

11-1543000
-001408-01

발간등록번호

11-1543000-001408-01

현장 이동형 농산물 원산지 판별기 개발 최종보고서

2016. 10. 19.

주관연구기관 / 아스트

협동연구기관 / 국립농산물품질관리원

한양대학교

부산대학교

농림축산식품 R&D Report

현장 이동형 농산물 원산지 판별기 개발 최종보고서

2016

농림축산식품부


농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “현장 이동형 농산물 원산지 판별기 개발”(개발기간 : 2014.7.29 ~ 2016.7.28)
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 10 . 19 .

주관연구기관명 : 아스트	(대표자)	
협동연구기관명 : 국립농산물품질관리원	(대표자)	(인)
한양대학교	(대표자)	(인)
부산대학교	(대표자)	(인)
참여연구기관명 : 고려대학교	(대표자)	(인)

주관연구책임자 : 아스트	김영호
협동연구책임자 : 국립농산물품질관리원	문지영
한양대학교	정희일
부산대학교	오진우
참여연구책임자 : 고려대학교	이병양

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

보고서 요약서

과제고유번호	314033022S B010	해 당 단 계 연 구 기 간	2014.7.29. ~ 2016.7.28	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단계)
연구사업명	중 사업명	첨단생산기술개발사업			
	세부 사업명				
연구과제명	대 과제명	현장 이동형 농산물 원산지 판별기 개발			
	세부 과제명				
연구책임자	김영호	해당단계 참여 연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 27명 내부: 명 외부: 명	총 연구개발비	정부:600,000천원 민간:200,000천원 계:800,000천원
연구기관명 및 소속부서명	아스트, 부산대학교(산학협력단) 한양대학교(산학협력단) 국립농산물품질관리원(시험연구소)			참여기업명	
위탁연구	연구기관명: 고려대학교(산학협력단)			연구책임자: 이병양	
요약				보고서 면수	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 원산지별 농산물 특정 지표 물질과 선택적으로 반응하는 수용체(receptor) 개발 ○ 유전자 조작을 통해 박테리오파지 표면에 각각의 농산물 특정 지표 성분에 상응하는 펩타이드 발현 ○ 자가조립 된 박테리오파지 기반 구조색 필름 개발 및 이를 이용한 컬러 센서 분석시스템 개발 					

국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<p>농산물의 원산지를 현장에서 신속히 바로 판별할 수 있는 박테리오파지 기반 신개념 컬러 센서 시스템 개발을 목표로 함. 세계 최초로 박테리오파지를 원산지별 특정 지표 성분 분석에 도입하여 각각 반응 펩타이드를 발현시키고, 이를 활용하여 휴대 가능한 나노-바이오 융합형 컬러 센서로 개발을 하여, 현재 널리 사용되고 있는 임신테스터기, 리트머스종이와 같이 실제 생활에 응용 될 수 있는 새로운 개념의 컬러 센서 시스템을 개발 하고자 함.</p>					
연구개발성과	<p>□ 원산지 판별을 위한 농산물 특정 지표성분 분석 및 수용체 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 원산지별 농산물 특정 지표 물질과 선택적으로 반응하는 수용체(receptor) 개발 ○ 신속한 원산지 판별 지표 물질 검출을 위한 다양한 분자각인 고분자 연구 ○ μ-Fluidic channel을 통한 농산물 지표 성분의 선별적 분류 시스템 구축 <p>□ 농산물 지표 성분확인을 위한 박테리오파지 기반 컬러 센서 개발 및 최적화</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 유전자 조작을 통해 박테리오파지 표면에 각각의 농산물 특정 지표 성분에 상응하는 펩타이드 발현 ○ 자가조립 된 박테리오파지 기반 구조색 필름 개발 및 이를 이용한 컬러 센서 시스템 확립 ○ 검출센서 시스템의 최적 조건 확립 ○ 스마트폰을 이용한 실시간 데이터 처리 기술 개발: iPhone, Galaxy 등 휴대 가능한 스마트폰을 바이러스 기반 컬러센서에 도입하여 실시간으로 데이터를 분석처리 할 수 있는 기술 개발 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>상품 수요자들에게 휴대성이 용이하며 간단하고 신속한 원산지 분석 결과를 제공하기 위해 컬러 필름 형태의 분석 장비를 개발하여 농산물 및 식품산업 종사자와 소비자들에게 신속 정확하게 원산지 분석 결과를 제공. 농산물 및 식품 안정성은 물론 생산자와 판매자에 대한 신뢰도를 높여 소비자들로 하여금 안전한 소비를 유도하여 신뢰 가능한 농산물의 유통시장을 활성화시킴으로써 국내 농산물 산업 안정화 할 수 있음. 또한 스마트 폰을 이용한 분석 기술은 IT산업에도 영향을 미쳐 경제·산업적 측면에서 다양한 효과를 누릴 수 있을 것으로 기대됨.</p>					
중심어 (5개 이내)	원산지 판별	이동형 장치	화학 지표 마커	컬러센서	박테리오파지	

< SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<p>We propose a structural color-based sensor that utilizes genetically engineered M-13 bacteriophage to discriminate agricultures from different geographical origin. This color sensor should be rapidly applied for field test. The world first discrimination sensor for agricultural geographical origin will be possible through target specific peptide on M-13 bacteriophage. This project will be resulted in noble color sensor with superior simplicity for agriculture just like pregnancy tester and litmus paper.</p>					
Results	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Analysis of specific marker compound in agricultural samples and development of target specific receptor for geographical origin distinction <ul style="list-style-type: none"> ○ Development of marker compound specific receptor ○ Research of various molecular imprinted polymers for rapid detection of marker compounds ○ Establishment of selective distinction system through μ-Fluidic channels <input type="checkbox"/> Development of bacteriophage-based color sensor for detection of agricultural marker compounds and optimization <ul style="list-style-type: none"> ○ Revealing particular marker compounds specific peptide on the surface of bacteriophage through genetic engineering ○ Establishment of color sensor system using self-assembled bacteriophage-based structural color sensor ○ Establishment of optimized sensor system ○ Development of real-time data processing technique using smartphone such as iPhone and Galaxy 					
Expected Contribution	<p>Developing portable color film -based sensor system to provide simple and rapid results to consumers and agricultural industry practitioner. This technique will provide highly reliable data, therefore, will increase reliability of agricultural product as well as sellers and manufacturer. Vitalizations of reliable circulation market of agriculture also will promote progress of local agricultural industry. Finally, It is anticipated that the smartphone-based analytical system will contribute IT industry, and result in various economical and industrial advance.</p>					
Keywords	Discriminant of geographical origin	Potable device	Chemical indicating marker	Colorimetric sensor	Bacteriophage	

< Contents >

1. Introduction	1
2. Current state of technical development trends	5
3. Results and Discussion	9
4. Attainment and Contribution	57
5. Application plan	60
6. International science and technology information	62
7. Security level of results	64
8. Registered facilities and equipment at NSTIS	64
9. Safety action during project	64
10. Representative records of research	67
11. Other detail	68
12. References	68

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	5
3. 연구수행 내용 및 결과	9
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	57
5. 연구결과의 활용계획 등	60
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	62
7. 연구개발성과의 보안등급	64
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	64
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	64
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	67
11. 기타사항	68
12. 참고문헌	68

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1. 연구개발 목적

○ 국민 다소비 농식품이며 한·중 FTA 개발 대비를 위해 중요한 품목인 고추, 마늘, 양파, 참깨, 도라지의 원산지 판별을 위한 특이 지표 물질 발굴

○ 농산물의 원산지를 현장에서 신속히 바로 판별할 수 있는 박테리오파지 기반 신개념 컬러 센서 시스템 개발을 목표로 함. 본 연구진은 세계최초로 특정 물질과 특이적으로 반응하는 펩타이드를 발현하는 박테리오파지 나노구조체를 제작하여 농산물 특정 지표물질과의 반응에 따른 색 변화에 대해 연구하고, 이를 활용하여 휴대 가능하며 신속하게 수 ppm 단위의 고감도 분석이 가능한 나노-바이오 융합형 컬러 센서로 개발을 하여, 현재 널리 사용되고 있는 임신테스터기, 리트머스종이와 같이 실제 생활에 응용 될 수 있는 새로운 개념의 컬러 센서 시스템을 개발 하고자 함.

1-2. 연구개발의 필요성

○ 농산물 원산지 판별 연구의 필요성

세계 각국의 FTA체결로 농산물 수입개방이 활발해져 값싼 농산물이 홍수처럼 몰려와 국내 농업 여건은 갈수록 악화되어가고 있는 실정이다. 수입 농산물과 국산 농산물의 큰 가격 차이로 인하여, 더 많은 상업적 이윤을 남기기 위해 원산지를 허위로 표기하거나 표기하지 않는 경우가 최근 크게 증가하고 있다. 이와 같은 허위 원산지 표기는 유통 질서에 악영향을 주어 전체적으로 먹거리에 대한 소비자들의 불신이 증가하는 결과를 초래하였다. 특히, 원산지 허위 표시 위반 사례가 많은 고춧가루, 깨, 마늘, 양파의 원산지 판별이 시급한 실정이다. 최근에는 원산지 표시제도가 강화되어 농산물을 검사자의 육안으로 식별하고 원산지 표시 내용이 의심되는 경우 거래내역을 토대로 추적조사 하거나 시료를 채취하여 유전자 분석 등의 과학적인 검정을 실시하여 위반여부를 확인하고 있다. 그러나 이와 같은 분석 결과는 100% 확신할 수 없으며, 현장 분석이 어렵고 분석 시간이 오래 걸리는 등의 단점이 있다. 따라서 상품 수요자들에게 휴대성이 용이하며, 간단하고 신속한 원산지 분석 결과를 제공하기 위해 컬러 필름 형태의 분석 장비를 제공함으로써 농산물 및 식품산업 종사자와 소비자들에게 신속 정확하게 원산지분석 결과를 제공하여 농산물 및 식품 안정성은 물론 소비자에게 생산자와 판매자의 신뢰도를 높이고 안전한 소비를 유도할 수 있는 실시간 현장검출 센서(Sensor)가 절실히 필요한 실정이다.

○ 컬러센서 연구의 필요성

현재 급변하는 산업 기술의 발전은 인류의 생활수준을 드높이는데 큰 기여를 하고 있지만, 그와 더불어 발생하는 다양한 환경오염 물질은 현재와 미래의 우리 생활에 악영향을 미치고 있다. 이에 국내를 포함한 많은 국가들이 환경규제를 강화 하고 있으며 이와 함께 신환경 오염물질(나노물질 포함)에 대한 새로운 모니터링 기술이 요구되고 있다. 현재, 현장에서

대상 환경오염 물질을 검지하여 실시간(in-situ)으로 정보를 제공하는 것에서부터, 시료를 채집하여 외부 전문 분석 장비를 이용(ex-situ)하는 방법에 이르기까지 다양한 환경 모니터링 (environmental monitoring) 기술이 개발·응용되고 있다. 하지만, 기존의 환경 센서 및 모니터링 기술은 장치 위주의 기술로 휴대가 용이하지 않고 현장 분석에 불편함이 있어 즉각적인 정보 산출이 어렵다는 한계점이 있다. 따라서 휴대가능하고 실시간으로 부대장비 없이 대상물질을 감지할 수 있는 다양한 기술 개발이 요구 되고 있으며, 그 중 컬러센서 (colorimetric sensor)가 가장 최선의 대안기술로 떠오르고 있다.

○ 기존 연구와의 차별성

낮은 농도의 특정 대상 물질을 선택적으로 감지할 수 있는 고감도·고선택성 컬러센서의 개발을 최종 목표로 하고 있으며, 나아가 스마트폰(smartphone)의 application 기능을 활용하여 장소에 구애받지 않고 실시간으로 대상을 검출하여 즉각적으로 정보를 전송할 수 있는 시스템을 구축하고자 한다. 특히, phage display 기술로 잘 알려진 바이러스(M-13 박테리오파지)를 기본 물질(basic building block)로 사용함으로써, 특수한 대상 물질(농산물 특이표, 병원균, 단백질, 폭발물, 중금속 등)에 특정 반응을 일으키는 수용체를 개발하여 기존 시스템에서 구현하지 못한 높은 선택성을 가지는 컬러센서를 개발 하고자 한다.

1-3. 연구개발 범위

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
PID 제어를 통한 온도 조절 (분석정확도 향상)	<ul style="list-style-type: none"> • 온도조절 컨트롤러를 사용한 정밀 온도 제어시스템 구현 • 온도조절기, 히터, 냉각팬, 방열판, 핫플레이트, 온도 센서 등으로 구성 	<ul style="list-style-type: none"> • 추출된 지표물질의 온도특성에 따른 분석 정확도를 높이기 위하여 온도프로파일제어 및 정밀한 온도 제어가 되도록 개발 • 다양한 지표물질에 활용 가능토록 제어 온도범위 및 정확도를 확보하도록 개발 • 동 시스템 구현을 위하여는 지표물질에 가해지는 온도의 정확한 제어가 필수적이고 또한 주변 외기환경으로 부터 영향을 차단하는 구조로 연구개발됨.

<p>압력조절 컨트롤러를 통한 압력조절(전처리 정확도 향상)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 압력조절 컨트롤러를 사용한 정밀 압력 제어시스템 구현 • 에어 콤프레샤, 레귤레이터, 스피드컨트롤러 등으로 구성 	<ul style="list-style-type: none"> • 에어 콤프레샤를 통하여 주변 공기를 압축 시켜 저장한 후 레귤레이터를 통해 압축된 공기를 요구되는 압력으로 전처리 장치로 공급 • 전처리 전과정(시간)에서 요구되는 일정압력 유지 및 미세 압력 조절 기능 확보
<p>대상물질에 선택적으로 반응하는 펩타이드 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Phage display 방법을 통해 대상물질에 선택적으로 반응하는 펩타이드 개발 및 박테리오 파지 표면에 발현 	<ul style="list-style-type: none"> • 다양한 단백질이 존재하는 랜덤라이브리리를 대상물질 위에 흡부러 반응을 하지 않는 펩타이드는 제외시키고 대상물질과 잘 부착되는 펩타이드만을 찾아내는 Evolutionary screening 방법을 이용해 대상물질과 선택적으로 반응하는 펩타이드 개발 • 변형된 Inverse PCR 기법을 이용해 개발한 수용체를 박테리오파지 표면에 발현
<p>농산물 원산지 판별을 위한 기능성 나노구조체 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> • self-assembly를 이용한 박테리오파지 기반의 기능성 나노구조체 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 원산지 판별에 최적화된 나노구조체 개발 • 고순도의 박테리오파지의 농도와 pulling 속도 조절을 통한 고정렬도를 가지는 박테리오파지 기반의 컬러센서 개발
<p>컬러센서 분석프로그램 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 웹캠 기반의 광학검출 시스템 구축을 통한 컬러센서 색변화 검출 • 통계처리 알고리즘을 활용한 분석물질 효율적 분류 	<ul style="list-style-type: none"> • 챔버 내에 웹캠 및 컬러센서를 설치한 후 분석물질 노출에 따른 컬러센서의 색변화를 웹캠을 이용하여 측정 • Matlab 기반의 분석 프로그램을 개발하여 컬러센서의 색변화를 RGB 데이터로 변환 • PCA 및 LDA 기반의 통계처리 알고리즘을 이용하여 분석물질 효율적 분류
<p>농산물 원산지 판별을 위한 기능성 나노구조체 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> • self-assembly를 이용한 박테리오파지 기반의 기능성 나노구조체 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 원산지 판별에 최적화된 나노구조체 개발 • 고순도의 박테리오파지의 농도와 pulling 속도 조절을 통한 고정렬도를 가지는 박테리오파지 기반의 컬러

<p>원산지 판별을 위한 농산물 시료 수집 및 특정 지표물질 선정·분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 각종 분석장비를 이용한 농산물 화학 성분 프로파일 확보 • 화학 성분 프로파일의 다변량분석을 통한 화학 지표 물질 선정 • 품목별 선정된 화학 지표물질의 원산지별 분포 확인 및 함량 비교, 평가 	<p>러센서 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> • 고춧가루 1g을 취해 25ml 시험관에 넣고 acetonitrile 25ml를 가한 뒤 shaker로 270rpm, 30분간 교반하여 추출하였으며, 100mL volumetric flask에 깔대기를 넣고 Whatman filter paper(Whatman No.2, Whatman International Ltd, Maidstone, UK)를 이용하여 여과한 뒤 acetonitrile로 정용하였다. 정용한 뒤 10ml을 취하여 0.2µm membrane filter로 여과한 뒤 1ml을 취하여 HPLC분석 하였다. • column은 C18(shiseido, 2.1 x 150 mm, 2.7µm)를 사용하였고, 2.1mm이동상은 acetonitrile : water gradient를 사용하였으며 flow rate는 300µL/min이었다. Orbitrap Ms detector를 사용하였으며 injection volume은 2µL였다.
<p>시료별 분자각인 고분자 합성 조건 확립 및 추출 효율 최적화</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 다양한 용매를 가지고 농산물의 추출을 시도 • 목표 타깃 물질을 가지고 분자각인 고분자 합성 및 최적의 합성 조건 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> • 고춧가루로 다양한 용매를 가지고 고춧가루 추출을 시도. • 추출 후 HPLC chromatogram으로 분석 및 확인 • capsaicin을 가지고 분자 각인 고분자 합성의 최적 조건 탐색 및 추출 효율을 최적으로 높일 수 있는 방법을 탐색

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
------	------

○ 컬러센서 연구 동향

컬러 센서는 대상 물질을 검지했을 때, 맨눈(naked eye)으로 현장에서 실시간으로 정보를 제공할 수 있다는 뚜렷한 장점이 있어, 현재 금속 나노 입자 이용법, 유기 염료 이용법, Vesicle 이용법 등 다양한 방법을 통한 연구가 개발 및 진행 중에 있다(그림 1) [1-4].

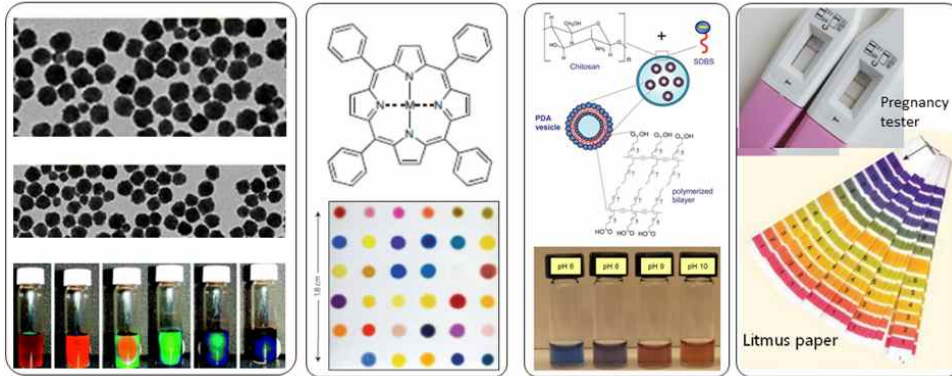


그림 1. 다양한 타깃물질 검출을 위한 컬러 센서

하지만, 금속 나노 입자 사용의 경우 유기물에 의한 분해가 적게 발생하고 색상이 뚜렷하게 발생하는 장점이 있어 많은 과학자들이 연구를 하고 있지만, 액상이라 휴대가 어렵고, 색깔 변화를 분석하기 위해선 UV 흡광도와 같은 외부 장비가 필요한 단점이 있다[1]. 유기 염료 이용법은 분자간 상호작용력을 색깔 변화의 기본 원동력으로 하는 시스템으로, 미국 UIUC의 K. S. Suslick 교수가 해당 분야를 집대성 하고 있다[2-3]. 하지만, 유기 염료 기반 컬러 센서의 경우 수용체로 사용되는 염료의 디자인(design) 및 합성이 어렵고 검출 여부를 분석하는 장비가 일반화 되어 있지 않은 단점이 있다(표1). 또한 전자코(electronic nose) 시스템을 기반으로 하고 있어 색깔 변화의 상대적인 차이로부터 대상 물질을 구분 할 수 있긴 하나 직접적인 분석은 어려운 면이 있다. 리트머스 종지와 임신 체외 진단테스터의 경우 모든 컬러 센서 연구자들이 지향하는 시스템으로 비록 이미 상용화가 되어 있긴 하지만, 대상 물질이 용액의 pH와 융모성선 자극 호르몬(여성 호르몬 중 하나)에 한정된다는 단점이 있어 다양한 대상 물질에 반응할 수 있는 컬러 센서의 개발이 요구되는 것이 현실이다.

방법	장점	단점	특징
금속 나노 입자이용법	색상이 뚜렷하고 유기물에 의한 분해가 작음	액상으로 존재해 휴대가 어렵고 분석 장비가 필요	입자의 모양에 따라 다양한 색 구현
유기염료 이용법	다양한 Dye를 이용하여 복합적인 분석을 함으로써 선택성과 감도가 높은 센서 시스템 구축	대상물질에 적합하게 반응하는 Dye의 디자인 및 합성이 어려우며, 분석 장비가 일반화 되어 있지 않음	현재 K.S. Suslick 교수가 분야를 주도함
Vesicle 이용법	생물체의 세포막과 동일한 이중 층 구조, 원료물질에 따라 다양한 크기의 구형 vesicle 제조 가능	액상 시스템, 낮은 감도, 분석이 용이하지 않음	Vesicle에 기능성 분자 도입하여 이용
리트머스종이	휴대가 용이하고 실시간 분석이 가능함	용액의 pH만 측정 가능	이미 상용화
임신 제외 진단테스터	휴대가 용이하고 실시간 진단이 가능함	임신 테스트에만 적용가능	이미 상용화

표 1. 현재 연구 개발되고 있는 대표적인 컬러 센서 시스템의 장·단점

○ 박테리오파지를 이용한 센서 시스템

다양한 생화학 물질을 선택적이며 고감도로 검출할 수 있는 소형 감지 플랫폼의 개발은 기존의 틀을 깰 수 있는 기회를 제공한다. 나노 규모의 물질들은 높은 surface-to-volume 비율 덕분에 매우 민감한 센서로 사용할 수 있기 때문에 많은 연구자들이 나노 물질, 나노 구조체 제작에 관한 연구를 수행하고 있다. 다양한 바이오 센싱 시스템에 적용하기 위해서는 독성이 없고 싸고 안정성이 높은 구조체가 필요하다. 최근, 이러한 요건들을 충족시키는 물질로서 바이러스의 시스템이 각광을 받고 있다. 특히 그 개체에 대하여 많은 연구가 진행된 바 있는 박테리오파지는 그 구조에 대해 명확히 알려져 있다. 박테리오파지는 그 표면 껍질에 2700여개의 수용체가 달려 있는 약 800nm 사이즈의 기다란 막대구조이다(그림 2). 박테리오파지의 DNA를 유전공학적으로 변형시켜주기만 하면 수용체 표면 단백질 구조를 쉽게 바꿀 수 있어 개체의 특성을 자유롭게 치환할 수 있는 장점이 있어서 훌륭한 생활성 나노

소재 재료가 될 수 있다. 이러한 큰 장점으로 인하여 많은 연구자들이 계속적으로 박테리오파지를 이용한 센서 시스템 개발에 박차를 가하고 있다.

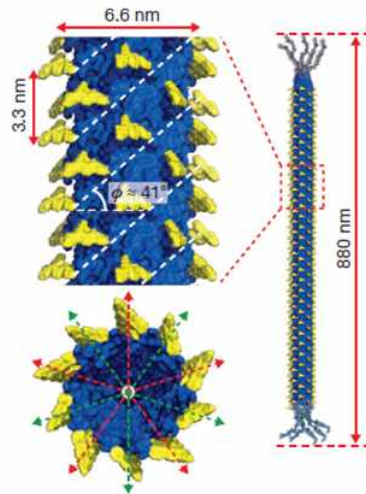


그림 2. 박테리오파지의 구조

미국 캘리포니아대학의 Jennifer N. Cha 교수 연구실에서 지난 2012년 ACS nano 저널에 박테리오파지와 금 나노 입자를 이용한 컬러 센서에 관한 연구를 발표하여 굉장히 큰 이슈가 되었다[5]. 박테리오파지와 같은 바이러스는 복제가 가능하며 열적 화학적 안정성을 지니고 피막의 개질이 쉬워, 이를 이용한다면 자연스럽게 빠른 결과를 손쉽게 얻을 수 있는 장점이 있어서 이러한 바이러스를 이용한 컬러 센서를 개발하였다. 이를 이용하여 Phage Display를 통해 특정 타겟에 결합 가능한 펩타이드 서열을 찾아내었고 DNA-Phage와 DNA-Au NPs 간 결합을 통해 색변화를 이끌어 낼 수 있으며, 용액 내 타겟 물질의 존재를 확인할 수 있다. 또한 이를 통해 DNA microarray를 만들 수 있다. 이를 이용한 센서는 매우 감도가 높으며 사용하기 쉽고 펩타이드 서열 인식이나 확인에 값싸게 적용할 수 있다는 장점을 지니고 있다.

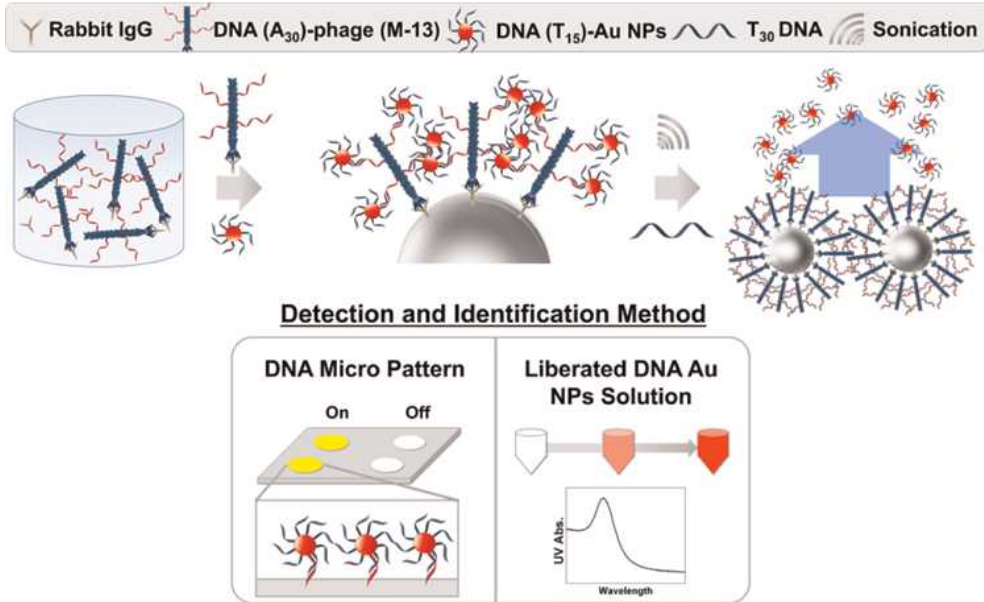


그림 3. DNA-phage의 센서 디자인 모식도

이 외에도 최근 Quartz crystal microbalance(QCM), Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), Fluorescent bacteriophage assay(FBA) flow cytometry, Amperometry, Fluoroimmunoassay, Electrolyte insulator semiconductor(EIS), Surface plasmon resonance(SPR) 등 다양한 시스템에서 박테리오파지를 Probe로 이용하여 센서화 하려는 노력이 시도되었으나 아직까지 크게 만족할만한 수준의 분석 감도를 얻을 수는 없었다.

3. 연구수행 내용 및 결과

		코드번호	D-05
구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2014	원산지 선별 고성능 판별기 시제품 개발 및 성능 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 국립농산물품질관리원 9개 지원과 사무소를 통한 고추, 마늘, 깨, 양파, 도라지의 농산물에 대해 원산지가 확인된 시료 확보 - UHPLC-QTOF-MS, NMR, ICP-MS, XRF를 이용한 농산물 대사산물 및 무기원소 분석 및 화학 성분 프로파일 확보 - 화학 성분 프로파일의 다변량분석을 통한 화학 지표 마커 확립 - 시료별 최적의 추출 조건 확립 (메탄올 기반 추출 용매 사용 및 squeezer 사용하여 즙액 추출) - 시료별 추출액을 기관위에 떨어뜨리고 용매가 증발하면서 발생하는 건조 패턴을 라만 및 적외선 현미경으로 이미징 - 시료별 분자각인 고분자 합성 조건 확립 및 추출 효율 최적화 - 합성된 분자각인 고분자를 적용시킨 분석 카트리지 시제품 제작 - 표면증강 라만산란 분석을 위한 나노 덴드라이트 구조체의 전기화학적 합성 방법 최적화 - 본 연구진이 보유한 다양한 기능성 파지를 기반으로한 특정 지표물질과 가장 최적화된 컬러 나노구조체 확보 - 원산지 판별용 자가조립 된 박테리오파지 기반 구조색 필름 개발 및 이를 이용한 컬러 센서 시제품 제작 - PCA, FA 등을 이용하여 색변화 분석 주요인자 설정 및 색변화 변위 설정 - 실시간 색변화 분석 프로그램 개발 및 시험 운용

2차년도	2015	<p>현장 적용 가능 박테리오파지 기반 컬러 센서 개발 및 시스템 구축</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 시제품과 비교하여 원산지별 화학 지표 마커 분포 확인 및 함량 비교, 평가 - 원산지별 화학 지표 마커를 이용한 각 농산물의 Database 구축 - 신속한 원산지 판별 지표 물질 검출을 위한 다양한 분자각인 고분자 전처리시스템 최적화 - 시제품을 기반으로 휴대용 실시간 데이터 처리 기술 개발: 색정보 분석이 가능한 간단한 카메라 및 소프트웨어연동을 통하여 간편하고 휴대 가능한 실시간 데이터분석처리 기술개발 - 시중 유통 농산물을 대상으로 실제 단속현장에서 이동형 농산물 원산지 판별기 현장 적용 가능성 실증 시험 실시 - 시료별 원산지 판별 인자를 각인시킨 분자각인 고분자 합성 조건 확립 및 필터 카트리지를 제작 - 다양하고 방대한 데이터의 효율적인 처리 및 원산지 판별정확도 향상을 위한 새로운 알고리즘 적용 - 나노 구조체를 이용한 다양한 원산지 판별인자의 선택적인 검출 - 최적화된 분석 센서시스템의 제품화 및 산업화 - 측정 대상이 되는 농산물의 색변화 데이터베이스 구축 - 새로운 분석기법(ICA)를 적용하여 최적화된 색변화 범위 설정 및 실시간 분석 프로그램 최적화
------	------	---	--

○ 농산물 원산지 판별을 위한 연구 시료 확보 (제3세부)

가. 원산지 판별을 위한 농산물 시료 수집 결과

고춧가루, 마늘, 양파, 참깨, 도라지, 들깨 각 품목별로 40점 씩 이상 수집하였다.

구분	국산	수입산	합계
고추	50	50	100
마늘	36	34	70
양파	25	24	49
참깨	30	30	60
도라지	22	21	43
들깨	30	30	60
합계	193	189	382

나. 농산물 원산지 판별을 위한 지표물질 발굴 및 원산지 판별기 현장 적용 가능성 검증

수집된 시료 각 품목별로 생산된 지역이나 국가에 따라 함유된 성분에 차이가 있는 특정 지표 물질을 탐색하였다.

(1) 고추

□ 지표물질 발굴 배경

○ LC MS MS 분석 조건

- 시료 1g을 칭량하여 50ml tube에 담고 100% acetonitrile로 추출 후 원심분리기로 3000rpm 5분간 처리하고 상등액을 취하여 100% acetonitrile로 희석하고 0.2um PTFE filter로 filtering 후 분석하였다.
- HPLC는 Shisheido Nasca를 이용하였으며, Orbitrap MS를 이용하여 non-target 분석하였으며 positive 모드에서 분석하였다.
- Mass 스캔 범위는 100 m/z ~ 1500 m/z에서 Full mass로 분석하여 Mass spectrum을 얻었다.

- 기기분석 조건

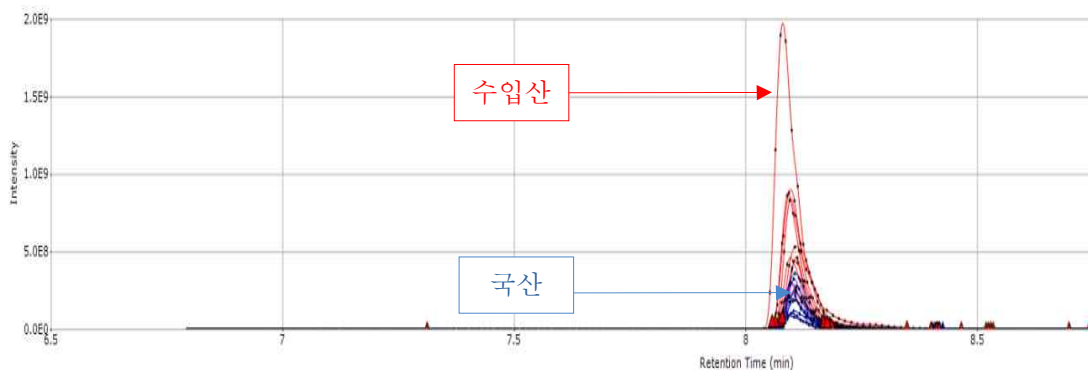
구 분	세부 내용	비고
LC 조건	- Retention time: 15 min - Flow rate: 300uL/min - Injection volume: 2uL - 이동상: A 0.1% formic water 100%, B 0.1% formic acetonitrile 100% - 기기: Shesheido HPLC, Japan	
MS 조건	- Mass range: 100 ~ 1500 m/z - 이온화 소스: ESI - Mode: positive - 기기 Thermo scientific orbitrap MS	

○ 지표물질 발굴 절차

- 국내산과 수입산 Mass 간에 차이나는 Mass 탐색 비교에는 Sieve 프로그램을 사용하였으며 mass intensity 기준으로 상위 5,000개 Mass를 탐색하였다.
- 국내산과 수입산 간에 차이나는 Mass 값을 기준으로 후보물질을 탐색하였고 MS MS 분석하여 성분을 정성하였으며, 표준물질을 이용하여 정성, 정량하였다.
- 분석결과 고춧가루에서는 capsaicin, dihydrocapsaicin, valine, glutamic acid 함량에서 차이가 있었다.
- 표준물질로 MS MS spectrum을 비교하여 정성하였고, 국내산과 수입산의 양을 비교하였다.
- 박테리오 파지 제작을 위해서는 표준물질이 필요하며, 이를 이용한 정성, 정량이 필요하다.

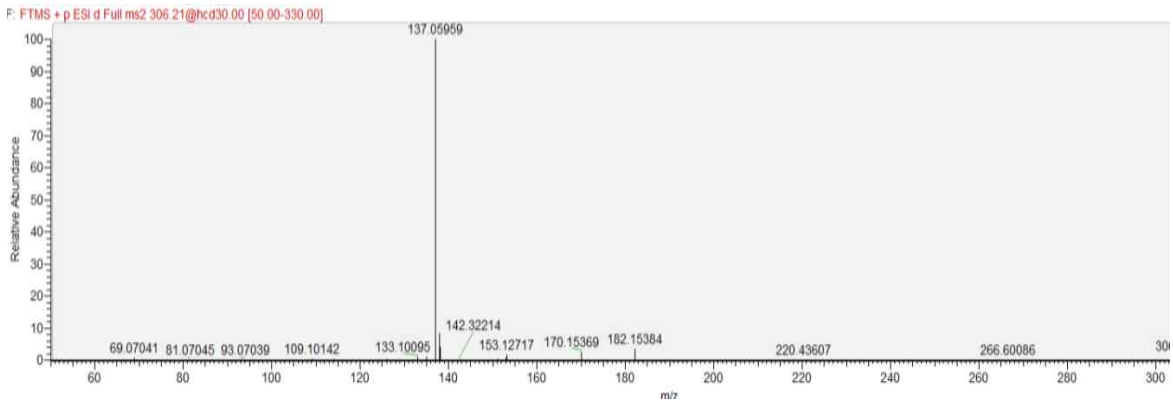
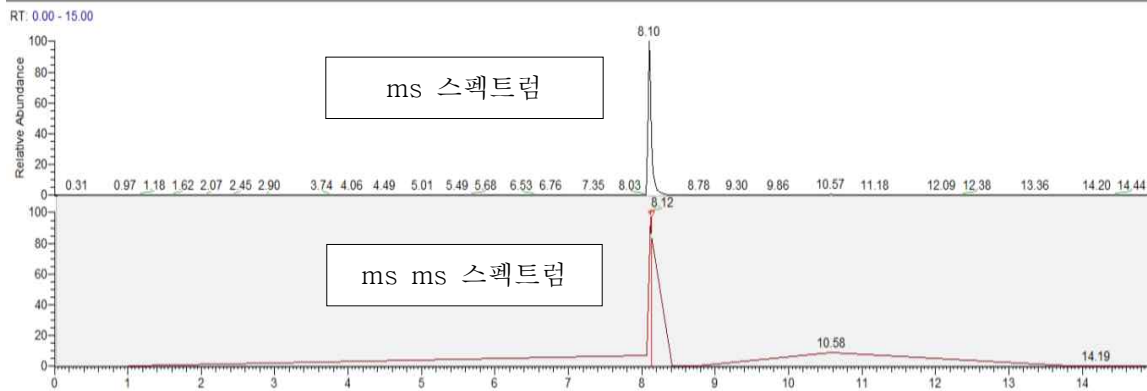
□ 고추 지표물질 발굴

(가) HPLC 크로마토그램을 지표물질 탐색 프로그램 Sieve로 분석한 결과 RT 8.10분, MZ 306.206에서 국산과 수입산 간의 intensity 차이가 나는 성분이 있는 것으로 나타났다.



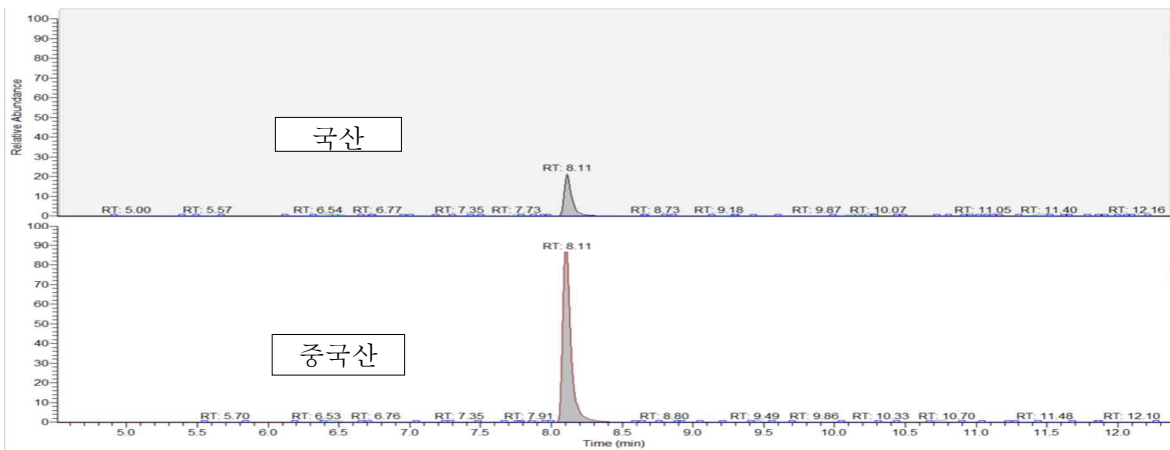
한국산, 중국산 고춧가루의 capsaicin 크로마토그램(UHPLC-Orbitrap-MS 분석 결과)

(나) 위의 성분을 확인하기 위해 ms ms한 스펙트럼을 M/Z cloud 프로그램으로 분석한 결과 캡사이신으로 확인되었으며, 표준물질을 이용하여 상기성분이 캡사이신으로 확인되었다.



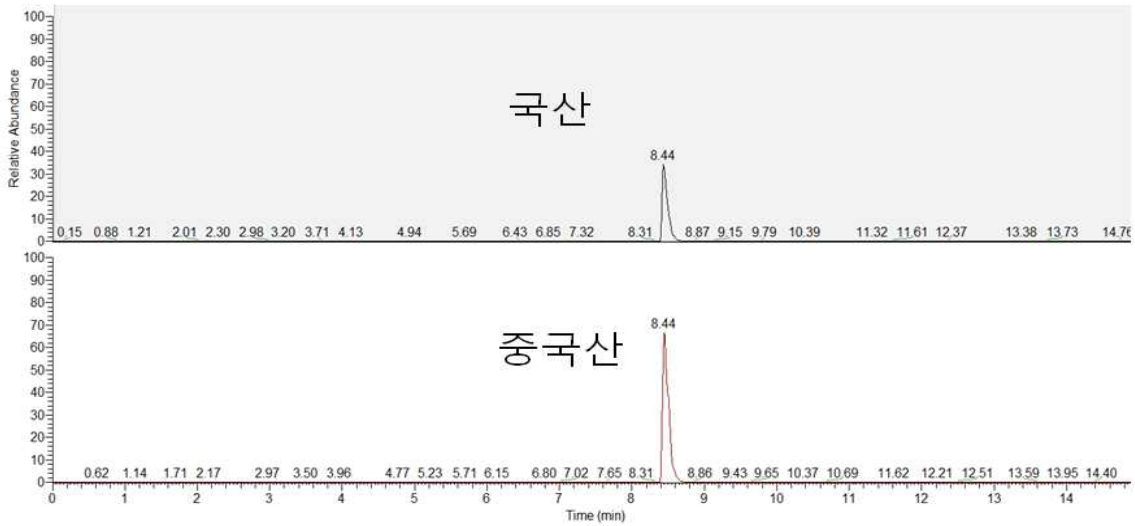
capsaicin mass spectrum(UHPLC-Orbitrap-MS 분석 결과)

(다) 고추의 경우 매운맛 성분인 capsicinoids 중에서 capsaicin의 함량이 국산에 비해 중국산의 경우 약 3~5배 정도 많아 지표 물질로 선정하였다. 또한 아미노산 중에서 valine의 함량 차이가 국산과 중국산에서 크게 나타나 지표 물질로 선정하였다. capsaicin 표준물질을 이용하여 함량분석한 결과 수입산이 국산에 비해 높았으며 국산 평균은 109ppm, 수입산 평균은 438ppm로 수입산이 국산에 비해 높았다.



한국산, 중국산 고춧가루의 capsaicin 크로마토그램(UHPLC-Orbitrap-MS 분석 결과)

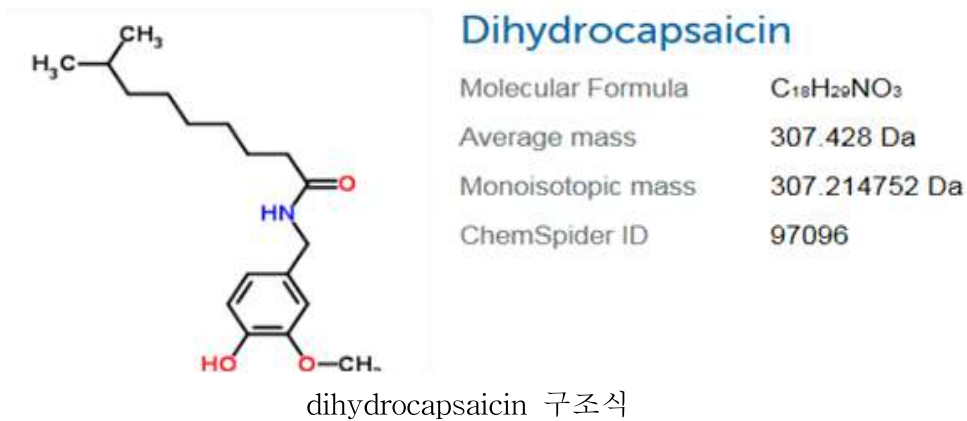
(라) 위의 ms 스펙트럼에서 볼 수 있는 바와 같이 Dihydrocapsaicin(308.222 m/z(M+H)⁺) 은 국산과 중국산에서 1.7배 차이가 있었다.



한국산, 중국산 고춧가루의 dihydrocapsaicin 크로마토그램(UHPLC-Orbitrap-MS 분석 결과)

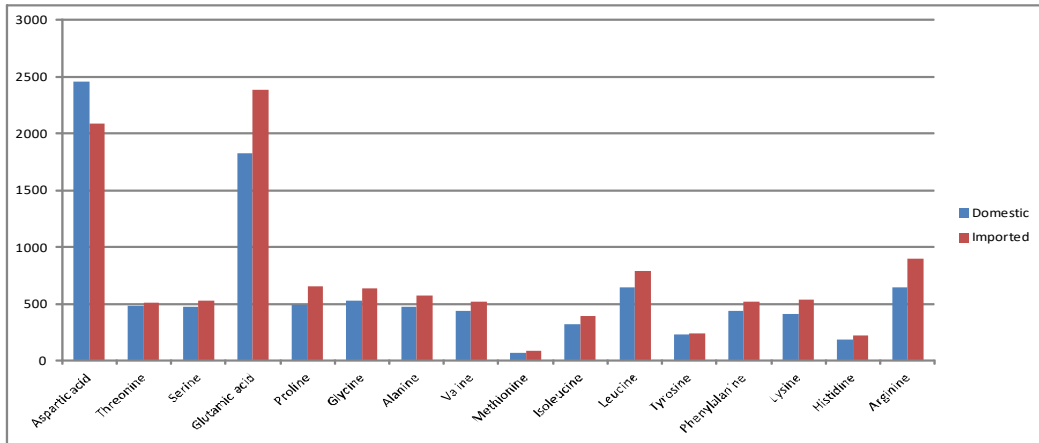


capsaicin mass spectrum(UHPLC-Orbitrap-MS 분석 결과)



(마) 이외에 다른 지표물질 탐색을 위해서 추가로 아미노산 16성분에 대한 분석을 실시하였다. 그 결과는 다음 그림과 같다. 국산과 수입산 고추에서 함량 차이가 나는

아미노산 성분들이 있었으며, 가장 크게 차이가 나타난 아미노산은 Glutamic acid였고, 그 다음은 Aspartic acid, 그 다음으로 차이가 나타난 아미노산은 Arginine이었다.



(2) 마늘

□ 지표물질 발굴 배경

○ LC MS MS 분석 조건

- 시료 1g을 칭량하여 50ml tube에 담고 0.1% formic acid 50% MeOH로 추출 후 원심분리기로 3000rpm 5분간 처리하고 상등액을 취하여 0.1% formic acid 50% MeOH로 희석하고 0.2um NYL filter로 filtering 후 분석하였다.
- HPLC는 Shisheido Nasca를 이용하였으며, Orbitrap MS를 이용하여 non-target 분석하였으며 positive 모드에서 분석하였다.
- Mass 스캔 범위는 100 m/z ~ 1500 m/z에서 Full mass로 분석하여 Mass spectrum을 얻었다.
- 기기분석 조건

구 분	세부 내용	비 고
LC 조건	<ul style="list-style-type: none"> - Retention time: 15 min - Flow rate: 300uL/min - Injection volume: 2uL - 이동상: A 0.1% formic water 100%, B 0.1% formic MeOH 50% - 기기: Shesheido HPLC, Japan 	
MS 조건	<ul style="list-style-type: none"> - Mass range: 100 ~ 1500 m/z - 이온화 소스: ESI - Mode: positive - 기기 Thermo scientific orbitrap MS 	

○ 지표물질 발굴 절차

- 국내산과 수입산 Mass 간에 차이나는 Mass 탐색 비교에는 Sieve 프로그램을 사용하

였으며 mass intensity 기준으로 상위 5,000개 Mass를 탐색하였다.

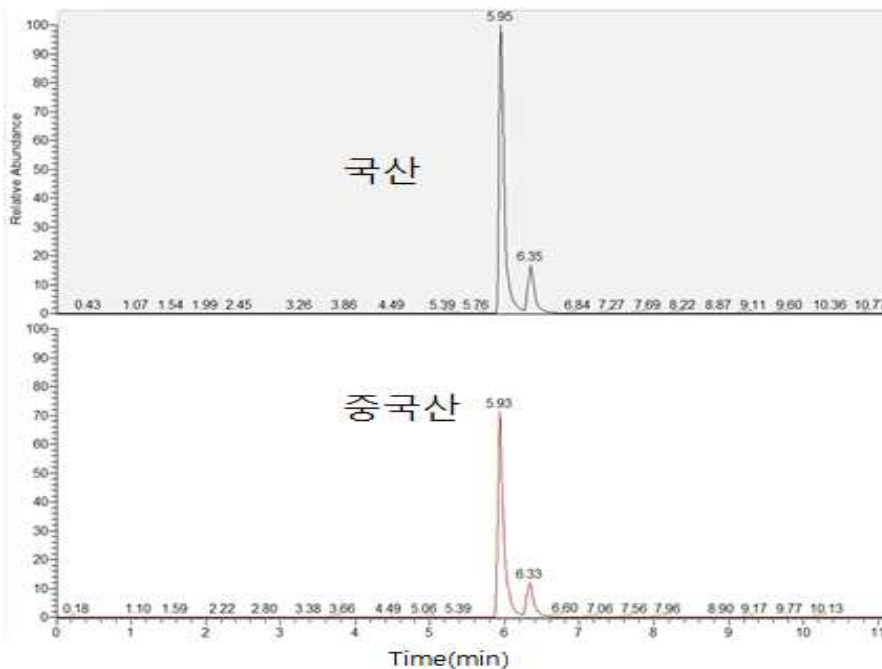
- 국내산과 수입산 간에 차이 나는 Mass 값을 기준으로 후보물질을 탐색하였고 MS MS 분석하여 성분을 정성하였으며, 표준물질을 이용하여 정성, 정량하였다.
- 분석결과 마늘에서는 allicin, aspartic acid, valine, proline 함량에서 차이가 있었다.
- 표준물질로 MS MS spectrum을 비교하여 정성하였고, 국내산과 수입산의 양을 비교하였다.
- 박테리오 파지 제작을 위해서는 표준물질이 필요하며, 이를 이용한 정성, 정량이 필요하다.

□ 마늘의 지표물질 발굴

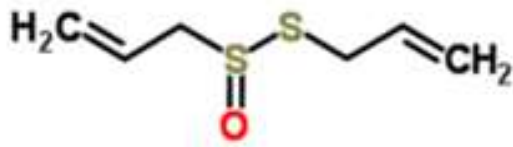
마늘은 아래 표에서 보듯이 유리 아미노산 중에서 aspartic acid와 proline이 국산과 국산 산지별 마늘 간에 차이가 나타나 지표 물질로 선정하였고, 마늘에 함유된 allicin인 황화합물로 thiosulfinate은 국산이 중국산 보다 높은 함량을 나타내 지표 물질로 선정하였다.

Table. 마늘에서 원산지별 성분 비교

components	aspartic acid	allicin (thiosulfinate)	valine	proline
Ratio Chinese / Korean	0.67	0.74	0.87	0.67



한국산, 중국산 마늘의 allicin 크로마토그램(UHPLC-Orbitrap-MS 분석 결과)



Allicin

Molecular Formula

$C_6H_{10}OS_2$

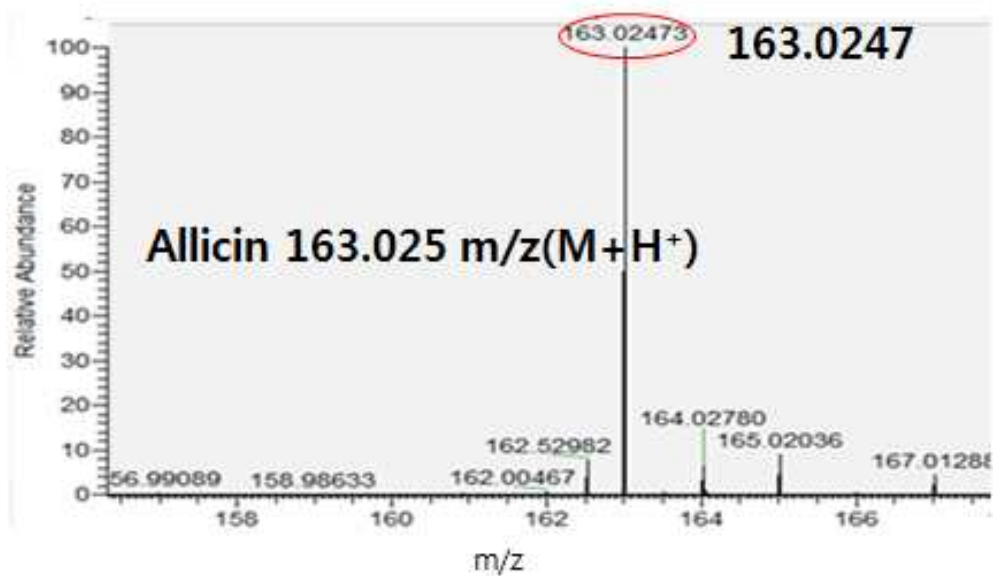
Average mass

162.273 Da

Monoisotopic mass

162.017303 Da

마늘의 allicin 구조식



allicin mass spectrum(UHPLC-Orbitrap-MS 분석 결과)

(3) 양과

□ 지표물질 발굴 배경

○ LC MS MS 분석 조건

- 시료 1g을 칭량하여 50ml tube에 담고 0.1% formic acid 50% MeOH로 추출 후 원심분리기로 3000rpm 5분간 처리하고 상등액을 취하여 0.1% formic acid 50% MeOH로 희석하고 0.2um NYL filter로 filtering 후 분석하였다.
- HPLC는 Shisheido Nasca를 이용하였으며, Orbitrap MS를 이용하여 non-target 분석하였으며 negative 모드에서 분석하였다.
- Mass 스캔 범위는 100 m/z ~ 1500 m/z에서 Full mass로 분석하여 Mass spectrum을 얻었다.
- 기기분석 조건

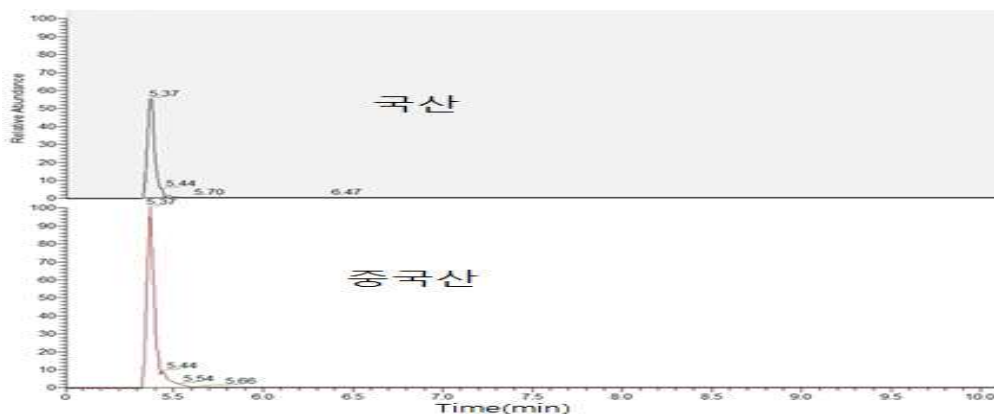
구 분	세부 내용	비 고
LC 조건	<ul style="list-style-type: none"> - Retention time: 15 min - Flow rate: 300uL/min - Injection volume: 2uL - 이동상: A 0.1% formic water 100%, B 0.1% formic MeOH 50% - 기기: Shesheido HPLC, Japan 	
MS 조건	<ul style="list-style-type: none"> - Mass range: 100 ~ 1500 m/z - 이온화 소스: ESI - Mode: negative - 기기 Thermo scientific orbitrap MS 	

○ 지표물질 발굴 절차

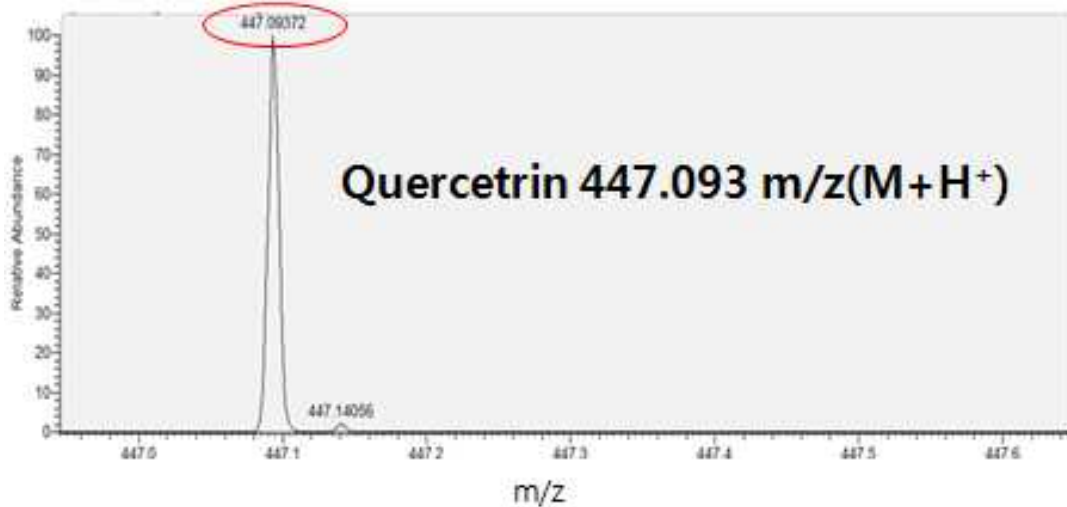
- 국내산과 수입산 Mass 간에 차이나는 Mass 탐색 비교에는 Sieve 프로그램을 사용하였으며 mass intensity 기준으로 상위 5,000개 Mass를 탐색하였다.
- 국내산과 수입산 간에 차이나는 Mass 값을 기준으로 후보물질을 탐색하였고 MS MS 분석하여 성분을 정성하였으며, 표준물질을 이용하여 정성, 정량하였다.
- 분석결과 양파에서는 quercetrin 함량에서 차이가 있었다.
- 표준물질로 MS MS spectrum을 비교하여 정성하였고, 국내산과 수입산의 양을 비교하였다.
- 박테리오 파지 제작을 위해서는 표준물질이 필요하며, 이를 이용한 정성, 정량이 필요하다.

□ 양파의 지표물질 발굴

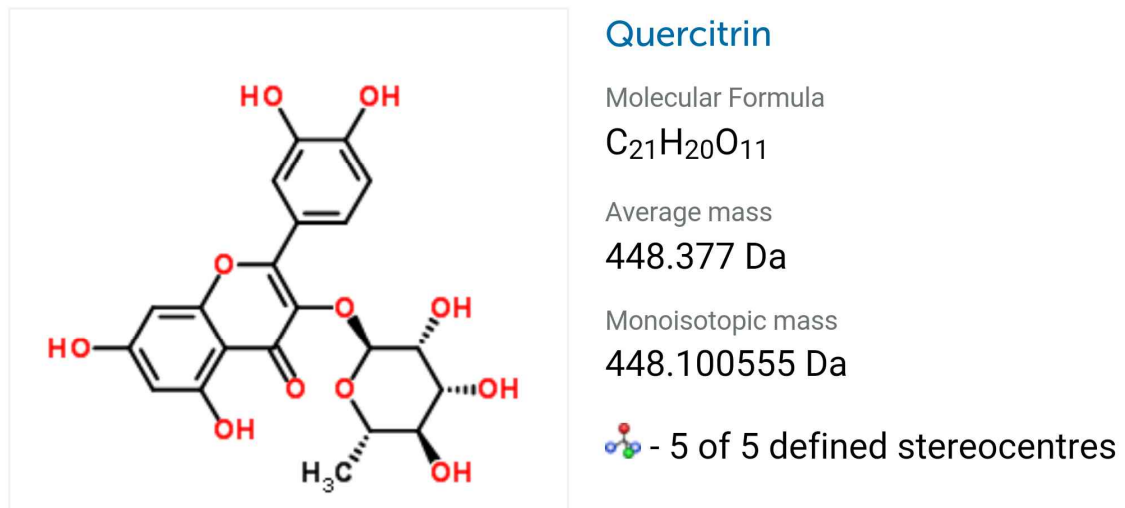
양파에는 quercetin, quercetrin, rutin 등의 기능성 물질이 함유되어 있고 alliin으로 알려진 황화합물인 thiosulfinate가 존재하므로 분석하였다. 그 중 quercetrin 은 국산과 중국산 간에 1.7배 차이가 있어 지표물질로 발굴하였다.



한국산, 중국산 양파의 quercetrin의 크로마토그램(UHPLC-Orbitrap-MS 분석 결과)



quercetin mass spectrum(UHPLC-Orbitrap-MS 분석 결과)



양파의 Quercetin 구조식

(4) 참깨

□ 지표물질 발굴 배경

○ LC MS MS 분석 조건

- 시료 1g을 칭량하여 50ml tube에 담고 80% EtOH로 추출 후 원심분리기로 3000rpm 5분 간 처리하고 상등액을 취하여 80% EtOH로 희석하고 0.2um NYL filter로 filtering 후 분석하였다.
- HPLC는 Shisheido Nasca를 이용하였으며, Orbitrap MS를 이용하여 non-target 분석 하였으며 positive 모드에서 분석하였다.
- Mass 스캔 범위는 100 m/z ~ 1500 m/z에서 Full mass로 분석하여 Mass spectrum을 얻었다.

- 기기분석 조건

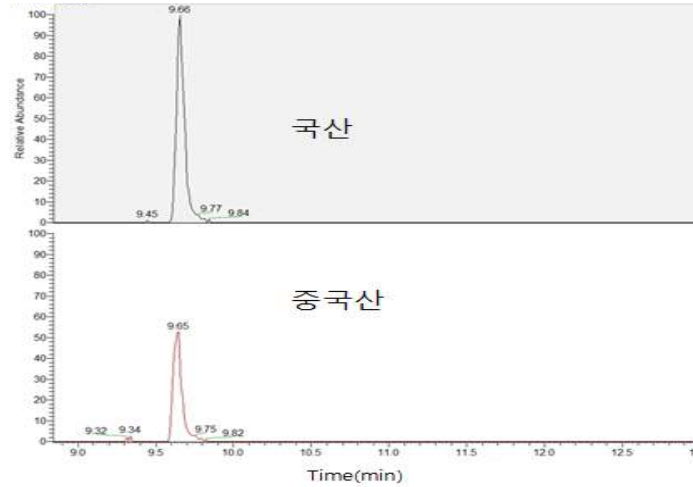
구 분	세부 내용	비 고
LC 조건	<ul style="list-style-type: none"> - Retention time: 15 min - Flow rate: 300uL/min - Injection volume: 2uL - 이동상: A water 100%, B 80% MeOH - 기기: Shesheido HPLC, Japan 	
MS 조건	<ul style="list-style-type: none"> - Mass range: 100 ~ 1500 m/z - 이온화 소스: ESI - Mode: positive - 기기 Thermo scientific orbitrap MS 	

○ 지표물질 발굴 절차

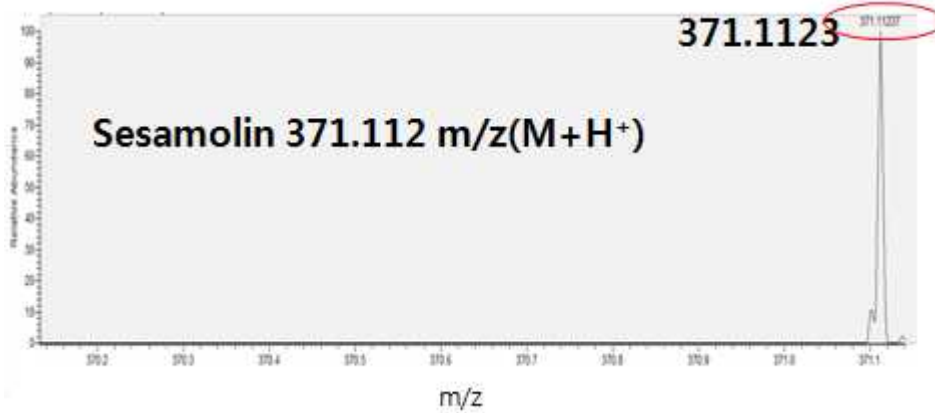
- 국내산과 수입산 Mass 간에 차이나는 Mass 탐색 비교에는 Sieve 프로그램을 사용하였으며 mass intensity 기준으로 상위 5,000개 Mass를 탐색하였다.
- 국내산과 수입산 간에 차이나는 Mass 값을 기준으로 후보물질을 탐색하였고 MS MS 분석하여 성분을 정성하였으며, 표준물질을 이용하여 정성, 정량하였다.
- 분석결과 참깨에서는 sesamol, glutamic acid 함량에서 차이가 있었다.
- 표준물질로 MS MS spectrum을 비교하여 정성하였고, 국내산과 수입산의 양을 비교하였다.
- 박테리오 파지 제작을 위해서는 표준물질이 필요하며, 이를 이용한 정성, 정량이 필요하다.

□ 참깨 지표물질 발굴

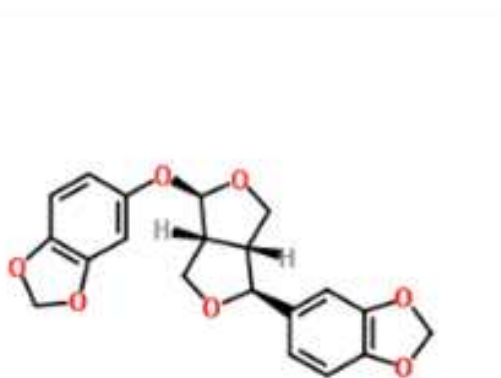
(가) 참깨의 경우 glutamic acid, leucine, arginine 등의 유리 아미노산과 sesamol 등의 기능성 물질이 재배 국가와 재배 산지에 따른 차이가 있기 때문에 지표 물질로 분석하였다. sesamol, glutamic acid, leucine, arginine 은 국산과 중국산 간에 차이가 나타났다. 그 중 sesamol은 국산과 중국산 간에 1.7배 차이가 있었다.



한국산, 중국산 참깨의 sesamol의 크로마토그램(UHPLC-Orbitrap-MS 분석 결과)



sesamol mass spectrum(UHPLC-Orbitrap-MS 분석 결과)

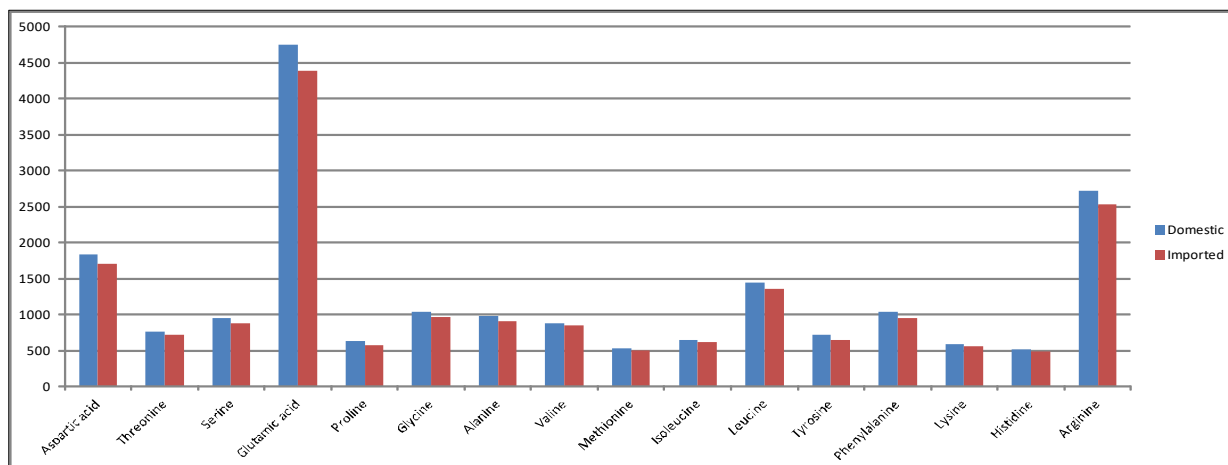


Sesamol

Molecular Formula	C ₂₀ H ₁₆ O ₇
Average mass	370.353 Da
Monoisotopic mass	370.105255 Da
ChemSpider ID	91932

참깨의 sesamol 구조식

(나) 실제 시중에 유통중인 시료를 수집하여 국산 10점, 수입산 10점에 대해 아미노산 16 성분을 HPLC로 분석한 결과 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.



Amino acid	Domestic	Imported
Aspartic acid	1841.856	1705.842
Threonine	764.342	721.566
Serine	956.516	875.124
Glutamic acid	4746.518	4393.6
Proline	624.998	573.232
Glycine	1040.506	969.244
Alanine	974.476	899.776
Valine	877.542	852.310
Methionine	533.810	495.044
Isoleucine	642.724	621.872
Leucine	1436.358	1360.046
Tyrosine	711.826	648.830
Phenylalanine	1040.518	957.384
Lysine	587.898	561.980
Histidine	518.652	491.512
Arginine	2714.488	2532.838

(5) 도라지

□ 지표물질 발굴 배경

○ LC MS MS 분석 조건

- 시료 1g을 칭량하여 50ml tube에 담고 70% EtOH를 넣고 45℃ 항온수조에서 2시간 Sonication 추출 후 수직 shaking 1시간하였고, 원심분리기로 3000rpm 5분간 처리하고 상등액을 취하여 100% water로 희석하고 0.2um PTFE filter로 filtering 후 분석하였다.
- HPLC는 Shisheido Nasca를 이용하였으며, Orbitrap MS를 이용하여 non-target 분석하였으며 positive 모드에서 분석하였다.
- Mass 스캔 범위는 100 m/z ~ 1500 m/z에서 Full mass로 분석하여 Mass spectrum을 얻었다.
- 기기분석 조건

구 분	세부 내용	비 고
LC 조건	<ul style="list-style-type: none"> - Retention time: 15 min - Flow rate: 300uL/min - Injection volume: 2uL - 이동상: A water 100%, B acetonitrile 100% - 기기: Shesheido HPLC, Japan 	
MS 조건	<ul style="list-style-type: none"> - Mass range: 100 ~ 1500 m/z - 이온화 소스: ESI - Mode: positive - 기기 Thermo scientific orbitrap MS 	

○ 지표물질 발굴 절차

- 국내산과 수입산 Mass 간에 차이나는 Mass 탐색 비교에는 Sieve 프로그램을 사용하였으며 mass intensity 기준으로 상위 5,000개 Mass를 탐색하였다.
- 국내산과 수입산 간에 차이나는 Mass 값을 기준으로 후보물질을 탐색하였고 MS MS 분석하여 성분을 정성하였으며, 표준물질을 이용하여 정성, 정량하였다.
- 분석결과 도라지에서는 platycodin D, depioplaticoside E 함량에서 차이가 있었다.
- 표준물질로 MS MS spectrum을 비교하여 정성하였고, 국내산과 수입산의 양을 비교하였다.
- 박테리오 파지 제작을 위해서는 표준물질이 필요하며, 이를 이용한 정성, 정량이 필요하다.

□ 도라지 지표물질 발굴

도라지에 함유된 사포닌의 종류인 platycodin D, depioplaticoside E 등을 분석한 결과 국산과 중국산 간에 차이가 있어 지표 물질로 선정하였다.

Table. 도라지 성분 함량(ug/ml)

components	Ratio (Chinese/Korean)
platycodin D	0.5
depioplaticoside E	6.0

(6) 들깨

□ 지표물질 발굴 배경

○ LC MS MS 분석 조건

- 시료 1g을 칭량하여 50ml tube에 담고 80% EtOH로 추출 후 원심분리기로 3000rpm 5분간 처리하고 상등액을 취하여 80% EtOH로 희석하고 0.2um NYL filter로 filtering 후 분석하였다.
- HPLC는 Shisheido Nasca를 이용하였으며, Orbitrap MS를 이용하여 non-target 분석하였으며 positive 모드에서 분석하였다.
- Mass 스캔 범위는 100 m/z ~ 1500 m/z에서 Full mass로 분석하여 Mass spectrum을 얻었다.
- 기기분석 조건

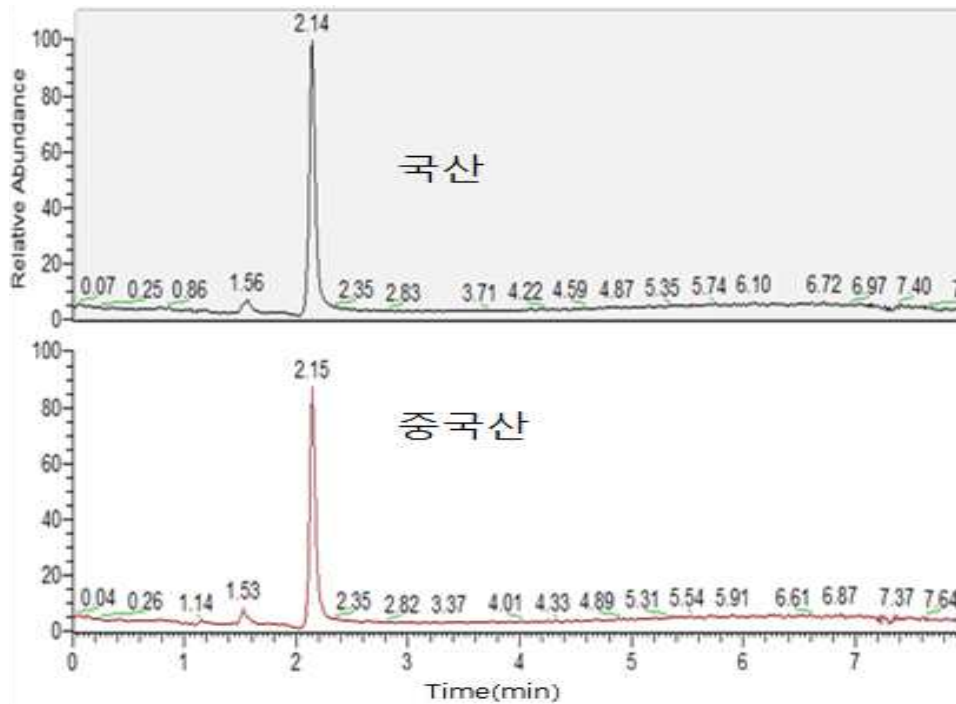
구 분	세부 내용	비 고
LC 조건	<ul style="list-style-type: none"> - Retention time: 15 min - Flow rate: 300uL/min - Injection volume: 2uL - 이동상: A water 100%, B 80% MeOH - 기기: Shesheido HPLC, Japan 	
MS 조건	<ul style="list-style-type: none"> - Mass range: 100 ~ 1500 m/z - 이온화 소스: ESI - Mode: positive - 기기 Thermo scientific orbitrap MS 	

○ 지표물질 발굴 절차

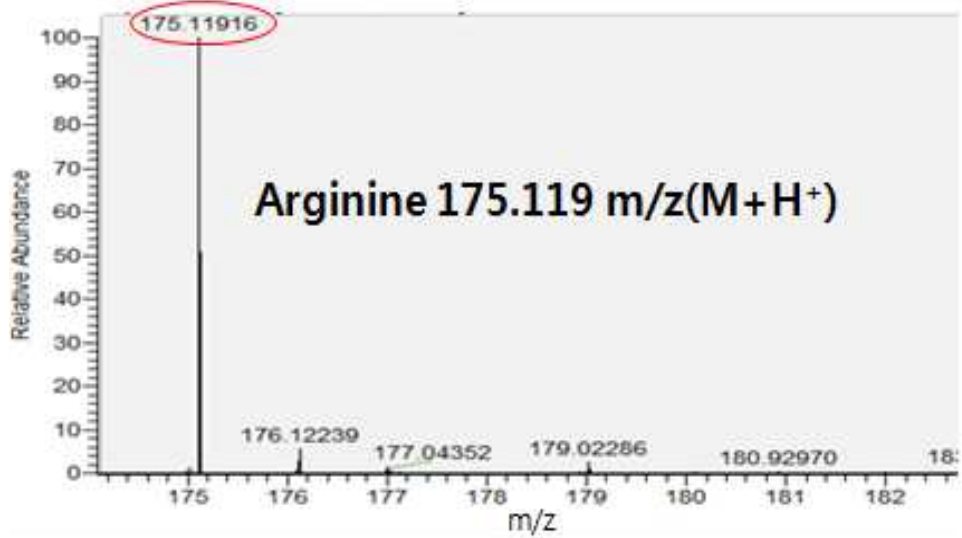
- 국내산과 수입산 Mass 간에 차이나는 Mass 탐색 비교에는 Sieve 프로그램을 사용하였으며 mass intensity 기준으로 상위 5,000개 Mass를 탐색하였다.
- 국내산과 수입산 간에 차이나는 Mass 값을 기준으로 후보물질을 탐색하였고 MS MS 분석하여 성분을 정성하였으며, 표준물질을 이용하여 정성, 정량하였다.
- 분석결과 들깨에서는 leucine, arginine 함량에서 차이가 있었다.
- 표준물질로 MS MS spectrum을 비교하여 정성하였고, 국내산과 수입산의 양을 비교하였다.
- 박테리오 파지 제작을 위해서는 표준물질이 필요하며, 이를 이용한 정성, 정량이 필요하다.

□ 들깨 지표물질 발굴

들깨에 함유된 아미노산 leucine, arginine 은 원산지 간에 차이가 있어 지표물질로 선발하였다.



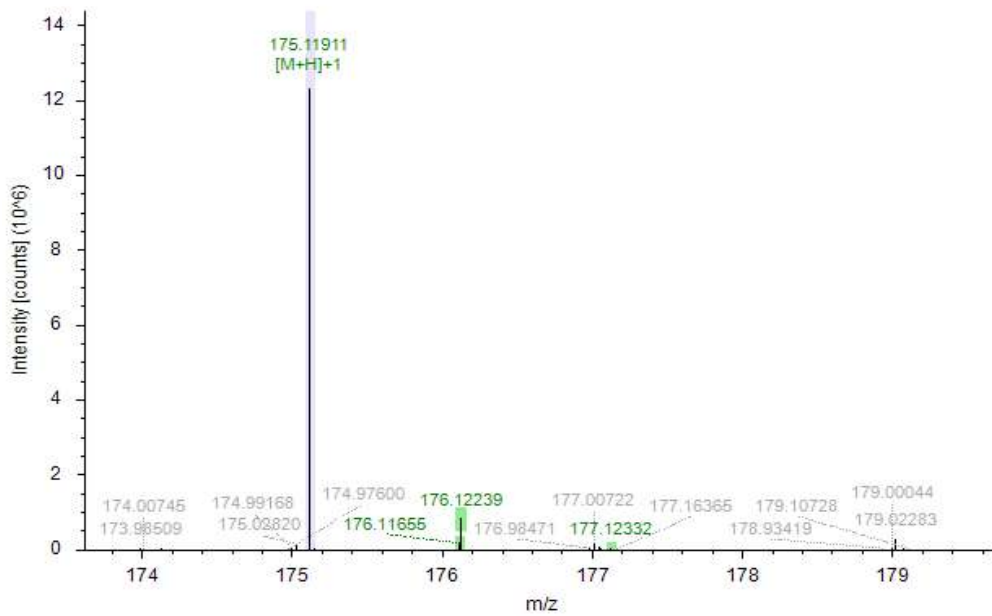
한국산, 중국산 들깨의 arginine의 크로마토그램(UHPLC-Orbitrap-MS 분석 결과)



arginine mass spectrum(UHPLC-Orbitrap-MS 분석 결과)

Table. 들깨의 원산지별 성분 비교

components	leucine	arginine
Ratio Chinese / Korean	1.22	0.88



Arginine mass spectrum(M+H)

○ 분자각인 고분자 기반의 신속한 원산지판별용 전처리 시스템 개발 (제4세부)

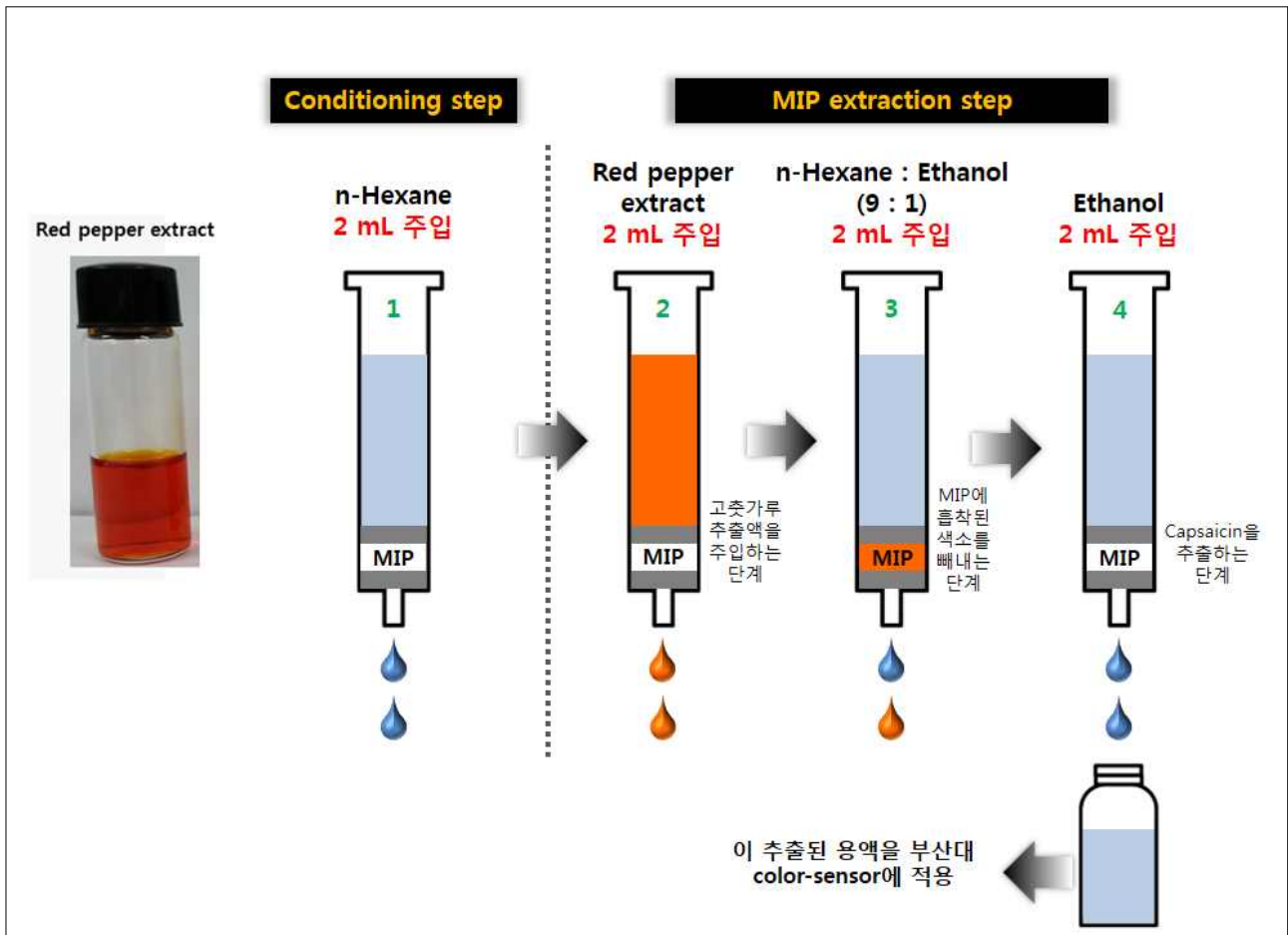
본 연구팀은 농산물 품질관리원 시험연구소(2협동)에서 제공 받은 국산 20종, 수입산 20종의 고춧가루를 n-hexane 용액으로 추출하여, 추출된 용액을 MIP 카트리지에 통과시켜 얻은 전처리된 elution 용액을 가지고 캡사이신 함량 비교를 HPLC로 확인했다.

n-hexane과 ethanol 용액을 9:1 비율로 만든 washing 용액과 elution 용액인 ethanol로 전처리 실험을 진행하였으며, HPLC의 고정상, 유속, 컬럼 등 모두 1차 년도와 동일한 조건으로 진행했다. 아래 표는 본 연구팀이 MIP 성능 테스트 및 국산 및 수입산 고춧가루 추출액의 캡사이신 함량을 비교하기 위하여 HPLC를 측정했을 때 조건을 나타냈다.

표 2. Liquid chromatography의 실험 조건

Type		Condition
LC	Column	Athena C18, 120Å, 4.6mm x 150mm, 5µm
	Column temperature	40 °C
	Flow rate	1.0 mL/min
	Mobile phase	Acetonitrile : Diluted Water : Acetic acid (60:39:1)
	Injection Vol.	20 µl
Detector	Range	280 nm UV extinction

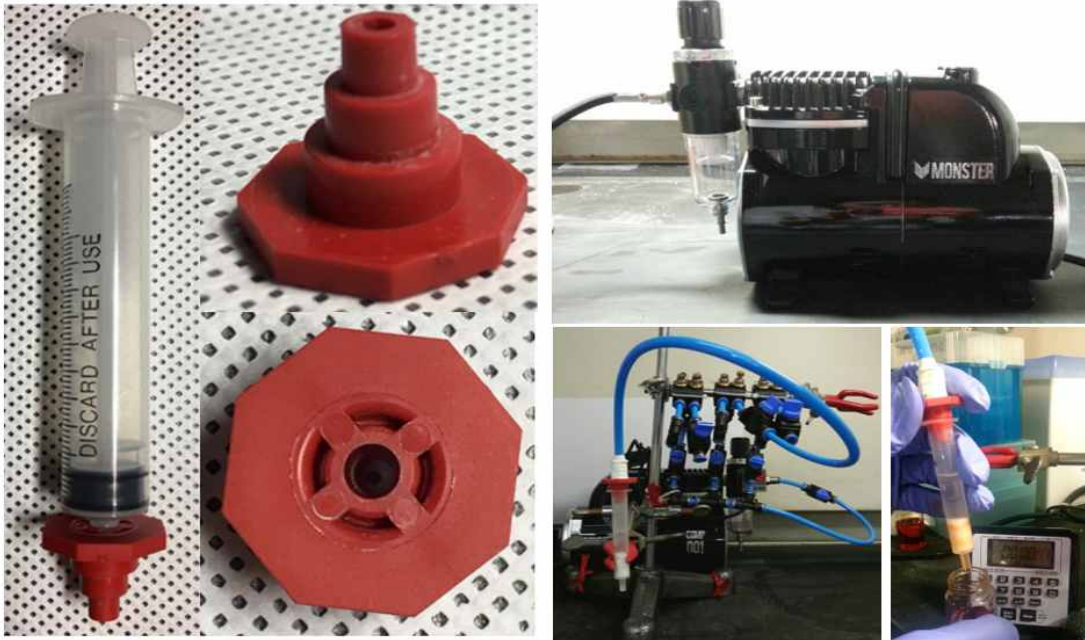
아래 그림은 실제 MIP cartridge를 사용하여 conditioning step 부터 MIP extraction step 까지 나타낸 전처리 시스템 flow chart이다. 고춧가루 추출은 1 g의 고춧가루에, n-hexane 20 mL를 넣고 Voltex mixer로 1분동안 물질을 섞는다. 그 후 syringe filter로 고춧가루의 잔여물을 거른 용액을 사용하였다. 처음 전처리 과정을 시작할 때 MIP 카트리지를 사용하기 위해 n-hexane 2 mL를 주입하여 카트리지 안에 들어있는 MIP를 활성화 시켜준다. 그 후 고춧가루 용액 2 mL를 넣고 카트리지를 통과 시킨 후 washing 용액으로 MIP에 흡착된 불필요한 물질들을 제거한다. 마지막으로 ethanol 용액을 통과시켜 MIP에 각인되어있는 캡사이신을 추출하는 단계를 거친다. 이렇게 고춧가루를 전처리한 elution 용액의 일부는 캡사이신의 함량을 확인하기 위해 HPLC를 측정하고, 나머지는 원산지 판별을 위한 칼라센서 측정을 위해 부산대학교(1협동)에 샘플을 전달했다.



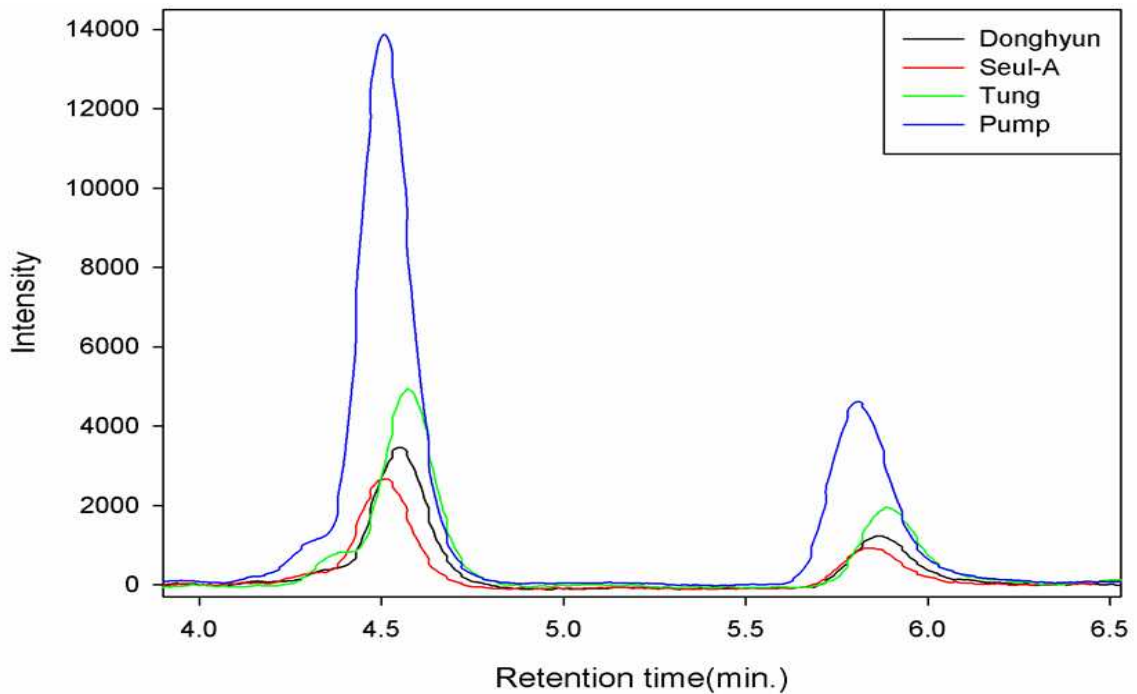
MIP 카트리지를 이용한 전처리 시스템 과정

MIP 카트리지에 SPE(Solid phase extraction) Tube Adapter를 부착하여 압력을 주어 단계별 용액들이 MIP 카트리지에 통과할 수 있도록 하였다. 하지만 tube adapter로 일정한 압력을 넣는 것이 힘들고, 측정하고자 하는 분석자의 악력에 따라 실린지를 통과하는 용액의 유속이 다른 문제점이 있었다. 본 연구팀은 분석자가 바뀌면 elution 용액 안에 들어있는 캡사이신의 함량이 다른지 확인해 보는 실험을 진행하였다. 그리고 compressor를 사용하여 실험을 진행해 elution 용액을 얻어 각각의 HPLC를 측정하여 캡사이신의 함량을 비교하는 chromatogram을 아래 그림에 나타내었다. 용액이 나오는 시간이 길어지면 MIP를 통과하여 MIP와 용액들 사이에 캡사이신이 각인되고 제거되는 상호작용을 많이 한다는 의미이고 통과하는 시간이 짧으면 MIP와 통과되는 용액들 사이에 상호작용이 많이 이루어지지 않는다는 것을 알 수 있다. SPE tube adapter를 이용해 고춧가루 추출 용액 2 mL를 주입하고 압력을 주어 나오는 시간은 2분이 걸리는데, elution 단계에서는 ethanol과 MIP 사이의 극성 분자간의 힘이 강하게 작용하여 분석자가 adapter로 줄 수 있는 최대한의 압력을 주어도 2 mL가 나오는 시간이 6분이 걸렸다. 이는 실제 원산지 판별 현장에서 주어진 시간 내에 분석자가 칼라센서로 원산지 판별을 하기 전에 전처리 과정을 진행하는데 전처리 과정 시간이 너무 오래 걸리고 분석자가 달라짐에 따라 전처리 결과의 재현성이 달라져 원산지 판별의 정확도 떨어질 수 있다. 따라서 본 연구팀은 전처리 과정 시간을 단축하고 일정한 압력을 이용하여 분석자가 달라도 전처리 과정에서 얻게 되는 캡사이신 함량이 일정할 수 있도록 주

관기관에서 제공받은 compressor 및 디지털 압력계, 압력조절 다이얼을 사용하여 전처리 과정을 진행하였다.



SPE Tube adapter 이미지(왼쪽) 및 Compressor 이미지(오른쪽)



각기 다른 분석자 3명이 SPE Tube adapter를 이용하여 전처리를 진행한 elution 용액과 Pump의 elution 용액의 캡사이신 함량 비교 HPLC

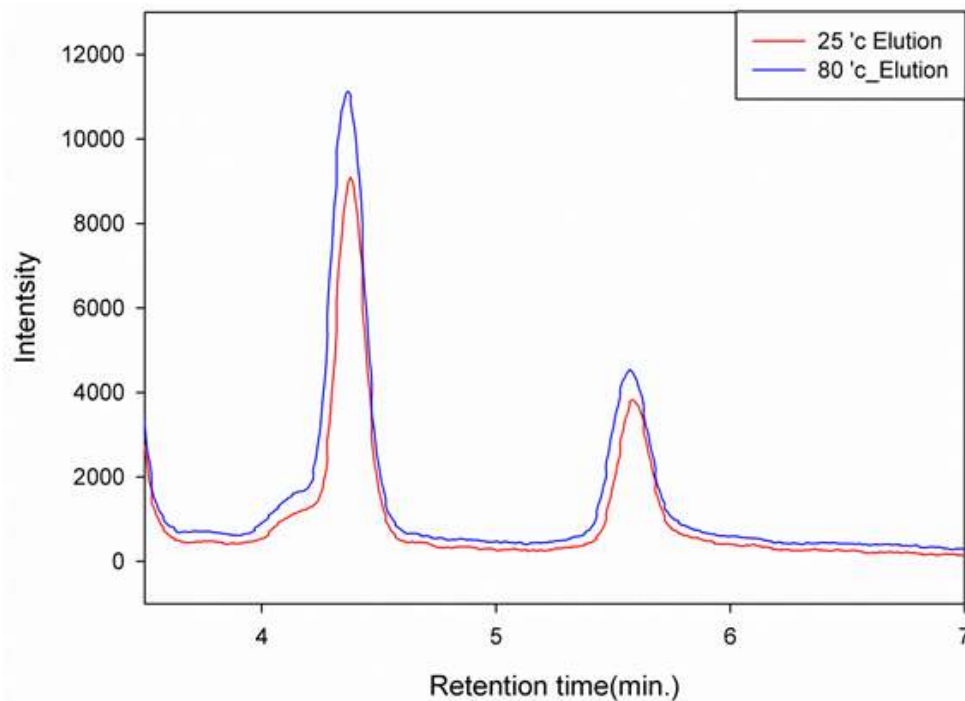
표 3. Compressor의 각 단계별 조건

구분	1단계	2단계	3단계	4단계	5단계
용액	Hexane	Red pepper powder extract	Washing (Hexane:Ethanol)	Elution (Etanol)	Cleaning (Acetone)
양 (mL)	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
횟수	3 회	1 회	1 회	1 회	3 회
시간	1 분 36 초	1 분 23 초	1 분 27 초	3 분 42 초	2 분 19 초
밸브 (B,C,D)	C	C	C	D	D
압력 (bar)	3.6	3.6	3.6	3.7	3.7
최대 압력 (bar)	3.7	3.71	3.74	3.75	3.73

위 표에서 볼 수 있듯이 본 연구팀은 compressor를 가지고 진행되는 시간 및 압력 조건을 최적화한 후, 실제 고춧가루를 추출한 용액을 MIP 카트리지에 통과시키는 실험을 진행하였다.

MIP 카트리지로 고춧가루 추출물을 통과시킨 전처리 된 elution 용액은 제1협동으로 전달되어 elution 용액을 칼라센서로 원산지 판별을 측정한다. 이때 elution 용액 속에 남아있는 캡사이신의 함량을 높이기 위해 온도를 최대 90도까지 올리면서 ethanol 용매를 기화시켜 칼라센서를 측정한다. elution 용액으로 사용되는 ethanol의 끓는점이 78.37 °C 이기 때문에, 상온에서 얻은 elution 용액과 elution 용액을 80도에서 1분 동안 가열하여 ethanol을 기화시킨 elution 용액의 캡사이신 함량을 HPLC로 측정하였다. 측정 결과 아래의 그림과 같이 80도로 가열한 후 남은 elution 용액의 캡사이신(4.3 min)과 다이하이드로 캡사이신(5.6 min)의 함량이 상온에서 얻은 elution 용액의 캡사이신 함량보다 더 많음을 알 수 있었다.

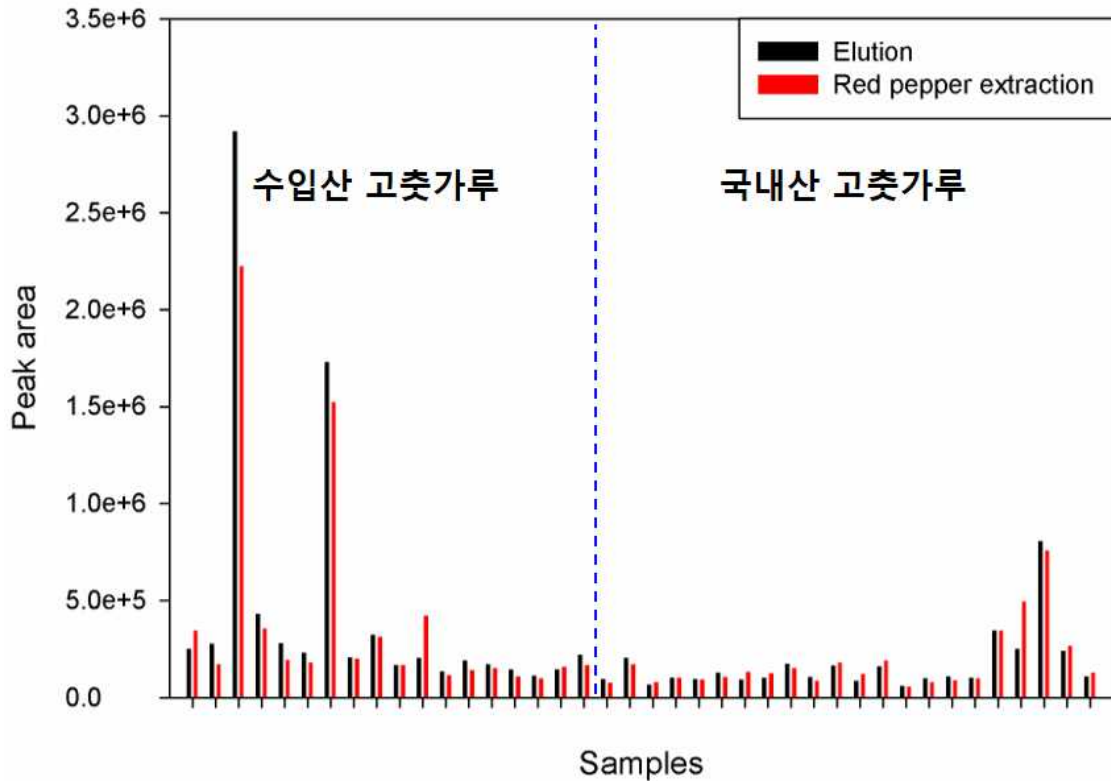
따라서 elution 용액을 가열하지 않고 상온에서 칼라센서를 측정하는 것 보다 온도를 올려 에탄올을 기화시키고 남아있는 캡사이신으로 칼라 센서를 측정하는 것이 원산지 판별을 하는 것에 더 적합하다고 결과를 내렸다.



25 °C elution 용액과, 80 °C 로 가열한 elution 용액의 캡사이신 함량을 측정한 HPLC

본 연구팀은 compressor의 압력, 전처리에 사용되는 용액의 종류 및 비율 등 다양한 조건들을 최적화 시킨 후 고춧가루 국산 20종, 수입산 20종을 n-hexane으로 추출한 용액으로 MIP 카트리지를 사용해 고춧가루 전처리 과정을 진행하였다. 그리고 국산 20종, 수입산 20종의 고춧가루 추출 용액과 MIP 카트리지에 고춧가루 용액을 통과시킨 전처리 된 elution 용액을 캡사이신의 함량을 알아보기 위해 HPLC로 측정을 하였다. 수입산 고춧가루 추출용액은 국산 고춧가루 추출용액보다 캡사이신 함량이 높은 고춧가루도 있었지만, 수입산 고춧가루의 함량과 국산 고춧가루의 함량이 비슷한 고춧가루도 있었다. HPLC로 측정하여 캡사이신의 면적을 구했고, 고춧가루 추출 용액의 캡사이신 함량과 MIP 카트리지를 통과한 elution 용액의 캡사이신 함량을 비교하는 그래프를 아래 그림에 나타냈다. 아래 그림에서 볼 수 있듯이 elution 용액 내 들어있는 캡사이신의 함량이 고춧가루 추출 용액 내 들어있는 캡사이신 함량보다 더 많이 들어있음을 아래 그림을 통해서 알 수 있다. 이는 고춧가루를 추출할 때 사용한 용매(n-hexane)와 MIP 카트리지를 사용해 추출한 elution 용액의 용매(ethanol)가 각각 다르기 때문에 HPLC를 측정 시 peak intensity가 약간 차이가 났다고 생각할 수 있다. n-hexane에 들어있는 캡사이신 보다 ethanol에 들어있는 캡사이신이 더 많이 추출될 수 있고, ethanol이 증발되는 성질이 있기 때문에 캡사이신의 함량이 더 높게 나왔을 수도 있다.

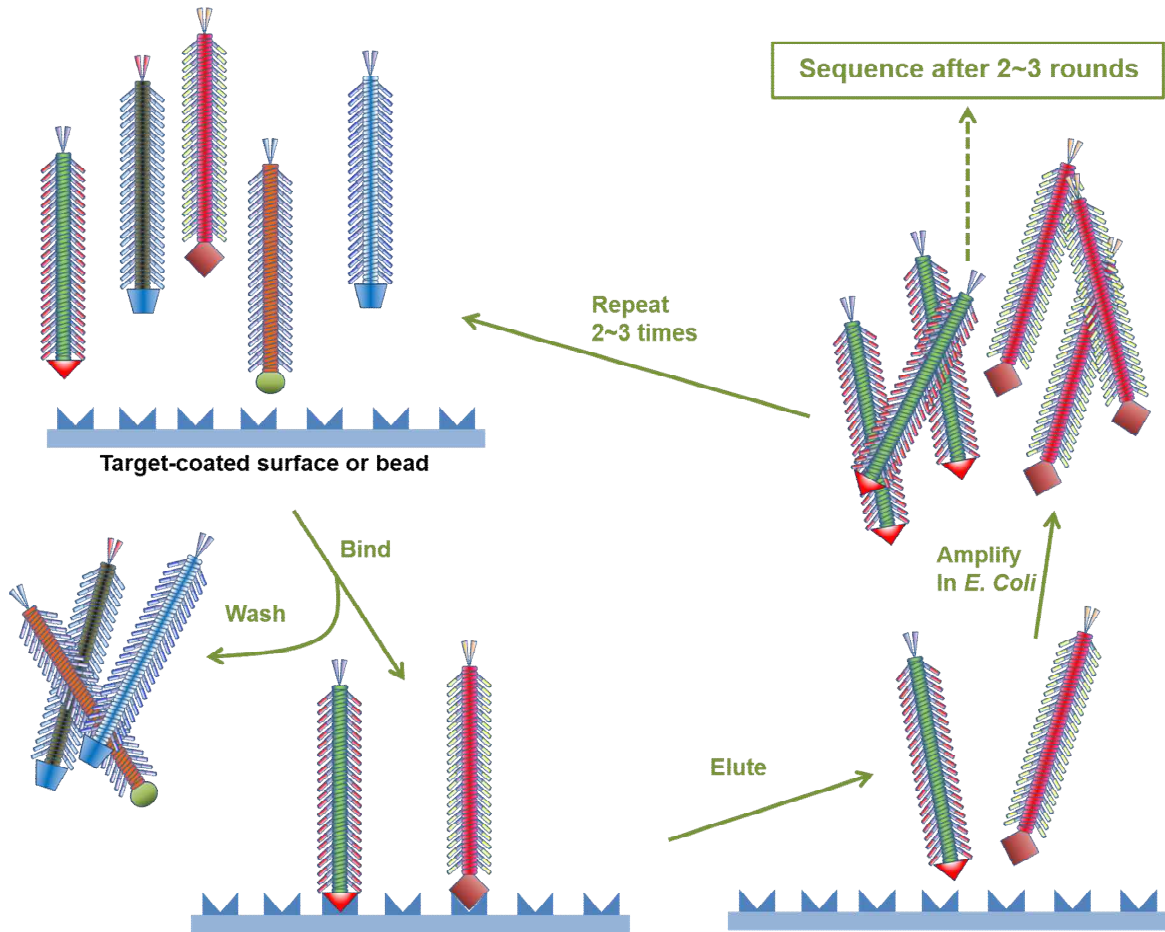
따라서 n-hexane에 의한 캡사이신의 용해도가 ethanol에 의한 캡사이신의 용해도 보다 낮고, ethanol에 대한 캡사이신의 선택도가 더 크기 때문에 아래의 그림에서 보는 것처럼 elution 용액 내 캡사이신의 함량이 더 높음을 알 수 있다.



고춧가루 추출 용액(빨간)과 elution 용액(검정) 내에 들어있는 캡사이신 함량 비교

전처리 과정에서 본 연구팀의 MIP 카트리지가 캡사이신의 선택도를 높여 칼라센서의 원산지 판별에 도움이 되었다. 하지만 현장에서 전처리 과정에 필요한 용액들을 가지고 다녀야 하고, 고춧가루를 추출해야하는 과정을 거친 후 전처리 과정이 끝나면 판별에 사용했던 용액을 폐기해야하는 등 현실적으로 현장 이동형 원산지 판별 장비가 만들어지고 이 장비를 가지고 다닐 때 여러 가지 힘든 점들이 있었다. 따라서 본 연구팀은 전처리 과정을 간단하게 하기 위해 다양한 칼라센서를 통한 양파 및 마늘의 원산지 판별 실험을 진행하였다.

○ 기능성 박테리오파지 기반의 대상물질에 선택적으로 반응하는 펩타이드 개발 (제2세부)

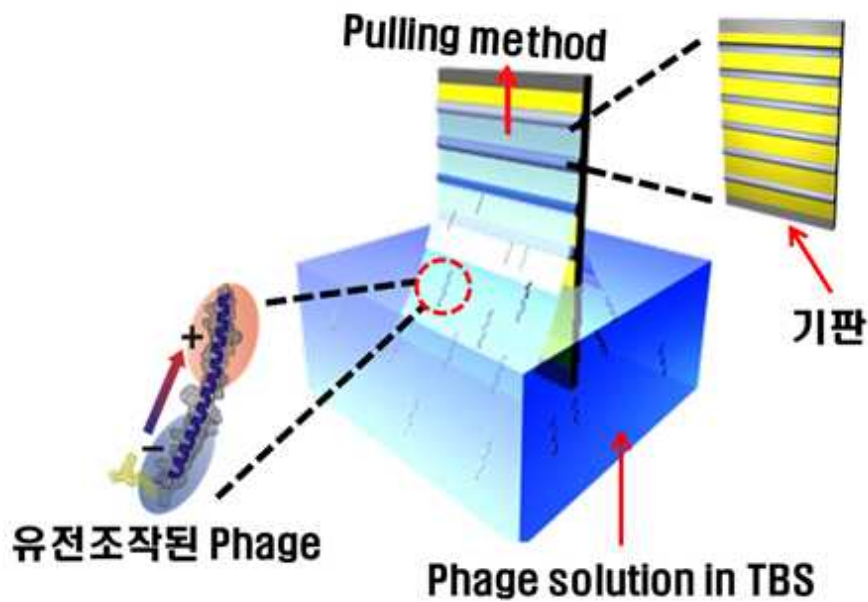


기능성 바이러스의 특징: 간단한 유전자 조작만으로 원하는 작용기를 가지는 나노입자로 발현이 가능

본 연구진은 간단한 유전자 조작을 통하여 박테리오파지 표면에 capsaicin과 선택적반응을 하는 펩타이드를 발현시켜 고춧가루 원산지 판별을 위한 컬러센서의 감도를 높이고자 하였다. 기존의 유무기물과 비교하여 독성이 없어 생체친화적인 박테리오파지(bacteriophage)는 길이 880nm, 직경 6.6nm의 일정한 크기를 가지는 긴 막대모양의 나노소재이다. 박테리오파지는 몸통, 꼬리에 pIII, pIV, pVIII 등의 단백질을 2700쌍 가지고 있어 아주 높은 표면비를 가지고 있다. 따라서 박테리오파지 내의 유전자를 조절하여 원하는 단백질(receptor로 활용할 수 있는 단백질)을 표면에 발현시켜 센서로서의 기능을 향상시킬 수 있는 것이다. 본 연구진은 10^6 개 이상의 박테리오파지를 뿌려 대상 물질(유해 환경호르몬)과 선택적으로 반응하는 박테리오파지를 찾는 Evolutionary screening 방법을 통하여 유해 환경호르몬에 선택적으로 반응하는 수용체(receptor)를 개발하였다. 이 방법은 박테리오파지의 랜덤 펩타이드 라이브러리(random peptide library) 중에서 특정 타깃 물질에 적합한 펩타이드(peptide)를 발현시키는 박테리오파지를 찾아내는 기술이다. 박테리오파지 라이브러리는 파지 몸통 전체를 둘러싸

는 주 단백질을 발현시키는 유전자를 스플라이싱(splicing)을 통해 무작위서열(random sequence)으로 발현시킨 것이며 랜덤 라이브러리는 10^{11} 개 이상의 무작위 서열로 재조합된 단백질이 존재한다. 이 파지 라이브러리를 대상 물질에 스크리닝(screening) 하여 이 중 일부 파지는 대상 물질과 더 큰 친화성에 의해 대상물질에 부착하고, 약하게 부착된 파지를 세척 하고 더 강하게 부착된 파지를 추출하여 숙주 박테리아에 감염시켜 증폭시킨다. 이렇게 개발한 펩타이드를 더 효율적으로 박테리오파지에 적용시키기 위하여 약간 변형한 형태의 Inverse PCR기법을 이용하였다. 박테리오파지의 몸통 부분에 발현되는 pVIII 단백질에 대상물질인 capsaicin 검출을 위한 기능성 펩타이드가 발현할 수 있도록 기능유전자의 특이적 삽입 기술을 확보하였다. 또한 나노파지의 다양한 껍질 단백질에 각기 다른 기능성 펩타이드(peptide)를 동시에 발현할 수 있도록 하는 다기능 나노파지 제작 기술 및 이를 구조체(Back-bone)로 사용하여 기능성 유전자를 나노파지의 표면단백질에 다양한 방법으로 발현할 수 있는 기술을 확보하였다.

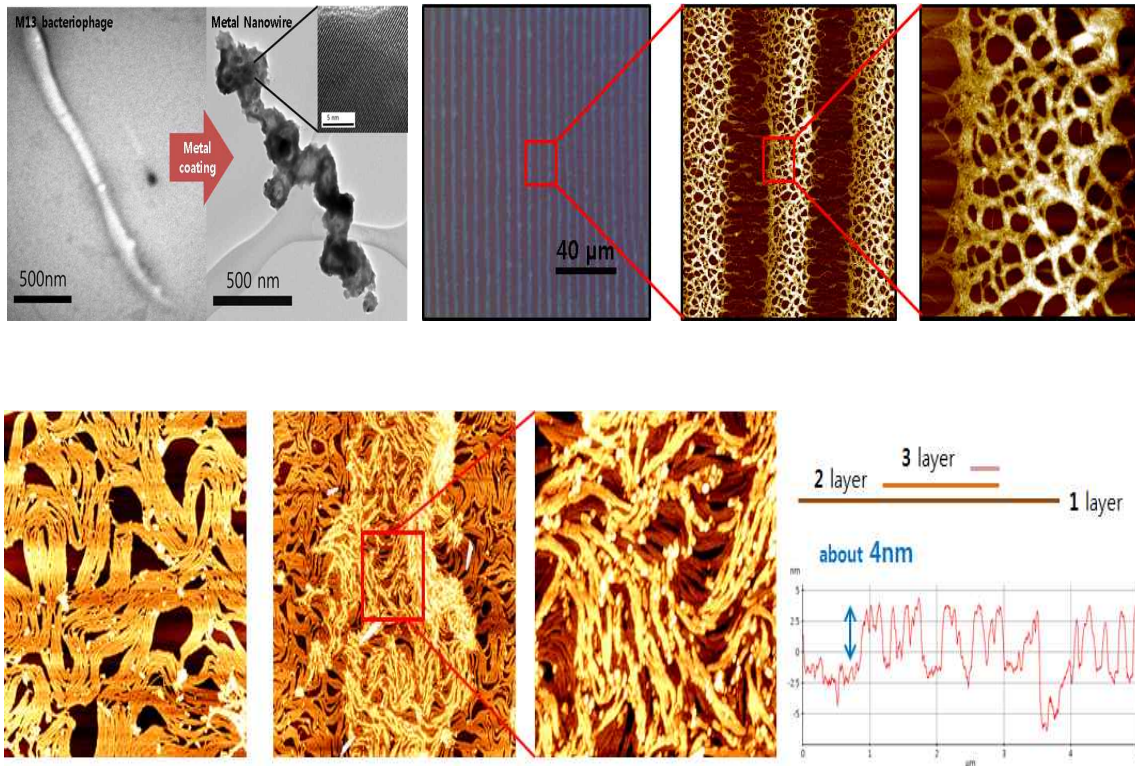
○ 바이러스를 이용하여 농산물 원산지 판별을 위한 기능성 나노구조체 개발 (제1협동)



자기조립 방식을 이용한 바이러스 필름 제조.

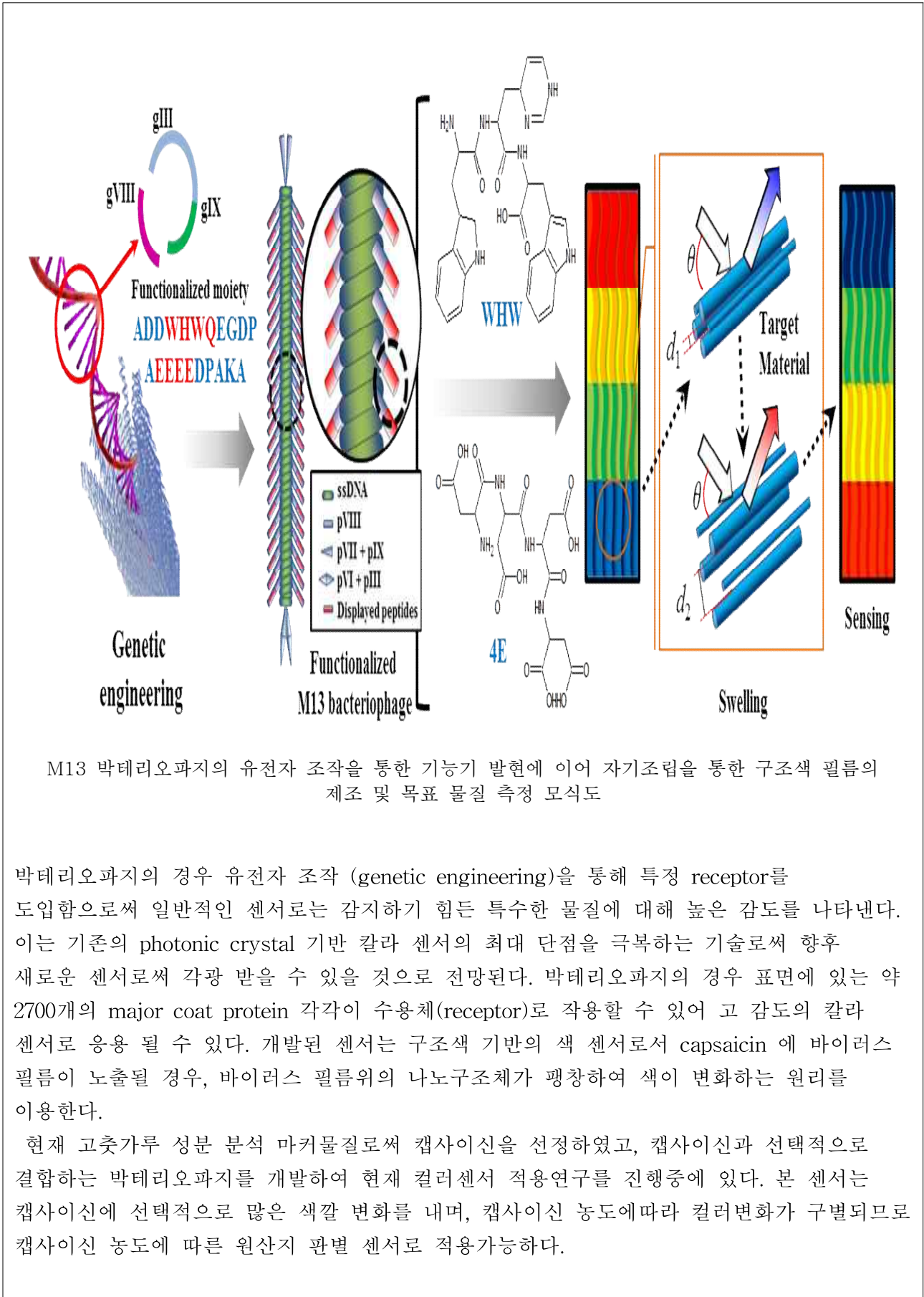
본 연구진은 사전 연구를 통해 다양한 색깔을 나타내는 박테리오파지 구조체 기반의 필름을 만들었으며, 그 중 일부 결과를 2011년 Nature에 보고 하였다. 새로운 self-templating 방법을 바탕으로 박테리오파지(M13 bacteriophage)를 이용하여 칠면조의 콜라겐 구조를 모방한 형태인 나선형 묶음(smectic helicoidal bundle) 구조를 만들었다. 칠면조 얼굴의 콜라겐 묶음은 일정한 간격을 가지고 있어 특정 파장의 빛을 산란시켜 색을 띠는 구조색을 가지며 콜라겐 구조를 변화시켜 얼굴의 색을 바꾼다. 이에 영감을 받은 본 연구진은 길이 880nm, 직경 6.6nm 의 일정한 크기를 갖는 막대모양의 박테리오파지를 활용하여 구조색을 가지는

나노구조체를 개발하였다. 박테리오파지가 잘 분산되어 있는 솔루션에 기판을 넣었다가 당기는 속도를 조절하면 솔루션이 기판에 응축되어 증발하는 과정에서 일어나는 과정을 이용하는 것이다.



기능성 파지의 우수한 액정성을 이용한 다양한 구조체 제작의 적용사례; (위)기능성 테리오파지를 주형으로 금속나노와이어의 TEM 및 AFM 이미지; (아래)기능성 파지 기반의 4nm 간격을 가지는 계층적 자기조립 구조체

박테리오파지 솔루션의 농도에 따라 다양한 정렬도를 가지게 되어 다양한 형태의 나노구조체를 제작할 수 있다. 본 연구진은 박테리오파지의 솔루션의 농도를 조절하여 특정 농도에서 네마틱 수직 꼬임 구조, 콜레스테릭 나선 리본 구조, 스멕틱 나선형 나노섬유 구조를 제작하는데 성공하였다. 특히 기판을 당기는 방향에서 약간 기울어진 방향으로 정렬되는 스멕틱 나선형 나노구조체의 경우 백색광을 조사하였을 때 가시광선을 선택적으로 흡수하여 구조색을 나타내게 된다. 기판을 당기는 속도를 다양하게 조절하여 기판위에 다양한 색상의 가지는 나노구조체를 제작하였다. 박테리오파지 구조체의 간격과 크기가 큰 경우 필름에 백색광을 조사하게 되면 구조물에 의해 coherence scattering이 일어나게 되면서 장파장인 붉은색 파장이 산란되고 우리 눈에 붉은색으로 보이게 된다. 반대로 작고 조밀한 박테리오파지 구조체에 백색광을 조사시키면 우리 눈에 푸른색 필름으로 보이게 되는 것이다. 당기는 속도를 조절하여 필름 위에 자기조립하는 박테리오파지 구조체의 크기를 조절하여 백색부터 검정색까지 다양한 색상을 가진 컬러 필름을 개발하였다. 새롭게 개발한 **고차원 박테리오파지 필름은 매우 균일한 간격의 자가 조립 구조물로 이루어져 있어 광학 필터나 tissue growth 등 다양한 분야에 응용 될 수 있다.**

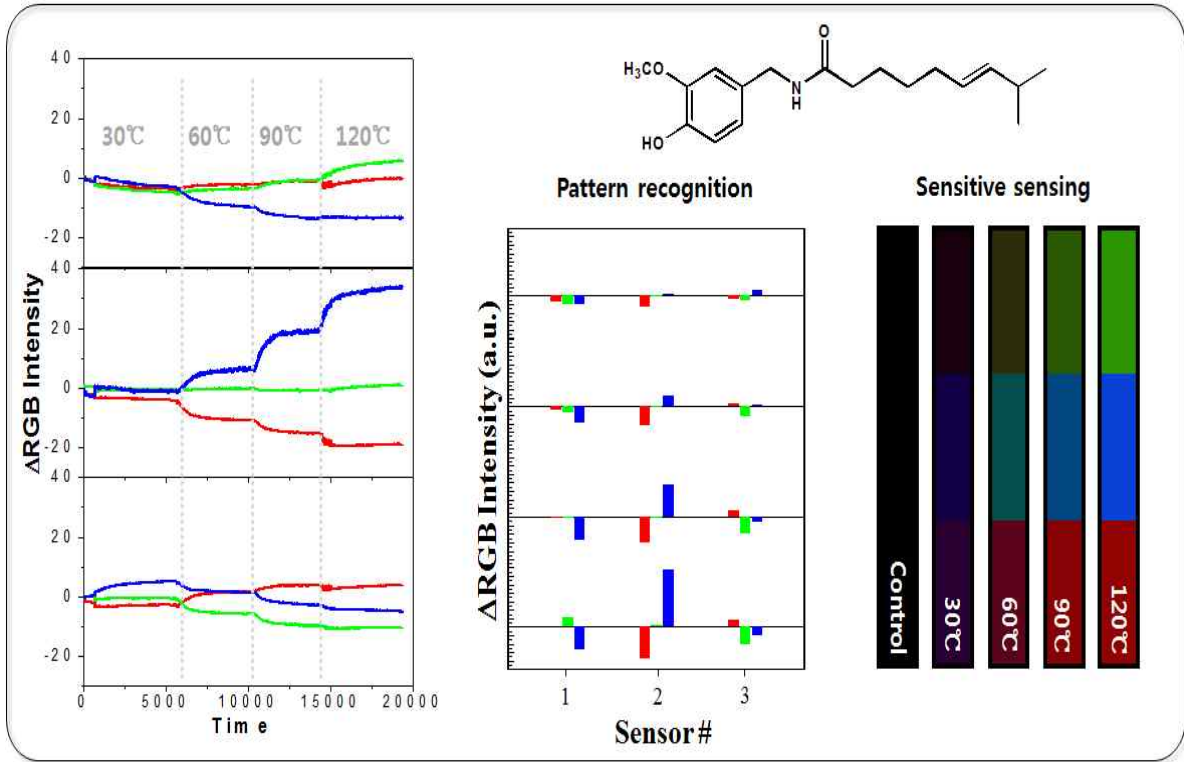


M13 박테리오파지의 유전자 조작을 통한 기능기 발현에 이어 자기조립을 통한 구조색 필름의 제조 및 목표 물질 측정 모식도

박테리오파지의 경우 유전자 조작 (genetic engineering)을 통해 특정 receptor를 도입함으로써 일반적인 센서로는 감지하기 힘든 특수한 물질에 대해 높은 감도를 나타낸다. 이는 기존의 photonic crystal 기반 칼라 센서의 최대 단점을 극복하는 기술로써 향후 새로운 센서로써 각광 받을 수 있을 것으로 전망된다. 박테리오파지의 경우 표면에 있는 약 2700개의 major coat protein 각각이 수용체(receptor)로 작용할 수 있어 고 감도의 칼라 센서로 응용 될 수 있다. 개발된 센서는 구조색 기반의 색 센서로서 capsaicin 에 바이러스 필름이 노출될 경우, 바이러스 필름위의 나노구조체가 팽창하여 색이 변화하는 원리를 이용한다.

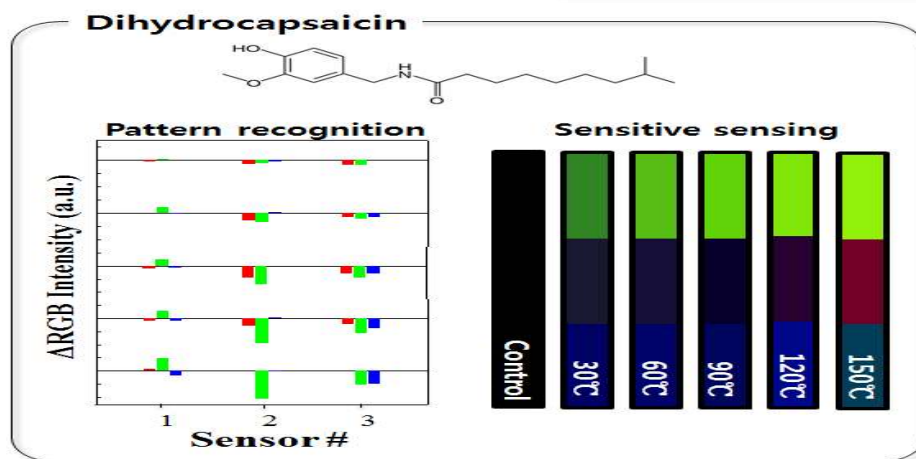
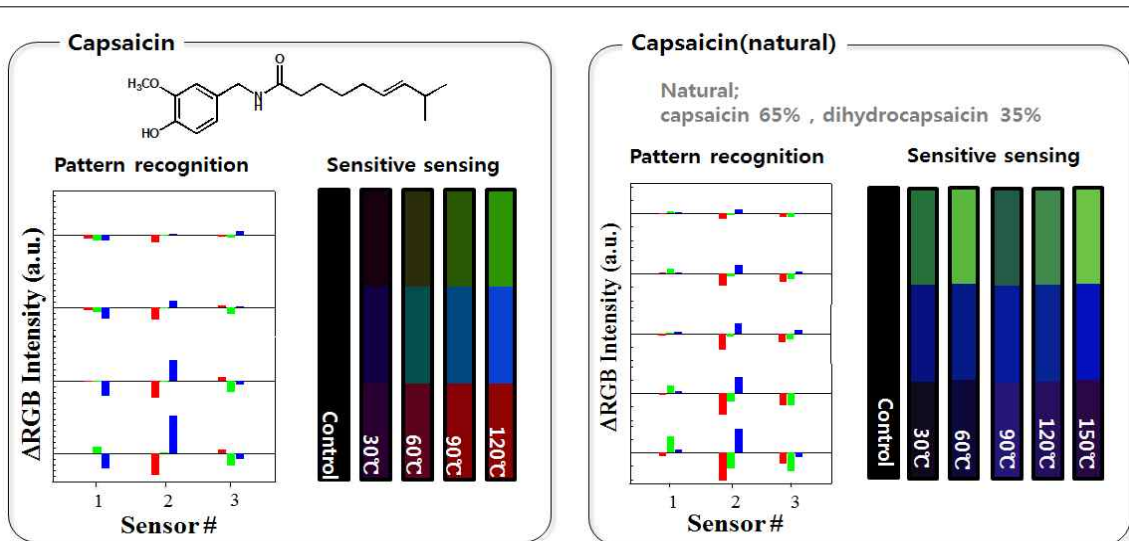
현재 고춧가루 성분 분석 마커물질로써 캡사이신을 선정하였고, 캡사이신과 선택적으로 결합하는 박테리오파지를 개발하여 현재 컬러센서 적용연구를 진행중에 있다. 본 센서는 캡사이신에 선택적으로 많은 색깔 변화를 내며, 캡사이신 농도에 따라 컬러변화가 구별되므로 캡사이신 농도에 따른 원산지 판별 센서로 적용가능하다.

○ 나노 구조체를 이용한 다양한 원산지 판별인자의 선택적인 검출 (제1협동)
 가. Engineering된 파지 기반의 컬러센서를 이용한 capsaicin 검출

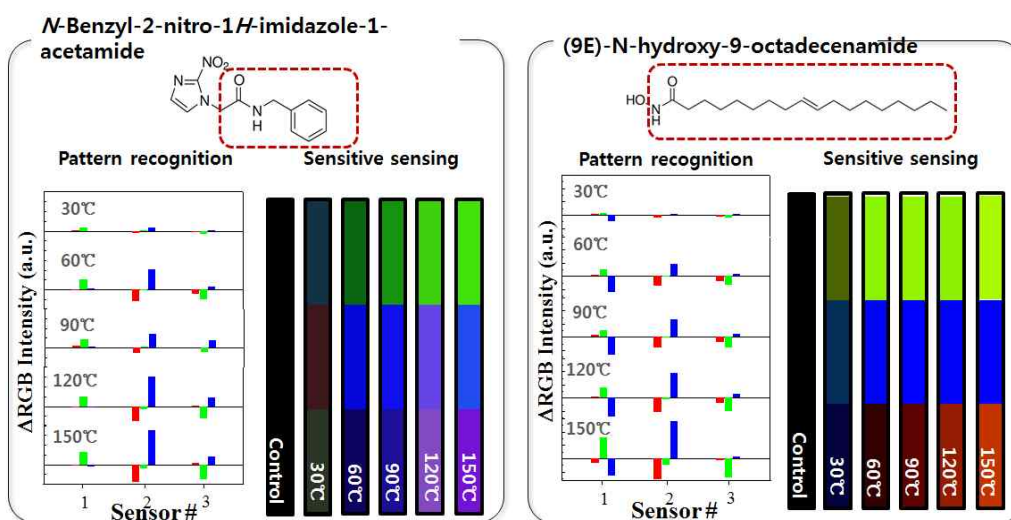


capsaicin sensing 결과

본 연구진은 컬러센서 시스템을 활용하여 capsaicin의 농도를 구분지어 고추의 원산지 판별을 위한 센서를 개발하고자하였다. 고춧가루의 경우 매운맛 성분인 capsinoids 중 capsaicin의 함량이 국산과 중국산에서 그 차이가 3~5배 정도이므로 이를 지표물질로 정하여 원산지 판별에 이용하고자 하였다. Evolutionary screening 방법을 통하여 개발한 capsaicin에 특이적 반응을 하는 펩타이드를 발현시킨 박테리오파지를 기반으로 한 컬러센서로 capsaicin 검출을 위한 연구를 진행하였다. 위의 그림은 챔버 내에 일정양의 capsaicin을 넣어주고 온도를 점차 올림으로써 증발되는 시료의 양을 늘려 컬러센서가 어떤 색 변화를 가지는지 연속적으로 관찰한 것이다. 증발되는 capsaicin의 양이 증가함에 따라 컬러센서의 색변화 또한 증가하는 것을 볼 수 있다. capsaicin의 농도 차이에 의해서 컬러센서의 변화량도 차이를 보이는 것을 알 수 있으며 이를 고추의 원산지 판별을 위한 센서로서의 가능성을 확인하였다.



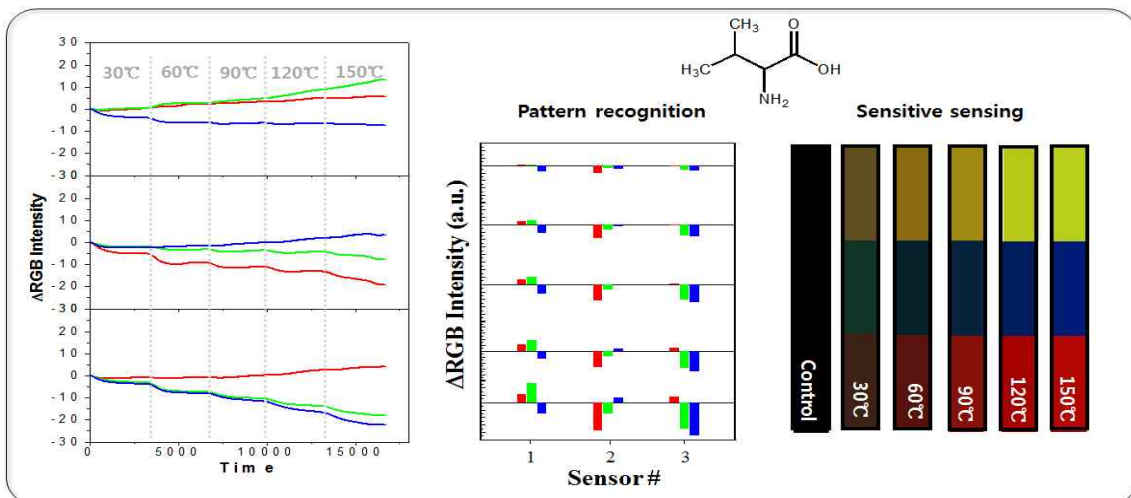
Engineering 된 박테리오파지 컬러센서를 이용한 capsaicin의 분류



Engineering 된 박테리오파지 컬러센서를 이용한 capsaicin의 분류

더 나아가 본 연구진은 capsaicin 뿐만 아니라 고춧가루에 존재하는 dihydrocapsaicin 과 capsaicin 65%와 dihydrocapsaicin 35% 가 섞여 있는 natural capsaicin 과 capsaicin과 유사한 작용기를 가지고 있는 N-Benzyl-2-nitro-1H-imidazole-1-acetamide, (9E)-N-hydroxy-9-octadecenamide 등에 대한 연구를 진행하였다. 연구는 앞서 설명한 capsaicin 검출 실험과 마찬가지로 챔버내에 일정한 양의 시료를 넣고 가열하는 온도를 증가시키면서 시료가 증발하는 양을 증가시켜주면서 컬러센서의 색변화량을 관찰한 것이다. 위의 그림에서 볼 수 있듯이 컬러센서에 노출되는 시료의 양이 증가할수록 색 변화량이 증가하는 것을 알 수 있으며 각각의 시료에 따라 서로 다른 색변화 패턴을 가지는 것을 알 수 있다. 이렇게 서로 다른 색변화 패턴을 분석하여 각각의 물질의 분석이 가능하다. 이 결과를 바탕으로 본 연구진은 capsaicin 류에 대한 컬러센서의 신뢰도를 높이고자 하였다.

나. Engineering된 파지 기반의 컬러센서를 이용한 valine 검출



박테리오파지 기반의 컬러센서의 valine sensing

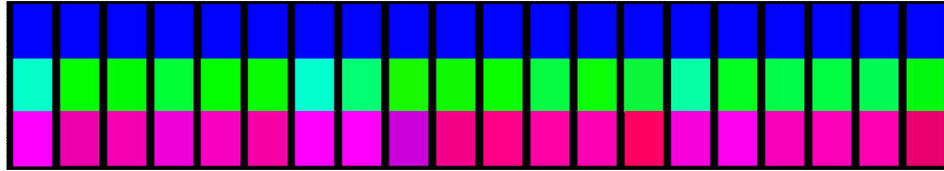
고춧가루의 경우 국산과 중국산에서 함량차이를 보이는 물질은 캡사이신뿐만 아니라 아미노산의 일종인 valine이 있다. 원산지 판별을 위한 컬러센서의 정확도 향상을 위해서는 국산과 중국산에서 함량의 차이를 지니는 다양한 대상물질이 필요하므로 본 연구진은 valine에 선택적으로 반응하는 펩타이드를 개발하고자 하였다. 이 펩타이드가 발현된 박테리오파지를 활용하여 컬러센서를 제작하여 위의 그림 7과 같은 결과를 얻었다. 온도를 점차 높여주어 valine이 증발되는 양을 증가시켰고 그에 따른 컬러센서의 색 변화를 관찰하였다. 박테리오파지 기반의 컬러센서에 가해지는 valine의 양이 증가할수록 컬러센서의 색 변화량이 증가하는 것을 알 수 있다. 이에 따라 본 연구진이 개발한 valine에 특이 반응을 하는 박테리오파지가 원산지 판별을 위한 컬러센서에 활용될 수 있는 가능성을 확인하였다.

본 연구진은 다양한 타겟 물질에 대해 선택적 반응을 하는 펩타이드를 박테리오파지에 발현시키는 기술을 활용하여 고춧가루의 원산지 판별뿐만 아니라 마늘, 참깨, 도라지 등 다양한 농산물에 대한 원산지 판별용 컬러센서의 개발을 하고자 하였다.

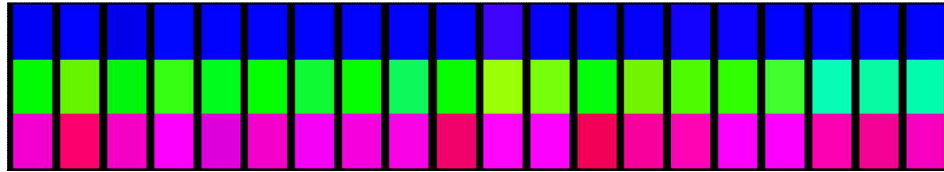
○ 측정 대상이 되는 농산물의 색변화 데이터베이스 구축(제2세부, 제4세부)
 가. 고춧가루

앞서 언급한 바와 같이 각 원산지별 고춧가루의 상이한 성분함량에 따라 본 연구진은 컬러센서를 이용한 원산지 판별을 시도하였다. 제3세부 연구진인 한양대에서 MIP를 사용하여 추출한 고춧가루 추출액을 컬러센서를 이용하여 측정, 아래의 그림과 같은 다양한 형태의 색깔 변화를 얻을 수 있었다.

고춧가루 (국내산) 20종



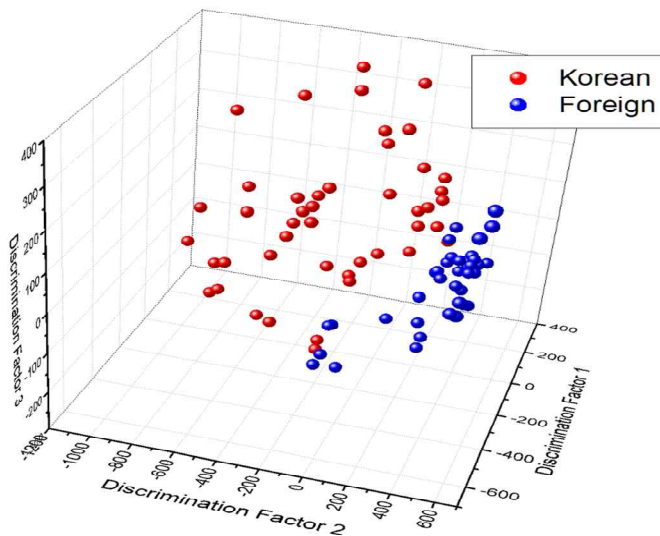
고춧가루 (수입산) 20종



고춧가루 elusion을 시료로 컬러센서를 이용한 측정과정에서 얻어진 색깔 변화

이렇게 얻어진 색변화를 통해 얻어진 RGB 데이터를 통한 Principle Component Analysis (주성분분석, PCA) 를 이용하여 판별 정확도를 3D 이미지로 나타내었다.

주성분분석은 기존 변수들의 선형조합으로 독립 변수의 전체분산을 최대한 설명하는 새로운 변수(주성분)를 추출하는 대표적인 기법이다. 서로 연관 가능성이 있는 고차원 공간(기존 변수)의 표본들을 선형 연관성이 없는 저차원 공간(주성분)의 표본으로 변환하기 위해 직교 변환을 사용한다. 고춧가루 분석 결과에서 나타난 주성분의 합은 84.5%로 위에 나타나있는 고춧가루의 PCA 이미지에서 각 x,y,z 축은 RGB 데이터의 주성분 값을 나타내었고, 이 이미지를 최대 84.5 %로 설명해준다.

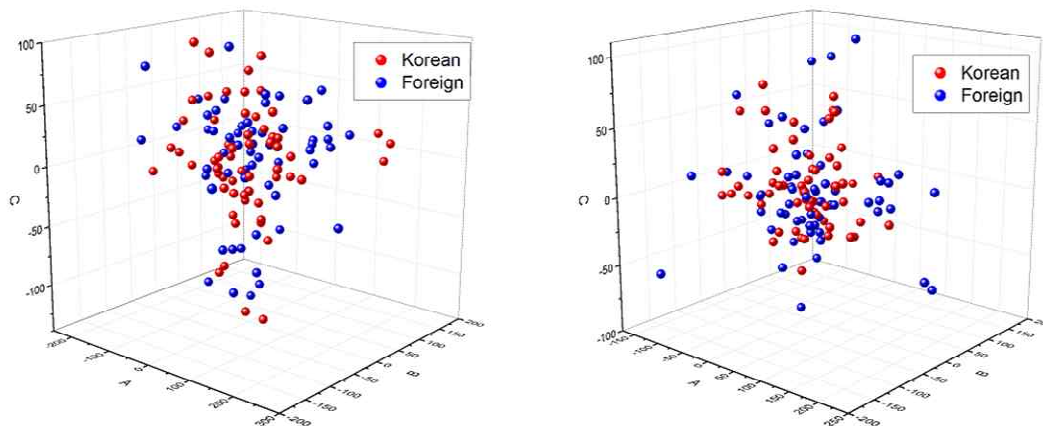


고춧가루 elusion을 이용한 원산지 판별 PCA분석 결과

나. 컬러센서를 이용한 참깨, 들깨, 마늘, 양파의 원산지 판별

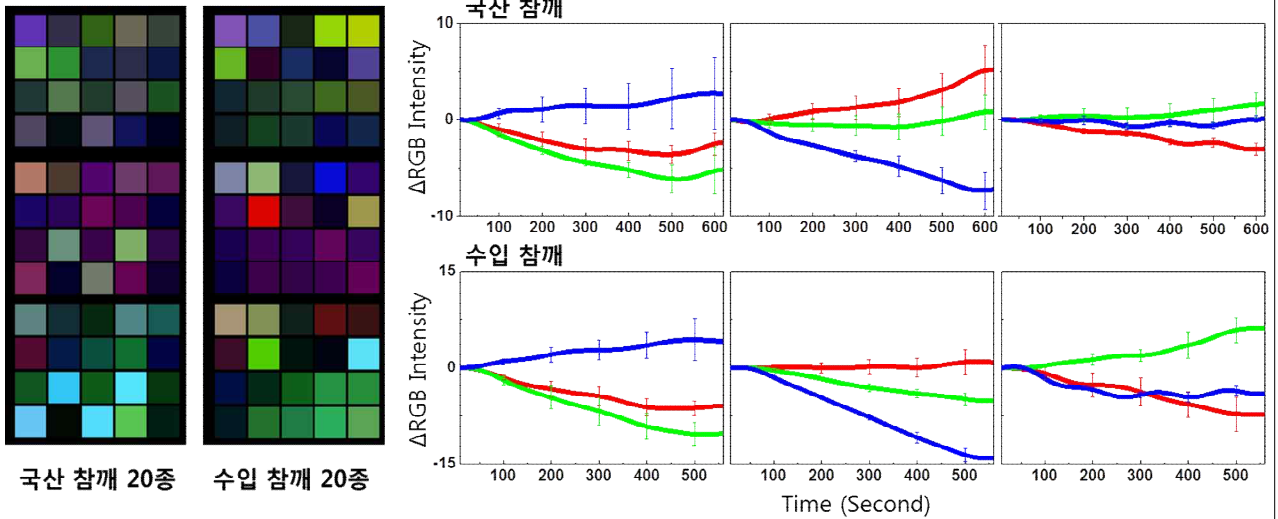
앞서 언급한 바와 같이, 전처리 과정의 분석효율에 대한 기여에도 불구하고, 실질적 사용에 있어 단점이 존재함을 알 수 있었고, 이에 본 연구팀은 실리콘-골드 기관 위에 각각 다른 박테리오파지가 자기조립되어있는 Wild, WHW, 4E 3종류의 칼라센서를 이용하여 서로 다른 시료에 대한 원산지 판별에 가장 적절한 기관을 찾는 연구를 진행했다. 이로써 각 농산물 시료에 대한 최적의 맞춤형 컬러센서를 발굴하여 보다 효율적이고 간편한 측정 방식을 도입하고자 하였다. 제2세부 연구팀에서 제공받은 국산 20종, 수입산 20종의 참깨, 들깨, 마늘, 양파의 원산지 판별 연구를 진행하여 각 시료에 포함된 휘발성 물질이 어떤 칼라센서에 특정하게 반응하는지를 최적의 칼라센서 필름을 찾는 연구를 진행하였다. 마늘과 양파는 각각 0.2 g 절편으로 썰어 칼라센서 측정 박스에 넣고 실험을 진행하였고, 참깨와 들깨는 0.2g 씩을 무게 측정하여 사용하였다. 실험 시작 온도는 30 °C에서 시작하여 60 °C, 90 °C 2개의 온도 구간에서 이미지를 추출하여 Adobe® Photoshop® CS6 소프트웨어를 이용해 30 °C의 칼라센서 이미지와 60 °C 이미지의 색빠기를 하고, 30 °C 이미지와 90 °C 이미지의 색을 뺀 결과 칼라 밴드들을 만들었다. 또한 각 필름마다 9개의 구역을 지정하여 CCD 카메라로 얻은 RGB 데이터 들을 이용해 변수를 추출 한 후 판별적 분류기를 사용해 판별 정확도를 확인하는 연구를 진행했다.

(1) 컬러센서를 이용한 참깨의 원산지 판별

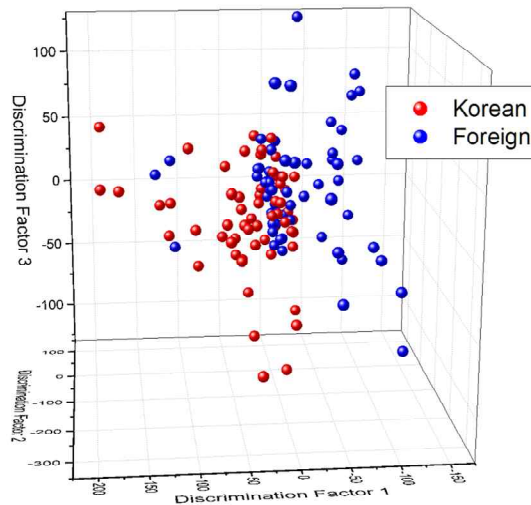


(좌) 국산 및 수입산 참깨의 wild 칼라센서 측정 결과 (우) 4E 칼라센서 측정 결과

위의 3차원 PCA 결과에서 알 수 있듯, wild와 4E 박테리오파지를 통해 제조된 칼라센서를 순차적으로 사용한 실험에서는 국산 및 수입산 참깨의 측정결과가 서로 구분이 되지 않음을 알 수 있다. 그에 비해 WHW 박테리오파지를 통해 제조된 칼라센서를 이용한 측정에서는 다음에서 볼 수 있듯, 뚜렷한 색변화 차이를 얻을 수 있었다.



WHW 박테리오파지 칼라센서를 이용한 참깨 시료의 측정결과 비교

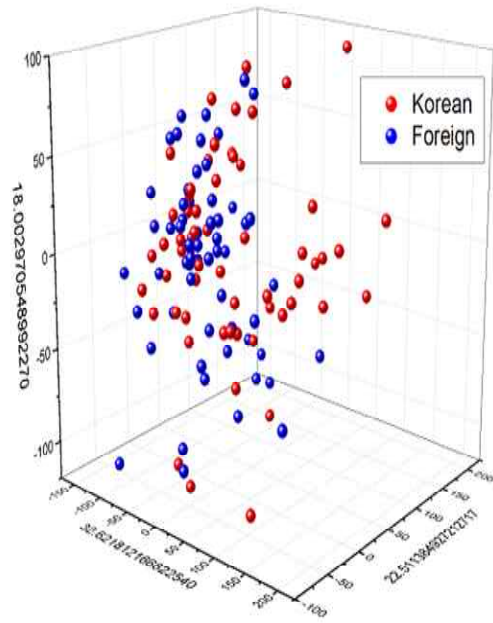
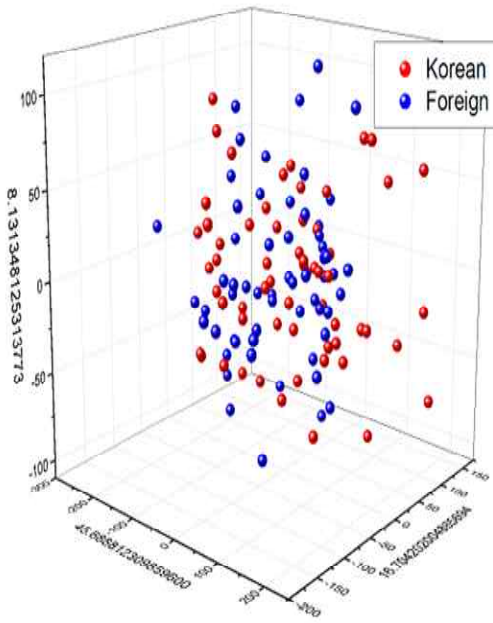


WHW 박테리오파지 칼라센서를 이용한 참깨 시료의 PCA 분석 결과

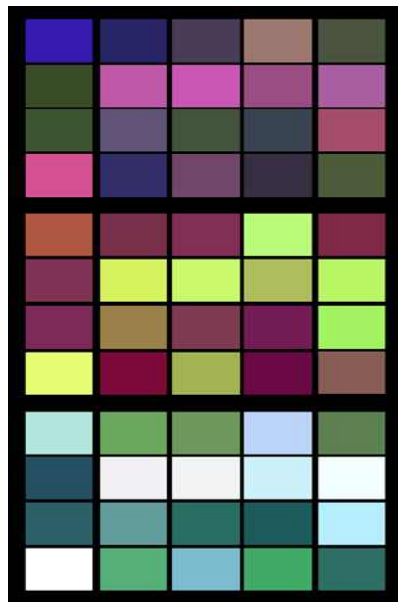
앞서 얻어진 색변화 분석결과를 통한 PCA 분석 결과 3가지 주성분 값의 합은 84%로 나타났으며, 일부 중앙에 원산지 구분이 되지않고 혼재된 영역이 존재하지만, 특정 화학물질이 아닌 자연시료를 통한 측정인 만큼 허용할 수 있는 결과라 평가할 수 있겠다.

(2) 컬러센서를 이용한 들깨의 원산지 판별

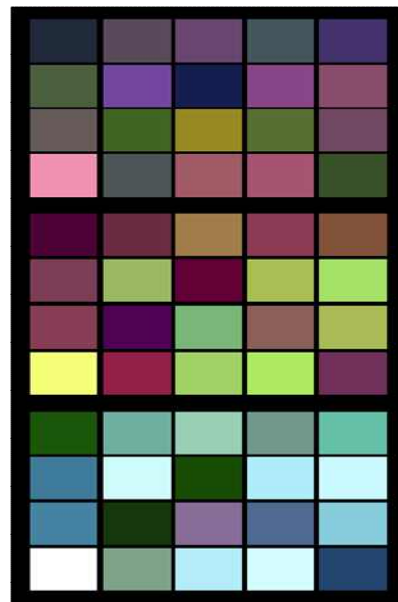
M13 박테리오파지를 자기조립하여 제조한 컬러센서를 이용한 들깨의 원산지 측정 결과 다음 그림에서 볼 수 있듯 참깨의 결과와 유사하게 wild와 4E 컬러센서에서 분별력이 없는 것으로 나타났다. 두가지 시료의 성질이 유사하다는 점을 고려할 때 충분히 납득할 수 있는 결과이며, 이후 실험은 WHW 박테리오파지를 이용한 칼라센서로 진행하였다.



(좌) 국산 및 수입산 들깨의 wild 칼라센서 측정 결과 (우) 4E 칼라센서 측정 결과

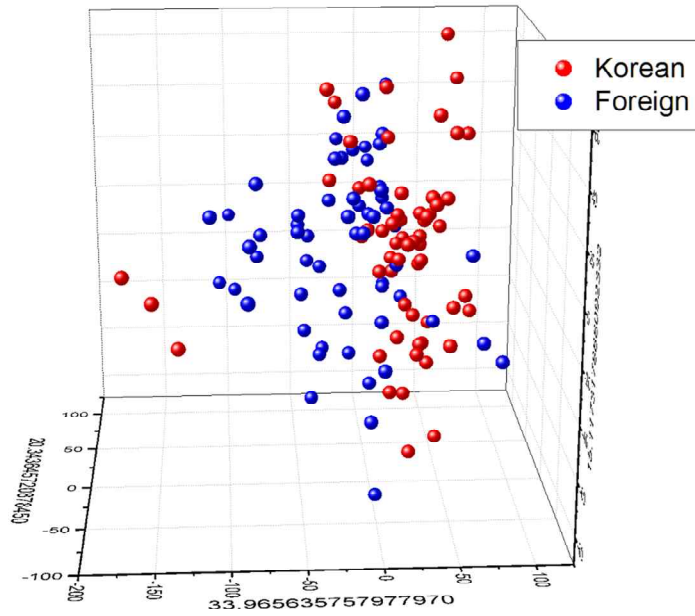


국산 들깨 20종



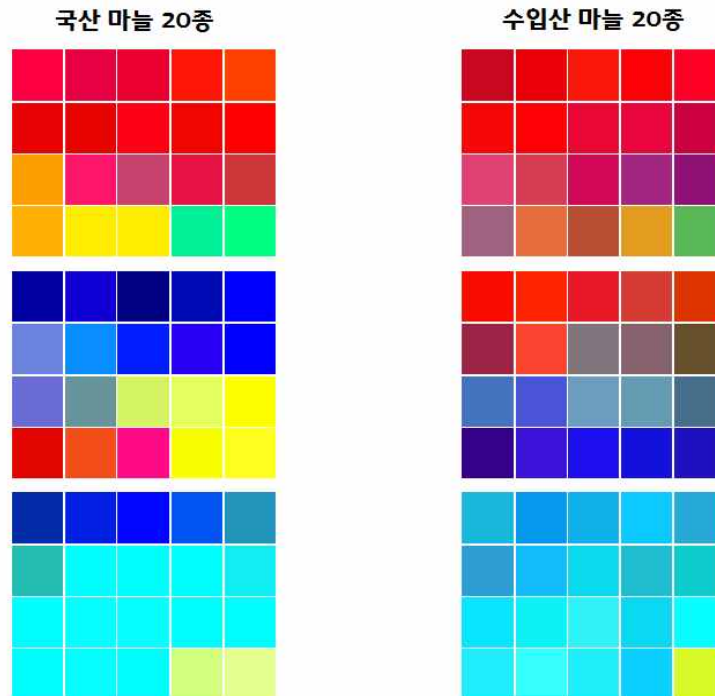
수입 들깨 20종

WHW 박테리오파지를 통해 제조된 칼라센서를 이용한 국산 및 수입산 들깨의 측정에서는 위에서 볼 수 있듯, 뚜렷한 색변화 차이를 얻을 수 있었으며, 이렇게 얻어진 결과의 PCA분석을 통해 주성분 합 66.5%를 얻을 수 있었다. 앞서 본 참깨의 PCA 분석결과가 유사하게 중앙분면에 일부 분별이 되지않는 영역이 존재하며 대체적으로 균일한 분별능력을 확인할 수 있었다.



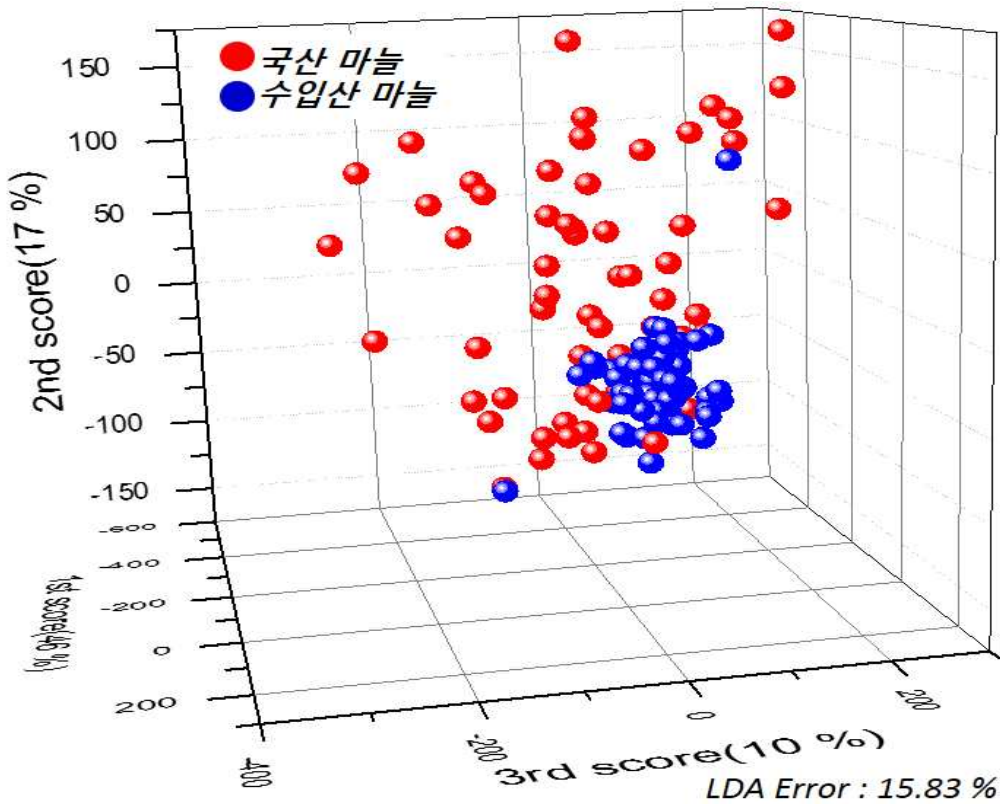
WHW 박테리오파지 칼라센서를 이용한 들깨 시료의 PCA 분석 결과

(3) 컬러센서를 이용한 마늘의 원산지 판별



국산 마늘 20종, 수입산 마늘 20종의 4E 칼라 패턴 이미지

본 연구팀은 국산 마늘 20종, 수입산 마늘 20종의 칼라센서를 측정후 30 ℃, 90 ℃의 이미지를 이용해 색 빼기를 한 후 위 그림처럼 칼라 밴드를 만들었다. 각 필름 별 칼라 패턴 이미지를 만들었다. 그 결과 4E 칼라 센서의 패턴 이미지가 가장 재현성이 있었고, 국산, 수입산의 차이도 알 수 있었다. 첫 번째 줄에는 수입산의 칼라밴드에 빨간색 패턴들이 많았고, 국산은 빨간색 및 초록색도 있고, 노란색 칼라 등 다양한 색깔들이 있음을 확인할 수 있다. 또한 두 번째 줄에서는 국산 마늘이 파란색, 노란색, 빨간색 등이 있는 반면에 수입산에서는 빨간색, 탁한 파란색, 진한 파란색 등 색깔의 변화가 크지 않았다. 마지막 줄에서는 수입산의 하늘색들이 국산의 하늘색들보다 더 진하고 비슷한 색깔들이 나옴에 따라 국산에 비교해서 수입산의 칼라가 국산에 비해 더 일정한 색깔이 나옴을 알 수 있었다.

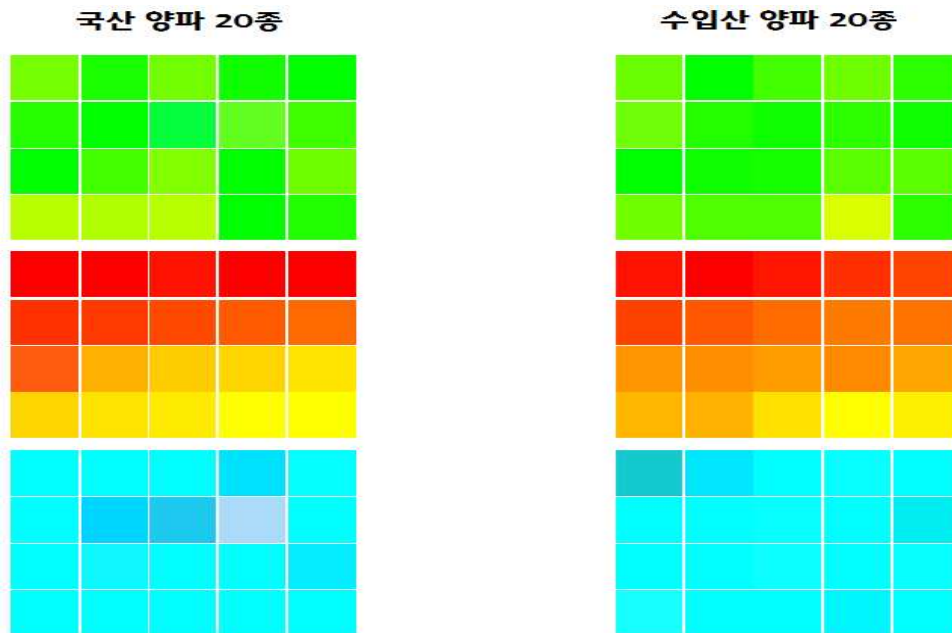


국산, 수입산 마늘의 PCA 3D 이미지

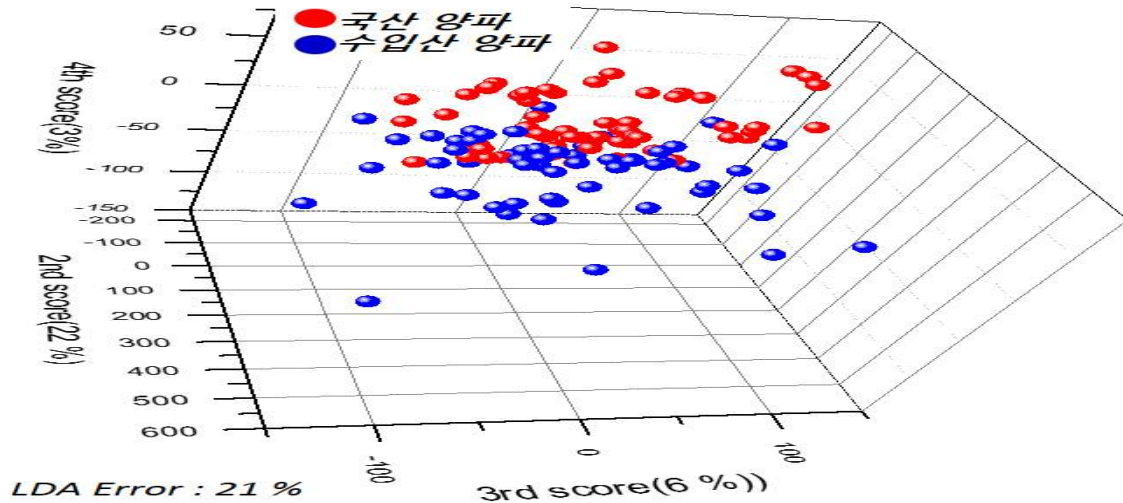
마늘의 칼라센서 분석을 통한 PCA 결과에서 주성분 값의 합은 73%로 나타났다. PCA가 데이터의 최적 표현의 관점에서 데이터를 축소하는 방법이라면, Linear discriminant analysis (선형판별분석법, LDA)는 데이터의 최적 분류의 관점에서 차원을 축소하는 방법이다. 클래스간 분산과 클래스내 분산의 비율을 최대화하는 방식으로 데이터에 대한 특징 벡터의 차원을 축소하는 방법이다. 따라서 LDA는 가능한 클래스간의 분별 정보를 최대한 유지시키기 위해서, 특징 공간상에서 클래스 분리를 최대로 하는 주축을 기준으로 사상시켜 차원을 축소하는 방법이라고 할 수 있다. 따라서 국산·수입산의 판별이라는 관점에서 보면 LDA를 사용하여 축소된 경우가 더 판별력이 우수하다고 볼 수 있다. 이에 마늘의 LDA의 error 값이 15.83 % 라면, 판별 정확도는 84 %라 말할 수 있다.

(4) 컬러센서를 이용한 마늘의 원산지 판별

또한 국산 양파 20종, 수입산 양파 20종의 칼라센서를 측정한 후 30℃와 90℃의 이미지를 이용해 색빼기를 한 후, 각 필름 별 칼라 패턴 이미지를 만들었다. 양파도 마늘처럼 마찬가지로 4E 칼라 센서의 패턴 이미지의 재현성이 우수했다. 첫 번째 줄에는 수입산의 칼라 패턴들은 진한 연두색들이 많았고 각 수입산 양파의 칼라 밴드 색깔들의 큰 변화가 없었다. 두 번째 줄의 국산 칼라 패턴에서는 빨간색, 노란색들이 많이 보이는 반면에 수입산에서는 빨간색, 주황색, 노란색 등 다양한 색깔이 많이 있었다. 마지막 줄에서는 수입산의 일정한 색깔들이 더 많았다.



국산 양파 20종, 수입산 양파 20종의 4E 칼라 패턴 이미지



국산, 수입산 양파의 PCA 3D 이미지

양파의 경우 PCA 2, 3, 4번째 score의 값을 이용했을 때 국산, 수입산 원산지 판별을 가장 잘 설명할 수 있었고, LDA의 error 값은 21 % 가 나왔다.

케모메트릭스 기법을 사용하여 원산지 판별 정확도 확인

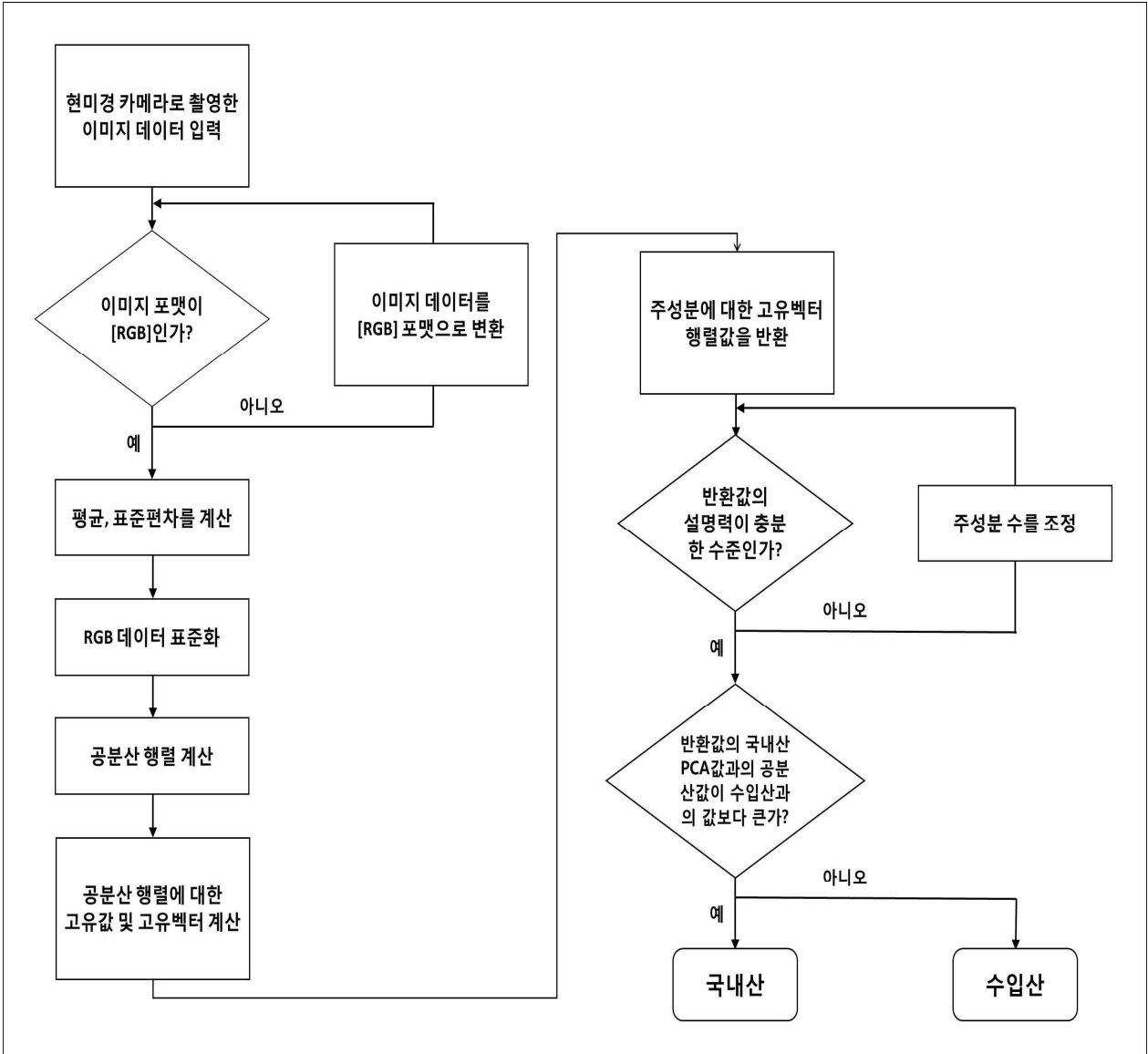
		Garlic				Onion			
		RGB	R	G	B	RGB	R	G	B
PLSDA	4E	54.7(9)	63.4(9)	60.8(9)	58.8(9)	59.8(9)	61.4(9)	66.3(9)	55.9(9)
	WHW	65.2(9)	66.8(9)	70.9(9)	70.3(9)	65.5(9)	63.0(9)	68.3(9)	71.5(9)
	Wild	60.8(9)	65.5(9)	73.5(9)	72.2(9)	59.5(9)	63.3(9)	62.0(9)	60.8(9)
PCA+SVM	4E	19.0	20.9	19.7	20.4	25.9	33.5	33.4	27.1
	WHW	31.1	28.5	39.8	34.8	34.8	43.9	33.1	43.0
	Wild	30.5	34.1	38.6	32.3	37.5	36.4	42.9	42.7
LDA	4E	15.83	-			21	-		

최종적으로 칼라센서 측정 시 얻은 RGB 데이터를 케모메트릭스 기법을 접목시켜 원산지 판별에 최적인 방법 연구를 하였다. 일반적으로 조성이 복잡한 농산물의 원산지 판별정확도를 향상시키기 위하여 Partial Least Square-Discriminant Analysis(부분최소제곱-판별분석, PLS-DA)를 많이 사용한다.

하지만 본 연구팀이 얻은 RGB 데이터에서는 PLS-DA로 얻은 결과 값(마늘 4E 필름 : 54.7 %, 양파 4E 필름 : 59.8 %)보다, PCA로 전처리 후 Support Vector Machine(서포트벡터머신, SVM)을 판별 분류기로 사용하였을 경우(마늘 4E 필름 : 19 %, 양파 4E 필름 : 25.9 %) 마늘, 양파에서 PLS-DA를 사용하였을 때보다 우수한 판별 성능을 보였다. 그리고 위 표에서 볼 수 있듯이 PLS-DA, SVM을 사용하는 것 보다 LDA의 판별 능력이 더 우수함을 확인할 수 있었다. (마늘 4E 필름 : 15.83 %, 양파 4E 필름 : 21 %)

○ 컬러센서 분석 프로그램 개발 (위탁)

확보된 데이터베이스를 실제 시제품에 적용시키기 위해서는 수동 또는 분리된 형태의 코드가 아닌 하나로 통일된 어플리케이션 형태의 프로그램이 필요하였다. 이는 모든 측정과정을 조절할 수 위한 프로그램 제작은 다음과 같은 알고리즘에 의해 제작되었다.



컬러센서 측정용 프로그램 알고리즘

```

static Matrix Compute(Matrix D){
    Matrix mean(1, D.cols());
    mean.setZero();
    for (int i = 0; i < D.cols(); i++) mean(0, i) = D.col(i).mean();
    Matrix s(1, D.cols());
    for (int i = 0; i < D.cols(); i++){
  
```

```

double ss{ 0 };
for (int j = 0; j < D.rows(); j++){
double tmp = (D(j, i) - mean(0, i));
tmp *= tmp;
ss += tmp;
}
ss /= (D.rows() - 1);
s(0, i) = sqrt(ss);
}
Matrix normD(D);
normD.setZero();
for (int i = 0; i < D.cols(); i++) for (int j = 0; j < D.rows(); j++) normD(j, i) =
(D(j, i) - mean(0, i)) / s(0, i);
mean.setZero();
for (int i = 0; i < normD.cols(); i++) mean(0, i) = normD.col(i).mean();
Matrix covariance(D.cols(), D.cols());
covariance.setZero();
for (int k = 0; k < D.cols(); k++){
for (int j = 0; j < D.cols(); j++){
double sum{ 0 };
for (int i = 0; i < D.rows(); i++) sum += (normD(i, k) - mean(0, k))*(normD(i, j)
- mean(0, j));
covariance(k, j) = sum / (D.rows() - 1);
}
}
EigenSolver<Matrix> solver(covariance);
Matrix eigenVectors = solver.eigenvectors().real();
Vector eigenValues = solver.eigenvalues().real();
int newDimension = brockenStickModel(eigenValues);
Matrix featureVectors(D.cols(), newDimension);
Vector sortEV(eigenValues);
sort(sort.derived().data(), sort.derived().data() + sort.derived().size());
for (int i = 0; i < newDimension; i++){
double max = sort(sort.rows() - 1 - i);
for (int j = 0; j < eigenValues.size(); j++){
if (max == eigenValues(j)){
Vector tmp = eigenVectors.col(j);
featureVectors.col(i) = tmp;
}
}
}

```



```

    }
    }
    return featureVectors;
}

```

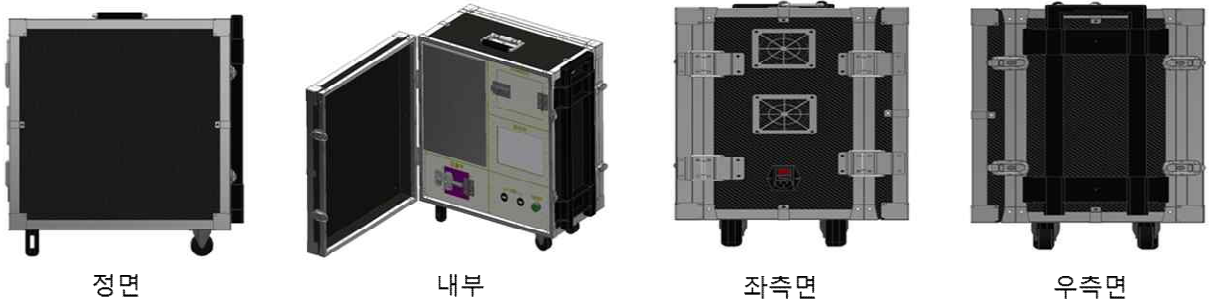
(위: PCA값 계산 함수)

제작된 프로그램은 컬러센서 측정값을 이용하여 농산물의 원산지를 판별하는 C 프로그램으로 구성하였다. 최종 원산지 판별에 관여하는 핵심 코드를 순서대로 살펴보면 우선 측정값을 위 소스의 Matrix D에 입력한다. 입력된 Matrix D는 평균을 0으로 표준편차를 1로 맞추는 표준화 작업(Normalization)을 한다. 그리고 각 색상 값에 대한 상관 행렬을 구해서 고유값(Eigenvalue), 고유벡터(Eigenvector)를 구한다. 여기서 큰 고유값은 원산지 판별에 대한 기여도가 크다는 것을 의미한다. 고유값 과 고유벡터가 충분한 설명력을 가지는 주성분의 수를 계산하고 결과값을 반환한다.

앞서 언급한 내용과 순서도의 흐름을 따라 주성분분석을 위한 변환을 하며, 앞서 프로그램 상에서 측정하고 저장한 값 또는 기존의 데이터베이스의 값들과 비교하여 국내산과의 연관성이 높은지, 수입산과의 연관성이 높은지를 계산하여 최종 판별 결과를 도출한다.

○ 원산지 선별 고성능 판별기 시제품 개발 (제1세부)

본 연구진은 외부이동이 가능한 휴대용 측정기기 개발을 위해 분석 정확도를 위한 정밀 온도 시스템과 정밀 광학검출 시스템, 그리고 외기환경으로부터의 영향을 차단하는 구조설계를 통한 최적의 시제품 개발을 수행하였다.

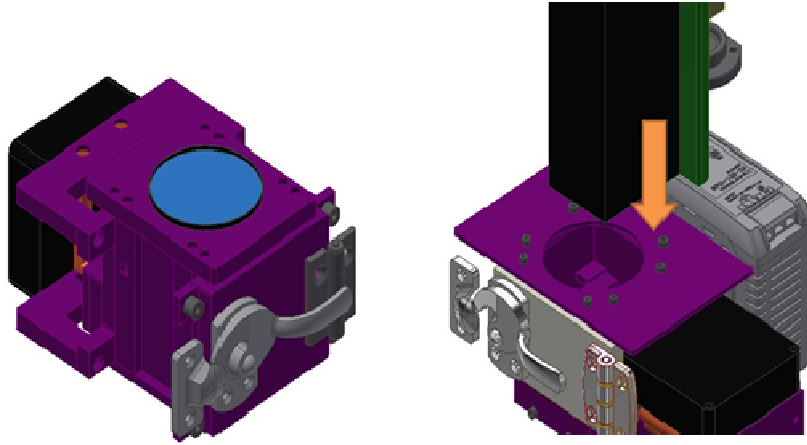


<시제품의 정면, 내부, 좌측면 및 우측면>

기본 설계는 광학부와 분석부, MIP구동을 위한 컴프레서, 냉각부 등으로 구성되었으며, 과제목표에 명기된 크기와 무게를 충족시키고자 하였다. 특징 점으로는, 분석 정확도 향상을 위한 정밀 온도조절 시스템이 있으며. 온도 시스템은 온도조절기, 히터, 냉각팬, 방열판, 핫플레이트, 온도 센서 등으로 구성된다. 온도조절 시스템은 고속 샘플링 기능을 구현하였으며, 가열과 냉각이 동시에 제어된다. 또한 SSR 구동 출력방식을 적용하여 일반 ON/OFF, 싸이클, 위상제어가 가능하다.

광학검출 시스템은 최대 2592x1944 해상도를 지원하는 500만화소 COMS 센서 사양의 전자현미경을 채용하였으며, B-270 고강도 광학원석을 적용한 필터를 시료챔버와 현미경 사이에 도입하여 내부 오염 가능성을 줄였다.

다음에서 볼 수 있는 바와 같이, 모든 체결 및 접합부위를 밀폐처리 및 WFT #1532를 적용, 0~0.5mm까지 모든 금속의 미세기공 및 헤어라인 균열을 함침하였다. 이렇게 완성된 밀폐 시스템은 광학검출시 오차 발생의 주요 요인이 되는 외부의 빛을 차단하여 측정 정밀도를 높일 수 있는 가능성을 제공한다.

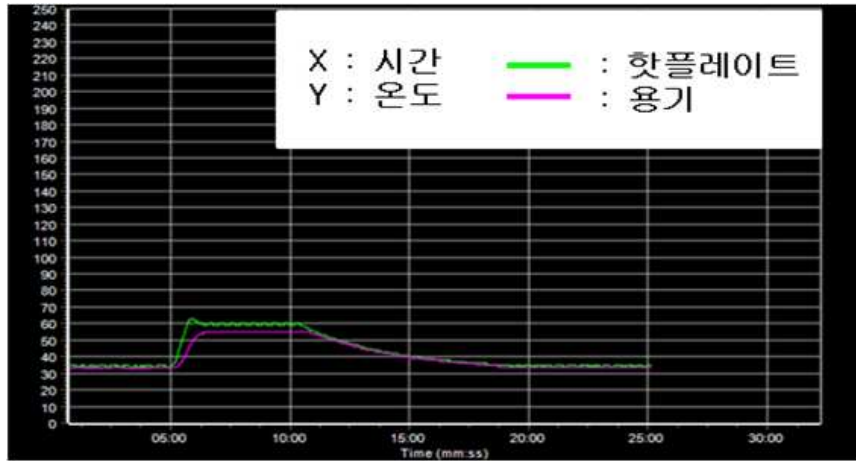


<외기환경으로부터 영향을 차단하는 구조 설계 (좌)시료챔버 (우)검출시스템과의 결합>

모든 조작은 WINDOWS 기반 컴퓨터에 의해 이루어지며, 현장 이동형 측정의 용이성을 위해 터치 스크린을 구현하였다. 또한 각종 무선 입력장치와 무선인터넷을 지원하여 현장에서의 다양한 상황에 대비할 수 있도록 하였다.

제작된 시제품의 온도성능은 최대 200℃까지 가능하다. 하지만 시험조건 측면에서 봤을 때 온도에 따른 시료별 성분 추출 시 60℃에서 추출 했을 때 효율성이 가장 높았고 그 외 온도에서 추출 시 효율성이 상대적으로 떨어짐을 확인하였다. 또한 시험장비 측면에서는 온도가 높을수록 가열 및 냉각의 시간이 상대적으로 늘어나게 되며 일정한 온도유지의 편차도 차이가 나게 된다. 그리고 컬러센서 및 시험장비의 내구성에도 영향을 미치기 때문에 시험조건 및 시험장비 측면에서 검토를 해본 결과 60℃에서 검출하는 것이 가장 효율적이다.

온도 제어 시험 결과 아래의 그래프와 표에서 볼 수 있듯이 고춧가루, 참깨, 들깨, 양파, 마늘의 측정에 공통적으로 적용되는 60℃까지의 가열 및 냉각이 10분 이내에 이루어짐을 알 수 있으며, 챔버 내부와 용기의 온도 편차 또한 크지 않음을 알 수 있다.



<시제품 측정부 챔버의 가열 및 냉각 그래프>

조건		시간(평균)	온도
핫플레이트	35℃→60℃	2분	60℃
	60℃→35℃	10분	
용기	35℃→60℃	2분	55℃
	60℃→35℃	9분 30초	

<지정된 초기온도에서 최종온도까지의 도달 시간 및 가열부와 측정용기간의 온도편차>



<시제품 실제 모습>

○ 원산지 판별기 현장 적용 가능성 검증시험 실시 (제2세부)

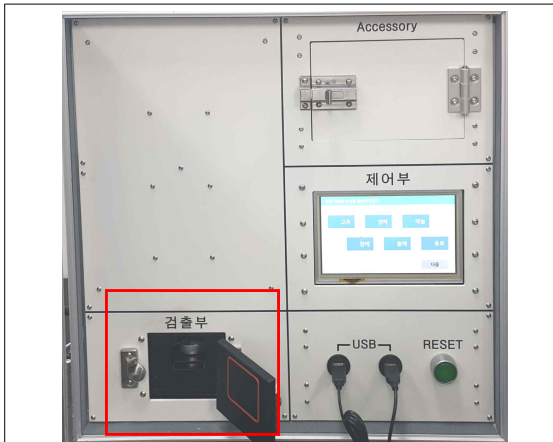
아스트(제1세부)가 제작한 아래 그림의 원산지 판별기를 이용하여 마늘, 참깨 등 시료의 판별 분석을 실시하였다.



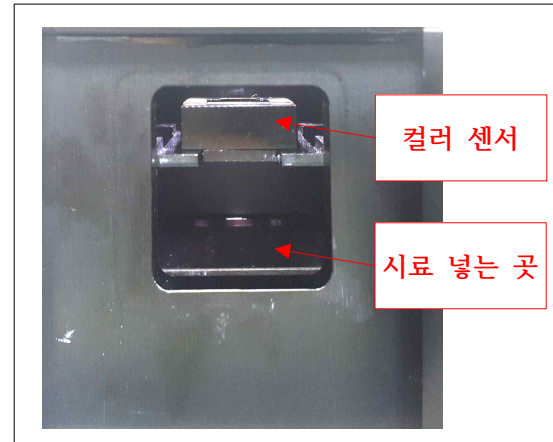
원산지 판별기(외부)



원산지 판별기(내부)

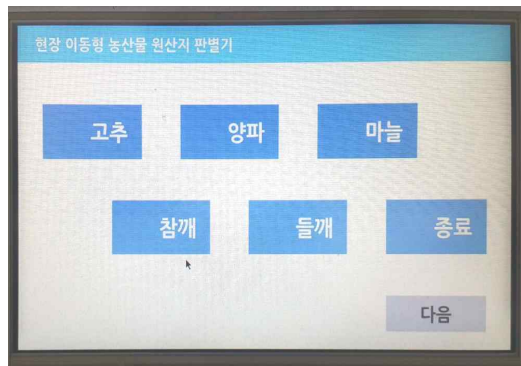


원산지 판별기(내부)

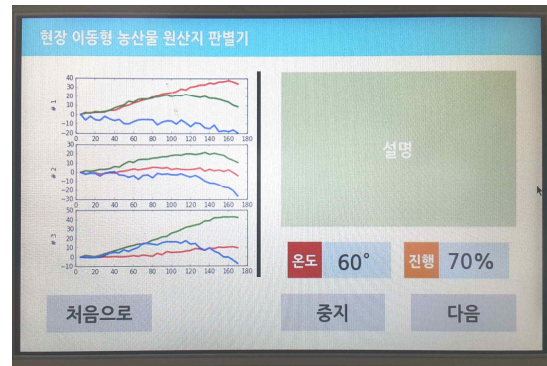


검출부(시료 투입구)

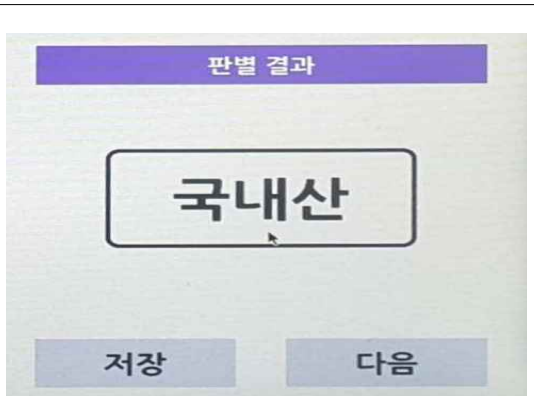
시료를 잘라 검출부에 넣고 판별 분석기 화면에서 품목을 선택하여 판별 분석이 간편하게 가능하였으며 판별 결과는 아래 사진과 같이 화면에 나타났다.



품목 선택 화면



분석 중 화면

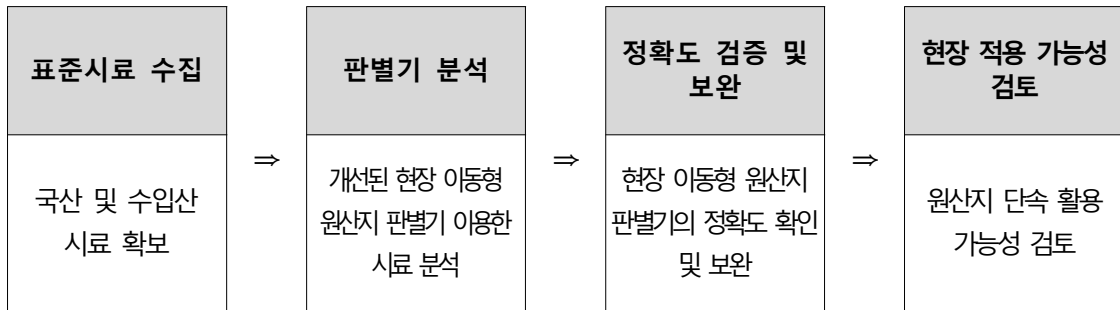


판별 결과

□ 현장 이동형 원산지 판별기 검증 계획

- 목적: 개발된 원산지 판별기 검증
- 대상: 개선된 현장 이동형 원산지 판별기
- 기간: 2016. 10. ~ 12.
- 검증 방법
 - 표준시료 수집
고춧가루, 마늘, 양파, 참깨, 들깨 품목별 20종의 시료(국내산 10종, 수입산 10종)를 수집
 - 판별기 분석
수집된 표준시료(고춧가루, 마늘, 양파, 참깨, 들깨 품목별 20종의 시료)를 개선된 현장이동형 원산지 판별기를 이용하여 분석
 - 판별 정확도 검증
표준시료의 원산지와 현장 이동형 원산지 판별기가 분석한 결과를 비교하여 정확도 검증

○ 검증 추진 체계



○ 검증 일정

연구내용	월 별 연구 추진 계획		
	2016년		
	'16.10	11	12
개선된 판별기 제작 완료			
표준시료 수집			
기기분석			
정확도 검증			
현장 활용 가능성 검토			
사업진도(%)	30%	70%	100%

□ 현장 이동형 원산지 판별기 매뉴얼

○ 현장 이동형 원산지 판별기 매뉴얼

기본적인 기기 운용은 프로그램상의 지시를 준수하며, 시료의 종류 선택에 오류가 없도록 주의한다.

1) 시료 준비

각 시료는 0.5g을 기준으로 하여 측정기에 비치된 저울을 이용하여 계량한다. 양과 마늘의 경우 사각형으로 절단하여 준비하여, 참깨, 들깨 및 고춧가루와 같은 형태의 시료는 직접 계량한다. 가능한 오차범위 0.1g 이내를 준수한다.

2) 측정 준비

계량된 시료를 측정 용기에 넣고 용기 슬롯에 삽입한 후 초기 측정 화면에서 시료 종류를 선택한다. 시료 종류의 선택 완료 후 다음 화면에서 칼라센서의 측정 영역을 지정한다. 영역은 기기상에 표시되는 이미지를 참고하여 같은 지점을 지정한다.

3) 측정

각 시료별 측정 조건은 사전에 입력되어 있으므로 화면의 설명에 따라 측정화면으로 진입한다. 측정이 시작되면 측정 시간동안 (약 5분) 가급적 측정기에 외부 충격을 가하지 않도록 안정된 환경을 유지하도록 한다. 측정이 완료되면 결과의 사용 여부에 따라 저장 또는 재측정을 결정하여 수행한다.

○ 원산지 판별기를 이용한 원산지 조사 지침(안)

1) 조사방법

해당 업소의 원산지 표시 대상 농산물 또는 그 가공품의 원산지 표시 상태를 육안으로 확인한 후, 외관상의 형태·맛·냄새·촉감·소리 등의 특성을 이용하여 대상품목의 원산지 표시의 위반 여부를 조사한다. 이 경우 육안으로 식별이 곤란하거나 원산지 표시 위반이 의심되는 경우에는 원산지 검정을 위한 시료를 수거하여 현장 이동형 원산지 판별기를 이용하여 원산지를 판별하며, 수입산 또는 검정불가 시료는 시험연구소에 정밀분석을 의뢰하여야 하며, 시료를 수거하였을 경우에는 확인서에 그 내용을 기록하여야 한다.

2) 시료의 검정

(1) 시험연구소장은 지원장 및 사무소장, 지방자치단체장 또는 검찰·경찰·세관 등 관계기관에서 의뢰하는 시료의 검정을 담당하며, 각 지원장은 지원 및 사무소의 조사원이 수거한 시료의 검정을 담당한다.

3) 원산지 검정방법 및 검정결과 통보

(1) 시험연구소장 및 지원장은 원산지 검정을 의뢰 받았을 경우 이를 관리시스템의 원산지관리 항목에 접수를 하고, 특별한 사유가 없는 한 접수한 날로부터 10일(공휴일 제외) 이내에 [별지 제5호서식]에 의한 원산지 검정결과를 의뢰기관에 통보하여야 한다. 다만, 시험연구소장 및 지원장이 검정업무량의 증가, 식별방법연구, 피의자 신문 등 불가피한 사유가 있는 경우에는 검정결과 통보 예정일을 별도로 정하여 통보할 수 있다.

4) 시료검정을 의뢰하여 통보 받은 사항의 처리

시료검정 결과 수입산 또는 혼합 된 것으로 통보받은 경우 유통과정 추적조사 등을 통하여 위반사실 여부를 밝혀내어 처리한다. 다만, 위반사실을 밝혀내지 못할 경우에는 내부보고로 종결 처리한다.

- 관련 참고: [농산물 원산지 표시 조사 요령] 농관원 예규 제197호(2015. 11. 09)

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
<p>4-1. 목표달성도</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 원산지 판별용 센서 시제품 제작 (비중 15%, 달성도 100%) <ul style="list-style-type: none"> - 규격 50 * 50 * 50 cm 이내의 시제품 제작 - 1가지 대상품목의 40종 이상의 분석을 통하여 80%이상의 분석정확도 확보 - 30분 이내의 전처리 과정을 포함하여 10분 이내의 분석 및 판결 시스템의 시제품 제작 ○ 최적화된 분석 센서 시스템의 제품화 및 산업화 (비중 10%, 달성도 50%) <ul style="list-style-type: none"> - 5가지 대상품목의 40종 이상의 분석을 통하여 95%이상의 분석정확도 확보 - 전처리 과정을 포함하여 10분 이내의 분석 및 판결 시스템의 시제품 제작 ○ 다양한 기능성 파지를 기반으로한 특정 지표물질과 가장 최적화된 컬러나노구조체 확보 (비중 15%, 달성도 100%) <ul style="list-style-type: none"> - 특정 지표물질을 10ppm 이내의 농도에서 판별가능 여부 ○ 시제품을 기반으로 휴대용 실시간 데이터 처리기술 개발 (비중 15%, 달성도 100%) <ul style="list-style-type: none"> - 색 정보 분석이 가능한 간단한 카메라 및 소프트웨어연동을 통하여 간편하고 휴대가능한 실시간 데이터 분석처리기술 개발 ○ 원산지 판별을 위한 농산물 시료수집 및 특정 지표물질 선정 분석 (비중 10%, 달성도 100%) <ul style="list-style-type: none"> - 5가지 농산물 품목별 국산 및 수입산 각 50종 시료 분석, 5품목 이하의 지표물질 선정 ○ 현장보급을 위한 실증시험 및 보급메뉴얼 제작 (비중 5%, 달성도 100%) <ul style="list-style-type: none"> - 5가지 품목의 농산물 고유 지표성분 확립 및 현장실증 시험 및 메뉴얼 제작 ○ 분자각인 고분자를 적용시킨 분석 카트리지 시제품 제작 (비중 15%, 달성도 100%) <ul style="list-style-type: none"> - MIP 카트리지 투과시 1가지 품목의 농산물 고유 지표물질의 70% 이상의 수득율 확보 ○ 시료별 원산지 판별인자를 각인시킨 필터 카트리지 제품 제작 (비중 15%, 달성도 100%) <ul style="list-style-type: none"> - 각 품목별 농산물 고유 지표물질을 85% 이상의 수득율을 가지는 전처리 필터카트리지 제품제작. 	

1차년도

- **고유지표 물질의 선별적 분류를 위한 고분자 기반의 채널 개발**
 - MIP를 이용한 분자각인 시스템 개발
 - 각종 압력지표를 이용한 효율적 분자각인 시스템 활용법 개발
- **농산물 특정 지표물질과 선택적으로 반응하는 수용체(receptor) 개발**
 - 유전자 조작을 통한 각각의 시료 농산물에 대해 선택적으로 반응하는 단백질 서열 개발
 - WHW, 4E 수용체의 개발로 고춧가루, 참깨, 들깨, 마늘, 양파 등의 시료에 대한 선별적 선택적 측정 가능
- **특정 농산물 지표 검출 박테리오파지 기반 컬러센서 개발**
 - Pulling technique를 이용한 박테리오파지 자기조립체 개발

2차년도

- **고유지표 검출용 기능성 박테리오파지 기반 컬러 센서 시제품화**
 - 1차년도에 개발된 단백질 서열의 실질적 응용 가능성 확인
 - 각각의 시료에 대한 데이터베이스 구축 및 검증 실시
- **컬러센서 특성 분석을 통한 검출시스템 확립**
 - 50 x 50 cm 이내의 시제품 제작
 - 실제 시료를 통한 다각적인 검증 완료
 - 기구축된 데이터베이스와의 연계성 검증 및 활용법 확립
- **실시간 휴대용 센서 시스템을 위한 데이터 분석처리기술 개발**
 - PCA 및 LDA 분석법을 기본으로 한 C언어 기반 프로그램 제작 완료
 - 최신 개발툴인 파이썬을 이용함은 물론, 비전문가도 손쉽게 사용할 수 있도록 간결하고 직관적인 User Interface (UI) 적용
- **시중 유통 농산물을 대상으로 실제 단속 현장에서 이동형 농산물 원산지 판별기 현장 적용 가능성 실증 검증 실시**
 - 수차례 자체검증을 통한 적용 가능성 확인

4-2. 관련분야 기여도

- 세계최초로 특정 물질과 특이적으로 반응하는 펩타이드를 발현하는 박테리오파지 나노구조체를 제작하여 농산물 특정 지표물질과의 반응에 따른 색 변화에 대해 연구하고, 이를 활용하여 휴대 가능하며 신속하게 수 ppm 단위의 고감도 분석이 가능한 나노-바이오 융합형 컬러 센서로 개발을 하였다.
- 낮은 농도의 특정 대상 물질을 선택적으로 감지할 수 있는 고감도·고선택성 컬러센서의 개발을 최종 목표로 하고 있으며, 나아가 휴대용 실시간 분석기를 개발하여 장소에 구애받지 않고 실시간으로 대상을 검출하여 즉각적으로 정보를 전송할 수 있는 시스템을 구축하고자 한다. 특히, phage display 기술로 잘 알려진 바이러스(M-13 박테리오파지)를 기본 물질(basic building block)로 사용함으로써, 특수한 대상 물질(농산물 특이지표, 병원균, 단백질, 폭발물, 중금속 등)에 특정 반응을 일으키는 수용체를 개발하여 기존 시스템에서 구현하지 못한 높은 선택성을 가지는 컬러센서를 개발 하고자 한다.
- 농산물 원산지 관별을 위하여 나노 소재를 이용한 농산물의 지표 성분 분석 및 센싱 기술 과정을 이해함으로써 식품영양학, 생명공학, 농학, 화학, 나노소재공학 등 다양한 분야에서 활발한 지식 및 정보 교류가 이루어 질 것이다.

5. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

현재 우리나라 수입 농산물의 시장 규모는 매년 꾸준히 증가하는 추세로 2012년 기준 34조 원규모의 시장을 형성하고 있다. 그중 고춧가루, 깨, 양파 등은 쌀 다음으로 수입규모가 크며 대다수 중국산에 의존하고 있는 실정이다. 현재 원산지를 허위로 신고한 농산물의 적발 사례는 10년 사이 5배 이상 증가하고 있으며 심지어 대형마트에서 조차 원산지 허위농산물이 적발 사례가 나타나고 있다. 이로 인해, 먹거리에 대한 국민들의 불신이 증가하는 결과를 초래하게 되었다.

상품 수요자들에게 휴대성이 용이하며, 현장에서 즉석으로 신속하게 농산물 원산지 판별을 위한 컬러필름 형태의 분석 장비를 제공 할 수 있으며, 연구원 뿐 아니라 농산물을 소비하는 일반 사람들도 간편하고 이해하기 쉬운 사용법을 통하여 마트에서 손쉽게 농산물 원산지 판별을 수행할 수 있는 환경을 만드는 것을 목표로 한다.

○ 개발 기술의 현장 보급 확산을 위한 관련 정책안

- 본 과제에서 목표물로 정한 농산물(고춧가루, 마늘, 양파, 깨)의 원산지 판별 기술을 바탕으로 다양한 농산물의 원산지를 판별할 수 있는 기반을 마련 한다. 추후 연속적인 연구 수행을 통해 다른 목표 농산물에 대한 원산지 판별 기술을 개발한다.
- 박테리오파지 기반 컬러 센서에 접근성 높은 스마트 폰을 도입함으로써 연구자뿐만 아니라 일반 소비자들도 손쉽게 현장에서 농산물의 원산지 판별을 수행할 수 있는 환경을 만든다.
- 농산물의 원산지 판별은 우리 나라 국민의 먹거리와 건강에 직결된 문제로 대다수의 국민이 큰 관심을 가지고 있다. 이에 본 연구 개발의 결과를 기업으로 기술 이전을 하여 제품화 한다면 높은 수익을 창출 할 수 있을 것으로 기대한다. 특히, 무분별한 외국산 농산물의 유입을 막음으로써 국내 농산물의 경쟁력을 강화 시킬 뿐만 아니라 수익을 증대 시킬 수 있을 것으로 기대한다.
- 본 연구 개발은 농산물의 원산지 판별뿐만 아니라 IT 기기를 통해 현장에서 실시간 측정 가능한 센서 시스템을 구축함으로써 고부가가치 IT 산업에서의 휴대용 센서 기술 발전을 촉진 시킬 수 있다.
- 농산물 원산지 판별을 위하여 나노 소재를 이용한 농산물의 지표 성분 분석 및 센싱 기술 과정을 이해함으로써 식품영양학, 생명공학, 농학, 화학, 나노소재공학 등 다양한 분야에서 활발한 지식 및 정보 교류가 이루어 질 것이다.

○ 기대성과

상품 수요자들에게 휴대성이 용이하며 간단하고 신속한 원산지 분석 결과를 제공하기 위해 컬러 필름 형태의 분석 장비를 개발함으로써 농산물 및 식품산업 종사자와 소비자들에게 신속 정확하게 원산지 분석 결과를 제공 할 수 있다. 이는 농산물 및 식품 안정성은 물론 생산자와 판매자에 대한 신뢰도를 높여 소비자들로 하여금 안전한 소비를 유도할 수 있다. 이를 통해 경제적으로는 국내 농산물 소비를 촉진시키고, 신뢰 가능한 농산물의 유통시장을 활성화시킴으로써 국내 농산물 산업을 안정화 할 수 있다. 또한 각종 IT기기를 적극 이용한 분석 기술은 IT산업에도 영향을 미쳐 경제·산업적 측면에서 다양한 효과를 누릴 수 있을 것으로 기대 된다.

○ 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도
직접 경제효과	1,000	3,000	10,000	50,000	1,000,000
경제적 파급효과	2,000	40,000	150,000	600,000	2,000,000
부가가치 창출액	30,000	40,000	60,000	1,000,000	1,500,000
합 계	33,000	83,000	220,000	1,650,000	4,500,000

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

				코드번호	D-08
Sensor type	Prove	Analyte	Detection limit	Year	Ref.
Quartz crystal microbalance (QCM)	fd phage displaying VTPPTQHQ	Salmonella typhimurium	$10^2 \text{ cell/sml}^{-1}$	2006	6
	fd phage displaying β -gal-binding peptide	β -gal from E.coli	2pm	2007	7
Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)	fd phage displaying target-binding peptides on PVIII	Streptavidin, avidin and β -gal	n.a	2000	8
	T7 phage displaying mAbs F4, F5 and LT1 binding heptapeptide	mAbs F4, F5 and LT1	n.a	1999	9
	M13 phage displaying HBsAg binding heptapeptide on PIII	Hepatitis B surface antigen	$K_d=2.9\text{nM}$	2005	10
Fluorescent bacteriophage assay(FBA) flow cytometry	Fluorescent bacteriophage	E. coli O157:H7	2.2CFUg^{-1}	1999	11
Fluoroimmunoassay	M13 phage displaying TNT binding peptide	TNT	10ugmL^{-1}	2002	12
	Recombinant anti-TNT antibodies	TNB	1ngmL^{-1}	2003	13
	Cy5 dye labelled M13 phage	SEB	1.4ngmL^{-1}	2000	14

Amperometry	M13 phage with a gene for alkaline phosphatase	E. coli TG-1	1CFU μ L ⁻¹	2005	15
	Phage-displayed antibodies	Lactose, L.monocytogenes	n.a	2001	16
Electrolyte-insulator-semiconductor(EIS)	M13 phage immobilized on electrode	PSMA	120nM	2006	17
	M13 phage immobilized on electrode	Anti-M13 antibody	20nM	2008	18
Surface plasmon resonance(SPR)	phage displayin CPMV binding peptide	Cowpea mosaic virus	n.a	2006	19
	β -gal binding landscape phage	β -gal	1pM	2007	20
	phage Lm P4:A8 displayed scFv antibody	L.monocytogenes actin polymerization protein	4.5nM	2007	21
	Lytic phage	S. aureus ssp.aureus	10 ⁴ CFU μ L ⁻¹	2007	22
	Anti-aflatoxin B ₁ scFv antibodies	Aflatoxin B ₁	3ngmL ⁻¹	2002	23

현재 연구 개발되고 있는 바이러스(박테리오파지) 기반 센서 시스템

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>가. 연구실 안전 점검 체계 및 실시</p> <p>1) 연구실 안전관리 조직</p> <ul style="list-style-type: none"> - 안전관리 조직 <ul style="list-style-type: none"> • 안전관리총괄책임자 : 대학원장 • 기관별안전관리책임자 : 각 기관별 장(ex.단과대학장) • 연구실별 안전관리자 정-부: 학과장 및 지도교수 - 조교 및 대학원생 • 연구활동종사자 : 과학기술분야 학부생, 대학원생, 연구원, 조교, 교수 등 - 관련 위원회 <ul style="list-style-type: none"> • 실험·실습실안전관리위원회(위원장 대학원장) : 연구활동 수행시 발생할 수 있는 안전사고 예방 및 교내환경오염 방지 등 • 방사선안전관리위원회: 방사선동위원소와 방사선발생장치의 생산, 판매, 사용을 규제하고 방사선동위원소 등에 따른 방사선 장해를 방지하여 안전을 확보 • 동물실험윤리위원회: 「동물보호법」이 시행됨에 따라 실험동물의 보호와 윤리적인 취급을 도모 <p>2) 연구실 안전점검</p> <ul style="list-style-type: none"> - 일상점검 : 매일 실험 전과 퇴실 전 - 자체점검(년 2회) : 7월, 12월(학기 종료후 15일 이내-부산대 실험실 규정 제10조) <ul style="list-style-type: none"> • 점검시행기관 및 담당자 : PNU-연구실안전정보망 관리대상 연구실 및 각 연구실 안전관리자 정-부 • 점검 목적 : 연구실 시설물에 대한 안전점검 및 취급, 유지관리 • 점검 내용 : 일반사항, 산업위생, 화공·소방·전기·기계·가스·생물안전, 폐액관리 등 • 점검 후 조치 사항 : 자체적으로 시정 가능한 것은 자체 처리 / 자체 처리가 불가능한 것은 시설과에서 공사 시행 		

- 정기점검(1회) : 매년 1회
 - 점검시행 기관 및 담당자 : 연안법 관련 점검 가능 업체 및 시설과 담당자
 - 점검 목적 : 부산대 연구실에 대한 전반적인 안전점검
 - 점검 내용 : 일반사항, 산업위생, 화공·소방·전기·기계·가스·생물안전, 폐액관리 등
 - 점검 후 조치 사항 : 자체적으로 시정 가능한 것은 자체 처리 /
 자체 처리가 불가능한 것은 시설과에서 공사 시행
- 정밀진단 : 2년 1회
 - 점검시행 기관 및 담당자 : 연안법 관련 점검 가능 업체 및 시설과 담당자
 - 점검 목적 : 부산대 연구실에 대한 정밀한 안전점검
 - 점검 내용 : 일반사항, 산업위생, 화공·소방·전기·기계·가스·생물안전, 폐액관리 등
 - 점검 후 조치 사항 : 자체적으로 시정 가능한 것은 자체 처리 /
 자체 처리가 불가능한 것은 시설과에서 공사 시행

나. 교육 훈련

1) 연구활동종사자 집합교육

- 대상자 : 교육 참가자-대학원생 / 교육 이수자
- 일 정 : 매년 3월 23일(1차), 3월 30일(2차), 4월 6일(3차)
- 교육내용 : 1차-생물,화학 계열 / 2차-물리,기계 계열 / 3차-영어교육(외국인 대상)
- 미이수자에 대한 조치 : “PNU-연구실안전정보망”에서 사이버교육 이수할 수 있도록 안내

2) 연구활동종사자 사이버교육

- 일 정 : 매년 4월 ~ 11월(8회)
- 대상자 : 집합교육 미참석자·미수료자
- 교육내용 : A,B,C 반 정기(대학원 2년차 이상)교육/ A,B,C 반 신규(대학원신입생, 학부생 등)교육



- 교육평가 : 매년 12월
- 교육 미이수자 : 익년 집합교육 참가 및 자체교육결과 기록부 제출

다. 연구실 시설개선

- 수요조사 시행과 점검지적사항 현장실사 : 매년 5월 ~ 7월
- 설계 및 발주 : 매년 8월 ~ 9월
- 보완공사 : 매년 10월 ~ 12월

라. 연구활동종사자 안전보험 가입

- 대상인원 : 과학기술분야 연구활동종사자
단, 연구활동종사자 중 4대 보험가입자는 제외(ex.교수, 조교, 연구원 일부 등)
- 보험가입 대상자 조사 : 매년 5월
- 보험가입 : 매년 6월
 - 법적기준 : 연구실안전환경조성에 관한법률 제14조, 동법 시행령 제15조
 - 보험가입기간 : 매년(365일)
 - 보험가입회사 :(사)교육시설재난공제회

마. 연구활동종사자 건강검진

- 건강검진 대상 : 과학기술분야 연구활동종사자 중 휘발성유기화합물(TVOC), 포름알데히드(HCHO) 등
측정을 통해 대상 연구실 선정
- 대상자 조사 : 매년 8월
- 건강검진 시행 : 매년 10월 ~ 12월
 - 건강검진 기관 :(재)한국의학연구소 부산종합검진센터
 - 건강검진 종류 : 일반건강검진(문진,진찰,혈압,혈액,소변검사,신장,체중,시력,청력측정,흉부방사선촬영), 특수건강검진(청력,폐기능,간기능,조혈기계,치아검사,소변검사 등)

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Exploring supervised neighborhood preserving embedding (SNPE) as a nonlinear feature extraction method for vibrational spectroscopic discrimination of agricultural samples according to geographical origins	한양대학교	주저자	Talanta	4.035	2015.07.09	중복사사	SCI
2	논문	Bioinspired M-13 bacteriophage-based Photonic Nose for Differential Cell Recognition	부산대학교	주저자	Chemical Science	9.144	최종수정개 재중	중복사사	SCI
3	논문	M-13 bacteriophage based structural color sensor for detecting antibiotics	부산대학교	주저자	Sensors and Actuators B	4.758	최종수정개 재중	중복사사	SCI
4	논문	Formation of water soluble wavelength tunable InGaP and InP quantum dots	부산대학교	주저자	Polymer Bulletin	1.371	2016.04.28	중복사사	SCI
5	특허	변색 센서, 이를 포함하는 캡사이신 또는 발린의 농도 추정 시스템 및 농산물의 원산지 판별 시스템	부산대학교	발명자	대한민국	-	2015.07.27. 출원	단독사사	-

11. 기타사항

코드번호	D-13

12. 참고문헌

코드번호	D-14
<ol style="list-style-type: none">1. Ge, J. and Yin. Y. J. Mater. Chem., 2008, 18, 50412. Rakow, N. A. and Suslick, K. S. Nature, 2000, 406, 7103. Lim, et al., Nature Chemistry, 2009, 1, 5624. Chah et al., Chemistry & Biology, 2005, 12, 3235. Lee et al., ACS nano. 2012. 6. 6. 56216. Olsen et al., ECS Trans, 2007, 2, 97. Nanduri et al., Bioelectron 2007, 22, 9868. Petrenko and Smith, Protein Eng 2000, 13, 5899. Houshmand et al., Biochem, 1999, 268, 36310. Tan et al., J. Virol, 2005, 34, 3511. Goodridge et al., J. Food Microbiol 1999, 47, 4312. Goldman et al., Anal. Chim. Acta, 2002, 457, 1313. Goldman et al., J. Environ. Monit, 2003, 5, 38014. Goldman et al., J. Mol. Recognit, 2000, 13, 38215. Neufeld et al., Anal. Chem, 2005, 77, 65216. Benhar et al., Talanta, 2001, 55, 89917. Yang et al., Anal. Chem, 2006, 78, 326518. Yang et al., Anal. Chem, 2008, 80, 569519. Torrance et al., J. Virol. Methods 2006, 134, 16420. Nanduri et al., Anal. Chim. Acta 2007, 589, 16621. Nanduri et al., Biosens. Bioelectron 2007, 23, 24822. Balasubramanian et al., Biosens. Bioelectron, 2007, 22, 94823. Daly et al., Food Agric. Immunol 2002, 14, 25524. Chung et al., Nature, 2011, 478, 36425. Huang et al, Korean J. Food Sci. Technol. 2014, 46, 39526. Lee et al, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2013, 42, 12927. Jeong et al, J. Agri. & Life Sci. 2009, 43, 5128. Oh et al, Korean J. Food Sci. Technol, 2011, 43, 55329. Lee et al, J. Agric. Food Chem. 2011, 59, 85730. Gulati et al, J. Green Chem. Bioprocess 2013, 3, 131. Wang et al, Pak. J. Bot, 2013, 45, 17732. Vichi et al, J. Mass Spectrom. 2012, 47, 117733. Kim et al, Korean J. Crop Sci, 2014, 59, 15134. Lee et al, Korean J. Food Sci. Technol, 2014, 46, 636	

주 의

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