

발간등록번호

11-1543000-001953-01

수출전략기술개발사업 R&D report

할랄 제품의 돈육/돈지 및 알코올 검출을 위한 신속 진단 기법 개발 최종보고서

2017 . 12. 12.

주관연구기관 / 중앙대학교
1협동연구기관 / 경상대학교
2협동연구기관 / (주)메덱스
위탁기관 / 숙명여자대학교

농림축산식품부

2. 제출문

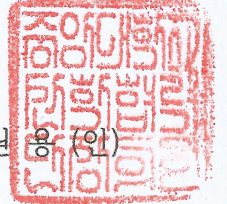
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

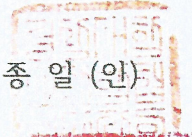
본 보고서를 “할랄 제품의 돈육/돈지 및 알코올 검출을 위한 신속 진단 기법 개발”(개발기간 : 2015.08.31 ~ 2017.08.30)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 12. 12.

주관연구기관명 : 중앙대학교 산학협력단 (대표자) 김 원 용 (인)



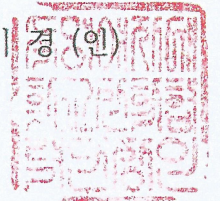
협동연구기관명 : 경상대학교 산학협력단 (대표자) 정 종 일 (인)



협동연구기관명 : ㈜메덱스 (대표자) 김 경 풍 (인)



위탁연구기관명 : 숙명여자대학교 산학협력단 (대표자) 성 미 경 (인)



주관연구책임자 : 박 태 정

협동연구책임자 : 심 원 보

협동연구책임자 : 박 홍 제

위탁연구책임자 : 윤 요 한

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	315050-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2015.08.31. ~ 2017.08.30	단 계 구 분	총 단 계
연구사업명	단 위 사 업	수출전략기술개발사업			
	사 업 명				
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	할랄 제품의 돈육/돈지 및 알코올 검출을 위한 신속 진단 기법 개발			
연구책임자	박 태 정	해당단계 참 여 연구원 수		해당단계 연 구 개 발 비	
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 37 명 내부: 37 명 외부: 0 명	총 연구개발비	정부:600,000천원 민간:200,000천원 계:800,000천원
연구기관명 및 소속부서명	중앙대학교, 경상대학교, 숙명여자대학교			참여기업명: (주)메덱스	
위탁연구	숙명여자대학교			연구책임자: 윤 요 한	
<ul style="list-style-type: none"> • 염기 존재 하에 알콜과 반응하여 형광을 나타내는 프로브를 합성했고, 이를 파이버 형태로 만들었으며 실제 유제품에 알코올을 spiking한 시료의 경우 역시 형광을 나타낸다는 것을 입증 • 돈지육 및 돈육으로부터 열에 안정한 crude protein 추출하여 이를 면역원으로 하여 돈지육과 돈육에 특이적으로 반응하는 항체를 성공적으로 개발 • 개발키트에 적합한 정량 및 정성결과를 판독할 수 있는 리더기 시제품 개발 - 상용화된 리더기에 개발키트를 적용할 수 있도록 결 				보고서 면수 : 154	

과관독 조건 최적화

- 키트 디바이스에 맞는 디바이스 홀더 제작
 - 키트 디바이스 제작
-

국문 요약문

	코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 할랄 식품에서 돈육/돈지육 및 알코올 성분 검출용 바이오센서 개발 및 성능 향상 연구 ○ 돈육/돈지육 및 알코올 검출용 바이ורי셉터 및 나노입자를 이용한 성능향상 융합기술 연구 ○ 돈육/돈지육 및 알코올 검출을 위한 현장 및 다중 분석용 고감도 정성, 정량 분석 광학 나노 바이오센서 칩(스트립) 개발 ○ 돈육/돈지육 및 알코올 검출을 위한 고감도 나노바이오센서 개발 ○ 돈육/돈지육 및 알코올 검출을 위한 휴대용 장치 및 제품화 기술 개발 	
연구개발성과	<p>1. 제 1 세부과제 (주관) : 알코올 검출 나노바이오센서 원천기술 개발. 고감도 신호검출 원천 기술 개발의 일환으로서 알코올과 반응시 형광을 나타내는 프로브 합성하였고, 염기의 농도에 따라 나타나는 양상을 파악 후 에탄올의 농도에 따른 검출양상을 확인하였다. 프로브를 고정화시키기 위해 프로브가 포함된 나노파이버를 합성한 뒤 염기 존재하에 알코올과 반응하는지 확인하였으며, 요구르트 및 우유 등의 유제품에 알코올을 첨가한 뒤 실제로 형광이 나타나는지 확인하였다.</p> <p>2. 제 1 세부 위탁과제 : 할랄 진단기 효율성 분석. 연구대상 식품군을 선정하고, 간이 진단기 이용을 위한 식품 전처리 방법 확립하였다. 간이 진단기를 이용한 의도적 오염 할랄식품을 분석하였는데, ELISA 분석방법을 이용하여 돈지를 검출하였고 PCR 방법과 간이 진단기를 활용한 방법에서의 검출력을 비교하였다.</p> <p>3. 제 1 협동과제 : 돈육 및 돈지육 검출 나노바이오센서 원천기술 개발. 돈지육 및 돈육으로부터 열에 안정한 단백질 추출하고 이를 항원으로 하여 항체를 생산하였다. 면역한 마우스의 비장세포를 암세포와 세포융합하여 특이 항체생산 하이브리도마 세포주를 개발하였으며, 마우스를 이용하여 항체를 대량생산한 후 항체 특성을 확인하였다. 생산된 항체를 이용하여 ELISA 분석법 및 스트립 분석법을 확립하였다.</p> <p>4. 제 2 협동과제 : 휴대용 검출장치 제조 및 제품화. 알코올, 돈육 및 돈지 검출을 위한 휴대형 광학 검출 장치를 고안하였다. CCD 모듈 설계 및 제작과 알고리즘 개발을 하고 PD 측정모듈을 설계하였다. 따라서 휴대형 분광 광학 검출 장치 알고리즘을 구현하여 광학시스템을 제작하였다. 제작한 휴대형 광학 검출 장치에 대한 검증을 하고, User interface 구현을 위한 임베디드 시스템을 설계 및 제작하였다.</p>	
연구개발성과의	○ 연구성과	

<p>활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 염기 존재 하에 알콜과 반응하여 형광을 나타내는 프로브를 합성했고, 이를 파이버 형태로 만들었으며 실제 유제품에 알코올을 spiking한 시료의 경우 역시 형광을 나타낸다는 것을 입증 • 돈지육 및 돈육으로부터 열에 안정한 crude protein 추출하여 이를 면역원으로 하여 돈지육과 돈육에 특이적으로 반응하는 항체를 성공적으로 개발 • 개발키트에 적합한 정량 및 정성결과를 판독할 수 있는 리더기 시제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 상용화된 리더기에 개발키트를 적용할 수 있도록 결과판독 조건 최적화 - 키트 디바이스에 맞는 디바이스 홀더 제작 - 키트 디바이스 제작 <p>○ 성과 활용계획</p> <ul style="list-style-type: none"> • 기술 응용분야 <ul style="list-style-type: none"> - 할랄 인증을 통하여 자연친화적이고 유기적인 방식에 의한 할랄 식품 확보를 위한 식품군 생산기술로 활용할 수 있음. - 할랄 헤어케어 및 화장품 등 다양한 산업에도 적용할 수 있음. • 기술의 활용 <ul style="list-style-type: none"> - 할랄 인증 기관, 할랄푸드 및 제품을 생산, 인증, 판매, 유통관리 서비스 제공자들이 바로 손쉽게 활용할 수 있음. - 돼지고기 지방 및 알코올 검출을 위한 나노바이오소재의 휴대형 검출기 제조 기술은 국제특허 출원을 통한 원천기술 확보와 산업화에 활용할 수 있음. - 이러한 연구를 기초로 해서 국내에서 식품 및 축산제품 중의 미표기·의도적 혼입 여부를 확인할 수 있는 축육 종 구분 현장진단 기술의 개발에도 활용이 가능 				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>할랄 식품</p>	<p>할랄 인증</p>	<p>할랄 진단기</p>	<p>돈지 검출</p>	<p>알코올 검출</p>

< SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development and improvement of biosensor for detecting pork meat/fat and alcohol components in halal foods ○ Fusion technology to enhance performance using bio-receptors and nanoparticles for detection of pork meat/fat and alcohol ○ Development of highly sensitive qualitative and quantitative optical nano-biosensor chip for field and multi-analysis for pork meat/fat and alcohol detection ○ Development of highly sensitive nano-biosensor for detection of pork meat/fat and alcohol ○ Development of portable device and commercialization of the technology for detection of pork meat/fat and alcohol 		
Results	<p>1. The first detailed task (subject): Development of source technology for alcohol detection via nano-biosensor</p> <p>As a part of the development of highly sensitivity signal detection technology, the probe, showing fluorescence when reacted with alcohol, was synthesized. The fluorescence intensity was determined according to the concentration of base and ethanol. In order to immobilize the probes, nanofibers containing probes were synthesized and reacted with alcohol in the presence of base. Alcohol was added to milk products such as yogurt and milk, and fluorescence was measured.</p> <p>2. First detailed commissioned task: efficiency analysis for halal diagnosis kit</p> <p>The food groups were selected, and the food pretreatment method was established for the use of the simple diagnosis kit. The spiked food sample was analyzed by a simple diagnosis kit. ELISA assay was used to detect the lard, and the detection performance was compared between the PCR method and the method using the simple diagnosis kit.</p> <p>3. First collaborative task: Development of nano-biosensor source technology for detection of pork meat/fat.</p> <p>The thermally stable protein was extracted from pork meat/fat and was used as an antigen to produce an antibody. We developed a hybridoma cell line that produce a specific antibody by cell fusion of immunized mouse spleen cells with cancer cells. The antibody characteristics were confirmed after mass production of antibody using mouse. ELISA assays and strip assays were established using the antibodies produced.</p> <p>4. Second collaborative task: Manufacture and commercialization of portable sensing device.</p> <p>A portable optical detection device for alcohol, pork and lard was devised. The CCD module was designed and manufactured, algorithm was developed, and PD measurement module was designed. Therefore, optical system was fabricated by implementing a portable spectroscopic optical detection device algorithm. We verified the developed portable optical detection device and an embedded system for user interface implementation was designed and built.</p>		
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Research results ● A probe has been synthesized and made into a fiber form that reacts with an alcohol in the presence of a base to produce fluorescence. It has also been proven that a sample spiked with alcohol in actual dairy products also exhibits fluorescence. ● Successful development of antibodies that specifically react with pork 		

	<p>meat/fat by extracting thermally stable crude protein from pork meat/fat as an immunogen.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Development of reader prototype that can read quantitative and qualitative results suitable for development kit <ul style="list-style-type: none"> - Optimization of results reading conditions so that development kits can be applied to commercially available readers - Manufacture of device holder for kit device - Kit Device Production <p>○ Performance utilization plan</p> <ul style="list-style-type: none"> • Technology application field <ul style="list-style-type: none"> -It can be used as food production technology for securing halal food by nature-friendly and organic way through HALAL certification. -It can be applied to various industries such as Halal hair care and cosmetics. • Utilization of technology <ul style="list-style-type: none"> - This simple diagnosis technology can be readily utilized by Halal certification organizations, service providers who provide service such as production, certification, sales and distribution management - Portable detector manufacturing technology of nanobiomaterial for detection of pork fat and alcohol can be used for securing source technology through international patent application and industrialization. - Based on these studies, it can be used for the development of on-site diagnostic technology for comparison of meat species to confirm whether intentionally contaminated/unlabeled in food and animal products in Korea 				
Keywords	Halal food	Halal certification	Halal Tester	Lard detection	Alcohol detection

Content

Chapter 1. Outline of research and development (R&D) task	12
Section 1. Necessity of R&D task	12
Section 2. Objective and contents of R&D task	16
Section 3. Range of research and development	17
Chapter 2. Status of domestic and overseas technology development	20
Section 1. Domestic product production and market status	20
Section 2. Overseas related product production and market status	22
Chapter 3. Details and results of detailed research	25
Section 1. Detailed research result	25
1. The first detailed task	25
2. First detailed commissioned task	34
3. First collaborative task	47
4. Second collaborative task	75
Chapter 4. Achievement of goal and contribution to related field	121
Chapter 5. Achievement of R&D and utilization plan of achievement	124
Section 1. Achievement of R&D	124
Section 2. Utilization plan of achievement	127
Section 3. Expected effect	127
Section 4. Feedback for improvement	128
Chapter 6. Status of Research facility and equipment	129
Chapter 7. Security grade of R&D achievements	131
Chapter 8. Status of Research facility and equipment registered with NTIS	132
Chapter 9. Implementation of safety measures	133
Chapter 10. Representative research performance	135
Chapter 11. Others	137

Chapter 12. References	138
Enclosure 1) Research report abstract	140
Enclosure 2) Self-assessment	143
Enclosure 3) Patent, paper, product (Market) analysis report	148

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	12
제 1 절 연구 개발의 필요성	12
제 2 절 연구 개발 목표 및 내용	16
제 3 절 연구 개발의 범위	17
제 2 장 국내외 기술개발 현황	20
제 1 절 국내 제품생산 및 시장 현황	20
제 2 절 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황	22
제 3 장 연구수행 내용 및 결과	25
제 1 절 세부연구수행 결과	25
1. 제 1세부	25
2. 제 1세부 위탁	34
3. 제 1협동	47
4. 제 2협동	75
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에 대한 기여도	121
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	124
제 1 절 연구 성과	124
제 2 절 연구 성과 활용계획	127
제 3 절 기대효과	127
제 4 절 성과 활용성 제고를 위한 의견	128
제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	129
제 7 장 연구개발결과의 보완등급	131
제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황	132
제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	133
제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적	135
제 11 장 기타사항	137

제 12 장 참고문헌	138
별첨 1) 연구개발보고서 초록	143
별첨 2) 자체평가의견서	148
별첨 2) 연구결과활용계획서	154

제 1 장 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

제 1 절 연구 개발의 필요성

1-1. 연구개발 목적

- 할랄 식품에서 돈육/돈지육 및 알코올 성분 검출용 바이오센서 개발 및 이를 바탕으로 휴대용 장치 및 제품화 기술 개발

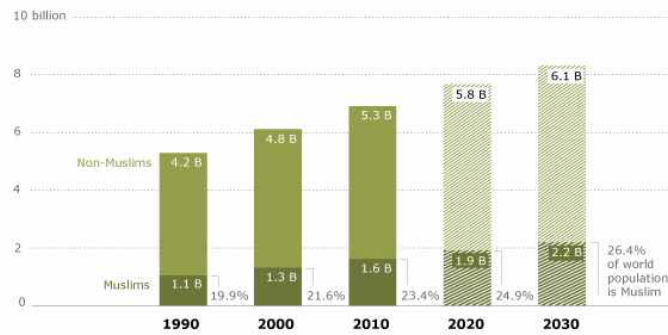
1-2. 연구개발의 필요성

- **할랄푸드 글로벌 시장 성장과 할랄 제품 및 인증 서비스에 대한 수요의 확대**
 - 할랄(halal)은 '이슬람법 (Shari'ah)에 의해 허용되다'라는 의미로, 본래 인간의 행위와 인간이 사용하거나 섭취하는 것 등 무슬림 삶 제반에 걸쳐 허용된 것을 의미하여, 식음료품에 있어서 무슬림이 섭취할 수 있는 제품을 의미함.. 이와 반대로, 무슬림들에게 금지된 것은 '하람(haram)'이라 하며, 식음료품 중에는 이슬람법에 따라 도축되지 않은 육류, 동물의 피, 돼지고기, 알코올이 포함된 제품이 있음(표 1).

표 1. 할랄식품과 하람식품(김철민, 2014)

할랄 식품(허용된 식품)	하람 식품(금지된 식품)
우유	돼지고기와 그 부산물
생선	피와 그 부산물
벌꿀	육식동물
신선한 야채	파충류 및 곤충류
밀, 쌀, 호밀 등의 곡물류	술과 알코올성 음료
소, 양, 낙타, 닭, 오리 등	이슬람법에 따라 도살하지 않은 동물

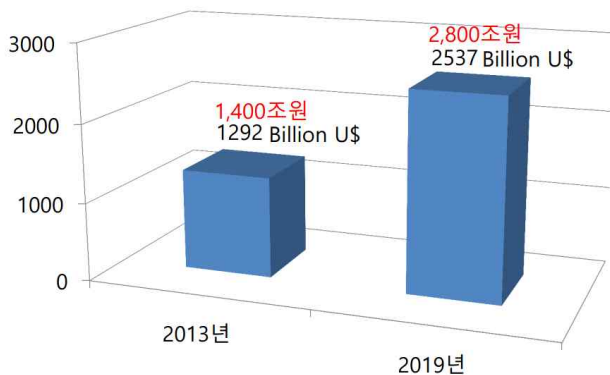
- 이슬람은 기독교, 불교와 더불어 세계 3대 종교의 하나이며, 2012년 기준 무슬림 인구가 18억이고, 2030년에는 약 22억 명으로 증가할 것이라 전망됨에 따라(그림. 1), 글로벌 **할랄 제품의 시장규모는 점점 확대되고** 있고 있음. 또한, 할랄은 비단 음식에만 국한되지 않고, 무슬림 삶, 즉 말, 행동, 의복, 및 사회적 활동들을 포함하기 때문에 글로벌 할랄 시장은 점차적으로 더 확대되고 있음.



[세계 인구분포 중 무슬림 인구의 변화 추세]

<출처: Lugo, Luis. 2011. The Future of the Global Muslim Population-Projections for 2010-2030. Pew Forum>

- 무슬림 인구의 지속적인 증가와 높은 경제성장률(무슬림지역 5년간 연평균 GDP 증가율 6.3%)로 인하여 세계 할랄식품 시장규모는 2013년 기준으로 1,421조원에 달하고 있으며 2019년에는 2,720조원에 이를 것으로 전망하고 있음.



[세계 할랄식품 시장 규모]

<출처: Thomson & Reuter(2014), State of the Global Islamic Economy 2014-2015>

- 할랄 상품은 단지 종교적으로 무슬림들이 소비할 수 있는 것을 의미할 뿐 아니라 불결하고 해로운 것을 철저히 금지하기 때문에 비무슬림에게도 깨끗하고 안전한 웰빙음식으로 인식되고 증가하고 있음. 이와 같은 할랄 시장에서 성장함에 따라 할랄 제품 및 인증 서비스에 대한 수요가 증가됨.
- 뿐만 아니라, 할랄 시장은 식품에만 국한되지 않고, 할랄 헤어케어와 메이크업 제품은 새로운 시장 트렌드로 각광을 받고 있음. 화장품을 사용하는 무슬림들은 돼지고기 지방(돈지)이나 알코올이 들어가지 않은 화장품 사용을 선호해 알코올, 동물성분, 유전자조작성분을 함유하지 않으며 방사선을 이용해 파괴된 미생물도 금기시함. 순수하고 자연적인 미용용품 및 에코화장품 수요 증가추세 속에서 무슬림여성뿐만 아니라 비무슬림계 여성들도 할랄 미용용품에 관심 확대되고 있음.

○ 할랄 인증에 국외 현황

- 할랄 인증은 비무슬림 국가에 거주하는 무슬림들을 위해 고안된 것으로, 할랄식품을 판매하기 위해서는 반드시 할랄 인증이 요구됨. 그러나 인증요건은 이슬람법 해석 등에 따라 인증기관별로 조금씩 달라서, 아직까지 할랄 인증에 대해 국제적인 표준 기준이 없고, 각국에서 고유 인증기준을 만들어 사용하는 실정임. 할랄 인증기관은 전세계에 300여개가 있으며 국가별 로 정부 또는 종교단체가 인증기관을 관리하고 있음(표 2).

표 2. 지역별 주요 할랄 인증 기관 (엄익란, 2013)

지역	국가	인증 기관명	할랄마크	지역	국가	인증 기관명	할랄마크
아시아	말레이시아	이슬람개발부 (자킴)		유럽	이탈리아	할랄 이탈리아 (Halal Italia)	
	브루나이	브루나이 할랄 (Brunei Halal)			독일	할랄 콘트롤 (Halal Control)	
아프리카	남아공	남아공 할랄청 (SANH A)		미주	미국	이판카 (IFANCA)	

- 할랄 산업을 선도해온 말레이시아 정부는 할랄 관리 및 운영을 담당해 왔으며, 최근 자국 정부가 인정하는 할랄마크만이 국내에서 통용되도록 법제화 하는 등 할랄 인증에 관한 통제를 강화하고 있음.
- 이와 함께 아랍에미리트 정부는 할랄 산업을 국가 경제의 새로운 성장동력으로 간주하고, 2016년 내 국제 할랄 표준 및 인증 기준을 적용하는 것을 목표로 하고 있음.
- 말레이시아와 아랍에미리트 할랄인증 기관에서는 할랄 인증신청 시 식품의 품질을 보장하는 기술적인 기준을 충족하도록 권장하고 있으며, 말레이시아 정부는 식품 품질관리 기준(GMP)와 식품 위해요소 중점관리기준(HACCP)에 부합되도록 권장하고 있음.
- 최근, 유럽에서 할랄푸드 및 할랄시장 확대가 두드러지는 가운데, 무슬림뿐 아니라 ‘깨끗한’ 제품을 찾는 비무슬림 소비자의 관심이 증가하고 있어, 친환경, 웰빙을 모토로 매스마켓 공략하고 있음.
- 게다가, 급격히 늘어나고 있는 유럽 내 무슬림 수요층을 겨냥하여, 네슬레, P&G, 맥도널드 등 다국적 기업들이 커져가는 식품 및 화장품 할랄 시장에서의 주도권을 잡기 위해 인증을 서둘러 획득하고 있음.

○ **할랄 인증을 위한 현장 분석용 고감도 바이오센서 개발의 필요성**

- 이슬람 국가의 경우 그들의 종교적인 이유로 인해 돈육 및 그 부산물, 그리고 알코올을 섭취가 엄격히 제한되어 있기 때문에 수입식품에 대한 상기 성분의 혼입을 철저히 규제하고 있는 실정임.
- 2014년 말레이시아에서 자킴 할랄 인증을 받은 캐드버리(Cadbury) 초콜릿에서 돼지 DNA가 검출되어 말레이시아에서 사회적 이슈로 부상하였으며(Food navigator-asia.com, 2014)., 이를 막고자 돼지 DNA 검출여부를 확인해 단속하는 할랄 감식반이 출범하였을 정도로 무슬림들은 돈육에 대해서 철저히 배제하고 있음(Hrealfoods, 2014).
- 게다가 각종 마켓에서 손쉽게 할랄 식품들의 이용이 가능해지고, 원재료보다는 가공하여 포장한 뒤 판매하는 할랄 식품들이 늘어남에 따라 하람(haram)의 오염에 대한 우려가 높아지고 있기 때문에(Fadzilliah et al., 2011), **현장 분석용 고감도 바이오센서의 개발의 필요성이 요구되어짐.**
- 돼지 지방의 경우 돈육의 가공 중에 발생하는 부산물로서 그 양이 방대하여 식품의 중량 증가와 향미 부여를 위해 식품첨가물로 많이 사용되고 있으나, 부정한 의도로 혼입한 돼지 지방의 경우 유관으로 구분이 어렵기 때문에 의도적으로 표기를 하지 않으면 혼입여부를 측정하기에 어려운 상황임.
- 따라서, 할랄 제품 인증을 위한 산업뿐만 아니라, 돈지나 알코올과 같은 하람(비할랄)을 현장에서 신속 정확하게 검출법 개발이 필요함. 특히, 기존의 많은 비용과 시간이 드는 기기분석법 (GC, HPLC, GC-MS, FT-IR)이나 분자생물학적법(PCR)을 바탕으로 하기 때문에, **간편하고 신속한 분석법에 대한 개발이 필요하며, 현장에서 신속하게 분석하기 위한 바이오센서의 개발이 절실한 상황임.**
- 또한, 저분자 화학물질에 대한 현장분석 기술의 요구가 지속적으로 증대됨에 따라 관련 연구 분야 선점을 통해 **원천 기술 확보 및 지속적 연구 개발이** 요구되며 이 분야의 산업화 가능성이 높음.
- 특히, 고감도 돼지고기 지방 및 알코올 검출 센서 개발은 **검출한계를 높이면서 기존의 복잡하고 휴대성이 용이**하지 않은 기기분석적 방법을 대체하면서, **일반인이 손쉽게 사용할 수 있을 것으로 기대됨.**
- 이를 위하여 돈육 결합 항체나 알코올 분해 효소를 이용한 바이오센서를 통해 위해물질을 검출하거나 이들을 다양한 면역기법 혹은 전기화학적 및 형광을 나타내는 나노물질과 융합한 **나노바이오센서 시스템**의 적용이 가능함.
- **국민건강, 보건위생, 웰빙산업, 믿을 만한 먹거리, 신뢰할 수 있는 할랄 푸드 및 제품** 등의 도출을 위한 휴대성 및 편의성을 제공할 수 있는 필요충분조건임.

제 2 절 연구 개발 목표 및 내용

2-1. 연구 목표

- 할랄 식품에서 돈육/돈지육, 및 알코올 성분 검출용 바이오센서 개발 및 성능 향상 연구
- 돈육/돈지육 및 알코올 검출용 바이오리셉터 및 나노입자를 이용한 성능향상 융합기술 연구
 - 할랄식품 내에 돈육/돈지육 및 알코올 성분 함유여부를 검출할 수 있는 항원-항체 반응법과 형광검출법을 개발하고자 함.
- 돈육/돈지육 및 알코올 검출을 위한 현장 및 다중 분석용 고감도 정성, 정량 분석 광학 적 나노 바이오센서 칩(스트립) 개발
 - 현장에서 효과적으로 할랄식품 내에 돈육/돈지육 및 알코올 성분 함유여부를 신속하게 확인할 수 있는 현장측정용 strip센서를 개발하고자 함.
- 돈육/돈지육 및 알코올 검출을 위한 고감도 나노바이오센서 개발
- 돈육/돈지육 및 알코올 검출을 위한 휴대용 장치 및 제품화 기술 개발

2-2. 연구개발 내용

[제1세부]

- ▶ 나노입자를 활용한 알코올 검출을 위한 고감도 나노바이오센서 원천기술 개발
- ▶ 알코올 검출용 바이오센서 개발 및 나노입자를 이용한 성능향상 융합기술 개발
- ▶ 알코올 검출용 고감도 정성·정량분석용 광학 나노바이오센서 칩(스트립) 개발

[제1협동]

- ▶ 돈육/돈지육 특이적 단일클론성 항체 생산 및 개발
- ▶ 돈육/돈지육 특이적 항체-금나노입자 기반 현장진단용 immuno-strip sensor 개발

[제2협동]

- ▶ 현장에서 할랄제품중 돈육유래 성분 및 알콜 함유 유무를 검사할 수 있는 진단키트를 위한 장비(리더기)의 최적화
- ▶ 돈육/돈지육 및 알콜 성분 분석을 위한 진단키트의 시제품 생산을 위한 최적화
- ▶ 할랄제품 중 돈육성분과 알콜성분 현장검사를 위한 시제품 키트의 평가

[위탁]

- ▶ 국내·외 관련 자료를 통한 다양한 할랄 식품 연구 대상 식품의 선정
- ▶ 휴대형 검출기를 이용한 식품 전처리 방법 확립
- ▶ 휴대형 검출기를 이용한 돼지 유래 물질 함유 유무 분석

제 3 절 연구 개발의 범위

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>[제1세부] 나노입자를 활용한 고감도 알코올 검출 기술 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> 알코올 검출용 화합물 합성 및 고감도 센서 기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 알코올 검출능 터페닐롤 유도체와 고정화 센싱 기술 개발 금결합단백질-알코올산화효소 재조합단백질과 자성나노입자를 융합한 광학 센서 개발
<p>[제1세부] 휴대형 초고감도 알코올 검출용 화합물 기반 초고감도 센서 칩 최적화</p>	<ul style="list-style-type: none"> 센서 스트립 형태의 검출 기술 개발 및 단말기와의 연동형광검출 방법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 터페닐롤 유도체와 고정화 센싱기술 최적화 나노파이퍼 기반 광학적 검출 기술 최적화 검출 스트립의 단말기와의 연동 검출 strip 특성 평가
<p>[제1세부 위탁] 돼지 및 알코올 검출 간이 진단기의 활용을 위한 적용 가능 식품군 결정</p>	<ul style="list-style-type: none"> 연구대상 식품의 선정 	<ul style="list-style-type: none"> 국내·외 관련자료(관련기사, 문헌, 시장 조사 등)를 분석하여 연구 대상 식품을 선정
<p>[제1세부 위탁] 돼지 및 알코올 검출 간이 진단기의 활용을 위한 식품 전처리 방법 확립 및 효율성 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> 간이 진단기 이용을 위한 식품 전처리 방법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 돈육 및 돈지육 단백질 추출 방법 확립
	<ul style="list-style-type: none"> 간이 진단기를 이용한 의도적 오염 할랄식품 분석 	<ul style="list-style-type: none"> PCR 분석 방법을 이용한 돼지유래물질 검출 소시지 제조 및 시판제품 구입 Genomic DNA 추출 후 PCR 수행 전기영동을 통하여 돼지유래물질 검출 한계 확인 ELISA 분석방법을 이용한 돈지 검출 샘플 제조 시판제품 구입 항체를 이용한 ELISA 분석
	<ul style="list-style-type: none"> ELISA 분석방법을 이용한 돈지 검출 	<ul style="list-style-type: none"> 샘플 제조 돈지육과 우육을 혼합하여 샘플 제조 돈지육 함량 : 0%, 10%, 30%, 50%, 100% 항체를 이용한 ELISA 분석 2B8-31 항체를 1,000배 희석 후 사용
	<ul style="list-style-type: none"> PCR 방법과 간이 진단기를 활용한 방법에서의 검출력 비교 	<ul style="list-style-type: none"> PCR 방법과 간이 진단기에서의 검출력 비교를 통하여 적용 가능 식품군 선정

<p>[제1협동] 돈육·돈지육 특이적 단일클론 항체 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 돈지육, 돈육으로부터 열에 안정한 crude protein 추출 조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ● 돈지육, 돈육으로부터 열에 안정한 crude protein 추출조건을 확립함
	<ul style="list-style-type: none"> ● 열 안전성 단백질을 면역원(항원)으로 하여 마우스에 면역 실시 	<ul style="list-style-type: none"> ● 열 안전성 단백질을 면역한 마우스에서 높은 항혈청 역가를 확인함
	<ul style="list-style-type: none"> ● 면역 마우스의 비장세포와 암세포(SP2)를 이용하여 세포융합 및 클로닝 실시(생산용 하이브리도마 세포주 개발) 	<ul style="list-style-type: none"> ● 돈지육, 돈육에 특이적으로 반응하는 7종의 하이브리도마 세포주를 개발함
	<ul style="list-style-type: none"> ● 개발된 하이브리도마 셀을 이용하여 복수를 생산하고 정제하여 항체를 대량 생산 후 항체 특성 확인 - ELISA법 - Western blot법 	<ul style="list-style-type: none"> ● 생산된 항체는 돈지육/돈육에 특이한 것으로 확인됨
	<ul style="list-style-type: none"> ● 생산된 항체를 이용하여 돈지육/돈육에 대한 ELISA 분석법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ● 돈지육에 대한 ELISA 분석법 확립결과 돈지육의 혼합함량 1%까지 검출가능함을 확인 ● 돈육에 대한 ELISA 분석법 확립결과 돈육의 혼합함량 1%까지 검출가능함을 확인
<p>[제1협동] 할랄 식품 중 돈육 현장진단용 immuno-strip sensor 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Tetrachloroauric acid에 대해 Sodium citrate 환원법으로 금나노입자 합성 조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ● Sodium citrate의 첨가량에 따라 생성된 금나노입자의 합성조건 확립
	<ul style="list-style-type: none"> ● 금나노입자를 안정화시키는 항체량 확인 ● 안정화량을 이용한 금나노입자-항체 결합체 합성 및 확인 	<ul style="list-style-type: none"> ● 금나노입자-항체 결합체를 이용한 스트립센서 제작 후 양성·음성 시료로 확인
	<ul style="list-style-type: none"> ● Sandwich assay를 기반한 Immuno-strip sensor 디자인 ● 구성품 중 test line과 conjugate pad에 처리되는 시약 처리량, 버퍼 등의 최적화 조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ● 2B8-31 항체-금나노입자를 detector 시약, 그 외 개발된 항체를 capture 시약으로 사용하여 조건 확립 ● Immuno-strip sensor에 적용하는 버퍼를 PBS로 선정
	<ul style="list-style-type: none"> ● 민감도와 교차반응성 확인 ● 임의로 돈육 및 돈지육 혼합식품을 이용한 immuno-strip sensor 평가 	<ul style="list-style-type: none"> ● 개발된 strip sensor에 대한 돈육 및 돈지육 검출한계 확인(돈지육 5%, 돈육 10%) ● 다른 축산물을 비롯한

		식품부재료에 대한 교차반응성 확인 <ul style="list-style-type: none"> • 임의로 돈육 및 돈지육을 혼합하여 제조한 식품을 이용한 적용성 평가 • 시판 발열팩을 이용한 현장 전처리법 개발
[제2협동] 현장용 리더기의 최적화	<ul style="list-style-type: none"> • 휴대형 분광 광학 검출 장치 설계 및 스트립 측정 모듈 설계 	<ul style="list-style-type: none"> • User Interface 구현을 위한 임베디드 시스템 설계 및 제작 • 개발키트에 적합한 측정영역 설정 • line intensity graph 전환을 위한 peak setting 값 결정 • 개발키트에 맞는 Device hold 개발
	<ul style="list-style-type: none"> • 나노입자 및 시약 제조 • 일회용 스트립 제조 	<ul style="list-style-type: none"> • Colloidal gold probe 제조 • Gold-antibody conjugate 제조 • NC 멤브레인 항체 coating 최적화 • Sample pad 전처리 조건 최적화 • 필드샘플을 통한 키트의 민감도 평가 • 필드샘플을 통한 키트의 특이도 평가 • 키트의 재현성 평가
[제2협동] 시제품키트의 최적화 및 성능평가	<ul style="list-style-type: none"> • 검출용 광학 신호 변환 처리기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 분광 광학 및 형광시스템의 분광 측정을 위한 CCD 구동 모듈 설계 및 제작 • CCD 측정 알고리즘 개발 및 구현 • PD 측정 모듈 설계 및 제작 • 이미지 센서 모듈 구현

제 2 장 국내외 기술개발 현황

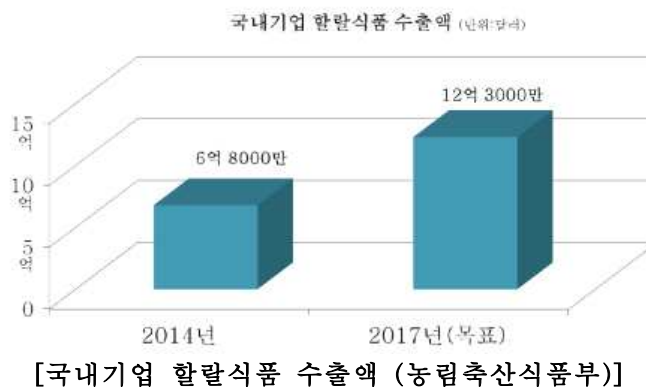
코드번호

D-04

제 1 절 국내 제품생산 및 시장 현황

○ 할랄 인증에 국내 현황

- 국내에도 약 13만 명의 무슬림이 거주하는 것으로 추산되며, 중동과 동남아에서의 한류 열풍으로 인하여 우리나라의 무슬림 방문객 수는 꾸준히 증가함에 따라 국내에서 무슬림 소비자들을 위한 국내의 할랄 시장 확대될 것으로 전망됨. 뿐만 아니라 **이슬람 시장 진출**을 위하여, 품질, 위생, 안전성이 인증된 **할랄 제품의 공급과 인증의 필요성**이 부각되고 있음.
- 최근 한국 기업들도 할랄 시장에 대한 관심이 늘어나면서 할랄 인증 제품이 늘어나는 추세임. 그러나, 세계적인 할랄 산업 개발 추세에 비해 국내에서는 **할랄에 대한 관심 및 정보 공유, 정책적 지원 등 산업 발전을 위한 연구수행이 미약한** 실정임.
- 국내기업 할랄식품의 수출액은 2014년 6억 8000만 달러로 전 세계 할랄식품 시장에서 적은 부분을 차지하고 있지만 할랄 인증을 획득을 시도하는 업체가 점차 증가하고 있기 때문에 2017년엔 12억 3000만 달러를 목표 하고 있음(파이낸셜 뉴스, 2015).



- 우리나라 기업의 할랄 인증 제품은 2010년 대상(주)에 의해 처음 시작되었고, 2011년 남양유업이 멸균초코유유, 2013년 CJ제일제당의 햇반, 김 등 30여개 품목이 말레이시아 JAKIM 할랄 인증을 획득함. 현재까지 농심의 신라면, 롯데제과와 오리온의 과자류, 남양유업 등 84개사가 국내 120여개 식품업체가 430여개 상품에 대해 할랄 인증을 획득함. (식품음료신문, 2013)(표 3).

표 3. 할랄 인증 제품 리스트(식품음료신문, 2013)

제품사진	제품명	회사명	제품사진	제품명	회사명
	햇반	CJ제일제당		닥터유	오리온
	조미김	CJ제일제당		엄마손파이	롯데제과
	멸균초코우유	남양유업		서울우유	서울우유

- 최근 할랄 인증 획득 후 서울우유와 빙그레는 말레이시아 정부로부터 2015년 3월 말레이시아 정식 수출업체로 등록되어(이성도, 2015)(표 4), 민관 합동으로 할랄 유제품 시장을 개척한 성과로 평가받고 있음.

표 4. 전 세계 말레이시아 유제품 수출업체 등록현황(식품의약품안전처, 2015)

국가명	등록업체	등록유형	국가명	등록업체	등록유형
중국	1	연유	독일	1	분유
인도	2	버터	케냐	1	낙타유
인도네시아	3	연유, 치즈, 우유, 가공유	태국	3	조제분유, 우유, 아이스크림
이란	1	우유, 치즈, 발효유, 크림	UAE	2	우유, 아이스크림, 낙타유
우루과이	1	치즈, 가공치즈	한국	2	우유, 가공우유, 아이스크림

- 우리나라의 바이오센서 시장은 (주)에스디, (주)올메디쿠스, (주)인포피아 (주)아이센스, (주)바이오포커스 등 몇 군데의 벤처기업에서 제품을 출시하고 있는 상태로 최근 매출이 상승하고 있으며, 현재 국내 바이오센서 기업들이 주로 관심을 가지고 있는 분야는 90% 이상이 의료용 바이오센서로, 아직 식품분석용과 환경용 및 그밖에 다른 분야의 바이오센서에 대한 관심 정도가 상대적으로 낮은 상태임.

- 향후 전망을 살펴보면 국내의 경우 국산 바이오센서가 상용화 되고 있으나, 아직 외국 제품의 의존도가 높은 실정임. 국내에서는 혈당 바이오센서 제품 외에는 시장이 매우 미미하나, 최근 들어 건강에 대한 관심이 고조되고 있으므로 젓산이나 콜레스테롤 등 다양한 바이오센서 관련 수요가 커질 것으로 전망됨.
- 국내 바이오센서 내수시장은 2012년 54억 달러 규모에서 2020년 99억 달러 규모로 연평균 10.4% 성장할 전망이다. 정부는 첨단 스마트 센서 육성사업 등을 추진하여 2020년 기준 42억 달러 생산과 21억 달러 수출을 달성할 계획임. 국내 나노 기술 연구 등의 활성화에 따른 연구용 바이오센서의 수요 증가를 고려할 때 국내 시장 성장률은 세계 시장 성장률보다 더 클 수 있을 것으로 예상됨.

제 2 절 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

○ 국외 돈육 유래 물질 및 알코올 함유 여부 진단 관련 연구 현황

- 할랄 식품에서 돈육 유래 물질 진단을 위한 방법은 크게 PCR을 이용한 방법과 신속 진단 키트를 이용한 방법으로 나눌 수 있음.
- DNA를 기반으로 한 PCR 진단법: 다른 검출 방법들에 비하여 안정적이기 때문에 많이 사용함. 최근에는 한 번의 수행으로 다양한 식품을 검출해냄으로써 비용과 시간을 절감할 수 있는 species-specific primer를 이용한 multiplex PCR 방법에 대한 연구가 활발히 이뤄짐(표 5, Bottero & Dalmaso, 2011; Matsunaga et al., 1999, Ali et al., 2015). 하지만 DNA를 이용한 진단 방법은 일반 소비자들이 신속하게 사용하기 힘들다는 단점이 있어 간편한 간이용 진단기 개발이 필요함.

표 5. 특정 육류 첨가 여부 진단을 위한 multiplex PCR 방법

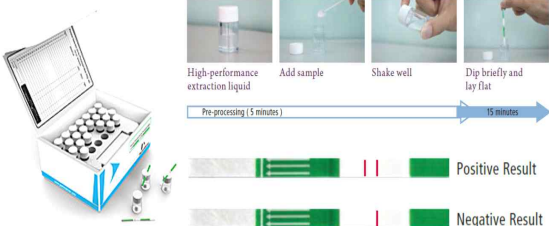
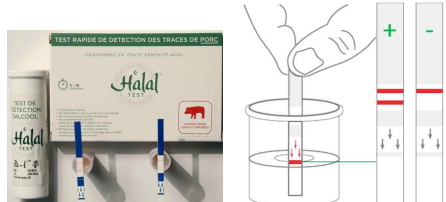


진단 가능한 종	타깃 유전자	유전자 크기(bp)	검출한계(ng)	참고문헌
소, 돼지, 닭, 염소, 양, 말	cyt b	274, 398, 227, 157, 331, 439	0.25	Matsunaga et al., 1999
말, 돼지	cyt b	439, 398	0.25	Di Pinto et al., 2005
소, 양, 돼지, 닭	16s rRNA	271, 274, 149, 266	0.1-0.2	Luo et al., 2008
닭, 소, 돼지	cyt b	216, 263, 322, 387	0.001	Zhang, 2013

- 간이 키트를 이용한 진단법: 글로벌 기업 퍼킨 엘머(PerkinElmer)에서는 개발한 돼지고기 성분 검출 키트는 15분 내에 신속하게 돼지고기 생체 지표에 대한 양성, 음성 반응을 판별할 수 있으며, 기술자가 아닌 일반 소비자도 최소 샘플 준비로 검사 가능함. 가공육은 0.5%, 생고기는 0.05%의 검출한계를 지닌 검출 키트는 인도네시아 최대

할랄 인증기관인 LPPOM MUI가 할랄식품 검사·검증을 위하여 채택됨 (<http://www.perkinelmer.com/>, 2012).

- FoodConfirm 사(프랑스)에서 돈육 특이적 항체를 인지하는 면역크로마토그래피 스트립은 돈육, 돈피, 돈지 등을 검출할 수 있도록 고안되었으며, 돈육 유래 물질을 판단함. 또한, 혈액의 산소화 정도로 도살 된 가축인지 판단할 수 있는 키트를 고안할 예정이라고 함(RT news, 2014).
- 말레이시아 셀랑고르 대학 연구진은 식품 속의 돼지고기 성분을 0.0001% 오차범위로 판별 가능한 나노 센서가 장착 된 간이 키트를 개발함. 센서가 장착된 탐지기에 샘플을 넣고 1분내 색 변화 검출이 가능하다고 함(Australian Food News, 2014).
- 알코올 검출은 대부분 GC나 NIR과 같은 기기분석법을 통해 검출하나, 최근 알코올 분해효소와 융합한 간이검출키트들에 대한 개발이 이뤄지고 있음.

표 6. 상용화 간이 할랄테스트 키트

개발사/국가	간이 키트	비고
Perkin Elmer/ 미국	<p>Porcine detection kit</p> 	<p>돈육 검출 검출한계 가공육: 0.5% 생고기: 0.05% 면역크로마토그래피법</p>
FoodConfirm/ 프랑스	<p>Halaltest® cooked and processed pork/raw pork(blood and fat)</p> 	<p>돈육/돈피, 돈지 검출 정확도 99% 면역크로마토그래피법</p>
말레이시아	<p>나노센서 돈육 검출키트</p> 	<p>제품 출시 예정 (2015.12.) 오차범위 : 0.0001% 나노센서 형광 검출법</p>
FoodConfirm/ 프랑스	<p>Halaltest® alcohol</p> 	<p>알코올 검출 검출한계:0.02% 효소기반 센서법</p>

○ 전기화학적 검출법, 형광분광법 등은 소규모 형태로 개발되어 바이오칩 검출 시스템으로 적용된 바 있으나 신호 발생을 위한 표지물질을 분석 시료에 접합시키기 위한 공정

과 이에 따르는 시약의 reservoir 및 pump 등으로 인해 휴대용 수준으로 소형화되지 못하고 생화학적 물질의 경우 측정한계가 수 $\mu\text{g/ml}$ 의 수준임.

- 외국 시장분석 전문기관 데이터모니터에 따르면 오는 2024년 세계 바이오시장은 2조6천억 달러(한화 약 3천 100조원)에 달할 전망이다. 이는 반도체, 자동차, 화학제품 분야의 예상 시자 규모를 합한 금액(약 2조5천억 달러)보다 많은 것으로 보고됨. 바이오센서와 밀접한 관련이 있는 나노바이오 하이브리드 기술의 응용 제품은 대부분 개발 초기단계이나 기술개발이 활발히 진행되어 상용화가 빠르게 진전될 것으로 예상됨. 따라서 생체 친화성 나노-바이오 하이브리드 프로브의 개발은 시장 선점 효과와 함께 원천 기술의 확보를 가능하게 할 것으로 판단됨.

제 3 장 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

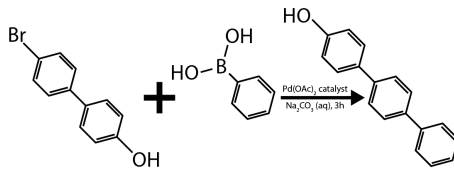
제 1 절 세부연구수행 결과

[제1세부]

○ 터페닐를 유도체 기반의 고감도 고선택적 알콜 검출 프로브 합성

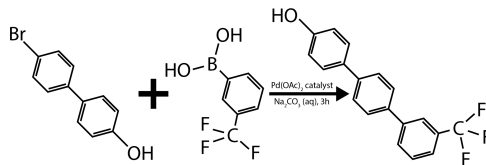
▪아래의 물질을 이용하여 알콜 검출 프로브 합성:

- $\text{Na}_2\text{CO}_3, \text{Pd}(\text{OAc})_2, 4\text{-bromo-4' -hydroxybiphenyl 4-(trifluoromethyl)-phenylboronic acid, Distilled water, Acetone, HCl}$

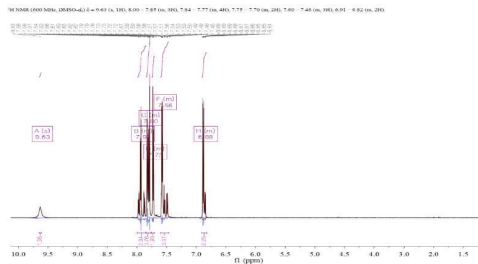


[알콜검출 프로브 (Terphenyl-phenol) 합성모식도]

- 형광의 세기를 증강시키기 위해 위의 프로브의 작용기를 Trifluoromethyl로 치환 (3F)
- 합성시 사용하는 물질을 바꿈으로써 진행
- 합성 여부는 H^1 NMR spectrum을 이용하여 규명함.



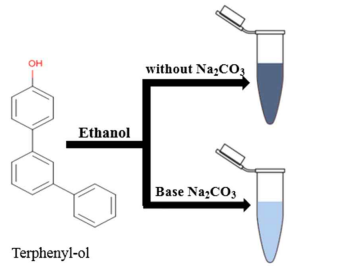
[개선된 알콜 검출 프로브 (3F) 합성모식도]



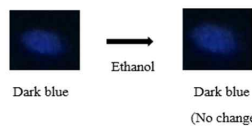
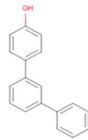
[개선된 알콜 검출 프로브 (3F)의 H^1 NMR spectrum]

▪ Na_2CO_3 의 유무에 따른 프로브의 활성 증감효과 관찰

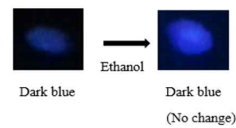
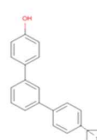
- 합성한 probe (Terphenyl-phenol, 3F)가 에탄올과 반응하여 형광을 나타내기 위해서는 Na_2CO_3 가 필요함을 실험을 통해 규명



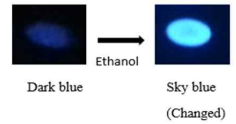
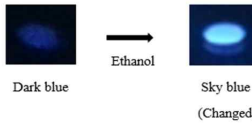
Terphenyl-phenol



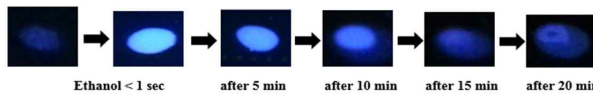
3F



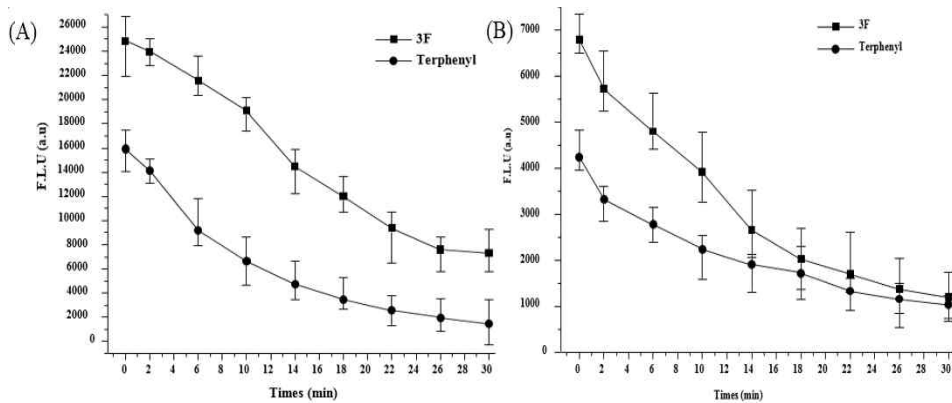
In the presence of inorganic base (Na₂CO₃)



✓ Under UV irradiation before and after addition of a drop of ethanol



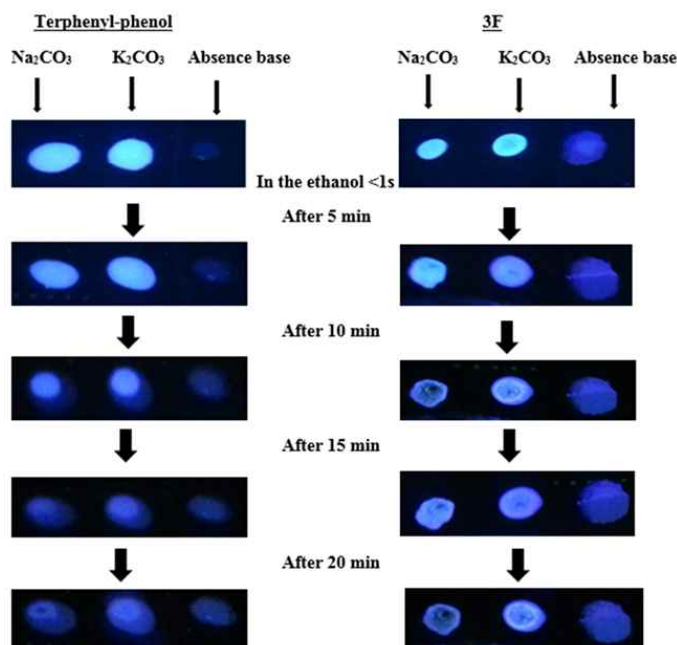
[고체상태의 Terphenyl-phenol, 3F의 Na₂CO₃유무 상태에 따른 형광 차이 및 발색 시간]



[고체상태 알콜검출 프로브의 형광지속시간]

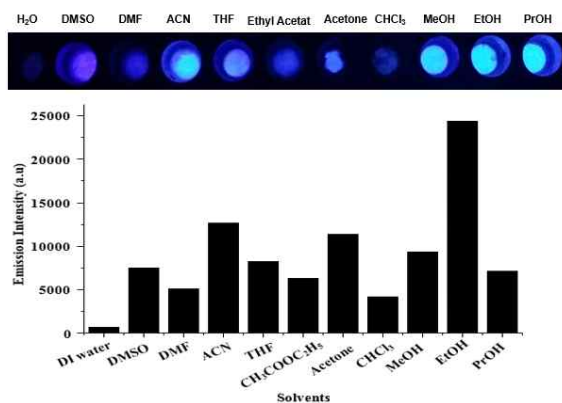
- 위 결과를 통해 Ethanol과 Terphenyl-phenol이 한 계에 존재할 경우 밝은 하늘색의 형광이 나타남을 알 수 있다.

- Base 의 종류 ($\text{Na}_2\text{CO}_3, \text{K}_2\text{CO}_3$)에 따른 형광의 세기 및 지속시간에 대한 경향
 - Terphenyl-phenol과 3F를 비교해 봤을 때, 확실히 3F의 형광 세기와 지속시간이 오래 간다는 것을 알 수 있으며, Na_2CO_3 의 경우 형광이 더 뛰어나다는 것을 알 수 있다.
 - 따라서 3F를 사용하기로 결정했다.



[Base의 종류에 따라 나타나는 형광의 세기 및 지속시간의 차이]

- 검출 환경에 따른 형광세기 관찰
 - 선택성 관찰
 - 에탄올 뿐 만 아니라 아세톤, DMF, 메탄올, DMSO 등을 위의 Na_2CO_3 가 포함된 프로브(3F)와 반응시켜봄으로써, 에탄올에만 선택적으로 반응한다는 것을 알 수 있다.



[3F의 알코올 및 다른 solvent 존재 여하에 따라 나타나는 형광의 세기]

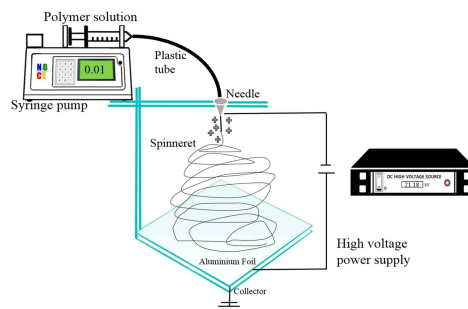
○ 알콜 검출 프로브를 고정화 할 수 있는 나노 파이버 합성

▪Electrospining (전기방사) 기술을 이용한 나노파이버 합성

- Poly vinyl alcohol(PVA)의 농도에 따라 나타나는 나노 파이버의 경향성 확인

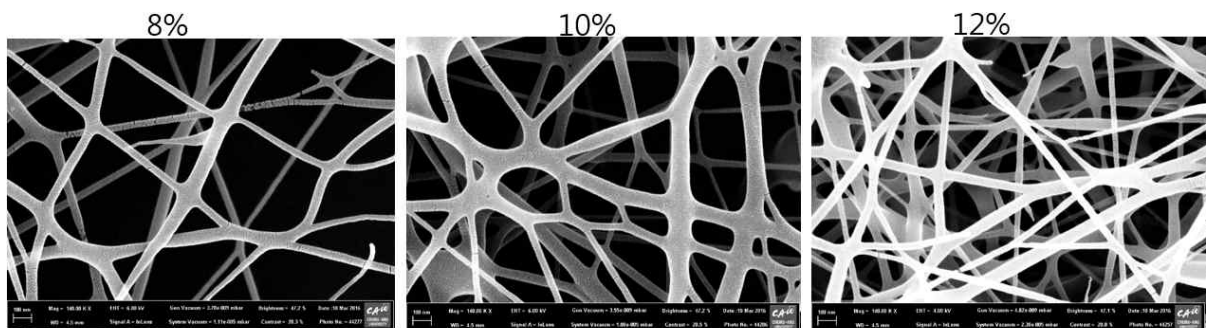
Ratio	PVA (g)	3차수 (mL)	Phenyl-4-ol (g)	K ₂ CO ₃ (g)
12 %	3.00	30.00	0.10	0.21
10 %	3.00	40.00	0.10	0.21
8 %	3.00	47.50	0.10	0.21

[나노파이버 합성시 사용한 각 물질들의 비율]



[나노파이버 합성과정에 대한 모식도]

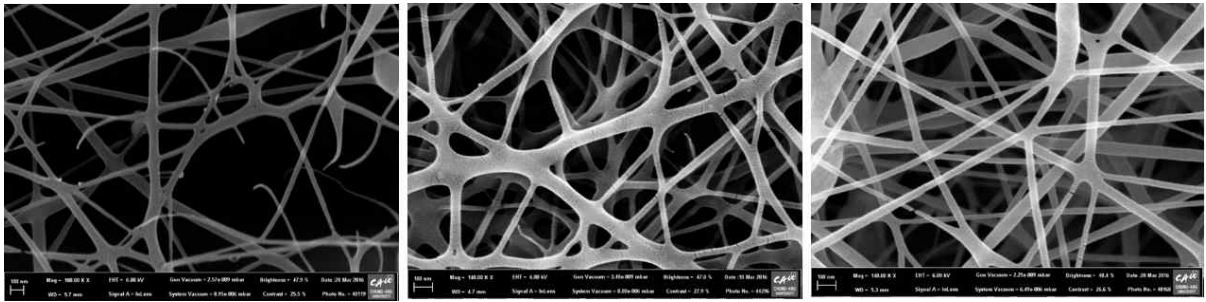
○ 전기 방사시 PVA 농도 최적화



[SEM images of nanofibers that were electrospun from the weight percentage PVA in the solution (8%, 10%, 12%)]

- PVA 농도에 따라 나노파이버의 네트워크 구조가 촘촘해짐을 알 수 있었음.
- 이후에 12%의 PVA를 사용한 나노구조를 합성하였음.

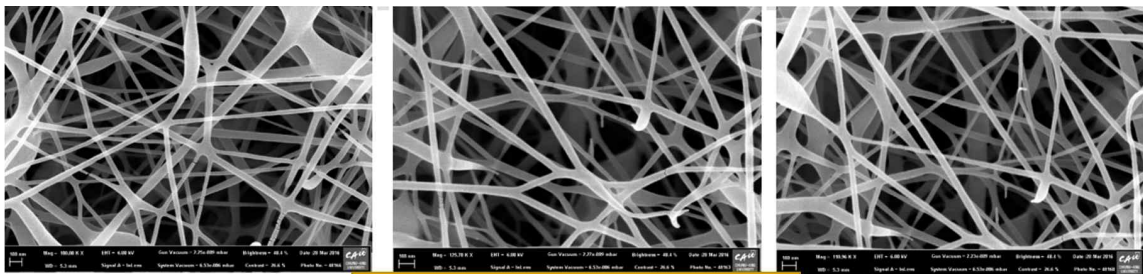
○ 전기 방사 전압 테스트



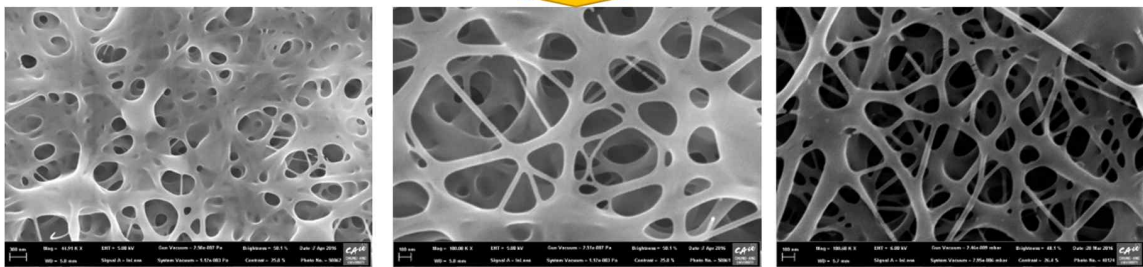
[SEM images of nanofibers that were electrospun from the electrical powers (16, 19, 21 kV)]

- 전압을 19 kV 이상으로 유지했을 때 나노파이버의 구조가 안정적으로 형성되었음을 확인하였음.
- 이후에 21 kV의 전압을 가하여 나노구조를 합성하였음.

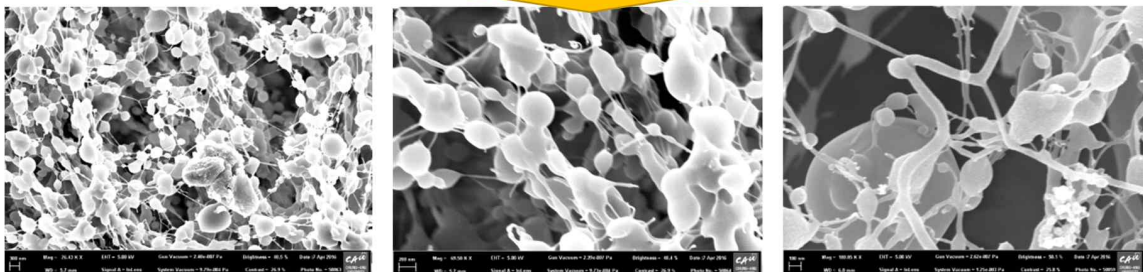
○ 나노파이버와 알코올의 반응성



EtOH과 반응



더 많은 EtOH과 반응



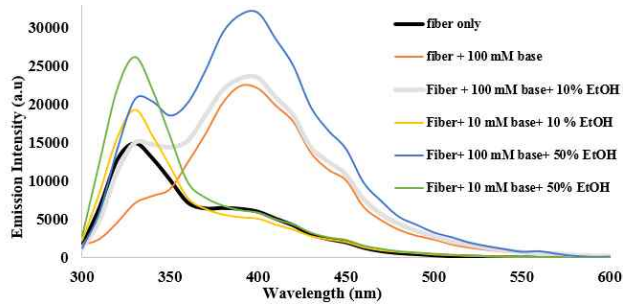
[SEM images of nanofibers that were reacted with ethyl alcohol]

- 합성된 알코올 검출용 나노파이버에 알코올을 점차 가할수록 나노구조가 변화함을

확인하였음.

- 반응성에 따라 형광을 띠면서 변화하는 모습을 관찰하였음.

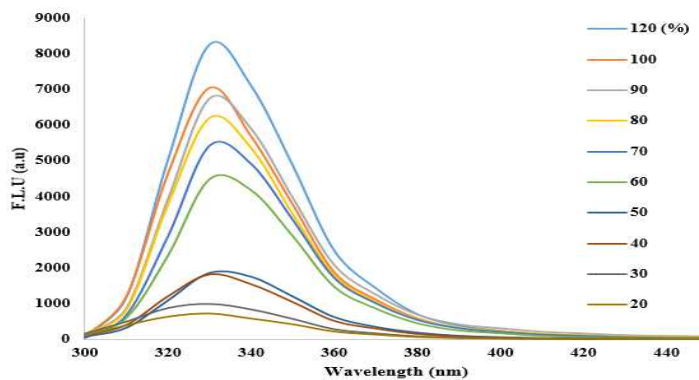
○ Na_2CO_3 의 농도에 따른 경향



[Na_2CO_3 의 농도에 따라 나타나는 형광의 경향성]

=> 염기 역시 400 nm의 파장에서 흡수 피크를 나타내어 알코올 측정에 방해가 될 수 있기 때문에, 농도가 100 mM일 때 보다는 10 mM일 경우 간섭을 덜 일으키기 때문에, 염기의 농도에 대한 조건을 최적화 시킬 수 있었음.

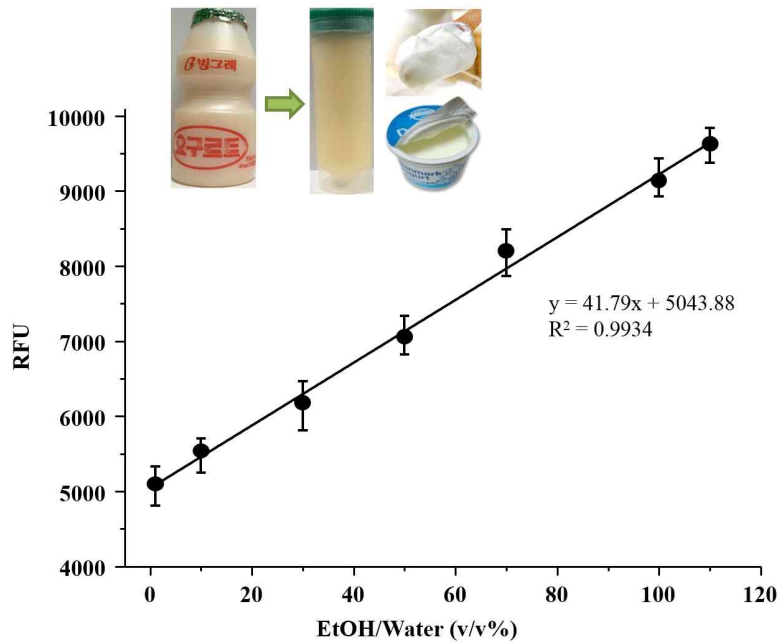
○ 알코올의 농도에 따른 경향



[Na_2CO_3 의 농도에 따라 나타나는 형광의 경향성]

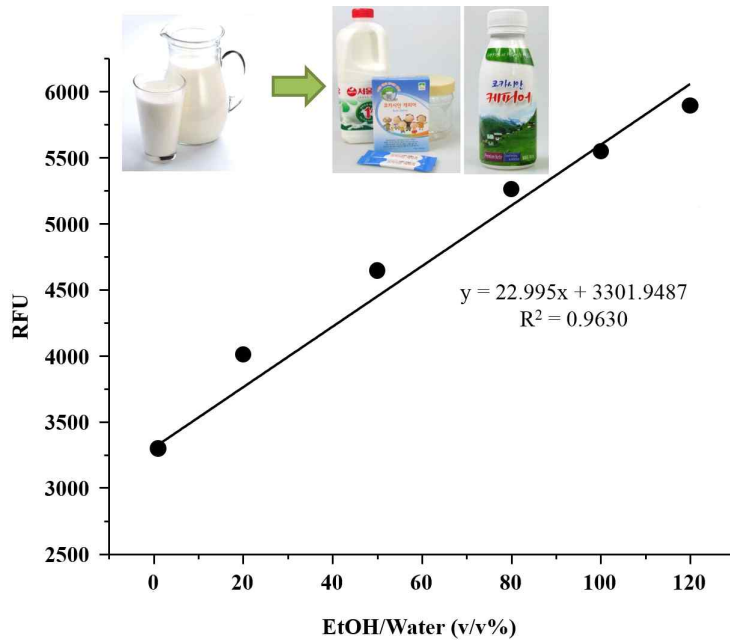
=> 최적화된 조건에서, 확실히 에탄올의 농도에 따라 형광의 세기 역시 비례적으로 증가하는 현상을 나타냈다. 이를 통해 형광세기 측정을 통해서 알코올의 함량을 결정지을 수 있는 척도가 될 수 있다는 것을 알 수 있다.

○ 실제 요구르트를 이용한 Spiked test 진행



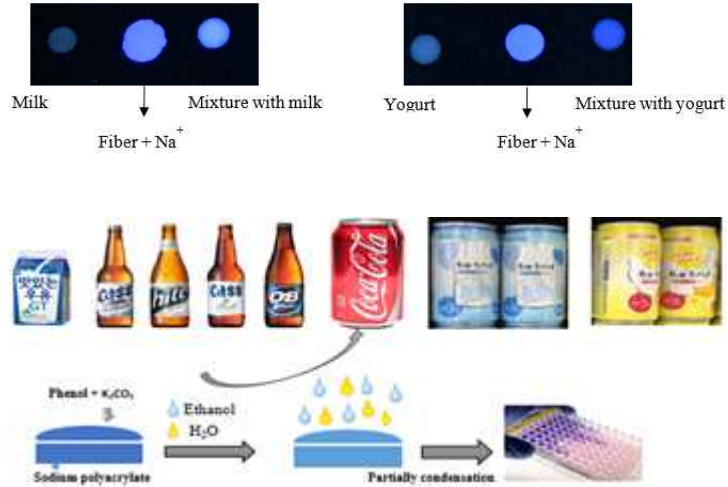
[요구르트 내의 알코올의 농도에 따라 나타나는 형광의 경향성]

=> 실제 요구르트에 알코올을 첨가한 뒤 나타나는 형광세기를 측정 한 뒤 측정한계를 계산해 본 결과 1.2%의 알코올 까지도 검출가능함을 규명.



[농축 유제품 (커피어) 내의 알코올의 농도에 따라 나타나는 형광의 경향성]

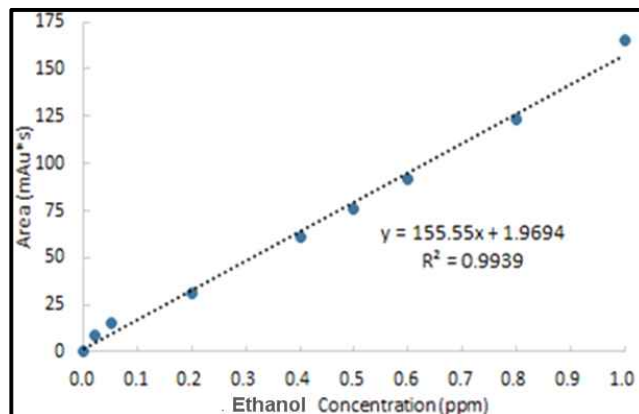
=> 실제 커피어에 알코올을 첨가한 뒤 나타나는 형광세기를 측정 한 뒤 측정한계를 계산해 본 결과 1.1%의 알코올 까지도 검출가능함을 규명.



=> 이 외에도 코카콜라나 우유, 맥주 및 알코올이 포함된 음료에 대한 진단도 가능함.

○ HPLC를 이용한 알코올의 정량 분석

- ◆ 일반적으로 사용하는 저분자 화학물질의 정량 검출 방법인 HPLC(High-performance liquid chromatography)를 이용하여 0~1 ppm의 낮은 농도에서 알코올의 표준곡선과 그에 대한 방정식을 얻었음.
- ◆ Ethyl alcohol의 경우 $y=155.55x+1.9694$ 의 방정식을 얻었고, R^2 값은 0.9939로 역시 높은 신뢰도를 나타내었음.



[Ethyl alcohol의 HPLC 정량 분석 결과]

- ◆ 이는 현재의 정량결과가 HPLC 만큼 정확할 뿐만 아니라, 시간과 고가의 장비 및 고급 기술을 필요로 하는 HPLC보다 훨씬 신속하고 효율적이며 아주 간단한 방법으로 알코올을 검출할 수 있는 것을 확인하는 동시에 HPLC 정량 법을 대체 가능함을 확인함.

○ HPLC 검사 결과와의 비교 검증

[커피어 시료에 적용된 알코올에 대한 HPLC 결과와 strip sensor간의 정성적 결과 비교]

Ethanol spiked (ng/g)	HPLC		Strip sensor	
	Ethanol detected (ng/g)	Recovery (%)	Ethanol detected (ng/g)	Recovery (%)
0	ND	-	ND	-
100	103.9±0.05	103.9±0.03	96.4±0.02	96.4±2.41
1000	926.3±0.03	92.6±0.04	997.7±0.41	99.8±0.44
10000	9,927.3±0.05	99.2±0.05	9,970.8±0.04	99.7±0.48
100000	97,327.3±0.32	97.3±0.31	100,674.4±1.81	100.7±1.82

* The standard deviations (SD) of measurements are calculated from three independent experiments.

- ◆ 위 결과에서 일반적인 알코올 분석법인 HPLC와 비교하여 **strip sensor의 경우에도 recovery가 100%에 가깝게 분석**되는 것을 확인하여 본 시스템의 유효성을 확인함.
- ◆ 또한, 정량성에 대한 결과도 나타남을 확인함으로 개발된 strip 센서가 정성능 뿐 아니라 정량적 측정이 가능함을 확인함.
- ◆ 본 연구진은 위의 결과를 토대로 **특허출원**이 되었고 **논문 심사** 중에 있음 (각 1건)
- ◆ 마지막으로 개발되어진 strip sensor의 경우에는 시료 회수부터 분석까지 총 1-2분의 시간으로 정성적 분석이 완료됨을 확인함.

○ 알코올 검출용 일회용 스트립 (69×28×5 mm³)



- ◆ 무형광 검정 polypyrene 재질의 플라스틱을 이용하여 일회용 스트립 제작
- ◆ 안쪽에 형광감응 터페닐롤 유도체를 PVA와 혼합한 나노파이버(nanofiber sheet)를 장착하고 있음.

[제1세부 위탁]

[1차년도 연구수행 결과]

1. 연구대상 식품의 선정

- 국내·외 관련자료(관련기사, 문헌, 시장 조사 등)를 분석하여 연구 대상 식품을 선정
 - 식육가공품
 - 할랄 식육 가공품 중 특히 소시지류에서 지속적으로 돼지고기 유래물질 검출
 - 돼지고기 1-10% 함유 소시지 직접 제조 후 분석
 - 국내 할랄마트에 판매하는 오염가능성이 높은 식품(소시지, 패티류 등) 구매 후 분석
 - 스낵류
 - 할랄 인증 감자칩(프링글스)과 비인증 국내 감자칩(포카칩) 구매 후 분석
 - 국내에서 판매중인 초코파이 내의 마시멜로우 분석
 - 캔디류
 - 최근 하리보의 젤리가 할랄 인증을 받았음.
 - 국내의 할랄마트에 돼지고기 유래 젤라틴이 아닌 생선 유래 젤라틴으로 만들어진 마시멜로우가 판매되고 있음.

2. 간이 진단기 이용을 위한 식품 전처리 방법 확립

- 간이 진단기에 이용될 항체의 민감도를 높이기 위하여 시료의 단백질을 추출 방법을 탐색 및 확립함.
 - 돈육 및 돈지 단백질 추출 방법 확립
 - 0.5 M NaCl 첨가 후 중탕 원심분리(3,220 ×g, 15분) 후 여과지를 이용하여 여과
 - Tris-Buffered Saline (TBS) buffer를 이용하여 희석

3. 간이 진단기를 이용한 의도적 오염 할랄식품 분석

- 제조 소시지에서 PCR 분석 방법을 이용한 돼지유래물질 검출

1) 소시지 제조

- 돼지유래물질(돈육 및 돈지)과 우육을 혼합하여 샘플 제조
- 돼지유래물질 함량 : 1%, 2%, 5%, 10%, 100%

2) 프라이머 제작

- 돼지 특이적 PCR 프라이머 제작

Forward	5'-CCA TCC CAA TTA TAA TAT CCA ACT C-3'
Reverse	5'-TGA TTA TTT CTT GGC CTG TGT GT-3'
Forward	5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3'
Reverse	5'-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3'

- 돼지유래 젤라틴 특이적 PCR 프라이머 제작

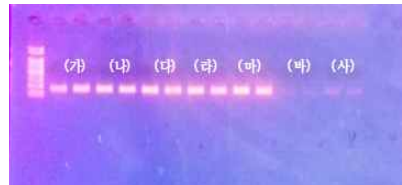
Forward	5'- ATT TCC ATC CCA CAG CCC-3'
Reverse	5'- AAC AGA TGC TGA CTC ACA GAC-3'

3) Genomic DNA 추출 후 PCR 수행

- 조리법(굽기 및 찌기)을 구분하여 genomic DNA를 추출
- 전기영동을 통하여 돼지유래 물질 검출 한계 확인

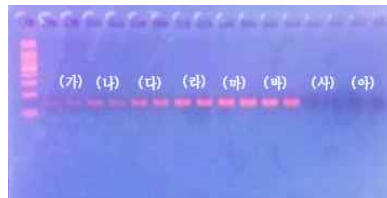
4) 돈육 및 돈지 첨가 제조 소시지 검출 결과

- 돈육과 돈지 모두 조리법에 따른 검출한계가 2% 미만으로 확인됨



[제조 소시지에서 돈육 검출한계 확인 시험]

(가) 돈육 1%, (나) 2%, (다) 5%, (라) 10%, (마) 생돈육 및 익힌 돈육, (바) 생우육, (사) 익힌 우육








[제조 소시지에서 돈지 검출한계 확인 시험]

(가) 돈지 1%, (나) 2%, (다) 5%, (라) 10%, (마) 생돈지, (바) 익힌 돈지, (사) 생우육, (아) 익힌 우육

○ 시판제품에서 PCR 분석 방법을 이용한 돼지유래물질 검출

1) 시판제품 구입

▪ 식육가공품

가	나	다	라	마
				
소민찌	소고기패티1	소고기패티2	미트볼	치킨소시지
식육	식육가공품			
할랄마트 구입				

▪ 스낵류

가	나	다
		
초코과자	감자칩 스낵류	감자칩
할랄비인증	할랄인증	할랄비인증

■ 캔디류

가	나	다	라	마
				
판젤라틴	마시멜로우1	젤리1	젤리2	마시멜로우2
	캔디류			
할랄비인증	할랄비인증	할랄비인증	할랄비인증	할랄비인증

2) 프라이머 제작

■ 돼지 특이적 PCR 프라이머 제작

Forward	5'-CCA TCC CAA TTA TAA TAT CCA ACT C-3'
Reverse	5'-TGA TTA TTT CTT GGC CTG TGT GT-3'
Forward	5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3'
Reverse	5'-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3'

■ 돼지유래 젤라틴 특이적 PCR 프라이머 제작

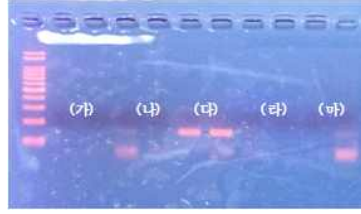
Forward	5'-ATT TCC ATC CCA CAG CCC-3'
Reverse	5'-AAC AGA TGC TGA CTC ACA GAC-3'

3) Genomic DNA 추출 후 PCR 수행

- 조리법(굽기 및 찌기)을 구분하여 genomic DNA를 추출
- 전기영동을 통하여 돼지유래 물질 검출 한계 확인

4) 할랄마트 시판제품 검출 결과

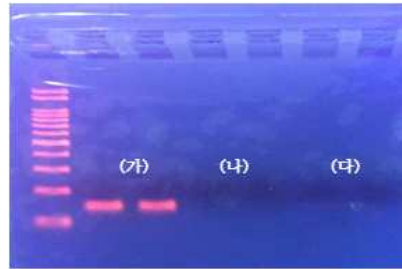
- 할랄마트에 판매 중인 식육가공품 5종을 구매하여 돈육 유래물질을 검출한 결과 1개 제품 (소고기 패티2)에서 돈육 유래 물질 (141 bp)이 검출되었음



[식육가공품에서 돈육 유래물질 검출 시험]

(가) 소민찌, (나) 소고기패티1, (다) 소고기패티2, (라) 미트볼, (마) 치킨소시지

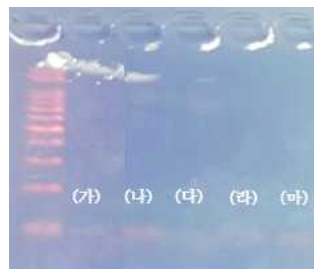
- 스낵류 중 초코과자의 젤라틴을 양성 시료로 할랄 인증 감자칩과 비인증 감자칩 분석을 수행하였는데, 비인증 감자칩에서도 돼지유래물질이 검출되지 않았음



[스낵류에서 돈육 유래물질 검출 시험]

(가) 초코과자, (나) 할랄인증 감자칩, (다) 할랄 비인증 감자칩

- 캔디류 중 판젤라틴을 양성 시료로 하여 시중에 판매하는 할랄 인증을 받지 않은 젤리류와 생선 유래 젤라틴이 함유된 마시멜로우 분석을 수행하였는데, 모든 시료에서 돈육 유래 젤라틴이 검출되지 않았음



[캔디류에서 돈육 유래 젤라틴 검출 시험]

(가) 판젤라틴, (나) 할랄 비인증 마시멜로우, (다) 할랄 비인증 젤리 1, (라) 할랄 비인증 젤리 2, (마) 생선 유래 젤라틴 마시멜로우

○ 제조 소시지에서 간이진단기를 이용한 돼지유래물질 검출

1) ELISA 분석 방법을 위한 샘플 준비

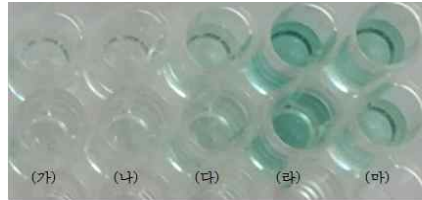
- 돈지와 우육을 혼합하여 샘플 제조
- 돈지 함량 : 0%, 10%, 30%, 50%, 100%
- 시판제품 구입 : 할랄 마트 식육가공품 구입 (PCR 분석 시료와 동일)

2) 항체를 이용한 ELISA 분석

- 2B8-31 항체를 1,000배 희석 후 사용
- 2차 항체로 Goat anti-mouse IgG peroxidase conjugate 사용

3) ELISA 분석 방법을 이용한 돈지 검출 결과

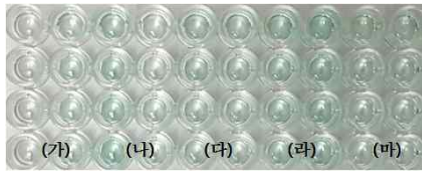
- 돈지 첨가 제조 소시지는 ELISA 분석 결과 돈지 10%까지 육안으로 확인 가능



[돈지 검출한계 확인 시험]

(가) 돈지 0%, (나) 10%, (다) 30%, (라) 50%, (마) 100%

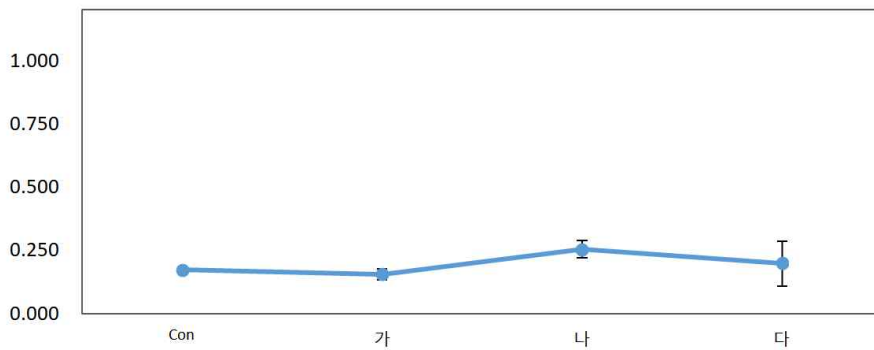
- 시판 식육가공품은 돈지 항체를 이용하여 ELISA 분석한 결과 검출 되지 않았음



[시판 식육 가공품에서 돈지 검출 시험]

(가) 소민찌, (나) 소고기패티1, (다) 소고기패티2, (라) 미트볼, (마) 치킨소시지

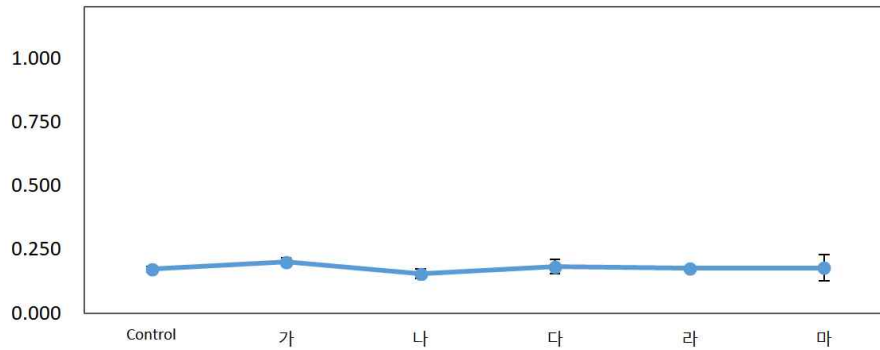
- 스낵류는 돈지 항체를 이용하여 ELISA 분석한 결과 검출 되지 않았음



[스낵류에서 돈지 검출 시험]

(가) 초코과자, (나) 할랄인증 감자칩, (다) 할랄 비인증 감자칩

- 캔디류도 돈지 항체를 이용하여 ELISA 분석한 결과 검출 되지 않았음



[캔디류에서 돈지 검출 시험]

(가) 판젤라틴, (나) 할랄 비인증 마시멜로우, (다) 할랄 비인증 젤리 1,
(라) 할랄 비인증 젤리 2, (마) 생선 유래 젤라틴 마시멜로우

[2차년도 연구수행 결과]

1. 연구대상 식품의 선정

- 국내·외 관련자료(관련기사, 문헌, 시장 조사 등)를 분석하여 연구 대상 식품을 선정
 - 즉석조리식품
 - 즉석조리식품의 가장 대표적 식품인 라면류 구매 후 분석
 - 국내 할랄 슈퍼마켓에서 많이 팔리고 있는 통조림 구매 후 분석
 - 냉동식품
 - 냉동식품 중 판매량이 높은 만두류를 구입 후 분석
 - 가정대체식품
 - 전자레인지로 간편하게 조리하여 섭취할 수 있는 커리 및 짜장류, 햄류를 구입 후 분석
 - 소스류
 - 판매량이 많은 돈까스소스, 오꼬노미소스, 허니머스타드를 구입 후 분석
 - 할랄 마켓에서 쉽게 구입 할 수 있는 할랄 소스 구입 후 분석

2. 간이 진단기 이용을 위한 식품 전처리 방법 확립

- 간이 진단기에 이용될 항체의 민감도를 높이기 위하여 시료의 단백질을 추출 방법을 탐색 및 확립
 - 돈육 및 돈지 단백질 추출 방법 확립
 - 0.5 M NaCl 첨가 후 중탕
 - 원심분리 (3,220 xg, 15분) 후 여과지를 이용하여 여과
 - Tris-Buffered Saline (TBS) buffer를 이용하여 희석하였으나 원액과 큰 차이가 나타나지 않아
원액을 이용하여 ELISA 수행

3. PCR 분석 방법을 이용한 돼지유래물질 검출

1) 돼지 특이적 PCR 프라이머 제작

- 미토콘드리아 DNA를 이용한 돼지 특이적 PCR 프라이머 제작

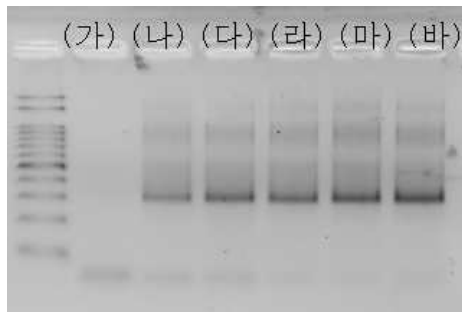
Porcine	Forward	5'-GGT TCT TAC TTC AGG ACC ATC-3'
	Reverse	5'-GTG TAC GCA CGT GTA TGT AC-3'
P_NDH	Forward	5'-GCC TCA CTC ACA TTA ACC ACA CT-3'
	Reverse	5'-AGG GGA CTA GGC TGA GAG TGA A-3'

2) 패티 제조

- 돈육과 우유, 계육을 혼합하여 샘플 제조
- 돈육 함량: 0%, 1%, 2%, 5%, 10%, 100%

3) PCR 방법을 이용한 검출 결과

- PCR 프라이머를 이용한 돼지 검출 한계 확인 시험 결과 돈육 검출한계가 1% 미만으로 확인됨



[PCR 프라이머를 이용한 돼지 검출 한계 확인 시험]

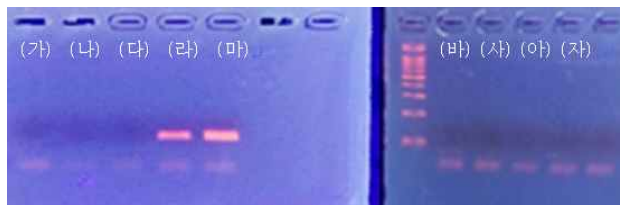
(가) 돈육 0%, (나) 1%, (다) 2%, (라) 5%, (마) 10%, (바) 100%

4) 시판 제품에서 PCR 방법을 이용한 검출 결과

▪ 즉석조리제품

가	나	다	라	마	바	사	아	자
								
소토미향 라면	치킨향 라면	미고랭 라면	신라면	진라면	팍미 인스턴트 컵라면	데히니하 리	파바빈스 사우디 코시나	팔렉 판니어
라면	라면	라면	라면	라면	라면	통조림	통조림	통조림
할랄인증	할랄인증	할랄인증	할랄비인증	할랄비인증	할랄인증	할랄인증	할랄인증	할랄인증

- 돼지 특이적 프라이머(P_NDH)로 PCR을 진행한 결과 (라) 신라면, (마) 진라면에서 밴드 검출됨



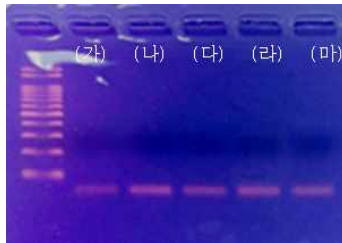
[즉석조리식품에서 돈육 유래물질 검출 시험]

(가) 소토미향라면, (나) 치킨향라면, (다) 미고랭라면, (라) 신라면, (마) 진라면,
(바) 팍미인스턴트컵라면, (사) 데히니하리, (아) 파바빈스사우디코시나, (자) 팔렉판니어

■ 가정대체식품

가	나	다	라	마
				
김보키친 치킨카레	3분쇠고기짜장	터키브레스트	콘비프	조안치킨런천로프
커리	짜장	햄	햄	햄
할랄인증	할랄비인증	할랄인증	할랄인증	할랄인증

- 돼지 특이적 프라이머 (Porcine)로 PCR을 진행한 결과 밴드 검출되지 않음.
- (나) 3분 쇠고기 짜장에서 밴드가 검출되었어야 함.



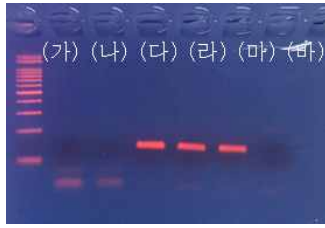
[가정대체식품에서 돈육 유래물질 검출 시험]

(가) 김보키친 치킨카레, (나) 3분쇠고기짜장, (다) 터키브레스트, (라) 콘비프, (마) 조안치킨런천로프

■ 냉동식품

가	나	다	라	마	바
					
푼자비 사모사	베지터블 사모사	홍진경의 더만두	자연담은 잎새 군만두	올바른 핫도그	템페히뿌로
만두	만두	만두	만두	핫도그	콩
할랄인증	할랄인증	할랄비인증	할랄비인증	할랄비인증	할랄인증

- 돼지 특이적 프라이머(P_NDH)로 PCR을 진행한 결과 (다) 홍진경의 더만두, (라) 자연담은 잎새 군만두, (마) 올바른 핫도그에서 밴드 검출됨.



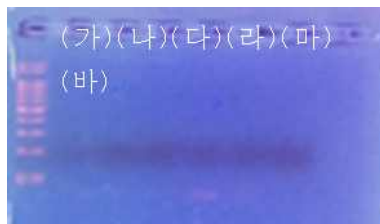
[냉동식품에서 돈육 유래물질 검출 시험]

(가) 훈자비사모사, (나) 베지터블사모사, (다) 흥진경의더만두,
(라) 자연담은잎새군만두, (마)올바른핫도그, (바) 탬페히쁘로

■ 소스류

가	나	다	라	마	바
					
돈까스 소스	그린커리 페이스트	툼윤수프 페이스트	부미푸드퍼셀	오꼬노미소스	허니머스타드 소스
소스	소스	소스	소스	소스	소스
할랄비인증	할랄인증	할랄인증	할랄인증	할랄비인증	할랄비인증

- 돼지 특이적 프라이머(Porcine)로 PCR을 진행한 결과 밴드 검출되지 않음.
- (마) 오꼬노미소스에서 밴드가 검출되었어야 함.



<소스류에서 돈육 유래물질 검출 시험>

(가) 돈까스소스, (나) 그린커리페이스트, (다) 톰윤수프페이스트,
(라) 부미푸드퍼셀, (마) 오꼬노미소스, (바) 허니머스타드소스

4. 간이진단기를 이용한 돼지유래물질 검출

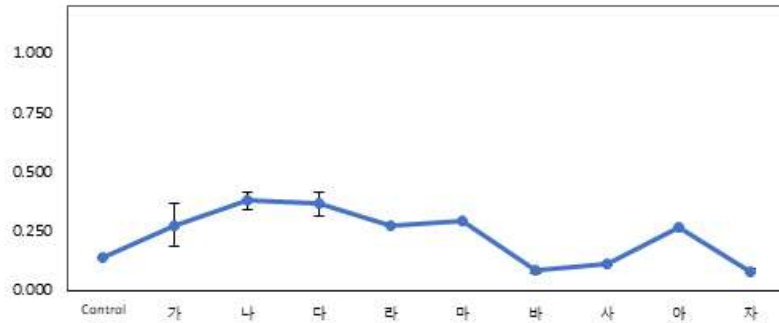
1) 항체를 이용한 ELISA 분석

- 1차 항체 2B8-31을 1,000배 희석 후 사용
- 2차 항체로 Goat anti-mouse IgG peroxidase conjugate를 2,000배 희석 후 사용

2) ELISA 분석을 이용한 검출 결과

■ 즉석조리제품

- (마) 신라면, (바) 진라면에서 높은 발색을 보였어야 하지만 다른 시료와 비슷한 정도의 발색을 보임.
- 가루류의 단백질 추출 또는 간이 진단기 적용이 어렵다고 판단됨.

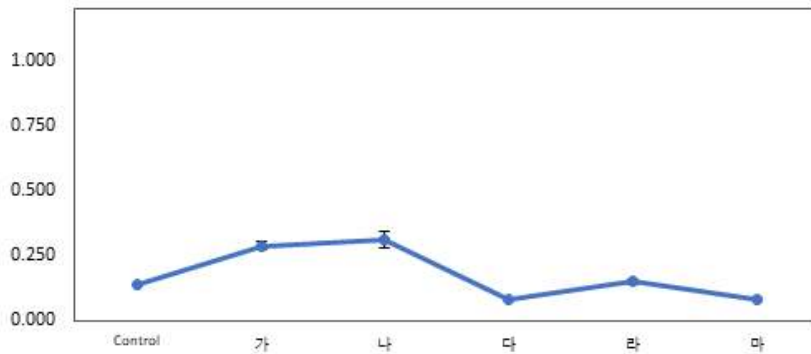


[즉석조리제품에서 돈육 유래물질 검출 시험]

- (가) 소토미향라면, (나) 치킨향라면, (다) 미고랭라면, (라) 신라면, (마) 진라면, (바) 팍미인스턴트컵라면, (사) 데히니하리, (아) 파바빈스사우디코시나, (자) 팔렉판니어

■ 가정대체식품

- (나) 3분쇠고기짜장에서 높은 발색을 보였어야 하지만 다른 시료와 비슷한 정도의 발색을 보임
- 점성이 있는 액체류의 단백질 추출 또는 간이 진단기 적용이 어렵다고 판단됨

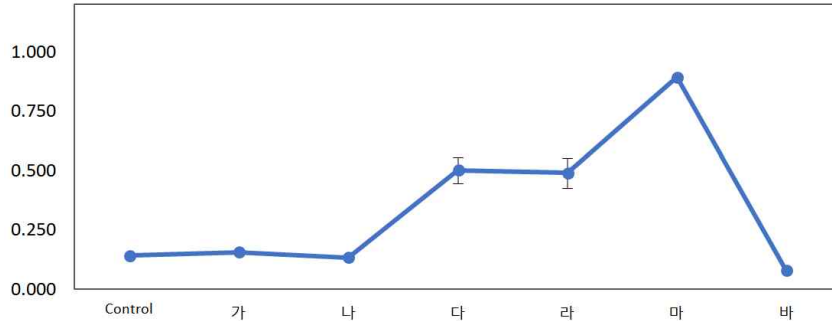


[가정대체식품에서 돈육 유래물질 검출 시험]

- (가) 김보키친 치킨카레, (나) 3분쇠고기짜장, (다) 터키브레스트, (라) 콘비프, (마) 조안치킨런천로프

■ 냉동식품

- (다) 홍진경의 더만두, (라) 자연담은 잎새 군만두, (마) 올바른핫도그에서 높은 발색을 보임.

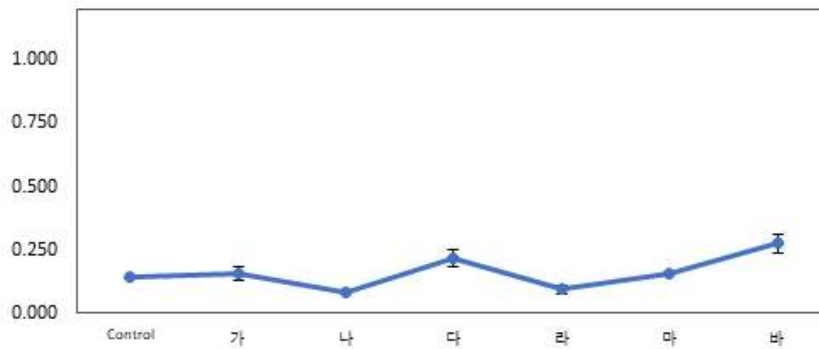


[냉동식품에서 돈육 유래물질 검출 시험]

- (가) 훈자비사모사, (나) 베지터블사모사, (다) 홍진경의더만두, (라) 자연담은잎새군만두, (마)올바른핫도그, (바) 템페히쁘로

■ 소스류

- (마) 오꼬노미소스에서 높은 발색을 보였어야 하지만 다른 시료와 비슷한 정도의 발색을 보임
- 점성이 있는 액체류의 단백질 추출 또는 간이 진단기 적용이 어렵다고 판단됨



[소스류에서 돈육 유래물질 검출 시험]

- (가) 돈까스소스, (나) 그린커리페이스트, (다) 톰윌수프페이스트, (라) 부미푸드퍼셀, (마) 오꼬노미소스, (바) 허니머스타드소스

5. PCR 방법과 간이 진단기를 활용한 방법에서의 검출력 비교

- PCR 이용 방법과 간이 진단기 비교 분석
 - 가루류 (라면스프) 및 점성이 있는 액체류 (소스류)는 간이 진단기의 적용이 어려움.

		PCR	간이진단기
1차년도	식육가공품	○	○
	스낵류	○	X
	캔디류	X	X
2차년도	즉석조리식품	○	X
	냉동식품	○	○
	가정대체식품	X	X
	소스류	X	X

[제1협동]

1. 돈지육, 돈육으로부터 열에 안정한 crude protein 추출조건 확립

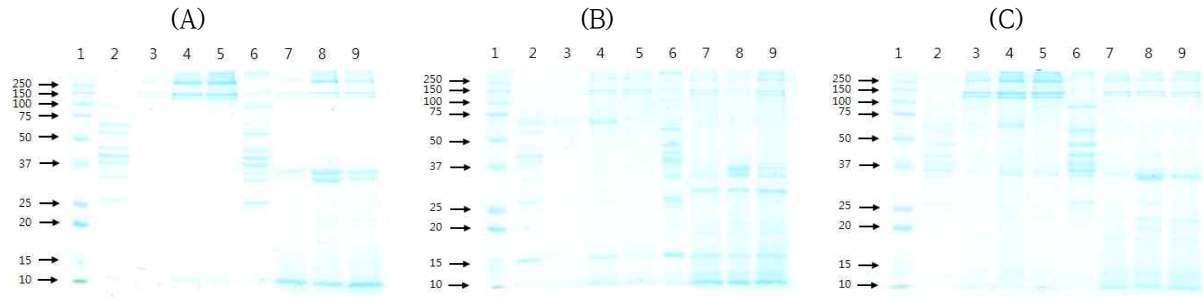
1) 열 안정 수용성 단백질 확인

- 돼지, 소, 닭의 근육 및 지방에서 추출한 단백질에 대해 정량을 실시한 결과 근육 뿐만 아니라 지방 조직 내에도 단백질이 존재하는 것이 확인됨.
- 가열 시료보다는 생 시료를 이용하여 추출 시 단백질 농도가 높으며, 가열시료의 경우 비열처리법 보다 열 처리법으로 추출하는 것이 단백질 추출에 더 효과적임.
- 가열 추출 시에도 일정량의 단백질이 존재하는 것으로 보아 추출된 단백질은 열에 안정한 수용성 단백질이라고 판단됨.

Table 1. Protein concentration of pork, beef and chicken meats and fat extract

Samples		Protein concentration (mg/mL)			
		Non-heating extraction		Heating extraction	
		Raw	Cooked	Raw	Cooked
Pork	Meat	14.221	0.254	1.381	0.503
	Fat	3.777	0.241	0.236	0.111
Beef	Meat	9.168	0.349	1.389	0.456
	Fat	3.332	0.071	0.270	0.119
Chicken	Meat	17.180	0.199	1.010	0.340
	Fat	3.168	0.078	0.386	0.177

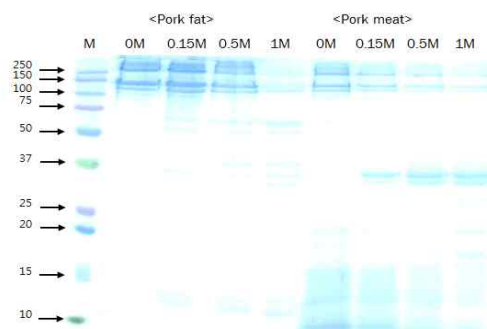
- SDS-PAGE를 통해 단백질의 패턴을 확인한 결과 생육, 생지방 시료를 비열처리법으로 추출한 시료의 경우는 다양한 크기의 여러 단백질이 존재하고 있음이 확인됨.
- 시료를 가열하거나 단백질 추출 시 열처리를 한 경우에는 특정한 크기의 단백질이 주로 존재하는 것으로 확인되어 이들 단백질은 열에 안정한 단백질이라 판단됨.



[SDS-PAGE pattern of pork (A), beef (B), chicken (C) meat and fat extracts. Lane 1: Marker, Lane 2: raw fat(non-heating), lane 3: cooked fat(non-heating), lane 4: raw fat(heating), Lane 5: cooked fat(heating), Lane 6: raw meat(non-heating), lane 7: cooked meat(non-heating), lane 8: raw meat(heating), Lane 9: cooked meat(heating).]

2) 돈지육 및 돈육 열안정 수용성 단백질 추출법 확립

- 돈지육 및 돈육의 열안정 수용성 단백질 추출 효율성을 높이기 위해 추출버퍼인 NaCl의 농도(0 M, 0.15 M, 0.5 M, 1 M)를 달리하여 열 처리법으로 추출한 결과 낮은 농도에서도 단백질이 추출이 가능하였고, 농도가 증가할수록 특정 크기의 단백질 밴드가 짙어지는 것을 확인할 수 있었음.
- 추출된 단백질 농도는 NaCl의 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 보였으나, 1M 이상의 염 농도는 이후 면역분석법에 이용 시 분석에 영향을 미칠 가능성이 있으므로 0.5M의 농도를 추출버퍼 농도로 결정함.

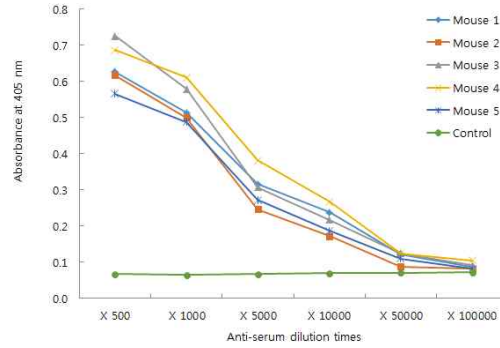


[SDS-PAGE pattern of pork meat and fat extracts]

2. 돈육 및 돈지육에 대한 단클론성 항체 개발

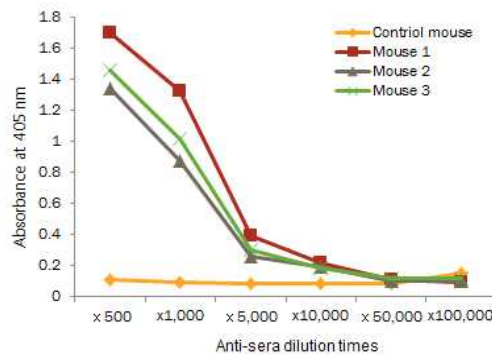
1) 추출 단백질을 이용한 면역실험 및 항혈청 역가확인

- 돈지육에서 열처리법으로 추출한 열안정 수용성 단백질을 면역한 마우스의 항혈청 역가 측정 결과 모든 마우스의 혈청이 항체 역가가 있는 것으로 확인되었으며, 모든 마우스를 세포융합에 사용하였음.



[Anti-sera titration for immunized mice with pork fat protein]

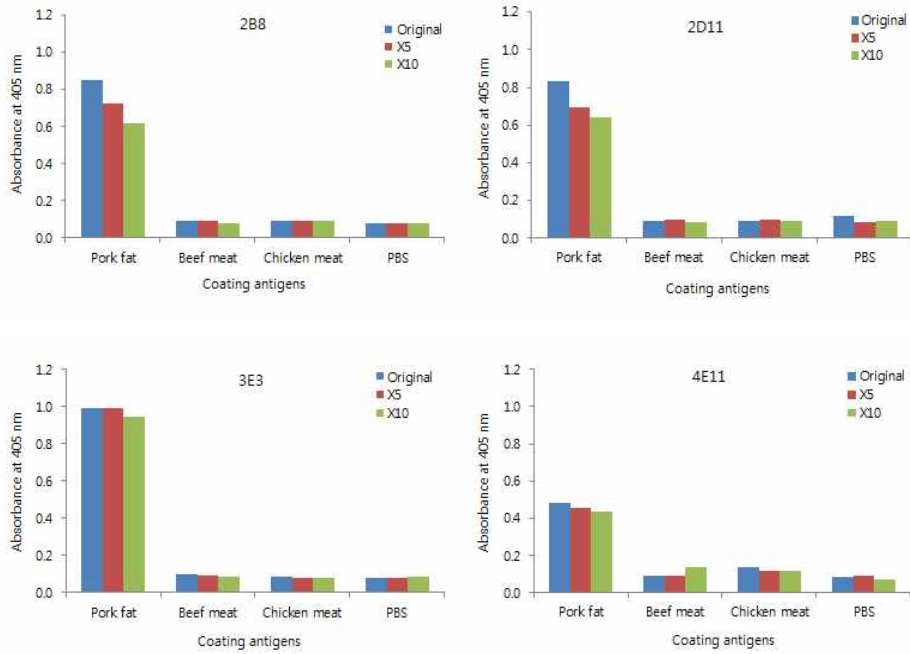
- 돈육에서 열처리법으로 추출한 열안정 수용성 단백질을 면역한 마우스의 항혈청 역가 측정 결과 모든 마우스의 혈청이 항체 역가가 있는 것으로 확인되었고, 돈지에 대해서도 항혈청역가를 함께 나타내는 것으로 확인됨.



[Anti-sera titration for immunized mice with pork meat protein]

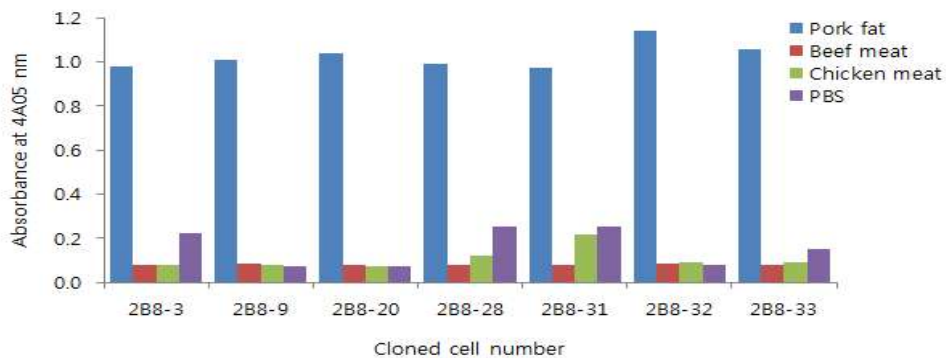
2) 돈지육 및 돈육 특이 항체 생산용 하이브리도마 세포주 개발

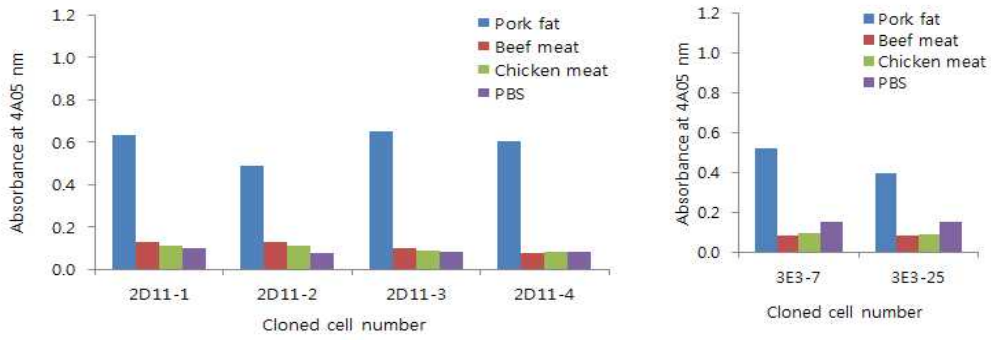
- 항혈청 역가를 나타내는 돈지육 수용성 단백질 면역 마우스의 비장세포와 암세포 (SP2/0)를 이용하여 세포융합을 실시한 결과 돈지에 대해 역가를 나타내는 총 4종(PF 2B8, 2D11, 3E3, 4E11)의 융합세포를 획득함.



[Titration of fused cell]

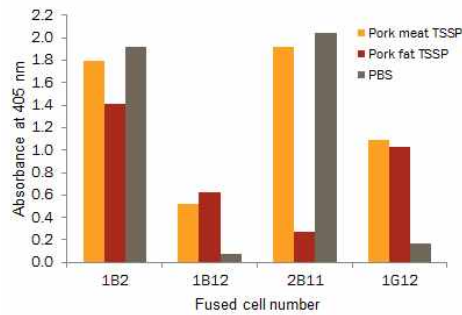
- 4종(PF 2B8, 2D11, 3E3, 4E11)의 융합세포를 무한대희석법으로 희석하여 클로닝 하였으며, 클로닝 세포의 역가 측정결과 2B8 클로닝 세포 7종(2B8-3, 2B8-9, 2B8-20, 2B8-28, 2B8-31, 2B8-32, 2B8-33) 2D11 클로닝 세포 4종(2D11-1, 2D11-2, 2D11-3, 2D11-4), 3E3 클로닝 세포 2(3E3-7, 3E3-25)종에서 역가를 확인 하였으며 그 중 2B8 클로닝 세포가 높은 역가를 나타내는 것으로 확인됨.
- 4E11 클로닝 세포는 역가를 나타내지 않음.



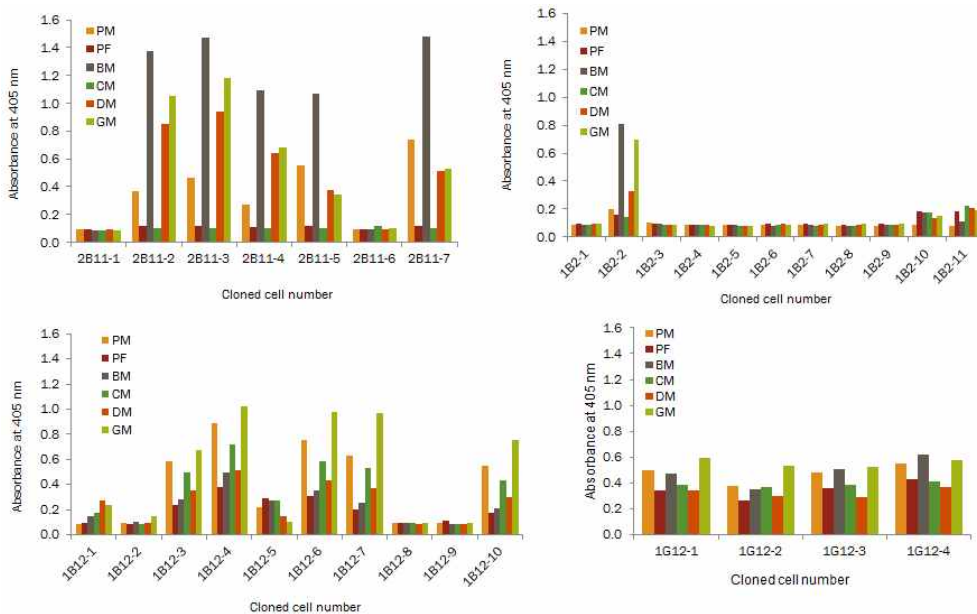


[Titration of cloned cell]

- 항혈청 역가를 나타내는 돈육 수용성 단백질 면역 마우스의 비장세포와 암세포(SP2/0)를 이용하여 세포융합을 실시한 결과 돈육에 대해 역가를 나타내는 총 4종(PM 1B2, 1B12, 2B11, 1G12)의 융합세포를 획득하였으나 클로닝 후 4종에 대해 돈지육 및 돈육 외에 우육, 염소육, 계육, 오리육에도 반응하는 것으로 확인됨.

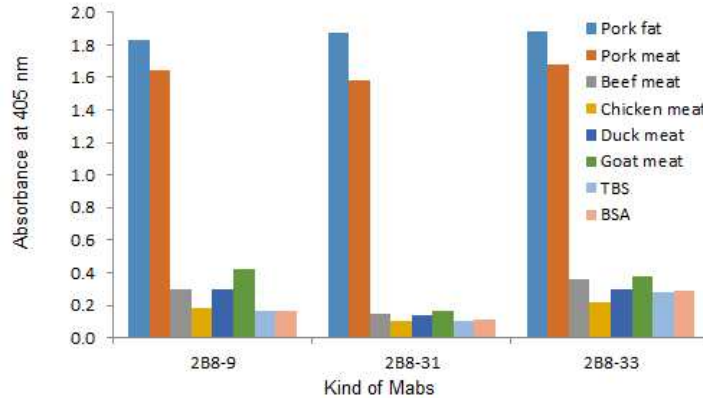


[Titration of fused cell]



[Titration of cloned cell]

- 최종적으로 돈지육의 열안정성 단백질을 면역한 마우스로부터 개발된 hybridoma cell 2B8 line은 돈지육과 돈육에 특이하게 반응하는 것으로 확인되어 본 협동연구과제 목표인 돈육 및 돈지육 검출 항체로 이용이 가능할 것으로 확인되었음.

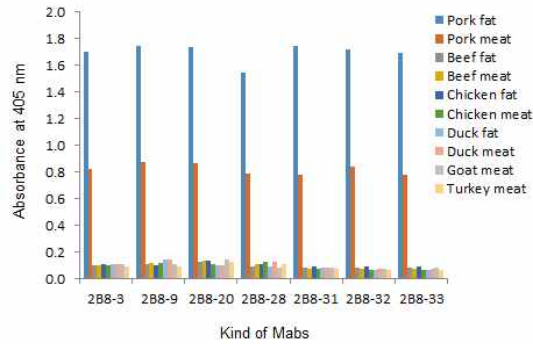


[Monoclonal antibodies specific to pork fat and meat]

3) 항체 특성 확인

가) ELISA법에 의한 특성 확인

- 돈지육 수용성 단백질을 면역한 마우스의 비장세포를 융합하여 얻은 하이브리도마 세포 중 높은 역가를 나타내는 PF 2B8 클로닝세포 7종(2B8-3, 2B8-9, 2B8-20, 2B8-28, 2B8-31, 2B8-32, 2B8-33)을 대상으로 다른 육류와의 교차반응성을 확인함.
- ELISA법으로는 다른 육류 및 어류 시료에 대해 교차반응을 함께 확인하였고, Western blot법으로는 다른 육류시료에 대해 교차반응을 확인하였음.
- ELISA법으로 교차반응성을 확인한 결과 생산된 PF 2B8 클로닝 세포 7종은 돈지육과 돈육에 대해서만 반응성을 나타내었고, 다른 육류와 어류에 대해서는 교차반응성을 나타내지 않아 항체 특이성이 매우 높은 것으로 확인됨.
- 본 결과에서는 이들 항체가 돈육보다 돈지육에 반응성이 더 좋은 것으로 확인되었지만, 돈육을 분석하기 위한 예비 실험에서 추출 시료를 원액으로 사용하는 것보다 PBS 등의 버퍼로 희석해서 사용하였을 때 돈육에 대한 반응성이 상승되는 것을 확인하였기 때문에 다른 조건들을 최적화 시킨다면 돈육에 대한 검출 민감도를 향상시킬 수 있을 것으로 생각됨.
- 그러므로, 돈지육 뿐만 아니라 돈육에도 반응하는 것으로 확인된 7종의 항체를 돈육 및 돈지육에 특이한 항체로 활용이 가능할 것으로 판단됨.

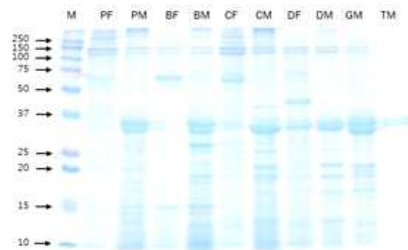


[Cross-reactivity of Mabs to other meat and fat samples diluted with buffers]

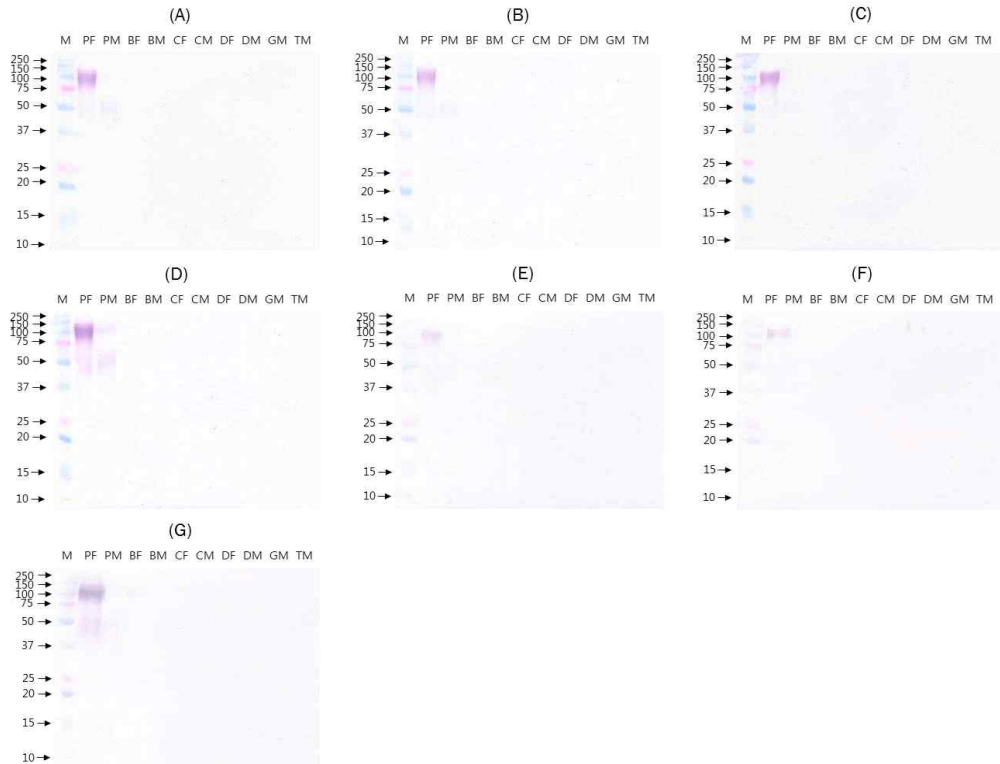
- 돈육 수용성 단백질을 면역한 마우스의 비장세포를 융합하여 얻은 하이브리도마 세포 중 역가를 나타내는 클로닝 세포의 경우 클로닝 세포 역가 측정 시 다른 축육 시료와 교차반응성을 확인하였음.

나) Western blot법에 의한 특성 확인

- Western blot으로 PF 항체의 교차반응성을 확인한 결과 PF 2B8-31, PF 2B8-32 2종은 돈지육에만 반응을 하였고, 나머지 5종(PF 2B8-3, 2B8-9, 2B8-20, 2B8-28, 2B8-33)은 돈육에 대해서도 반응성을 가지는 것으로 확인됨.

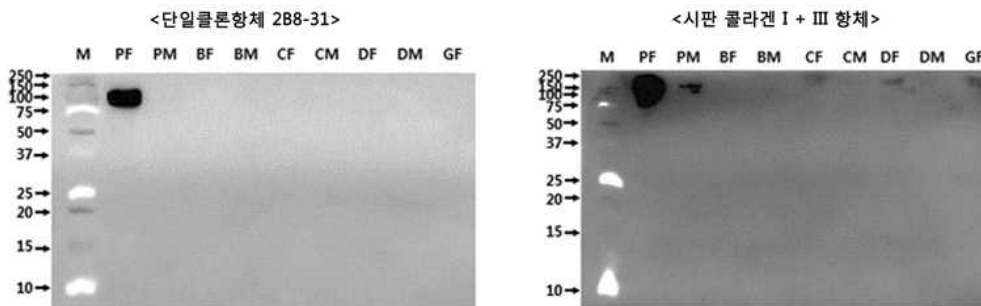


[SDS-PAGE of raw meat and fat extracts with heating treatment. Lane M : protein marker, Lane PF : pork fat, Lane PM : pork meat, Lane BF : beef fat, Lane BM : beef meat, Lane CF : chicken fat, Lane CM : chicken meat, Lane DF : duck fat, Lane DM : duck meat, Lane GM : goat meat]



[Western blot of thermal-stable soluble proteins extracted from fat and meat using (A) Mab 2B8-3, (B) Mab 2B8-9, (C) Mab 2B8-20, (D) Mab 2B8-28, (E) Mab 2B8-31, (F) Mab 2B8-32 and (G) Mab 2B8-33. Lane M: protein marker, Lane PF: pork fat, Lane PM: pork meat, Lane BF: beef fat, Lane BM: beef meat, Lane CF: chicken fat, Lane CM: chicken meat, Lane DF: duck fat, Lane DM: duck meat, Lane GM: goat meat]

- 개발된 항체와 반응하는 단백질은 collagen으로 추정되었고, 이를 확인하기 위해 시판되는 Bio-Rad collagen I/III을 이용하여 western blot을 실시하였고, 본 연구에서 개발된 단일클론항체 2B8-31과 반응 위치를 비교하였음.
- 그 결과 두 항체 모두 동일한 위치에 반응하는 것으로 확인되어 본 연구에서 개발된 항체 7종이 collagen에 반응하는 항체로 확인되었음.

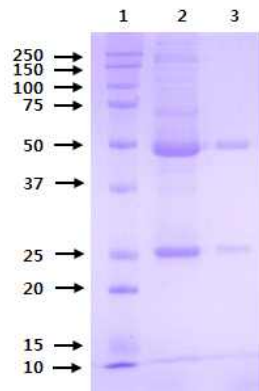


[Comparison of western blot results by both antibodies, PF2B8-32 and commercial Bio-Rad Collagen I/III Antibody. Lane M: protein marker, Lane

PF: pork fat, Lane PM: pork meat, Lane BF: beef fat, Lane BM: beef meat, Lane CF: chicken fat, Lane CM: chicken meat, Lane DF: duck fat, Lane DM: duck meat, Lane GF: goat fat]

4) 항체 대량 생산 및 정제

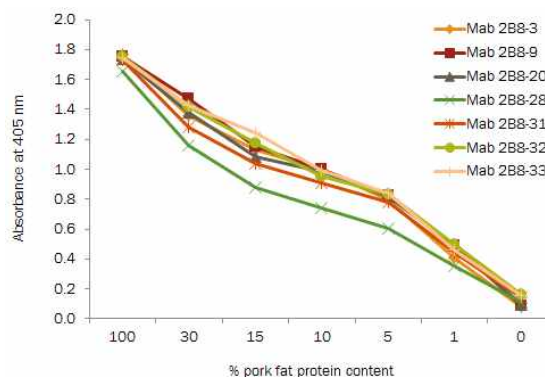
- 이상의 결과 돈지육 및 돈육에 대한 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주 PF 2B8 line 7종 (PF 2B8-3, 2B8-9, 2B8-20, 2B8-28, 2B8-31, 2B8-32, 2B8-33)을 마우스 복강에 주입하여 복수액을 생산한 후 ammonium sulfate법으로 정제하여 다량의 항체를 생산하였음.
- 생산된 항체의 일부는 protein G 컬럼을 이용하여 2차 정제를 실시하였으며, SDS-PAGE를 실시하여 항체 정제 여부를 확인하였고, 생산된 항체는 IgG1 타입의 항체임을 확인함.



[SDS-PAGE patterns of purified monoclonal antibodies. Lane 1: Marker, Lane 2: purified ammonium sulfate, Lane 3: purified protein G]

[Isotype of Mab]

- 생산한 항체의 역가를 측정 한 결과 2B8-28 항체를 제외한 6종의 항체 역가는 비슷한 것으로 확인됨.



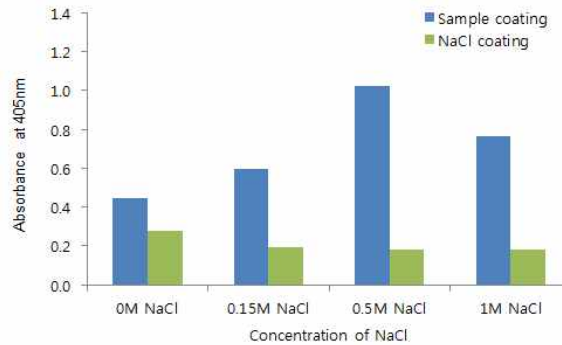
[Titration of seven kinds Mab against pork fat by indirect ELISA]

3. 돈육 및 돈지육 검출을 위한 효소면역분석법(ELISA)의 최적화

1) 돈지육 검출을 위한 효소면역분석법(ELISA)의 최적화

가) 시료추출 buffer 농도에 따른 ELISA 영향 확인

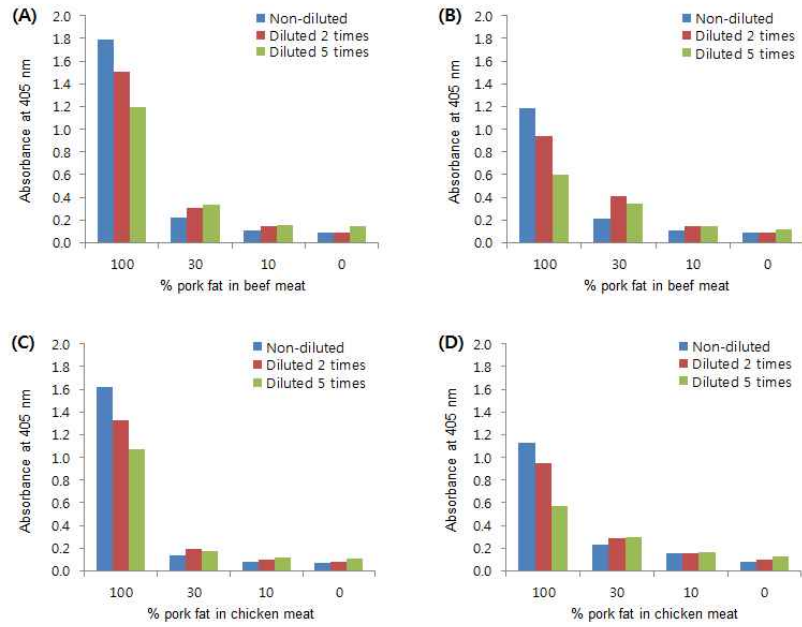
- NaCl의 농도가 높아짐에 따라 ELISA에 미치는 영향을 확인하기 위해 돈지 시료를 0M, 0.15M, 0.5M, 1.0M의 NaCl로 추출한 후 분석한 결과 1.0M NaCl로 추출한 시료의 경우 0.5M NaCl로 추출한 시료보다 흡광도 값이 낮은 것으로 확인되어 시료추출 시에는 0.5 M NaCl을 사용하는 것으로 결정함.



[Effect of sample extraction buffer concentration for the detection of pork fat by indirect ELISA using Mab 2B8-31]

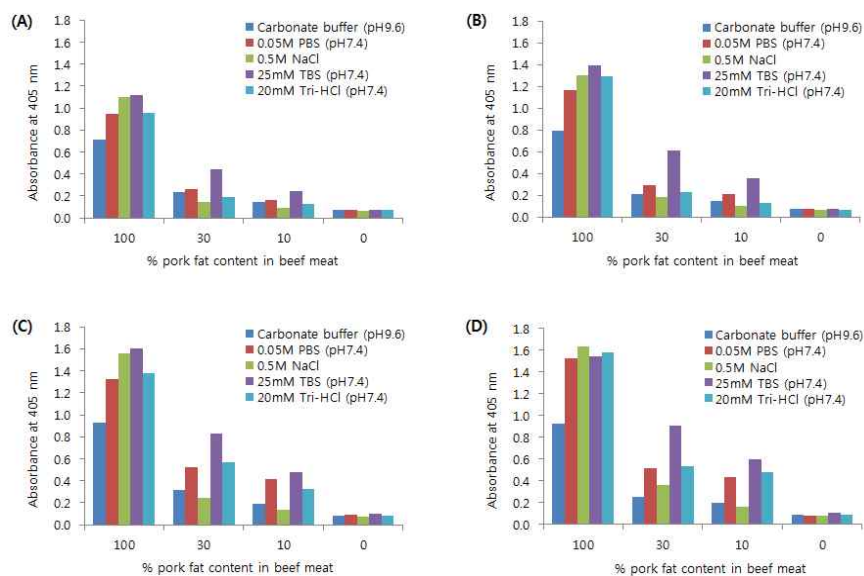
나) 추출 단백질 coating 조건 결정

- 추출한 단백질을 coating 항원으로 하여 ELISA를 실시하기 위해 먼저 추출한 단백질 원액을 그대로 사용가능한지의 여부 확인을 위해 추출 원액, 2배 희석액, 5배 희석액을 각각 coating하여 비교하였으며, 이와 함께 시료의 pre-cooking에 따른 영향을 확인하였음.
- 그 결과 추출 원액 그대로 coating하는 것 보다 2배 희석하여 coating하는 것이 좋았고, 시료를 pre-cooking 없이 열처리 추출하는 것보다 pre-cooking 후 열처리 추출하는 것이 분석에 더 효과적임을 확인함. 따라서 이후 실험은 pre-cooking 후 열처리 추출한 다음 2배 희석하여 coating하는 것으로 결정함.



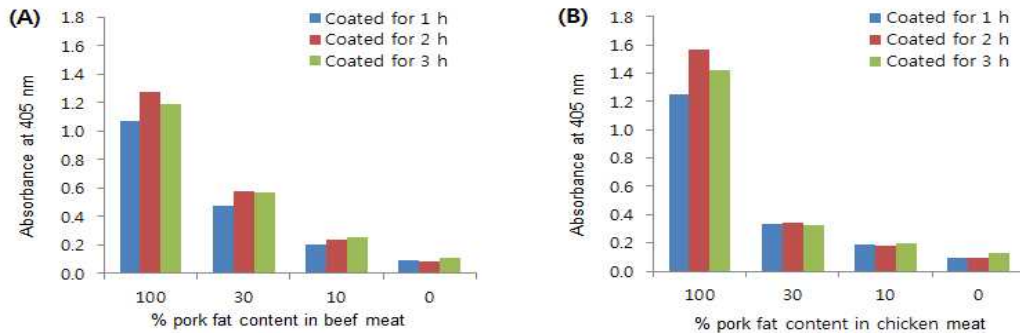
[Determination of optimal sample dilution times and effect of sample pre-cooking for the detection of pork fat in beef and chicken meat by indirect ELISA using Mab 2B8-31. (A) Non pre-cooked pork fat in beef meat, (B) Pre-cooked pork fat in beef meat, (C) Non pre-cooked pork fat in chicken meat, (D) Pre-cooked pork fat in chicken meat.]

- 추출 단백질의 희석 buffer를 결정하기 위해 carbonate buffer(pH9.6), 0.05M PBS(pH7.4), 0.5M NaCl, 25mM TBS(pH7.4), 20mM Tris-HCl(pH7.4)을 비교한 결과 25mM TBS(pH7.4)가 가장 흡광도가 높고 10%의 돈지 함량에서도 다른 buffer 보다 반응성이 좋아 이를 희석 buffer로 선택함.



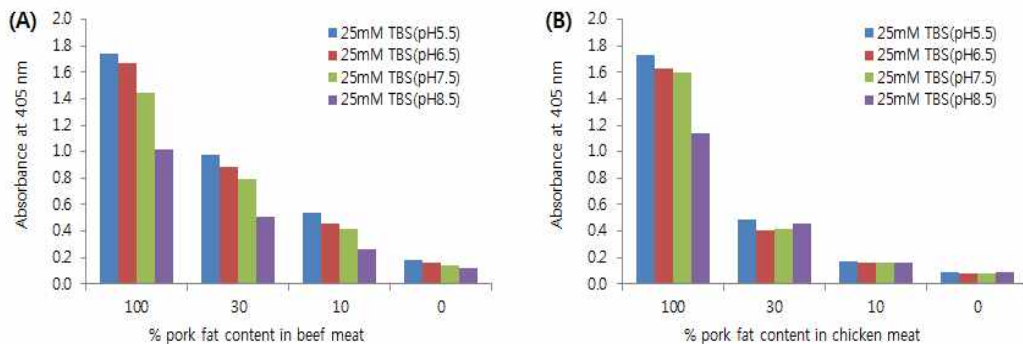
[Comparison of coating conditions and sample dilution buffers for the detection of pork fat in beef meat by indirect ELISA using Mab 2B8-31. (A) 4°C for 1h, (B) 4°C for overnight, (C) 37°C for 1h, (D) 37°C for overnight.]

- 추출 단백질의 coating 온도 및 시간을 비교한 결과 4°C에서 반응시키는 것 보다 37°C에서 반응시키는 것이 좋았고 시간의 경우 overnight 하여 반응을 시키는 경우가 좋은 결과를 나타내었음.
- 추출 단백질을 overnight 하여 코팅시키는 것은 분석에 효율성이 떨어지는 것으로 판단되어, 실험의 효율성을 보다 높이기 위해 코팅시간을 37°C에서 1시간, 2시간, 3시간으로 세분화하여 비교한 결과 2시간 반응이 좋은 것으로 확인되어 최종적으로 추출 단백질의 coating 온도 및 시간은 37°C에서 2시간으로 결정하였음.



[Comparison of coating times for the detection of pork fat in beef and chicken meat by indirect ELISA using Mab 2B8-31. (A) Pork fat in beef meat, (B) Pork fat in chicken meat]

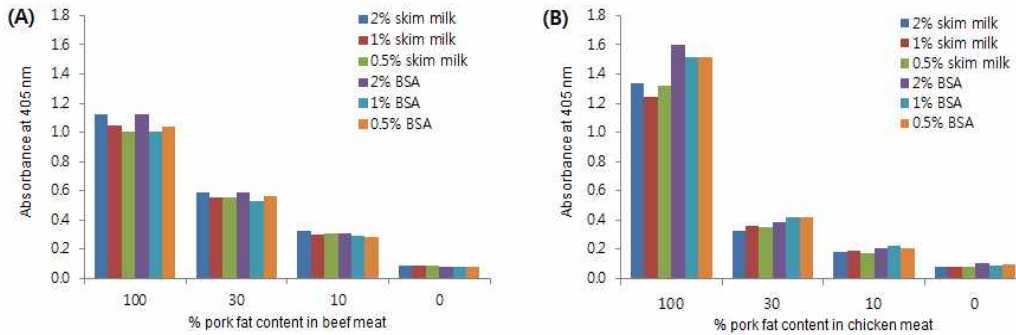
- 희석 buffer로 선택된 25mM TBS의 pH 영향을 알아보기 위해 pH를 5.5, 6.5, 7.5 및 8.5로 달리하여 비교한 결과 pH가 낮아질수록 반응성이 감소하는 것으로 확인되었고, 큰 차이는 없지만 pH 6.5를 희석버퍼의 pH로 결정함.



[Effect of sample dilution buffer pH for the detection of pork fat in beef and chicken meat. (A) pork fat in beef meat, (B) pork fat in chicken meat]

다) Blocking 용액 및 농도 결정

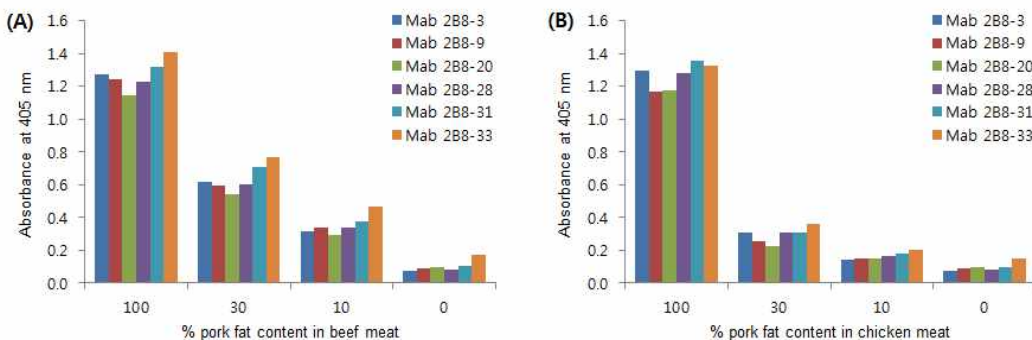
- Blocking 용액 종류 및 농도를 결정하기 위해 일반적으로 많이 사용되고 있는 skim milk와 BSA를 각각 0.5%, 1%, 2%의 농도로 하여 비교한 결과 소고기에서는 차이는 없었으며, 닭고기의 경우도 큰 차이는 없었으나 0.5 % BSA가 보다 좋은 결과 값을 나타내 blocking 용액은 0.5% BSA로 결정함.



[Selection of blocking reagent and concentration. (A) Pork fat in beef meat, (B) Pork fat in chicken meat]

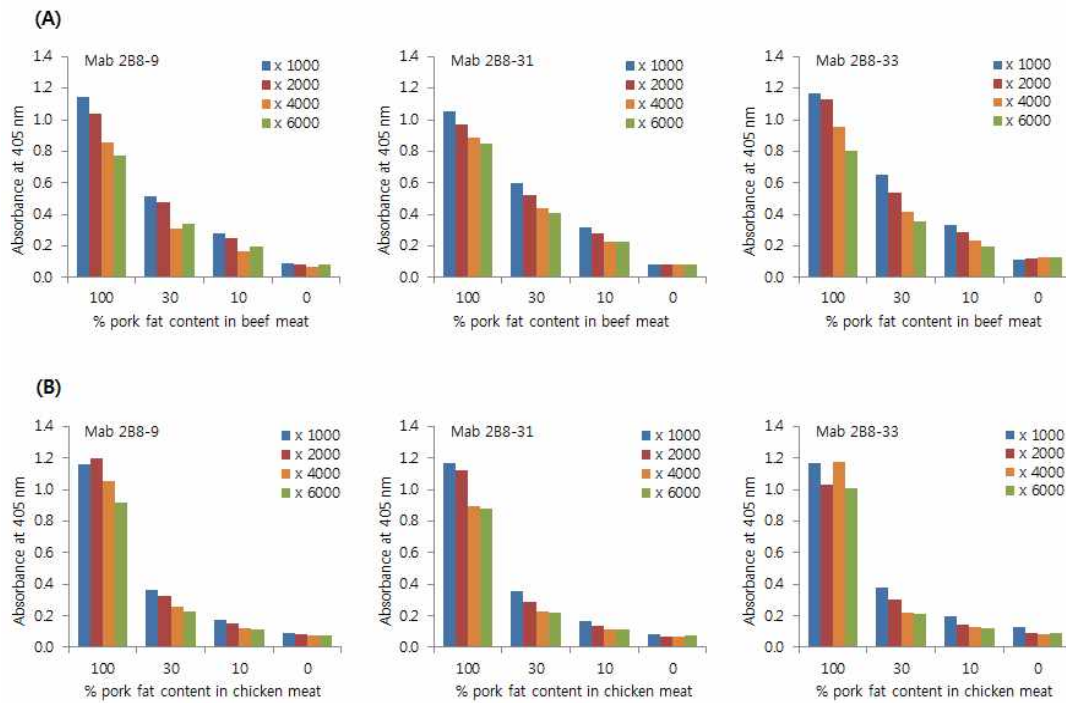
라) 항체종류 및 항체 희석배수 결정

- Western blot을 통해 1차적으로 항체를 선택하였으나 ELISA 상에서 반응성이 좋은 항체를 다시 선택하기 위해 생산된 7종의 항체(2B8-3, 2B8-9, 2B8-20, 2B8-28, 2B8-31, 2B8-32, 2B8-33)를 비교한 결과 2B8-31 항체가 가장 좋은 것으로 확인됨.
- 2B8-33 항체의 경우 2B8-31 항체를 제외한 다른 항체에 비해 0% 돈지에서 약간의 반응성을 나타내지만 반응성이 좋은 것으로 판단되어 이후 실험에 사용할 항체로 선택함.
- 또한 앞서 Western blot 결과와 비교하여 2B8-9 항체도 선택하여 최종적으로 2B8-9, 2B8-31, 2B8-33 항체를 ELISA 분석에 사용하는 항체로 선택함.



[Selection of Mabs. (A) Pork fat in beef meat, (B) Pork fat in chicken meat.]

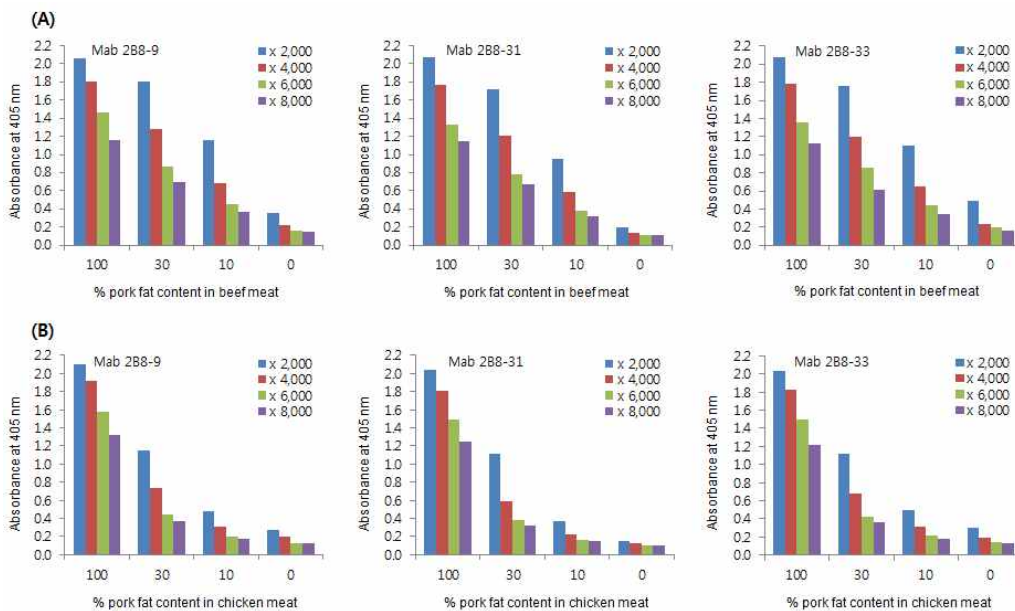
- 항체 희석배수를 결정하기 위해 선택한 항체 2B8-9, 2B8-31, 2B8-33 항체를 1,000배, 2,000배, 4,000배, 6,000배로 희석하여 비교한 결과 1,000배 희석하여 사용하였을 때 가장 좋은 결과를 나타내어 항체 희석배수는 1,000배로 결정함.



[Determination of optimal Mab dilution times by indirect ELISA. (A) Pork fat in beef meat, (B) Pork fat in chicken meat]

마) 2차 항체 희석배수 결정

- 2차 항체의 희석배수를 결정하기 위해 2차 항체를 2000배, 4000배, 6000배, 8000배 희석하여 반응성을 비교한 결과 2000배로 희석하여 사용하는 경우가 반응성이 가장 좋은 것으로 확인됨.

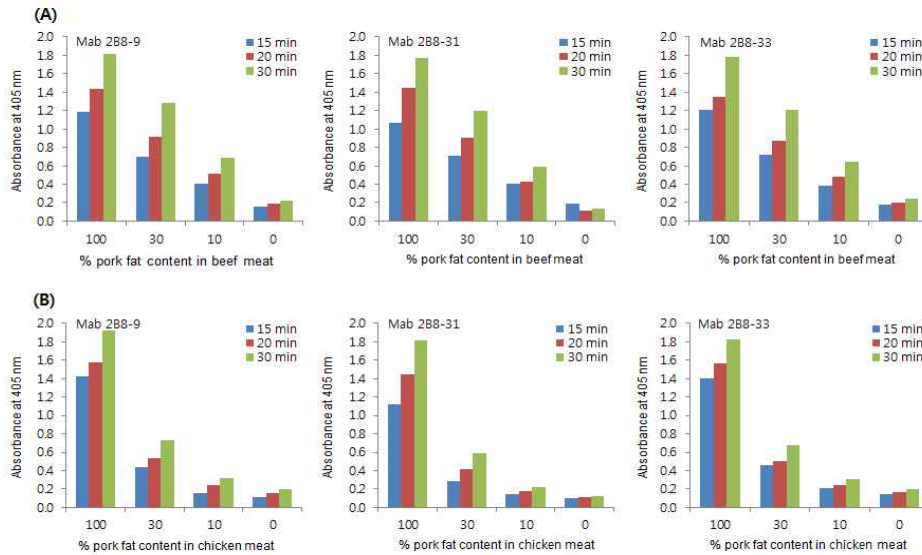


[Determination of optimal secondary antibody dilution times. (A) pork fat in

beef meat, (B) pork fat in chicken meat]

바) 기질반응 시간 결정

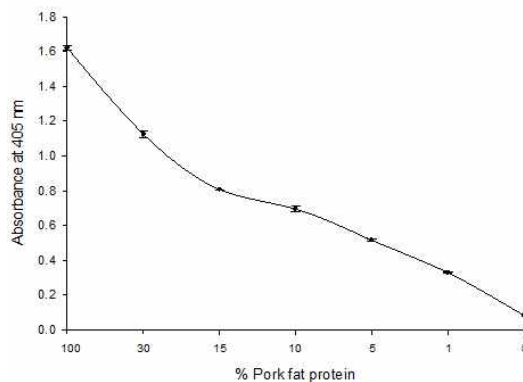
- 기질반응 시간을 15분, 20분, 30분으로 하여 결과를 비교한 결과 기질 반응시간은 30분이 좋은 것을 확인됨.



[Determination of substrate reaction time. (A) pork fat in beef meat, (B) pork fat in chicken meat]

사) 검출한계 확인

- 돈지육 열안정성 단백질 추출물을 단독으로 존재할 때 검출한계를 확인한 결과 1% 까지 검출이 가능한 것으로 확인됨.

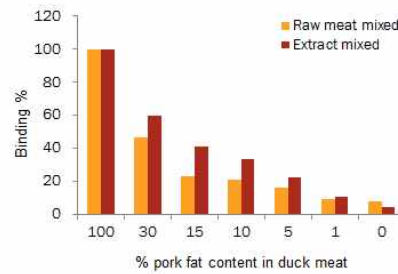
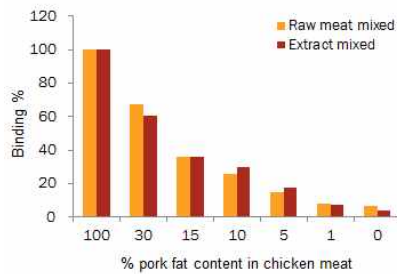
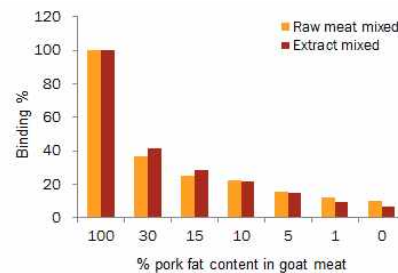
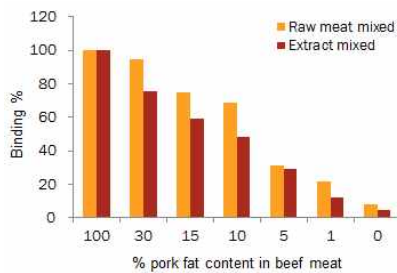


[Detection limit for pork fat protein by Mab 2B8-31 based-indirect ELISA]

- 다른 축육과의 혼합시료에서의 돈지육 검출한계를 확인한 결과 소고기 혼합 시료에서는 1%까지, 염소, 닭, 오리 혼합시료에서는 5% 까지 검출이 가능한 것으로 확인됨.
- 이상의 연구결과로 볼 때 ELISA법으로 검출할 수 있는 돈지육은 혼입되어 있는 축육

의 종류에 따라 민감도가 달라지는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 축육 별로 그 구성이 다른 것에 기인하는 것으로 생각됨.

- 실제로 2016년 Rao 등이 Journal of Agricultural and Food Chemistry에 보고한 “immunoassay for the detection of animal central nervous tissue in processed meat and feed products” 논문에서도 가공식육의 종류에 전처리의 어려움과 해결방안이 필요하다는 것을 설명하였음.
- 그러므로 개발된 간이 ELISA법과 immuno-strip sensor를 이용하여 각 식품의 종류에 대한 시료 전처리법의 개발이 추가로 연구되어야 할 것을 판단됨.



[Detection of different percentages of pork fat in other species by indirect ELISA]

- 이상의 실험에서 다른 축육에 혼입된 돈지육을 분석하기 위해 확립된 ELISA의 최적 조건을 요약하면 다음과 같음.

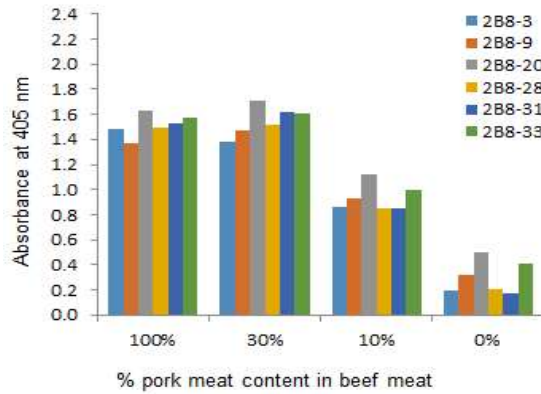
표. Optimized conditions of ELISA for the detection of pork fat

Parameters	Conditions
Coating	- Extract dilution 1:2 with 25 mM TBS (pH 6.5) - Incubation at 37°C for 2 h
Blocking	- 0.5% BSA in PBS - Incubation at 37°C for 1 h
Primary antibody	- Mab 2B8-31 dilution 1:1,000 with PBS - Incubation at 37°C for 1 h
secondary antibody	- Goat anti-mouse IgG peroxidase dilution 1:2,000 with PBS - Incubation at 37°C for 1 h
Substrate	- ABTS-30% H ₂ O ₂ - Incubation at 37°C for 30 min

2) 돈육 검출을 위한 효소면역분석법(ELISA)의 최적화

가) 항체선택

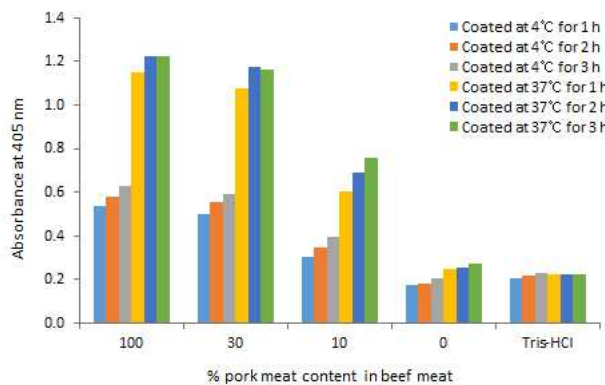
- 생산된 항체 중 돈육의 검출에 사용될 항체를 결정하기 위해 돈육에 대한 항체 반응성을 확인한 결과 2B8-3, 2B8-28, 2B8-31 항체가 돈육 함량 0%에서 비특이적인 반응이 없는 것으로 확인되어 이들 3종의 항체를 선택함.



[Selection of Mabs]

나) 코팅 온도 및 시간

- 돈육을 검출하기 위한 ELISA 코팅 온도 및 시간은 돈지육의 경우와 마찬가지로 37°C에서 2시간 반응시키는 조건을 선택함.



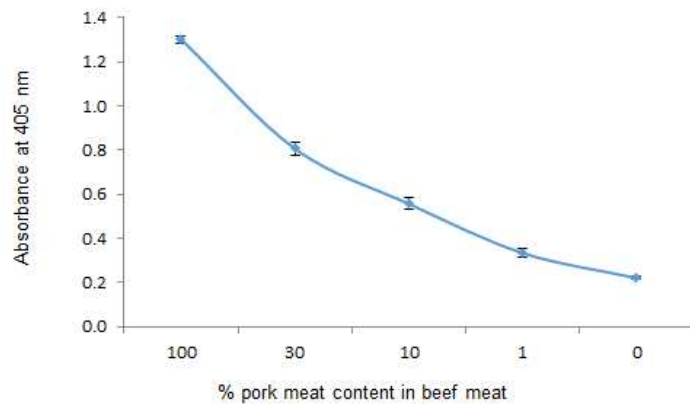
[Comparison of coating conditions for the detection of pork meat in beef meat by indirect ELISA]

다) 돈육검출을 위한 코팅 온도 및 시간

- 돈지육에 대한 효소면역분석법의 개발과 동일한 과정으로 최적화를 수행하였고, 그 결과는 아래 표와 같음.
- blocking 시약으로 0.5% BSA로 37°C에서 1시간 반응하는 것이 효율적이었으며, 1차 항체는 2B8-28 항체를 1/1000배 희석하는 조건으로 선택하였음.
- 최적화된 돈육 검출용 ELISA법의 검출한계는 1% 수준이었음.

표. Optimized conditions of ELISA for the detection of pork meat

Parameters	Conditions
Coating	- Extract dilution 1:2 with 25 mM TBS (pH 7.4) - Incubation at 37°C for 2 h
Blocking	- 0.5% BSA in PBS - Incubation at 37°C for 1 h
Primary antibody	- Mab 2B8-28 dilution 1:1,000 with PBS - Incubation at 37°C for 1 h
secondary antibody	- Goat anti-mouse IgG peroxidase dilution 1:500 with PBS - Incubation at 37°C for 1 h
Substrate	- ABTS-30% H ₂ O ₂ - Incubation at 37°C for 30 min



[Detection limit for pork meat protein by Mab 2B8-28 based-indirect ELISA]

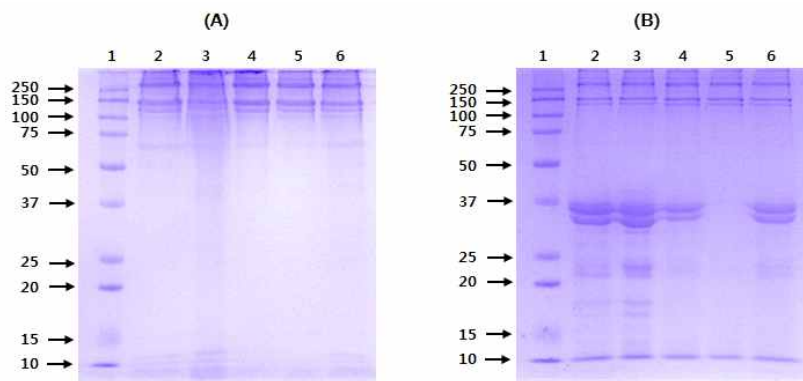
3) 시료추출 방법 확립

가) 시료추출 버퍼 결정

- 시료에서 열안정성 단백질을 효과적으로 추출할 수 있는 버퍼를 결정하기 위해 다양한 추출버퍼를 이용하여 단백질 추출량을 비교한 결과 단백질 밴드 패턴에는 차이가 없었으나 추출되는 열안정성 단백질의 양에는 차이가 있음을 확인함.
- 단백질 추출량은 carbonate buffer로 추출 시 가장 많은 양을 추출 할 수 있었고, 그 다음으로 0.5 M NaCl, 0.05 M PBS 순으로 많은 양을 추출 할 수 있었음.

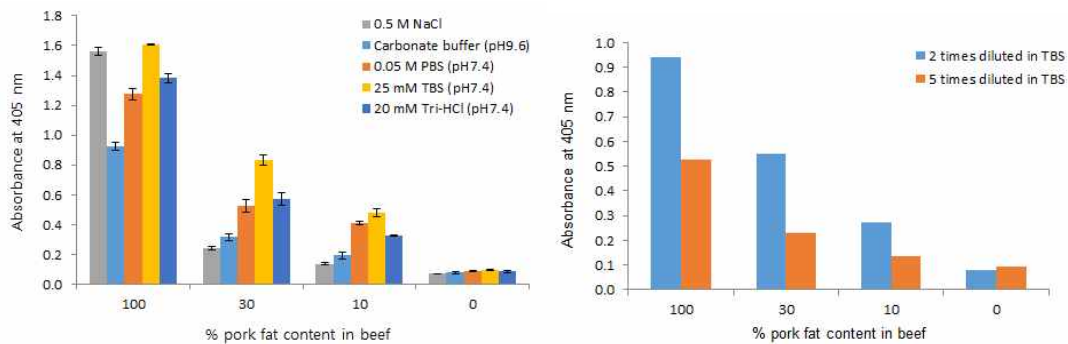
㉞. Protein concentration of pork fat and meat extracts with various buffers

Extract buffers	Concentration of protein (mg/mL)	
	Pork fat	Pork meat
0.5M NaCl buffer	1.223	2.488
Carbonate buffer (pH 9.6)	3.687	2.797
25mM TBS buffer (pH 7.4)	0.270	1.244
20mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)	0.186	0.271
0.05M PBS buffer (pH 7.4)	1.492	1.665



[SDS-PAGE pattern of pork fat (A) and meat (B) extracts with various buffers. Lane 1: Maker, Lane 2: 0.5M NaCl buffer, Lane 3: Carbonate buffer (pH 9.6), Lane 4: 25 mM TBS buffer (pH 7.4), Lane 5: 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), Lane 6: 0.05 M PBS buffer (pH 7.4)]

- 돈지육과 돈육 ELISA 최적화 과정에서 확인할 수 있었던 시료 코팅조건으로 추출버퍼 별 민감도를 확인한 결과에서는 비록 carbonate buffer가 많은 양의 단백질을 추출하였지만, 시료를 0.5 M NaCl을 이용하여 추출 후 25 mM Tris buffer(pH 6.5)로 2배 희석하여 ELISA에 적용하는 것으로 확립하였음



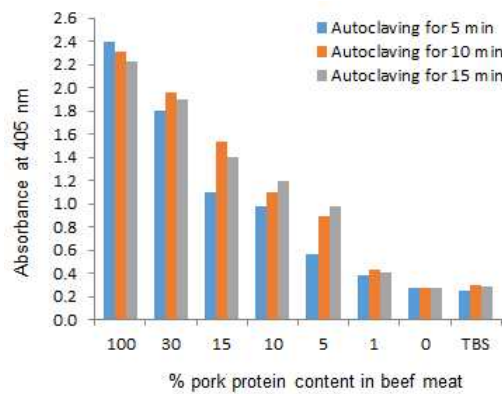
[Effect of a dilution buffer and times on ELISA for pork protein]

- 추가적으로 희석버퍼로 선정된 TBS의 pH를 5.5, 6.5, 7.5, 8.5로 하여 비교한 결과에서

도 민감도의 차이는 없었으나 pH가 증가할수록 전체적인 흡광도 감소하는 것이 확인되어 pH 6.5의 TSB buffer를 희석액으로 선정하였음

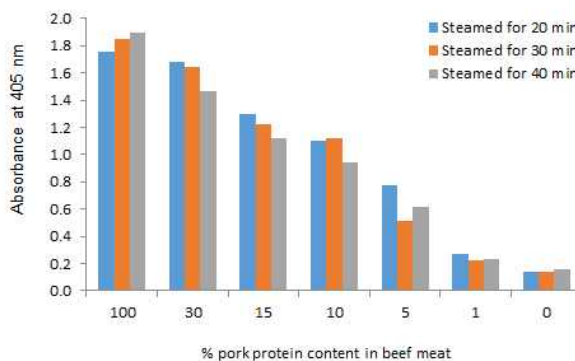
4) 시료 처리형태 및 조리 조건에 따른 검출 가능 여부 확인

- 시료의 가공 형태 및 조리 조건에 따른 검출 가능 여부를 확인하기 위해 소고기와 돈육 단백질의 혼합시료(100, 30, 15, 10, 5, 1, 0% pork protein)을 준비하였고 autoclaving, steaming, roasting, frying 등 4가지 조건으로 실험실에서 준비하여 ELISA로 확인하였음
- Autoclaving 시료는 15분 정도 처리하였을 경우에도 본 연구에서 개발한 ELISA법으로 1% 검출이 가능하였음.



[Detection of pork protein in beef meat autoclaved for different time by an indirect ELISA]

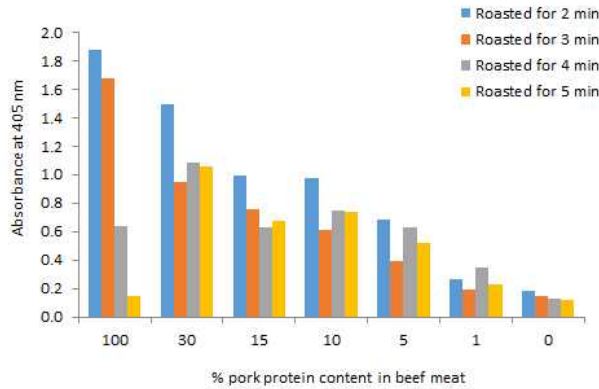
- Steaming한 시료는 40분까지 처리하였을 경우에도 본 연구에서 개발한 ELISA법으로 1% 검출이 가능하였음



[Detection of pork protein in beef meat steamed for different time by an indirect ELISA]

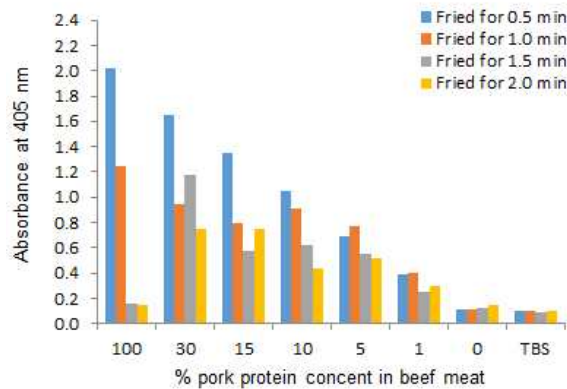
- Roasting한 시료는 4분 이상 처리한 경우 돈육 100%는 검게 타서 섭취할 수 없는 상태로 되었으나, 우육의 성분이 증가하면 섭취할 수 있는 상태였음.

- 5분까지 roasting한 시료에서도 1%까지 검출이 가능하였음.



[Detection of pork protein in beef meat roasted for different times by an indirect ELISA]

- Frying한 15 g의 시료는 1.5분 이상 처리한 경우 돈육 100%는 검게 타서 섭취할 수 없는 상태로 되었으나, 우육의 성분이 증가하면 섭취할 수 있는 상태였음.
- 2분까지 frying한 시료에서도 1%까지 검출이 가능하였음.



[Detection of pork protein in beef meat fried for different time by an indirect ELISA]

4. 돈(지)육 현장진단용 immuno-strip sensor 개발

1) 금나노입자 합성

- Immuno-strip sensor에 표지자로 사용되는 금나노입자(gold nanoparticle, GNP)를 Fren's의 방법으로 아래와 같은 방법으로 합성을 실시하였음

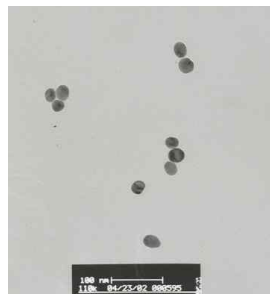


[Procedures for the synthesis of colloidal gold nanoparticle(Fren's method, 1973)]

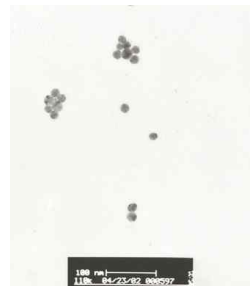
- Tetrachloroauric acid(HAuCl₄)을 sodium citrate로 환원하여 GNP를 합성하며, 첨가하는 sodium citrate의 양에 따른 합성법을 확립함
- 100ml의 0.01% HAuCl₄에 sodium citrate 첨가량을 0.5, 1, 2, 3, 4 ml로 하여 합성된 GNP의 직경을 전자현미경 TEM으로 확인한 결과 sodium citrate 1 ml 이상 첨가 시 전형적인 적포도주 색의 GNP가 합성되는 것으로 확인되었으며 그 직경은 아래 표와 같음

표. Determination of particle diameter for colloidal gold synthesized by adding different amount of 0.1% sodium citrate into 0.01% HAuCl₄

1% sodium citrate (ml)	Color of colloidal gold	Diameter of gold particle (nm)
0.5	Purple	>100
1	Red wine	35-45
2	Red wine	20-30
3	Red wine	15-20
4	Red wine	10-15



35-45 nm gold particles



20-30 nm gold particles



15-20 nm gold particles



10-15 nm gold particles

[The photos of colloidal gold nanoparticles produced by TEM(magnification 110K)]

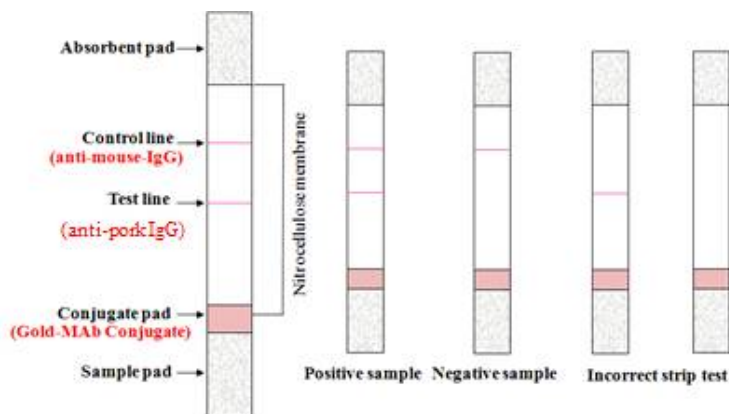
2) 금나노입자-항체 합성 및 결합체 확인

-Bare GNP의 경우 양이온과 만나게 될 경우 전기적으로 불안정하여 응집되고 적포도주의 색에서 자주색으로 변하게 되는데, 이러한 현상은 일정량의 단백질 또는 DNA와 결합하게 되면 안정화되고 양이온을 만나더라도 상태를 유지함.

-따라서 본 연구과제에서 개발된 항체 6종 2B8-3, 2B8-9, 2B8-20, 2B8-28, 2B8-31 그리

고 2B8-33 Mab(각 농도 0.1 mg/ml)을 이용하여 GNP 안정화 농도를 확인하였으며, 6종의 항체 모두 1 ml당 30 μ l(3 μ g)를 첨가했을 때 안정화되었음.

-Immuno-strip sensor는 아래와 같은 전형적인 sandwich assay를 이용한 방법으로 디자인하였으며, conjugate pad에는 금나노입자-항체 결합체로 처리하였고 membrane 상의 test line과 conjugate line에는 돈(지)육에 특이한 항체를 capture antibody로, anti-mouse IgG를 각각 처리하였음.



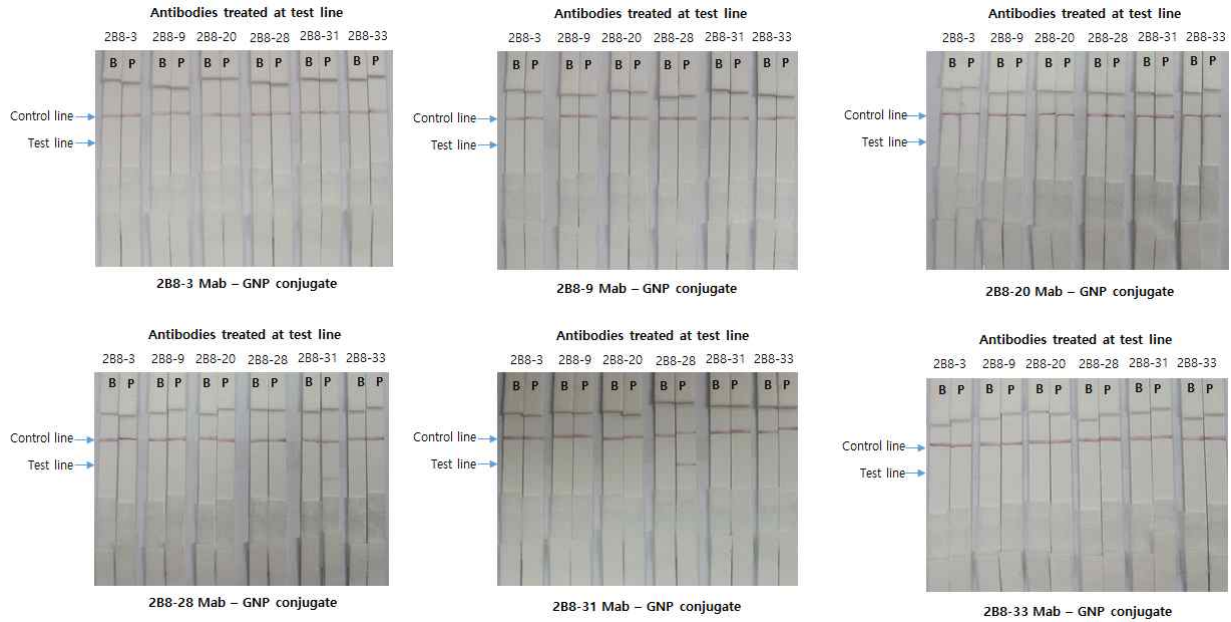
[Schematic description of immuno-strip sensor for pork protein detection]

-금나노입자-항체 결합체는 희석버퍼(2 mM borate buffer containing 1% sucrose and 1% BSA)로 3배 희석하여 conjugate pad에 5 μ l 씩 각각 처리하였고, test line에는 개발된 항체 6종(capture 항체)을 각각 PBS로 3배 희석한 후 1 μ l씩 처리하였음.

-앞서 합성한 금나노입자-항체 결합체를 합성한 후 immuno-strip sensor에 적용가능성 여부를 확인하기 위해서 각 처리된 strip을 양성시료로는 돈육 추출물과 음성시료로는 우육 추출물을 이용하여 분석하여 그 결과를 확인하였음.

-아래의 그림에서 보는바와 같이 control line에 적색 띠가 생성되어 금나노입자에 항체가 결합되어 있는 것은 확인되었으나, 양성과 음성을 구분할 수 있는 조건은 2 쌍의 항체로 확인됨.

-즉, 금나노입자-항체 결합체와 capture 항체 쌍으로 이용될 수 있는 조합은 2B8-28-GNP 결합체와 2B8-31 capture 항체와 2B8-31-GNP 결합체와 2B8-28 capture 항체 2쌍으로 확인되었고, 그 중 2B8-31-GNP 결합체와 2B8-28 capture 항체 쌍의 조건에서 test line의 색 강도가 높아 이 조합을 이후에 실험에 사용하였음.



[Selection of pair for MAb-GNP conjugate and capture Mab to develop immuno-strip sensor.

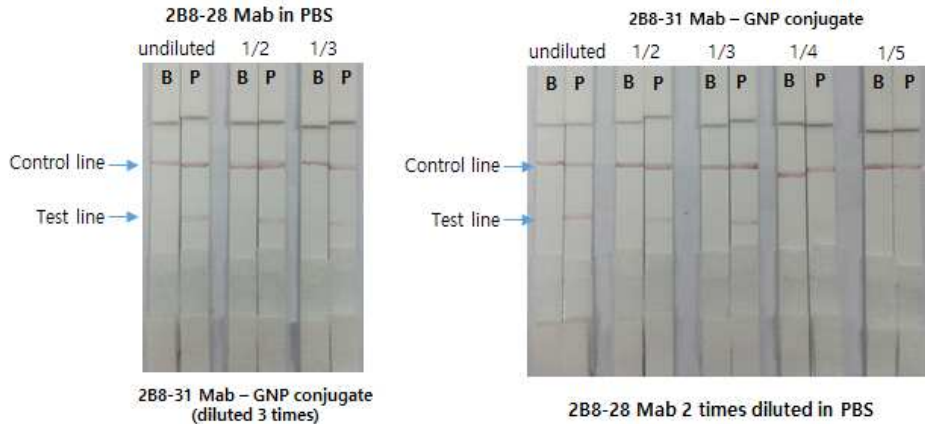
B: beef meat extract, P: pork meat extract]

3) Immuno-strip sensor의 최적화

가) 항체-GNP 결합체와 capture 항체의 처리량 결정

-Immuno-strip sensor의 개발에 있어 conjugate pad에 처리되는 항체-GNP 결합체와 test line에 처리되는 capture 항체의 양은 중요한 factor이기 때문에 2B8-3 capture 항체의 처리량은 희석배수(원액, 1/2, 1/3 in PBS)를 달리하여 test line에 1 μ l씩 처리하였고, 2B8-31 MAb-GNP 결합체도 희석배수(원액, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 in 2 mM borate buffer containing 1% sucrose and 1% BSA)로 처리하여 음성시료와 양성시료로 확인하였음.

-그 결과 아래 그림에서 보는바와 같이 2B8-3 capture 항체는 1/2 희석까지는 양성시료 test line에서 강한 적색 띠를 형성하였고, 2B8-31 MAb-GNP 결합체는 1/3 희석까지는 양성시료 test line에서 강한 적색 띠를 형성하였음.



[Determination of optimal amount of capture antibody and MAb-GNP conjugate treated on immuno-strip sensor. B: beef meat extract, P: pork meat extract]

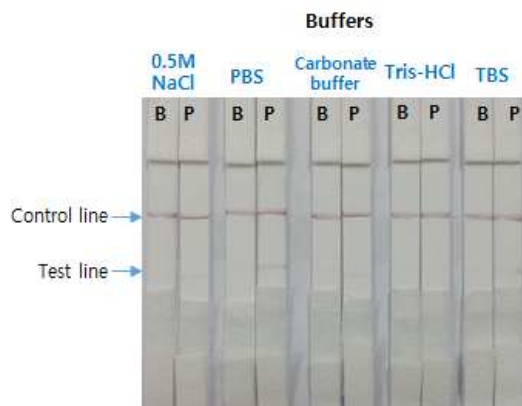
나) Working buffer의 선정

-앞서 ELISA법을 개발하고 시료적용을 수행하였을 때 0.5 M NaCl로 추출한 추출액을 TBS로 1/2희석하는 조건이 분석에 용이하였기 때문에 immuno-strip sensor의 최적화에서도 희석버퍼로 carbonate buffer (pH 9.6), 0.05M PBS (pH 7.4), 0.5M NaCl, 25mM TBS(pH7.4), 20mM Tris-HCl (pH 7.4)로 사용하여 돈육과 우육 추출액을 1/2로 희석하여 비교 분석하였음.

- 그 결과 비교한 결과 PBS로 희석한 경우 양성과 음성 시료의 test line에 적색 띠 색의 차이가 뚜렷하게 차이가 나는 것을 확인할 수 있었고, 0.5 M NaCl과 TBS버퍼도 적색 띠의 색 차이가 확인되었으나 그 정도가 덜 하였음.

-Carbonate buffer는 우육을 적용한 strip의 test line에도 적색 띠가 형성되어 비특이적인 반응을 유도하는 것으로 확인되었고, Tris-HCl은 음성과 양성 모두에서 test line에서 적색 띠가 생성되지 않았음.

-그러므로 immuno-strip sensor를 이용하기 위해서는 0.5 M NaCl로 추출하여 PBS로 2배 희석하는 조건을 시료 전처리 조건으로 사용하였음.



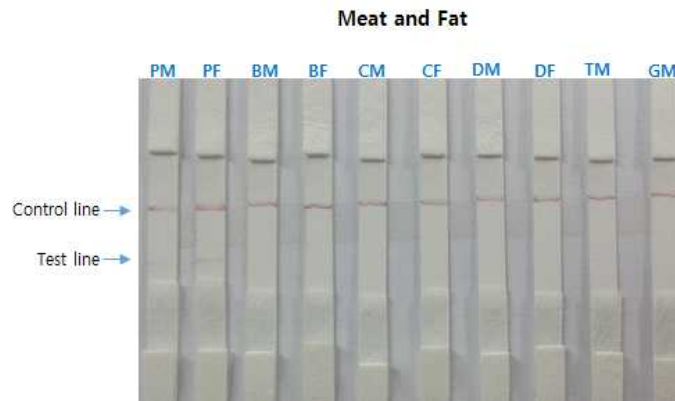
[Effect of various buffers on immuno-strip sensors]

4) Immuno-strip sensor의 평가

가) 민감도 및 교차반응성 평가

-최적화된 strip sensor의 특이성 확인을 위해 돈육, 돈지육, 우육, 우지육, 계육, 계지육, 압(鴨)육, 압(鴨)지육, 칠면조육, 염소육 추출물을 이용하여 교차반응성을 확인하였음.

-아래 그림에서 보는바와 같이 본 연구과제에서 개발된 immuno-strip sensor는 돈지육과 돈육에 특이적으로 반응하는 것으로 확인되었으나, 다른 육 및 지육 추출물에 대해서는 반응하지 않는 것으로 확인되었기 때문에 pork protein에 특이적으로 반응하는 것을 확인함.



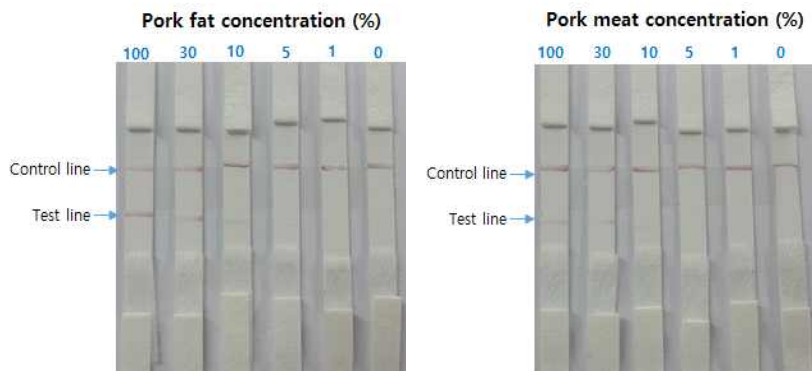
[Result of cross-reactivity test with other meat and fat extracts by the immuno-strip sensor]

-개발된 immuno-strip sensor에 대해 여러 농도의 돈지육 추출물과 돈육 추출물(100, 30, 10, 5, 1, 0% in PBS)을 이용하여 민감도 확인하였음

-돈지육 추출물에 대해서는 5%까지는 test line에 적색 띠를 확인하였고, 돈육 추출물에 대해서는 10%까지 test line에 적색 띠를 확인하였음

-그러므로 Immuno-strip sensor 검출한계는 돈지육에는 5%, 돈육에 대해서는 10%로 확인됨

-Immuno-strip sensor의 민감도는 1차년도에 개발된 ELISA법과 비교하여 민감도가 낮은 것으로 확인되어 추가적인 polyclonal antibody와 monoclonal antibody의 개발을 통해서 극복하고자 연구를 진행 중에 있음



[Sensitivity of immuno-strip sensor for the pork fat and meat samples]

나) 임의로 오염시킨 돈육 및 돈지육 혼합 식품을 이용한 평가

- 시료의 가공 형태 및 조리 조건에 따른 검출 가능 여부를 확인하기 위해 소고기와 돈육 단백질의 혼합시료(100, 30, 15, 10, 5, 1, 0% pork protein)를 준비하였고 섭취할 수 있는 조리 및 가공 조건인 autoclaving(15분), steaming(40분), roasting(4분), frying(2분) 등 4가지 조건으로 실험실에서 처리한 후 0.5 M PBS로 추출하여 분석하였음.
- 돈지육 및 돈육을 PBS로 추출하고 희석한 후 검출한계는 돈지육 5%, 돈육 10%로 확인되었으나, 우육과 혼합한 돈지육 및 돈육 시료를 제조하여 추출한 경우는 15% 이상 돈지육 및 돈육을 혼합시킨 시료에서 양성으로 확인되었음.
- 1차년도 ELISA 조건 확립에서도 우육과 혼합한 돈지육 및 돈육에 대한 민감도가 낮아지는 현상을 확인할 수 있었으며, 이는 우육 및 다른 육과 혼합되고 추출 시 복합적인 반응에 의해 돈육 및 돈지육의 target 단백질의 추출효율이 떨어지는 것으로 판단되었음.
- 따라서, 개발된 immuno-strip sensor의 상용화를 위해서는 다양한 시료에 대한 시료전처리법의 개발이 수행되어야 할 것으로 판단됨.



[Analysis of artificially adulterated pork fat and meat in beef meat by the immuno-strip sensor]

다) 현장평가를 위한 시료 전처리 키트 제안과 확인

- 돈지육 및 돈육 중 target 단백질을 추출하기 위해서는 일정한 시간의 열을 처리할 필요는 있기 때문에 본 연구과제를 수행하면서 모든 시료는 끓는 물에 15분간 처리하는 조건으로 처리하여 개발된 분석법에 사용하였음.
- 실험실에서는 아래에서 보는바와 같이 전기냄비를 이용하여 추출하였으나, 제조 및 유통현장에서는 추출하기에는 적합하지 않기 때문에 인터넷에서 식품을 데워서 먹는 용도로 제작된 발열팩을 이용하여 추출 가능여부를 ELISA법과 immuno-strip sensor로 확인하였음.

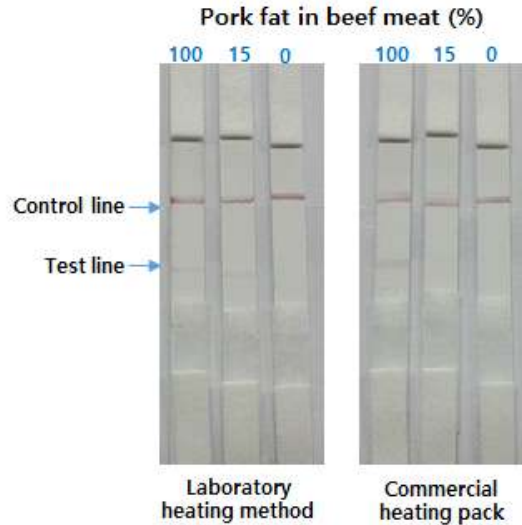
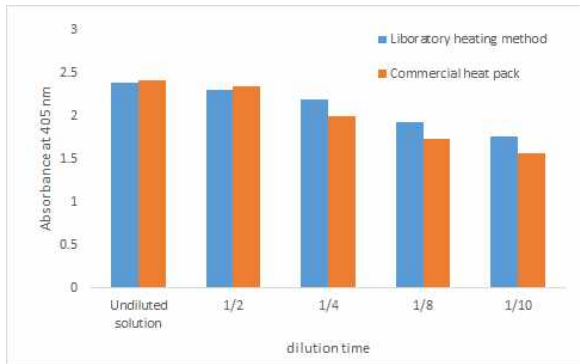


[Commer heat pack for foods]



[Developed laboratory pretreatment method]

- 발열팩에 물을 붓게 되면 내포되어 있는 물질에 의해 발열이 일어나는 원리이기 때문에 물을 붓고 난 후 온도계를 이용하여 온도를 확인한 결과, 물은 첨가한 직후 98℃의 온도로 상승하고 6분까지 98℃를 유지하고 8분까지 90℃를 유지하는 것으로 확인되어 시료를 전처리하는 데 사용이 가능할 것으로 확인되었음
- 발열팩과 전기냄비를 이용하여 15분간 시료를 추출한 후 ELISA법과 immuno-strip sensor로 확인한 결과 두 전처리법 모두 동일한 결과를 나타내었음
- 이상의 결과로 볼 때 시판되고 있는 발열팩을 이용한 시료 전처리가 가능한 것으로 확인됨



[Comparison of commercial heating pack and laboratory heating method by ELISA]

[Comparison of commercial heating pack and laboratory heating method by immuno-strip sensor]

[제2협동]

가. 분광 광학 시스템 설계

- 본 연구에서의 분석 시스템은 샘플이 조사되는 광원 시스템과 분광 분석 시스템으로 구분되며 광원은 샘플의 분광 특성을 이용하여 White-LED(450nm ~ 750nm)를 사용하였으며, 분석 시스템도 이와 같이 450 ~ 750 nm 영역의 분석이 가능한 분광 분석 시스템으로 구성하였다. 또한 외부 신호 및 노이즈의 차단을 위하여 대역 통과 필터를 필요로 한다. 분광 분석 시스템에서는 샘플에서 발생한 분광의 강도 및 스펙트럼을 측정한다. 스펙트럼을 측정하기 위해서 다채널 분광 검출기를 채택하였으며, 이 과정에서 다채널 검출기의 구동 회로 및 신호 처리 회로를 개발하였다. 샘플에서 발생하는 분광은 매우 미세한 강도이므로 분광 분석 시스템에 사용되는 광학 시스템은 수차 및 광 손실을 최소화 감소시킬 수 있도록 최적 설계가 되어야 한다.
- 분광 분석 시스템은 기존에 구성된 spectrometer의 소형화에 초점을 맞추어서 개발되었다. 기존 분광 시스템의 구조는 여러 가지가 있지만 대표적으로 Czerny-Turner mount type, Seya-Namioka mount type 로 나누어진다. 첫 번째 Czerny-Turner mount의 경우에 있어서 구동하는 부분이 없고 Seya-Namioka mount 형태에 비해서 정확한 측정 정확도를 가지며, 이미지면에서 나타나는 오차를 보정할 수 있다는 장점이 있다. 두 번째 Seya-Namioka mount의 경우에 있어서 Czerny-Turner mount 경우에 비해 사용되는 광학 부품이 작고, 이미지면에서의 오차가 적고, Czerny-Turner mount 경우처럼 구동하는 부분이 없다는 장점이 있지만, 존재하는 에러에 대한 보정이 힘들고 정확한 광학 정렬이 맞아야 원하는 분해능을 얻을 수 있다는 단점이 있다. 이러한 부분을 고려하

여 첫 번째 형태인 Czerny-turner mount 형태로 본 연구에서 제안한 소형화된 분광 분석 시스템을 구현하였다.

- ◆ 구성된 시스템은 크게 3개의 광학 부품과 광검출기인 CCD를 이용하여 구성이 되었다. 입력 광원은 시준 거울 (Collimating mirror)로 입사하여 평행광이 되어 회절 격자 (Grating)로 입사되고 회절 격자에서 회절된 후 초점 거울(Focusing mirror)을 통해서 이미지면인 CCD로 입사되게 된다. 시스템 구성에 사용된 시준 거울은 구면 반경이 70mm인 오목거울을 이용하였고, 평면 회절 격자는 600lines/mm에서 13도 Blazed angle 을 갖는 Edmund 社의 제품을 사용하였고, 초점 거울은 수차를 최소화하기 위하여 Bicon 형태의 오목거울을 이용하였다.

Photometric System	White LED, CCD Array
Wavelength Range	450 ~ 750 nm
Wavelength Accuracy	< 1 nm
Spectral Bandwidth	about 10 nm
Photometric Accuracy	< 0.01 @1.000 ABS
Photometric Range	-0.5 ~ 2.000 ABS

[표 M-1. 분광 시스템의 성능표]

- ◆ Liquid Sample 측정을 위한 앞서 설계한 분광시스템을 기반으로 형광/분광 통합시스템 개발을 위해 Light Source를 LED로 사용하고 PD/CCD 검출기를 이용하여 Spectroscopic Optical System을 Design 하였다. 형광은 UV LED 와 PD 형태, 분광은 White LED 와 Spectrographic(CCD) 형태로 450 ~ 750 nm, 10nm Bandwidth, -0.5~2.000 ABS 의 Spec 결정되었다.
- ◆ 본 연구에서 사용되는 형광 특성은 아직 정해지지 않아 임의적으로 형광분석시스템의 광원은 분광분석시스템의 광학 설계에 따라 370nm LED를 적용하고 광원의 Bandwidth 를 보장하기 위하여 10nm의 Bandwidth를 갖는 370nm 간섭필터를 사용하였으며, 형광 반응 분석 시스템은 400-700nm 영역의 분석이 가능한 분광 분석 시스템을 구성하였다.

나. CCD 모듈 설계

- ◆ CCD 측정부 보드 구성은 위 그림에서 볼 수 있듯이 CCD 또는 PD 보드에서 측정된 아날로그 신호를 디지털 신호로 변환하기 위한 ADC 구성부와 이 디지털 신호를 처리하는 ST사의 STM32F103을 사용한 MCU, Control 보드의 설정 값들을 저장할 수 있는 EEPROM, BASE 보드와 데이터 송수신을 위한 통신부, 그리고 Control 보드의 전원 관리를 할 수 있는 전원부로 구성되어 있다.
- ◆ 아날로그 신호를 디지털 신호로 변환하기 위해서 24-Bit Analog-to-Digital Converter를

사용하였고, CCD 센서에서 측정된 아날로그 DATA를 Digital로 변환하여 SPI 통신으로 MCU로 DATA를 전송한다. ADC는 MCU의 IO포트 와 SPI 통신을 통해서 제어가 가능하다.

- 이 ADC 회로를 통해 얻을 수 있는 샘플링 속도는 78.125kSPS(=12.5us)이고, 이 샘플링 속도에서 얻을 수 있는 DATA의 수는

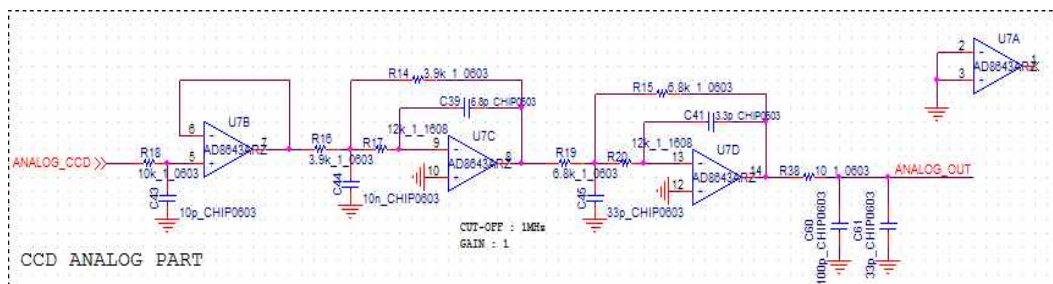
CCD pixel 수 : 3648(약 3700)

CCD Master Clock : 0.8MHz(=1.25us)

CCD DATA Rate : 0.2MHz(=5us)

CCD가 모든 pixel를 읽는 시간은 $3700 * 5us = 18.5ms$ 가 된다.

- 취득 가능한 DATA의 수는 $18.5ms / 12.5us = 1480$ 이 된다.



[아날로그 필터 회로]

- CCD에서 들어오는 아날로그 신호는 위 그림에서 구성된 아날로그 필터를 거쳐 노이즈를 차단하고 ADC 입력단으로 들어가게 된다. 해당 아날로그 필터의 Gain은 1로 설계되었으며, Cut-off Frequency 는 CCD 출력 데이터 Rate를 감안하여 1MHz로 설계하였다.



CCD 모듈



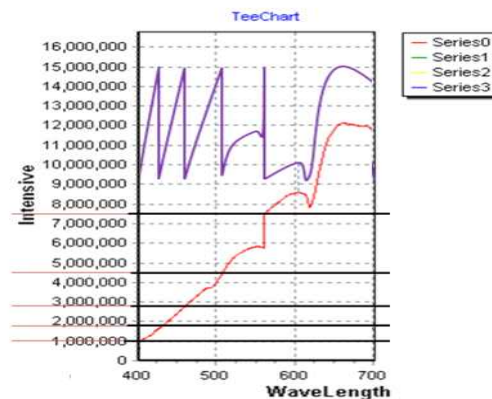
Analog Part

[CCD 센서 보드]

Pixel Number	3648 Pixel
Pixel Size	8 μ m * 200 μ m
Photo Sensing Region	High Sensitive & Low Dark Current Pn Photodiode
internal Circuit	CCD Driver Cuit 내장
Power	Only 3.0V Drive
Function	Electronic Shutter, Sample and Hold Circuit 내장
Package	22Pin Dip Type

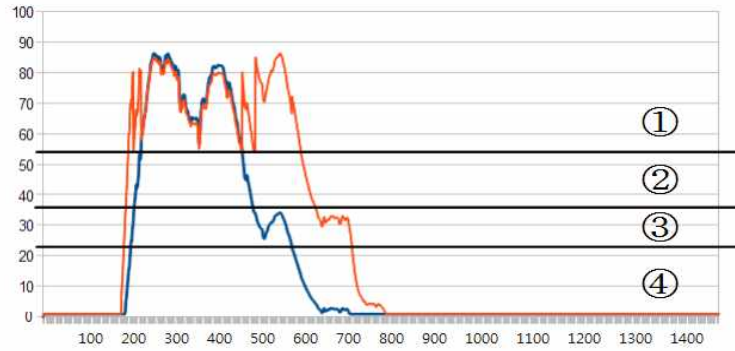
[표 M-3. CCD 이미지 센서 주요 특징]

다. CCD 측정 알고리즘



[CCD 알고리즘 원리]

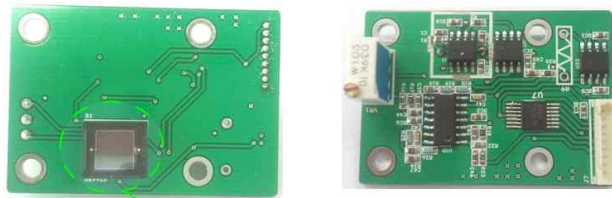
- ◆ 위 그림에서 붉은색으로 표시한 선은 기본 광량에서 측정한 데이터이고, 이 기본 광량을 6개의 구간으로 나누어 (그림에서 5개의 검은 선) 각 구간별로 최대값들이 설정한 목표 범위에 들어갈 수 있도록 노출시간을 조정하여 데이터를 측정한다. 노출시간을 달리해서 측정한 6개의 데이터를 합하면, 그림M-6에서 보라색 선으로 표시할 수 있다.
- ◆ 이렇게 기본 광량에서 구간을 설정한 후 목표 범위에 도달할 수 있도록 노출시간을 조절하여 충분한 광량을 나타낼 수 있게 하는 방법을 FULL AUTO GAIN CONTROL(이하 Full AGC)라 정의한다.
- ◆ Full AGC를 통해 얻은 각 구간 설정 값과 각 구간에서 설정된 노출시간을 가지고 샘플 측정이 이루어진다.



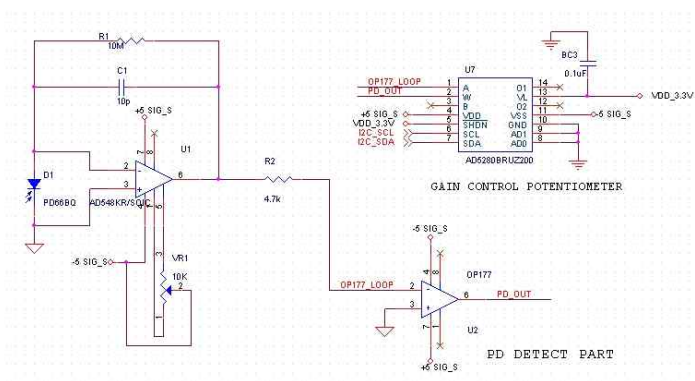
[Full AGC Data]

- 위 그림은 실제 기기를 이용하여 측정된 데이터를 나타낸 것이다. 파란색으로 표시한 선은 기본 광량을 측정 후 최대값이 목표범위 (90~80) 안에 들어갈 수 있도록 노출시간을 조정된 데이터이다. 이 데이터에서 최대값을 기준으로 Full AGC를 하면, 주황색으로 표시한 결과 데이터를 얻을 수 있다. 이와 같이 구간 별로 노출시간을 조정하여 측정 데이터 값을 증폭시킴으로써 파장에 대한 낮은 데이터 값에서의 측정보다 노출시간이 조정된 높은 데이터 값에서의 데이터산출 값이 보다 다 분별력이 있다.

라. PD 측정 모듈



PD Sensor

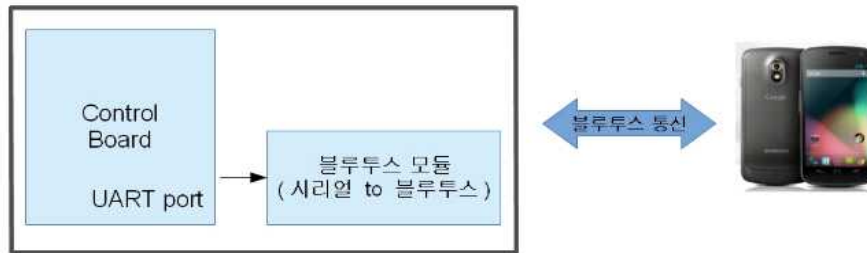


[PD 센서보드 구성도(위) 및 회로도(아래)]

- 위 그림은 PD 센서보드로 HAMAMATSU사의 S1336BR Visible 영역 PD 센서를 사용하여 형광량을 측정하도록 사용하였다. DIGITAL Potentiometer를 적용하여 Reference 측정시 최적의 광량을 회로상의 Gain 조정을 통하여 이루어지도록 구현하였으며 이와

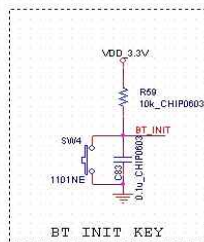
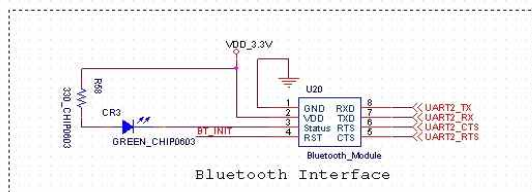
같은 구성시의 장점으로는 보다 높은 분해능의 저해율을 계산할 수 있으며, 시료별 Reference 값이 달라짐에 따른 Gain 튜닝작업을 SW를 통하여 쉽게 적용할 수 있다. AD5280BRUZ200 은 내부 저항값이 최대 200kΩ으로 총 255단계까지 MCU와 I2C 통신을 통하여 조절이 가능하게 되어 있다. 최대 증폭율은 200kΩ / 4.7kΩ 으로 입력 신호 대비 약 42배까지 증폭할 수 있다.

마. 무선 통신(B/T) 환경 구축



[무선 통신 환경 구축의 예]

- ◆ 제어 보드는 UART2 포트를 이용하여 블루투스와 연결을 하는데, 블루투스의 연결 상태를 확인 할 수 있도록 CR3의 LED를 통해서 확인이 가능하며, 블루투스 모듈의 초기화를 하기 위한 리셋 버튼 SW4를 별도로 설계해 놓았다. 미리 정의된 통신 프로토콜을 이용하여 제어 보드에서 측정된 결과를 스마트폰으로 전송을 하며, 스마트폰에서 제어 보드를 제어할 수 있도록 한다.

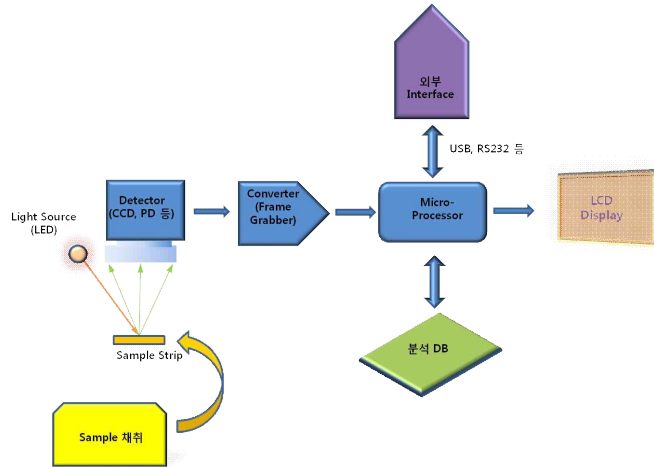


[BT Interface 회로도(좌) 및 사용 모듈(우)]

- ◆ 블루투스 모듈은 칩센의 ESD200을 사용하고, 이 모듈은 UART 인터페이스가 있는 장치를 블루투스 무선 네트워크를 통해 통신할 수 있도록 해주며, 동작거리는 30m를 지원한다. 안테나 형태는 고정된 내장형 안테나를 지원하고 있고, 블루투스 v1.2를 지원한다.

바. 스트립 측정 모듈

- 아래 그림은 스트립 측정 원리를 보여주고 있다. 스트립은 보통 Membrane에 반응 시약을 고정시키고 샘플을 Membrane에 분주하였을 때 Membrane에 있는 시약과 반응하여 발색 반응을 일으킨다. 이때, 발색 정도에 따라 샘플의 농도를 예측하게 된다.



[스트립 측정 원리]

- 스트립의 발색 정도를 측정하기 위해서는 아래 그림에서와 같이 빛을 조사하기 위한 광원과 스트립의 발색 정도를 읽기 위한 Color 센서로 구성되어진다. Color 센서는 일반적인 Photodiode type으로 One-point 측정을 하는 방법과 CCD 카메라와 같은 칼라 이미지 센서를 이용하여 스트립의 색 변화를 측정할 수 있다. 아래 그림에서는 스트립 측정 모듈이 개략도와 실제 설계된 모듈을 보여준다.



[스트립 측정 모듈 개략도(좌) 및 설계 모듈(우)]

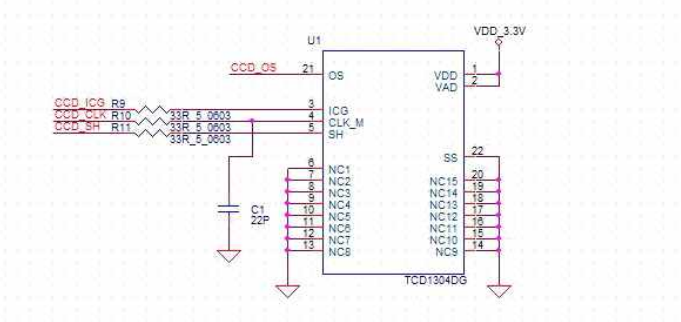
- 설계된 스트립 측정 모듈의 검증을 위하여 상용 스트립(수질 정도 측정용)을 이용하여 스트립의 색 변화를 측정하였다. 측정 모듈의 측정 재현성 확인을 위하여 동일 스트립으로 120회 반복 측정하여 측정 재현성을 확인하였다. 측정 결과 표준편차가 0.105로 측정 평균값에 비하여 매우 작은 값으로 측정 재현성이 우수하다고 할 수 있겠다. 실제 샘플의 반복 측정에서는 위 그림에서와 같이 반응 시간에 따른 재현성이 확보되지 않아서 측정 모듈의 반응 재현성을 확인할 수는 없었지만 샘플 농도별 발색 정도를 구분하고

시간별 변화율을 감지할 수 있음을 알 수 있다. 향후, 시간별 발색 변화율을 이용하여 반응시간을 단축하고 측정 재현성을 높일 수 있는 알고리즘을 개발할 예정이다.

측정 방법	동일 스트립으로 반복 측정		
측정 목적	측정 재현성 확인		
측정 횟수	120		
측정 최소값	93.56	측정 평균값	93.74
측정 최대값	93.99	측정 표준편차	0.105

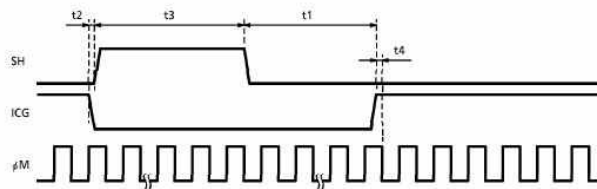
[표 M-4. 스트립 발색반응 재현성 측정 결과]

사. 이미지 센서 모듈 설계



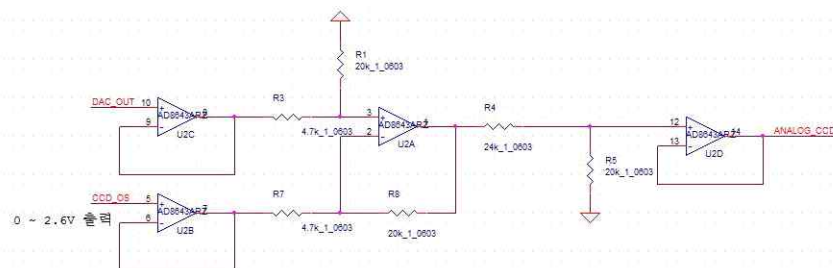
[M-14. 이미지 모듈 main 부]

TIMING REQUIREMENTS



[이미지 모듈 타이밍도]

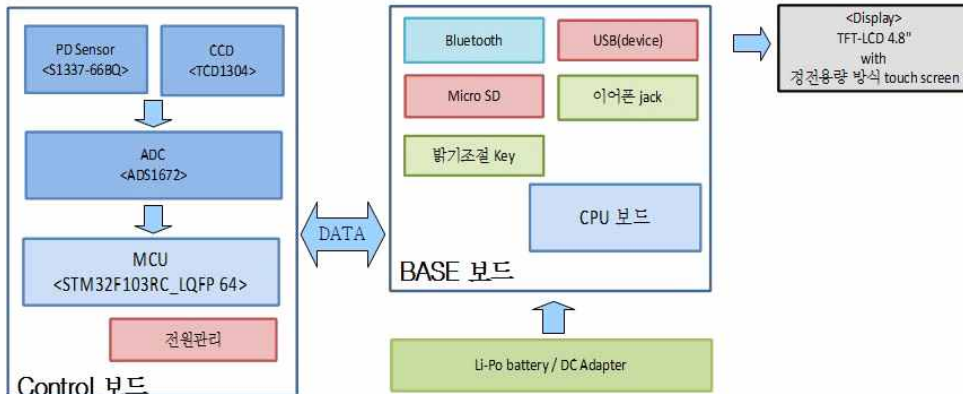
- MCU의 IO를 통해서 이미지 모듈의 제어 IO(ICG / CLK / SH)에 신호를 보냅니다. 여기서 제어 IO에 보내는 신호는 이미지 모듈의 타이밍 조건에 맞도록 보내고, 이미지 모듈에서 처리된 신호(CCD_OS)는 아날로그 필터를 거쳐서 Control Board의 ADC에 의해서 디지털화를 합니다.



[아날로그 필터 회로]

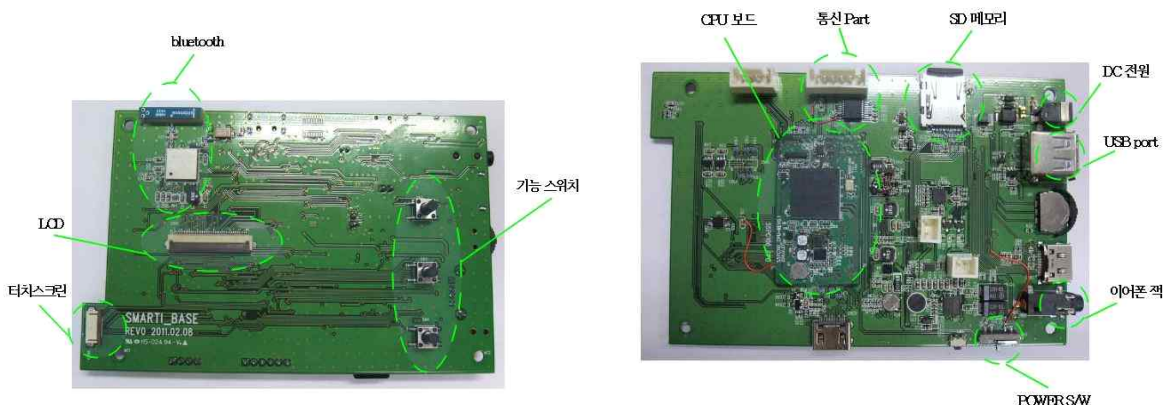
- ◆ 이미지 모듈에서 나오는 신호(CCD_OS)는 Control Board로 가기 전에 아날로그 필터를 거치는데, 이 부분에서는 REF 값을 Controller의 DAC 신호를 통해서 조절을 합니다. 이 REF값을 통해서 OFFSET 조절을 할 수 있습니다.

아. 전자 H/W 개발



[전자 H/W 구성도]

- ◆ H/W 구성은 크게 Control 보드 및 Base 보드로 나누어진다. Control보드는 CCD 또는 PD(PhotoDiode)에서 측정한 아날로그 신호를 디지털 신호로 변환하여 MCU(Micro Controller Unit)에 전달을 하고, MCU는 작성된 프로그램으로 신호를 처리한 후에 BASE 보드로 데이터를 전송한다. BASE 보드는 Control 보드에서 받은 데이터를 가지고 SW에서 처리를 한 후 LCD를 통해서 측정값을 확인한다. 이 기기는 DC 어댑터와 Li-Po(리튬-폴리머) 배터리, 두 종류의 전원을 이용하여, 동작시킬 수 있다. 그리고 정전 용량 방식의 TSP(Touch Screen Panel)를 적용하여 SW의 동작을 할 수 있도록 하였다.

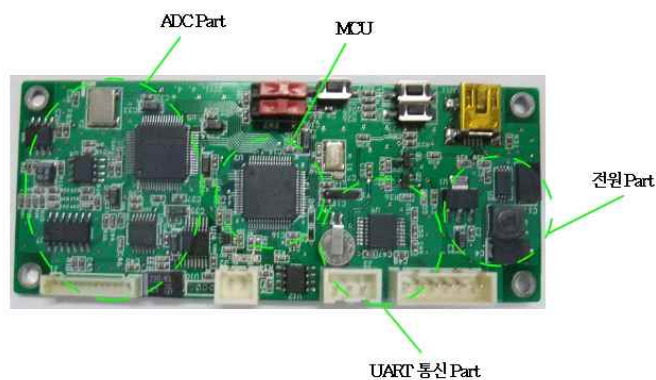


[Base 보드 구성 (좌 : Base 보드 구성도 (TOP), 우:Base 보드 구성도(Bottom))]

- ◆ 위 그림은 BASE 보드의 상하 구성도를 보여준다. BASE 보드는 TOP면과 BOTTOM면에 전자부품이 배치되어 있다. TOP면에는 무선 인터넷 환경을 지원하기 위하여

Bluetooth를 연결 할 수 있는 구성부와 4.8인치 LCD와 정전용량 방식의 터치스크린을 연결할 수 있는 커넥터가 위치해 있다. BOTTOM면에는 데이터 연산을 처리하기 위해 SAMSUNG의 Cortex-A8 코어와 1GHz의 속도를 가지는 S5PC110 모델을 사용한 CPU 보드와 Control 보드와의 통신을 하기 위한 구성부, 안드로이드 OS와 부트로더 및 측정 데이터 저장용으로 사용하기 위한 SD 메모리를 제공한다. 외부장치(마우스) 연결 및 데이터를 외부 USB 메모리로 옮길 수 있도록 포트를 제공하고 있다. CPU 보드와 BASE 보드는 확장성을 고려하여 분리가 가능하도록 구성하였다. CPU 보드의 경우 45nm BGA 타입의 보드여서 PCB 설계시 임피던스 매칭 및 전원부 설계에 대한 고난이도의 기술을 필요로 하고 PCB Layer도 8층을 필요로 하여 BASE 보드와 분리하여 진행하였다.

◆



[Control 보드 구성]

- ◆ Control 보드의 구성은 그림 M-19에서 볼 수 있듯이 CCD 또는 PD 보드에서 측정된 아날로그 신호를 디지털 신호로 변환하기 위한 ADC 구성부와 이 디지털 신호를 처리하는 ST사의 STM32F103을 사용한 MCU, Control 보드의 설정 값들을 저장할 수 있는 EEPROM, BASE 보드와 데이터 송수신을 위한 통신부, 그리고 Control 보드의 전원 관리를 할 수 있는 전원부로 구성되어 있다.

[2차년도 연구 수행 결과]

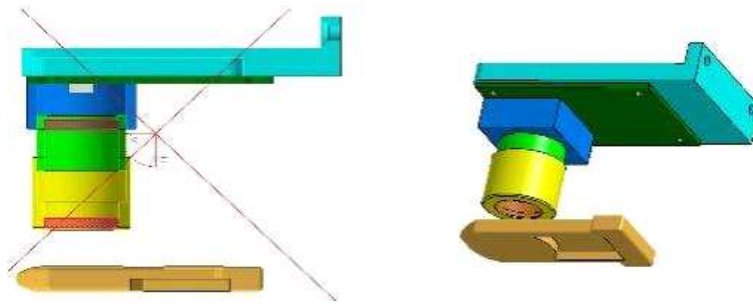
가. 고감도 광학 센서 시스템 개발1) 카메라 보드 렌즈 모듈 설계

- ◆ 스트립의 이미지 측정을 위해서는 이미지 취득을 위한 이미지 센서 모듈과 이미지면으로 스트립의 영상을 전달하는 렌즈 모듈이 필요하다. 아래 사진은 렌즈 부품, 조립된 렌즈모듈, 카메라 보드 상에 렌즈 모듈이 조립된 이미지이다. 카메라 렌즈 모듈을 구성하기 위해 Diameter 12.0mm, Focal Length 10.5mm 의 Aspheric Condenser Lens 2개를 사용하였으며, 별도의 가공품 base 를 이용하여 조립된 렌즈모듈을 카메라보드 이미지

센서 앞에 위치시켰다. Light Tool을 이용한 렌즈 광학계 설계 자료를 바탕으로, 이미지 센서와 각 렌즈 부품의 전후 거리 조절을 통해 align을 진행, 가장 선명한 상을 갖는 초점거리 정보를 얻고 이를 기준으로 조립시 렌즈의 위치를 적용했다. Align된 각 렌즈 부품은 조절된 거리에 위치를 고정시킬 수 있는 측면 고정 볼트를 갖는다. 다음 그림은 마운트에 장착된 카메라 렌즈 모듈과 측정샘플간의 간격을 확인할 수 있는 3D 모델링 도식화 이미지이다.



[카메라 보드와 렌즈 모듈 조립도]

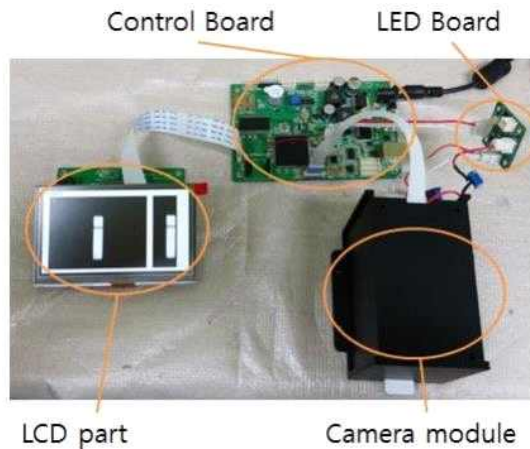


[마운트 장착 카메라 모듈 및 샘플 위치 참조도]

2) 측정 모듈 설계

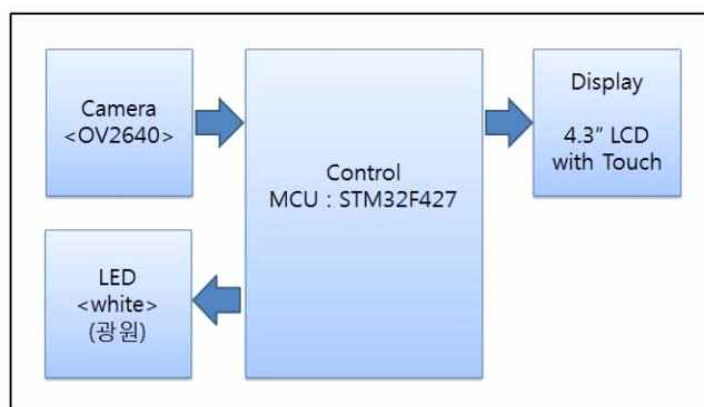
- 측정 모듈이 휴대형 광학 검출 장치임을 고려하여 각 부품 및 외관 크기는 소형화에 초점을 맞추어 설계하였다. 광원으로 사용한 White LED 장착을 위해 LED Holder를 스트립 삽입 방향 대칭형으로 2개 장착하고, 각 LED에 가변저항을 추가하여 광의 세기를 조절하여 테스트할 수 있도록 구성하였다. 또한, 외부 잡광(Stray Light)을 차단하기 위해 스트립 투입구를 제외한 전체를 암막 형태로 밀폐시키는 구조로 설계되었다. 아래 그림은 스트립 측정 모듈의 외관 사이즈 참고 도면과 모듈의 분해 및 조립 3D 모델링 이미지이다.

3) 스트립 측정 모듈 Proto-type 제작



[스트립 측정 모듈 테스트 시스템 구성]

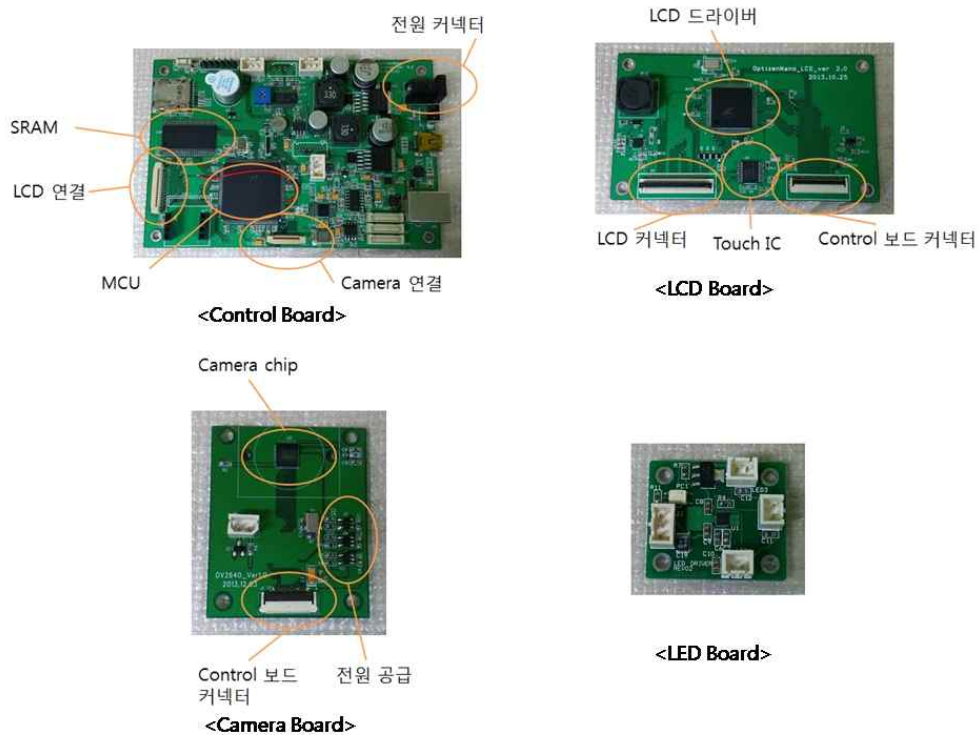
- ◆ 테스트 시스템을 보면 총 4개의 Part로 구분을 할 수 있다. 우선 LCD Part는 4.3인치 LCD와 LCD Board로 구성되어있고 이 Part는 케이블로 Control Board와 연결되어있다.
- ◆ Control 보드에서는 Camera 모듈에서 읽어 들인 스트립 이미지를 LCD로 보내서 화면에 출력하는 역할을 하고, LED 보드에 제어 신호를 보내서 광원(LED)를 on/off 할 수 있도록 한다. 또한 LCD의 터치스크린의 입력이 있으면 Control 보드에 입력한 프로그램에 의해서 촬영한 스트립의 이미지를 처리를 진행하여, 결과를 시리얼 통신으로 전송하는 기능을 수행한다.
- ◆ Camera module는 Camera Board와 카메라 렌즈 그리고 스트립을 측정할 수 있도록 한 케이스로 이루어져있다. 케이스 안의 광원을 동작시키기 위한 LED 보드는 외부에 별도로 구성을 해놓았다.
- ◆ 각각의 보드류와는 케이블로 서로 연결을 하였고, 서로간의 setting에 관련해서는 I2C 통신과 IO제어를 통해서 명령을 주고받는다.



[테스트 시스템의 구동 시스템 구성]

- ◆ Control 보드에서는 Camera 모듈에서 찍은 스트립의 이미지를 LCD보드로 보내서 화면에 출력 할 수 있도록 하고, LED보드에 제어신호를 보내서 광원을 On/Off 할 수 있도록 한다.

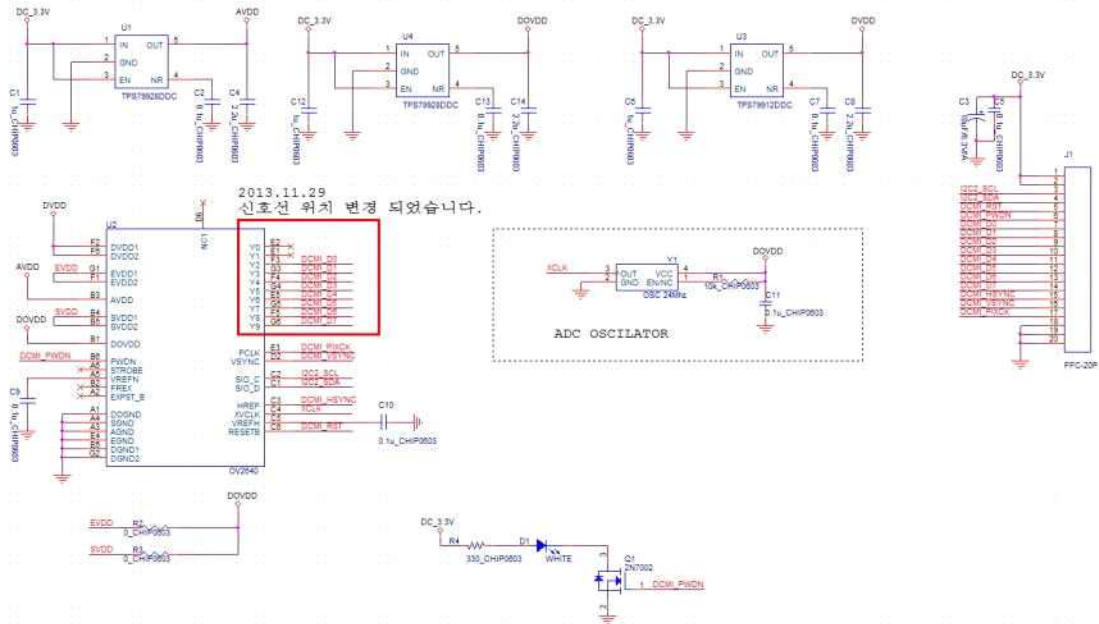
- ◆ 터치스크린의 반응이 있으면, Control 보드의 프로그램에 의해서 촬영한 스트립의 이미지 처리를 진행하여, 이 결과를 시리얼 통신으로 전송한다.



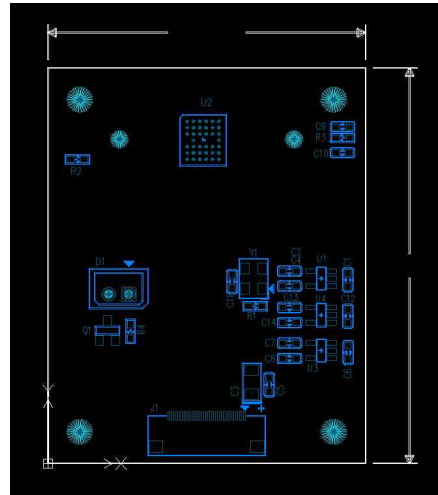
[스트립 측정 모듈 구동 시스템의 개발 Board 사진]

- ◆ Control 보드에서는 LCD제어와 LED제어 그리고 Camera 제어를 담당하며, 카메라로 들어오는 영상을 이미지 처리 알고리즘 프로그램에 의해서 처리하고 있다. 보드의 전원은 12V 전원을 사용한다. SRAM은 카메라로 들어오는 이미지를 임시로 저장하는 역할과 이미지 보정 결과 값과 이미지 처리한 값들을 보관하는데 사용된다.
- ◆ LCD Board에서 LCD 제어 드라이버로 SSD1963을 사용하여 4.3인치 LCD에 이미지를 표시하고, 저항막 터치 스크린을 사용하기 위해서 터치IC 소자를 사용하여 터치 스크린을 누를 때의 좌표를 읽어와서 MCU에 전달하는 역할을 한다. LCD는 4.3인치 TFT LCD를 사용하고 있으며, 해상도는 480x272을 가지고 있다. 터치 스크린은 4선식을 사용하고 있다.
- ◆ Camera Board에서 Camera chip은 OmniVision의 OV2640 모델(2Megapixel)을 사용하였고, 보드에는 Chip 동작에 필요한 주변 회로(전원, 클럭)을 배치하였고, Control Board에서 I2C 통신을 이용하여 카메라 동작에 관련한 setting을 수행하고, 동작을 시킵니다. 카메라의 해상도는 320x240로 QVGA 사이즈이고, 이미지의 output format는 RGB565 형식을 사용한다.
- ◆ 광원인 LED의 안정적인 동작을 위해 LED 구동 Board를 별도 구성하였으며 Control Board에서 Enable 신호를 받아서 동작을 하고, LED 구동에 필요한 정전류 드라이버 IC를 이용한다. 출력은 20mA을 가지고 있다.

(가) Camera Board



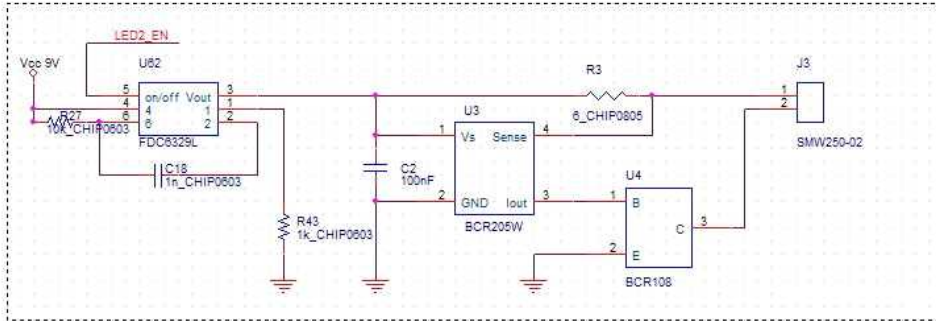
[Camera Board 회로도]



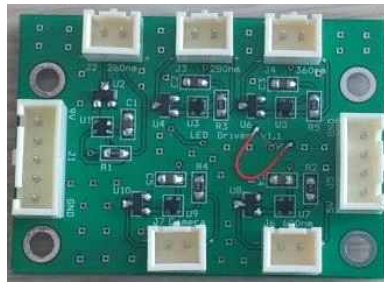
[Camera Board 사진]

- Camera Board에서 Camera chip은 OmniVision의 OV2640 모델(2Megapixel)을 사용하였고, 보드에는 Chip 동작에 필요한 주변 회로(전원, 클럭)를 배치하였고, Control Board에서 I2C 통신을 이용하여 카메라 동작에 관련한 레지스트 세팅(초기화, 해상도 설정, 게인설정 등)을 수행하고, 동작을 시킵니다. 보드의 전원과 제어는 케이블을 통해서 Control 보드에서 공급 받는다.
- 카메라의 해상도는 320x240로 QVGA 사이즈이고, 이미지의 output format는 RGB565 형식을 사용하여 스트립의 이미지를 읽어들이어서 LCD 화면에 출력을 합니다.

(나) LED Driver Board



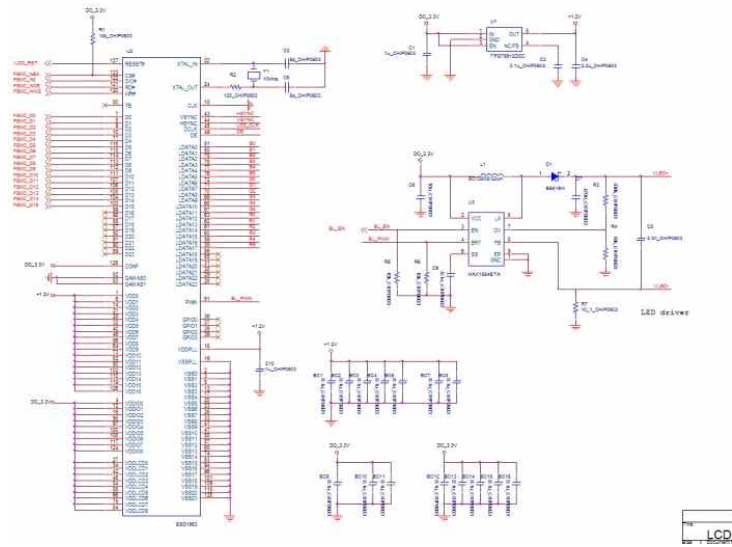
[LED Driver Board 회로도]



[LED Driver Board 사진]

- ◆ LED Driver 보드는 최대 50mA의 정전류로 LED 구동이 가능하며, 최대 18V까지 입력전압을 가지고 있다. R3의 저항을 통해서 LED 전류 세팅을 변경가능하다.
- ◆ 사용 할 수 있는 LED의 사양으로 구동 전압과 전류가 다양해서 각각의 제품에 적용하기 용이하도록 전류의 선택폭이 있는 드라이버를 선정하였다.
- ◆ 드라이버의 구동 방식은 Control 보드에서 On/Off 명령을 통해서 LED 동작을 제어 할 수 있다.

(다) LCD Board



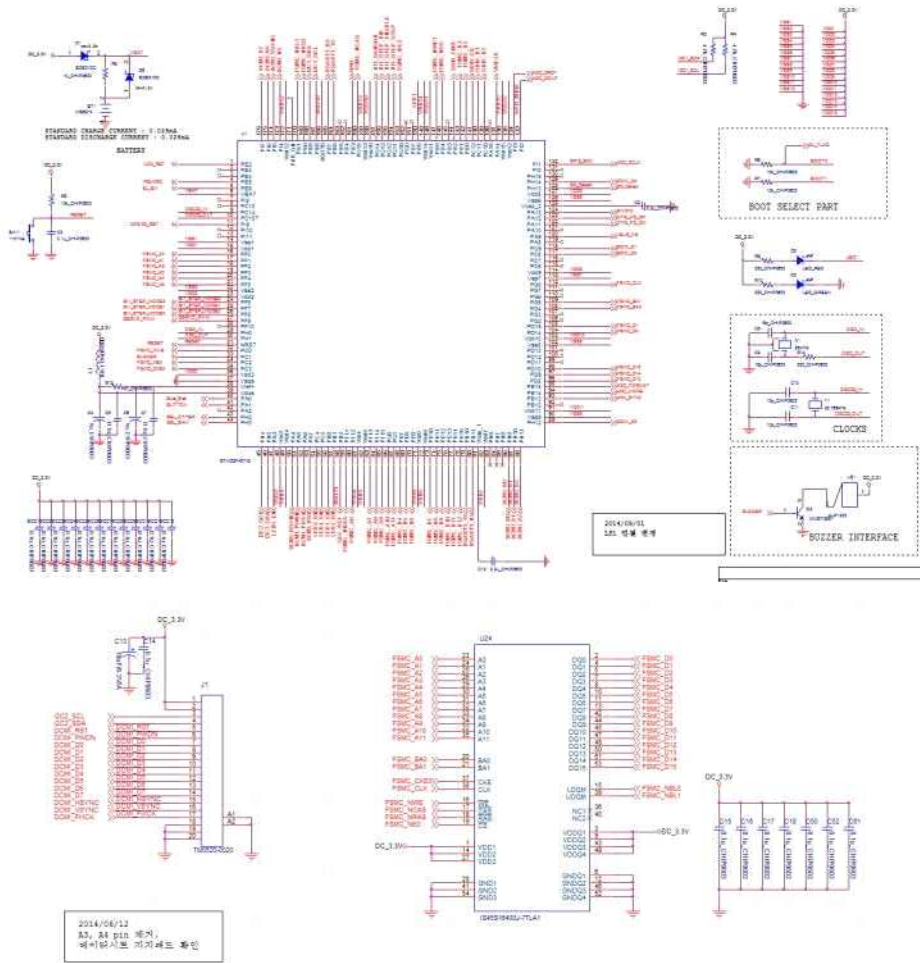
[LCD Board 회로도]



[LCD Board 사진]

- ◆ LCD Board에서 LCD 제어 드라이버로 SSD1963을 사용하여 4.3인치 LCD에 이미지를 표시하고, 4선식 저항막 터치 스크린을 사용하기 위해서 터치IC 소자를 사용하여 터치 스크린을 누를 때의 좌표를 읽어와서 Control 보드에 전달하는 역할을 한다. LCD는 4.3인치 TFT LCD를 사용하고 있으며, 해상도는 480x272을 가지고 있다.

(라) Control Board



[Control Board 회로도]



[Control board 사진]

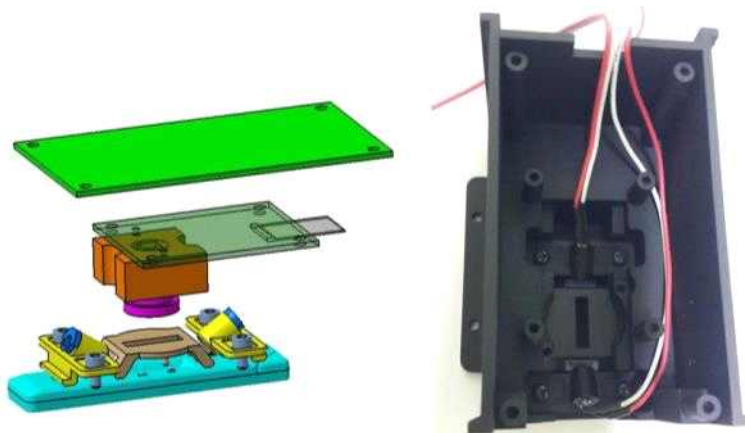
- ◆ Control 보드의 MCU는 ST사의 Cortex-M4 계열의 STM32F427 모델을 사용하고 있다.

Control 보드에서는 광원 LED의 제어를 담당하고 있고, Camera의 기능 제어를 담당하며, 카메라로부터 들어오는 이미지를 LCD로 출력을 하고, 알고리즘을 통해서 처리하고 그 결과를 출력하는 역할을 담당하고 있다.

- ◆ 입력전원으로는 12V의 전압을 사용하고 있고, 이 전압은 레귤레이터를 통해서 각각의 IC에 맞는 전압으로 다운하여 분배를 한다.

(마) 스트립 측정 모듈

- ◆ 스트립 측정 모듈은 효율적인 공간구성 및 테스트를 위해 LED 모듈 및 필터 모듈, 카메라렌즈 모듈을 분리된 형태로 구성하였다. 측정시 카세트 멤브레인 부분이 아닌 카세트 케이스(플라스틱)가 같이 센싱되어 Data Background 에 영향을 주는 문제를 해결하기 위해 Partition 을 추가장착, 이미지 센싱 영역을 축소하여 멤브레인 부분만이 이미지 센싱되도록 측정 영역을 한정하였다. 또한, LED 의 빛이 한곳에 집중되었을 때 발생하는 주변부와의 측정 불균일성 및 그림자 발생으로 인한 Data 오차를 보정하고자, diffuser 역할의 광확산PC 를 LED 앞단-Partition 에 고정 장착하였다. 광확산 PC 는 LED에서 나오는 빛이 한점에 몰리지 않고 스트립 측정부위 전체적으로 균일한 광원 조사가 가능하도록 한다. 또한, 측정시 카세트의 흔들림 오차를 최소화하기 위해 카세트 레일부에 2개소 Hook 형태의 Holding System 을 추가하여 시스템 전체 측정 정밀성과 카세트 장착 재현성을 확보하고자 하였다. 아래 그림은 Partition 이 포함된 3d 설계 이미지 및 실제 목업 조립도이다.



[스트립 측정 모듈 3D 모델링 및 Mock-up 조립도]

- ◆ 광원은 Diameter=Ø3mm White LED 를 사용하였다. LED가 장착되는 부분의 각도를 조절하여 카세트 상 측정되는 2개의 밴드에 각각 직접 LED의 빛이 조사될 수 있는 각도로 설계하였다.
- ◆ 이미지 센싱 카메라 모듈도 설계 변경되었다. 1차 카메라 모듈 구성에서 사용하던 카메라 렌즈는 거리 조절이 어렵고 측정 이미지가 선명하지 못한 문제가 발생하여 이를 해결하고자, 카메라 모듈 1차에서 시뮬레이션 되었던 초점거리와 유사한 거리 및 성능을

지닌 기성품 렌즈로 교체하였다.

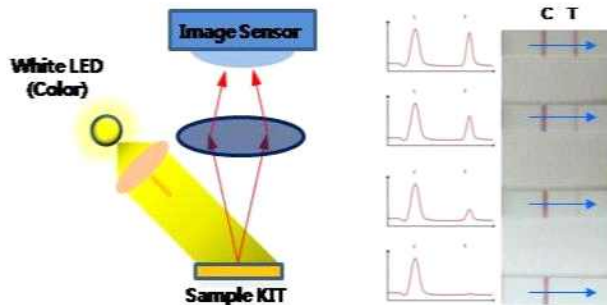
- ◆ 아래 그림은 변경된 카메라 모듈 렌즈 및 카메라 보드와의 실제 조립 이미지이다. 변경된 렌즈는 기구물 일체형으로 외곽에 Tap 형상이 구비되어있어 조립 공차 발생이 적고 기구적 흔들림이 적어 교정 작업이 용이하고, 더 선명한 이미지를 얻을 수 있다.



[카메라 모듈 렌즈 및 조립 이미지]

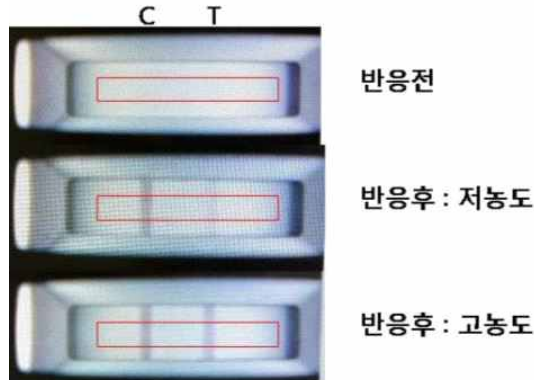
나. 측정 결과 도출을 위한 알고리즘 개발 및 검증

- ◆ 스트립의 측정은 아래 그림에서와 같이 광원(White LED)을 스트립(Sample KIT)에 조사하고 스트립 상에 나타나는 반응 밴드(C, T)를 이미지 센서(Camera Board)를 통해 촬영한 후 각 반응 밴드의 발색 정도를 분석하여 샘플의 농도를 정량화한다.



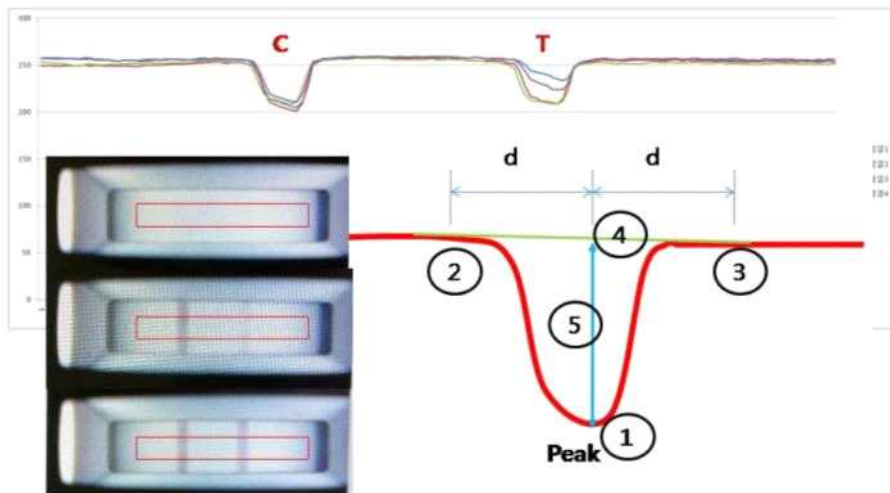
[스트립 측정 Scheme]

- ◆ 카메라로 스트립을 찍으면 320x240의 QVGA의 영상이 찍힌다. 이 이미지를 SRAM에 저장하고, 저장된 데이터 포맷은 RGB565 포맷으로 16bit = R(5bit) G(6bit) B(5bit)로 표현하는 방식을 사용한다. 아래 그림은 농도별로 반응 시킨 스트립을 카메라로 촬영한 이미지이다. 저농도와 고농도에서 T 밴드의 발색 정도가 차이가 나는 것을 볼 수 있다.



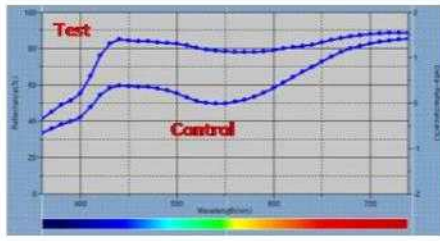
[농도별 반응 스트립 이미지]

- ◆ 측정 시스템의 이미지 처리를 위해 반응 시키지 않은 White Strip을 먼저 측정하여 메모리에 저장한다. 이미지의 균일성 보장을 위해 이렇게 측정된 결과를 이용하여 White Balancing을 수행한다. 이를 통해서 광원 측정부의 환경 등에 보다 강인한 이미지를 추출할 수 있다.

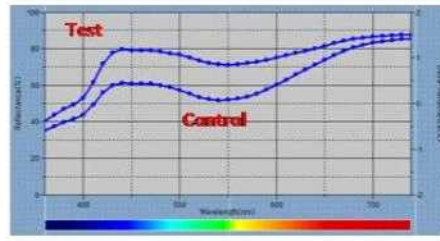


[측정값 추출 방법]

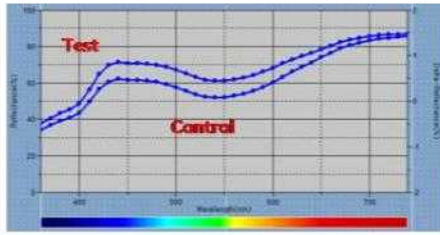
- ◆ 또한, 측정 환경 및 스트립의 위치 등에 덜 민감할 수 있도록 아래와 같이 측정값을 추출한다. 측정된 이미지에서 측정하고자 하는 스트립의 특정 범위를 선정하여 가로 방향의 위치별 측정 신호를 추출한다. 추출된 측정 신호에서 Peak 1 위치를 찾는다. Peak 1로부터 특정 거리 d 만큼의 좌우 위치 2, 3에서 측정값을 도출한다. 위치 2, 3의 측정값으로부터 평균값을 취하여 중간 위치 4에서의 Background 값을 추정한다. 1에서의 Peak값과 4에서의 Background 값의 차이를 측정값으로 계산한다.
- ◆ 위에서 제시한 측정 모듈과 측정 알고리즘을 검증하기 위하여 1~5단계의 농도로 반응시킨 스트립에 대하여 개발한 측정 모듈과 기준 장비(CM-2600d)의 비교 테스트를 진행하였다.
- ◆ 아래 그림은 스트립 샘플 5종에 대한 기준장비로 측정된 결과를 보여주고 있다. 측정 결과는 반사율(%)로 표시된다.



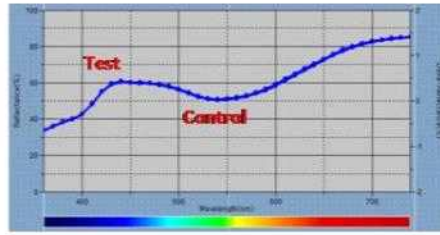
< 샘플 1 >



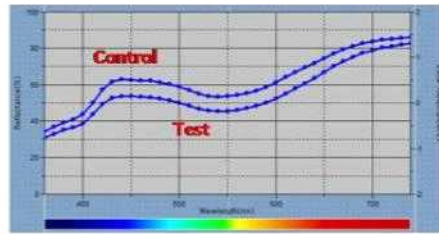
< 샘플 2 >



< 샘플 3 >



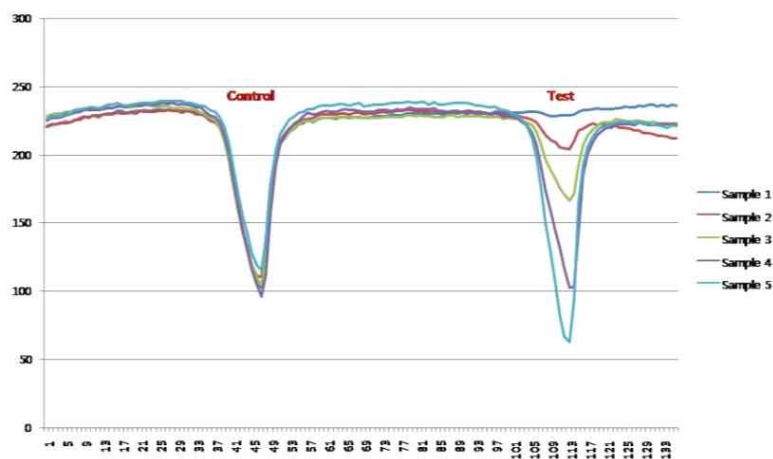
< 샘플 4 >



< 샘플 5 >

[기준장비로 측정 한 결과]

- ◆ 아래 그림은 본 연구에서 개발된 반사형 측정 모듈로 샘플 5종을 측정 한 결과이며 결과 값은 위에서 제시한 방법으로 Control 과 Test 밴드의 Peak 값을 계산한 결과이다.



[스트립 측정 모듈로 측정 한 결과]

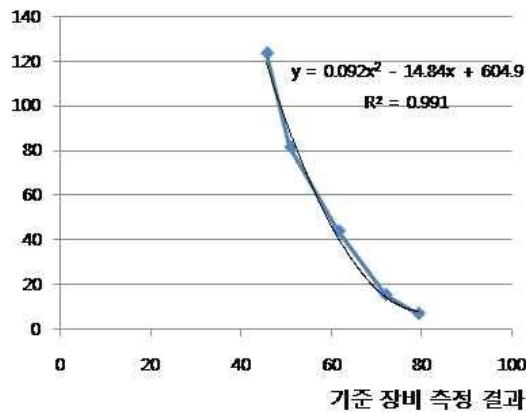
- ◆ 아래 표에서 기준장비와 개발장비 간의 측정 결과를 비교하였다. 두 장비간의 Test 밴드의 측정결과는 높은 상관관계를 가지고 있다. 이를 통해서 본 과제에서 개발한 스트립

측정 모듈에 대한 신뢰성을 확인할 수 있으며 위에서 제시한 측정 결과 도출 알고리즘에 대한 검증을 확인할 수 있다. 또한, Control 밴드의 측정 결과에서도 기준장비와 개발장비의 결과가 같은 경향성을 보이고 있다. 측정 결과를 단순 비교할 수는 없지만 Control 밴드의 샘플별 변화 경향이 동일함을 확인할 수 있다.

[기준장비와 개발장비의 샘플 측정 결과 비교]

Sample No.	CM-2600d		개발 모듈	
	Control	Test	Control	Test
1	49.91	79.16	101.4	6.7
2	52.18	71.91	94.7	15.1
3	52.29	61.57	98.7	43.7
4	51.37	50.89	111	81.3
5	53.70	45.67	99	123.4

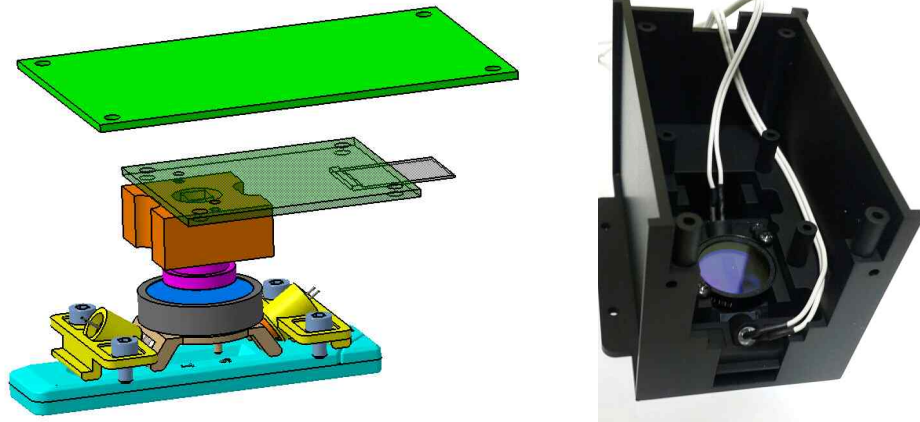
개발 장비 측정 결과



[기준장비와 개발장비의 측정결과 비교]

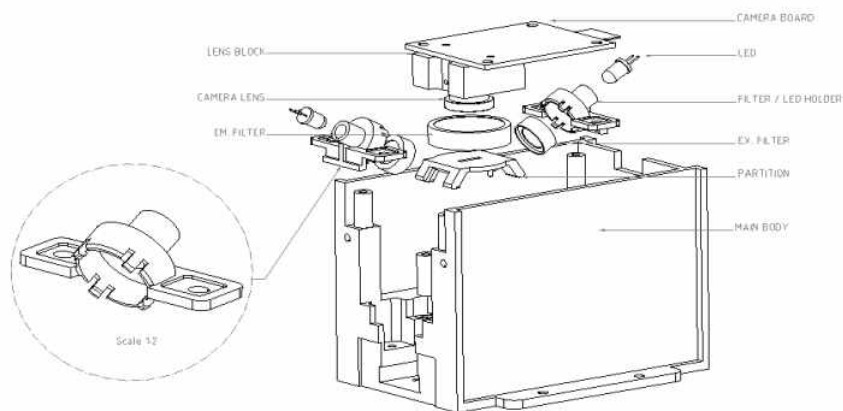
다. 형광 스트립 측정 모듈 Proto-Type 제작

- 형광 스트립 측정 모듈에서는 반사형 측정 모듈과 달리 여기 파장용 LED를 사용하기 위해서 LED 사양에 맞추어 Diameter Ø5mm 인 625nm LED를 사용했다. Filter 및 LED 고정부를 제외한 나머지 부품은 White LED를 사용할 때와 호환 가능하도록 유사한 설계형상을 갖게 하고, 추가적으로 Cut-off Wavelength 675nm인 Longpass Filter를 장착했다. Emission Filter는 Partition과 렌즈 모듈 사이에 위치하며 목업 Main Body의 지정 위치에 삽입 후 상측에서 볼트로 고정시키는 구조를 택해 조립을 용이하게 하였다. 아래 그림은 측정 모듈 3d 모델링 이미지와 카메라 보드를 제외한 상태의 측정 모듈 실제 조립 상태이다.



[형광 측정 모듈 3D 모델링 및 실제 조립 상태]

- ◆ Excitation Filter는 Diameter 1/2 inch Bandpass Interference Filter를 사용했다. 스트립에서 측정되는 위치를 기준으로 대칭으로 장착된 LED 앞에 위치하며, 그 장착부는 LED Holder와 일체형이다. Filter 고정부는 Filter를 손으로 간단히 끼워 넣을 수 있도록 3개소 Hook 형태를 가진다. 아래 그림은 변경된 Excitation Filter 고정부와 전체 모듈 분해도이다.

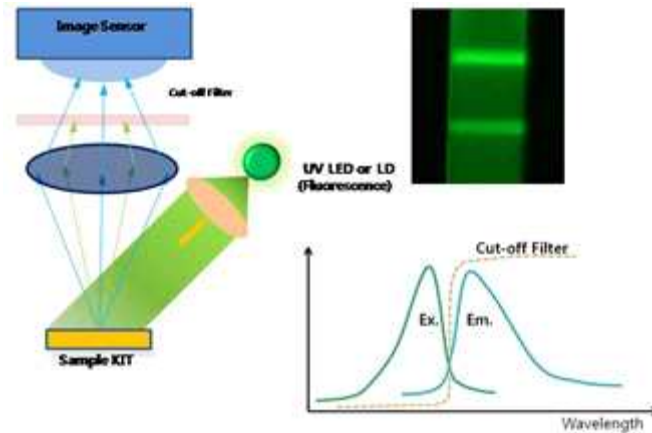


[변경된 Filter 고정부와 측정 모듈 분해도]

- ◆ 아래 그림은 형광 측정 모듈이 적용된 형광 측정 시스템이다. 스트립 이미지 센싱 시스템과 마찬가지로 filter가 적용된 카메라 모듈, LCD 모듈, LED Board, Control Board 로 크게 4 part 로 구성된다.

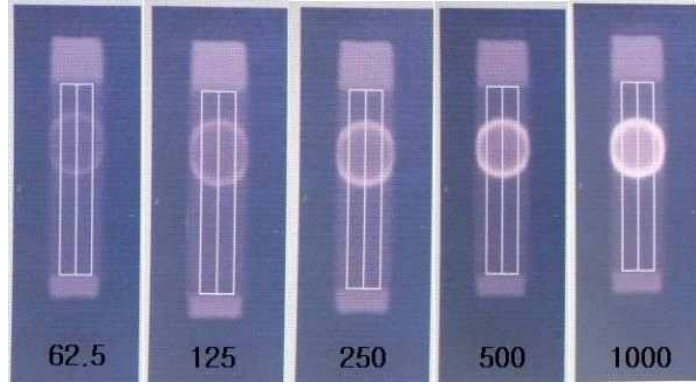


[형광 측정 모듈 시스템 구성]

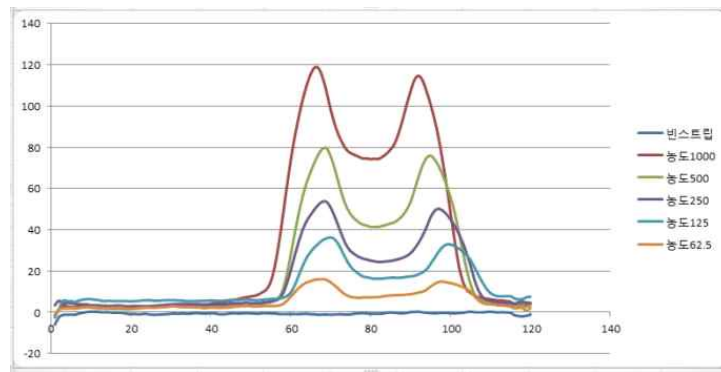


[형광 스트립 측정부 구조]

- ◆ 형광의 측정 방법은 반사형 장비의 측정방법과 동일하다. 스트립에 LED를 조사하고 스트립에 나타나는 반응을 이미지 센서를 통해 촬영한 후 스트립의 형광발색 정도를 분석하여 샘플의 농도를 정량화 하는 방법이다.
- ◆ 위 스트립을 형광 proto-type에 넣고 카메라 촬영을 한 이미지를 아래에 표시하였다. 각 농도별로 형광의 차이가 나타나는 것을 볼 수 있다.
- ◆ 반사형과 같은 띠형식의 스트립이 아닌 형광물질을 스트립에 직접 떨어뜨려서 테스트를 진행을 하게 되었다. 그래서 아래와 같은 동그란 모양의 형상이 되었고, 형광물질이 중앙부보다 끝라인쪽으로 물리는 현상이 발생하였다. 이 현상은 앞으로 띠 형식의 스트립을 사용하게 되면 개선될 것으로 보인다.

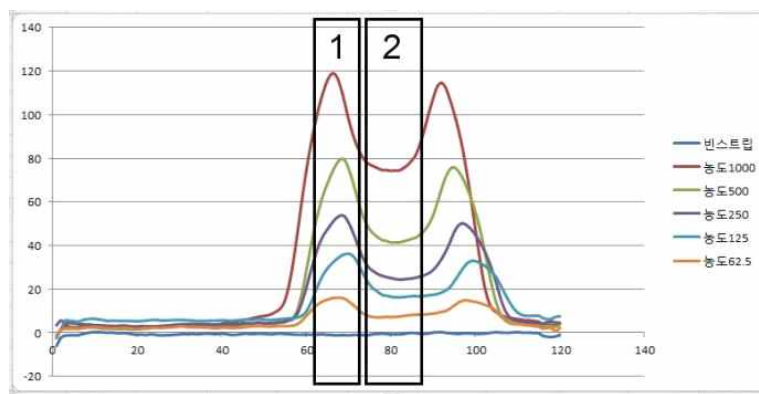


[농도별 형광 스트립 측정 이미지]



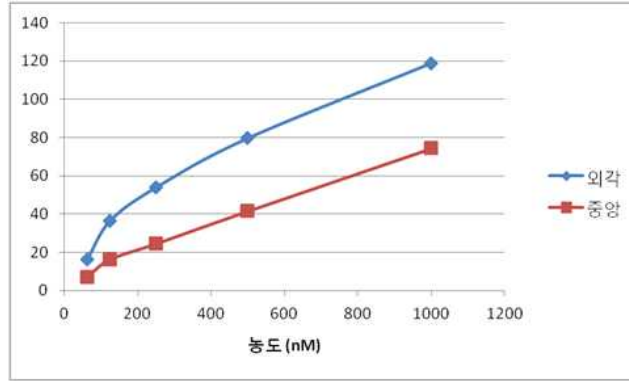
[농도별 형광 스트립 측정 결과]

- ◆ 위 그래프는 위에 있는 농도별 스트립의 측정 결과를 나타낸 것이다.
- ◆ 농도별 스트립 이미지에서 보면 중앙부가 외각보다 어둡게 나타난 경향이 측정 결과에서도 나타나고 있으며, 농도별로 측정값의 변화가 있는 것을 확인할 수 있다.



[농도별 최대최소 측정 결과 위치]

- ◆ 스트립의 측정 결과에서 외각의 형광 측정 결과치와 중심부의 형광 측정 결과치를 표로 나타내었다.



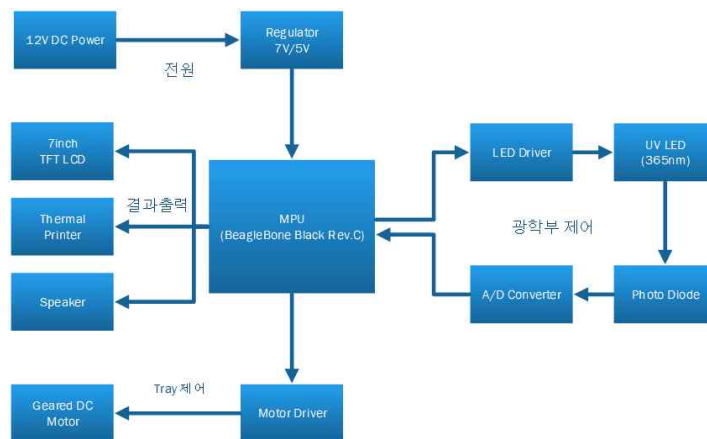
[농도별 형광 측정 결과 상관관계]

- ◆ 위 측정 결과로 형광물질의 농도에 따른 변화를 측정결과로 확인이 가능하다.

1. 측정기기 시스템

가. 본 시스템은 오픈하드웨어(BeagleBone Black)를 기반으로 하며, User Interface는 LCD 터치 스크린으로 전체 시스템을 제어

나. 모터 제어를 통해 Tray를 움직여 카트리지의 I/O 및 측정 위치 제어를 자동화
 다. 카트리지 삽입이 인식되면 LED Driver를 통해 UV LED 광원을 동작 시키고 광학필터를 통과한 빛을 포토다이오드로 받아 A/D Converter를 거쳐 데이터를 프로세싱
 라. 프로세싱 과정부터 결과까지 모두 LCD를 통해 Graphic User Interface (GUI)로 사용자에게 디스플레이 해주며, Thermal Printer로 출력 가능



[측정기기의 시스템 구조 및 프로세스 모식도]

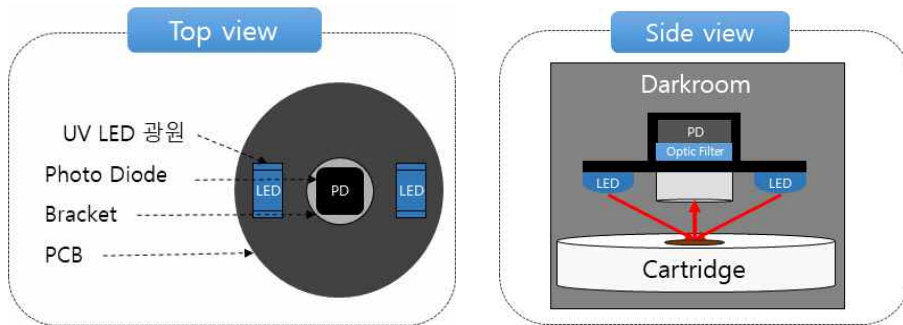
가) 12V DC 아답터에서 전원을 공급받아 Regulator를 통해 MPU와 Motor 및 광학부 회로에 5V 전원을 공급하고, Thermal Printer에 7V 전원을 공급

나) Digital Potentiometer를 제어하여 LED Driver의 전류량을 조절하여 광학부의 LED 밝기를 128단계로 정밀 조정하여 측정에 필요한 광량을 세부적으로 설정

- 다) Photo Diode를 통해 들어온 아날로그 신호를 12bit 디지털 신호로 컨버팅
- 라) 측정 간의 모든 프로세스를 7inch TFT LCD에 시각적으로 출력하며, Speaker를 통해 청각적인 정보 제공
- 마) 5V Geared DC 모터를 사용하여 Tray를 자동 제어하며, 카트리지를 광학부의 정확한 위치에 이동 제어

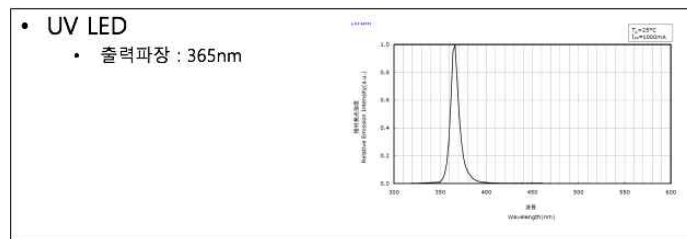
2. 측정기기의 광학부 구성

- 가. 광원에서 직접 포토다이오드로 빛이 들어오는 것을 방지하기 위해 포토다이오드 주변에 빛을 차단할 수 있는 Bracket 설치
- 나. 외부에서 들어오는 빛을 차단하기 위해 광학부를 암실로 구성하여 데이터의 노이즈 차단
- 다. 광학부의 구성은 시약의 반응에 맞춰 365nm UV LED를 대칭으로 조사하여 반사되는 빛을 포토다이오드를 통해 Intensity Value를 획득함
- 라. 광학 필터를 통해 원하는 파장의 반사된 빛을 측정하여 정량적인 데이터 센싱



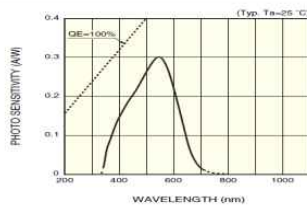
[측정기기의 광학부 구상도]

마. 광학부 Spec.



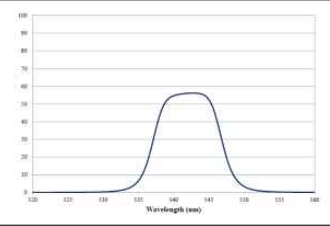
가) 시약과의 반응을 위한 365nm의 UV광원을 사용

- Photo Diode
 - Sensitivity : 340~720nm
 - Peak Sensitivity : 540nm



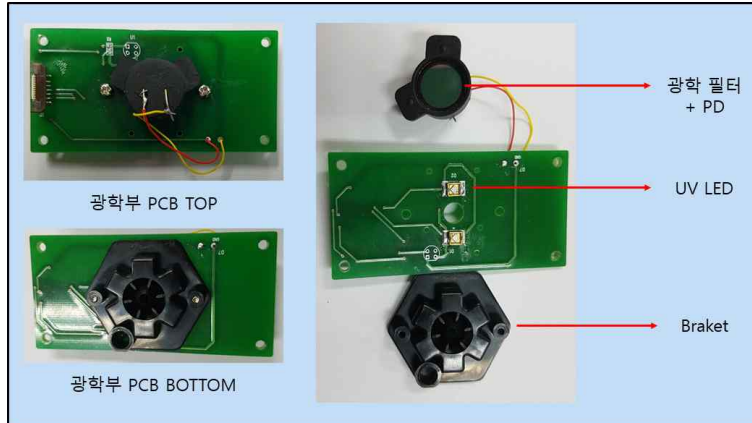
나) 시약과 반응 후 발생하는 형광물질의 발광 파장에 맞춰 540nm에서 Peak Sensitivity를 갖는 Photo Diode 사용

- 광학 필터
 - Center Wavelength : 540nm

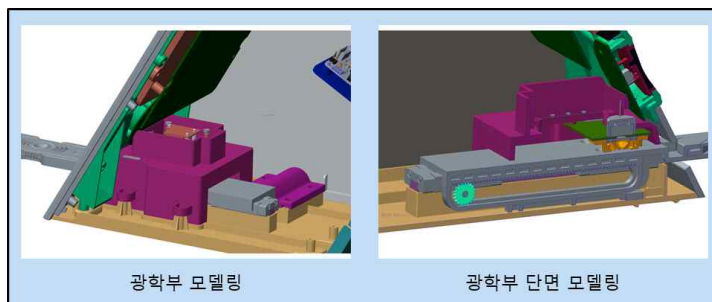


다) 측정 간의 외부 빛 차단 및 광원에서의 기구물 반사를 통해 들어오는 기타 광신호들을 차단하기 위해 540nm Center Wavelength의 특성을 가진 Bandpass 광학 필터를 사용

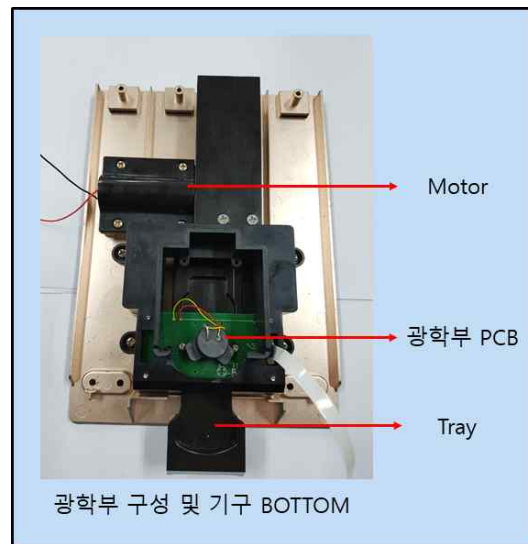
바. 개발한 광학부 모듈



가) 광학부 스펙 구성을 토대로 설계된 PCB 및 광학부 구성으로 Cartridge에 광원을 올바르게 전달하고 간섭을 최소화 할 수 있도록 Braket과 광학 필터를 구성



나) 측정기기 광학부의 기구설계 및 목업 제작을 위한 3D 모델링

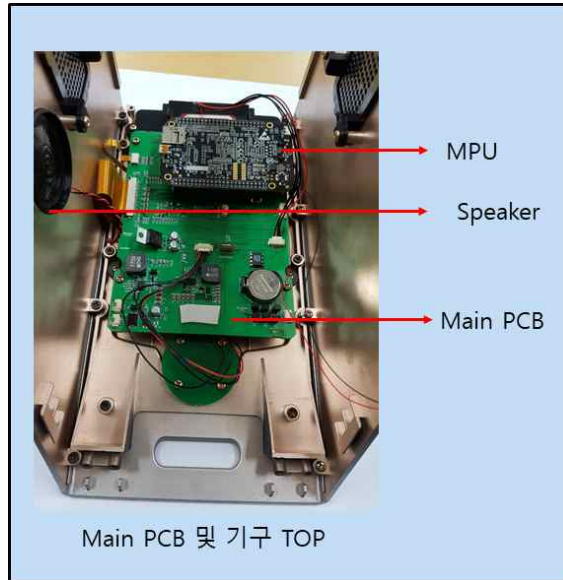


다) 3D 모델링 기반의 광학부 목업을 제작하고 Tray 및 Motor 등 기구 조립

3. 측정기기 기구 제작

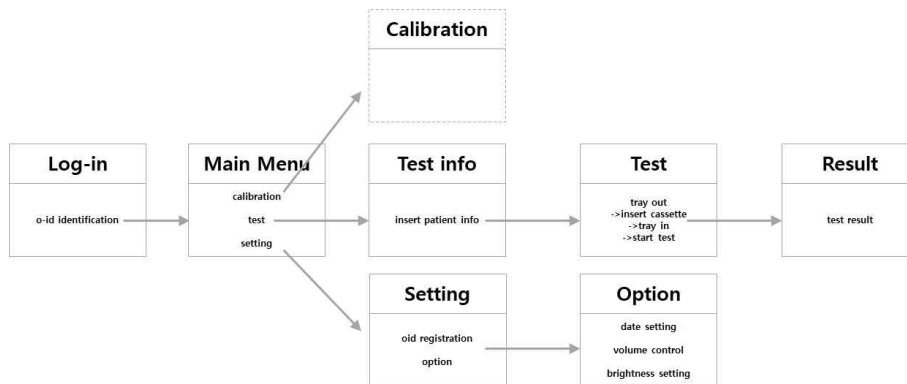


가) 형광측정기기의 기구 설계 및 목업 제작을 위한 3D 모델링



나) 형광측정기기의 Main PCB와 MPU 및 주변 기기들과의 기구 조립

4. 측정 소프트웨어 구성



[측정 소프트웨어의 구성 도식화]

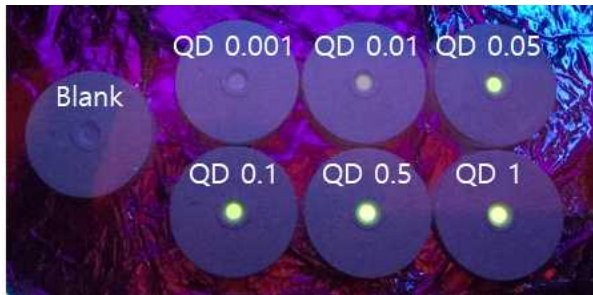
- 가) 측정 소프트웨어는 Linux 기반의 OS와 QT5.5의 플랫폼 기반으로 제작
- 나) 오픈하드웨어와 OS기반의 시스템으로 기기의 버전업 및 기능 추가에 능동적으로 확장이 가능
- 다) 기기의 부팅이 완료되면 기기 관리자 로그인 화면이 나오고 로그인을 성공할 경우 메인 메뉴로 이동
- 라) 메인 메뉴는 테스트, 캘리브레이션, 세팅으로 구성
- 마) 테스트는 환자의 정보를 입력하고 카세트의 형광 값을 측정
- 바) 세팅 화면에서 볼륨, 밝기, 날짜 그리고 관리자 번호를 변경하는 것이 가능

나. 형광측정기기 기구물 및 소프트웨어



가) 형광측정기기 개발 완료된 모습으로 측정 소프트웨어 구동 화면

다. 샘플 시약 테스트 및 결과



가) 농도 별 샘플 카트리지의 반응 사진



나) 농도 별 샘플 카트리지 측정 결과 화면

- ▶ 현장에서 할랄제품중 돈육유래 성분 및 알콜함유 유무를 검사할 수 있는 진단키트를 위한 장비(리더기)의 최적화

1. 돈육/돈지 유래 성분 검사를 위한 리더기 선정

가. 리더기 선정

: 정량, 정성 분석이 가능한 터치스크린 타입의 SMART reader를 선정하여 개발키트에 적합하게 프로그램을 최적화하여 적용하였다.



[돈육/돈지 검사를 위한 선정 리더기]

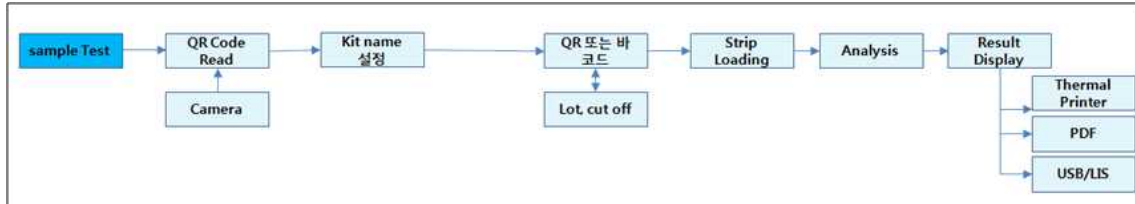
나. 리더기 구성

- 1) 리더기 본체: 임베디드 시스템으로써 터치스크린으로 모든 작동 구현가능함.
- 2) Reference kit: 리더기의 보정 및 유지를 위해 사용
- 3) Touch pen
- 4) Adaptor 및 전원 케이블
- 5) 사용 매뉴얼



6) 측정 procedure

- 키트 디바이스에 인쇄된 QR code 또는 Barcode를 스캔하여 kit name 자동 인식함.
- Lot 번호 및 cut-off 자동인식하여 키트결과를 판독하게 됨.



[측정 시스템의 도식화]

7) 샘플 테스트 및 결과화면

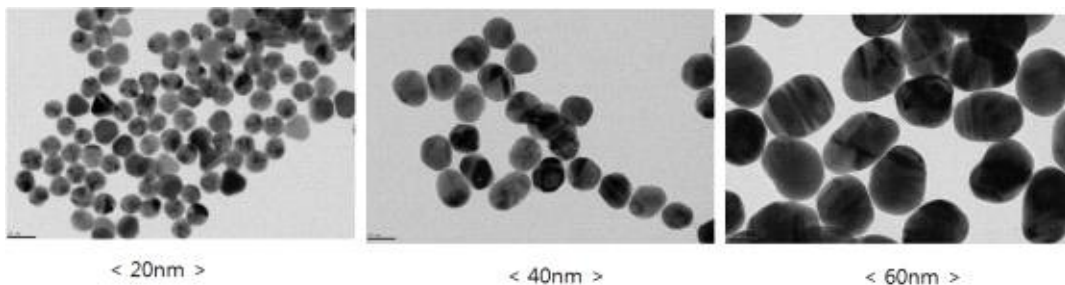
- 결과 print 가능하고 저장하여 USB로 옮길 수도 있음.



▶ 돈육성분 분석을 위한 진단키트의 시제품 생산을 위한 최적화

1. Colloidal gold probe 제작

- Colloidal gold의 제조는 Frens의 방법에 따라 sodium citrate 양 조절을 통해 20, 40, 60 nm의 gold particle을 제조하여 전자현미경으로 particle size와 균질성을 확인함.
- gold-antibody conjugate에 들어가는 항체의 량과 검출능을 고려하여 40nm gold particle을 키트개발에 사용하는 것으로 결정함.



[실험에 사용한 금나노입자의 TEM image]

2. Gold-antibody conjugate 제조

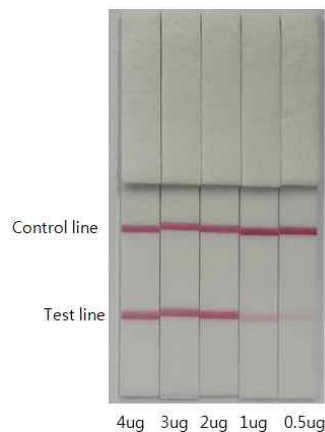
협동기관(경상대)에서 제공받은 돈육/돈지에 특이적인 단클론 2B8-31을 gold 용액 1mL에 0, 1, 2, 3, 4, 5ug을 넣고 30분 동안 교반하며 반응시킨 후, 10% NaCl을 100ul 첨가하여 gold particle의 침전유무를 확인하였다. gold에 conjugation을 위해 충분한 돈육/돈지 항체량은 4ug/mL인 것으로 확인됨.



[Gold-antibody conjugation을 위한 titration]

3. 나이트로셀룰로스 멤브레인 항체코팅 최적화

검사선에 코팅하는 돈육/돈지 특이적인 항체의 최적량을 결정하기 위해서 0.5mg/mL, 1mg/mL, 2mg/mL, 3mg/mL 그리고 4mg/mL 농도를 1uL/cm로 분주하여 37°C에서 1시간 건조시킨 후 PBS에 10% 돈육이 포함된 시료를 적용하여 검사선의 진하기를 비교하여 결정하였다. 2, 3, 4ug/mL 3가지 농도에서 큰 차이가 없어 적은량을 코팅한 2mg/mL로 결정하여 추후 키트 최적화 시험에 사용하는 것으로 결정함.

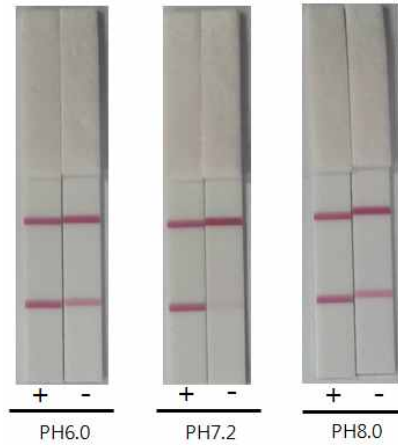


[멤브레인 코팅 항체량 결정]

4. Sample Pad 전처리조건 최적화

샘플의 원활한 전개와 pH 조절 등 버퍼링 기능을 하는 샘플패드 전처리 버퍼의 조건시험을 0.1% Tween20을 포함한 50mM phosphate buffer(PB)의 pH에 따른 최적시험을 실

시하였다. pH 6.0, 7.2, 8.0의 PB를 샘플패드에 처리한 후 37도씨에서 3시간 건조 후 확인하였다. pH 7.2 PB에서 양성의 검사선이 가장 좋은 결과로 판단하여 추후 키트제작에 사용하기로 결정함.

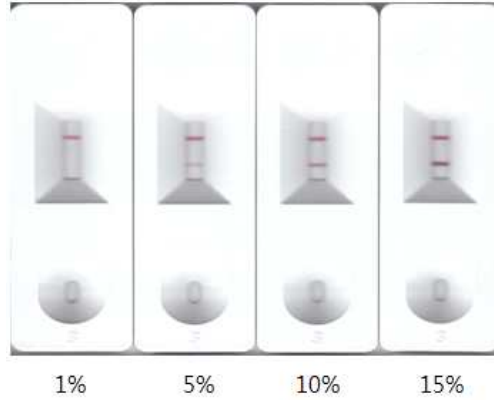


5. 돈육/돈지 검사키트의 시제품 생산

: gold-antibody 컨쥬게이션, 멤브레인 코팅, 샘플패드 전처리 조건 시험을 통해 확인된 최적 조건으로 완제품 키트를 제조하여 PBS 버퍼에 돈육 5%, 10%, 15%를 spiking하여 확인한 결과 5%까지 검출한 것으로 확인됨.

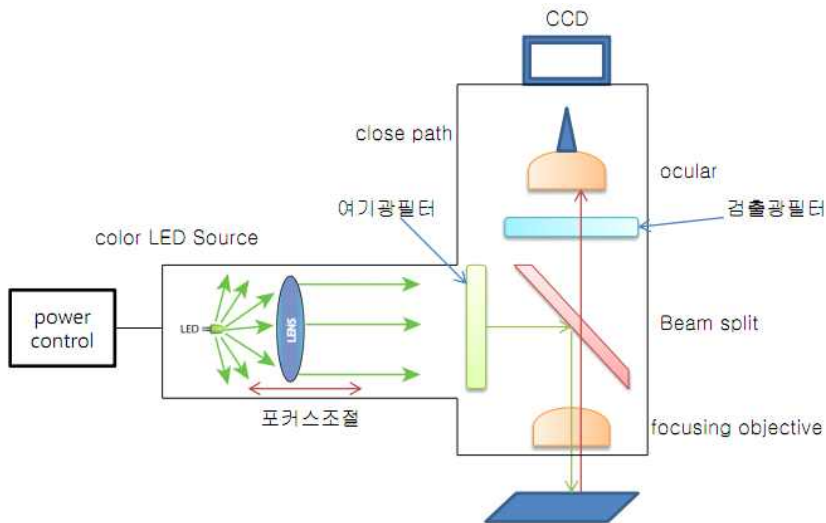
공정	Test line 조건
Gold-Antibody conjugation	- 2B8-31 항체 사용 - 4ug 항체: 1ml gold 용액
멤브레인 코팅 항생제결합체 최적화	1. 검사선 조건 - 2B8-28 항체 사용 - 2mg/ml 농도, 1ul/cm 분주 2. 대조선 조건 - Anti-mouse IgG 사용 - 0.8mg/ml 농도, 1ul/cm 분주
Sample Pad 전처리 버퍼	Phosphate buffer(containing 0.1% tween20, pH7.2)

[완제품 생산 조건]



[돈육 함유량에 따른 검출능 확인]

- ▶ 알콜성분 분석을 위한 진단키트의 시제품 생산을 위한 최적화
- ▶ 할랄제품 중 돈육성분 알콜성분 현장검사를 위한 시제품 키트의 평가



- 포커싱렌즈의 배율이 높을 수록 여기광의 에너지가 높아지고 타겟과 거리가 가까워 형광검출이 잘됨
- 반대로 검출영역이 적음

- 포커싱렌즈의 배율이 작으면 타겟과 거리가 멀어지며 검출영역이 넓어짐.
- 반대로 형광신호가 작게 검출됨

[카메라 모듈 개발 컨셉]

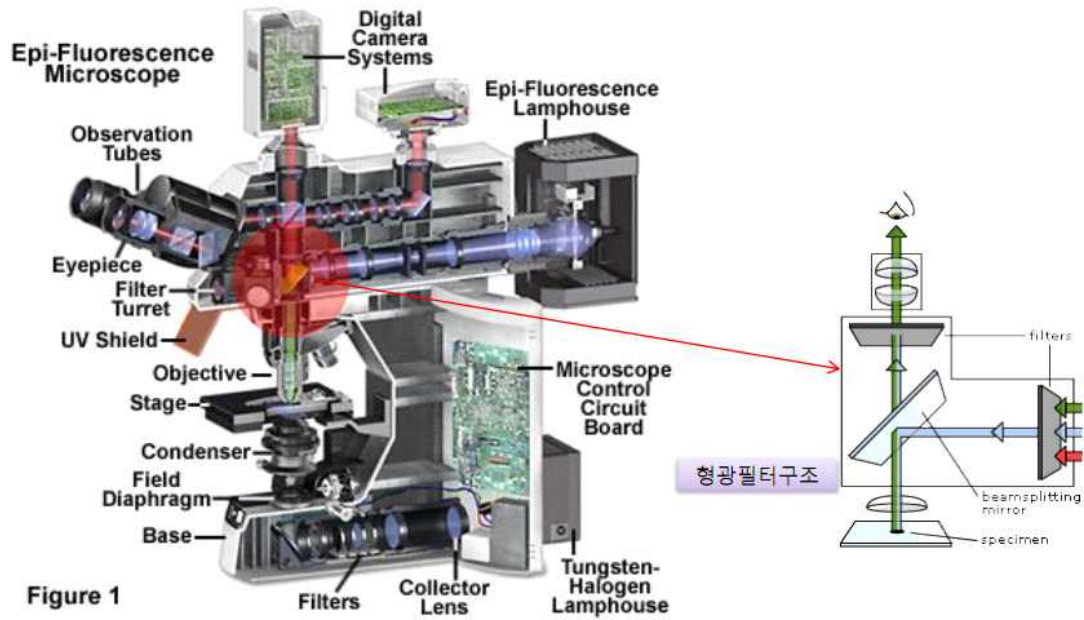
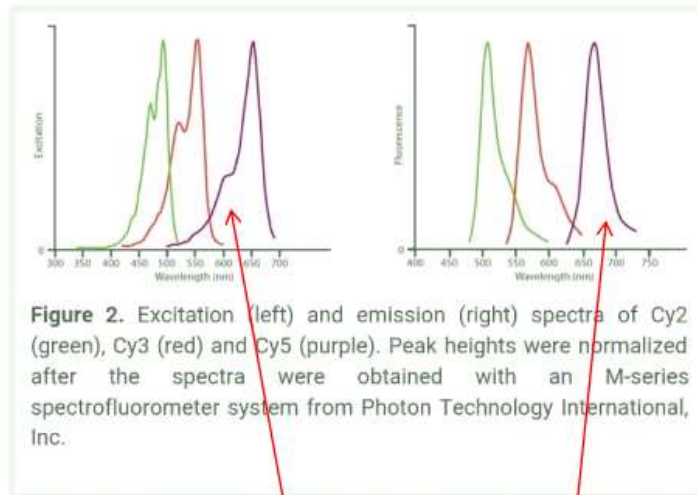


Figure 1

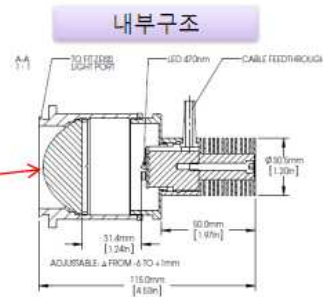
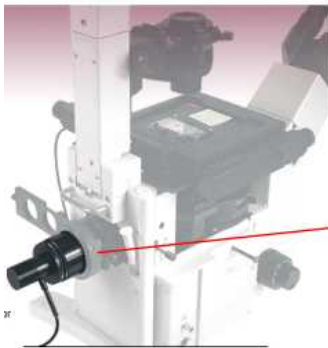
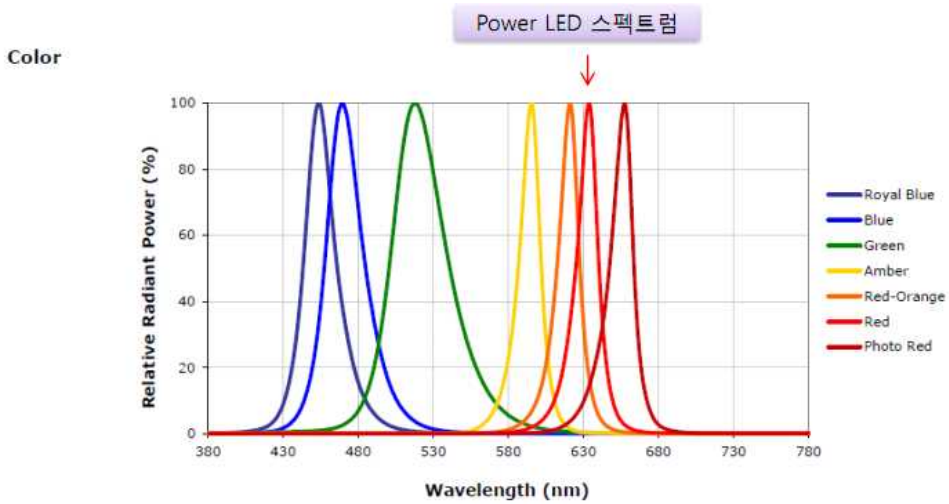
Nikon 현미경 구조도

[카메라 구조 이해도]



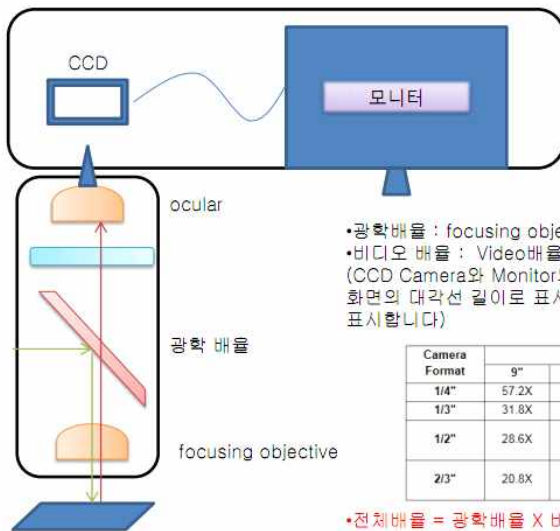
Fluorophore	Excitation Peak (nm)	Emission Peak (nm)
Cyanine, Cy2	492	510
Indocarbocyanine, Cy3	550	570
Indodicarbocyanine, Cy5	650	670

[형광 스펙트럼 검출 영역]



[LED Light Source]

비디오 배율



- 광학배율 : focusing objective X ocular
- 비디오 배율 : Video배율은 CCD Camera와 Monitor의 크기에 비례합니다. (CCD Camera와 Monitor의 크기 비례관계는 같지 않습니다. Monitor의 크기는 화면의 대각선 길이로 표시하나 CCD Camera는 CCD 촬상소자의 가로크기를 표시합니다)

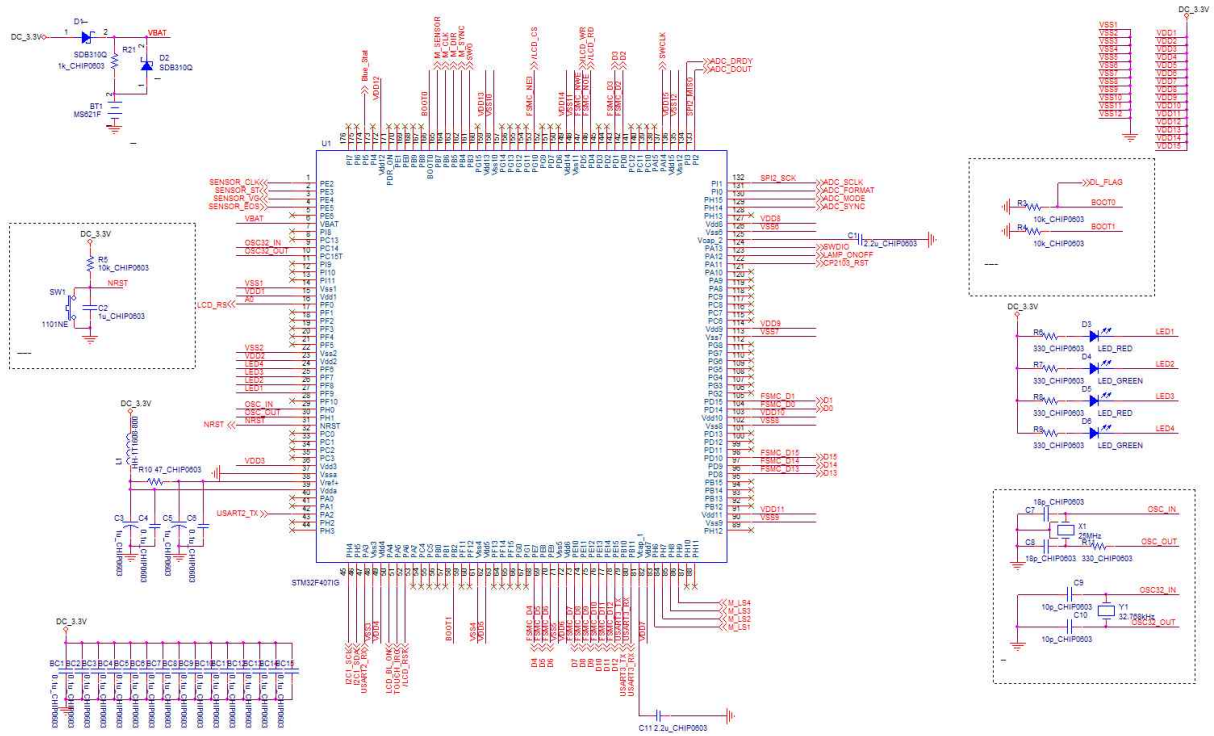
Camera Format	Monitor Size						
	9"	12"	14"	15"	17"	20"	27"
1/4"	57.2X	76.2X	79.0X	85.0X	96.0X	127X	171.5X
1/3"	31.8X	50.7X	59.0X	63.0X	72.0X	84.6X	114.1X
1/2"	28.6X	38.1X	45.0X	48.0X	54.0X	63.5X	85.7X
2/3"	20.8X	27.7X	32.0X	34.0X	39.0X	46.2X	62.3X

- 전체배율 = 광학배율 X 비디오 배율
- 그러므로 포커싱렌즈의 거리를 바꾸지 않고 CCD의 크기를 크게하면 높은 영위를 관촬할 수 있음



[CCD 배율 선정 기준표]

2) 형광 광학 시스템 제어 모듈 개발



[MCU]

Cortex-M4 계열의 고속의 MCU를 사용하여, 처리속도가 높아 실시간 처리가 가능하다. 상태를 표시를 위한 LED를 표시하여 디버깅에 사용하였으며, 내부 RTC를 사용할 수 있도록 외부에 32.768kHz 오실레이터를 장착하였다. 아래 그림에서 보는 바와 같이 설계하였다.

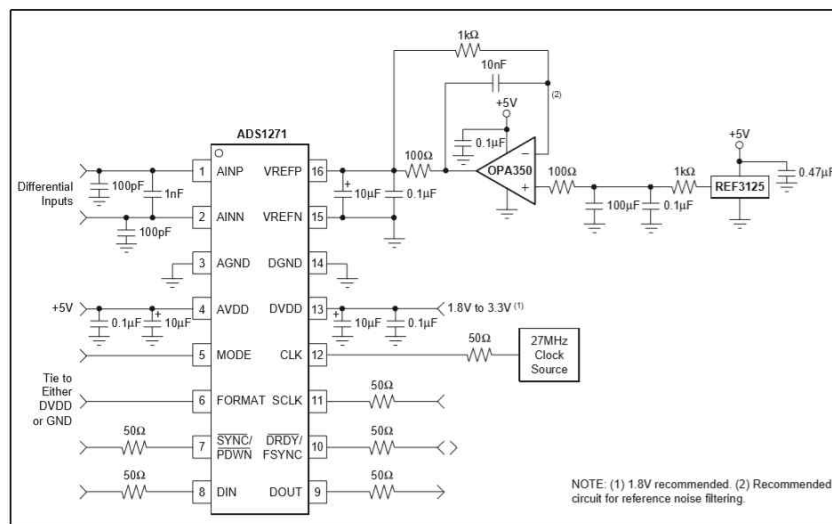
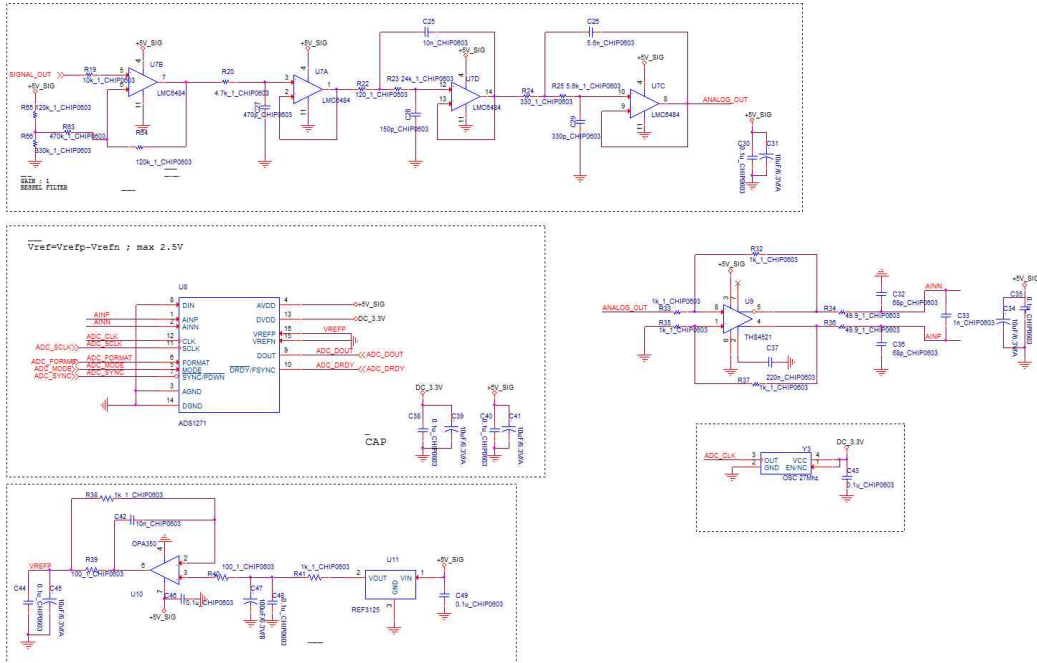
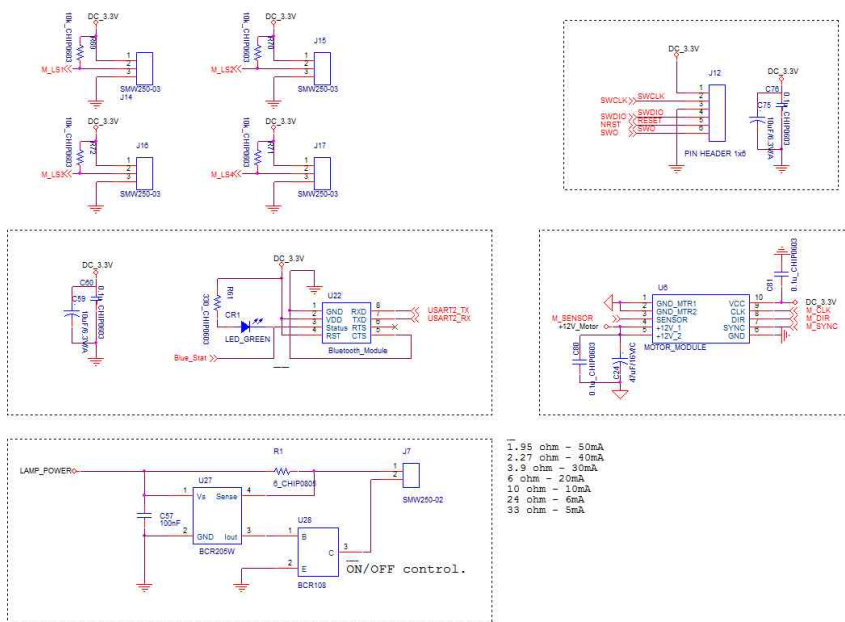


Figure 68. Basic Connection Drawing
[ADS1271 DATASHEET]

ADC는 24bit delta-sigma Analog to Digital Converter를 사용하여 분해능이 좋고 고속의 변환이 가능한 ADS1271 소자를 사용하였으며, 위 그림에 나와 있는 부분을 참고하여 아래 그림의 ADC를 설계하였고 외부에 Noise Filter 회로를 사용하여 S/N비를 개선하였다.



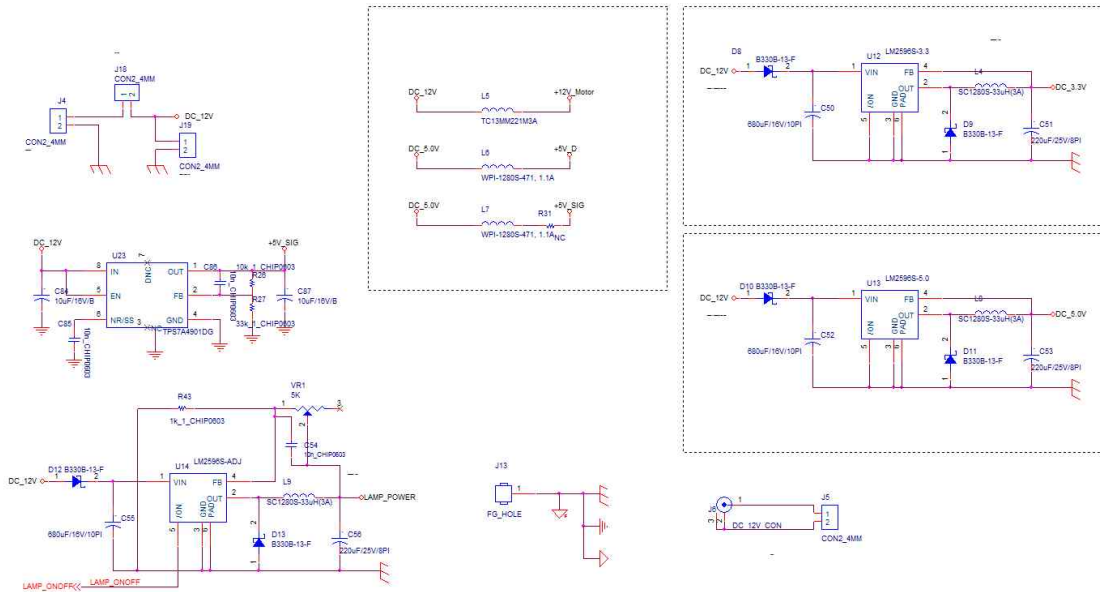
[ADC 회로]



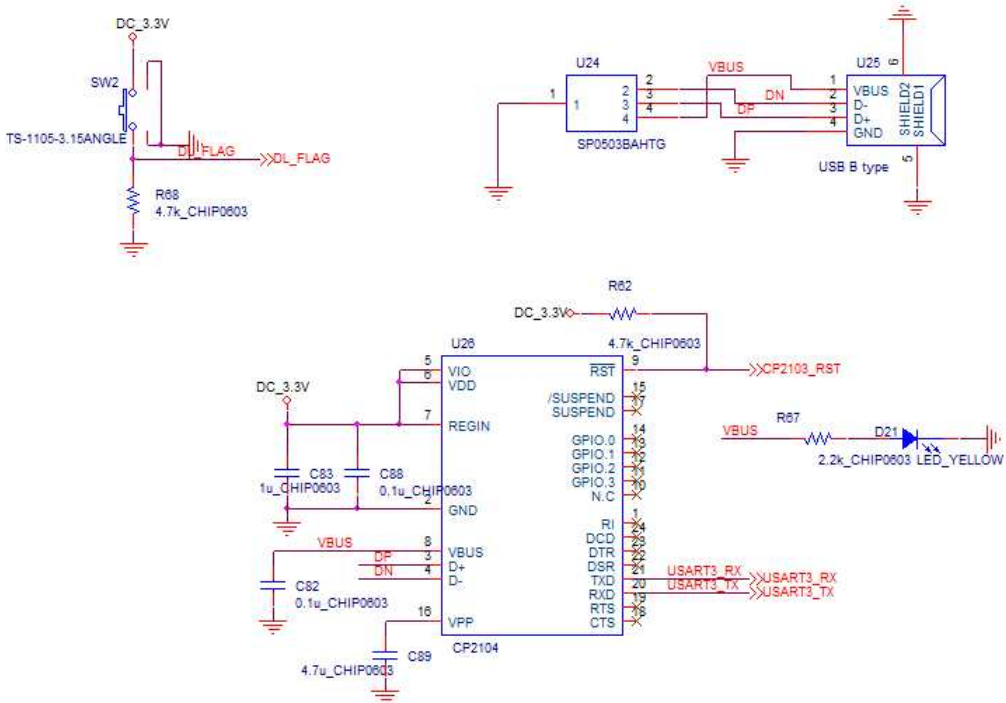
[기타 입출력 회로]

위 그림에서는 외부에서 입력받는 스위치 즉, 리미트 스위치, PhotoDiode SW의 인터페이스 회로와 Vision 사용되는 Lamp 전원 On/Off 회로, Step Motor를 구동하기 위한 인터페이스 회로를 설계하였다. 아래 그림에서는 필요한 전원을 공급하기 위한 회로로서 12V를 입력받

아 5V/3.3V를 공급하는 회로로 구성하였고 FG(외함접지)에 그라운드를 몰려 외부 전자파 노이즈 및 써지 노이즈를 저감하도록 설계하였다.



[POWER BOARD 회로]



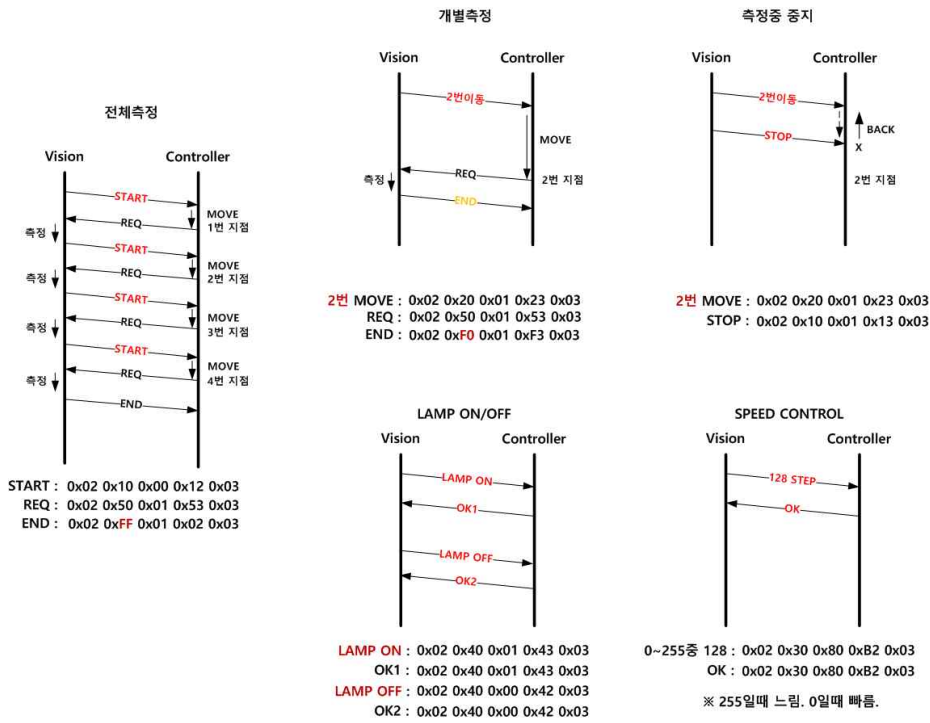
[USB 인터페이스 회로]

아래 그림에서는 MCU는 USB를 통해서 태블릿과 시리얼 통신이 가능하도록 설계하였으며, 시리얼 통신의 프로토콜은 다음과 같이 설계하였다.

- 통신방식 : 시리얼 통신, 9600 bps / 8/ 1/ N

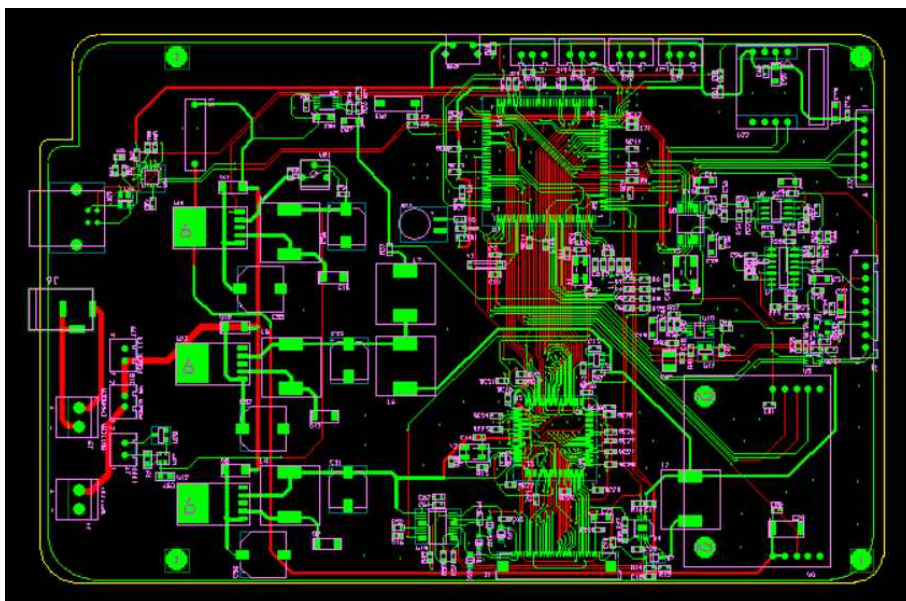
	내용	STX	CMD	DATA	CheckSum	ETX
동작관련	시작(전체측정)	0x02	0x10	0x00	0x12	0x03
	중지	0x02	0x10	0x01	0x13	0x03
	복귀	0x02	0x10	0x02	0x14	0x03
매뉴얼 동작관련	측정끝(auto)	0x02	0xFF	0x01	0x02	0x03
	측정끝(manual)	0x02	0xF0	0x01	0xF3	0x03
	개별	0x02	0x20	0x00~ 0x03	0x22~0x25	0x03
속도관련	Free Scale	0x02	0x30	0x00~0xff	STX~DATA SUM	0x03
Lamp관련	On/Off	0x02	0x40	0x00/0x01	0x43	0x03
검사요청	On/Off	0x02	0x50	0x01	0x53	0x03
에러관련	CMD ERR	0x02	0xF0	0x00	0xF2	0x03
	DATA OutOfRange ERR	0x02	0xF0	0x01	0xF3	0x03
	Check sum ERR	0x02	0xF0	0x02	0xF4	0x03a

즉, 동작시퀀스는 아래 그림과 같으며, 테블릿에 설치된 프로그램은 MCU와의 통신으로 모터의 동작 및 Vision에 사용되는 Lamp의 제어 등등의 명령어를 주고받아 동작하도록 구현하였다.



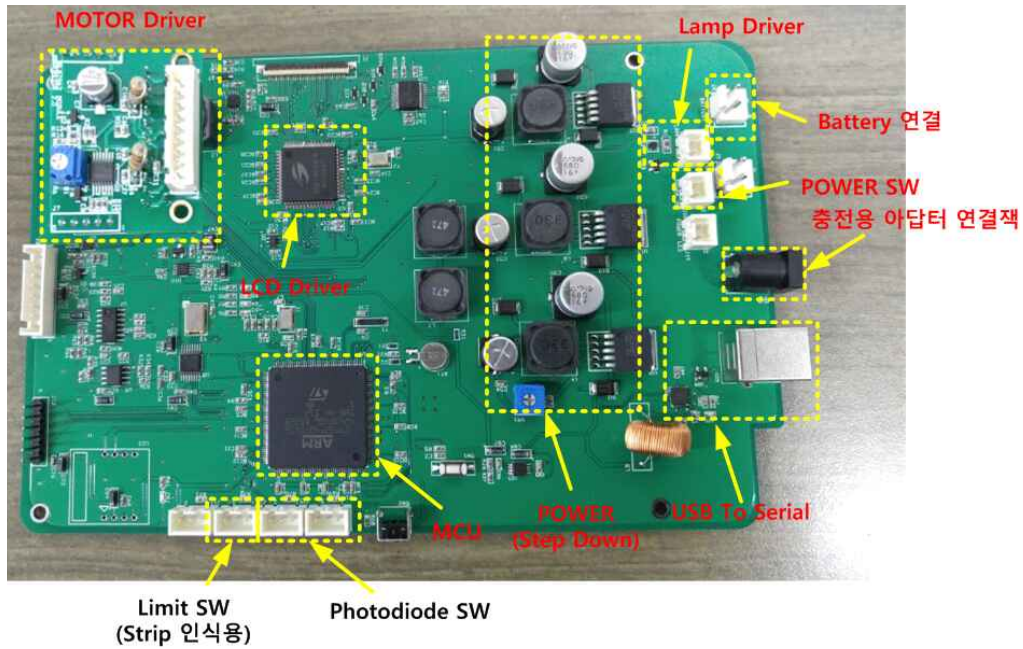
[동작시퀀스]

PCB Artwork 설계는 아래 그림과 같다.



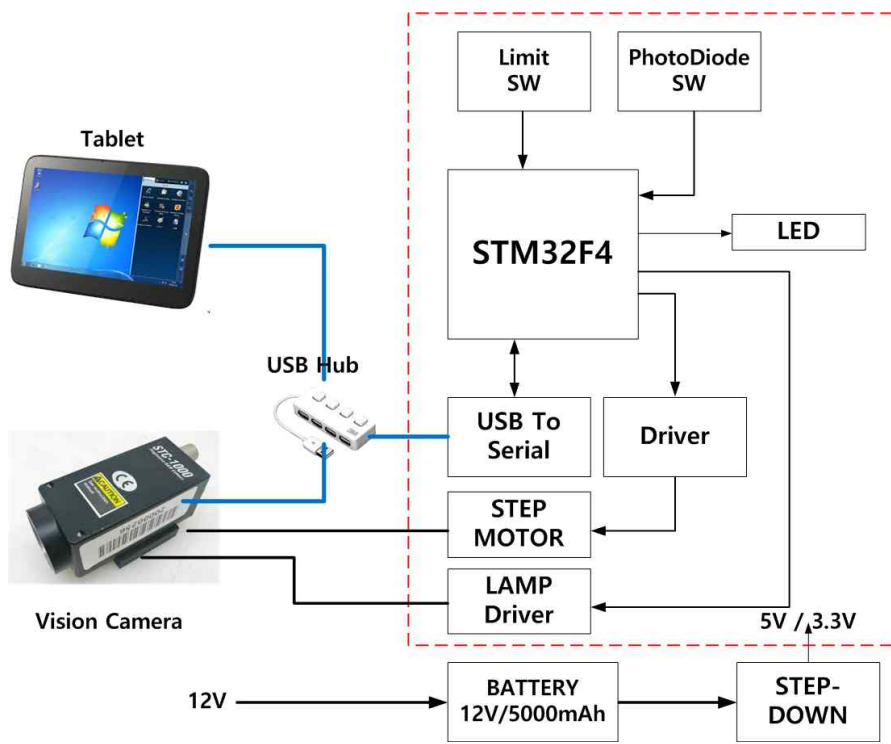
[PCB ARTWORK]

PCB 조립품은 아래 사진과 같다. PhotoDiode SW의 역할은 모터의 시작점과 끝점을 인식하는데 사용되었으며, Limit SW의 역할은 스트립이 없는 것을 인식하도록 하기 위함이다. 스트립이 없는 경우, 측정이 되지 않도록 하였으며, Tablet 비전프로그램에서 인식하여 표시하도록 하였다.



[PCB 사진]

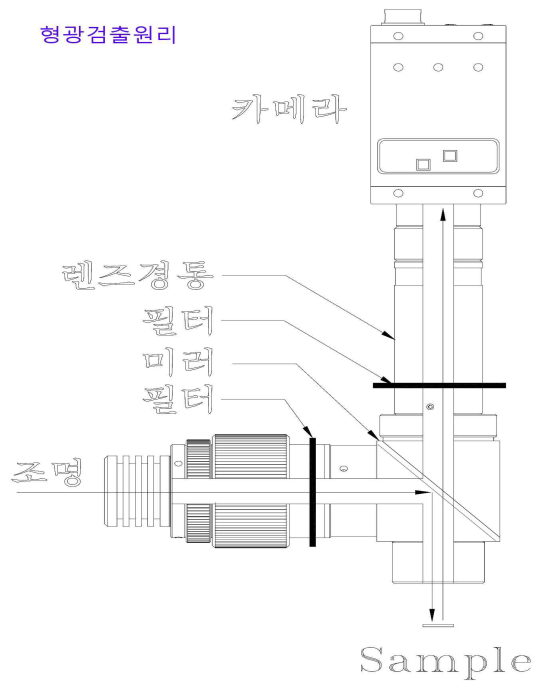
전체적인 Block Diagram은 아래 그림과 같다. 장치간의 통신은 USB Hub를 통하여 이루어지며, Tablet의 비전프로그램과 MCU간 통신은 시리얼 통신을 한다. 전원은 배터리의 전압으로 사용하며, 배터리의 충전은 12V 아답터의 입력을 받아 충전이 이루어진다. 12V의 전압을 입력받아 STEP-DOWN Switching Regulator 소자를 사용하여 회로에 필요한 5V, 3.3V를 만들어 공급한다. 또한 MCU는 Tablet의 비전프로그램의 명령을 받아 모터를 제어하거나 Lamp를 제어하도록 설계하였다. Step Motor는 Vision Camera를 움직여 스트립의 위치에 오도록 하는 역할을 하며, 비전프로그램의 명령에 따라 동작의 제어되도록 설계하였다. Lamp를 On/Off 하여 배터리의 전력소모를 줄였다.



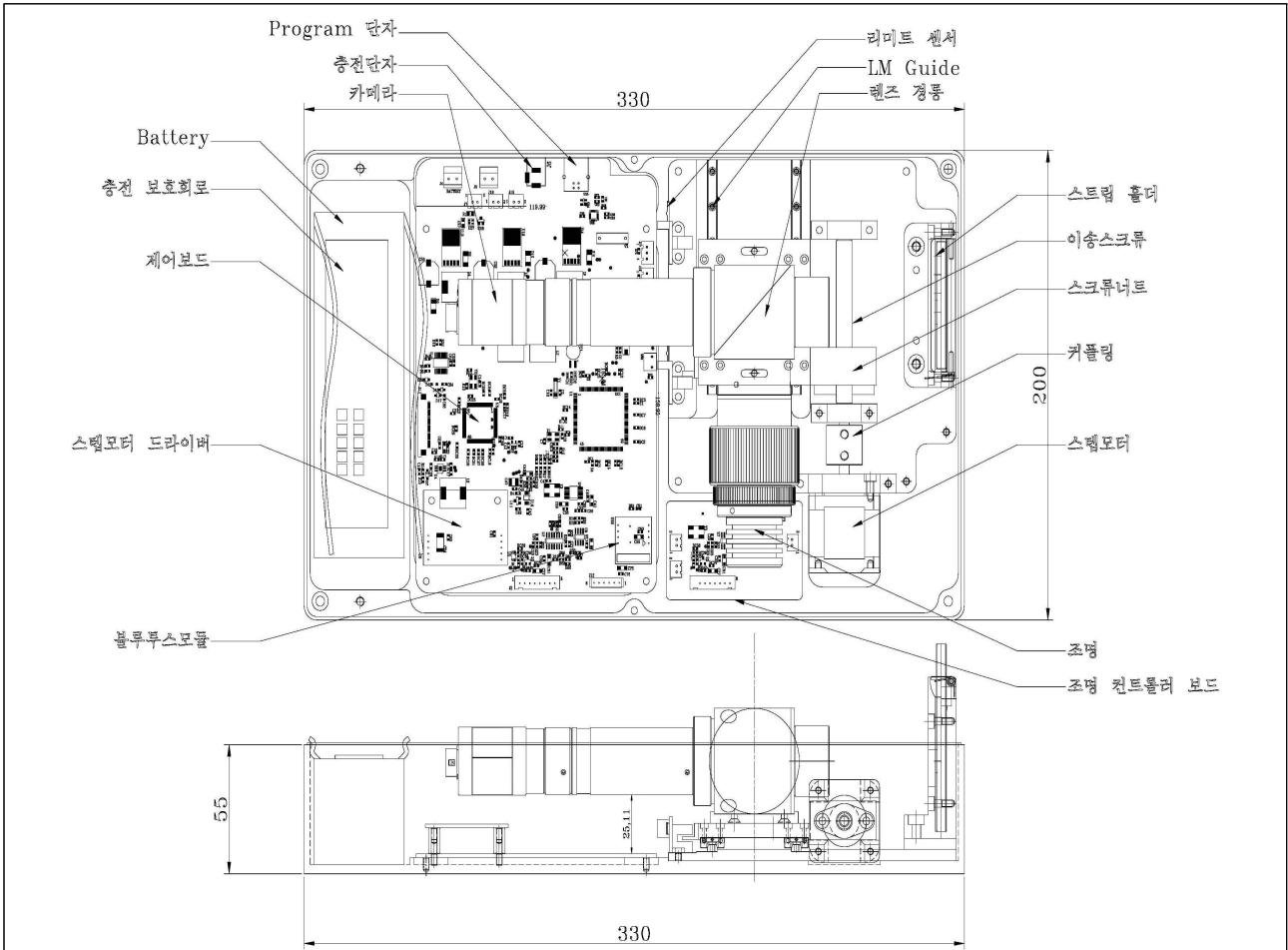
[BLOCK DIAGRAM]

4) 휴대용 분석 시스템 개발

형광검출원리



[분광 광학시스템 원리]



[분광 광학시스템 내부 구조 도면]

- 제품 양산 계획
 - 기존 돈육/돈지 속성 검사 시스템 대체
 - 생산형태는 완제품이며, 핵심 원재료는 검출기와 검출용 시약 및 스트립 KIT임
 - 검출기의 경우 기존 생산 시스템을 이용함으로 초기 별도의 생산시설 불필요
 - 새로운 개발 시약 및 스트립의 생산을 위해 (주)메텍스에서 공급하기로 함.
 - 생산될 시약 및 스트립 KIT 안정성 향상을 위한 품질 관리는 참여기업인 (주)메텍스에서 품질관리 협의 완료
 - 생산될 검출단말기는 (주)메텍스에서 공급받기로 함.

- 제품 판매 계획
 - 기존 속성 검사 스트립에 대한 대체 보완 판매
 - 새로운 시장 개척 및 영업 마케팅을 위해 참여기업인 (주)메텍스와 판매계약 추진중
 - 이후 다양한 무슬림 국가의 할랄랩과 할랄인증분석법에 적용하고 할랄식품 소비자의 요구사항을 반영하여 현장에 적용하도록 추진할 예정임.
 - 시장요구성 반영을 통한 매출 발생을 목표로 추진할 예정임.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

			코드번호	D-06	
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	
1차 년도 (2015)	[제1세부] 나노입자를 활용한 고감도 알코올 검출 기술 개발 및 화합물 기반 초고감도 센서 칩 최적화	● 알코올 검출용 화합물 합성 및 고감도 센서 기술 개발	100	● 알코올 검출능 터페닐롤 유도체와 고정화 센싱 기술 개발	
			100	● 금결합단백질-알코올산화효소 재조합단백질과 자성나노입자를 융합한 광학 센서 개발	
	[제1세부 위탁] 돼지 및 알코올 검출 간이 진단기의 활용을 위한 적용 가능 식품군 결정	● 간이 진단기를 이용한 의도적 오염 할랄식품 분석	● 연구대상 식품의 선정	100	● 국내·외 관련자료(관련기사, 문헌, 시장 조사 등)를 분석하여 연구 대상 식품을 선정
			● 간이 진단기 이용을 위한 식품 전처리 방법 확립	100	● 돈육 및 돈지 단백질 추출 방법 확립
			● ELISA 분석방법을 이용한 돈지 검출	100	● PCR 분석 방법을 이용한 돼지유래물질 검출 ● 소시지 제조 ● 시판제품 구입 ● Genomic DNA 추출 후 PCR 수행 ● 전기영동을 통하여 돼지유래물질 검출 한계 확인 ● ELISA 분석방법을 이용한 돈지 검출 ● 샘플 제조 ● 시판제품 구입 ● 항체를 이용한 ELISA 분석
				100	● 샘플 제조 ● 돈지와 우육을 혼합하여 샘플 제조 ● 돈지 함량 : 0%, 10%, 30%, 50%, 100% ● 항체를 이용한 ELISA 분석 ● 2B8-31 항체를 1,000배 희석 후 사용
	[제1세부 협동] 돈육·돈지 특이적 단일클론 항체 개발	● 면역 마우스의 비장세포와 암세포(SP2)를 이용하여 세포융합 및 클로닝 실시(생산용 하이브리도마 세포주 개발)	● 돈지육, 돈육으로부터 열에 안정한 crude protein 추출 조건 확립	100	● 돈지육, 돈육으로부터 열에 안정한 crude protein 추출조건을 확립함
			● 열 안정성 단백질을 면역원(항원)으로 하여 마우스에 면역 실시	100	● 열 안정성 단백질을 면역한 마우스에서 높은 항혈청 역가를 확인함
			● 면역 마우스의 비장세포와 암세포(SP2)를 이용하여 세포융합 및 클로닝 실시(생산용 하이브리도마 세포주 개발)	100	● 돈지육, 돈육에 특이적으로 반응하는 7종의 하이브리도마 세포주를 개발함
			● 개발된 하이브리도마 셀을	100	● 생산된 항체는 돈지육, 돈육에

		<p>이용하여 복수를 생산하고 정제하여 항체를 대량 생산 후 항체 특성 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> - ELISA법 - Western blot법 		특이한 것으로 확인됨
		<ul style="list-style-type: none"> ● 생산된 항체를 이용하여 돈 지육, 돈육에 대한 ELISA 분석법 확립 	100	<ul style="list-style-type: none"> ● 돈지육에 대한 ELISA 분석법 확립결과 돈지육의 혼합함량 1%까지 검출가능함을 확인 ● 돈육에 대한 ELISA 분석법 확 립결과 돈육의 혼합함량 1%까 지 검출가능함을 확인
		<ul style="list-style-type: none"> ● 휴대형 분광 광학 검출 장 치 설계 및 스트립 측정 모 듈 설계 	100	<ul style="list-style-type: none"> ● User Interface 구현을 위한 임베디드 시스템 설계 및 제작 ● 개발키트에 적합한 측정영역 설정 ● line intensity graph 전환을 위 한 peak setting 값 결정 ● 개발키트에 맞는 Device hold 개발
	[제2협동] 현장용 리더기의 최적화 검출을 위 한 휴대형 광학 검출 장치 고안	<ul style="list-style-type: none"> ● 나노입자 및 시약 제조 ● 일회용 스트립 제조 	100	<ul style="list-style-type: none"> ● Colloidal gold probe 제조 ● Gold-antibody conjugate 제조 ● NC 멤브레인 항체 coating 최 적화 ● Sample pad 전처리 조건 최적 화 ● 필드샘플을 통한 키트의 민감 도 평가 ● 필드샘플을 통한 키트의 특이 도 평가 ● 키트의 재현성 평가
2차 년도 (2016)	[제1세부] 휴대형 초고감도 알코올 검출용 화 합물 기반 초고감 도 센서 칩 최적 화	<ul style="list-style-type: none"> ● 센서 스트립 형태의 검출 기술 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> ● 터페닐롤 유도체와 고정화 센 싱기술 최적화 ● 나노파이버 기반 광학적 검출 기술 최적화
		<ul style="list-style-type: none"> ● 센서 스트립의 단말기와의 연동 형광검출 방법 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> ● 검출 스트립의 단말기와의 연 동 ● 검출 strip 특성 평가
		<ul style="list-style-type: none"> ● 연구대상 식품의 선정 	100	<ul style="list-style-type: none"> ● 국내·외 관련자료(관련기사, 문헌, 시장 조사 등)를 분석하여 연구 대상 식품을 선정
	[제1세부 위탁] 돼지 및 알코올 검출 간이 진단기 의 활용을 위한 식품 전처리 방법 확립 및 효율성 검증	<ul style="list-style-type: none"> ● 간이 진단기를 이용한 의도적 오염 할랄식품 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> ● PCR 분석 방법을 이용한 돼지유래물질 검출 ● 소시지 제조 ● 시판제품 구입 ● Genomic DNA 추출 후 PCR 수행 ● 전기영동을 통하여 돼지유래 물질 검출 한계 확인 ● ELISA 분석방법을 이용한 돈 지 검출 ● 샘플 제조

			<ul style="list-style-type: none"> 시판제품 구입 항체를 이용한 ELISA 분석
	<ul style="list-style-type: none"> PCR 방법과 간이 진단기를 활용한 방법에서의 검출력 비교 	100	<ul style="list-style-type: none"> PCR 방법과 간이 진단기에서의 검출력 비교를 통하여 적용 가능 식품군 선정
<p>[제1세부 협동] 할랄 식품 중 돈육 현장진단용 immuno-strip sensor 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> Tetrachloroauric acid에 대해 Sodium citrate 환원법으로 금나노입자 합성 조건 확립 	100	<ul style="list-style-type: none"> Sodium citrate의 첨가량에 따라 생성된 금나노입자의 합성조건 확립
	<ul style="list-style-type: none"> 금나노입자를 안정화시키는 항체량 확인 안정화량을 이용한 금나노입자-항체 결합체 합성 및 확인 	100	<ul style="list-style-type: none"> 금나노입자-항체 결합체를 이용한 스트립센서 제작 후 양성·음성 시료로 확인
	<ul style="list-style-type: none"> Sandwich assay를 기반한 Immuno-strip sensor 디자인 구성품 중 test line과 conjugate pad에 처리되는 시약 처리량, 버퍼 등의 최적화 조건 확립 	100	<ul style="list-style-type: none"> 2B8-31 항체-금나노입자를 detector 시약, 그 외 개발된 항체를 capture 시약으로 사용하여 조건 확립 Immuno-strip sensor에 적용하는 버퍼를 PBS로 선정
	<ul style="list-style-type: none"> 민감도와 교차반응성 확인 임의로 돈육 및 돈지육 혼합식품을 이용한 immuno-strip sensor 평가 	100	<ul style="list-style-type: none"> 개발된 strip sensor에 대한 돈육 및 돈지육 검출한계 확인(돈지육 5%, 돈육 10%) 다른 축산물을 비롯한 식품부재료에 대한 교차반응성 확인 임의로 돈육 및 돈지육을 혼합하여 제조한 식품을 이용한 적용성 평가 시판 발열팩을 이용한 현장 전처리법 개발
<p>[제2협동] 돈육/돈지 및 알코올 검출을 위한 휴대형 광학 검출 장치 시제품키트의 최적화 및 성능평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> 고감도 광학 센서 시스템 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> 스트립 이미징 광학계 설계 및 제작 스트립 이미징 광학계 검증 백그라운드 보정용 알고리즘 제안 및 검증
	<ul style="list-style-type: none"> 검출용 광학 신호 변환 처리기술 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> 분광 광학시스템 설계 및 제작/검증 스트립 측정 모듈 설계/제작/검증 무선 통신(B/T) 환경 구축 임베디드 시스템 설계 및 제작
	<ul style="list-style-type: none"> 휴대형 광학 검출 장치 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> 분광 광학 및 형광시스템의 분광 측정을 위한 CCD 구동 모듈 설계 및 제작 CCD 측정 알고리즘 개발 및 구현 PD 측정 모듈 설계 및 제작 이미지 센서 구현

제 5 장 연구결과의 활용계획

코드번호 D-07

제 1 절 연구성과

1. 연구성과

가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

(1) 연구성과

구분	특허		학술대회	인력양성	기술이전	논문		기타	
	출원	등록	발표			SCI	비SCI		
1차 년도	목표	1		4	2		3	1	
	달성			8	4		1	1	
2차 년도	목표	1	1	4	3	2	3	1	
	달성	2		2	5	1	3	1	
계	목표	2	1	8	5	2	6	2	
	달성	2		10	9	1	4	2	

(2) 연구성과 활용 실적

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2	2	-	-	1
	달성	1	4	-	2	1

나. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해년도 징수액	향후 징수액	합계
100,000,000 원	100,000,000 원	0	100,000,000 원

다. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기대출액	당해년도 대출액	대출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			
분광광학용 돈육/돈지 검출시스템	분광검출시스 템 시제품	(주)메텍 스	김경동	60	검출장비			
분광광학용 돈육/돈지 검출 시약	검출 센서 스트립	(주)메텍스	김경동	60	소모성 스트립			
형광광학용 알코올 검출 시스템	형광검출시스 템 시제품	(주)딕스 젠	이진우	15	검출장비			
형광광학용 알코올 검출 스트립	검출 센서 스트립	(주)딕스젠	이진우	15	소모성 스트립			

라. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
9		9			2	7	9		

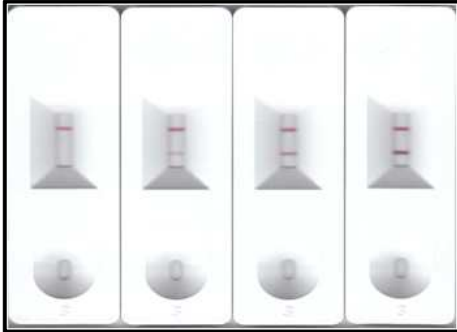
2. 관련사진

▣ 돈육/돈지육 검출 광학단말기 (1건)

- SMART Reader : 스트립 리더를 장착한 돈육/돈지육 검출 광학단말 시스템



■ 돈육/돈지육 검출용 일회용 스트립 (1건)



■ 알코올 검출 형광단말기 (1건)

- EPITHOD616™ : 스트립 리더를 장착한 알코올 검출 형광단말기 시스템



■ 알코올 검출용 일회용 스트립 (1건 - 69×28×5 mm³)



제 2 절 연구성과 활용계획

1. 구체적 성과물의 명칭

- 돈육/돈지육 검출 광학단말 시스템
- 돈육/돈지육 검출용 일회용 스트립
- 알코올 검출 형광단말 시스템
- 알코올 검출용 일회용 스트립

2. 성능

- 돈육/돈지육 검출 광학단말기는 측정시 총 검출시간 10분 소요
- 알코올 검출 형광단말기는 측정시 약 15초 소요

3. 용도

- 할랄 제품 내 돈육/돈지육 및 알코올 검출용으로 활용될 예정임.

4. 수요처

- 참여기업이 주관기관과 협동기관으로부터 기술이전 받은 기술에 대해 단말기를 양산하고 돈육/돈지 및 유제품 내 알코올 검출을 위한 부품 및 시약 공급업체와 공급계약을 체결하고, 판매업체와 판매계약을 체결하고 중임.

제 3 절 기대효과

1. 학술적 의의

- 할랄 인증을 통하여 자연친화적이고 유기적인 방식에 의한 할랄식품 확보를 위한 식품군 생산기술로 활용할 수 있음.
- 할랄 인증 기관, 할랄푸드 및 제품을 생산, 인증, 판매, 유통관리 서비스 제공자들이 바로 손쉽게 활용할 수 있음.
- 돼지고기 지방 및 알코올 검출을 위한 나노바이오소재의 휴대형 검출기 제조 기술은 국제특허 출원을 통한 원천기술 확보와 산업화에 활용할 수 있음.
- 이러한 연구를 기초로 해서 국내에서 식품 및 축산제품 중의 미표기·의도적 혼입 여부를 확인할 수 있는 축육 중 구분 현장진단 기술의 개발에도 활용이 가능

2. 기술적 측면

- 휴대형 돼지고기 지방 및 알코올 검출을 위한 나노융합원천기술을 확보할 수 있고, 이를 이용하여 기술발전 단계상 아직 태동기에 머무르고 있는 바이오센서 시장에서의 국제경쟁력 향상에 이바지할 수 있을 것으로 생각됨.
- 동물성 지질 및 알코올에 대한 현장 분석용 바이오센서가 개발될 경우 국제적으로도 시장에서 충분한 경쟁력을 가질 수 있을 것으로 판단됨.

3. 경제적 측면

- 국내 거주 및 한국 방문 무슬림 관광객을 위한 품질이 보장된 할랄푸드 및 화장품과 같은 제품을 등을 통한 할랄 시장의 성장 및 확대를 기대할 수 있음.
- 돈육을 포함한 돈지육의 현장·신속 분석기술의 개발을 선점하여 점점 확대하고 있는 할랄 식품 중 미표기·의도적 돈지육의 혼입 관리를 위한 도구로 활용한다면 국내뿐만 아니라 이슬람권 국가들에 막대한 수출 물량을 확보할 수 있을 것으로 예상됨.
- 할랄 인증된 수입품들을 국내 생산 할랄 제품으로 대체할 경우 발생할 경제적 효과가 기대됨.

4. 산업적 측면

- 기존의 방식 대체 및 해외 수출가능성이 높다.
- 신속 정확한 현장 분석을 통해 직접 할랄제품을 확인할 수 있게 됨으로써 무슬림에게 적합한 식품을 제공할 것으로 기대할 수 있음.
- 이에 국내외 특허 출원과 등록을 통해 새로운 산업화 기반을 조성한다.

5. 신산업 창출

- 수출 및 관광객, 국내 거주 무슬림에 대한 식품시장 창출
- 할랄 헤어케어 및 화장품 등 다양한 산업에도 적용할 수 있음.
- 무슬림 문화에서 사용되는 의약품, 건강기능제품 등으로의 확장성 제고로 신시장 창출

6. 무슬림 문화 및 청정한 먹거리에 대한 인식 전환

- 무슬림 국가로의 식품 수출 증진을 위한 인식의 변화
- 종교적 문화 및 먹거리에 대한 인식 전환
- 새로운 일자리 창출

제 4 절 성과 활용성 제고를 위한 의견

- 연구성과 활용성 제고를 위한 업무 주체별로 협의하여 추진할 계획임.
- 주관연구기관 및 협동기관 - 원천기술제공
- 실시기업 - 기술이전 및 상용화 추진 (부품 및 시약 공급계약, 판매계약 체결)
- 전문기관 - 할랄 및 하람 재료 사용에 대한 전문가 초청 및 자문기관 운영

제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

가. 생산 및 시장현황

1) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 외국의 경우 Neogen, Tanaka, Xema사 등에서 돈육에 대한 항체 및 효소면 (2011년 1월 6일 노컷뉴스)과 같은 관련 연구 개발이 활발히 진행 중에 있으며, 이를 활용한 immuno-strip sensor의 상품을 개발 판매하고 있음.
- 무슬림 인구의 지속적인 증가와 높은 경제성장률(무슬림지역 5년간 연평균 GDP 증가율 6.3%)로 인하여 세계 할랄식품 시장규모는 2013년 기준으로 1,421조원에 달하고 있으며 2019년에는 2,720조원에 이를 것으로 전망하고 있음
- 현재 블루오션으로 여겨지는 이슬람 국가의 할랄 시장에 접근성이 우수할 것으로 판단되며, 러시아의 Xema사도 이슬람 국가에 눈을 돌리고 있음.
- 또한 중국과 개발도상국 국가에서의 식가공 제품에 대해서도 돈(지)육 비표기 혼입 여부 진단 키트 시장에도 접근성이 밝다고 판단됨.
- 위에서 언급한 3곳의 외국 기업보다 후발연구를 시작하지만, 전 세계적인 육류 검출 진단 키트 시장성은 매우 크기 때문에 세계 시장 접근성도 높음.

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향

○ 외국에서 개발되고 있는 돈육검출키트의 특징은 아래와 같음.

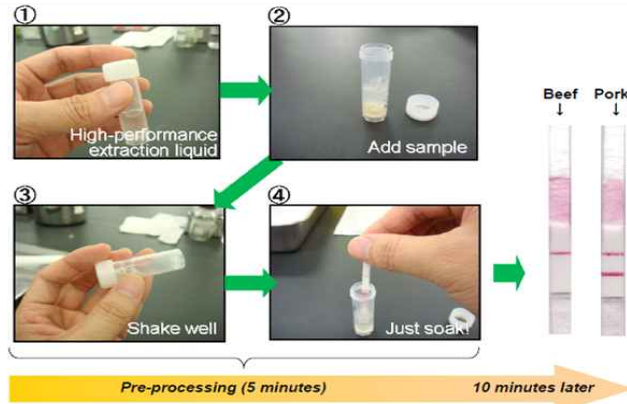
- Neogen 사의 ReVeal Ruminant 제품
 - * 제품 특징(Specification)
 - Sensitivity(감도) : 1% in feed and feed Supplements
 - Test time(시험 시간) : Extraction boiling step: 10min
Test strip development: 10min
 - Storage Temperature(저장온도) : Room Temperature (18-30℃)
 - Tests per kit(한 키트당 스트립 개수) : 25개
 - Approvals(승인 규정) : AOAC-RI010405



[ReVeal Ruminant(Neogen)의 제품 및 스트립]

- Tanaka 사의 Easy to use Pork Detection Kit 제품
 - * 제품 특징(Specification)
 - Test time(시험 시간) : 15분
 - Detection limit(검출 한도) : 0.1%(meat), 0.005%(Raw meat)
 - 이 제품은 이 분야의 전문가인 Y-H. Peggy Hsieh(Florida state university)와 공동 연

구 개발 중임.



[Easy to use Pork Detection Kit(Tanaka) 제품의 모식도]

- Xema 사의 Pork Test Kit 제품

* 제품 특징(Specification)

- Test time(시험 시간) : 10분
- Storage(저장 온도) : 2-25℃
- Strips per kit(한 키트당 스트립 개수) : 5개
- 본 제품도 위의 상용화된 두 제품과 거의 비슷한 사양임.



INTERPRETATION OF THE RESULTS

Test is considered **POSITIVE** if TWO colored lines appear in the test zone.



Test is considered **NEGATIVE** if only ONE colored line is clearly visible.



If **NO** colored line is formed, the test is **INVALID**. Try to repeat it with another test strip, check the correct



specimen handling and test procedure, expiry date and storage conditions.

[Pork Test Kit(Xema) 제품 및 모식도]

제 7 장 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
<input type="radio"/> 해당사항 없음	

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호 D-11

가. 연구실 안전조치 이행계획

○ 기술적 위험요소 분석

(「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 및 「산업안전보건법」에 따른 연구실 안전조치 이행계획(해당 연구실안전점검 및 정밀안전진단실시, 참여연구원의 교육훈련 및 건강검진 실시, 보험가입 등) 및 기타 당해 연구개발사업 수행 시 필요한 연구실안전 확보 계획 등을 서술)

○ 취급물질의 관리 및 취급방법에 대한 기술적 숙련도에 따른 교육과 안전관리 지침에 따른 위험요소의 극복

나. 안전관리대책

○ 연구실 안전관리 개요

- 교내 연구실 안전사고를 예방하고 연구실의 안전성을 확보하고자 연구실 안전관리규정에 의거 연구실 정기점검 및 정밀안전진단실시, 연구활동 종사자의 교육 및 검진을 통한 안전성 확보, 사고 발생 시 초도대응을 통한 인적, 물적 피해를 최소화 하고자 함.

○ 연구실 안전관리

- 위험도에 따른 연구실 등급 관리 : A/B/C 등급 분류
- 연구실 정기점검 및 정밀 안전 진단



다. 연구실 안전교육

구분	교육 대상	시간	교육 내용
정기	(상시)연구활동종사자	6시간이상 /학기	<ul style="list-style-type: none"> • 연구실 안전환경 조성 법령에 관한 사항 • 연구실내 유해·위험요인에 관한 사항 • 안전한 연구개발 활동에 관한 사항 • 물질보건 안전자료에 관한 사항 • 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항
특별	중대사고 및 필요시 (상시) 연구활동종사자	2시간이상	<ul style="list-style-type: none"> • 연구실내 유해·위험 요인에 관한 사항 • 안전한 연구개발 활동에 관한 사항 • 물질안전보건자료에 관한 사항 • 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항

라. 연구실 건강검진

- 검진대상 별 특수 검진 실시(위험등급 A, B 등급)

마. 연구실 안전보험

- 2017년 연구실 안전조치 이행계획
 - 연구실 위험등급별 조정 및 조정에 따른 환경 개선 조치
 - 연구실 환경개선공사 실시
 - 연구실 정밀안전진단 실시
 - 계열별 안전용품 수요조사를 실시하여 위험요소에 따른 안전용품 지급
 - 안전교육 우수학과 안전용품 포상
 - 연구실 실내 공기의 질 측정 및 안전조치 시행

나. LMO 연구시설 및 수입신고 현황

시설 번호	제LML 16-631호	안전 관리 등급	1등급
수입 신고(최근 1년간)		대장균(<i>Escherichia coli</i>)	

제 10 장 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	Thermal stable soluble proteins in pork fat and meat, and their antigenicity	경상대 대학교	교신저 자	Journal of Food Hygiene and Safety		2016.10.14	중복사사	비SCI
2	논문	Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies highly specific to pork fat protein	경상대 대학교	교신저 자	Food Control	3.496	2017.09	단독사사	SCI
3	논문	Development of aflatoxin B1 aptasensor based on wide-range fluorescence detection using graphene oxide quencher	중앙대 대학교	교신저 자	Colloids and Surface B	3.887	2017.06.01	단독사사	SCI
4	논문	Portable agrichemical detection system for enhancing the safety of agricultural products using aggregation of gold nanoparticle	중앙대 대학교	교신저 자	ACS Omega		2017.03.16	단독사사	SCI
5	논문	Hexagonal tungsten oxide nanoflowers as enzymatic mimics and electrocatalysts	중앙대 대학교	교신저 자	Scientific Reports	4.259	2016.11.17	중복사사	SCI
6	논문	Identification of Pork Adulteration in Processed Meat Products Using the Developed Mitochondrial	숙명여 자대학 교	교신저 자	Korean Journal for Food Science of Animal Resources	0.484	2017.06	단독사사	SCI

		DNA-Based Primers							
7	특허	식품 내 돈지 분 석용 마커 및 의 용도	경상대 학교 산학협 력단	출원인	대한민국		2016.12.02		
8	특허	알코올 검출용 성물 및 이를 함하는 키트	중앙대 학교 산학협 력단	출원인	대한민국		2017.08.30		

제 11 장 기타사항

코드번호	D-13
○ 해당사항 없음	

제 12 장 참고문헌

코드번호	D-14
1.	Yeong Siang Chiam, Kok Sing Lim, Sulaiman Wadi Harun, Seng Neon Gan, Sook Wai Phang, Conducting polymer coated optical microfiber sensor for alcohol detection, <i>Sensors and Actuators A: Physical</i> , Volume 205, Pages 58-62, 2014.
2.	Roy Bogseth, Eric Edgcomb, Christopher M Jones, Edward K. Chess, Peifeng Hu, Acetonitrile Adduct Formation as a Sensitive Means for Simple Alcohol Detection by LC-MS, <i>Journal of The American Society for Mass Spectrometry</i> , Volume 25, Issue 11, pp 1987-1990, 2014.
3.	Xuezhu Xu, Jian Zhou, Yangyang Xin, Gilles Lubineau, Qian Ma & Long Jiang, Alcohol Recognition by Flexible, Transparent and Highly Sensitive Graphene-Based Thin-Film Sensors, <i>Scientific Reports</i> 7, Article number: 4317, 2017.
4.	Jayoung Kim, Itthipon Jeerapan, Somayeh Imani, Thomas N. Cho, Amay Bandodkar, Stefano Cinti, Patrick P. Mercier, and Joseph Wang, Noninvasive Alcohol Monitoring Using a Wearable Tattoo-Based Iontophoretic-Biosensing System, <i>ACS Sensors</i> , 1 (8), pp 1011-1019, 2016.
5.	Guangyao Ran, Linzhu Ren, Xiaolei Han, Xingxing Liu, Zhuang Li. Daxin Pang, Hongsheng Ouyang, Xiaochun Tang, Development of a Rapid Method for the Visible Detection of Pork DNA in Halal Products by Loop-Mediated Isothermal Amplification, <i>Food Analytical Methods</i> , Volume 9, Issue 3, pp 565-570, 2016.
6.	Jafar Nikzad, Soraya Shahhosseini, Maryam Tabarzad, Nastaran Nafissi-Varcheh and Maryam Torshabi, Simultaneous detection of bovine and porcine DNA in pharmaceutical gelatin capsules by duplex PCR assay for Halal authentication, <i>DARU Journal of Pharmaceutical Sciences</i> , 25, 3, 2017.
7.	Joana S. Amaral, Graciete Santos, M. Beatriz P.P.Oliveira, Isabel Mafra, Quantitative detection of pork meat by EvaGreen real-time PCR to assess the authenticity of processed meat products, <i>Food Control</i> , Volume 72, Part A, February, Pages 53-61, 2017.
8.	Hassan A.Al-Kahtani, Elsayed A.Ismaila, Mohammed Asif Ahmed, Pork detection in binary meat mixtures and some commercial food products using conventional and real-time PCR techniques, <i>Food Chemistry</i> , Volume 219, Pages 54-60, 2017.
9.	Aly Farag El Sheikha, Nur Fadhilah Khairil Mokhtar, Ceesay Amie, Dhilia Udie Lamasudin, Nurulfiza Mat Isa & Shuhaimi Mustafa, Authentication technologies using DNA-based approaches for meats and halal meats determination, <i>Food Biotechnology</i> Vol. 31 , Issue 4, 2017.
10.	Wakana, H., Yamada, M., and Sakairi, M., "Development of Breath-Alcohol-Detection System," SAE Technical Paper 2016-01-1498, 2016.

11. Zhen Wen, Jun Chen, Min-Hsin Yeh, Hengyu Guo, Zhaoling Li, Xing Fan, Tiejun Zhang, Liping Zhu, Zhong Lin Wang, Blow-driven triboelectric nanogenerator as an active alcohol breath analyzer, *Nano Energy*, Volume 16, Pages 38-46, 2015.
12. M.Gamella, S.Campuzano, J.Manso, G. González de Rivera F. López-Colino, A.J.Reviejo, J.M.Pingarrón, A novel non-invasive electrochemical biosensing device for in situ determination of the alcohol content in blood by monitoring ethanol in sweat, *Analytica Chimica Acta*, Volume 806, Pages 1-7, 2014.
13. Phurpa Dema Thungon, Ankana Kakoti, Lightson Ngashangva, Pranab Goswami, Advances in developing rapid, reliable and portable detection systems for alcohol, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 97, Pages 83-99, 2017.
14. Stefano Cinti, Mattia Basso, Danila Moscone, Fabiana Arduini, A paper-based nanomodified electrochemical biosensor for ethanol detection in beers, *Analytica Chimica Acta*, Volume 960, Pages 123-130, 2017.
15. Siti Aminah Ahmed, Lee Li Pin, Carsten A. Raabe, Timofey S. Rozhdestvensky, Tang Thean Hock, A Combined Rapid DNA Extraction and Multiplex PCR for the Detection of Porcine DNA in Raw and Processed Food, *Contemporary Issues and Development in the Global Halal Industry* pp 201-208, 2016.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 할랄 제품의 돈육/돈지 및 알코올 검출을 위한 신속 진단 기법 개발				
	(영문) Development of diagnostic system for rapid authenticity determination of pork and alcohol in halal foods				
주관연구기관	중앙대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 중앙대학교	
참여기업	(주)메텍스			(성명) 박 태 정	
총연구개발비 (800,000 천원)	계	800,000 천원	총 연구 기간	2015.08.31. ~ 2017.08.30..(2년)	
	정부출연 연구개발비	600,000 천원	총 참 연 구 원 수	총 인원	37 명
	기업부담금	200,000 천원		내부인원	37 명
	연구기관부담 금			외부인원	0 명

1. 연구개발 목표 및 성과

- 할랄 식품에서 돈육/돈지육 및 알코올 성분 검출용 바이오센서 개발 및 성능 향상 연구
- 돈육/돈지육 및 알코올 검출용 바이ורי셉터 및 나노입자를 이용한 성능향상 융합기술 연구
- 돈육/돈지육 및 알코올 검출을 위한 현장 및 다중 분석용 고감도 정성, 정량 분석 광학 나노 바이오센서 칩(스트립) 개발
- 돈육/돈지육 및 알코올 검출을 위한 고감도 나노바이오센서 개발
- 돈육/돈지육 및 알코올 검출을 위한 휴대용 장치 및 제품화 기술 개발

2. 연구내용 및 결과

1) 제 1 세부과제 (주관) : 알코올 검출 나노바이오센서 원천기술 개발.

고감도 신호검출 원천 기술 개발의 일환으로서 알코올과 반응시 형광을 나타내는 프로브 합성하였고, 염기의 농도에 따라 나타나는 양상을 파악 후 에탄올의 농도에 따른 검출양상을 확인하였다. 프로브를 고정화시키기 위해 프로브가 포함된 나노파이버를 합성한 뒤

염기 존재하에 알코올과 반응하는지 확인하였으며, 요구르트 및 우유 등의 유제품에 알코올을 첨가한 뒤 실제로 형광이 나타나는지 확인하였다.

2) 제 1 세부 위탁과제 : 할랄 진단기 효율성 분석.

연구대상 식품군을 선정하고, 간이 진단기 이용을 위한 식품 전처리 방법 확립하였다. 간이 진단기를 이용한 의도적 오염 할랄식품을 분석하였는데, ELISA 분석방법을 이용하여 돈지를 검출하였고 PCR 방법과 간이 진단기를 활용한 방법에서의 검출력을 비교하였다.

3) 제 1 협동과제 : 돈육 및 돈지육 검출 나노바이오센서 원천기술 개발.

돈지육 및 돈육으로부터 열에 안정한 단백질 추출하고 이를 항원으로 하여 항체를 생산하였다. 면역한 마우스의 비장세포를 암세포와 세포융합하여 특이 항체생산 하이브리도마 세포주를 개발하였으며, 마우스를 이용하여 항체를 대량생산한 후 항체 특성을 확인하였다. 생산된 항체를 이용하여 ELISA 분석법 및 스트립 분석법을 확립하였다.

4) 제 2 협동과제 : 휴대용 검출장치 제조 및 제품화.

알코올, 돈육 및 돈지 검출을 위한 휴대형 광학 검출 장치를 고안하였다. CCD 모듈 설계 및 제작과 알고리즘 개발을 하고 PD 측정모듈을 설계하였다. 따라서 휴대형 분광 광학 검출 장치 알고리즘을 구현하여 광학시스템을 제작하였다. 제작한 휴대형 광학 검출 장치에 대한 검증을 하고, User interface 구현을 위한 임베디드 시스템을 설계 및 제작하였다.

3. 연구성과 활용실적 및 계획

○ 연구성과

-
- 염기 존재 하에 알콜과 반응하여 형광을 나타내는 프로브를 합성했고, 이를 파이버 형태로 만들었으며 실제 유제품에 알코올을 spiking한 시료의 경우 역시 형광을 나타낸다는 것을 입증
- 돈지육 및 돈육으로부터 열에 안정한 crude protein 추출하여 이를 면역원으로 하여 돈지육과 돈육에 특이적으로 반응하는 항체를 성공적으로 개발
- 개발키트에 적합한 정량 및 정성결과를 판독할 수 있는 리더기 시제품 개발
 - 상용화된 리더기에 개발키트를 적용할 수 있도록 결과판독 조건 최적화
 - 키트 디바이스에 맞는 디바이스 홀더 제작
 - 키트 디바이스 제작

○ 성과 활용계획

• 기술 응용분야

- 할랄 인증을 통하여 자연친화적이고 유기적인 방식에 의한 할랄 식품 확보를 위한 식품군 생산기술로 활용할 수 있음.
- 할랄 헤어케어 및 화장품 등 다양한 산업에도 적용할 수 있음.

• 기술의 활용

- 할랄 인증 기관, 할랄푸드 및 제품을 생산, 인증, 판매, 유통관리 서비스 제공자들이 바로 손쉽게 활용할 수 있음.
- 돼지고기 지방 및 알코올 검출을 위한 나노바이오소재의 휴대형 검출기 제조 기술은 국제특허 출원을 통한 원천기술 확보와 산업화에 활용할 수 있음.
- 이러한 연구를 기초로 해서 국내에서 식품 및 축산제품 중의 미표기·의도적 혼입 여부를 확인할 수 있는 축육 중 구분 현장진단 기술의 개발에도 활용이 가능

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

			코드번호	D-15	
			과제번호	11-1543000-001953-01	
사업구분	수출전략기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	수출전략기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	할랄 제품의 돈육/돈지 및 알코올 검출을 위한 신속진단 기법 개발			과제유형	개발
연구기관	중앙대학교, 경상대학교, 숙명여자대학교			연구책임자	박태정
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2015.08.31 ~2016.08.30	300,000	100,000	400,000
	2차년도	2016.08.31 ~2017.08.30	300,000	100,000	400,000
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계	2015.08.31 ~2017.08.30	600,000	200,000	800,000
참여기업	(주)메텍스				
상대국		상대국연구기관			


2. 평가일 : 2017.12.12

3. 평가자(연구책임자) : 박태정

소속	직위	성명
중앙대학교	부교수	박태정

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 박태정

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

확약	
----	---

2. 연구성과

가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

(1) 연구성과

구분		특허		학술대회	인력양성	기술이전	논문		기타
		출원	등록	발표			SCI	비SCI	
1차 년도	목표	1		4	2		3	1	
	달성	0		8	5		1	1	
2차 년도	목표	1	1	4	3	2	3	1	
	달성	2		2	4	1	3	1	
계	목표	2	1	8	5	2	6	2	
	달성	2	0	10	9	1	4	2	

(2) 연구성과 활용

단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2	2	-	-	1	
	달성	1	4	-	2	1	

나. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2016	Thermal stable soluble proteins in pork fat and meat, and their antigenicity	김정숙	심원보	이정은	Journal of Food Hygiene and Safety	31(6)	국내	비SCI
2017	Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies highly specific to pork fat protein	김정숙	심원보	권인준, 김민곤, 장지윤	Food Control	79	국외	SCI

2017	Development of aflatoxin B1 aptasensor based on wide-range fluorescence detection using graphene oxide quencher	주민영	박태정	백승훈, 전선아, 전향숙, 최성욱	Colloids and Surface B	154	국외	SCI
2017	Portable agricultural detection system for enhancing the safety of agricultural products using aggregation of gold nanoparticle	백승훈, 이승우	박태정	김은주, 신동혁, 이석우	ACS Omega	2(3)	국외	비SCI
2017	Hexagonal tungsten oxide nanoflowers as enzymatic mimics and electrocatalysts	박찬영	육강민, 박태정	서지민, 조홍일, 박주현	Scientific Reports	7	국외	SCI
2017	Identification of Pork Adulteration in Processed Meat Products Using the Developed Mitochondrial DNA-Based Primers	하지명	윤요한	김세정, 이지연, 이수민, 이희영, 최유경, 오혜민	Korean Journal for Food Science of Animal Resources	37	국내	SCI

다. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원 연도	특허명	출원인	출원 국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2016	식품 내 돈지 분석용 마커 및 이의 용도	경상대학교 산학협력	대한민국	10-2016-0163508					

		단							
2017	알코올 검출용 조성물 및 이 를 포함하는 키트	중앙대학 교 산학협력 단	대한 민국	10-2017- 0110473					

라. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해년도 징수액	향후 징수액	합계
100,000,000 원	100,000,000 원	0	100,000,000 원

마. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해년도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			
분광광학용 돈육/돈지 검출시스템	분광검출시스 템 시제품	(주)메텍 스	김경동	60	검출장비			
분광광학용 돈육/돈지 검출 시약	검출 센서 스트립	(주)메텍 스	김경동	60	소모성 스트립			
형광광학용 알코올 검 출시스템	형광검출시스 템 시제품	(주)딕스 젠	이진우	15	검출장비			
형광광학용 알코올 검 출 스트립	검출 센서 스트립	(주)딕스 젠	이진우	15	소모성 스트립			

3. 연구개발의견

가. 연구관리규정 및 제도개선이 필요한 사항

해당사항없음.

나. 연구수행 중 애로사항 및 건의사항

- 국내 할랄시장에 대한 대처방안과 국가적 기반의 부족으로 인해 수출증진을 위한 사업 개발에 어려움이 많음.
- 할랄산업전문가들을 양성하고 국가적 지원 및 컨트롤 타워가 하루빨리 만들어져야 할 것으로 사료됨.

다. 성과에 대한 홍보 요청사항

- 무슬림 국가 및 국내 할랄제품 진출을 위한 준비기관들에게 널리 홍보되기를 바람.

4. 주관연구기관책임자의 종합의견

- 돈지육 및 돈육으로부터 열에 안정한 crude protein 추출하여 이를 면역원으로 하여 돈지육과 돈육에 특이적으로 반응하는 항체를 성공적으로 개발함.
- 돈지육 및 돈육의 혼입여부를 1%까지 신속하게 측정할 수 있는 ELISA을 개발하였음.
- 돈지육 및 돈육의 혼입여부를 현장에서 확인할 수 있는 immuno-strip sensor를 개발하였고 돈지육에 대해 5%, 돈육에 대해 10% 검출한계를 확인하였음.
- 유제품 내에 존재하는 알코올 검출을 위한 원천기술을 개발하였음.
- 유제품 내에 존재하는 알코올의 약 1%까지 검출이 확인됨.
- 돈지육/돈육 및 알코올에 대한 할랄제품 진단을 목적으로 하는 검출 시스템(일회용 스트립 및 단말기)을 개발하였음.

그러므로, 상기 표시내용과 같이 해당기간 내에 모든 목표치를 달성한 것으로 사료됨.

다만, 시장에서의 요구사항을 반영하기 위한 검출한계의 향상을 위해 계속 개발이 이루어져야 함.

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	수출전략기술개발사업	
연구과제명	할랄 제품의 돈육/돈지 및 알코올 검출을 위한 신속 진단 기법 개발			
주관연구기관	중앙대학교		주관연구책임자	박 태 정
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	600,000 천원	200,000 천원		800,000 천원
연구개발기간	2015.08.31 - 2017.08.30 (24개월)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도			

2. 연구목표 및 내용

가. 연구목표

- 할랄 식품에서 돈육/돈지 및 알코올 성분 검출용 바이오센서 개발 및 성능 향상 연구
- 돈육/돈지 및 알코올 검출용 바이オリ셉터 및 나노재료를 이용한 성능향상 융합기술 연구
- 돈육/돈지 및 알코올 검출을 위한 현장 및 다중 분석용 고감도 정성, 정량 분석 광학 나노 바이오센서 칩(스트립) 개발
- 돈육/돈지 및 알코올 검출을 위한 고감도 나노바이오센서 개발
- 돈육/돈지 및 알코올 검출을 위한 휴대용 장치 및 제품화 기술 개발

나. 주요연구내용

- ▶ 나노입자를 활용한 알코올 검출을 위한 고감도 나노바이오센서 원천기술 개발
- ▶ 알코올 검출용 바이오센서 개발 및 나노입자를 이용한 성능향상 융합기술 개발
- ▶ 알코올 검출용 고감도 정성·정량분석용 광학 나노바이오센서 칩(스트립) 개발
- ▶ 돈육/돈지 특이적 단일클론성 항체 생산 및 개발
- ▶ 돈육/돈지 특이적 항체-금나노입자 기반 현장진단용 immuno-strip sensor 개발
- ▶ 현장에서 할랄제품중 돈육 유래 성분 및 알콜 함유 유무를 검사할 수 있는 진단키트를 위한 장비(리더기)의 최적화
- ▶ 돈육/돈지 및 알콜 성분 분석을 위한 진단키트의 시제품 생산을 위한 최적화
- ▶ 할랄제품 중 돈육/돈지와 알콜 성분 현장검사를 위한 시제품 키트의 평가
- ▶ 국내·외 관련 자료를 통한 다양한 할랄 식품 연구 대상 식품의 선정

- ▶ 휴대형 검출기를 이용한 식품 전처리 방법 확립
- ▶ 휴대형 검출기를 이용한 돼지 유래 물질 함유 유무 분석

3. 연구성과 및 활용실적

(1) 연구성과

구분	특허		학술대회	인력양성	기술이전	논문		기타	
	출원	등록	발표			SCI	비SCI		
1차 년도	목표	1		4	2		3	1	
	달성			8	4		1	1	
2차 년도	목표	1	1	4	3	2	3	1	
	달성	2		2	5	1	3	1	
계	목표	2	1	8	5	2	6	2	
	달성	2		10	9	1	4	2	

(2) 연구성과 활용 실적

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2	2	-	-	1
	달성	1	4	-	2	1

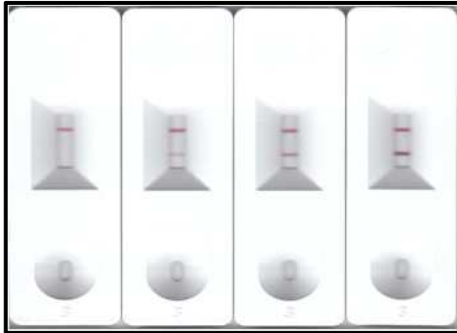
(3) 관련사진

▣ 돈육/돈지 검출 광학단말기 (1건)

- SMART Reader : 스트립 리더를 장착한 돈육/돈지 검출 광학단말 시스템



▣ 돈육/돈지 검출용 일회용 스트립 (1건)



▣ 알코올 검출 형광단말기 (1건)

- EPITHOD616™ : 스트립 리더를 장착한 알코올 검출 형광단말 시스템



▣ 알코올 검출용 일회용 스트립 (1건 - 69×28×5 mm³)



4. 연구성과 활용계획

○ 구체적 성과물의 명칭

- 돈육/돈지 검출 광학단말 시스템
- 돈육/돈지 검출용 일회용 스트립
- 알코올 검출 형광단말 시스템
- 알코올 검출용 일회용 스트립

○ 성능

- 돈육/돈지 검출 광학단말기는 측정시 총 검출시간 10분 소요
- 알코올 검출 형광단말기는 측정시 약 15초 소요

○ 용도

- 할랄 제품 내 돈육/돈지 및 알코올 검출용으로 활용될 예정임.

○ 수요처

- 참여기업이 주관기관과 협동기관으로부터 기술이전 받은 기술에 대해 단말기를 양산하고 돈육/돈지 및 유제품 내 알코올 검출을 위한 부품 및 시약 공급업체와 공급계약을 체결하고, 판매업체와 판매계약을 체결하고 중임.

5. 기대효과

○ 학술적 의의

- 할랄 인증을 통하여 자연친화적이고 유기적인 방식에 의한 안전한 먹거리 확보를 위한 식품군 생산기술로 활용할 수 있음.
- 음주 측정을 위한 개인용 휴대형 검출기 생산분야에 적용할 수 있음.
- 할랄 인증 기관, 할랄푸드 및 제품을 생산, 인증, 판매, 유통관리 서비스 제공자들이 바로 손쉽게 활용할 수 있음.
- 돼지고기 지방 및 알코올 검출을 위한 나노바이오소재의 휴대형 검출기 제조 기술은 국제특허 출원을 통한 원천기술 확보와 산업화에 활용할 수 있음.
- 이러한 연구를 기초로 해서 국내에서 식품 및 축산제품 중의 미표기·의도적 혼입 여부를 확인할 수 있는 축육 중 구분 현장진단 기술의 개발에도 활용이 가능

○ 기술적 측면

- 휴대형 돼지고기 지방 및 알코올 검출을 위한 나노융합원천기술을 확보할 수 있고, 이를 이용하여 기술발전 단계상 아직 태동기에 머무르고 있는 바이오센서 시장에서의 국제경쟁력 향상에 이바지할 수 있을 것으로 생각됨.
- 동물성 지질 및 알코올에 대한 현장 분석용 바이오센서가 개발될 경우 국제적으로도 시장에서 충분한 경쟁력을 가질 수 있을 것으로 판단됨.

○ 경제적 측면

- 국내 거주 및 한국 방문 무슬림 관광객을 위한 품질이 보장된 할랄푸드 및 화장품과 같은 제품을 등을 통한 할랄 시장의 성장 및 확대를 기대할 수 있음.
- 돈육을 포함한 돈지육의 현장·신속 분석기술의 개발을 선점하여 점점 확대하고 있는 할랄 식품 중 미표기·의도적 돈지육의 혼입 관리를 위한 도구로 활용한다면 국내뿐만 아니라 이슬람권 국가들에 막대한 수출 물량을 확보할 수 있을 것으로 예상됨.
- 할랄 인증된 수입품들을 국내 생산 할랄 제품으로 대체할 경우 발생할 경제적 효과가 기대됨.

○ 산업적 측면

- 기존의 방식 대체 및 해외 수출가능성이 높다.
- 신속 정확한 현장 분석을 통해 직접 할랄제품을 확인할 수 있게 됨으로써 무슬림뿐만 아니라 비무슬림에게도 건강에 좋은 식품을 제공함으로써 안전한 먹거리 제공에 기여할 것으로 기대할 수 있음.
- 이에 국내외 특허 출원과 등록을 통해 새로운 산업화 기반을 조성한다.

○ 신산업 창출

- 수출 및 관광객, 국내 거주 무슬림에 대한 식품시장 창출
- 할랄 헤어케어 및 화장품 등 다양한 산업에도 적용할 수 있음.

- 무슬림 문화에서 사용되는 의약품, 건강기능제품 등으로의 확장성 제고로 신시장 창출

○ 무슬림 문화 및 청정한 먹거리에 대한 인식 전환

- 무슬림 국가로의 식품 수출 증진을 위한 인식의 변화
- 종교적 문화 및 먹거리에 대한 인식 전환
- 새로운 일자리 창출

6. 성과 활용성 제고를 위한 의견

- 연구성과 활용성 제고를 위한 업무 주체별로 협의하여 추진할 계획임.
 - 주관연구기관 및 협동기관 - 원천기술제공
 - 실시기업 - 기술이전 및 상용화 추진 (부품 및 시약 공급계약, 판매계약 체결)
 - 전문기관 - 할랄 및 하람 재료 사용에 대한 전문가 초청 및 자문기관 운영

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.