 측정함. 열화상 신호로부터 시간에 따른 온도의 감소 추이를 구하고, 그 데이터로부터 시간에 따른 온도 감소 곡선의 회기 상수를 계산함. 각각의 회기 상수는 씨앗의 나이와 상관관계가 있으며, 이를 이용하여 이미징 영상을 처리했을 때 씨앗의 노화 수준을 판별할 수 있다는 것을 확인함.

근적외선 열화상 영상을 통해 식물 잎의 온도를 계산하는 과정



서로 다른 노화 수준의 씨앗의 열화상 이미지

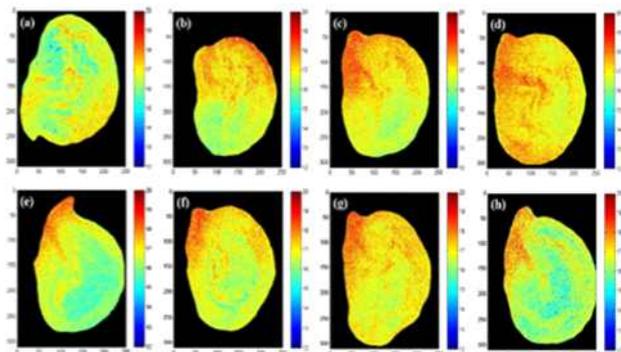


Fig. 3. Infrared thermal images of a healthy seed (a), and seeds that were artificially aged for 24 h (b), 48 h (c), 72 h (d), 96 h (e), 120 h (f), 144 h (g), and 168 h (h).

<그림 16. 열화상기법을 활용한 식물 분석 예시/ Journal of Biosystems Engineering (2019), Infrared Physics & Technology (2014)>

| | 형광 분광법 | | 적외선 분광법 | | 초분광 기법 | 열화상 기법 | 표면라만증강산란 (SERS) |
|--------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|------------------------------|---|---------------------------|---------------------------------|
| | 형광 표지법 | 엽록소 이미징 | 중적외선 | 근적외선 | | | |
| 신호의 세기 (민감도) | 매우 강함 (다분자 수준 검출 가능) | | 약함 | 강함 | 강함 | 강함 | 매우 강함 (다분자 수준 검출 가능) |
| 신호 안정성 | 광표백 현상으로 점차 약해짐 | 식물 자체 신호이므로 쉽게 측정 가능 | 물, 유리 등의 주변 물질로부터 신호 간섭으로 신호가 약함 | 복잡한 신호 중첩으로 신호 분석이 어려움 | 비교적 장거리에서도 측정가능 | 비교적 장거리에서도 측정가능 | 시료의 배경-형광에 가려질 수 있음 |
| 전처리 필요여부 | 형광 표지 필요 | 필요 없음 | 시료 전처리 필요 | 필요 없음 | 필요 없음 | 필요 없음 | 필요 없음 |
| 획득 가능한 정보수준 | 병원체, 바이오마커 직/간접 검출 가능 정량화 용이 | 형태학적 정보 의존 (진균병 초기진단 부적합) | 분자의 화학적 구조 분석 용이 바이오마커 검출 가능 정량화 용이 | 분자의 화학적 구조 분석 다소 어려움 정량화 어려움 | 다양한 수학적 도구로 이미지 분석 가능 형태학적 정보 의존 (진균병 초기진단 부적합) | 형태학적 정보 의존 (진균병 초기진단 부적합) | 분자의 화학적 구조 분석 용이 바이오마커 직접 검출 가능 |
| 별도의 광원 필요 여부 | 필요 | | 필요 | | 필요 없음 | 필요 없음 | 필요 |

<표 2. 이미징·분광 기반의 식물 분석법들의 특징 비교>

1.4.2. 기존 분광기법들에서 극복할 문제점

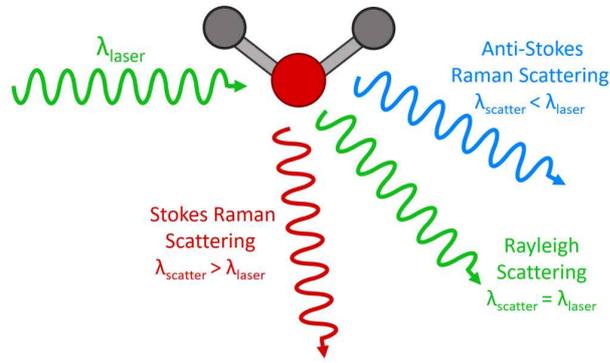
효율적인 식물의 진균 감염을 진단하기 위해서는

- 물, 온도 등의 생물학적 스트레스와 진균 감염이 구별되어야 하므로 형태적인 변화를 관찰하는 것보다는 자극에 대한 **식물 반응의 산물을 직접 측정이 필요함**.
- 진균 감염으로 인한 식물이 분비하는 극미세량의 물질을 감지하기 위해서는 측정에 대한 **매우 높은 민감성**을 가져야함.
- 일회성 진단이 아닌 **지속적인 진단**을 통해 식물의 건강상태를 **모니터링**할 수 있어야 함.
- 식물 체내에 존재하는 **다양한 미세신호들을 서로 구별**할 수 있어야 하며 **동시에 측정 가능**해 분석에 쉬워야 함.

1.4.3. 나노광학 기반의 식물 모니터링

○ 표면증강라만산란 (Surface Enhanced Raman Scattering, SERS) 분광법

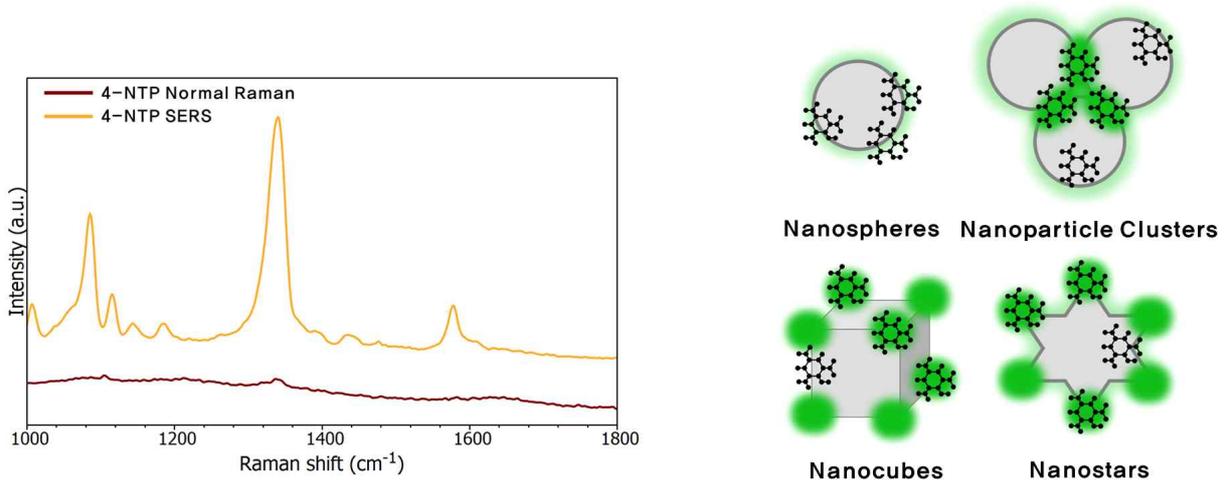
라만 산란 분광법은 레이저 등의 광원을 분자에 조사했을 때 빛의 전자기장과 분자의 진동모드가 상호작용하여 고유의 산란 스펙트럼을 방출하는 것을 이용한 분광법임. 이 산란 스펙트럼은 분자의 구조에 따라 다르므로 라만 스펙트럼은 분자의 지문 (Molecular Fingerprint)라고 부름. 마찬가지로 분자의 진동 모드에 대한 정보를 얻을 수 있는 IR 분광법과 비교하여 라만 분광법은 다음과 같은 특징을 가짐.



<그림 17. 라만 산란의 모식도>

- 대부분의 분석물질은 수용액 상태에서 존재하는데, 적외선 분광법과 달리 물의 라만 산란 신호는 매우 약하여 물에 의한 신호 간섭이 최소화됨.
- 주로 라만 분광법에 사용되는 광원의 파장 영역에서 유리는 투명하므로 유리재질의 분석용 용기나, 광섬유 등을 사용할 수 있어 경제적임.
- 시료를 투과하지 않고 산란된 빛을 이용하기 때문에 시료의 전처리 과정이 필요하지 않아 비파괴적이고 측정이 간단함.

금이나 은 등 금속 나노입자를 이용하면 라만 산란 신호의 크기가 대폭 증강되는데, 이런 현상을 표면 증강 라만 산란 (Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS)이라고 함. 나노 크기의 금속의 자유전자들이 빛의 전자기장을 만나면 국소 표면 플라스몬 공명(Local surface plasmon resonance, LSPR)이라 불리는 집단적 공명을 하게 되는데, 이를 통해 매우 강한 장(Optical field)이 생성되어 증폭된 라만 산란을 얻는 것이 가능함. 신호 증강 현상은 특히 “핫스팟(Hot Spot)”이라 불리는 금속 나노입자들의 접합점(junction) 혹은 나노 입자의 첨단에서 더 강하게 발생하며, 그 신호의 증폭수준은 10^{10} 배 이상으로 단분자의 신호를 검출하는 것이 가능함.



<그림 18. (좌측) 금 나노입자 표면에서의 라만신호 증강 (우측) 다양한 금속 나노입자와 핫스팟 /Edinburgh Instrument>

○ SERS 분광법을 활용한 식물 진균 감염 분석법의 장점

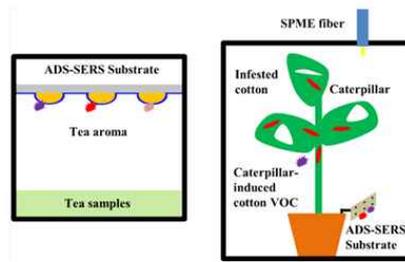
- 단일 분자 수준의 측정 민감도를 갖는 매우 민감한 검출 기술로서, 병증이 나타나기 전 식물 체내 물질의 미세한 변화를 감지할 수 있으므로 **조기 진단에 유리함**.
- 기술의 적용 방식이 비파괴적이고, 측정 시기가 즉각적이므로 살아있는 식물체 내 **실시간 검출이 가능함**.
- 스펙트럼 분석을 통해 표적 물질 자체의 화학적 구조 정보를 얻을 수 있어, **추가적인 표지가 필요하지 않은 검출법임**.
- 형광과는 달리 신호가 안정적으로 유지되어 **장기간 모니터링에 적합함**.
- 여러 분석물 신호를 하나의 입사광으로 동시에 얻을 수 있어 **다중 분석에 적합함**.
- 물의 간섭을 거의 받지 않아 식물 *in vivo* 측정이 **용이함**.

○ SERS 분광법을 활용한 식물 관련 기존 연구 분석

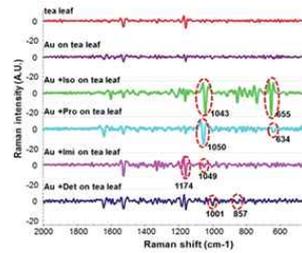
- 식물의 휘발성 유기화합물(VOC)를 잘 흡착하는 고분자를 나노입자 표면에 처리하고, VOC 표준 물질로부터 스펙트럼 정보를 얻음. 찻잎 샘플로부터 VOC 조성을 분석하고, 목화가 질병에 감염되거나 벌레에 공격받았을 때 VOC의 정성적 변화가 있음을 확인함
 - ▶ 표적 물질을 식물체 외부에서 수집하기 때문에 감염된 식물을 특정하기 어렵고, 일정 농도 이상의 VOC가 축적될 동안 감염 시기와 시간차가 발생하여 조기 진단의 시기를 놓칠 위험이 있음. 하지만, 극저농도의 표적 물질 검출이 가능함을 확인함.
- 금 나노입자를 식물 잎에 뿌린 뒤 말려, 잎에 잔류한 농약의 신호를 얻음.
 - ▶ 표적 물질의 신호를 얻을 수 있는 위치가 식물 잎 표면으로 제한적임. 세포 및 세포 소기관을 비롯한 식물체 내의 다양한 면역반응을 검출하고 이해하는 것이 불가능함.
- 식물체에서 시료를 추출하여 목표물질을 분리 검출하는 연구가 대부분임. 지난 10년간 약 40 편의 논문에서 SERS를 이용한 살충제, 색소, DNA, 호르몬, 영양소, 곰팡이독소 검출 연구가 보고됨. Anthoxyanin계 염료나 DNA를 추출하여 식물 품종에 따른 구성 화합물 차이를 이용해 얻은 SERS 스펙트럼 차이를 분류학적 기준으로 삼는 연구들도 보고된 바 있음.
 - ▶ 표적 물질을 식물체부터 추출하여 분석하기 때문에 파괴적이고 실시간 모니터링이 불가능함. 다만, 식물 생체 시료에 대한 SERS 분광법의 가능성을 확인함.
- 라만 신호를 나노 구조체를 식물에 주입하여 이미징에 활용하려는 시도가 보고됨. 식물에 주입된 나노입자는 독성이 없고, 식물 대사에 영향을 주지 않는 것을 확인함 (RSC Advances, 2014).

→ 현재까지의 SERS 기반 식물 분석법은 *in vivo* 형태보다는 *in vitro* 형태가 주류임.

SERS 기판을 이용하여 차 샘플과 목화의 VOC를 포착하는 과정



금 나노입자를 이용하여 측정한 잔류 농약의 SERS 신호



<그림 19. SERS 분광법 기반 식물 분석 예시/ ACS Omega (2020),
Analytical Methods (2015)>

- SERS 분광법을 *in vivo* 식물 진균 감염 진단에 적용하기 위해서 극복해야 할 점들

- SERS 신호를 안정적으로 측정하기 위해서는 배경-형광 신호의 간섭을 최소화해야 함. 대부분의 식물 배경-형광은 엽록소로 인한 신호이므로, 이를 피하기 위해서는 측정 신호의 범위가 근적외선 영역이어야 함. 따라서 근적외선 영역에서 높은 활성을 갖는 나노입자를 사용해야함.
- SERS 신호의 세기는 나노입자에 의한 신호 증강 정도에 절대적으로 좌우됨. 매우 높은 표면 증강은 핫스팟에서 이루어지므로 나노센서로 사용될 나노입자는 매우 강한 핫스팟을 가져야함. 또한 분자의 신호는 핫스팟 근처에서만 증강되므로 나노입자의 핫스팟 근처로 표적 물질을 유도할 수 있는 능력 또한 필요함.
- 식물 체내에는 많은 물질이 존재하고 이들에 의해서 나노입자의 안정성이 영향을 받을 수 있음. 따라서 식물 체내에서 나노입자가 안정적으로 유지될 수 있도록 표면 개질이 필요함.

1.5. 지식재산권 현황

- 잿빛곰팡이병균 진단 방법 (KR101836741B1) - *Botrytis cinerea* 진단용 프로브 및 프라이머에 관한 발명. 식물체에서 DNA를 추출하여 감염 여부 확인. 하지만, 현장 진단이 가능하지 않은 기술로 본 과제의 경쟁기술이 아님.
- 농작물 역병 감염에 대한 진단 탐침으로서의 펩타이드를 스크리닝하는 방법, 및 이로부터 얻어진 신규한 펩타이드 (KR20090107904A 등록) - 파지 디스플레이를 이용하여 고추 역병의 원인균으로 알려진 고추 역병균 *Phytophthora capsici* 단백질과 특이적으로 결합하는 펩타이드를 스크리닝하여, 고추 역병 진단용 탐침 펩타이드를 선별하고, 해당 펩타이드와의 결합 여부를 통해 고추 역병의 감염 여부를 진단.
- 작물의 병해를 진단하기 위한 종이 기반 PG 검출센서 및 그 제조방법과 이를 이용한 PG 검출방법 (KR101987198B1 등록) - 식물체 표면에 침입한 병원균류가 생성하는 Polygalacturonase (PG)를 검출.
- 양파 노균병 진단용 프라이머 세트, 이를 포함하는 진단용 조성물, 및 진단용 키트 (KR101746413B1 등록)
- 복합 나노구조체를 이용하여 유해바이오 물질을 포집 및 진단하기 위한 시스템 및 방법 (KR10-2018-0000810 출원) - 고분자 기반 나노구조체 상에 각종 병원체,

감염성 미생물을 포집한 뒤, 이를 세포 용해(lysis)시켜 방출된 nuclease에 대하여 응답성을 갖는 프로브의 절단에 의한 형광 신호를 검출함으로써 진단.

- Nanoprobe and method for detecting target analyte using the same (US9885716B2 등록)/ Surface enhanced Raman scattering nano-tagging particle and method for preparing thereof (US 7982870 B2 등록) – 연구팀의 두 특허로 **표적 물질 다중 측정**이 가능한 SERS 나노입자를 개발함.
- Method for simultaneously detecting fluorescence and Raman signals for multiple fluorescence and Raman signal targets (US9833145B2 등록; 독일과 프랑스 등록) –연구팀의 특허로 **형광을 회피하여 라만 산란 스펙트럼을 얻는 기술**의 개념을 보여줌.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

2.1. 1단계 : 식물 체내 신호전달물질 검출 연구

진균병으로 인한 식물 건강 상태를 나노광학 센서를 통해 진단하기 위하여 식물체가 스트레스 상황에 처했을 때 발생하는 체내 신호전달물질을 검출하기 위한 연구를 진행하였음. 식물체의 생체적 특성을 고려하여 광학 신호 수집에 최적화된 나노 구조체를 설계하고, 동시에 다중 분석 상황에서의 나노 센서와 타겟 분자간의 상호작용 예측을 통해 정량 분석 모델링을 수행함. 대표 작물인 딸기에 나노광학 센서를 적용하기 앞서, 모델 실험을 위해 물냉이 (watercress, *Nasturtium officinale*), 보리(barley, *Hordeum vulgare*), 밀(wheat, *Triticum aestivum*)의 식물종을 선정하여 비생물적·생물적 스트레스 상황에서 생성하는 신호전달물질을 나노광학 센서 및 SERS 분광법으로 검출하는 연구를 수행함.

○ 근적외선 영역에서 최적화된 나노광학 센서 설계 및 합성 프로토콜 확보

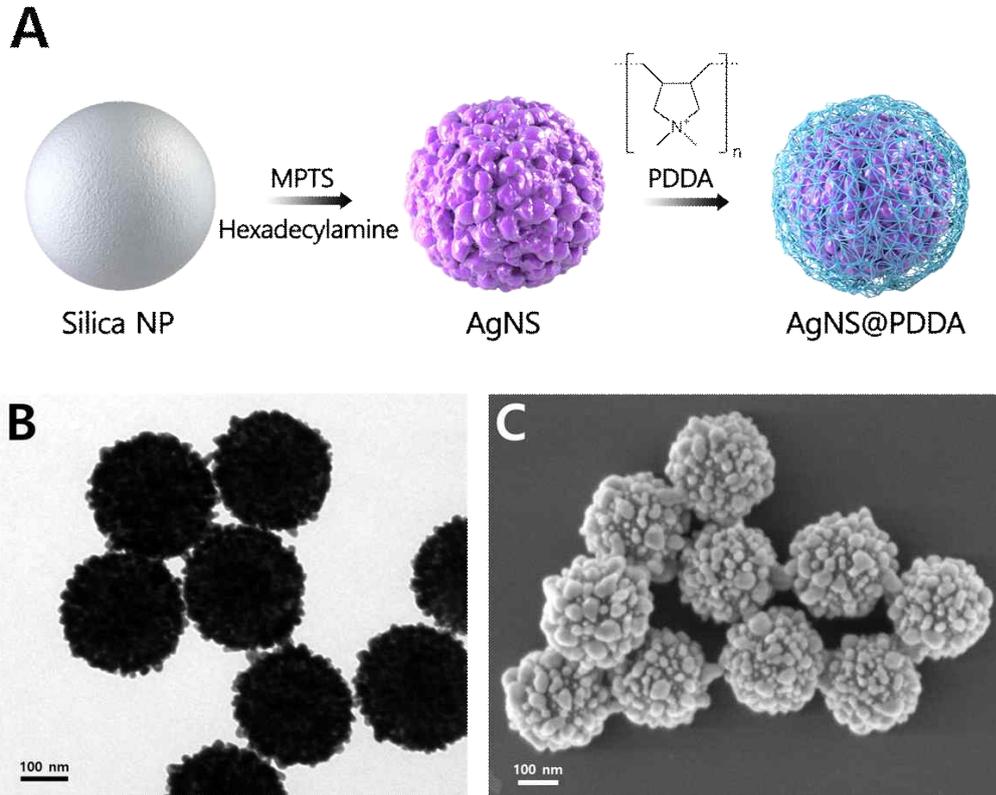
- 식물 체내에서 내부에서 강한 신호를 얻을 수 있는 고감도 SERS 나노센서를 개발함. 본 연구진이 기 개발한 Ag bumpy nanoshell (AgNS)는 약 150 nm 정도 크기의 실리카 나노입자를 코어로 하여 그 표면이 매우 울퉁불퉁한 여러 개의 은 나노입자로 이루어져 있음(그림 18). SERS의 표면 증강은 나노입자의 첨단 혹은 입자 간의 접점에서 매우 강하게 이루어지며, 이를 핫스팟이라 부르는데 AgNS의 경우 표면의 매우 강한 요철로 인하여 상당히 강한 신호 증강효과를 유도할 수 있음. 또한 입자 표면 일부에 핫스팟이 국한되지 않고, 모든 면적에서 고르게 분포하고 있기 때문에 매우 높은 수준의 신호를 얻는 것이 가능함.
- 식물 잎에 광범위하게 존재하는 엽록소 a에서 발생하는 600~750 nm 영역의 배경 형광 신호를 회피해서 SERS 신호를 측정하는 것이 필수적임. 이를 위해, 광학적 활성도가 근적외선 영역에 해당하는 ~780 nm 까지 매우 높게 유지될 수 있도록 나노센서 표면을 개질함(그림 19).

○ 표적 물질에 대한 최소 검출 농도 확보: 고감도 SERS 나노센서 개발

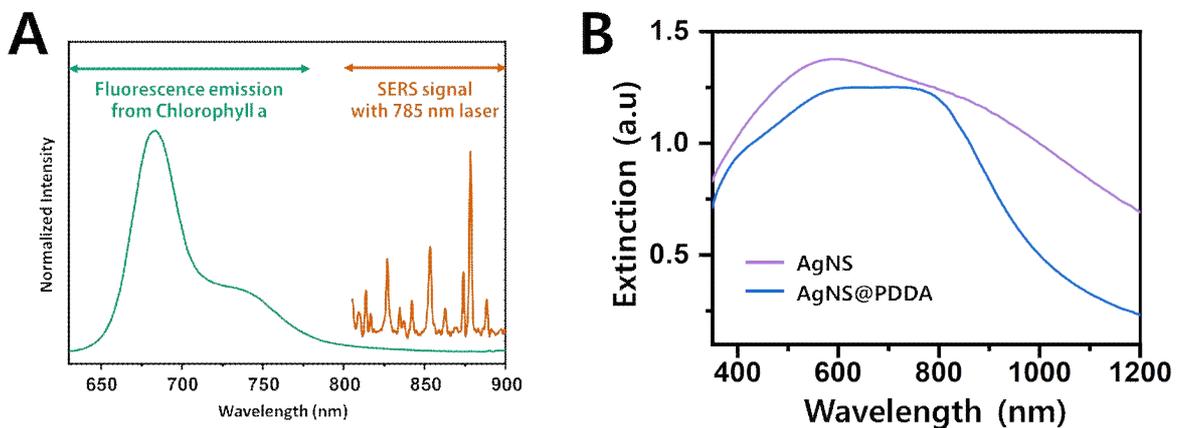
- 기존의 AgNS는 실리카 shell을 가지고 표적 물질과 특별한 상호작용 없이, 단순히 금속 나노입자 표면에 존재하는 분자만을 증강시켜 SERS 신호를 얻었기 때문에 표적이 되는 분자가 금속 표면과 상호작용이 약한 경우 표면 증강 효과를 거의 얻을 수 없었음. 주로 금속과 강한 결합을 이루는 분자는 -NH₂나 -SH 말단을 가지지만, 생물 대사에 매우 중요한 분자들은 대부분 그러한 작용기를 가지고 있지 않아 SERS 효율이 낮고, 라만 신호의 효율을 결정하는 신호 단면적(cross-section) 또한 낮은 편이기 때문에 SERS 신호 검출이 매우 어려움.
- 위와 같은 문제점을 극복하기 위하여 표적 물질의 유도 전략을 채택함. Poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA) 고분자 사슬로 AgNS 표면을 둘러싸 표면 전하를 (+)로 기존의 AgNS의 표면에 Poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA) 고분자로 처리하여 (AgNS@PDDA) 나노센서의 표면 전하를 약 +50 mV까지 증가시키고, 정전기적 인력 (electrostatic attraction) 및 수소결합을 통해 검출하고자

하는 표적 분자의 검출 능력을 크게 향상시키는데 성공하였음(그림 20).

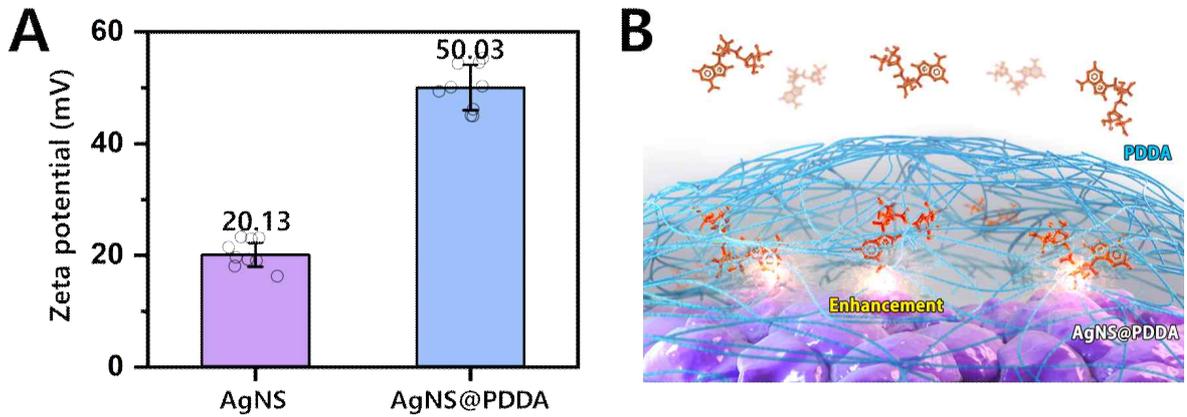
- PDDA 고분자를 나노센서 표면에 도입하여 기능화 한 이후에도 나노센서 표면의 bumpy Ag nanoshell 구조가 잘 유지되고 있음을 TEM, SEM 이미지로 확인함. 나노입자 추적분석법 (Nanoparticle tracking analysis, NTA) 기법을 활용한 hydrodynamic radius 측정 결과에서는 PDDA 고분자 사슬도입으로 인해 약 30 nm 증가했음을 확인함(그림 21). 또한 UV-Vis 분광기를 이용하여 extinction 스펙트럼을 측정한 결과, PDDA를 처리하더라도 여전히 785 nm에서 높은 광학적 활성도를 지녀, 살아있는 식물체 내 신호검출에 적합함을 증명함.



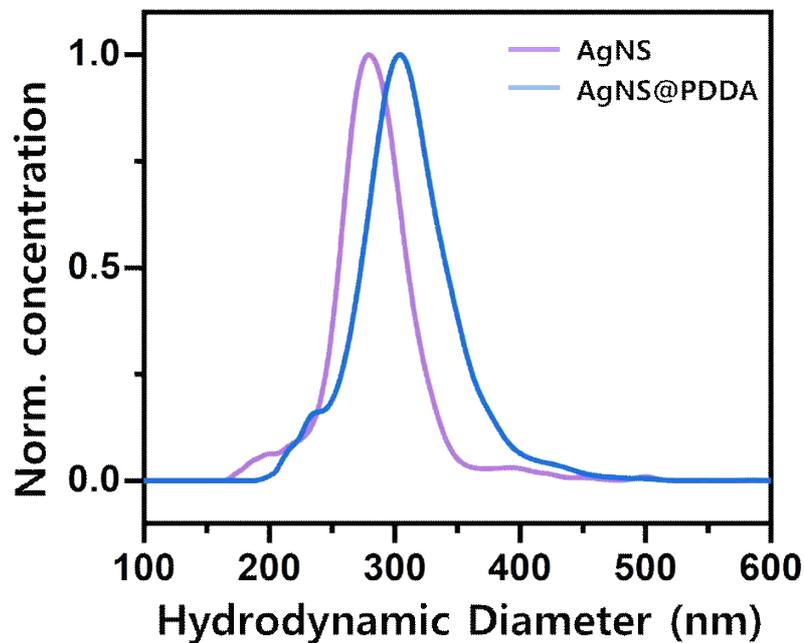
<그림 18. AgNS@PDDA의 합성 모식도(A), AgNS@PDDA의 TEM(B), SEM(C) 이미지>



<그림 19. 식물 배경형광신호와, 785 nm 레이저 사용 시 측정된 SERS 신호(A), AgNS와 AgNS@PDDA의 파장별 광학활성도(B)>

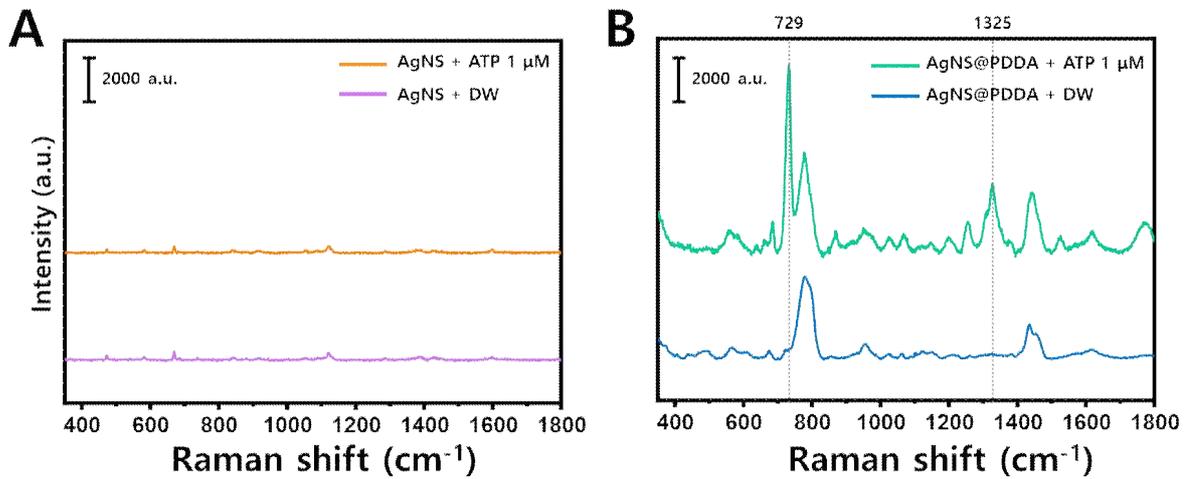


<그림 20. PDDA 처리 전후의 zeta potential 변화(A), AgNS@PDDA의 표적 분자 유도 메커니즘 모식도(B)>

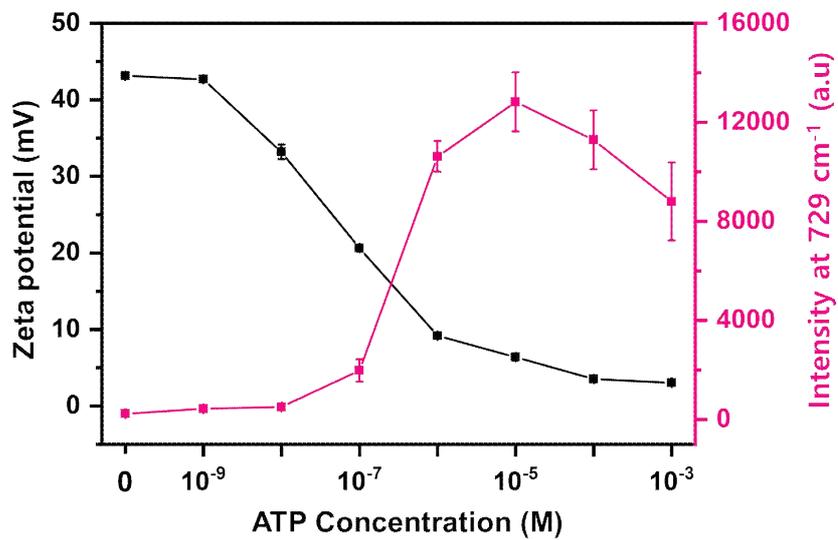


<그림 21. PDDA 처리 전후의 나노센서의 hydrodynamic diameter 변화>

- 식물 물질대사에 매우 중요한 물질 중 하나인 adenosine triphosphate (ATP)는 자체적으로 매우 낮은 라만 단면적을 가지면서도 금속과 매우 낮은 친화성을 지녀, 이전의 AgNS에서는 검출이 어려웠음. 그러나 AgNS@PDDA로 ATP의 검출 실험을 수행한 결과 이전에는 얻을 수 없었던 매우 높은 민감도의 신호를 얻을 수 있었음(그림 22). 특히 약 1 nM 수준의 최소 측정 한계(LOD)를 달성하여, 식물 체내 존재하는 ATP의 검출이 충분히 가능함을 검증함(그림 23).
- 나노센서 표면에 존재하는 reactive site에 검출분자가 접근하여 reactive site를 채워감에 따라 SERS 신호 세기는 증가함. 다시 말해, 나노센서 주변에 존재하는 검출분자가 높을수록 SERS 신호 세기는 증가하고, 이는 나노센서의 표면전하의 변화로 증명할 수 있음. 일정 농도 이상의 검출 분자가 reactive site를 saturation 시키고 나면, SERS 신호 세기는 더 이상 증가하지 않는 정체기 상태 (plateau)에 도달하게 되며, 그 이상의 농도에서는 표면전하의 neutralization으로 전하 반발력에 의한 분산안정성이 감소함(그림 23).

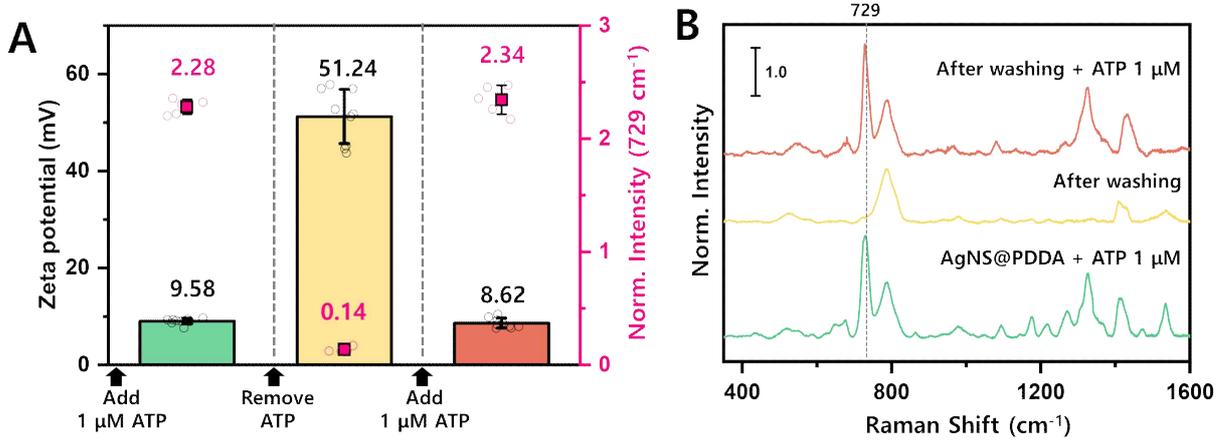


<그림 22. 동일한 농도의 ATP에 대한 AgNS(A)와 AgNS@PDDA(B)의 신호 검출 비교>



<그림 23. ATP 분자에 대한 AgNS@PDDA의 SERS 신호 세기와 zeta potential의 변화>

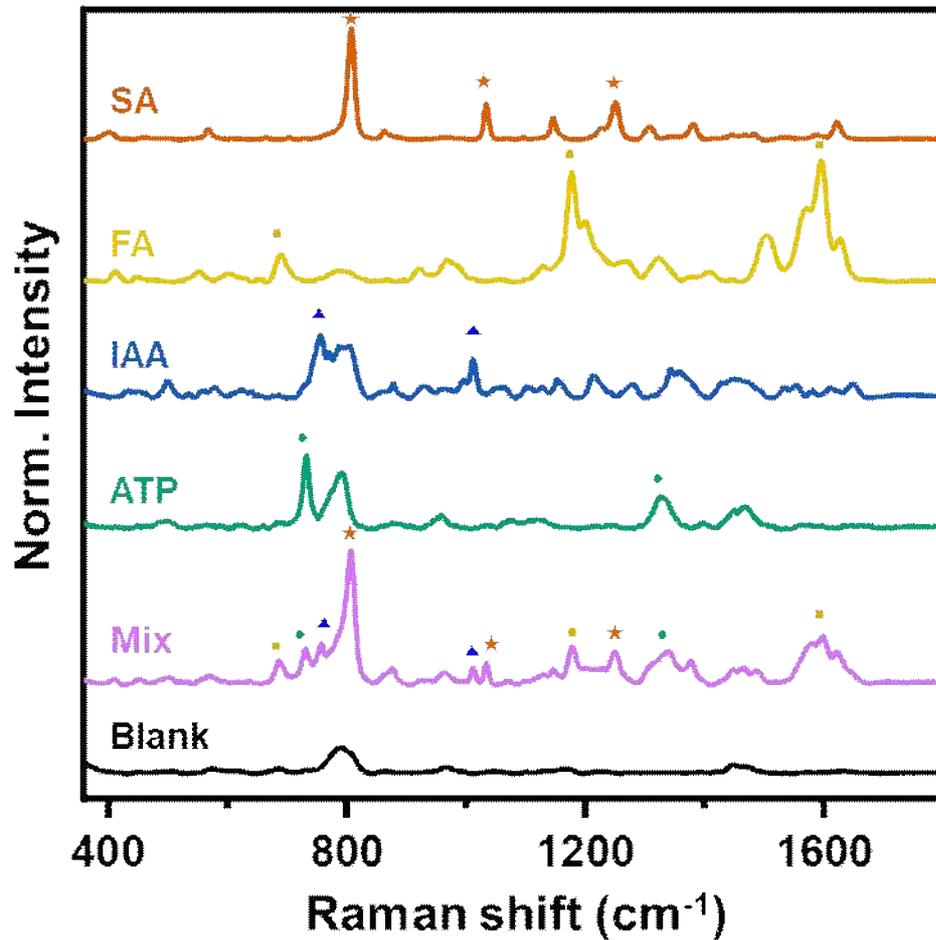
- 지속적이고 실시간의 SERS 모니터링을 위해서는 측정 분자와 나노센서의 결합 과정이 가역적(reversible)해야만 가능함. 이를 검증하기 위해 ATP를 검출한 이후, 나노센서로부터 ATP를 제거한 이후, 나노센서가 원래 가지고 있던 표면 전하값을 회복하는 것을 확인함. 이는 나노센서와 검출 분자와의 상호작용이 비공유결합에 의한 것으로서, 주변 검출분자 농도에 의존적인 가역반응임을 의미함. 나노센서 주변에 존재하는 검출 분자의 농도 증감에 따라 SERS 신호 세기가 변함으로 이를 이용하여, 식물 내부에서 실시간으로 변화하는 표적 물질의 농도 dynamics를 모니터링할 수 있음을 검증함(그림 24).



<그림 24. ATP 검출 후 제거 시 AgNS@PDDA의 표면전하 및 SERS 신호 세기 비교(A), 동일한 과정에서의 스펙트럼 변화(B)>

○ 딸기 잿빛곰팡이 병 진단을 위한 표적 물질 선정 및 나노센서의 다중검출 능력 검증

- 병증이 전혀 눈에 보이지 않는 진균류 감염 초기에, 분자 인식 기반으로 식물 내 일련의 반응을 이해할 수 있도록 표적 물질을 선정함. 검출하고자 하는 표적 물질은 (1) 잿빛곰팡이균 (표면 분자, DNA 등), (2) 잿빛곰팡이균이 분비하는 분자들 (mycotoxin, 세포벽 분해 효소 등), (3) 딸기 식물이 생성하는 면역반응관련 분자들(salicylic acid, indole-3-acetic acid, extracellular adenosine triphosphate 등)로 그룹화 함. SERS 신호로 검출이 가능한 표적 물질들을 선정하고, 해당하는 주요 검출 분자들 간의 상관관계를 바탕으로 딸기 잿빛곰팡이병 감염 초기의 반응을 다각적으로 분석하고자 하였음.
- 식물 체내에는 다양한 신호 물질들이 혼재되어 있기 때문에 두 가지 이상의 분자들의 상호작용을 분석함으로써, 보다 풍부하고 정확한 식물 스트레스 관련 정보를 얻을 수 있음. 따라서, 나노 센서의 다중 분자 동시 측정능력이 필수적임. 식물 대사 관련 및 호르몬 분자에 해당하는 4 종류의 분자(Salicylic acid (SA), Folic acid (FA), Indole-3-acetic acid (IAA), Adenosine triphosphate (ATP))를 가지고 다중 분자에 대한 동시 측정능력을 검증하기 위해 4 종류의 분자를 모두 섞어 측정 실험을 수행하였음. 그 결과, 각각의 물질들에 고유한 SERS 밴드 신호들을 모두 검출하는 데 성공함(그림 25).



<그림 25. 식물 방어체계 전달물질에 대한 AgNS@PDDA의 다중 검출 능력 실험 결과>

○ 표적 물질과 나노센서의 상호작용 메커니즘 및 정량화 분석

- 다중 SERS 검출의 경우, 여러 가지 분자들이 경쟁적으로 나노센서 표면에 접근하므로 기존의 단일 분자 검출보다 그 신호의 양상이 달라짐. 따라서 정확한 정량분석을 위해서는 다중 검출에 대한 정량적 분석모델을 새롭게 구축할 필요성이 있음. 분자가 고체 표면에 흡착되는 현상을 설명하는 Langmuir model을 기반으로, 두 가지 분자가 혼합된 상황에서 각각의 분자가 나노입자 표면에 흡착하는 비율 (coverage fraction)을 계산할 수 있는 관계식을 개발함(식 1).

나노 센서의 surface binding site인 N,M과 물질 X,Y가 결합한다고 생각할 수 있다.



각각의 반응식에 대한 평형상수는 다음과 같다:

$$K_X = \frac{[X_{bound}]}{[N][X]} \quad K_Y = \frac{[Y_{bound}]}{[M][Y]}$$

이때 X와 Y의 binding fraction이 서로에게 미치는 영향을 다음과 같다고 가정한다.

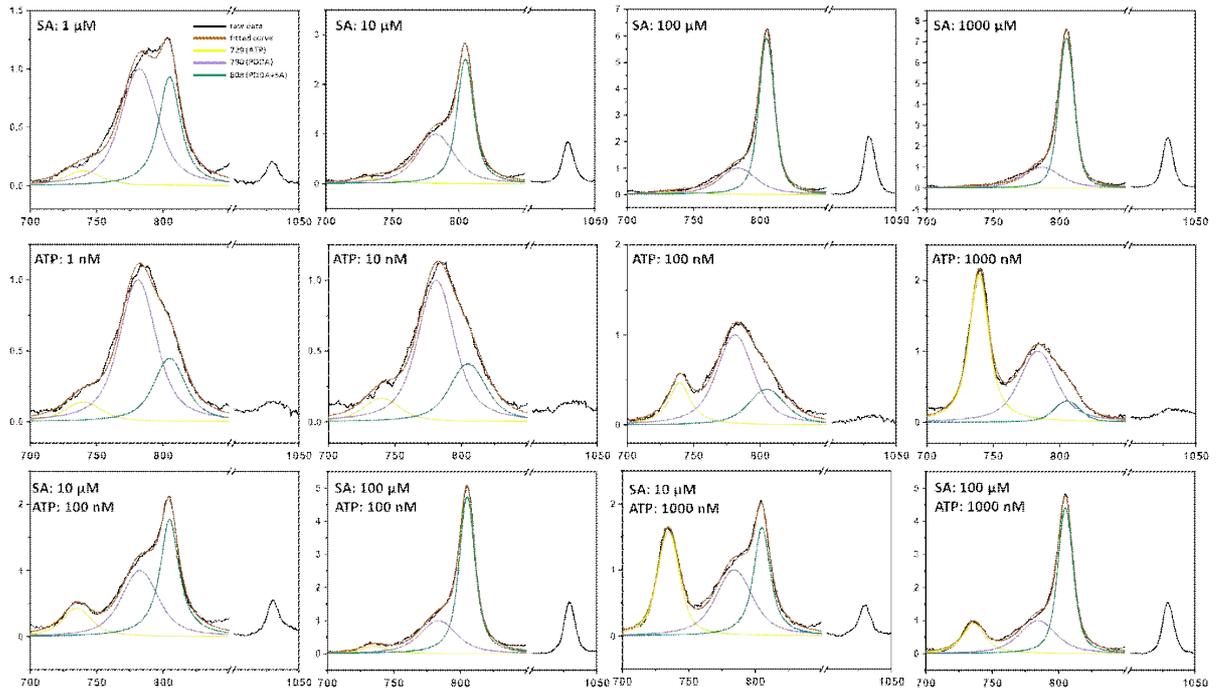
$$[N_{eff}] = [N] \cdot (1 - \theta_X^\alpha) \quad [M_{eff}] = [M] \cdot (1 - \theta_X^\beta)$$

이를 각각의 식에 대입하면

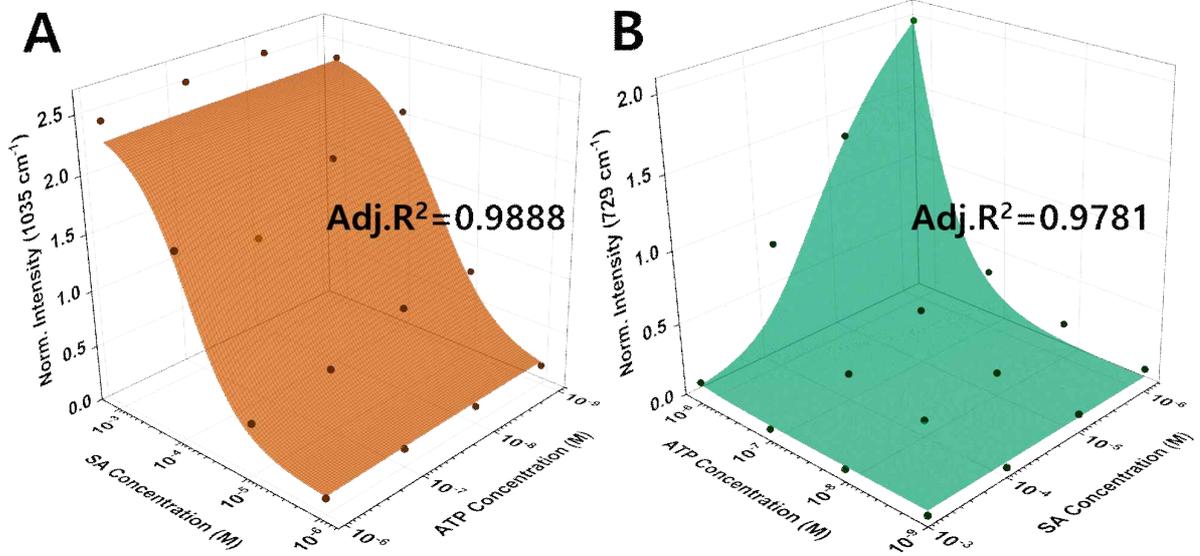
$$\theta_X = \frac{K_X[X] \cdot (1 - \theta_Y^\alpha)}{1 + K_X[X] \cdot (1 - \theta_Y^\alpha)}, \quad \theta_Y = \frac{K_Y[Y] \cdot (1 - \theta_X^\beta)}{1 + K_Y[Y] \cdot (1 - \theta_X^\beta)}$$

<식 1. 혼합물에서의 나노 입자와 분자 흡착 비율에 대한 수식화 모델>

- 식물의 면역반응관련 분자인 SA와 ATP로 혼합물을 구성하고 농도별 SERS 신호를 측정하여, SA에 해당하는 1035 cm⁻¹ 밴드와 ATP에 해당하는 729 cm⁻¹ 밴드의 신호 세기를 분석함. 이후 수식 모델로부터 3차원상의 model fitting surface를 구성하고, 이를 통해 스펙트럼의 밴드 세기로부터 표적 물질의 농도를 역산할 수 있는 다중 정량분석 모델을 구축함(그림 26, 27). 측정값과 계산값을 비교분석한 결과, 수식적 모델이 매우 높은 정확도로 측정값을 예측할 수 있음을 확인함.



<그림 26. 두 가지 분자 ATP, SA에 대한 다중 신호의 정량적 분석>



<그림 27. 두 가지 분자 SA(A), ATP(B)의 혼합물에 대한 SERS 신호 세기 경향성 분석. 점은 실험으로부터 얻은 측정값을 나타내고, 색칠된 메쉬 곡면 플롯은 계산값을 나타냄>

- 개발한 수학적 모델을 기반으로 실제 식물 체액에서 적용 가능성을 모색함. 기존의 수학적 모델에서 식물 체액의 영향을 나타내는 항을 새롭게 도입하여 수식을 수정하고 (식 2) 이를 측정값과 비교한 결과, 마찬가지로 높은 일치율을 얻을 수 있었음(그림 28).

식물 체액은 매우 많은 종류의 분자들이 복잡하게 섞여 있는 혼합체이지만, 나노 입자의 binding site에 미치는 영향을 평균 내어 어떤 한 가상 분자만의 영향으로 고려해볼 수 있다.

따라서 기존의 X에 대한 binding site의 관계식은 다음과 같이 수정될 수 있다.

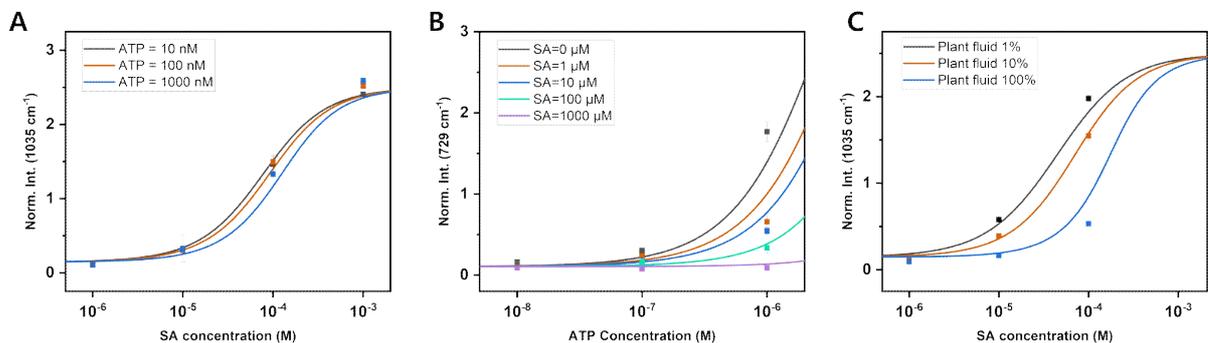
$$[N_{eff,x}] = [N] \cdot (1 - \theta_Y^\alpha)$$

$$\rightarrow [N_{eff,x,plant}] = [N] \cdot (1 - \theta_{plant}^Y) \cdot (1 - \theta_Y^\beta)$$

마찬가지로 Y에 대한 binding site의 관계식도 동일하게 수정된다.

$$[M_{eff,y,plant}] = [M] \cdot (1 - \theta_{plant}^Y) \cdot (1 - \theta_X^\alpha)$$

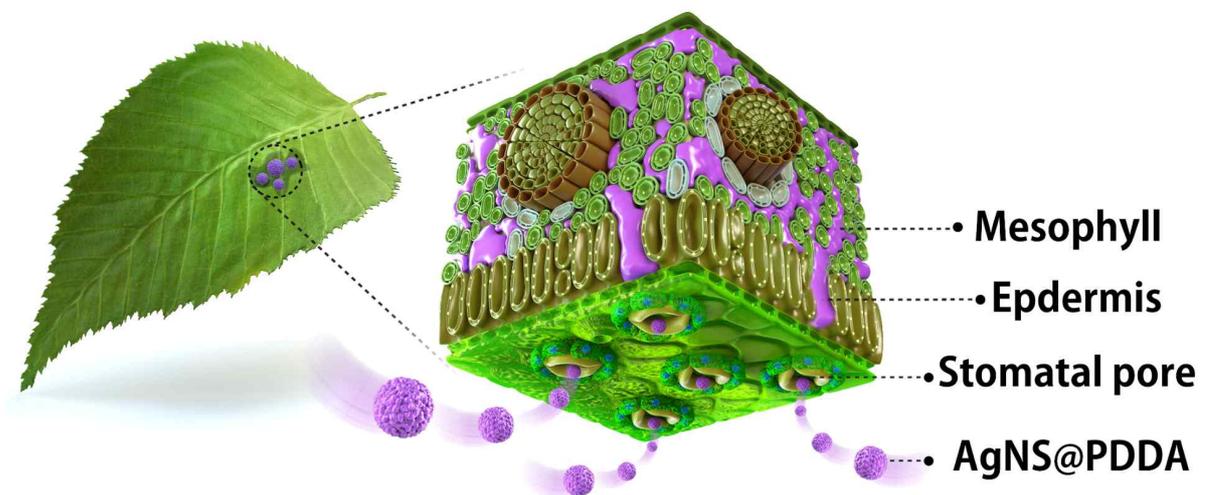
<식 2. 식물 체액 내에서의 나노 입자와 분자 흡착 비율에 대한 수식화 모델>



<그림 28. 10% 식물 체액에서의 ATP(A)와 SA(B)의 혼합물의 신호 측정값(점)과 계산값(실선). 식물 체액의 농도에 따른 SA의 신호값 변화와 계산값 비교(C)>

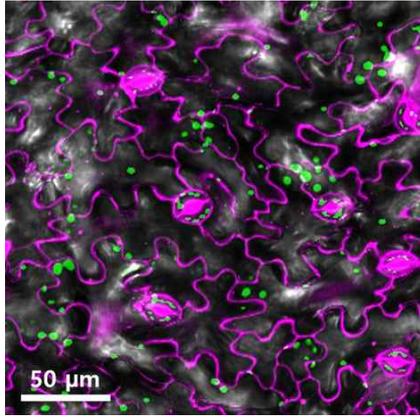
○ 식물 내 선택적 국지화를 위한 나노센서 설계 및 검증

- 식물 세포는 세포벽이 있어 동물 세포에 비해 나노입자의 투과가 매우 제한적임. 또한, 식물 세포 내 소기관들에 대한 나노입자투과기작이 각기 다를 것으로 예상됨. 분석대상 물질의 생성 부위 및 이동 경로를 정확하게 파악하고 분석하기 위해서는 나노센서의 선택적 위치가 필수적이므로, 나노입자의 표면 전하와 크기 등의 주요 변수들을 미세조절하여, 식물체 내 원하는 위치에 나노센서를 선택적으로 국지화시키고자 했음.
- 식물 잎 내부에서 세포벽을 따라 나노센서들을 위치시켜, 세포 내부에서 생성되는 물질이 세포 밖으로 분비되고 다른 세포로 이동하며 스트레스 신호를 전달하는 과정을 탐색하고자 함. 식물의 스트레스 신호 전달을 정확하게 감지함으로써 실제 병증이 일어나기 전의 식물 상태를 읽을 수 있어, 조기 진단에 응용할 수 있음.
- 나노입자의 분포는 형광과 SERS 두 가지 신호를 통해 식물 내 분포를 정밀하게 검증함. 개발된 나노센서는 표면이 금속이기 때문에 형광 분자를 도입할 경우 발생하는 quenching 효과를 우회하고자, 유사한 크기와 표면 전하 특성을 갖는 형광 dye-실리카 나노입자를 합성하여 실험에 사용함. 공초점 형광 현미경 이미징을 통해 측정된 형광 이미지는 물냉이(*watercress, Nasturtium officinale*), 보리(*barley, Hordeum vulgare*), 밀(*wheat, Triticum aestivum*) 세 가지 식물에 대해서 측정하였음. 본 연구에서 사용하는 나노센서는 hydrodynamic 직경이 300 nm로서, 기공을 통과하여 식물체 내로 들어간 뒤에 세포 내로 들어가지 않고 intercellular space에 위치하도록 설계함(그림 29). 실제 현미경 관찰 결과 나노 입자들이 세포벽을 따라 위치하고 있는 것을 확인하였음(그림 30,31 또한 공초점 현미경을 이용하여 잎의 표면 (epidermis)와 내부 (mesophyll)에서의 AgNS@PDDA의 위치를 모두 분석함. AgNS@PDDA의 자체적인 230 cm^{-1} 에서의 측정되는 강한 신호를 식물체 내 나노센서의 분포를 알려주는 reference로 사용해서 위치를 파악하였는데, 형광 이미지와 동일하게 epidermis와 mesophyll 모두 나노센서가 식물 세포벽을 따라 위치함을 확인하였음.(그림 32).

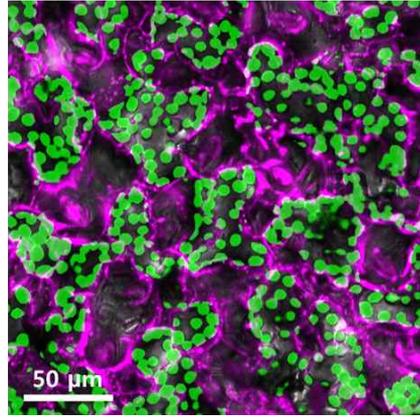


<그림 29. 식물 기공을 통해 식물 내부로 주입된 나노센서 모식도>

Epidermis

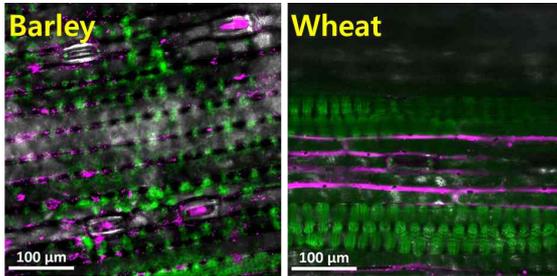


Mesophyll

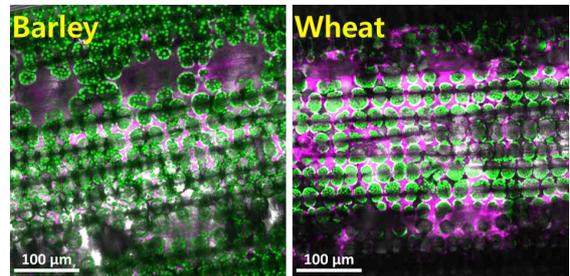


<그림 30. 물냉이에 주입된 형광 나노입자의 분포. 초록: 엽록체, 보라: 나노입자>

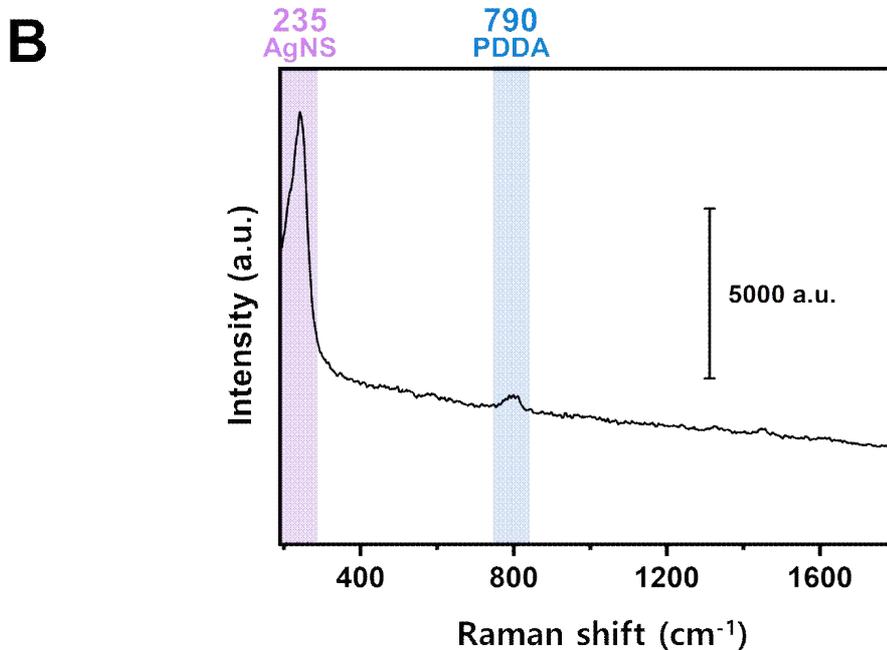
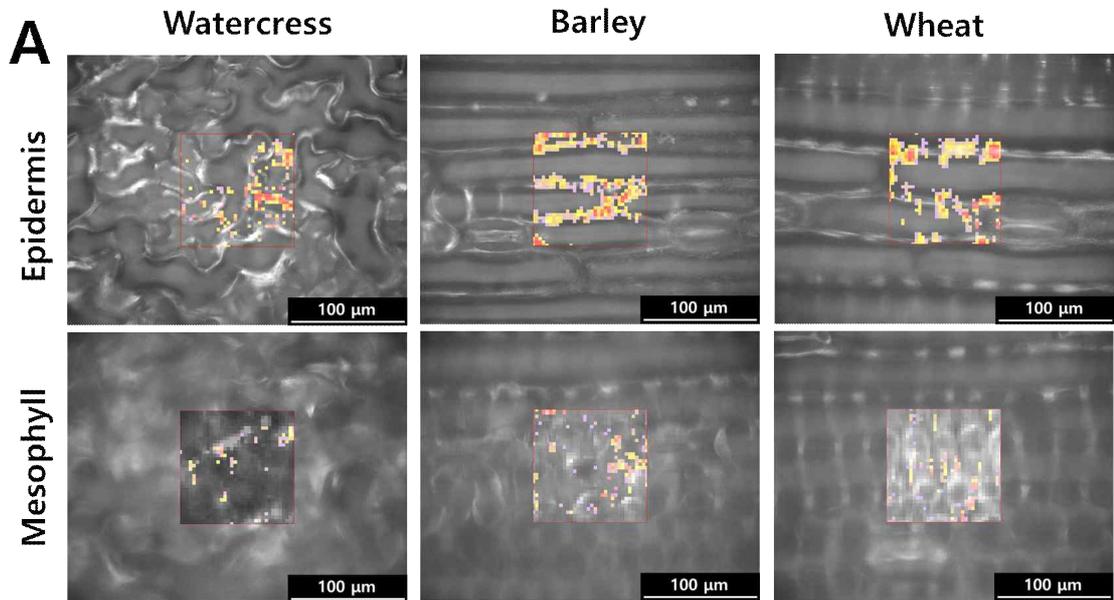
Epidermis



Mesophyll



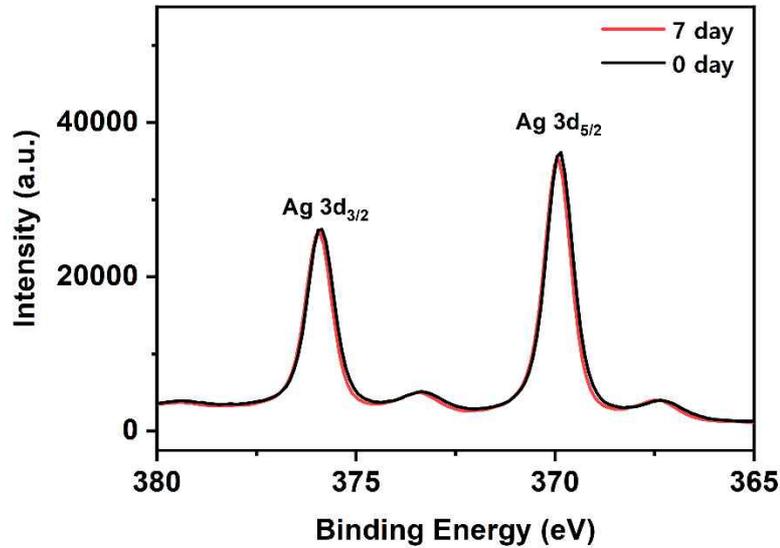
<그림 31. 밀과 보리에 주입된 형광 나노입자의 분포. 초록: 엽록체, 보라: 나노입자>



<그림 32. 물냉이, 밀, 보리에 주입된 AgNS@PPDA의 SERS 이미지(A), AgNS@PPDA의 자체 SERS 스펙트럼(B)>

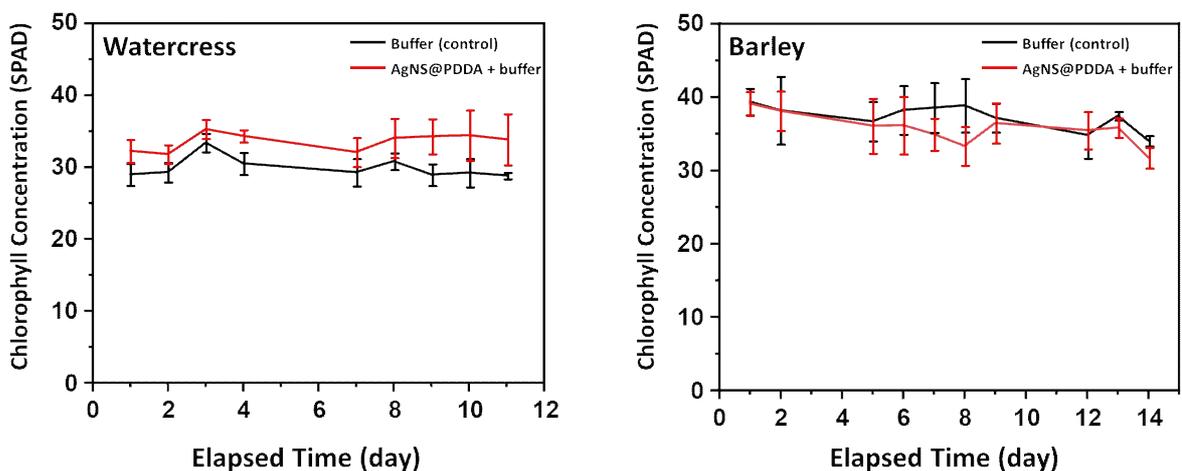
○ 식물 체내에서의 나노센서의 안정성 및 생체 적합성 검증

- 식물의 건강 상태를 지속적으로 모니터링하기 위해서는 식물 체내로 도입된 나노센서의 안정성이 필수이며, 동시에 나노입자의 도입 자체가 식물에 스트레스를 유발해서는 안되기 때문에 나노센서의 생체 적합성 역시 요구됨.
- AgNS@PPDA의 콜로이드 수용액 상에서 안정성을 확인하기 위해, 상온 조건에서 7일 동안 수용액에서 보관된 AgNS@PPDA의 X-ray photoelectron spectroscopy(XPS) 스펙트럼을 측정함. 그 결과 7일이 경과해도 AgNS@PPDA의 은 나노입자들은 산화되지 않고 매우 안정하게 그 상태를 잘 유지하고 있음을 확인함(그림 33).

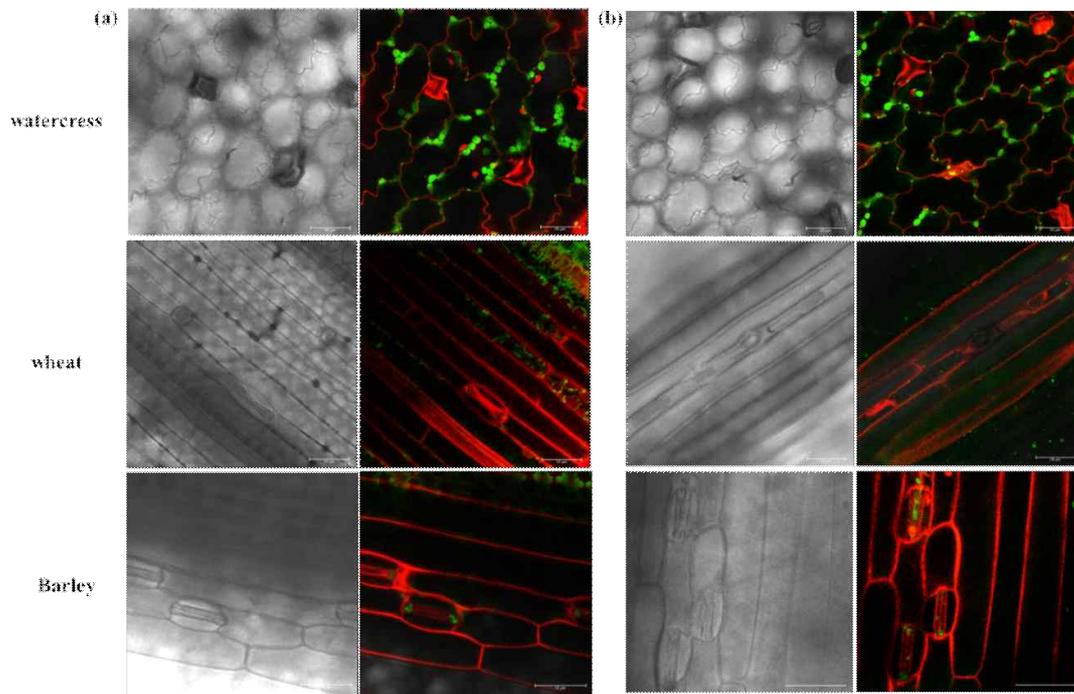


<그림 33. 수용액 상태에서 7일 경과 전후의 AgNS@PDDA의 XPS 스펙트럼>

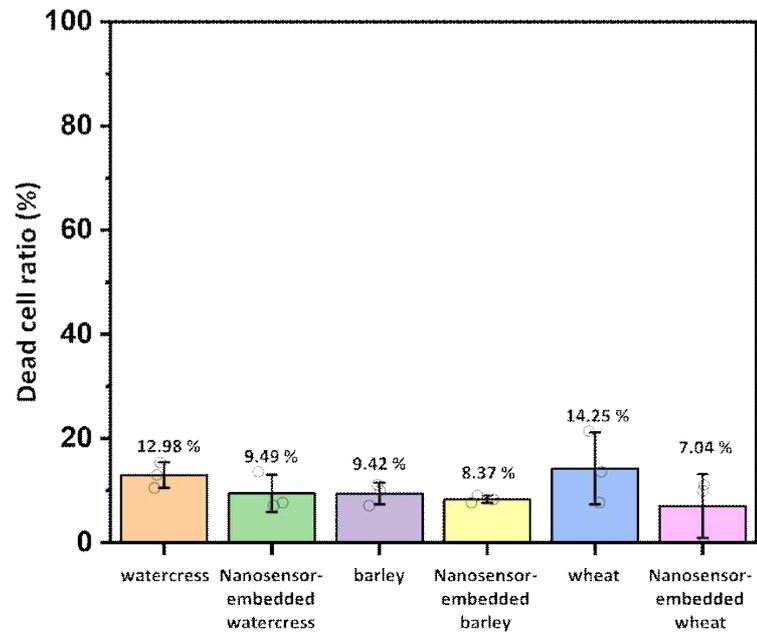
- 나노센서의 식물체에 대한 생체 적합성을 확인하기 위해, 나노센서가 주입된 식물 잎의 chlorophyll content 측정과 cell death를 확인할 수 있는 propidium iodide assay(PI assay)를 수행함. 나노센서의 유해성을 확인하기 위해서 대조군은 나노센서 없이 buffer 용액만 주입하였으며, 나노입자는 buffer와 함께 주입하였음.
- chlorophyll contents 측정은 물냉이와 보리 두 종류의 식물에 대해서 수행하였는데, 두 식물 모두 나노센서를 주입한 실험군과 주입하지 않은 대조군이 유의미한 차이를 보이지 않았음. 그 결과는 약 2주 동안 지속되어 나노센서의 식물 체내 유해성이 미미함을 검증함(그림 34).
- PI assay를 통해 나노센서의 주입을 통해 파괴된 식물 세포의 개수를 공초점 현미경을 통해 형광이미지로 확인함. chlorophyll contents 측정과 동일하게, 모든 식물 종류에서 대조군과 실험군 사이의 유의미한 차이를 발견하지 못하였음(그림 35, 36).



<그림 34. 나노센서를 주입한 물냉이와 보리의 chlorophyll contents의 변화 양상>



<그림 35. PI assay의 결과를 공초점 현미경을 통해 확인한 이미지>



<그림 36. PI assay를 통한 cell death 비율 비교>

○ 식물체의 표적 물질 후보군에 대한 표준 SERS 스펙트럼 데이터베이스 구축

- 식물체에서 발생할 수 있는 신호 전달 분자의 SERS 스펙트럼을 분석하기 위하여, 신호 전달 물질뿐만 아니라 식물 대사물질 및 신호전달물질의 전구체 중 유력한 화합물들을 선정함. 선정된 물질들의 SERS 스펙트럼을 측정하고 표준 데이터를 확보하여 추후의 분석에 활용될 데이터 라이브러리를 구축함.
- SERS 신호의 특성과 품질은 측정 조건에 크게 좌우되기 때문에 화학적 특성이 서로 다른 수십 종의 화합물들의 표준 SERS 스펙트럼을 확보하기 위해서는 범용적으로 적용 가능한 SERS 측정법이 필요함. 동시에 실제 측정은 식물 체내에서 이루어지기 때문에 이와 유사한 SERS 측정 환경을 재현할 필요가 있음. 이를 위하여 표적물질 후보군의 SERS 측정에 적합한 SERS 기판을 설계 및 제작하였음.
- 유리 기판위에 폴리머 코팅을 처리하여 초발수성을 갖는 SERS 기판을 제작함 (그림 37). 측정하고자 하는 분자와 나노광학 센서를 섞어 매우 작은 물방울 형태로 기판 위에 올리게 되면, 시간이 지나면서 물방울이 마르면서 매우 좁은 면적에 나노 광학센서들이 밀집되는 효과를 가져와 매우 강한 SERS 신호를 내게 됨. 이때, 나노 광학센서는 MWCNT 표면위에 얇은 필름층을 형성하게 되면서 동시에 상단부는 타겟 분자가 녹아 있는 수용액 층에 노출이 됨. 이는 식물 세포벽 표면에 나노 광학센서가 국지화된 상태로 식물 체액에 녹아 흐르는 신호전달물질을 검출하는 것과 유사한 환경임.
- SERS 신호의 측정은 수용액 방울이 완전히 마르지 않은 상태로 이루어졌기 때문에, 일반적인 SERS 기판에서 분석물을 말려 측정하는 방식과는 차별화되며 물방울을 통해 레이저로 인한 열의 분산이 이루어져 분석 물질이 타거나 변질되는 현상을 방지할 수 있다는 장점도 가짐. 또한 수용액 방울의 부피가 감소함에 따라 분석물질의 농도 역시 점차 농축되기 때문에 적은 양의 분석 물질로도 높은 신호 세기와 SNR(signal to noise ratio)를 달성할 수 있었음.

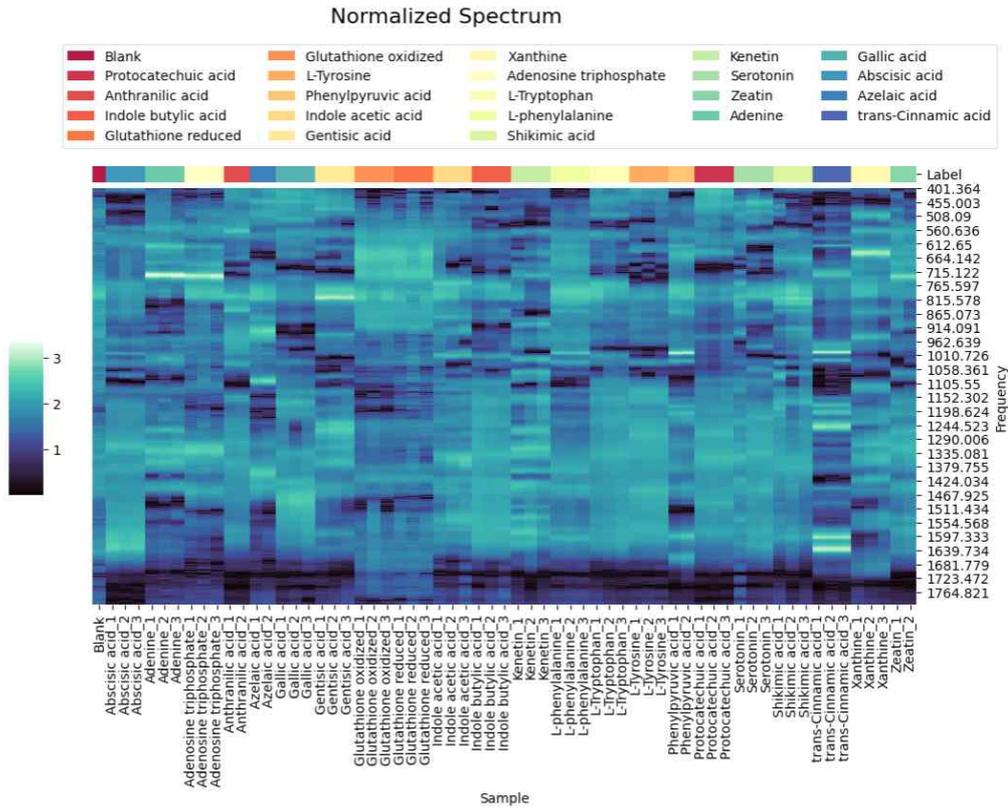


<그림 37. 초발수성 SERS 기판을 이용한 신호 측정 과정 모식도>

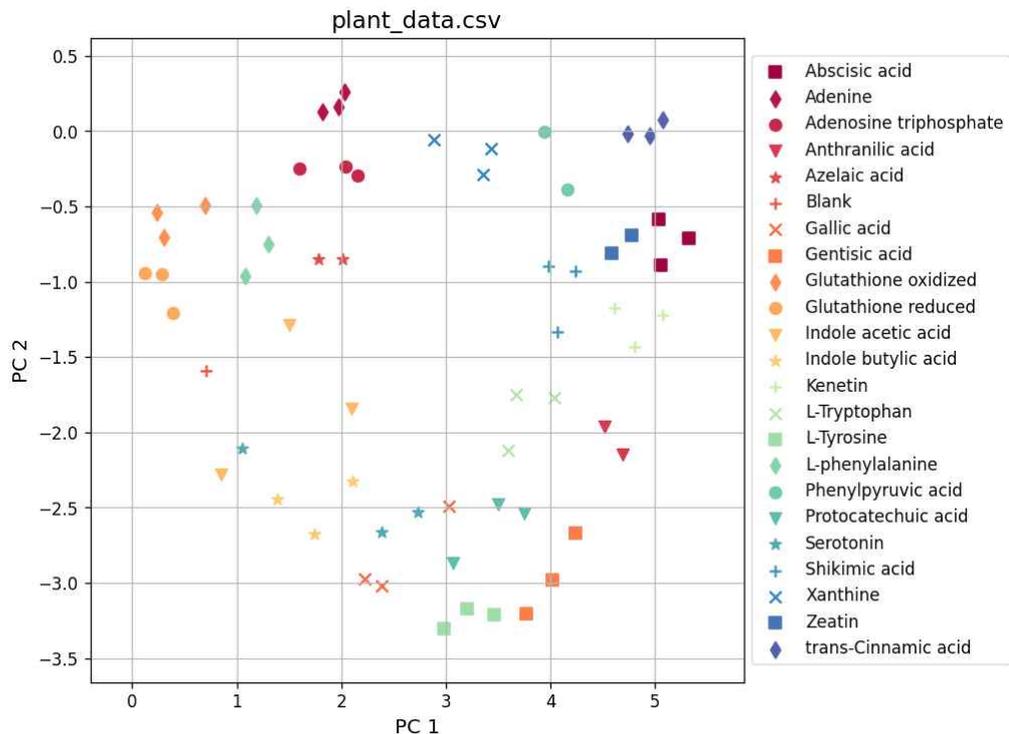
- 위와 같은 측정 방식으로 총 22 종의 표적 물질 후보에 대한 표준 SERS 스펙트럼을 확보 및 라이브러리를 구축함 (그림 38).
- 22종의 후보군 분자 스펙트럼의 효율적인 판별을 위하여 머신러닝 기법을 도입한 알고리즘 개발을 진행함. 표준 SERS 스펙트럼을 PCA (principal component analysis)을 통해 2차원 벡터 공간에 사영하고, 이를 UMAP (uniform manifold approximation and projection) 기법을 통해서 평면 공간 상에서 다양한 스펙트럼들이 어떻게 구별될 수 있는지 시각화를 시도함. 그 결과 대부분의 분자들의 SERS 스펙트럼을 쉽게 구별할 수 있었음 (그림 39, 40).
- 개발된 SERS 기판과 알고리즘을 기반으로 향후 더 많은 표적 물질 후보군에 대해 추가적인 데이터 라이브러리 확보가 가능할 것으로 전망됨.

| 표적 물질 | Abscisic acid | Adenosine triphosphate | Folic acid | Gallic acid | Indole-3-acetic acid | Melatonin | Salicylic acid | Serotonin |
|-----------|---------------|------------------------|------------|-------------|----------------------|-----------|----------------|-----------|
| 분자 구조 | | | | | | | | |
| SERS 스펙트럼 | | | | | | | | |

<그림 38. 대표적인 표적 물질 후보들의 분자구조와 표준 SERS 스펙트럼>



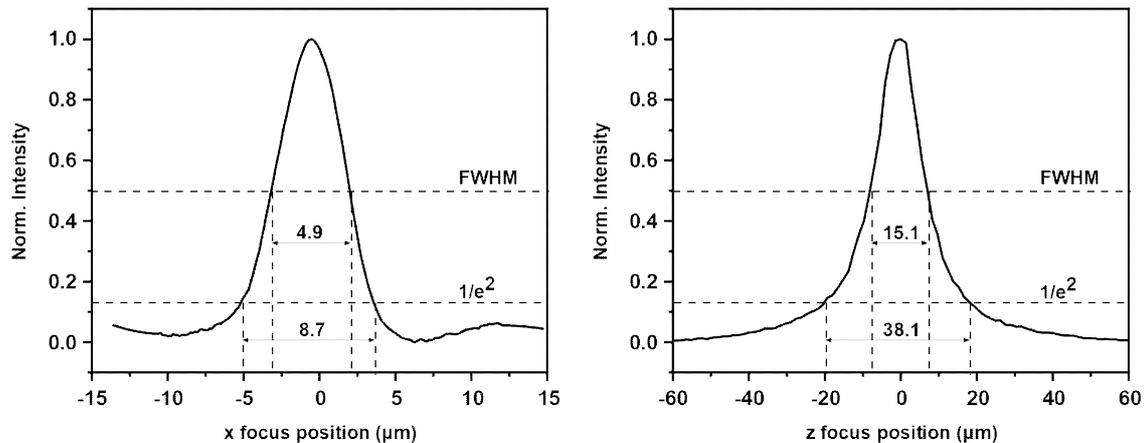
<그림 39. 표적 물질 후보들의 표준 SERS 스펙트럼의 분석>



<그림 40. UMAP 기법을 활용한 표준 SERS 스펙트럼의 분석 시각화>

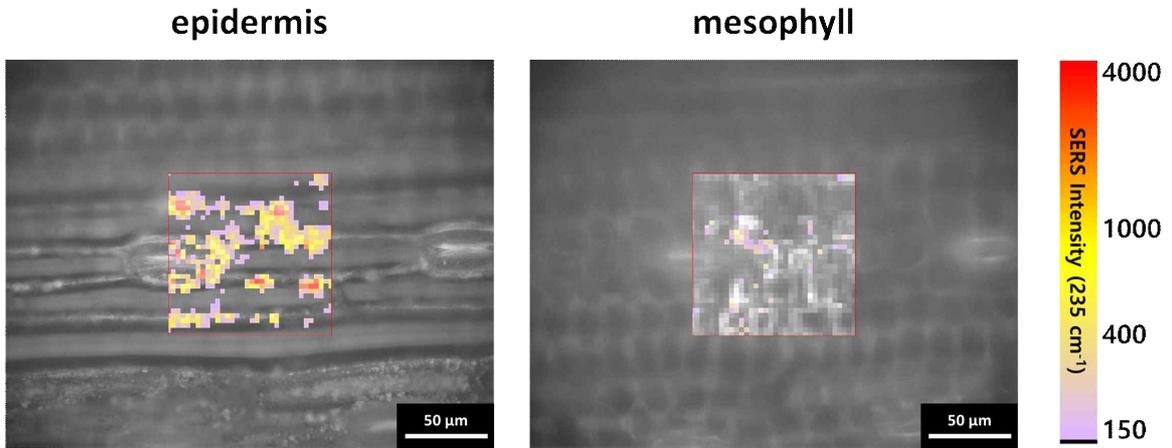
○ 나노센서가 도입된 식물체 SERS 신호의 시공간적 분석

- 식물의 신호 전달 물질의 발생과 전달 과정은 그 위치와 시간에 따라 양상이 달라질 수 있음. 예를 들어 병변으로부터 거리가 가까우면 신호 전달 물질의 농도가 높게 측정될 것이고, 반대로 멀다면 농도가 낮게 측정될 수 있음. 또한 병변이 발생한 시점에 따라 농도가 또 달라질 수 있으므로, 식물의 건강 상태를 정확히 파악하기 위해서는 시공간 측면에서 다각적인 분석이 필수불가결함.
- 특히 나노센서의 경우, 기공을 통해 수용액 상태로 주입되기 때문에 물관을 따라 이동하는 성질과 동시에 세포벽 주변으로 국지화하려는 성질을 모두 갖기 때문에, 시간에 따른 나노센서의 위치의 변화를 파악하는 것이 매우 중요함. 따라서 나노센서를 주입하고 시간에 따른 위치를 측정하기 위해, 일정 시간 간격으로 SERS mapping 이미지를 측정하고 분석함.
- SERS 이미지를 분석하기 앞서, 나노입자의 SERS 신호가 갖는 위치의 정확성을 확인하기 위하여 측정 장비의 spatial resolution을 측정함. 매우 강한 단일 라만 밴드를 갖는 실리콘 기판 위에 레이저의 초점 위치를 조절하여, 그 세기의 변화를 프로파일링하여 레이저 초점이 갖는 영역의 공간을 측정함. 신호의 세기가 절반이 되는 full-width-half-maximum(FWHM)을 기준으로 xy 평면 상의 해상도는 약 5 μm , z축(높낮이) 공간상으로 약 15 μm 의 해상도를 가짐을 확인함 (그림 41).

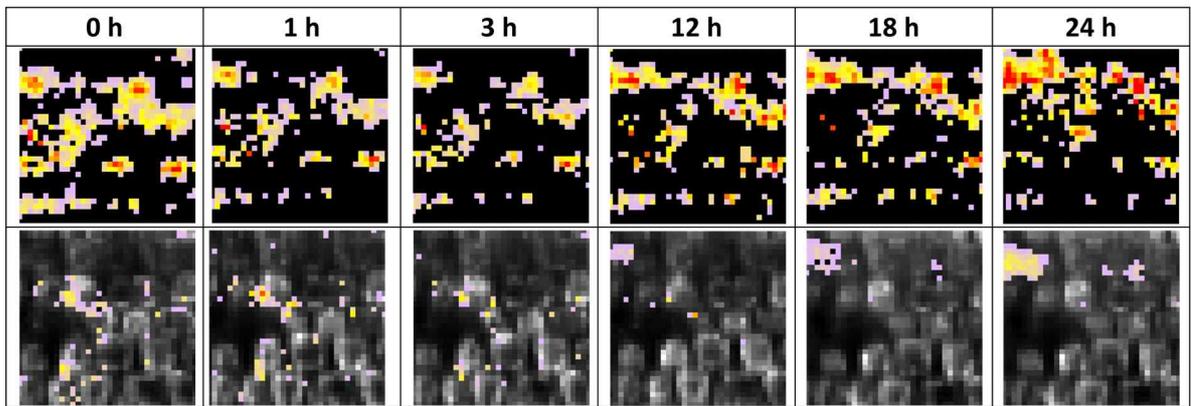


<그림 41. 신호 측정을 통한 레이저 초점 영역 프로파일링>

- 나노센서의 시공간적 분석을 위해, 식물에 나노센서를 도입하고 시간과 공간에 따른 나노센서의 위치와 신호 세기를 측정함. SERS mapping 이미지는 z 축 resolution에 해당하는 15 μm 간격으로 측정되어 epidermis 영역과 mesophyll 영역을 모두 분석할 수 있도록 함. 그 결과, epidermis와 mesophyll에서 전혀 다른 양상의 SERS 이미지를 얻어 깊이에 따른 나노 입자의 밀집도를 정확히 파악할 수 있었음 (그림 42). 한편, 시간에 따른 나노입자의 움직임을 비교했을 때, 시간이 지남에 따라 나노입자들이 줄기 방향(우측)으로부터 잎의 끝부분(좌측)으로 매우 조금씩 이동함을 확인함 (그림 43).



<그림 42. z 축 위치에 따른 SERS 이미지>

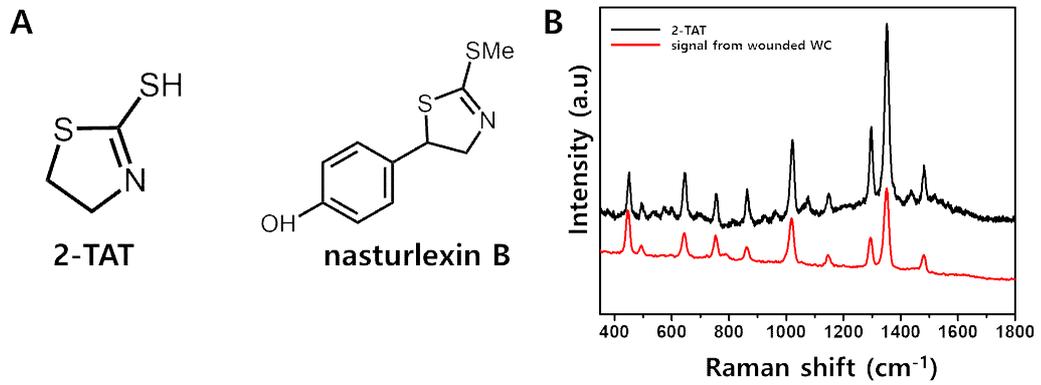


<그림 43. 시간에 따른 나노입자의 위치와 세기 변화>

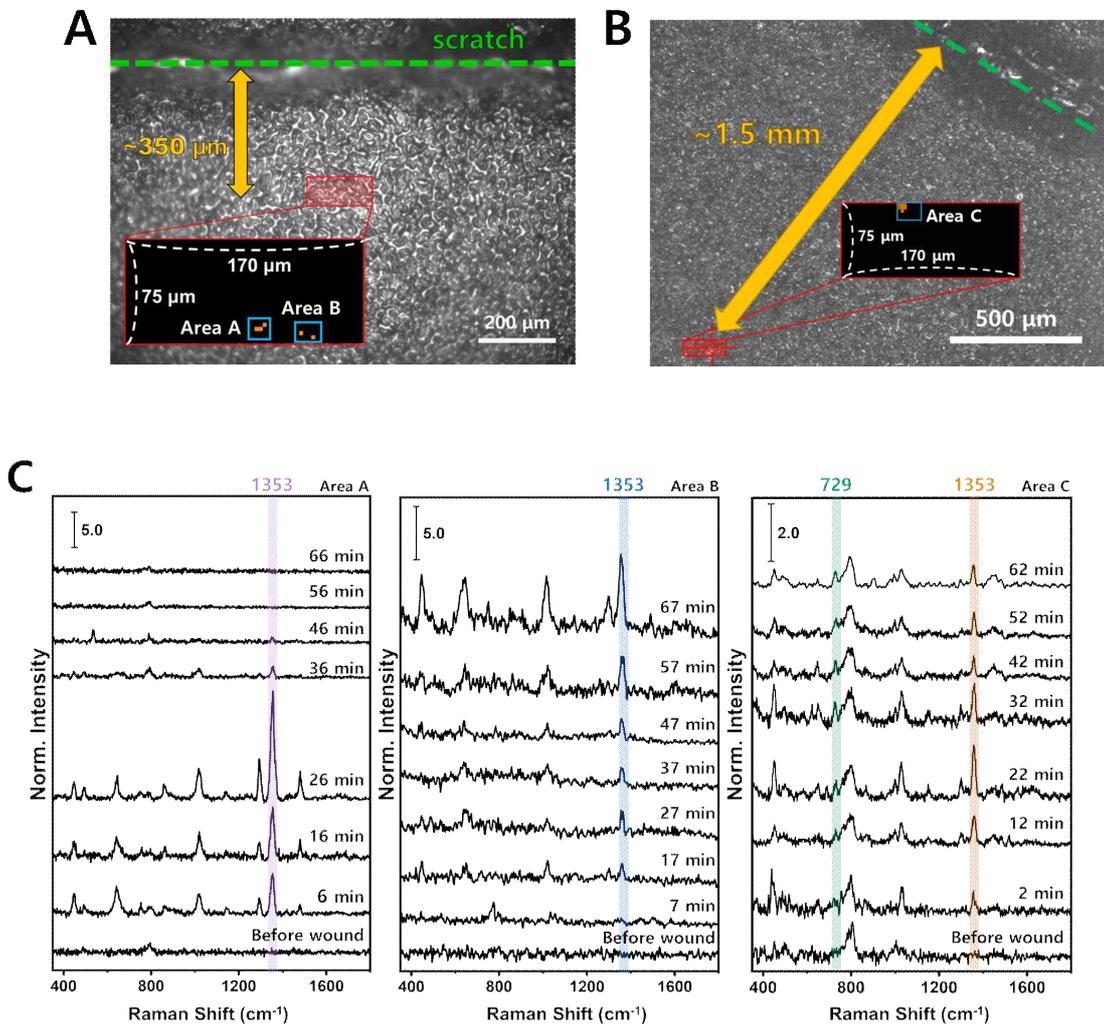
○ 나노센서의 식물체 적용: 식물 내 비생물학적 스트레스 SERS 신호 모니터링

- 정확한 잣빛곰팡이균의 감염의 진단을 위해, 진균병 감염으로 인한 스트레스를 다른 요인으로 인한 스트레스와 명확히 구분되어야 함. 따라서 진균병에 감염된 식물을 분석하기 앞서, 비생물적 스트레스에 대한 식물의 신호 전달 물질 발생 및 SERS 신호 검출 연구를 수행함.
- 개발된 나노센서를 실제 식물체에 적용하고, 다양한 비생물적 스트레스에 대한 식물의 반응을 SERS 신호로 검출하는 연구를 수행함. 그 결과 물리적 손상과 저온에 대한 스트레스가 발생했을 시 발생하는 특정 신호 전달 물질을 포착함.
- 물냉이에 기공을 통해 AgNS@PDDA를 주입하고 주입구로부터 일정 거리만큼 떨어진 위치에 물리적 손상이 발생했을 경우, 1353 cm^{-1} 밴드를 포함한 특정 SERS 신호가 매우 강하게 발생함을 확인하였음. 신호 분석을 통해 발생한 SERS 신호가 thiazoline 유도체에서 발생하였음을 확인함. 이는 물냉이가 비생물적 스트레스에 대해서 생성하는 것으로 알려진 phytoalexin으로 추정되며 그 중에서도 thiazoline 유도체를 포함한 nasturlexin B가 유력해보임 (그림 44). 이후 물리적 손상이 발생한 직후 시점부터 실시간 SERS 모니터링을 수행하여, 1 시간 동안 성공적으로 신호의 변화 추이를 관찰하였음. 일부 실험군에서는 nasturlexin B 뿐만이 아니라 면역반응과 밀접한 관련이 있는

extracellular ATP 또한 729 cm^{-1} 밴드로 검출되었음(그림 45).



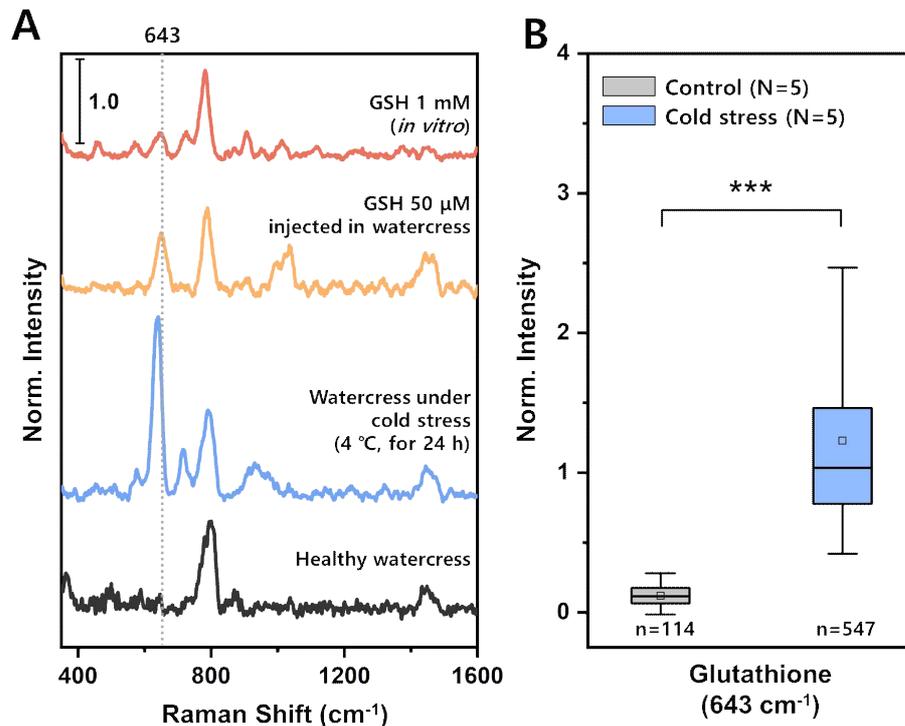
<그림 44. 2-thiazoline-2-thiol과 nasturlexin B의 구조 비교(A), 물냉이의 상처로부터 발생한 SERS 신호와 2-TAT의 신호비교(B)>



<그림 45. 물냉이의 상처로부터 약 350 μm(A)와 1.5 mm(B) 떨어진 지점에서 170x75 μm 영역의 SERS 맵핑. 이후, 각 영역에서 1 시간 동안 신호 변화 추이 모니터링(C)>

- 마찬가지로 나노센서를 주입한 물냉이 식물을 서리가 생기지 않는 저온($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 환경에 노출시켰을 때, 냉기로 인한 스트레스로 인한 신호 전달 물질의 발생을 SERS 신호를 통해 확인함. glutathione 분자는 환원된 형태(GSH)와 산화된 형태(GSSG)의 비율이 냉

기 스트레스와 밀접한 관련이 있음. 본 연구에서 추위에 24 시간 동안 노출된 물냉이 체내에서 GSH의 신호가 급격히 증가하여 대조군과 통계적으로 유의미한 차이(t-test; $p < 0.0001$)를 가짐을 확인함 (그림 46).

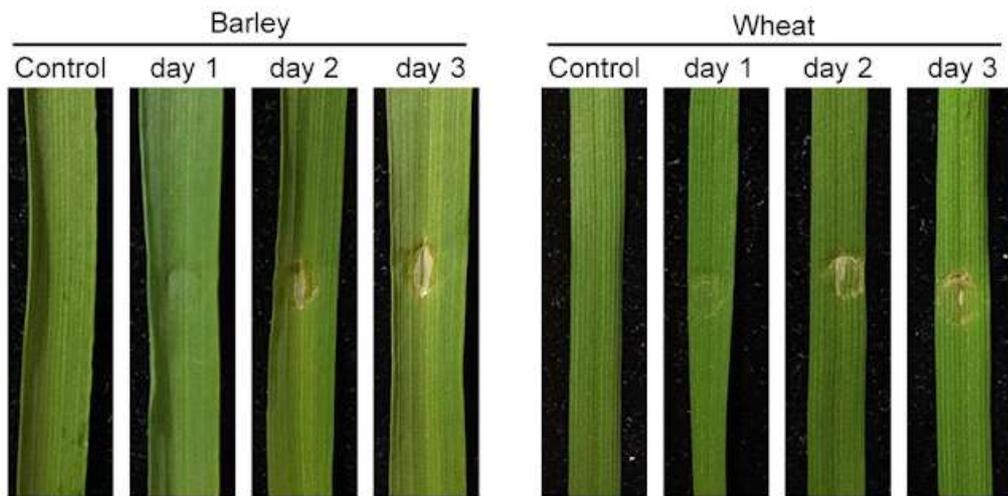


<그림 46. 냉기 스트레스에 노출된 물냉이에서 검출된 SERS 신호와 GSH의 SERS 신호 비교(A) 및 대조군과의 SERS 밴드 세기 비교(B)>

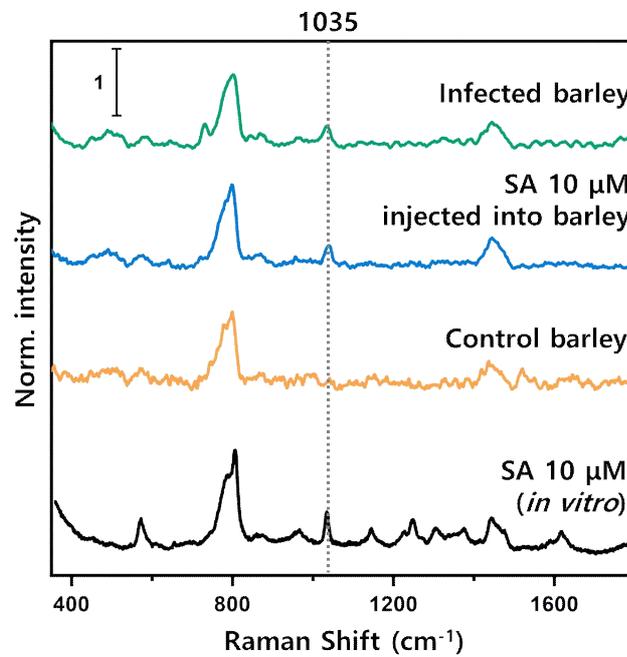
○ 나노센서를 통한 진균병 감염 식물 체내 SERS 신호 검출 및 감염 초기 단계 분석

- 나노센서를 통해 진균병 감염 초기 단계에서 발생하는 SERS 신호를 검출하고, 이를 통해 신호 전달 물질의 양상을 파악하여 식물의 진균병 감염 초기의 반응을 다각적으로 분석하고자 함.
- 본 연구진은 밀과 보리 식물에 감염되는 진균병 모델을 기확보하고 있어, model plant로 식량 작물인 밀 (wheat, *Triticum aestivum*) 과 보리 (barley, *Hordeum vulgare*) 식물을 이용해서 실험을 수행함. 진균병에 감염된 식물의 SERS신호 모니터링을 통해 조기진단이 가능한 지 증명하고자, 대표적인 식량 작물인 밀과 보리에 이삭마름병을 발병시키는 *F. graminearum* 균을 잎에 주사하여 이삭마름병을 발병시켜 식물질병모델을 구축함. 시간경과에 따라 식물이 생성하는 방어체계 전달물질을 검출하고자 식물체 내에 나노센서를 도입한 뒤 SERS 신호 변화 추이를 모니터링함.
- 균을 주입한 당일 (균 주입 후 약 2시간) 부터 1일 간격으로 SERS 신호를 측정함. 그 결과 자가면역체계와 관련된 것으로 알려진 SA와 extracellular ATP(eATP)의 신호가 발생함을 확인함. 이를 검증하기 위하여 아무런 균을 주입하지 않은 식물의 신호와 비교하여 유의미한 차이를 가짐을 검증함. 또한 SA, ATP 뿐만이 아니라 주입된 진균으로부터의 신호 역시 검출해내는데 성공함. 이전 연구에서 개발한 다중 분석 정량모델을 활용하여 검출된 신호 세기로부터 분자의 농도를 역산함. 그 결과 이삭썩음병의 병변이 육안으로 관찰되지 않는 0~1일 차에서도 유의미한 방어체계전달물질의 검출이 확인됨

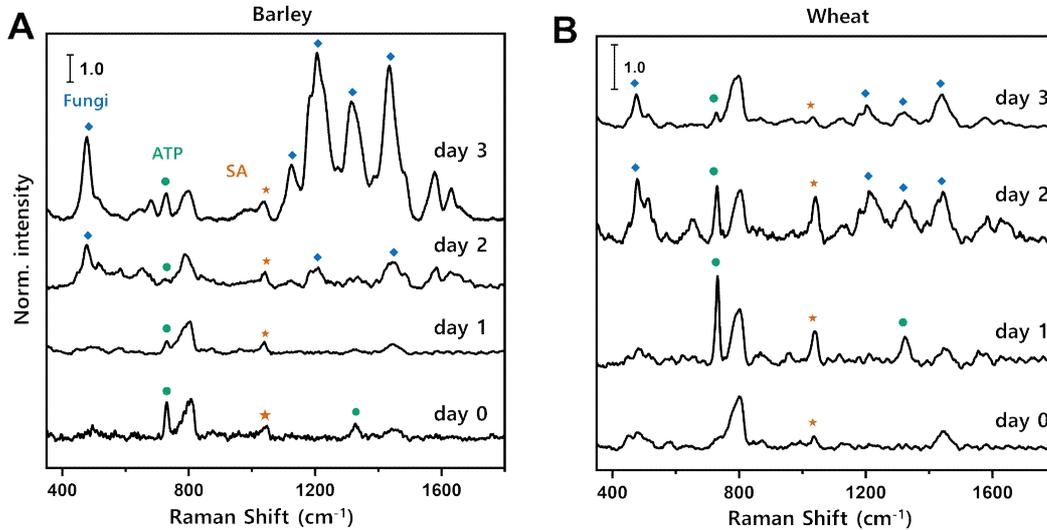
(그림 47~49).



<그림 47. 진균을 주입한 뒤 시간에 따른 밀과 보리의 병변 변화>

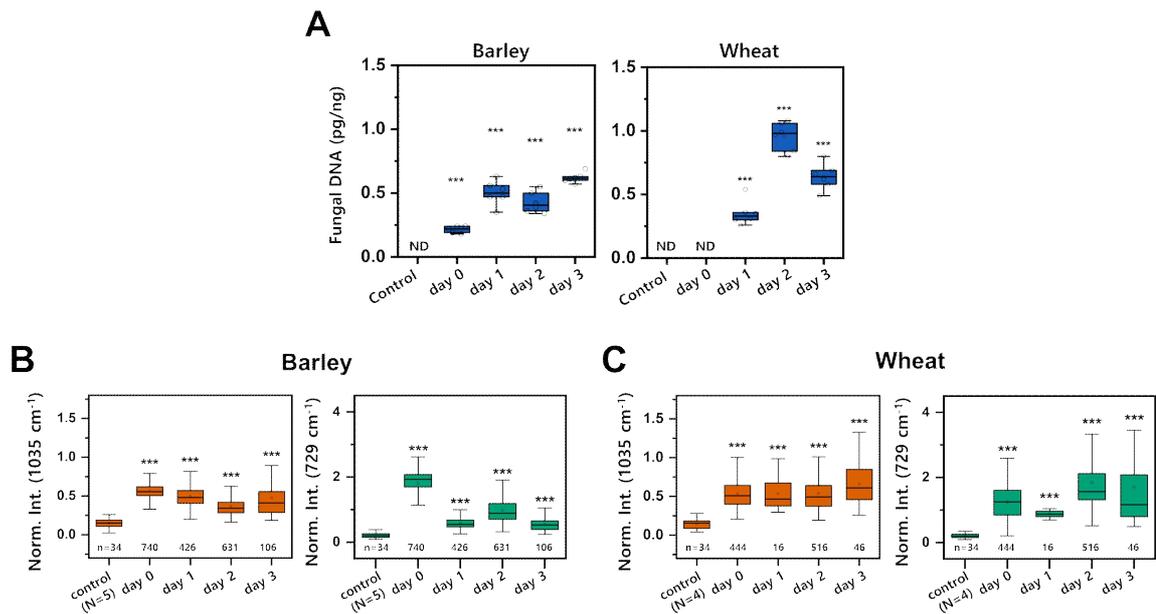


<그림 48. SA의 SERS 신호와 진균병에 감염된 보리의 SERS 신호 비교>



<그림 49. 진균병에 감염된 이후 보리와 밀의 날짜별 SERS 스펙트럼>

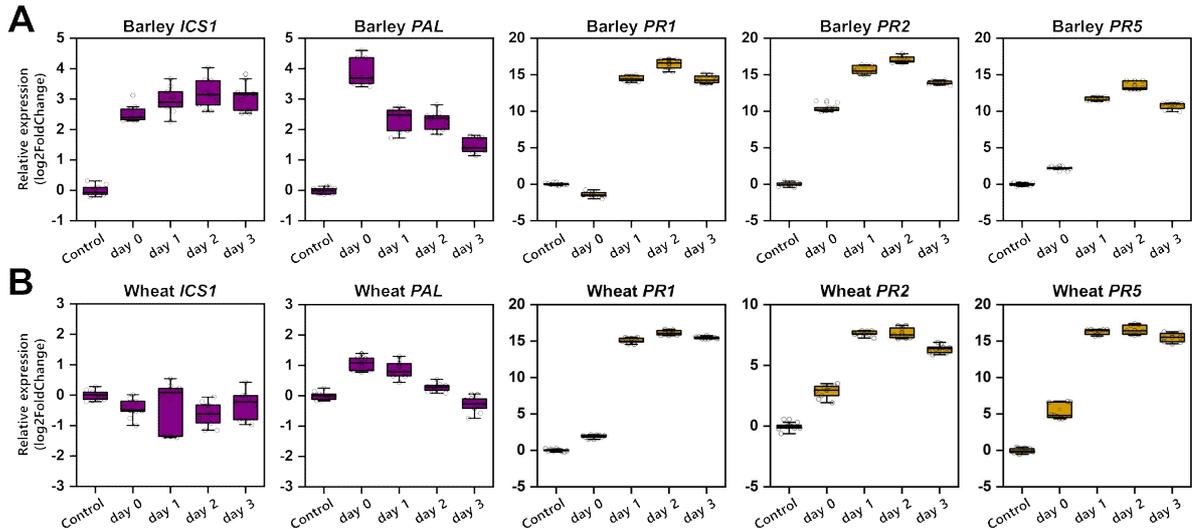
- SERS 측정과 비교하기 위하여 PCR을 통해 진균병 감염 식물의 진균 DNA를 측정한 결과, 30 cycle PCR을 수행했음에도 불구하고 간신히 측정 가능한 DNA 수치만(측정한 계; 0.2 pg/ng)을 얻을 수 있었음. 특히 밀의 경우 감염 직후(0 일차)의 샘플에서는 진균 DNA를 검출할 수가 없을 정도로 낮은 농도의 DNA가 검출됨. 이에 비해 나노센서를 통해 얻은 SERS 측정에서는 감염 직후부터 신호 변화가 1 일차 이후의 신호세기에 비해 오히려 더 높거나 비슷한 수준으로 얻을 수 있었음. 이는 SERS 나노센서가 초기 단계의 진균병 검진에 매우 탁월한 성능을 가짐을 보여줌(그림 50).



<그림 50. 진균병에 감염된 이후 날짜별 보리와 밀에 대한 측정 결과. 진균 DNA에 대한 PCR 측정(A)과 SERS 나노센서를 통한 SA와 ATP 신호 세기(B,C) >

- SERS 측정을 통해 검출한 SA의 검증을 위해, 식물체의 SA 생성 및 방어체계와 관련된 유전자 발현을 real-time quantitative reverse transcription PCR(RT-qPCR)을 통해 확인함. SA의 생합성에는 isochorismate synthase(ICS)와 phenylalanine ammonia-lyase (PAL)가 관여하는 것으로 알려져 있는데, 감염 직후인 0일차부터 보리

의 경우 ICS1와 PAL 모두의 발현이, 밀의 경우 PAL의 발현이 뚜렷하게 나타났음을 확인함. 이는 SERS로 검출한 SA가 실제로 진균병 감염으로부터 유발된 물질임을 확인시켜줌. 또한 SA의 생성은 식물의 면역반응과 관련있는 pathogenesis-related (PR) 유전자 역시 발현을 유발시킴을 확인할 수 있었으며 그 변화는 매우 초기 단계부터 급격히 발생함을 확인하였음. 이는 SA가 식물의 진균병 초기 진단에 매우 적합함을 증명함(그림 51).

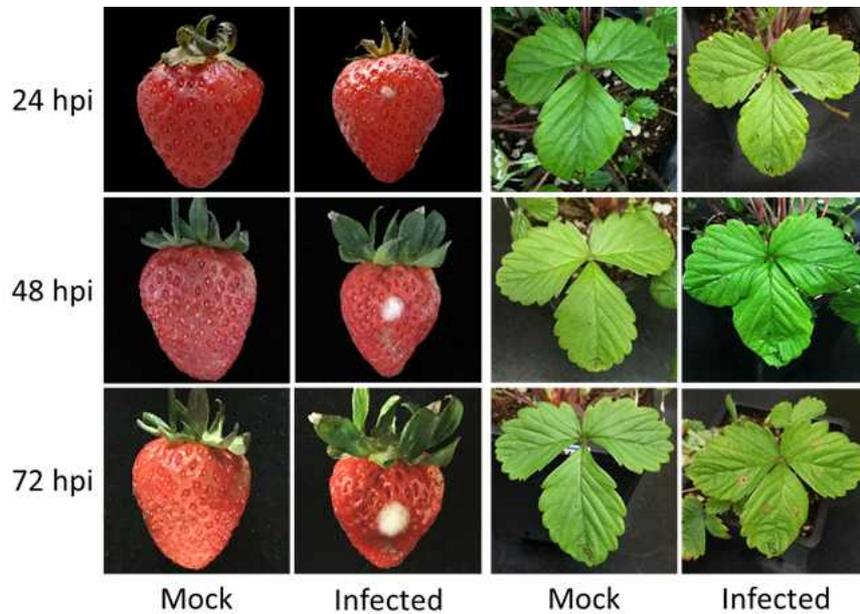


<그림 51. 진균병에 감염된 이후 날짜별 보리과 밀에 대한 RT-qPCR 결과>

- 본 연구결과는 향후 나노센서를 딸기 식물에 적용하기에 앞서, 육안으로 구분하기 어려운 초기 단계 진균병 감염 여부를 SERS를 통해 조기 진단하고, 지속적으로 모니터링할 수 있는 기술의 근간을 마련했다는 데 의의가 있음.

○ 딸기-잿빛곰팡이 식물 병원시스템(Plant pathosystem) 기반의 딸기 조직별 감염에 따른 형태학적·생리학적 변화의 시·공간적 모니터링

- 본 연구진이 구축하고 있는 식물병원시스템(Plant pathosystem)을 기반으로 잿빛곰팡이병균의 딸기의 조직별(열매와 잎) 감염에 따른 변화를 모니터링함. 감자한천배지(potato dextrose agar, PDA)에 접종한 잿빛곰팡이병균을 12시간 주기의 명암 조건에서 일주일간 배양하여 포자생성을 유도한 후, 0.1% tween20을 이용하여 포자를 수확하고 딸기의 열매와 잎에 각각 10,000개의 포자(10 μ L, 1×10^6 포자/mL)를 접종함. 접종 후 48시간 동안 습도 95%를 유지한 후 24시간 단위로 발병 여부를 관찰함.

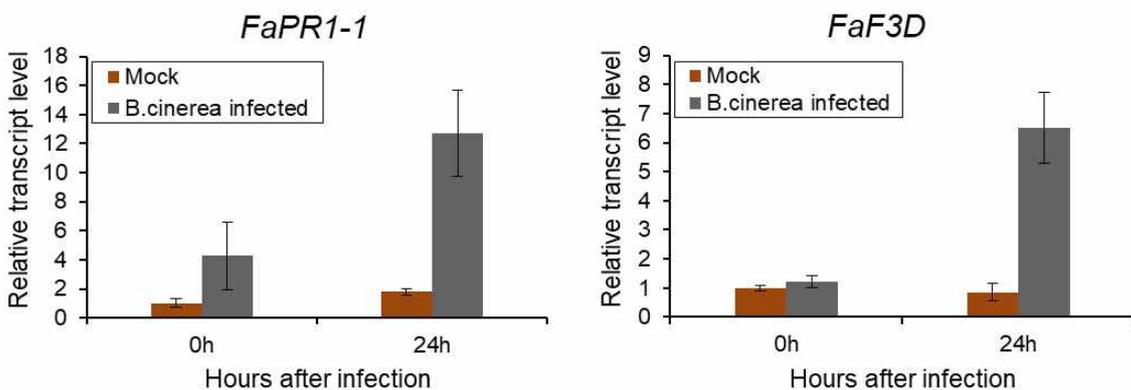


<그림 52. 잣빛 곰팡이 감염에 따른 딸기 열매(좌측)와 잎(우측)의 시간에 따른 변화>

- 병원균 접종 후 24시간 후(24 hpi)부터 딸기의 열매에서 접종부위에 군사가 자라나는 것이 관찰되었으며, 잎에서도 접종부위가 갈색으로 변하는 것이 관찰되었음. 시간이 지날수록 열매에는 군사가 자라며 접종부위가 괴사하는 것이 관찰되었고, 잎에서도 갈색병반이 커지는 것을 관찰할 수 있었음(그림 52).

○ 잣빛곰팡이 감염 초기의 방어반응 유전자의 발현량 측정

- 딸기 잣빛곰팡이 병 진단을 위한 표적물질 선정을 위해 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 수행함. 여러 모델 식물에서 이미 salicylic acid (SA) 신호전달은 활물병원균 (biotrophic pathogen)이나 반활물병원균(hemibiotrophic pathogen)에 대한 식물의 면역반응으로 알려져 있음.
- 그에 기반하여, salicylic acid 방어기작의 마커로 알려진 pathogenesis related gene 1 (*FaPR1-1*) 유전자와 salicylic acid 생합성에 관여하는 유전자로 알려진 flavanone 3-dioxygenase (*FAF3D*) 유전자의 발현량을 딸기의 잎에서 잣빛곰팡이병 감염 초기에 확인함.



<그림 53. 잣빛곰팡이 감염초기의 salicylic acid-responsive 유전자들의 발현량 비교>

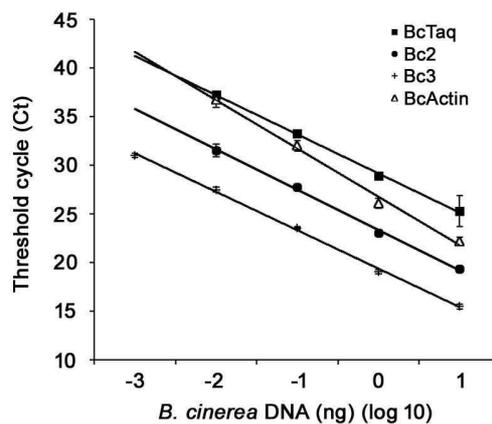
- 감염 24시간 후에 *FaPR1-1*과 *FaF3D* 두 유전자 모두 0.1% tween20을 접종한 대조군 (mock)에서는 발현량이 차이가 거의 없었던 것에 비해 잣빛곰팡이가 감염된 딸기 잎의 경우에는 24시간 후에 그 발현량이 각각 약 12배(*FaPR1-1*), 6.5배(*FaF3D*) 정도로 크게 증가한 것을 알 수 있었음 (그림 53).
- 그 결과, 잣빛곰팡이 감염초기 salicylic acid 신호전달과정이 활성화 되어 식물의 면역반응이 활성화 되었을 것이라는 것을 예측할 수 있었고 이를 통해 딸기 잣빛곰팡이병 초기 진단용 표적물질로서 salicylic acid가 매우 적합함을 확인함.

○ 딸기-잣빛곰팡이 식물 병원시스템에 대한 정량실시간 PCR (qPCR) 진단법 구축

- 본 연구진이 개발한 나노센서들의 민감도 및 정확도를 비교·분석하기 위해 식물 내 감염된 잣빛곰팡이에 대한 정량실시간 PCR(qPCR) 진단법을 구축하고자함. 선행 연구들에서 잣빛곰팡이 검출을 위해 개발된 종 특이적 primer 세트들을 이용하여 본 연구의 딸기-잣빛곰팡이 식물 병원시스템에서 높은 민감도를 가진 primer 세트를 선별하고자 시험을 수행함. 잣빛곰팡이 표준균주 B05.10의 genomic DNA를 추출하여 100 ~10⁻³ ng/μl 의 농도로 10배씩 연속적으로 희석한 후, 네 쌍의 프라이머 세트들(BcTaq, Bc2, Bc3, BcActin)을 이용하여 각각 qPCR을 수행함. 각 프라이머 세트를 이용한 qPCR 결과를 분석한 결과 모두 0.99이상의 결정계수를 나타냈고, Bc3 프라이머 세트를 이용했을 경우에만 0.001ng/ul의 낮은 DNA농도에서 유의미한 측정값을 얻을 수 있었음 (그림 54, 표 3). 시험한 프라이머 세트 중 가장 낮은 검출한계 (limit of detection, LOD)를 보인 Bc3 프라이머 세트를 선정함 (표 4).

| Primer set | Regression curve | R ² |
|------------|--------------------|----------------|
| BcTaq | y = -4.02x + 29.17 | 0.9987 |
| Bc2 | y = -4.13x + 23.37 | 0.9976 |
| Bc3 | y = -3.94x + 19.39 | 0.9985 |
| BcActin | y = -4.96x + 26.79 | 0.9947 |

<표 3. 프라이머 세트별 qPCR 결과값을 통한 회귀곡선 및 결정계수>

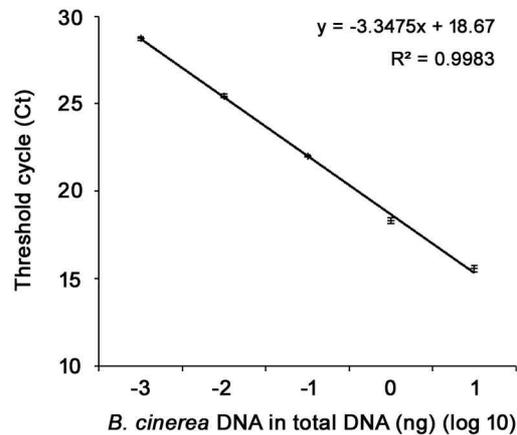


<그림 54. B. cinerea 프라이머 세트들의 민감도 비교>

| DNA concentration (ng/ul) | Threshold cycle (Ct) | | | |
|------------------------------|----------------------|-----------|-------|-----------|
| | BcTaq | Bc2 | Bc3 | BcActin |
| 10 | 25.29 | 19.34 | 15.50 | 22.19 |
| 1 | 28.90 | 23.05 | 19.09 | 26.11 |
| 0.1 | 33.28 | 27.80 | 23.57 | 32.01 |
| 0.01 | 37.23 | 31.54 | 27.50 | 36.77 |
| 0.001 | no signal | no signal | 31.0 | no signal |

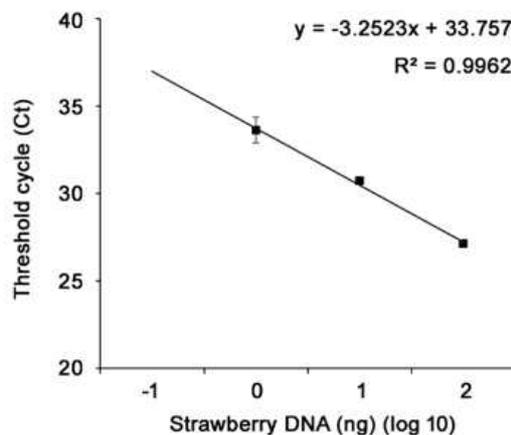
<표 4. DNA 농도별 Ct 값>

- Bc3 프라이머 세트를 이용한 잣빛곰팡이의 진단이, 식물의 DNA와 혼합되어있을 시에도 유의한 결과 값을 가지는지를 확인하기 위하여, 기주 식물인 딸기식물의 DNA를 잣빛곰팡이의 DNA와 혼합한 샘플에 대하여 동일 실험을 수행함. 딸기식물 DNA의 농도는 200ng/ul로 유지한 상태에서, 잣빛곰팡이의 DNA 농도를 1:1에서 1:0.00001로 희석한 샘플을 대상으로 qRT 실험을 진행하였음. 그 결과, 결정계수 0.9983 값을 가짐에 따라, 식물 DNA의 혼합여부와 무관하게 병원균 DNA의 농도에 따라 Ct값이 일정한 정도로 변화하는 것을 확인하였음 (그림 55).



<그림 55. 식물 DNA와의 혼재 시, Bc3 primer를 사용한 qPCR진단의 유효성 검증>

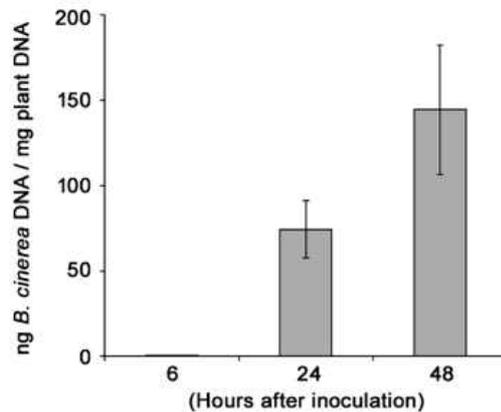
- 식물 DNA의 양에 대한 곰팡이 DNA양의 정량을 위하여 딸기식물에 특이적인 프라이머 세트를 확보하여 식물 DNA를 대상으로 qPCR을 수행하였음. 딸기 genomic DNA를 100 ~10⁻³ ng/μl로 10배씩 연속 희석한 후 딸기의 Actin 유전자를 타겟으로 한 프라이머 세트를 이용하여 qPCR을 수행한 결과, 결정계수 0.9962 값을 가지는 회귀곡선을 도출할 수 있었음 (그림 56).



<그림 56. 딸기식물 DNA 정량을 위한 표준곡선>

○ 잣빛곰팡이병에 대한 정량실시간 PCR (qPCR) 진단의 민감도 확인

- 광학 나노센서를 이용한 진단과 기존의 분자진단법의 민감도에 대한 비교분석을 위하여, 잣빛곰팡이를 감염시킨 딸기식물의 잎에서 qPCR 진단법을 적용하여 민감도를 확인하고자 함. 1×10^7 포자/mL 농도의 잣빛곰팡이 포자액 10 μ l를 딸기식물 잎에 접종한 후, 접종 후 6, 24, 48시간마다 잎을 수확하여 genomic DNA를 추출하고, Bc3 프라이머 세트를 이용하여 qPCR을 수행함.
- 딸기식물의 Actin 프라이머 세트와 잣빛곰팡이병의 Bc3 프라이머 세트를 이용하여 각각 qPCR을 수행하였으며 각각의 표준 곡선을 기반으로 해당 시료 내의 식물과 병원균 DNA 양을 각각 계산한 후, 식물 DNA 1 mg 당 잣빛곰팡이의 DNA 양을 도출해냄 (그림 57). 그 결과, 잣빛곰팡이를 접종 후 6 시간의 시료에서는 진단범위 밖의 Ct 값(> 35)이 검출되었으며, 접종 후 24시간 이후에서부터 진단범위내의 값이 확인됨. 따라서 기존 정량실시간 분석을 이용한 방법으로는 잣빛곰팡이 접종 후 24시간 이후부터 진단여부 확인이 가능함을 결론지음.



<그림 57. 감염시간에 따른 잣빛곰팡이의 검출량 변화>

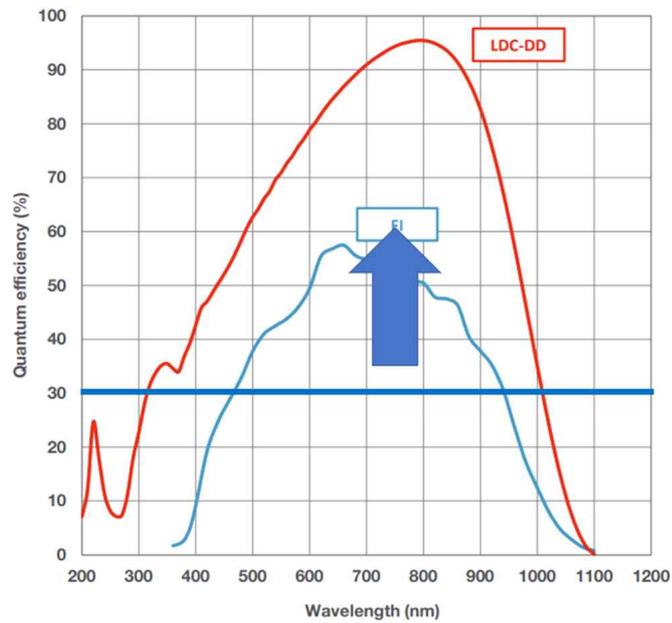
○ SERS 측정에 용이한 고해상도 분광기 개발

- 원예식물 내 식물의 상태를 SERS 나노센서를 이용하여 확인하기 위해서는 식물 개체를 in-vivo 상태로 측정하는 이동형 라만분광기기가 필요함.
- 생물학 영역의 측정은 일반적인 가시광 영역의 레이저를 사용할 경우, 세포 파괴 및 형광으로 인해 근적외선 영역에 가까운 785nm 레이저가 필수적임. 본 과제를 수행하기 위한 기본 사양을 위한 분광기 시뮬레이션을 통해 표 5의 결과를 얻음.

| Laser | Optical | | | Wavelength | | | Raman shift (cm ⁻¹) | | | | |
|--------|---------|--------------|---------|------------|--------|-------|---------------------------------|-------------|--------------|------------------|-------------------|
| | slit | focal length | grating | Start | Center | End | Range | FWHM @laser | FWHM @center | per pixel @laser | per pixel @center |
| 785 nm | 50.0 | 200 | 1200 | 781.9 | 837.0 | 889.7 | 1549 | 3.4 | 3.0 | 0.88 | 0.77 |
| | 50.0 | 200 | 600 | 781.9 | 903.2 | 960.0 | 2372 | 7.6 | 5.7 | 1.96 | 1.47 |
| | 50.0 | 200 | 300 | 781.9 | 1029.7 | 960.0 | 2372 | 15.6 | 9.0 | 4.03 | 2.33 |

<표 5. 785nm 라만 스펙트럼 측정을 위한 분광기 시뮬레이션>

- 본 과제의 목표인 30 ~ 2000 cm⁻¹ 라만 측정 범위와 해상도 3 cm⁻¹ 를 가지는 분광기 제작을 진행함. 교체형 Grating을 가진 이동형 장비를 구축하는 것이 목표이므로 일반적인 현미경 기반의 장비가 아닌, Fiber 기반의 매크로 라만 분광기를 제작함.

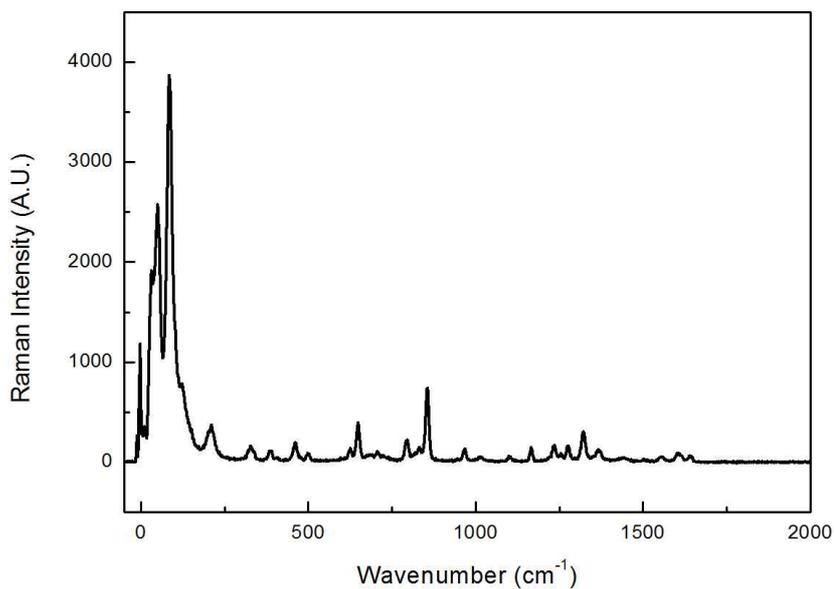


<그림 58. 스펙트럼에 장착된 CCD 카메라의 파장별 양자효율 그래프>

- 785 nm 레이저를 사용하여 라만 스펙트럼을 얻기 위해서는 레이저에 의해 여기된 라만 신호가 CCD 카메라에 입력되어야 함. 본 과제를 위해 선정한 CCD 카메라는 785 nm에 의해 여기된 빛을 양자효율 30%이상으로 받아들일 수 있음을 확인함.

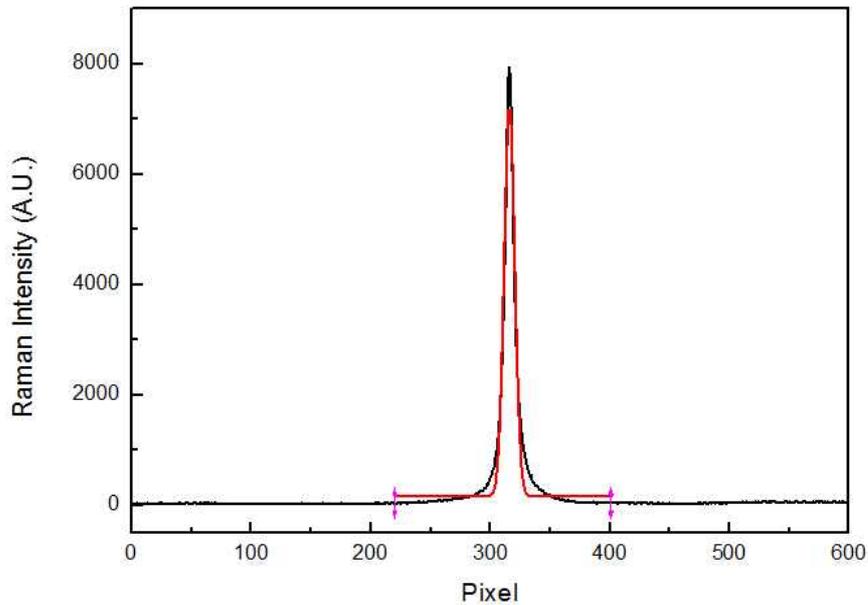
○ 식물체 현장 진단을 위한 이동형 라만 분광기 광학계 구성

- 785 nm 기반의 분광기를 제작하여 기본 시료 측정을 진행함. 다양한 라만 신호를 확인하기 위해서 타이레놀 및 실리콘 기판 측정을 통해 라만 측정 범위 및 각 라만 피크의 해상도를 확인함.



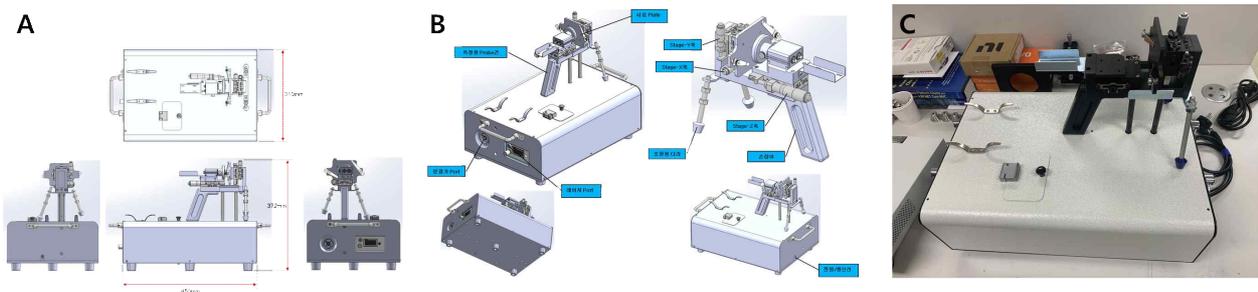
<그림 59. 785 nm 레이저의 라만 측정 범위 확인>

- 30 cm^{-1} 부터 2000 cm^{-1} 범위까지의 라만 스펙트럼 범위를 확인하기 위해서 타이레놀 시료를 측정함. 다양한 라만 피크를 가지는 타이레놀을 사용하여 2000 cm^{-1} 근접한 라만 신호가 나오는 것을 스펙트럼으로 확인함.



<그림 60. 785nm 레이저를 사용하여 실리콘을 측정한 라만 스펙트럼>

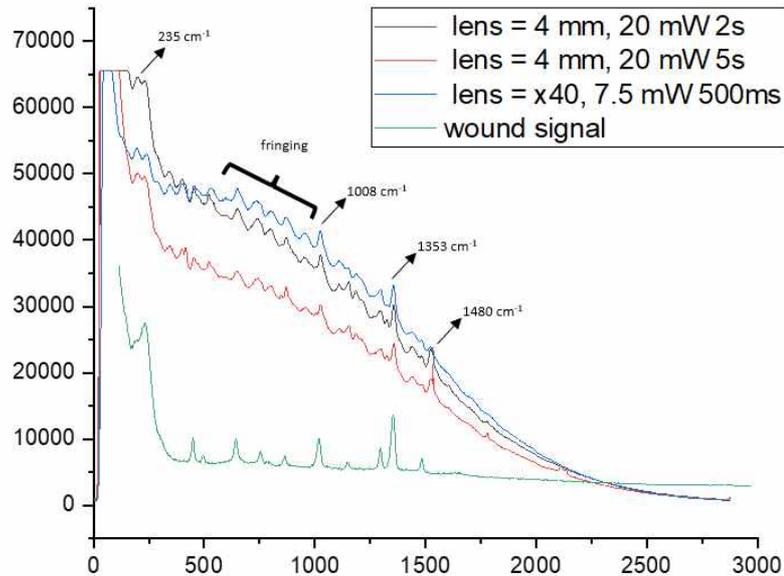
- 785nm 레이저를 사용하여 실리콘을 측정한 결과, CCD의 픽셀 기준으로 FWHM 값이 약 8로 측정됨. 해당 장비의 경우는 1 pixel 당 0.4 cm^{-1} 의 신호가 맺히므로 해상도는 3.2 cm^{-1} 로 목표인 4 cm^{-1} 를 초과 달성함.
- 현장 측정의 용이함을 위해 장비 전체를 들고 다닐 수 있는 포터블 형태의 라만 분광기를 설계하였고, 농가 현장의 딸기 잎을 측정할 수 있도록 라만 분광기의 프로브 부분은 핸드건 타입으로 설계하여 손으로 직접 들고 측정 가능하게 제작하였음(그림 53).



<그림 61. 개발된 이동형 라만 분광기의 설계도(A,B) 및 제작된 실물 사진(C)>

○ 식물체 측정을 위한 이동형 라만 분광기 최적화

- 식물체에서 발생하는 형광 신호가 매우 강하게 검출되고, 추가적으로 fringing effect 현상이 발생하여, 스펙트럼 상에 물결 무늬의 noise가 지속적으로 검출되는 문제가 발생함. 이는 보고자 하는 신호 전달 물질의 밴드를 가리거나 겹치게 해서 그 신호의 식별이 불가능하게 만드는 문제가 있음 (그림 62).



<그림 62. 기존 현미경 타입으로 측정된 신호(초록)과 macro lens를 사용하여 측정된 신호(빨강,파랑,검정)>

- 이를 극복하기 위하여 광섬유의 코어 사이즈를 줄여 배경 신호가 들어가는 것을 최대한 줄이고, multi-mode laser가 아닌 single mode laser를 채택하여 여기광이 측정 위치 주변으로 가는 것을 최소화함.

2.2. 2단계: 휘발성 신호전달물질 공기 중 검출을 통한 진균병 진단 연구

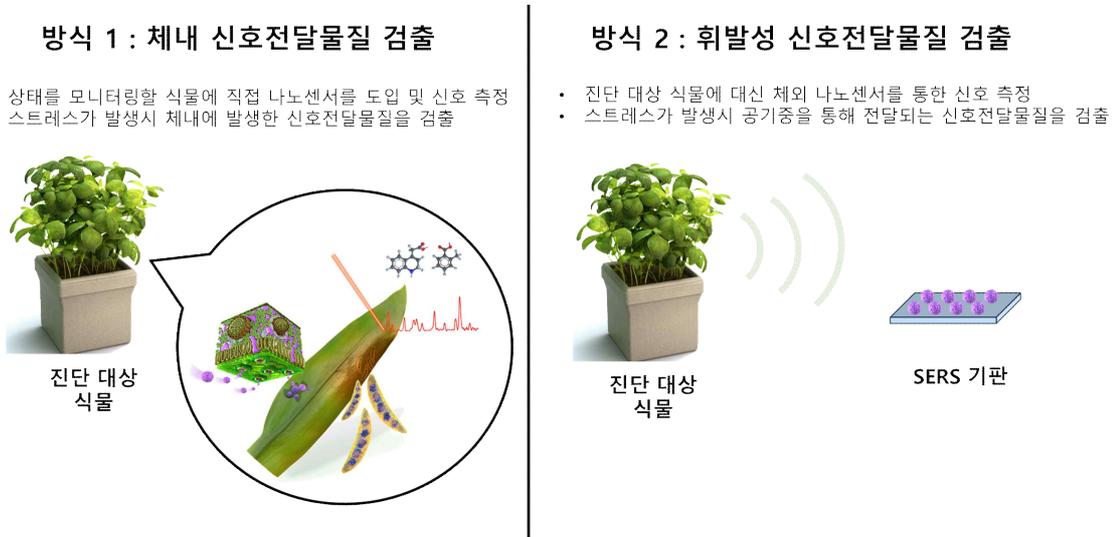
1단계 선행 연구에서 나노 광학센서를 도입했던 식물 (물냉이, 보리, 밀)과 달리 딸기는 잎 표면에 미세한 섬모 (trichome)이 존재하고 있어 발수성이 매우 뛰어난 특성을 지니기 때문에 콜로이드 수용액 상태의 나노센서를 주입하는데 어려움을 유발함 (그림 63). 따라서 딸기 식물에 나노 광학센서를 체내로 주입하여 신호전달물질을 검출하는 기존 방식은 적용하기 어렵다고 판단하였음. 이에 딸기에 적용 가능한 새로운 방식의 신호전달물질의 진단법을 모색함.



<그림 63. 딸기 잎 위의 섬모조직(A). 나노센서의 콜로이드 수용액을 올리면 그 물방울의 형태가 유지됨(B,C)>

식물이 스트레스 상황에서 생성하는 신호전달물질은 개체 내 세포 간의 의사소통뿐만이 아니라 개체 간 의사소통을 통해 주변의 환경 변화나 외부 침입 등을 주변 다른 식물에게 알리는데도 사용됨. 이러한 신호전달물질은 휘발성이 높은 분자들로 매우 낮은 농도로 공기 중 확산을 통해 전달됨. 본 연구진은 이러한 식물 특성으로부터 공기 중에 방출된 식물 신호전달물질을 검출하여 주변 식물 상태를 진단할 수 있는 방식을 착안함. 이와 같은 휘발성 신경전달물질을 통한 주변 식물 상태 진단 전략은 단일 측정으로 넓은 면적에 포진된 식물의 상태를 한 번에 파악할 수 있으며, 나노센서의 도입 과정에서 대상 식물의 종특이성을 고려하지

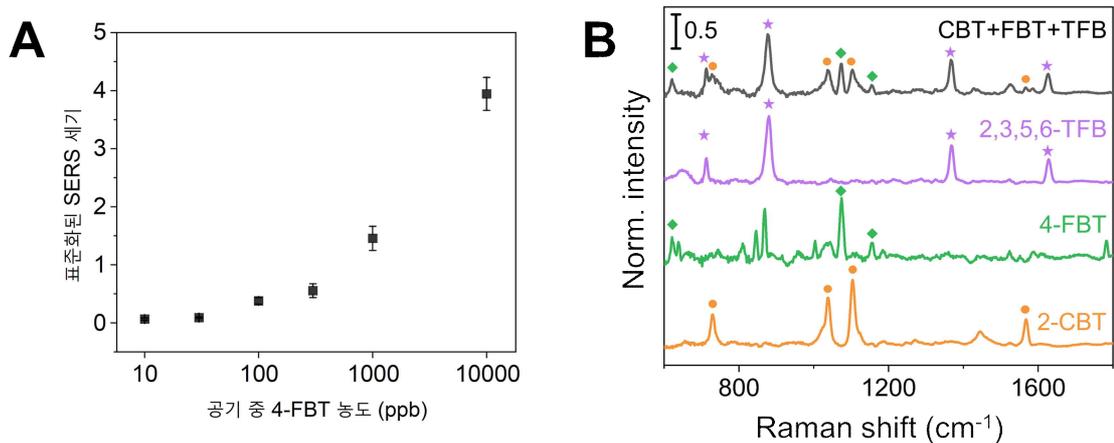
않아도 된다는 장점을 지님 (그림 55).



<그림 64. 나노 광학센서를 이용한 식물 신경전달물질의 두 가지 진단방식>

○ SERS 측정을 통한 휘발성 물질 검출 검증

- 공기 중 휘발성 화합물에 대한 SERS 나노광학센서의 민감도를 확인하기 위하여 휘발성을 갖는 대표적인 SERS 표지물질인 4-FBT (4-fluorobenzenethiol)을 이용한 모델연구를 진행함. 실험 결과 그 검출 한계가 100 ppb 수준으로 확인됨 (그림 65A).
- 신호전달물질 체내 검출 방식에서 가능했던 다중 검출 역시 공기 중 휘발성 화합물 검출에서도 가능함을 검증하였음. 나노광학센서를 3 종류의 기체 상 화합물이 섞인 공기와 노출시키고 SERS 신호를 검출하였을 때, 각각의 기체 분자의 고유한 SERS 신호 밴드가 모두 빠짐없이 동시에 관찰됨을 확인함 (그림 65B).

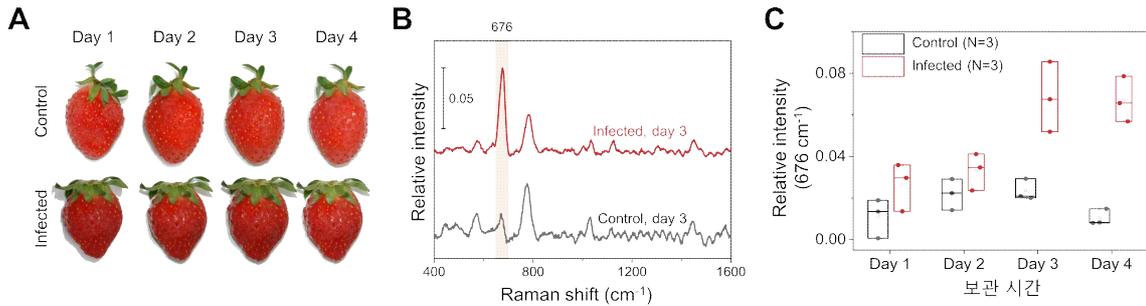


<그림 65. (A) 휘발성 물질에 대한 검출 한계, (B) 휘발성 분자에 대한 다중 검출 검증>

○ 딸기 잿빛곰팡이 진균병 진단에 대한 적용

- 본연구의 핵심 목표인 딸기 잿빛곰팡이병 진단을 위하여 휘발성 신호전달물질 검출법으로 진균병 진단이 가능한지 검증을 수행함. 딸기 열매를 잿빛곰팡이병 감염시킨 후 4 일 동안 지속적으로 모니터링하여 신호전달물질의 발생 양상을 확인함.

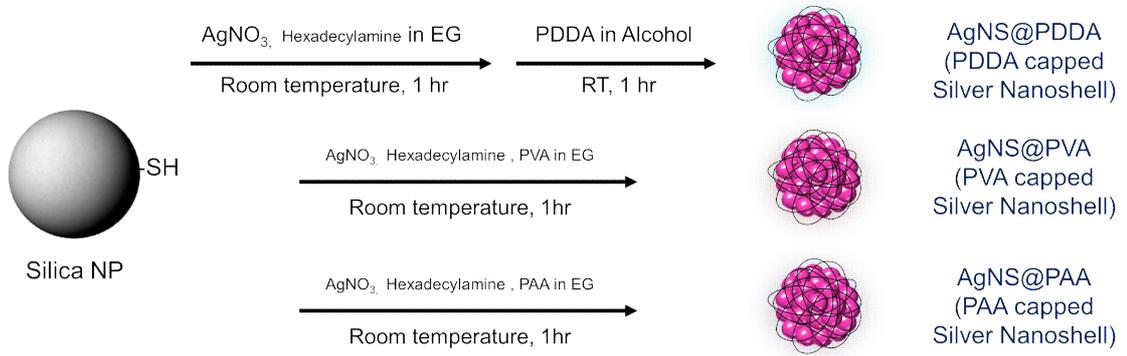
- 잿빛곰팡이병이 감염된 후 4일 경과까지, 감염된 딸기 열매는 대조군의 딸기과 비교하여 별다른 외형의 변화가 없었으나, 감염군의 SERS 신호로부터 유의미한 변화가 감지되었음. 분석결과 methanethiol의 것으로 확인된 676 cm^{-1} 에서의 SERS 밴드는 감염이후 4일 동안 계속해서 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 감염되지 않은 대조군의 경우 4일 기간 내에 별다른 변화가 관찰되지 않았음 (그림 66). 이는 육안으로 진균병 감염이 전혀 확인되지 않는 이른 시점에서도 휘발성 신호전달물질 검출을 통해 딸기 잿빛곰팡이 진균병 진단이 가능함을 증명하였음.



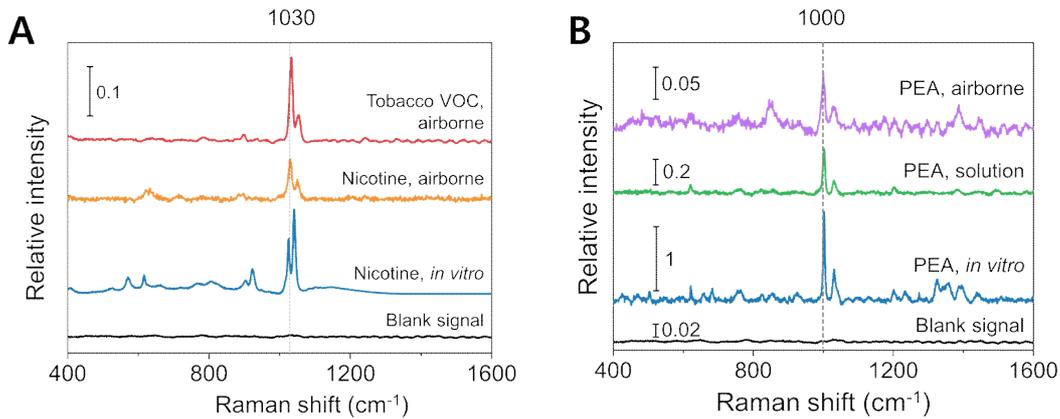
<그림 66. 공기 중 휘발성 신호전달물질을 통한 딸기 질병 검출 (A) 감염/비감염군 딸기 열매의 날짜별 외형 (B) 감염된 딸기 열매에서 3일차에 검출된 methanethiol SERS 신호 (C) 날짜별로 검출된 methanethiol 신호 세기 양상>

○ 식물체 모니터링 지속성 확장을 위한 나노광학센서 표면 개질

- 나노 광학센서를 활용하여 보다 많은 범위의 분석 물질에 대한 검출하기 위해, 다양한 고분자 물질의 처리를 통한 나노 광학센서 표면개질의 다변화를 시도함. 이를 위해 나노 광학센서 표면에 PVA (polyvinylalcohol) 와 PAA (polyacrylicacid) 등의 고분자를 처리하였으며, 해당 고분자들이 나노 광학센서 표면에 안정적으로 결합되어 있음을 확인함 (그림 67).
- PVA 고분자를 처리한 나노 광학센서를 기판에 처리한 후, 해당 기판을 이용하여 공기 중의 니코틴을 검출함. 공기 중에서 검출된 니코틴의 신호는 용액 상에서 측정된 니코틴의 신호와 $1030, 1050\text{ cm}^{-1}$ 등의 위치에서 동일한 밴드를 보였으며, 전체적인 신호 양상이 일치함을 확인함. 이와 같은 결과를 바탕으로 PVA 고분자를 처리한 나노 광학센서를 이용해 담배 식물에서 발생한 니코틴을 검출함. 물리적 상해를 입힌 담배 식물의 앞에서 발생한 니코틴의 신호를 약 70 cm 떨어진 기판에서 검출하였으며, 해당 신호 또한 니코틴 용액과 공기 중 니코틴에서 검출된 신호와 일치함. 이를 통해 다변화된 고분자 처리를 통한 광범위한 식물 신호전달물질 공기 중 검출에 대한 가능성을 확인함.
- PAA 고분자를 처리한 나노 광학센서를 기판에 처리한 후, 이를 통해 공기 중 PEA (phenethylamine)을 검출함. 해당 물질은 인체 내 신경 전달에 중요한 물질 중 하나이며, 마약류에 해당하는 암페타민 등과 구조적 유사성이 있음. 공기 중에서 검출된 PEA의 신호는 용액 상에서 측정된 니코틴의 신호 및 기판에 용액으로 처리된 신호와 1000 cm^{-1} 등의 위치에서 동일한 밴드를 보였으며, 전체적인 신호 양상이 일치함 (그림 68).



<그림 67. 나노광학센서의 다양한 표면개질>



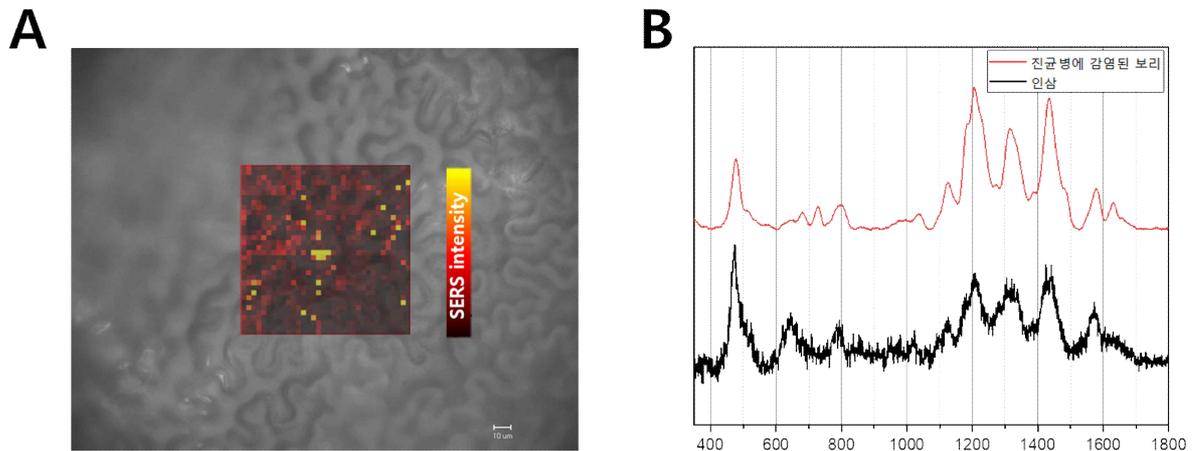
<그림 68. (A) PVA 표면개질을 이용한 담배식물의 니코틴 분자의 공기 중 검출 (B) PAA 고분자를 이용한 공기중 PEA 분자 검출>

○ 다양한 작물에 나노센서 도입 기술 적용 가능성 모색

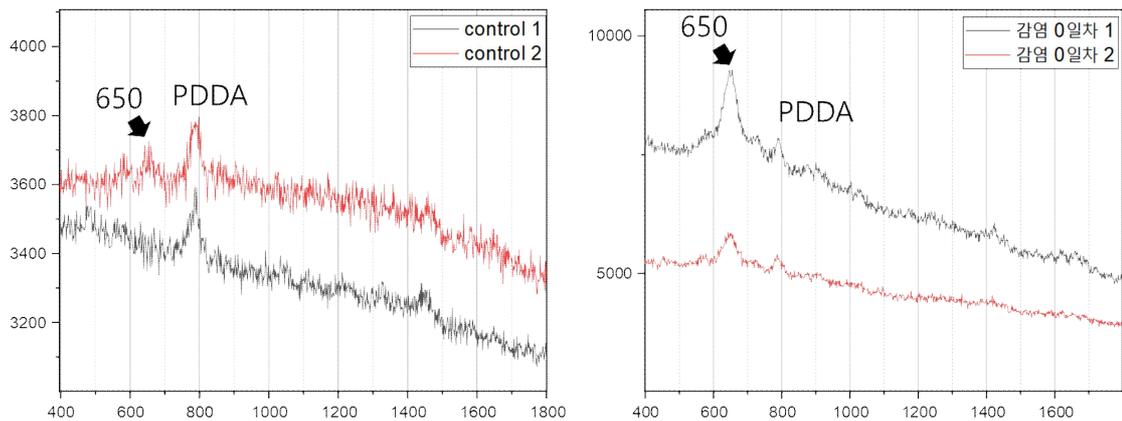
- 딸기 이외에도 다양한 작물에 대해서 나노광학센서를 도입하여 추가적인 활용 가능성을 모색함. 국립원에 특작과학원을 방문하여 특용작물 중 하나인 인삼을 대상으로 나노광학센서 적용을 시도함 (그림 69). 인삼의 경우 주로 상품화되는 지하부의 상태 진단이 필요한데, 기존의 기술로는 인삼의 지하부 상태를 직접적으로 파악하기 힘들고 지상부의 관찰을 통한 간접적인 파악만 이루어지고 있음. SERS 나노 기술의 경우 신호전달 물질을 통해 식물의 상태를 파악하기 때문에, 지하부에서 발생하여 물관을 통해 전달되는 식물 신호전달 물질의 지상부에서의 검출을 통해 식물 지하부 상태에 대한 파악이 가능함. 이와 같은 진단 시스템 적용이 가능해질 경우 특용작물 진단과 관련하여 다양한 기대효과 및 사업화를 모색할 수 있을 것으로 예상됨.
- 나노 광학센서를 인삼 모종에 도입하여 SERS를 측정한 결과 이전 밀·보리의 진균병 연구에서 발견한 신호와 상당히 유사한 신호를 검출하는데 성공함 (그림 70).
- 딸기 외에도 토마토의 잿빛곰팡이 진균병 감염에 대한 SERS를 이용한 진단을 시도하였음. 나노 광학센서를 주입한 진균병 감염군 토마토에서 특정 위치 (650 cm^{-1})에서 SERS 신호가 증가하는 것을 확인함 (그림 71).



<그림 69. 인삼에 대한 나노 광학센서 적용 가능성 모색>



<그림 70. 인삼에 나노 광학센서를 도입하여 획득한 SERS 이미지(A)와 스펙트럼(B)>

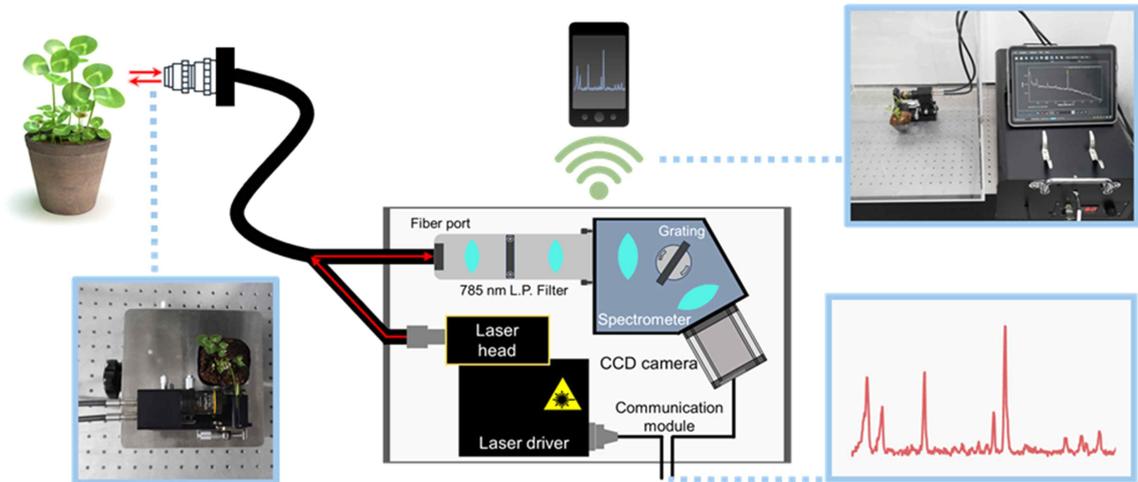


<그림 71. 잿빛 곰팡이 감염 여부에 따른 토마토의 SERS 신호 차이>

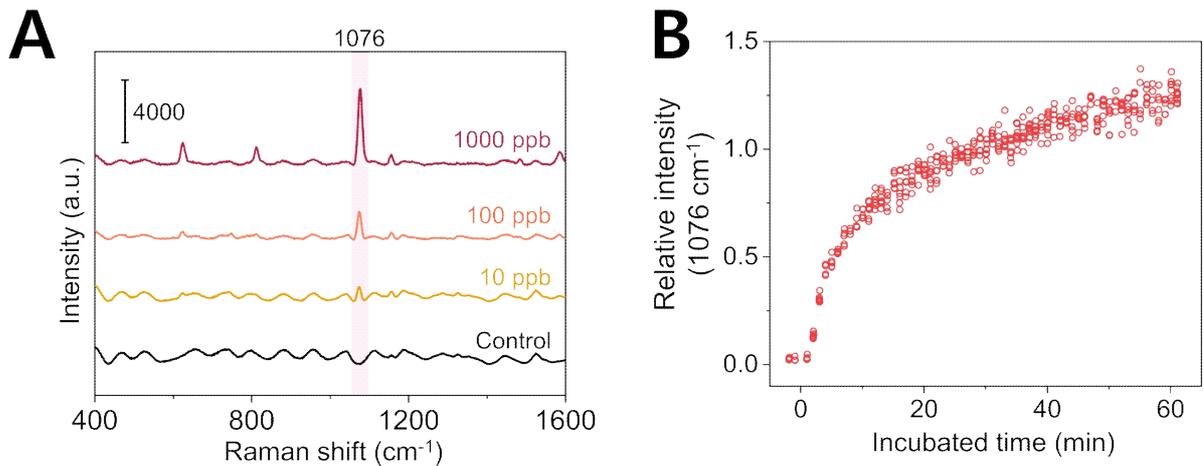
○ 농가 현장에서의 이동형 라만 분광기 측정 안정성 확보 및 최적화

- 시제품으로 개발한 이동형 라만 분광기를 활용하여 식물체에서 발생하는 SERS 신호 측정을 수행함 (그림 72).
- 휘발성 기체 분자의 검출을 시험하기 위하여 투명한 용기 내에 이동형 SERS 분광기의 probe를 넣고 밀폐하여, 기존의 현미경 형태의 라만 분광기를 사용하지 않고도 실시간으로 변화하는 SERS 신호를 모니터링하는데 성공함 (그림 73).
- 실제 딸기와 토마토의 농가 현장을 방문하여 개발한 이동형 라만 분광기 시제품을 사용

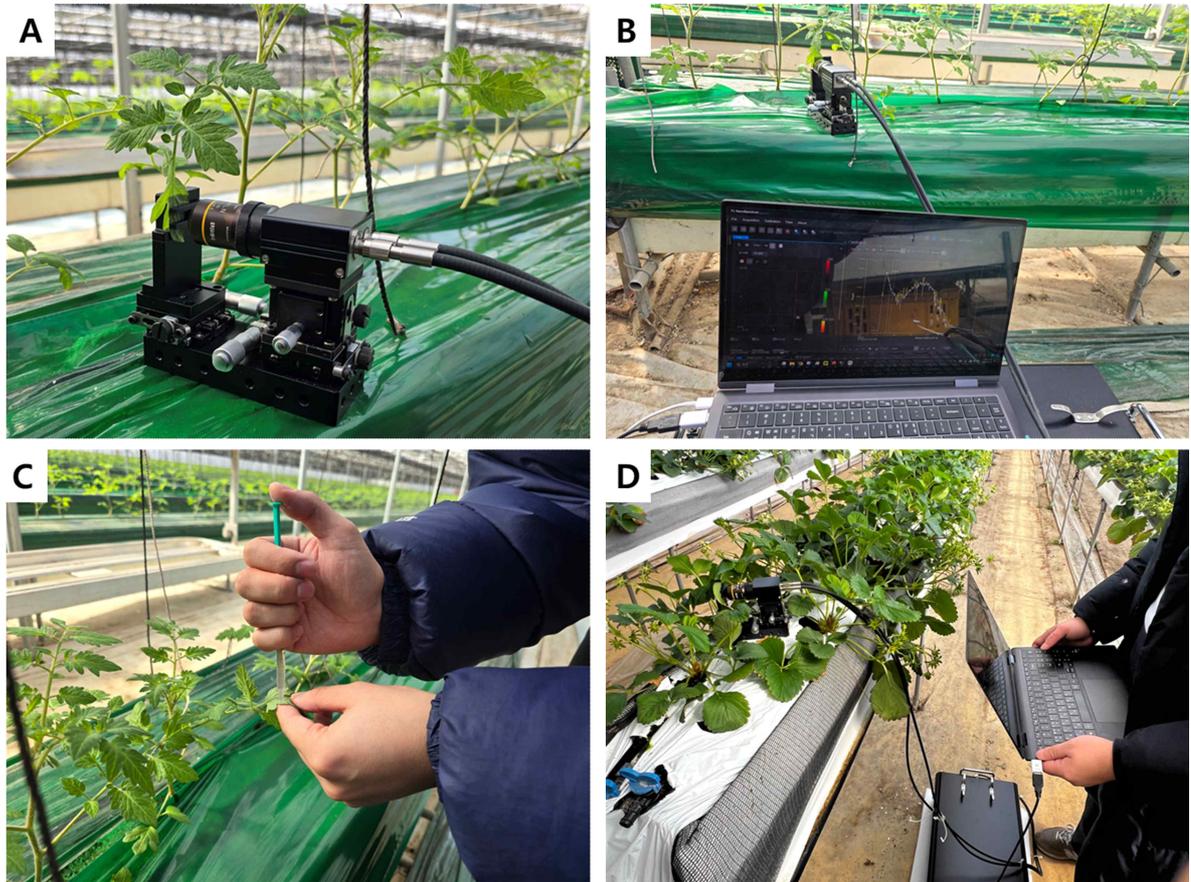
하여 측정함. (그림 74) 측정 과정에서 프로브가 재대로 고정이 되지 않거나 식물 주변에 위치시키기 어려운 애로사항들이 확인됨. 추후 설계상 미흡했던 점을 수정하기 위하여 유연하면서도 튼튼하게 프로브를 지지할 수 있는 고정용 암을 프로브에 부착할 수 있도록 설계를 수정하였음 (그림 75).



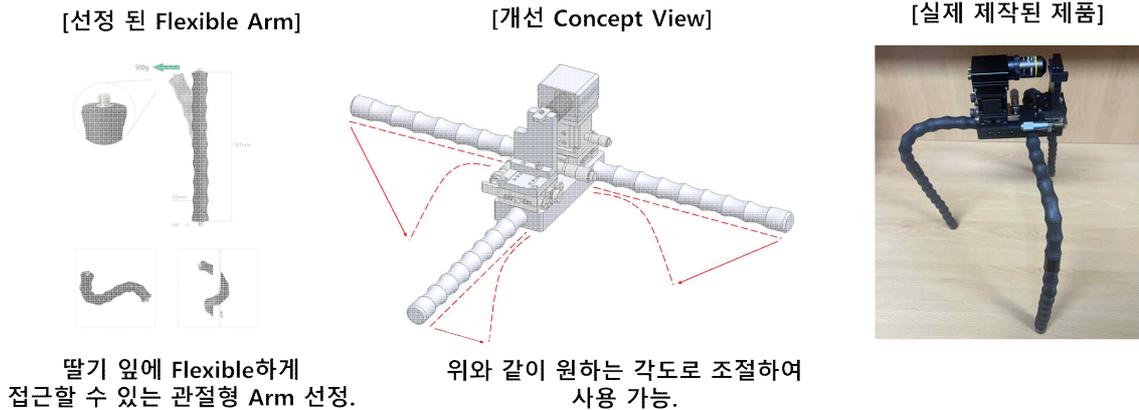
<그림 72. 이동형 분광기를 이용한 식물체의 SERS 신호 측정 모식도 및 사진>



<그림 73. 이동형 분광기를 이용한 기체 분자의 식물 유입 확인(A) 및 실시간 측정(B)>



<그림 74. 농가 현장에서 이동형 라만 분광기를 이용한 신호전달물질 측정 시험. 토마토 잎을 측정하는 이동형 분광기의 프로브(A), 실제 측정 화면(B), 나노입자 주입 장면(C), 딸기 식물에서의 측정(D)>



<그림 75. 농가 현장 측정 후 피드백을 기반으로 이루어진 프로브 개선>

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

1단계 (21'~22')

▶ 고감도 SERS 나노센서 개발 및 최적화

- 식물 엽록소 a를 비롯한 배경 형광 신호으로 인한 신호 간섭을 회피하고, 동시에 SERS 신호를 효율적으로 측정가능한 근적외선 영역(785 nm)에서 높은 광학활성도 달성함과 동시에 최대 10^{10} 배 수준의 enhancement factor도 확보함.
- PDDA 폴리머를 나노센서에 도입하여 그 표면에 강한 양전하를 유도하였고, 이를 이용하여 기존 나노센서에서 측정하기 어려웠던 식물 대사관련 혹은 식물 호르몬 분자들을 정전기적 인력을 통해 검출하는데 성공, 특히 식물 주요 대사물질인 ATP 분자에 대해 1 nM 수준의 최소 검출 농도를 확보함.
- 개발한 나노센서와 검출 분자와의 상호작용이 검출분자 농도에 의존적인 가역반응임을 확인하고, 식물 내부에서 실시간으로 변화하는 표적 물질의 농도 dynamics를 모니터링할 수 있음을 검증함.

▶ **딸기 잿빛곰팡이 병 진단을 위한 표적 물질 선정 및 나노센서의 다중검출 능력 검증**

- 병증을 육안으로 확인할 수 없는 초기 단계에도 분자 인식 기반을 통해 진균병을 진단할 수 있는 표적물질들을 선정. (1) 잿빛곰팡이균 (표면 분자, DNA 등), (2) 잿빛곰팡이균이 분비하는 분자들 (mycotoxin, 세포벽 분해 효소 등), (3) 딸기 식물이 생성하는 면역반응관련 분자들(salicylic acid, indole-3-acetic acid, extracellular adenosine triphosphate 등)로 그룹화 함.
- 식물 대사 관련 및 호르몬 분자에 대한 동시 측정능력을 검증하기 위해 4 종류의 표적 분자를 모두 섞어 측정 실험을 수행하였고, 각각의 물질들에 고유한 SERS 밴드 신호들을 모두 동시에 검출하는 데 성공함.

▶ **표적 물질과 나노센서의 상호작용 메커니즘 및 정량화 분석**

- 매우 복잡한 화합물들이 혼합된 식물 체내에서는 다양한 분자들이 경쟁적으로 나노센서에 접근하기 때문에 단일 물질 측정과는 전혀 다른 양상의 신호가 검출됨. 이를 분석하고, 정확히 예측하고자 Langmuir model을 기반으로 다분자 동시 검출에 대한 수학적 모델링을 설계하고 성공적으로 그 신호 세기를 예상함. 또한 실제 식물의 체액에서도 수식화 모델이 성공적으로 적용가능함을 확인함.

▶ **식물체의 표적 물질 후보군에 대한 SERS 스펙트럼 데이터베이스 구축 및 측정용 기관 개발**

- 기존 식물 호르몬으로 알려진 분자들을 포함하여, 그 생합성 과정에서 발생하는 유도체와 주요 물질대사 분자들까지 후보군을 선정함.
- 다양한 후보물질에 대한 범용적인 SERS 측정을 위하여 초발수성을 갖는 SERS 기관을 개발하여 분석 물질과 나노 광학센서가 포함된 물방울이 기관위에서 최소의 접촉면적을 가지도록 하였음. 이후 시간이 경과하면서 나노 광학센서는 좁은 영역에 국지화되어 높은 SERS 민감도와 식물 체내의 세포벽에 국지화되는 것과 유사한 SERS 측정환경 재현에 달성함.
- 이후 후보군 물질 총 22 종의 분자들에 대해 표준 SERS 스펙트럼을 얻어 데이터베이스를 확보하였으며, 이를 이용한 PCA 및 UMAP을 활용한 머신러닝 기법을 통해 판별할 수 있는 알고리즘을 검증함.

▶ **체내 선택적 국지화를 위한 나노센서 최적화 및 식물 체내에서의 안정성 검증**

- 식물 잎 내부에서 세포벽에 따라 나노센서를 선택적 국지화하고, 세포에서 생성되어 다른 세포로 전달되는 스트레스 신호를 검출하고자 함. 따라서 나노입자의 크기를 약 250 nm의 직경으로, 세포간의 공간 속에 위치되도록 최적화하였음.
- 이러한 나노센서의 분포를 확인하기 위하여, 형광과 SERS 두 광학신호를 통해 식물 내 나노센서의 위치를 정밀하게 검증함. 물냉이, 보리, 밀의 세 가지 식물에 대하여 현미경을 통해 화상을 얻음. 그 결과 기공을 통해 들어간 나노센서 입자들이 세포 내로 들어가지 않고 세포벽을 따라 위치함을 검증함.
- 콜로이드 수용액 상태의 AgNS@PDDA가 일주일 이상 물성의 변화 없이 안정하게 확인함.
- 실제 식물에 완충용액과 함께 나노입자를 주입하고 그 생체 적합성과 안정성을 테스트하였음. chlorophyll contents를 측정한 결과 약 2 주 동안 대조군과 거의 차이없이 식물이 건강함을 확인하였음. 또한 PI assay를 통해 나노입자가 유발한 cell death가 있는지 확인하였으나 이 또한 대조군과 미미한 차이를 보임.

▶ 나노센서가 도입된 식물체 SERS 신호의 시공간적 분석

- 나노센서가 도입된 이후 공간과 시간에 따라 어떻게 분포하고 있는지 파악하기 위해서 시공간적 분석을 수행하였음. 주입된 나노센서는 mesophyll 보다는 주로 표면 부근의 epidermis 영역에 밀집해있었으며, 시간이 지남에 따라 매우 천천히 잎의 끝부분을 향해 이동하는 것을 확인하였음.

▶ 나노센서의 식물체 적용: 식물 내 비생물학적 스트레스 SERS 신호 모니터링

- 물냉이 잎에 나노센서를 주입하고, 주입구 근처에 상처를 낸 다음, 물리적 손상에 대한 식물 방어체계 전달물질 생성을 관찰함. 그 결과 상처가 발생한 경우, phytoalexin의 일종인 nasturlexin B로 추정되는 SERS 신호가 매우 강하게 나타남을 확인하였으며 그 신호를 1 시간에 걸쳐 실시간으로 모니터링하는데 성공하였음.
- 서리가 생기지 않는 4 °C의 온도에서 24 시간 동안 노출된 물냉이에서 특정 SERS 신호를 검출하는데 성공하였음. 문헌 조사 결과 냉기 스트레스와 관련이 있는 glutathione 분자의 SERS 신호로 추정되며, 그 SERS 밴드의 세기가 대조군과 통계적 수준에서 유의미하게 차이가 남을 검증하였음.

▶ 나노센서를 통한 진균병 감염 식물 체내 SERS 신호 검출 및 감염 초기 단계 분석

- 밀과 보리 식물에 감염되는 진균병 모델을 이용하여, 실제 SERS 신호 모니터링을 통한 진균병 감염 진단이 가능한지에 대한 실험을 진행함. 기존 진단방식인 PCR 방식의 경우 감염 후 24 시간 이후에서야 낮은 신호를 검출할 수 있었지만, SERS 진단 결과 병변이 육안으로 보이지 않는 감염 0일차 시점에서 방어체계 전달물질인 SA의 SERS 신호를 검출하는데 성공함.
- 검출한 SA의 신호의 유효성을 검증하기 위해, 감염된 밀과 보리의 유전자 발현을 RT-qPCR을 검사하였음. 그 결과 실제로 감염된 직후부터 SA의 생합성과 관련이 있는 유전자들이 발현하였음을 확인하였고, SA가 검출된 시점부터 자가면역반응과 관련이 있는 유전자들 역시 발현을 시작하였음을 확인하여 SA의 SERS 신호를 검출하는 것이 진균병 초기 단계 진단에 매우 적합함을 검증하였음.
- 위의 성과들을 통해 향후 딸기 식물의 잣빛곰팡이균 조기 진단 기술의 근간을 마련.

▶ 나노센서의 딸기 식물체 내 효율적인 도입을 위한 기술 개발

- 나노센서의 도입은 식물의 잎의 모양, 면적, 친수성, 잎맥 구조에 따라 영향을 받을 수 있기 때문에, 각 식물종에 맞는 최적화 도입 방식을 연구할 필요성이 있음. 물냉이, 밀, 보리와는 달리 딸기 식물은 표면에 미세한 섬모 조직(trichome)이 있어, 그 표면의 친수성이 매우 떨어지게 됨. 따라서 콜로이드 수용액 상태의 나노입자의 도입이 매우 어렵고, 기존의 기공을 통해 주입하는 방식의 적용이 불가능함을 확인함.
- 이를 개선하기 위하여, 기공이 아닌 속씨 식물들이 가지고 있는 배수조직(hydrothode)를 통해 나노입자를 주입하는 연구를 수행 중에 있음. 배수조직은 기공과 달리 빛이나 수분의 양과 관계 없이 항상 열려있으며, 그 크기 또한 기공보다 크기 때문에 보다 원활한 나노센서의 도입이 가능할 것으로 예상하고 있음.

▶ 딸기-잣빛곰팡이 식물 병원시스템(Plant pathosystem) 기반의 딸기 조직별 감염에 따른 형태학적·생리학적 변화의 시·공간적 모니터링

- 딸기의 열매와 잎에 각각 10,000개의 포자(1×10^6 포자/ml, 10 μ l)를 딸기 열매와 잎에 접종하여 24시간 주기로 관찰한 결과, 병원균 접종 24시간 후부터 열매에서는 균사가 자라는 것을, 잎에서는 접종부위가 갈색으로 변하는 것을 육안으로 관찰할 수 있음.

▶ 잣빛곰팡이 감염 초기의 방어반응 유전자의 발현량 측정

- qRT-PCR을 통해 딸기 잣빛곰팡이 병 진단을 위한 표적물질 탐색을 수행함. salicylic acid의 방어기작 마커인 FaPR1-1 유전자와 salicylic acid 생합성에 관여하는 FAF3D 유전자의 발현량을 진균병 감염 초기단계에서 비교하여 salicylic acid가 진균병 진행 초기단계에 진단용 표적물질로써 적합함을 검증함.

▶ 딸기-잣빛곰팡이 식물 병원시스템에 대한 정량실시간 PCR (qPCR) 진단법 구축

- 잣빛곰팡이와 딸기 식물의 종 특이적 primer 세트들을 이용하여 본 연구의 딸기-잣빛곰팡이 식물 병원시스템에서 높은 민감도를 가진 잣빛곰팡이에 대한 Bc3 프라이머 세트를 선별하고 각 프라이머 세트의 검출한계(limit of detection)을 확인함.

▶ 잣빛곰팡이병에 대한 정량실시간 PCR (qPCR) 진단의 민감도 확인

- 잣빛곰팡이를 감염시킨 딸기식물 시료에서 시간별로 qPCR 방법을 이용하여 잣빛곰팡이를 검출했을 때 감염 후 24시간 후부터 유의미한 결과를 얻을 수 있음을 확인함.

▶ SERS 측정에 용이한 고해상도 분광기 개발

- 식물 측정에 적합한 785 nm 레이저에 대하여 분광기 시뮬레이션을 수행하였고, 30~2000 cm^{-1} 라만 측정 범위와 3 cm^{-1} 의 해상도를 가지는 광섬유 기반 매크로 라만 분광기 제작.

▶ 식물체 현장 진단을 위한 이동형 라만 분광기 광학계 구성

- 제작된 785 nm 레이저용 분광기를 이용하여 타이레놀과 실리콘을 측정하고, 라만 측정 범위 및 라만 신호의 해상도를 확인한 결과, 목표로 한 수치에 근접한 결과를

획득함.

- 농가 현장에서 활용가능한 형태의 이동형 라만 분광기와 핸드건 타입의 프로브를 설계하여 실물을 제작하였음.

▶ 식물체 측정을 위한 이동형 라만 분광기 최적화

- 현미경 타입의 분광기보다 초점 영역이 크기 때문에 식물 형광 신호가 강해져서 분석 대상인 SERS 신호를 수집 및 분석하는데 어려움이 생김. 이를 극복하기 위해 광섬유 코어 크기 조절 및 single-mode laser를 탑재함

2단계 (23')

▶ SERS 분광법을 이용한 휘발성 신호전달물질 검출법 개발

- 딸기 식물이 잎 표면에 존재하는 섬모로 인한 발수성을 가져 기공을 통한 콜로이드 용액의 주입이 어려운 것을 확인함. 따라서 새로운 방식의 신호전달물질의 검출법을 모색함.
- 진단 대상 식물에 나노 광학센서를 직접 주입하는 것이 아닌, 진단 대상 식물이 스트레스 상황에 처했을 때 다른 식물에게 공기 중 확산을 통해 전달하는 신호전달물질을 검출하는 방식을 새롭게 개발함.
- 이러한 진단법은 진단 대상이 달라지더라도 기존 체내진단방식에 비해 종특이성으로부터 비교적 자유롭다는 장점을 지님. 또한 단일 식물을 진단 대상으로 하지 않고 주변에 있는 모든 식물로부터 신호전달물질을 검출하기 때문에 농업 현장에서 보다 경제적으로 활용될 수 있음.

▶ SERS 측정을 통한 휘발성 신호전달물질 검출 검증

- 농도 별로 SERS 신호의 세기를 모니터링한 결과, 100 ppm의 농도에서도 약 수분 내로 휘발성 기체분자를 검출하는데 성공하였음. 또한 3가지 종류의 기체가 혼합되어 있는 상황에서도 각각의 고유 SERS 신호를 동시에 검출하여 그 다중분석능력을 확인할 수 있었음.

▶ 식물체 모니터링 지속성 확장을 위한 나노광학센서 표면 개질

- PDDA 이외에 다양한 폴리머를 이용한 나노분광센서의 표면개질을 통해 다양한 분자의 검출을 시도함. 담배 식물로부터 유래한 공기 중 니코틴을 PVA 폴리머 처리를 통해 검출하고, PAA 폴리머를 통해 PEA 분자를 공기 중 검출하는데 성공하였음.

▶ 딸기 잣빛곰팡이 진균병 진단에 대한 적용

- 휘발성 신호전달물질 검출법을 이용하여 잣빛곰팡이 진균병에 걸린 딸기 열매에 대한 모니터링을 수행함.
- 진균병에 감염된 감염균과 대조균 모두 모니터링 기간동안 형태적으로 아무런 변화가 없었음에도 불구하고, 감염균에서는 휘발성 물질의 일종인 methanethiol로 확인된 SERS 신호가 검출되었음. 감염균의 methanethiol의 SERS 신호는 3일차까지 매우 강하게 증가한 반면 대조균의 경우 유의미한 변화가 관찰되지 않았음.
- 따라서 휘발성 신호전달물질의 검출이 딸기 잣빛곰팡이병 진균병의 조기진단에 유용

함을 확인할 수 있었음.

▶ **다양한 작물에 나노 광학센서 도입 기술 적용 가능성 모색**

- 딸기 외의 작물에 대해서도 나노 광학센서의 도입을 통한 진균병 진단의 가능성을 모색하였음.
- 국립원예특작과학원을 방문하여 특용 작물 중 하나인 인삼에 나노 광학센서를 도입하고 SERS 신호를 측정하였음. 그 결과, 일부 샘플에서 진균병에 감염된 밀·보리에 서 관찰되었던 SERS 신호와 상당히 유사한 형태의 신호를 검출하는데 성공함.
- 딸기 이외의 잣빛곰팡이 진균병의 주요 대상인 토마토에 나노 광학센서를 도입하고 진균병 감염 진단 가능성을 시험함. 진균병에 감염된 토마토 식물에서 특정 SERS 신호가 증가하는 것을 관찰할 수 있었음. 따라서 토마토의 잣빛곰팡이병에 대해서도 나노 광학센서를 이용한 진단법의 적용 가능성을 확인함.

▶ **농가 현장에서의 이동형 라만 분광기 측정 안정성 확보 및 최적화**

- 개발한 이동형 라만 분광기 시제품을 이용하여 기존 현미경 형태의 라만분광기에서만 가능하였던 식물 내 SERS 신호를 검출하는데 성공하였으며, 실시간으로 신호가 증가하는 것을 모니터링할 수 있었음.
- 이후 실제 농가 현장을 방문하여, 딸기 및 토마토 식물을 대상으로 이동형 라만 분광기를 사용하여 SERS 신호 측정을 수행함. 그 과정에서 발견된 미흡점을 기반으로 다시 구조의 개선을 수행함.

(2) 정량적 연구개발성과

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

| 성과지표명 | | 연도 | 1단계 (2021~2022) | 2단계 (2023) | 계 | 가중치 (%) |
|-------------------------------|------|---------|--------------------|---------------|----|------------|
| 전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾ | 논문 | 목표(단계별) | 2 | 2 | 4 | 40 |
| | | 실적(누적) | 3 | 5 | 5 | |
| | 특허 | 목표(단계별) | 0 | 3 | 3 | 10 |
| | | 실적(누적) | 2 | 3 | 3 | |
| 연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾ | 고용창출 | 목표(단계별) | 3 | 2 | 5 | 10 |
| | | 실적(누적) | 2 | 3 | 3 | |
| | 제품개발 | 목표(단계별) | 0 | 1 | 1 | 40 |
| | | 실적(누적) | 0 | 1 | 1 | |
| 계 | | 목표(단계별) | 5 | 8 | 13 | 100 |
| | | 실적(누적) | 7 | 12 | 12 | |

< 연구개발성과 성능지표 >

| 평가 항목 (주요성능 ¹⁾) | 단위 | 전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%) | 세계 최고수준 보유국/보유기 관 | 연구개발 전 국내 수준 | 연구개발 목표치 | | 목표 설정 근거 | 연구개발 달성치 | |
|--------------------------------|------------------|---|-----------------------------|--|---|--|--|--|---|
| | | | 성능수준 | 성능수준 | 1단계 (‘21~’22) | 2단계 (‘22~’23) | | 1단계 (‘21~’22) | 2단계(‘23) |
| 고감도 SERS 나노센서 | 배 | 30 | 1.3 x 10 ⁸ | 10 ¹⁰ (본 연구진 보유한 나노센서) | 1x10 ¹⁰ | 5x10 ¹⁰ | 조기 진단을 위해서는 미세농도의 표적 물질을 검출하는 것이 필수적이므로 매우 높은 민감도를 필요 | 1x10 ¹⁰ | 1단계 대비 약 1000 배 정도 더 민감 (측정 방식이 식물을 통한 기체 유입을 포함하기 때문에 단순 비교가 어려움) |
| | | | Si기반 상용제품 | | | | | | |
| 식물 체내에서의 나노입자 안정성 | - | 30 | 연구 내용 없음 | 연구 내용 없음 | 5 mM, PBS 완충용액 및 5 mM MgSO ₄ 염 용액에서 일주일 간 안정성 유지 | 식물체 내 도입 후 1주일 동안 신호 민감도 유지 | 경제적이고 장기적인 모니터링을 위해 식물 체내의 나노센서의 안정성을 확보 | 나노 센서를 주입한 식물에서 최대 2주간 유의미한 스트레스의 징후를 보이지 않음 | - |
| 이동형 라만 측정 장비 | cm ⁻¹ | 20 | 4.5 | 12 | 4 | 4 | 엽록소의 배경-형광을 회피하기 위하여 785 nm 파장에서의 높은 성능의 라만 측정 장비가 필요함 | 3.2 | - |
| | | | B&W TEK, i-Raman Plus | 유니나노텍(주), Handheld Raman spectrometer | | | | | |
| 라만 스펙트럼 정밀도 | cm ⁻¹ | 20 | < 3 | < 5 | < 3 | < 3 | 스펙트럼의 변화를 통해 조기 진단 알고리즘을 작성하기 위해서 스펙트럼 정확성의 확보 | 2 | - |

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

| 번호 | 논문명 | 학술지명 | 주저자 명 | 호 | 국명 | 발행기관 | SCIE 여부 (SCIE/비SCI E) | 게재일 | 등록번호 (ISSN) | 기여율 |
|----|---|-------------------------|----------|---------------|------|------------------------------------|-----------------------------|------------|----------------|-----|
| 1 | Identification and characterization of fungal pathogens associated with boxwood diseases in Korea | Plant Pathology Journal | 신○○ | 38(4):304-312 | 대한민국 | Korean Society of Plant Pathology | SCIE (IF: 2.94) | 2022.08.01 | 1598-2254 | 30 |
| 2 | First report of <i>Pseudonectria buxi</i> causing Volutella blight on Boxwood (<i>Buxus microphylla</i>) in the Republic of Korea | Plant Disease | 신○○ | 106(9):2518 | 미국 | American Phytopathological Society | SCIE (IF: 4.438) | 2022.09.01 | 0191-2917 | 30 |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|------------------------|-----|---------------|----|-----------------------------------|-------------------|------------|-----------|----|
| 3 | Intron turnover is essential to the development and pathogenicity of the plant pathogenic fungus <i>Fusarium graminearum</i> | Communications Biology | 최○○ | 5(1):1129 | 영국 | Springer Nature | SCIE (IF: 6.548) | 2022.10.26 | 2399-3642 | 40 |
| 4 | In vivo surface-enhanced Raman scattering nanosensor for the real-time monitoring of multiple stress signalling molecules in plants | Nature Nanotechnology | 손○○ | 18(2):205-216 | 영국 | Springer Nature | SCIE (IF: 39.213) | 2022.12.15 | 1748-3387 | 50 |
| 5 | Genetic and transcriptional regulatory mechanism of lipase activity in the plant pathogenic fungus <i>Fusarium graminearum</i> | Microbiology Spectrum | 김○○ | 11(3) | 미국 | American Society for Microbiology | SCIE (IF: 3.7) | 2023.06.16 | 1069-5524 | 30 |

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

| 번호 | 회의 명칭 | 발표자 | 발표 일시 | 장소 | 국명 |
|----|---|-----|------------|------------|------|
| 1 | 2021 KSM Spring Meeting | 박○○ | 2021.05.21 | 부산 BEXCO | 대한민국 |
| 2 | 2021 KSM Spring Meeting | 최○○ | 2021.05.21 | 부산 BEXCO | 대한민국 |
| 3 | KBM2021 48th Annual Meeting & International Symposium | 손○○ | 2021.06.24 | 부산 BEXCO | 대한민국 |
| 4 | KBM2021 48th Annual Meeting & International Symposium | 최○○ | 2021.06.24 | 부산 BEXCO | 대한민국 |
| 5 | 11 th Asian Photochemistry Conference | 손○○ | 2021.11.1 | ZOOM(화상회의) | 대한민국 |
| 6 | 11 th Asian Photochemistry Conference | 김○○ | 2021.11.1 | ZOOM(화상회의) | 대한민국 |
| 7 | 2021 한국바이오칩학회 추계학술대회 | 손○○ | 2021.11.18 | 제주 신화월드 | 대한민국 |
| 8 | 2021 한국바이오칩학회 추계학술대회 | 김○○ | 2021.11.18 | 제주 신화월드 | 대한민국 |
| 9 | 2022 KSPP Spring Conference | 최○○ | 2022.04.21 | 부산 소노벨 리조트 | 대한민국 |
| 10 | 2022 KSPP Spring Conference | 김○○ | 2022.04.21 | 부산 소노벨 리조트 | 대한민국 |
| 11 | 제137차 대한화학회 물리화학분과 여름 심포지엄 | 손○○ | 2022.06.29 | 부산 한화리조트 | 대한민국 |

| | | | | | |
|----|--|-----|------------|---|------|
| 12 | 제137차 대한화학회 물리화학분과 여름 심포지엄 | 이○○ | 2022.06.29 | 부산 한화리조트 | 대한민국 |
| 13 | 2022 한국공업화학회 춘계 학술대회 | 한○○ | 2022.05.13 | 제주컨벤션센터 | 대한민국 |
| 14 | The 22nd International Conference on the Science and Application of Nanotubes and Low-dimensional Materials | 한○○ | 2022.06.21 | 성균관대학교 캠퍼스 | 대한민국 |
| 15 | 2022 한국공업화학회 추계 학술대회 | 한○○ | 2022.11.03 | 대전컨벤션센터 | 대한민국 |
| 16 | 2023 MRS Spring Meetings & Exhibits | 손○○ | 2023.04.14 | Moscone Center West, San Francisco, California | 미국 |
| 17 | 2023 MRS Spring Meetings & Exhibits | 최○○ | 2023.04.11 | Moscone Center West, San Francisco, California | 미국 |
| 18 | 131st General Meeting of the Korean Chemical Society | 손○○ | 2023.04.27 | 수원컨벤션센터 | 대한민국 |
| 19 | 2023 Annual spring Meeting of the korean biochip society | 심○○ | 2023.05.31 | 여수엑스포컨벤션센 터 | 대한민국 |
| 20 | NANO KOREA Symposium | 곽○○ | 2023.07.05 | 일산 킨텍스 | 대한민국 |
| 21 | IAPB 2023 | 곽○○ | 2023.08.10 | 대전컨벤션센터 | 대한민국 |
| 22 | 2023 ICAVS | 손○○ | 2023.08.29 | Jagiellonian University, Krakow | 폴란드 |
| 23 | 2023 한국생체재료학회 추계 학술대회 | 곽○○ | 2023.09.22 | 제주신화월드 | 대한민국 |
| 24 | 2023 한국식물학회 | 심○○ | 2023.10.25 | 여수 소노캄 | 대한민국 |
| 25 | 2023 한국식물학회 | 곽○○ | 2023.10.26 | 여수 소노캄 | 대한민국 |
| 26 | A3 symposium | 곽○○ | 2023.10.31 | 고려대학교 서울캠퍼스 | 대한민국 |
| 27 | A3 symposium | 심○○ | 2023.10.31 | 고려대학교 서울캠퍼스 | 대한민국 |

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

| 번호 | 지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재) | 국명 | 출원 | | | | 등록 | | | 기여율/ 부처기 여율 | 활용 여부 |
|----|---|---------------|-------------|------------|-----------------|----------|-----|-----|-------|-------------------|----------|
| | | | 출원인 | 출원일 | 출원 번호 | 등록 번호 | 등록인 | 등록일 | 등록 번호 | | |
| 1 | 신규한 데커신 유도체, 이의 제조방법 및 이의 용도 | 대한민국 | 서울대학교 산학협력단 | 2021.10.18 | 10-2021-0138874 | | | | | 100% / 50% | N |
| 2 | 식물 호르몬 검출용 플라즈몬 나노센서와 그 동작 및 이용 방법 | 대한민국 + 해외 PCT | 서울대학교 산학협력단 | 2021.10.29 | 10-2021-0146340 | | | | | 100% / 70% | N |
| 3 | 셀룰로오스 나노섬유로 안정화시킨 피커링 에멀전을 이용한 생물학적 방제제 조성물 | 대한민국 | 서울대학교 산학협력단 | 2023.06.23 | 10-2023-0081256 | | | | | 60% / 10% | N |

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

| 번호 | 시제품명 | 출시/제작일 | 제작 업체명 | 실치 장소 | 이용 분야 | 사업화 소요 기간 | 인증기관 (해당 시) | 인증일 (해당 시) |
|----|------------|-----------|----------|-------------|-------------|-----------------------------|----------------|---------------|
| 1 | 이동형 라만 분광기 | 2023.6.12 | (주)나노베이스 | 서울대학교 화학교육과 | 식물용 SERS 측정 | 시제품 제작 소요 기간: 약 2.5 년 | | |

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

| 성과 | | 식물용 SERS 측정이 가능한 이동형 라만분광기 개발 | | | |
|--------------------------------|-------------|-------------------------------|---------|---------|------|
| 사업화 계획 | 사업화 소요기간(년) | 3년 | | | |
| | 소요예산(천원) | 140,000 | | | |
| | 예상 매출규모(천원) | 현재까지 | 3년 후 | 5년 후 | |
| | | 0 | 100,000 | 200,000 | |
| | | 시장 점유율 | 단위(%) | 현재까지 | 3년 후 |
| | 국내 | | 0 | 5 | 10 |
| 국외 | 0 | | 2 | 4 | |
| 향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획 | | 시료 측정 편의성을 위한 악세사리 개선 및 개발 | | | |
| 무역 수지 개선 효과(천원) | 수입대체(내수) | 현재 | 3년 후 | 5년 후 | |
| | 수출 | 0 | 100,000 | 100,000 | |
| | | 0 | 100,000 | 100,000 | |

□ 고용 창출

| 순번 | 사업화명 | 사업화 업체 | 고용창출 인원(명) | | | 합계 |
|----|---------------|----------|------------|-------|-------|----|
| | | | 2021년 | 2022년 | 2023년 | |
| 1 | 신규 및 청년 인력 채용 | (주)나노베이스 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| 합계 | | | 1 | 1 | 1 | 3 |

□ 홍보 실적

| 번호 | 홍보 유형 | 매체명 | 제목 | 홍보일 |
|----|----------------|------------|--|------------|
| 1 | 중앙전문지 | 한국대학신문 | 서울대 연구팀, 식물 스트레스 실시간 감지하는 나노센서 개발 | 2022.12.21 |
| 2 | 중앙일간지 | 뉴시스 | 서울대, 식물 스트레스 실시간 감지하는 나노센서 개발 | 2022.12.21 |
| 3 | 중앙일간지 | 서울경제 | 식물 스트레스 실시간으로 모니터링 | 2022.12.21 |
| 4 | 중앙일간지 | 동아일보 | 서울대, 식물 스트레스 실시간 감지하는 나노센서 개발 | 2022.12.21 |
| 5 | Internet/PC 통신 | 서울대학교 보도자료 | 동림생물자원학부 곽○○ 교수팀, 식물 스트레스 실시간 감지하는 나노센서 개발 | 2022.12.21 |

□ 포상 및 수상 실적

| 번호 | 종류 | 포상명 | 포상 내용 | 포상 대상 | 포상일 | 포상 기관 |
|----|---------|-------------------------|---------|-------|------------|----------|
| 1 | 학술대회 발표 | 2023 춘계 바이오칩학회 최우수 포스터상 | 최우수 포스터 | 심○○ | 2023.05.31 | 한국바이오칩학회 |

2) 목표 달성 수준

| 추진 목표 | 달성 내용 | 달성도(%) |
|---|---|--------|
| 고감도 SERS 나노센서 개발 및 최적화, 다양한 host-guest 메커니즘을 활용한 표면개질 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 기개발한 AgNS 표면에 PDDA 고분자를 도입하여 표면 전하를 양전하로 반전시키고 표적 물질에 대한 친화성 획득 ○ AgNS@PDDA의 안정적인 합성 프로토콜 확보 ○ 식물 엽록소 A에 대한 형광 신호를 회피하고 성공적으로 라만 신호를 획득 ○ 표적물질 ATP에 대한 1 nM 수준까지의 최소 검출 한도 (LOD) 확보 ○ 동시에 네 가지 표적물질에 대한 다중 검출이 가능함을 확인 ○ 수용액 콜로이드 상태에서 장기간 안정성 확인 | 100 % |
| 딸기 잿빛곰팡이 병 진단을 위한 표적 물질 선정 및 식물체 내 선택적 국지화 및 효율적인 도입을 위한 나노센서 최적화 | <ul style="list-style-type: none"> ○ mycotoxin, salicylic acid(SA), eATP 등의 표적물질들을 선정하여 후보군 그룹화 ○ 나노센서의 크기를 약 250 nm 수준으로 조정하여 식물 세포 내부가 아닌 세포벽 부근에 국지화되도록 설계함. 이후 형광 이미지와 SERS mapping 이미지를 통해 성공적으로 세포 외부에 나노센서가 국지화되었음을 확인 ○ 기공을 통해 식물을 주입하는 전략을 사용. 물냉이, 밀, 보리에 대해서는 잘 적용되었으나, 딸기의 경우 표면에 섬모조직으로 인해 소수성을 띄어 기공을 통한 나노센서 도입이 쉽지 않았음. ○ 이를 해결하기 위하여 공기 중 휘발성 신호전달물질의 검출법을 새롭게 개발하였으며 성공적으로 신호전달물질을 검출함. | 100 % |
| 식물 병원시스템 기반 분광학적 분석에 적합한 딸기 잿빛곰팡이병 감염 초기 진단 표적 물질 선정 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 딸기 열매와 잎에 잿빛곰팡이 포자를 접종하여 관찰한 결과 접종 후 24시간부터 열매에서의 균사생장과 잎의 접종부위 갈변을 육안으로 관찰하여 초기 단계의 딸기 식물의 형태학적 및 생리학적 변화에 대해 시공간적 모니터링 수행 ○ 잿빛곰팡이병 감염 초기단계에서 qRT-PCR을 통해 식물의 salicylic acid 방어반응 유전자들의 발현량 측정을 통해 salicylic acid가 진균병 진행 초기단계에 진단용 표적물질로써 적합함을 검증 | 100 % |

| | | |
|--|--|--------------|
| <p>실시간 원예작물 측정이 가능한 이동형 고감도 라만 분광기 개발</p> | <ul style="list-style-type: none"> ○ 농가 현장에서의 측정을 위해 이동형 라만 분광기 형태를 설계 및 제작하였으며, 30 ~ 2000 cm^{-1}의 측정 범위 및 3.2 cm^{-1}의 해상도를 확보 ○ 제작한 장비를 이용하여 라만 스펙트럼을 성공적으로 획득 | <p>100 %</p> |
| <p>나노센서를 통한 진균 감염 식물 체내 SERS 신호 검출 및 데이터베이스 확보</p> | <ul style="list-style-type: none"> ○ 진균병에 감염된 밀과 보리에 대한 모델 실험을 통해 육안으로 식별되지 않는 수준의 초기단계에서 성공적으로 SA과 eATP의 신호를 검출하였으며, 감염 이후 신호 변화의 추이를 성공적으로 모니터링 ○ 기존 분석 방법인 PCR과 비교했을 때, SERS를 활용한 진균병 진단법이 검출 시점이 더 빠르고, 민감도 역시 높다는 것을 확인 ○ SERS로 검출한 SA는 실제 식물이 진균병으로 인해 생합성하였음을 유전자 발현 검사를 통해 검증함, 동시에 SA의 검출이 곧 자가면역반응으로 이어지고 있음을 확인 ○ 진균병 감염시 신호 전달 물질로 사용될 수 있는 후보 물질들에 대해서 SERS를 측정하기 위하여 범용적으로 적용될 수 있는 초발수성 SERS 기판을 제작하고 이를 활용하여 표준 스펙트럼을 확보 | <p>100 %</p> |
| <p>식물 스트레스 및 SERS 신호 관계 (시간, 공간) 분석</p> | <ul style="list-style-type: none"> ○ 진균으로 인한 생물학적 스트레스 이외에 물리적 손상 및 냉기 스트레스로 인한 신호 전달 물질 발생을 나노센서를 활용하여 그 SERS 신호를 검출하는데 성공 ○ 특히 물리적 상처 발생 이후부터 1 시간 동안 같은 영역에서의 SERS mapping 이미지를 획득하여 시공간적 분석을 수행 ○ 나노입자가 주입된 이후 시간에 따라 위치와 그 신호 세기가 어떻게 변화하는지 모니터링 | <p>100 %</p> |
| <p>제작된 나노센서 민감도 및 정확도 검증</p> | <ul style="list-style-type: none"> ○ 잿빛곰팡이를 감염시킨 식물시료의 genomic DNA에서 잿빛곰팡이 특이적 프라이머 세트(Bc3)를 이용하여 qPCR을 수행한 결과 접종 후 24시간부터 잿빛곰팡이 검출 가능함을 확인 | <p>100 %</p> |
| <p>안정적인 라만 측정을 위한 식물 고정용 라만프로브 개발</p> | <ul style="list-style-type: none"> ○ 농가 현장에 딸기 식물의 잎을 직접 현장에서 측정할 수 있도록 핸드건 타입의 프로브를 설계 및 제작 ○ 제작한 라만 프로브를 활용하여 SERS 신호를 성공적으로 획득 | <p>100 %</p> |
| <p>SERS 신호를 통한 진균 감염 판별 알고리즘 개발 및 나노센서 준양산화 공정 연구</p> | <ul style="list-style-type: none"> ○ 휘발성 기체 분자인 Methanethiol의 SERS 신호를 통해 딸기의 잿빛곰팡이 진균병을 판별할 수 있었음. 감염군의 경우 676 cm^{-1}에서의 SERS 밴드가 유의미하게 증가하는 것을 확인할 수 있었지만, 대조군의 경우 유의미한 변화가 관찰되지 않았음. ○ 현재까지 개발한 나노 광학센서의 합성 프로토콜을 기준으로 0.1 mg/ml 농도로 30 ml만큼 합성하는 것이 가능함. 식물에 나노 광학센서 도입 시 1회당 약 0.2 ml 정도 소모되므로, 1회의 합성으로 대략 150 회까지 사용가능한 분량을 생산할 수 있음. | <p>100 %</p> |
| <p>식물체 내 모니터링 지속성 확장을 위한 나노센서 표면 개질</p> | <ul style="list-style-type: none"> ○ PDDA를 이외에도 PVA (polyvinyl alcohol), PAA (polyacrylic acid)로 처리한 나노 광학센서 등을 개발함. 이를 활용하여 도파민, 니코틴등 다양한 화합물의 검출에 성공함. | <p>100 %</p> |
| <p>딸기 잿빛곰팡이병 조기 진단 현장 적용을 통한 신뢰성 확보 및 지속성·확장성을 위한 기술 고도화</p> | <ul style="list-style-type: none"> ○ 형태학적으로 아무런 변화가 없어 육안으로 구별되지 않는 시점에도 불구하고 신호전달물질의 검출을 통해 진균병의 감염을 조기에 진단할 수 있음을 확인함. ○ 딸기 뿐만이 아니라 인삼, 토마토 등 다른 작물에서도 진균병 진단의 가능성을 모색하였으며, 시험 결과 유의미한 데이터를 얻을 수 있었음. | <p>100 %</p> |

| | | |
|---|--|--------------|
| <p>농가 현장에서 이동형 라만 분광기 측정 안정성 확보 및 최적화</p> | <p>○ 이동형 라만 분광기를 개발하고 이를 이용한 SERS 측정을 수행함. ○ 딸기와 토마토 농가 현장을 방문하여 이동형 라만 분광기를 이용한 SERS 신호의 측정을 시험하고, 미흡점을 반영하여 측정 장비의 구조를 개선함</p> | <p>100 %</p> |
|---|--|--------------|

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- **특허 등록**

당초 목표였던 3건의 특허 등록을 위해 3건의 특허 출원을 마친 상황이지만, 연구과제 수행기간 내에 등록을 마치지 못하였음.

- **고용 창출**

본 연구 과제의 진행 기간(2021~2023) 동안 COVID-19으로 인한 사상 초유의 판데믹이라는 예기치 못한 상황이 발생하여 사회적 거리두기, 이동 제한 등의 제약으로 인하여 새로운 인력 고용에 난항을 겪게 되었음.

2) 자체 보완활동

- **특허 등록**

본 연구 과제 종료 이후에 출원된 특허를 등록하기 위하여 필요한 절차를 계속해서 진행할 예정임.

- **고용 창출**

예기치 못한 상황에도 불구하고 연구과제 수행기간 동안 매년 1명의 정규직의 고용창출을 이루어냈으며, 본 연구과제가 종료된 이후에도 사업화를 계속 진행하면서 관련 개발 인력을 고용하여 최종적으로 목표로 한 5명의 고용 창출을 달성할 예정임.

3) 연구개발 과정의 성실성

연구 계획 단계에서 식물의 내부로 나노광학센서를 도입하여 체내 신호전달물질을 측정하는 것으로 목표로 하였으나, 딸기를 포함한 일부 식물에서 나노입자의 도입이 어려운 문제가 있었음. 이를 해결하기 위해 (1) 농약 등에서 사용되는 계면활성제 사용, (2) 음압 환경에서 나노입자 도입, (3) 배수조직(hydrothode)를 통한 도입 등 다양한 전략을 성실히 모색하였음.

그 결과 휘발성 신호전달물질 검출 방식이라는 새로운 전략을 발견할 수 있었고, 성공적으로 딸기에서 발생하는 잣빛곰팡이 발생을 진단할 수 있었음.

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

가. 사회·경제적 성과

- 본 연구는 차세대 농업 기술에서 핵심 영역으로 꼽히는 센서 분야에서 광학나노센서를 이용한 비파괴적·실시간 질병 및 건강 진단 기술을 제시하여 미래 식량 안보 확립에 기여함.

- 원예작물의 수확 이후 육안으로 식별되지 않는 시점에서든 잿빛곰팡이의 감염을 포착하여 수확 및 유통과정에서 발생할 수 있는 막대한 잠재적 경제적 손실을 최소화하고 방지하는데 기여할 수 있을 것으로 전망됨.
- 작물의 건강상태를 실시간 모니터링을 통해 생산되는 농산물의 품질을 높이고 생산 비용의 절감을 통해 국내외 시장에서의 경쟁력을 강화함.
- 진균병의 조기 진단을 통해 과도한 진균병 방제를 줄일 수 있으며 약물 저항성 병원체의 발생이나 환경오염과 같은 위험을 방지하는데 기여하여 지속가능한 농업 모델의 근간을 마련함.
- 농산업에 나노 기술을 활용한 센서의 도입으로 앞으로의 농산업을 포함한 다양한 산업에 나노 기술이 도입될 발판을 마련함.

나. 학술·기술적 성과

- 최근 활발히 연구되고 있는 식물 나노센서 분야지만, 대부분의 나노 센서는 전기적 신호 혹은 형광 신호를 기반으로 개발되었음. 본 연구는 SERS 분광학을 기반으로 한 새로운 형태의 나노 센서를 제시하여, 농업용 센서 기술의 분야를 선진화하고 국제적 경쟁력을 확보하는데 기여함
- SERS를 통한 신호전달물질의 검출을 통한 진균병 진단 기술을 새롭게 개발하고, 실제 원예작물에 적용시켜 통상적인 유전학 기반의 방식보다도 이른 시점에 진단이 가능함을 증명함. 이는 나노광학센서를 이용한 식물 진균병 조기정밀진단 기술의 원천 확보 및 표준화에 기여할 수 있을 것으로 기대됨.
- 식물의 스트레스에 대한 지표로서 활용될 수 있는 수십 종의 신호전달물질 후보군을 선정하고 이에 대한 표준 SERS 스펙트럼 데이터 베이스를 확보를 위해 다양한 물질에 대해 범용적으로 사용될 수 있는 표준 SERS 기판을 제작하였음. 이후 여러 종류의 신호전달물질이 자동적으로 판별할 수 있도록 SERS 스펙트럼의 판별 알고리즘을 개발함. 본 기술들은 농업 뿐만 아니라 SERS 분광법과 나노광학센서를 활용한 다양한 분야에서 머신러닝 및 인공지능을 이용한 자동화 판별·진단 분야에 폭 넓게 활용될 수 있을 것으로 전망됨.
- 대부분의 기존 연구들이 애기장대나 담배와 같은 모델 작물에 초점을 맞추었던 반면, 본 연구는 실제 농업 현장에서 경제적 가치가 높은 딸기, 토마토, 인삼과 같은 작물을 대상으로 나노 센서를 적용함으로써, 실험실 환경을 넘어 실제로 활용 가능한 연구 결과를 도출하였음.
- 이동형 라만 분광기의 시작품을 개발하여, 본 연구의 성과를 실제 농업 현장에서 적용가능할 수 있는 기반을 마련하였음.

다. 개발 성과에 대한 기술 기여도 및 산정 근거

(단위 : 백만원, %)

| 총괄과제명 | 세부과제명 | 기관명 | 유형 | 총 연구개발비 (A) | 정부지원 연구개발비 (B) | 정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A) | 성과 유형 | 기술기여도 | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|----------|-----------|-------------|----------------|-----------------------|---------|-------|-------|
| | | | | | | | | 산정 근거 | 비율 |
| 원예작물의 생산성 향상을 위한 잿빛곰팡이병 조기 진단 기술 개발 | 원예작물의 생산성 향상을 위한 잿빛곰팡이병 조기 진단 기술 개발 | 서울대학교 | 대학 (비영리) | 795 | 795 | 100 | 신규 기술개발 | 해당 없음 | - |
| | 이동형 측정 장비 개발 및 신뢰성 시험 데이터 확보 및 검증 | (주)나노베이스 | 중소기업 (영리) | 137 | 105 | 76.642 | 신규 기술개발 | ①-① | 76.48 |
| 계 | | | | 932 | 900 | - | - | - | - |

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

연구개발성과 활용 분야 및 활용 방안 계획

가. 학술적 성과

- 본 연구과제를 진행한 서울대학교 연구진과 (주)나노베이스는 연구과제 종료 이후에도 지속적인 협동 연구를 통해, 연구과제를 진행하면서 달성한 학술적 성과를 기반으로 SERS 분광학을 통한 식물의 신호전달물질을 이용한 모니터링 및 질병 진단 연구와 식물 측정용 장비 제품 개발 및 개선을 지속해나갈 예정이다.
- 본 연구과제에서 휘발성 신호전달물질을 통한 식물 건강 및 질병 진단이 가능함을 확인 하였으므로, 보다 민감하고 효과적인 휘발성 신호전달물질 검출을 위한 추가적인 연구 및 기술 개발이 필요함. 이는 원예작물의 신호전달물질 뿐만이 아니라, 나무 등으로부터 발생하는 휘발성 물질을 통한 산림보호, 개미 혹은 흰개미 등이 발생하는 호르몬 등의 검출을 통한 해충 방제 등의 보다 넓은 분야에 대해서 연구가 가능할 것으로 보임.
- 연구과제 종료 이후 해외 전문 학술 저널에 매년 1회 이상 논문 작성 및 게재를 계획하고 있으며, 그 외에 국내외 학술대회에 지속적인 참여를 통해 연구 내용 발표 예정.

나. 기술·산업적 성과

- 라만 분광기의 종류는 크게 현미경 기반의 마이크로 라만 장비와 이동이 가능한 형태의 휴대용 매크로 장비로 유형으로 분리됨. 현미경 기반의 장비는 대학 및 연구기관에서 연구 목적으로 주로 활용하는 반면에, 휴대용 유형의 장비는 현장에 직접 장비를 가져 가서 신속 진단, 품질 관리 및 환경 모니터링의 용도로 활용하고 있음.
- 이동형 및 휴대용 라만 분광기 제품은 북미/유럽의 주요 국가들의 제품으로 시장이 독점되어 있는 상황이며, 휴대용 라만 분광기 제품을 보유하고 있는 몇몇의 업체에서는 SERS 기판을 사용하여 측정할 수 있는 악세사리도 보유하고 있음.
- SERS 기술과 이동형 라만 분광기를 통해 실질적인 병해충 측정 장비의 가능성을 보임에 따라, 라만 기술의 산업화 및 대중화의 시발점이 될 것으로 보임. 이를 통해, 새로운 사업 분야에 진출할 수 있는 가능성을 확인함과 동시에 적극적인 홍보를 통해 당사의

라만 점유율을 높힐 수 있는 가능성을 확인함.

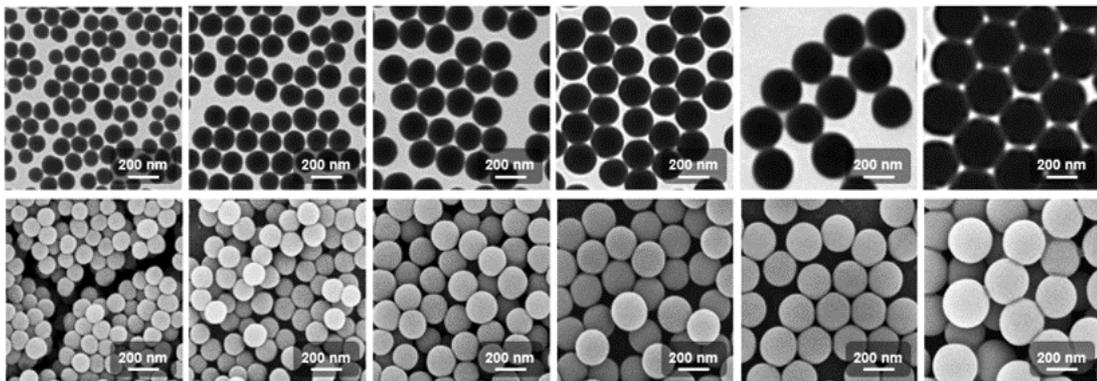
- 본 과제를 통해 개발한 이동형 라만 장비를 통해 농식물의 병해 감지 분야 뿐만 아니라, 다양한 화학 물질의 현장 검출이 필요한 화학 응용분야, 수질 검사 등의 다양한 응용분야에 적용할 수 있는 기반을 다짐.

다. 사업화 및 향후 성과 활용 계획

- SERS 나노입자 기반 진단 회사인 (주)나노필리아를 2023년 2월에 창업하여 나노입자의 생산 프로토콜 및 공성 개발을 진행 중임.
- 현재 나노광학센서의 코어에 해당하는 실리카 나노입자는 균일한 품질로 대량 생산이 가능해져 나노입자 시장에 공급을 시작한 상태임. 이어서 실리카 코어 입자 생산에 이어서 나노광학센서도 대량 생산 공정을 개발 중에 있음.
- 현재 SERS 나노광학센서의 실험실 수준에서의 소매로 재료를 구매할 경우 생산 단가는 약 16,200 원 수준이며, 대량 판매 품목으로 구매할 경우 10,880 원 수준까지 떨어짐. 1회 생산시 약 150번 사용이 가능하므로, 1회에 소모되는 나노광학센서의 비용은 100원 수준으로 매우 저렴함. 또한 추후에 대량 생산 공정 단계로 진행시 한 번 더 가격의 절감이 가능할 것으로 예측됨.



<그림 76. 나노입자 기반 진단 사업을 진행하기 위해 창업한 (주)나노필리아>

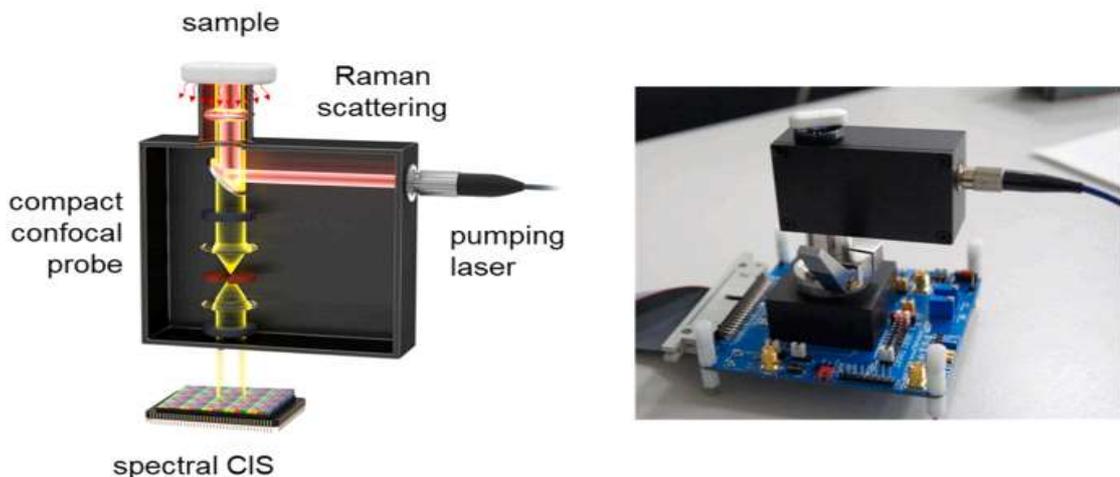


<그림 77. 현재 대량 생산 공정 개발이 완료된 실리카 코어 입자의 크기별 모습>

- 연구 과제 진행 기간 동안 출원된 3건의 특허에 대해 등록을 진행 중이며, 해외에도 추가적인 출원 및 등록을 진행할 예정임. 본 연구 개발의 결과 중 핵심 특허인 ‘식물 호르몬 검출용 플라즈몬 나노센서와 그 동작 및 이용 방법’은 현재 미국 특허 출원을 미쳤으며, 이어서 특허 등록 및 아일랜드를 포함한 추가적인 해외 특허 출원을 진행 중에 있음.
- SERS 분광 기술의 정량/정성 분석의 고도화를 위하여, SERS 나노광학센서와 분자 간의 상호작용에 대한 정밀한 모델화와 검증 과정을 진행할 예정임. 정성 분석의 경우

기계학습을 통해 스펙트럼의 개형을 통한 식물 건강 상태에 대한 분석 알고리즘 연구를 진행할 예정임. 정량 분석의 경우, 기존에 나노광학센서에 처리된 고분자 사슬 신호를 내부 기준 신호로 삼아 정량화 한 것을 보다 발전시켜, 고분자 이외의 방식으로도 신호세기를 정량화할 수 있는 방안에 대해 탐색할 예정임.

- 실험실 수준의 신호전달 물질 검출 수준을 뛰어넘어, 실제 농업 현장에서 현업 종사자들이 사용하기에 어려움이 없도록 더욱 간편한 진단 방식을 계속해서 모색할 예정임. 나노센서의 직접적인 주입이 필요없는 휘발성 물질 검출 방식을 포함하여, 스프레이 등을 통해 나노입자의 더욱 간편한 도입 등을 모색 중임.
- 식물 관련 진단 기술 실용화를 위해서 현 연구를 통해 개발한 SERS 나노광학센서 기술의 추가 연구 및 후속 사업을 추진 중에 있음 : ①농식품부에서 주관하는 ‘식물건강 증진 첨단기술 개발 및 융합형 연구인력 양성 과제 (연구책임자: 오○○ 교수)를 최근에 개시, ②나노 소재 기술 개발 과제인 ‘나노커넥트 기술이전 사업’을 포함하여 다양한 과제에 지원 중에 있음.
- 본 연구과제에서 개발한 이동형 라만 분광기의 가격은 다소 높은 편이나, 시제품임을 감안하고 구조 개선 및 나노광학센서의 성능을 보다 향상시켜 신호의 민감도를 높인다면 라만 분광기의 성능 한도를 낮출 수 있어 단가를 획기적으로 낮출 수 있을 것으로 예상됨. 또한, 본 과제를 공동 진행한 (주)나노베이스와 (주)나노필리아가 협업하여 또 다른 방식의 SERS 스캐너 장비 개발 진행 중에 있음
- 기존의 CCD 타입의 라만 분광기 이외에도 저렴하고 크기가 작은 CMOS 형태의 라만 분광기에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있음. 특히 최근에 학계에 발표된 소형 라만 분광기의 경우 그 크기가 손바닥보다 작음에도 NIR 영역에서 매우 효율적인 광학 신호를 수집할 수 있음이 발표되었음. 본 연구진도 이러한 라만 분광기의 기술을 식물 현장 진단에 도입하여 경제적이고 간편한 식물 진균병 진단에 활용할 계획임.



<그림 78. CMOS를 이용한 소형 라만 분광기의 모습/ Sensors and Actuators: B. Chemical (2023)>

< 연구개발성과 활용계획표 >

| 구분(정량 및 정성적 성과 항목) | | 연구개발 종료 후 5년 이내 | | | | |
|---------------------|--------------|-----------------|---------|------|---------|------|
| | | 2023 | 2024 | 2025 | 2026 | 2027 |
| 국외논문 | SCIE | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | 비SCIE | | | | | |
| 국내논문 | SCIE | | | | | |
| | 비SCIE | | | | | |
| 특허출원 | 국내 | | 1 | | 1 | |
| | 국외 | | | | | |
| 특허등록 | 국내 | | | | | |
| | 국외 | | | | | |
| 인력양성 | 학사 | | | | | |
| | 석사 | | | | | |
| | 박사 | | | | | |
| 사업화 | 시제품개발 | 1 | | | | |
| | 상품출시 | | 1 | | 1 | |
| | 기술이전 | | | | | |
| | 공정개발 | | | | | |
| | 매출액(단위 : 천원) | | 100,000 | | 100,000 | |
| | 기술료(단위 : 천원) | | 5,000 | | 5,000 | |
| 비임상시험 실시 | | | | | | |
| 임상시험 실시 (IND 승인) | 의약품 | 1상 | | | | |
| | | 2상 | | | | |
| | | 3상 | | | | |
| | 의료기기 | | | | | |
| 진료지침개발 | | | | | | |
| 신의료기술개발 | | | | | | |
| 성과홍보 | | | | | | |
| 포상 및 수상실적 | | | | | | |
| 정성적 성과 주요 내용 | | | | | | |

뒷면지

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업의 연구보고서입니다
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.

자체평가의견서

1. 과제현황

| | | | | | |
|-----------------------|-------------------------------------|-------------------|---------|----------|---------|
| | | 과제번호 | | 321107-3 | |
| 사업구분 | 000000사업 | | | | |
| 연구분야 | | | | 과제구분 | 단위 |
| 사업명 | 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업 | | | | 주관 |
| 총괄과제 | 기재하지 않음 | | | 총괄책임자 | 기재하지 않음 |
| 과제명 | 원예작물의 생산성 향상을 위한 잿빛곰팡이병 조기 진단 기술 개발 | | | 과제유형 | (개발) |
| 연구개발기관 | 서울대학교 | | | 연구책임자 | 정대홍 |
| 연구기간 연구개발비 (천원) | 연차 | 기간 | 정부 | 민간 | 계 |
| | 1차년도 | 21.04.01~21.12.31 | 245,000 | 10,000 | 255,000 |
| | 2차년도 | 21.04.01~21.12.31 | 328,000 | 13,000 | 341,000 |
| | 3차년도 | 21.04.01~21.12.31 | 327,000 | 9,000 | 336,000 |
| 참여기업 | (주) 나노베이스 | | | | |
| 상대국 | 상대국연구개발기관 | | | | |

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2024.02.25.

3. 평가자(연구책임자) : 정대홍

| | | |
|-------|-----|-----|
| 소속 | 직위 | 성명 |
| 서울대학교 | 정교수 | 정대홍 |

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

| | |
|-----|---|
| 확 약 |  |
|-----|---|

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

본 연구과제의 연구개발성과는 기존 식물 체내 나노센서 분야에서는 거의 시도된 바가 없는 SERS 분광학 기술을 도입한 것으로, 그 독창성이 매우 높게 평가됨. 또한 실험실 수준에서 이루어지는 애기장풀, 담배 등의 모델 식물 수준에서의 적용을 넘어, 경제적 가치가 높은 작물인 딸기, 토마토, 인삼에 대한 실질적 적용 가능성을 입증함으로써 그 가치가 더 높다고 평가할 수 있음. 또한, 이동형 라만 분광기의 시제품을 제작하여, 본 연구의 성과가 차세대 농산업 분야에서 새로운 시장 개척의 기반을 마련했다고 할 수 있음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

본 연구과제는 차세대 농업 기술의 핵심 분야인 센서 기술로써 미래 식량 안보와 밀접한 관련이 있음. 그리고 식물의 건강 상태 및 질병의 실시간 모니터링을 통해 약물 저항성 및 환경오염 등의 위험성이 있는 과도한 방제를 경감할 수 있으므로 지속가능한 농업의 기초 기술에 해당한다고 할 수 있음. 또한 경제성 높은 작물에 대해 적용 가능성을 입증함으로써 본 연구과제의 성과가 갖는 경제적 파급효과 역시 막대하다고 할 수 있음.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

나노광학센서를 통해 식물의 건강과 질병을 실시간으로 모니터링할 수 있는 센서 기술로서 정밀 농업 등의 차세대 농업에서 핵심을 담당할 수 있을 것으로 기대되며, 공기 중 휘발성 신호전달물질의 검출 등의 기술은 식물 외에도 폭발물, 마약 등의 위험물질의 공기 중 검출 기술로서 활용될 수 있을 것으로 보임. 그 외에 이동형 라만 분광기는 농업 뿐만이 아니라 축산업, 임업 등 다양한 산업 분야에서 활용가능할 것으로 예상됨.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

연구과제를 수행한 서울대학교 연구진과 참여기업인 (주)나노베이스는 연구과제의 효율적인 수행을 위하여 지속적으로 연구 내용에 대한 회의 및 피드백을 진행하였으며, 특히 두 기관 간의 긴밀한 협업을 통해 이동형 라만 분광기의 개발을 진행하였음. 그 결과 연구 계획 단계에서 목표로 했던 연구 성과들을 훌륭하게 달성할 수 있었음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

본 연구과제 수행 기간 (3년) 동안, 국제 전문 학술 저널에 총 5편의 논문을 게재하였음. 특히 그 저명도가 매우 높은 (IF:39.213) Nature nanotechnology에 SERS 나노광학센서를 이용한 식물 스트레스 연구를 발표하여 관련된 내용으로 5 편의 보도자료로 발표된 바가 있음. 그 외에도 10 회의 국제 학술대회 및 17 회의 국내 학술대회를 참여하여 본 연구과제의 성과를 활발히 공개 발표하였음. 이러한 연구성과를 기반으로 3건의 특허 출원과 이동형 라만 분광기의 시제품을 제작하였음.

II. 연구목표 달성도

| 세부연구목표 (연구계획서상의 목표) | 비중 (%) | 달성도 (%) | 자체평가 |
|---|-----------|------------|---|
| 식물체 내 분자 검출용 고감도 SERS 나노센서 개발 및 신호분석 | 25 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ● 식물 체내의 신호전달 물질에 대해 최대 1 nM 검출 수준의 고민감도 SERS 나노분광센서를 개발함 ● 총 22 종의 신호전달물질 후보군에 대한 표준 SERS 스펙트럼 라이브러리 구축 및 판별 머신러닝 알고리즘 개발 ● SERS 나노분광센서를 이용하여 공기 중 휘발성 신호전달물질 극미량 (100 ppm)을 검출 성공 |
| 식물체 내 효율적 전달과 지속적인 모니터링을 위한 나노센서 표면개질 | 25 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ● 식물체에 도입된 나노분광센서의 국지화를 통해 세포 간의 정보전달에 사용되는 신호전달물질의 포착이 가능하게 함 ● 다양한 폴리머의 처리를 통해 신호전달물질의 포착에 최적화된 나노분광센서의 표면개질을 수행하고 성공적으로 신호전달 물질을 검출함 ● 식물체에 도입된 나노분광센서가 최대 2 주간 유의미한 생물적 스트레스의 징후가 나타나지 않음을 확인함 |
| 딸기 잿빛곰팡이의 초기 감염 메커니즘과 형태학적 변화 모니터링을 통한 표적 물질 선정 및 진단기술 지속성·확장성을 위한 연구 | 25 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ● 딸기 잿빛곰팡이의 감염 메커니즘 분석을 통해 광학나노센서로 검출할 신호전달물질의 후보군을 선정함 ● 형태학적으로 아무런 변화가 없어 육안으로 구별되지 않음에도 불구하고 신호전달물질의 검출을 통해 진균병의 감염을 진단할 수 있음을 확인함 ● 딸기 이외에 토마토, 인삼 등의 경제작물에 나노분광센서를 도입, SERS 스펙트럼을 통한 진균병 진단의 적용 가능성을 확인함 |
| 실시간 원예작물 측정이 가능한 이동형 고감도 라만 분광기 개발 | 25 | 100 | <ul style="list-style-type: none"> ● 현장 진단용 이동형 라만 분광기 개발을 위해 광학계 구성 및 시제품 제작을 진행하였음 ● 농업 현장에서 사용하기 적합한 구조를 고안하고, 실제 농가 현장에서 시험 측정을 통해 추가적인 구조의 개선을 수행함. |
| 합계 | 100점 | | |

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구과제는 기존에 시도된 바 없는 SERS 분광학을 이용한 나노광학센서를 이용한 식물 신호전달물질의 실시간 검출을 통해 진균병 조기 진단을 목표로 하였음. 그 결과 본 연구과제가 당초에 목표로 하였던 세부 연구 내용은 모두 달성하였으며, 상당히 우수한 논문 및 학술대회 등의 학술적 성과를 이루었음. 다만 시간적 제약 및 코로나로 인한 판데믹 상황으로 인하여 불가피하게 사업화 관련 정량 성과들은 다소 미흡하였으므로 연구개발 종료 이후에도 연구활동을 이어가 관련 성과들을 보완하고자 함.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

연구에 참여한 서울대학교 연구진은 휘발성 신호전달물질 관련 연구를 중점으로 계속해서 식물 신호전달물질 검출 관련 내용에 대해서 연구를 진행할 예정임. 또한 (주)나노베이스의 지속적인 협업을 이어나가 시제품으로 개발한 제품의 추가적인 개발과 개선을 통해 상품화를 진행하고자 함.

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

| 성과 목표 | 사업화지표 | | | | | | | | | | 연구기반지표 | | | | | | | | | |
|------------|-----------|----------|----------|--|------------------|-----|---------|---------|---------|----------|----------|----------|-----|----------|----------|----------|-------------|------------------|--------------------|------------------|
| | 지식 재산권 | | | | 기술 실시 (이전) | | 사업화 | | | | 기술 인증 | 학술성과 | | | 교육 지도 | 인력 양성 | 정책 활용·홍보 | | 기타 (타연구 활용예) | |
| | 특허 출원 | 특허 등록 | 품종 등록 | S M A R T P R O J E C T | 건수 | 기술료 | 제품 화 | 매출 액 | 수출 액 | 고용 창출 | | 투자 유치 | 논문 | | | | 학술 발표 | 정 책 활 용 | | 홍 보 전 시 |
| | | | | | | | | | | | | | SCI | 비 SCI | | | | | | |
| 단위 | 건 | 건 | 건 | 건 | 건 | 백만원 | 건 | 백만원 | 백만원 | 명 | 백만원 | 건 | 건 | 건 | 명 | 건 | 건 | | | |
| 가중치 | | 10 | | | | | 40 | | | 10 | | | | 30 | 10 | | | | | |
| 최종 목표 | | 3 | | | | | 1 | | | 5 | | | 4 | 4 | 8 | | | | | |
| 당해 년도 | 목표 | 3 | | | | | 1 | | | 2 | | | 2 | 4.5 | 3 | | | | | |
| | 실적 | 1 | 0 | | | | 1 | | | 1 | | | 1 | 3.7 | 12 | | | | | |
| 달성률 (%) | | 0 | | | | | 100 | | | 50 | | | 50 | 82 | 400 | | | | | |

[별첨 2]

4. 핵심기술

| 구분 | 핵심기술명 |
|----|--------------------------------------|
| ① | 식물 신호전달물질 체내 검출을 위한 SERS 나노광학센서 |
| ② | 신호전달물질의 표준 SERS 스펙트럼 라이브러리 및 판별 알고리즘 |
| ③ | 휘발성 신호전달물질 검출을 위한 SERS 기판 및 분석 |
| ④ | 농업 현장 측정을 위한 이동형 라만 분광기 |

5. 연구결과별 기술적 수준

| 구분 | 핵심기술 수준 | | | | | 기술의 활용유형(복수표기 가능) | | | | |
|-------|----------|----------|------------|---------------|---------------|-------------------|----------------|------------|----------|----------------------|
| | 세계 최초 | 국내 최초 | 외국기술 복제 | 외국기술 소화·흡수 | 외국기술 개선·개량 | 특허 출원 | 산업체이전 (상품화) | 현장애로 해결 | 정책 자료 | 기타 |
| ①의 기술 | v | | | | | v | | | | |
| ②의 기술 | v | | | | | | | | | v (추가적인 연구 예정) |
| ③의 기술 | | | | v | | v | | | | v (추가적인 연구 예정) |
| ④의 기술 | | v | | | | v | v | | | |

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

| 핵심기술명 | 핵심기술 별 연구 결과 활용 계획 및 기대효과 |
|-------|--|
| ①의 기술 | <p>활용 계획: 본 기술은 특허 출원을 마쳤으며, 추후 특허 등록을 진행할 예정임</p> <p>기대 효과: 식물의 실시간 스트레스 모니터링을 통해 질병의 조기 진단이 가능함. 이는 막대한 경제적 손실 및 과도한 방제로 인한 환경 오염 등의 위험을 경감할 수 있음.</p> |
| ②의 기술 | <p>활용 계획: 실제 식물의 스트레스 상황에서 발생하는 SERS 신호와 비교 대조하여 각 식물 및 질병 별로 발생하는 신호전달물질에 대한 분석을 진행할 예정임</p> <p>기대 효과: SERS를 이용한 신호전달물질의 연구에 전반적으로 활용될 수 있음</p> |
| ③의 기술 | <p>활용 계획: 아직은 초기 연구 단계 수준으로 추가적인 연구를 진행해 더 민감하고 효과적인 타겟 물질의 검출 방법을 연구하여 차별화된 기술을 개발하고자 함.</p> <p>기대 효과: 식물 신호전달물질의 체내 검출과는 또 다른 장단점을 가지고 있음. 특히 하나의 SERS 분석을 통해 광범위한 공간의 식물을 동시에 모니터링 할 수 있다는 장점을 가지기 때문에 체내 진단에 비해 경제적인 실시간 진단이 가능할 것으로 기대 중.</p> |
| ④의 기술 | <p>활용 계획: 현재 시제품 수준이며, 추가적인 개발과 개선을 통해 상품화를 진행할 예정임</p> <p>기대 효과: 본 연구의 성과를 실제 농산업 현장에서 적용할 수 있을 것으로 기대함.</p> |

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

| 성과 목표 | 사업화지표 | | | | | | | | | | 연구기반지표 | | | | | | | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|---|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------|----------|------------------|-------------|------------------|----------|----------|------------------|------------------|---------------------------|------------------|
| | 지식 재산권 | | | | 기술 실시 (이전) | | 사업화 | | | | 기술 인증 | 학술성과 | | | 교육 지도 | 인력 양성 | 정책 활용·홍보 | | 기타 (타연구 활용액) (명) | |
| | 특 허 출원 | 특 허 등록 | 품 종 등록 | S M A R T 평 가 제 도 | 건 수 | 기 술 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 |
| | | | | | | | | | | | | | S C I | 비 S C I | | | | | | |
| 단위 | 건 | 건 | 건 | 건 | 건 | 백만원 | 건 | 백만원 | 백만원 | 명 | 백만원 | 건 | 건 | 건 | 명 | 건 | 건 | | | |
| 가중치 | | 10 | | | | | 40 | | | 10 | | | | 30 | 10 | | | | | |
| 최종목표 | | 3 | | | | | 1 | | | 5 | | | 4 | | 4 | 8 | | | | |
| 연구기간내 달성실적 | 3 | | | | | | 1 | | | 3 | | | 5 | | 11.37 | 27 | | | 5 | |
| 연구종료후 성과장출 계획 | | 3 | | | | | | 200 | 100 | 2 | | | 2 | | 6 | | | | | |