

발간등록번호

11-1543000-002360-01

# ICT/BT 기반 양파·마늘 작물의 가뭄·저온·병해 현장 진단 및 작황 예측 최종보고서

2018.11.15.

주관연구기관 / 전남대학교(1세부)  
협동연구기관 / 전남대학교(2세부)  
전남대학교(3세부)  
충남대학교(1협동)

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “첨단생산기술개발사업”(개발기간 : 2015. 08. 14. ~ 2018. 08. 13.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 11. 15.

주관연구기관명	: 전남대학교 산학협력단	(대표자) 송진규 (인)	
협동연구기관명	: 충남대학교 산학협력단	(대표자) 이영석 (인)	
참여기관명	: (주) BNR	(대표자) 송기수 (인)	
참여기관명	: (주) 케이에스	(대표자) 신지현 (인)	
참여기관명	: 해봉(주)농업회사법인	(대표자) 박경담 (인)	

주관연구책임자 : 이경환  
세부·협동연구책임자 : 김철수  
양광열  
김용주

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	315012-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2015.08.14. ~2018.08.13. (36개월)	단 계 구 분	3차년도/ (총 3 단 계 )
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	첨단생산기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	ICT/BT 기반 양파·마늘 작물의 가뭄·저온·병해 현장 진단 및 작황 예측			
	세 부 과 제 명				
연구책임자	이 경 환	해당단계 참여연구원 수	총: 41명 내부: 40명 외부: 1명	해당단계 연구개발비	정부: 400,000천원 민간: 140,000천원 계: 540,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 116명 내부: 113명 외부: 3명	총 연구개발비	정부: 1,200,000천원 민간: 420,000천원 계: 1,620,000천원
연구기관명 및 소속부서명	전남대학교 지역바이오시스템공학과			참여기업명 (주)센서아이, BNR, (주)케이에스, 폴빛영농조합법인, 해봉(주)농업 회사법인	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: (주)케이에스 전남대학교			연구책임자: 배강훈 백장선	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반과제/ 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의 4에 해당하지 않음
-------------------------	---

### 9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황: 해당사항 없음

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수  
**274**

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>○ ICT/BT 기반 양파, 마늘 작물의 실시간 병해 진단 및 작황 예측 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 환경장해 및 병해 진단 마이크로 키트 개발</li> <li>- 환경장해 표현형에 대한 수용체 센싱 최적화 시스템 개발</li> <li>- 주요 병해 진단 분자마커 및 탐침 표지 개발</li> <li>- 환경장해, 병해 발생 모니터링 및 작황 예측 시스템 개발</li> </ul>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 환경장애를 진단할 수 있는 종이기반 센서 개발 및 최적화</li> <li>- 병해를 진단할 수 있는 종이기반 센서 개발 및 최적화</li> <li>- 환경장애 및 병해를 동시에 진단할 수 있는 종이 기반 센서 개발 및 최적화</li> <li>- 가뭄 및 병해를 동시에 진단할 수 있는 스마트폰 기반 키트 및 리더기 개발</li> <li>- 양파·마늘로부터 가뭄·저온 수용체 동정 개발</li> <li>- 저온 환경장애 심화 기반에 따른 프롤린 분석 시스템 개발</li> <li>- 양파 및 마늘의 흑색썩음균핵병균 진단용 항체의 항원에 대한 특이적 결합, 민감성 및 반응성 검정</li> <li>- 양파 및 마늘의 노균병균균 진단용 LAMP 기법 개발</li> <li>- 생육 모니터링을 위한 영상처리 알고리즘 개발</li> <li>- 생육 모니터링 플랫폼의 데이터 획득 및 제어 시스템 개발</li> <li>- 펠드 서버를 이용한 기후정보 및 작물 표현형 데이터 측정 : 주/야간, 측정위치, 생육단계별 측정 및 분석함</li> <li>- 기상 요인을 이용한 양파와 마늘의 주요 병해발생 예측모형 개발</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 파속작물 재배에 맞게 설계된 개발품은 다른 농작물 환경에 적용하여 다양하게 활용 가능하며 특히, 병징이 발현되기까지의 잠복기가 긴 병원균의 경우 유용하게 적용될 수 있음</li> <li>- 양파 노균병과 흑색 썩음균핵병으로 인해 많은 피해를 입고 있는 양파 농가의 살균제 사용 빈도 감소 및 방제 효과 상승으로 농가 소득 증대 기여</li> <li>- 수확량 수급 안정 측면에서는 병해 발생 초기에 진단 및 조치가 가능하기 때문에 병해의 2차 확산을 통한 피해 최소화가 가능하며(수급 변동량 5% 이내 유지), 이를 통해 양파, 마늘 수확량 안정화를 도모할 수 있음</li> <li>- 최초의 양파·마늘 작황 예측 기술로 다른 작물에 확대 적용을 통한 고효율 작물 생산 체계 구축</li> <li>- 기술이전과 제품 양산화를 통해 국내 및 국외 농가 보급으로 시장 활성화 및 국가 기술 경쟁력 상승에 기여</li> <li>- 환경장해 마이크로 진단 키트는 현장에서 신속히 진단이 가능하므로 중·고등학교 과학교실 및 가정에서 사용할 수 있는 진단키트로도 활용 가능함</li> </ul>				
<p>국문핵심어</p>	<p>현장 진단기</p>	<p>작황예측</p>	<p>가뭄·저온 장애</p>	<p>병해</p>	<p>작물 생육 모니터링 시스템</p>
<p>영문핵심어</p>	<p>Portable field diagnosis system</p>	<p>Crop yield estimation</p>	<p>Drought, cold stress</p>	<p>Plant disease</p>	<p>Crop growth monitoring system</p>

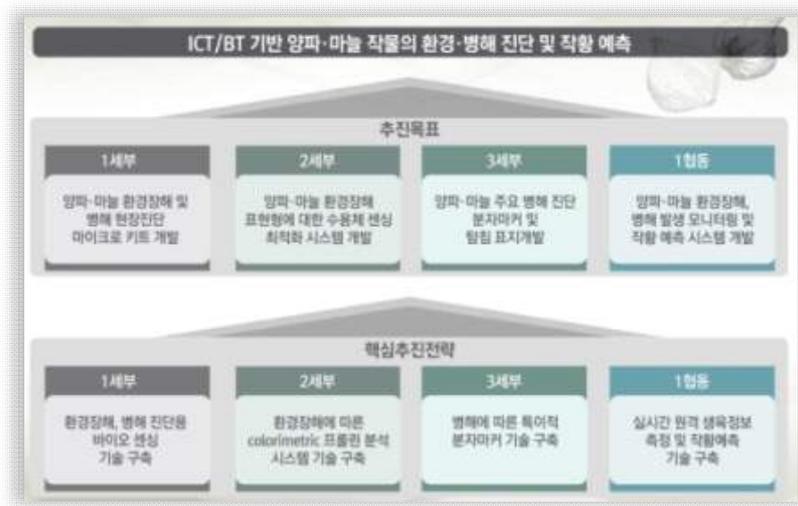
## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	27
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	265
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	271
붙임. 참고 문헌 .....	273

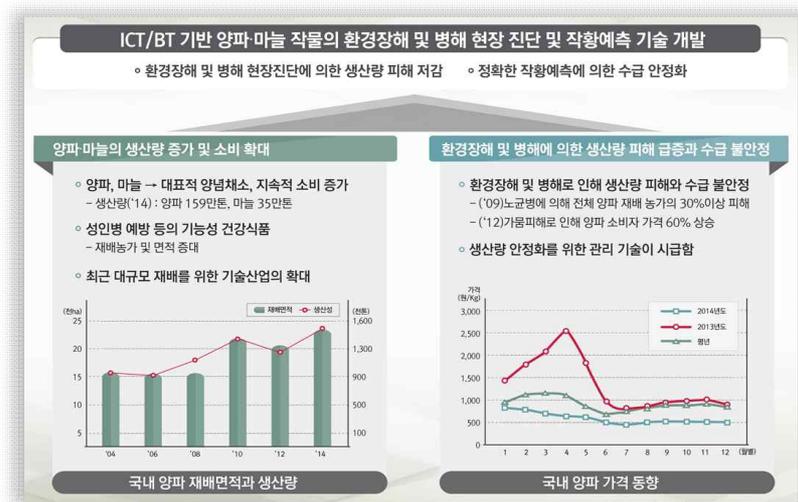
# 1. 연구개발과제의 개요

## 가. 연구개발 목적

- 양파·마늘 환경장해 및 병해 현장진단 마이크로 키트 개발
- 양파·마늘 환경장해 표현형에 대한 수용체 센싱 최적화 시스템 개발
- 양파·마늘 주용 병해진단 분자마커 및 탐침표지 개발
- 양파·마늘 환경장해, 병해 발생 모니터링 및 작황예측 시스템 개발



## 나. 연구개발의 필요성



### (1). 국내·외 양파, 마늘의 재배 현황 및 수급조절

#### (가) 양파, 마늘의 재배면적 및 생산량

- 양파는 전 세계적으로 재배되는 주요 양념채소로 마늘과 함께 모든 요리의 기본재료로 이용된다. 인구 증가 및 소득 증대와 더불어 최근 건강 기능성 식품이 알려지면서 세계 양파 재

배면적은 2000년 2,843천 ha에서 2012년 4,204천 ha로 48%가 증가하였으며 같은 기간 생산량은 49,946천 톤에서 82,852천 톤으로 67% 증가하였다. 주요 생산 국가는 2012년 기준으로 중국, 인도, 미국이 차지하고 있다.

- 중국은 지속적으로 재배면적을 확대하여 2012년 기준 전체 생산량의 27%를 차지하고 있으며, 우리나라는 1% 내외로 미미한 점유율을 보이고 있다. 그러나 단위면적당 수확량은 5.7톤/10a로 전 세계에서 가장 높은 생산성을 보이고 있을 정도로 생산기술은 매우 우수하다.



[세계 양파 재배면적과 생산량]



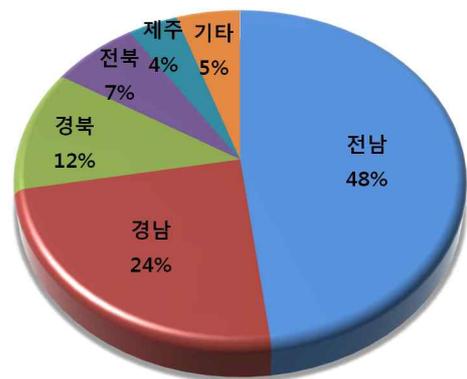
[양파 생산 주요 국가 생산량 비교('12)]

- 국내 양파 재배면적과 생산량은 지속적으로 증가하여 2014년 각각 24천 ha와 1,589천 톤이었다. 2012년 기상 악화로 재배면적과 생산량이 일시적으로 감소하였으나, 가격 상승에 따라 다시 증가 추세를 보이고 있는 실정이다.

- 국내 주요 양파 재배지역은 전남, 경남, 경북, 전북으로, 특히 전남은 전체 생산량의 48%(763천 톤)를 차지하고 있으며, 또한 다양한 양파 가공시설들이 설비되어 있어 양파 생산 및 가공의 메카이다.



[국내 양파 재배면적과 생산량]

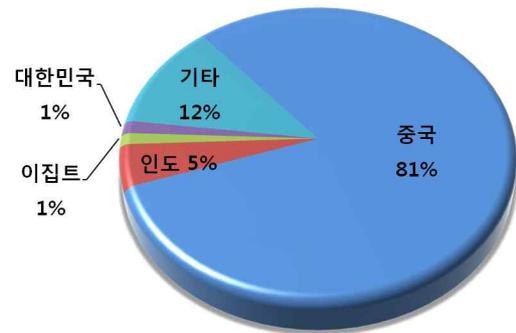


[국내 지역별 양파 생산량 비교('14)]

○ 마늘은 파속작물 중 두 번째로 생산량이 많은 양념작물이며 고기능성 건강식품으로 알려지면서, 미국 등 서구지역에서 지속적으로 소비가 증가하고 있는 실정이다. 세계 마늘 재배면적은 2002년 1,117천 ha에서 2012년 1,466천 ha로 31.2% 증가하였으며, 같은 기간 생산량은 12,570천 톤에서 24,837천 톤으로 97.5% 증가하였다. 중국은 세계 최대 마늘 생산국으로 2012년 기준, 전 세계 마늘 생산량의 81%를 차지하였고, 다음으로 인도 5%, 한국 1%, 이집트 1% 순이었다.



[세계 마늘 재배면적과 생산량]



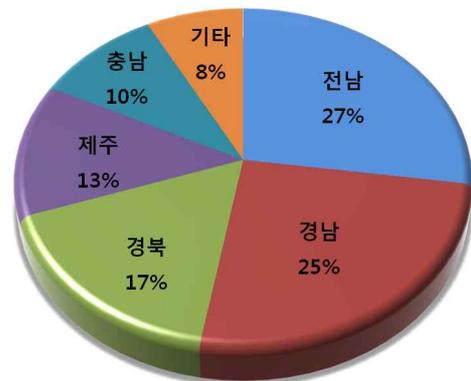
[마늘 생산 주요 국가 생산량 비교('12)]

○ 국내 마늘 재배면적은 2014년 기준 25천 ha이며, 같은 해 마늘 생산량은 353천 톤으로 보고되었다. 2014년은 정식기 가격하락으로 2013년보다 재배면적이 줄어 생산량이 감소하였지만, 마늘 재배면적과 생산량은 2010년부터 전반적으로 증가 추세를 유지하고 있다.

○ 국내 주요 마늘 재배지역은 전남, 경남, 경북, 제주로, 특히 전남은 전체 생산량의 27%(96천 톤)를 차지하고 있다.



[국내 마늘 재배면적과 생산량]

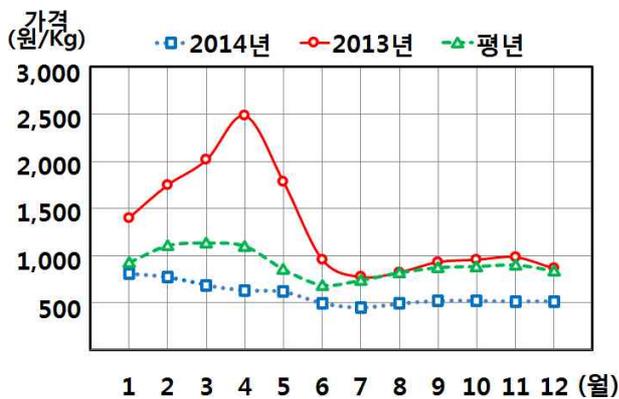


[국내 지역별 마늘 생산량 비교('14)]

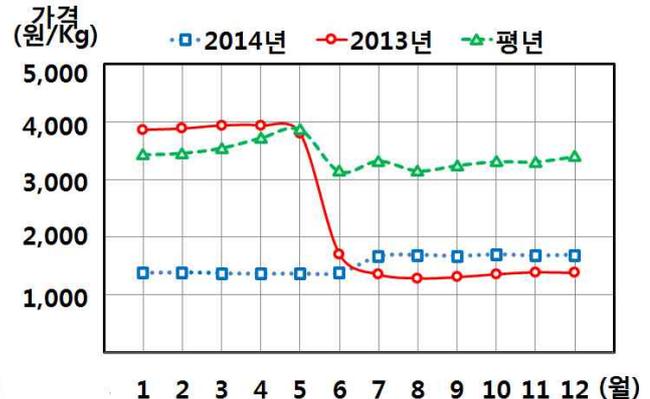
- 양파, 마늘은 전 세계적인 양념채소 작물로서 국내외적으로 재배면적과 생산량이 지속적으로 증가하고 있다. 최근 대규모 재배를 위한 기술 산업이 확대되면서 생산성 향상 및 안정화를 위한 첨단 작물 관리 기술의 도입이 시급히 요구된다.

## (2). 국내 양파, 마늘의 수급조절

- 양파, 마늘과 같이 생산량 예측이 부정확한 농산물에 대해 원활한 수급과 가격안정을 도모하고 유통개선을 촉진하기 위해 정부가 저장성이 있는 농산물을 수매 또는 수입 비축하여 판매하고 있다.
- 양파, 마늘, 배추, 고추, 콩 등 주요 농산물의 수급 조절 및 가격안정을 위하여 정부에서는 농산물 가격안정 기금을 조성하였으며, 과잉 생산된 농산물의 산지 폐기, 수매 비축, 자조금 등을 지원하기 위해 매년 약 7,000억 원을 투입하고 있다.
- 2012년 11월 이후 국산 양파 가격이 꾸준히 상승함에 따라 2013년 3월 양파 수입량은 신선 양파 6,456톤(전년 168톤), 건조양파 16톤(전년 27톤), 냉동양파 301톤(전년 169톤)으로 크게 증가 하였으며, 2013년 5월 이후 조생종 햇양파가 본격 출하하여 가격이 급격히 떨어졌다.
- 이후 양파 가격은 지난 2013년 11월 이후 지속적으로 하락하여 700원/kg 내외로 하향 경계 단계에 위치하고 있으며, 기존 재고량이 많아 지속적인 가격 약세를 보일 것으로 전망되고 있다.
- 마늘의 경우도 2013년 가격 폭락이후 국내산 마늘 재고량이 평년보다 많아 지속적으로 낮은 가격을 유지하고 있다.
- 따라서, 농식품부는 농산물 출하 이전 단계부터 수급조절을 대폭 강화하기 위하여 가칭 ‘사전 생산안정제’와 ‘출하안정제’ 도입을 핵심으로 한 수급안정 대책 정책을 수립하였다. 사후적이면서 정부가 직접 개입해 왔던 기존 수급안정대책을 개선해 수급불안 해소를 통한 농가소득 안정이라는 원칙을 세워 민간 참여형 사전적 수급안정체계를 구축하고 있다.
- 또한 생산안정 제도에 참여하는 농가에 대한 수급조절 의무를 부여하는 동시에 가격 등락에 관계없이 소득을 일정 수준 보전해 주는 방안도 마련하고 있다. 특히 농업관측정보를 영농현장에 입체적으로 전파하고, 농작물 작황 실태 등 산지정보를 실시간 제공해 관측 정확도를 높이고, 농업인이 사전에 수급조절을 할 수 있도록 관측 정보를 제공하고자 한다.
- 이에 따라 기상여건 및 농작물 생육 상태 등을 실시간 원격 모니터링하여 농작물 작황을 지속적으로 예측할 수 있는 첨단 작황관리 시스템이 요구된다.



[국내 양파 가격 동향]

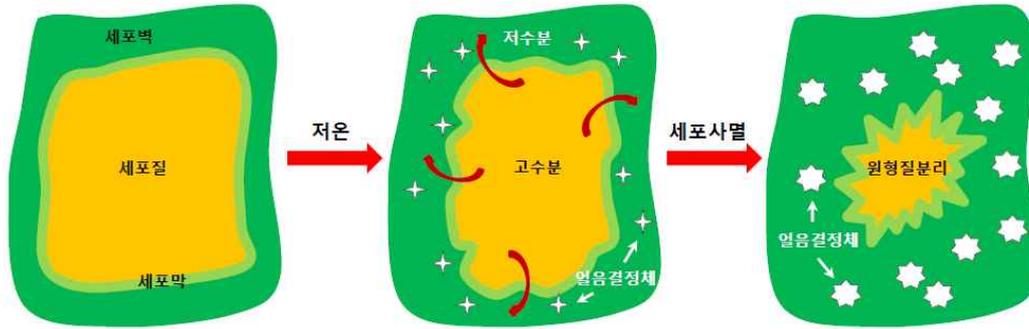


[국내 마늘 가격 동향]

### (3). 양파·마늘 재배의 문제점

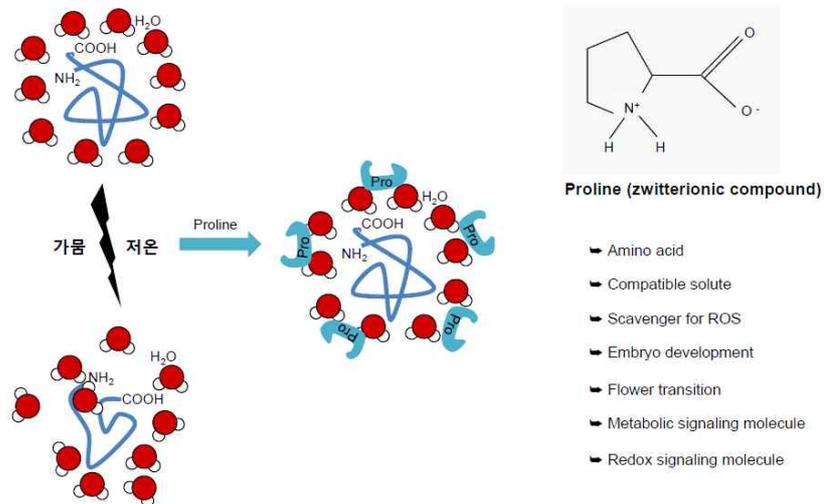
#### (가) 환경장애로 인한 양파·마늘 생산량 저하

- 지구온난화 및 이상기후에 따른 가뭄 스트레스에 의해 농작물의 피해가 점점 증가하고 있으며, 이에 따라 작물재배를 위한 수자원 확보 및 최적 관수 방법 개발이 세계 모든 국가가 안고 있는 미래 농업의 문제점으로 대두되고 있다.
- 양파와 마늘의 생육적온은 20℃ 내외로 25℃ 이상이 유지될 경우 생육이 둔화 및 정지되며, 특히 양파는 재배기간 동안 많은 수분을 필요로 하는 작물로 수분이 부족하면 월동작물임에도 불구하고 겨울에는 동해에 의한 피해가 우려되고 수확기의 가뭄은 구 비대가 정상적으로 이루어지지 않아 상품성이 떨어지게 된다.
- 2012년 최악의 가뭄으로 5월 평균 강수량이 전년에 비해 39%에 그쳐 양파 및 마늘의 피해가 심각하였다. 대형마트에서 2,480원 하던 양파1대(8개입)가 3,980원까지 상승하여 소비자 가격이 60% 상승하였다.
- 2014년 5월 하순 최고기온이 양파와 마늘 생육적온보다 훨씬 높은 기온을 유지하였고, 또한 강수량도 전체적으로 평년대비 11.3% 감소되어 두 작물의 생산량이 전망치보다 4-5% 감소할 것으로 예상하였다.
- 가뭄, 저온 및 고온 조건하에서의 세포 내 수분 항상성 유지는 양파·마늘 생장 및 대사 작용에 매우 중요하기 때문에 삼투조절물질 조절 기술 개발 연구는 양파·마늘 작물발달 최적화 시스템 개발에 매우 중요한 분야이다.



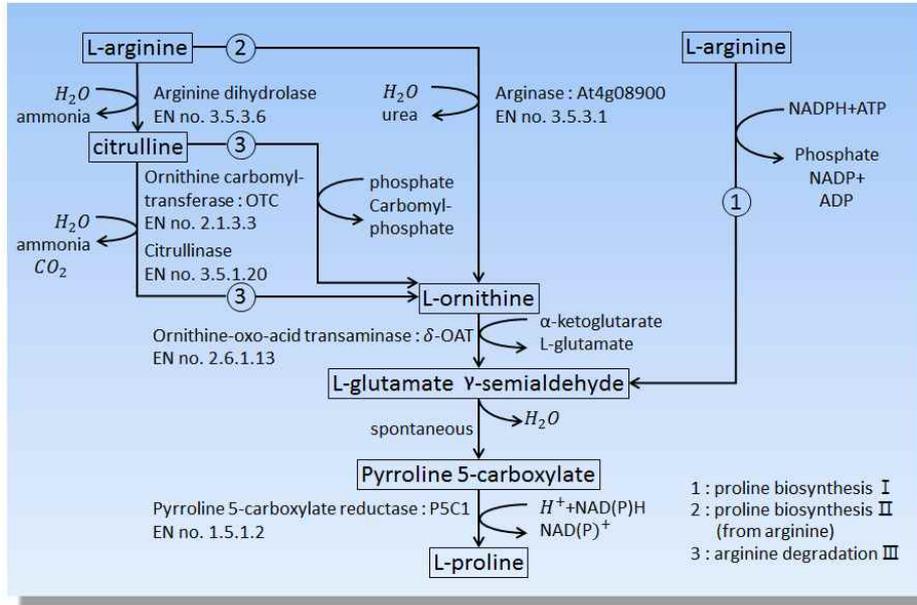
[저온스트레스 기작: 식물체 내 가뭄스트레스 기작과 유사함]

- 보습효과가 뛰어난 삼투조절물질 프롤린은 가뭄 및 저온 등 작물 환경스트레스에 대해 농작물이 성장하는데 있어서 매우 중요한 물질이다. 또한, 프롤린은 단백질 합성뿐만 아니라, 광합성 효율, 개화시기 및 배유 발달에 아주 중요한 신호 분자로 최근 알려지고 있다.



[가뭄·저온 환경장애에 대한 식물체 내 프롤린의 기능 모식도]

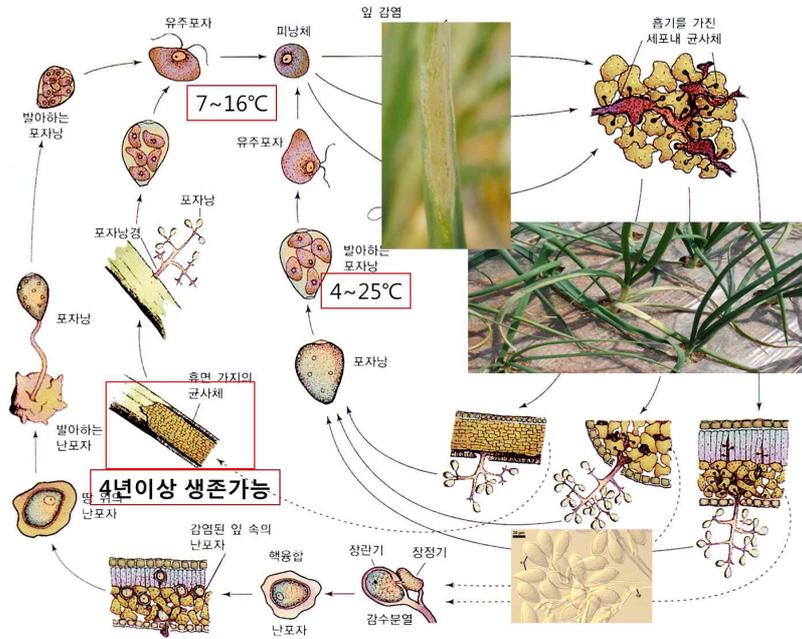
- 프롤린 생합성 혹은 분해 관련 유전자 및 중간 조절인자의 동정, 스트레스 조건하에서의 프롤린 수송, 프롤린 대사 네트워크 연구 등이 진행되어진다면 환경장애 맞춤형 수용체 개발로 파속작물의 현장진단 키트 최적화 기술을 강화할 수 있을 것으로 판단된다.



[식물체 내 프롤린 합성 체계도]

### (나) 주요 병해로 인한 양파·마늘 생산량 저하

- 양파 병해 중에서 피해가 가장 심각한 노균병은 *Peronospora destructor* 병원균에 의해 유발되는 토양 전염성 병으로, 주로 잎에 피해를 주어 심각한 수량 감소를 야기한다. 육안으로 병징이 보이기까지 잠복기가 길어 1차 감염 후, 초기 방제가 효과적으로 이루어지지 않으면 2주안에 포장에 있는 거의 모든 양파가 노균병에 걸리게 될 정도로 빠른 속도로 병이 전파된다.
- 노균병 피해는 1960년대부터 지역별로 전반적인 피해가 보고되어져 왔으나, 절대활물 기생균 (obligate parasite)으로 인한 연구 어려움 때문에 효과적인 방제가 매우 어려우며, 양파 생산지역에서 재배기간 동안 저온·다습 조건의 일기상황으로 인해 피해면적이 계속 늘어가고 있는 실정이다.
- 노균병균 포자 발아는 온도와 잎이 젖어 있는 시간이 가장 중요한 환경요인이며, 적합한 상대 습도가 유지되면 10°C~18°C 조건에서 2~3시간이면 포자 발아가 완료되고, 22°C에서는 4시간, 25°C에서는 5~7시간 정도 필요하며, 27°C가 되면 포자 발아는 거의 되지 않는다고 보고되었다.



[노균병균의 생활사]

- 포자가 발아하여 부착기를 형성하기 위해서는 포자 발아와 유사한 온도 조건이 필요하며, 이와 같은 기상 조건은 양파가 재배되고 있는 지역의 10-11월 그리고 2-4월까지의 기상조건과 매우 흡사하여 노균병이 발생하기 매우 좋은 조건이라 할 수 있다.
- 노균병은 양파 포장에서 적합한 습도와 기온이 유지된다면 최소한 4번 이상의 병환이 발생할 수가 있다. 노균병균을 실험실 조건에서 인위적으로 접종한 결과, 양파 노균병균의 밀도가 높았을 때, 접종 후 1주일 정도가 지나면 감염과 포자 형성이 이루어졌다. 이러한 결과, 전염원의 밀도를 줄이는 것이 매우 중요하다고 여겨진다.



[노균병의 증상]



[노균병 피해가 심하게 발생한 양파밭(2015년 5월)]

- 1989년 전남 고흥에서 처음 발생한 마늘 흑색썩음균핵병은 *Sclerotium cepivorum* 병원균에 의해 유발되는 토양 전염성 병으로, 토양에서 균핵 상태로 생존하여 전염되는 병해로 겨울철에 병 진전이 억제되었다가, 봄에 기온이 상승함에 따라 병징이 발현된다.
- 흑색썩음균핵병에 감염된 마늘은 뿌리, 인경, 잎 등의 생육이 현저하게 감소하며, 지상부에서는 하엽부터 시들기 시작하여 잎 전체가 마르고 고사하게 된다. 결국에는 인경이 흑색으로 부패되고 마늘 전체가 고사하게 되어 수확량 감소를 야기 시킨다.
- 양파·마늘 연작 재배지역에서 발생하는 주요 병해인 노균병과 흑색썩음균핵병은 초기 방제가 제대로 이루어지지 않으면, 수확이 불가능할 정도로 피해가 크며 방제 비용도 많이 소요된다.



[마늘 뿌리흑색썩음균핵병 증상]

- 토양 전염성 곰팡이병인 노균병과 흑색썩음균핵병은 1차 감염뿐만 아니라, 포자가 공중에 퍼지기 때문에 2차 감염 피해가 급속하게 확산된다. 또한, 토양 전염성 병해이므로 작업 시 농기계(트랙터, 경운기 등), 농기구(삽, 괭이, 호미 기타) 등에 묻은 흙을 통해 피해가 더욱 확산되기도 한다.
- 2009년 많은 강우량으로 인해 전국적으로 노균병이 발생하여 피해가 심각하였으며, 특히 양파 주산지인 무안의 경우는 전체 양파 재배농가의 30%이상이 피해를 입어, 그 피해액은 100억원 가량으로 보고되었다.

- 2012년에는 양파 주산지인 무안군에 노균병이 발생하여, 전체 재배면적의 30%에 해당하는 1,094 ha가 피해를 입었으며 피해액은 47억 5천만원으로 집계되었다. 2014년에도 양파의 주산지인 무안, 신안 중심으로 예년에 비해 노균병이 많이 발생하여 생산량이 크게 감소한 것으로 추정되었다.
- 흑색썩음균핵병 또한 양파, 마늘 재배지역에서 지속적으로 발생되어지고 있으며, 특히 2011년 전국에서 생산된 마늘 생산량은 34만7546톤으로 추정 되었으나, 마늘 흑색썩음균핵병 발생으로 15% 이상의 피해를 입었다고 보고되었다.
- 현재 농가에서는 양파 노균병 등 병해 방제를 위해서 서로 다른 계통의 살균제를 과도하게 살포하고 있으며, 이로 인해 사용 중인 농약에 대한 약제 저항성이 염려되고 있는 실정이다. 따라서 노균병균 등이 양파에 잠복되어 있는 감염 초기에 진단하여 적절한 방제를 수행하는 조기진단 시스템의 개발이 절실하다.
- 외국에서는 양파 노균병을 효율적으로 방제하기 위하여 상대습도, 온도 등의 기상 자료를 활용한 DOWNCAST라는 예측 프로그램과 ZWIPERO라는 프로그램을 활용하여 살균제 살포시기를 예측하는 연구를 진행하였으나, 실질적으로 양파 밭에서 노균병균 등의 밀도 여부를 확인할 수 있는 기술이 부족하여 농업 현장에서 큰 효과를 보지는 못했다.
- 노균병 등을 육안으로 확인하기 전인 발병 잠복기에 이들 병원균이 양파에 감염되었는지 여부를 현장에서 직접 진단할 수 있는 기술이 개발된다면, 초기에 노균병 등을 예방할 수 있으리라 생각된다.

1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월	12월
	상 중 하	상 중 하	상 중 하	상 중 하	상 중 하	상 중 하	상 중 하				
월동기	생장초기	일성장기			성숙기	수확기	파종, 발아, 유묘기			월동기	
	노균병 (발병기)					노균병 (잠복기)					
	발병	1차 발병		2차 발병							
	흑색썩음균핵병 (발병기)					흑색썩음균핵병 (잠복기)					

[노균병 및 흑색썩음균핵병의 잠복기 및 발병기]

#### (4). 환경장해, 병해 진단 및 작황예측 기술

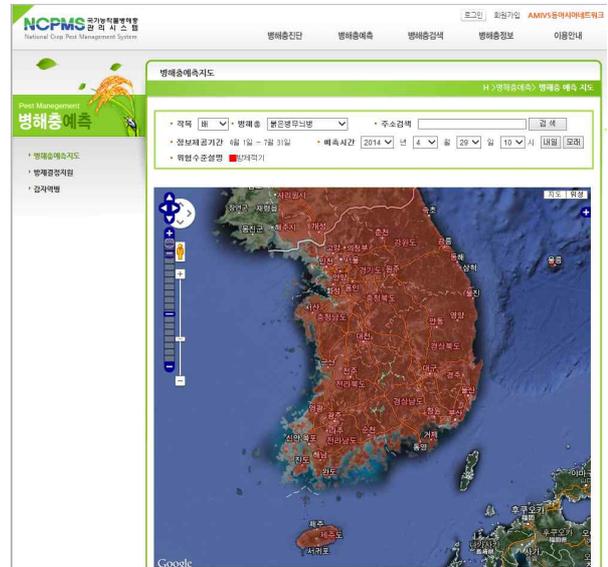
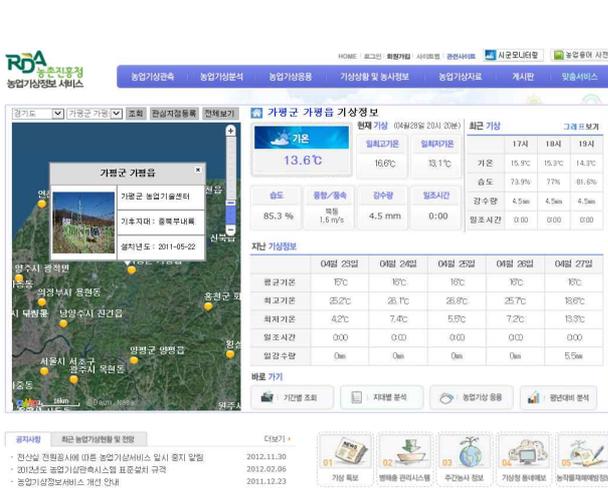
##### (가) 환경장해, 병해 진단 기술

###### ■기상관측에 의한 예찰시스템

- 중요한 작물 병에 대해 몇 가지 형태의 작물 병 발생-경고 시스템들이 미국을 비롯한 세계 각국에서 사용되어지고 있다. 이 시스템들의 목적은 농업인에게 작물 병 발생 위험과 이미

발생하여 진행되고 있는 상태를 알려주고, 그 진전을 멈추게 하거나 추가 감염이 발생하는 것을 막기 위하여 즉시 적합한 방제를 할 수 있도록 해 준다.

- 미국의 일부 주에서는 1970년대 중반부터 컴퓨터화된 작물 병 발생-경고 시스템을 중요한 작물 병 방제에 이용하고 있다. 그 중 하나인 “BLITECAST”는 개개 농업인이 농장에서 수집한 기상 자료와 자동화된 기상 스테이션에서 수집한 기상자료들을 분석하여 병의 발생을 예측하고 농업인에게 약제 살포 종류와 양 관련 정보를 제공한다.
- 국내에서도 기후변화, 이상기후 등에 적극 대응하고 농작물의 안정적인 생산을 돕기 위해 농촌진흥청에서는 농업기상정보 서비스를 제공하고 있다. 전국적으로 약 144개의 기상관측소를 운영하면서 기온, 습도, 풍향/풍속, 강수량, 일조시간뿐만 아니라 국가농작물 병해충 관리 시스템과 연동하여 병해충 예측 정보를 인터넷과 스마트 폰으로 실시간으로 제공한다. 하지만 이 시스템의 기상관측소는 보통 시군별로 1개정도 운영되고 있으므로 농가의 농경지별 기상 측정에 의한 정확한 병해충 예측은 어려운 실정이다.



[농촌진흥청 농업기상정보 서비스와 병해충 예측 시스템]

- 제주특별자치도는 현재 30개소의 농경지에 설치된 자동기상관측시스템을 전면 재구축하여 기온, 습도, 강수량, 풍속, 일사량뿐만 아니라 초상온도, 토양 20cm 깊이의 수분과 지온, 이슬 지속시간 등 다양한 기상관련 정보를 스마트폰을 통해 제공할 예정이다. 이를 통해 작물의 작황 및 병해충 예측의 정확도 향상을 꾀하고자 한다. 특히, 지면 1cm내외의 높이에서 관측한 초상온도를 토대로 서리 정보를 정밀하게 제공하고, 토양수분 변화를 지역별, 작물별로 측정하여 정확한 관수시기를 제공할 예정이다.

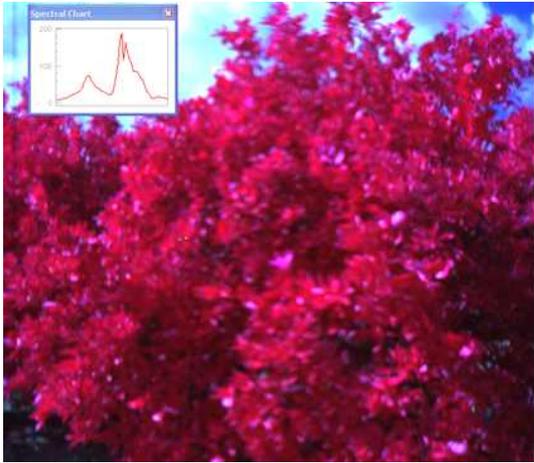


[제주특별자치도 기상관측 시스템]

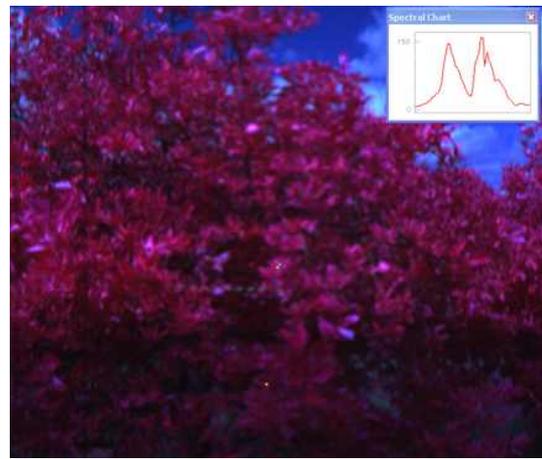
○ 현재 운영 중인 기상정보 관측에 의한 병해충 예찰시스템은 1개의 기상관측 시스템이 시군의 넓은 영역을 대표하고 있으므로 각각 농경지의 기상 측정은 불가능하며 따라서 각 농경지에 대한 병해 예측은 어려울 실정이다. 다만 이 시스템은 시군 단위의 병해 발병의 가능성을 농가에 알려주어 예방차원의 적극적인 방제를 하도록 추천하고 있다. 따라서 그 시스템의 예측 오차에 따라서 오히려 권장량 이상의 막대한 양의 농약이 살포될 가능성이 높다고 하겠다.

■ 초분광, 형광, 열 영상 분석법

○ 초분광 영상 분석법: 미국 플로리다에서는 Greening (HLB)라는 병해가 발생하여 오렌지 생산량의 40%가 감소하였고 약 9,000억원의 경제적 손실을 야기했다. 따라서 주 정부는 2014년도 HLB 퇴치를 위해 약 600억원의 예산을 편성하였고, 병해 진단을 위한 연구에 약 50억원을 투자하여 오렌지 병해 진단 및 퇴치에 총력을 기울이고 있다. 연구자들은 대규모 오렌지 농장에서 HLB를 진단하기 위해 초분광분석(hyperspectral system) 시스템을 사용하였으며, 병에 감염된 과수와 그렇지 않은 과수의 스펙트럼 패턴의 차이를 확인하고 병해 진단의 가능성을 확인하였다. 하지만 초분광분석시스템은 매우 고가이며 주위 광원의 특성과 강도에 따라 정밀한 캘리브레이션이 수반되어야 하는 등의 어려움이 있으며 현장에서 진단센서로 활용되기에는 아직 더 많은 연구가 진행되어야 한다.



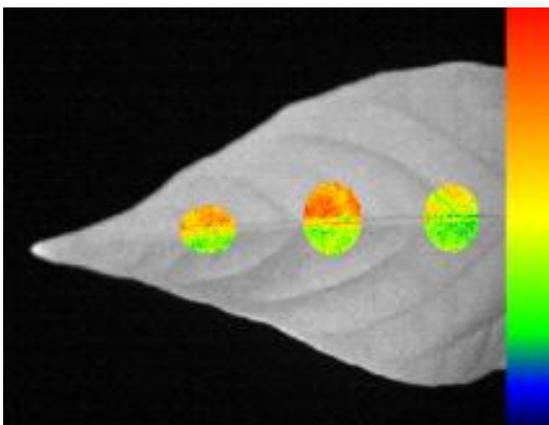
(HLB에 감염되지 않는 작물)



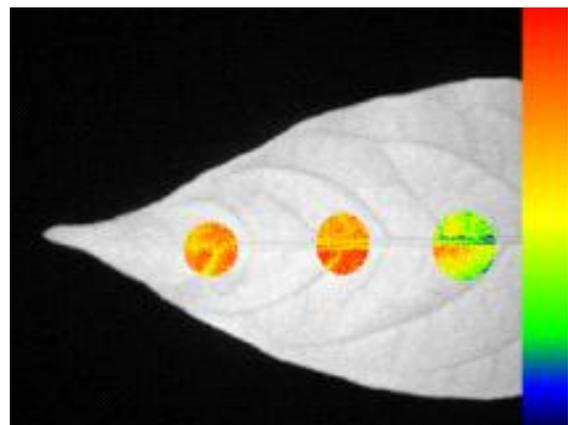
(HLB에 감염된 작물)

[초분광분석 영상]

- 엽록소 형광 영상 분석법: 빛에 노출 된 엽록소에 흡수된 빛의 파장과 강도에 따른 형광 양상의 변화를 측정함으로써 작물의 특성을 분석한다. 이러한 특성을 이용하여 수분 스트레스 조건이 작물 생육에 미치는 영향을 연구하거나, 이를 통한 수분 스트레스 지표를 선별하는 데에 이용된다. 하지만 엽록소 형광반응 분석 시 작물의 수분 스트레스를 판단할 수 있는 지표는 제한이 있으며, 광계에 의해 형광 조절이 불가능한 경우에는 잎의 전체 부분을 관찰할 수 없다는 한계점이 있다.



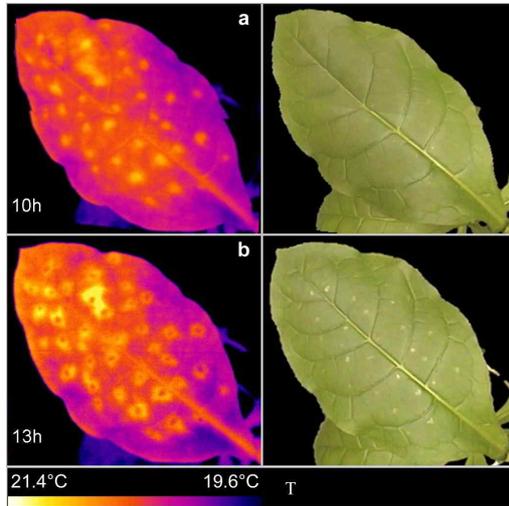
(Optimum watering 조건에서의 이미지)



(Drought 조건에서의 이미지)

[고추 잎의 엽록소 형광 매개변수의 공간적 분포]

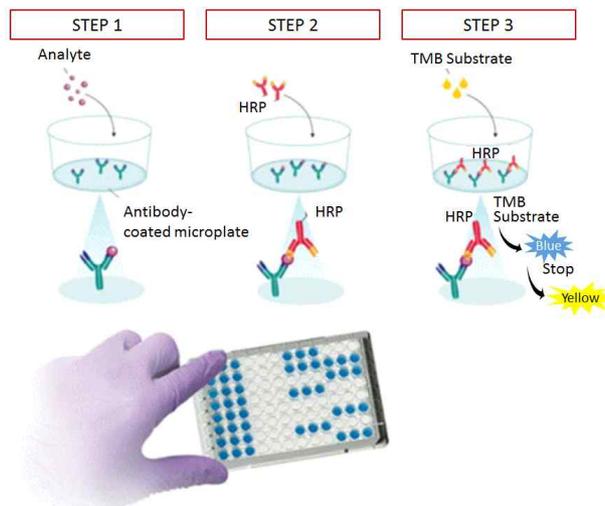
- 열 영상 분석법: 식물 질병 및 환경장애에 대한 스트레스를 진단하는 방법으로 적외선 온도계를 사용하여 식물 표면 잎의 온도패턴을 영상화하여 분석하는 기술을 사용한다. 병원균의 활동은 식물의 기공을 닫게 유도하고 이에 따라 증산속도가 감소함으로써 온도 변화를 유발한다. 하지만 열 영상 분석법은 주위 환경의 온도 변화에 민감함으로 주위 환경의 온도에 따라 식별 능력이 저하될 수 있는 단점을 가지고 있다.



[담배 잎에 TMV를 접종시켰을 때 열 영상 변화]

### ■ELISA(항원항체반응)

- 효소를 표식자로 하여 항원항체 반응을 이용한 항원 또는 항체량 측정 방법으로서 키트에 특정 바이오마커와 반응하는 항체를 부착시켜 샘플과의 반응 정도를 분석하는 방법이다. 미량 분석이 가능하고 가격이 저렴하다는 장점이 있지만, 현장에서 신속 진단이 쉽지 않다는 단점이 있다.



[ELISA 방법의 원리]

### ■LSON 칩

- 2011년 농촌진흥청에서는 염기서열이 알려진 모든 식물바이러스를 진단할 수 있고 신종바이러스까지 탐색할 수 있는 식물 바이러스 진단용 대용량 유전자 진단(LSON) 칩을 개발하였다.
- 2012년 일본산 배추 종자를 통해 국내 최초로 발생한 신종 ‘순무황화모자이크바이러스’를 3

일 만에 진단하여 긴급방제를 실시해 질병 확산을 조기에 예방하였다. 또한 네덜란드에서 수입된 나리꽃 중 질경이모자이크포텍스바이러스(PIAMV)의 구근 감염을 확인해 검역관리 대상 병으로 지정 요청하고 긴급 공적 방제를 실시해 농가 피해를 최소화 하였다.

- 하지만 질병을 진단하는데 식물 시료로부터 RNA 분리, 칩 분석까지 30시간이 소요되며 분석을 위한 시스템이 구축되어 있어야 하고 전문 인력이 수행해야 한다는 단점 때문에 현장에서 식물 병의 신속 진단을 위해 사용하기에는 어려움이 있다.



[LSON 칩 분석 시스템]

## ■진단키트

- 작물의 주요 병해 중 바이러스에 의해 감염되는 병해 진단용 키트는 상품화되어 현장에서 사용되고 있으나, 농가에 가장 많은 피해를 주는 곰팡이 병 진단을 위한 키트는 개발되어 있지 않은 상태이다.
- 농촌진흥청에서는 바이러스 진단키트를 2006년부터 개발하여 2007년에 보급하기 시작하였고, 2012년까지 9종에 대하여 37,490점을 분양하였다. 2009년에는 오이녹반모자이크바이러스, 쥬키니녹반모자이크바이러스, 큐리녹반모자이크바이러스 진단키트를 통해 박과작물에 많이 발생하는 바이러스 병 발생 여부를 영농 현장에서 쉽게 파악할 수 있었고, 약 79억원 상당의 농가 피해를 줄인 것으로 보고하였다.
- 2013년까지 농촌진흥청에서 개발한 진단키트를 활용한 바이러스병 손실 방지 비용 분석 결과, 고추, 수박 등 과채류의 수량과 상품성에 미치는 경제적 손실 방지 비용은 최소한 약 100억 원에 이를 것으로 추정하였다(출처: 농촌진흥청 원예특작환경과).



[보급용 진단키트]



[농업현장에서 바이러스 검정]



[바이러스 진단키트 반응]

○ 해외의 경우도 대부분 바이러스병을 진단하는 진단키트가 주를 이루고 있지만 작물별로 세분화 되어 있으며 중요한 세균병이나 곰팡이병을 진단하는 키트도 개발되어 있으며 상업화되어 농업 현장에서도 활용하고 있는 실정이다. 하지만 양파, 마늘의 노균병이나 흑색썩음균핵병을 진단하는 키트는 전무한 실정이다.

[양파, 마늘 작물의 병해 진단 기술 및 특성]

진단 기술	장 해	작물 / 측정인자	분석 시간	측정 범위	진단 시기	Ref.	현장 적용	
I m m u r i o p	본 연구에서 제안하는 시스템	plant disease	Onion & garlic/ downy mildew, white rot	5 min	10 <sup>4</sup> spores/mL	early		◎
		drought stress	Onion & garlic/ environmental stress	5 min	300 µM	early		◎
	Miniaturized Paper-Based Gene Sensor	plant disease	Banana/ bunchy top virus	10 min	80 copy/µL	early	Jitao Wei et al., 2014.	◎
	Loop-mediated isothermal amplification /lateral flow devices	plant disease	Tomato/ rhizoctonia solani	10 min	10 fg	early	Jaimin S. Patel et al., 2014.	◎
	Recombinase polymerase amplification/lateral flow devices	plant disease	Plum/ plum pox virus	20 min	1.0 fg	early	Shulu Zhang et al., 2014.	○
M o b i e c l o g a r	Real-time PCR	plant disease	Oak tree/ lonsdalea quercina	30 min	0.1 pg	early	By J. Shang et al., 2015.	△
	Real-time PCR	plant disease	Garlic/ garlic viral disease	30 min	2 fg	early	Moon Nam et al., 2015.	△
	ELISA	plant disease	Grape/ grapevine fanleaf virus	30 min	2 ng/ml	early	Stefanie Rettcher et al., 2015.	△
I m a g e s	Hyperspectral image	drought stress	Maize/ leaf senescence	30 min	430-890 nm	early	Jan Behmann et. al., 2013.	△
	Thermal image	drought stress	Wheat/ water evaporation	-	3.2-3.6°C	middle	Fehér-Juhász E et. al. 2014.	○
	Chlorophyll fluorescence image	drought stress	Maize/ chlorophyll	-	720-800 nm	late	Zhuoya Ni et. al., 2015.	△
	Near infrared spectroscopy	plant disease	Soybean/ virus infected	30 min	910 nm	early	Balasuriya Jinendra et. al., 2010.	△

<현장 적용 가능성 고려 사항 : 크기, 기술, 간편성, 분석시간, 감도, ◎:매우 높음 ○: 보통 △:낮음>

## (나) 작황예측 기술

### ■원격탐사 기술

- 원격탐사는 인공위성, 항공기 등에 센서를 탑재하여 물리적인 접촉 없이 농작물의 상태를 측정하는 방법이다. 활용분야로는 환경오염 감시, 재해감시, 작물작황 예측, 작물 생체정보 측정 등의 거시적인 분야에서부터 미시적인 분야까지 광범위하게 응용되고 있다. 원격탐사는 신속하게, 반복적으로 넓은 영역을 탐사할 수 있는 능력 때문에 최근에는 작물의 스트레스나 병해를 예측하는 수단으로 이용되고 있다.
- 현재 미국, EU, 일본 등의 선진국에서는 인공위성 영상을 판독하여 경지면적 조사, 재배면적 조사, 작황예측 분석 등의 농업생산통계에 활용하기 위해서 원격탐사 기반의 작황예측 체계를 구축하고 있다.
- 미국 NASS(국립농업통계청)에서는 항공사진과 위성영상을 이용하여 미국 내 주요 농산물 생산지의 농장 경계를 구분하여 미국의 농산물 생산현황과 농경지면적을 추정하고 농작물 상태를 진단하고 있다. FSA(농업지원청)에서는 FAS(대외농업지원청)과 공조하여 원격탐사 업무를 수행하고 미국 내 농작물의 잠재적인 피해가능성을 사전 경고한다.
- 미국 USDA(United States Department of Agriculture)는 전 세계 농경지의 작황 및 기상 정보를 제공하기 위하여 crop explorer (<http://www.pecad.fas.usda.gov/cropexplorer>)를 자체 제작하여 운영하고 있으며, 사용자가 쉽게 이해하도록 작물의 종별, 지역별, 계절별 카테고리를 활용하여 각종 정보를 그래픽으로 제공하고 있다.
- 유럽에서는 Landsat-TM(4호), Spot-XS(2호) 위성영상 데이터를 이용하여 지역별 경작지 및 수확량 변화를 신속히 측정하고 있으며, NOAA-AVHRRISPOT-VGT(4호) 위성영상 데이터를 이용하여 작물 성장 조건 및 수확량을 예측하고 수확량 예측 모델을 개발하였다.



[Crop explorer에서 제공한 한반도의 NDVI]



[Crop explorer에서 제공한 미국 전역의 NDVI]

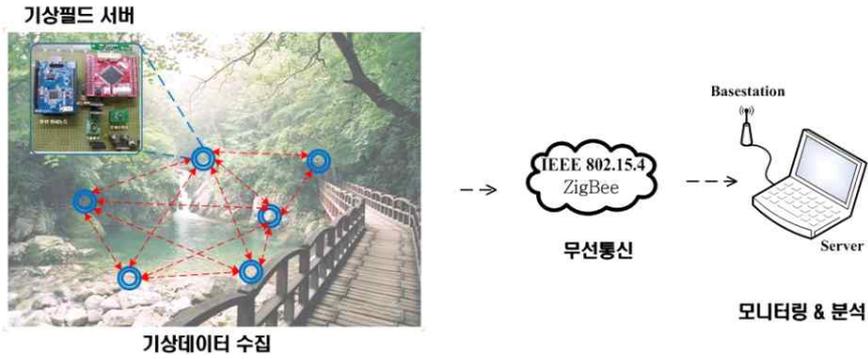
■Field Server

- 최근 지구 온난화에 따른 기후변화에 따라 자연재해가 빈번히 발생하며, 이에 대한 인명 및 재산 피해의 규모가 매년 크게 증가하고 있다. 기후의 급변으로 인해 기존의 예측방법에 의해 예측하기가 더욱 어려워지고 있는 실정으로, 특수한 환경에서의 기상데이터 획득에서 오는 문제점들을 극복하기 위한 안정적이고 효율적인 원격모니터링 시스템의 구축이 요구된다.
- 기상선진국에서는 국지적 기상재해 대응을 위해 고해상도 모델 활용, 자료동화 기술 개발, 앙상블 예보 체계 확립 등 다각적인 노력과 관측/예측기술의 기반기술의 발전에 지속적인 투자가 이루어지고 있다.
- 미국의 경우 무선 센서네트워크 관련 회사인 ES2000에서 환경, 정밀농업, 기상예측용서버를 2008년에 개발하여 시험 판매를 하고 있다.
- 일본의 경우 쓰쿠바시에서는 산업기술총합연구소, 국립쓰쿠바대학, 농업생물계 지정 산업기술연구소와 협력하여 2001년부터 필드서버를 개발하여 농업관련 분야의 응용에 활용하기 위한 노력을 하고 있다.
- 국내의 경우 농업과 관련된 응용분야를 위해 무선기반의 필드서버는 일부 연구소나 대학에서 기초연구가 이루어지기 시작하고 있으며, 전문 인력 부족 및 기반 기술 부족으로 인하여 소프트웨어, 미들웨어, 하드웨어에 대한 기술개발과 응용분야로의 독자적 기술개발 및 연계가 불가능한 실정이다.
- 기상재해 관측 시스템은 온도와 습도 일사량을 감지하는 센서 및 카메라로 이루어져 있으며, 필드서버에서 기상데이터를 수집하고 수집된 데이터는 무선 네트워크를 통해 원격지인 베이스스테이션으로 전송 과정을 거친 후 모니터링 시스템을 통해 실시간 기상정보를 받아볼 수 있다.



[기상 관측용 AWS]

[기상 관측 시스템 구성도]



[WSN 기반의 기상필드서버 시스템 구성도]

- SK플래닛은 이동통신 기지국 기반의 날씨 서비스를 제공하는 실시간 국지 기상정보 통합 모니터링 시스템인 웨더플래닛을 개발하여 2014년 9월부터 서비스하고 있다. 이동통신 기지국에 자동기상관측소(AWS: Automatic Weather Station)를 설치하고 온도, 습도, 강수량, 기압, 풍속, 풍향 등의 기상정보를 실시간으로 제공하고 있다.
- 한국기상산업진흥원에서는 기상정보 실시간 웹 모니터링 시스템을 개발하여 전국 단위의 기상정보를 제공하고 있다. 전국의 강우·온도·풍속 관련 관측상황을 지역별로 그래픽을 통해 차이를 확인할 수 있도록 제공하고 있으며, 뇌우·구름·레이더 등의 기상변화를 애니메이션 영상으로 제공하여 가을장마와 집중호우, 태풍 등의 기상재해 예방에 도움을 주고 있다.

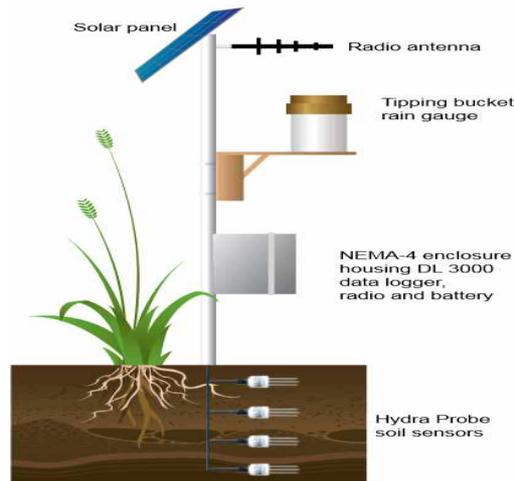


[SK플래닛에서 제공하는 국지성 기상정보 통합 모니터링 서비스]



[한국기상산업진흥원의 기상정보제공 흐름도]

- 미국의 모니터링 시스템 회사인 스티븐스는 농업 모니터링 시스템을 개발하였다. 이 시스템은 토양의 여러 변수를 모니터링하고, 작물 관리 정보를 결정하기 위해 사용자에게 데이터를 제공하며 수집된 데이터가 작물에 미치는 영향을 분석하기 위해 사용자의 기지국 PC로 송신한다.



[스티븐스 모니터링 시스템]

- 국내의 경우 대부분 기상관측을 하는 필드서버가 주를 이루고 있으며, 기상관측 분야를 제외한 필드서버 시장은 거의 전무한 실정이다. 이에 전반적인 토양의 여러 변수를 센싱하고 스마트폰을 통해 실시간 원격 모니터링을 가능하게 하는 필드서버 개발이 요구된다.
- 지금까지 개발된 필드서버는 작물의 기상 및 토양 정보에 대한 데이터들을 측정하고 모니터링을 통해 보여주는 것에 국한되지만, 본 연구에서 개발예정인 필드서버는 작물의 기상 및 토양 정보뿐만 아니라 작물의 환경장해/병해를 진단하고 위험경보를 농업인에게 알림으로써 예방할 수 있는 시스템으로 확대할 계획이다.

### ■작황예측 모형

- 기존의 농업관측업무는 표본 농가를 중심으로 재배(의향)면적과 작황조사를 기반으로 생산량을 예측하고 있다. 또한 현재 농업관측에서 운영하고 있는 생산량 예측모형은 설명변수가 과거 기상변수를 사용하였으나, 기상변수의 정형화된 예측치를 활용하지 못하였고, 단순한 선형식으로 구성되어 있어 기상변화와 환경장해, 병해충 발생 상황 등을 반영하지 못하고 있다.
- 농작물 생산량 예측에 일조시간과 같은 기상요인을 최초로 고려한 김장채소 공급함수를 추정하는 연구를 시작으로, 강수량 등을 추가하여 주요 과실류와 무·배추 생산량에 대하여 20개 미만의 시계열 자료를 이용하여 회귀분석을 적용한 연구가 있다.
- 과채류와 청과물의 단수에 미치는 기상요인의 영향력을 예측한 연구가 수행되었으며, 기상요인과 작황과의 관계를 분석하는데 사용되는 전통적인 선형회귀분석 대신 주요곡물인 쌀 단수에 미치는 기후변화의 영향을 비모수적 및 준모수적 분석방법을 적용한 연구도 수행되었다.

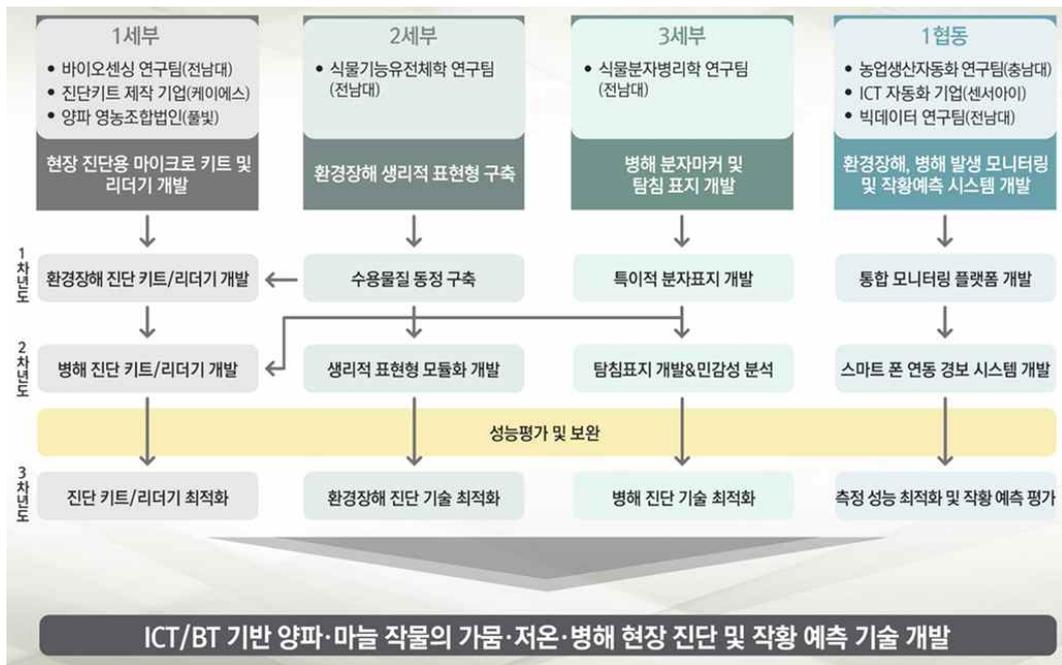
- 최근에는 쌀, 콩, 고랭지 배추 등 3개 품목의 단수예측모형으로서 패널회귀모형을 적용하여 출하기 1-2개월 전에 수확량을 예측하였으며, 또한 패널회귀모형을 이용하여 사과생산량에 영향을 미치는 기상요인에 대하여 분석하였다.
- EPIC 모형은 1981년 초 토양의 침식과 농작물간의 관계를 결정짓는 수리적 모형으로 개발되었으며, 경제적 평가 등 시뮬레이션도 가능한 모형이다. 투입되는 변수의 계수(parameter)를 조정하여 여러 나라에 적용된 사례가 있다. 또한, 장기적 추적 가능한 기상데이터를 이용하여 다양한 농업 기법 또는 기후변화의 영향을 평가하는 모형이라 할 수 있다.

## 다. 연구개발 범위

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용
1차년도	2015년	1세부	환경장애 현장 진단 마이크로 키트 및 리더기 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 양파·마늘의 가뭄·저온 현장 진단을 위한 마이크로 키트 개발</li> <li>- 색상 강도 측정 방식의 스마트폰 기반 키트 리더기 개발</li> </ul>
		2세부	양파·마늘 파속작물로부터 환경장애 프롤린 수용체 동정 및 함량 측정 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 환경장애 심화 기반에 따른 프롤린 분석 시스템 개발</li> <li>- 프롤린 함량 동정 및 기상장애 척도 기준 기술 개발</li> </ul>
		3세부	노균병원균·흑색썩음균핵병원균으로부터 특이적 분자의 항체 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PG 재조합 단백질 및 병원균으로부터 특이적 항체 개발</li> <li>- 양파·마늘 작물과 노균병원균·흑색썩음균핵병원균 간의 상호작용 단백질을 이용한 특이적인 항체 개발</li> </ul>
		1협동	ICT 기반 생육 모니터링 플랫폼 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 노지 현장적용이 가능한 필드 서버 플랫폼 개발</li> <li>- 작물 표현형 (색상, 형상)의 이동식 측정을 위한 영상획득 시스템 개발</li> <li>- 생육 환경 정보 (온도, 습도, 조도) 센싱 시스템 개발</li> <li>- 양파, 마늘의 생산량, 기상요인을 이용한 작황 예측의 패널 회귀 모형 개발(위탁)</li> </ul>
2차년도	2016년	1세부	병해 현장 진단 마이크로 키트 및 리더기 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 노균병, 흑색썩음균핵병 현장 진단을 위한 종이 기반 미세유체소자 개발</li> <li>- 광 스케터링 방식의 스마트폰 기반 센서 리더기 개발</li> </ul>
		2세부	ICT/BT 기법을 이용한 환경장애 프롤린 탐침 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 환경장애에 따른 파속작물의 통계학적 생리적 표현형 모듈 개발</li> <li>- ICT/BT 기법을 이용한 가뭄·저온 프롤린 탐침 기술 구축 및 개발</li> </ul>
		3세부	노균병·흑색썩음균핵병 특이 분자마커에 대한 탐침 표지 개발 및 민감성 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항체·항원 반응에 대한 특이적 결합 검정</li> <li>- 항체 민감성 및 특이적 반응성에 대한 최적화 시스템 구축</li> </ul>
		1협동	생육 모니터링 센싱 알고리즘 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 생육 모니터링을 위한 영상처리 알고리즘 개발</li> <li>- 생육 모니터링 플랫폼의 데이터 획득 및 제어 시스템 개발</li> <li>- 필드 서버를 이용한 기후정보 및 작물 표현형 데이터 측정</li> <li>: 주/야간, 측정위치, 생육 단계별</li> <li>- 다양한 모델 기반의 환경장애, 병해 발생 예측 모</li> </ul>

				형 개발(위탁)
3차년도	2017년	1세부	현장 실증 시험 및 진단 키트 최적화	- 현장 실증시험 및 진단 키트 최적화 - 현장 적용 매뉴얼 개발
		2세부	현장 실험 분석 및 환경장애 진단 최적화	- 가뭄·저온에 대한 현장 적용 실험 분석 - 현장진단 최적화 및 매뉴얼 개발
		3세부	현장 진단용 마이크로 키트의 현장 실험 분석 및 주요 병해 진단 최적화	-노균병균 및 흑색썩음균핵병균 진단용 마이크로 키트의 현장 적용 진단 실험 분석 -주요 병해 현장 진단 최적화 시스템 구축
		1협동	생육 모니터링 현장 적용 및 작황 예측 기술 개발	- 데이터 송수신을 위한 무선/원격 통신의 server-client간 프로토콜 개발 - 현장 적용을 위한 원격/무선 통신 시스템 및 사용자 어플리케이션 개발 - 양파, 마늘 생육 상태에 따른 실시간 알람/경보 플랫폼 개발 - 빅 데이터 기반의 작황 예측 모델 개발 및 성능평가를 통한 최적 모형 선정(위탁)

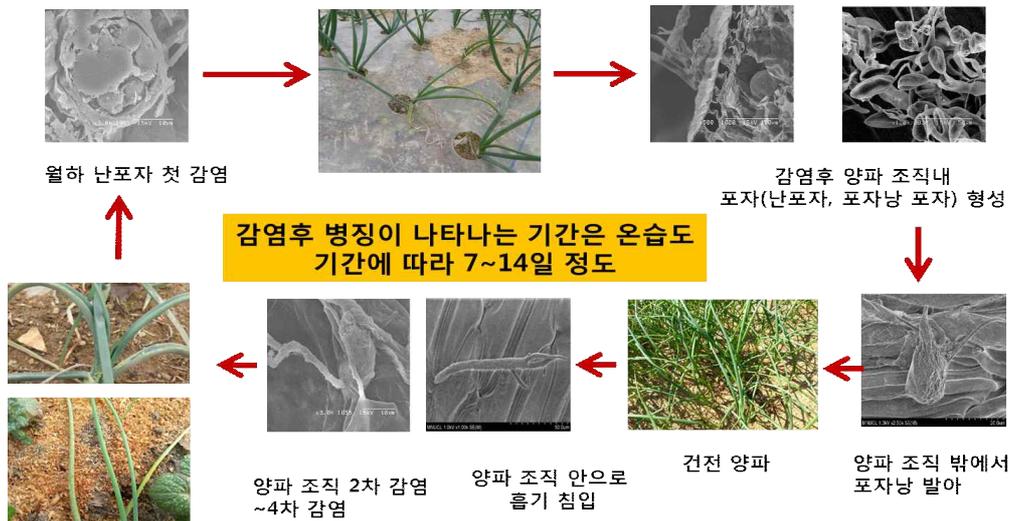
## 라. 연구개발의 추진전략 및 체계



### (1). 연구개발의 추진전략

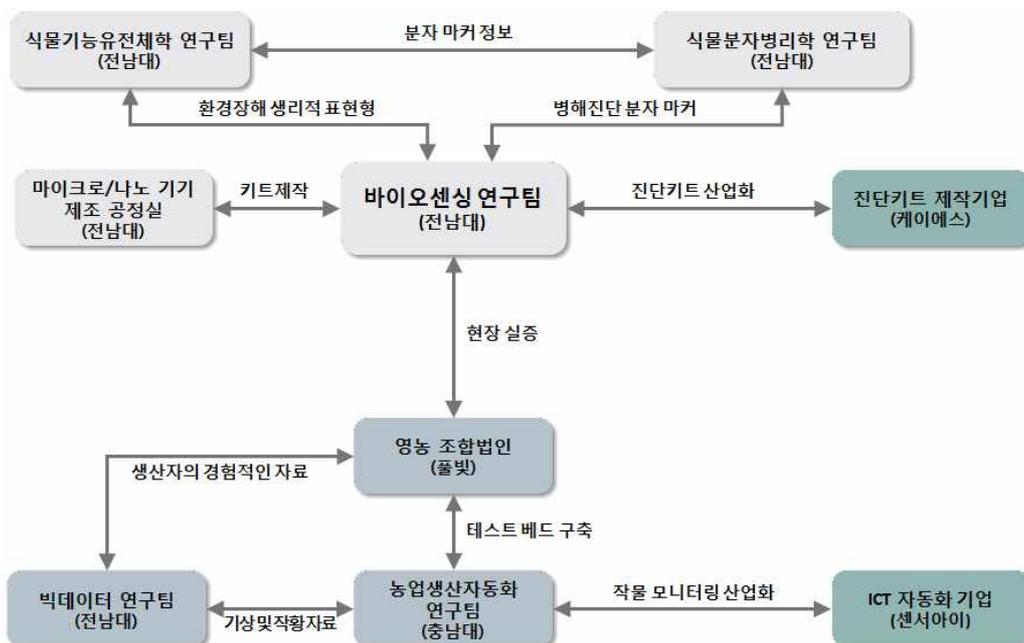
- 양파, 마늘의 노균병 특성 및 방제 방법, 식물과 병원균 상호작용 관련 연구 경험 등 본 연구 수행과 연관된 기초 연구 경험이 풍부한 연구진 배치를 통해 연구 개발 프로세스 중 발생하는 시행착오를 최소화.
- 국내의 대표적인 양파 및 마늘 재배지 선정 및 해당 지역의 숙련된 농업인, 영농법인 등 재배 현장 관련 종사자를 연구에 참여시켜 양파, 마늘의 환경장해, 병해의 발병 요인, 잠복기간, 특성 등을 요인을 사전에 정확하게 평가/분석하여 연구개발의 신뢰성을 향상시킴. 또한 개발과 동시에 현장 바로 적용함으로써 개발 기간 단축 및 조기 제품화를 실현할 계획임.
- 모니터링 시스템의 핵심부품 설계 및 통합 시스템 개발은 각각의 요소에 대한 layout 설계 결과를 토대로 시뮬레이션 수행하고 이를 통해 실제 설계에 앞서 동작 가능성 및 성능을 예측해봄으로써 연구의 효율성과 제품의 정확성 및 신뢰도를 향상시킴.
- 국내 농업 생산량 조사(통계청)에서 대상으로 정한 양파, 마늘 재배지에 대한 다양한 환경 측정 및 생육 상태의 빅 데이터를 구축하여 개발 제품의 예측 성능을 향상시킬 뿐만 아니라 연구 전반에 걸쳐 측정된 데이터와 제품화 이후에도 지속적인 데이터 관리를 통해 최적화 시킬 예정임.
- 양파, 마늘의 환경장해, 병해 진단은 본 연구개발 결과물의 핵심 기술로써 관련 연구 분야에서 가장 높은 전문성을 갖는 대학 및 연구팀을 통해 실시하였음. 이를 통해 환경장해, 병해의 진단 등에 대한 핵심 기술을 정립하고 논문, 학술발표 등의 학술적인 성과를 낼 계획임

- 작황 예측 모니터링 시스템은 시작품 제작 후 본 연구의 종료 시점까지 지속적인 보완과 검증을 통해 최적화시킬 것이며 과제 종료 후에도 지속적인 이력 관리를 통해 문제점을 보완할 예정이다.
- 본 연구개발의 효율적 관리를 위해 분기별 워크숍을 진행할 계획으로, 이와 동시에 관련 학계 및 연구기관의 전문가를 초청 및 활용하여 연구결과가 조기 사업화, 양산화 될 수 있도록 만전을 다할 계획이다.



양파 재배 현장의 사전 조사를 통한 노균병균의 잠복기간 특성 분석

## (2). 연구개발의 추진체계



## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 가. 연구수행내용

구분 (연도)	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1차 년도 (2015. 08.14 -2016. 08.13)	<ul style="list-style-type: none"> <li>종이센서 제작 및 설계 (1세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>왁스 프린팅 공정 기법을 이용한 종이센서 설계 및 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>종이에 흡수된 샘플의 흐름을 제어하거나 한 지역에 국한시키기 위해 소수성 물질인 왁스를 이용하여 패터닝 함</li> <li>친환경 고체 잉크인 왁스를 이용한 패터닝 공정은 포토리소그래피 공정과 같이 화학 약품에 종이가 노출되어 종이의 특성을 변화시켜 발생하는 문제점을 예방할 수 있음</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>종이센서를 이용한 프롤린 농도 측정 (1세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>닌히드린 반응을 이용한 프롤린 농도 측정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>아미노산의 일종인 프롤린은 닐히드린 분자와 특이적인 분해 결합을 통해 붉은 빛을 띰</li> <li>닐히드린 반응에 필요한 가열원은 폴리이미드 마이크로 히터를 이용하여 공급하였으며, 진단간 이미지를 획득하여 색상 강도를 분석 후 정량화</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>양파 가뭄 스트레스 조기 진단용 종이센서 개발 (1세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>가뭄 스트레스 단계에 따른 양파 내 프롤린 생성량 측정 및 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>양파의 가뭄 스트레스 조기 진단 가능성을 확인하기 위해 25일, 35일, 53일 동안 물을 공급하지 않고 샘플을 획득하여 프롤린 농도 측정(2세부와 협동)</li> <li>25일부터 53일까지의 양파 내 프롤린 농도는 100 <math>\mu\text{mol}</math>부터 300 <math>\mu\text{mol}</math>까지 증가하였으며, 제작된 종이센서 역시 위 범위의 프롤린 농도 측정이 가능함</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>소형화된 마이크로 히터 제작 (1세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>스마트폰 기반 키트 리더기 내 닐히드린 반응을 유도하기 위한 소형 히터 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>MEMS 공정을 이용하여 저전력에서도 가열이 가능한 소형 히터를 개발</li> <li>스마트폰과 블루투스를 이용하여 무선 통신이 가능하게 하였으며, 스마트폰의 제어를 통해 소형 히터의 온도를 제어함</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>작물 가뭄 스트레스 진단용 어플리케이션 개발 (1세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>발색 반응 색상 강도 분석을 통해 프롤린 정량화를 위한 스마트폰 앱 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Web inventor 프로그램을 이용하여 기본적인 앱 UI를 구성하고 세부 기능으로는 이미지 촬영, 분석이 가능하도록 함</li> </ul>

구분 (연도)	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1차 년도 (2015. 08.14 -2016. 08.13)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Paper sensor 제작 (위탁1)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>종이의 특성인 모세관 현상을 통하여 샘플을 흡수</li> <li>photolithography를 이용</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>양파 및 마늘의 환경장해를 진단하기 위한 검출부로서 종이의 특성인 모세관 현상을 통하여 샘플을 흡수하고 내부에 고정화된 물질과의 생화학 반응을 확인</li> <li>반도체 제작공정 중의 하나인 photolithography를 이용하여 친수성영역과 소수성 영역을 구분함으로써 샘플의 유량제어 및 분석 영역을 결정할 수 있음</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>노균병 screening stain (위탁1)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>곰팡이균주를 주로 염색하는 방법으로 노균병 균주 염색 실시</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fungus염색은 Grsm염색, Lacto phenol cottonblue염색, Hematoxl yline-eosin염색, Grocott염색, AFB 염색 방법 등이 있음</li> <li>세균등의 구조와 진균의 구조는 매우 유사한 구조를 가지고 있기 때문에 일반적으로 세균염색에 쓰이는 염색법으로도 진균염색을 실시할 수 있음</li> <li>이 중 Gram염색법과 Lactophe nol cottonblue염색이 가장 보편적으로 사용되고 있음</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>건조 수용체 개발 (2세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>프롤린 함량 및 PAP 기작의 산물에 대한 정량적 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>식물체 내 프롤린과 PAP phosphatase는 건조 수용체로 사용될 수 있음</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>가뭄 처리 기간별 토양 수분량 분석 (2세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>가뭄 처리 0 ~ 37일 기간별, 토양 내 수분량의 손실을 측정 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>가뭄 처리 5일 및 10일 후, 토양 수분은 각각 50% 및 70%까지 손실하였으며, 가뭄 처리 20일 정도에는 90%까지 손실율을 보였음</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>양파로부터 건조스트레스 관련 유도 유전자의 전사 발현 분석 (2세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>RT-PCR 및 qPCR에 의한 건조스트레스 관련 유도 유전자의 전사 발현 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>건조스트레스 하에서 RD29A 유전자의 전사 발현량은 정상조건에 비하여 약 14배, RAB18 유전자는 5배 정도 증가함을 알 수 있었음</li> </ul>

구분 (연도)	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
	<ul style="list-style-type: none"> <li>가뭄 처리 후, 양파 잎 부위별 프롤린 농도 분석 (2세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>가뭄 처리 0 ~ 53일에 대한 각 양파 품종별 중단부 및 하단부 부위별 프롤린 농도를 측정 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>조생종과 중생종은 잎 중단부의 프롤린 함량이 하단부보다 높았으며, 가뭄 처리 기간에 따라 프롤린 함량이 높았음.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>가뭄 처리 시간별, 마늘로부터 프롤린 농도 및 생리적 표현형 분석 (2세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>가뭄 처리 0 ~ 24시간에 대한 마늘의 프롤린 농도 및 생리적 표현형 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>마늘의 유식물체로부터 시간별 4, 8, 및 24 시간 건조 처리한 결과, 무처리 대조구 보다 각각 약 5, 7, 및 9배 정도 프롤린 함량이 높아짐을 알 수 있었음.</li> </ul>
<p>1차 년도 (2015.08.14-2016.08.13)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>노균병원균·흑색썩음균핵병원균 분리 및 최적의 배양 조건 확립 (3세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>식물병리학적인 방법을 통한 병원균 순수 분리 및 곰팡이 배양 조건 확립</li> <li>분자생물학적 방법을 이용하여 Genomic DNA 추출 및 PCR 방법을 이용한 ITS 염기서열 확인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>노균병원균·흑색썩음균핵병원균을 이병엽이나 토양으로부터 각각 순수 분리하여 PDA배지에 배양한 후 genomic DNA를 추출하여 ITS 프라이머를 이용하여 병원균을 확인함</li> <li>기존에는 흑색썩음균핵병원균을 PDA배지에서 배양 하였으나 양파와 양파 껍질을 적절히 혼합한 배지를 새롭게 조성하여 최적의 배양 조건을 확립하였으며 보리를 이용한 접종 방법도 확립함</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>노균병원균·흑색썩음균핵병원균 특이적 항체 및 양파와 병원균의 상호작용 관련 특이적 항체 개발 (3세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>병원균의 total RNA를 추출한 후 oligo dT 프라이머와 각 유전자의 특이적인 프라이머를 사용하여 RT-PCR를 수행함으로써 full-length 유전자 클로닝</li> <li>유전자의 염기서열을 확인한 후 아미노산으로 해독한 다음 항체로써 가능한 최적의 peptide 제작하여 항원으로 사용할 수 있게 토끼에 주사한 후 항체 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>노균병원균·흑색썩음균핵병원균의 Endo 또는 Exo polygalacturonase 유전자를 PCR 방법으로 클로닝한 후 최적의 peptide를 합성하거나 재조합 단백질을 이용하여 항체를 제작 중에 있음</li> <li>양파·마늘과 노균병원균·흑색썩음균핵병원균 등이 상호작용 시 특이적으로 발현하는 Oxaloacetate acetylhydrolase(Oah) 유전자를 클로닝하여 염기서열을 밝혀 peptide를 합성하여 항체를 제작 중에 있음</li> </ul>

구분 (연도)	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
	<ul style="list-style-type: none"> <li>노지 현장적용이 가능한 필드 서버 플랫폼 개발 (1협동)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>생육 환경을 측정할 수 있는 환경 계측 모니터링 시스템 개발</li> <li>외기, 토양의 온·습도 및 EC, 조도측정이 가능한 모니터링 시스템 개발</li> <li>IP6등급을 적용하여 열악한 포장 환경에서도 사용이 가능하도록 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>필드 서버에 GPS를 장착하여 현재 포장 위치를 실시간 전송</li> <li>외기센서, 토양의 온·습도센서, EC 센서, 조도 센서를 탑재한 모니터링 시스템을 이용하여 데이터를 전송</li> <li>필드계측데이터는 SD카드를 통하여 수집되며, 실시간 무선 통신을 이용하여 사용자에게 전송이 가능하도록 기능을 개발. 무선 통신을 이용한 사용자 모니터링, 알람 등은 3차년도에 개발</li> </ul>
<p>1차 년도 (2015. 08.14 -2016. 08.13)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>작물 표현형 (색상, 형상)의 이동식 측정을 위한 영상획득 시스템 개발 (1협동)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>상/하 이동식 측정이 가능한 스탠드형 CCD 카메라 개발</li> <li>실시간 생육 모니터링을 확인할 수 있는 영상 장치를 개발</li> <li>IP6등급을 적용하여 누수 등 열악한 포장 환경에서도 사용이 가능하도록 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>작물의 생육환경을 지속적으로 모니터링 할 수 있는 영상 획득 시스템 개발</li> <li>상/하 이동 모터를 이용하여 작물의 높이에 따라 리프팅이 가능하도록 개발</li> <li>카메라 tilting 기능을 이용하여 좌/우의 작물 영상 획득이 가능함</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>생육 환경 정보 (온도, 습도, 조도) 센싱 시스템 개발 (1협동)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>마이크로프로세서를 이용하여 온도, 습도, 조도 등의 환경 센싱 시스템 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>열악한 포장 환경에서 사용이 가능한 센서 선정, 포장 테스트를 통한 센서 시스템의 신뢰성 확보</li> <li>Arduino 범용 칩을 사용하여 다양한 센서의 확장성 제공</li> <li>병해 진단을 위한 센서의 추가 장착은 2차년도에 진행</li> <li>필드 서버를 통하여 측정된 기상 등의 값과 기상청 값과의 비교를 통한 시작품 신뢰성 확보</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>작황예측을 위한 기상요인분석 (위탁2)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>기상자료 수집</li> <li>2006년~2015년</li> <li>대상지: 양파주산지 13개 지역</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>상관분석, 다중회귀분석을 통하여 선택된 양파 생산량에 영향이 미치는 9가지 기상요인 추출</li> </ul>

구분 (연도)	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
2차 년도 (2016. 08.14 -2017. 08.13)	<ul style="list-style-type: none"> <li>프롤린-닌히드린 반응 최적화 및 microplate 기반의 다중 분석법 개발 (1세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>프롤린을 추출하는데 사용되는 sulfosalicylic acid 및 ninhydrin을 구성하는 시약들의 변경을 통해 프롤린-닌히드린 반응을 최적화</li> <li>많은 수의 샘플을 동시에 분석하기 위하여 dry oven과 microplate를 사용한 다중분석법 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ninhydrin 시약을 구성하는 toluene 및 phosphoric acid를 제거했을 때 프롤린-닌히드린의 반응이 짧아지고 감도가 향상됨</li> <li>프롤린 추출을 위해 사용되는 sulfosalicylic acid의 농도를 1% 했을 때 프롤린-닌히드린 반응의 감도가 개선됨</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>작물 가뭄스트레스 검출을 위한 종이기반의 밀폐된 바이오센서 제작 (1세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>왁스프린팅 및 오리가미 방법을 사용하여 종이기반의 밀폐된 바이오센서 개발</li> <li>암실에서 얻은 종이센서의 이미지를 RGB분석을 통해 프롤린 농도 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>왁스프린팅 및 오리가미 방법을 사용하여 4층 구조의 종이기반 밀폐된 바이오센서 제작</li> <li>제안된 센서는 닐히드린이 미리 코팅되어 있어서 측정샘플을 로드만하면 프롤린의 농도를 분석할 수 있으며 최소 50µM까지 분석 가능</li> <li>일정한 광원을 가지는 암실에서 종이센서를 카메라 찍어서 RGB분석을 통해 프롤린 농도를 정량화함</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>작물의 병해를 진단하기 위한 종이기반의 PG 검출 센서 제작 (1세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>왁스프린팅 및 오리가미 방법을 사용하여 작물의 병해를 진단하기 위한 종이기반 PG검출 센서 개발</li> <li>암실에서 얻은 종이센서의 이미지를 RGB분석을 통해 PG 농도 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>최초로 PG 검출을 위한 종이기반의 센서를 왁스프린팅 및 오리가미 방법을 사용하여 제작함</li> <li>상용 PG를 통해서 PG unit에 따른 흡광도 크기의 변화에 대한 standard curve 확보함</li> <li>제안된 종이센서는 최소 0.1unit의 PG까지 검출 가능함</li> <li>균사체에서 얻은 실제 PG 샘플을 종이센서에 적용하여 측정된 결과 0.1unit의 PG가 검출됨</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>작물의 가뭄 스트레스 및 병해를 동시에 진단할 수 있는 종이기반의 센서 제작 (1세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>왁스프린팅 및 오리가미 방법을 사용하여 가뭄 스트레스 및 작물의 병해 진단을 위한 종이기반의 센서 개발</li> <li>닌히드린 로드량 및 PGA-RR complex의 균일한 코팅 방법을 최적화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>왁스프린팅 및 오리가미 방법을 사용하여 4층 구조의 가뭄 및 병해를 동시에 진단할 수 있는 종이기반의 센서 제작함</li> <li>가뭄 및 병해를 동시에 진단할 수 있는 센서는 가뭄 진단센서 및 병해를 진단 센서와 같은 감도를 가짐</li> </ul>

구분 (연도)	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
2차 년도 (2016. 08.14 -2017. 08.13)	<ul style="list-style-type: none"> <li>현장에서 환경장애 및 병해를 진단하기 위한 휴대용 진단 키트 개발(1세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>환경장애 및 병해 진단 키트의 자동화를 위해 MCU기반의 회로 제작</li> <li>휘스톤브릿지 회로를 사용하여 온도센서의 저항 변화를 측정하여 온도 변화를 정밀하게 조절</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>스마트폰과 블루투스를 이용하여 무선 통신이 가능하게 하였으며, 스마트폰의 제어를 통해 소형 히터의 온도를 제어함</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>작물의 가뭄 스트레스 및 병해 진단용 어플리케이션 개발(1위탁)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>가뭄 및 병해에 의해서 나타나는 발색의 변화를 정량적으로 분석할 수 있는 스마트폰 앱 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Web inventor 프로그램을 이용하여 기본적인 앱 UI를 구성하고 세부 기능으로는 이미지 촬영, 분석, 결과 저장 및 전송이 가능하도록 함</li> <li>샘플의 측정 위치를 직접 입력하거나 스마트폰 내 GPS 센서를 이용하여 나타낼 수 있도록 프로그램 하고 맵핑 자료로 이용을 위해 데이터 전송</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>가뭄 처리 후, 마늘 작물의 생리적 표현형 및 토양 수분량 분석(2세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>기간별 가뭄 처리 0 ~ 36일에 대한 마늘 작물의 생리적 표현형 분석 및 pots 내 토양 수분의 손실을 측정 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>가뭄 처리 24일 이후, 마늘 작물이 정상조건하에서보다 잎생장과 생육이 이루어지지 않았으며, 특히 27일 이후에는 잎 끝부분에서 황화현상이 진행되었음</li> <li>가뭄 처리 기간별 토양 수분 손실을 분석 결과, 가뭄 처리 5일 만에 토양 수분 손실율이 50%에 도달하였음</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>가뭄 처리 후, 마늘 작물구근의 생리적 표현형 분석(2세부)</li> <li>가뭄 처리 후, 마늘 작물의 측정 부위별 프롤린 함량 분석(2세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>정상 조건 및 가뭄 처리 18일 및 36일 후, 마늘 작물 구근의 생리적 표현형 분석</li> <li>가뭄 처리 0 ~ 36일에 대한 난지형 마늘 작물의 중단부 및 하단부 부위별 프롤린 농도를 측정 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>건조 처리 36일 후, 무처리 대조구 보다 마늘 구근 크기가 상대적으로 더 작음을 알 수 있었고, 뿌리 생장과 발달이 제어됨을 알 수 있었음</li> <li>건조 처리 18일과 36일 후 구근의 무게는 무처리 대조구 보다 각각 약 30% 및 45% 정도 감소함을 알 수 있었음</li> <li>잎 하단부의 프롤린 함량이 중단부보다 높았으며, 가뭄 처리 기간에 따라 프롤린 함량이 높았음</li> </ul>

구분 (연도)	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
	<ul style="list-style-type: none"> <li>저온 처리 후, 양파 작물의 품종별 및 측정 부위별 프롤린 농도 분석(2세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>저온 (40C) 처리 28일 후, 양파 품종별 생리적 표현형 및 프롤린 농도 비교 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>저온 (40C) 처리 28일 후, 각 샘플로부터 프롤린 함량을 측정 한 결과, 저온 처리 기간에 조생종, 중생종 및 만생종은 잎 중단부의 프롤린 함량이 하단부 보다 높았음</li> <li>반면에 조생종과 만생종은 중생종에 비해 프롤린 함량이 적었으며, 조생종과 만생종은 서로 프롤린 함량이 유사함을 알 수 있었음</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>병해스트레스에 대한 양파 작물의 프롤린 함량 분석(2세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>노균병에 감염된 초기 및 중기 양파 샘플로부터, 프롤린 함량 변화 비교 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>가뭄과 저온 센싱 프롤린 수용체가 파속작물의 병해 스트레스에 대해서도 인지함을 알 수 있었음</li> </ul>
2차 년도 (2016. 08.14 -2017. 08.13)	<ul style="list-style-type: none"> <li>건조스트레스에 대한 식물 세포 내 새로운 수용체 개발(2세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>HPLC 및 qPCR에 의한 1차와 2차대사 관련 산물의 산량과 관련 유전자의 전사 발현 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>가뭄 관련 저항성 애기장대 돌연변이체 (atrzf1)와 민감성 돌연변이체 (pca17)를 이용, PAP pathway 및 항 대사 작용을 분석한 결과, 시스테인 (Cys)이 건조 관련 수용체로 사용할 수 있음을 알 수 있었음.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>항체의 항원에 대한 특이적 결합, 민감성 및 반응성 검정(3세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>유전자 클로닝 및 재조합 단백질 정제</li> <li>anti-ScPG 항체 제작 및 항체 특이성 확인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>흑색썩음균핵병균인 S. cepivorum으로부터 PG 유전자 클로닝 및 대장균으로부터 PG 재조합 단백질 정제하여 항체 제작에 이용함</li> <li>재조합 PG 단백질을 이용해 anti -ScPG 항체 제작 및 흑색썩음균핵병이 걸린 양파로부터 항원-항체 특이성 및 민감성을 확인함</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>LAMP 기법을 활용한 양파 노균병원균 조기 검출(3세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>LAMP Primer 제작 및 최적의 조건 확립</li> <li>양파 노균병원균 조기 진단법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>LAMP 기법에 이용할 F3, B3, FIP(F2+F1c), BIP(B1+B1c) 4개의 primer 제작 및 LAMP 최적의 반응 온도와 반응 시간 조건을 확립함</li> <li>LAMP 기법을 활용해 이병엽으로부터 양파 노균병원균 확인 및 특이적으로 노균병원균에만 반응하는 조건을 확립함</li> </ul>

구분 (연도)	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
2차 년도 (2016. 08.14 -2017. 08.13)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 생육 모니터링을 위한 영상처리 알고리즘 개발 (1협동)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 영상처리 장치의 영상 판독, 변형 등을 통한 작물의 영상처리 알고리즘 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 영상처리 알고리즘은 Image noise filtering, HSV conversion, Color distance calculation. Detection by distance threshold, Detection by blob detection, Area rate calculation의 순서로 진행</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 양파의 장변, 단변, 높이를 PTZ 카메라로 측정하여 이미지 획득</li> <li>- 이미지 필터링을 통하여 잡음 제거한 후 HSV conversion으로 변환하여 임의의 색상과의 거리를 계산</li> <li>- 문턱치(threshold) 처리 방법을 통해 양파 앞의 갈변된 부분을 검출할 수 있는 알고리즘 개발</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 생육 모니터링 플랫폼의 데이터 획득 및 제어 시스템 개발 (1협동)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 생육 모니터링 영상획득 시스템은 모터를 구동시키는 구동 시스템과 작물을 촬영하는 영상 입력부로 구성하여 이동식 측정 시스템 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 구동 모터 시스템은 카메라의 상/하 이동이 가능하도록 스테핑 모터와 모터 제어프로그램으로 구성</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 구동 PC는 영상 입력 컴퓨터와 RS232 시리얼 통신 포트를 통하여 모니터링 PC와 연결되었으며, 모터 구동 프로그램은 영상처리부가 보낸 신호를 모터 구동 PC가 수신을 한 후 모터를 회전시켜 모터를 제어함</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 필드 서버를 이용한 기후정보 및 작물 표현형 데이터 측정 : 주/야간, 측정위치, 생육 단계별 (1협동)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 영상촬영 시간간격을 각각 다른 위치의 양파를 선정하여 30분 주기로 측정               <ul style="list-style-type: none"> <li>- PTZ 카메라는 작물의 생육 환경을 자세히 확인 할 수 있게 32배 줌 ~ 512배줌까지 가능한 렌즈 사용</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 양파, 마늘의 측정은 전라남도 무안 국립식량과학원에서 실시하였으며 측정 주기는 30분 단위로 실시함</li> <li>- 주/야간에 따른 양파, 마늘의 생육환경 정보를 확인할 수 있었으며 측정위치 에 따른 양파의 앞의 변화를 측정함</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 병해발생 예측을 위한 기상요인 분석(위탁2)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기상자료 및 시도별 병해충예찰 자료 수집</li> <li>• 2016년 농촌진흥청 국가농작물병해충관리시스템과 기상청자료</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 발병 1, 2 개월 전의 유의한 기상 요인 추출</li> <li>- 월평균기온, 월평균상대습도, 월평균최저기온, 월누적강수량</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 병해발생 예측모형 구축(위탁2)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GAM(Generalized Additive Model) 모형</li> <li>• 프로빗(Probit)에 의한 발병주율 모형화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 프로빗 일반화방법모형</li> <li>- <math>\Phi^{-1}(\pi(\mathbf{x})) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_q x_q + f_{q+1}(x_{q+1}) + \dots + f_p(x_p) + \epsilon</math></li> <li>- 실증분석: 광역 지역별 예측결과</li> </ul>

구분 (연도)	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
	<ul style="list-style-type: none"> <li>가뭄, 냉해 및 저온을 정밀하고 신속하게 검출하기 위한 개선된 고감도 종이센서의 제작 (1세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2차년도에 개발한 종이센서의 정밀도를 가지면서 센서의 센싱속도 향상 및 히터의 파워 소비를 줄인 다층구조의 종이센서 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2차년도 제작된 센서는 센서부가 4층에 존재해서 센싱속도가 느리며 파워소비가 크다는 단점을 가지지만 개선된 센서는 센싱부가 2층에 존재해 센싱속도는 기존에 비해 4배 빨라졌으며 파워 소비도 1/4로 줄어듬.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>현장에서 재배한 양파에서 다양한 환경장애(냉해, 저온, 가뭄)의 진단 (1세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>제안된 종이센서의 현장 사용가능성 파악을 위해 일정한 환경에서 양파에 가뭄, 냉해 및 저온스트레스를 인가 후 프롤린 검출 실험 진행</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>실험군은 냉해 스트레스, 저온 스트레스, 건조 스트레스로 나누어 스트레스를 처리함. 다양한 스트레스 처리된 샘플은 최적화된 종이센서를 이용하여 프롤린을 검출하여 결과를 정량함.</li> </ul>
<p>3차년도 (2017.08.13-2018.08.13)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>작물의 병해 진단을 위한 비색법을 사용한 종이센서 및 종이기반의 효소 결합 면역반응 센서 제작 (1세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>작물의 질병을 일으키는 균류에 의한 감염을 확인하는 바이오 마커로써 펙틴의 주요 구성물질 중 하나인 PG를 사용함</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>PG의 활성 정도를 현장에서 간편하게 검출하기 위하여 왁스프린팅 기반의 종이기반 센서를 제작.</li> <li>P-ELISA는 기존에 96 웰플레이트에서 수행되었던 ELISA를 종이기반의 효소 면역흡착 분석법으로 수행함. P-ELISA는 종이를 사용하여 제작의 용이성 및 측정시간을 단축하는 장점을 가짐</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>환경장애 및 병해진단을 위한 휴대용 진단키트 및 매뉴얼 제작 (1세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>종이센서가 센서모듈에 장착되어 있는 상태에서 히터를 이용, 발색반응을 유도하고 스마트폰을 이용하여 발색정도 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>PCB와 접사렌즈가 집적화된 본체, 종이센서에 열을 가하기 위한 두 개의 세라믹 히터가 집적화된 센서모듈, 환경장애 및 병해를 진단할 수 있는 종이센서, 종이센서의 발색반응을 촬영 분석하기 위한 스마트폰으로 구성하여 스트레스 분석.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>환경장애 및 병해진단을 위한 어플리케이션 및 매뉴얼 제작 (1위탁)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>가뭄 및 병해를 분석할 수 있는 스마트폰 앱 및 매뉴얼 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2차년도에 개발한 어플리케이션 촬영, 분석, 결과 저장 및 전송이 가능하도록 함</li> <li>샘플의 측정 위치를 직접 입력 하거나 스마트폰 내 GPS 센서를 이용하여 나타낼 수 있도록 프로그램 하고 맵핑 자료로 이용을 위해 데이터 전송함</li> </ul>

구분 (연도)	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
3차 년도 (2017. 08.13 -2018. 08.13)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 냉해스트레스에 대한 양파·마늘의 생리적 표현형 분석 및 잎 측정부위별 프롤린 함량 비교 분석 (2세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 겨울철 4일 동안 지속된 냉해스트레스 (영하 섭씨 2도) 조건하에 자란 양파·마늘의 생리적 표현형 분석 및 세포 내 프롤린 함량 비교 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 양파·마늘 작물들은 모든 잎에 시들음 현상을 초래한 것을 알 수 있었고, 구근의 발달은 거의 이루어지지 않았음</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 파속작물의 현장적용 진단 실험 분석 및 환경장해 진단 키트에 대한 성능 평가 분석 (2세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 생리적 스트레스를 입은 양파 작물의 잎 중단부 샘플로부터 추출물을 확보한 후, 제 1세부과제에서 제작한 종이 진단 키트를 이용, 프롤린 민감도 비교 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 제 1세부과제에서 제작한 종이 진단 키트를 가지고 스트레스 인지 수용체 프롤린 탐침을 진단한 결과, 정량적 데이터와 유사하게 색깔 변화가 나타남을 알 수 있었음. 이러한 결과들은 프롤린이 작물 스트레스에 대한 종이 센서 진단 마커로 이용될 수가 있음을 알 수 있었음.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 노균병과 흑색썩음균핵병에 조기 진단 최적화 시스템 확립 및 현장 적용 (3세부)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● LAMP 기법을 이용해 양파 노균병과 흑색썩음균핵병 조기 진단법 확립</li> <li>● 최적의 노균병과 흑색썩음균핵병 조기 진단법을 활용한 효율적인 병해 방제력 개발 및 농업 현장 적용</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 최적의 노균병과 흑색썩음균핵병 조기 진단법을 활용하여 육묘 관리부터 본밭까지의 효율적인 양파 주요 병해 방제력을 확립하여 농업현장에 적용하였음</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 생육 데이터 송수신을 위한 무선/원격 통신 기술 개발 (1협동)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 생육환경 모니터링시스템을 이용하여 무선/원격 통신 기술 개발</li> <li>● 스마트폰 어플을 이용하여 실시간 작물의 생육환경 데이터 확인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 노지에서 현장적용을 통하여 실시간 작물의 생육환경 정보 수집</li> <li>- 스마트폰 어플을 이용한 대기 온·습도, 토양 온·습도, 토양 EC, 조도의 데이터 실시간 확인</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 작물 표현형 데이터 기반 생육정보 알람 및 경보 플랫폼을 개발 (1협동)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 딥러닝 기반 양파, 마늘의 질병 데이터 학습</li> <li>● 양파, 마늘의 질병 발생을 인식 및 알람체계 구축</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 양파, 마늘의 질병 인식을 위한 학습데이터 구축 및 양파 재배 시 질병 발생율을 측정</li> <li>- 양파, 마늘의 재배의 실시간 모니터링 및 질병 인식, 알람체계 구축을 위해서 학습단위 영상의 통합 및 전체영상 내 질병의심영역 시각화를 수행함</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 병해발생 예측모형 구축(위탁2)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● GAM(Generalized Additive Model) 모형</li> <li>● 프로빗(Probit)에 의한 발병 주율 모형화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 프로빗 일반화가법모형</li> <li>- <math>\Phi^{-1}(\pi(\mathbf{x})) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_q x_q + f_{q+1}(x_{q+1}) + \dots + f_p(x_p) + \epsilon</math></li> <li>- 실증분석: 광역 지역별 예측 결과</li> </ul>

## ■ 제1세부과제 연구내용 및 결과

### (1) 1차년도 연구내용 및 결과

#### 가. 바이오 센싱 분야에서의 종이센서 적용

- 작물내의 가뭄 및 저온 스트레스는 작물의 생장과 수확량에 직접적인 영향을 미치기 때문에, 조기에 징후를 감지하여 진단하고 적절한 대처를 통해 피해를 최소화 하여야 함. 현재까지 작물의 가뭄 및 저온 스트레스를 진단하기 위해 다양한 분야에서 수많은 연구가 진행되어 왔으며 대표적으로 광학 분석 방법, 이미지 분석 방법, 엽록소 측정 방법 등이 수행되고 있음. 하지만 이러한 진단 기술들은 고가의 장비, 전문 분석 수행원, 환경에 따른 제약 등 많은 단점들이 있으며 작물 스트레스를 조기에 진단하는데 어려움이 따름. 따라서 본 연구에서는 종이센서를 이용하여 작물의 가뭄 스트레스를 진단하고자 함.
- 종이는 자연 어디에서나 손쉽게 구할 수 있는 물질로서 저비용, 유연성, 간편성을 모두 갖추고 있으며 모세관 현상으로 인해 주입된 시료의 이동이 외부의 동력 없이 가능하기 때문에, 최근 들어 바이오센싱 분야에서 새로운 현장 적용형 진단 기술로 높은 관심을 받고 있음. 본 연구에서는 제 2세부과제의 연구결과를 바탕으로 가뭄 및 저온 저항성 물질인 프롤린을 환경장해 맞춤형 수용체로 선택하고, 아미노산 검출 방법인 닌히드린 반응을 이용하여 작물의 가뭄 스트레스를 조기에 진단이 가능하도록 하고자 함.

표 1. 가뭄 스트레스 진단 방법 비교

진단방법		진단비용	휴대성	조기진단	분석시간	Ref.
Paper-based microfluidic sensor		○	○	○	4 min	
M o l e c u l a r  B i o l o g y	mass spectrometer	△	×	○	50 min	Mouhssin Oufir et al., 2009.
	colonization	×	×	○	30 min	Rupam Kapoor et al., 2012.
	Grapevine responsive method	○	×	△	50 min	Zhen-Hua Cui et al., 2016.
O p t i c a l	spectroradiometer	△	×	×	30 min	Lingtong Du et al., 2012.
	Infrared Thermal Imaging	○	×	○	30 min	S. Zia et al., 2013.
	cavity-enhanced multi-gas Raman spectrometry (CERS)	△	△	○	30 min	Stefan Hanf et al., 2015.

○ : 좋음, △ : 보통, X : 나쁨

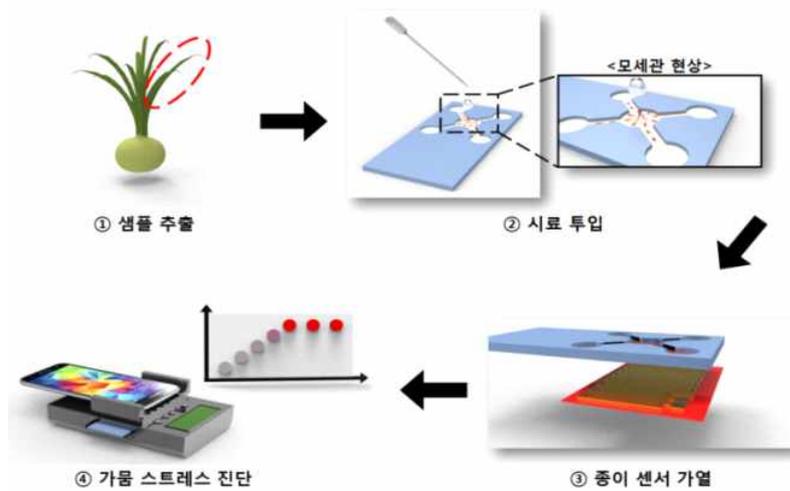


그림 1. 왁스 프린팅 공정 기법을 이용한 종이센서 제작 개략도

## 나. 종이센서의 재질 선택

○ 종이센서 기술의 발달과 다양한 기술과의 접목으로 인해 glucose, lactate, protein과 같은 생물학적 물질들의 정성 분석이 가능하게 되었고 검출 성능 역시 향상됨. 주로 종이센서에 이용되는 비색법을 비롯하여 분광 분석법, 면역 분석법, 전기화학 분석법 등 다양한 기술들과 접목하여 센서의 성능을 높일 수 있도록 연구가 이루어지고 있지만 가장 기본적으로 고려되어야 할 사항은 종이의 재질 선택임. 종이센서를 제작하기에 앞서 활용 목적에 맞는 적합한 재질을 선택하는 것은 센서의 성능을 좌우할 수 있음. 현재 대부분의 종이센서는 whatman 크로마토그래피 종이를 기본 센싱 플랫폼으로 이용하고 있으며 표 1.에 그 종류와 각 종이의 물리적 특성이 나타나있음.

표 2. 종이 재질의 종류와 물리적 특성

	크로마토그래피 종이		
	1 Chr	3MM Chr	4 Chr
중량 ( $gm^{-2}$ )	87	189	93
두께 (mm)	0.18	0.34	0.21
다공성 (s)	10.9	19.1	3.4
유속 (mm/min)	4.3	4.3	6
입자보존 ( $\mu m$ )	11	6	20



그림 2. 재질에 따른 종이 표면 섬유 조직의 형상. (a) Grade 1 Chr, (b) Grade 3MM Chr

- 종이의 두께, 중량, 다공성, 유속 등은 종이의 성능을 결정하는 주된 요소로서 각 용도에 따라 다양하게 이용될 수 있다. 예를 들어 Grade 4 Chr 종이의 경우 다른 두 종이에 비해 샘플의 흐름이 빠르기 때문에 높은 분해능 보다는 샘플의 빠른 이동이 결과에 중요한 영향을 미칠 때 사용됨. 본 연구에서는 작물의 가뭄스트레스를 진단하기 위해 두께와 중량에 비해 유속이 느려 소량의 시료로도 안정적인 화학 반응을 유도하여 가장 표준적으로 많이 사용되고 있는 Grade 1 Chr을 선택하였음.

#### 다. 종이센서 제작 공정 및 설계

- 투입된 시료를 원하는 지역으로 이동시키거나 국한시키기 위해서는 친수성 물질인 종이를 소수성 영역과 분리하기 위한 제작 공정이 필요함. 현재까지 활용 목적에 따라 포토리소그래피, 왁스 프린팅, 잉크젯 프린팅, 커팅 등 다양한 방법들이 많은 연구자들에 의해 보고되었음. 각 제작 공정의 특징과 장단점이 표 2.에 나타나있음.

표 2. 종이센서 제작 공정 방법과 각 방법에 대한 채널 폭의 한계, 소수성 구분 물질, 장단점.

제작 방법	채널 폭 (um)	물 질	장단점
Photolithography	186 ± 13	SU-8	- 채널을 정교하게 인쇄할 수 있으며 분해능이 좋음 - 유기화합물로 인해 종이의 재질이 손상을 입을 수 있음
Wax printing	561 ± 45	Wax	- 제작 공정이 간단하고 짧은 시간에 - Wax 흡수 과정에서 채널의 정교함이 낮아질 수 있음
Plasma treatment	1500	AKD	- 단순한 모양의 패턴의 종이센서의 대량 생산에 적합함 - 구조가 변경될 때마다 금속 마스크의 제작이 별도로 필요로 함
Cutting	1000	-	- 별도의 공정 과정이 필요로 하지 않고 종이의 본래 성질을 보존할 수 있음 - 정교한 모양의 구조를 만들기 어려우며 시료가 누수될 가능성 있음

- 본 연구에서 사용한 종이센서 제작 공정은 왁스 프린팅 공정으로서 작물 가뭄스트레스 진단을 위한 마커가 되는 프롤린이 다른 화학 약품의 영향을 받지 않고 안정된 반응을 보일 수 있도록 하였음. 소수성 특성을 띄며 친환경 물질인 왁스를 whatman 크로마토그래피 종이에 인쇄하기 위해서 고체 잉크 전용 프린터인 Xerox사의 Colorqube 8570DN을 사용하였고 종이센서 마스크 구조는 AutoCAD 2008을 이용하여 설계하였음. 센서의 구조는 소수성 영역으로서 시료의 흐름을 제어할 수 있는 역할을 하는 2 cm x 2 cm의 사각형 구조 안에 친수성 영역인 지름 6 mm의 원이 위치할 수 있도록 하였음. 인쇄된 종이는 고체 잉크가 종이

속으로 흡수될 수 있도록 다시 한 번 핫플레이트(PC-420D, Labnet, USA)를 이용하여 150°C에서 3분 동안 가열해 줌 (그림 3).

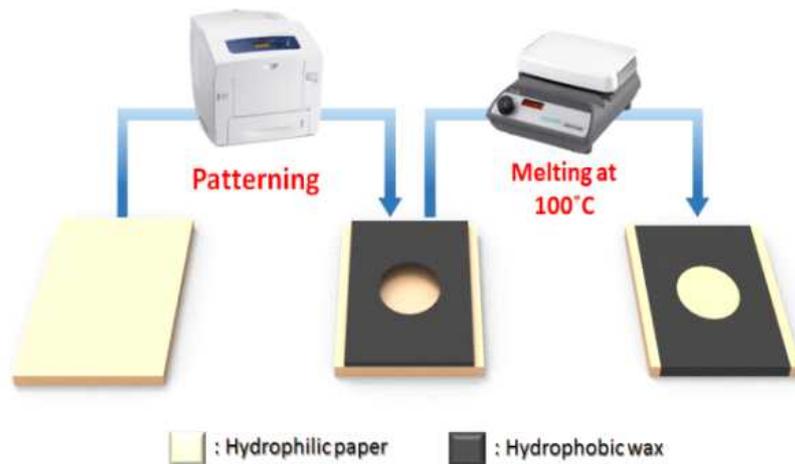


그림 3. 왁스 프린팅 공정 기법을 이용한 종이센서 제작 개략도

- 종이센서 제작 공정을 통해 친수성 영역과 소수성 영역이 잘 구분되었는지 검증하기 위해 유색 잉크를 떨어뜨려 확인해 보았음. 그림 4.에서 볼 수 있듯이 왁스로 인해 영역 간 구분이 잘 되었음을 알 수 있었고 빨간 잉크가 종이의 다른 부분에는 흡수되지 않고 오직 친수성 영역만을 따라 이동하는 것을 확인함.

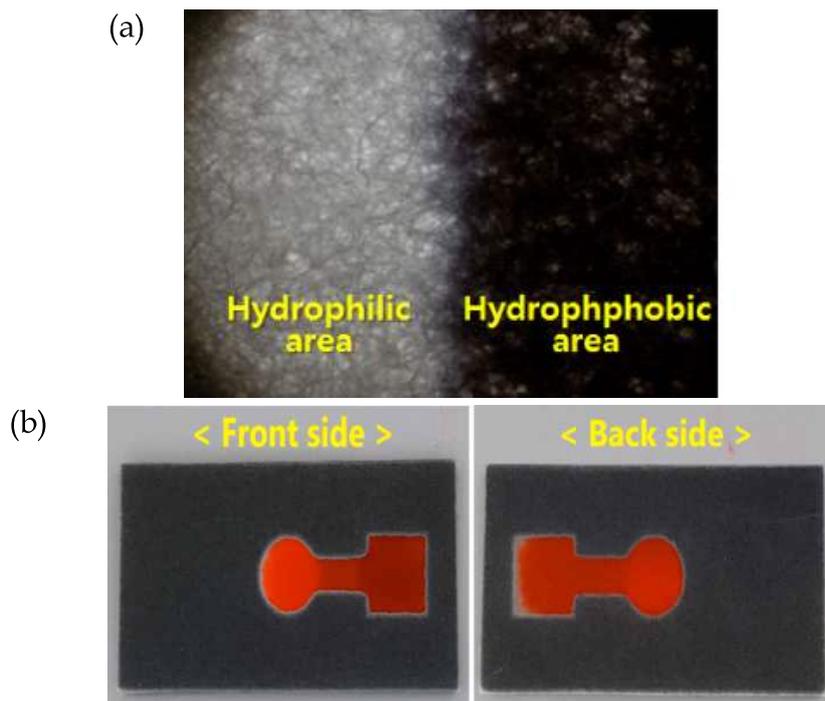


그림 4. 왁스 프린팅 공정 기법을 이용하여 제작된 종이센서.

(a) 패터닝 된 종이센서의 광학 현미경 이미지, (b) 투입된 시료의 흐름 결과

- 종이 기반 센서 구조의 전체 크기는 2 cm x 2 cm 이며 투입된 닐히드린-프롤린 샘플이 흡수되어 가열 과정을 통해 반응이 일어날 수 있도록 중앙에 지름 6 mm의 소수성 특성을 지닌 원형상의 reaction zone을 배치하였다. 또한 실제 현장에서 간편하고 신속한 진단을 위해 시료의 전처리 과정을 최소화 하는 것은 필수적이기 때문에 3  $\mu$ l의 닐히드린 용액을 1시간 동안 상온에서 건조하였으며, 휘발성인 닐히드린이 공기 중으로 증발된 부분을 보완하기 위해 3 반복을 수행하여 실험을 진행함.

## 라. 프롤린 및 양파 시료 준비

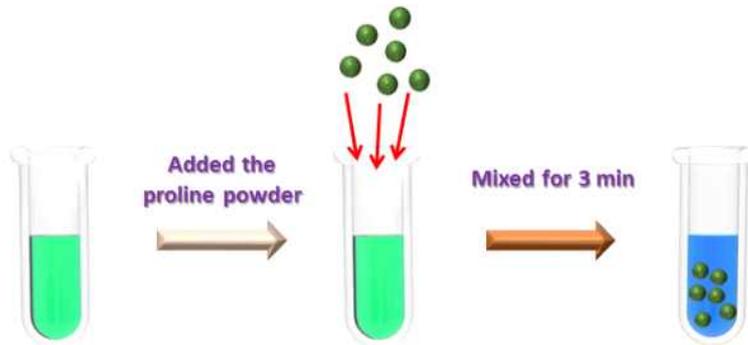


그림 5. 종이센서 성능 시험을 위한 프롤린 샘플 준비

- 종이센서의 프롤린 검출 성능을 시험하기 위해 순수한 프롤린 시약을 사용하여 5단계(5  $\mu$  mole, 10  $\mu$  mole, 25  $\mu$  mole, 50  $\mu$  mole, 100  $\mu$  mole)의 각기 다른 농도의 시료를 준비하였다. 프롤린 샘플은 3 % sulphosalicylic acid 1mL에 프롤린 시약을 첨가한 후 3분 동안 볼텍스 믹서를 사용하여 버퍼안의 프롤린이 잘 용해될 수 있도록 함. 닐히드린 용액은 80 % glacial acetic acid, 6.8 % phosphoric acid와 70.17 mM의 닐히드린을 이용하여 제조함 (그림 5).

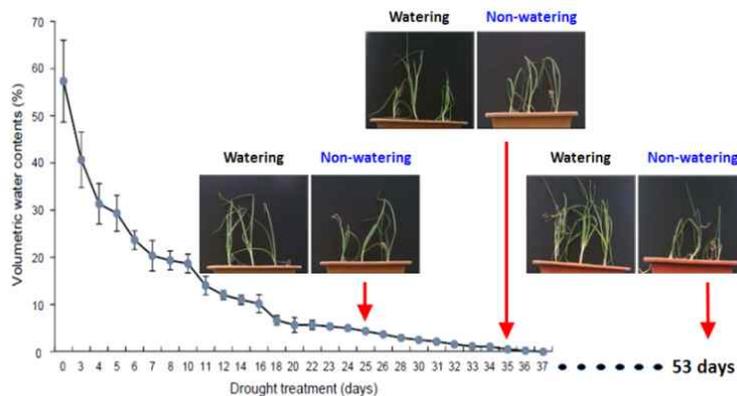


그림 6. 토양 수분 함량과 가뭄 스트레스 단계에 따른 양파 샘플의 모습 (Watering: 지속적으로 물을 공급해 주었을 때, Non-watering: 물을 공급하지 않았을 때).

- 실제 양파 샘플의 가뭄 스트레스를 진단하기 위해 조생종, 중생종, 만생종의 양파에 물을 공급하지 않고 수분 함량을 지속적으로 감소시킴. 기본적으로 화분의 토양이 머금고 있는 수분은 5일 만에 절반 이하의 수치로 줄어들었으며, 25일이 지난 이후부터는 양파 작물에 충분한 수분이 공급되지 않을 정도가 되었음. 따라서 25일부터 35일, 53일의 양파 샘플을 이용하여 가뭄 스트레스 진단을 하고자 함. 가뭄 스트레스 진단에 이용된 양파는 향후 현장 적용에 초점을 맞춰 중생종 중간 부분의 샘플을 추출함.

#### 마. 다투드린 반웅 최적화 (가열 온도, 가열 시간)

- 작물의 가뭄 스트레스 진단을 위해서는 식물체 내에서 축적되는 프롤린을 다투드린 반응을 통해서 검출하여야 함. 다투드린 반응을 통한 색 변화를 감지하기 위해서는 단백질의 가수분해를 촉진하는 가열 과정이 필수적임. 따라서 본 연구에서는 종이센서 내의 다투드린 반응 최적화를 위해 각각 70°C, 80°C, 90°C에서 가열을 해보았으며 시간에 따른 반응 정도를 확인하기 위해서 가열 시작 후부터 10초 간격으로 이미지를 획득함 (그림 7).

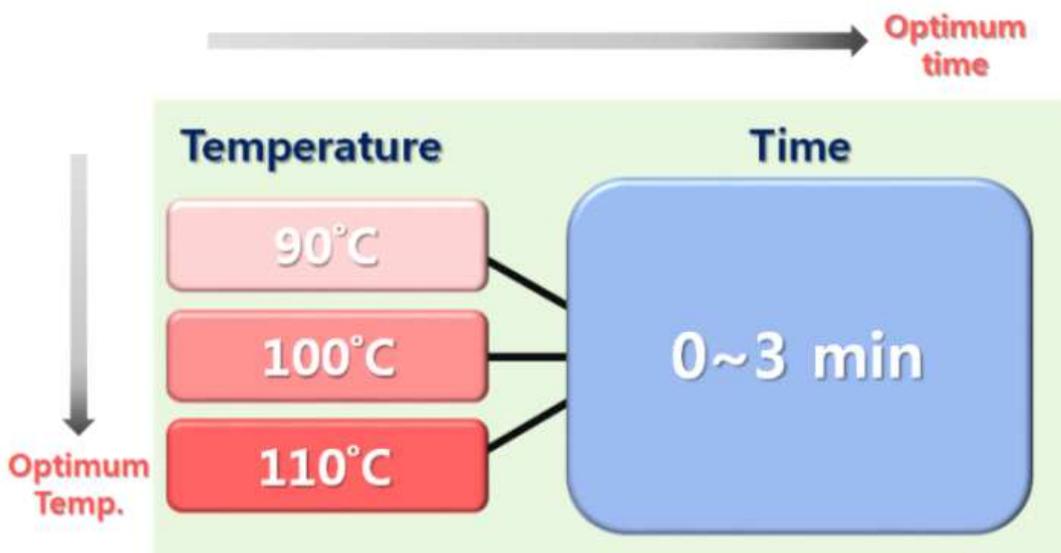


그림 7. 다투드린 최적 반응을 위한 실험 모식도

- 각 온도에 따른 다투드린-프롤린 용액은 3분 동안 반응을 시켰으며 10초 간격으로 촬영한 이미지를 분석해본 결과 90°C에서는 색상 강도가 꾸준히 증가하지만 다른 두 온도보다는 색 변화가 느리게 나타남. 하지만 110°C에서는 40초가 지난 시점부터 색 변화가 급격하게 일어나 120초 부근에서 반응이 완료되고 그 이후부터는 종이가 그을리는 문제가 발생하여 안정된 반응을 확인하는데 어려움이 따름. 따라서 가장 반응이 안정적이며 완료된 이후에도 같은 강도를 계속 유지하고 있는 100°C를 프롤린 검출을 위한 최적 온도로 설정함. 반응 시간은 3분이면 색상강도가 포화되어 시료 투입부터 4분 이내에 작물 가뭄 스트레스를 진단할 수 있을 것으로 판단함 (그림 8).

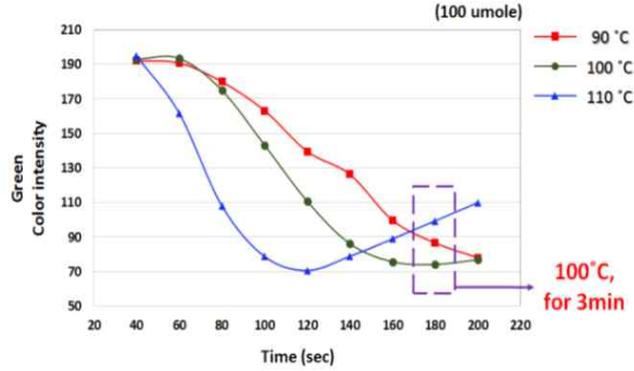


그림 8. 가열 온도에 따른 시간별 종이센서 색상 강도 변화 결과

### 바. 종이센서의 프롤린 농도 측정 성능 시험

- 작물의 가뭄 스트레스를 진단하기 위해서는 정확한 프롤린 농도 측정이 필수적으로 이루어져야함. 따라서 본 연구에서는 사전 실험으로 순수한 프롤린 시약으로 각기 다른 농도 (5 μmol, 10 μmol, 25 μmol, 50 μmol, 100 μmol, 200 μmol)의 샘플을 준비하였다. 앞서 최종적으로 선정된 닌히드린 반응 최적 가열 온도와 시간인 100°C, 3분의 조건으로 실험을 진행함. 본 연구팀에서 제작한 종이센서를 이용하여 측정하였으며, 센서의 프롤린 검출 성능은 5 μmol부터 200 μmol까지 검출할 수 있었음 (그림 9, 그림 10).



그림 9. 프롤린 샘플 농도에 따른 닌히드린 발색 반응

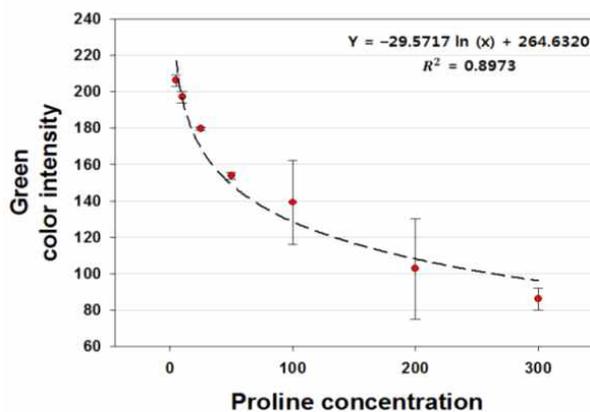


그림 10. 프롤린 샘플 농도에 따른 색상 강도 그래프

## 사. 양파 가뭄 스트레스 진단

○ 양파의 경우 물을 공급하지 않은 이후로부터 지속적으로 토양의 수분이 감소하고 25일이 경과한 이후부터는 토양의 수분이 충분하지 않게 되지만 특별한 형태학적 변화는 보이지 않음. 하지만 실제 프롤린 값을 측정한 결과 25일 째에는 약 100  $\mu\text{mol}$ , 35일 째 약 200  $\mu\text{mol}$ , 53일 째에는 약 300  $\mu\text{mol}$ 의 프롤린이 형성된 것을 확인함. 따라서 임의로 중생종 양파 중 단부의 잎 0.01g을 채집하여 100  $\mu\text{mol}$ 부터 400  $\mu\text{mol}$ 까지 7수준의 샘플을 준비함. 기존에 주로 사용 되었던 분광 분석 방법을 이용하여 프롤린 농도를 측정한 결과 실측값은 142  $\mu\text{mol}$ , 187  $\mu\text{mol}$ , 261  $\mu\text{mol}$ , 290  $\mu\text{mol}$ , 316  $\mu\text{mol}$ , 368  $\mu\text{mol}$ , 402  $\mu\text{mol}$  임을 확인함. 종이센서에서의 실험 결과 역시 프롤린 농도가 증가함에 따라 색상 강도가 감소함 (그림 11, 그림 12). 양파 내의 가뭄 스트레스 조기 단계가 100  $\mu\text{mol}$  정도임을 감안할 때, 본 연구에서 개발된 종이센서를 이용하여 양파의 가뭄 스트레스를 조기에 간편하고 신속하게 진단할 수 있을 것이라 판단 됨.

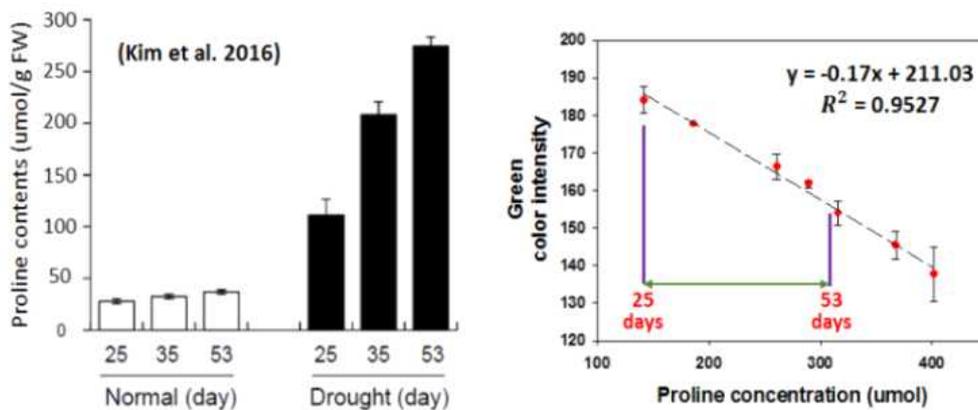


그림 11. 프롤린 샘플 농도에 따른 색상 강도 그래프

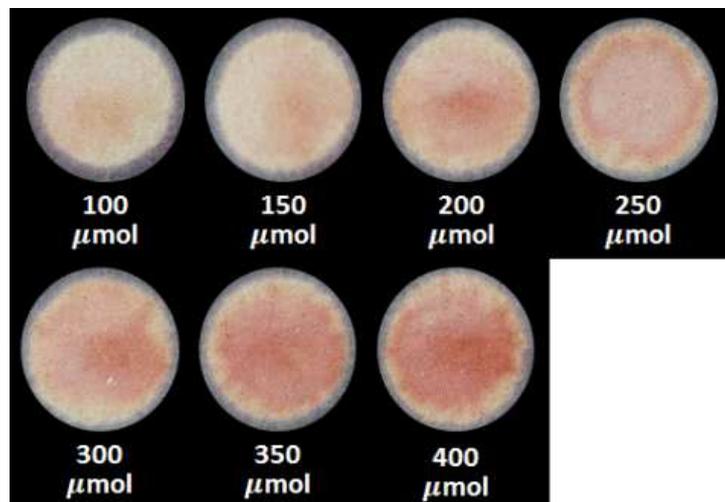


그림 12. 프롤린 샘플 농도에 따른 색상 강도 그래프

### 아. 환경장해를 현장에서 진단하기 위한 휴대용 진단키트의 설계 및 제작

- 환경장해를 현장에서 실시간으로 모니터링하기 위한 진단키트는 PCB와 집게형태의 접사렌즈가 집적화된 본체, 종이센서에 열을 가하기 위한 히터 및 히터의 온도를 일정하게 유지하기 위한 온도센서가 집적화된 센서모듈, 종이센서, 종이센서의 발색반응을 촬영 분석하기 위한 스마트폰으로 구성됨. 그림13은 환경장해를 현장에서 진단하기 위한 진단키트의 개략도를 나타냄.
- 진단키트의 동작은 측정 하고자하는 용액이 도포되어 있는 종이센서가 장착된 센서모듈을 본체에 슬라이딩 방식으로 삽입 했을 때 PCB기판 위에 있는 MCU(Micro Controller Unit)가 실시간으로 온도 센서의 온도정보를 얻어서 센서모듈 표면의 온도를 일정하게 유지하여 종이센서의 발색반응을 유도한 후 스마트폰을 사용하여 얻어지는 이미지의 발색정도 평가를 통해 가뭄의 정도를 나타냄.
- 진단키트의 구성하는 각각의 요소들은 설계 및 제작은 아래와 같음. 진단키트의 본체는 항상 일정한 밝기를 가지는 암실, 센서모듈에 집적화된 히터 및 온도 센서의 조절 및 전원 공급을 할 수 있는 PCB기판, 스마트폰에 장착된 카메라의 접사능력을 향상 시켜 본체의 두께를 슬립화하기 위한 접사렌즈로 구성됨. 그림14는 진단키트 본체의 개략도를 나타냄. 진단키트 외장 케이스는 상판과 하판으로 구성되며 58mm(가로)×118mm(세로)×30mm(두께) 크기로 모델링 소프트웨어인 라히노프로그램을 사용하여 설계되며 그림15는 진단키트 외장 케이스의 개략도를 나타냄.
- 본체 외장 케이스 하판은 진단키트를 동작하는데 사용되는 소자들이 집적되어 있는 PCB기판과 종이센서를 일정한 밝기에서 사진을 찍을 수 있는 암실로 구성되어 있으며 상판은 암실에 밝기를 조절할 수 있는 LED와 접사모듈을 결합할 수 있는 19mm크기의 홀로 구성됨.

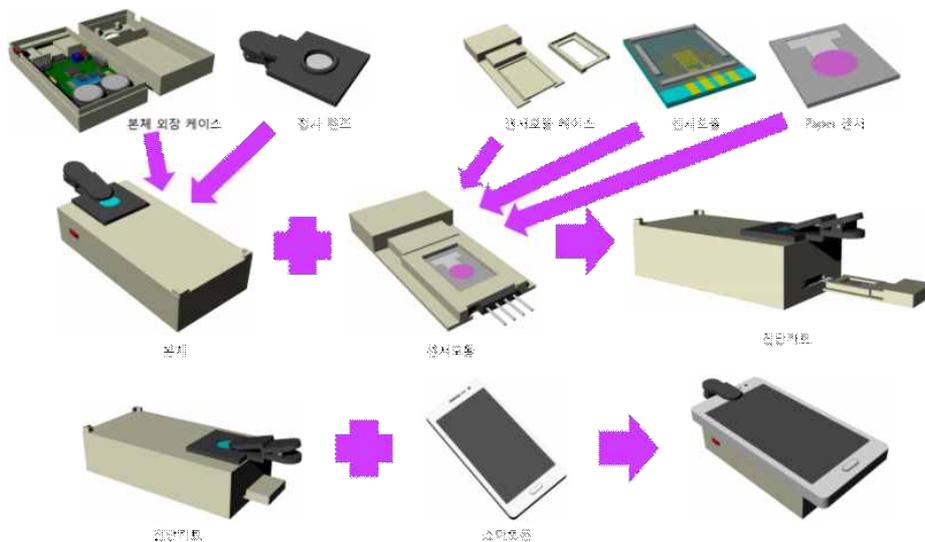


그림13. 환경장해를 현장에서 진단하기 위한 진단키트의 개략도

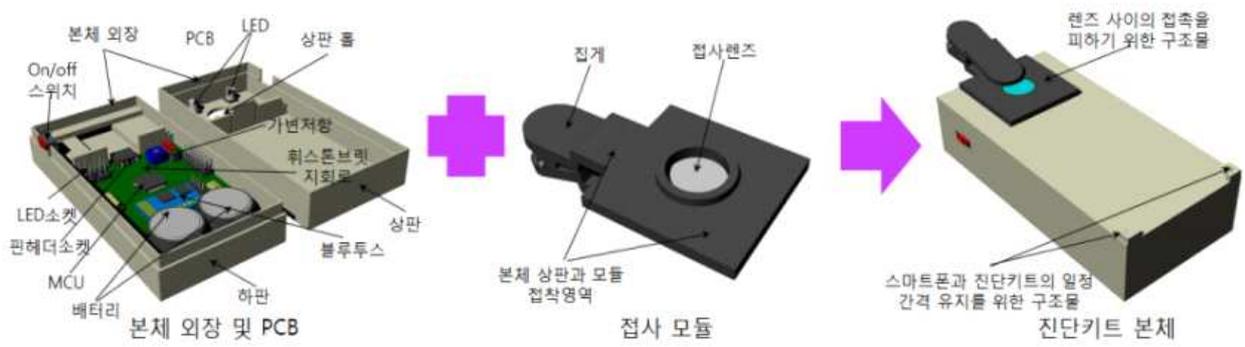


그림14. 진단키트 본체의 개략도

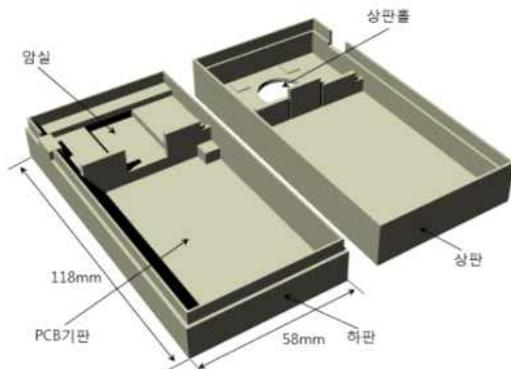


그림15. 진단키트 외장 케이스의 개략도

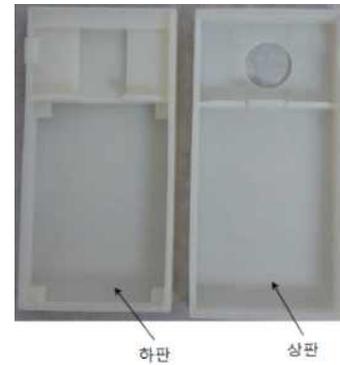


그림16. 3D 프린터를 사용하여 제작된 진단키트 외장 케이스

○ 설계된 진단키트 외장 케이스는 3D프린터를 사용하여 제작되며 그림16은 3D프린터 사용하여 제작된 외장 케이스를 나타냄. 진단키트의 전체적인 동작을 관장하는 PCB기판은 MCU(Micro Controller Unit), 블루투스, LED, 휘스톤 브릿지 회로, 수은건전지, 센서모듈과 결합을 위한 핀 헤더소켓, 환경장애 진단을 위해 사용할 때만 동작할 수 있도록 on/off 스위치로 구성됨. 그림17은 진단키트의 동작을 위한 PCB기판의 개략도를 나타냄.



그림17. PCB의 개략도

- MCU는 센서 모듈에 집적화된 온도센서를 통해서 실시간으로 온도를 측정하여 히터에 인가되는 전력의 크기를 조절하며 종이센서의 발색반응을 촬영할 때 항상 일정한 밝기를 유지하기 위해 LED 밝기 조절 기능함. 센서모듈에 집적화된 온도센서의 온도 측정원리는 온도의 변화에 따른 금속 비저항의 변화에 의해 발생하는 저항변화를 측정하여 온도를 예측할 수 있음. 또한 PCB 기판 위에는 휘스톤브릿지회로가 형성되어 온도센서의 저항변화를 실시간으로 감지하여 센서모듈 표면의 온도를 항상 일정하게 유지할 수 있도록 하였다. 가변저항은 휘스톤브릿지회로에서 출력되는 전압이 상온에서 제로 셋팅을 하는데 사용됨.
- 블루투스는 실험결과를 외부로 무선 송출 및 무선으로 MCU를 코딩할 때 사용되며 수은 건전지는 진단키트가 동작할 수 있도록 전원을 공급하는 역할을 함. 핀헤더 소켓은 핀과 결합하여 센서모듈에 전원공급을 하며 히터 가열 및 온도센서에서 제공하는 온도정보를 읽는 역할을 함. 마지막으로 on/off 스위치는 진단키트를 사용할 때만 전원을 공급하는 역할을 함.
- PCB에 장착되는 구성부품들이 동작범위에서 작동할 수 있도록 PCB내부에 회로를 artwork을 통해서 설계함. 그림18은 artwork을 통해서 설계된 PCB 회로의 개략도를 나타내며 PCB 회로에 구성부품요소를 결합하여 PCB회로를 제작함. 그림19는 진단키트의 동작을 위해 제작된 PCB회로를 나타냄. 진단키트의 두께를 줄이면서 스마트폰의 접사력을 향상시키기 위해 접사렌즈모듈은 진단키트 본체의 상판에 완벽하게 접합됨. 접사렌즈를 포함하는 모듈은 끝이 집게 형태로 되어 있어 양 끝단을 누르는 상태에서 다양한 위치에 위치한 스마트폰 카메라에 접사렌즈를 고정할 수 있음. 또한, 스마트폰 카메라 렌즈와 접사렌즈의 마찰에 의해 발생할 수 있는 렌즈 표면의 스크래치를 줄이기 위해 접사렌즈와 카메라 렌즈 사이에 일정한 간격을 유지하기 위한 구조물을 형성함.

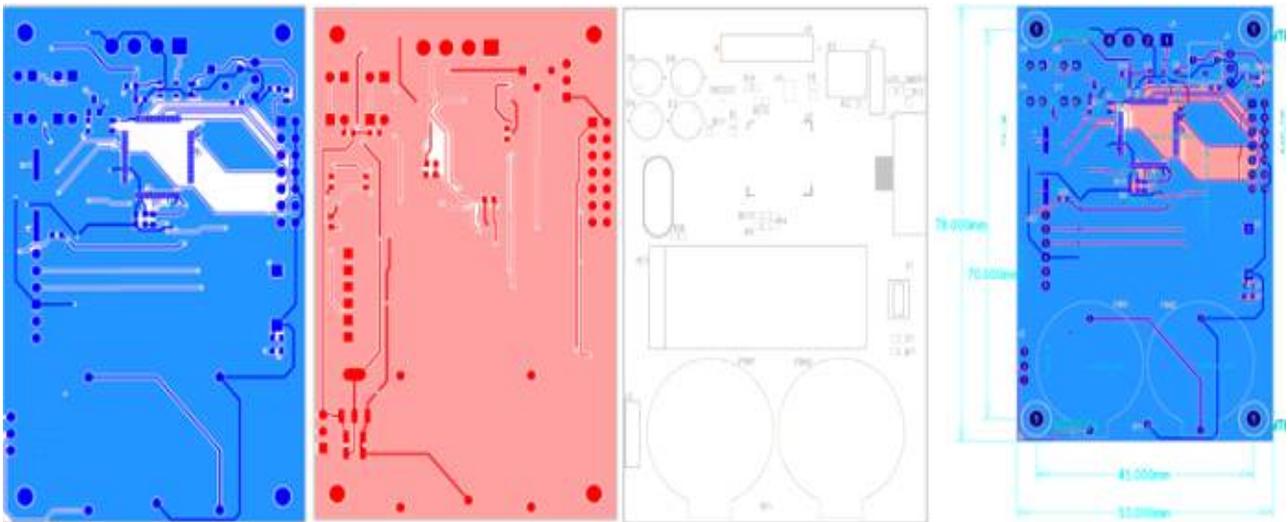


그림18. PCB 회로의 개략도

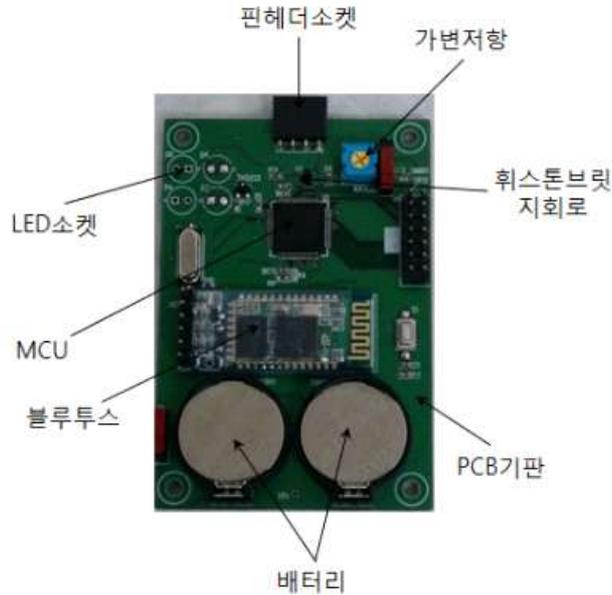


그림19. 제작된 PCB

- 접사모듈에 형성된 구조물에 의해 스마트폰과 진단키트의 본체의 일정한 간격 유지가 어려우므로 본체 외장 케이스 상판 외부에 접사모듈의 구조물과 같은 두께의 ‘L’자 형태의 구조물을 형성함. 이렇게 제작된 각각의 구성요소들을 결합하여 진단키트 본체 제작을 완료함. 그림20은 제작된 진단키트 본체를 나타냄.

### 자. 환경장해를 진단하기 위한 센서모듈부의 설계 및 제작

- 센서모듈부는 본체 내부의 암실 유지 및 종이센서를 항상 평평하게 유지하기 위한 케이스, 히터와 온도센서가 집적화 된 센서모듈, 히터와 온도센서에 전원을 공급하기 위해 센서모듈에 장착된 탈부착이 쉬운 핀으로 구성됨. 센서모듈부의 조립은 케이스 하판에 센서모듈이 삽입되고 그 위에 종이센서가 놓여진 다음 케이스의 상판을 하판과 결합하면 완료됨.

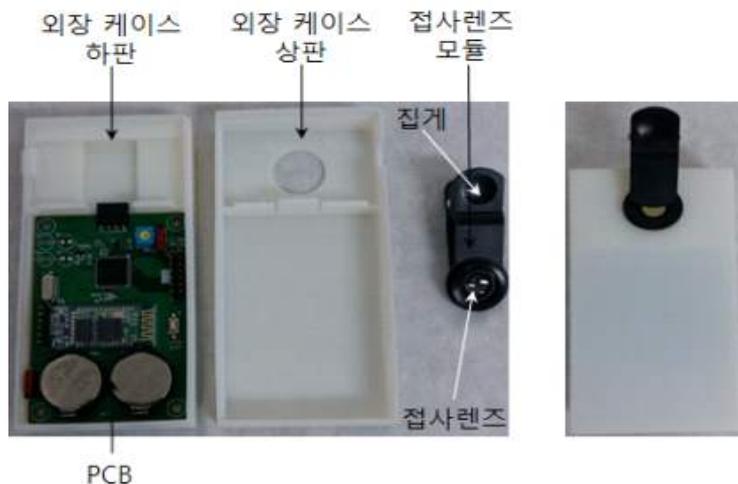


그림 20. 제작된 진단키트 본체

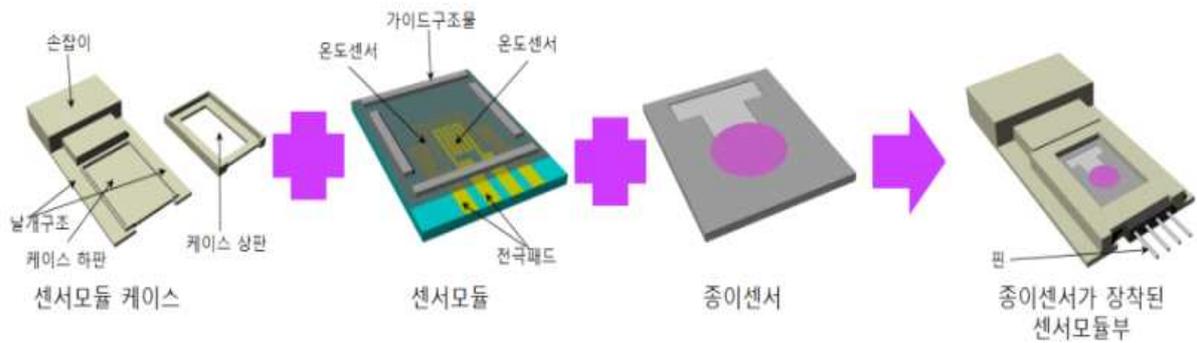


그림 21. 센서모듈부의 개략도

- 그림21은 센서모듈부의 개략도를 보여줌. 센서모듈 케이스는 종이센서를 평평하게 유지하기 위해 모듈 위에 종이센서를 위치했을 때 케이스 상판이 종이센서를 누르는 구조로 되어 있음. 케이스의 손잡이를 센서모듈 보다 두껍게 설계하여 진단키트 본체에서 센서모듈부가 삽입 되는 부분을 통해 빛이 암실로 투과되는 것을 방지하는 역할을 함.
- 센서모듈부가 정밀하게 본체와 결합하기 위해 케이스 하판에 날개구조물을 형성함. 히터와 온도센서가 집적화된 센서모듈은 소형화시키기 위해 반도체공정을 사용하여 제작됨. 센서모듈에 집적화된 히터는 줄히팅 방식으로 가열되며 크기는 7mm(가로)×7mm(세로)로 제작됨. 온도센서는 정밀하게 히터의 온도를 측정하기 위해서 히터의 중앙에 위치하게 설계함. 또한 종이센서의 위치를 항상 일정하기 위해 센서모듈 위에 300 $\mu$ m두께의 가이드라인 구조물을 설계함.
- 설계된 크기를 바탕으로 L-edit 프로그램을 사용하여 마스크를 설계 하였으며 Laser lithography장비를 사용하여 5인치 마스크를 제작함. 그림22는 L-edit를 통해 설계된 마스크를 나타냄. 그림23은 센서모듈을 제작하기 위해 제작된 마스크를 나타냄.

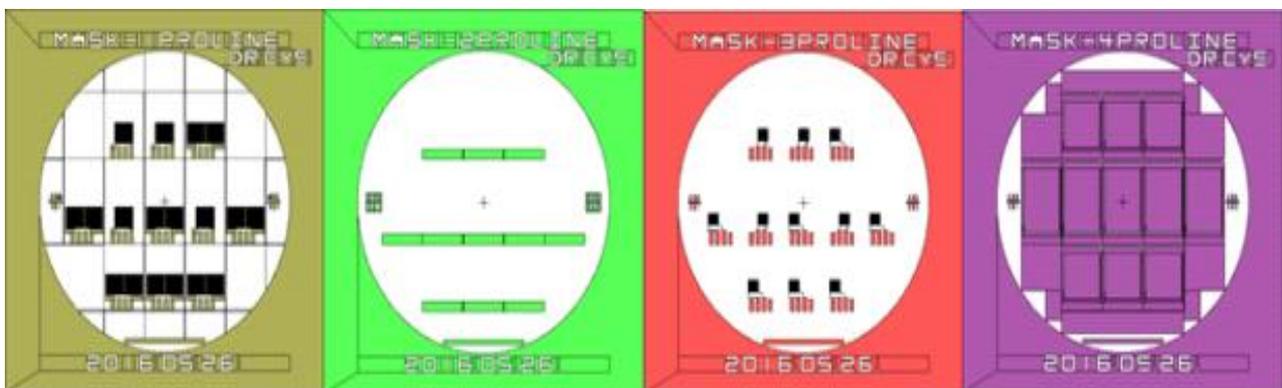


그림 22. L-edit를 사용하여 설계된 마스크

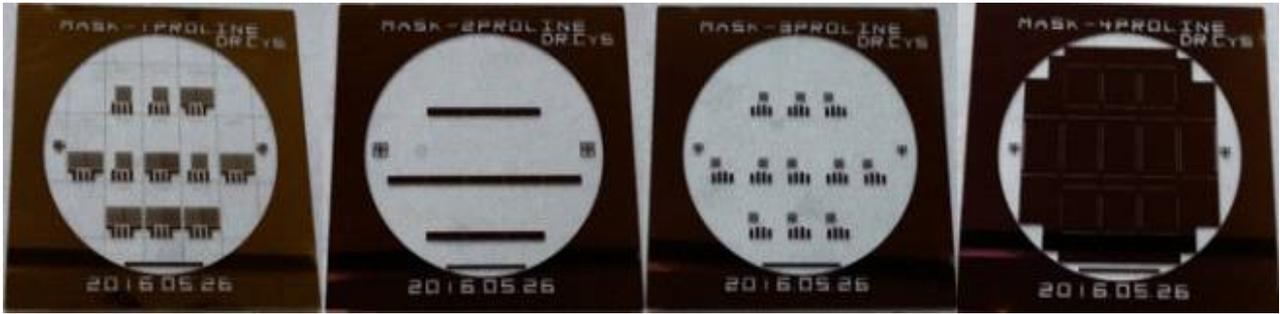


그림 23. 센서모듈을 제작하기 위해 제작된 마스크

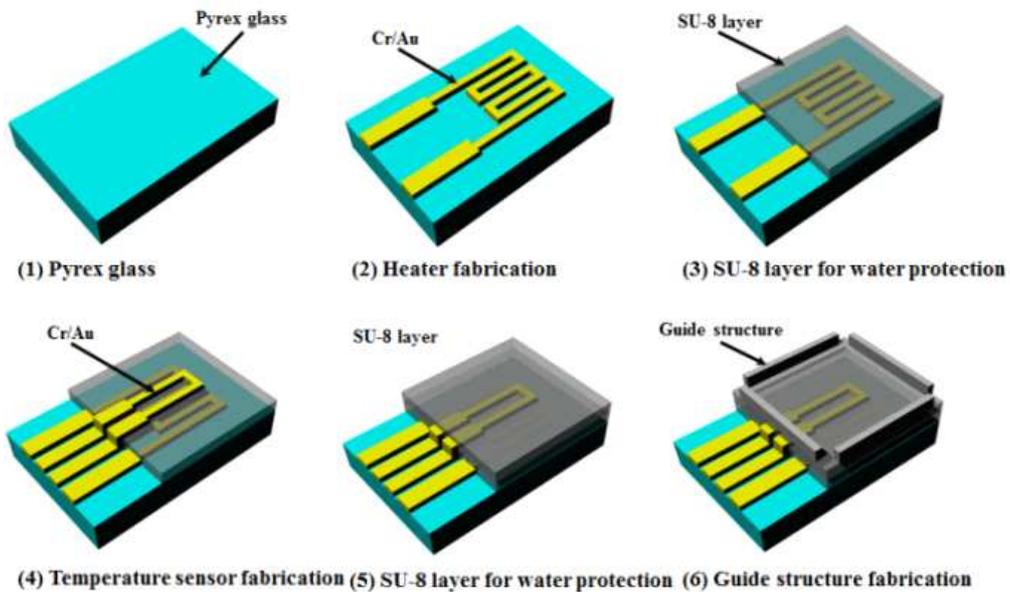


그림 24. 반도체공정을 사용한 센서모듈 제작 공정도

○ 제작된 마스크를 사용하여 마이크로머시닝공정을 통해서 센서모듈 제작 공정을 진행함. 센서 모듈 제작 공정은 위와 같으며 그림 24는 센서모듈 제작 공정도를 나타냄.

※ 센서모듈 제작 공정도

- ① 센서모듈을 제작하기 위해 4inch 크기의 원형 Pyrex glass 기판이 사용됨
- ② 기판 위에 sputter를 사용하여 Cr/Au 각각 5nm 와 200nm 증착
- ③ 포토리소그래피 공정을 통해 히터 형상을 패터닝한 다음 Cr/Au층을 Cr 식각용액과 Au 식각용액을 사용한 식각을 통해 히터를 제작
- ④ 제작된 히터 표면에 용액의 침투 방지 및 온도센서의 형성을 위해 절연층으로 SU-8 2002를 얇게 코팅
- ⑤ 온도센서를 SU-8 층 위에 제작하기 위해 lift-off공정을 사용
- ⑥ Cr/Au층은 E-beam을 사용하여 증착
- ⑦ 아세톤을 사용한 포토레지스트 제거를 통해 온도센서 제작이 완료됨

- ⑧ 온도센서 제작 후 센서 표면으로 용액 침투를 방지 및 파워손실을 줄이기 위해 SU-8 2002 층 얇게 코팅
- ⑨ 종이센서의 위치가 항상 일정하게 하기 위해 SU-8 2150을 사용하여 300um두께의 가이드 구조물이 제작
- ⑩ 다이싱 소우장비를 사용한 Pyrex glass 다이싱을 통해 센서모듈 제작은 완료됨

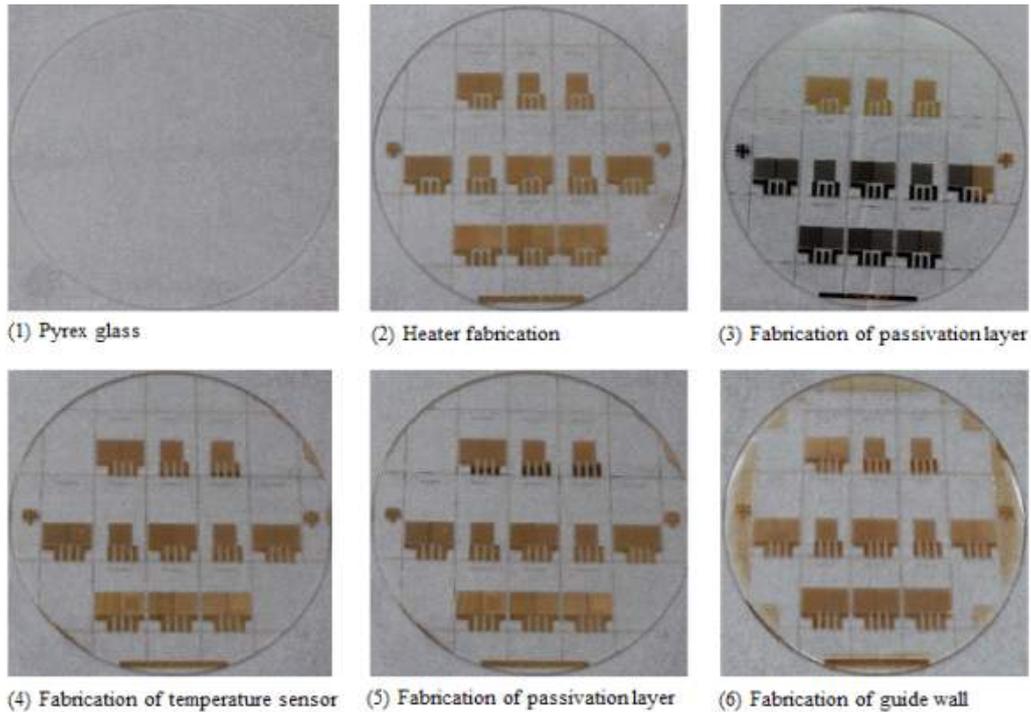


그림 25. 반도체 공정장비를 사용한 센서모듈의 제작과정

○ 그림 25는 반도체 공정장비를 사용하여 제작되는 센서모듈의 제작과정을 나타냄. 그림 26은 반도체공정을 통해 제작된 센서모듈의 광학이미지를 나타냄. 제작된 센서모듈을 PCB기판과 연결하기 위해 센서모듈의 전극패드에 전도성에폭시 혹은 납땜 방법을 통해 핀이 전극에 장착되며 이 핀을 통해 히터와 온도센서에 전원을 공급함. 센서모듈에 장착된 핀은 PCB기판에 장착된 핀헤더소켓에 연결이 되며 정확한 전극 접촉 및 탈부착이 쉽다는 장점을 가짐.

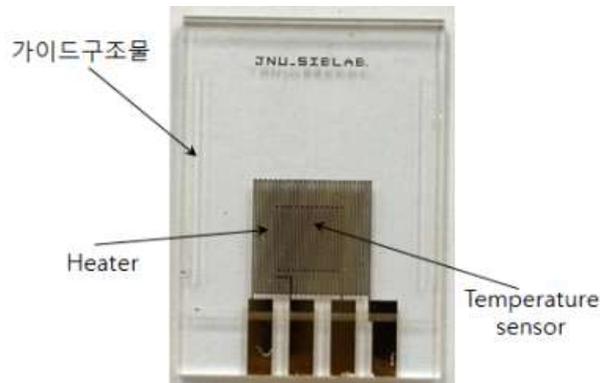


그림 26. 반도체 공정을 통해 제작된 센서 모듈의 광학이미지



그림 27. 센서모듈 케이스 및 모듈이 조립된 센서모듈의 광학 이미지

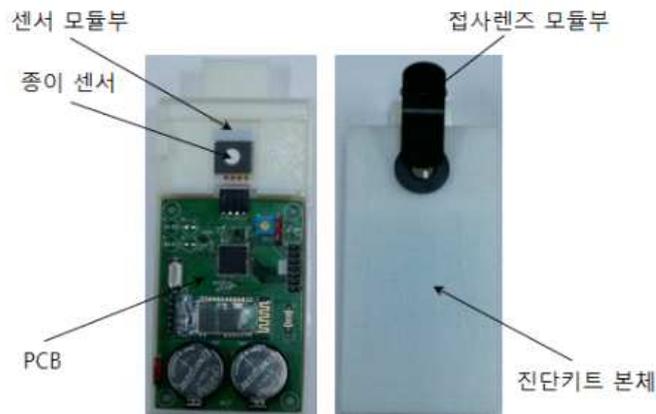


그림 28. 진단키트 본체와 센서모듈부가 결합된 진단키트의 광학적 이미지

○ 그림 27은 센서모듈케이스 및 모듈이 조립된 센서모듈부의 광학이미지를 나타냄. 이렇게 제작된 다양한 구성요소들이 결합하면 가뭄을 진단하기 위한 휴대용 진단키트로 사용될 수 있으며 그림 28은 진단키트 본체와 센서모듈부가 결합하여 제작된 진단키트의 이미지를 나타냄. 제작된 진단키트의 접사모듈 끝단이 집게로 되어 있어 양 끝단을 누르는 상태에서 다양한 위치에 위치한 스마트폰 카메라에 접사렌즈를 고정할 수 있음.



그림 29. 스마트폰에 장착된 진단키트의 이미지



그림 30. 종이센서의 색상을 분석하기 위해 제작된 app의 이미지

○ 그림 29는 스마트폰에 장착된 진단키트의 이미지를 나타냄

#### 차. 스마트폰을 사용한 Paper sensor의 색상의 강도 정량화를 위한 app 제작

○ 종이센서의 색상의 정도를 정량화하기 위해서 스마트폰에서 색상을 분석을 할 수 있는 app을 설계 및 제작함. Web inventor 프로그램을 사용하여 색상의 정도를 분석하기 위한 app을 제작함. 제작된 app은 크게 종이센서의 이미지를 촬영하기 위한 카메라, 색상의 정도를 파악하기 위한 analysis, 측정된 위치를 표시하기 위한 Map, 분석한 결과를 외부로 전송하기 위한 Transfer로 구성됨. 그림 30은 종이센서의 색상을 분석하기 위해 제작된 app의 이미지를 나타냄.

○ 제작된 app을 사용하여 프롤린을 검출하기 위해 사용된 종이센서의 측정된 결과를 촬영, 분석, 결과의 전송과정을 실험적으로 진행함. 그림 31은 제작된 app을 사용하여 종이센서의 색상의 정도를 분석하는 과정을 나타냄.

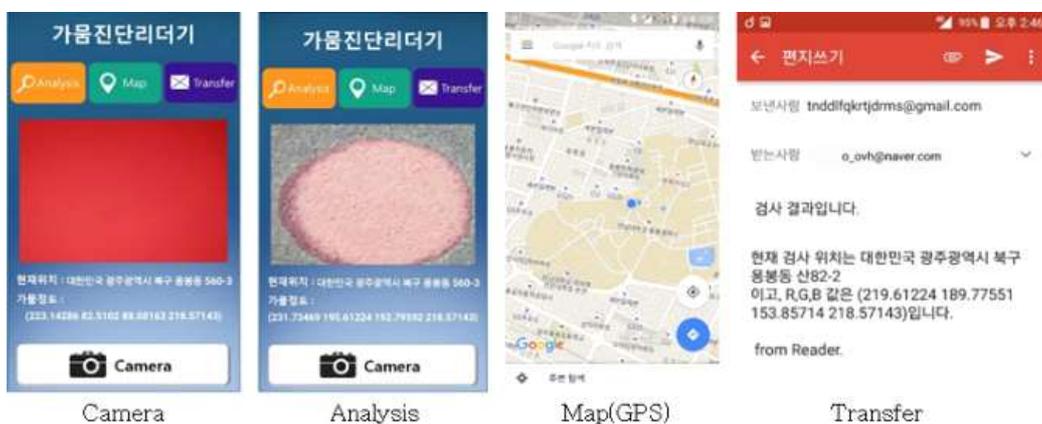


그림 31. 제작된 app을 사용하여 종이센서의 색상의 정도를 분석하는 과정

- 제작된 app을 통해서 프롤린의 양에 따라 변화는 색상의 정도를 RGB(RED Green Blue) 분석을 통해서 나타낼 수 있으며 또한, 측정된 위치도 GPS방식을 통해서 위치를 화면에 표시할 수 있음. 이렇게 측정된 결과는 이메일을 통해서 외부에서 실내에 있는 데이터베이스에 다양한 통신방법을 통해 결과를 전송할 수 있음. 본 연구에서는 종이센서의 색상의 정도를 분석하기 위해 app을 제작하였으며 이를 통해 종이센서의 색상의 정도를 실험적으로 분석함.

## ■ 제1위탁과제 연구내용 및 결과

### 가. 마이크로 진단키트 개발

- 마이크로 진단키트를 개발하기 위한 선행연구

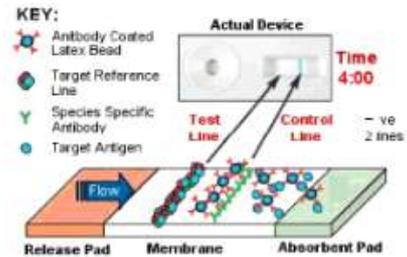
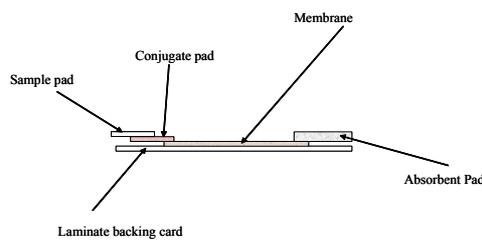


그림32. Portable air sampling device for onion downy mildew conidia

그림33. 기존의 진단키트

- 진단키트 검출방식: 항원, 항체 반응 방식

#### (1) 진단키트 내부도



(2) 기존 진단키트 형태





그림34. Outdoor Microtiter Immunospore Trap (MTIST)

○ 종이센서 재질 선별

○ [환경장해 현장 진단용 마이크로 키트 사양]

Sensor: paper sensor

주요사양: Whatman chromatography no.1

Material: cellulose

Detection zone diameter: 10mm

Particle retention liquid: 11 $\mu$ m<sup>2</sup>

Filtration speed: 150

Analysis method: Light intensity



**나. 노균병 screening stain**

○ 노균병 염색을 위해 사전 스크리닝 염색을 실시하여 본염색에 들어가기 전 결과예측하기 위해 *Peronospora destructor* 스크리닝 염색을 위한 Gram염색 실험을 진행함

○ Materials(재료)

시약: 그람염색시약(제조사: 케이에스)

- Crystal violet, Gram iodine, Acetone alcohol, Safranin

검체: 서울00병원 검체(테스트용 100검체)

- Gram positive, negative, yeast 등

○ 염색방법

- Crystal violet(1분10초) > Rinse > Gram iodine(1분10초) > Rinse > Acetone alcohol(20초) > Rinse > Safranin(2분) > Rinse > Microscope

○ 참고사항

Acetone alcohol시간 준수(오래 할 경우 그람양성이 음성으로 보임)

○ 실험 결과 및 고찰

사진			
Staphylococcus aureus	Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Escherichia coli
Eliminated cell & E.coli	Eliminated cell	Gram negative bacilli	Gram negative bacilli
Streptococcus	Yeast	Streptococcus	Peronospora destructor

○ 고찰: Fungus염색법은 Gram염색, PAS염색, Lactophenol cotton blue염색, Hematoxyline-Eosin염색, Grocott염색, AFB염색 방법 등이 있음. 세균등의 구조와 진균의 구조는 매우 유사한 구조를 가지고 있기 때문에 일반적으로 세균염색에 쓰이는 염색법으로도 진균염색을 실시할 수 있음. 이 중 Gram염색법과 Lactophenol cotton blue염색이 가장 많이 보편화되 사용되고 있으므로 이 두 가지 법으로 차 후 Peronospora destructor염색을 실시할 것임

○ Lactophenol cotton blue(LPCB)습윤표본 제작

시약제조

Phenol.....10ml

Lactic acid.....3ml

Glycerol.....20ml

Cotton blue.....2g

D.W.....10ml

※실험방법

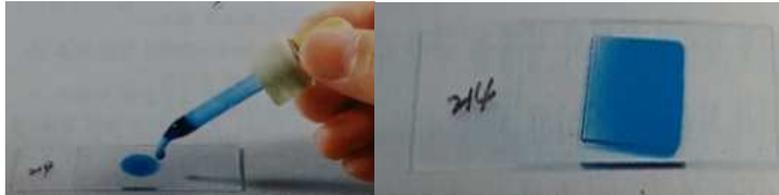
① 슬라이드 글라스 위에 검체를 한방울 놓고 LPCB용액 한방울을 가함(Pleural fluid 같은 일부

검체는 이 염색에서 침전 발생)

② 시약과 검체를 잘 혼합한 후 커버글라스를 덮는다.

③ 현미경으로 100×, 400×로 균사와 포자의 형태를 관찰함.

④ 영구 표본제작을 위해 canada balsam으로 봉입함.



## (2) 2차년도 연구내용 및 결과

### 가. 가뭄 스트레스 진단을 위한 프롤린 Ninhidrin 반응의 최적화 및 많은 수의 샘플을 분석하기 위한 microplate 기반의 다중분석법 개발

- 많은 식물들은 성장하면서 다양한 환경변화에 노출되고 스트레스를 받으며 이러한 스트레스에 적응하기 위해 여러 가지 기작을 가짐. 특히 식물은 건조한 스트레스에 노출되는 경우 다양한 대사체의 농도를 변화시키는데 이때 강하게 축적되는 아미노산이 proline 임(그림36). 이렇게 만들어진 Proline은 스트레스에 조건에서 cytosolic pH 와 cell redox status를 완충하는 역할을 통해 단백질 구조를 안정화 함.
- proline은 식물의 건조 스트레스를 측정할 수 있는 대표적인 지표로, proline을 측정하는 방법은 크게 HPLC-based amino acid 분석하는 방법, istatin paper assay 방법 colorimetric assay 등이 있음. 그 중 ninhydrin reagents을 이용한 colorimetric assay 방법은 proline을 측정할 수 있는 방법으로 널리 이용되고 있음.(그림37) Colorimetric assay 중 주로 사용되는 Bates et al. 방법은 3% sulfosalicylic acid을 이용해 proline을 추출하고, proline-ninhydrin complex 으로부터 toluene을 이용하여 발색단을 추출하여 proline의 양을 측정함. 그러나 이 방법은 환경과 동물의 중추신경계에 유해한 유기용매를 사용하고 반응에 일정시간이 필요하다는 번거로움이 있음.
- 그래서 이러한 번거로움을 줄이고자 proline-ninhydrin반응의 조건들에 변화를 주어 반응의 단순화를 유도함. 이를 위해 우선 Ninhydrin reagent를 만들 때 사용하는 phosphoric acid의 제거 여부와 반응의 가열시간의 단축 가능성에 관한 연구를 수행함. 그리고 proline을 추출할 때 사용되어 지는 sulfosalicylic acid의 농도에 따른 반응의 민감도를 확인함.

- Proline-ninhydrin 반응물의 흡광도는 보통 spectrophotometer-based assay를 방법을 이용하여 측정되는데 이 방법은 일정량 이상의 샘플이 요구되며(100 $\mu$ l 이상) 한 번에 여러 샘플을 측정하는데 한계가 있음. 그에 반해 microplate reader를 이용한 측정은 적은 양의 샘플을 한 번에 여러 개를 측정할 수 있다는 장점을 가지며 실제로 빠르게 발색단의 분광광도, 혼탁도, 형광 분석에 흔히 사용되고 있음. 이러한 장점을 이용하기 위해 간소화된 proline-ninhydrin 반응을 토대로 proline 다량분석을 위한 microplate base 에서 분석 방법을 확립함.

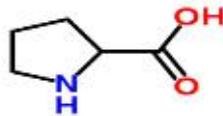


그림36: proline 화학 구조

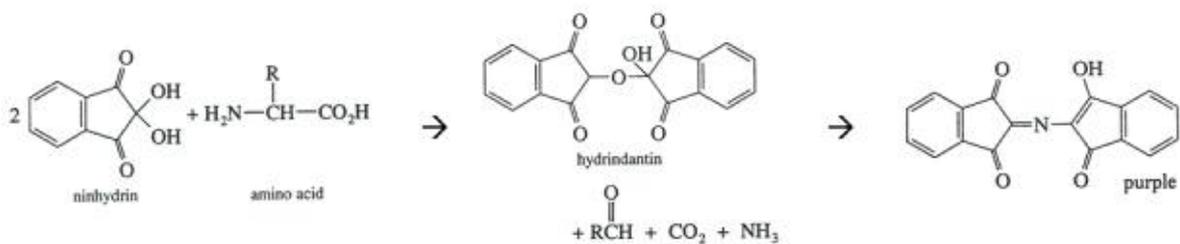


그림37. 닐히드린 반응의 화학적인 구조

- proline의 양의 측정은 Bates et al. 방법을 기초로 변형함. ninhydrin reagent는 1.25% ninhydrin (sigma)을 80% glacial acetic acid에 넣어서 준비하고 건조스트레스를 받은 애기장대 0.04g에서 1ml의 1%, 3% 또는 5% sulfosalicylic acid (W/V)을 이용하여 proline을 추출함. 원심분리하여 얻은 상층액 1ml에 미리 만들어 놓은 2ml의 ninhydrin reagent를 넣고 섞은 후, 100 °C로 온도를 유지하는 항온수조에 30분 또는 60분 동안 열을 가함. 반응을 종료하기 위해 얼음에 10분 두었다. 반응 후 반응액을 1ml을 큐벳에 넣고 UV/VIS spectrophotometer (USB4000-UV-VIS,OceanOptics,USA) 을 이용해 510nm에서 흡광도를 측정함. proline 농도를 결정하기 위한 standard curve 값은 상용화된 proline (sigma)을 이용하여 위와 같은 방법으로 실험을 하여 얻음(그림38).
- proline 의 다량분석을 위해서는 건조스트레스를 준 애기장대 0.04g 식물체에서 1ml의 1% 또는 3% sulfosalicylic acid (W/V)을 이용하여 proline을 추출함 microplate에 식물 추출액 66 $\mu$ l을 넣고 즉시 ninhydrin reagent 132 $\mu$ l을 넣어 잘 혼합함. 그리고 100 °C로 온도를 유지하는 dry oven (WiseVen dry oven®, WOF-105, DAIHAN Scientific) 에 30분 또는 60분 동안 열을 가해줌. 반응 종료 후 multi-modereader

(SynergyH1HybridMulti-ModeMicroplateReader, BioTek, USA) 을 이용해서 510nm에서 흡광도를 측정함. proline의 양은  $\text{proline/g FW material} = [(\text{ng proline/ml} \times \text{ml extraction buffer})/115.5]/\text{g}$  공식을 이용해 계산함.

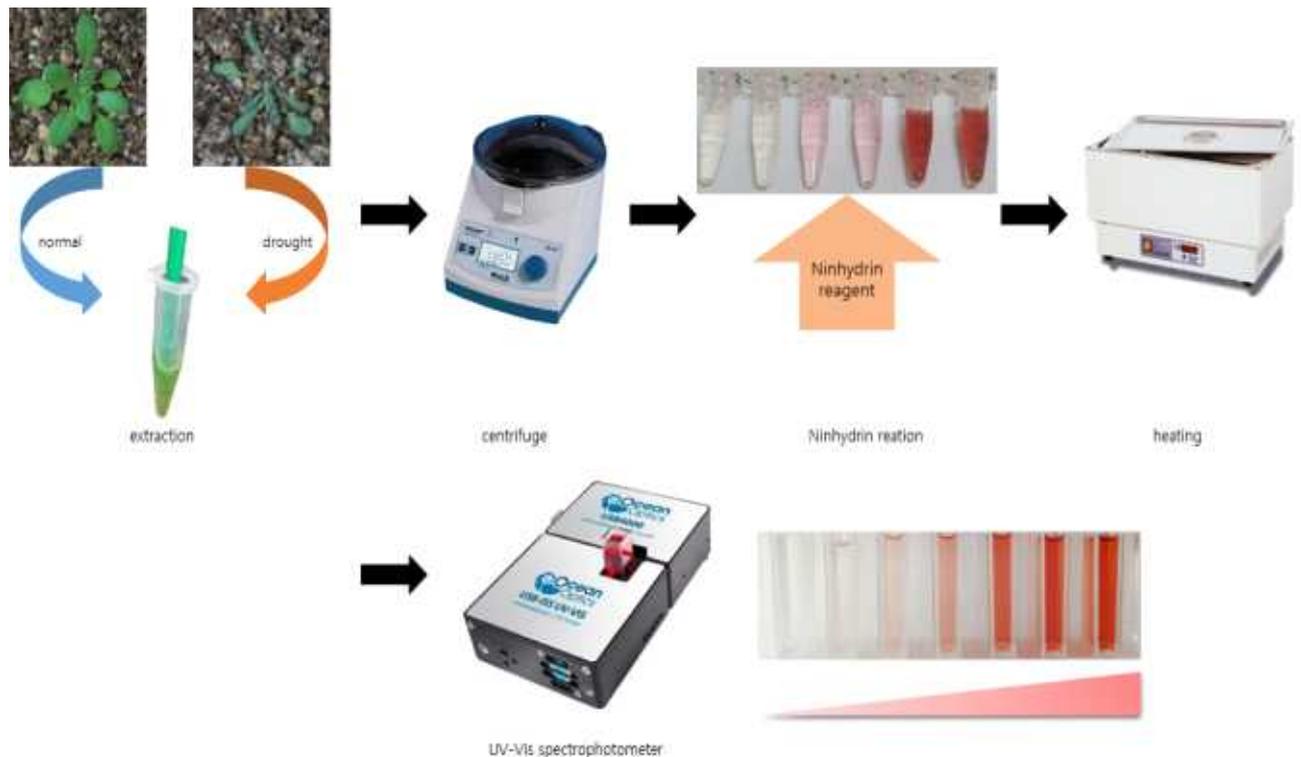


그림38. 건조스트레스를 받은 애기장대 내부의 proline 양 변화를 확인하기 위한 proline-ninhydrin 반응 실험 개략도

- 실험에 사용되는 애기장대(Col-0)은 60% 습도, 23 °C 온도가 유지되는 배양실에서 장일 빛 조건하에서 키움. 애기장대에 건조스트레스를 주기 위해 애기장대를 심은 화분안의 흙의 무게를 동일하게 맞추고 2주 동안 물이 충분한 조건에서 애기장대를 성장 시킴. 2주 후, 식물에 물을 충분히 주고 16일 동안 물을 주지 않으면서 날짜 별로 흙을 포함한 화분의 무게를 측정하여 기록함. 흙속에 포함되어 있는 상대적인 물의 양은  $(\text{final weight}-\text{dry weight})/(\text{initial weight}-\text{dry weight}) \times 100\%$  공식을 기초로 계산함.
- proline-ninhydrin 반응에 사용되는 ninhydrin reagent안에 phosphoric acid 의 존재여부에 따른 반응 시간 별 proline-ninhydrin 반응의 민감도를 확인함. 모든 실험은 toluene의 사용으로 야기되는 환경 및 동물에 대한 독성 및 proline 측정 시 민감도의 부정적 영향을 제거하기 위한 목적으로 Bates et al 방법에서 toluene이 없는 Shabnam protocol의 방법을 참고하여 수행함.
- proline 의 농도는 0  $\mu\text{M}$ ~50  $\mu\text{M}$  로 정하고 standard curve의 양상을 확인한 결과

Phosphoric acid의 존재 여부와 가열시간과는 무관하게 standard curve의 선형성은 유지됨. 그러나 ninhydrin reagent 안에 phosphoric acid가 있을 때 보다 없을 때 반응의 흡광도가 향상됨을 알 수 있음. 이러한 양상은 반응시간을 30min으로 줄였을 때 더 확연한 차이가 나타났고 반응시간이 60min 일 때는 phosphoric acid 존재 유무에 따른 차이를 알 수 없음. (그림39 A,B) 이러한 차이는 저농도 일 때 보다 고농도 일 때 뚜렷이 나타남.

- (그림39 C,D) 그 결과 Ninhydrin reagent의 phosphoric acid의 제거가 proline-ninhydrin 반응의 흡광도를 올리는데 중요한 요소가 됨을 확인하였고, 반응시간 30min 으로 감소시키더라도 proline 양 측정에 큰 영향이 없음을 알 수 있음. 더불어 ninhydrin reagent 안에 phosphoric acid가 없고 반응시간을 30min으로 줄였을 때 proline-ninhydrin 반응물의 적절한 흡광도는 508nm~510nm임을 확인할 수 있음.

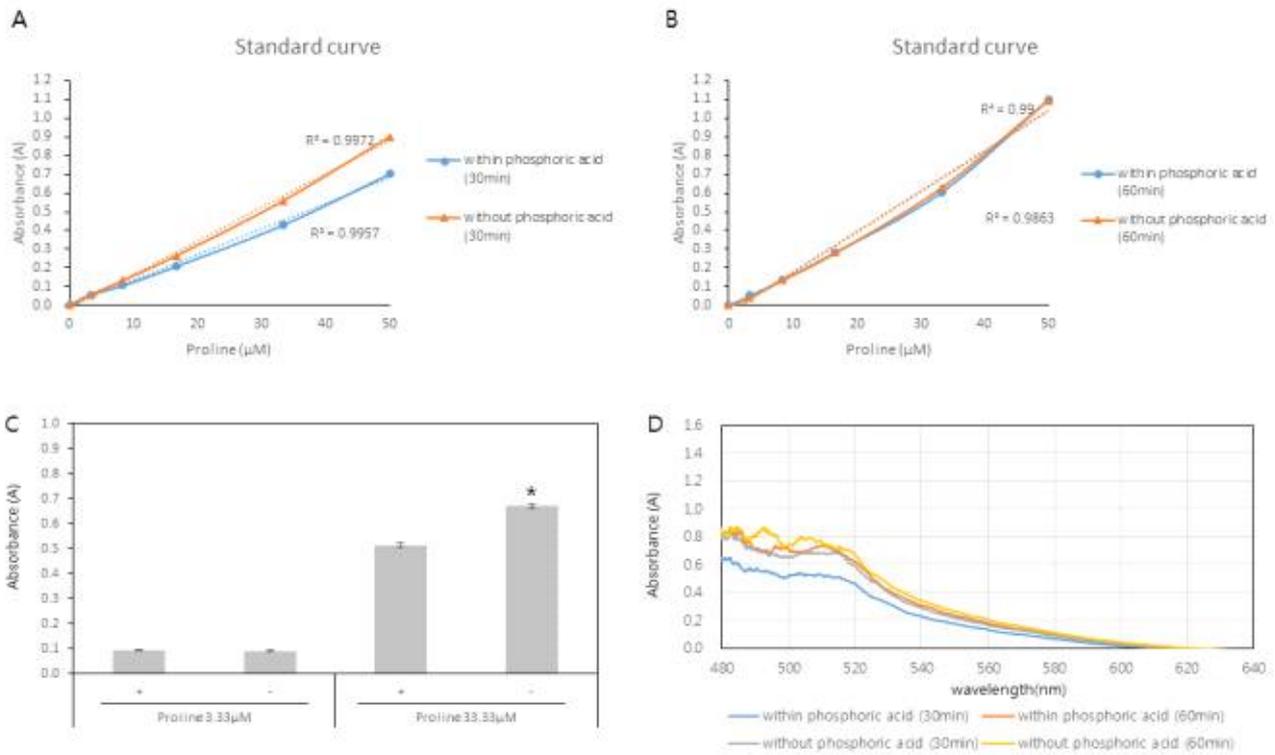


그림39. ninhydrin reagent 안에 phosphoric acid의 유무에 따른 30분과 60분 반응에서의 흡광도

- 물체 proline을 추출하는데 사용되는 sulfosalicylic acid 용액의 농도가 proline-ninhydrin 반응의 민감도에 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위해 sulfosalicylic acid 농도 별로 standard curve를 확인함. 1%, 3% 그리고 5% sulfosalicylic acid 용액으로 proline을 용해하고 phosphoric acid를 제거한 ninhydrin reagent에 혼합 후 30min 동안 가열함.

- 그 결과 기존에 사용하는 3% sulfosalicylic acid 용액에 비해 5% sulfosalicylic acid 은 반응의 민감도가 감소되고, 1% sulfosalicylic acid 은 반응의 민감도가 증가하는 것을 알 수 있었고 (그림40) 이 현상은 여러 번의 반복실험을 통해서도 확인됨. 이를 통해 proline-ninhydrin 반응 때 형성되는 red-colored product에 필요한 pH조건이 3% sulfosalicylic acid 용액조건보다 1% sulfosalicylic acid 용액 조건에서 더 잘 형성됨을 예상할 수 있음.

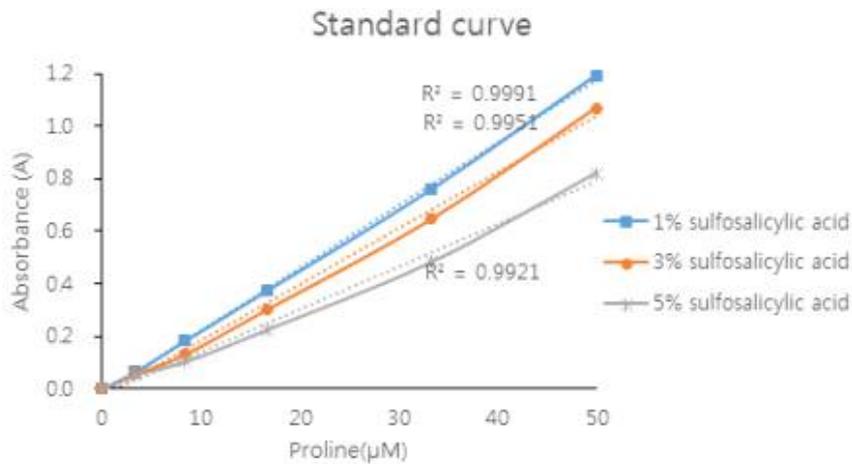


그림40. proline을 추출하는 sulfosalicylic acid의 농도에 따른 흡광도 크기의 변화

- 더불어 1% sulfosalicylic acid 를 사용하였을 때 적합한 ninhydrin 반응 비율양을 알아보기 위해서, proline이 용해되어 있는 1% sulfosalicylic acid 용액에 일정 비율의 phosphoric acid 가 제거된 ninhydrin reagent를 섞고 30min 가열함. proline이 저 농도 (3.33 μM) 일 때와 고 농도(33.3 μM)일 때 모두 1% sulfosalicylic acid 와 ninhydrin reagent 의 비율이 1:2 일 때, 높은 흡광도 값을 얻음(그림41). 이를 통해 1% sulfosalicylic acid와 ninhydrin reagent의 적정 비율이 1:2임을 알 수 있음.
- microplate를 이용한 proline의 양을 측정하려는 시도가 없었던 것은 아니었으나, 발색단을 추출하기 위해 유기용매인 toluene을 사용하였기 때문에 실험실에서 보통 사용하는 polystyrene microplate 을 사용하기 어려움. 또한 tube 안에서 proline-ninhydrin 반응을 위한 가열을 끝낸 후 특수한 microplate로 옮겨서 반응을 측정하는 번거로움이 있음.
- 앞에서 실험결과, 발색단 추출을 위한 toluene의 사용이 없이도 proline-ninhydrin 반응 흡광도가 변하지 않음이 증명되어 있기 때문에 polystyrene microplate의 사용이 가능해 졌으며 Polystyrene의 glass transition temperature가 100°C로 proline-ninhydrin 반응에 필요한 가열 온도를 직접 polystyrene microplate에 사용할 수 있음. 이러한 근거로 직접적으로 microplate에 standard curve 샘플부터 실제 식물체에서 얻은 실험 샘플까지 한 번에 많은 양의 샘플을 측정 할 수 있는지를 확인함.

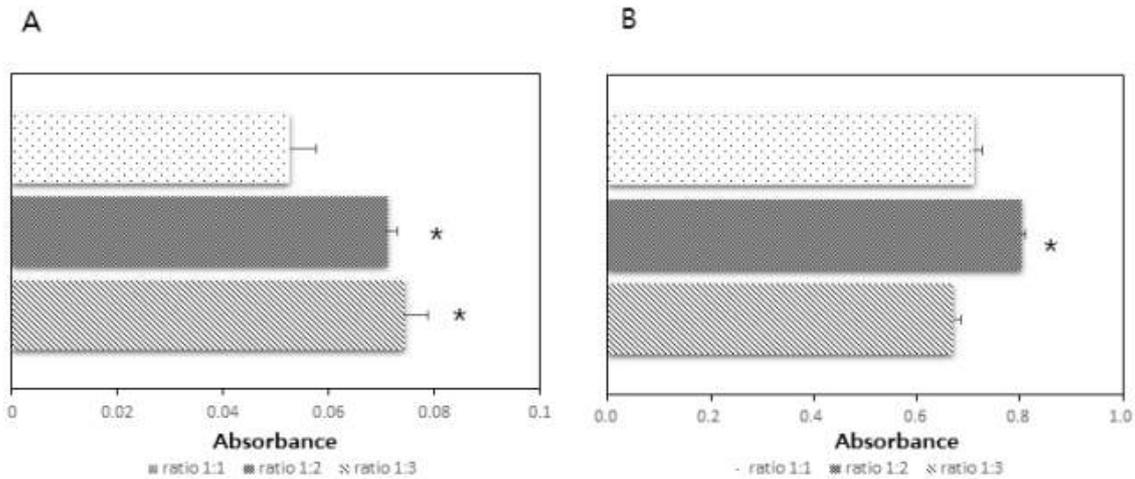


그림41. 1% sulfosalicylic acid 를 사용하였을 때 적합한 ninhydrin 반응 양을 알아보기 위한 proline과 ninhydrin reagent의 혼합비율별 흡광도 (A) Proline 3.33  $\mu\text{M}$  (B) Proline 33.3  $\mu\text{M}$

- polystyrene microplate에 1% sulfosalicylic acid에 proline을 용해시킨 샘플 66 $\mu\text{l}$ 와 phosphoric acid를 제거한 ninhydrin reagent 132 $\mu\text{l}$ (혼합 부피 비율 1:2) 을 직접 혼합한 후, dry oven에서 100°C로 30min과 60min 가열 반응함.
- proline standard curve의 양상을 확인한 결과 spectrophotometer로 측정된 결과와 유사하게 standard curve의 선형성이 유지되었고, 1% sulfosalicylic acid 일 때 3% sulfosalicylic acid를 사용 했을 때보다 시간과 무관하게 흡광도가 증가하는 것을 확인 할 수 있음. 반응시간은 microplate를 사용하여 측정하였을 때 30min보다는 60min 일 때 흡광도가 유의미하게 나타났으며 이는 dry oven 사용으로 인한 열의 전달효율이 water bath 를 사용한 것과 달라 나타난 결과로 예상됨 (그림42).

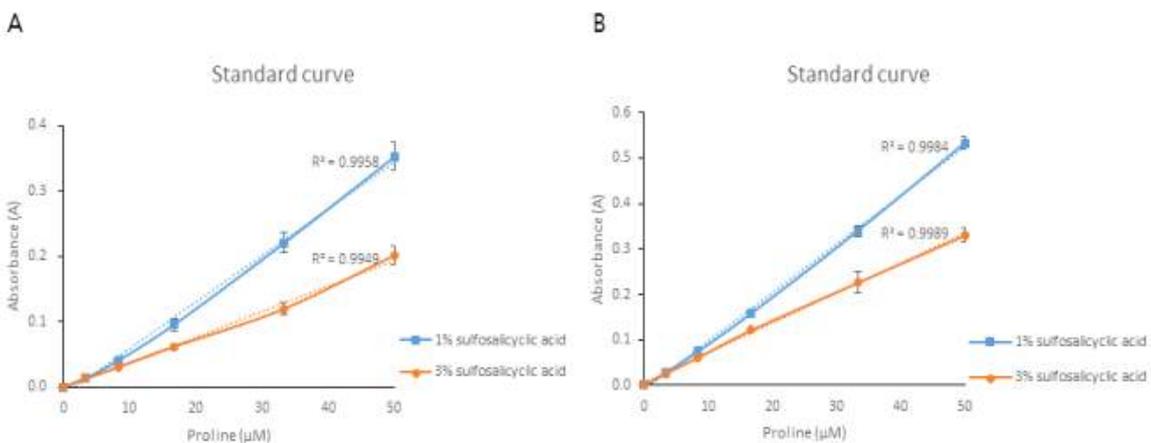


그림42. microplate-based assay 방법을 이용한 proline-ninhydrin 반응의 가열 시간에 따른 흡광도 (A) 30분 (B) 60분

- 앞에서 확인한 1% sulfosalicylic acid로 proline을 추출하고 microplate을 이용하여 proline-ninhydrin 반응의 흡광도 측정 결과가 실제 건조스트레스를 받은 식물에서 proline을 추출하였을 때 적용이 되는지 확인함. 이를 위해, 애기장대에 가뭄 스트레스를 주어 Relative soil water content(RWC:%) 별로 샘플을 준비하고 물을 충분히 준 애기장대와 비교하여 애기장대에서 proline 양을 확인함.
- 실험 결과 애기장대는 RWC가 3% 이하 일 때부터 건조 스트레스에 의한 형태학적인 변화가 나타나 육안으로 건조스트레스에 의한 변화 측정이 가능함 그러나 실제 proline의 양의 증가는 RWC가 5% 이하일때부터 나타나는 것을 알 수 있음 (그림43). 이는 건조스트레스를 육안으로 확인하기 전에 proline의 양의 변화를 통해 건조스트레스를 초기에 진단 가능함을 나타내어 주고 있음.

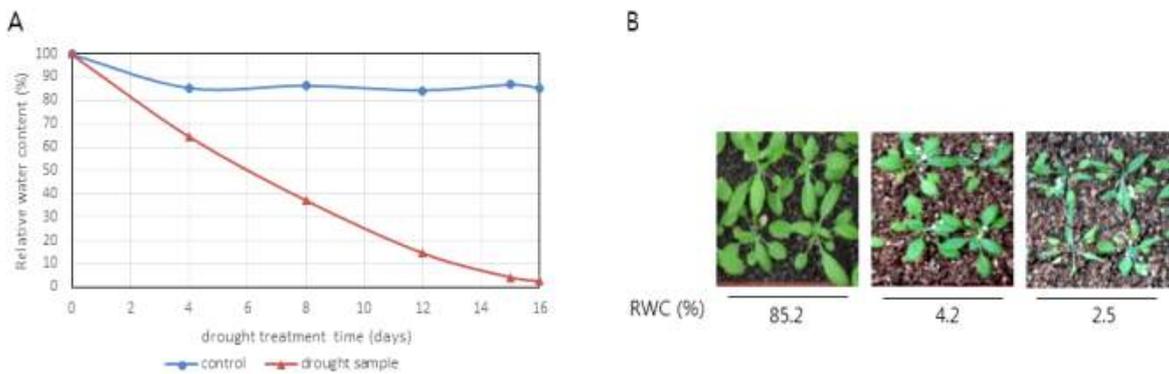


그림43. 가뭄 스트레스를 준 애기장대 Relative Soil water content(RWC) 와 RWC 별 식물의 형태

- 그리고 기존 사용했던 spectrophotometer를 통한 proline 양의 측정과 microplate을 이용한 proline양 측정값은 차이가 나지 않는 것을 보아 microplate를 이용한 proline의 양의 측정이 사용 용이함을 알 수 있음 (그림44).

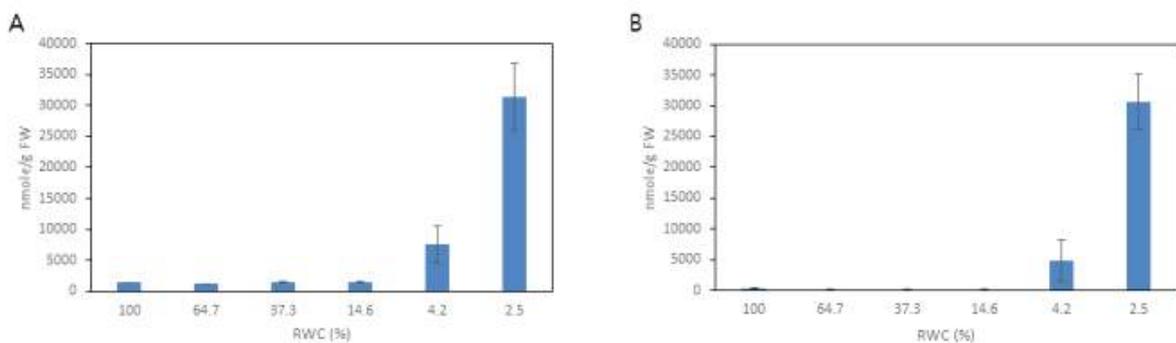


그림44. 가뭄 스트레스를 준 애기장대 RWC 따른 proline의 양 측정 (A) microplate based assay (B) spectrophotometer based assay

## 나. 작물 가뭄스트레스 검출을 위한 종이기반의 밀폐된 바이오센서의 제작

- 작물은 외부 환경 조건에 의해 지속적인 스트레스에 노출되어 있으며 최근 지구 온난화 현상 등 다양한 이상 기후 현상에 의해 작물 생산량이 급격하게 감소되거나 피해를 입는 사례가 증가하고 있음. 이와 같이 작물이 환경장애의 영향을 받게 되면 작물 세포 내 세포질에 프롤린이라는 아미노산을 축적하는 것으로 알려져 있고, 프롤린을 검출하는 것은 작물의 상태를 진단할 수 있으며 가뭄 스트레스가 작물의 생장에 영향을 미치는 정도를 파악할 수 있음.
- 가뭄에 따른 비생물학적 스트레스를 진단하기 위해 광학분석 방법, 이미지 분석 방법 등의 연구가 진행되고 있으나 이러한 방법은 고가의 장비와 숙련된 기술자가 요구되며 조기에 작물 가뭄 스트레스를 진단하는데 어려움이 있음. 이러한 단점을 극복하기 위하여 본 과제 of 선형 연구에서 종이 기반의 미세유체센서를 통해 작물의 가뭄 스트레스를 검출하고자 함.
- 센서의 재료로 사용된 종이는 어디서나 손쉽게 구할 수 있는 물질로써 유연성과 간편성, 저비용을 모두 갖추고 있으며 별도의 동력장치 없이 시료의 이동이 가능한 특징을 가지고 있음.
- 일반적으로 종이센서들은 오픈채널 형태의 센서로 주로 많이 사용하고 있으나 반응이 일어나는 채널이 공기 중으로 노출되어 있어 외부 환경의 오염물이 혼입하기 쉽고 용액의 증발이 일어나 정확한 검출결과를 얻기가 어렵다는 문제점 때문에 이러한 문제를 해결하기 위해 밀폐된 채널 형태의 센서 개발이 요구됨.
- 또한, 1차년도에 제안한 프롤린을 검출하기 위한 종이센서는 다투드린반응을 위해 프롤린 용액과 다투드린 용액을 볼텍싱하여 종이센서에 로드하였기 때문에 현장 진단 시 항상 다투드린 용액을 휴대해야하는 단점이 있음. 본 과제에서는 왁스 프린팅과 오리가미 방법을 이용하여 밀폐된 채널을 구성하고 다투드린 용액을 사전에 로드하여 현장 진단 시 외부 환경의 오염물 혼입 방지와 최소화된 용액으로 반응을 확인하고자 함 (그림45).

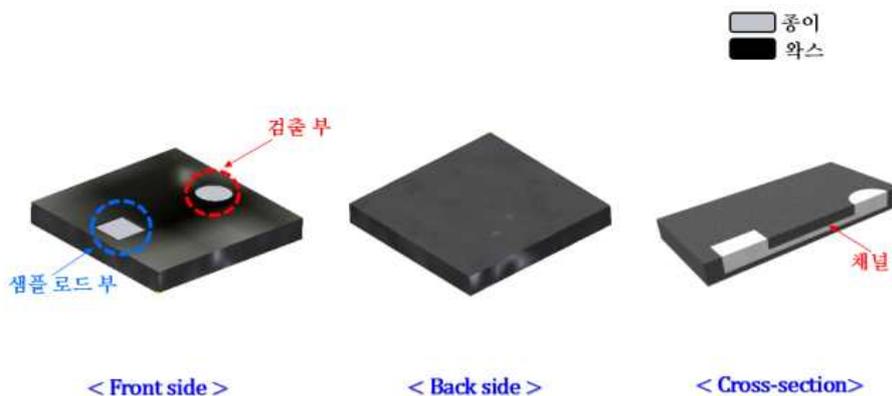


그림45. 왁스 프린팅 공정과 오리가미 방법을 이용하여 제작된 밀폐된 종이센서의 개략도

- 가뭇스트레스 진단을 위해 검출될 프롤린의 경우 탄소원자에 결합되어 있는 R그룹이 아민기와 연결되어 있으며 닐히드린 분자와 결합한 프롤린에 의해 나타나는 발색반응은 520nm에서 흡광도를 측정함으로써 수용액 상의 프롤린 함량을 측정하고 정량화가 가능하게 됨. 이러한 아미노산 정성반응을 이용하여 프롤린의 농도에 따른 발색반응을 확인하고자 함. 샘플 로드 부에는 사전에 닐히드린 용액을 코팅시켜 두고 이 후 샘플 로드 부에 수용액 상태의 프롤린을 로드 시켜 미세유체 채널을 통과하도록 함. 채널을 유동함에 따라 측정샘플의 프롤린과 닐히드린이 충분히 혼합되어 균일한 발색반응이 이루어지도록 구성하였으며, 미세유체 채널은 왁스 층으로 밀폐되어 있어 프롤린 용액이나 닐히드린 용액이 아래 방향으로 누설되지 않고 검출 결과에 대한 신뢰도가 향상되는 효과를 얻고자 함 (그림46).
- 제작된 종이센서의 프롤린 검출 성능을 시험하기 위해 순수한 프롤린 시약(Sigma aldrich, USA)을 사용하여 4단계( $50\mu\text{mole}$ ,  $100\mu\text{mole}$ ,  $150\mu\text{mole}$ ,  $200\mu\text{mole}$ )의 각기 다른 농도의 시료를 준비하함. 프롤린 0.0575g을 용해하여 수용액 상태로 제작하기 위해 1% sulfosalicylic acid (Sigma aldrich, USA)  $500\mu\text{l}$ 를 프롤린과 볼텍싱(SI-A256, Scientific Industrials, USA) 함. 프롤린 농도의 제작은 표 1.의 방법을 이용하였으며, 닐히드린 용액은 Acetic acid(DUKSAN PURE CHEMICALS CO., LTD, South Korea) 40ml와 증류수 10ml, 닐히드린(Bio Basic Inc, Canada) 0.625g을 볼텍싱하여 닐히드린을 용해하여 수용액 상태로 준비함.

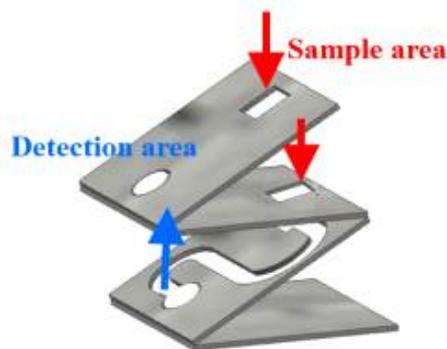


그림46. 종이 센서의 반응 원리 및 구조 개략도

표 1. 프롤린과 sulfosalicylic acid 혼합 방법

Final concentration	1mM proline	sulfosalicylic acid
$0\mu\text{M}$	$0\mu\text{l}$	$1000\mu\text{l}$
$3.33\mu\text{M}$	$10\mu\text{l}$	$990\mu\text{l}$
$8.33\mu\text{M}$	$25\mu\text{l}$	$975\mu\text{l}$
$16.66\mu\text{M}$	$50\mu\text{l}$	$950\mu\text{l}$
$33.3\mu\text{M}$	$100\mu\text{l}$	$900\mu\text{l}$
$50\mu\text{M}$	$150\mu\text{l}$	$850\mu\text{l}$
Total Volume	1000 $\mu\text{l}$	

- 본 연구에서 사용된 종이 센서의 제작으로는 왁스프린팅 공정을 이용하였으며, whatman 크로마토 그래피 종이를 기본 플랫폼으로 이용함. 원하는 형상의 채널과 센서의 구조를 설계하기 위해 Autocad 2014 버전을 이용하여 마스크를 설계 하였으며, Xerox사의 Colorqube 8570DN 고체 왁스 프린터를 사용하여 크로마토그래피 종이에 인쇄함. 크로마토그래피 종이는 평균 색상강도를 가장 뚜렷하게 판별하고 화학 분석에 안정적이며 높은 해상도를 가지는 chromatography paper 1Chr을 사용 함. 센서의 구조는 4개의 부분으로 나누어진 형태로 설계하였으며 초기 길이는 160mm x 40mm로 구성함 (그림47).
- 왁스가 인쇄된 종이는 고체 잉크가 종이 속으로 침투할 수 있도록 열을 가해 종이 속으로 흡수시키는 과정이 필요함. 인쇄된 종이는 그림47.에서 볼 수 있듯이 120도 온도의 핫플레이트(HSD180, Misung Scientific, South Korea)를 통해 가열 하였으며, 이 때 균일한 채널의 길이와 왁스 층을 얻기 위해 가열 시간을 최적화할 필요가 있음. 이를 위해 왁스가 가열 시간에 따라 종이 내로 팽창하는 정도를 파악함. 그림48.에서 볼 수 있듯이 종이에 프린팅된 왁스는 120°C의 온도조건에서 녹아서 종이에 스며드는데, 가열 시간이 증가할수록 종이 내 왁스의 팽창정도 역시 선형적으로 증가함. 또한 그림48. (b)에 도시된 바와 같이 120°C의 온도조건으로 40초 동안 가열하면 왁스가 종이에 완전히 침투되지 못하고, 160초를 가열할 경우 종이의 단면으로 왁스가 충분히 스며들어 아랫면까지 균일하게 침투된 것을 확인함. 이에 본 연구에서 사용할 종이 센서의 마스크 제작 가열 온도와 시간은 120°C의 온도와 160초의 시간으로 최적화 함.

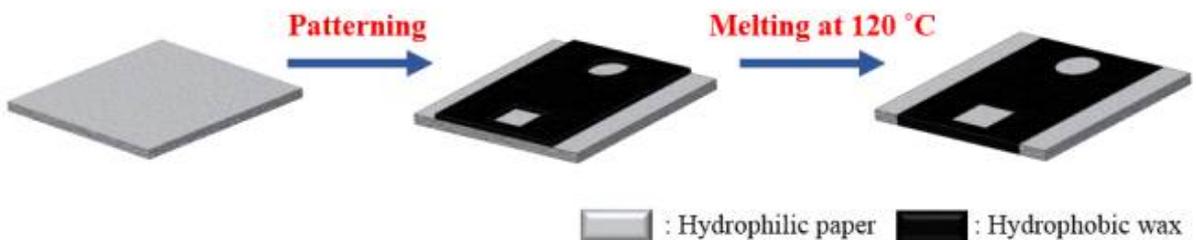


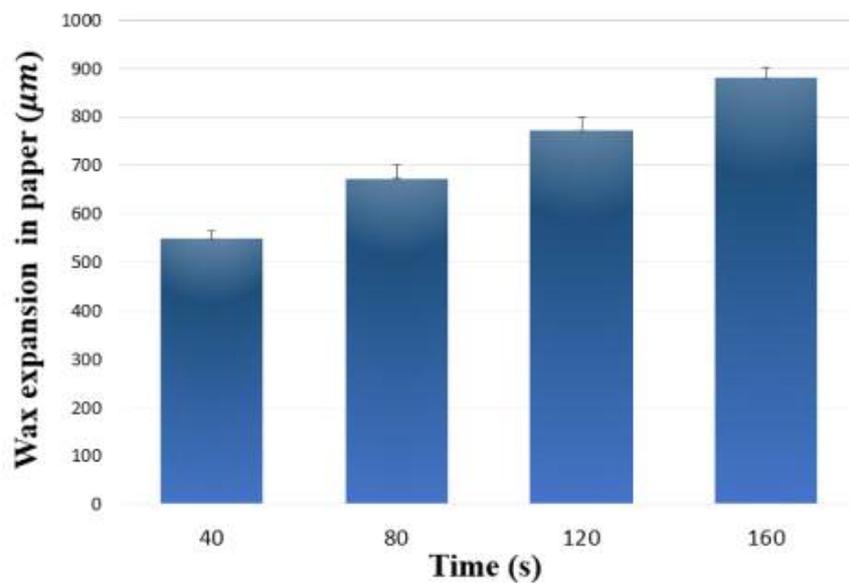
그림47. 왁스 프린팅 공정 기법을 이용한 종이센서 제작 개략도

- 이상의 과정을 통해 왁스가 프린팅 되지 않은 부분은 친수성의 종이만 남게 되고, 이 부분들이 샘플로드부와 검출부 및 미세유체채널을 형성하게 됨. 샘플 로드부와 센서부 및 미세유체 채널의 주변이 왁스가 침투된 종이로 이루어져 있으므로, 오리가미 방법을 이용하여 형성된 본체에서는 샘플로드부와 센서부의 표층만 외부로 노출되고 나머지 부분은 내부에 위치하여 외부와 차단된 상태가 되어 밀폐된 미세유체채널의 구조를 얻게 됨. 본체를 구성하는 각층은 특별한 정렬 없이 선을 기준으로 간단하게 접어 제작하며 각층 사이를 접착하여 제작함.
- 오리가미 방법으로 밀폐 채널을 제작하기에 앞서 샘플 로드 부에 닌히드린 용액을 프리 로드함. 그림49.에서 도시된 바와 같이 두 부분의 사각형(8mm x 8mm)에 30 $\mu$ l를 로드 후 건

조하였으며, 휘발성을 띄고 있는 다흐린 용액이 증발하는 것을 보완하기 위해 총 3반복을 수행함. 이를 통해 현장 진단 시 sulfosalicylic acid 용액만을 구비하여 간단하게 프롤린을 검출 할 수 있으며, 다흐린 용액이 균일하게 코팅됨에 따라 검출부에서의 감도가 향상되고 프롤린 농도에 따라 일정한 색상이 감지되도록 함 (그림49).

- 종이 센서에서 다흐린 반응을 통해 얻어진 발색 반응을 분석하기 위해 일정한 광 조건에서 영상을 촬영할 필요가 있음. 따라서 일루미네이션 챔버 내에 반응이 완료된 종이센서를 위치시켜 이미지를 획득함. 챔버의 윗부분에는 디지털 카메라를 설치하여 일정한 광 조건에서 이미지를 획득하였고, 획득한 이미지는 영상 분석 소프트웨어인 Image J를 이용하여 RGB색상강도 분석을 통하여 발색 반응의 정도를 측정함.

(a)



(b)

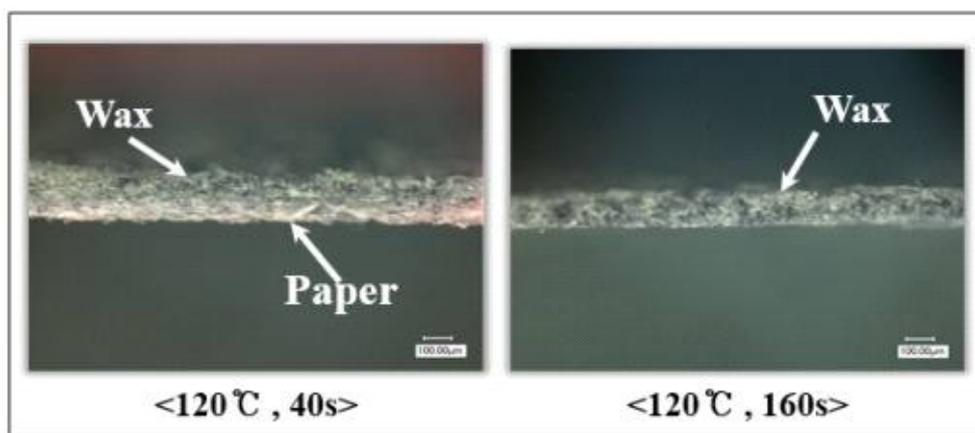
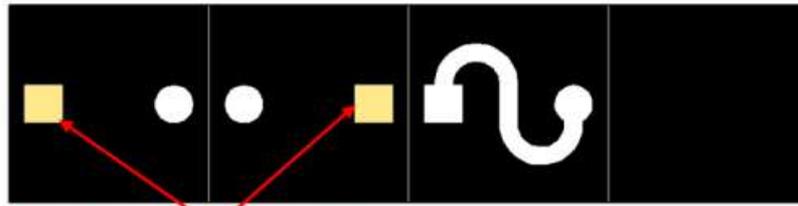


그림 48. 가열 온도에 따른 왁스에 팽창 정도. (a)120°C의 온도에서 가열 시간에 따른 왁스의 팽창정도, (b) 가열 시간에 따른 종이 내 왁스의 팽창 현미경 이미지



**Pre-load area (Ninhydrin)**

그림 49. 왁스 프린팅 공정 기법을 이용한 종이센서 제작 개략도

- 작물의 가뭄 스트레스 진단을 위해서는 식물체 내에서 축적되는 프롤린을 닌히드린 반응을 통해서 검출함. 닌히드린 반응을 통한 색 변화를 감지하기 위해서는 단백질의 가수 분해를 촉진하는 가열 과정이 필수적임. 따라서 본 연구에서 최적화된 가열온도를 결정하기 위해 핫 플레이트 온도 100°C, 110°C, 120°C, 130°C, 140°C, 150°C에서 가열 하였으며, 시간에 따른 발색 반응 정도를 확인하기 위해 가열 시작 직후부터 30초 간격으로 이미지를 촬영함.
- 각 온도에 따른 닌히드린-프롤린 반응은 1000초 동안 가열하였으며, 프롤린 용액은 3mM 농도를 사용하여 30초 간격으로 이미지를 촬영함. 닌히드린-프롤린 반응 프로토콜에 따르면 반응 결과를 획득하기 위한 가열온도는 100°C이나 종이센서가 4층으로 이루어져 있어 상부까지 충분한 열을 전달할 수 있도록 총 6단계의 온도로 가열함. 그 결과 100°C부터 140°C까지의 온도로 가열을 하였을 때 가열 시간이 종료되었음에도 반응이 완료되지 않음. 반면 150°C의 온도로 가열을 하였을 때 상부의 검출 부에서 가장 균일하고 뚜렷한 발색반응을 확인할 수 있었으며, 반응을 얻기 위한 가열 시간 또한 다른 온도에 비해 짧은 시간에 결과를 얻을 수 있음. 또한 550초 부근에서 반응이 완료되었고, 그 이후에는 일정한 색상강도를 유지함을 알 수 있었다. 따라서 150°C의 온도로 550초의 가열시간을 최적화된 가열 조건으로 설정함 (그림50)

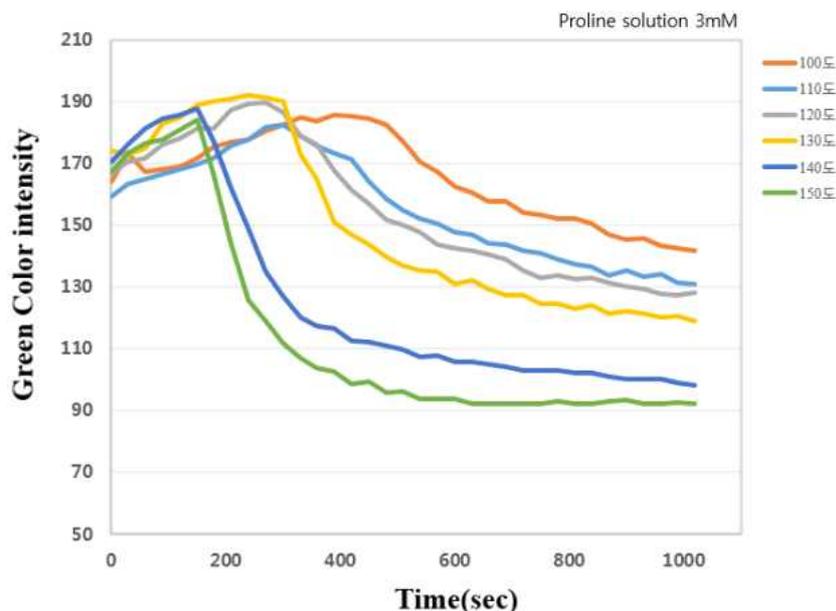
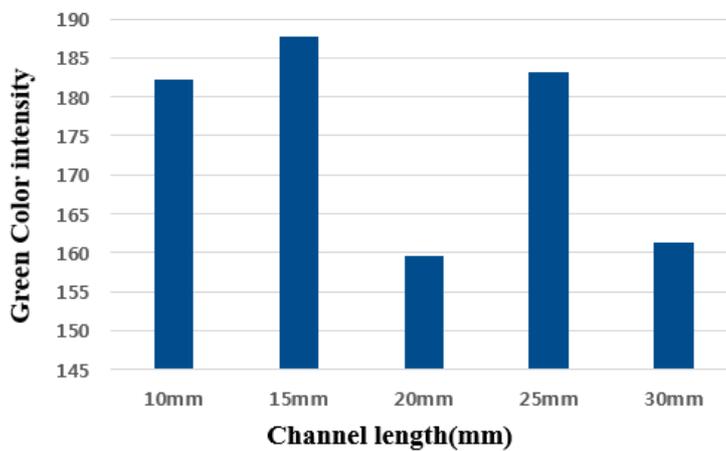


그림50. 가열 온도에 따른 시간별 종이센서 색상 강도 변화 결과

- 샘플 로드부에 투입될 프롤린 용액과 사전에 코팅되어 있던 닌히드린 용액이 채널을 유동하며 충분히 섞이고 반응이 일어날 수 있도록 채널의 길이를 결정함. 프롤린 용액은 3mM의 농도를 사용하였고, 채널의 길이는 10mm, 15mm, 20mm, 25mm, 30mm로 설계함. 프롤린 용액을 100 $\mu$ l 로드한 이후 핫플레이트 온도 150°C에서 550초 동안 가열하였으며 반응이 완료된 이후 일루미네이션 챔버에서 이미지를 획득한 후 결과를 분석함. 그 결과 채널의 길이가 20mm 일 때 발색결과가 가장 뚜렷하게 나타났으며, 이를 최적화된 길이로 설정함 (그림51).

(a)



(b)

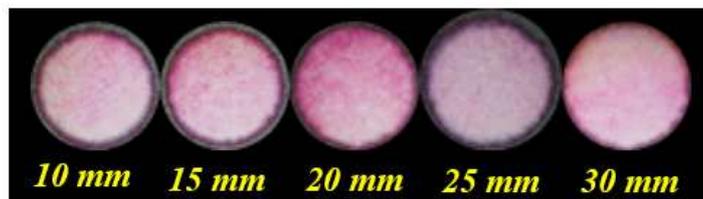


그림51. (a)채널 길이에 따른 종이센서 색상 강도, (b) 채널길이에 따른 닌히드린 발색 반응

- 상기의 최적화된 조건을 고정하고 최종적으로 닌히드린 로드 양을 결정함. 샘플 로드 부의 사각형(8mm x 8mm)에 포화되지 않고 균일하게 코팅되는 닌히드린 양은 30 $\mu$ l이었으며, 로드 횟수를 조절하여 최적화된 결과를 도출하고자 함. 프롤린 용액은 3mM의 농도를 사용하였으며 미세유체 채널의 길이는 20mm로 설정하였고, 가열 조건은 150°C에서 550초로 진행함. 닌히드린 용액을 30 $\mu$ l 로드하고, 상온에서 1시간 건조 후 다시 닌히드린 용액을 횡수별로 로드하여 종이센서를 제작하였다. 닌히드린 용액을 1,2회 로드하였을 때 닌히드린 반응이 충분히 일어나지 않아 균일한 색상강도를 얻을 수 없었다. 반면에 닌히드린을 3번 이상 로드하였을 때는 균일한 색상강도를 확인할 수 있었으며, 3회 이상 닌히드린을 로드하였을 경우 색상강도에는 큰 변화가 없어 닌히드린 로드 횟수는 3회차로 결정하여 실험을 진행함 (그림52).

- 제작된 종이센서를 통해 실제 작물에서 가뭄 스트레스를 측정하기 위해 프롤린 농도의 측정

이 필수적으로 이루어져야 함. 따라서 실제 작물의 가뭄스트레스를 측정하기에 앞서 프롤린 시약을 통해 종이 센서의 성능을 시험함. 프롤린 시약은  $50\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$ ,  $150\mu\text{M}$ ,  $200\mu\text{M}$ 의 4가지 농도를 준비하였고 앞서 최적화된 조건으로 실험을 진행함. 검출 부의 색상은 프롤린의 농도가 높아질수록 붉은 색의 발색 정도가 진하게 나타났으며, 검출 부의 변색 정도를 측정하여 기준이 되는 색상과 비교하는 비색법을 이용하여 프롤린 샘플을 농도별로 분석함.

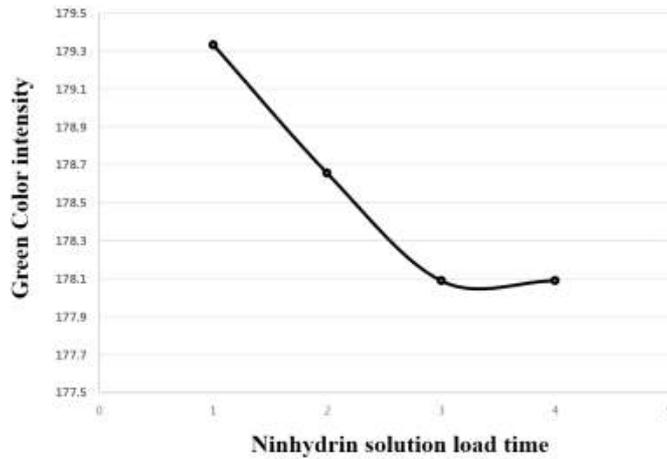


그림52. 닐히드린 용액 로드 횟수에 따른 종이센서 색상강도

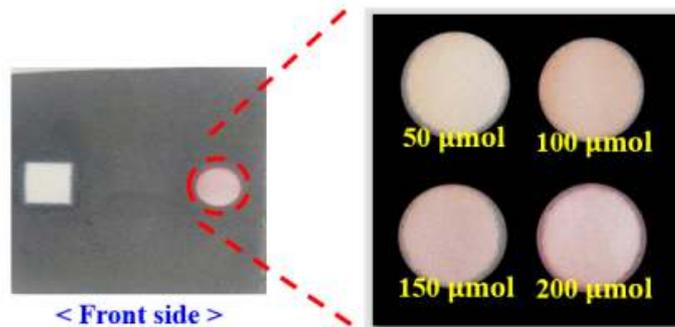


그림53. 프롤린 샘플 농도에 따른 닐히드린 발색 반응

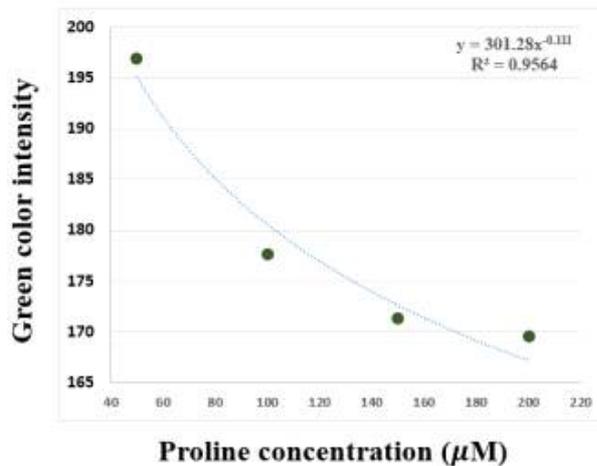
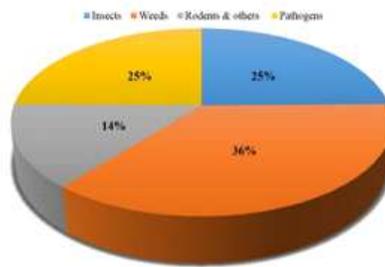


그림54. 프롤린 샘플 농도에 따른 색상강도

### 다. 작물의 병해를 진단하기 위한 종이기반의 polygalacturonase(PG)검출 센서 제작

- 지구 온난화로 인한 기후 변화에 의해 아열대성 병해충이 유입되고, 병원균의 생식주기도 짧아져 식물 질병을 일으키는 병원균의 개체수도 증가하고 있음. 식물 질병은 작물의 수확량 감소에 크게 영향을 미치고 특히 균류는 감염성이 높은 식물 질병을 일으키는 주요한 요인으로 알려져 있음(그림55). 따라서 식물의 병해가 발현되기 전 조기에 식물의 병해를 진단할 수 있는 바이오 마커를 찾는 것은 중요한 일임.
- 세포벽은 식물세포의 세포막 바깥쪽에 형성되어 식물 세포를 지지하고 보호하고 형태를 유지하는 역할을 함. 식물 별로 구성 성분에 차이는 있으나 공통적으로 다당류인 셀룰로오스, 헤미셀룰로스와 펙틴으로 구성되어 있고 펙틴은 셀룰로스-헤미셀룰로스 네트워크를 둘러싸는 수화된 겔로 갈락토스의 산화물인 갈락투론산이 주성분인 다당류 임(그림56). polygalacturonic acid (PGA) 는 펙틴의 주요 구성 물질 중 하나로, galacturonic acid (GA) 가 여러 개 모인 기다린 체인 형식으로 이루어 짐.



(Oerke, E.C., 2006, "Crop losses to pests," Journal of Agricultural Science)

그림55. 식물 질병에 의한 작물 수확량 손실

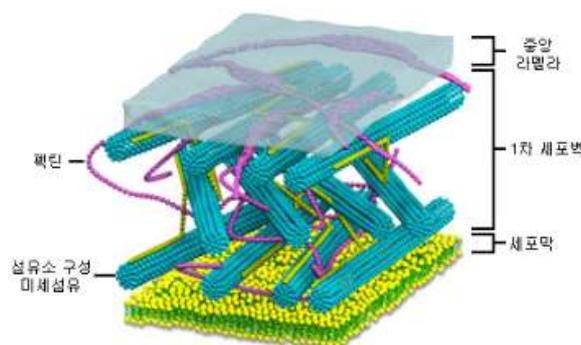


그림56. 세포벽 성분

- 식물 병원체중 곰팡이 균에 의한 감염은 포자 부착, 발아, 숙주 침투, 병변 형성 및 확장, 조직 형성 및 포자 성숙이 포함되는 복잡한 과정이 수반됨. 곰팡이 균의 침투는 규티나제 및 리파아제의 작용을 통해 외부 표피를 분해시킴으로써 달성 할 수 있고, 표피를 통과 후에는 세포 벽 분해 효소를 생성하여 식물 세포벽을 공격함. 이때 생성되는 세포벽 분해 효소중 하

나인 PG (polygalacturo nase:EC 3.2.1.15) 는 세포벽의 주성분인 펙틴을 분해하여 세포벽의 안정성을 광범위하게 파괴하기 때문에 초기 감염단계에서 생산되는 병원성을 확인 할 수 있는 인자임(그림57).

○ PG (polygalacturonase:EC 3.2.1.15) 는 galacturonic acid의 잔기 사이에 있는  $\alpha$ -1,4 글리코시드결합을 가수분해하는 효소임. 특히 세포벽의 펙틴 결합을 구성하는 주요한 구성 요소인 polygalactronic acid (PGA) 사슬을 galacturonic acid (GA) 라는 작은 단위의 체인 형태로 절단함. 현재 PG의 효소 활성은 기질의 환원성 말단의 증가율을 측정하는 비색법을 이용해 측정되고 있음. 그 방법에는 대표적으로 Nelson-Somogyi 방법, 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법, 그리고 Ruthenium red (RR) 방법 등이 있음. Nelson-Somogyi 방법은 다른 방법들과 비교해서 효소 활성이 떨어지며 효소를 검출하기 까지 과정이 복잡하다는 단점이 있음. 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 은 높은 효소 활성을 측정할 수 있으나 측정하는데 장시간이 소요됨. 그러므로 다양한 PG검출 방법 중에 과정이 가장 단순하고 빠른 시간내 효소의 활성을 측정할 수 있는 Ruthenium Red (RR) 방법을 이용해 PG의 활성을 측정함.

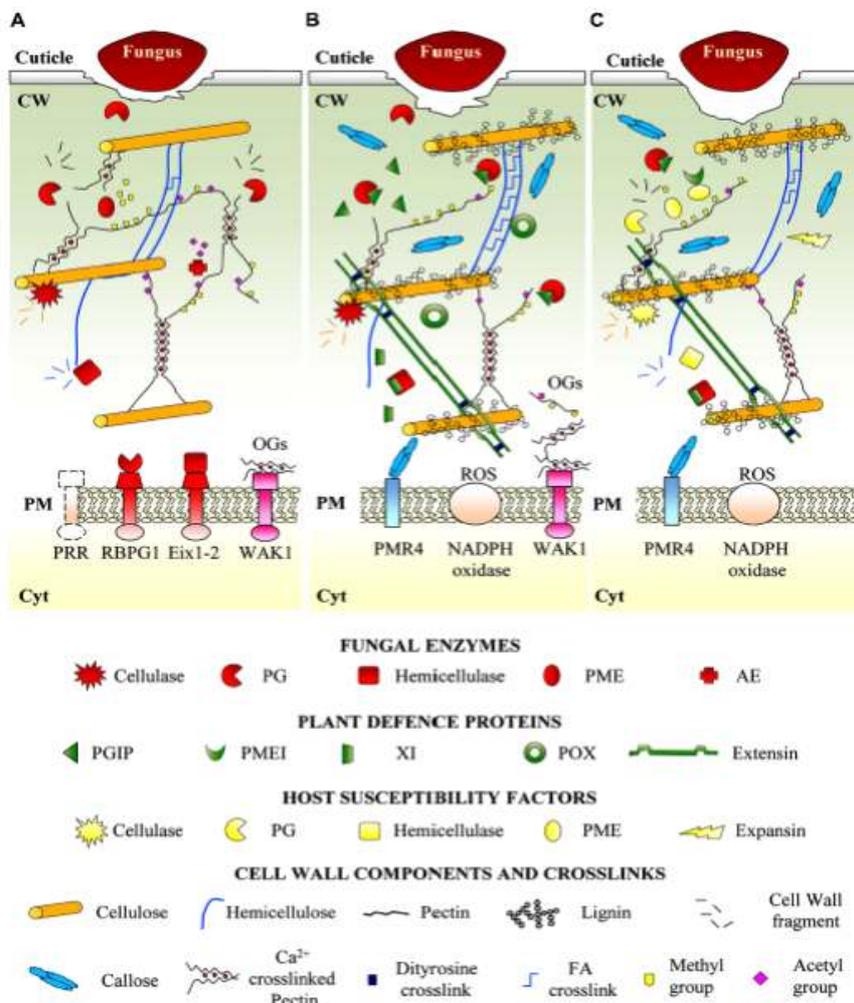


그림57. 식물병원균 침입 고정과 세포벽 유동성 (<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00228>)

- Ruthenium Red (RR) 방법에서 사용되는 Ruthenium Red는 pectin의 카르복실기의 분자 내 공간에 선택적으로 결합하고 알긴산 카르복실기와는 거의 결합하지 않는 염료임. 염료 그룹은 하나의 galacturonide 잔기의 카르복실기 산소와 펙테이트 사슬내의 인접한 galacturonide의 하이드록실기 산소에 결합함(그림58). 이러한 결합 특성을 기초로 하여 결합된 PGA와 Ruthenium Red의 dye-polysaccharide 복합체에서 PG에 의한 절단되는 PGA의 양에 비례해 비색화되는 양을 측정함으로써 PG의 활성을 측정할 수 있음.

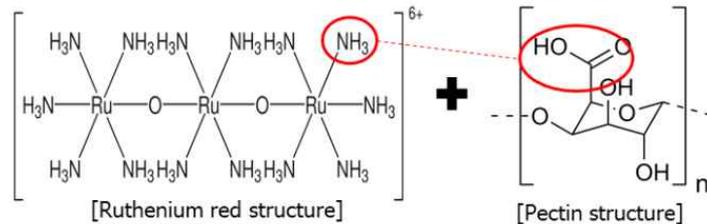


그림58. Ruthenium red의 화학구조와 pectin의 결합 구조

- Ruthenium Red (RR) 방법을 이용하기 위해 먼저 PGA와 Ruthenium Red가 결합된 dye-polysaccharide 복합체에 의해 생긴 침전물을 제외한 상층액의 흡광도가 '0'이 되는 두 물질의 결합 최적의 비율을 찾음. 흡광도 값은 결합하지 않는 PGA의 양을 나타내며 결합에 최적의 비율을 찾게 되면 PG 활성 측정에 필요한 적절한 PGA양과 RR의 양을 결정할 수 있다. 이렇게 결정된 두 물질의 최적의 비율로 흡광도 값이 0 되면 PG의 활성에 의해 잘리는 PGA의 양은 dye-polysaccharide 복합체에서 떨어져 나오는 RR의 색 변화로 나타나며 변화된 양은 흡광도 측정을 통해 확인할 수 있음.
- PGA와의 결합 반응에 적합한 RR 농도를 찾기 위해 80mM sodium acetate buffer(pH5.5) buffer에 PGA(sigma)를 5mg/ml 농도로 용해시켜 준비하고, PGA와 결합시킬 RR(sigma)도 5mg/ml 농도로 증류된 물에 용해 시켜 만든다. 반응시킬 RR는 20 $\mu$ g/ml, 40 $\mu$ g/ml 그리고 60 $\mu$ g/ml 와 같이 3가지 농도로 만듦. 각각 만들어 놓은 RR에 다양한 농도(5~70 $\mu$ g/ml)의 PGA를 섞고 나머지는 증류된 물로 채워 최종 부피가 6ml이 되도록 하였다. 반응 후 dye-polysaccharide 복합체에 의해 형성된 침전물은 5000RPM에서 10분 원심분리기를 이용해서 분리하였다. 이렇게 분리된 상층액을 1ml 큐벳에 넣고 RR가 최대 흡광도를 나타내는 535nm에서 UV-vis spectrophotometer (Ultrospec™ 3000, GE Healthcare, USA)을 이용해 흡광도를 측정함 (그림59).



그림59. PGA-RR의 최적 결합 비율 확인을 위한 실험 개략도

- 시간에 따라 PG가 분해하는 기질의 양 및 PG의 활성을 측정하기에 RR방법이 유용한지 확인하기 위해 상용화된 PG를 이용해 활성도를 측정함. 구매한 Pectinex® Ultra SP-L (novozimes, Denmark) 는 활성이 3300unit/g 으로 pH3~5, 온도는 20~50에서 최대 활성을 갖는 상용화된 PG임. 기질인 PGA를 분해시키는 효소의 활성을 나타내는 단위인 unit은 1.0 $\mu$ mole 의 polygalacturonic acid를 galacturonic acid 로 1분 동안 pH4.0 과 25°C조건에서 유리시키는 농도로 정의됨.
- 효소의 활성을 측정하기 위해 결정된 일정량의 PGA (45 $\mu$ g/ml 또는 65 $\mu$ g/ml) 에 상용화된 PG를 0.01 unit/10 $\mu$ l, 0.1 unit/10 $\mu$ l, 0.5unit/10 $\mu$ l, 1unit/10 $\mu$ l 으로 최종 부피가 100 $\mu$ l 되도록 구성함. 그리고 효소가 활성을 갖기 적당한 온도인 37~40°C로 유지되는 항온수조에 서 분 단위로 반응을 시킴. 각각의 반응물들은 1분 단위로 꺼내어 효소의 활성을 억제시키는 온도인 90°C이상의 열을 5분 처리해 준 다음 바로 얼음에 5분 동안 냉각시켜 효소 반응을 완전히 종료시킴. 반응이 종료된 튜브에 최종 부피가 3ml이 되도록 물을 넣고, 일정량의 RR (40 $\mu$ g/ml 또는 60 $\mu$ g/ml) 을 넣은 후 물로 최종 부피가 6ml이 되도록 구성함. 이렇게 준비된 샘플에서 침전물을 분리하기 위해 5000RPM에서 10분 원심분리를 하고 상층액만 1ml 큐벳에 넣어 UV-vis spectrophotometer로 535nm에서 흡광도를 측정함 (그림60).



그림60. PG 활성도 측정을 위한 실험 개략도

- PG의 정도를 현장에서 간편하게 검출하기 위해서 일반적으로 저가로 간편하게 제작할 수 있는 종이 기반 센서를 PG를 검출하는 센서로 설계 및 제작함. 종이는 어디에서나 손쉽게 구할 수 있는 물질로서 저비용, 유연성, 간편성을 모두 갖추고 있어 현장 진단을 위한 키트 개발에 많이 사용되고 있는 재료임. 종이 기반 센서의 구조는 크게 세부분으로 나누어져 있으며 전체 크기는 6cm X 1.8cm 임. 첫 번째 부분은 PG 샘플을 흡수시키면서 동시에 RR의 색 변화를 감지할 수 있도록 중앙에 지름 0.8cm 크기의 원형 모양의 센서가 있는 센서부가 있음. 두 번째 부분은 PG가 반응하는 PGA-RR complex를 균일하게 코팅할 수 있도록 한 변이 1.32cm 크기의 정사각형 모양의 PGA-RR complex 부분이 형성됨. 마지막 부분은 투입된 시료가 종이를 투과하지 않고 PGA-RR complex 부분에서 반응할 수 있도록 방수층으로 구성됨 (그림61).

- CAD 프로그램을 이용해 종이 센서는 디자인 하였고 PG를 친수성 물질인 종이에서만 반응 되도록 반응이외의 부분은 왁스프린팅 방법을 이용해 소수성 영역으로 제작함. 왁스 프린팅 방법은 소수성 특성을 가지고 있는 왁스를 whatman 크로마토그래피 종이에 인쇄한 다음 왁스가 종이 속으로 흡수될 수 있도록 핫플레이트 (PC-420D, Labnet, USA) 를 이용하여 120°C에서 3분 동안 가열해 주는데 제작 공정이 간단하고 짧은 시간에 소수성 부분을 만들 수 있는 장점 가짐.

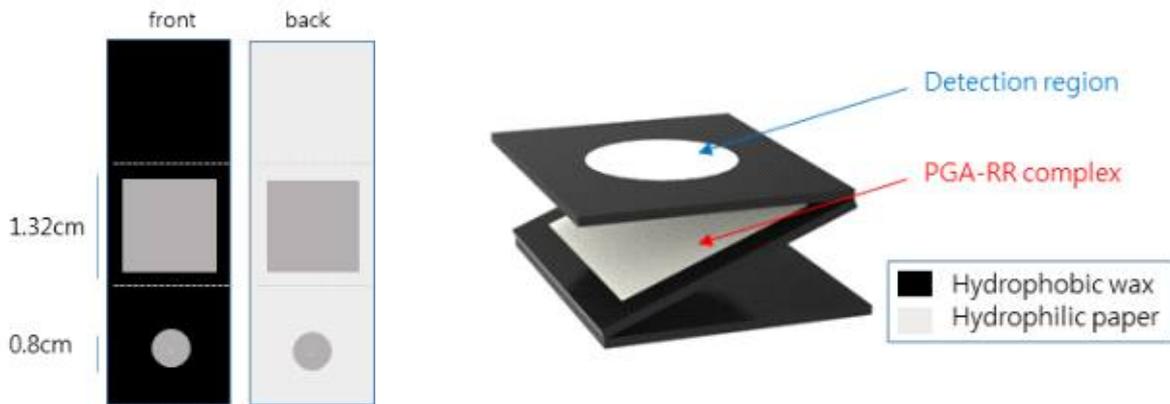


그림61. PG 활성 측정을 위한 종이 기반 센서 구조

- 일정량의 PGA (65 $\mu$ g/ml)와 RR (60 $\mu$ g/ml) 을 최종 부피 250 $\mu$ l buffer에 넣어 PGA-RR complex를 만들었다. 이렇게 만들어진 PGA-RR complex를 종이 센서의 두 번째면의 친수성 종이 부분에 올리게 되면 buffer는 종이 아래 부분으로 모두 빠지고 PGA-RR complex만 종이 위에 남게 됨. 이렇게 만들어진 종이센서에서 PG가 활성을 갖는 적당한 온도를 찾기 위해 상용화된 PG를 0unit/100 $\mu$ l, 0.1 unit/100 $\mu$ l, 1unit/100 $\mu$ l, 10unit/100 $\mu$ l 다양한 농도로 준비하여 센서부에 로드함. 그리고 핫 플레이트를 30°C~40°C 온도가 유지되도록 준비하고 PG를 떨어뜨린 종이 센서에 반응을 관찰함. 종이 센서 위에 올린 PG가 모두 흡수될 때까지 반응 시킨 후, PG가 PGA-RR을 잘라내면서 나오는 색의 변화를 암실의 일정량의 광원 아래에서 카메라를 이용해 이미지를 촬영함. 얻어진 이미지는 image J 프로그램을 이용해 RGB 값을 분석하고 각각의 red, green, blue 값에 평균값을 얻음. 종이 센서에서 PGA-RR complex 의 분포도를 확인하기 위해서는 이미지 분석프로그램을 사용하여 pixel 별 intensity 분석 함.
- 곰팡이 균에서 추출한 PG를 얻기 위해 농업유전자정보센터 (KACC) 에서 분양받은 Botrytis cinerea을 이용함. 이 균은 (KACC No. 40574) 토마토에서 유래된 잿빛곰팡이병에서 분류되었고 PDA 배지에서 25°C 배양기를 이용해 약 2주 간격으로 계대배양 함. Botrytis cinerea은 애기장대잎에서 병원체로서 감염을 쉽게 일으키는 균으로 널리 사용되어 지고, PG 관련된 논문의 실험재료로도 사용되는 곰팡이 균임 (그림62).
- Botrytis cinerea에서 PG를 생산하기 위해 Czapek Dox 배양액을 사용함. 곰팡이 균의 배양에서 사용되어지는 PDB liquid medium은 높은 글루코스 농도를 가지고 있어 성장에 필

요한 탄소원으로 글루코스를 사용함. 그러나 Czapek Dox 배양액 (per liter: 2.5g of  $\text{NaNO}_3$ , 0.5g of  $\text{KCl}$ , 0.5g of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10mg of  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 10g of pectin) 은 에너지 원으로 pectin을 사용함으로써 pectin 분해에 유용한 효소의 생산을 높이게 되는데, 이 때 활성이 높은 PG를 생산하게 됨. Czapek Dox 배양액은 pectin을 넣은 것과 pectin을 넣지 않은 배지를 만들고 고온 고압에서 멸균 후 *Botrytis cinerea*을 배양하고 있는 PDA 배지에서 포자를 수집하여  $1 \times 10^5/\text{ml}$  농도로 준비된 배양액에 접종함. 이렇게 준비된 배양액은  $25^\circ\text{C}$ , 120RPM 조건의 shaker incubator에서 PG 생산이 최대로 되는 5일 동안 배양함 (E. Rha et al. / FEMS Microbiology Letters 201 (2001) 105~109). *Botrytis cinerea*은 배양되는 동안 배양액으로 PG를 분비하여 pectin을 분해하게 되므로 5일 배양후 배양액에 PG가 존재하게 됨(그림63). 배양 후에는 Whatman chromatography no.1 paper을 이용해 균사체와 분리하여 실험에 사용할 PG를 얻음.

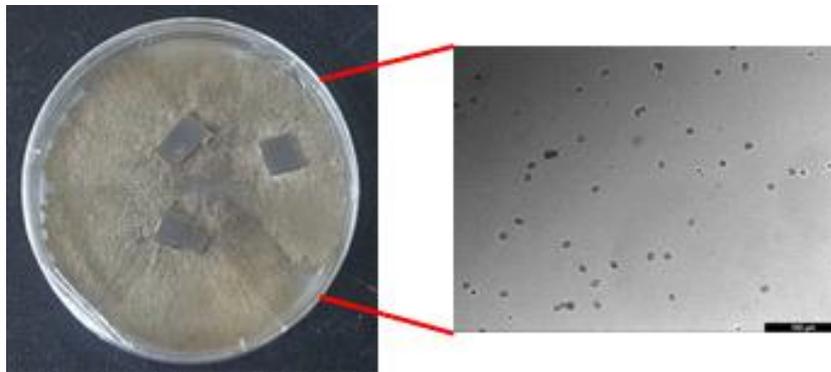


그림62. *Botrytis cinerea* 균사체 와 포자 모습



그림63. pectin 유무에 따른 *Botrytis cinerea* 배양액 모습

- PGA와의 결합 반응에 적합한 RR 농도를 찾기 위해 반응시킬 RR는  $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $40\mu\text{g}/\text{ml}$  그리고  $60\mu\text{g}/\text{ml}$  와 같이 3가지 농도로 만듦. 세 가지 농도의 RR에 다양한 농도 ( $5\sim 70\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 PGA를 섞고 증류된 물로 채워 최종 부피가  $6\text{ml}$ 이 되도록 함. 반응 후 형성된 침전물은 원심분리하게 분리하고 RR가 최대 흡광도를 나타내는  $535\text{nm}$ 에서 흡광도를 측정함 (그림 64). 세 가지 농도의 RR은 PGA와 결합 비율이 1:1에 가까워질수록 PGA-RR 결합에 의한 침전물의 양이 가장 많아졌고, 상대적으로 상층액의 RR에 의해 나타나는 붉은색이 거의 사라지는 것을 알 수 있음. 따라서 PGA-RR의 결합이 모두 이루어지는 최적의 결합 비율은 1:1 이며 그 양은 PGA가  $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 RR 은  $20\mu\text{g}/\text{ml}$ , PGA가  $45\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 RR 은 40

$\mu\text{g/ml}$  그리고 PGA가  $65\mu\text{g/ml}$ 일 때 RR 은  $60\mu\text{g/ml}$  임을 확인함. 이는 다양한 PGA-RR 결합 비율에 따른 상층액의 붉은 색의 변화를 통해서도 같은 결과를 얻음 (그림65).

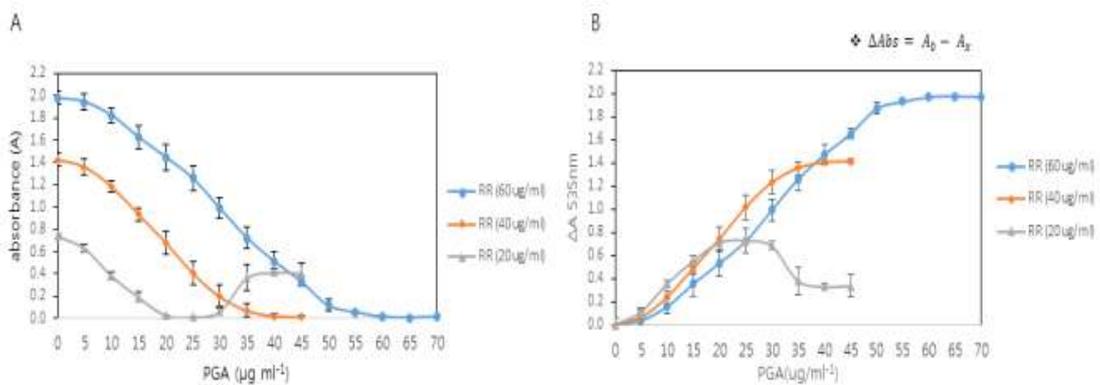


그림64. 다양한 PGA-RR 결합 비율에 따른 흡광도

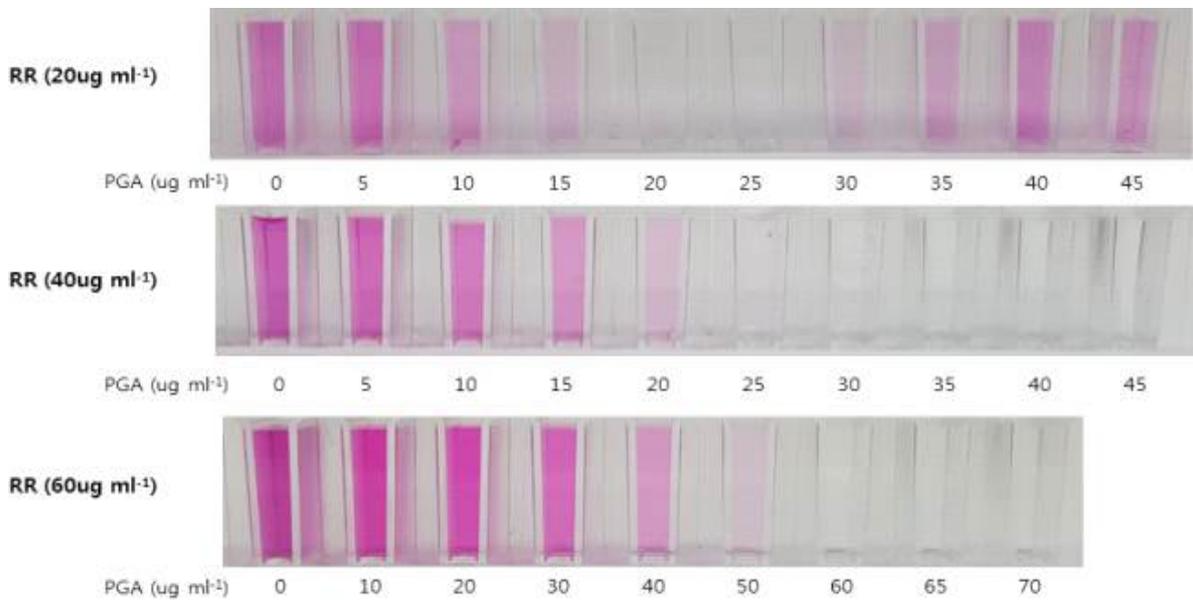


그림65. 다양한 PGA-RR 결합 비율에 따른 RR 색의 변화

- 일정량의 PGA-RR ( $45\mu\text{g/ml}$ - $40\mu\text{g/ml}$  또는  $65\mu\text{g/ml}$ - $60\mu\text{g/ml}$ ) 에 상용화된 PG를 다양한 조건의 농도 (0.01 unit, 0.1 unit, 0.5unit, 1unit)로 넣고 효소가 활성을 갖도록 분단위로 온도 처리를 하여 흡광도를 측정함. PGA-RR의 결합양이 다르면 효소 활성별 나타나는 최종 흡광도는 다르나, 두 가지 PGA-RR 결합비율에서 모두 온도 처리시간이 PG 0.1unit은 1분, PG 0.5unit은 5분에 제공된 PGA를 이용한 효소 활성이 포화상태에 도달함. 그에 반해 농도가 낮은 PG 0.1 unit과 PG 0.01unit은 20분이 지나도 제공된 PGA가 모두 가수 분해 되지 않았으나 농도가 낮더라도 온도 처리시간이 증가함에 흡광도가 증가함 (그림66). 결과적으로 PG 농도에 비례해서 흡광도의 차이가 나타나며, 온도 처리시간을 5분 정도 주었을 때 PG 농도별 흡광도의 차이가 확실히 나타남을 알 수 있음. 이러한 결과는 PG 0.1 unit의 처리시간별 가수분해되는 PGA양을 통해 다시 확인 할 수 있음 (그림66).

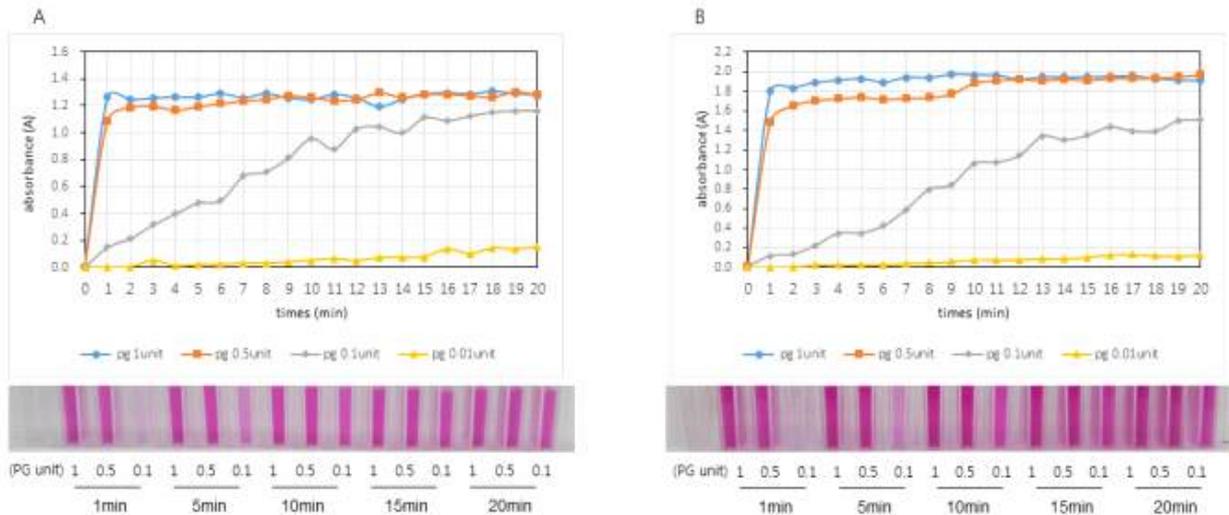


그림66. 다양한 농도의 PG의 처리시간별 흡광도 (A) PGA-RR=45µg/ml-40µg/ml  
(B) PGA-RR=65µg/ml-60µg/ml

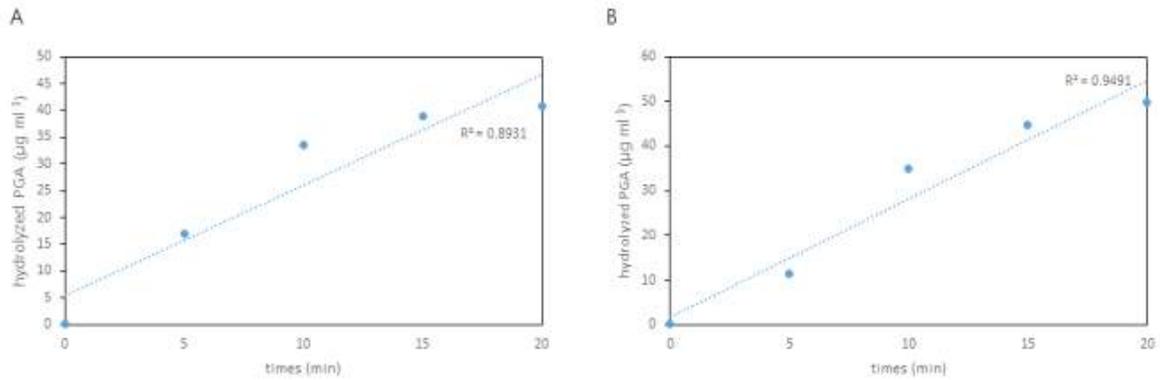


그림66. PG 0.1 unit의 처리시간별 가수분해되는 PGA양 (A) PGA-RR=45µg/ml-40µg/ml (B) PGA-RR=65µg/ml-60µg/ml

- 종이 기반 센서 개발을 위해서 가장 먼저 RR의 종이 안에서 이동률을 확함. 그러나 RR은 종이에 착색하였고 이러한 특징 때문에 종이 채널흐름을 통한 RR의 색의 변화는 확인하기 어려움. 그래서 PG활성 측정 종이 기반 센서의 기본 형태를 결정하는 하기 위해 실험을 진행함. 이를 위해 종이센서를 색깔 변화 확인 부분과 PGA-RR complex을 올릴 수 있는 부분으로 나누고 RR 색의 변화를 효과적으로 확인 할 수 있는 종이 센서 형태를 찾음. PGA-RR complex 양은 65µg/ml-60µg/ml로 정하고 PG를 반응시키는 면 (A면) 을 고정한 후, PGA-RR complex 올리는 면을 다양화 함. 상용화된 PG의 농도는 0unit, 0.1 unit, 1unit, 10unit 과 같은 네 가지 농도로 실험을 진행함.
- complex를 A면에 올리는 경우에는 PG 농도와 무관하게 변화가 없었고, complex를 A면과 D면에 올리는 경우에는 A면에만 올렸을 때 보다는 색의 변화가 나타났으나 농도와 무관하게 색이 착색되었다. 반면에 complex를 D면에 올렸때, 가장 뚜렷한 색의 변화가 관찰 되었고, PG를 반응시켰던 부분에서도 색의 변화가 있음 (그림67). 이러한 실험 결과를 바탕으로

complex를 D면에 올리고 색변화부분을 complex 바로 위쪽에 오도록 하는 종이 센서의 구조를 결정함.



그림67. PG 활성 측정 종이 센서 개발 위한 PGA-RR complex 면 다양화

- PG를 검출하기 위해서는 효소가 반응하는 기질의 분포가 중요하므로, PGA-RR complex 가 종이 표면에 고르게 분포하는지를 확인함. PGA-RR complex를 표면적이 같은 한변이 1.32cm인 사각형 모양 (square) 과 지름이 1.5cm인 원모양 (circle) 으로 제작함 (그림68). 이렇게 표면적은 같고 모양은 다른 종이면에 PGA-RR complex을 동일한 조건으로 올리고 카메라를 이용해 이미지를 얻음.
- 획득한 이미지는 이미지 분석프로그램을 이용해 흑백으로 전환한 후 PGA-RR complex에 있는 모든 pixel에서 intensity를 측정함. 이렇게 측정된 intensity의 평균값을 내어 분석해 보면 면의 모양에 따른 intensity 차이는 없음 (그림69. A). 또한 intensity별 pixel number를 확인하여 보았을 때도 면의 모양의 차이가 값에 영향을 주지 않으며 같은 모양 사이에서도 큰 차이 없이 경향이 나타남을 알 수 있음 (그림69. B). 따라서 PGA-RR complex 올리는 면의 모양은 분포에 큰 영향이 없으므로 제작이 용이한 사각형 모양으로 면의 모양을 결정함.

- PGA-RR complex를 종이 면에 올리게 되면 친수성 종이 부분과 소수성 왁스 부분의 경계에 complex가 모이는 경향을 확인할 수 있었다. 그래서 PGA-RR complex를 올리는 면에 임의의 소수성 부분을 첨가하여 PG 반응 부분에 complex를 집중시킬 수 있는지 실험을 진행함. 우선 PGA-RR complex를 올리는 면에 약 1mm 두께에 소수성 선을 십자가 모양으로 넣어서 소수성 선을 첨가하지 않는 종이 센서에 같은 조건의 PG 0unit 과 10unit 를 반응시킴. 반응 후 이미지는 암실 조건에서 광원 밝기를 3가지 조건 (90C, 180C, 270C)으로 조절하여 얻고 이미지는 image J 프로그램을 이용해 RGB 값을 분석함.
- 광원의 밝기와 상관 없이 공통적으로 PG 0unit 보다 PG 10unit 일 때 blue, green, red 값이 감소함. 그 중 blue 값의 변화가 가장 두드러지게 나타났으며 특히 광원이 180C일 때 값의 차이가 더 선명하게 나타남. 그러나 기대와는 달리 소수성 선이 첨가된 종이 센서가 소수성 선이 없는 종이 센서 보다 우수한 감도를 나타내지는 않음 (그림70).
- 효소가 기질과 반응하기 위해서는 효소가 활성을 갖는 온도가 중요함. 그래서 PG 활성을 측정하기 위해 만들어지는 종이센서에서의 기질과 반응에 적합한 최적의 온도를 찾기 위한 실험을 진행함. 기존 PGA-RR 반응은 항온 수조에서 35°C~40°C온도에서 진행되었기 때문에 핫플레이트를 30°C, 35°C 그리고 40°C로 세가지 온도로 고정하고 종이센서에 PG를 0unit, 1unit, 5unit, 10unit 농도로 반응시킴. 반응시간은 종이 센서에 반응시킨 PG가 모두 건조되는 시간인 25분으로 함. 이미지는 암실 광원 180C에서 카메라를 사용해서 광학이미지를 얻었고, 얻어진 이미지는 image J 프로그램을 이용해 RGB 분석함.

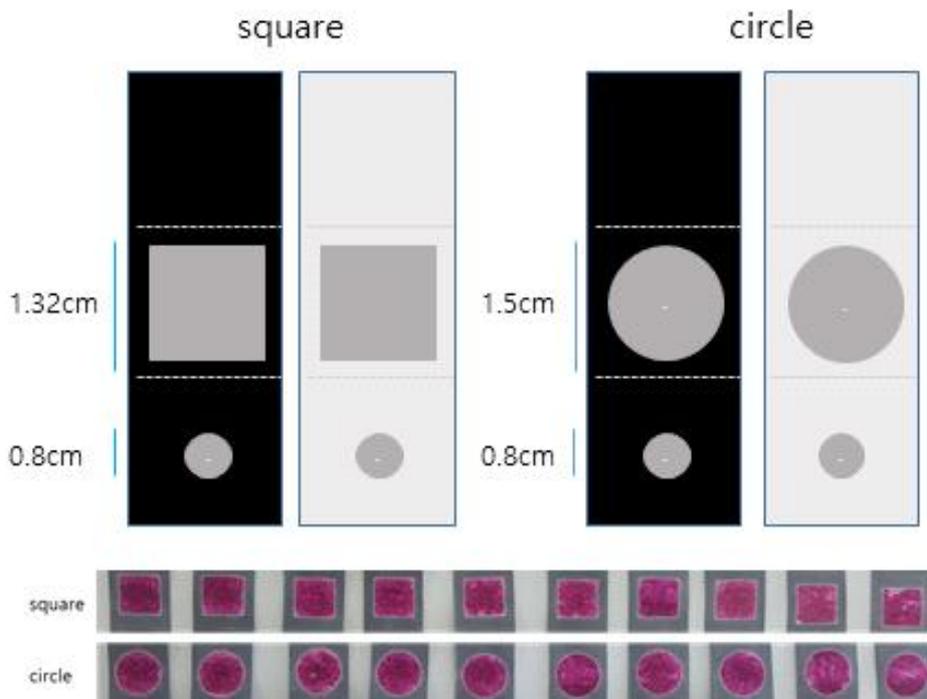


그림68. 소수성 종이면 모양에 따른 PGA-RR complex 분포

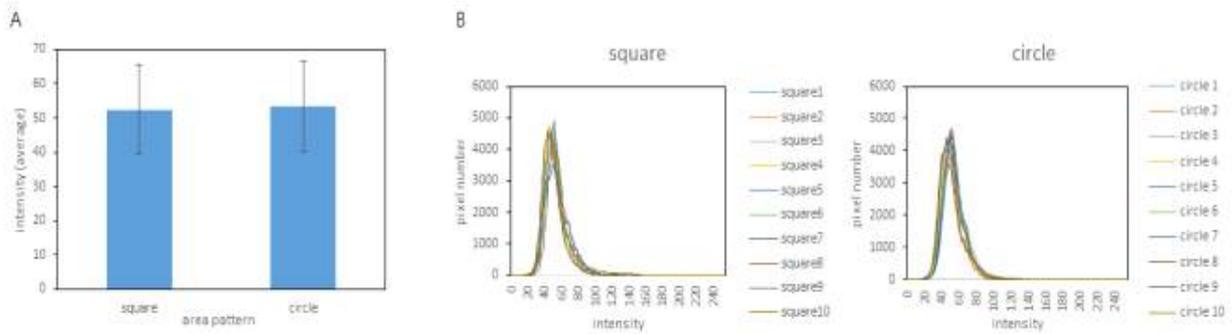


그림69. 소수성 종이면 모양에 따른 PGA-RR complex 이미지 분석

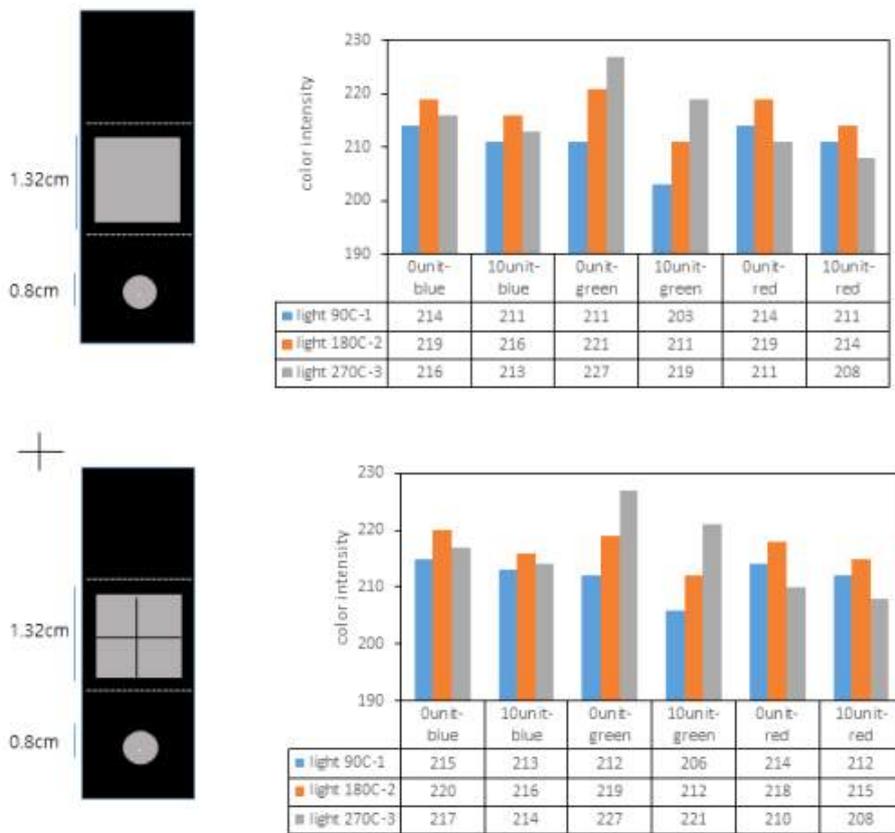


그림70. 두 가지 형태의 PGA-RR complex에서 PG 활성화에 따른 이미지 RGB 분석 값

○ 전체적으로 온도가 35°C일 때 PG 활성화에 따른 RR의 색의 변화가 확실히 나타나는 것을 보아 PG 활성을 측정할 수 있는 적당한 온도는 35°C임을 확인함 (그림71), 이는 항온 수조에서 효소 반응을 일으키는 온도와 비슷함. 모든 온도에서 unit 이 증가할수록 red, green, blue 값이 감소하였고 특히 green 값의 감소폭이 가장 크므로 이미지를 분석을 통한 RGB값 중 green 값이 분석에 가장 유용한 값을 알 수 있음. 그러나 1unit 과 5unit 의 값 차이가 비례적이지 않았고, 0unit 과 10unit 의 green 값의 최대 차이가 10정도로 기존 PGA-RR반응보다 민감도가 감소되었지만 현장에서 병해 진단 센서로 활용 가능성을 확인함.

○ pectin의 유무에 따라 두 가지 Czapek Dox 배양액에서 *Botrytis cinerea* 균을 5일간 배양하여 PG를 얻음. 배양액으로 나온 전체 단백질은 양은 Bradford assay 방법을 통해 확인해본 결과 pectin이 없는 배양액은 약 0.1 $\mu$ g의 단백질이 있었고, pectin이 있는 배양액의 경우 약 1.7 $\mu$ g의 단백질이 확인됨. pectin이 없는 배지에 비해 pectin이 있는 배지에 17배에 가까운 단백질이 나왔고, 이렇게 나온 단백질의 대다수는 pectin을 분해하기 위한 효소들일 것이라는 예상을 할 수 있음. 상용화된 PG값은 standard 값으로 하고 얻어진 PG 100 $\mu$ l를 기존 PGA-RR 방법을 통해 활성을 측정함. 이때 PG의 활성도를 1분, 10분, 20분 시간 간격으로 확인함. 상용화된 PG의 흡광도와 비교했을 때 배양액에서 얻어낸 PG의 양은 0.1unit이하의 활성도가 나오는 것을 알 수 있음 (그림 72).

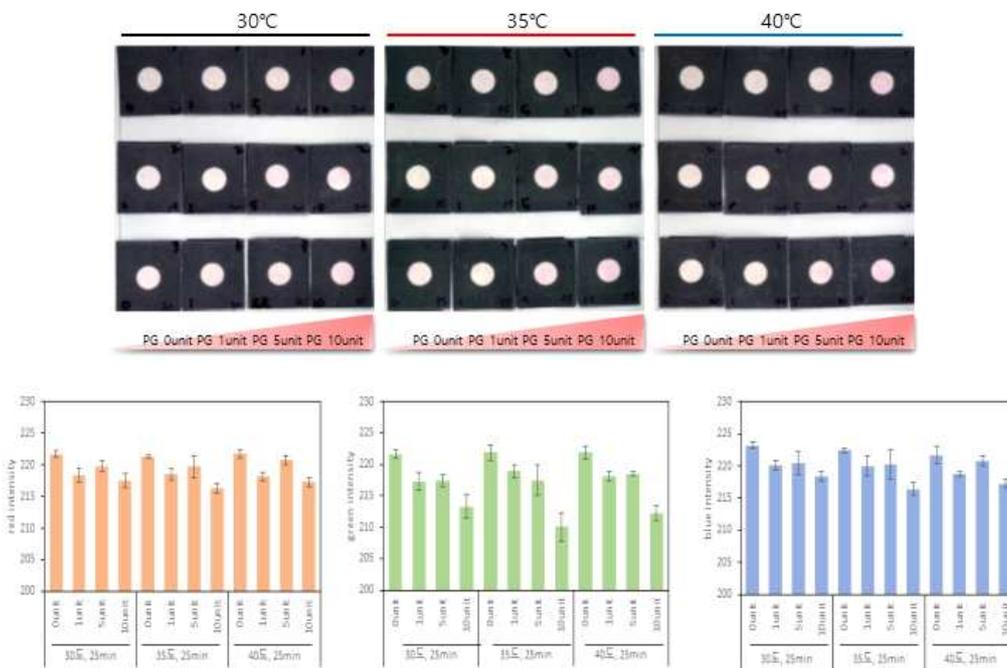


그림71. PG 활성 측정 종이센서에서 반응 온도별 RGB 분석 값

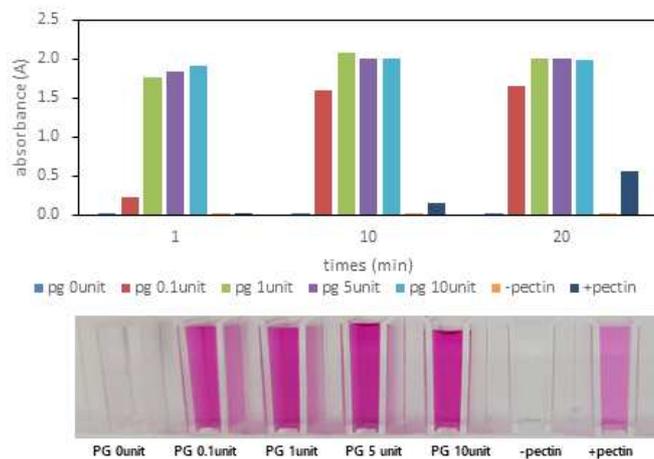


그림72. *Botrytis cinerea*에서 획득한 PG 활성 측정

- Botrytis cinerea에서 분리하여 활성을 측정한 샘플을 PG활성 측정을 위한 종이센서에 반응시켜 활성정도를 분석함. 상용화된 PG값은 standard 값으로 하고 얻어진 PG 100 $\mu$ l를 종이센서에 올려서 약 30분 동안 반응시킴. 이미지 분석을 통한 RGB 분석 결과 PGA-RR 방법을 위하여 측정한 PG 활성 값과 유사한 0.1unit 이하의 활성도가 확인됨 (그림 73). 이를 통해 종이 센서를 이용한 PG 활성 측정 및 현장에서 작물의 병해 진단 가능성을 확인함.

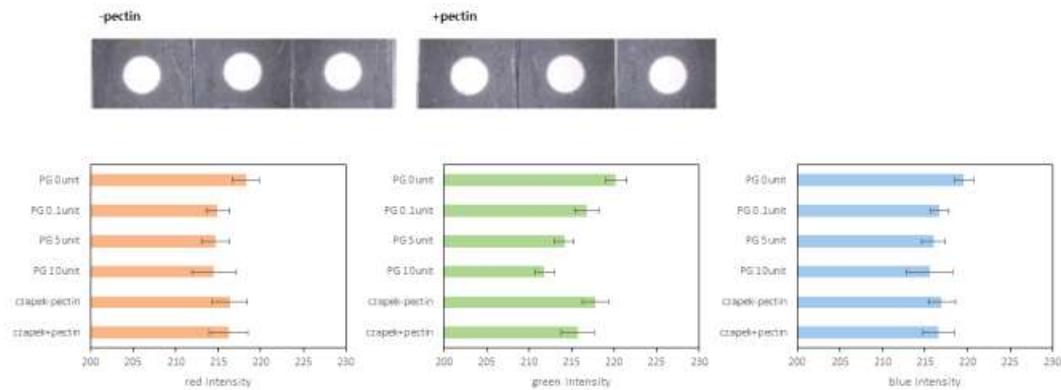


그림73. Botrytis cinerea에서 획득한 PG 활성 종이센서에서 측정

## 라. 작물의 가뭄 스트레스 및 병해를 동시에 진단할 수 있는 종이기반의 센서 제작

- 작물의 가뭄 및 병해가 작물의 생산성 저하에 큰 영향을 미치므로 가뭄 및 병해를 조기 진단할 수 있는 진단 센서의 개발은 매우 중요함. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 앞의 연구에서 작물의 가뭄 스트레스를 측정할 수 있는 종이기반의 센서 및 병해를 진단할 수 있는 종이기반의 센서를 제안하였지만 현장에서 사용할 때 가뭄 혹은 병해 하나만 측정할 수 있어서 두 가지를 동시에 진단해야 할 경우 두 가지 센서를 보유하고 있어야 하며 하나의 측정이 끝난 다음 다른 측정을 해야 함으로 많은 시간이 소비되는 단점을 가짐. 그러므로 이러한 문제점을 해결하기 위한 가뭄 및 병해를 동시에 진단할 수 있는 센서 개발의 필요성이 요구됨.
- 본 연구에서는 가뭄 스트레스 및 병해를 동시에 측정하기 위해 가뭄 및 병해 센서를 하나의 센서에 집적화하여 동시에 가뭄 및 병해를 검출할 수 있는 종이기반 센서의 설계 및 제작에 대해서 나타냄.
- 앞에서 제안한 작물의 가뭄 스트레스 진단을 위한 센서 및 병해를 진단하기 위한 센서는 센서의 재료로 같은 종류의 종이를 사용하고 있어서 두 개의 센서를 하나의 센서에 집적화하는데 특별한 어려움이 없이 쉽고 간단하게 제작할 수 있음.
- 가뭄 및 병해를 진단할 수 있는 센서가 집적화된 종이센서는 wax printing 방법과 오리가미

방법을 사용하여 제작되며 측정하고자 하는 샘플을 정밀하게 측정하기 위해 밀폐된 형태로 제작되며 샘플이 아랫방향으로 새는 것을 방지하기 위해 방수층을 가짐.

- 또한, 가뭄 측정을 위한 센서의 작동 온도와 병해를 진단할 수 있는 센서의 작동 온도가 서로 다르므로 두 가지 센서가 열적으로 서로 영향을 미치지 않고 정밀하게 가뭄 및 병해를 검출할 수 있도록 일정한 간격을 가지고 설계 및 제작됨.
- 제안된 두 가지 센서가 집적화된 종이 기반의 센서의 작동원리는 다음과 같음. 먼저 가뭄 및 병해를 진단하기 위해서 작물에서 샘플을 추출한 후 추출된 샘플을 측정 목적에 맞게 각각의 센서에 로드함. 다음으로 가뭄 및 병해를 진단하기 위해서 가뭄 측정 센서에 로드된 샘플을 150°C에서 10분간 반응을 시켜주며 동시에 병해 측정 센서에 로드된 샘플은 45°C에서 20분간 반응을 시켜준 후 일정한 밝기를 가지고 있는 암실에 센서를 놓고 디지털 카메라를 사용하여 광학적인 이미지를 얻음. 마지막으로 얻어진 이미지를 RGB 분석을 통하여 green 값의 평균을 얻은 다음 가뭄 및 병해에 대한 standard curve 값과 비교하여 가뭄 및 병해의 정도를 분석하여 현재의 상태를 나타냄.
- 두 가지 센서가 집적화된 종이기반 센서의 제작 공정은 다음과 같음. 먼저 Auto CAD 프로그램을 사용하여 센서를 설계하고 설계된 도면을 wax printer를 사용하여 종이에 인쇄한 다음 표면에 wax가 코팅된 종이를 핫 플레이트 위에 놓고 120°C에서 3분간 가열하여 wax가 녹아서 종이 아래까지 침투시킴. wax가 완전히 침투된 종이에 가뭄 및 병해 진단을 위해 ninhydrin 및 PGA-PG complex를 균일하게 코팅한 후 종이 접기선을 따라 종이를 3번 접은 다음 접착제를 사용하여 각 층 사이를 완벽하게 접착시킴. 마지막으로 4층이 완벽하게 접착된 종이를 평평한 판에 놓고 1시간 정도 무거운 추를 놓고 압착시켜주면 제작이 완료됨. 그림74는 가뭄 및 병해를 동시에 진단할 수 있는 종이 기반의 센서 제작 공정을 나타냄.

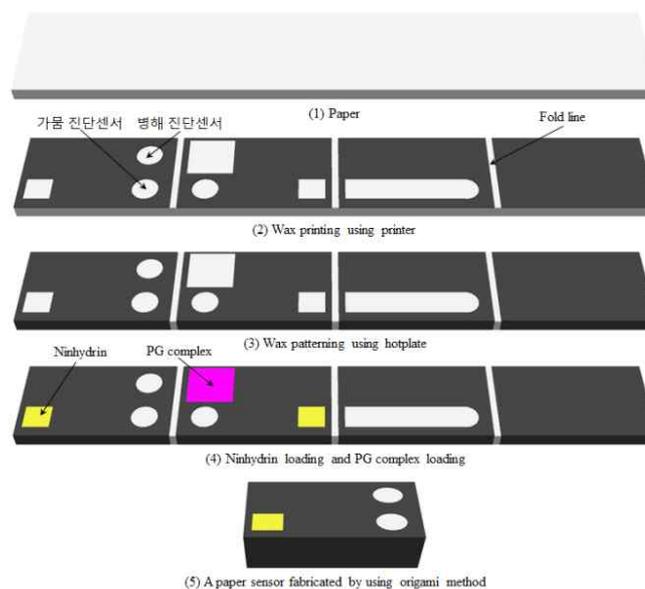


그림74. 가뭄 및 병해를 동시에 측정할 수 있는 종이 기반의 센서 제작 공정도

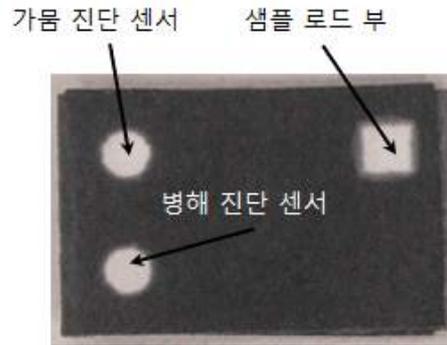


그림75. 제작된 가뭄 및 병해를 동시에 진단할 수 있는 종이 기반 센서의 광학적인 이미지



그림76. 제작된 가뭄 및 병해를 동시에 진단할 수 있는 종이 기반 센서를 사용한 가뭄 및 병해를 진단한 이미지

- 그림75는 wax printing 방법 및 오리가미 방법을 사용하여 제작된 가뭄 및 병해를 동시에 진단할 수 있는 종이 기반 센서의 광학적인 이미지를 나타냄.
- 제작된 센서를 사용하여 가뭄 및 병해를 진단하기 위해 센서에 가뭄 측정용 샘플 및 병해 측정용 샘플을 로드한 다음 가뭄 및 병해의 정도를 측정함. 그림76은 제작된 가뭄 및 병해를 동시에 진단할 수 있는 종이 기반 센서를 사용한 가뭄 및 병해를 진단한 이미지를 나타냄. 그림을 보면 측정 샘플에 반응하여 센서부에서 발색 반응이 나타나는 것을 알 수 있음.
- 실험결과 두 가지 센서가 집적화된 종이센서의 감도는 위에서 나타낸 가뭄 스트레스 진단을 위한 종이센서 및 병해 진단을 위한 종이센서의 감도와 같음을 알 수 있으며 이는 두 가지 센서가 하나의 종이센서에 집적화될 때 발생하는 문제를 해결하고 최적화됨을 알 수 있음.

#### 마. 현장에서 환경장애 및 병해를 진단하기 위한 휴대용 진단키트의 설계 및 제작

- 위 연구결과를 바탕으로 현장에서 환경장애 및 병해를 실시간으로 모니터링하기 위한 진단 키트를 설계 및 제작함. 제안된 진단키트는 1차 년도에 제안한 환경장애 키트를 기반으로

설계 및 제작되며 PCB와 접사렌즈가 집적화된 본체, 종이센서에 열을 가하기 위한 두 개의 히터 및 히터의 온도를 일정하게 조절하기 위한 온도센서가 집적화된 센서모듈, 환경장애 및 병해를 진단할 수 있는 종이센서, 종이센서의 발색반응을 촬영 분석하기 위한 스마트폰으로 구성됨. 그림77은 환경장애 및 병해를 현장에서 진단하기 위한 진단키트의 개략도를 나타냄.

- 진단키트의 동작은 환경장애 및 병해를 진단하기 위한 종이센서가 센서모듈에 장착되어 있는 상태에서 센서의 샘플 로딩부에 샘플을 로드한 후 센서모듈을 본체에 슬라이딩 방식으로 삽입 했을 때 PCB기판 위에 있는 MCU(Micro Controller Unit)가 실시간으로 히터의 온도를 온도 센서를 사용하여 실시간 조절하여 센서모듈 표면의 온도를 일정하게 유지하여 종이 센서의 발색반응을 유도한 후 스마트폰을 사용하여 얻어지는 이미지의 발색정도 평가를 통해 가뭄의 정도를 나타냄.
- 진단키트를 구성하는 각각의 요소들의 설계 및 제작은 아래와 같음. 진단키트의 본체는 항상 일정한 밝기를 가지는 암실, 센서모듈에 집적화된 히터 및 온도 센서의 조절 및 전원 공급을 할 수 있는 PCB기판, 스마트폰에 장착된 카메라의 접사능력을 향상 시켜 본체의 두께를 슬립화하기 위한 접사렌즈로 구성됨. 그림78은 진단키트 본체의 개략도를 나타냄. 진단키트 외장 케이스는 상판과 하판으로 구성되며 58mm(가로)×118mm(세로)×30mm(두께) 크기로 모델링 소프트웨어인 라히노프로그램을 사용하여 설계되며 그림79는 진단키트 외장 케이스의 개략도를 나타냄

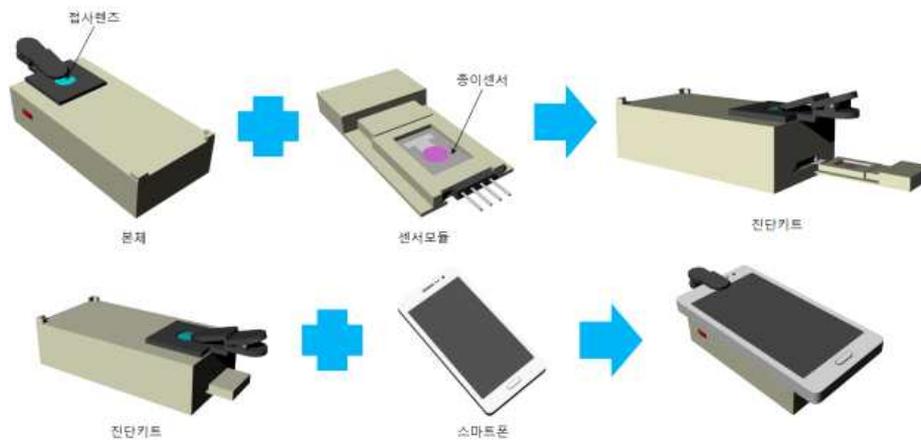


그림77. 환경장애 및 병해를 현장에서 진단하기 위한 진단키트의 개략도

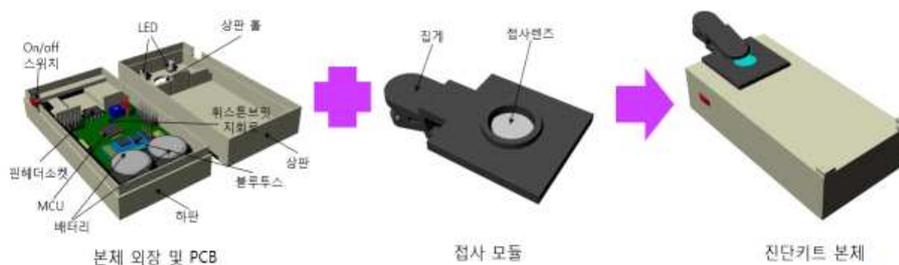


그림78. 진단키트 본체의 개략도

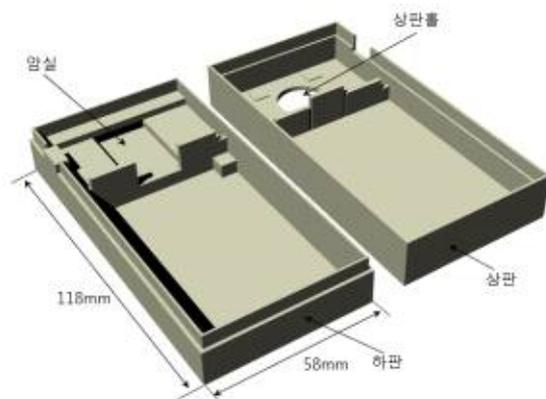


그림79. 진단키트 외장 케이스의 개략도

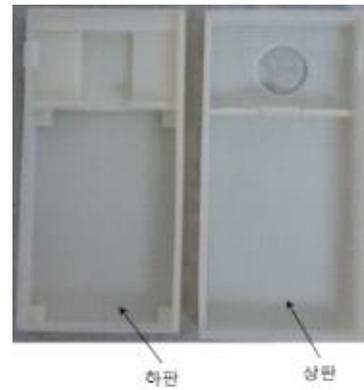


그림80. 3D 프린터를 사용하여 제작된 진단키트 외장 케이스

- 본체 외장 케이스 하판은 진단키트를 동작하는데 사용되는 소자들이 집적되어 있는 PCB기판과 종이센서를 일정한 밝기에서 사진을 찍을 수 있는 암실로 구성되어 있으며 상판은 암실에 밝기를 조절할 수 있는 LED와 접사모듈을 결합할 수 있는 19mm크기의 홀로 구성됨
- 설계된 진단키트 외장 케이스는 3D프린터를 사용하여 제작되며 그림80은 3D프린터 사용하여 제작된 외장 케이스를 나타냄. 진단키트의 전체적인 동작을 관장하는 PCB기판은 MCU(Micro Controller Unit), 블루투스, LED, 휘스톤 브릿지 회로, 수은건전지, 센서모듈과 결합을 위한 핀 헤더소켓, 환경장애 진단을 위해 사용할 때만 동작할 수 있도록 on/off 스위치로 구성됨.
- MCU는 센서 모듈에 집적화된 온도센서를 통해서 실시간으로 온도를 측정하여 히터에 인가되는 전력의크기를 조절하며 종이센서의 발색반응을 촬영할 때 항상 일정한 밝기를 유지하기 위해 LED 밝기를 조절함. 센서모듈에 집적화된 온도센서의 온도 측정원리는 온도의 변화에 따른 금속 비저항의 변화에 의해 발생하는 저항변화를 측정하여 온도를 예측할 수 있음. 또한 PCB 기판 위에는 휘스톤브릿지회로가 형성되어 온도센서의 저항변화를 실시간으로 감지하여 센서모듈 표면의 온도를 항상 일정하게 유지할 수 있도록 함. 가변저항은 휘스톤브릿지회로에서 출력되는 전압이 상온에서 제로 셋팅을 하는데 사용됨.
- 블루투스는 실험결과를 외부로 무선 송출 및 무선으로 MCU를 코딩할 때 사용되며 수은 건전지는 진단키트가 동작할 수 있도록 전원을 공급하는 역할을 함. 핀헤더 소켓은 핀과 결합하여 센서모듈에 전원공급을 하며 히터 가열 및 온도센서에서 제공하는 온도정보를 읽는 역할을 함. 마지막으로 on/off 스위치는 진단키트를 사용할 때만 전원을 공급하는 역할을 함.
- PCB에 장착되는 구성부품들이 동작범위에서 작동할 수 있도록 PCB내부에 회로를 artwork를 통해서 설계함. 진단키트의 두께를 줄이면서 스마트폰의 접사력을 향상시키기 위해 접사렌즈모듈은 진단키트 본체의 상판에 완벽하게 접합됨. 접사렌즈를 포함하는 모듈은 끝이 집

게 형태로 되어 있어 양 끝단을 누르는 상태에서 다양한 위치에 위치한 스마트폰 카메라에 접사렌즈를 고정할 수 있음. 또한, 스마트폰 카메라 렌즈와 접사렌즈의 마찰에 의해 발생할 수 있는 렌즈 표면의 스크래치를 줄이기 위해 접사렌즈와 카메라 렌즈 사이에 일정한 간격을 유지하기 위한 구조물을 형성함

- 접사모듈에 형성된 구조물에 의해 스마트폰과 진단키트의 본체의 일정한 간격 유지가 어려우므로 본체 외장 케이스 상판 외부에 접사모듈의 구조물과 같은 두께의 ‘L’자 형태의 구조물을 형성함. 이렇게 제작된 각각의 구성요소들을 결합하여 진단키트 본체 제작을 완료함.
- 센서모듈부는 본체 내부의 암실 유지 및 종이센서를 항상 평평하게 유지하기 위한 케이스, 히터와 온도센서가 집적화 된 센서모듈, 히터와 온도센서에 전원을 공급하기 위해 센서모듈에 장착된 탈부착이 쉬운 핀으로 구성됨. 센서모듈부의 조립은 케이스 하판에 센서모듈이 삽입되고 그 위에 종이센서가 놓여진 다음 케이스의 상판을 하판과 결합하면 완료됨.

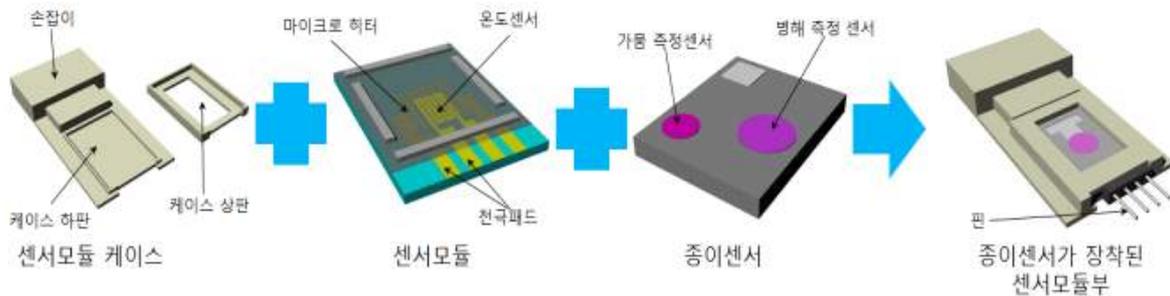


그림81. 센서모듈부의 개략도

- 그림81은 센서모듈부의 개략도를 보여줌. 센서모듈 케이스는 종이센서를 평평하게 유지하기 위해 모듈 위에 종이센서를 위치했을 때 케이스 상판이 종이센서를 누르는 구조로 되어 있음. 케이스의 손잡이를 센서모듈 보다 두껍게 설계하여 진단키트 본체에서 센서모듈부가 삽입 되는 부분을 통해 빛이 암실로 투과되는 것을 방지하는 역할을 함.
- 센서모듈부가 정밀하게 본체와 결합하기 위해 케이스 하판에 날개구조물을 형성함. 히터와 온도센서가 집적화된 센서모듈은 소형화시키기 위해 반도체공정을 사용하여 제작됨. 센서모듈에 집적화된 히터는 두 개로 구성되어 줄히팅 방식으로 가열되며 각각의 히터 크기는 7mm(가로)×7mm(세로)로 제작됨. 온도센서는 정밀하게 히터의 온도를 측정하기 위해서 두 개의 히터 중 가습측정을 위한 히터의 중앙에 위치하게 설계함. 또한 종이센서의 위치를 항상 일정하기 위해 센서모듈 위에 300µm두께의 가이드라인 구조물을 설계함.
- 설계된 크기를 바탕으로 L-edit 프로그램을 사용하여 마스크를 설계 하였으며 Laser lithography장비를 사용하여 5인치 마스크를 제작함. 그림82는 L-edit를 통해 설계된 마스크를 나타냄. 그림83은 센서모듈을 제작하기 위해 제작된 마스크를 나타냄.

○ 제작된 마스크를 사용하여 마이크로머시닝공정을 통해서 센서모듈 제작 공정을 진행함. 센서 모듈 제작 공정은 위와 같으며 그림84는 센서모듈 제작 공정도를 나타냄.

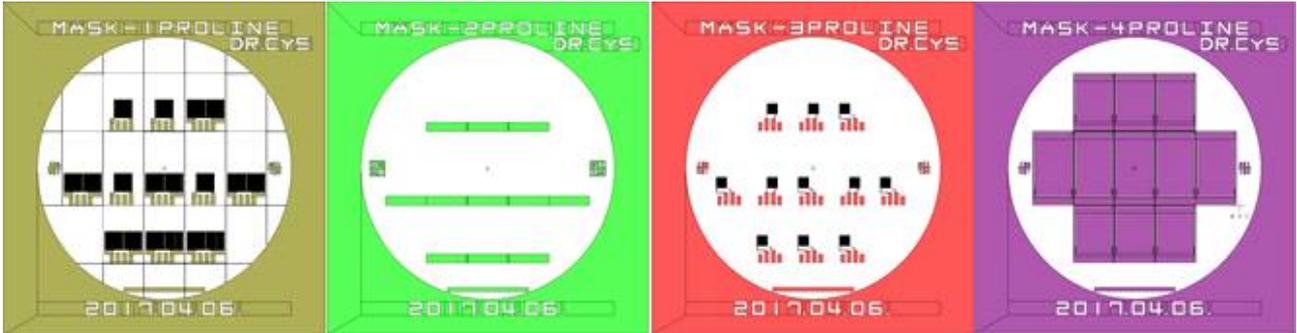


그림82. L-edit를 사용하여 설계된 마스크

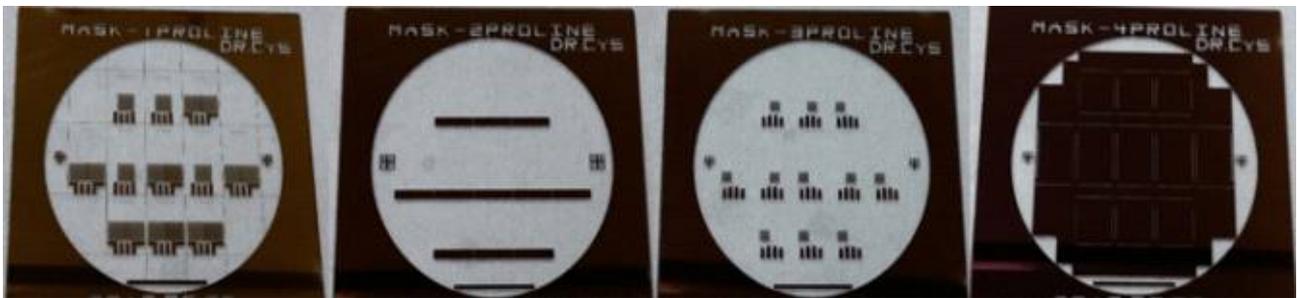


그림83. 센서모듈을 제작하기 위해 제작된 마스크

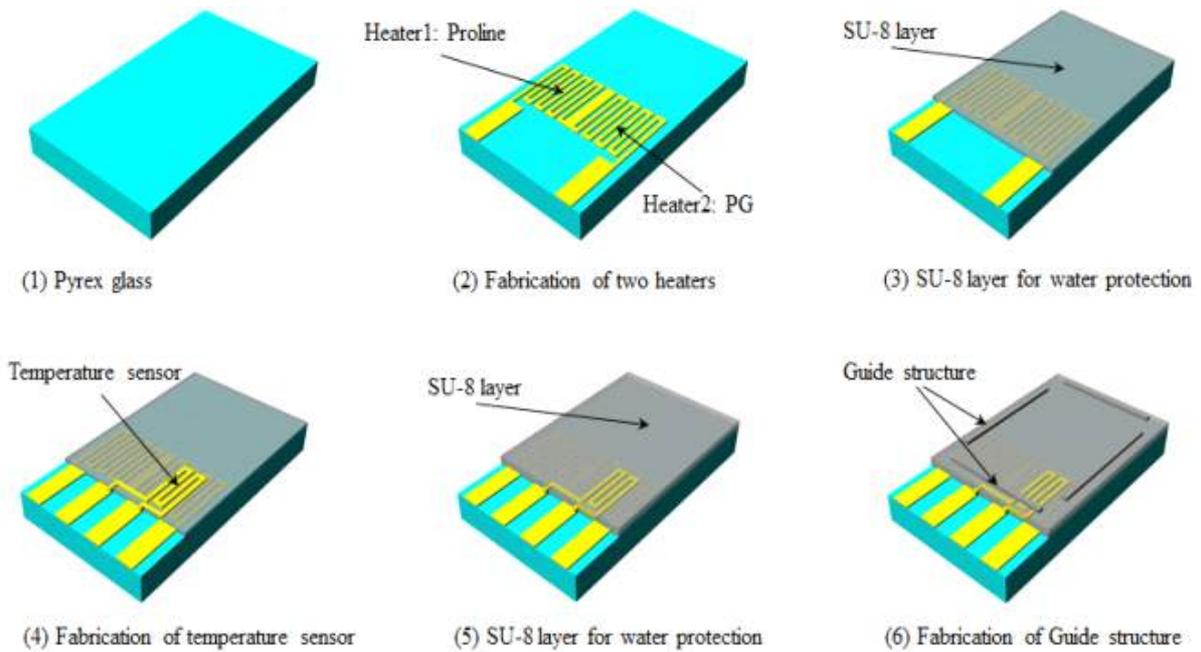


그림84. 반도체공정을 사용한 센서모듈 제작 공정도

※ 센서모듈 제작 공정도

- ① 센서모듈을 제작하기 위해 4inch 크기의 원형 Pyrex glass 기판이 사용됨
- ② 기판 위에 sputter를 사용하여 Cr/Au 각각 5nm 와 200nm 증착
- ③ 포토리소그래피 공정을 통해 히터 형상을 패터닝한 다음 Cr/Au층을 Cr 식각용액과 Au 식각용액을 사용한 식각을 통해 히터를 제작
- ④ 제작된 히터 표면에 용액의 침투 방지 및 온도센서의 형성을 위해 절연층으로 SU-8 2007을 5 $\mu$ m 두께로 코팅
- ⑤ 온도센서를 SU-8 층 위에 제작하기 위해 lift-off공정을 사용
- ⑥ Cr/Au층은 E-beam을 사용하여 증착
- ⑦ 아세톤을 사용한 포토레지스트 제거를 통해 온도센서 제작이 완료됨
- ⑧ 온도센서 제작 후 센서 표면으로 용액 침투를 방지 및 파워손실을 줄이기 위해 SU-8 2007을 5 $\mu$ m 두께로 코팅
- ⑨ 종이센서의 위치가 항상 일정하게 하기 위해 SU-8 2150을 사용하여 300 $\mu$ m두께의 가이드 구조물이 제작
- ⑩ 다이싱 소우장비를 사용한 Pyrex glass 다이싱을 통해 센서모듈 제작은 완료됨

○ 그림85는 반도체 공정장비를 사용하여 제작되는 센서모듈의 제작과정을 나타냄. 그림86은 반도체공정을 통해 제작된 센서모듈의 광학이미지를 나타냄. 제작된 센서모듈을 PCB기판과 연결하기 위해 센서모듈의 전극패드에 전도성예폭시 혹은 납땜 방법을 통해 핀이 전극에 장착되며 이 핀을 통해 히터와 온도센서에 전원을 공급함. 센서모듈에 장착된 핀은 PCB기판에 장착된 핀헤더소켓에 연결이 되며 정확한 전극 접촉 및 탈부착이 쉽다는 장점을 가짐.

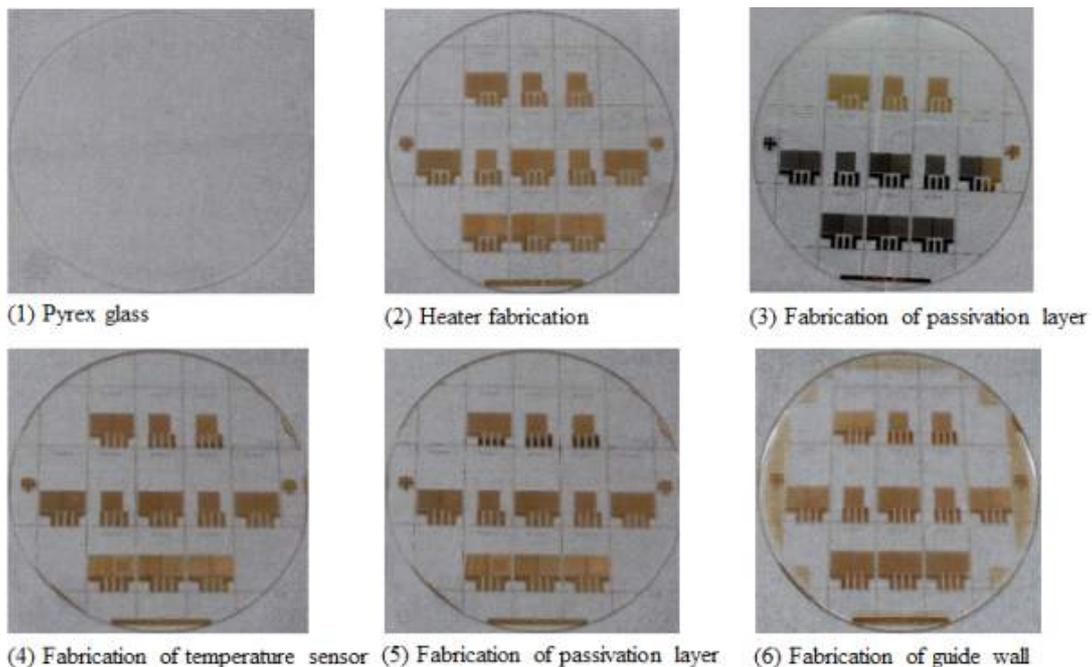


그림85. 반도체 공정장비를 사용한 센서모듈의 제작과정

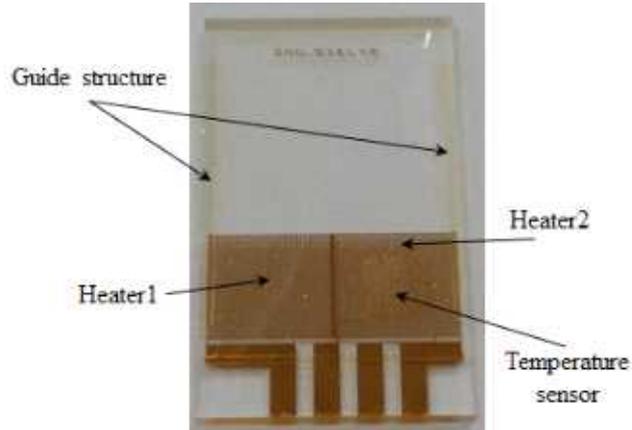


그림86. 반도체 공정을 통해 제작된 센서 모듈의 광학이미지

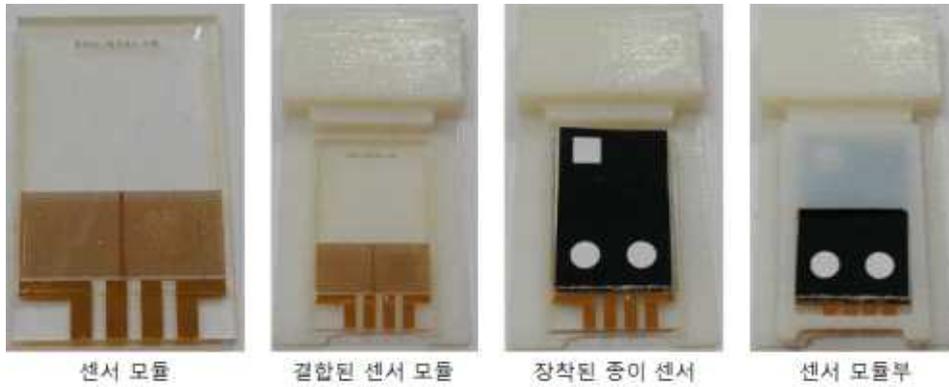


그림87. 센서모듈 케이스 및 모듈이 조립된 센서모듈의 광학 이미지

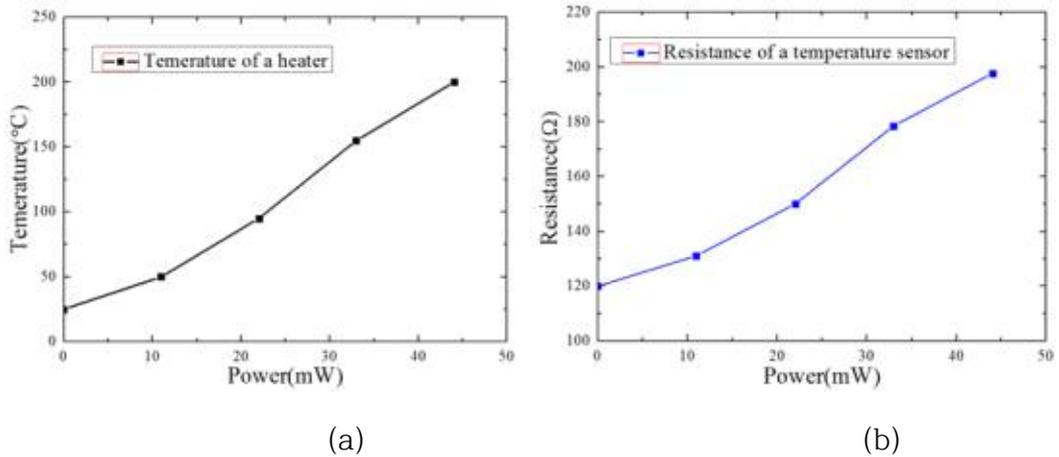


그림88. 마이크로히터 및 온도 센서의 특성; (a) 인가된 파워에 대한 히터의 온도 변화, (b) 히터에 인가된 파워에 의해 발생하는 히터의 열에 대한 온도 센서의 저항변화

○ 그림87은 센서모듈케이스 및 모듈이 조립된 센서모듈부의 광학이미지를 나타냄. 이렇게 제작

된 다양한 구성요소들이 결합하면 가뭄 및 병해를 진단하기 위한 휴대용 진단키트로 사용될 수 있음.

- 그림88은 제작된 마이크로히터 및 온도 센서의 특성을 나타내며 히터에 약 33mW를 인가했을 때 히터의 온도가 150°C에 도달하는 것을 알 수 있으며 이 때 온도 센서의 저항은 약56 Ω 증가하는 것을 알 수 있음. 실험결과 제작된 히터는 작은 파워에서 센싱에 필요한 온도에 도달하는 것을 알 수 있으며 히터 위에 집적화된 온도 센서는 민감하게 히터의 온도를 감지할 수 있음.



그림89. 스마트폰에 장착된 진단키트의 이미지

- 제작된 진단키트의 접사모듈 끝단이 집게로 되어 있어 양 끝단을 누르는 상태에서 다양한 위치에 위치한 스마트폰 카메라에 접사렌즈를 고정할 수 있으며 그림89는 스마트폰에 장착된 진단키트의 이미지를 나타냄

## ■ 제1위탁과제 연구내용 및 결과

### 가. 작물의 가뭄 스트레스 및 병해 진단용 application(app) 개발

- 가뭄 스트레스 및 병해 진단용 종이센서의 발색 정도를 정량화하기 위해서 색상에 대해서 표준화 할 수 있는 리더기가 필요하며 본 연구에서는 스마트폰을 사용하여 색상을 정량적으로 분석하여 작물의 질병/가뭄을 진단할 수 있는 app을 설계 및 제작함. 1차 년도에는 오직 양파·마늘의 가뭄 스트레스를 정도를 분석하기 위한 가뭄 진단용 app을 개발 하였으며 이를 바탕으로 2차 년도에는 작물의 가뭄 스트레스 및 병해를 동시에 진단이 가능한 app을 개발 함. 개발된 app은 1차 년도에 개발된 app을 개선하여 사용자가 편하게 쓸 수 있도록 UI 구성을 편하게 하였으며 색상 분석을 좀 더 정밀하기 위해서 RGB분석을 최적화 함. 1차 년도와 마찬가지로 app을 제작하기 위해 사용된 프로그램은 web inventor 이며 이를 사용하여 사용자가 편하게 가뭄 및 병해를 진단할 수 있도록 user interface(UI) 및 색상의 정도를 분석하기 위한 app을 제작함.



그림90. 작물의 질병/가뭄을 진단하기 위한 app의 이미지

- 제작된 app은 메뉴는 크게 기존의 측정된 자료들이 저장되어 있는 자료보기, 채취한 샘플을 분석하기 위한 검사시작, 측정하고자 샘플의 정보(작물이 무엇인지?, 가뭄 진단인지?, 병해 진단인지?)를 입력하는 설정(set up), app을 종료하기 위한 종료(exit)로 구성됨. 그림90은 작물의 질병/가뭄을 진단하기 위한 app의 이미지를 보여줌.
- 채취한 샘플을 분석하는 검사시작은 샘플의 가뭄 및 병해를 진단하는 위치를 나타내는 진단 위치, 샘플의 생화학적인 반응을 위한 일정한 온도를 유지할 위한 히터가열, 종이센서의 이미지를 촬영하기 위한 사진 캡처, 색상의 정도를 파악하기 위한 사진 분석, 분석한 결과를 저장하기 위한 결과 저장, 외부로 결과를 전송하기 위한 Transfer로 구성됨. 제작된 app을 사용하여 가뭄 및 병해를 검출하기 위해 사용된 종이센서의 측정된 결과를 촬영, 분석, 결과의 전송과정을 실험적으로 진행함. 그림91은 제작된 app을 사용하여 가뭄 및 병해진단을 위하여 종이센서의 색상의 정도를 분석하는 과정을 나타냄.
- 1차 년도에 제작한 프로그램과는 다르게 2차 년도에는 작물의 가뭄 및 질병을 진단하는 위치를 GPS 뿐만 아니라 수동으로 입력할 수 있게 함. 현재 스마트에 적용되고 있는 GPS는 정밀하지 못하여 가까운 거리에서 2가지 샘플을 분석할 경우 2가지 샘플의 위치를 정밀하게 표시하지 못하는 단점을 가지고 있으므로 이를 보완하기 위해 수동으로 샘플의 진단위치를 정확하게 명기할 수 있게 함. 또한, 다양한 작물을 측정할 것을 대비해서 각각의 작물의 정보를 입력하여 작물에 적합한 가뭄 및 병해를 분석을 할 수 있는 기능을 추가함.



그림91. 제작된 app을 사용하여 가뭄 및 병해진단을 위하여 종이센서의 색상의 정도를 분석하는 과정

- 제작된 app을 통해서 프롤린 및 PG의 양에 따라 변화는 색상의 정도를 RGB(RED Green Blue) 분석을 통해서 나타낼 수 있으며 또한, 측정된 위치도 GPS방식 및 수동 입력을 통해서 위치를 화면에 표시할 수 있음. 이렇게 측정된 결과는 날짜에 따라 스마트폰에 저장할 수 있으며 또한 이메일을 통해서 외부에서 실내에 있는 데이터베이스 및 클라우드 서버에 다양한 통신방법을 통해 결과를 전송할 수 있음. 본 연구에서는 가뭄 및 병해 진단을 위하여 발색의 정도를 분석할 수 있는 app을 제작하였으며 이 app은 현재 실험실 레벨에 구동 가능함

### (3) 3차년도 연구내용 및 결과

#### 가. 가뭄을 정밀하고 신속하게 검출하기 위한 고감도 종이기반 미세유체 센서의 최적화

- 일반적으로, 식물이나 작물은 성장과정 중에 다양한 환경 요인들로부터 영향을 받게 됨. 특히, 다양한 환경 요인 중 가뭄, 고염, 중금속, 냉해, 고온 및 오존 등과 같은 환경장애들은 작물들에 영향을 주어 스트레스를 유발하게 하며, 이러한 환경 장애는 작물의 성장과 발달의 제한 요인이 됨.
- 이와 같이 작물이 환경장애에 영향을 받게 되면, 작물은 세포 내 세포질에 아미노산의 일종인 프롤린을 축적하게 되며, 이러한 프롤린은 작물의 성장하는데 있어 단백질 합성 뿐만 아니라 광합성 효율, 개화시기 및 배유 발달에 아주 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있음.
- 그러므로, 작물의 프롤린 농도의 변화 정도를 파악하는 것은 환경이 작물의 성장 상태에 미치는 영향을 파악하는데 있어 매우 중요한 요소임. 현재 프롤린을 검출하기 위해 프롤린-닌히드린(Ninhydrin) 반응은 UV-Vis 스펙트로미터를 사용하여 흡광도를 분석하는 비색법이 많이 사용되고 있지만 기존에 이러한 측정은 채취한 작물을 실험실로 가져가 고가의 휴대가 불가능한 장비를 사용하여 분석해야 했으며 분석 시간이 많이 소요되어, 현장에서 실시간으

로 환경장애의 영향에 의한 작물 성장 상태의 모니터링 어렵다는 단점이 있음.

- 이러한 문제점을 해결하기 위해서 환경장애를 진단하기 위한 진단키트 및 종이 센서에 대하여 1차년도 및 2차년도에 제안이 됨. 그러나 환경장애를 진단하기 위한 제안된 기존의 종이 센서는 센서 구동을 위해서 150°C에서 10분 동안 가열이 필요하여 높은 파워 소비, 센싱 하는데 장시간이 걸리며 2층에 위치한 채널에서 4층의 센서부까지 도달하기 위해서는 중력의 방향의 반대방향으로 흘러야 하므로 센서의 감도가 떨어지는 문제가 발생함.
- 본 연구는 기존의 이러한 문제점을 개선하기 위하여 왁스프린팅(wax printing) 방법 및 오리가미(Origami) 방법을 사용한 종이기반의 밀폐된 미세유체센서의 제작에 관하여 나타냄. 종이기반의 미세유체센서는 왁스프린터를 사용하여 종이에 왁스를 프린팅한 후 hotplate를 사용하여 왁스를 종이에 침투시켜 종이 센서 제작하는 방법이며 다른 방법들에 비해 쉽고 간단해서 단시간에 종이센서를 제작할 수 있다는 장점을 가짐. 종이는 일반적으로 친수성을 띠는데 왁스가 침투된 영역은 소수성의 특성을 가져서 종이센서 내에 왁스를 적절하게 침투시키면 유체를 원하는 방향으로 흐를 수 있게 할 수 있으며 이러한 특성을 사용하여 종이기반의 미세유체센서가 오픈채널 형태로 주로 제작됨.
- 기존의 가뭄을 진단하기 위해 제안된 종이기반의 미세유체센서는 오픈채널로 제작되어 프롤린을 닌히드린반응을 통하여 비색법으로 검출하는 형태로 많이 제작되었으나 샘플 분석 중 외부환경으로부터 센서로 오염물질 혼입, 현장에서 프롤린 검출을 위해서 닌히드린용액 및 sulfosalicylic acid 용액 구비 및 측정샘플의 증발에 의한 정밀한 측정이 어렵다는 문제점을 가지고 있음.
- 그래서 이러한 문제를 해결하기 위해 밀폐된 미세유체채널의 제작이 필요 되었으며 본 연구에서는 샘플을 로딩할 수 있는 샘플 로딩부 와 프롤린을 검출할 수 있는 센서부 두 부분만 외부로 노출되고 나머지 샘플이 이동하는 유체채널이 내부에 집적화된 종이기반의 밀폐된 미세유체센서의 제작에 대해서 나타냄. 그림92는 가뭄을 진단하기 위한 종이기반의 밀폐된 미세유체센서의 개략도에 대해서 나타냄. 제안된 종이센서는 4층 구조를 가지며 샘플 로딩부(4층), 닌히드린을 독립적으로 로드할 수 있는 닌히드린 로드부(3, 4층), 샘플과 닌히드린이 이동 중에서 충분히 섞일 수 있는 미세유체채널(2층), 유체가 아래로 흐르지 않도록 하는 방수층(1층) 및 프롤린을 검출하는 센서부(2층)로 구성됨.

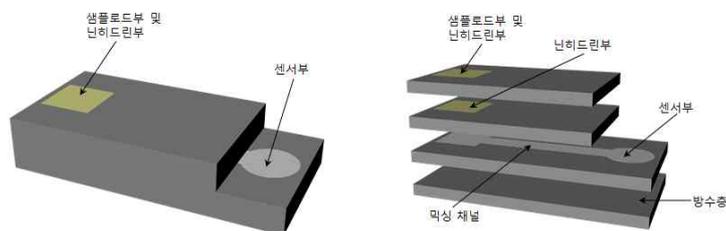


그림92. 가뭄스트레스의 검출을 위한 종이기반 밀폐된 미세유체센서의 개략도  
(a) 센서의 개략도, (b) 각층의 구성

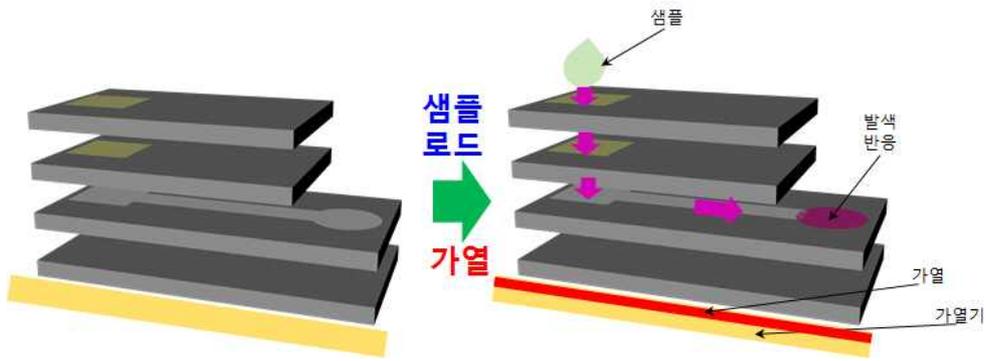


그림93. 가뭄을 검출하기 위한 종이기반 센서의 구동원리

- 가뭄을 진단하기 위한 종이 기반의 밀폐된 미세유체센서의 구동원리는 그림93과 같음. 제작된 센서 샘플로드부에 샘플을 로딩하면 샘플에 있는 프롤린과 닐히드린부에 있는 닐히드린과 서로 결합하게 되고 닐히드린과 결합된 샘플이 미세유체채널을 흐르면서 프롤린과 닐히드린이 완벽하게 섞이게 됨. 샘플 로딩 후 2분 정도의 시간이 경과하면 닐히드린과 결합된 프롤린이 센서부에 도달하게 되고 센서부에 도달한 샘플을 hotplate를 사용하여 150°C에서 3분정도 열을 가열하게 되면 프롤린-닐히드린 반응에 의하여 센서부의 색이 분홍색으로 변색하게 되며 변색 정도를 측정하여 프롤린의 농도를 검출할 수 있음.
- 실험에 사용한 ninhydrin reagent는 1.25% ninhydrin (Sigma)을 포함하는 80% glacial acetic acid(DUSAN pure chemicals)용액으로 만듦. 프롤린 농도의 정량화를 위하여 사용된 L-Proline (Sigma)은 3% aqueous sulfosalicylic acid (Bio BASIC CANADA INC.) 용액을 사용하여 Milli-Q water에 완전히 용해되도록 섞어서 사용함.
- *Arabidopsis thaliana* (Col-0) plants were grown in a controlled culture room at 23 °C with a relative humidity of 60% under long day conditions (16 h light/8 h dark). To estimate the proline accumulation response to drought stress, *Arabidopsis* plants were grown in pots containing equal weights of dry soil under normal watering condition for 3 weeks. Two-week-old plants were subject to drought stress by withholding water for 16 days. Pots were irrigated with water to saturation and weighed at the start of drought stress treatment (initial weight) and then periodically throughout the treatment period. Relative soil water content was calculated as  $(\text{final weight} - \text{dry weight}) / (\text{initial weight} - \text{dry weight}) \times 100\%$  [35].
- 그림94는 제안된 종이기반의 밀폐된 미세유체센서의 제작과정을 보여주며 제작방법은 다음과 같음. 먼저 4층 구조를 가지는 센서 각층의 형상을 종이접기를 고려한 종이접기 선을 기준으로 일정한 간격으로 2차원적인 평면에 캐드프로그램을 사용하여 설계한 후 왁스프린터를 사용하여 종이에 프린팅 함. 왁스가 프린팅 된 종이를 hotplate 위에 놓고 110°C에서 2분 30초 동안 가열하여 종이 윗면에 프린팅된 왁스를 종이 아랫면까지 완벽하게 침투 시킴.

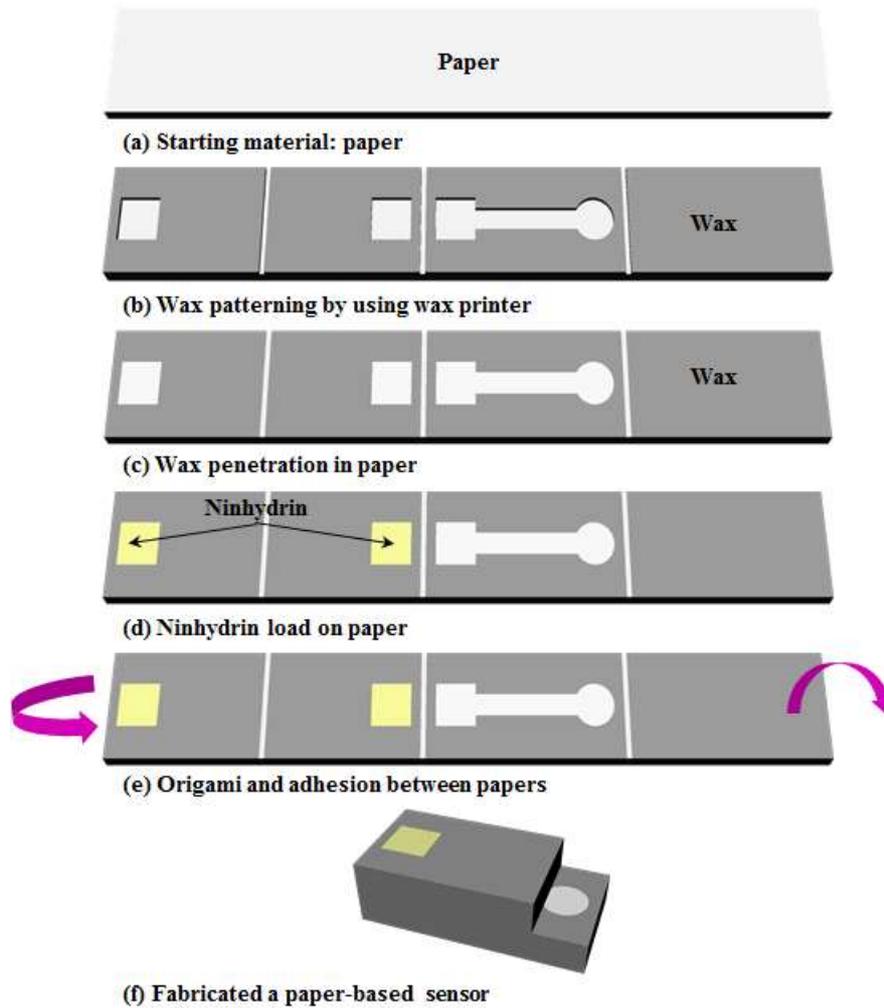


그림94. 제안된 종이기반 미세유체센서의 제작과정

○ 다음으로 닐히드린을 일정한 농도로 샘플 로딩부 및 닐히드린부 두 곳에 로드하고 건조시켜 닐히드린을 일정한 농도로 코팅함. 마지막으로 왁스가 침투된 종이 센서의 각층을 특별한 정렬 없이 간단하게 종이접기 선을 따라 종이접기(오리가미) 방법을 사용하여 접은 후 층 사이를 접착제를 사용하여 완벽하게 접착시키면 센서의 제작은 완료됨. 그림95는 프롤린을 검출하기 위하여 제작된 종이기반 미세유체센서의 광학적인 이미지를 나타냄.

○ 제작된 종이기반의 센서는 프롤린-닐히드린 반응을 사용한 비색법에 의한 센서부에서 색의 변화를 사진 이미지로 얻어 이미지 프로그램을 사용한 RGB분석을 통해 프롤린을 정량적으로 검출하게 됨. 센서에서 프롤린을 농도에 따라 정밀하고 고감도로 검출하기 위해서는 일정한 환경을 유지가 필요하며 이를 고려하여 빛의 위치 및 밝기가 고정된 암실, 종이센서의 센서부를 찍기 위한 카메라 및 프롤린-닐히드린 반응 동안 일정한 열을 유지하기 위한 hotplate로 구성된 프롤린 측정 시스템을 제작함. 그림96은 프롤린을 정량적으로 검출하기 위한 프롤린 측정 시스템의 개략도를 보여줌. 제작된 측정 시스템을 사용하여 프롤린 농도에 따른 프롤린에 대한 이미지를 얻었으며 RGB 분석을 통해 농도에 따른 Green color intensity의 변화를 측정하여 프롤린 농도를 정량화 함. 사진 이미지의 분석에 있어서 RGB 중 green color

intensity만 분석한 것은 이미지를 분석 했을 때 blue, red color intensity의 변화 보다 녹색에서 color intensity 변화가 크므로 프롤린을 농도에 따라 정량화하기가 쉽기 때문임.



그림95. 제작된 종이기반 미세유체센서의 광학적인 이미지

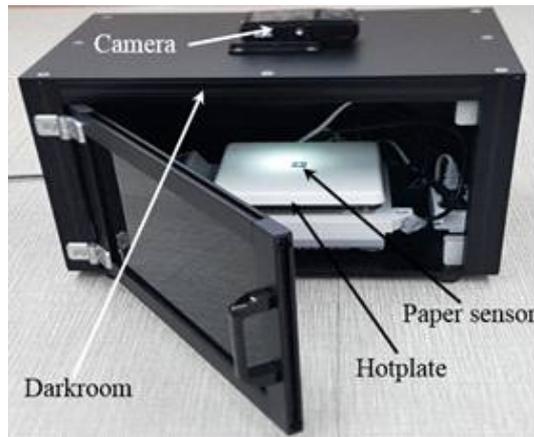


그림96. 프롤린을 정량적으로 측정하기 위한 프롤린 측정시스템의 개략도

- 제작된 종이센서를 사용하여 고감도로 프롤린을 검출하기 위해서는 센서의 최적화가 필요하며 센서의 감도에 영향을 미치는 다양한 요소에 대해서 고려해야 함. 가뭄 진단센서에서 센서의 감도에 영향을 미치는 주요 요소는 프롤린-닌히드린 반응의 반응 온도 및 시간, 샘플량과 닌히드린량의 반응비율, 믹싱채널 길이 등 세 가지로 볼 수 있으며 이 요소들을 최적화하여 센서의 감도를 향상시키기 위한 실험을 하였음.
- 첫 번째로 종이의 센서부에 샘플을 로드 했을 때 프롤린-닌히드린 반응이 최적화가 이루어지는 반응 온도 및 시간에 대해서 실험적으로 분석하였다. 실험에서 사용한 샘플의 양은 100 $\mu$ l 이고 센서에 미리 로드된 닌히드린 양은 200 $\mu$ l 이며 샘플에서 프롤린의 농도는 3mM로 고정된 상태에서 다양한 반응 온도(120 $^{\circ}$ C, 130 $^{\circ}$ C, 140 $^{\circ}$ C, 150 $^{\circ}$ C) 및 시간(10분 이내)에 따른 센서부에서 색의 변화를 측정함. 그림97은 종이센서의 감도 및 구동시간을 최적화하기 위해서 프롤린-닌히드린 반응의 반응 온도 및 시간에 따른 green color intensity의 변화를 보여줌. 실험결과 센서에서 프롤린-닌히드린 반응은 반응 온도 150 $^{\circ}$ C에서 2.5분 동안 반응 했을 때 green color intensity가 가장 많이 감소되는 것을 알 수 있으며 이는 센서부에서 색의 변화가 가장 크며 센서의 감도가 가장 우수함을 나타냄. 반응 온도 140 $^{\circ}$ C의 조건에서는 150 $^{\circ}$ C의 반응 조건에 근접한 green color intensity 값을 얻기 위해서는 반응시간이 10분 이상 필요하며 센서의 구동 시간 증가에 따른 파워 소비가 증가하므로 150 $^{\circ}$ C의 조건에 비해 현장에 적용하기가 어렵다는 단점을 가짐. 반응 온도 150 $^{\circ}$ C의 조건에서는 반응속도가 너무 빠르기 때문에 센싱 시간을 정확하게 설정해야지 프롤린 농도 분석을 정밀하게 할 수 있음.

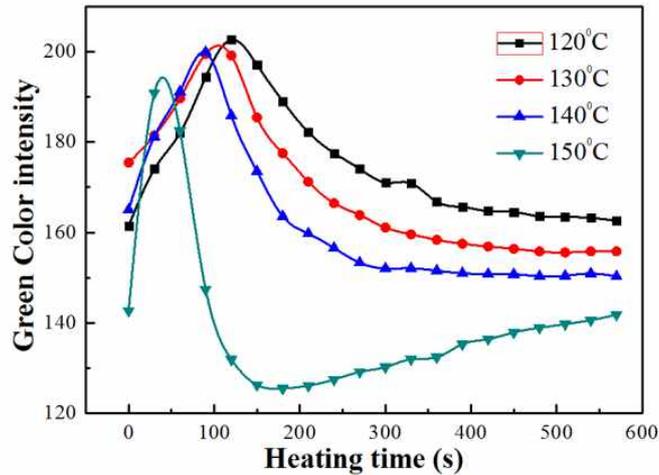


그림97. 종이센서의 감도 및 구동시간을 최적화하기 위해서 프롤린-닌히드린 반응의 반응 온도 및 시간에 따른 green color intensity의 변화

- 그러므로, 가뭇진단을 위한 종이센서의 감도는 반응 온도 110°C 에서 3min 동안 구동 했을 때 가장 최적화됨을 알 수 있으며 2차년도에 제안한 가뭇진단 센서에 비해 센싱 시간이 1/4 로 줄어들어 센싱 속도가 획기적으로 향상된 것을 확인할 수 있음.
- 다음은 사전에 닌히드린을 로드하여 프롤린과 반응할 수 있도록 구성된 센서에서 샘플양 대비 최적화된 닌히드린 로드량을 결정하기 위한 실험을 진행함. 그림98은 닌히드린 로드량에 따른 green color intensity의 변화를 나타냄. 샘플로드 부는 64mm<sup>2</sup>인 정사각형의 면적으로서 프롤린 100ul를 로드하였을 때 왁스층을 벗어나지 않는 면적으로 구성함. 또한 닌히드린 프리로드 양은 acidic한 닌히드린 솔루션이 왁스를 녹이지 않고 평평하게 샘플 로드 부에 건조될 수 있는 한번에 30ul 로드함. 이 때 샘플 로드양은 100ul로 고정하고, 닌히드린 양에 따른 발색반응을 파악하고자 하였으며, 이는 닌히드린 로드횟수와 종이센서의 구조를 변화해 가며 이루어짐. 닌히드린 로드는 1회차를 기준으로 1시간이 지난 이후 다시 로드하는 것을 기준으로 진행했으며, 1시간은 샘플로드 부의 닌히드린이 완벽히 건조될 때 소비되는 시간임.
- 다음으로는 종이센서의 구조를 3층과 4층으로 구성하고 결과를 확인해 보고자 함. 3층 센서의 구조는 밑바닥을 기준으로 1층이 왁스층으로 이루어진 방수층, 2층은 채널부, 3층은 샘플 로드부와 검출부로 구성을 하였으며 닌히드린을 로드할 수 있는 영역인 샘플로드 부가 한 영역만 존재하게 됨. 또한 4층의 센서 구조는 3층과 4층이 샘플로드 부, 검출부로 위치하며 샘플로드 부가 2영역 존재하는 구조이다. 각각 1번(30 ul) 부터 4번(120ul)를 로드하여 건조 후 프롤린 3mM을 150도에서 540초일때의 발색반응을 분석함.
- 먼저 3층 구조-샘플로드 부 1영역에서의 결과는 닌히드린을 30ul나 60ul 로드하였을 때 결과 값의 차이가 없었으며, 90ul와 120ul를 로드하였을 때 조금 더 강한 발색반응이 분석됨. 다음으로 4층구조-샘플로드 부 2영역의 발색반응을 살펴보면 60ul와 120ul를 로드하였을 때 발색반응은 3층 구조에서 동일한 볼륨의 닌히드린을 로드 후 분석하였을 때와 큰 차이가 나지 않았으며, 180ul를 로드하였을 때 가장 균일하고 붉은 발색반응이 분석됨. 또한 240ul를 로드

하였을 때의 결과는 180ul를 로드하였을 때와 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 동일 면적에 포화될 수 있는 닐히드린양이 존재함을 의미하고 180ul이상의 닐히드린을 로드하였을 때는 그 결과값의 차이가 유의하지 않음을 의미함. 따라서 닐히드린 로드량은 4층 구조에서 3번-180ul를 로드하였을 때를 최적화 된 과정으로 결정함.

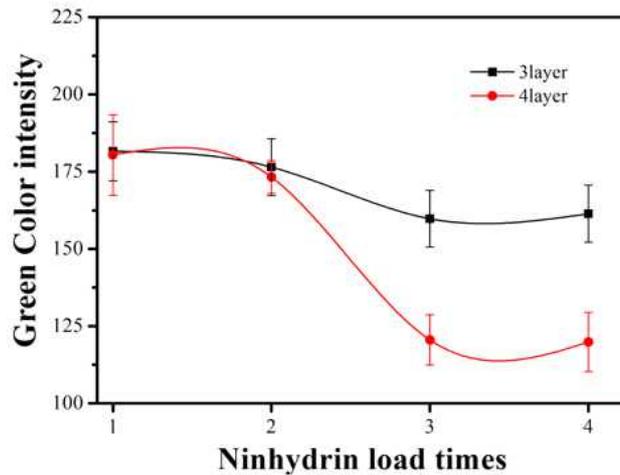
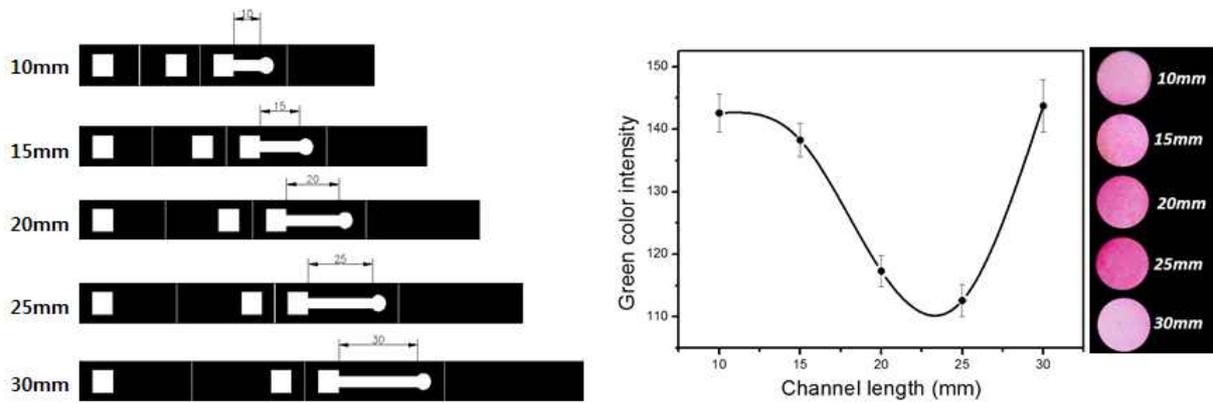
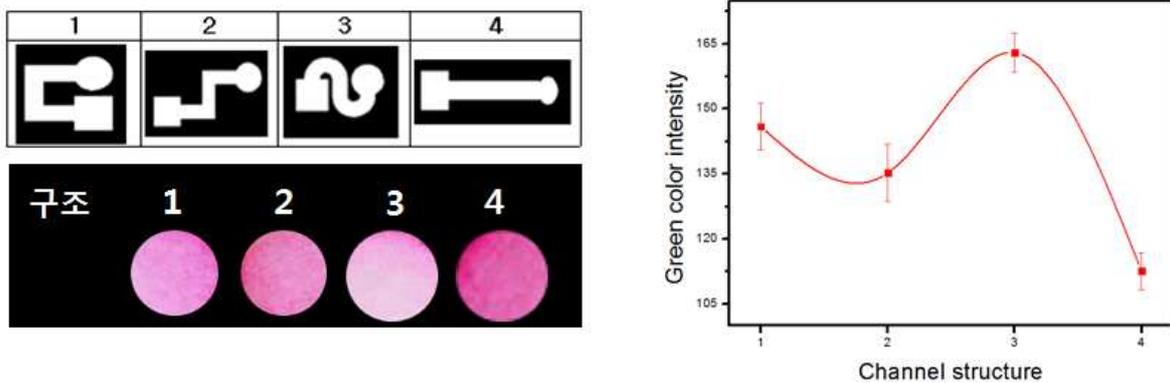


그림98. 닐히드린 로드 양에 따른 종이센서 색상 강도 변화

- 마지막으로 프리로드 되어 건조한 상태로 존재하고 있는 닐히드린과 프롤린 솔루션이 채널을 유동함에 따라 원활하게 섞이는 과정을 조절하기 위하여 채널의 길이와 형상을 파악하고자 함. 이는 혼합물이 섞이는 시간을 조절하는 요소로써, 너무 짧은 시간이나 긴 시간의 혼합과정을 거치게 되면 균일하고 붉은 발색반응을 얻을 수 없기 때문에 반응물이 적절히 섞여 가장 적합한 반응을 획득할 수 있는 조건을 규명하고자 함. 종이센서의 구조는 4층 구조를 이용하여 프롤린의 농도 3mM과 닐히드린 180ul를 로드하여 결과를 분석함.
- 먼저 채널의 길이에 따른 RGB 분석 결과임 (그림99(a)). 채널의 길이는 10mm~30mm 까지 5mm씩 길이를 늘려가며 제작함. 채널이 10mm일때는 혼합물이 섞이기에는 너무 짧은 시간이었으며 이는 RGB 분석을 통한 green color intensity값을 통해 파악할 수 있음. 채널을 5mm씩 늘려감에 따라 green color intensity값은 선형적으로 하강하는 모습을 보이며 25mm의 채널 길이일 때 가장 낮은 green color intensity값을 얻을 수 있었다. 반면 30mm까지 채널이 길어졌을 때는 혼합물이 섞여 유동하는 시간이 길고 그에 따른 혼합물이 검출부까지 원활히 도달하지 못하여 채널 길이 25mm일때의 결과보다 낮은 발색정도를 보임.
- 따라서 채널길이가 25mm일 때 가장 붉은 결과값을 도출함에 따라 동일한 길이 내에서 각기 다른 채널 형상에 따른 발색반응을 확인하고자 함. 그림99(b)와 같이 형상이 다른 25mm 길이의 채널 구조를 제작하였고 이에 따른 프롤린 분석 결과를 확인함. 그 결과 모든 채널 구조에서 유사한 발색 반응과 green color intensity값을 얻을 수 있었으며 향후 여러 농도를 한 개의 센서에서 분석할 수 있어 배열이 편리한 직선형 채널 구조를 선택하여 센서의 길이와 형상을 최적화 함.



(a)



(b)

그림99. (a) 채널 길이에 따른 종이센서의 green color intensity의 변화, (b) 채널길이 25mm에서 다양한 형상에 따른 종이센서 green color intensity의 변화

- 위의 실험결과를 바탕으로 직선형상의 25mm 길이의 믹싱채널을 가진 종이기반 센서를 제작 하였으며 센싱온도 및 시간은 150°C, 2.5min 으로 하여 프롤린 농도에 따른 green color intensity의 변화를 측정함
- 최적화된 종이센서를 사용하여 다양한 농도를 가진 프롤린에 대한 색의 변화를 RGB분석을 통해서 정량화하여 standard curve를 확보함. 실험에서 사용한 프롤린 농도 범위는 0부터 300 $\mu$ M까지이며 샘플의 양은 100 $\mu$ l, 반응온도는 150°C, 반응시간은 2.5min 으로 설정하여 실험을 진행함. 그림100은 종이센서에 로드한 프롤린 샘플의 농도에 따른 green color intensity 의 변화를 보여줌.
- 실험결과 프롤린의 농도가 증가할수록 센서부에서 색이 진한 자색이 되어서 green color intensity 값이 감소하는 것을 알 수 있으며 제안된 센서는 최소 25 $\mu$ M의 농도까지 측정 가능함. 프롤린 농도가 25 $\mu$ M일 때 센서부에서 green color intensity의 값은 약 205 이며 농도가 300 $\mu$ M 일 때는 green color intensity 값이 약 170으로 control sample에 비해서 약 50정도의 green color intensity 값이 감소하는 것을 알 수 있음.

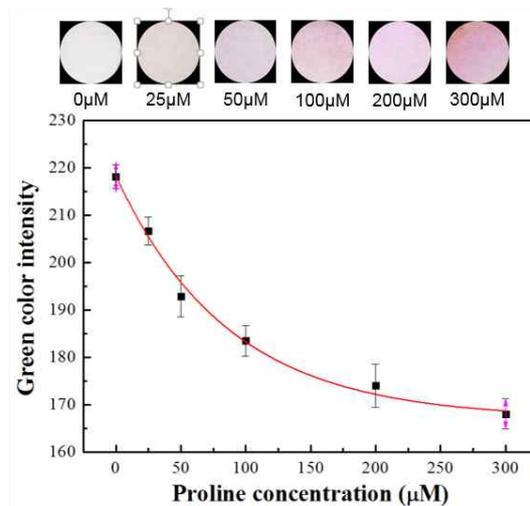


그림100. 종이센서에 로드한 프롤린 샘플의 농도에 따른 green color intensity 의 변화

- 본 연구에서는 종이기반 센서를 사용한 가뭄을 정밀하고 신속하게 검출할 수 있는 센서에 대해서 나타냄. 제안된 센서는 빠른 프롤린 검출을 위해 센싱부가 2층에 위치하며 약스프린팅 방법 및 오리가미 방법을 사용하여 간단하게 제작됨. 또한, 다양한 요소들에 대해서 센서를 최적화하여 센싱온도 150°C, 센싱시간 2.5min, 샘플량:닌히드린량 1:2비율, 직선형의 25mm 믹싱채널에서 가장 우수한 감도를 얻을 수 있었으며 센싱시간은 기존에 비해 1/4로 줄어 빠른 프롤린 검출이 가능함을 증명함. 실험결과로부터 제작된 센서는 최소 25μM의 프롤린을 검출할 수 있었으며 프롤린의 농도가 증가할수록 green color intensity가 감소하는 것을 알 수 있음. 제안된 종이기반 센서는 앞으로 가뭄 스트레스의 현장 진단에 활용할 수 있을 것으로 기대됨.

#### 나. 최적화된 종이기반 센서를 사용한 양파 작물에서 다양한 환경장애(냉해, 저온 및 가뭄) 진단

- 제안된 종이기반 센서의 현장 사용 가능성을 확인하기 위해서 일정한 환경에서 양파에 가뭄 스트레스 및 저온스트레스를 주고 샘플을 채취한 다음 종이센서를 사용하여 프롤린 검출 실험을 진행함.
- 가뭄 및 저온이 양파에 미치는 영향을 실험하기 위해서 현장에서 성장한 양파를 화분에 옮겨 심고 배양실(25°C, 16hr light/ 8hr dark photo)에서 24시간 순응시킴. 그리고 비교군은 실험실 배양실 조건인 25°C에서 배양하고 실험군은 냉해 스트레스, 저온 스트레스, 건조 스트레스로 나누어 스트레스를 처리함. 냉해 스트레스는 화분에 있는 양파를 -20°C 조건에 4시간 처리 하고 상온으로 꺼내 5분 후 스트레스를 처리한 샘플을 채취했으며, 저온 스트레스는 4°C에서 일정량의 빛을 주는 조건에서 3주 동안 처리하고 샘플을 채취함. 건조 스트레스는 양파를 구근채로 상온조건인 25°C에 두고 24시간 동안 무게를 재어 수분 손실률을 측정하여 준비함. 스트레스를 처리가 완료된 양파는 4번째와 5번째 잎을 상단부, 중단부, 하단부 세부

분으로 나누어서 샘플을 만들고 각 부분의 프롤린 함량을 측정함.

- 프롤린은 양파 0.15g 에서 1ml의 1% sulfosalicylic acid(W/V)을 이용하여 추출함. 제작된 종이기반 센서의 샘플로드부에 식물 추출액 100 $\mu$ l를 로드하고 센서부를 150 $^{\circ}$ C에서 2.5min 동안 가열에 의해 나타나는 발색반응의 색을 RGB 분석을 통해 샘플 내에 있는 프롤린량을 검출함. 종이기반 센서를 통해서 검출한 프롤린 농도 값의 정확성을 측정하기 위해 같은 샘플을 96웰 플레이트를 이용한 프롤린 검출 방법을 통해서 측정값과 비교 분석함. 96 웰 플레이트를 사용하여 프롤린을 검출하는 방법은 다음과 같음. 96웰 플레이트에 각각의 식물 추출액 66 $\mu$ l을 넣고 ninhydrin reagent 132 $\mu$ l을 넣어 잘 혼합함. 그리고 100  $^{\circ}$ C로 온도를 유지하는 dry oven (WiseVen dry oven $^{\circ}$ , WOF-105, DAIHAN Scientific) 에서 60분 동안 열을 가해줌. 반응 종료 후 multi-modereader (SynergyH1HybridMulti-ModeMicroplateReader, BioTek, USA) 을 이용해서 510nm에서 흡광도를 측정함.
- 그림101은 냉해스트레스(-20 $^{\circ}$ C)를 처리한 양파의 형태(a)와 96웰 플레이트를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 측정된 프롤린 농도(b), 종이기반 센서를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 측정된 RGB 값(c) 및 종이기반 센서를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 검출한 프롤린 농도(d)을 나타냄.
- -20 $^{\circ}$ C에서 4시간 냉해를 처리한 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부의 프롤린 함량을 측정함. 냉해를 처리하면 양파 자체의 수분에 의해 양파가 얼고 냉해 처리 전 모양을 유지하고 있으나 상온으로 꺼내어 두면 잎 끝부분부터 아래로 처지면서 순식간에 잎이 흐물거림(그림101.a). 상대적으로 어린잎(5번째 잎)은 형태가 유지되는 것을 알 수 있었음. 종이 센서를 사용하여 프롤린 측정 결과 4번째 잎은 중단부에서 5번째 잎은 상단부에서 프롤린이 약50~70 $\mu$ M 정도 검출되며(그림101.c, d) 96웰 플레이트를 사용하여 측정한 결과와 측정값이 비슷함으로 종이센서를 사용한 프롤린 농도 분석은 정밀도를 가지므로 종이센서를 사용하여 현장에서 냉해를 검출하는데 적합한 것을 알 수 있음. 그리고 상대적으로 오래된 잎인 4번째 잎은 상단부에서는 종이센서를 사용하여 프롤린을 검출 했을 때 프롤린 농도가 control하고 비슷한 것을 알 수 있는데 이는 양파 잎의 상단부에서 이미 세포의 괴사가 일어나 프롤린이 나오지 않은 것으로 추측됨.
- 다음으로 저온이 양파에 미치는 영향을 분석하기 위해서 4oC에서 일정량의 빛을 주는 조건에서 3주 동안 저온처리한 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부의 프롤린 함량을 종이센서를 사용하여 측정함. 그림102는 저온스트레스(4 $^{\circ}$ C)를 처리한 양파의 형태(a)와 96웰 플레이트를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 측정된 프롤린 농도(b), 종이기반 센서를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 측정된 RGB 값(c) 및 종이기반 센서를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 검출한 프롤린 농도(d)을 나타냄.

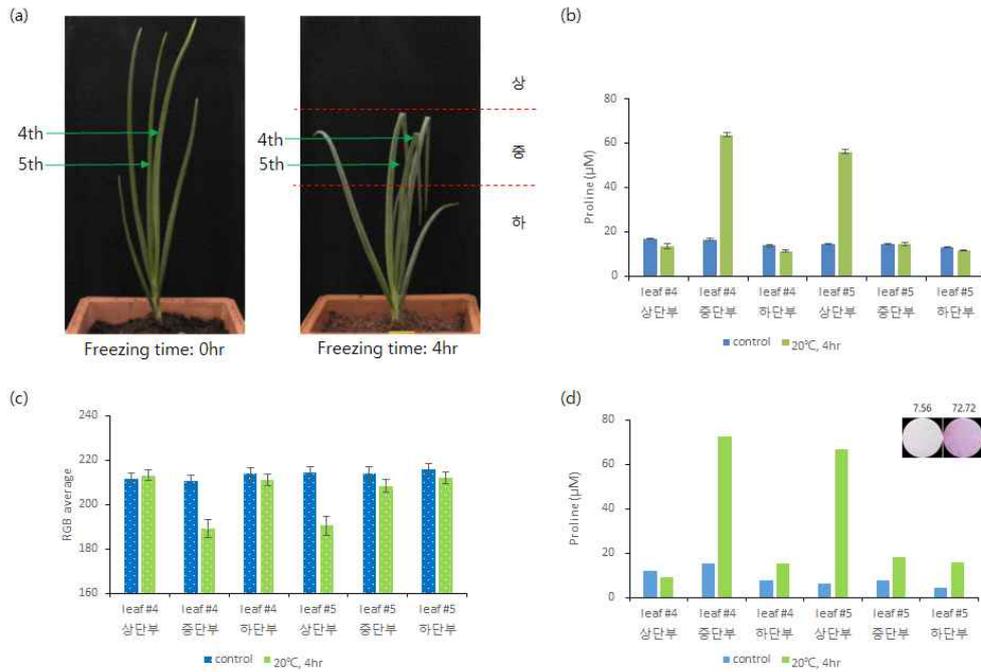


그림101. (a) 해스트레스(-20°C)를 처리한 양파의 형태, (b) 96웰 플레이트를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 측정된 프롤린 농도, (c) 종이기반 센서 를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 측정된 RGB 값, (d)종이기반 센서를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 검출한 프롤린 농도

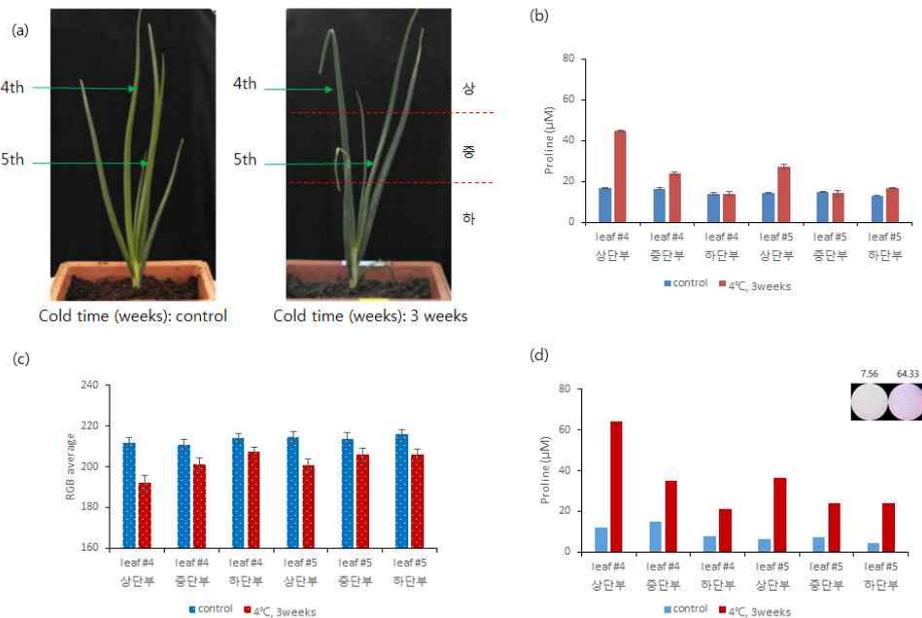


그림102. (a) 저온스트레스(4°C)를 처리한 양파의 형태, (b) 96웰 플레이트를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 측정된 프롤린 농도, (c) 종이기반 센서를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 측정된 RGB 값, (d) 종이기반 센서를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 검출한 프롤린 농도

- 저온 스트레스 처리 후 2주가 지나면 양파의 잎 끝부분부터 잎 마름현상이 나타나기 시작하며, 3주 정도가 되면 잎 끝부분이 휘어지는 형태를 나타내기 시작함(그림102.a). 종이센서를 사용하여 저온 스트레스 영향에 의해 발생하는 프롤린 농도를 측정 결과 잎 마름 현상이 나타나는 잎의 상단부분에서 프롤린이 약40 $\mu$ M 검출되는(그림102.c, d) 것을 확인하였으며 측정된 결과는 96웰 플레이트를 사용하여 측정된 결과값 비슷하므로 종이센서를 사용한 측정결과가 정밀도를 가지는 것을 알 수 있음 . 프롤린 양은 상대적으로 오래된 잎인 4번째 잎에서 더 많이 검출됨.
- 마지막으로 상온에서 건조스트레스를 처리한 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부의 프롤린 농도를 측정함. 그림103은 시간에 따른 양파의 수분 손실률(a)과 96웰 플레이트를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 측정된 프롤린 농도(b), 종이기반 센서를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 측정된 RGB 값(c) 및 종이기반 센서를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 검출한 프롤린 농도(d)을 나타냄.

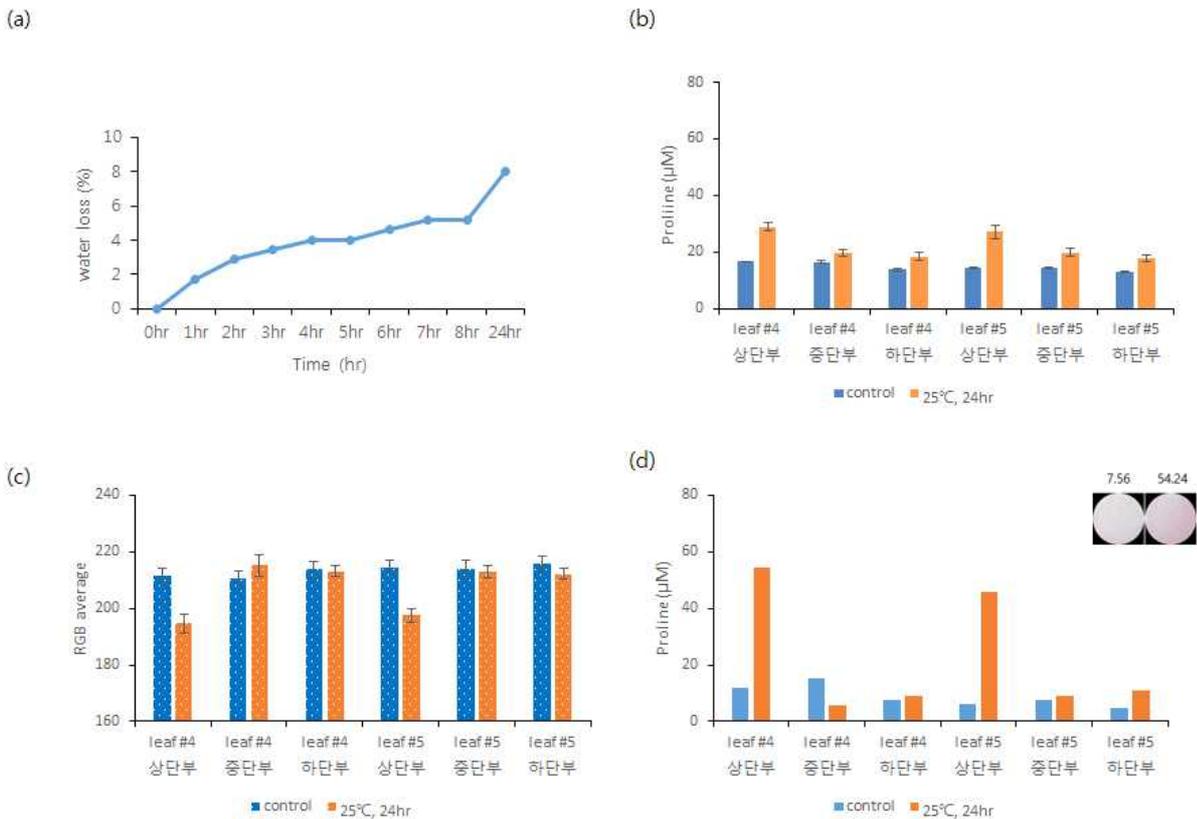


그림103. (a) 건조스트레스를 처리한 양파의 시간별 수분 손실률, (b) 96웰 플레이트를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 측정된 프롤린 농도, (c) 종이기반 센서를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 측정된 RGB 값, (d) 종이기반 센서를 사용하여 양파의 4번째와 5번째 잎의 상단부, 중단부, 하단부에서 채취한 샘플에서 검출한 프롤린 농도

- 양파를 구근채로 상온에 두고 건조스트레스를 처리한 결과 24시간 후에 약 8%의 수분 손실을 보였고 첫 번째와 두 번째 잎의 끝부분에 잎 마름현상이 두드러지게 나타남(그림103.a). 샘플을 채취한 4번째와 5번째에는 잎 마름 현상은 보이지 않음. 프롤린 측정 결과 5번째 잎의 상단부에서 약30 $\mu$ M의 프롤린이 검출되는(그림103. c, d) 것을 확인하였으며 96웰 플레이트를 측정된 결과도 비슷한 것을 알 수 있음.
- 결론적으로 양파가 냉해, 저온, 건조 스트레스에 영향을 받았을 경우 양파 내에서 프롤린량이 증가하는 것을 알 수 있었으며 제작된 종이기반 센서를 사용하여 정밀도를 가지고 실제 샘플에서 프롤린을 검출 할 수 있음을 확인함. 다양한 환경에서 냉해 스트레스의 경우 양파의 4번째 잎의 중단부와 5번째 잎의 중단부에서 프롤린이 검출, 저온 스트레스의 경우 양파의 4번째 잎의 중단부에서 검출, 건조 스트레스의 경우 양파의 5번째 잎의 중단부에서 프롤린이 검출되는 것을 알았으며 제안된 종이센서를 사용하여 현장에서 환경장애 진단 할 수 있음을 확인함.

#### 다. 작물의 병해를 진단하기 위해서 비색법을 사용한 종이기반 센서 제작

- 식물의 질병을 일으키는 균류에 의한 감염을 확인하는 바이오 마커로써 펙틴의 주요 구성 물질 중 하나인 polygalacturonic acid (PGA) 을 분해하는 polygalacturo nase:PG)를 사용함. PG는 세포벽의 주성분인 펙틴을 분해하여 세포벽의 안정성을 광범위하게 파괴하기 때문에 초기 감염단계에서 생산되는 병원성을 확인 할 수 있는 인자임.
- Ruthenium Red (RR) 방법에서 사용되는 Ruthenium Red는 pectin의 카르복실기의 분자내 공간에 선택적으로 결합하고 알긴산 카르복실기와는 거의 결합하지 않는 염료임. 염료 그룹은 하나의 galacturonide 잔기의 카르복실기 산소와 펙테이트 사슬내의 인접한 galacturonide 의 하이드록실기 산소에 결합함. 이러한 결합 특성을 기초로 하여 결합된 PGA와 Ruthenium Red의 dye-polysaccharide 복합체에서 PG에 의한 절단되는 PGA의 양에 비례해 비색화되는 양을 측정함으로써 PG의 활성을 측정할 수 있음(그림104).
- PG의 활성 정도를 현장에서 간편하게 검출하기 위해서 왁스 프린팅을 기반으로 종이 기반 센서를 만듦. 종이 센서의 첫 번째 부분은 PG 샘플을 흡수시키면서 동시에 RR의 색 변화를 감지할 수 있는 지름 0.8cm 크기의 원형 모양의 센서부가 있음. 두 번째 부분은 PGA-RR complex를 균일하게 코팅할 수 있도록 정사각형 모양의 PGA-RR complex 부분이 형성됨. 마지막 부분은 투입된 시료가 종이를 투과하지 않고 PGA-RR complex 부분에서 반응할 수 있도록 방수층으로 구성됨(그림105).
- 일정량의 PGA (65 $\mu$ g/ml)와 RR (60 $\mu$ g/ml) 을 최종 부피 250 $\mu$ l buffer에 넣어 PGA-RR complex를 만들고 센서의 두 번째 부분에 올림. 종이센서에서 PG가 활성을 갖는 적당한 온도는 효소의 반응이 가장 잘 일어나는 35 $^{\circ}$ C 로 고정함. PG에 의한 PGA-RR complex의 색의 변화는 암실의 일정량의 광원 아래에서 카메라를 이용해 이미지를 촬영함. 얻어진 이미지

는 image J 프로그램을 이용해 RGB 값을 분석하고 Green intensity 평균값을 얻음.

- 구매한 Pectinex Ultra SP-L (novozymes) 는 활성이 3300unit/g 으로 pH3~5, 온도는 20~50에서 최대 활성을 갖는 상용화된 PG임. 1unit은 1.0 $\mu$ mole 의 polygalacturonic acid 를 galacturonic acid 로 1분 동안 pH4.0 과 25 $^{\circ}$ C조건에서 유리시키는 농도로 정의됨.
- *Botrytis cinerea*에서 PG를 생산하기 위해 에너지원으로 1% pectin 과 2% PGA를 첨가한 Czapek Dox 배양액을 사용함. Czapek Dox 배양액은 에너지원을 넣지 않은 것과 1%pectin 또는 2% PGA를 넣은 Czapek Dox 배지를 고온 고압에서 멸균 후 *Botrytis cinerea*의 포자를 1X10<sup>5</sup>/ml 농도로 준비된 배양액에 접종함. 균이 접종된 배양액은 25 $^{\circ}$ C, 120RPM 조건의 shaker incubator에서 3일 이내로 배양함. 배양 후에는 Whatman filter grade 1Chr을 이용해 균사체와 분리함.

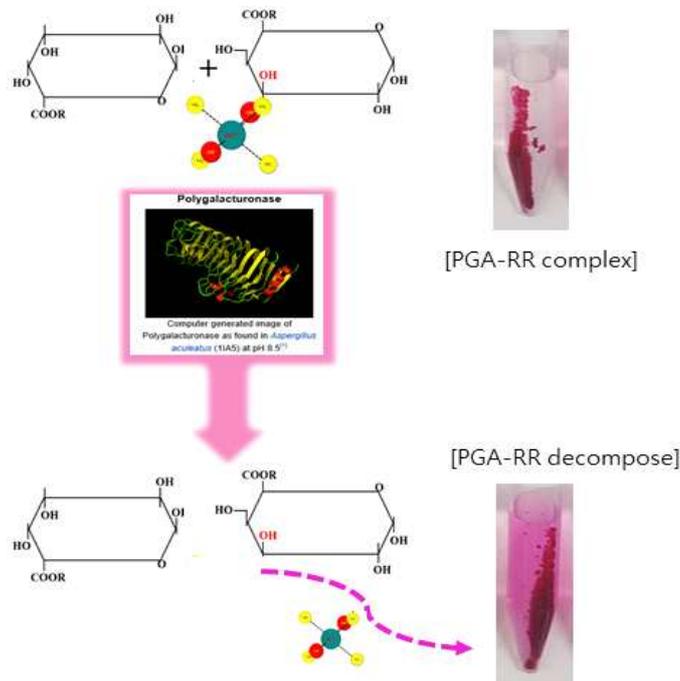


그림104. PGA-RR complex을 이용한 PG 활성 측정 원리

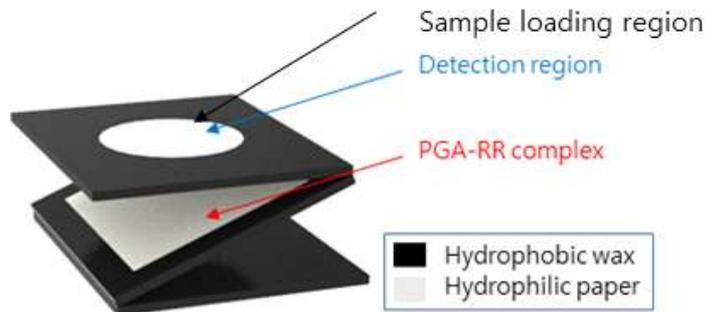


그림105. PG 활성도 측정을 위한 종이 센서 구조

- 2차년도에 수행한 실험에서 종이센서에서 Pectinex 0unit과 10unit의 RGB분석을 통한 Green intensity 값의 차이가 적음. 종이센서에서 PG의 활성도를 더 높은 민감도로 측정하기 위해서 종이의 재질에 변화를 줌(표.1).

표1. Whatman filter grade 1Chr 과 4Chr의 특징 비교

	Grade 1Chr	Grade 4Chr
Description	Medium Flow	Very Fast
Particle retention liquid(μm)	11	20-25
Filtration speed	150	37
Typical thickness(μm)	180	205

- 기존에 사용한 종이는 셀룰로오스 재질로 저렴한 가격, 자연 친수성 및 빠른 액체 침투 때문에 대부분의 연구자들에 의해 널리 사용됨. 사용하였던 Whatman filter grade 1Chr은 많은 유속 기술과 호환되므로 널리 사용되고, 중간 유속 및 입자 유지에 사용됨. Whatman filter grade 4Chr은 큰 기공 크기를 가지고 있어 용매를 사용하여 셀룰로오스 섬유를 팽창시키고 기공 크기를 제한할 때 사용됨. Whatman filter grade 1Chr 과 4Chr로 종이센서를 만들고 PGA-RR complex를 이용한 종이센서에서 PG활성도를 측정하고 비교함.

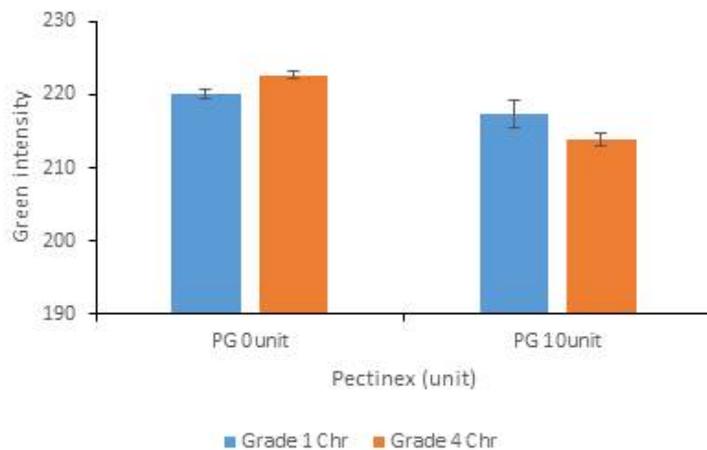


그림106. Whatman filter grade 1Chr와 4Chr에서 PG 활성에 따른 Green color intensity값

- Pectinex 10unit을 PGA-RR complex를 이용한 종이 센서에 첨가하고 35°C에서 일정시간 반응한 후, Whatman filter grade 1Chr와 4Chr의 반응정도를 RGB 분석을 통해 비교함. Pectinex가 0unit 일 때 grade 1Chr 와 4Chr은 비슷한 Green intensity 값을 나타내고 있었음. Pectinex가 10unit일 때 grade 4Chr에서 더 낮은 Green intensity를 나타내므로써 민감도 향상에 가능성을 확인함(그림106).

- 종이 센서에서 PG의 활성화 측정의 민감도를 높이기 위해 종이 재질의 변화와 더불어 센서부의 반응 용량에 변화에 의한 영향을 확인함. Pectinex 10unit로 PG 양을 고정하고 센서부에 첨가하는 PG가 포함되어 있는 반응액의 용량을 50 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 200 $\mu$ l 으로 정함. 종이 센서에 용량별로 반응액을 첨가하고 35 $^{\circ}$ C에서 일정시간 반응한 후 Whatman filter grade 1Chr와 4Chr의 반응정도를 RGB 분석을 통해 확인함. Pectinex가 10unit일 때 반응 용량이 100 $\mu$ l일 때 가장 뚜렷한 값의 차이가 나타나고 grade 4Chr에서 가장 낮은 Green color intensity를 나타냄(그림107).
- PGA-RR complex를 기반으로 PG 활성화 측정을 위한 종이센서에서 Petinex 의 unit 별 Green intensity 변화를 확인함. Whatman filter grade 4Chr에서 PG가 포함되어 있는 반응액의 용량은 100 $\mu$ l 로 고정하고, 35 $^{\circ}$ C에서 일정시간 반응 후 RGB 분석을 통해 Green intensity 변화를 확인함. Pectinex의 unit이 증가할수록 Green intensity의 전체적으로 값이 감소하였고, 감소값은 Pectinex가 1unit일 때 확실히 나타났음(그림107). 0.1unit에서 10unit까지 PG의 활성을 확인할 수 있음.

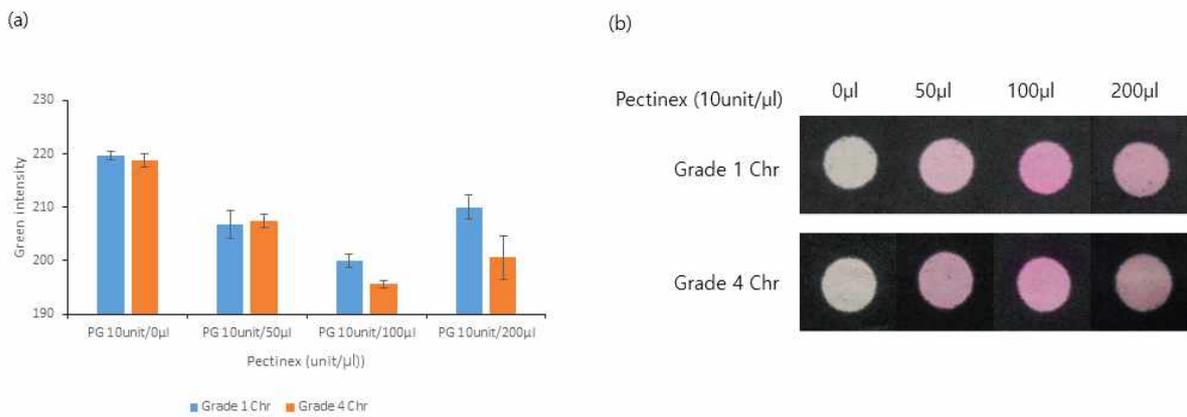


그림107. (a) Whatman filter grade 1Chr와 4Chr에서 센서부의 반응 용량에 따른 Green color intensity 값(a), (b) 종이센서를 사용하여 측정된 Pectinex의 unit에 따른 센서부(1Chr과 4Chr)의 이미지

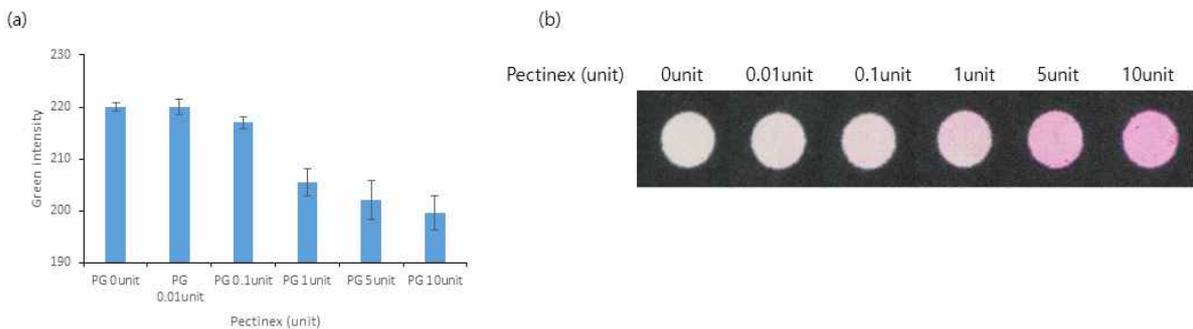


그림107. (a) Whatman filter grade 4Chr에서 Pectinex의 unit 별 Green color intensity 값, (b) 종이센서를 사용하여 측정된 Pectinex의 unit에 따른 센서부의 이미지

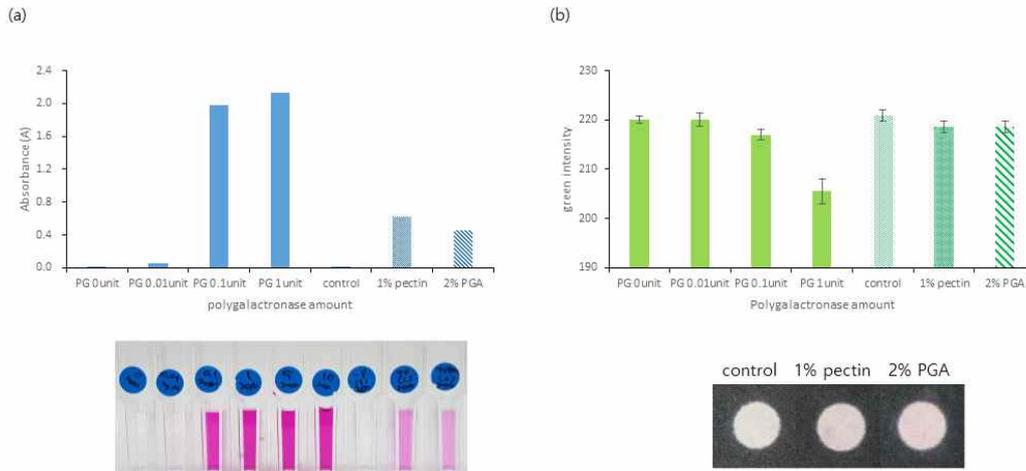


그림108. Botrytis cinerea에서 획득한 PG의 활성을 spectrophotometer로 측정한 흡광도(a)와 Whatman filter grade 4Chr 종이 센서에서 측정한 Green intensity 값(b)

- Pectin과 PGA의 유무에 따라 Czapek Dox 배양액에서 Botrytis cinerea 균을 배양하여 PG를 얻음. 상용화된 Pectinex값을 standard 값으로 하고 배양액으로 나온 단백질 30 $\mu$ g을 spectrophotometer와 종이 센서에서 반응시켜 활성도를 측정함. 상용화된 Pectinex의 흡광도와 비교했을 때 에너지원으로 1% pectin 과 2% PGA배양액에서 얻어낸 PG의 양은 0.01~0.1unit 사이의 값을 가지며(그림108.a), 종이센서로 측정하였을 때도 비슷한 값을 얻음(그림108.b). 이를 통해 종이 센서를 이용한 PG 활성 측정 및 현장에서 작물의 병해 진단 가능성을 확인함.

## 라. 작물의 병해를 진단하기 위한 종이기반의 효소 결합 면역 반응(paper based ELISA) 센서 제작

- ELISA(효소면역정량법)는 효소면역정량법은 오늘날 가장 많이 이용되는 면역정량법으로 항원과 항체의 반응을 이용해 항원을 정량할 수 있는 실험 방법임. 항원의 농도는 기질 전환 정도에 따라 결정되며, 항체에 결합되는 효소로는 염기성인산분해효소나 양고추냉이과산화효소등이 많이 이용됨. 이들 효소는 항체 분자의 Fc지역에 공유 결합되도록 화학반응을 이용하여 결합시켜 사용함. 통상적으로 폴리스티렌 재질인 96 웰 플레이트에서 수행되는 ELISA는 정량적이며 고밀도 성형에 적합하고 다량 분석이 가능한 방법임. 그러나 이 분석법은 많은 양 (20 ~ 200 ul) 의 분석 물질과 시약이 필요하며 처리에 긴 시간이 필요함(1시간 이상). 또한 결과 분석을 위한 고가의 장비가 필요하여 현장에서 신속한 분석 어려움.
- Paper based ELISA (P-ELISA)는 기존에 96 웰 플레이트에서 수행되었던 ELISA를 종이 기반의 효소 면역 흡착 분석법으로 수행하는 것임. P-ELISA는 종이를 사용하므로써 제작의 다양성과 용이성을 제공하며, 각 테스트 존에 약 3ul의 분석 물질과 적은 양의 시약을 필요로 하고 전체 반응에 필요한 시간이 2시간 미만임(그림110). 또한 분석에 필요한 장비도 일반적인 데스크톱 스캐너를 사용하여 ELISA의 민감도와 특이도를 편리하고 저렴한 비용으로 사용

할 수 있게 함. PG의 존재 유무를 항원-항체 반응을 이용해 간편하게 검출하기 위해서 종이를 기반으로 하는 센서를 제작함.

- 제3세부에서 양파와 마늘의 흑색썩음균핵병균인 *S. cepivorum*로부터 polygalacturonase (이하:PG) 유전자를 클로닝하고 대장균으로부터 PG 재조합 단백질 정제하여 polyclonal rabbit anti-ScPG 항체를 제작함. Anti-ScPG 항체는 재조합 PG 단백질과 흑색썩음균핵병이 걸린 양파로부터 항원-항체 특이성 및 민감성을 확인함. 실험의 용이성을 제공하기 위해 구매한 Pectinex Ultra SP-L (*Aspergillus aculeatus*에서 분리된 PG, novozymes) 와 Pectinase (*Aspergillus niger*에서 분리된 PG, sigma)가 흑색썩음균핵병균에서 만들어진 PG를 항원으로 사용한 anti-ScPG 항체에 반응성이 있는지를 확인함. 이를 위해 *S. cepivorum*의 PG, *Aspergillus aculeatus*의 PG 그리고 *Aspergillus niger*의 PG 각각의 단백질 서열을 비교함(그림111.a). 결과적으로 *S. cepivorum* PG의 단백질서열은 *Aspergillus aculeatus*의 PG와 약 60%, *Aspergillus niger*의 PG와 약50% 유사성이 있음을 확인함. 그리고 western blotting 결과 Pectinex Ultra SP-L이 anti-ScPG 항체에 항체와 특이성이 존재함을 확인함(그림111.b).

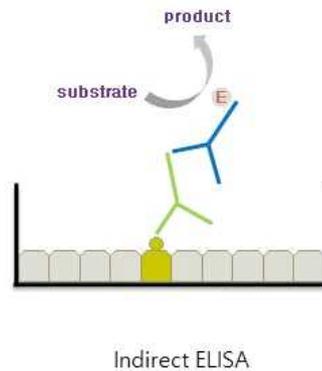


그림109. ELISA 키트의 원리

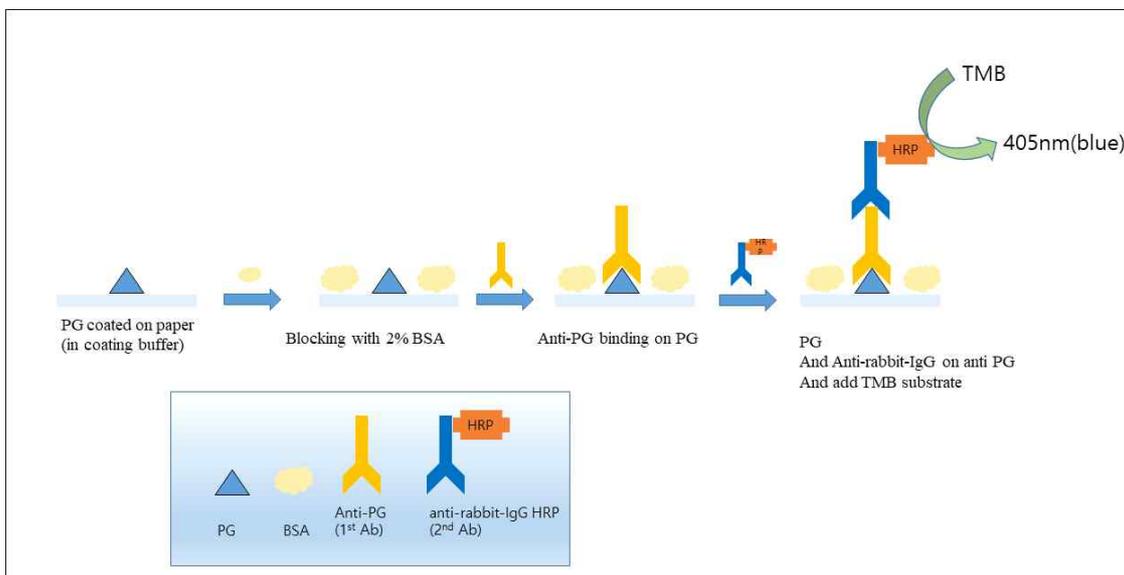


그림110. Paper-based ELISA (P-ELISA) 반응 개략도



그림111. (a) S. cepivorum의 PG, Pectinex Ultra SP-L 와 Pectinase 들의 anti-ScPG 항체에 대한 특이성 확인, (b) anti-ScPG를 이용한 western blotting 결과

- ELISA 분석을 위해 anti-ScPG 항체를 표지하기 위한 HRP가 접합된 goat anti rabbit IgG HRP (cell signal) 항체를 구매함. 면역 반응이 일어나는 플랫폼으로는 폴리스틸렌 재질인 96 웰 플레이트와 chromatography paper 1Chr를 사용함. 기본 완충액으로 PBS(phosphate-buffered saline)을 이용했으며 washing solution을 위해 Tween20 (sigma), blocking solution을 위해 Bovine Serum Albumin(sigma)을 구매함. 접합된 HRP의 발색을 위해 TMB substrate solution (thermo) 사용함.
- ELISA 분석법을 간단히 기술하면 다음과 같다. 50mM 또는 100mM carbonate buffer(pH 9.0)에 농도별로 희석한 항원(Pectinex)을 각 웰 당 100μl 넣고 4°C에서 살짝 흔들어주면서 16시간 이상 코팅을 함(0~64μg). 다음날 antigen solution을 버리고 0.05% tween 20이 포함되어 있는 PBS로 3번 씻어줌. 2% BSA가 포함되어 있는 Blocking buffer를 200μl씩 첨가하고 상온에서 1시간 반응시키고 완충액을 버린 후 washing buffer로 3번 씻어줌. blocking buffer에 희석된 anti-ScPG를 각 웰 당 100μl 첨가하고 상온에서 2시간 인큐베이션하고 washing buffer로 3번 씻어줌. 그 후, blocking buffer에 희석된 goat anti-rabbit HRP 항체를 웰 당 100μl씩 첨가하여 다시 상온에서 2시간 반응하도록 두었다가 반응액을 버리고 washing buffer로 3번 씻어줌. 반응이 끝나면 웰 당 100μl의 TMB substrate solution을 넣고 적당히 발색될 때까지 기다려 multi-modereader Synergy 1Hybrid Multi-Mode MicroplateReader, BioTek, USA)기로 OD 405nm 값을 측정함.
- 종이 기반의 면역 분석을 수행하기 위해 원형의 반응 영역을 왁스 프린팅 기반으로 제작함. 크로마토그래피 종이는 평균 색상 강도를 가장 뚜렷하게 판별할 수 있고 널리 사용되고 있는 Whatman filter grade 1Chr을 사용함. 원형의 테스트 영역은 AutoCAD 소프트웨어를 이용

하여 반응 영역을 지름 4mm로 설계하였으며, Xerox사의 Colorcube 8570DN 고체 왁스 프린터를 사용하여 인쇄함. 인쇄한 종이는 120°C, 180sec 동안 핫 플레이트 상에 놓아 왁스가 전체 종이에 완전히 녹아서 흡수되도록 함. 만들어진 종이 센서는 상온에서 냉각하고 실온에서 보관하여 사용함.

- Paper based ELISA 분석법을 간단히 기술하면 다음과 같다. 왁스 프린팅 기반으로 만든 종이 센서의 반응 영역에 PBS 용액에 농도별로 희석한 항원(Pectinex)을 3µl 넣고 20분 정도 배양함. 배양 후 washing buffer로 씻어줌. 2% BSA가 포함되어 있는 Blocking buffer를 3µl씩 첨가하고 10분 반응시키고 washing buffer로 씻어줌. blocking buffer에 희석된 anti-ScPG를 3µl 첨가하고 10분 반응하고 washing buffer로 씻어줌. blocking buffer에 희석된 goat anti-rabbit HRP 항체는 3µl 첨가하여 다시 10분 반응하도록 두었다가 washing buffer로 씻어줌. 종이센서가 건조되면 3µl의 TMB substrate solution을 넣고 30분 기다림 (그림110). 이 모든 실험은 실험실 상온조건(22-25°C)에서 수행함.
- 종이 센서에서 효소 면역 흡착 분석법을 통해 얻어진 발색 반응을 분석하기 위해 일정한 광 조건이 유지되는 암상자에서 이미지를 획득함. 암상자의 윗부분에 디지털 카메라(SONY)를 설치하였고, 획득한 이미지는 영상 분석 소프트웨어인 Image J 프로그램을 이용해 RGB 색상 강도 값을 얻음. 얻어진 RGB 값은 엑셀을 이용해 Delta RGB 값 ( $\Delta RGB = \sqrt{(R_n - R_0)^2 + (G_n - G_0)^2 + (B_n - B_0)^2}$ )을 분석하였고, 발색 반응의 정도를 비교함.

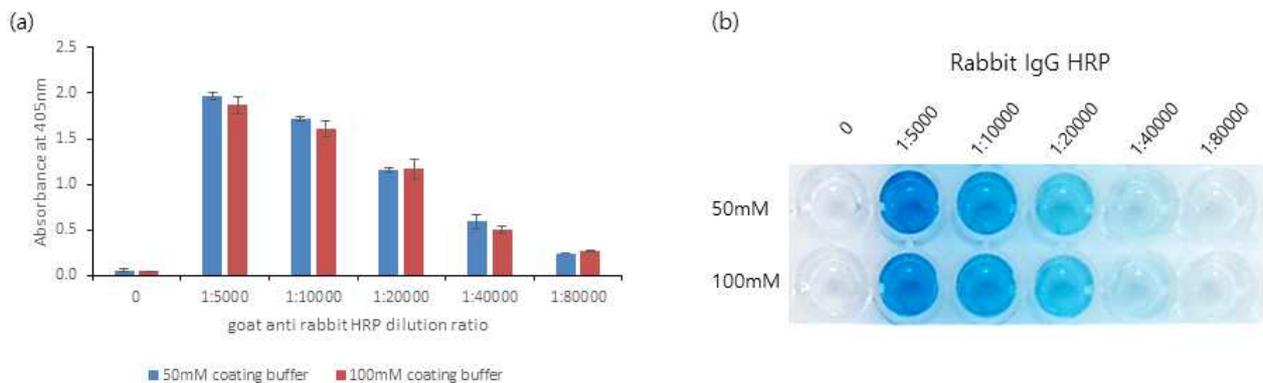


그림112. HRP가 접합된 goat anti rabbit IgG 항체의 희석비율 최적화. 50mM 또는 100mM carbonate buffer 에서 goat anti rabbit IgG 항체의 희석 비율에 따른 TMB 발색 흡광도(a)와 발색의 변화(b)

- 제공받은 anti-ScPG가 ELISA 분석법에 적용 가능한 항체인지 확인하기 위해 96웰 플레이트 기반의 ELISA 반응을 수행함. 먼저 HRP가 접합된 goat anti rabbit IgG 항체를 직접 96 웰 플레이트에 50mM or 100mM coating buffer를 이용하여 4°C, 16시간 이상 불침. blocking 후 TMB substrate를 첨가하여 발색의 정도를 확인함. carbonate buffer 농도에 따른 발색 반응의 차이는 없고 goat anti rabbit IgG 항체가 1:10000일 때가 최적의 희석비율임을 확인함(그림112).

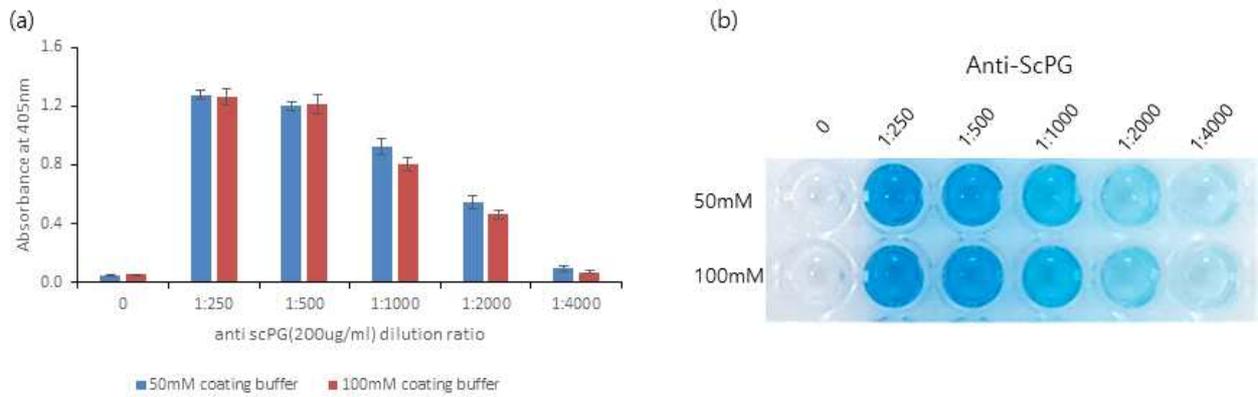


그림113. (a) Anti-ScPG와 HRP가 접합된 goat anti rabbit IgG 항체의 상호 반응의 희석비율 최적화. 50mM 또는 100mM carbonate buffer 에서 anti-ScPG 항체의 희석 비율에 따른 TMB 발색 흡광도(a)와 발색의 변화(b)

- Anti-ScPG와 goat anti rabbit IgG HRP의 상호 반응의 최적화 희석비율을 확인함. 이를 위해 96well 플레이트에 50mM or 100mM coating buffer를 이용하여 4°C, 16시간 이상 불침. blocking 후 goat anti rabbit IgG HRP를 1:10000 희석하여 상온에서 2시간 반응하고, TMB substrate를 첨가하여 발색의 정도를 확인함. 100mM보다 50mM carbonate buffer에서 반응의 효율이 좋고 anti-ScPG 항체가 1:500일 때가 최적의 희석비율임을 확인함(그림 113).

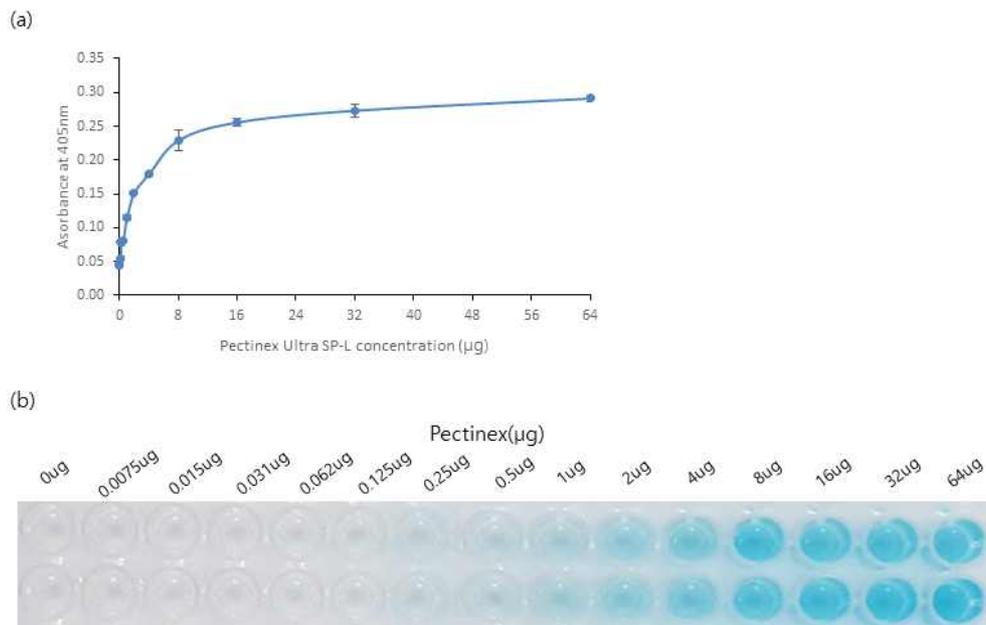


그림114. Anti-ScPG의 항원(Pectinex)에 대한 반응 최적화. 50mM carbonate buffer에서 다양한 농도의 항원과 anti-ScPG 항체의 반응에 따른 TMB 발색 흡광도(a)와 발색의 변화(b)

- 50mM carbonate buffer에 다양한 농도로 희석한 항원(Pectinex)을 96웰 플레이트에 4°C, 16시간 이상 불림. blocking 후 anti-ScPG는 1:500으로 goat anti rabbit IgG HRP는 1:10000 희석하여 상온에서 2시간 반응하고, TMB substrate를 첨가하여 발색의 정도를 확인함. 항원의 농도가 0.125 $\mu$ g에서 발색 반응이 나타나기 시작하고 8 $\mu$ g 보다 높은 농도에서는 반응의 포화가 일어남(그림114). Anti-ScPG를 이용한 ELISA 분석법에 의한 검출 가능한 항원의 농도는 0.125 $\mu$ g~8 $\mu$ g으로 통상적인 ELISA 분석법에 사용되는 항체의 민감도보다 민감도가 떨어짐을 알 수 있음. 그러나 제공받은 anti-ScPG가 western blotting 방법과 더불어 ELISA 분석법에도 적용 가능함을 확인함.
- Anti-ScPG가 96웰 플레이트 기반의 ELISA 분석법에 적용 가능함을 확인하고 종이 센서에 이를 적용함. 먼저 HRP가 접합된 goat anti rabbit IgG 항체를 PBS 용액에 희석하여 종이 센서 반응 영역에 3 $\mu$ l 넣고 20분 배양함. Blocking 후 TMB substrate를 첨가하여 30분 발색시킴. 발색 반응을 분석하기 위해 암상자에서 일정한 빛의 조건에서 이미지를 얻고 image J 소프트웨어를 통해 RGB값 얻음(그림115). Delta RGB 값 분석 결과 goat anti rabbit IgG HRP 항체가 1:5000일 때가 최적의 희석비율임을 확인함.
- Anti-ScPG 항체를 PBS 용액에 희석하여 종이 센서 반응 영역에 3 $\mu$ l 넣고 20분 배양함. blocking 후 씻어내고 1:5000으로 희석된 HRP가 접합된 goat anti rabbit IgG 항체를 3 $\mu$ l를 첨가하고 10분간 반응시킴. 반응 후 3 $\mu$ l TMB substrate를 첨가하여 30분 발색시킴. 발색 반응을 분석하기 위해 암상자에서 일정한 빛의 조건에서 이미지를 얻고 image J 소프트웨어를 통해 RGB값 얻음(그림116). Delta RGB 값 분석 결과 anti-ScPG 항체가 1:125일 때 최적의 희석 비율임을 확인함.

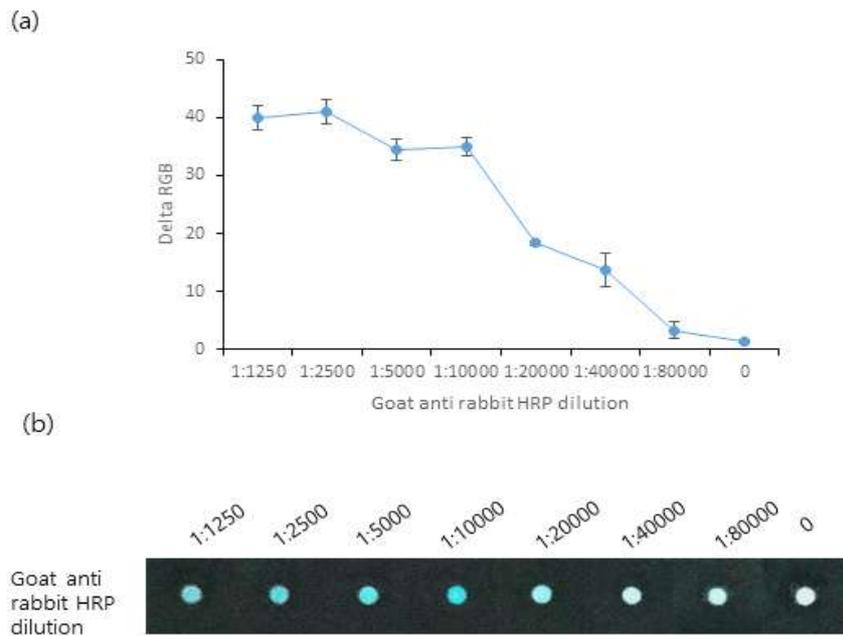


그림115. 종이 센서에서 HRP가 접합된 goat anti rabbit IgG 항체의 희석비율 최적화. Goat anti rabbit IgG 항체의 희석 비율에 따른 TMB 발색의 Delta RGB분석 값(a)과 종이 센서에서 발색의 변화(b)

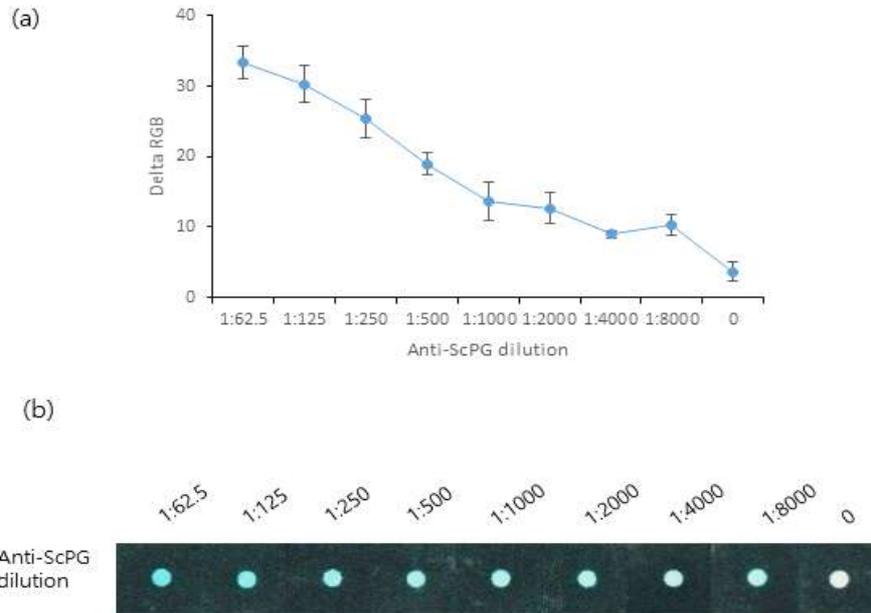


그림116. 종이 센서에서 anti-ScPG와 HRP가 접합된 goat anti rabbit IgG 항체의 상호 반응의 희석비율 최적화. Anti-ScPG 항체의 희석 비율에 따른 TMB 발색의 Delta RGB분석 값(a)과 종이 센서에서 발색의 변화(b)

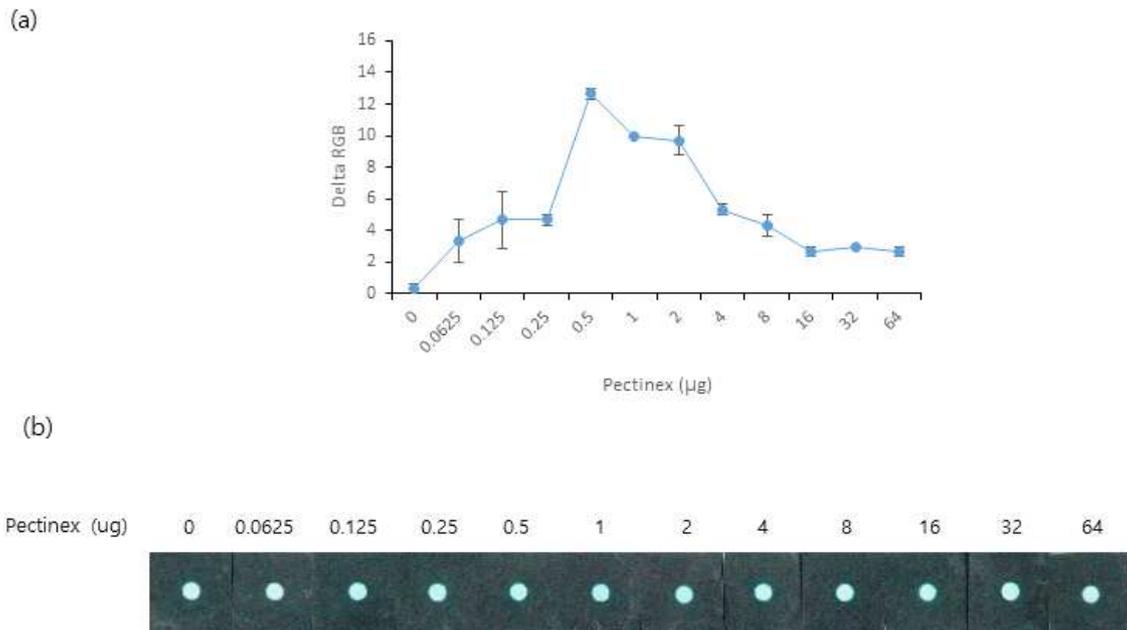


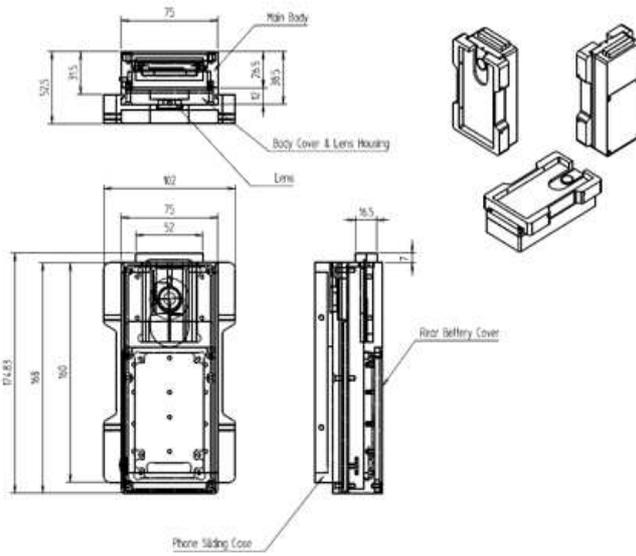
그림117. 종이 센서에서 anti-ScPG의 항원(Pectinex)에 대한 반응 최적화. 다양한 농도의 항원과 anti-ScPG 항체의 반응에 따른 TMB 발색의 Delta RGB분석 값(a)과 종이 센서에서 발색의 변화(b)

- PBS 용액에 다양한 농도로 희석한 항원을 종이 센서 반응 영역에 3 $\mu\text{l}$  넣고 20분 배양함. blocking 후 씻어내고 1:125로 희석한 anti-ScPG 항체와 1:5000으로 희석된 HRP가 접합된 goat anti rabbit IgG 항체를 3 $\mu\text{l}$ 를 순서대로 첨가하고 10분씩 반응함. 반응이 끝나면 TMB substrate를 첨가하여 30분 발색시킴. 발색 반응을 분석하기 위해 암상자에서 일정한 빛의

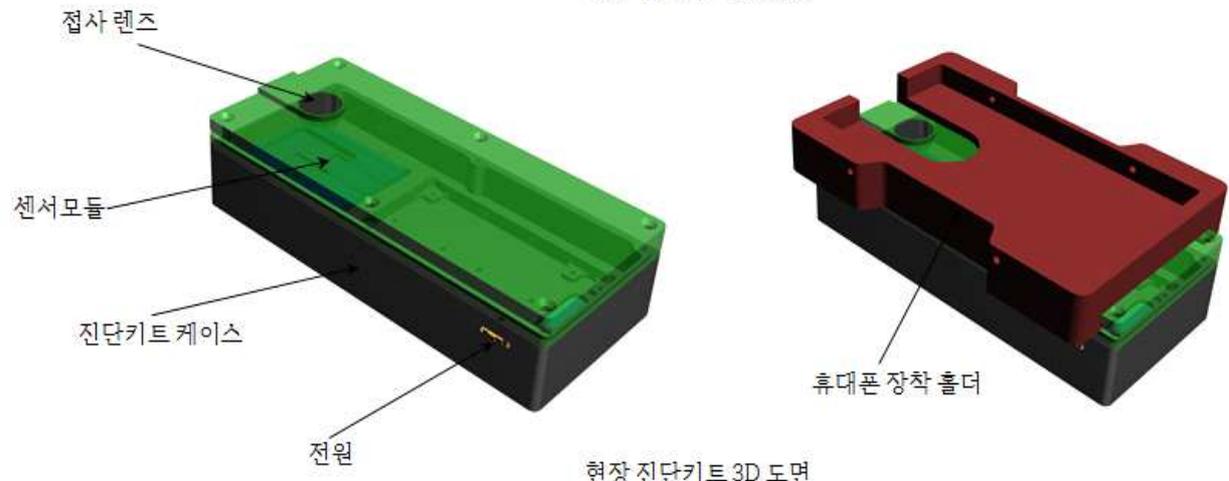
조건에서 이미지를 얻고 image J 소프트웨어를 통해 RGB값 얻음. Delta RGB 값 분석 결과 P-ELISA 분석법에 의한 측정 가능한 항원의 농도 범위는 0.5 $\mu$ g~2 $\mu$ g이며, 0.5 $\mu$ g농도에서 가장 높은 Delta RGB분석값을 얻음(그림117). 96웰 플레이트에서 수행하는 ELISA 분석법보다 P-sensor의 민감도와 측정범위는 낮으나 분석에 필요한 시간을 1시간 이내로 간소화시켰고, 소모되는 시약의 양도 많이 감소시킬 수 있음.

#### 마. 현장에서 환경장애 및 병해 진단을 위한 휴대용 진단키트의 설계 및 제작

- 위 연구결과를 바탕으로 현장에서 환경장애 및 병해를 실시간으로 모니터링하기 위한 진단키트를 설계 및 제작함. 제안된 진단키트는 2차 년도에 제안한 환경장애 키트를 기반으로 설계 및 제작되며 PCB와 접사렌즈가 집적화된 본체, 종이센서에 열을 가하기 위한 두 개의 세라믹 히터가 집적화된 센서모듈, 환경장애 및 병해를 진단할 수 있는 종이센서, 종이센서의 발색반응을 촬영 분석하기 위한 스마트폰으로 구성됨.
- 진단키트의 동작은 환경장애 및 병해를 진단하기 위한 종이센서가 센서모듈에 장착되어 있는 상태에서 센서의 샘플 로딩부에 샘플을 로드한 후 센서모듈을 본체에 슬라이딩 방식으로 삽입 했을 때 PCB기판 위에 있는 MCU(Micro Controller Unit)가 실시간으로 히터의 온도를 일정하게 유지하여 종이센서의 발색반응을 유도한 후 스마트폰을 사용하여 얻어지는 이미지의 발색정도 평가를 통해 가뭄의 정도를 나타냄.
- 진단키트를 구성하는 각각의 요소들의 설계 및 제작은 아래와 같음. 진단키트의 본체는 항상 일정한 밝기를 가지는 암실, 센서모듈에 집적화된 히터 및 온도 센서의 조절 및 전원 공급을 할 수 있는 PCB기판, 스마트폰에 장착된 카메라의 접사능력을 향상 시켜 본체의 두께를 슬립화하기 위한 접사렌즈로 구성됨. 그림118은 진단키트 본체의 2D, 3D 설계도를 나타냄. 진단키트 외장 케이스는 상판과 하판으로 구성되며 75mm(가로)×160mm(세로)×31.5mm(두께) 크기로 설계되며 그림119는 제작된 진단키트 외장 케이스 광학적인 이미지를 나타냄.
- 본체 외장 케이스 하판은 진단키트를 동작하는데 사용되는 소자들이 집적되어 있는 PCB기판과 종이센서를 일정한 밝기에서 사진을 찍을 수 있는 암실로 구성되어 있으며 상판은 암실에 밝기를 조절할 수 있는 LED와 접사모듈을 결합할 수 있는 25mm크기의 홀로 구성됨.
- 설계된 진단키트 외장 케이스는 정밀 가공기계를 사용하여 제작됨. 진단키트의 전체적인 동작을 관장하는 PCB기판은 MCU(Micro Controller Unit), 블루투스, LED, 휘스톤 브릿지 회로, 배터리, 센서모듈과 결합을 위한 핀 헤더소켓, 환경장애 진단을 위해 사용할 때만 동작할 수 있도록 on/off 스위치로 구성됨.
- MCU는 센서 모듈에 집적화된 온도센서를 통해서 실시간으로 온도를 측정하여 히터에 인가되는 전력의크기를 조절하며 종이센서의 발색반응을 촬영할 때 항상 일정한 밝기를 유지하기 위해 LED 밝기를 조절함. 센서모듈에 집적화된 온도센서의 온도 측정원리는 온도의 변화에



현장 진단키트 2D 도면



현장 진단키트 3D 도면

그림118. 현장진단키트 본체의 2D, 3D 설계도



그림119. 제작된 현장진단키트의 광학적인 이미지

따른 저항변화를 측정하여 온도를 예측할 수 있음. 또한 PCB 기판 위에는 휘스톤브릿지회로가 형성되어 온도센서의 저항변화를 실시간으로 감지하여 센서모듈 표면의 온도를 항상 일정하게 유지할 수 있도록 함. 가변저항은 휘스톤브릿지회로에서 출력되는 전압이 상온에서 제로 셋팅을 하는데 사용됨.

- 블루투스는 실험결과를 외부로 무선 송출 및 무선으로 MCU를 코딩할 때 사용되며 폴리머 배터리는 진단키트가 동작할 수 있도록 전원을 공급하는 역할을 함. 핀헤더 소켓은 핀과 결합하여 센서모듈에 전원공급을 하며 히터 가열 하는 온도정보를 읽는 역할을 함. 마지막으로 on/off 스위치는 진단키트를 사용할 때만 전원을 공급하는 역할을 함.
- PCB에 장착되는 구성부품들이 동작범위에서 작동할 수 있도록 PCB내부에 회로를 artwork을 통해서 설계함. 진단키트의 두께를 줄이면서 스마트폰의 접사력을 향상시키기 위해 접사렌즈 모듈은 진단키트 본체의 상판에 완벽하게 접합됨. 또한, 스마트폰 카메라 렌즈와 접사렌즈의 마찰에 의해 발생할 수 있는 렌즈 표면의 스크래치를 줄이기 위해 접사렌즈와 카메라 렌즈 사이에 일정한 간격을 유지하기 위한 구조물을 형성함.
- 센서모듈부는 본체 내부의 암실 유지 및 종이센서를 항상 평평하게 유지하기 위한 케이스, 히터와 온도센서가 집적화 된 센서모듈, 히터에 전원을 공급하기 위해 센서모듈에 장착된 탈부착이 쉬운 핀으로 구성됨. 센서모듈부의 조립은 케이스 하판에 센서모듈이 삽입되고 그 위에 종이센서가 놓여진 다음 케이스의 상판을 하판과 결합하면 완료됨.
- 센서모듈 케이스는 종이센서를 평평하게 유지하기 위해 모듈 위에 종이센서가 위치했을 때 케이스 상판이 종이센서를 누르는 구조로 되어 있음. 케이스의 손잡이를 센서모듈 보다 두껍게 설계하여 진단키트 본체에서 센서모듈부가 삽입 되는 부분을 통해 빛이 암실로 투과되는 것을 방지하는 역할을 함.
- 센서모듈부가 정밀하게 본체와 결합하기 위해 케이스 하판에 날개구조물을 형성함. 히터와 온도센서가 집적화된 센서모듈은 소형화시키기 위해 반도체공정을 사용하여 제작됨. 센서모듈에 집적화된 히터는 두 개로 구성되어 줄히팅 방식으로 가열되며 각각의 히터 크기는 15mm(가로)×20mm(세로)로 제작됨.



그림120. 스마트폰이 장착된 진단키트의 이미지

- 그림120은 스마트폰이 장착된 현장 진단키트의 이미지를 나타냄.
- 제작된 현장 진단키트 및 종이센서를 사용하여 다양한 농도를 가진 프롤린에 대해서 정량적인 분석 실험을 진행함. 그림121은 종이센서에 로드한 프롤린 샘플의 농도에 따른 green color intensity의 변화를 보여줌. 진단키트에 종이센서를 장착해서 실험한 결과 프롤린을 최소 25 $\mu$ M까지 검출할 수 있음을 확인함.
- 현장에서 성장한 양파에 가뭄, 냉해, 저온 스트레스를 준 다음 얻은 샘플을 갈아서 가뭄, 냉해, 저온이 양파에 미치는 영향을 프롤린 분석을 통해서 확인하였으며 양파에 스트레스 처리 조건은 앞에서

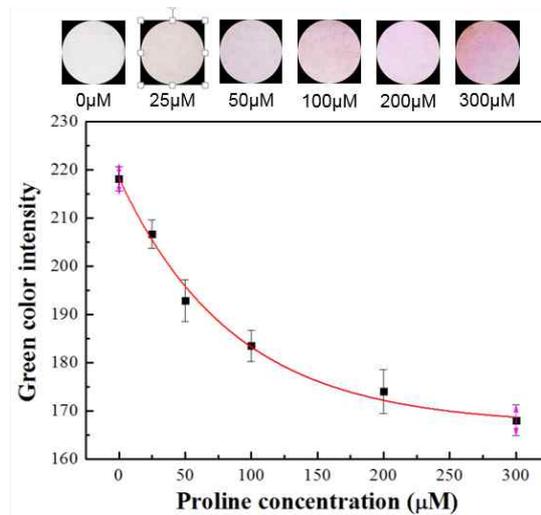


그림121. 종이센서에 로드한 프롤린 샘플의 농도에 따른 green color intensity 의 변화 나타낸 조건과 같음.

- 현장진단키트를 사용하여 실험한 결과 양파가 냉해, 저온, 건조 스트레스에 영향을 받았을 경우 양파 내에서 프롤린량이 증가하는 것을 알 수 있었으며 제작된 종이기반 센서를 사용하여 정밀하게 실제 샘플에서 프롤린을 검출 할 수 있음을 확인함. 다양한 환경에서 냉해 스트레스의 경우 양파의 4번째 잎의 중단부와 5번째 잎의 상단부에서 프롤린이 검출, 저온 스트레스의 경우 양파의 4번째 잎의 중단부에서 검출, 건조 스트레스의 경우 양파의 5번째 잎의 상단부에서 프롤린이 검출되는 것을 알았으며 제안된 종이센서를 사용하여 현장에서 환경장애 진단 할 수 있음을 확인함. 제안된 휴대용 진단기는 작물의 환경장애 및 병해에 의한 피해를 줄이는 처방용 진단기로 노지의 양파·마늘에 적용시 생산량 향상 및 생산비의 절감으로 농가의 소득에 기여할 수 있을 것으로 기대됨
- 본 연구에서는 실험을 통해서 현장진단키트를 사용하여 환경장애 진단 할 수 있음을 확인 하였으며 현장진단키트 사용방법은 매뉴얼로 제작함.

## 바. 스마트폰을 사용한 환경장애 진단을 위한 종이센서의 색상 강도 분석 application 제작 (위탁1 케이스)

- 가뭄 스트레스 및 병해 진단용 종이센서의 발색 정도를 정량화하기 위해서 색상에 대해서 표준화 할 수 있는 리더기가 필요하며 본 연구에서는 스마트폰을 사용하여 색상을 정량적으로 분석하여 작물의 질병/가뭄을 진단할 수 있는 app을 설계 및 제작함. 2차 년도에는 오직 양파·마늘의 가뭄 스트레스를 정도를 분석하기 위한 가뭄 진단용 app을 개발 하였으며 이를 바탕으로 3차 년도에는 작물의 가뭄 스트레스 및 병해를 동시에 진단이 가능한 app을 개발함. 개발된 app은 2차 년도에 개발된 app을 개선하여 사용자가 편하게 쓸 수 있도록 UI 구성을 편하게 하였으며 색상 분석을 좀 더 정밀하기 위해서 RGB분석을 최적화 함. 2차 년도와 마찬가지로 app을 제작하기 위해 사용된 프로그램은 web inventor 이며 이를 사용하여 사용자가 편하게 가뭄 및 병해를 진단할 수 있도록 user interface(UI) 및 색상의 정도를 분석하기 위한 app을 제작함.



그림122. 작물의 질병/가뭄을 진단하기 위한 app의 이미지

- 제작된 app은 메뉴는 크게 기존의 측정된 자료들이 저장되어 있는 자료보기, 채취한 샘플을 분석하기 위한 검사시작, 측정하고자 샘플의 정보(작물이 무엇인지?, 가뭄 진단인지?, 병해 진단인지?)를 입력하는 설정(set up), app을 종료하기 위한 종료(exit)로 구성됨. 그림122은 작물의 질병/가뭄을 진단하기 위한 app의 이미지를 보여줌.
- 채취한 샘플을 분석하는 검사시작은 샘플의 가뭄 및 병해를 진단하는 위치를 나타내는 진단 위치, 샘플의 생화학적인 반응을 위한 일정한 온도를 유지하기 위한 히터가열, 종이센서의 이미지를 촬영하기 위한 사진 캡처, 색상의 정도를 파악하기 위한 사진 분석, 분석한 결과를 저장하기 위한 결과 저장, 외부로 결과를 전송하기 위한 Transfer로 구성됨. 제작된 app을 사용하여 가뭄 및 병해를 검출하기 위해 사용된 종이센서의 측정된 결과를 촬영, 분석, 결과의 전

송과정을 실험적으로 진행함. 그림123은 제작된 app을 사용하여 가뭄 및 병해진단을 위하여 종이센서의 색상의 정도를 분석하는 과정을 나타냄.

- 2차 년도에 제작한 프로그램과는 다르게 3차 년도에는 작물의 가뭄 및 질병을 진단하는 위치를 GPS 뿐만 아니라 수동으로 입력할 수 있게 함. 현재 스마트에 적용되고 있는 GPS는 정밀하지 못하여 가까운 거리에서 2가지 샘플을 분석할 경우 2가지 샘플의 위치를 정밀하게 표시하지 못하는 단점을 가지고 있으므로 이를 보완하기 위해 수동으로 샘플의 진단위치를 정확하게 명기할 수 있게 함. 또한, 다양한 작물을 측정할 것을 대비해서 각각의 작물의 정보를 입력하여 작물에 적합한 가뭄 및 병해를 분석을 할 수 있는 기능을 추가함.



그림123. 제작된 app을 사용하여 가뭄 및 병해진단을 위하여 종이센서의 색상의 정도를 분석하는 과정

- 제작된 app을 통해서 프롤린 및 PG의 양에 따라 변화는 색상의 정도를 RGB(RED Green Blue) 분석을 통해서 나타낼 수 있으며 또한, 측정된 위치도 GPS방식 및 수동 입력을 통해서 위치를 화면에 표시할 수 있음. 이렇게 측정된 결과는 날짜에 따라 스마트폰에 저장할 수 있으며 또한 이메일을 통해서 외부에서 실내에 있는 데이터베이스 및 클라우드 서버에 다양한 통신방법을 통해 결과를 전송할 수 있음. 본 연구에서는 가뭄 및 병해 진단을 위하여 발색의 정도를 분석할 수 있는 app을 제작하였으며 이 app을 현장에서 사용할 수 있게 매뉴얼을 제작함.

## ■ 제2세부과제 연구내용 및 결과

### (1) 1차년도 연구내용 및 결과

#### 가. 가뭄 및 저온에 대한 최종 산물인 프롤린의 기능

- 식물체 내 가뭄과 저온스트레스의 수분 항상성 기작은 매우 유사하며 (그림124), 특히 프롤린은 보습효과가 뛰어난 삼투조절물질로서 가뭄 및 저온 등 작물 환경스트레스에 대해 농작

물이 생장하는데 있어서 매우 중요한 물질이다. 또한, 프롤린은 단백질 합성뿐만 아니라, 광합성 효율, 개화시기 및 배유 발달에 아주 중요한 신호 분자로 최근 알려지고 있다 (그림 125). 프롤린 생합성 혹은 분해 관련 유전자 및 중간 조절인자의 동정, 스트레스 조건하에서의 프롤린 수송, 프롤린 대사 네트워크 연구 등이 진행되어진다면 환경장해 맞춤형 수용체 개발로 파속작물의 현장진단 키트 최적화 기술을 강화할 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 가뭄 및 저온에 대한 최종 산물로서 프롤린은 불량환경에 대한 바이오 마커로서, 양파·마늘 진단 키트 제작에 성공 가능성이 매우 높음.

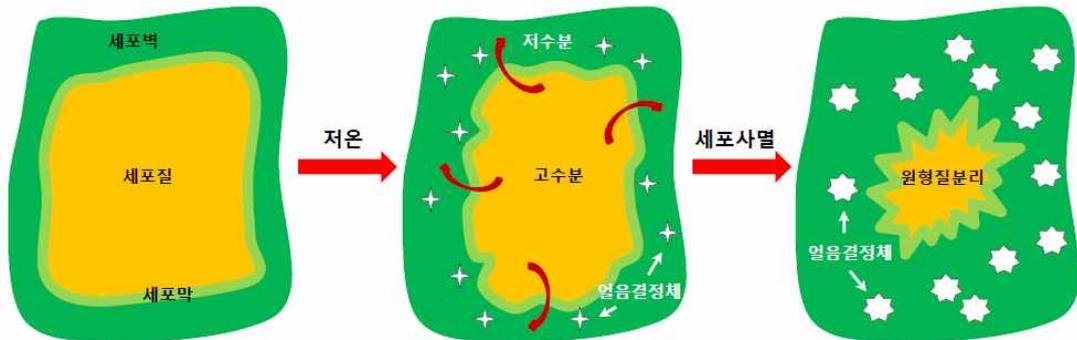


그림124. 가뭄과 저온스트레스 연관 관계도. 저온스트레스 기작은 식물체 내 가뭄스트레스 기작과 매우 유사함.

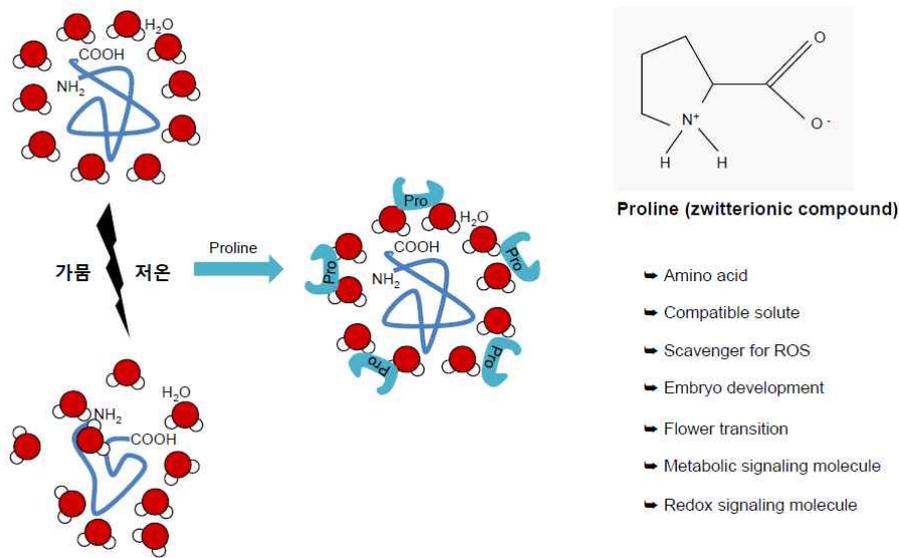


그림125. 가뭄·저온 환경장해에 대한 식물체 내 프롤린의 기능 모식도

#### 나. 가뭄 처리 기간별 토양 수분량 분석

○ 가뭄 처리 기간별, 토양 내 수분량을 측정한 결과, 가뭄 처리 5일 및 10일 후, 토양 수분은 각각 50% 및 70%까지 손실하였으며, 가뭄 처리 20일 정도에는 90% 손실율을 보였음. 또한 30일 이후에는 거의 수분 손실율이 98% 까지 도달하였음 (그림126).

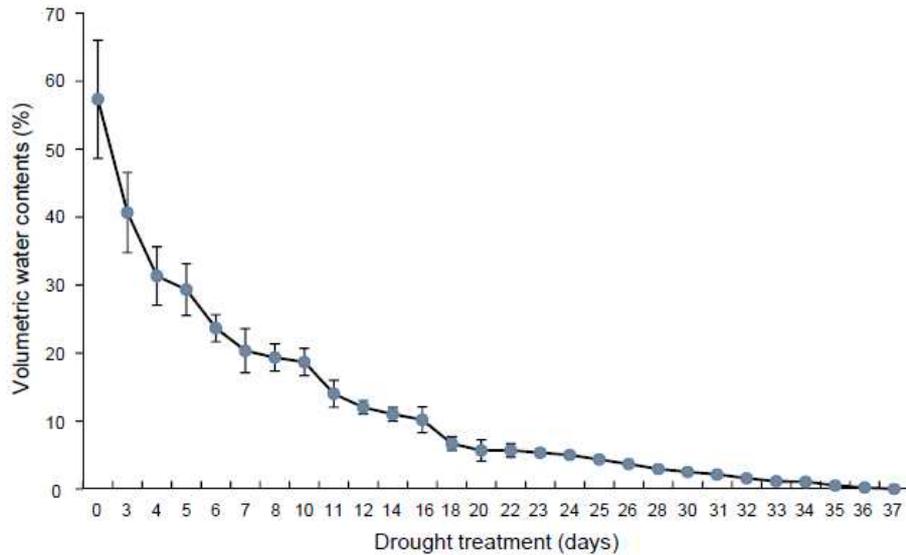


그림126. 가뭄 처리 기간별 토양 수분 손실을 분석. 가뭄 처리 0 ~37일까지 측정한 결과 가뭄 처리 5일 만에 토양 수분 손실율이 50%에 도달하였음.

#### 다. 가뭄 처리 후, 양파 품종별 생리적 표현형 분석

○ 가뭄 처리 후, 양파 품종별 생리적 표현형을 분석하기 위하여, 양파 조생종, 중생종 및 만생종 샘플을 이용하였음. 가뭄 처리 25일 후, 모든 양파 품종이 정상조건하에서보다 잎 생장이 이루어지지 않았으며, 특히 조생종과 만생종 잎 끝부분에서 황화현상이 진행되었음. 또한, 정상조건 35일 이후에서는 잎 성장과 발달이 이루어진 반면, 가뭄 처리 35일 및 53일 건조 조건하에서는 전혀 잎 성장과 발달이 이루어지지 않았음을 알 수 있었고, 가뭄 처리 35일 후, 모든 양파 품종의 잎들이 심한 갈색화 현상이 나타났음 (그림127).

#### 라. 양파로부터 건조스트레스 유도 유전자의 전사 발현 분석

○ 정상조건하에서 키운 양파와 10일간 가뭄 처리된 양파로부터 total RNA를 추출한 후, RT-PCR 및 quantitative real-time PCR (qPCR)을 통해, 가뭄스트레스 유도 유전자 마커인 RD29A 및 RAB18 유전자의 전사 발현량을 분석하였음 (그림128). 그림 128A에서 나타났듯이, 건조스트레스 하에서 RD29A 및 RAB18 유전자의 전사 발현은 정상조건 보다 유도 증가됨을 알 수 있었으며, RD29A 유전자의 전사 발현량은 정상조건에 비하여 약 14배, RAB18 유전자는 5배 정도 증가함을 알 수 있었음 (그림128B).

#### 마. 양파 품종별 건조스트레스 처리 후, 양파 부위별 프롤린 분석

○ 양파 품종별 가뭄 처리 후, 세포 내 프롤린 함량을 분석하기 위하여, 양파 조생종, 중생종 및 만생종 샘플을 이용하였음. 또한 가뭄에 의한 양파 잎 부위별 프롤린 집적량을 측정하기 위하여, 각 양파 품종별 상단부, 중단부 및 하단부로 구분하여 분석하였음. 단, 가뭄 처리 25일 후, 이미 상단부는 갈색화 현상을 보여 잎 마쇄가 어려워 프롤린 함량 측정이 불가능하였기

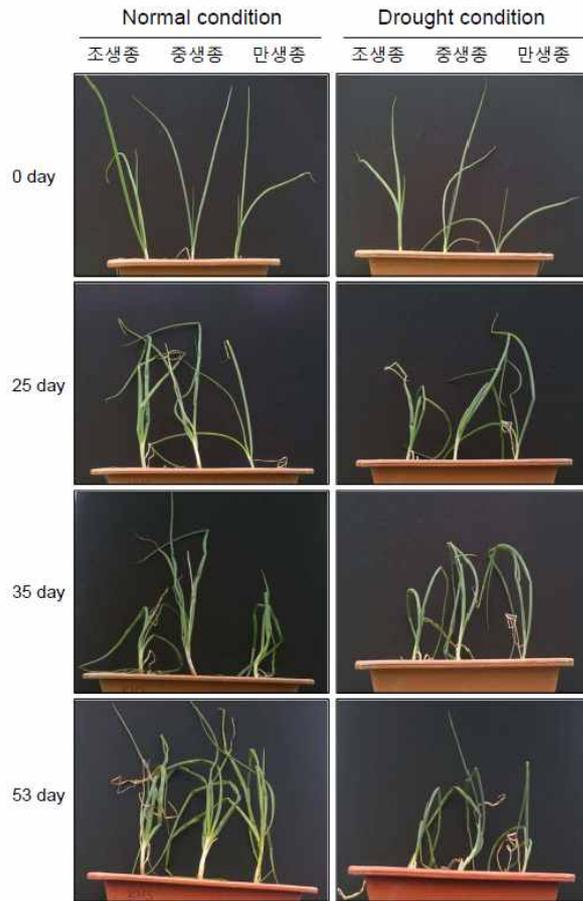


그림127. 가뭄 처리 후, 양파 품종별 생리적 표현형 분석. 양파 조생종, 중생종 및 만생종 품종을 이용하여, 가뭄 처리 0 ~ 53일간, 생리적 표현형을 분석하였음. 가뭄 처리 25일 후, 모든 양파 품종이 정상조건하에서보다 잎 생장이 이루어지지 않았으며, 특히 조생종과 만생종 잎 끝부분에서 황화현상이 진행되었음.

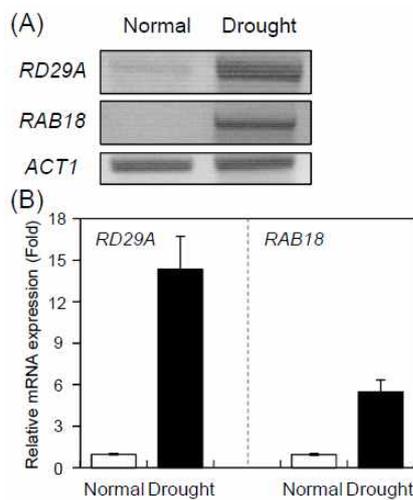


그림128. 건조스트레스 유도 유전자의 전사 발현 분석. 정상조건하에서 키운 양파와 10일간 가뭄 처리된 양파로부터 total RNA를 추출한 후, RT-PCR (A) 및 qPCR (B)을 통해, 가뭄스트레스 유도 유전자 마커인 *RD29A* 및 *RAB18* 유전자의 전사 발현량을 분석하였음.

때문에, 중단부와 하단부로 구분하여 각 샘플로부터 프롤린 함량을 측정된 결과, 조생종과 중생종은 잎 중단부의 프롤린 함량이 하단부보다 높았으며, 가뭄 처리 기간에 따라 프롤린 함량이 높았음. 반면에 만생종은 조생종과 중생종에 비해 프롤린 함량이 적었으며, 특히 하단부는 프롤린 함량이 극히 적음을 알 수 있었음 (그림129).



그림129. 가뭄 처리 후, 양파 품종별 및 잎 부위별 프롤린 함량 분석. 양파 조생종, 중생종 및 만생종 품종을 이용하여, 가뭄 처리 0 ~ 53일간, 프롤린 함량을 분석하였음. 조생종과 중생종은 잎 중단부의 프롤린 함량이 하단부보다 높았으며, 가뭄 처리 기간에 따라 프롤린 함량이 높았음. 반면에 만생종은 조생종과 중생종에 비해 프롤린 함량이 적었음.

○ 다음은 정상조건 및 가뭄조건하에서의 양파 품종별 각 샘플로부터 프롤린 함량을 정량한 그래프임 (그림130-132).

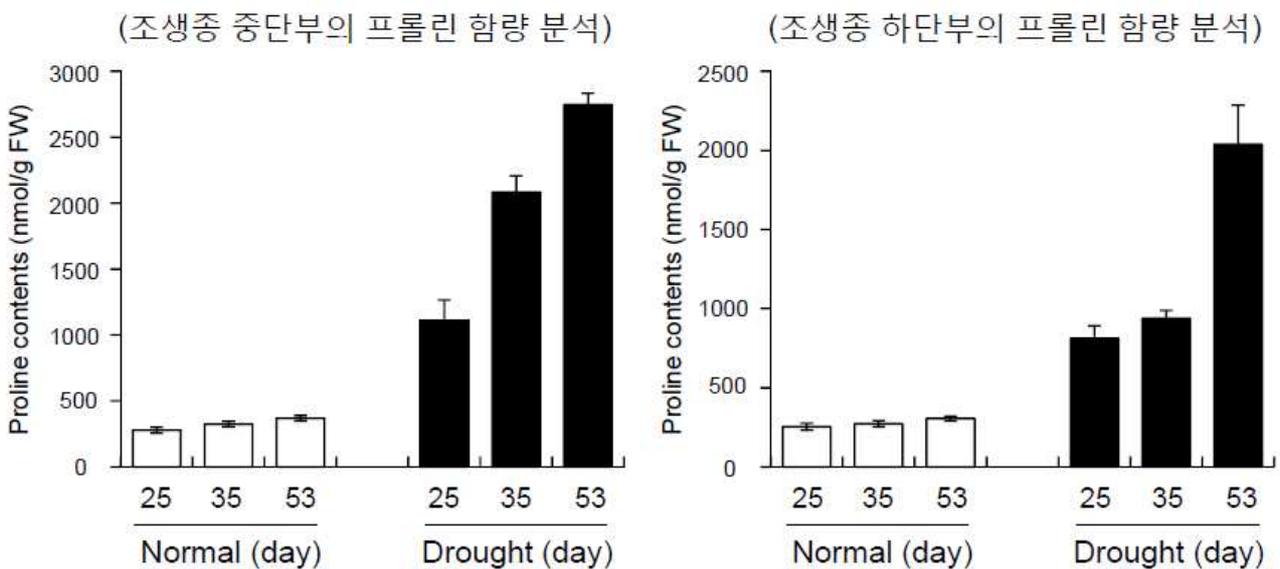


그림130. 가뭄 처리 후, 양파 품종별 및 잎 부위별 프롤린 함량 분석. 양파 조생종 품종을 이용하여, 정상조건 및 가뭄 처리 0 ~ 53일간, 잎 부위별 프롤린 함량을 정량 분석하였음.

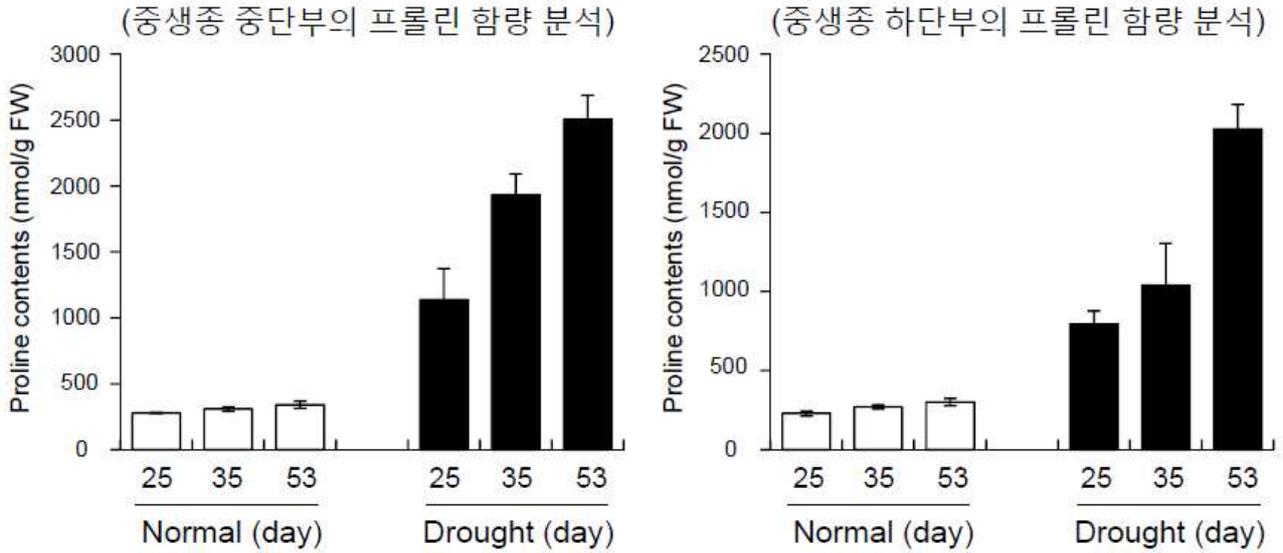


그림131. 가뭄 처리 후, 양파 품종별 및 잎 부위별 프롤린 함량 분석. 양파 중생종 품종을 이용하여, 정상조건 및 가뭄 처리 0 ~ 53일간, 잎 부위별 프롤린 함량을 정량 분석하였음.

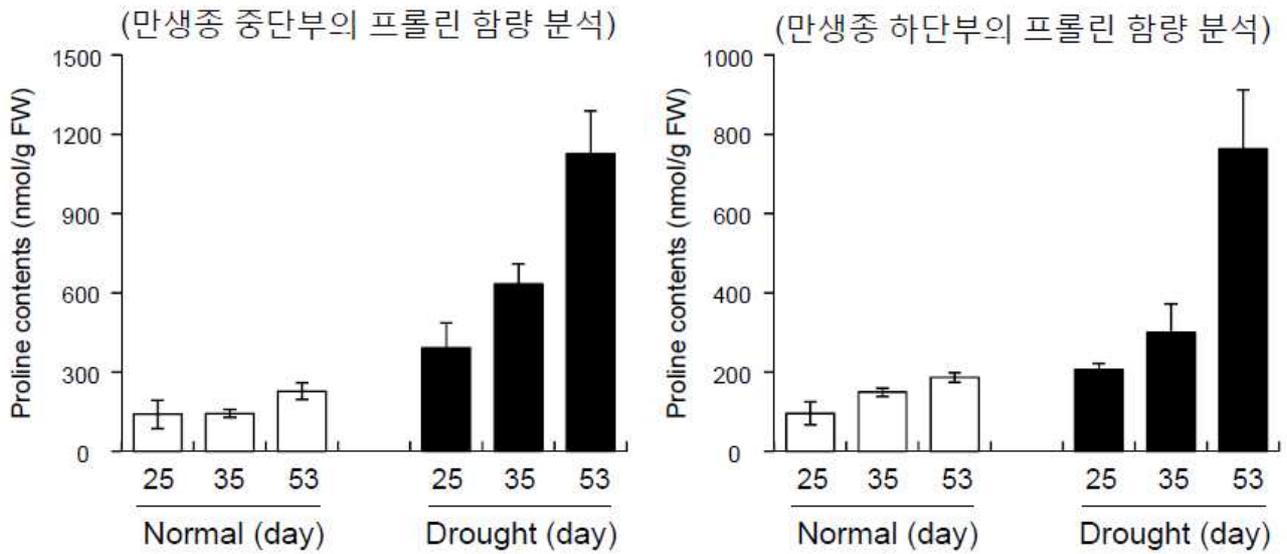


그림132. 가뭄 처리 후, 양파 품종별 및 잎 부위별 프롤린 함량 분석. 양파 만생종 품종을 이용하여, 정상조건 및 가뭄 처리 0 ~ 53일간, 잎 부위별 프롤린 함량을 정량 분석하였음.

#### 바. 마늘로부터 시간별 건조스트레스 처리 후, 마늘의 생리적 표현형 및 프롤린 함량 분석

○ 마늘의 유식물체 (25-day-old seedling)로부터 시간별 건조스트레스 처리 후, 프롤린 함량을 분석하였음. 시간별 4, 8, 및 24 시간 건조 처리한 결과, 무처리 대조구 보다 각각 약 5, 7, 및 9배 정도 프롤린 함량이 높아짐을 알 수 있었음 (그림133).

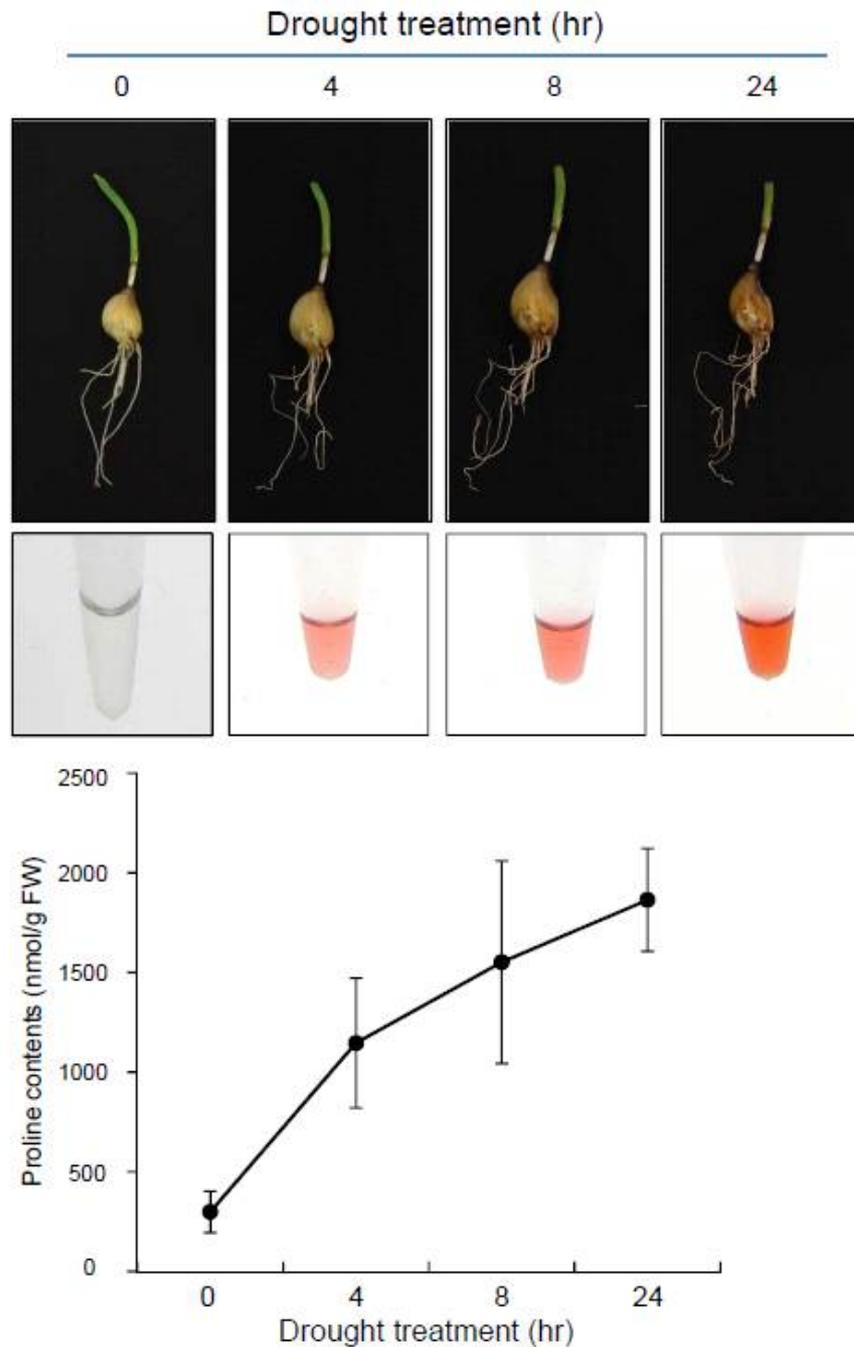


그림133. 시간별 가뭄 처리 후, 마늘 유식물체의 프롤린 함량 분석. 시간별 4, 8, 및 24 시간 건조 처리 후, 마늘 유식물체의 생리적 표현형, 프롤린 함량의 정성적 및 정량적 분석.

#### 사. 식물체 내 새로운 건조 수용체 개발

○ 식물체 내 새로운 건조스트레스 수용체를 개발하기 위하여, 최근 가뭄 관련 애기장대 돌연변이체를 이용, PAP pathway를 분석한 결과, PAP phosphatase가 건조 관련 수용체로 사용할 수 있음을 알 수 있었음 (그림134).

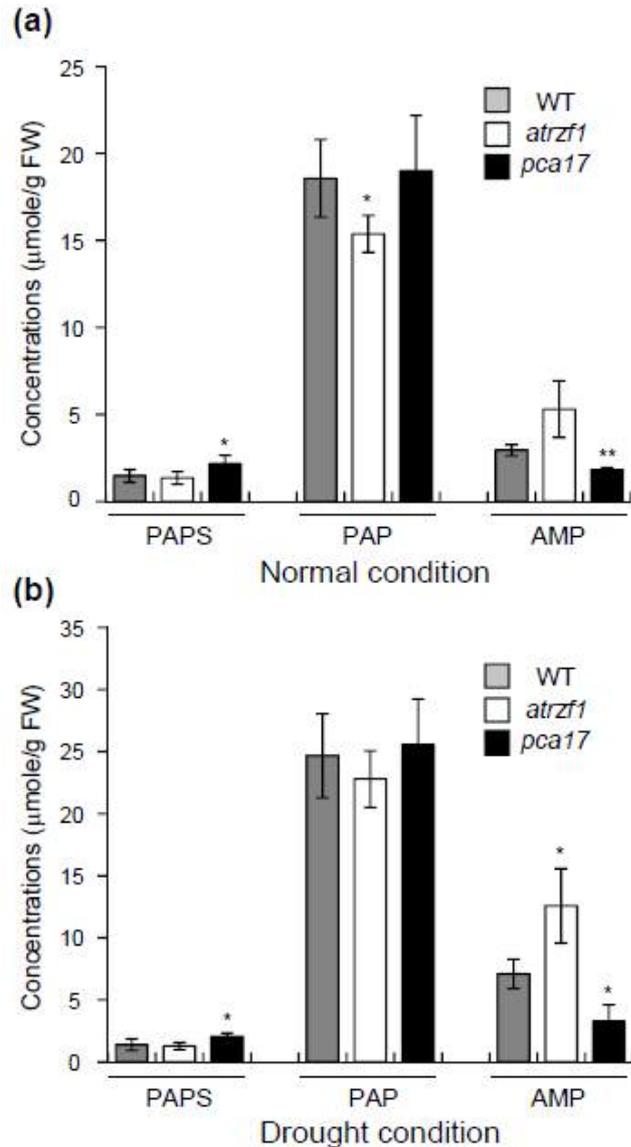


그림134. 가뭄 관련 애기장대 돌연변이체를 이용한 PAP pathway 산물의 정량적 분석.

## (2) 2차년도 연구내용 및 결과

### 가. 가뭄 처리 후, 마늘 작물의 생리적 표현형 분석

○ 가뭄 처리 후, 마늘 작물의 생리적 표현형을 분석하기 위하여, 난지형 마늘 샘플을 이용하였음. 가뭄 처리 20일 이후, 가뭄 처리 된 모든 마늘 작물 (각 판넬의 오른쪽) (그림135B-E)이 정상조건하 (각 판넬의 왼쪽) (그림135B-E)에서보다 잎 성장과 생육이 이루어지지 않았으며, 특히 잎 끝부분에서 황화현상이 진행되었고, 24일 이후에는 잎 벤딩 (구부러짐) 현상이 일어났음 (그림135C-E). 또한, 정상조건 24일 이후에서는 잎 성장과 발달이 이루어진 반면, 가뭄 처리 27일 및 36일 건조 조건하에서는 전혀 잎 성장과 발달이 이루어지지 않았음을 알 수 있었고, 가뭄 처리 36일 후, 마늘 작물의 잎들이 심한 갈색화 현상이 나타났음 (그림135).

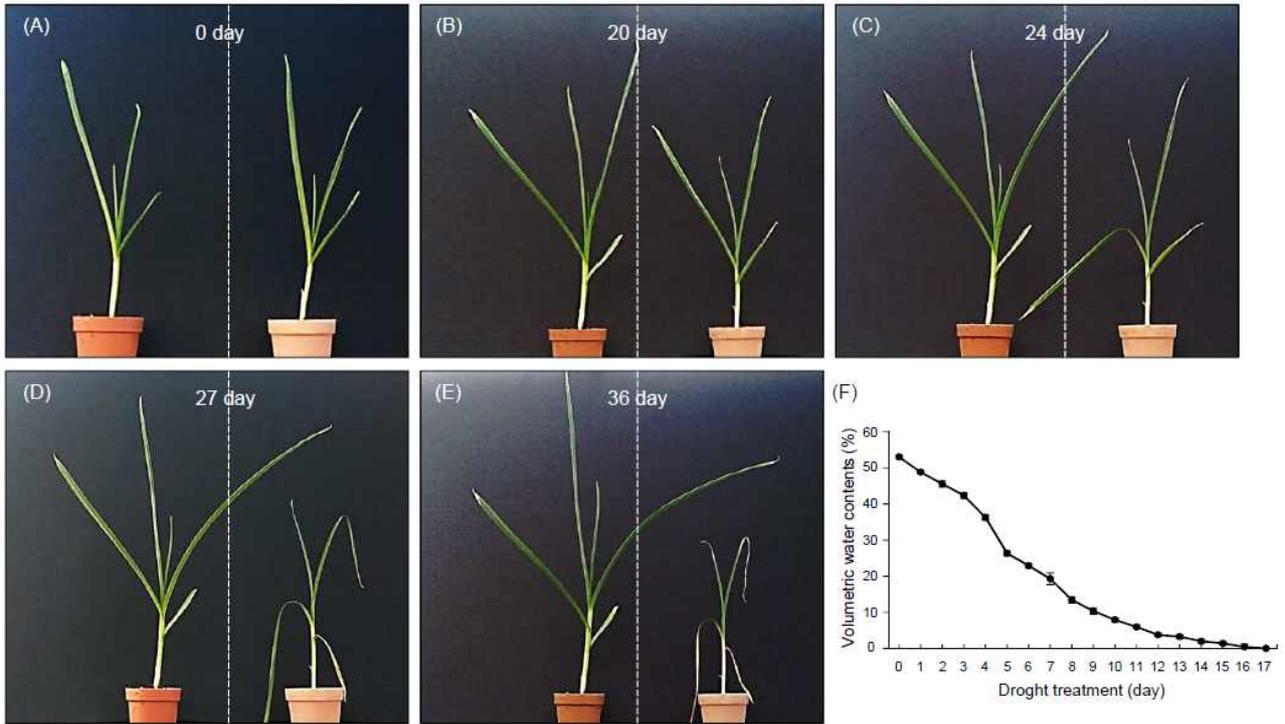


그림135. 가뭄 처리 후, 마늘 작물의 생리적 표현형 분석. 난지형 마늘 작물을 이용하여, 가뭄 처리 0 ~ 36일간 (A-E), 생리적 표현형을 분석하였음. 가뭄 처리 24일 이후, 마늘 작물이 정상조건하에서보다 잎 성장과 생육이 이루어지지 않았으며, 특히 27일 이후에는 잎 끝부분에서 황화현상이 진행되었음. (F) 가뭄 처리 기간별 토양 수분 손실을 분석. 가뭄 처리 0 ~17일까지 측정된 결과 가뭄 처리 5일 만에 토양 수분 손실율이 50%에 도달하였음.

#### 나. 가뭄 처리 기간별 토양 수분량 분석

○ 가뭄 처리 기간별, 토양 내 수분량을 측정된 결과, 가뭄 처리 5일 및 8일 후, 토양 수분은 각각 50% 및 70%까지 손실하였으며, 가뭄 처리 12일 정도에는 90% 손실율을 보였음. 또한 16일 이후에는 거의 수분 손실율이 98% 까지 도달하였음 (그림135F).

#### 다. 마늘 작물로부터 건조스트레스 처리 후, 마늘 구근의 생리적 표현형 분석

마늘의 유식물체 (20-day-old seedling)로부터 날짜별 건조스트레스 처리 후, 마늘 구근의 생리적 표현형 크기와 무게를 분석하였음. 건조 처리 36일 후, 무처리 대조구 보다 마늘 구근 크기가 상대적으로 더 작음을 알 수 있었고, 뿌리 성장과 발달이 제어됨을 알 수 있었음 (그림136A). 건조 처리 18일과 36일 후 구근의 무게는 무처리 대조구 보다 각각 약 30% 및 45% 정도 감소함을 알 수 있었음 (그림136B). 이러한 결과들로 미루어보아, 마늘 구근의 성장과 발달은 가뭄스트레스에 큰 영향을 받는다는 것을 알 수 있었으며, 또한 마늘 생산 손실율이 크게 작용됨을 예상할 수 있었음.

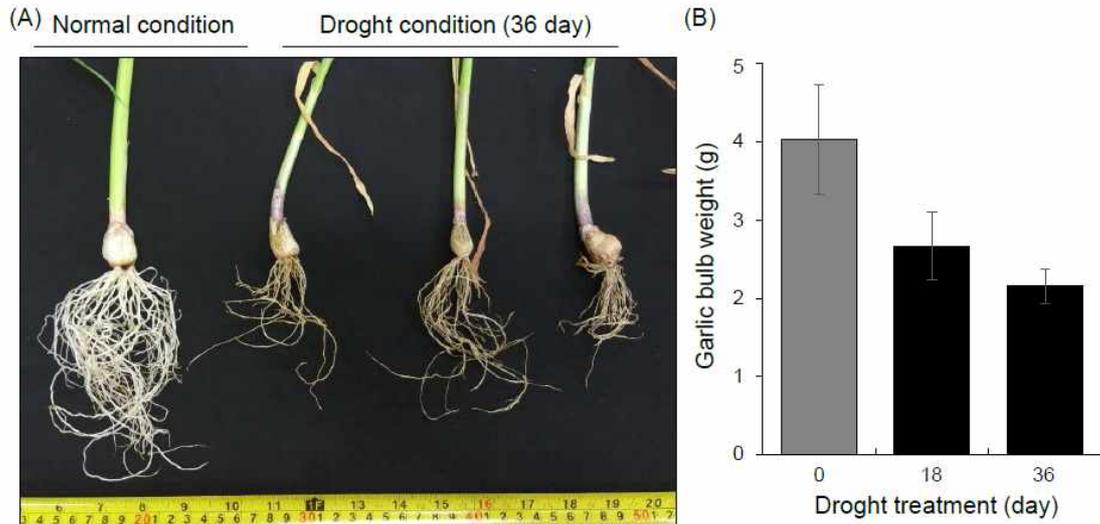


그림136. 가뭄 처리 후, 마늘 구근의 생리적 표현형 분석. (A) 건조 처리 36일 후, 마늘 유식물체 구근의 생리적 표현형 분석 (B) 건조 처리 18일 및 36일 후, 마늘 유식물체 구근의 무게 비교 분석

#### 라. 건조스트레스 처리 후, 마늘 작물의 측정 부위별 프롤린 함량 분석

○ 기간별 (20일 ~ 36일) 가뭄 처리 후, 마늘 작물의 세포 내 프롤린 함량을 분석하기 위하여, 난지형 마늘 샘플을 이용하였음. 또한 가뭄에 의한 마늘 작물의 측정 부위별 프롤린 집적량을 측정하기 위하여, 마늘 작물의 3번째 잎 상단부, 중단부 및 하단부로 구분하여 분석하였음. 단, 가뭄 처리 24일 이후, 마늘 작물의 잎 상단부는 갈색화 혹은 황색화 현상을 보여 잎 마쇄가 어려워 프롤린 함량 측정이 불가능하였기 때문에, 중단부와 하단부로 구분하여 각 샘플로부터 프롤린 함량을 측정하였음. 마늘 작물의 잎 중단부의 프롤린 함량이 하단부보다 상대적으로 낮았으며, 가뭄 처리 기간에 따라 프롤린 함량이 낮았음 (그림137). 이러한 결과는 가뭄스트레스에 대해 마늘 작물의 잎 하단부가 중단부 보다 더욱 민감함을 알 수 있었음.

#### 마. 양파 품종별 저온스트레스 처리 후, 양파 측정 부위별 프롤린 분석

○ 저온 (영상 섭씨 4도) 처리 후, 양파 품종별 생리적 표현형을 분석하기 위하여, 양파 조생종, 중생종 및 만생종 샘플을 이용하였음. 저온 처리 28일 후, 모든 양파 품종이 정상조건하에서 보다 잎 생장이 이루어지지 않았으며, 조생종, 중생종, 만생종 세 품종 모두 잎 끝부분에서 황화현상과 잎 마름현상이 진행되었음 (그림138). 양파 품종별 저온 (영상 섭씨 4도) 처리 후, 세포 내 프롤린 함량을 분석하기 위하여, 양파 조생종, 중생종 및 만생종 샘플을 이용하였음. 또한 저온에 의한 양파 잎 부위별 프롤린 집적량을 측정하기 위하여, 각 양파 품종별 상단부, 중단부 및 하단부로 구분하여 분석하였음. 단, 저온 처리 28일 후, 이미 상단부는 갈색화 현상을 보여 잎 마쇄가 어려워 프롤린 함량 측정이 불가능하였기 때문에, 중단부와 하단부로 구분하여 각 샘플로부터 프롤린 함량을 측정한 결과, 저온 처리 기간에 조생종, 중생

종 및 만생종은 잎 중단부의 프롤린 함량이 하단부보다 높았음. 반면에 조생종과 만생종은 중생종에 비해 프롤린 함량이 적었으며, 조생종과 만생종은 서로 프롤린 함량이 유사함을 알 수 있었음 (그림138). 이러한 결과들은 저온스트레스와 건조스트레스가 파속작물에 있어서 유사한 기작으로 생리적 표현형을 유도함을 알 수 있었음.

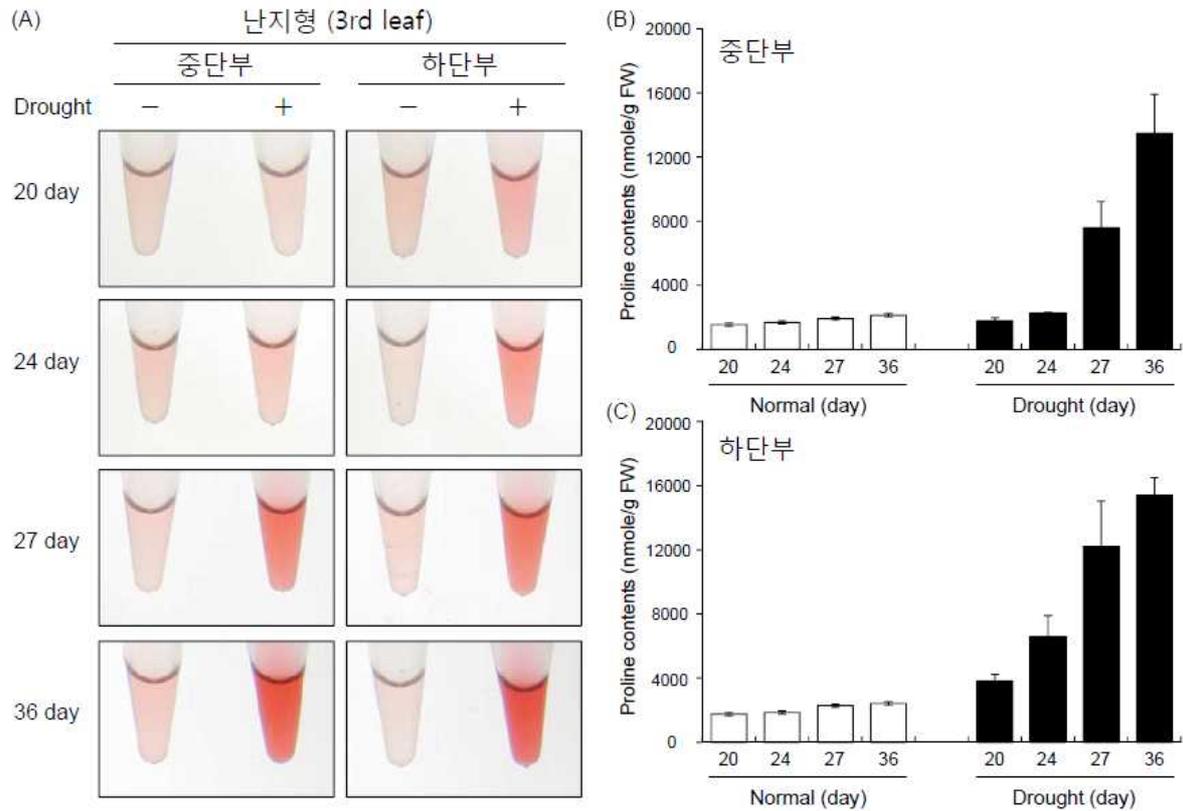


그림137. 가뭄 처리 후, 마늘 작물의 잎 부위별 프롤린 함량 분석. (A) 난지형 마늘 작물의 3번째 잎을 이용하여, 가뭄 처리 20 ~ 36일간, 프롤린 함량을 분석하였음. (B, C) 잎 하단부의 프롤린 함량이 중단부보다 높았으며, 가뭄 처리 기간에 따라 프롤린 함량이 높았음.

#### 바. 병해스트레스 처리 후, 양파의 생리적 표현형 및 프롤린 함량 분석

○ 가뭄과 저온 센싱 프롤린 수용체가 병해 스트레스에 대해서도 인지 기작이 있는지를 조사하기 위하여, 노균병에 감염된 초기 및 중기 양파 샘플로부터, 프롤린 함량의 변화를 측정하였음 (그림139). 측정된 결과, 병해 정도에 따라 프롤린 함량의 식물 세포 내 축적량도 변화함을 알 수 있었음. 이러한 결과는 가뭄과 저온 센싱 프롤린 수용체가 파속작물의 병해 스트레스에 대해서도 인지함을 알 수 있었음.

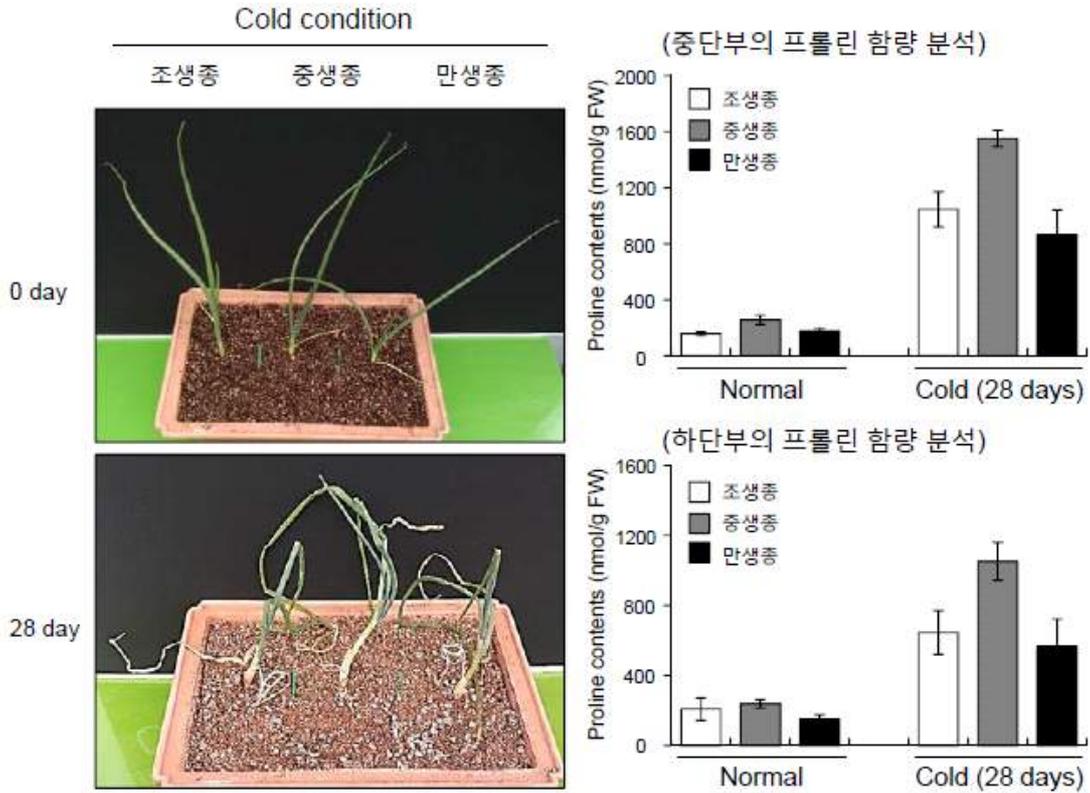


그림138. 저온 처리 후, 양파 품종별 생리적 표현형 분석. 양파 조생종, 중생종 및 만생종 품종을 이용하여, 가뭄 처리 28일 후, 생리적 표현형을 분석하였음. 저온 처리 28일 후, 모든 양파 품종이 정상조건하에서보다 잎 생장이 이루어지지 않았으며, 조생종, 중생종, 만생종 잎 끝부분에서 황화현상 및 마름현상이 진행되었음. 저온 처리 후, 양파 품종별 및 잎 부위별 프롤린 함량 분석. 양파 조생종, 중생종 및 만생종 품종을 이용하여, 저온 처리 28일 후, 프롤린 함량을 분석하였음. 조생종, 중생종 및 만생종은 잎 중단부의 프롤린 함량이 하단부보다 높았음. 반면에 조생종과 만생종은 중생종에 비해 프롤린 함량이 적었으며, 조생종과 만생종은 서로 프롤린 함량이 유사함.



그림139. 노균병에 감염된 초기 및 중기 양파 샘플로부터, 프롤린 함량 분석. 노균병에 의한 병해 정도에 따라 식물 세포 내 프롤린 축적량도 변화함을 알 수 있었음.

### 사. 식물체 내 새로운 건조 센싱 수용체 시스테인 개발

○ 식물체 내 새로운 건조스트레스 수용체를 개발하기 위하여, 가뭄 관련 저항성 애기장대 돌연변이체 (*atrzf1*)와 민감성 돌연변이체 (*pca17*)를 이용, PAP pathway 및 황 대사 작용을 분석한 결과, 시스테인 (Cys)이 건조 관련 수용체로 사용할 수 있음을 알 수 있었음 (그림40).

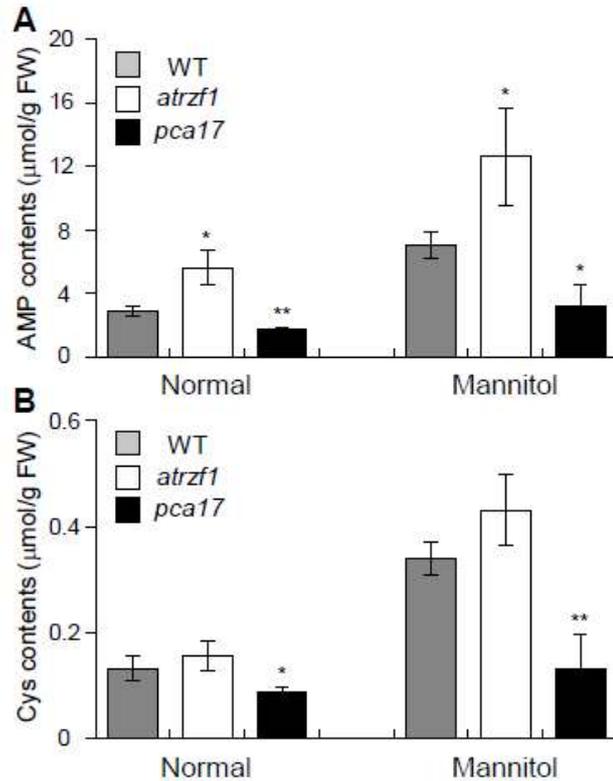


그림140. 가뭄 관련 애기장대 돌연변이체 *atrzf1*과 *pca17*을 이용한 PAP pathway 및 황 대사 작용 산물의 정량적 분석.

### 아. 건조 센싱 수용체 시스테인 관련 황 대사 작용 유전자들의 발현 분석

○ 가뭄 저항성 애기장대 돌연변이체 (*atrzf1*)와 민감성 돌연변이체 (*pca17*)를 이용하여 건조 센싱 수용체 시스테인 개발 관련 황 대사 작용 유전자들의 전사 발현을 분석한 결과, 황 2차 대사 작용과 밀접한 APK2 및 SOT12 유전자의 전사 발현이 가뭄 저항성 애기장대 돌연변이체 (*atrzf1*)에서 민감성 돌연변이체 (*pca17*)보다 발현량이 현저히 적게 발현되었으며, 황 1차 대사산물인 시스테인 관련 SiR 및 OASA1 유전자는 *atrzf1* 돌연변이체가 *pca17* 보다 전사 발현량이 높음을 알 수 있었음 (그림141). 이러한 PAP pathway 및 황 대사 작용 관련 유전자의 전사 발현을 분석한 결과, 시스테인 (Cys)이 건조 관련 수용체로 사용할 수 있음을 보여준 결과임 (그림141).

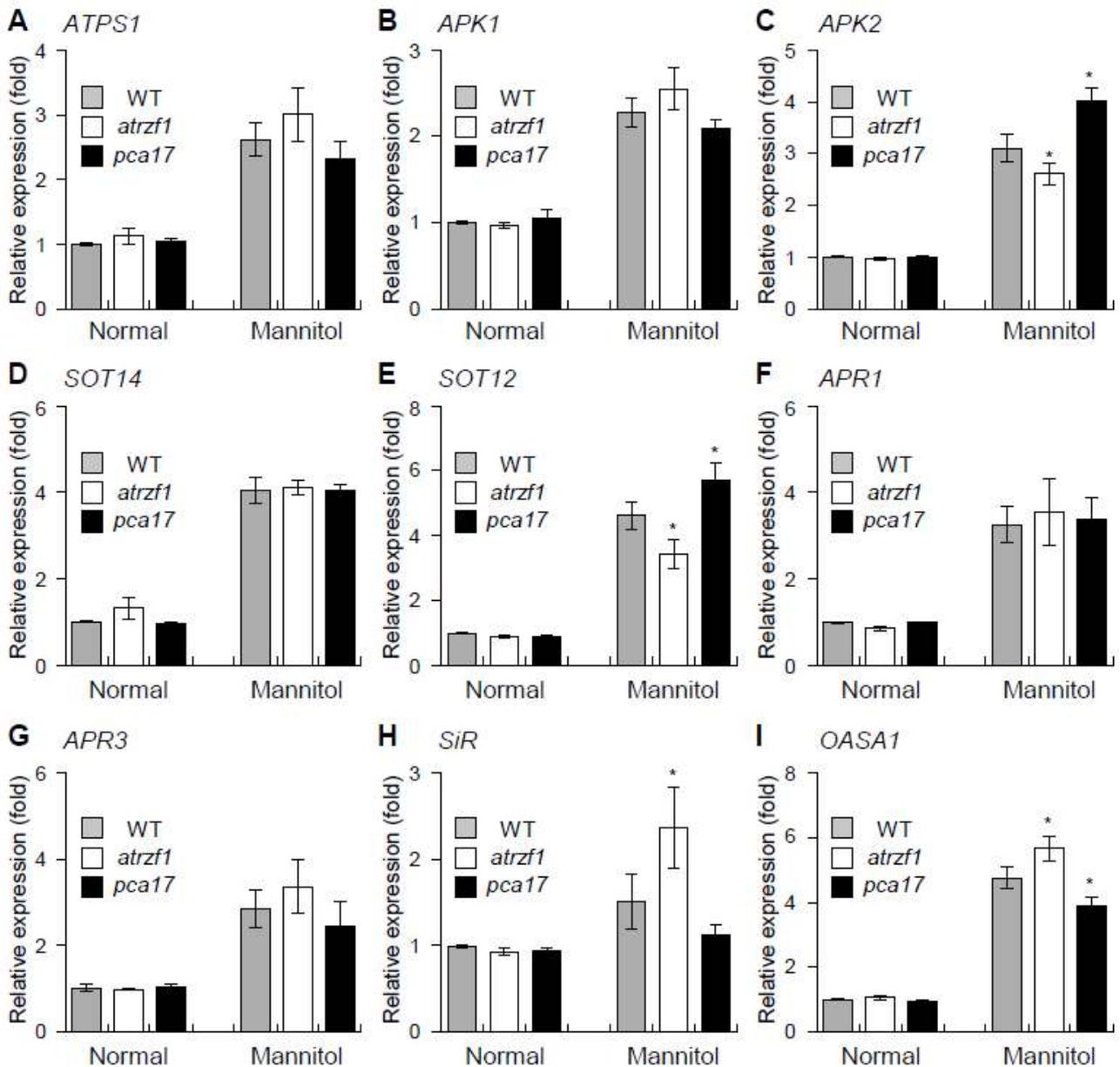


그림141. 가뭄 관련 애기장대 돌연변이체 *atrzf1*과 *pca17*를 이용한 PAP pathway 및 황 대사 작용 산물유전자들의 전사 발현량 분석.

### (3) 3차년도 연구내용 및 결과

#### 가. 냉해스트레스 (영하 섭씨 2도)에 대한 양파·마늘의 생리적 표현형 분석

- 2018년 겨울철 1월 중순, 전남대학교 양파 및 마늘 포장으로부터 냉해스트레스를 받은 양파·마늘 구근 및 잎의 생리적 표현형을 조사하였다. 대부분의 양파들은 3~4 개의 잎만 가지고 있었으며, 거의 모든 잎에 시들음 현상을 초래한 것을 알 수 있었음 (그림142). 또한 구근의 발달은 거의 이루어지지 않았음 (그림142 및 그림143).



그림142. 겨울철 4일 동안 지속된 냉해스트레스 (영하 섭씨 2도) 조건하에 자란 양파의 생리적 표현형 분석. 잎 생장이 이루어지지 않았으며, 잎 끝부분에서 황화현상 및 마름현상이 진행되었음. 또한 구근의 성장도 거의 이루어지지 않았음.

- 냉해스트레스 (영하 섭씨 2도) 조건하에 자란 양파·마늘의 유식물체로부터 구근의 무게를 분석하였음. 구근 크기가 정상에서 자란 구근 (2차년도 연구내용의 그림 2)보다 더 작음을 알 수 있었고, 구근 성장과 발달이 제어됨을 알 수 있었음 (그림142). 이러한 결과들로 미루어보아, 양파·마늘 구근의 성장과 발달은 냉해스트레스에 큰 영향을 받는다는 것을 알 수 있었으며, 또한 양파·마늘 생산의 손실율이 크게 작용됨을 예상 할 수 있었음.

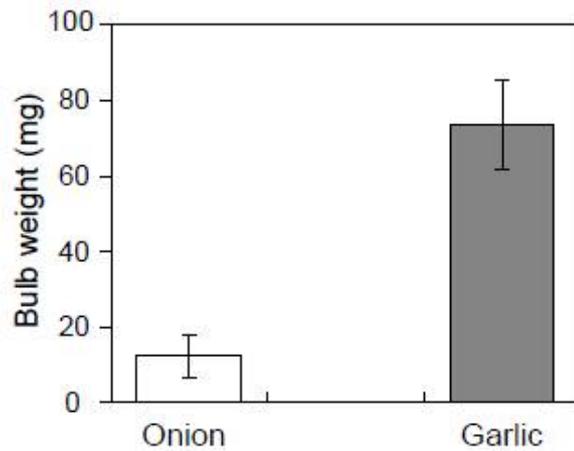


그림143. 겨울철 4일 동안 지속된 냉해스트레스 (영하 섭씨 2도) 조건하에 자란 양파·마늘 구근의 무게 비교 분석

- 마늘 작물들은 5~6 잎 정도로 발달되었으며, 새롭게 출현된 잎을 제외한 거의 모든 잎에 시들음 현상을 초래한 것을 알 수 있었음 (그림144). 구근의 발달도 거의 이루어지지 않았음 (그림143 및 그림144).



그림144. 겨울철 4일 동안 지속된 냉해스트레스 (영하 섭씨 2도) 조건하에 자란 마늘의 생리적 표현형 분석. 잎 생장이 이루어지지 않았으며, 잎 끝부분에서 황화현상 및 마름현상이 진행되었음. 또한 구근의 성장도 거의 이루어지지 않았음.

#### 나. 냉해스트레스 (영하 섭씨 2도)에 대한 양파·마늘 잎 측정부위별 프롤린 함량 비교 분석

○ 겨울철 1월 중순~2월 초, 무안 양파재배지 평균기온이 영상 섭씨 1도~영하 3도임에 따라, 냉해스트레스 조건을 영하 섭씨2도에서 자란 양파·마늘의 잎 상단부와 하단부 부위별 프롤린 함량을 비교 분석하였음. 양파·마늘의 잎 생장이 이루어지지 않았으며, 작물 거의 모두 잎 끝부분에서 황화현상과 잎 마름현상이 진행되었음 (그림142 및 그림144). 냉해스트레스를 받은 양파·마늘의 세포 내 프롤린 함량을 분석하기 위하여, 양파의 3번째 잎 상단부 및 하단부, 마늘의 4번째 잎 상단부 및 하단부로 구분하여 분석하였음. 상단부와 하단부로 구분하여 각 샘플로부터 프롤린 함량을 측정한 결과, 잎 상단부의 프롤린 함량이 하단부보다 높았음을 알 수 있었음 (그림144). 이러한 결과들은 냉해스트레스와 건조스트레스가 파속작물에 있어서 유사한 기작으로 생리적 표현형을 유도함을 알 수 있었음.

#### 다. 가뭄 센싱 수용체 시스테인 및 AMP 탐침 분석

○ 식물체 내 새로운 건조스트레스 수용체를 개발하기 위하여, 모델식물을 이용한 2차 년도 연구 결과, PAP pathway의 AMP 및 황 대사산물의 시스테인 (Cys)이 건조 관련 수용체로 사용할 수 있음을 알 수 있었음 (2차년도 연구결과, 그림 6). 따라서, 35일간 건조스트레스를 처리 한 양파·마늘의 잎 중단부로부터 시스테인 함량을 분석하였음. 그림145A에서와 같이, 가뭄스트레스가 처리된 양파와 마늘 잎 중단부 샘플의 시스테인 함량은 정상 샘플보다 약 2배 혹은 2.5 배 증가함을 알 수 있었고, 이는 파속작물에서 시스테인 (Cys)이 건조 관련 수용체로 사용할 수 있음을 확인할 수 있었음. 또한, 35일간 건조스트레스를 처리 한 양파 잎의 중단부로부터 HPLC에 의한 AMP 축적량을 분석한 결과, 건조스트레스에 의해 AMP 함량도 증가함을 알 수 있었음 (그림145B).

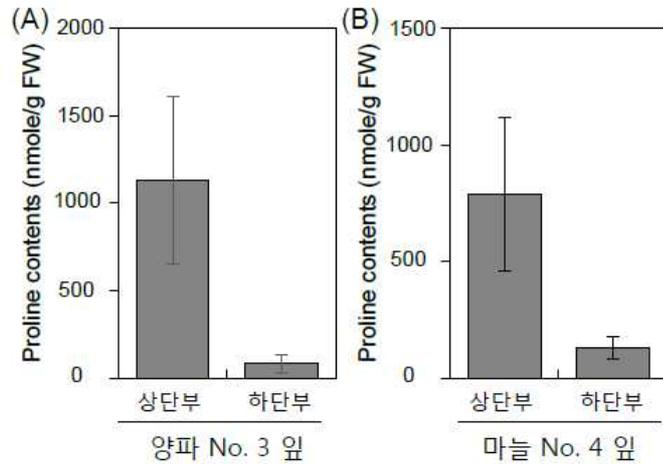


그림144. 냉해스트레스를 받은 양파·마늘의 세포 내 프롤린 함량 비교 분석. 겨울철 4일 동안 지속된 냉해스트레스 (영하 섭씨 2도) 조건하에 자란 양파·마늘의 잎 상단부와 하단부 부위별 프롤린 함량을 분석한 결과, 잎 상단부의 프롤린 함량이 하단부보다 높았음. 양파와 마늘의 잎 부위별 프롤린 함량이 서로 유사함을 알 수 있었음.

#### 다. 가뭄 센싱 수용체 시스테인 및 AMP 탐침 분석

○ 식물체 내 새로운 건조스트레스 수용체를 개발하기 위하여, 모델식물을 이용한 2차 년도 연구 결과, PAP pathway의 AMP 및 황 대사산물의 시스테인 (Cys)이 건조 관련 수용체로 사용할 수 있음을 알 수 있었음 (2차년도 연구결과, 그림 6). 따라서, 35일간 건조스트레스를 처리 한 양파·마늘의 잎 중단부로부터 시스테인 함량을 분석하였음. 그림 5A에서와 같이, 가뭄스트레스가 처리된 양파와 마늘 잎 중단부 샘플의 시스테인 함량은 정상 샘플보다 약 2배 혹은 2.5 배 증가함을 알 수 있었고, 이는 파속작물에서 시스테인 (Cys)이 건조 관련 수용체로 사용할 수 있음을 확인할 수 있었음. 또한, 35일간 건조스트레스를 처리 한 양파 잎의 중단부로부터 HPLC에 의한 AMP 축적량을 분석한 결과, 건조스트레스에 의해 AMP 함량도 증가함을 알 수 있었음 (그림 5B).

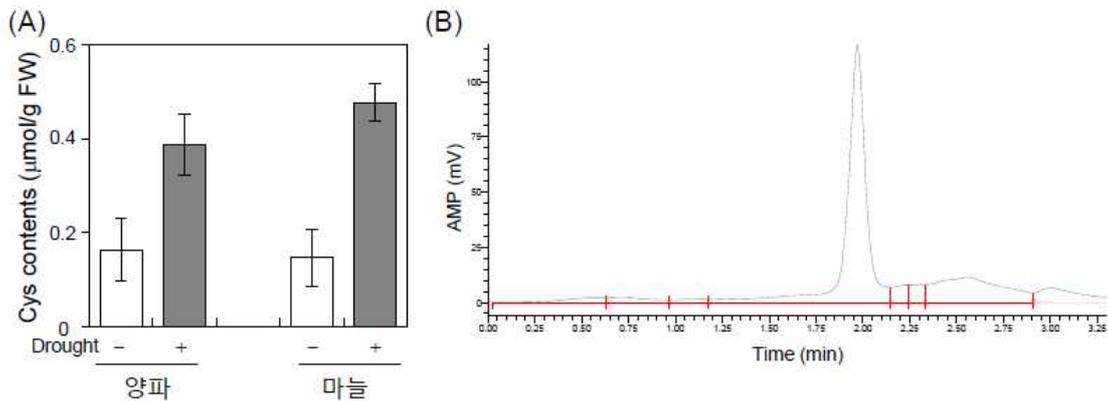


그림145. 가뭄스트레스 처리 후, 양파·마늘의 잎 중단부로부터 시스테인 (Cys) 및 건조 처리 된 양파로부터 AMP 산물의 정량적 분석.

**라. 시스테인 수용체에 대한 환경장해 진단 최적화 및 스트레스 내성 유도제를 위한 생물체의 독성 실험 구축**

○ 건조스트레스에 대한 시스테인을 진단 수용체 및 스트레스 내성 유도제로 이용하기 위하여, 우선 동물 세포의 독성 실험을 구축하였음. 동물세포의 생존율을 조사한 결과, 10 mM 시스테인 농도 처리는 대조구 (control)와 positive control LPS (lipopolysaccharide) 처리에 비해 생존율이 현저히 낮아짐에 따라 10 mM 시스테인 농도는 동물세포에 독성이 유도됨을 알 수 있었음 (그림146).

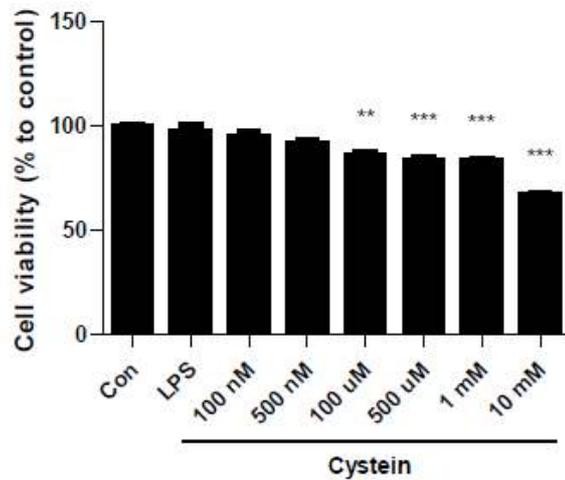


그림146. 시스테인 농도에 따른 동물세포의 생존율 비교 분석

또한, 동물세포에 대한 면역성 유도를 분석하기 위하여, 여러 농도의 시스테인을 처리 후, pro-inflammatory cytokines 성분 중의 하나인 IL-6와 TNF-alpha 함량을 측정된 결과, 10 mM 시스테인 농도를 제외한 대부분의 시스테인 처리는 대조구와 LPS 처리에 비해 pro-inflammatory cytokines 성분이 높아짐을 알 수 있었음 (그림147). 이러한 결과는 시스테인이 동물세포에 염증 유도를 촉진시키는 물질임을 알 수 있었음.

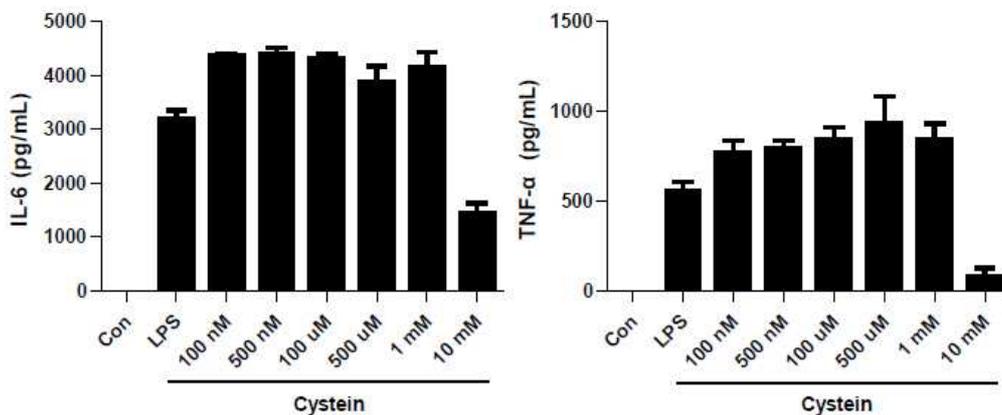


그림147. 시스테인 농도에 따른 동물세포의 pro-inflammatory cytokines IL-6와 TNF-alpha 함량 분석

○ 모델식물인 애기장대와 고추 작물에 각 100 mM 농도와 50 mM 농도의 시스테인을 스프레이한 결과, 식물체 잎의 마름 현상 혹은 괴사 반응을 유도함을 알 수 있었음 (그림148). 이러한 결과들로부터, 높은 농도의 시스테인 처리는 식물체의 괴사를 유도함을 알 수 있었음.



그림148. 높은 농도의 시스테인 처리 후, 식물체의 괴사 반응 (화살표) 유도 분석

#### 마. 파속작물의 현장적용 진단 실험 분석 및 환경장해 진단 키트에 대한 성능 분석

○ 파속작물의 현장 적용 진단 실험 분석을 통한 환경장해 현장 진단 최적화 시스템을 구축하기 위해서 1차 및 2차년도 연구결과를 토대로, 생리적 스트레스를 입은 양파 작물의 잎 중단부 샘플로부터 추출물을 확보한 후, 제 1세부과제에서 제작한 종이 진단 센서를 가지고 프롤린 민감도를 비교 분석하였음. 전남대 양파 작물 재배지로부터 (그림149A), 잎 마름이 심한 정도에 따라 임의적으로 상 (양파 #3)/중 (양파 #2)/하 (양파 #1)로 분류하여 샘플들을 확보하였음 (그림149B 및 149C). 각 샘플들의 잎 중단부로부터 프롤린 함량을 비교 분석한 결과, 예상한 대로 생리적 스트레스가 가장 적은 양파 #1 샘플에서 프롤린 함량이 가장 적었으며, 반면에 양파 #3 샘플에서는 프롤린 함량이 가장 많은 것을 알 수 있었음 (그림149B). 제 1세부과제에서 제작한 종이 진단 키트를 가지고 스트레스 인지 수용체 프롤린 탐침을 진단한 결과, 정량적 데이터 (그림149B)와 유사하게 색깔 변화가 나타남을 알 수 있었음 (그림149C). 이러한 결과들을 말미암아, 프롤린은 작물 스트레스에 대한 종이 센서 진단 마커로 이용될 수가 있음을 알 수 있었음.

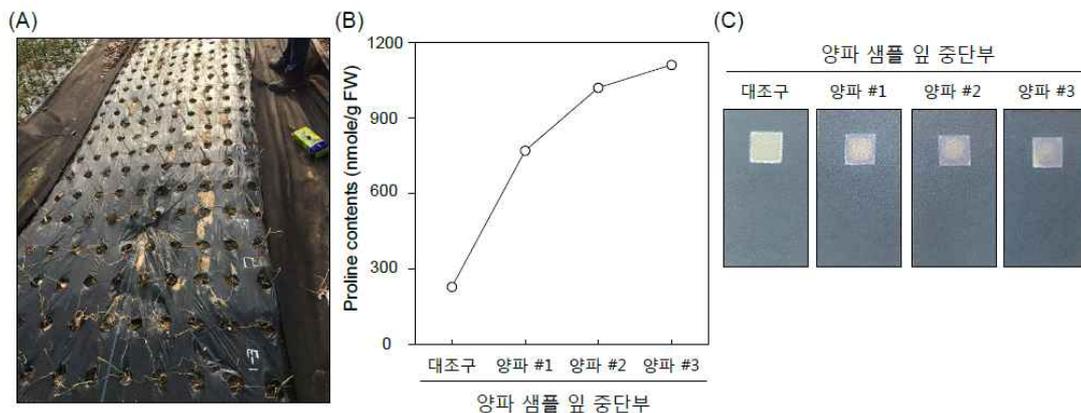


그림149. 파속작물의 현장적용 진단 실험 분석 및 환경장해 진단 키트에 대한 성능 평가 분석. (A) 전남대 양파 작물 현장 재배지로부터 샘플 확보 (B) 각 양파 샘플들의 잎 중단부로부터 프롤린 함량 비교 분석 (C) 종이 진단 키트 이용, 스트레스 인지 수용체 프롤린 탐침 분석

## ■ 제3세부과제 연구내용 및 결과

### (1) 1차년도 연구내용 및 결과

#### 가. 노균병균·흑색썩음균핵병균 분리 및 최적의 배양 조건 확립

○ 노균병에 걸린 양파는 그림1에서 확인할 수 있듯이 건전 양파에 비해 전체적으로 생장이 위축되며 잎이 엷록소가 없어지며 누렇게 변하면서 최종적으로 말라 죽게 됨. 양파 주생산지인 무안지역에서 노균병에 걸린 이병엽을 채집한 후 절대활물기생균인 노균병균을 순수 분리한 후 현미경상에서 포자와 포자낭병을 확인하였으며 보다 명확하게 확인하기 위해 iodine으로 염색하여 재차 포자와 포자낭병을 확인함 (그림150과 151).



그림150. 현미경상에서 100배, 400배, 1,000배의 비율로 포자와 포자낭병을 확인한 결과

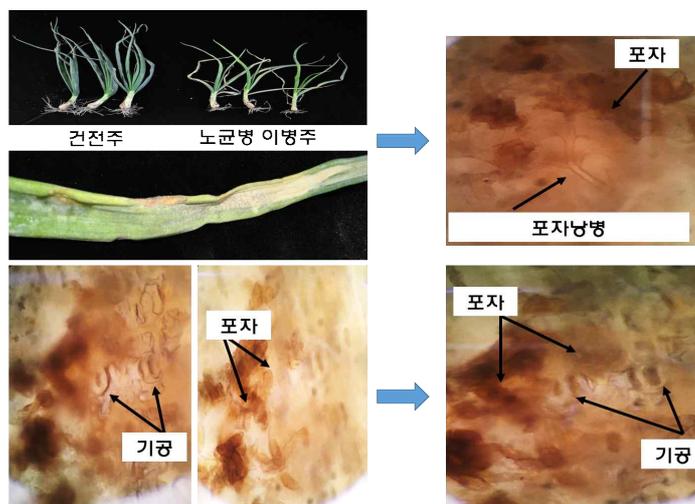


그림151. 노균병 이병주 부위를 iodine으로 염색한 후 현미경상에서 포자와 포자낭병을 확인한 결과

- 건전 양파 잎과 노균병에 감염된 이병엽으로부터 genomic DNA를 추출한 후 ITS 프라이머를 이용해서 순수 분리된 포자가 노균병균임을 확인하고자 함. 프라이머는 ITS1번과 ITS4번을 사용하였으며 PCR 조건은 94°C에서 3min간 predenaturation 후, 94°C에서 30sec, 52°C에서 30sec, 72°C에서 45sec 반복을 30회 한 후 마지막으로 72°C에서 10min간 마지막으로 합성함. PCR 결과를 전기영동한 결과 그림152에서 확인할 수 있듯이 건전 양파에서는 하나의 밴드를 확인 할 수 있었으나 이병엽의 병반에서는 두 개의 밴드를 확인 할 수 있었음.



그림152. 노균병 이병주 병반으로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR한 후 전기영동한 결과

- 그림 3의 건전 양파에서는 확인된 밴드와 이병엽의 병반에서는 확인된 두 개의 밴드를 각각 염기서열을 분석한 다음 NCBI database에서 그 상동성을 확인해 본 결과 건전 양파는 *Allium cepa*로 병반의 결과는 노균병균인 *Peronospora destructor*로 확인됨으로써 절대할 물기생균에 걸린 이병엽을 간단하게 PCR방법으로 분리하는 방법을 개발하였음 (그림153와 154).

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
→ 양파로 확인됨	<a href="#">Allium vavilovi x Allium cepa ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, specimen voucher tax 3731 (GAT)</a>	1184	1184	85%	0.0	100%	AM418368.1
	<a href="#">Allium cepa ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, specimen voucher tax G2168 (GAT)</a>	1179	1179	85%	0.0	99%	AM418370.1
	<a href="#">Allium cepa var. agrogatum mRNA 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1 and internal transcribed spacer 2</a>	1177	1177	85%	0.0	99%	AJ411906.1
	<a href="#">Allium cepa voucher SBB-0467 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2</a>	1099	1099	80%	0.0	99%	JN115012.1
	<a href="#">Allium cepa 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2</a>	1258	1258	91%	0.0	99%	KC119703.1
	<a href="#">Allium cepa ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2</a>	1175	1175	85%	0.0	99%	AM418388.1
	<a href="#">Allium cepa ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, specimen voucher tax G2146 (GAT)</a>	1173	1173	85%	0.0	99%	AM418369.1
	<a href="#">Allium cepa ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, specimen voucher tax G2143 (GAT)</a>	1173	1173	85%	0.0	99%	AM418368.1
	<a href="#">Allium cepa 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1 and internal transcribed spacer 2</a>	1171	1171	85%	0.0	99%	AJ411944.1
	<a href="#">Allium cepa cultivar Nashik red 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1227	1227	89%	0.0	99%	KI895597.1
	<a href="#">Peronospora destructor 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	1370	1370	84%	0.0	99%	JX130106.1

그림153. 건전 양파에서 확인된 밴드를 NCBI database에서 그 상동성을 확인해 본 결과 *Allium cepa*로 확인된 결과

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
→ 노균병원균 확인됨	<a href="#">Peronospora destructor 5.8S rRNA, 28S rRNA, and ITS2</a>	183	183	60%	8e-43	94%	AJ427418.1
	<a href="#">Peronospora destructor genes for 18S rRNA, 5.8S rRNA and 28S rRNA, partial and complete cds</a>	183	183	60%	8e-43	94%	AB021712.1
	<a href="#">Peronospora destructor TAS2, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	152	152	50%	2e-33	93%	AY225469.1
	<a href="#">Peronospora destructor 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	178	178	60%	4e-41	93%	JQ265211.1
	<a href="#">Peronospora chenopodii voucher HAL3550/01 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2</a>	135	135	50%	2e-28	90%	EF514955.1
	<a href="#">Peronospora polytroni isolate HV_184 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2</a>	130	130	50%	1e-26	89%	AY198282.1
	<a href="#">Peronospora cf. facopyri MK-2015 voucher HOMO PF-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2</a>	147	147	57%	1e-31	89%	KP271924.1
	<a href="#">Peronospora trivialis isolate HV_324 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2</a>	113	113	50%	1e-21	87%	AY198278.1
	<a href="#">Peronospora sordida isolate HV_146 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2</a>	113	113	50%	1e-21	87%	AY198247.1
	<a href="#">Peronospora sordida internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence</a>	134	134	60%	8e-28	86%	DQ605294.1

그림154. 이병엽의 병반에서 확인된 밴드를 NCBI database에서 그 상동성을 확인해 본 결과 *Peronospora destructor*로 확인된 결과

- 흑색썩음균핵병원균은 기존에 PDA배지에서 배양 하였으나 균핵이 형성되는 기간이 오래 걸려 양파나 마늘에 접종하여 상호작용에 관련된 특이적인 항체를 제작하는데 어려움이 있음. 따라서 흑색썩음균핵병원균에 걸린 양파로부터 균핵을 순수 분리하여 최적의 배양 조건을 개발하고자 함. 그래서 양파껍질과 양파를 적절하게 혼합한 배지를 조성하여 배양한 결과 균핵이 기존의 PDA 배지에 비해 빠르고 많은 수가 생성되었으며 양파만 첨가된 배지에 비해 균사의 성장도 좋음 (그림155).



그림155. 흑색썩음균핵병원균에 걸린 양파의 균핵과 새로운 배지에 자란 균핵의 모습

- 그림55에서 확인된 자연상태에서 감염된 양파는 다른 병원균이 혼재되어 있으므로 양파와 흑색썩음균핵병원균간의 상호작용을 확인하기는 어려운 상태임. 따라서 새로운 조성이 개발된 배양 배지에서 균핵을 최대한 확보한 다음 무균상태의 양파에 균핵을 접종함으로써 상호작용에 관련된 항체를 찾는 연구방법을 개발하고자 여러 번 멸균한 보리에 확보된 균핵을 접종한 다음 양파에 인위적인 접종을 하는 방법을 확립하였음 (그림156).



그림156. 새로운 배지에 자란 흑색썩음균핵병원균의 균핵을 양파에 접종 시키는 모습

## 나. 노균병균·흑색썩음균핵병균 특이적 항체 및 양파와 병원균의 상호작용 관련 특이적 항체 개발

- 그림152에서 노균병균인 *Peronospora destructor*로 확인된 이병엽의 병반에서 total RNA를 추출한 다음 건전 양파에서 발현되지 않지만 이병엽에서 발현이 증가되고 있는 유전자들을 클로닝하여 재조합 단백질을 *E. coli*에서 발현시킨 후 특이적인 항체를 탐색하기 위해 GeneFishing kit를 이용하여 최대한 많은 유전자를 클로닝하여 그 발현 여부를 확인하고 있으며 그 중에서 강력하게 발현되는 유전자는 염기서열을 분석하였음 (그림157).

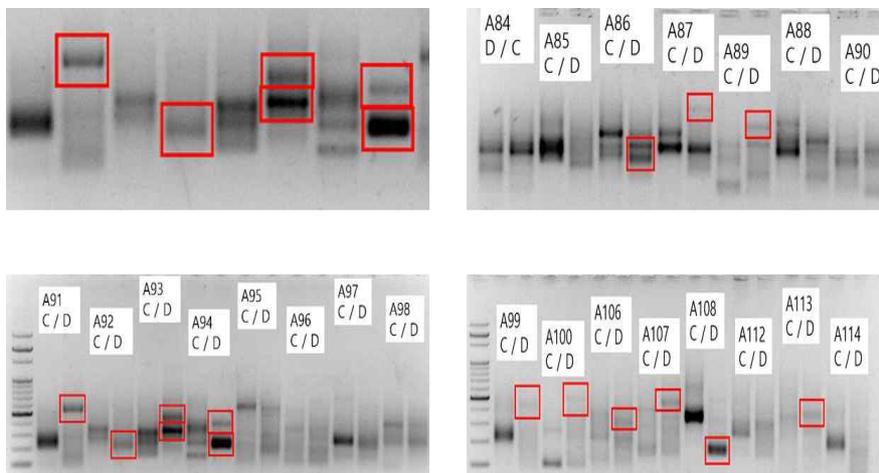


그림157. 노균병에 걸린 이병엽의 병반으로부터 GeneFishing kit를 이용하여 유전자를 선별한 결과 (빨간색으로 표시된 유전자들이 이병엽에서 많이 발현되고 있는 유전자들임)

- 노균병균·흑색썩음균핵병균의 total RNA를 추출한 후 oligo dT 프라이머와 Endo/Exo polygalacturonase, Oxaloacetate acetylhydrolase(Oah) 유전자들의 특이적인 프라이머를 사용하여 RT-PCR를 수행함으로써 full-length 유전자 클로닝하여 염기서열 및 아미노산 서열을 분석하였음 (그림158).

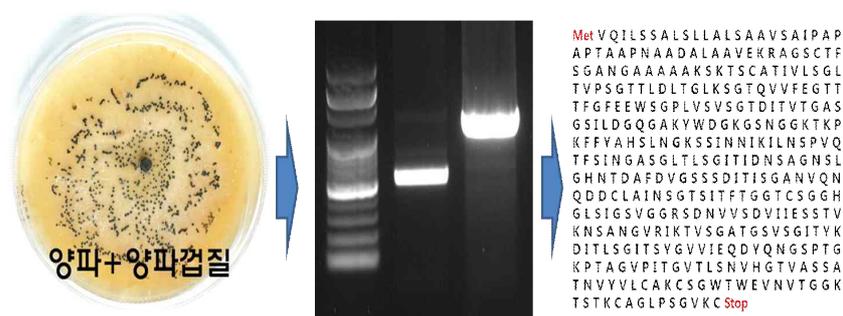


그림158. Endo/Exo polygalacturonase, Oxaloacetate acetylhydrolase(Oah) 유전자들의 특이적인 프라이머를 사용하여 RT-PCR 방법으로 유전자를 클로닝하여 염기서열 및 아미노산 서열을 분석한 결과

○ 특이적이며 좋은 항체를 제작하는 기간이 6개월이상 소요되기 때문에 우선 Endo/Exo polygalacturonase, Oxaloacetate acetylhydrolase(Oah) 단백질에서 각각의 peptide을 합성하기로 하고 peptide antigen prediction을 수행한 다음 예상되는 transmembrane domain 또한 확인하여 peptide를 제작하였으며 peptide를 이용하여 항체를 제작하는 작업을 수행함. 예들들면 Endo polygalacturonase의 경우는 peptide 1과 2가 예측되었음 (그림 159).

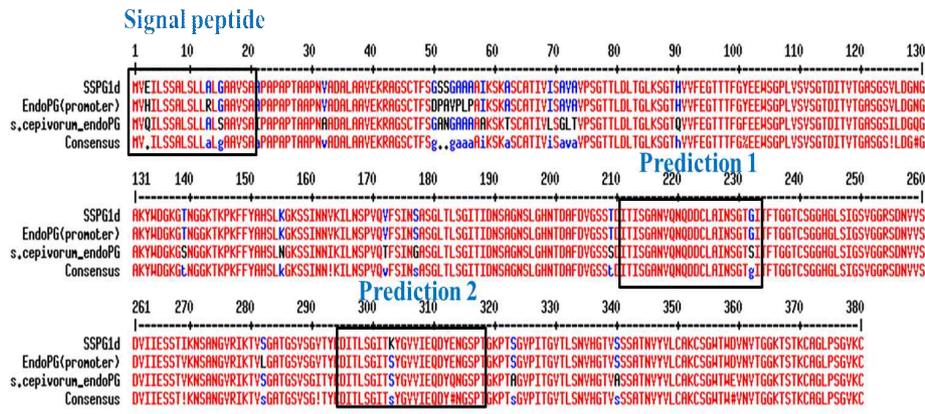


그림159. Peptide 항체 제작을 위해 Endo polygalacturonase 단백질의 peptide antigen prediction을 확인한 결과

○ 그러나 Oxaloacetate acetylhydrolase(Oah) 단백질의 경우는 peptide antigen prediction 결과 Peptide 1 (57~76 amino acid) : C-DLGLIAHLSDMKDHAEMIANL(21mer), Peptide 2 (156~173 amino acid) : C-QLGYDECIKRLKVARELG(19mer), Peptide 3 (181~199 amino acid) : GYTSKEMAAKTVKEFAPWP-C(20mer) 등 세 가지 peptide가 예측되었으며 transmembrane domain을 확인 한 결과는 중간에 transmembrane domain이 예측되었음 (그림160). 따라서 Peptide 1또는 Peptide 2에서 하나를 선택하여 peptide를 제작하기로 함.

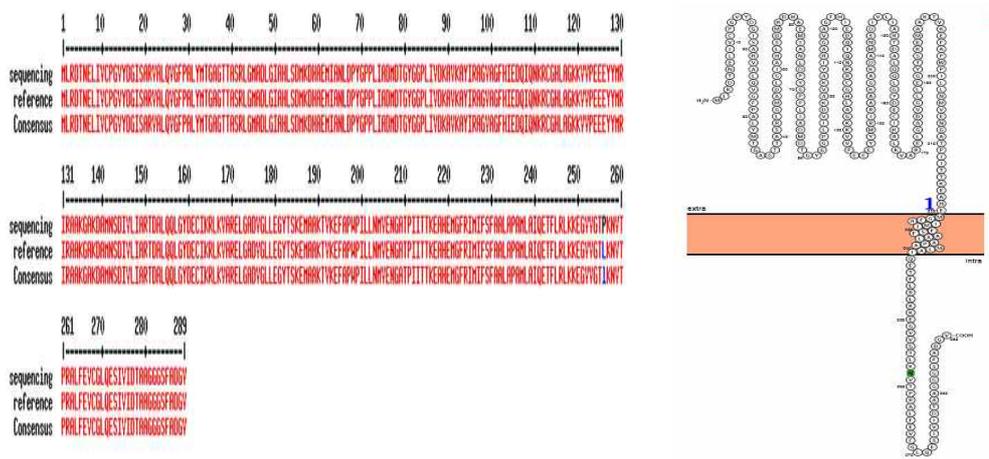


그림160. Peptide 항체 제작을 위해 Oxaloacetate acetylhydrolase(Oah) 단백질의 peptide antigen prediction 및 transmembrane domain을 확인한 결과

## (2) 2차년도 연구내용 및 결과

### 가. 재조합 polygalacturonase 단백질 정제 및 항체 제작

- 양파와 마늘의 흑색썩음균핵병을 일으키는 곰팡이 병원균인 *S. cepivorum*을 조기에 진단하기 위해 감염초기에 병원균이 대량으로 생산하고 분비하는 단백질로 알려져 있는 polygalacturonase을 이용하여 항체를 제작하였음. 대량의 재조합 PG 단백질을 생산하기 위해 먼저 대장균에서 재조합 단백질을 발현시킴으로서 단백질을 얻고자 함. PG 단백질을 암호화하고 있는 유전자를 RT-PCR을 통해 증폭하였고, 증폭된 PCR 생산물을 정제하여 pET28a(+) vector에 cloning하였음. 염기서열 분석결과 1-20 아미노산이 신호서열로 예측되었고, 효소 분비시 잘리는 부분이기 때문에 신호서열(20a.a)을 제외한 단백질의 전체 서열의 cDNA을 제한효소 위치에 재조합하여 N-terminal에서 6x histidine tag이 발현되게 구성하였음 (그림161).



그림161. 재조합 단백질 발현 벡터인 pET28a(+)에 polygalacturonase(PG) 유전자를 클로닝한 모습

- PG 유전자가 클로닝된 벡터를 대장균에 형질전환 시킨 후 IPTG 0.2mM 농도와 37도 온도 조건으로 단백질 발현 후 SDS-PAGE를 통해 발현 양상을 확인하여 그림162와 같은 발현 양상을 보임. Vector control에 비해 약 37kDa로 예상했던 크기에서 재조합 단백질이 과발현되었으며 대부분이 불용성 상태로 발현이 되는 것을 확인 할 수 있었음.

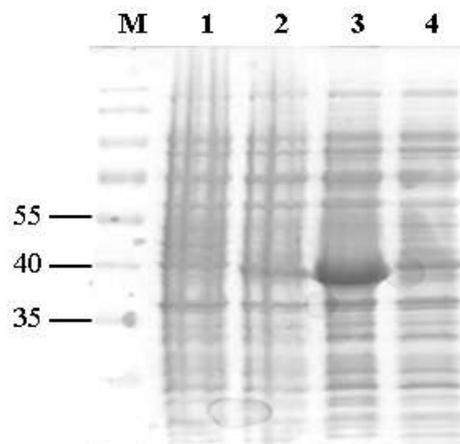


그림162. 대장균에서 재조합 PG 단백질의 과발현을 SDS-PAGE로 확인한 결과. 1; vector control(BL21), 2; sonication 전 total protein, 3; sonication 후 total protein(Soluble+Insoluble protein), 4; sonication후 상층액(Soluble protein)

- 단백질 발현 특성상 불용성을 많이 띄고 있기 때문에 6M Urea를 통해 변성을 통해 단백질을 녹였고, Ni-NTA column을 통해 Ni 금속이온을 이용하여 his-tag 정제를 한 결과 100mM Imidazole과 400mM Imidazole 추출 단계에서 순도 95% 이상으로 단백질을 정제할 수 있었음(그림163). 정제한 재조합 PG 단백질을 항원으로 영인프론티어(Ab frontier) 항체 제작 회사에 의뢰하여 토끼 2마리에 주사한 후 다중클론성 항체(Polyclonal antibody)를 약 3개월 가량의 기간을 거쳐 제작하였음. 면역 후 한달 뒤 1차 boosting한 항체(serum상태)를 받았으며 일주일 간격으로 boosting을 진행하여 마지막으로 3차 boosting을 마지막으로 하여 면역과정을 마쳤으며 전혈을 통해 각각의 토끼에서 30-50ml의 serum을 받아 항체 민감성 실험에 이용함(그림164).

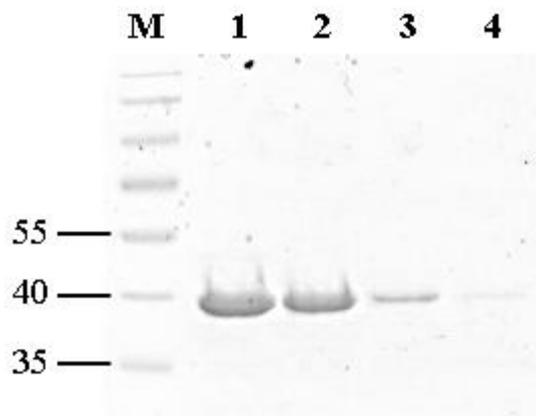


그림163. 대장균에서 과발현되는 재조합 PG 단백질을 Ni-NTA column을 통해 정제를 한 결과 400mM Imidazole 1번부터 4번 추출 단계의 단백질을 SDS-PAGE로 확인한 결과. M: 단백질 크기 Marker



그림164. 대장균에서 추출한 재조합 PG 단백질을 항원으로 사용하여 다중클론성 항체(Polyclonal antibody)를 최종적으로 제작한 결과

#### 나. 제작된 PG 항체의 특이적 결합 및 민감성 확인

- 재조합 PG를 항원으로 하여 토끼 2마리에서 생산된 anti-ScPG 항체와 흑색색염균핵병균 PG와의 친화성을 확인하기 위해 western 분석을 실시함. 그림 166과 167의 1-3번은 대장균에

서 발현된 전체 단백질(crude protein), 165번은 *S. cepivorum* 전체 단백질을 각각 SDS-PAGE(12%)에 로딩한 후, nitrocellulose membrane에 transfer한 뒤 1차, 2차 및 3차 항체를 최적의 비율을 사용하여 실험을 수행하였음. 그 결과 그림166의 면역전 혈청에 대한 western 분석 결과, 토끼1 혈청은 어떠한 항원에서도 반응을 하지 않았으며 토끼2 혈청에 대해서는 약 60kDa의 크기에서 불특정 크기의 밴드가 확인됨. 면역 후 3번째 boosting후 얻은 혈청에 대한 western blot의 결과 토끼1 혈청 같은 경우에는 대장균에서 발현된 목적 단백질에 대해서는 특정하게 반응을 하는 것으로 보이지만 실제로 흑색썩음균핵병균에서 발현된 PG 항원에 대해서는 항원-항체 친화성이 매우 떨어지는 것으로 나타남(그림167). 그러나 토끼2의 경우에는 boosting이 진행됨에 따라서 대장균에서 발현시켜 추출한 재조합 단백질인 관계로 대장균 단백질에 대한 불특정한 밴드가 나타났지만 실제로 *S. cepivorum*이 생산한 전체 단백질에 대해서는 PG로 예상되는 크기에서 특정하게 반응하는 것을 확인 할 수 있었음. 신호서열을 제외한 후 클로닝하여 단백질을 발현시켰음에도 불구하고 대장균에서 발현된 재조합 PG와 *S. cepivorum*에서 발현된 Native PG 단백질에서 발견되는 크기 차이는 재조합 단백질 N-terminal 부분의 Histag(2-3kDa)으로 예상하고 있음.

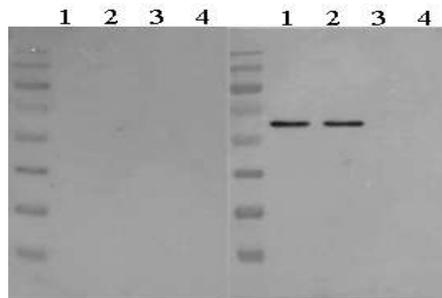


그림165. 토끼에 면역전 혈청을 이용해 western 분석을 수행한 결과. 토끼1(왼쪽), 토끼2(오른쪽) 1; pET28 vector E.coli BL21(DE3) - 5 $\mu$ g, 2; 재조합 단백질 E.coli BL21(DE3) - 5 $\mu$ g, 3; 정제된 PG 단백질 - 0.5 $\mu$ g, 4; *S. cepivorum* crude 단백질 - 3 $\mu$ g

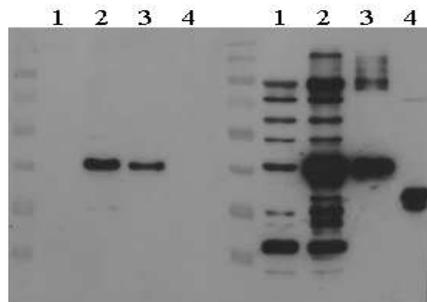


그림166. 토끼에 면역후 혈청을 이용해 항체의 특이성을 western 분석을 통해 수행한 결과. 토끼1(왼쪽), 토끼2(오른쪽) 1; pET28 vector E.coli BL21(DE3) - 5 $\mu$ g, 2; 재조합 단백질 E.coli BL21(DE3) - 5 $\mu$ g, 3; 정제된 PG 단백질 - 0.5 $\mu$ g, 4; *S. cepivorum* crude 단백질 - 3 $\mu$ g

○ anti-ScPG 항체를 이용해 *S. cepivorum* PG를 탐색하기 위해 Zymography를 수행함. *S. cepivorum*이 생산하는 단백질 중 PG를 탐지하기 위해 양파배지에서 배양된 균사체에서 단

백질을 추출한 후 SDS-PAGE을 수행한 다음, western 분석을 한 결과 anti-ScPG 항체가 약 37kDa 크기의 단백질을 인지함. 그러나 새롭게 제작된 anti-ScPG 항체에 대한 PG 탐지 능력이나 *S. cepivorum*의 PG 발현 패턴이 아직 보고된 바가 없어 그에 대한 정보가 없기 때문에 효소 활성을 볼 수 있는 Zymography를 추가로 수행하였음. 기존 SDS-PAGE gel에 단백질을 로딩 후, Tris-HCL 20mM을 통해 단백질을 활성화 시킨 후, 100mM sodium acetate 완충액에 Polygalacturonic acid 1%를 기질로 하여 40도 온도조건에 1시간 반응한 결과 western 분석과 상응하는 크기의 밴드가 나타나는 것을 확인할 수 있었음(그림167).

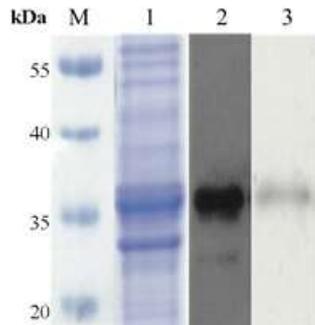
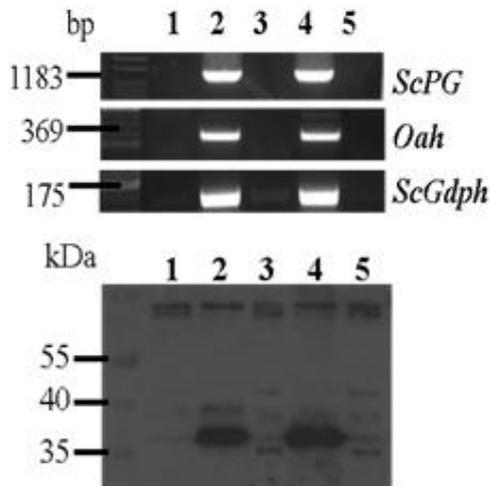


그림167. *S. cepivorum*의 PG 활성을 볼 수 있는 Zymography를 통해 western 분석과 상응하는 크기의 밴드를 확인한 결과. 1; *S. cepivorum* crude 단백질, 2; western 분석 결과, 3; Zymography 확인 결과

○ anti-ScPG 항체의 *S. cepivorum*에 대한 탐색 능력을 시험하기 위해 양파 육묘 식물체 (21days) 뿌리에 *S. cepivorum*를 인위적으로 접종함. 양파 육묘 식물체는 종자 파종 후 3주가량 MS 배지에서 23도 배양실에서 배양했고, *S. cepivorum*은 양파배지에 계대 후 1주일 동안 20도 암조건에서 배양 후 가장자리에 있는 군사를 펀치를 이용해 뿌리에 감염시킴. 감염 조건은 20도 암조건에서 *S. cepivorum*이 잘 접종될 수 있도록 조건을 만들어 주었고, 접종 후 1일, 2일 차에 샘플링 하였다. 실제 *S. cepivorum*에서 PG 유전자의 발현을 확인하기 위해 RT-PCR을 통해 발현을 확인하였는데, 그 결과 무병 양파육묘에서는 밴드가 나타나지 않았으나, 1day와 2day 모두 접종된 부위인 뿌리에서만 밴드가 증폭되었고, 그 윗부분인 양파 잎에서는 증폭되지 않은 것을 확인할 수 있었음(그림168(A) 윗 부분). 또한 *S. cepivorum*이 기주에 병원성을 일으킬 때 유도발현 된다고 보고된 Oxalic acid 합성 유전자인 Oah(Oxaloacetate hydrolase) 유전자 또한 같은 양상으로 발현이 된 것을 확인할 수 있었음. 그리고 Western 분석 결과, 뿌리 부위에서 37kDa 크기의 단백질이 anti-ScPG 항체에 의해 확연하고 강하게 탐지되는 것으로 나타남(그림168(A) 아랫부분). 그러나 제작된 항체에 의해 양파의 다른 밴드들이 약하게 비특이적으로 나타나지만 이 밴드들은 진단 키트를 제작시에는 크기를 선별함으로써 제거할 수 있으므로 큰 문제는 되지 않을 것으로 생각함. 그리고 항체의 특이성을 확인하기 위해 본 병원균인 *S. cepivorum* 이외에 양파에 감염을 일으키는 토양 곰팡이인 *Sclerotinia minor*, *Sclerotium rolfsii* 의 전체단백질에 대해 Western blot을 수행하였음. 그 결과 본 병원균 이외의 곰팡이의 단백질에 대해서는 뚜렷한 밴드를 볼 수 없었고, 아주 희미한 비특이적 밴드만이 존재하였다. 본 연구에서 제작된 항체는 다중클론성항체이며 PG 단백질이 곰팡이에 특이적인 단백질이 아니며 식물 및 다른 곰팡

이 병원균에도 존재하는 단백질이기 때문에 그들의 PG 와도 반응할 가능성이 존재함. 그러나 항원의 농도를 낮추게 되면 이러한 비특이적 밴드도 나타나지 않음을 확인하였음(그림 168(B)). 이러한 연구결과들을 종합하여 “양파 흑색썩음균핵병의 조기 진단을 위한 *Sclerotium cepivorum*이 분비하는 Polygalacturonase에 대한 항체 개발”이라는 제목으로 특허 출원 및 SCI급 논문을 준비 중.

(A)



(B)

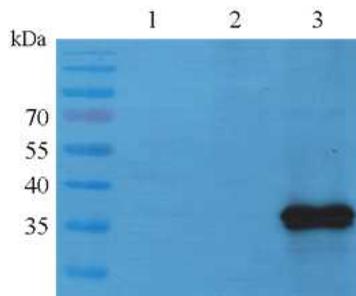


그림168(A). *S. cepivorum*을 양파 뿌리에 감염시킨 후 RT-PCR를 통해 *S. cepivorum*의 PG 유전자의 발현(윗 그림)과 anti-*ScPG* 항체를 통해 PG 단백질을 확인한 결과(아랫 그림). 1; 무병 양파 육묘식물체, 2; 24dpi 뿌리 부위, 3; 24dpi 잎 부위, 4; 48dpi 뿌리 부위, 5; 48dpi 잎 부위; (B). 양파에 감염을 일으키는 다른 토양곰팡이들에 대한 항체의 특이성 검사M : Molecular weight, lane 1: *S. minor* 전체 단백질, lane 2: *S. rolfsii* 전체단백질, lane 3: *S. cepivorum* 전체단백질.

#### 다. LAMP 기법을 활용한 양파 노균병 조기 진단

○ 노균병에 걸린 양파를 조기 검출하는 방법으로는 양파 잎에 포자가 형성되어 이를 현미경상에서 관찰하거나 PCR에 의거하여 감염유무를 확인할 수 있으나 병원균이 양파에 잠복되어 있는 상태에서 조기 진단 기술의 개발은 전무한 상태임. 따라서 여러 PCR 방법중에 하나인

Loop-Mediated Isothermal Amplification(이하 LAMP)를 이용하여 시료 전처리를 과정을 포함하여 2시간 이내에 양파 노균병균을 조기 검출 가능한 방법을 확립하였음. 또한 PCR에서 증폭산물을 확인하기 위해 수반되는 전기영동기와 UV 램프 필요 없이 육안으로 증폭산물, 양파 노균병 검출 유, 무를 판단 할 수 있는 방법을 정립하였음. 검출에 필요한 F3, B3, FIP(F2+F1c), BIP(B1+B1c) 4개의 Primer를 제작하기 위해 NCBI에 등록된 유전서열정보 (AB021712.1)의 일부를 이용함(그림169).

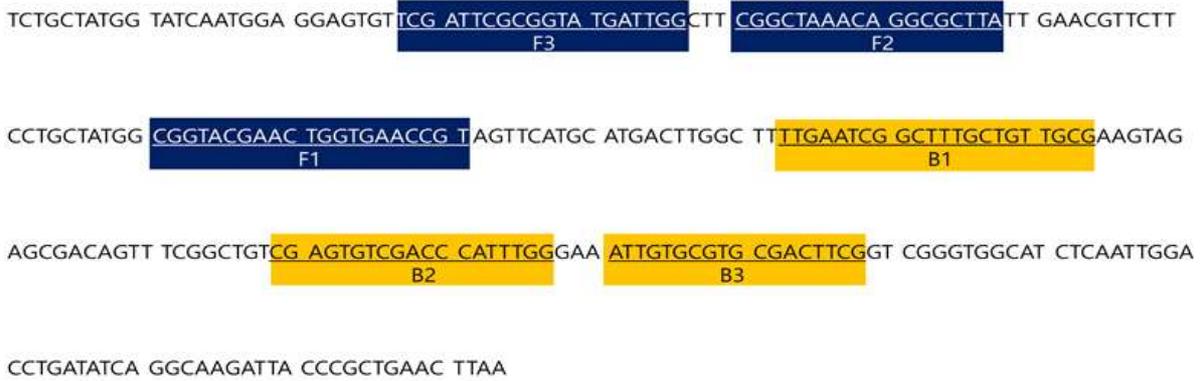


그림169. LAMP용 4개의 primer 위치

- 노균병균 검출 최적 반응 조건을 확립하기 위해 다양한 시간, 온도 조건에서 수행함(그림 170). 실험 결과를 토대로 최적의 반응 온도는 63도, 최적의 반응 시간은 60분으로 설정하였음. 이후 확립한 LAMP의 최적 반응 조건에 의거하여 일반적인 PCR 검출방법과의 비교를 통해 최소 검출 한계 검정을 실시함. 양파 노균병균의 genomic DNA를 정량하여 이후 10배씩 희석하여 각 희석농도에 따른 LAMP와 일반 PCR의 검출 한계 능력을 비교 수행하였음. 비교 수행한 실험 결과 일반 PCR에서는 72.5g/μl을 한계로 더 이상 검출 하지 못했으나 LAMP에서는 725ng/μl까지 검출 되어 LAMP가 일반 PCR 대비 약 100배 더 희석된 농도에서도 검출이 가능한 것으로 판명 됨(그림171).

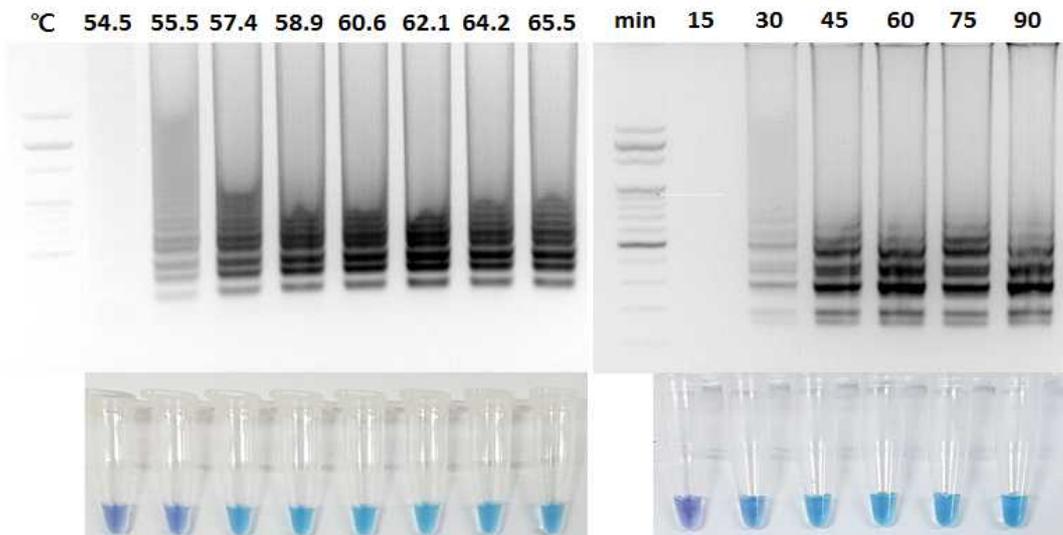


그림170. 노균병균 검출 최적반응 온도(좌) 및 시간(우)

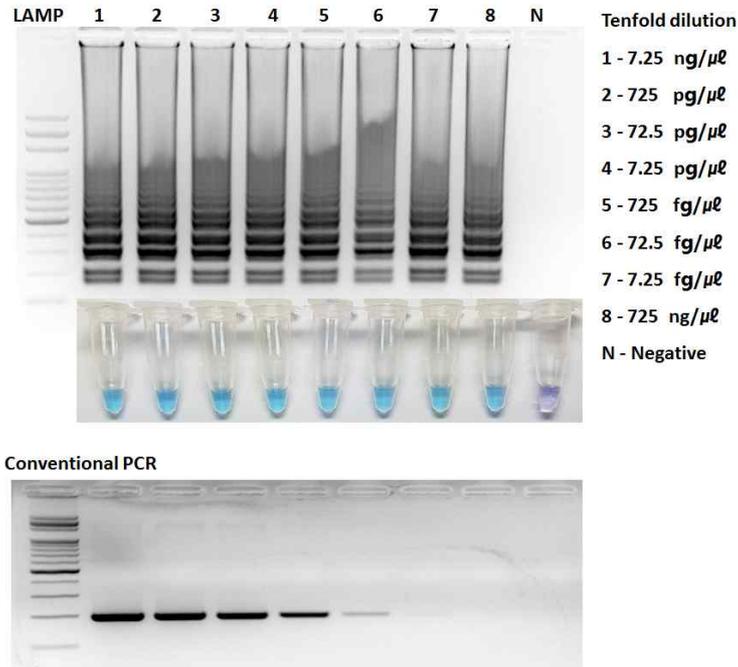
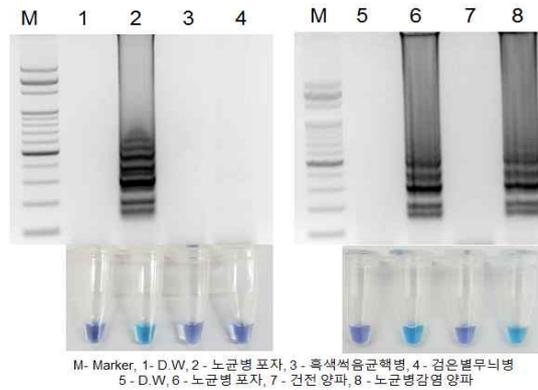


그림171. LAMP와 conventional PCR의 검출 한계 능력 검정 비교

- LAMP을 이용한 검출 방법에서 양파 노균병균만을 검출 가능한지 알아보기 위해 병원균은 노균병균 포자와 양파를 가해하는 다른 병원균인 흑색썩음균핵병균 및 배를 기주로 하는 배검은별무늬병균에서 genomic DNA를 추출 하였으며 양파 조직에서 genomic DNA를 추출 하여 특이성 검증 실험을 수행하였음. 그림172에서처럼 노균병균 포자 또는 노균병 감염 양파에서 추출한 genomic DNA에서만 반응함으로써 양파노균병균에만 특이적으로 반응하는 것으로 증명됨.



M- Marker, 1- D.W, 2- 노균병 포자, 3- 흑색썩음균핵병, 4- 검은별무늬병  
5- D.W, 6- 노균병 포자, 7- 건전 양파, 8- 노균병감염 양파



그림172. 노균병균 검출 특이성 검정 및 양파 감염 검출 실험

- 양파 내부에 존재하고 있는 양파 노균병균 검출 가능성 유, 무와 생육별 검출 가능 여부를 판단하기 위하여 검출 대상인 양파 육묘기 및 정식 이후의 시료(포자의 생육을 관찰 할 수 없어 실제로 노균병에 감염되었는지 판단이 불가능한 시료)에서 검출 능력평가를 수행하였음 (그림173). 실제 2016년 10월 28일의 육묘상 양파로써 파종 후 약 60일 이후의 샘플과 정식 이후 본답에서 황화증상이 있거나 생육이 불량한 육묘를 대상으로 노균병 검출결과 노균병이 검출된 결과 포자 생성 이전 및 노균병 내부 감염 여부를 LAMP로 검증 할 수 있었음.

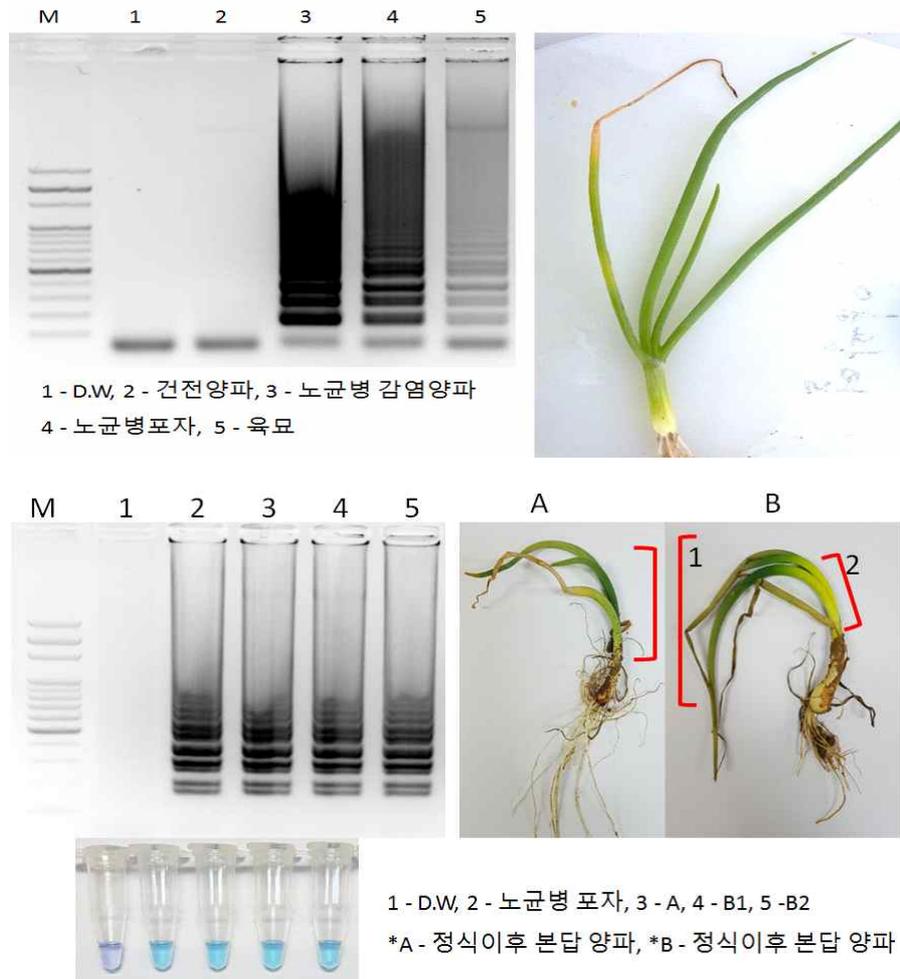


그림173. 양파 내부에 존재하고 있는 노균병균 검출 실험. 육묘상(위), 정식 이후 본답 양파(아래).

- 재배현장에서 노균병 감염이 예상되는 식물체로 인지하는 식물체의 이상변화(황화 증상 및 식물체 기형생장) 및 토양 감염 여부를 알아보기 위해 뿌리부분과 토양에서 노균병 감염 여부를 알아보기 위하여 LAMP 실험 검정 하였음(그림174). 실험결과 실제로 황화증상 및 재배현장에서 기형부분을 통해 노균병 감염 여부를 알아보는 것과 동일하게 기형적으로 휘어진 부분에서 노균병이 검출 되었으며 또한 토양시료에서도 노균병균이 검출됨. 따라서 이러한 결과들을 종합해서 2017년 3월 21일 “양파노균병균 검출용 프라이머 세트, 이를 포함하는 검출키트 및 이를 이용한 검출 방법”이라는 제목으로 특허를 출원하여 심사 중에 있음.

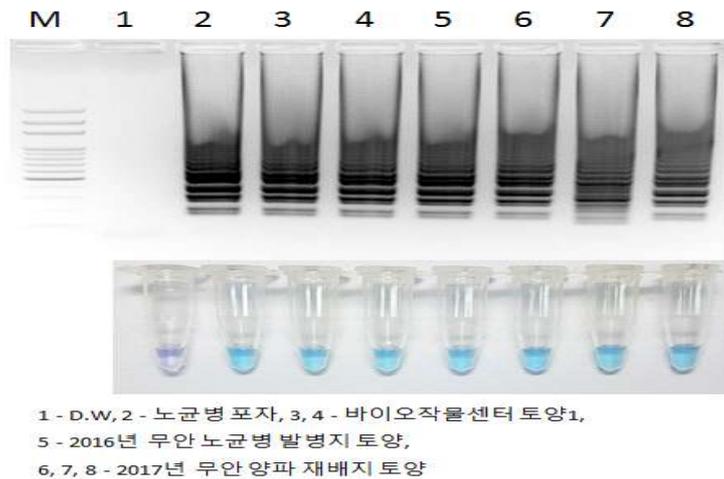
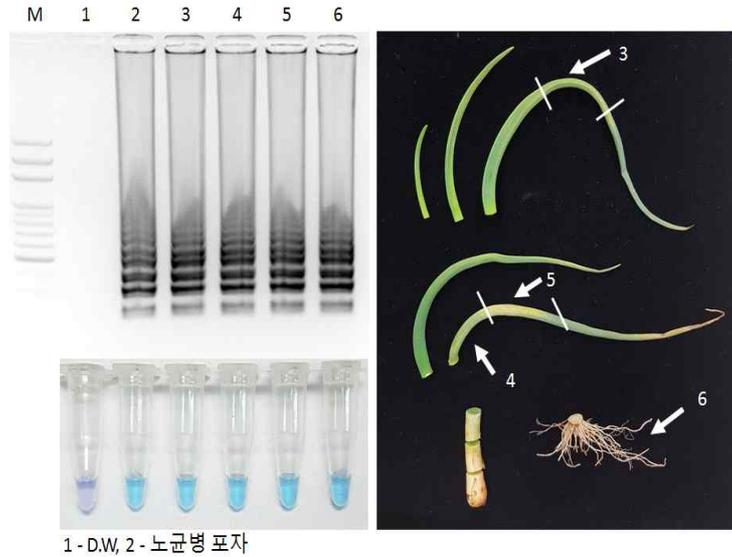


그림174. 노균병 감염 의심주 LAMP 부위별 검출 검정(위), 토양시료에서의 노균병 검출 검정(아래).

### (3) 3차년도 연구내용 및 결과

#### 가. 효율적인 양파 노균병 방제 현장 적용을 위한 LAMP 기법 활용

○ 확립된 양파 노균병 진단용 LAMP 기법 활용하여 농업 현장에 적용하기 위해 우선적으로 감염 증상이 보이지 않는 양파 육묘에서 LAMP 방법을 이용하여 노균병균 검출 실험을 수행하였음. 그림 1에서 확인할 수 있듯이 양파 정식 전, 감염 증상이 보이지 않는 시료를 무작위 선택하여 끝 마름 증상의 부위만 시료 절단용 가위로 절단 후 액체질소에서 마쇄하여 genomic DNA를 추출하여 이를 주형으로 사용 하였음. LAMP 기법을 통해 양파 노균병균 검출 실험을 수행 한 결과, 10개의 시료 중 2개의 시료에서 이미 노균병에 감염되었음을 밝힘으로써 초기 생육 단계인 육묘단계에서 잠복하고 있는 노균병균의 검출이 가능함을 확인하였으며 양파를 본밭에 정식하기 전에 육묘상 양파부터 적극적인 관리가 중요함을 생각하게 하는 결과라 할 수 있음(그림175).

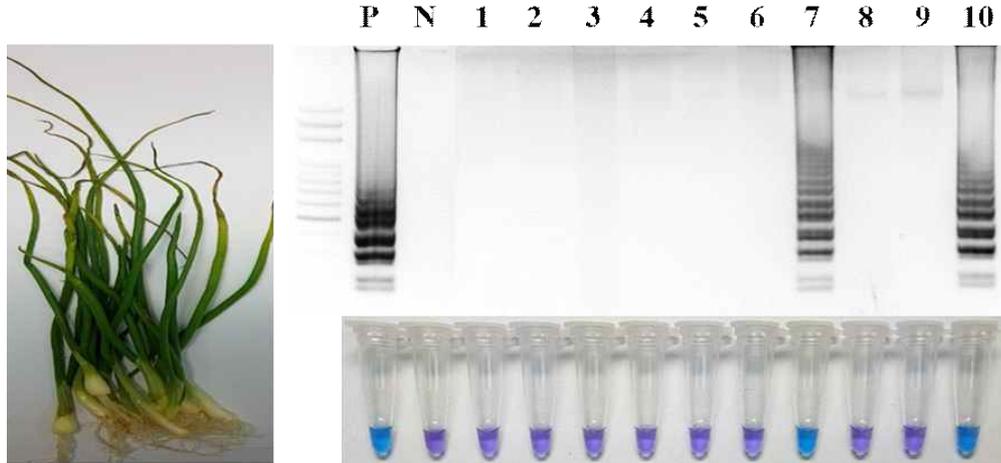


그림175. 육묘 단계의 양파로부터 LAMP 방법을 통해 양파 노균병균 검출을 확인한 결과

○ 그리고 토양 전염을 통해서도 양파 노균병이 발병하기 때문에 재배 단계의 토양에서 양파 노균병균 존재여부 확인하기 위해 LAMP 방법을 적용하여 전남대학교 양파 포장의 토양에서 시료를 채취 하였음 (그림176의 위). 그리고 양파를 수확한 직후의 토양과 수확 후 태양열 소독한 뒤같은 위치에서 채취한 토양을 비교하기 위해 각각의 토양으로부터 genomic DNA를 추출하여 LAMP 방법을 적용하였음(그림 2의 아래). 양파 수확 직후 토양에서는 잔존하고 있는 노균병균이 대부분 검출되었으나 이와 반대로 태양열 소독을 한 모든 토양에서는 노균병균이 검출 되지 않았음 (그림176의 아래). 이러한 연구 결과는 농업 현장의 토양으로부터 노균병균의 존재 유, 무를 파악하여 파종 및 정식 전 태양열 소독 또는 토양 훈증제 등의 토양 소독이 병원균의 밀도 감소에 크게 기여함으로써 건전한 토양에서 건강한 양파 재배를 할 수 있도록 하는데 중요한 조기 진단법으로 활용될 수 있을 것으로 생각됨. 현재 이러한 LAMP 관련 모든 연구결과를 종합하여 SCI급 국제저널에 투고하여 심사중에 있음.

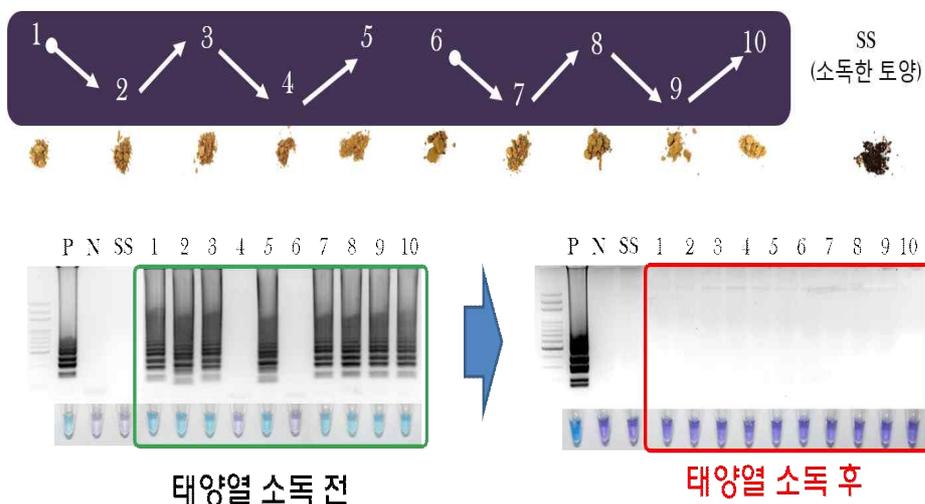


그림176. 토양 시료 채취 방법과 LAMP 방법을 이용하여 태양열 소독 전후의 토양 시료에서 노균병균 검출을 확인한 결과

## 나. LAMP 기법을 활용한 양파 흑색썩음균핵병 조기 진단

- 양파 노균병균의 조기 진단을 위해 확립된 LAMP 기법을 흑색썩음균핵병균 검출을 위해 적용하기 위해 ITS 5 와ITS 4 사이의 전 지역 중 205 bp (base pair)을 대상으로 LAMP PCR용 프라이머 세트를 설계하였음(그림177). FIP는 두 개(F1c, F2)의 Anti-sense sequence의 상보적인 염기서열(inner-sense)과 TTTT spacer 그리고 고리(Loop)를 형성하는 염기서열(loop-sense)의 부분을 합한 것으로 설계되었으며, Backward Inner Primer(BIP)도 마찬가지로 두 개(F1c, F2)의 sense sequence의 상보적인 염기서열(inner-antisense)과 TTTT spacer, loop를 형성하는 염기서열(loop-antisense)의 부분으로 설계됨. 또한 F3와B3 프라이머는 각각 Inner primer의 바깥쪽에 위치하도록 설계하였음(그림177).

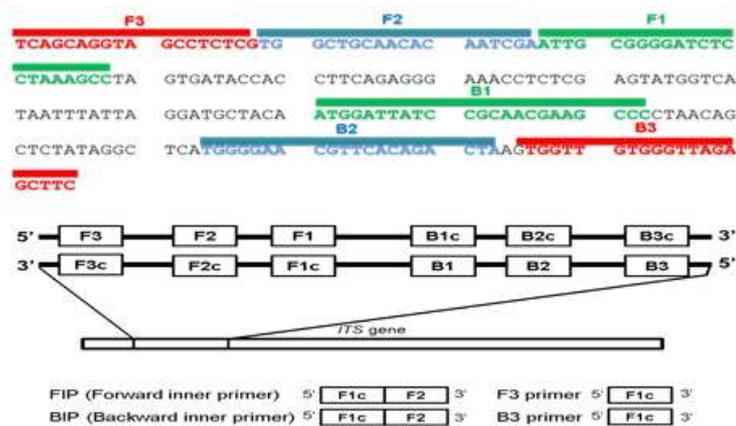


그림177. 흑색썩음균핵병균 검출을 위한 LAMP primer를 제작한 결과

- LAMP의 최적 반응조건을 확립하기 위해 각각의 온도별, 시간별 조건을 다르게 하여 PCR을 수행하였음. 같은 시간조건(60분)에서 60.1, 62.1, 63, 64.6, 65.1°C의 각각 다른 온도조건에서PCR을 수행한 결과 모든 온도조건에서 HNB상의 색변화, 그리고 전기영동상에서도 밴드를 확인 할 수 있었음. 또한 같은 60°C 온도조건에서 각 반응시간별(15, 30, 45, 50, 55, 60분)로 PCR을 수행한 결과 45분부터 반응이 나타나며 50분부터는 전기영동상에서 밴드가 명확하게 나타나는 것을 확인하였음(그림178).

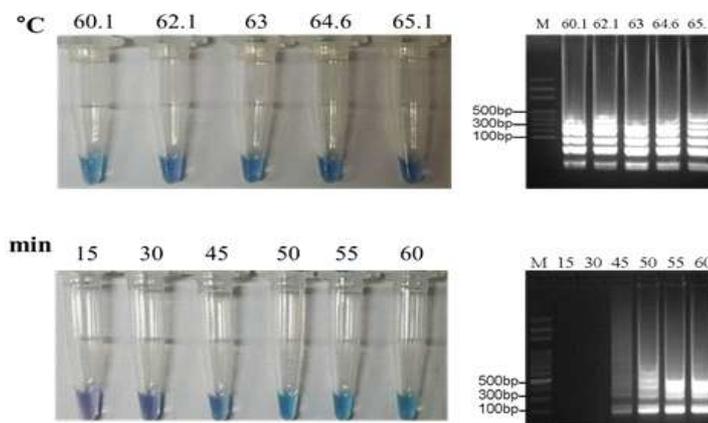


그림178. LAMP 방법의 최적 반응조건을 확립하기 위해 수행한 결과

- LAMP 방법의 민감성을 확인하기 위해 흑색썩음균핵병균의 genomic DNA 원액(100 fg)을 단계적으로 1/10배씩 희석하여 10<sup>-4</sup>까지 총7개 농도에서 기존의 PCR과 함께 검출 테스트를 한 결과 LAMP의 경우에는 1 fg의 농도까지 검출이 가능한 반면 기존의 PCR 방법은 그보다 10배 낮은 10 fg 에서 아주 희미한 밴드를 보이며 검출의 민감도에서 큰 차이를 보임 (그림 179).

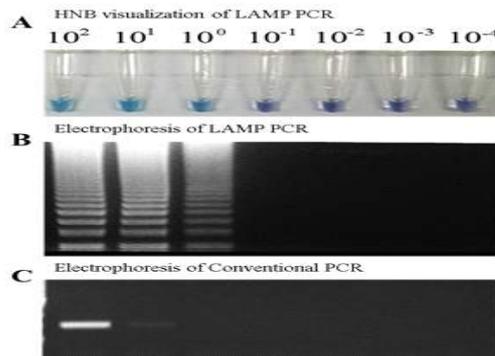


그림179. LAMP 방법의 민감도를 conventional PCR 방법과 비교한 결과

- 양파 흑색썩음균핵병균 검출용 LAMP 프라이머 세트가 *S. cepivorum*에 특이적인지 확인하기 위하여 본 병원균을 포함하여 양파에 병을 일으키고 있는 다른 9개의 곰팡이인 *Sclerotium rolfii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis aclada*, *Alternaria porri*, *Rhizoctonia solani*, *Peronospora destructor* 등과 같은 병원균들의 genomic DNA를 추출하여 주형으로 사용하여 각각 샘플에 대해 검출 테스트를 한 결과 LAMP primer는 특이적으로 흑색썩음균핵병균 이외의 나머지 병원균들에서는 검출반응이 나타나지 않았음을 확인하였음(그림180).

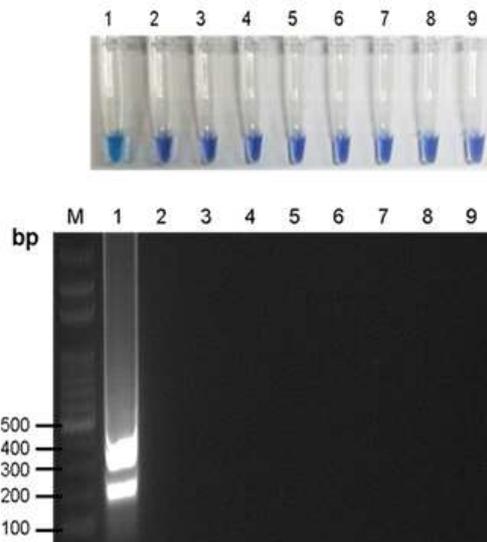


그림180. 흑색썩음균핵병균 검출을 위한 LAMP primer의 특이성 검정. M : Marker, 1:*S. cepivorum*(Positive control) 2:*S. rolfii*, 3:*S. sclerotiorum*, 4:*S. minor*, 5:*B. cinerea*, 6:*B. aclada*, 7:*A. porri*, 8:*R. solani*, 9:*P. destructor*

○ 양파 흑색썩음균핵병은 토양 전염성병으로 흑색썩음균핵병균(*Sclerotium cepivorum*)이라는 토양곰팡이에 의해 발병하여 국내를 포함한 세계 곳곳의 양파재배지역에서 수확에 큰 피해를 주고 있는 병으로 토양속에서 균핵의 형태로 약 20년 이상 월동할 수 있는 능력을 가지고 있어 방제에 큰 어려움이 있음. 따라서 농업현장에서 흑색썩음균핵병균을 파종 전 토양상태 및 파종 후 양파 육묘상태에서 조기에 신속하게 검출할 수 있는 LAMP 기법을 이용한다면 양파 흑색썩음균핵병을 효율적으로 방제할 수 있는 방법이 될 수 있을 것으로 생각됨. 이러한 연구결과를 종합적으로 정리하여 현재 “양파흑색썩음균핵병균 검출용 프라이머 세트, 이를 포함하는 검출키트 및 이를 이용한 검출 방법”이라는 제목으로 특허 출원을 준비중임.

#### 다. 최적의 노균병과 흑색썩음균핵병 조기 진단법을 활용한 효율적인 병해 방제력 개발 및 농업현장 적용

○ 확립된 노균병과 흑색썩음균핵병 조기 진단법을 이용하여 육묘단계에서부터 살균제를 이용하여 방제하였으며 본밭으로 정식한 다음 병원균의 존재 여부를 확인하면서 양파 농가에 가장 큰 피해를 주는 노균병을 방제하기 위한 살균제를 이용한 방제력 개발 및 방제력 효과 검정을 전남대학교 농생대 양파 포장에서 실시함(그림181). 양파 노균병에 대한 방제력은 동일 약제의 연용 지양 및 작용기작이 다른 여러 계통의 살균제를 교호 사용과 보호살균제에 중점을 두고 수립하였다. A 처리구는 보호제 없이 침투이행성 살균제만을 살포한 처리구이며 각각의 B, C, D, E 처리구는 A 처리구 사이에 병원균의 존재 여부와 일정한 간격을 유지하면서 침투이행성 살균제 대신 Captan, Chlorothalonil, Mancozeb, Copper의 보호살균제를 살포하는 처리구로 설정하였음. 따라서 각 처리구는 총 10회 살포 함. 살균제 살포가 처리된 일자 는 강우가 예상되어 노균병 발병 가능성이 높아지거나 LAMP 진단법을 이용하여 병원균의 존재가 확인되는 시기를 고려하여 약제 살포일을 조정하였음(표 1).

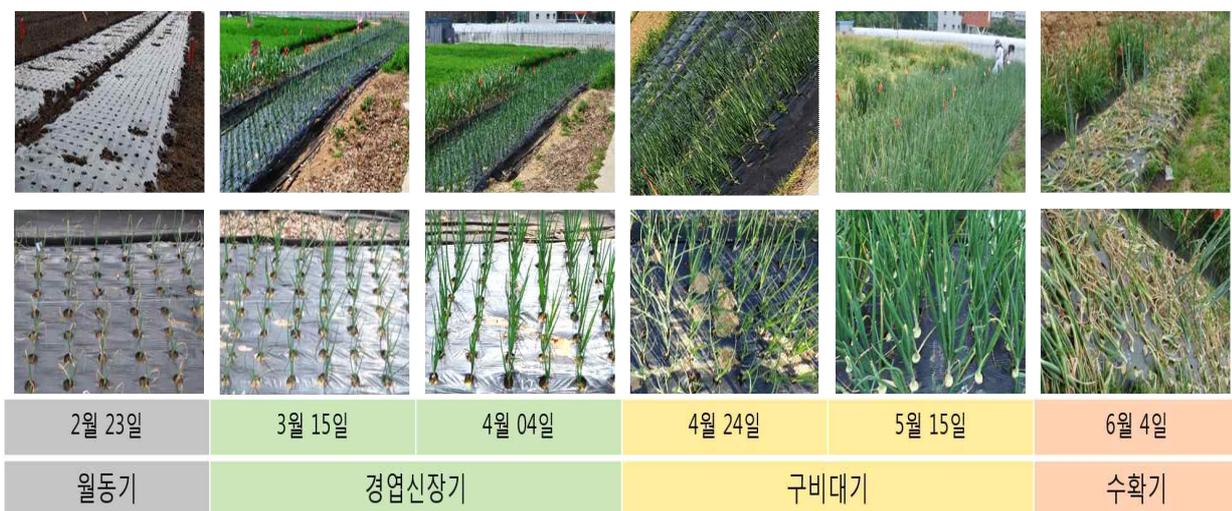


그림181. 노균병 조기 진단법을 이용하여 노균병을 방제하기 위해 살균제를 이용한 방제력 개발 및 방제력 효과 검정을 실시한 양파 포장 모습

	Con	A	B	C	D	E
02.23	Fluopicolide + Propamocarb hydrochloride					
03.05	Dimethomorph	Captan	Chlorothalonil	Mancozeb	Copper	
03.15	Cyazofamid					
03.25	Propamocarb hydrochloride	-	Chlorothalonil	Mancozeb	Copper	
04.04	Dimethomorph + Pyraclostrobin					
04.14	Oxathiapiprolin	Captan	Chlorothalonil	Mancozeb	-	
04.24	Pyraclostrobin					
05.02	Dimethomorph	-	Chlorothalonil	Mancozeb	Copper	
05.08	Cyazofamid					
05.18	Propamocarb hydrochloride	Captan	Chlorothalonil	Mancozeb	Copper	

표 1. 양파 노균병 방제를 위한 방제력

○ 양파 포장에서 발생한 노균병 조사 방법은 그림182에서 확인할 수 있듯이 양파에 발생한 양파 노균병균의 포자 발생 면적을 조사하여 그림 9번의 지수(Index)에 의해 발병심각도(Disease Severity)를 측정 및 산출하였고 이러한 발병심각도를 이용하여 방제가(Control Value)를 산출하였음(그림183). 지수에 의해 산출된 발병심각도를 볼 경우 Copper 처리가 된 E 처리구에서 가장 낮은 발병심각도와 동시에 95.72%의 가장 높은 방제가를 나타냄. A 처리구는 43.61%, B 처리구는 26.41%, C 처리구는 39.4%, 그리고 D 처리구는 73.47%로 나타났음. Mancozeb이 처리된 D 처리구가 E 처리구 다음으로 낮은 발병심각도를 나타내고 있으며 방제가는 73.47%로 E 처리구와도 유의미한 차이를 보임(그림183). 이 결과는 2018년 한해에 이루어진 결과이므로 내년에 양파 포장에서 재차 확인 후 비SCI급 논문에 투고할 생각임.

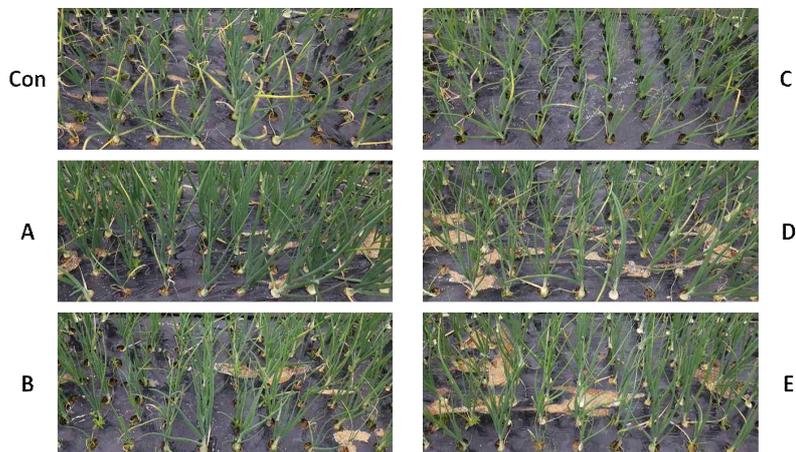


그림182. 노균병 발병심각도 조사 시점의 각 처리구 모습

Ex) A 처리구 1번 식물체(잎수 8개)

포자 발생 면적							
	0	5% ↓	5~10% ↓	10~30% ↓	30~60% ↓	60~90% ↓	90~100
Index	1	2	3	4	5	6	7
Value	0	2.5	7.5	20	45	75	95

$$\begin{aligned}
 & \begin{array}{l}
 1\text{번 잎} \cdot 0 \rightarrow 0 \\
 2\text{번 잎} \cdot 0 \rightarrow 0 \\
 3\text{번 잎} \cdot 4 \rightarrow 20 \\
 4\text{번 잎} \cdot 5 \rightarrow 45 \\
 5\text{번 잎} \cdot 6 \rightarrow 75 \\
 6\text{번 잎} \cdot 7 \rightarrow 95 \\
 7\text{번 잎} \cdot 7 \rightarrow 95
 \end{array} \\
 & \rightarrow \frac{(0+0+20+45+75+95+95)}{7(\text{잎수})} \\
 & = \frac{330}{7} \\
 & = 47.14285
 \end{aligned}$$

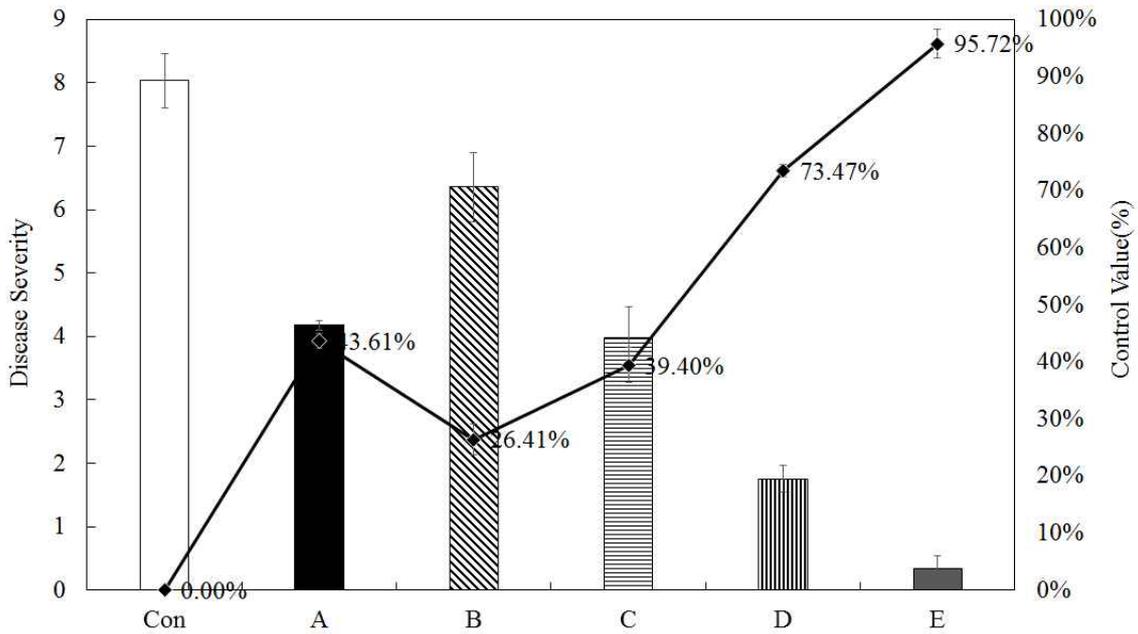


그림183. 양파 노균병 발병심각도 조사 방법과 각 처리구의 방제 결과

- 이러한 연구결과를 종합적으로 정리한 결과, 확립된 노균병과 흑색썩음균핵병 조기 진단법을 이용하여 토양에 존재하는 병원균의 밀도를 확인하여 태양열 소독 방법 등과 같은 물리적인 방법을 활용하고 제거하고 육묘단계에서부터 정식 후 본밭까지 병원균의 존재 유무를 확인하면서 적절한 시기에 작용기작을 고려한 적절한 살균제를 선택하여 화학적 방법을 효과적으로 적용한다면 양파 농가에 가장 큰 피해를 주는 노균병과 흑색썩음균핵병을 효율적으로 방제할 수 있다는 가능성을 확인하였음.

## ■ 제1협동과제 연구내용 및 결과

### (1) 1차년도 연구내용 및 결과

#### 가. 노지 현장적용이 가능한 필드 서버 플랫폼 개발

##### 1) 환경 기술

- 작물은 환경 조건에 따라 생육 상태, 병해, 환경장해 등이 발생하며, 이는 수확량의 수급 불균형을 초래하여 급격한 수확량 변동은 물론 작물의 가격불안을 유발함. 최근 지구온난화에 따른 기후변화에 따라 자연재해가 빈번히 발생하며, 이에 대한 인명 및 재산 피해의 규모가 매해 크게 증가하고 있음. 기후의 급변으로 인해 기존의 예측방법에 의해 예측하기가 더욱 어려워지고 있는 실정으로, 특수한 환경에서의 기상데이터 획득에서 오는 문제점들을 극복하기 위한 안정적이고 효율적인 환경 계측 모니터링 시스템을 개발하고자 아래의 그림과 같이 구성함.

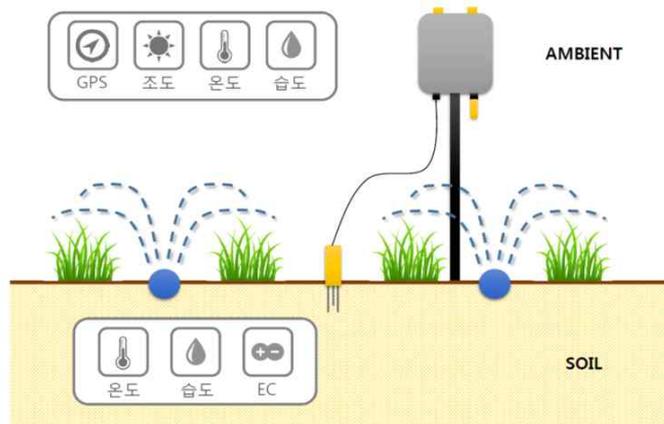


그림184. 모니터링 시스템 구성도

- 모니터링 시스템은 GPS를 부착하여 위도와 경도의 정보를 제공하여 아래의 그림과 같이 현재 위치를 알려주고 있음. 실험장소는 다음 그림과 같이 충남대학교 부속농장에서 데이터 측정을 실시함.



그림185. 위성으로 바라본 모습



그림186. 충남대학교 부속농장

○ 아래의 그림과 같이 모니터링 시스템을 지지할 수 있는 프레임을 부속농장 노지에 고정 시켜 스탠드에서 조도센서와 GPS센서의 데이터 값을 측정함. 다음 그림과 같이 노지의 위치가 조도센서에 직사광선으로 인하여 매우 취약한 곳으로서 센서 바깥쪽에 투명 막을 씌워 보호기능을 하였으며 GPS센서의 움직임을 없애기 위해서 고정 할 수 있는 판을 놓음.



그림187. 프레임 설치



그림188. 조도센서와 GPS센서

#### Frame Spec

	주요사양	비고
Frame	Stand : 1 m (L) x 1 m (W) x 2 m (H) Sensing arm : 1 m Material : Aluminum	Movable stand type Frame arm up/down

- 토양수분을 측정하기 위해 온·습도 센서와 EC센서를 측정할 수 있는 센서를 환경 계측 모니터링 시스템에서 1m정도 떨어진 자리에 핀을 꽂았으며 이는 아래의 그림과 같음. 모니터링 시스템의 내부 모습은 다음 그림과 같이 오랜 기간 측정할 수 있게 병렬형태로 만들었으며 일정한 데이터 값을 얻기 위해서 주기는 20분 단위로 측정하여 실험을 함.



그림189. 토양수분 센서



그림190. 환경 계측 모니터링 시스템 내부 모습

- 아래의 그림과 같이 데이터 통신은 전원 버튼을 누르게 되면 자동으로 GPS 센서가 감지하여 현재 위치를 나타내주는 위도와 경도의 값이 나오며 데이터 시간 간격은 20분 간격으로 설정을 하면 SD카드로 데이터가 저장이 되어서 다음 그림과 같이 확인이 가능함.



그림191. GPS 데이터 통신

Index	Time	Intensity	Temperat.	Humidity(	Temperat.	Humidity(	EC(Soil)	Diagnosis
	[GMT+9]	[Lux]	[deg C]	[%RH]	[deg C]	[%VWC]	[ds/m]	[PASS/FAIL]
1	0 20.05.2016	51219	31.35	46.12	26.7	11.4	11.4	PASS
11	1 20.05.2016	51219	32.75	42.02	27.2	11.4	11.4	PASS
12	2 20.05.2016	51174	33.21	41.99	27.4	11.3	11.5	PASS
13	3 20.05.2016	51727	33.27	40.76	27.5	11.3	11.5	PASS
14	4 20.05.2016	52152	33.2	38.95	27.8	11.4	11.4	PASS
15	5 20.05.2016	24736	32.05	41.42	28.1	11.4	11.4	PASS
16	6 20.05.2016	41606	32.01	40.97	27.9	10.9	11.9	PASS
17	7 20.05.2016	48096	31.94	40.42	28.1	11.2	11.6	PASS
18	8 20.05.2016	33488	32.16	40.16	28.2	11.2	11.6	PASS
19	9 20.05.2016	48635	33.32	39.45	28.2	11.3	11.5	PASS
20	10 20.05.2016	46935	32.73	41.26	28.5	11.2	11.6	PASS
21	11 20.05.2016	37676	32.62	36.2	27.7	9.9	11.1	PASS
22	12 20.05.2016	40782	32.29	36.83	26.5	9.4	11.7	PASS
23	13 20.05.2016	32801	31.85	35.17	26.5	9.9	11.1	PASS
24	14 20.05.2016	31512	31.19	42.87	26.6	10.1	10.8	PASS
25	15 20.05.2016	25764	31.91	38.27	26.7	10.3	10.6	PASS
26	16 20.05.2016	23925	31.54	38.26	26.5	9.9	11.1	PASS
27	17 20.05.2016	22715	31.4	41.04	26.4	9.6	11.4	PASS
28	18 20.05.2016	14876	29.86	41.16	26.2	9.3	11.8	PASS
29	19 20.05.2016	12829	29.87	41.98	25.7	8.6	12.7	PASS
30	20 20.05.2016	4437	27.88	46.58	25.3	8.4	13	PASS
31	21 20.05.2016	2642	25.96	54.66	24.8	7.6	13.1	PASS
32	22 20.05.2016	1228	23.94	59.34	24.4	7.3	13.6	PASS
33	23 20.05.2016	172	22.5	58.61	23.9	6.8	14.7	PASS
34	24 20.05.2016	6	20.99	60.06	23.4	6.5	15.3	PASS
35	25 20.05.2016	0	20.02	65.57	22.9	6.3	15.8	PASS
36	26 20.05.2016	0	19.48	66.2	22.6	6.1	14.7	PASS

그림192. 센서 데이터 값

## 나. 작물 표현형 이동식 측정을 위한 영상획득 시스템 개발

○ 농업에서 생산량은 온도, 습도 등의 다양한 기후 조건 및 토양의 함수율, 유/무기물, 지온 등의 환경 조건과 매우 밀접한 관계를 가지고 있으며 이러한 환경조건의 변화에 따라 다양한 장애, 병해 발현 및 작물의 생육을 결정 짓게 됨. 그러므로 양파, 마늘의 실시간 모니터링 시스템을 개발 목표로 영상장치를 위해 필요한 영상획득 시스템을 개발함.

### 1) PID 제어

○ PID제어는 자동제어 방식 가운데서 가장 흔히 이용되는 제어방식임. PID란 P(Proportional) : 비례, I(Integral) : 적분, D(Differential) : 미분의 3가지 조합으로 제어하는 것으로 유연한 제어가 가능하며, 본 연구에서는 영상획득 시스템의 상/하 이동을 위하여 아래의 그림과 같은 특성을 갖는 PID 제어를 사용함.

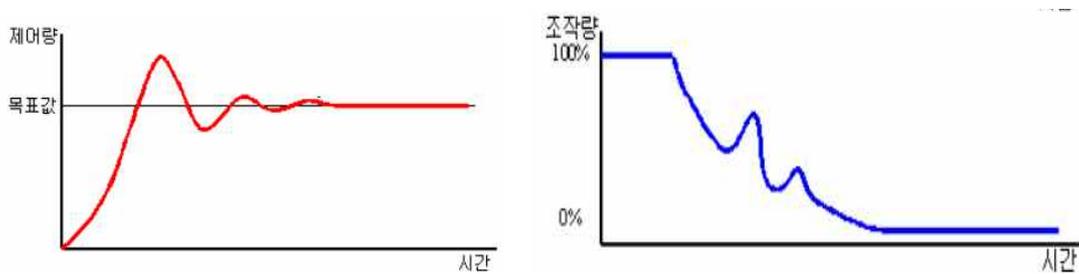


그림193. PID제어 특성

### 2) 설계

#### 가) 영상장치

○ 양파와 마늘의 생육 모니터링을 위한 영상장치는 주위의 모든 환경을 볼 수 있게 360° 회전이 가능하게 설계하였으며 카메라의 길이와 폭은 아래의 그림과 같음.

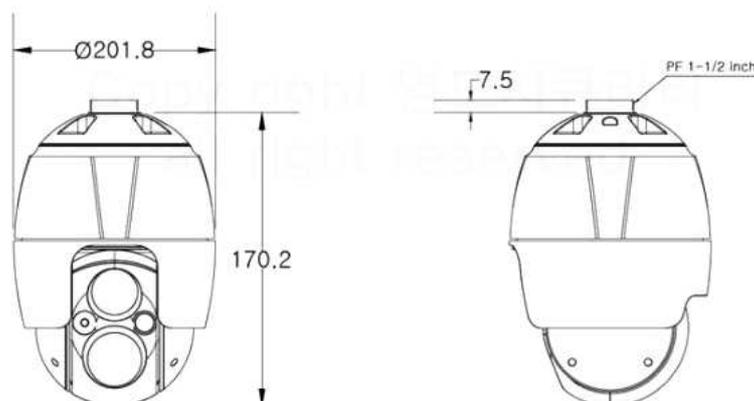


그림194. Camera 도면

나) 리프팅 장치

○ 영상장치의 상/하 이동이 가능하게 할 수 있는 스탠드를 개발하여 암의 상하, 회전 운동 및 영상 장치 자체의 회전 운동을 통해 넓은 면적의 작물 생육 정보를 효과적으로 측정할 수 있는 리프팅 장치를 개발함. 또한 카메라가 비가오거나 눈이 올 때 방수 역할을 할 수 있게 보호막을 만들어서 비가 내릴 때에도 촬영을 할 수 있게 만들었음. 아래의 그림은 CATIA V5를 이용하여 도면을 설계한 모습임.

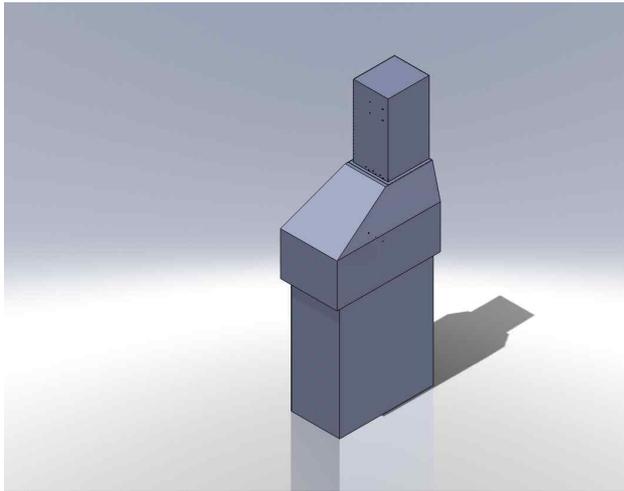


그림195. 등각도

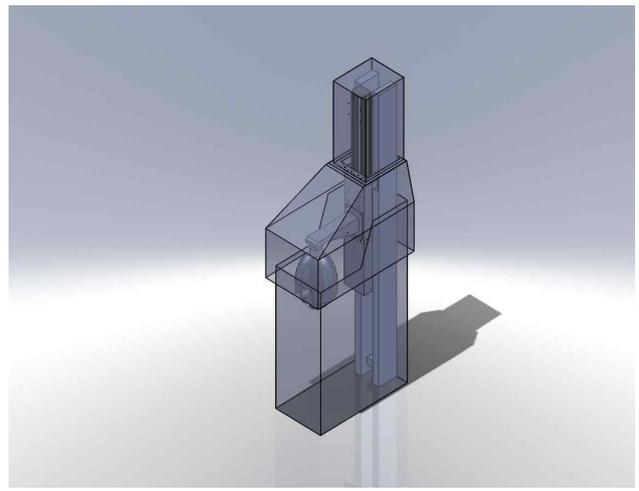


그림196. 등각도(투명)

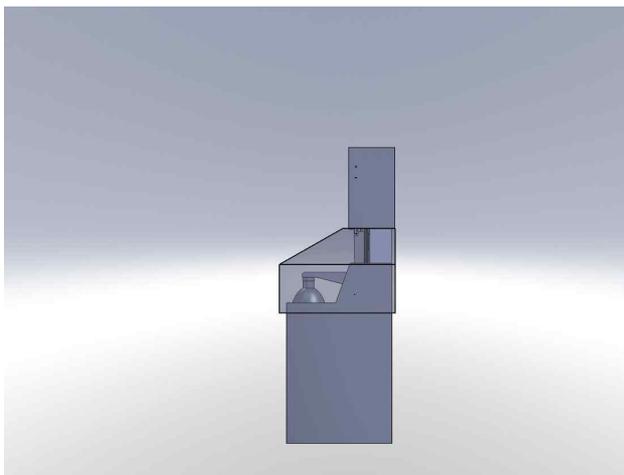


그림197. 촬영하지 않을 때의 우측면도

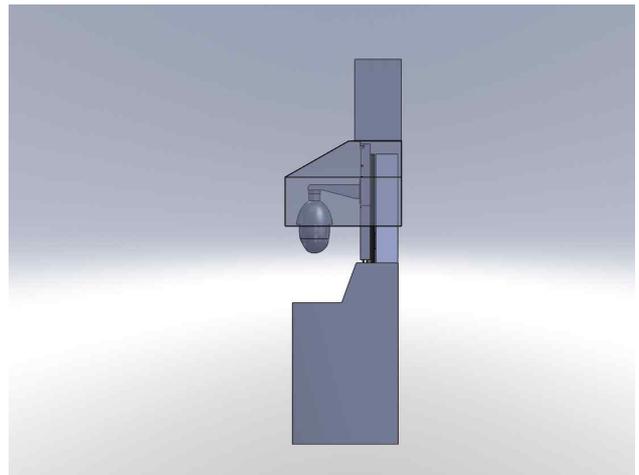


그림198. 촬영할 때의 카메라 측정위치의 우측면도

3) 1차년도 시제품

가) CCD 카메라

○ 아래의 그림과 같이 영상 장치인 CCD 카메라는 작물의 생육환경을 자세히 볼 수 있게 32배 줌에서 최대 512배까지 가능 할 수 있는 렌즈를 사용하였으며 촬영해야 하는 특징에 맞게 가변 IR 투광기를 장착함으로써 야간에 항상 촬영을 할 수 있게 구성함.



그림199. CCD 카메라

### CCD Camera Spec

	Specification
Image sensor	- 1/28" Sony Exmor CMOS
Lens	- Optical 32 times zoom(Auto focus) - Digital 16 times zoom
Resolution	- Full HD (1920 x 1080p)
Scanning system	- Progressive Scan
Day & Night	- True Day & Night(ICR)
Intelligent Video	- Movement detection, Tempering, imaginary space & line
Panning	- 360° , a 380° revolution per sec (maximum)
Tilting	- 200°(-10°~190°), a 380° revolution per sec (maximum)
Preset	- 256 Preset position - 8 Tours, 8 patterns,
Image compression	- H.264 (baseline, Main-profile, High profile), MJPEG
Streaming	- Triple streaming (2 x H.264, 1 x MJPEG)
Transmission rate	- 1080P@60fps
Audio	- Input/Output x2 - output x2(G.711)
Power consumption	- DC12V ± 10% - 3.0A(36W)
Operating temperature / Operating humidity	- 30°C ~ 50°C - 0~90%RH
Size / Weight	- 201.83(D) x 370.78(H)mm - 4.9kg

나) 모터 장치

○ 카메라의 상/하 이동이 가능할 수 있도록 스탠드에 모터를 부착함. 아래의 그림과 같이 상/하 이동이 가능한 Servo Motor는 32bit 고속 DSP를 이용하여 고속, 고정도의 Full Digital 제어를 구현하였으며 오토 튜닝 기능이 있어 조작이 쉬우며 속도제어 범위가 1:3000으로 고정도 제어가 가능한 모터를 사용함. 다음 그림과 같이 실제 모터를 스탠드에 부착한 모습이며 아래의 그림은 1차 시제품임.



그림200. Servo Motor



그림201. 스탠드에 카메라 부착모습



그림202. 1차 시제품

### 사용제품 Spec

	Specification
Servo motor	100W, max
	3000rpm
	전자 제어 방식 brake 장착
전원	단상 200V
통신 제어 기능	RS232 protocol
Stage Working distance	550mm
Sensor	상한, 하한 Limit sensor 부착
Lifting weight	15kg, Max

#### 다) 영상 촬영

- 상/하 이동이 가능한 CCD 카메라는 충남대학교 부속 농장 환경 계측 모니터링 시스템 옆에 설치하였으며 영상으로 획득한 주변 환경은 아래의 그림과 같음.



그림203. 설치된 카메라로 촬영한 주변 환경

#### 라) 모터 구동 시스템

- 모터 구동 시스템 구성은 아래의 그림과 같이 PC, 데이터 입출력 장치, 모터 드라이버, 서보 모터, 경사계로 구성함. 서보 모터 제어는 전자 제어 방식을 가지고 브레이크를 장착하였다. 양방향 제어가 용이한 모터 드라이버(MD5-HF28, Autonics, KOREA)를 사용했으며, 0~5.25V의 디지털 입력과 0~3.8V의 16비트 디지털 출력이 가능한 데이터 입출력 장치(6212, National Instrument, USA)를 이용함.

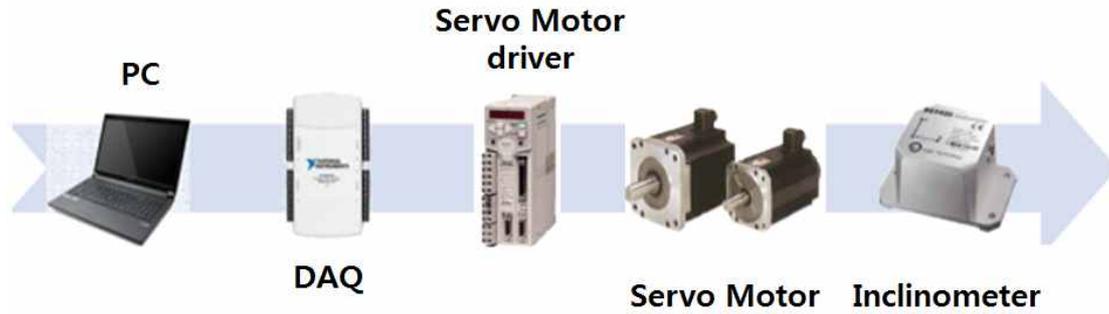


그림204. 모터 제어 방법

- 모터의 제어를 위해서는 가장 간단한 형태면서 가장 많이 사용하는 비례 제어기 (Proportional controller), 시스템의 정상 상태 오차를 줄이는데 사용되는 적분 제어기 (Integral controller), 감쇠기의 영향을 증가시켜서 출력 값의 변동을 줄이는 역할을 하는 미분 제어기(Derivative controller)의 특성을 적용한 PID 제어기를 사용하여 모터를 제어할 수 있도록 함. PID 제어계수는 trial-error 방식으로 선정하였고, 반복 실험을 통하여 각도에 따른 오차를 측정하기로 했다. trial-error 반복 실험에 적용된 PID 제어기 식은 (1)과 같음.

$$G_c(s) = K_p(1 + \frac{1}{T_i} + T_d) \dots\dots\dots \text{식 (1)}$$

$$K_p = 1.2 \frac{T}{L}, K_i = \frac{K_p}{2L}, K_d = K_p \times 0.5L$$

마) 모터 구동 시스템

- 영상획득장치의 상/하 이동을 위해 LabVIEW 프로그램을 이용하여 펄스를 생성해 모터를 작동시킴. 아래의 그림은 모터의 제어를 위한 펄스 생성 블록다이어그램을 나타낸 것이며, 생성된 펄스는 데이터 입출력 장치를 통해 스텝핑 모터 드라이버의 CW포트에 입력되고, 회전 방향 제어 신호는 CCW포트에 입력됨. 각 모터의 회전방향에 변화를 주어 사용자가 입력한 각도에 도달했을 때 펄스의 생성을 중단함.

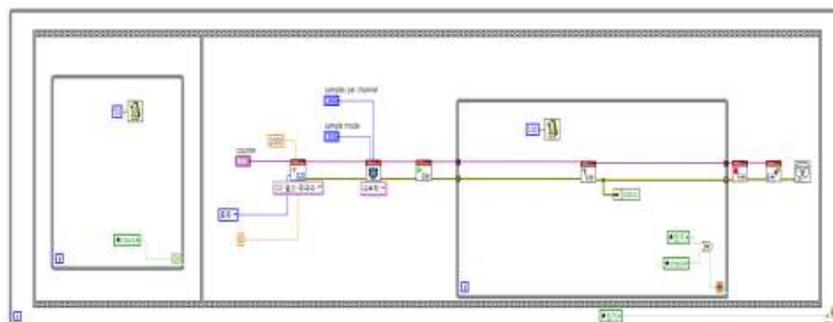


그림205. 모터 제어를 위한 펄스 신호 생성

- 아래의 그림은 모터의 회전 방향 제어를 위한 블록다이어그램으로 입력한 각도에 도달하지 못하면 모터를 구동시켜 리프팅을 올리고 입력된 각도에 도달하면 리프팅이 정지됨. 만약 입력한 각도를 초과하면 리프팅을 내리도록 케이스 구문을 이용함.

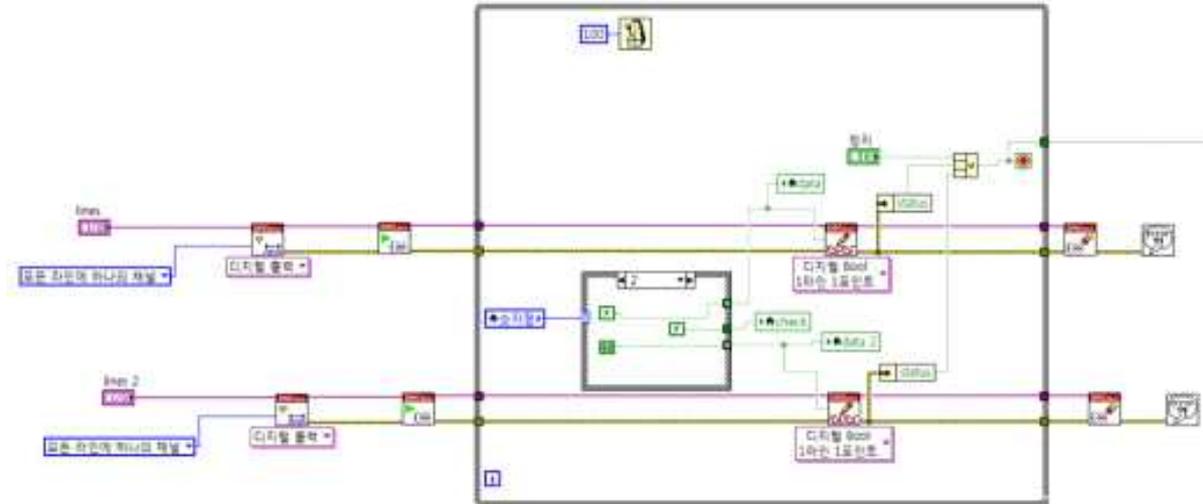


그림206. 모터의 회전방향 제어

## 다. 생육 환경 정보 센싱 시스템 개발

### (1) 센싱 시스템 구성

#### (가) 센서

##### 1) 외기 센서

- 대기의 온도와 습도를 측정하고자 외기 센서를 사용하였으며 내부는 서미스터로 온도에 따라 저항이 변화하며, 설치 장소에 열이 누적되지 않게 하기 위하여 모니터링 시스템 아래에 부착을 함. 또한 비나 눈이 많이 올 경우 수막현상을 방지하기 위하여 보호막을 만들어서 아래의 그림과 같은 센서를 사용함.



그림207. 외기 센서

### Relative Humidity Spec

Parameter	Condition	min	typ	max	Units
Resolution	-	0.1	0.05	0.05	%RH
		8	12	12	bit
Accuracy SHT10	typical	±4.5			%RH
Accuracy SHT11	typical	±3.0			%RH
Accuracy SHT15	typical	±2.0			%RH
Repeatability	-	-	±0.1	-	%RH
Hysteresis	-	-	±1	-	%RH
Non-linearity	-	-	<<1	-	%RH
Response time	$\tau(63\%)$	-	8	-	s
Operating Range	-	0	-	100	%RH
Long term drift	-	-	<0.5	-	%RH/yr

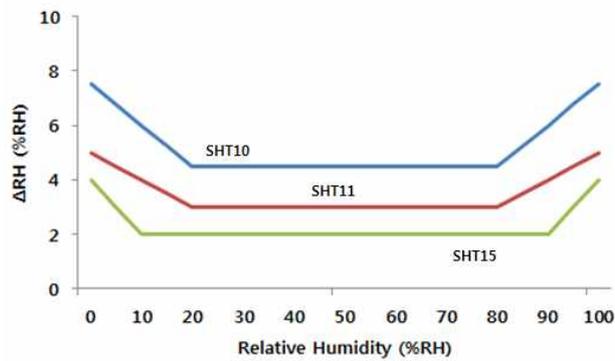


그림208. Humidity Accuracy

### Temperature Spec

Parameter	Condition	min	typ	max	Units
Resolution	-	0.04	0.01	0.01	°C
		12	14	14	bit
Accuracy SHT10	typical	±0.5			°C
Accuracy SHT11	typical	±0.4			°C
Accuracy SHT15	typical	±0.3			°C
Repeatability	-	-	±0.1	-	°C
Operating Range	-	-40	-	-	°C
	-	-40	-	-	°F
Response time	$\tau(63\%)$	5	-	30	s
Long term drift	-	-	<0.04	-	°C/yr

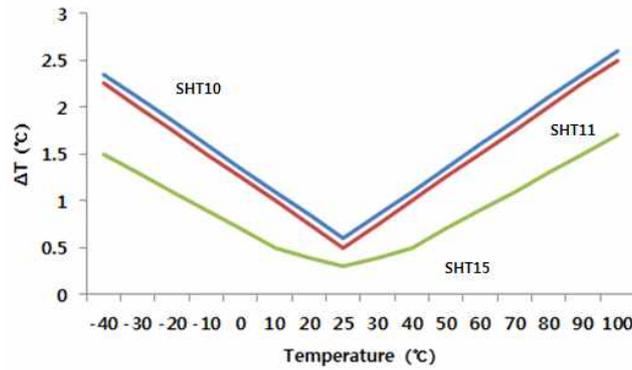


그림209. Temperature Accuracy

2) 토양 진단 센서

- 토양 진단 센서는 토양 온·습도, EC(전도도)를 측정할 수 있도록 구성되어 있으며 주요 기능으로는 토양의 종류를 선택하는 토성 선택, 측정된 결과를 기록으로 보관하는 데이터 저장, 측정된 내역과 평균값 산정을 하는 평균값 계산, 평균값 데이터의 그래프를 볼 수 있는 그래프 보기, 측정값 보정 등임.



그림210. 토양 진단 센서

토양 진단 센서 Spec

Item	Spec	
Size	φ48mm	Length 250mm (Pin length 115mm )
Measuring RangeMoisture(측정범위)	0 - 99.9%	
Tmeperature	0 - 60°C	
AccuracyMoisture (오차)	± 3%	
Temperature	± 0.5°C	
Power SupplyDC	9-15[V]	
Operating Range	60°C	
SizeProbe length	11.5cm	
∅	48mm	
Current	25mA	

3) 조도 센서

- 빛의 밝기에 따른 데이터 값을 위해 조도 센서를 사용하였으며 사용한 센서는 1 ~ 65535lx의 넓은 범위와 높은 해상도를 가지고 있고, 광원 의존성이 적으며, 적외선의 영향이 매우 작음.



그림211. 조도 센서

조도 센서 Spec

Item Parameter	Spec		
	Symbol	Limits	Units
Supply Voltage (공급전압)	Vmax	4.5	-
Operating Temperature (작동온도)	Topr	-40~85	-
Storage Temperature (저장온도)	Tstg	-40~100	-
SDA Sink Current (SDA 싱크전류)	Imax	7	-
Power Dissipation (전력손실)	Pd	260*	-
Vcc Voltage (Vcc전압)	-	-	V
I <sup>2</sup> C Reference Voltage (I <sup>2</sup> C 기준전압)	-	-	V

3) GPS



그림212. NEO6 GPS

GPS Spec

Item	Spec		
	Accuracy	Position	2.0 m CEP
SBAS		2.5 m CEP	
sensitivity	Tracking	-162 dBm	-161 dBm
	Cold starts	-148 dBm	-147 dBm
	Hot starts	-157 dBm	-156 dBm
Acquisition	cold starts	26s	
	Hot/Aided starts	1s	

(나) 데이터 수집 장치

1) 하드웨어

- 환경 계측 모니터링 시스템의 데이터 수집 장치로는 아래의 그림과 같이 범용성이 좋으며, 다양한 센서 확장이 용이한 마이크로컨트롤러인 Arduino(Uno, Italy)를 이용함.

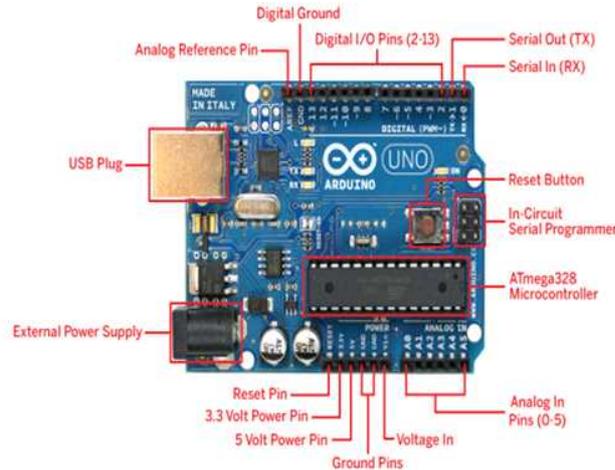


그림213. Arduino Uno

Arduino Uno Spec

Item	Spec
Microcontroller	ATmega328
Operating Voltage	5V
Input Voltage (recommended)	7-12V
Digital I/O Pins	14 (of which 6 provide PWM output)
Clock Speed	16MHz
Length / Width / Weight	68.6mm / 53.4mm / 25g
Flash Memory	32KB (ATmega328) of which 0.5 KB used by bootloader

- 아두이노 우노에 마이크로컨트롤러는 아래의 그림과 같이 Atmega328을 사용하였는데 마이크로컨트롤러란 마이크로프로세서와 입출력 모듈을 하나의 칩으로 만들어 특정 기능을 수행하는 작은 컴퓨터를 말하는데 아두이노는 이러한 마이크로컨트롤러 보드와 관련된 개발 도구 및 환경을 모두 포함함. 아두이노의 장점으로는 소프트웨어 개발을 위한 통합개발환경(IDE)가 제공되며 컴파일 된 펌웨어(특정 하드웨어 상에서 동작하는 소프트웨어)를 USB를 통해 손쉽게 업로드 할 수 있음. 또한 하드웨어 및 소프트웨어는 오픈 소스 툴이기 때문에 고급 프로그래머들에 의해 작성된 확장 소프트웨어 라이브러리들을 구할 수 있으며, 회로 설계자들이 손쉽게 자신만의 모듈을 만들고 개선할 수 있음.

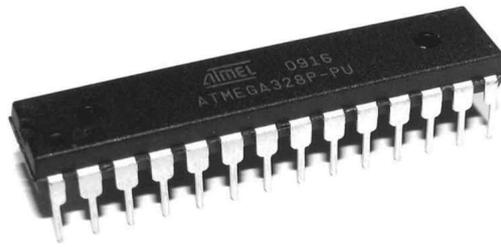


그림214. Atmega328

## 2) 소프트웨어

- 아두이노 소프트웨어는 일반적으로 스케치(Sketch)라고 부르며 Java와 C를 기반으로 개발되는 크로스 플랫폼 응용 소프트웨어이며 구문 강조, 괄호 찾기, 자동 들여쓰기 기능이 포함된 에디터와 한 번의 클릭으로 컴파일과 업로드가 가능한 컴파일러 기능을 포함하고 있음. 아두이노 동작을 위해서 C++ 언어 기반을 사용한다. 컴파일러는 avr-gcc[10]을 사용함. 따라서 avr-gcc가 제공하는 많은 C언어의 표준라이브러리 함수를 사용할 수 있음.

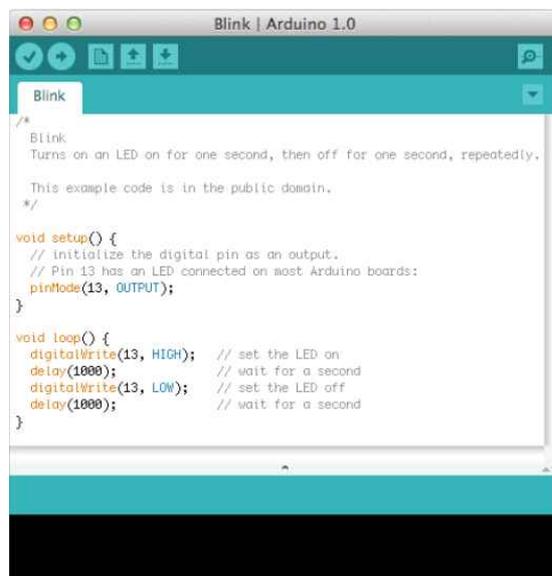


그림215. 스케치(Sketch)

### (다) Arduino 시스템

- 아두이노 우노의 고사양 버전으로 UNO에 사용되는 ATmega328칩을 ATmega2560으로 교체하였고, 플래시 메모리가 UNO의 8배인 256kb로 증가하였다. 하드웨어로 지원되는 시리얼포트가 4개로 증가하였고 입·출력 핀 또한 UNO에는 아날로그, 디지털 핀을 합쳐 20개였다면 아래의 그림과 같이 ATmega2560에는 아날로그, 디지털 핀을 합쳐 70개가 존재함. 전에는 UNO와 Mega시리즈의 하드웨어 핀 배열의 불일치로 호환성 면에서 문제가 있었지만 새 버전에서는 호환이 가능하게 하였다. 입출력 핀이 많아 다수의 디바이스 제어에 적합함.



그림216. ATmega2560

Arduino ATmega2560 Spec

Item	Spec
Microcontroller	ATmega2560(R3)
Operating Voltage	5V
Input Voltage (recommended)	7-12V
Digital I/O Pins	54 (of which 14 provide PWM output)
Clock Speed	16MHz
Length / Width / Weight	101.52mm / 53.3mm / 37g
Flash Memory	256 KB (8 KB bootloader)

라. 실험방법

○ 실험방법은 노지에 환경 계측 모니터링 시스템을 설치 한 후 환경에 따른 센서의 데이터 값을 얻어서 기상청과의 관계를 분석하는 방법으로 하였으며 환경 계측 모니터링 시스템의 구성도는 아래의 그림과 같음.

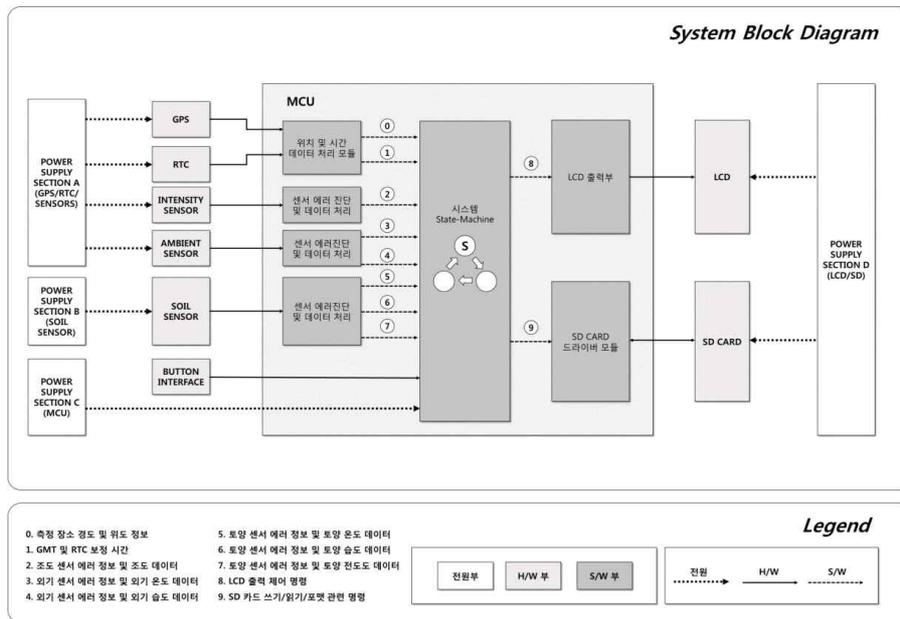


그림217. 블록 다이어그램

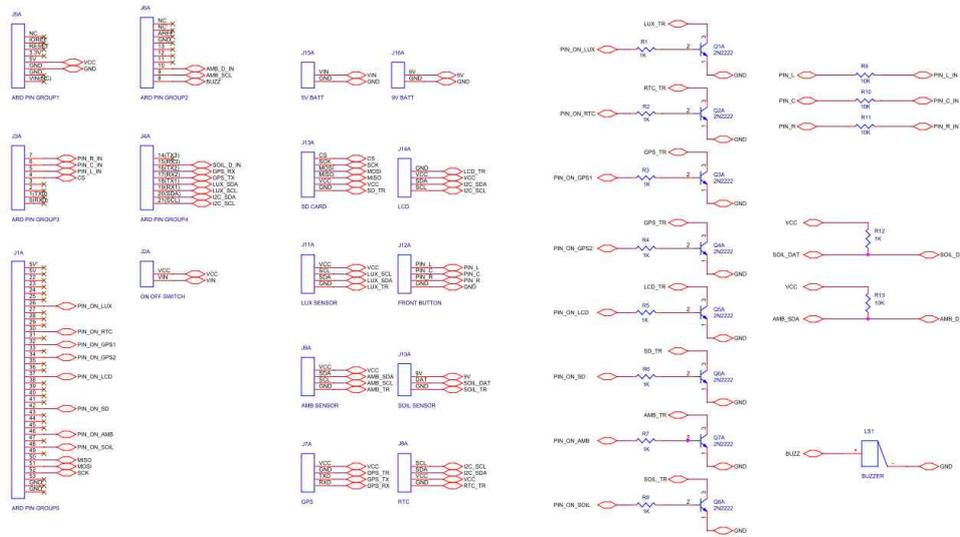


그림218. 환경 계측 모니터링 시스템 구성요소

(2) 데이터 수집 분석

○ 데이터 수집을 통한 비교 분석 방법은 모든 환경과 장소를 통일하여 오전, 오후로 나눠서 각 센서별로 비가 내리지 않은 날과 비가 내린 날, 비 오기 전날, 비가 온 다음날을 비교하여 분석함. 실험은 3개월 간 진행하였으며, 본 보고서에서는 대표적인 7일간의 데이터 값을 추출하여 분석함.

(가) 비가 내리지 않은 날

1) 조도

○ 환경 계측 모니터링 시스템이 설치된 장소의 비가 내리지 않은 날 일주일간의 조도값을 분석한 결과 오전은 평균적으로 00:14분 ~ 04:34분까지 최소값 0이 나왔으며 오후는 평균적으로 20:14분 이후로 최소값 0의 데이터 값을 얻음. 최대값은 오전에는 11:00분 ~ 12:00분, 오후는 13:00분 ~ 14:00분에 가장 높은 조도 값을 얻음.

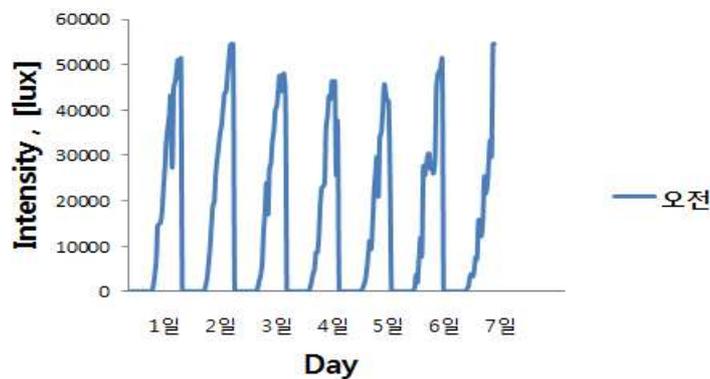


그림219. 일주일 간 비가 내리지 않은 날의 조도(오전)

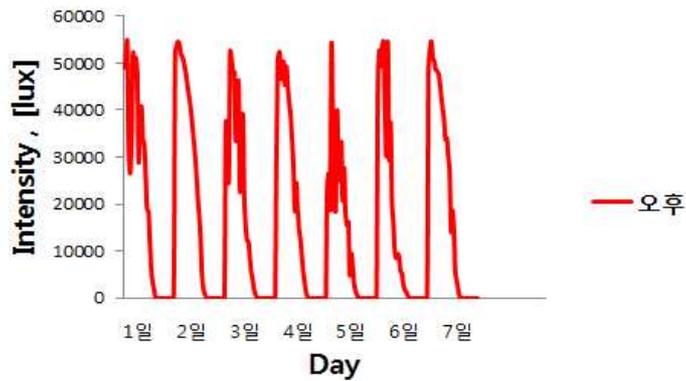


그림220. 일주일 간 비가 내리지 않은 날의 조도(오후)

2) 대기 온도

○ 환경 계측 모니터링 시스템이 설치된 장소의 비가 내리지 않은 날 일주일간의 대기 온도를 분석한 결과 오전은 평균적으로 05:00분 ~ 06:00분에 가장 온도가 낮았으며 오후는 평균적으로 23:00분 ~ 24:00분에 가장 온도가 낮았음. 대기 온도가 가장 높은 시간은 오전에는 11:00분 ~ 12:00분, 오후는 14:00분 ~ 15:00분에 가장 대기 온도가 높았음.

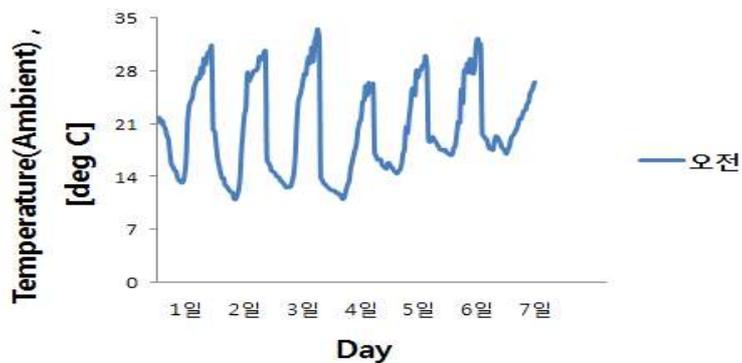


그림221. 일주일 간 비가 내리지 않은 날의 대기 온도(오전)

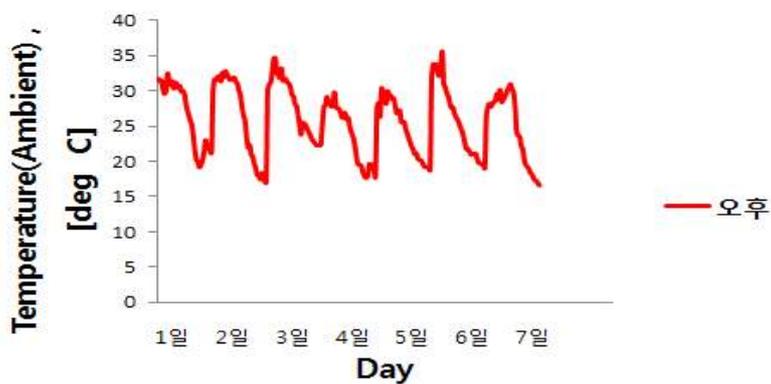


그림222. 일주일 간 비가 내리지 않은 날의 대기 온도(오후)

### 3) 대기 습도

- 환경 계측 모니터링 시스템이 설치된 장소의 비가 내리지 않은 날 일주일간의 대기 습도를 분석한 결과 오전은 평균적으로 11:00분 ~ 12:00분에 가장 낮았으며 오후는 대기 상태에 따라 가장 낮은 시기가 다르게 나왔음. 대기 습도가 가장 높은 시간은 오전 5시부터 증가하다가 오후는 11:50분 이후로 습도가 줄어듦.

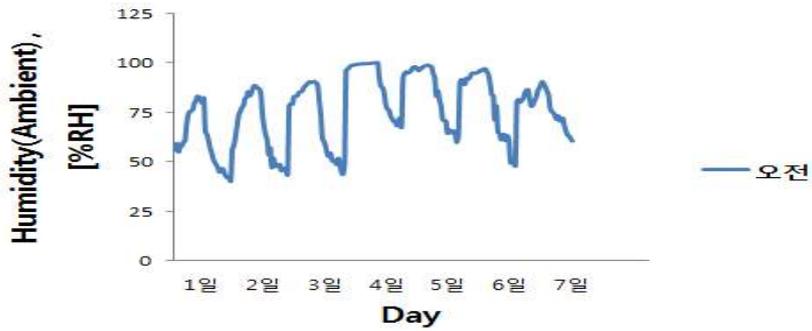


그림223. 일주일 간 비가 내리지 않은 날의 대기 습도(오전)

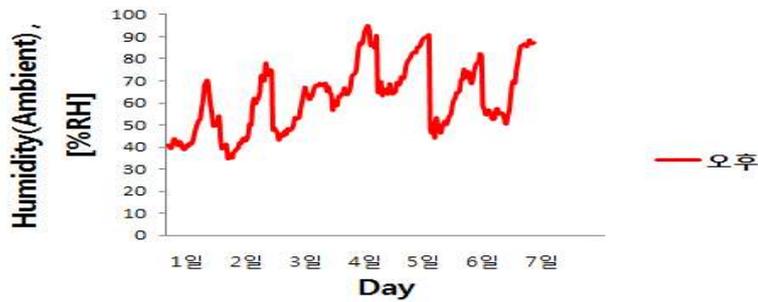


그림224. 일주일 간 비가 내리지 않은 날의 대기 습도(오후)

### 4) 토양 온도

- 환경 계측 모니터링 시스템이 설치된 장소의 비가 내리지 않은 날 일주일간의 토양 온도를 분석한 결과 대기의 온도와 같이 오전 06:00분부터 온도가 서서히 증가하다가 평균적으로 17:54분이 되는 순간 온도가 점점 낮아지는 현상을 볼 수 있었음.

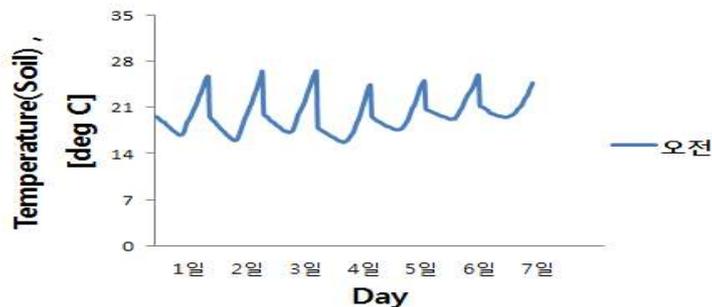


그림225. 일주일 간 비가 내리지 않은 날의 토양 온도(오전)



그림226. 일주일 간 비가 내리지 않은 날의 토양 온도(오후)

5) 토양 습도

○ 환경 계측 모니터링 시스템이 설치된 장소의 비가 내리지 않은 날 일주일간의 토양 습도를 분석한 결과 토양 온도는 대기 온도가 올라가면 같이 올라가고 내려가면 같이 내려가는 경향을 보였는데 토양 습도의 경우에는 대기 습도와는 관계가 없는 걸로 결과가 나왔으며 06:30분부터 습도가 증가하였으며 13시 이후로는 습도가 하락함.

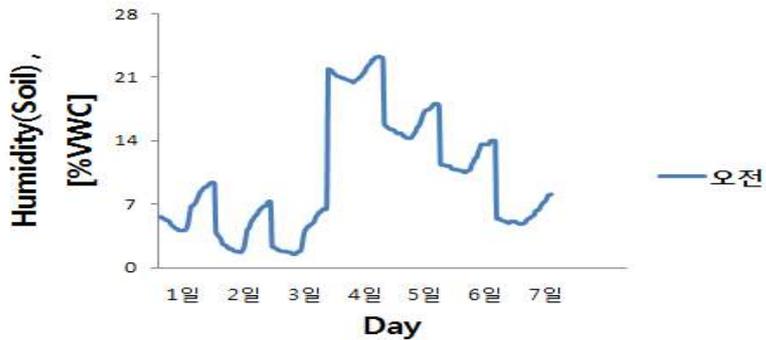


그림227. 일주일 간 비가 내리지 않은 날의 토양 습도(오전)

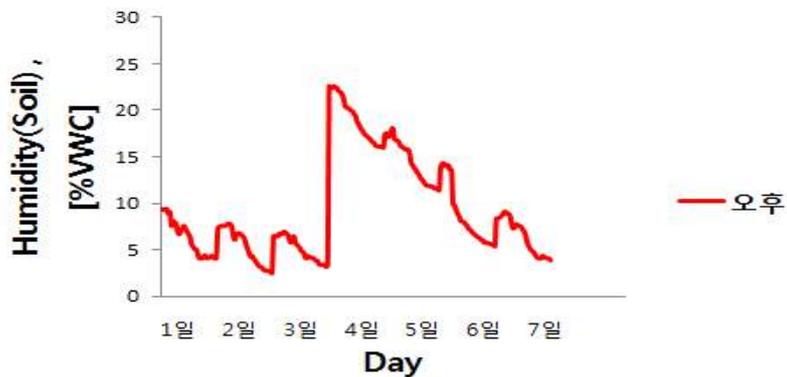
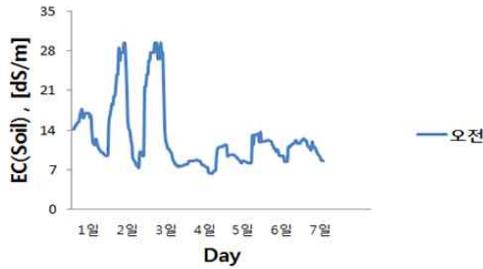


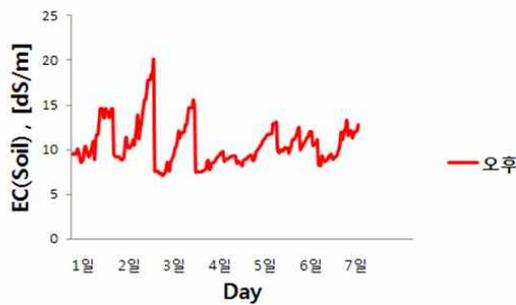
그림228. 일주일 간 비가 내리지 않은 날의 토양 습도(오후)

6) 토양 전도도

- 환경 계측 모니터링 시스템이 설치된 장소의 비가 내리지 않은 날 일주일간의 토양 전도도를 분석한 결과 05:00분 일 때 데이터의 최고값을 나타냈으며 06:00분 이 후로 전도도가 다시 감소하였으며 17:00분일 때 최저값을 나타냈으며 그 이후로는 다시 증가하는 경향을 보임



일주일 간 비가 내리지 않은 날의 토양 전도도(오전)



일주일 간 비가 내리지 않은 날의 토양 전도도(오후)

(나) 비가 내린 날

1) 조도

- 환경 계측 모니터링 시스템이 설치된 장소의 비가 내린 날 조도값을 분석한 결과 오전에는 비가 내리지 않은 날보다 조도값이 약 10배 가까이 낮게 나왔으며 최대값은 약 11:00분으로 동일하게 나타남 오후는 14:34분에 최대 값을 나타내었다가 서서히 감소하다 16:34분에 급격히 올라갔다가 시간이 지날수록 낮아지는 것을 알 수 있음

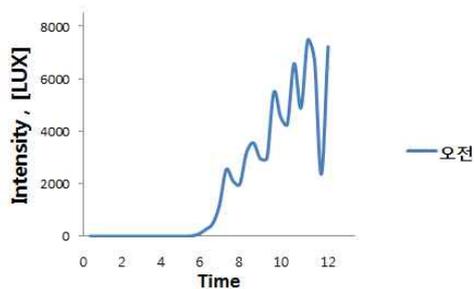


그림229. 비가 내린 날의 조도(오전)

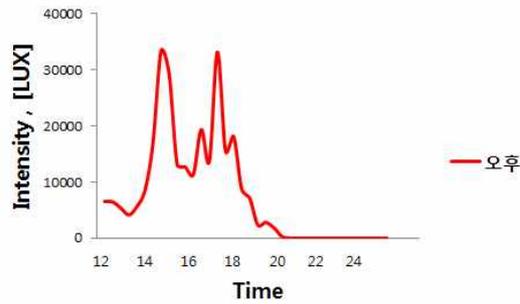


그림230. 비가 내린 날의 조도(오후)

## 2) 대기 온도

- 환경 계측 모니터링 시스템이 설치된 장소의 비가 내린 날 대기 온도를 분석한 결과 오전은 00:00분 이후로 조금씩 계속 감소하다가 09:00분에 다시 온도가 올라갔으나 다시 줄어드는 추세를 보임 오후에는 온도가 올라가다가 17:00분 가장 높은 온도를 보였으나 그 이후로 계속 줄어드는 추세를 보임 비가 내리지 않은 날과 비교하였을 때 온도의 최고 기온이 14:00분이 아니라 17:00분이라는 차이점을 보임

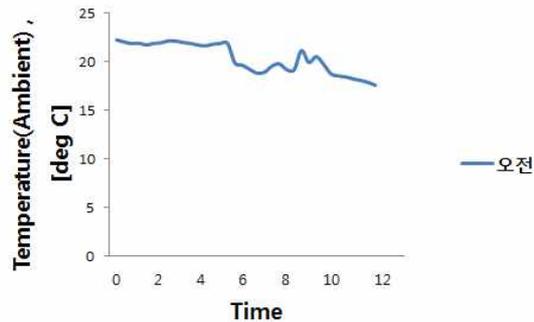


그림231. 비가 내린 날의 대기 온도(오전)

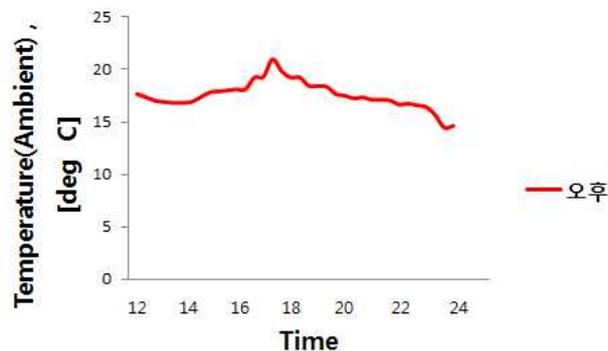


그림232. 비가 내린 날의 대기 온도(오후)

### 3) 대기 습도

- 환경 계측 모니터링 시스템이 설치된 장소의 비가 내린 날 대기 습도를 분석한 결과 비가 본격적으로 내리기 시작한 05:00분부터 오전과 오후의 대기 습도가 증가하다 14:00분 최고값을 나타냈으며 평균적으로 일정한 데이터를 보임

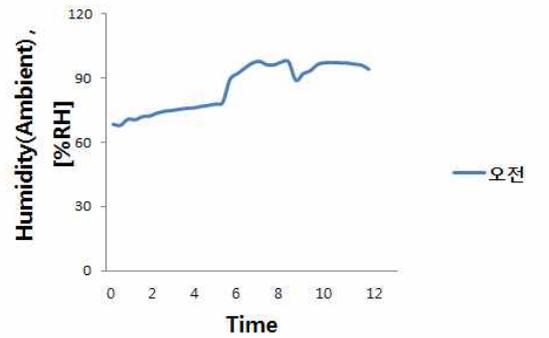


그림233. 비가 내린 날의 대기 습도(오전)

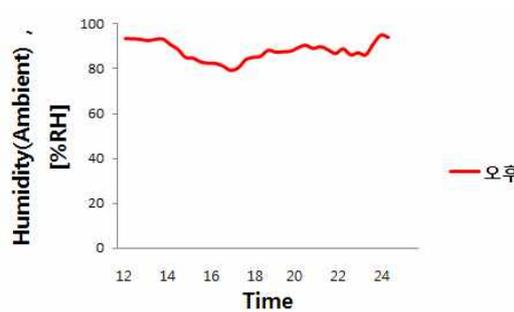


그림234. 비가 내린 날의 대기 습도(오후)

### 4) 토양 온도

- 환경 계측 모니터링 시스템이 설치된 장소의 비가 내린 날 토양 온도를 분석한 결과 토양의 온도는 평균적으로 20 ~ 23°C 사이를 유지하였으며 대기 온도와 비슷한 17:00분에 최대값이 나타남.

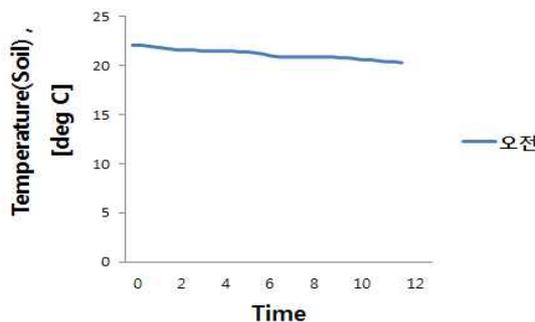


그림235. 비가 내린 날의 토양 온도(오전)

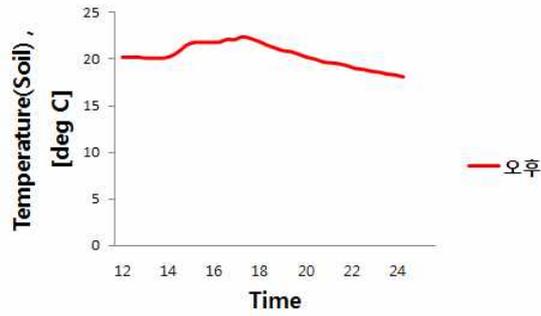


그림236. 비가 내린 날의 토양 온도(오후)

5) 토양 습도

- 환경 계측 모니터링 시스템이 설치된 장소의 비가 내린 날 토양 습도를 분석한 결과 06:00분 부터 13:00분까지 데이터가 급격히 상승하다 13:30분에 최대값을 보임. 그 이후 비가 서서히 감소하면서 토양 습도도 점차 낮아지는 것으로 나타남.

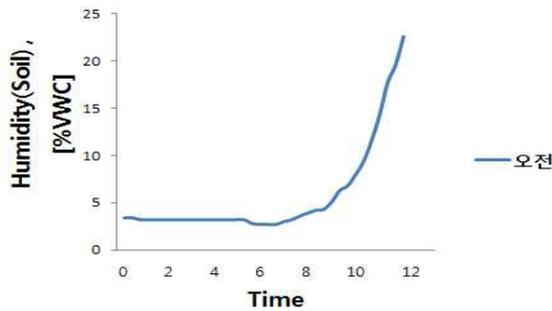


그림237. 비가 내린 날의 토양 습도(오전)

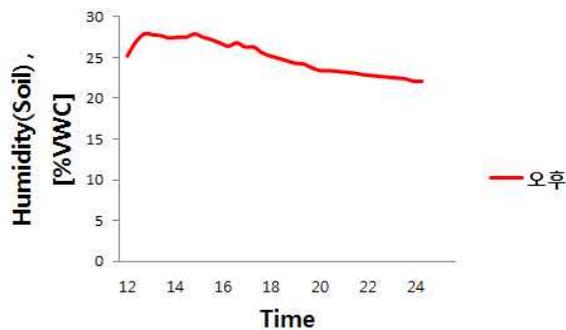


그림238. 비가 내린 날의 토양 습도(오후)

(나) 데이터 측정 결과

1) 비가 내리지 않은 날 데이터 측정 결과(오전)

- 표 4-1은 비가 내리지 않은 날(오전)에 대하여 그 날의 대기 온·습도, 토양의 온·습도, EC의

데이터를 평균, 최대, 최소, 표준편차로 나타내었다. 비가 내리기 전 날의 대기의 온·습도는 평균적으로 비슷한 데이터 값이 나타났지만 비가 내린 날의 대기 온도는 평균적으로 5°C정도 내려갔으며 습도는 급격하게 상승함. 비가 내린 다음 날의 대기 온도는 비가 내린 날의 온도보다 1°C정도 내려갔으며 습도도 소폭 하락함.

비가 내리지 않은 날 데이터 측정 결과(오전)

NO.	항목	Intensity (LUX)	Temperature (Ambient)	Humidity (Ambient)	Temperature (Soil)	Humidity (Soil)	EC(Soil)
1일차	평균	16468.83	21.75	60.84	19.75	6.36	13.60
	최대	51117	31.33	83.07	25.70	9.40	17.70
	최소	0.00	13.18	40.32	16.80	4.10	9.50
	표준편차	19307.24	6.04	14.10	2.63	1.96	2.91
2일차	평균	17311.50	20.03	66.35	19.31	4.03	17.08
	최대	54612	30.69	88.55	26.40	7.30	29.40
	최소	0.00	10.98	43.60	16.00	1.70	7.40
	표준편차	20535.08	7.23	16.09	2.96	2.00	7.54
3일차	평균	15710.94	20.47	71.37	20.06	3.39	18.99
	최대	48000	33.51	90.56	26.50	6.50	29.40
	최소	0.00	12.56	43.67	17.20	1.50	7.60
	표준편차	18726.50	7.64	17.33	2.78	1.87	8.76
4일차	평균	13694.53	16.57	89.70	18.06	21.66	7.83
	최대	46440	26.44	100.02	24.40	23.30	8.80
	최소	0.00	11.02	67.63	15.70	20.40	6.40
	표준편차	17356.49	5.46	12.33	2.53	0.95	0.78
5일차	평균	12793.56	19.95	85.58	19.62	15.84	9.56
	최대	45590	30.02	98.82	25.00	18.10	11.40
	최소	0.00	14.40	59.86	17.60	14.30	8.20
	표준편차	16333.15	5.55	14.12	2.23	1.32	1.13
6일차	평균	14654.33	22.36	80.16	21.05	11.92	11.28
	최대	51354	32.29	96.88	25.90	14.00	13.70
	최소	0.00	16.82	47.99	19.20	10.50	8.50
	표준 편차	18007.61	5.44	16.91	1.97	1.29	1.58
7일차	평균	9988.31	20.24	77.88	20.79	5.78	11.10
	최대	54612	26.52	90.52	24.70	8.10	12.50
	최소	0.00	17.00	60.45	19.50	4.80	8.60
	표준 편차	14962.64	2.68	8.44	1.38	1.03	1.11

○ 아래의 표는 비가 내리지 않은 날(오후)에 대하여 그 날의 대기 온·습도, 토양의 온·습도, EC의 데이터를 평균, 최대, 최소, 표준편차로 나타냄.

비가 내리지 않은 날 데이터 측정 결과(오후)

NO.	항목	Intensity (LUX)	Temperature (Ambient)	Humidity (Ambient)	Temperature (Soil)	Humidity (Soil)	EC(Soil)
1일차	평균	19606.25	26.74	48.68	24.71	6.28	11.41
	최대	54612	32.46	70.26	28.00	9.40	14.60
	최소	0.00	19.18	38.89	19.70	4.10	8.60
	표준 편차	20401.28	4.57	9.39	2.71	1.91	2.23
2일차	평균	21645.75	26.45	51.80	25.65	5.38	12.44
	최대	54612	32.82	78.05	29.70	7.80	20.00
	최소	0.00	16.98	34.85	20.30	2.50	8.90
	표준 편차	22438.00	5.96	14.42	3.12	1.95	3.40
3일차	평균	16307.50	28.02	56.27	26.29	5.13	10.39
	최대	52534	34.67	68.86	29.40	7.00	15.60
	최소	0.00	22.30	43.18	22.20	3.20	7.10
	표준 편차	18707.65	4.09	9.10	2.43	1.30	2.81
4일차	평균	18599.72	23.80	74.41	23.75	19.14	8.59
	최대	52444	29.80	95.04	27.00	22.60	9.80
	최소	0.00	17.67	56.58	19.80	16.00	7.50
	표준 편차	20268.68	4.15	12.18	2.36	2.38	0.75
5일차	평균	12418.53	24.68	75.33	23.76	14.48	10.19
	최대	54036	30.35	90.87	26.20	18.10	13.10
	최소	0.00	18.71	63.26	20.90	11.40	8.20
	표준 편차	14396.40	3.93	9.66	1.79	2.29	1.52
6일차	평균	14977.61	26.05	62.42	25.05	8.61	10.75
	최대	54612	35.52	82.37	28.80	14.30	12.50
	최소	0.00	19.05	44.11	21.40	5.40	9.60
	표준 편차	19971.77	5.18	11.80	2.40	3.16	0.80
7일차	평균	20933.58	24.86	67.18	25.11	6.47	10.43
	최대	54612	30.96	88.49	28.40	9.10	13.30
	최소	0.00	16.61	50.45	20.70	3.90	8.20
	표준 편차	21580.57	5.02	14.33	2.43	1.91	1.58

○ 아래의 표는 비가 내리기 전 날(오전)에 대하여 그 날의 대기 온·습도, 토양의 온·습도, EC의 데이터를 평균, 최대, 최소, 표준편차로 나타냄.

비가 내리기 전 날 데이터 측정 결과(오전)

NO.	항목	Intensity (LUX)	Temperature (Ambient)	Humidity (Ambient)	Temperature (Soil)	Humidity (Soil)	EC(Soil)
	평균	15710.94	20.47	71.37	20.06	3.39	18.99
	최대	48000	33.51	90.56	26.50	6.50	29.40
	최소	0.00	12.56	43.67	17.20	1.50	7.60
	표준 편차	18726.50	7.64	17.33	2.78	1.87	8.76

○ 아래의 표는 비가 내리기 전 날(오후)에 대하여 그 날의 대기 온·습도, 토양의 온·습도, EC의 데이터를 평균, 최대, 최소, 표준편차로 나타냄.

비가 내리기 전 날 데이터 측정 결과(오후)

NO.	항목	Intensity (LUX)	Temperature (Ambient)	Humidity (Ambient)	Temperature (Soil)	Humidity (Soil)	EC(Soil)
	평균	16307.50	28.02	56.27	26.29	5.13	10.39
	최대	52534	34.67	68.86	29.40	7.00	15.60
	최소	0.00	22.30	43.18	22.20	3.20	7.10
	표준 편차	18707.65	4.09	9.10	2.43	1.30	2.81

○ 아래의 표는 비가 내린 날(오전)에 대하여 그 날의 대기 온·습도, 토양의 온·습도, EC의 데이터를 평균, 최대, 최소, 표준편차로 나타냄.

비가 내린 날 데이터 측정 결과(오전)

NO.	항목	Intensity (LUX)	Temperature (Ambient)	Humidity (Ambient)	Temperature (Soil)	Humidity (Soil)	EC(Soil)
	평균	1967.22	20.40	85.81	21.18	5.73	13.91
	최대	7474.00	22.26	97.90	22.10	22.60	18.50
	최소	0.00	17.60	67.99	20.30	2.70	6.60
	표준 편차	2461.04	1.55	11.14	0.51	5.10	3.17

○ 아래의 표는 비가 내린 날(오후)에 대하여 그 날의 대기 온·습도, 토양의 온·습도, EC의 데이터를 평균, 최대, 최소, 표준편차로 나타냄.

비가 내린 날 데이터 측정 결과(오후)

NO.	항목	Intensity (LUX)	Temperature (Ambient)	Humidity (Ambient)	Temperature (Soil)	Humidity (Soil)	EC(Soil)
	평균	7685.89	17.55	87.91	20.41	25.06	6.20
	최대	33358	20.96	94.99	22.40	27.90	7.90
	최소	0.00	14.46	79.31	18.10	22.10	5.00
	표준 편차	9580.37	1.31	4.14	1.25	2.04	1.03

○ 아래의 표는 비가 내린 다음날(오전)에 대하여 그 날의 대기 온·습도, 토양의 온·습도, EC의 데이터를 평균, 최대, 최소, 표준편차로 나타냄.

비가 내린 다음날 데이터 측정 결과(오전)

NO.	항목	Intensity (LUX)	Temperature (Ambient)	Humidity (Ambient)	Temperature (Soil)	Humidity (Soil)	EC(Soil)
	평균	13694.53	16.57	89.70	18.06	21.66	7.83
	최대	46440	26.44	100.02	24.40	23.30	8.80
	최소	0.00	11.02	67.63	15.70	20.40	6.40
	표준 편차	17356.49	5.46	12.33	2.53	0.95	0.78

○ 아래의 표는 비가 내린 다음날(오후)에 대하여 그 날의 대기 온·습도, 토양의 온·습도, EC의 데이터를 평균, 최대, 최소, 표준편차로 나타냄.

비가 내린 다음날 데이터 측정 결과(오후)

NO.	항목	Intensity (LUX)	Temperature (Ambient)	Humidity (Ambient)	Temperature (Soil)	Humidity (Soil)	EC(Soil)
	평균	18599.72	23.80	74.41	23.75	19.14	8.59
	최대	52444	29.80	95.04	27.00	22.60	9.80
	최소	0.00	17.67	56.58	19.80	16.00	7.50
	표준 편차	20268.68	4.15	12.18	2.36	2.38	0.75

(다) 정확도 분석

1) 실제 계측한 값과 기상청 데이터 분석

가) 대기 온도(비가 내리지 않은 날)

○ 실제 계측한 값과 기상청 데이터의 대기 온도의 비교 결과 아래의 그림과 같이 전체적으로 유사한 경향을 보이는 것을 확인 할 수 있었으나, 일부 오차가 발생한 원인은 데이터 수집 대상 지역이 다르기 때문으로 판단됨. 기상청 데이터는 대전 지방 기상청 내에 위치한 장소에

서 측정하였으나 환경 계측 모니터링 시스템이 설치된 장소는 충남대학교 부속 농장이므로 거리 차이가 있어서 오차가 발생한 것으로 판단되며 또한 측정한 장소가 황량한 노지이기 때문에 햇빛에 직접적으로 노출이 많이 되어서 차이가 발생한 것으로 판단됨. 기상청 데이터는 기상자료개방포털에서 기상관측자료를 받아서 분석함.

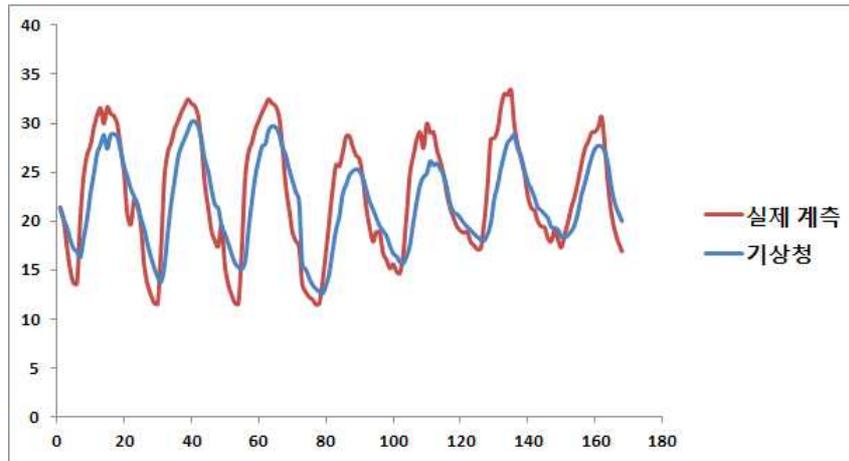


그림239. 실제 계측값과 기상청 데이터의 경향 분석

나) 대기 온도(비가 내린 날)

○ 비가 내린 날의 대기 온도는 위와 마찬가지로 똑같은 영향을 받아서 데이터의 오차가 발생하였으나 아래의 그림과 같이 전체적으로 유사한 경향을 나타내고 있음.

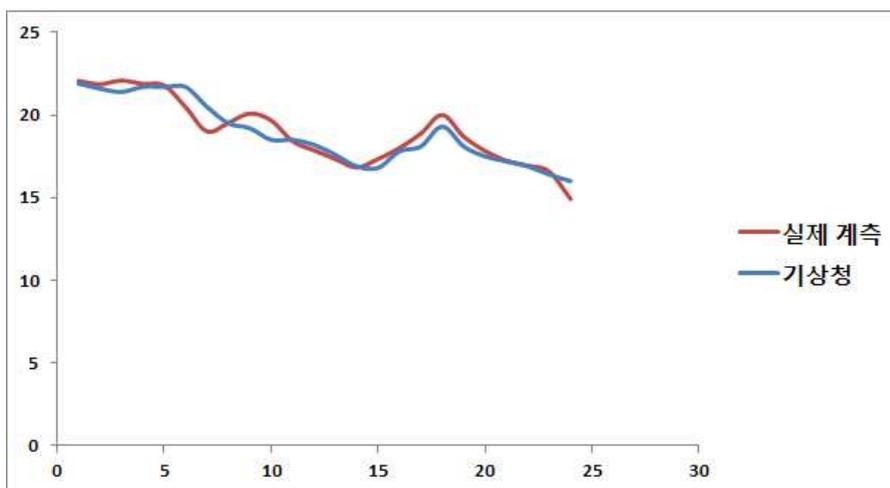


그림240. 실제 계측값과 기상청 데이터의 경향 분석

다) 대기 습도(비가 내리지 않은 날)

○ 실제 계측한 값과 기상청 데이터의 대기 습도의 비교 결과 아래의 그림과 같이 전체적으로 유사한 경향을 보이는 것을 확인 할 수 있었으나, 일부 오차가 발생한 원인은 위에서 말한 바와 같음.

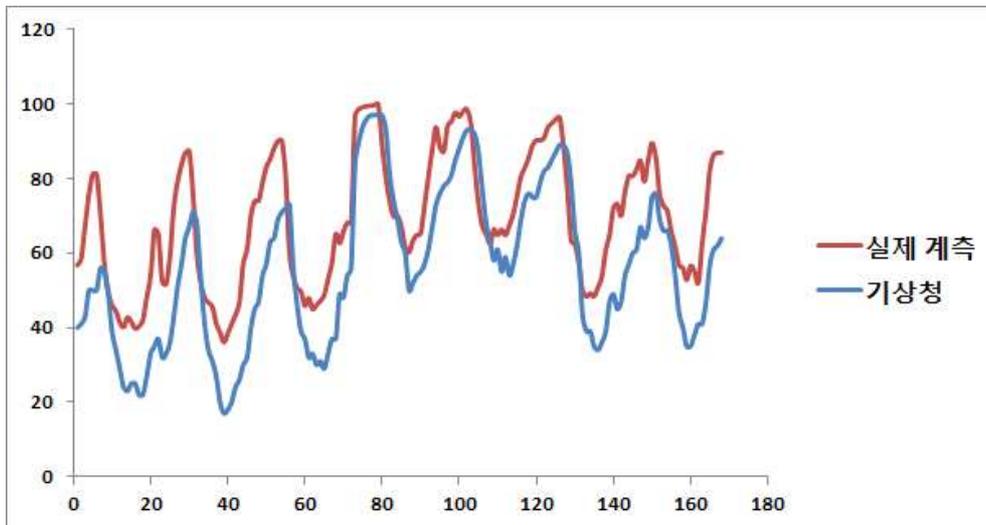


그림241. 실제 계측값과 기상청 데이터의 경향 분석

라) 대기 습도(비가 내린 날)

○ 비가 내린 날의 대기 습도는 위와 마찬가지로 똑같은 영향을 받아서 데이터의 오차가 발생하였으나 아래의 그림과 같이 전체적으로 유사한 경향을 나타내고 있음.

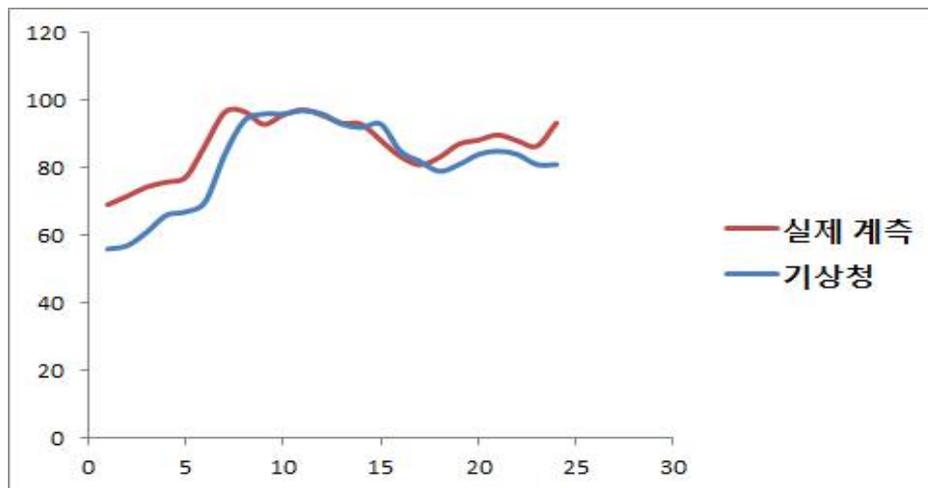


그림242. 실제 계측값과 기상청 데이터의 경향 분석

## (2) 2차년도 연구내용 및 결과

### 가. 생육 모니터링을 위한 영상처리 알고리즘 개발

○ 전 세계적으로 양파는 인구 증가 및 소득 증대와 건강 기능성 식품이 알려지면서 국내 양파 재배면적은 2015년 18,015 ha에서 2016년 19,891 ha로 10.4%가 증가함. 같은 기간 생산량은 1,093천 톤에서 1,298천 톤으로 18.7% 증가하였음. 최근 지구온난화 및 이상기후에 따른 가뭄 스트레스에 의해 양파의 피해가 점점 증가하고 있음. 따라서 기후의 급변으로 인해 기존의 예측방법에 의해 예측하기가 더욱 어려워지고 있는 실정으로, 특수한 환경에서의 기상데이

터 획득에서 오는 문제점들을 극복하기 위한 안정적이고 효율적인 생육 모니터링 장치를 이용한 기후 정보 및 작물 표현형의 데이터 측정을 통한 영상처리 시스템을 개발하고자 아래의 그림과 같이 구성하였음.

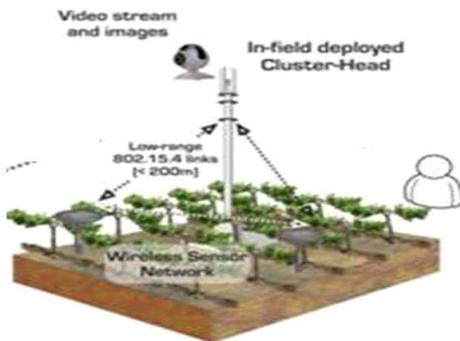


그림243. 영상획득 시스템 구성도

- 영상획득 시스템을 구성하여 영상처리 알고리즘을 개발하였는데 구성은 아래의 그림과 같이 Image noise filtering, HSV conversion, Color distance calculation. Detection by distance threshold, Detection by blob detection, Area rate calculation로 구성하였음.

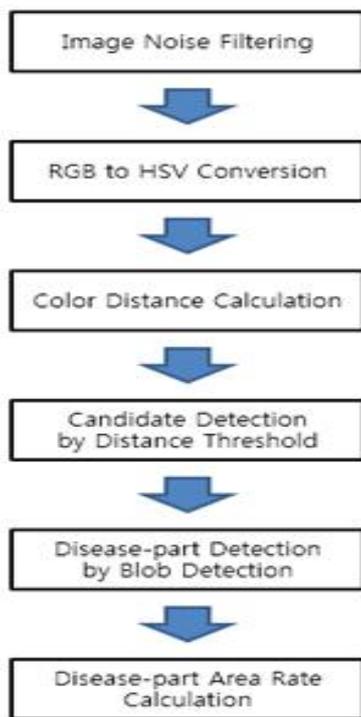


그림244. 영상처리 알고리즘

- 영상처리의 개략도를 살펴보면, 먼저, 양파의 장변, 단변 및 높이를 PTZ 카메라로 이미지를 획득함. Image noise filtering은 입력된 데이터에 low-pass 필터를 이용하여 전처리 과정을 통하여 잡음을 제거함. HSV conversion은 제거된 영상은 빛의 3원색인 Red, Green, Blue의 빛을 서로 더할 때 다양한 색상을 표현하는 방법으로 3차원(R, G, B) 색상공간에서 좌표

로 특정 색상을 나타내는 RGB 색상을 사용하였다. R, G, B의 값이 각각 0 ~ 100사이로 주어졌을 경우 식(1), (2), (3)을 이용하여 H, S, V를 구하였다. 아래 식에서 MAX는 (R, G, B)의 값 중에 최대값을 나타내며, MIN은(R, G, B) 값 중 최소값을 나타냄.

$$H = \begin{cases} 60 \times \frac{G - B}{MAX - MIN} + 0, & \text{if } MAX = R \\ 60 \times \frac{B - R}{MAX - MIN} + 120, & \text{if } MAX = G \\ 60 \times \frac{R - G}{MAX - MIN} + 240, & \text{if } MAX = B \end{cases} \quad (1)$$

$$S = \frac{MAX - MIN}{MAX} \quad (2)$$

$$V = MAX \quad (3)$$

- HSV는 사람의 시각 인식 방법과 비슷한 모델로 구성됨. 아래의 그림과 같이 Hue는 빨강, 파랑, 노랑의 색조를 나타내며 0 ~ 360°범위 값을 갖는다. Saturation은 색의 선명도를 나타내며 0 ~ 100%의 범위 값을 갖음. 그 값은 수평축을 나타내며 중심축에 근접할수록 0에 가깝고 멀어질수록 100에 가까움. Value는 색의 밝기를 나타내며 0 ~ 100%의 범위 값을 갖음. 그 값은 수직축을 나타내며 아래쪽에 갈수록 0에 가깝고 위쪽으로 갈수록 100%에 가까움.

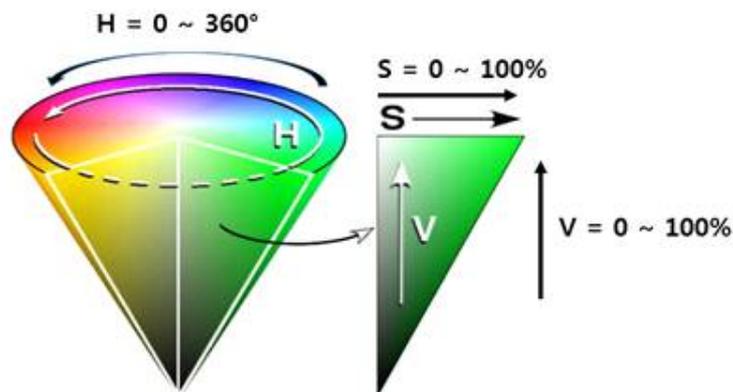


그림245. HSV color space

- Color distance calculation은 필터링한 이미지를 RGB 픽셀 값으로 계산하여 HSV로 변환 후 임의의 색상과의 거리를 계산하여 각 픽셀의 색과 특정 색과의 거리를 측정하함. Detection by distance threshold은 HSV 변환 후 영상 히스토그램을 시각적으로 검사하는 문턱치(threshold) 처리 방법을 통해 문턱치 이하이면 검정색, 문턱치 초과면 노랑색으로 나눔. 문턱치 처리 방법을 이용한 이진화 영상의 효과를 알아보기 위해 각 구성요소 영상은 R, G, B, H, S, V 성분 영상에 시행착오 방법, 자동 문턱치 처리 방법의 Otsu와 ISODATA 방법을 이용해 이진화 영상을 생성하였음. Detection by blob detection은 측정된 데이터를 문턱치 처리 방법을 거친 후 얼룩 검출 방법을 통해 양파 앞의 갈변된 부분을 검출함. Area rate calculation은 검출된 데이터를 통해 이진화 영상과 기존 영상을 육안으로 비교하여 노

균병 검출이 잘 되었는지 확인을 한 후 각 양파 잎간의 질병 면적 발병률을 구함.

#### 나. 생육 모니터링 플랫폼의 데이터 획득 및 제어 시스템 개발

- 영상획득 시스템은 모터를 구동시키는 구동 시스템과 작물을 촬영하는 영상 입력부로 구성하였음. 구동 모터 시스템은 카메라의 상/하 이동이 가능할 수 있도록 스테핑 모터와 모터 제어프로그램으로 구성함. 구동 PC는 영상 입력 컴퓨터와 RS232 시리얼 통신 포트를 통하여 모니터링 PC와 연결하였다. 모터 구동 프로그램은 영상처리부가 보낸 신호를 모터 구동 PC가 수신한 후 모터를 회전시켜 모터를 제어하도록 함. 구동 시스템은 작물의 정확한 측정을 위해 모터의 측정 시간과 각도를 회전시켜 주도록 구축함. 상/하 이동이 가능한 Servo Motor는 32bit 고속 DSP를 이용하여 고속, 고정도의 Full Digital 제어를 구현하였으며 오토 튜닝 기능이 있어 조작성이 쉬우며 속도제어 범위가 1:3000으로 고정도 제어가 가능한 모터를 사용함. 아래의 그림은 카메라 상/하 이동이 가능하게 스탠드에 구동 모터를 장착한 모습과 구동 모터에 카메라를 설치한 모습임.



그림246. 스테핑 모터 장착 모습



그림247. PTZ 카메라 설치 모습

- 영상 입력부는 대상 작물의 영상을 얻기 위한 장치로 영상획득을 위한 Honeywell사의 HDWC-322MIR PTZ 카메라를 사용하였으며 모니터링 및 카메라 제어를 위한 두 대의 컴퓨터로 구성함. PTZ 카메라는 작물의 생육환경을 자세히 확인 할 수 있게 32배 줌에서 최대 512배줌까지 가능한 렌즈를 사용함. 아래의 표는 카메라의 재원을 나타냄.

## PTZ 카메라 재원

Item	Specification
Lens	Optical 32 times zoom(Auto focus) Digital 16 times zoom
Resolution	Full HD (1920 x 1080p)
Scanning system	Progressive Scan
Panning	360°, a 380° revolution per sec (maximum)
Power consumption	DC12V ± 10%, 3.0A(36W)
Size / Weight	201.83(D) x 370.78(H)mm / 4.9kg

- 영상획득 시스템은 아래의 그림과 같이 양파 밭과 영상장치 사이의 거리가 있어 노면에서 약 1.7m 높이의 구조물을 세워 카메라를 설치하여 넓은 반경에서 영상촬영이 가능하게 구축함. 모터의 작동을 위해 스테이지 상한, 하한에 limit sensor를 부착하였으며 모터의 작동거리는 550 mm로 전자 저에 방식 Brake를 장착함. 정확한 측정을 위해 모터를 24°씩 15번 360°를 회전 시켜 주는 구동 시스템을 구성함. 눈이나 비가 올 경우에도 영상을 획득 할 수 있게 영상획득 시스템 외곽에 커버를 설치함. 또한 많은 양의 눈과 비가 올 경우 다음 그림과 같이 우적센서를 통해 자동적으로 접점의 신호를 주어 모터의 구동을 멈추게 구성하였다. 아래의 그림은 우적센서의 기능을 나타냄. 구성된 영상획득 시스템은 다음의 그림과 같음.

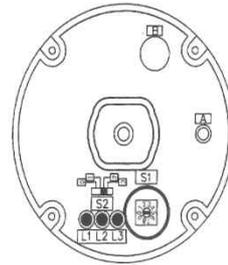


그림248. 영상획득 시스템 구축을 위한 구조물 설치



그림249. 눈과 비가 올 경우 카메라 작동 중지를 위한 우적센서

기능설정 MODE



- L1 LED : 전원 입력시 점등,
- L2 LED : 히터작동시 점등,
- L3 LED (황색) : 안개, 이슬 감지시 황색 점등, (대기상태)
- LED (적색) : 비 감지시 적색 점등, (동작상태)

S1				S2	
ON지연	OFF지연	ON지연	OFF지연	히터 온도	
0	0 sec	10 sec	5	0 sec	30 sec
1	10 sec	10 sec	6	10 sec	60 sec
2	30 sec	10 sec	7	30 sec	2 min
3	60 sec	10 sec	8	60 sec	3 min
4	2 min	10 sec	9	2 min	5 min
				0	0
				1	25* (겨울)
				2	35* (봄, 가을)
				3	45* (여름)

- A 주, 야간 감지센서
- B 케이블입력 - 적색, 흑색 (AC24V, DC24V)  
출력(2COM) - 백색, 녹색 (릴레이 A접점출력)  
황색, 청색 (릴레이 B접점출력)

그림250. 우적센서 기능



그림251. 실시간 영상획득 모니터링 시스템

- 영상획득 시스템의 상/하 이동을 위하여 아래의 그림과 같은 특성을 갖는 PID 제어를 사용함. PID제어는 자동제어 방식 가운데서 가장 흔히 이용되는 제어방식임. PID란 P(Proportional) : 비례, I(Integral) : 적분, D(Differential) : 미분의 3가지 조합으로 제어하는 것으로 유연한 제어가 가능하다. 또한 PID 제어를 위한 제어시스템은 아래의 그림과 같이 컨트롤박스에 구성함. 컨트롤러는 다음 그림과 같이 Wireless JOG controller를 사용하였다. 컨트롤러는 원격 Pan, Tilt, Zoom, Position preset 기능이 가능하며 와이파이 이더넷 통신이 가능함.

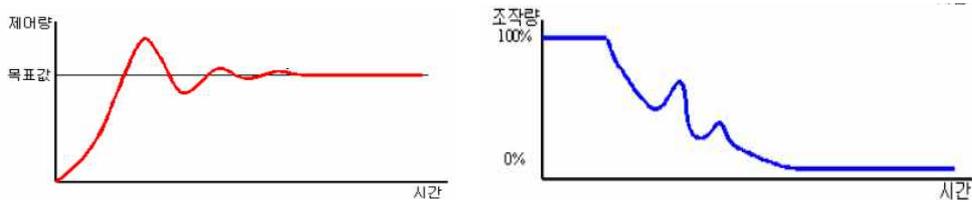


그림252. PID제어 특성



그림253. 제어 시스템 컨트롤박스



그림254. Wireless JOG controller

- 획득한 영상의 이미지 저장장치로는 Embedded logging system과 ITX Embedded PC를 사용함. Embedded logging system은 순차적 위치 이동 기능과 자동 이미지 저장 기능, 순차적 이미지 로깅 기능, 와이파이 이더넷 통신이 가능하도록 구성되어 있음. 아래의 그림은 이미지 저장장치인 ITX Embedded PC은 획득한 영상을 모니터로 출력해주는 PC와 카메라 컨트롤 구동을 할 수 있는 PC로 구성함.



그림255. 획득한 영상 모니터링 PC(왼쪽), 카메라 컨트롤 PC(오른쪽)

## 다. 필드 서버를 이용한 기후정보 및 작물 표현형 데이터 측정

### (1) 작물 표현형 데이터 측정

#### 1) 실험방법

- 본 연구에서 시험 포장 장소는 전남 무안 국립식량과학원 바이오에너지작물센에 위치한 양파밭을 대상으로 함. 선정 이유는 양파는 다른 작물에 비해 잎의 장변, 단변의 성장 정도 및 병해 발생이 가장 잘 일어나는 작물이기 때문임. 양파는 11월 초순에 심은 것을 대상으로 하였으며 아래의 그림은 측정 대상 양파를 나타낸 것임.



그림256. 양파의 실시간 병해 모니터링 계측 장소

- 영상획득 시스템은 양파, 마늘의 병해 및 상태 변화를 예측 할 수 있게 양파, 마늘 밭에서 10m 떨어진 곳에 구성함. 양파, 마늘의 측정시기는 2017년 4월 20일 ~ 5월 1일까지이며 측

정 시간은 오전 07:00 ~ 오후 19:00로 설정함. 영상촬영 시간간격은 각각 다른 위치의 15개의 양파, 마늘을 선정하여 30분 주기로 측정함. 영상획득 시스템을 이용하여 양파의 질병 면적 발병률을 알아보기 위하여 실험기간 동안 양파 노균병이 잘 발생하는 환경에서 측정함. 노균병의 1차 피해 시기인 4월 중순에 측정하였고 토양온도가 25 ~ 28°일 때의 칼라영상을 임의로 4개의 샘플을 선정하여 영상처리 하였음.

## 2) 데이터 측정결과

- 작물의 생육 변화를 확인하기 위하여 동일한 장소에서 마늘 잎의 장변, 단변, 높이를 확인하고자 1일 ~ 10일까지 영상획득 시스템을 통하여 데이터 측정함. 데이터 측정을 통하여 확인한 결과 시간이 지남에 따라 마늘 잎의 색이 갈변이 되는 것을 알 수 있었으며 잎의 기울기가 햇빛의 양에 따라 변함을 알 수 있음. 아래의 그림은 영상획득 시스템을 이용하여 1일부터 10일까지의 마늘의 변화 모습을 보여줌.



1일차(마늘)



2일차(마늘)



3일차(마늘)



4일차(마늘)



5일차(마늘)



6일차(마늘)



7일차(마늘)



8일차(마늘)



9일차(마늘)



10일차(마늘)

- 작물의 생육 변화를 확인하기 위하여 동일한 장소에서 양파 잎의 장변, 단변, 높이를 확인하고자 1일 ~ 10일까지 영상획득 시스템을 통하여 데이터 측정을 함. 데이터 측정을 통하여 확인한 결과 시간이 지남에 따라 양파 잎의 색이 갈변이 되는 것을 알 수 있었으며 잎의 기울기가 햇빛의 양에 따라 변함을 알 수 있음. 아래의 그림은 영상획득 시스템을 이용하여 1일부터 10일까지의 양파의 변화 모습을 보여줌.



1일차(양파)



2일차(양파)



3일차(마늘)



4일차(마늘)



5일차(양파)



6일차(양파)



7일차(양파)



8일차(양파)



9일차(양파)



10일차(양파)

○ 획득한 영상을 통해 노균병 감염을 판단하고자 영상처리를 양파 잎 영상에 노균병을 제외한 녹색 잎 부분에 검정색을 입히고 이진화 영상을 얻어 면적을 구함. 데이터 선별은 양파 잎의 갈변 현상이 육안으로도 확인이 가능한 데이터를 추출하여 임의의 4개의 샘플을 선정하였음. 영상획득 시스템을 이용하여 PTZ 카메라로 획득한 4개의 샘플 영상은 아래 아래의 그림 (a), (b), (c), (d)과 같이 나타남.



(a) Sample 1



(b) Sample 2



(c) Sample 3

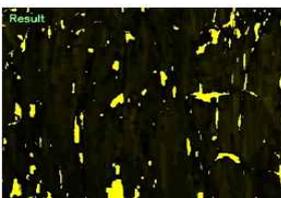


(d) Sample 4

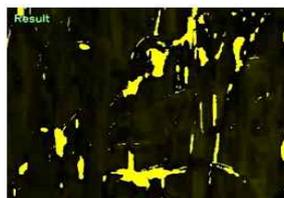
그림257. 실시간 모니터링 시스템의 영상획득 이미지

### 3) 영상처리 결과

○ 임의의 4개체를 영상처리한 결과 양파, 마늘 잎의 질병 면적 발병률은 아래 그림과 같이 감지된 감염 질병 비율은 (a)는 5.34 %, (b)는 6.94%, (c)는 3.38%, (d)는 4.40%로 나타남. 그 결과 현재 1차 노균병 감염 상태에 걸렸으며 (b)가 가장 큰 질병 면적을 보유하고 있는 것으로 판단됨. 아래의 표는 영상 크기와 양파 잎의 갈변으로 인식된 검출율과 제거율로 분류하여 나타냄.



(a) Sample 1



(b) Sample 2



(c) Sample 3



(d) Sample 4

그림258. 양파의 영상처리 결과

병해 인식 결과

No	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Disease-part area rate (%)	5.34	6.94	3.38	4.40

○ 양파, 마늘의 노균병은 육안으로 구별할 때 비해 정확한 판단이 어려우므로 수치로 된 문턱치 처리방법을 통하여 이진화 영상을 확인하면 정확한 질병 면적 비율을 알 수 있음. 하지만 영상처리 과정에서 잎의 갈변 부분만 색출하지 않고 양파, 마늘 밭의 흙까지 인식을 하여 오차가 발생함. 본 연구에서 개발한 영상획득 시스템 장치를 이용하면 시간의 경과에 따른 양파, 마늘의 생장 상태의 변화 및 병해 발생을 연속적으로 예측 할 수 있었음. 연속적으로 측정된 생장 상태에 관한 정보와 영상처리를 이용하면 각 생육단계에 알맞은 환경을 효과적으로 공급해 줄 수 있을 것으로 판단됨. 그러나 양파, 마늘 잎 주변의 다른 환경요소도 인식을 하여 오차가 발생한 것으로 보아 추가적인 영상 처리 방법이 필요한 것으로 판단됨.

(2) 환경 계측 모니터링을 이용한 필드 기후정보

1) 실험 방법

○ 본 연구는 다양한 환경조건에서의 작물의 생육환경을 계측할 수 있는 모니터링 시스템을 개발함. 모니터링은 기상청과의 데이터를 비교하여 실제 측정된 값과 정밀도를 비교 분석함. 정밀도를 분석하기 위해 사용한 조건은 대기온도, 대기습도, 조도, 토양온도, 토양습도, EC(전도도)를 분석함. 양파, 마늘의 측정시기는 2017년 4월 20일 ~ 5월 1일까지이며 측정 시간은 오전 07:00 ~ 오후 19:00로 설정함. 실험장소는 아래의 그림과 같이 전라남도 무안 국립식량과학원과 일반 농가의 양파, 마늘밭에서 데이터 측정을 실시함.



그림259. 위성으로 바라본 모습(국립식량과학원)



그림260. 전라남도 무안 국립식량과학원 양파, 마늘밭



그림261. 위성으로 바라본 모습(일반 농가의 양파, 마늘밭)



그림262. 일반 농가의 양파, 마늘밭

- 아래의 그림과 같이 모니터링 시스템을 지지할 수 있는 프레임을 각각 국립식량과학원, 일반 농가의 밭 노지에 고정 시켜 스탠드에서 대기 온·습도, 토양 온·습도, 토양 EC, 조도, GPS의 데이터 값을 측정함. 아래의 그림에서 노지의 위치가 조도센서에 직사광선으로 인하여 매우 취약한 곳으로서 센서 바깥쪽에 투명 막을 씌워 보호기능을 하였으며 GPS센서의 움직임을 없애기 위해서 고정 할 수 있는 판을 놓음.



그림263. 환경 계측 모니터링 설치



그림264. 조도센서와 GPS센서

- 토양수분을 측정하기 위해 온·습도 센서와 EC센서를 측정할 수 있는 센서를 환경 계측 모니터링 시스템에서 1m정도 떨어진 자리에 핀을 꽂았으며 이는 아래의 그림과 같음. 모니터링 시스템의 내부 모습은 아래의 그림과 같이 오랜 기간 측정할 수 있게 병렬형태로 만들었으며 일정한 데이터 값을 얻기 위해서 주기는 30분 단위로 측정하여 실험을함.



그림265. 토양수분 센서



그림66. 환경 계측 모니터링 시스템 내부 모습

- 아래의 그림과 같이 데이터 통신은 전원 버튼을 누르게 되면 자동으로 GPS 센서가 감지하여 현재 위치를 나타내주는 위도와 경도의 값이 나오며 데이터 시간 간격은 30분 간격으로 설정을 하면 SD카드로 데이터가 저장이 되어서 다음의 그림과 같이 확인이 가능함.



그림267. GPS 데이터 통신

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	ChugNam University								
2	Bio-Mecha Lab.								
3	Farmiland weather&soil data center								
4	Location	LAT : 34.9(L0T : 126.452209							
5	Start at	30.03.2017 11:59:11							
6	Period	30 Min.							
7									
8	Index	Time	Intensity	Temperatu	Humidity(	Temperatu	Humidity(	EC(Soil)	Diagnosis
9		[(GMT+9)	[LUX]	[deg C]	[%RH]	[deg C]	[%VWC]	[dS/m]	[PASS/FAIL]
10	1512	01.05.2017	0	13.26	89.12	19.1	9.3	9.6	PASS
11	1513	01.05.2017	0	13.78	88.01	18.9	9.1	9.8	PASS
12	1514	01.05.2017	0	14.38	86.14	18.7	9.1	9.8	PASS
13	1515	01.05.2017	0	13.92	88.04	18.5	9.1	9.8	PASS
14	1516	01.05.2017	0	14.02	87.32	18.3	9.1	9.8	PASS
15	1517	01.05.2017	0	13.62	89.08	18.2	8.9	10.1	PASS
16	1518	01.05.2017	0	12.12	92.49	18.1	8.8	10.2	PASS
17	1519	01.05.2017	0	10.94	93.73	17.8	8.6	10.4	PASS
18	1520	01.05.2017	0	9.73	94.46	17.5	8.5	10.5	PASS
19	1521	01.05.2017	0	9	94.8	17.4	8.4	10.7	PASS
20	1522	01.05.2017	12	8.41	95.17	17.1	8.1	11.1	PASS
21	1523	01.05.2017	263	10.95	95.67	16.9	8.4	10.7	PASS
22	1524	01.05.2017	1151	12.38	95.64	16.8	8.5	10.5	PASS
23	1525	01.05.2017	2455	14.06	90.42	16.9	8.8	10.2	PASS
24	1526	01.05.2017	3440	15.36	84.79	17.1	9.1	9.8	PASS
25	1527	01.05.2017	8710	17.1	77.88	17.4	9.4	9.5	PASS
26	1528	01.05.2017	21423	22.34	60	17.7	9.9	10.1	PASS
27	1529	01.05.2017	24714	24.72	53.53	18.1	10.5	9.5	PASS
28	1530	01.05.2017	28163	26.81	48.36	18.8	11.2	8.9	PASS
29	1531	01.05.2017	31734	28.42	42.46	19.5	12.1	7.4	PASS
30	1532	01.05.2017	33899	30.46	37.7	20.5	12.9	6.9	PASS
31	1533	01.05.2017	35003	30.9	36.98	21.6	13.6	6.6	PASS
32	1534	01.05.2017	35330	31.76	36.01	22.7	14	6.4	PASS
33	1535	01.05.2017	36383	33.46	31.02	24	14.3	7.6	PASS
34	1536	01.05.2017	36935	34.32	28.25	25.3	15.5	7	PASS
35	1537	01.05.2017	36740	32.39	38.68	26.8	15.8	6.9	PASS
36	1538	01.05.2017	38027	32.71	38.1	27.9	16	6.8	PASS

그림268. 센서 데이터 값

2) 데이터 측정 결과

○ 데이터 수집을 통한 국립식량과학원과 일반 농가 양파, 마늘 밭에서의 기후환경의 비교 분석 방법은 모든 측정시간을 통일하였으며 임의의 특정 날을 비교 분석함.

(a) 조도

○ 국립식량과학원과 일반 농가 양파, 마늘 밭에서의 조도값을 분석한 결과는 아래의 그림과 같음. 국립식량과학원에서의 최대 조도는 38027, 최소 0, 평균 12128로 나타났으며 일반 농가 양파, 마늘 밭에서는 최대 조도는 40532, 최소 0, 평균 12524로 나타남. 두 지역 모두 05:30분부터 12:30분까지 점점 증가하다가 13:00분부터 점점 감소하는 것을 알 수 있었음. 국립식량과학원에서의 최대 조도 시간은 13:00분으로 나타났으며 농가는 12:30분으로 나타남.

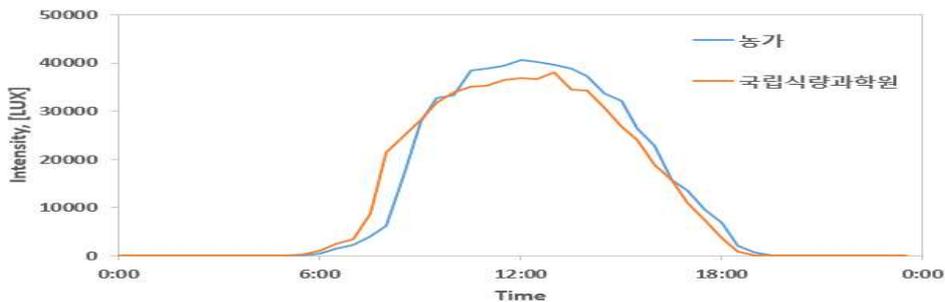


그림269. 농가 → 노균병 다수 발생, 국립식량과학원 → 노균병 발생 무

(b) 대기온도

○ 국립식량과학원과 일반 농가 양파, 마늘 밭에서의 대기온도값을 분석한 결과는 아래의 그림과 같음. 국립식량과학원에서의 최대 온도는 34.32°C, 최소 8.41°C, 평균 20.89°C로 나타났으며 일반 농가 양파, 마늘 밭에서 최대 온도는 29.2°C, 최소 9.9°C, 평균 18.9°C로 나타났음. 두 지역 모두 05:30분부터 12:30분까지 점점 증가하다가 13:00분부터 점점 감소하는 것을 알 수 있었음. 국립식량과학원에서의 최대 온도 시간은 12:00분으로 나타났으며 농가는 14:30분으로 나타남.

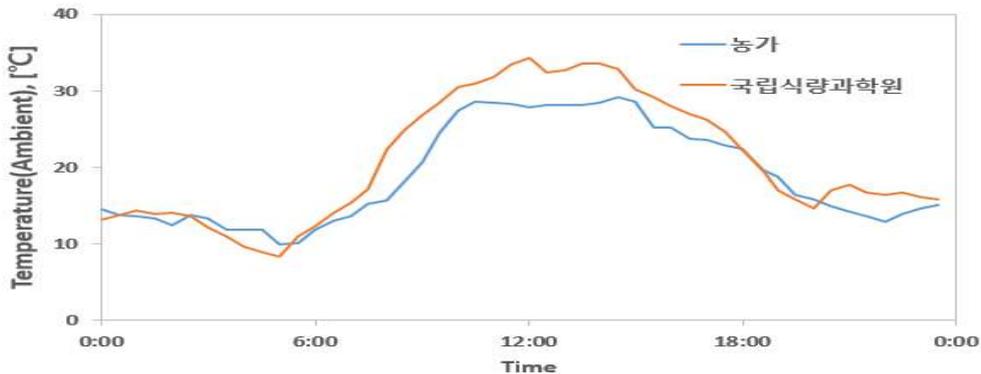


그림270. 농가 → 노균병 다수 발생, 국립식량과학원 → 노균병 발생 무

(c) 대기습도

○ 국립식량과학원과 일반 농가 양파, 마늘 밭에서의 대기습도값을 분석한 결과는 아래 그림과 같음. 국립식량과학원에서의 최대 습도는 95.67%, 최소 28.25%, 평균 65.01%로 나타났으며 일반 농가 양파, 마늘 밭에서 최대 습도는 94.89%, 최소 53.16%, 평균 78.76%로 나타남. 두 지역 모두 05:30분부터 12:00분까지 점점 감소하다가 20:00분까지 증가하는 것을 알 수 있었음. 국립식량과학원에서의 최대 습도 시간은 05:30분으로 나타났으며 농가는 06:00분으로 나타남.

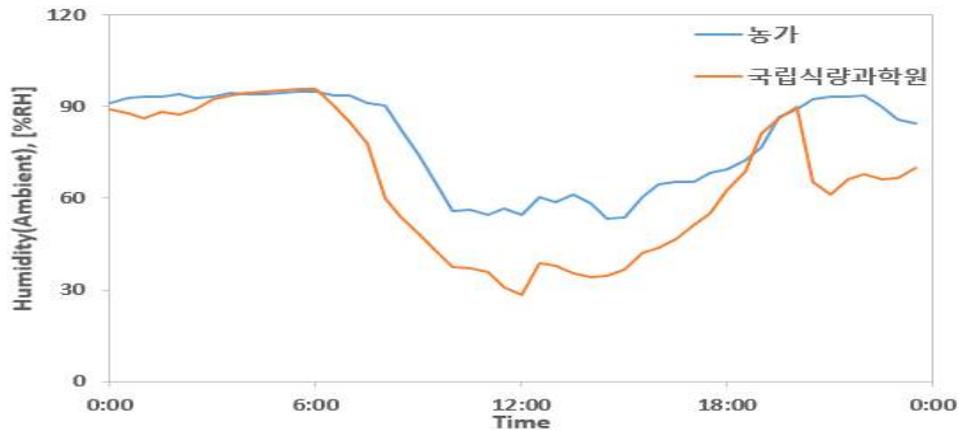


그림271. 농가 → 노균병 다수 발생, 국립식량과학원 → 노균병 발생 무

(d) 토양온도

○ 국립식량과학원과 일반 농가 양파, 마늘 밭에서의 토양온도값을 분석한 결과는 아래 그림과 같음. 국립식량과학원에서의 최대 온도는 29°C, 최소 16.8°C, 평균 21.88°C로 나타났으며 일반 농가 양파, 마늘 밭에서 최대 온도는 27.5°C, 최소 17.8°C, 평균 21.8°C로 나타남. 두 지역 모두 10:00까지 일정한 온도를 유지하다가 그 이후로 16:00까지 점점 증가하는 것을 알 수 있었음. 국립식량과학원에서의 최대 온도 시간은 14:30분으로 나타났으며 농가는 15:00분으로 나타남.

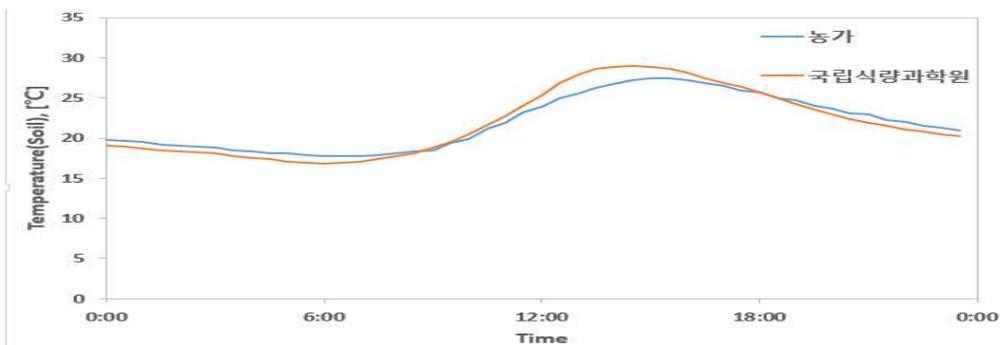


그림272. 농가 → 노균병 다수 발생, 국립식량과학원 → 노균병 발생 무

(e) 토양습도

- 국립식량과학원과 일반 농가 양파, 마늘 밭에서의 대기습도값을 분석한 결과는 아래의 그림과 같음. 국립식량과학원에서의 최대 습도는 16%, 최소 8.1%, 평균 11.32%로 나타났으며 일반 농가 양파, 마늘 밭에서 최대 습도는 28.1%, 최소 23.2%, 평균 25.13%로 나타남. 두 지역 모두 10:30분까지 일정한 온도를 유지하다가 14:00 이후로 감소하는 것을 알 수 있었음. 국립식량과학원에서의 최대 습도 시간은 13:00분으로 나타났으며 농가는 14:30분으로 나타남.

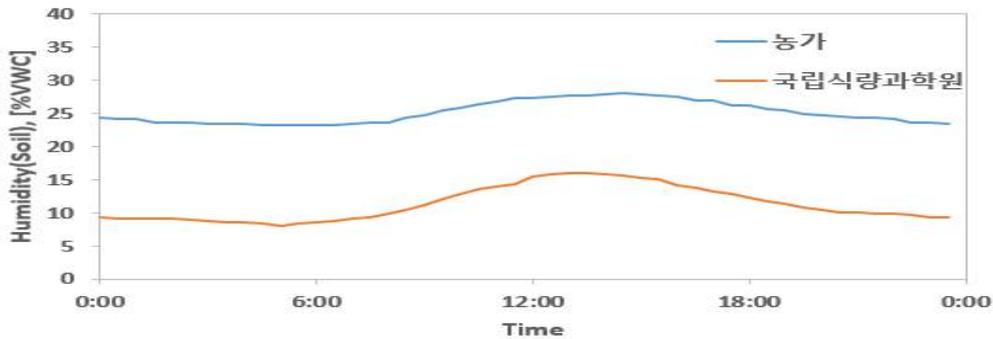


그림273. 농가 → 노균병 다수 발생, 국립식량과학원 → 노균병 발생 무

- 데이터 분석결과 양파와 마늘의 병해가 잘 발생하는 일반 농가의 밭에서 환경 계측 모니터링을 확인 하였을 때 국립식량과학원과 차이가 있었음. 대기온도의 경우 일반 농가의 밭의 평균 온도가 더 높게 나타났으며 대기습도의 경우 국립식량과학원에 비해 평균적으로 더 낮게 나타남. 양파, 마늘의 병해를 발생시키는 기상조건 중 온도가 높고, 습도가 낮은 곳에서 발생하게 됨. 국립식량과학원의 경우 주기적으로 농약을 뿌려 작물을 관리하지만 일반 농가의 밭 경우 농약을 뿌리지 않고 작물을 재배하기 때문에 더 많은 병해에 걸릴 수 있는 요인을 가지고 있다는 것을 알 수 있음
- 아래의 표는 비가 오기 전 날 국립식량과학원과 일반 농가 양파, 마늘 밭에 대하여 그 날의 조도, 대기 온·습도, 토양의 온·습도, EC의 데이터를 평균, 최대, 최소, 표준편차로 나타냄. 조도와 대기 습도, 토양온도, 토양습도는 일반 농가가 국립식량과학원보다 높게 나타났으며 대기온도, EC는 국립식량과학원이 높게 나타남.

비가 오기 전 날

NO.	Item	Intensity (LUX)	Temperature (Ambient, °C)	Humidity (Ambient, %)	Temperature (Soil, °C)	Humidity (Soil, %)	EC (Soil)
국립식량과학원	Average	12128	20.89	65.1	21.88	11.32	8.94
	Max	38027	34.32	95.67	29	16	11.1
	Min	0	8.41	28.25	16.8	8.1	6.4
	Stdev	14875	8.18	22.72	4.12	2.6	1.4
일반 농가	Average	12524	18.9	78.76	21.89	25.13	8.3
	Max	40532	29.2	94.89	27.5	28.1	9.4
	Min	0	9.9	53.16	17.8	23.2	7.1
	Stdev	15969	6.49	15.74	3.33	1.69	0.8

- 아래의 표는 비가 내린 날 국립식량과학원과 일반 농가 양파, 마늘 밭에 대하여 그 날의 조도, 대기 온·습도, 토양의 온·습도, EC의 데이터를 평균, 최대, 최소, 표준편차로 나타내었음. 조도는 비가 내리기 전 날에 비해 오전, 오후의 값이 낮게 나타났으며 대기 온도와 토양의 온도도 낮아짐. 습도의 경우는 비가 내리기 전 날과 달리 오전과 오후 모두 비슷한 데이터 값이 나타남.

#### 비가 내린 날

NO.	Item	Intensity (LUX)	Temperature (Ambient, °C)	Humidity (Ambient, %)	Temperature (Soil, °C)	Humidity (Soil, %)	EC (Soil)
국립식량과학원	Average	10810	16.22	67.44	19.45	12.86	9.97
	Max	38941	24.7	96.22	25.2	17.1	11.6
	Min	0	5.8	29.03	16.3	10.1	7
	Stdev	14189	5.33	26.54	2.87	2.17	1.6
일반 농가	Average	11931	15.72	75.72	19.16	28.77	8.08
	Max	43746	25.34	94.53	23.1	31.3	8.7
	Min	0	9.08	45.65	17	27.2	6.9
	Stdev	15887	4.53	17.35	2.04	1.38	0.5

- 아래의 표는 비가 내린 다음날 국립식량과학원과 일반 농가 양파, 마늘 밭에 대하여 그 날의 조도, 대기 온·습도, 토양의 온·습도, EC의 데이터를 평균, 최대, 최소, 표준편차로 나타냄. 조도와 대기 온·습도, 토양의 온도는 비가 내리기 전 날과 같이 비슷한 데이터 값을 나타내고 있으나 토양의 습도는 비가 온 날 오후부터 비가 내린 다음 날 오전까지 높은 습도를 보였으나 오후부터는 다시 습도도 낮아지는 것을 알 수 있었음.

#### 비가 내린 다음날

NO.	Item	Intensity (LUX)	Temperature (Ambient, °C)	Humidity (Ambient, %)	Temperature (Soil, °C)	Humidity (Soil, %)	EC (Soil)
국립식량과학원	Average	12913	14.36	61.99	18.67	12.02	9.78
	Max	39274	24.54	95.05	25.9	16.8	11.8
	Min	0	5.34	20.94	14.1	9.3	7.1
	Stdev	15147	7.15	27.67	3.99	2.599	1.64
일반 농가	Average	14196	15.08	68.50	18.63	28.03	7.95
	Max	42474	23.83	90.71	23.8	30.9	9
	Min	0	9.26	41.88	14.9	26.2	6.8
	Stdev	16945	5.17	17.62	3.05	1.63	0.6

## 다. 정확도 분석

(1) 대기 온도

- 실제 계측한 값과 기상청 데이터의 대기 온도의 비교 결과 아래의 그림과 같이 전체적으로 유사한 경향을 보이는 것을 확인 할 수 있었으나, 일부 오차가 발생한 원인은 데이터 수집 대상 지역이 다르기 때문으로 판단됨. 기상청 데이터는 광주 지방 기상청 내에 위치한 장소에서 측정하였으나 환경 계측 모니터링 시스템이 설치된 장소는 전라남도 무안 국립식량과학원 이므로 거리 차이가 있어서 오차가 발생한 것으로 판단되며 또한 측정된 장소가 황량한 노지이기 때문에 햇빛에 직접적으로 노출이 많아 차이가 발생한 것으로 판단됨. 기상청 데이터는 기상자료개방포털에서 기상관측자료를 받아서 분석함.

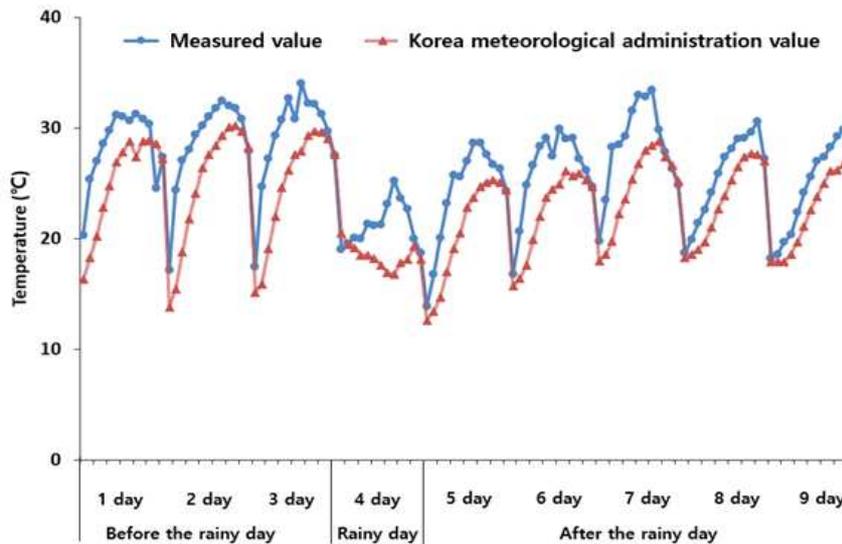


그림274. 대기온도의 실제 계측값과 기상청 데이터의 경향 분석

- 실제 계측한 값과 기상청 데이터의 대기 습도의 비교 결과 아래의 그림과 같이 전체적으로 유사한 경향을 보이는 것을 확인 할 수 있었음.

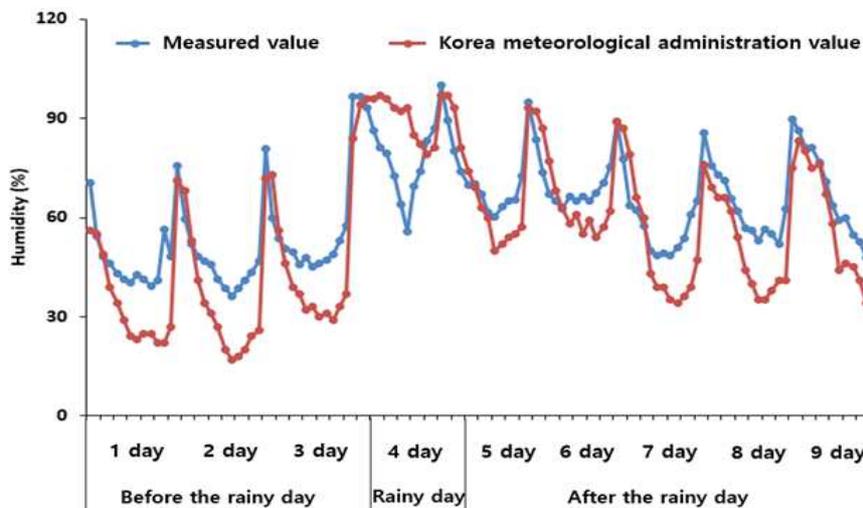
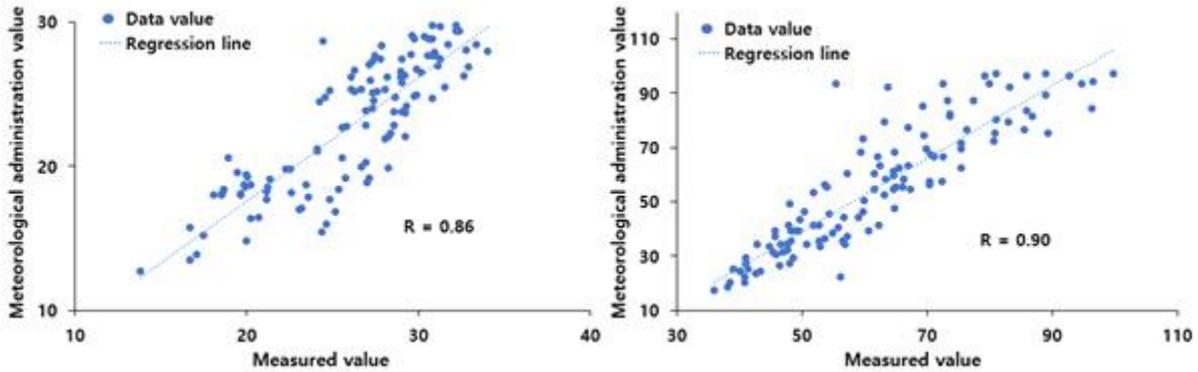


그림275. 대기습도의 실제 계측값과 기상청 데이터의 경향 분석

- 생육환경 모니터링 시스템의 대기온도, 대기습도 값과 기상청 데이터와의 상관관계를 분석한 결과는 아래의 그래프와 같이 나타남. 생육환경 모니터링 시스템을 이용하여 측정된 값과 기상청 데이터와의 상관관계는 대기온도가 0.86 대기습도가 0.90로 높은 상관관계를 보여주어 개발된 생육환경 모니터링 시스템을 이용하여 대기온도와 대기습도의 계측이 가능함을 알 수 있음.



(a) 대기온도

(b) 대기습도

그림276. 대기온도, 대기습도 값과 기상청 데이터와의 상관관계를 분석결과

- 본 연구는 기후의 급변으로 인해 기존의 예측방법에 의해 예측하기가 더욱 어려워지고 있는 문제점들을 극복하기 위한 안정적이고 효율적인 생육환경 모니터링을 개발하여 원격지에서 모니터링이 가능한 시스템을 설계 및 구현하기 위해 수행함. 대기온도와 대기습도의 실제 계측 값을 기상청 데이터 값과 비교한 결과 약간의 차이가 있는 것을 확인 할 수 있었는데 그 차이는 기상청에서 제공하는 데이터의 값이 실제 계측한 노지에서 거리가 있어서 나타나는 결과로 보여지며 추세는 일정한 것을 알 수 있었음. 이를 통해 노지에서 주변의 환경을 실시간 모니터링이 가능하여 관리자에게 더욱 더 원활하고 사용하기 쉽게 작물을 관리할 수 있는 환경을 제공할 수 있을 것으로 판단됨. 향후 본 연구에서는 임베디드 및 자바를 이용하여 와이파이 통신 시스템을 적용하여 언제 어디서나 사용자가 원하는 환경을 원격지에서 모니터링이 가능한 시스템을 개발할 예정임.

### (3) 3차년도 연구내용 및 결과

#### 가. 생육 데이터 송수신을 위한 무선/원격 통신 기술 개발

##### 1. 데이터 송수신을 위한 무선/원격 통신 기술

##### (1) 안테나

- 본 연구에서 데이터 송수신을 위해 사용한 무선 통신 기술은 NRF24L01 2.4GHz antenna B52의 모듈의 무선전송 시스템에서 전파를 송출하고 수신하는 안테나를 사용하였으며 그 사양은 아래 표와 같음.

## 안테나 Specification

Item	Spec
Power Supply	3.3 - 5V DC
Current	30mA, max. spike 100mA
Interface	UART
Default Baud Rate	9600 bps
Update rate	1Hz (Default), 5Hz (Max)
Size	53 x 60 mm
GPS Cable length	~280cm (~9ft aprox)
Weight	23g (shield only), 55g (gps antenna + cable)



그림277. 안테나 모듈

### (2) 중계기

- Application을 통한 작물의 생육환경을 실시간으로 받고자 랜 케이블 대신 무선으로 인터넷에 접속 할 수 있는 이동형 무선 인터넷 공유기를 사용하였음. 중계기는 인포마크 사의 IML460을 사용하였으며 사양으로는 배터리는 2420mAh으로 연속사용 시 LTE는 최대 8시간, WiBro는 최대 12시간 사용 가능하며 대기시간은 LTE는 최대 14시간, WiBro는 최대 16시간이다. 절전모드는 최대 100시간이다. LTE egg+ A 처럼 보조 배터리 기능이 있으며 micro USB 충전 케이블이 에그 테두리에 내장되어 있으며 배터리 지속시간이 최대 8시간 밖에 지속되지 않아 모니터링 내부에 보조 배터리를 설치하였음.



그림278. 에그 및 배터리 설치

### (3) App 모니터링

- 개발한 무선 통신을 이용하여 생육환경 모니터링 시스템의 데이터를 사용자에게 전송하게 되어 사용자는 App을 통한 데이터를 실시간으로 모니터링 할 수 있게 구성하였음.

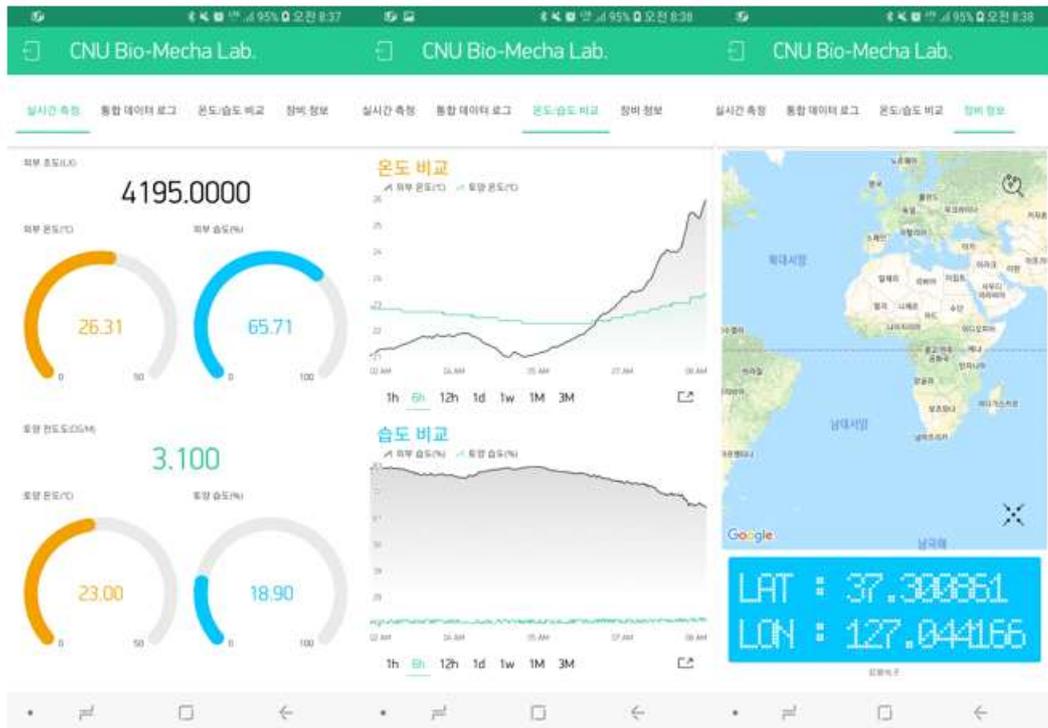


그림279. App을 통한 생육환경 모니터링 시스템의 센싱 정보

## 나. 작물 표현형 데이터 기반 생육정보 알람 및 경보 플랫폼을 개발

### a. 딥러닝 기반 양파질병 데이터 학습

#### ○ 인공 신경망을 이용한 학습

- 인공 신경망은 인간의 뇌가 패턴을 인식하는 방식을 모사한 알고리즘으로. 시각, 청각 입력 데이터를 퍼셉트론이나 분류, 군집을 이용하여 해석하는데, 이렇게 해석한 결과를 이용하면 이미지, 소리, 문자, 시계열 데이터에서 특정 패턴을 인식할 수 있음.
- 인공 신경망을 이용하면 각종 분류 및 군집화가 가능하다. 단순하게 표현하면 분류나 군집화를 원하는 데이터 위에 여러 가지 층(layer)을 얹어서 원하는 작업을 할 수 있고, 각 층에서는 라벨링이 되어있지 않은 데이터를 서로 비교하여 유사도를 구해주거나, 라벨링이 되어있는 데이터를 기반으로 분류기를 학습하여 자동으로 데이터를 분류하도록 할 수 있음.
- 일반적으로 사용되는 기본적인 인공신경망 알고리즘인 다층인공신경망(multi-layer neural network)의 경우 입력층(input layer), 은닉층(hidden layer), 그리고 출력층(output layer)로 세가지 층으로 구분되며 각 층들은 노드들로 구성되어 있음.

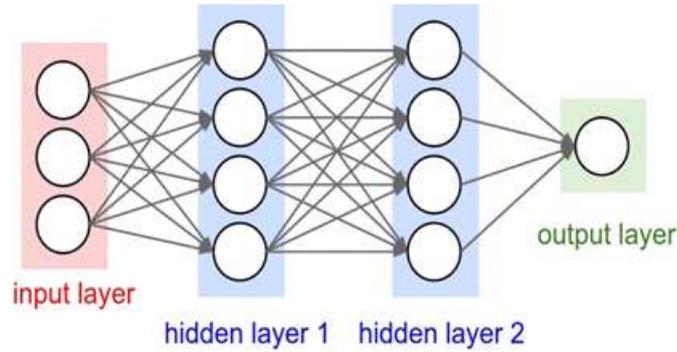


그림280. 인공신경망 구조

○ 다층인공신경망(Multi-layer ANN)

- 다층인공신경망 모델은 입력층과 출력층 사이에 하나 이상의 중간층이 존재하는 신경망으로 여러개의 퍼셉트론 뉴런들로 구성된 뉴런을 여러층 쌓은 다층 신경망 구조.
- 이때 입력층과 출력층 사이의 중간층을 은닉층(hidden layer)이라 부른다. 네트워크는 입력층, 은닉층, 출력층 방향으로 연결되어 있으며, 각 층내의 연결과 출력층에서 입력층으로의 직접적인 연결은 존재하지 않는 전방향(Feedforward) 네트워크 구조.

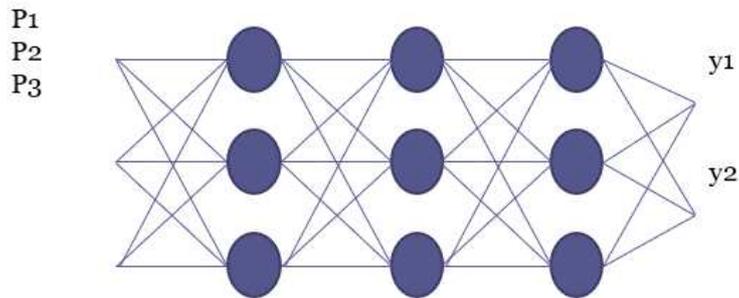


그림281. 다층인공신경망 구조

- 다층인공신경망은 단층 perceptron과 유사한 구조를 가지고 있지만 중간층과 각 unit의 입출력 특성을 비선형으로 함으로써 네트워크의 능력을 향상시켜 단층 퍼셉트론(Perceptron)의 여러 가지 단점들을 극복할 수 있음.
- 다층인공신경망은 단층일 경우 패턴공간을 두 구역으로 나누어주고, 2층인 경우 볼록한 (convex) 개구역 또는 오목한 폐구역을 형성하며, 3층인 경우에는 이론상 어떠한 형태의 구역도 형성하며, 데이터 x가 입력층에 주어지면 다음 층의 뉴런들은 그 가중치와 곱해지고 합해져서 총합이 계산된 후 시그모이드 함수를 통해서 출력값이 결정.

$$S_j = \sum_I wx_i \quad \dots\dots\dots \text{식 (2-8)}$$

$$f_j = \sigma(s_j) = \frac{1}{1 + \exp(-s_j)} \quad \dots\dots\dots \text{식 (2-9)}$$

- 여기서  $j$ 는 시냅스후 뉴런이고  $i$ 는 시냅스전 뉴런임. 층별 활성화값은 이와 같이 순차적으로 계산되어 마지막 출력 뉴런층의 값이 계산됨.

○ 역전파 알고리즘(Baackpropagation)

- 역전파 알고리즘은 역방향의 오차 전파라는 뜻으로써, 경사하강법과 같은 최적화 방법과 함께 인공신경망을 학습시킬 때 많이 이용함.
- 구성은 학습 벡터로부터 실제 출력값을 출력하고, 목적값과 실제 출력값의 차이인 오차를 계산하여 각 층에 전달하는 전파 단계와 전파된 오차를 이용하여 가중치를 수정하는 가중치 수정 단계로 구성.
- 역전파 알고리즘은 두 단계로 이루어지는데 먼저, 훈련 입력 패턴을 신경망의 입력층에 전달하고 신경망은 출력층에서 출력 패턴이 생성될 때까지 층에서 층으로 입력 패턴을 전파하며, 이때 전파과정에서 활성화 함수와 가중치 등이 적용.
- 출력 패턴이 목표 패턴과 다를 경우 그 오차를 계산하고 출력층에서 입력층까지 신경망을 따라 거꾸로 전파를 하게 되는데 오차의 전파과정에서 가중치가 수정하게 되어 가중치의 에러를 최소화하여 가중치 업데이트함.

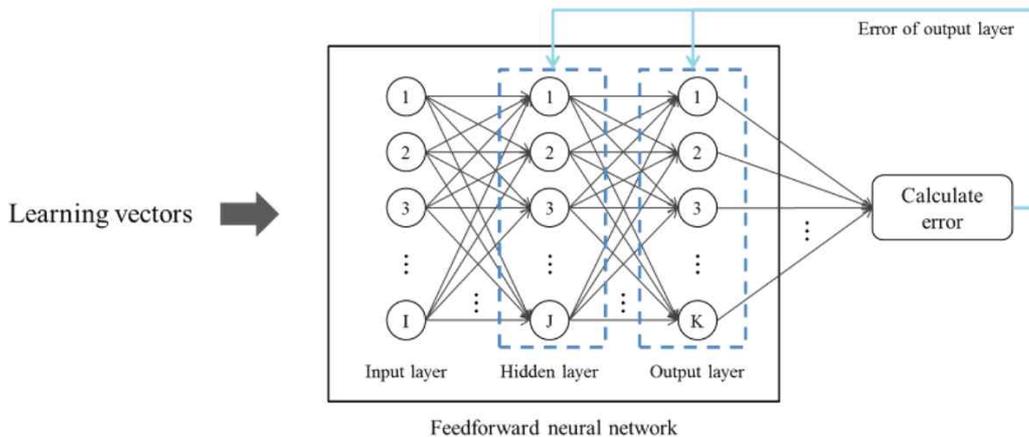


그림282. 역전파 알고리즘

○ 인공신경망 입력 데이터

- 신경망의 처리과정은 데이터의 확보 후 각 모델에 합한 영향자의 파악이 선행되어야 한다. 이러한 영향인자는 신경망의 입력변수가 되어 학습이 이루어지며 예측시 발생된 오차의 크기로 신뢰성을 검증.
- 학습과정은 신경망에 적절한 데이터가 입력되어 이루어지며 적절한 데이터는 주어진 문제를 위한 모든 필요한 정보가 포함되어 있고 최대한 대표할 수 있는 자료임을 의미함.

○ 학습 데이터

- 데이터 촬영 기간 및 장소 : 2018. 5. 10. ~ 25., 전남 무안 국립식량과학원 바이오에너지작물 센터.

- 학습데이터는 영상획득 시스템을 통해 측정된 영상 데이터는 비교적 큰 사이즈로 샘플링을 통해 학습에 적합한 여러개의 영상으로 나눈 후 데이터 증강을 통해 과적합(over-fitting)을 최소화함.

: 측정데이터(1280 x 800 pixels) → 학습데이터(224 x 224 pixels)

: 데이터 증강 → horizontal flip, random crops&re-scales, color jittering, rotation 등.

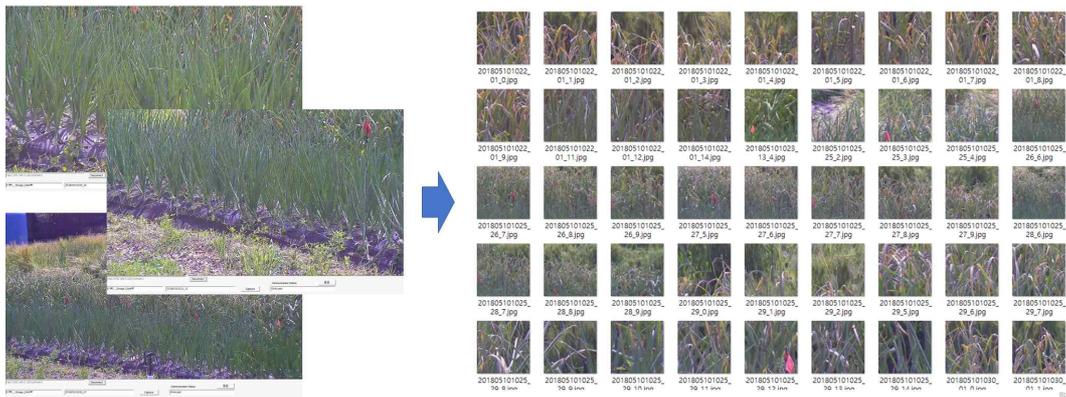


그림283. 양파질병 인식을 위한 학습데이터 구축

- 양파의 질병 인식은 양파의 재배면적 내에서 검출되어야 하므로, 촬영된 데이터 내 정보 분석을 기반으로 주요 잡음 요인인 토양, 시멘트바닥, 작업자(장애물) 등을 선정하였음.

(데이터 카테고리) Normal (onion area), disease (onion area), obstacle, ground



(a) 주요 잡음 요인

(b) 분석 대상 면적

그림284. 양파질병 인식을 위한 학습데이터 구축

- 학습데이터는 측정된 데이터를 샘플링한 후 모델 학습을 위한 training-set, 학습 검증을 위한 validation-set, 성능평가를 위한 test-set으로 분류함.

: (학습데이터) 1000 raw-image × 15 samples/raw-image = 15,000 samples (224 × 224 size)

: (데이터 구성 비율) training (8840, 58%), validation (3080, 21%), test (3080, 21%)

: (클래스 비율) normal (9120, 63%), disease (2710, 19%), obstacle (1630, 11%), ground (1540, 11%)

학습을 위한 DB 구성

(단위 : 개)

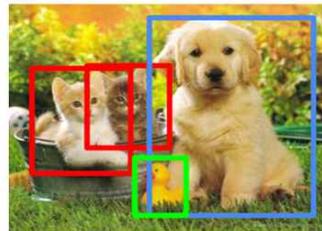
classes Dataset	Normal	Disease	Obstacle	Ground	Total
Training	5,720	1,500	820	800	8,840
Validation	1,720	580	410	370	3,080
Test	1,680	630	400	370	3,080
Total	9,120	2,710	1,630	1,540	15,000

○ 영상 학습 모델

- 일반적으로 영상 학습은 영상 분류(classification), 검출(detection)으로 분류될 수 있으며 영상 검출은 영상 분류에 지역화(localization)이 추가됨.
  - : (영상 분류) 입력된 영상의 클래스(카테고리)를 구분하는 것으로 영상 전체를 하나의 평가 대상으로 인식하며, 학습 시 하나의 영상에 대해 클래스에 대한 정보만 필요.
  - : (영상 검출) 입력된 영상 내 대상체(object)의 클래스(카테고리) 뿐만 아니라 영상 속 위치, 범위까지 평가대상으로 인식하며, 학습 시 하나의 영상에 대해 클래스-위치에 대한 정보가 필요 (다양한 객체 포함 시 그에 해당하는 클래스-위치 정보 필요)



CAT



CAT, DOG, DUCK

(a) Object classification

(b) Object detection

그림285. 영상 학습 방법 및 목적

- 본 연구에서는 양파 재배 시 질병 발생율을 측정하는 것으로 징후의 위치까지 확인이 필요한 영상 검출을 수행하여야 하며, 이를 위해서는 측정데이터별로 징후의 존재와 위치를 작성해야 함.
- 하나의 객체당 class, 위치의 4개 모서리(x,y) 정보의 입력(annotation)이 수작업으로 필요하므로 인력투입 및 시간소요가 크며, 작물의 병징의 경우 배경과의 구분이 명확하지 않아 정확한 데이터베이스 구축이 어려움.
- 따라서 본 연구에서는 영상 내 객체의 존재 유무의 정보(image level labeling)만으로도 영상 검출 학습이 가능한 약지도 학습(weakly supervised learning)을 통해 투입자원 최소화하였으며, transfer learning 방법을 통해 개발 효율을 극대화하였음.
- 딥러닝을 위한 기초 모델(base model)은 VGG-19 (Visual Geometry Group)을 이용하였으며, 약지도 학습을 위해 convolution layer(conv-net)와 classifier (분류기) 사이에 global average pooling (GAP) layer를 삽입하였음.

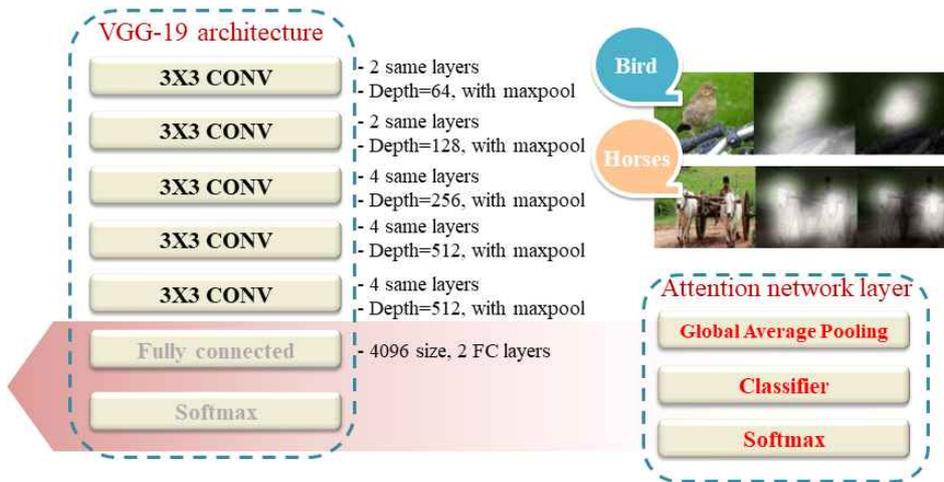


그림286. 질병인식을 위한 딥러닝 모델 구조

- 딥러닝 모델 구축을 위한 개발환경은 윈도우 기반의 파이썬 개발 통합 플랫폼을 활용하였으며 상세한 사양은 다음 표와 같음.

딥러닝 모델 및 학습을 위한 개발환경

Item	Specification	
H/W	CPU	AMD Ryzen 5 1600 6core processor 3.2 GHz
	Memory	16 GB
	GPU	GTX 1070ti
S/W	OS	windows 10
	Python platform Framework	Anaconda 3.5 + jupyternotebook + python 3.6 Pytorch 0.4.0 + opencv 3.4.1

- VGG19 기반의 딥러닝 모델은 아래의 그림과 같으며, 이미지 추출을 위한 컨볼루션 신경망 (convolutional neural networks)은 3x3 사이즈의 필터를 사용하여 16 layers로 구성되었으며 필터 채널수별로 64채널 2 layers, 128채널 2 layers, 256채널 4 layers, 512채널 4 layers임

```

class VGG19(nn.Module):
    def __init__(self):
        super(VGG19, self).__init__()
        self.conv1_1 = nn.Conv2d(3, 64, kernel_size=3, stride=1, padding=1)
        self.conv1_2 = nn.Conv2d(64, 64, kernel_size=3, stride=1, padding=1)
        self.conv2_1 = nn.Conv2d(64, 128, kernel_size=3, stride=1, padding=1)
        self.conv2_2 = nn.Conv2d(128, 128, kernel_size=3, stride=1, padding=1)
        self.conv3_1 = nn.Conv2d(128, 256, kernel_size=3, stride=1, padding=1)
        self.conv3_2 = nn.Conv2d(256, 256, kernel_size=3, stride=1, padding=1)
        self.conv4_1 = nn.Conv2d(256, 512, kernel_size=3, stride=1, padding=1)
        self.conv4_2 = nn.Conv2d(512, 512, kernel_size=3, stride=1, padding=1)
        self.fc6 = nn.Linear(512*512*3, 4096)
        self.fc7 = nn.Linear(4096, 4096)
        self.softmax = nn.Softmax()

    def forward(self, x):
        x = self.conv1_1(x)
        x = self.conv1_2(x)
        x = self.conv2_1(x)
        x = self.conv2_2(x)
        x = self.conv3_1(x)
        x = self.conv3_2(x)
        x = self.conv4_1(x)
        x = self.conv4_2(x)
        x = self.fc6(x)
        x = self.fc7(x)
        x = self.softmax(x)
        return x
  
```

그림287. 질병인식을 위한 딥러닝 모델 개발 결과

○ 학습 방법

- Transfer learning은 image-net 등의 빅 데이터로 미리 잘 학습된 모델을 사용하여 현재 데이터에 적합하도록 네트워크 수정 및 일부만 학습하는 방식으로 타 분야에 모델을 적용하기 위해 주로 활용됨.
  - 본 연구 모델의 학습은 아래와 같은 절차로 수행하였음
    - i) Conv-net은 기존 VGG 모델의 가중치를 초기값을 사용
    - ii) Fully connected 계층을 제외한 모든 신경망의 가중치를 고정
    - iii) 지도학습 수행 → classifier만 학습
  - 학습 과정에서 최적 가중치를 알아내기 위해 검증 데이터를 활용한 교차검증 (cross-validation)을 수행하였으며, 이 과정에서 모델 학습의 불확실성을 고려하기 위해서 총 5번의 랜덤 샘플링을 수행함.
- : 서로 다른 학습 데이터와 검증 데이터 세트를 구성 후 모델을 구성하는 다양한 파라미터들을 바꿔가며 가장 높은 성능을 보이는 모델을 선정
- 모델 성능은 정확도 (accuracy), 재현성 (recall), 정밀도 (precision) 그리고 F1-score 등의 항목을 활용하여 평가하였으며 관련 식은 아래와 같음(Janssens et al., 2016)
- : 여기서, TP는 true positive, FP는 false-positive, FN은 false-negative, 그리고 TN은 true-negative를 나타냄.

$$Accuracy = \frac{TP + TN}{TP + FP + FN + TN}$$

$$Recall = \frac{TP}{TP + FN}$$

$$Precision = \frac{TP}{TP + FP}$$

$$F1 - score = \frac{2(Recall)(Precision)}{Recall + Precision}$$

○ 학습 결과

- 학습은 약 8840개의 training dataset을 이용하여 8회 반복(8 epochs) 학습하였으며, 그 결과 손실(loss), 정확도(accuracy)는 아래의 그림과 같이 나타남.
  - 학습은 데이터 2000개까지 손실 감소 및 정확도 향상이 나타났으며 정확도의 경우 3000개 학습 이후부터 큰 변화가 나타나지 않았음.
- : (정확도) 55% → 94%, (손실) 1.26 → 0.017

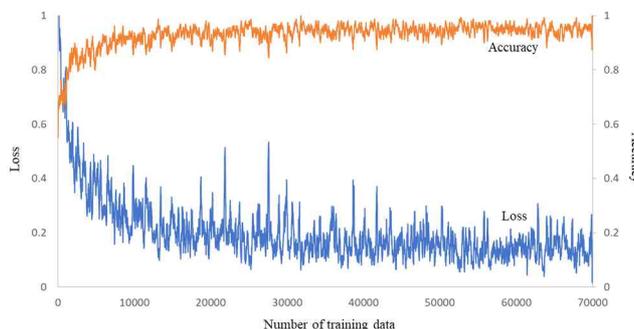
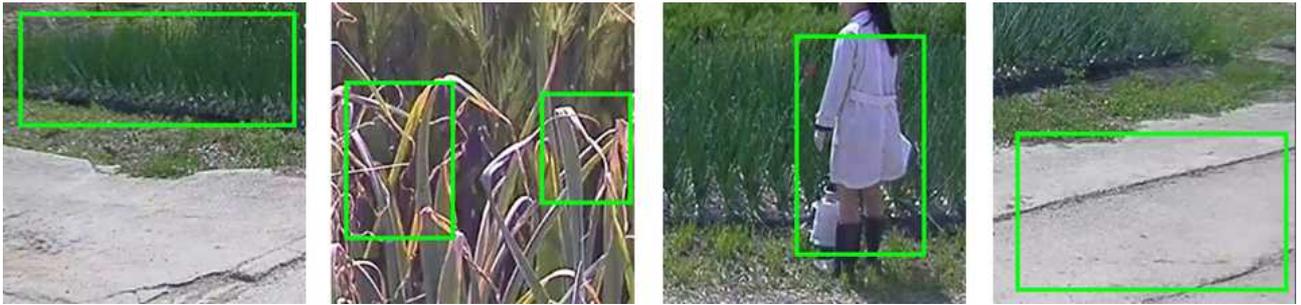


그림288. 딥러닝 학습 결과

- Test dataset을 활용한 모델 성능평가 결과 약 84%의 정확도를 보였으며 대표적인 샘플의 클래스별 검출 결과 및 경계박스(bounding box) 작성 결과는 아래의 그림과 같음.
- : 양파 재배지에서 양파 재배 영역만의 검출이 가능할 뿐만 아니라, 촬영 중 작업자, 간판 등의 장애물 및 양파의 질병도 식별이 가능하였음.



(a) Normal

(b) Disease

(c) Obstacle

(d) Ground

그림289. 딥러닝 기반 영상 검출 결과

## 2) 질병 발생율(disease severity) 인식

### ○ 주요 샘플의 질병 발생율 측정 결과

- 영상취득시스템을 통해 측정된 양파영상 샘플 중 양파 잎의 색깔이 갈변되는 등 육안으로 식별 가능한 노균병 감염 증상이 포함된 영상을 임의로 선정하였음.



(a) Sample 1

(b) Sample 2

(c) Sample 3

(d) Sample 4



(e) Sample 5

(f) Sample 6

(g) Sample 7

(h) Sample 8

그림290. 양파생육데이터의 샘플링 영상 및 질병영역

- 검출된 질병 확인, 발병을 측정, 알람 기준 마련을 위해 시각화를 이용하여 학습모델의 현재 영상에 대한 판단 기준 및 집중 정도(attention)를 표현하였음.
- Class activation map (CAM)은 학습모델이 현재 영상의 클래스를 판단하는 기준을 보여주며 해당 영상이 normal, disease, obstacle, ground 등의 클래스로 어떻게 추론되었는지를 feature map의 활성화 정도를 가시화해줌.
- 본 연구에서는 이미지 추출기(image extraction 또는 conv-net)으로부터 출력되는 최종 feature map에 GAP (global average pooling)의 가중치를 곱하고 전체 맵을 합산, 정규화를 해줌으로써 CAM을 작성하였음.

: CAM의 활성화 정도의 표현은 아래의 그림과 같이 jet color-map을 이용하였음.

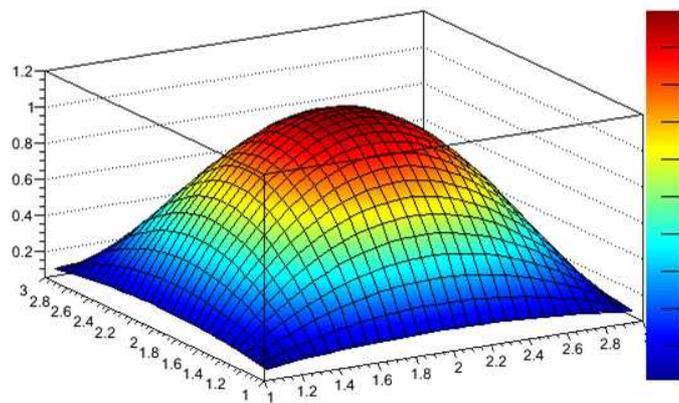


그림291. Jet colormap을 활용한 표현 예시

- CAM을 이용하여 아래의 그림과 같이 양파 영상의 질병 활성화맵을 작성하였으며 그 결과, 학습모델이 질병을 진단하기 위해 관심 갖는 영역이 다음의 그림의 육안을 통해 선정된 영역과 유사하게 나타나 신뢰성 있는 특징 추출 및 검출이 진행되었다고 판단됨.  
: 붉은색에 가까울수록 학습모델이 질병의 징후가 높다고 판단되는 것이며, 푸른색일 경우 질병이 아닌 것으로 평가됨.
- 활성화맵을 통한 양파의 질병(노균병) 발병도는 질병으로 인식되어 활성화된 영역의 면적 계산을 통해 평가되며, 이는 발병도 기준이 되는 활성화값에 따라 달라짐.
- 양파 노균병의 발병도 평가는 영상의 전체 면적 대비 활성화된 영역의 비율로 계산하였으며, 기준 활성화값을 5수준으로 변경하며 평가하였음.  
: (발병도) =  $\text{activated pixels} / \text{entire pixels} \times 100\%$   
: Activated pixels  $\rightarrow$  activation value > activation threshold  
: 활성화값 수준(0 ~ 1) : 최대값의 95%, 90%, 85%, 80%, 75%에 대해 실시
- 활성화값 기준에 따른 발병도는 아래의 표와 같이 0.2 ~ 12.8% 범위를 가졌고, 95%수준으로 기준을 가장 높게 설정했을 때 샘플 1, 2, 5에서 0.7%로 가장 높게 나타났으며, 75%수준으로 기준을 설정했을 때 샘플 4에서 12.8%로 가장 높게 나타남.
- 따라서, 질병 인식의 활성화 수준 및 전체 영상에 대한 그 비율을 활용하면 발병도를 수준별로 분류 가능할 것으로 판단되며, 이를 통해 알람, 경보체계 설정이 가능함.

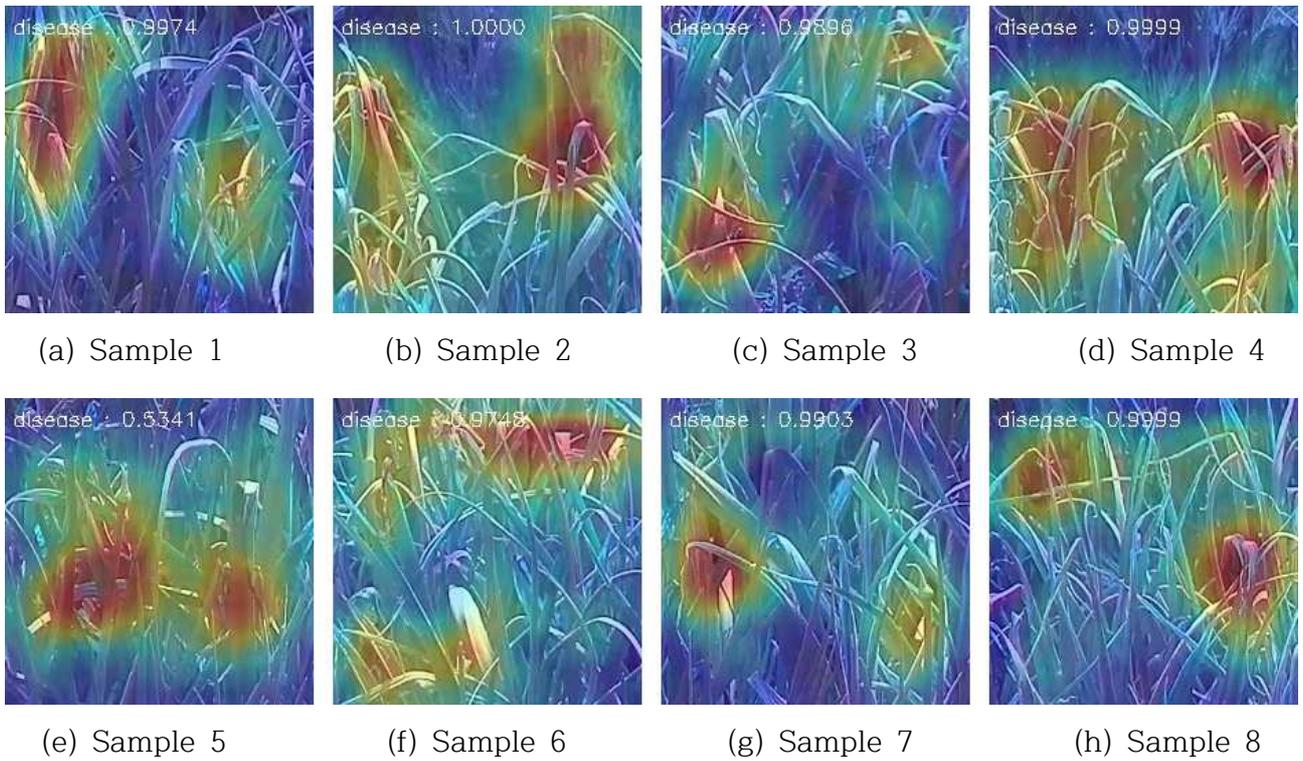


그림292. CAM을 이용한 질병의 활성화맵(CAM)

활성화 문턱값 변화에 따른 샘플별 발병도

Sample no.	Severity by activation threshold (%)				
	95%	90%	85%	80%	75%
1	0.7	2.4	4.0	5.4	6.9
2	0.7	1.8	2.9	4.7	7.5
3	0.5	1.5	2.3	3.3	5.0
4	0.6	1.4	3.4	6.6	12.8
5	0.7	2.3	3.8	5.3	7.2
6	0.2	0.7	1.6	2.5	3.6
7	0.4	1.1	2.0	2.9	3.9
8	0.6	1.9	3.7	6.4	9.1

○ 양파 모니터링 및 알람체계 구축

- 양파 재배의 실시간 모니터링 및 질병 인식, 알람체계 구축을 위해서 학습단위 영상의 통합 및 전체영상 내 질병 의심영역 시각화를 수행함.
- 개별 영상의 분석 데이터 이력을 활용하여 재배영역 내 양파 질병 의심구역의 경계박스를 생성.



그림293. 양파 샘플영상 통합 및 질병 의심영역 경계박스 생성

- 개별 샘플영상의 class activation map을 통합하여 전체 활성화맵을 작성하였으며, 이를 통해 현재 촬영된 영상의 실시간 활성화 분포 분석을 통한 발병도 평가와 작업자 알람-경보를 위한 기준 DB 구축 가능.

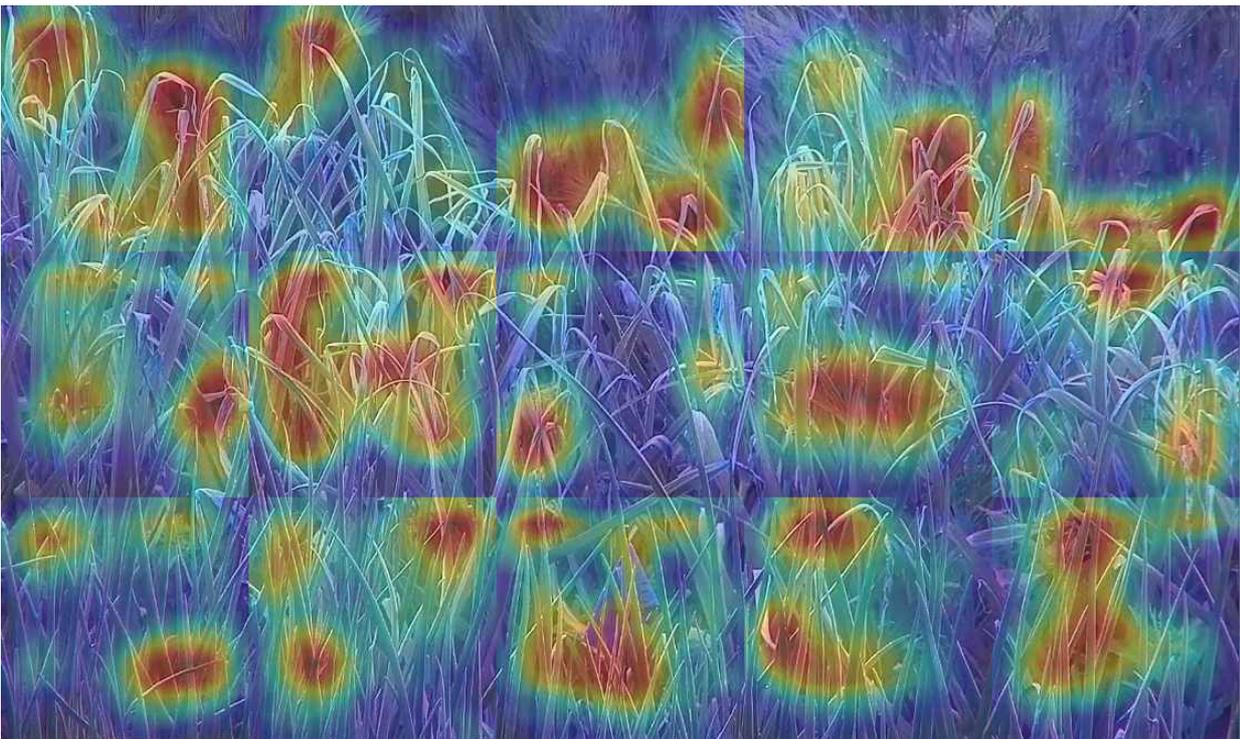


그림294. CAM(활성화맵) 기반 양파밭 발병도 평가 및 시각화(샘플)

- 학습에 활용된 양파 재배 영상 데이터를 토대로 질병의 발병도 수준에 따른 농업인 알람-경보 기준을 설정하였으며, 이를 통해 실시간 자동화 질병 예찰 및 경보 서비스가 가능할 것으로 판단됨.
- 알람-경보는 총 5단계로 구성하였으며, 질병 활성화 기준 및 전체 영상 대비 확산범위를 이용하여 단계별 기준을 설정하였음.
  - : (1~2단계) 농업인 영상 확인 및 이력 관리
  - : (3~4단계) 농업인 현장 확인 및 조치, 전문가 영상 확인
  - : (5단계) 전문가 현장 투입 및 방제 준비

질병 활성화 수준에 따른 알람-경보단계 기준

Activation threshold	Percentage of total image (%)									
	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5
95%	5단계		4단계			3단계		2단계		1단계
90%	5단계		4단계			3단계		2단계		1단계
85%	5단계		4단계			3단계		2단계		1단계
80%	5단계		4단계			3단계		2단계		1단계
75%	5단계		4단계			3단계		2단계		1단계
70%	5단계		4단계			3단계		2단계		1단계
65%	5단계		4단계			3단계		2단계		1단계
60%	5단계		4단계			3단계		2단계		1단계

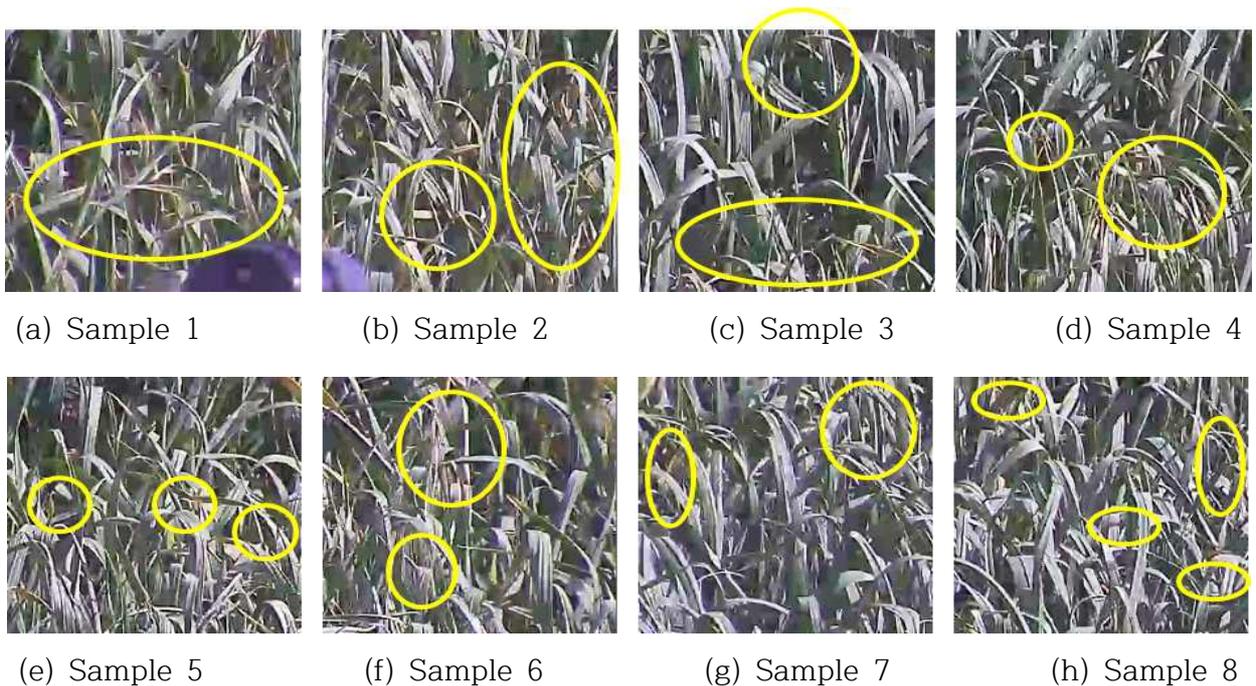


그림295. 마늘생육데이터의 샘플링 영상 및 질병영역

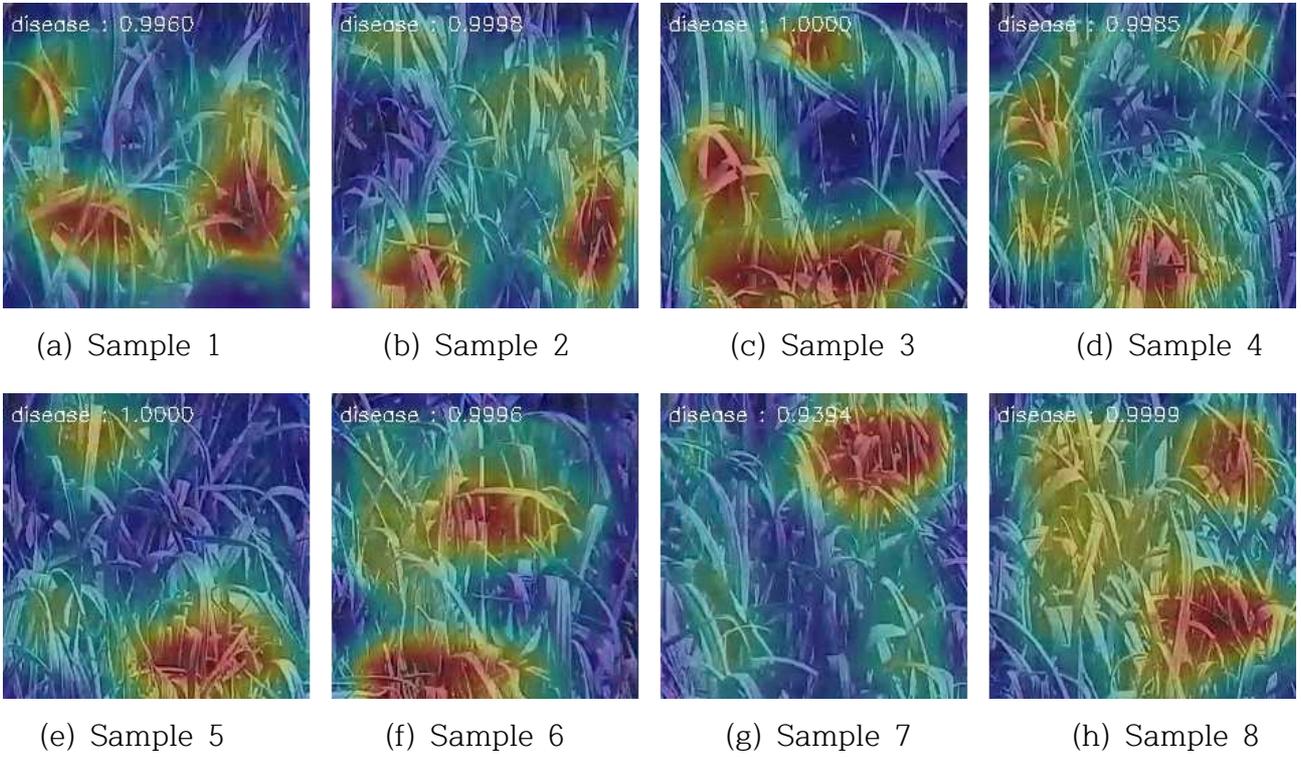


그림296. CAM을 이용한 질병의 활성화맵(CAM)

활성화 문턱값 변화에 따른 샘플별 발병도

Sample no.	Severity by activation threshold (%)				
	95%	90%	85%	80%	75%
1	1.3	2.3	4.4	6.9	9.6
2	1.0	2.0	3.4	5.0	6.9
3	0.5	3.2	6.7	10.8	16.4
4	0.6	1.4	2.6	3.2	5.3
5	0.4	1.6	3.1	4.8	6.9
6	0.2	3.1	5.4	8.4	11.4
7	0.3	3.2	5.2	6.7	8.3
8	0.6	1.7	3.9	6.8	10.6

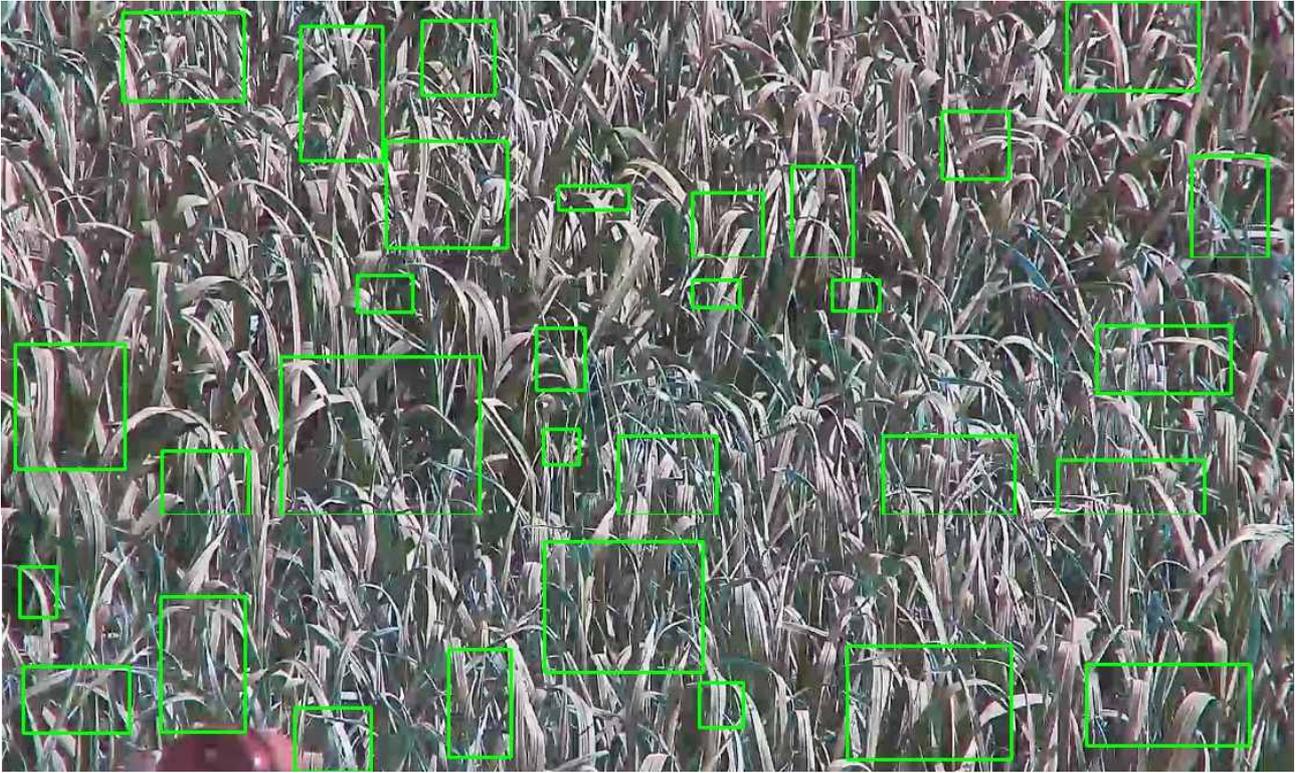


그림297. 마늘 샘플영상 통합 및 질병 의심영역 경계박스 생성

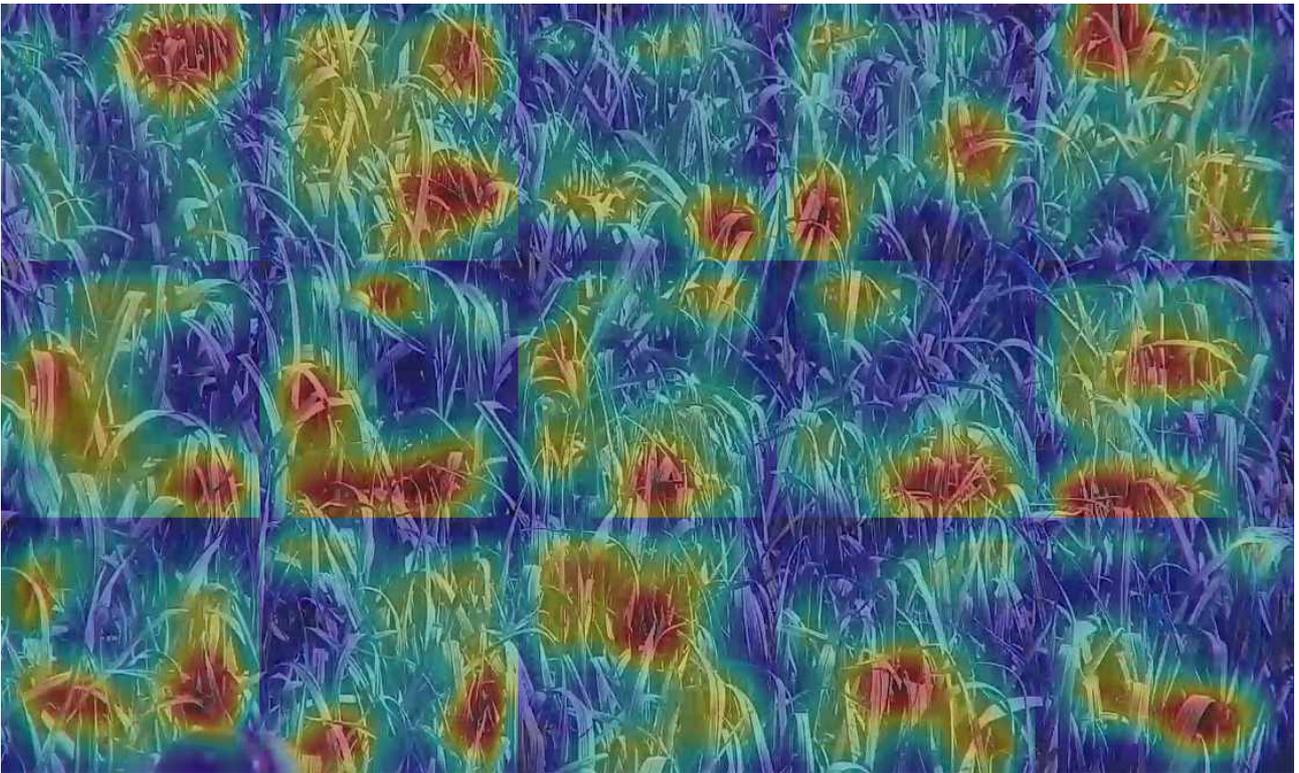


그림298. CAM(활성화맵) 기반 마늘밭 발병도 평가 및 시각화(샘플)

## ■ 제2위탁과제 연구내용 및 결과

### (1) 1차년도 연구내용 및 결과

- 2006년부터 2015년까지 13곳의 양파 주산지의 단수데이터를 활용해 패널모형을 구축하여 기상변화에 따른 생산량 추정을 하고자 함. 이와 더불어 주산지의 위치가 대부분 전남, 경남, 경북 등 남부지방에 집중되어 있어 지역 간 상관성이 존재할 것이라 예상되어 공간계량모형을 고려한 분석을 시도함.

#### 가. 분석모형 (공간가중패널회귀모형)

- $W_N$ 를  $N \times N$ 행렬로서 지역간의 상관성을 나타내는 공간가중치행렬이라고 하자. 행렬의 원소인  $w_{ij}$ 는 지역  $i$ 와 지역  $j$ 간의 상호의존성의 크기를 나타내며, 모든 지역이 인접성(근접성) 정도에 따라 동일한 가중치를 가진다고 가정함. 또한 시간에 걸쳐 변하지 않는다고 가정하며 모든 행원소의 합은 1이 되도록 표준화 시킴. 공간가중행렬은 한 시점에서의 지역간의 상관성을 나타내는 행렬이지만, 패널모형은 총  $T$ 시점의 시차를 고려해야 함. 따라서 다음과 같이  $NT \times NT$ 크기의  $W_{NT} = I_T \otimes W_N$  행렬을 생성하게 됨.
- 지역간의 상관성이 존재하여 추정치의 편의가 발생하는 경우 다음과 같이 공간시차(spatial lag)를 반영한 공간 패널 모형을 구축하여 공간적인 자기상관성을 고려할 수 있음.

$$y = \rho(I_T \otimes W_N)y + X\beta + (\iota_T \otimes \mu) + \varepsilon, \varepsilon \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2 I_{NT})$$

이때  $y$ 는  $NT \times 1$  벡터로서 반응변수이며,  $\rho$ 는 공간 자기상관 회귀 계수,  $X$ 는  $NT \times k$  행렬로서 설명변수,  $\mu$ 는  $N \times 1$  벡터로서 개별특성효과,  $\varepsilon$ 는  $NT \times 1$  벡터로서 오차항,  $W_N$ 는  $N \times N$  공간가중치행렬임.  $I_T$ 는  $T \times T$  크기의 단위행렬이며  $\iota_T$ 는 원소가 모두 1의 값을 가지는  $T \times 1$  크기의 벡터임.

#### 나. 분석자료

- 공간패널모형에서 반응변수로 사용한 자료는 2006년부터 2015년 까지 통계청에서 제공하는 13개 시군의 10a당 양파 생산량임. 해당 시군은 전국 양파 주요 산지이며, 전국대비 양파 수확면적 비율은(2010년 농림어업총조사 기준, 통계청) 무안군 19.97%, 신안군 9.35%, 창녕군 6.76%, 해남군 6.53%, 제주시 6.17%, 합천군 5.48%, 함평군 5.45%, 고흥군 2.82%, 함양군 2.60%, 청도군 1.24%, 군위군 1.11%, 의성군 1.09%, 영천시 1.01%를 점유하고 있음. 설명변수로는 농촌진흥청(농업기술길잡이, 2013)의 자료를 참조하여 양파 생육에 영향을 미치는 주요 기상변수로서 온도, 강수량, 습도, 햇빛 등을 고려하였음. 기상자료는 기상청에서 제공하는 2006년부터 2015년까지 월별 기상자료를 사용하였음. 1월부터 12월까지의 평균기온, 평균최저기온, 평균최고기온, 누적강수량, 평균상대습도, 누적일조시간, 평균지면온도에 대해 기상자료를 구축하여 총 84개의 설명변수를 사용함. 기상관측장비가 없는 지역인 경우 가장 인접해

있는 지역의 기상자료로 대체함.

- 설명변수 선택은 생산량과 기상데이터를 활용하여 다중회귀분석 단계선택 방법을 통해 유의한 변수만을 선택함.(유의수준:진입 0.08, 제거 0.1). 양파의 생육과정중 7월, 8월의 경우 수확이 끝나고 파종을 기다리는 시기로 양파 생산량과 날씨 사이에 상관성이 없을거라 판단하여 제외함. 다중회귀분석에 투입된 설명변수는 생산량과의 상관분석시 유의한 변수만을 고려한 경우와, 설명변수 전체를 고려한 경우로 나누어 분석하였으나 선택되어지는 설명변수는 동일하였음. 다중회귀분석-단계선택 방법을 통하여 4월평균상대습도, 4월누적일조시간, 9월평균지면온도, 10월누적강수량, 12월누적강수량이 선택됨. 농촌진흥청에서 제공하는 [품목별 관리메뉴얼 : 농작업일정]을 참조하여 기상재해 및 예상되는 문제점에서 4월, 5월의 가뭄과 고온현상이 생산량에 영향을 미친다고 안내하여 4월누적강수량, 4월평균기온, 5월누적강수량, 5월평균기온을 추가로 사용함.
- 공간가중치행렬( $W_N$ )의 원소( $w_{ij}$ )를 결정하는 방법은 한곳에 밀집되어 있지 않고 전남, 경남, 경북, 제주로 떨어져 있어 인접여부의 방법 ( $w_{ij}=1$  or  $w_{ij}=0$ )은 사용하지 않고, 지역간 거리를 활용하여 생성함. 지역간의 공간적인 자기상관성을 나타내는 기준은 임계치 설정방법과 최근거리 설정방법으로 구분함.
- 임계치 설정방법은 지역간 거리가 특정 임계치를 기준으로 가까울 경우는 서로 자기상관성이 존재한다고 판단하는 방법임. 만약 지역간 거리가 임계치보다 가까운 경우 행렬의 원소값은 지역간 거리의 역수( $w_{ij} = dist(지역i, 지역j)^{-1}$ )를 사용하며, 지역간 거리가 임계치보다 멀리 떨어진 경우는 원소의 값을 0으로( $w_{ij}=0$ )사용함. 지역간 자기상관성이 최소한 1곳 이상 존재하도록 설정하기 위하여 제주와 해남간의 거리인 141,900m를 최소임계치로 설정하는 방법과, 모든 지역이 서로 자기상관성이 존재하기 위해 424,037m를 최대임계치로 설정하는 방법을 사용함.
- 최근거리 설정방법은 특정지역을 기준으로 가장 가까운 k번째 까지 지역은 서로 자기 상관성이 존재한다고 판단하는 방법으로 예를 들면 제주를 기준으로 k=3인 경우 제주와 가장 가까운 고흥, 무안, 해남의 지역만 제주와 공간적인 자기 상관성을 가지게 됨. 행렬의 원소값은 위와 동일하게 자기상관성이 존재하는 경우 지역간 거리의 역수( $w_{ij} = dist(지역i, 지역j)^{-1}$ )를 사용하며 그 외 원소의 값은 0으로( $w_{ij}=0$ )사용함. 최근거리는 k=2, k=3, k=4 총 3가지 방법을 사용함. 공간데이터분석을 수행하는 Geoda프로그램(Geoda Center, College of Liberal Arts and Sciences) 을 활용하여 가중치행렬을 생성하였으며 행을 기준으로 표준화 시켜 행 원소의 합이 1이 되도록 변경함

#### 다. 결과

- 공간가중행렬 구성방법에 따른 공간패널효과 모형의 추정결과는 각각 표1과 표2와 같음. 모형

추정시 회귀계수가 유의하지 않은 변수가 발생할 경우 해당되는 변수는 제외시킨후 다시 추정하는 과정을 반복하여 4월누적강수량, 4월평균기온, 5월평균기온이 제외되었으며, 최대임계치를 사용한 경우에만 4월누적일조시간이 추가로 제외됨. 하우스만 검정결과 모든 모형에서 귀무가설을 채택하게 되어 확률효과모형으로 추정함. 공간적인 자기상관성을 나타내는  $\rho$ 의 경우 최대임계치,  $k=3$ ,  $k=4$ 의 방법에만 유의수준 0.1하에 유의하게 나타났으며, 랜덤효과 모수인  $\phi = \sigma_{\mu}^2 / \sigma_{\varepsilon}^2$ 는 모든 모형에서 유의수준 0.1하에 유의한 결과가 나옴.  $corr^2 = 0.46$ 로 비슷하며 AIC, BIC값을 비교할시  $k=3$ 인경우가 가장 좋은 모형임.

- $k=3$ 인 경우 계수값을 직접효과와 간접효과로 구분하여 추정한 결과는 표3과 같음. 10월 누적강수량의 경우 직접효과는 5.216, 간접효과는 1.221 총 효과는 6.438이며 유의한 결과가 나옴. 이는 10월 누적강수량이 1mm 증가할 경우 양파 10a당 6.438kg 생산량이 증가하는 효과가 있다는 것을 의미하며, 해당 지역에는 5.21, 인접지역에는 1.22의 영향을 미치게 됨. 즉 10월 누적 강수량이 양파 생산량에 미치는 영향력은 공간적인 상관성 때문에 총 효과의 81%는 해당지역에, 19%는 인접지역에 영향력이 미치게 됨.  $k=3$ 인 추정된 모형을 이용하여 연도별 양파생산량을 각 지역별로 추정하여 실제 생산량과 비교한 결과가 그림299에 나타나 있음. 모든 지역에서 연도별 추정값의 추이가 실제 생산량과 일치함을 알 수 있으며 따라서 제안된 공간패널회귀모형이 잘 적합됨을 확인할 수 있음.

변수	최소임계치		최대임계치	
	Estimate	p값	Estimate	p값
4월누적일조시간	4.9865	0.0366*		
4월평균상대습도	-36.5758	0.0020**	-41.8037	0.0001***
5월누적강수량	2.3420	0.0445*	2.0176	0.0847·
9월평균지면온도	104.2268	0.0104*	102.8484	0.0088**
10월누적강수량	5.6223	0.0012**	4.8818	0.0050**
12월누적강수량	-6.3891	0.0187*	-5.2687	0.0532·
$\phi$	0.3339	0.0713·	0.3616	0.0629·
$\rho$	0.1139	0.3040	0.2673	0.0399*
Hausman	0.9449		0.9506	
AIC	2050.641		2050.99	
BIC	2070.714		2068.195	
$corr^2$	0.456		0.443	

(\*\*):p-values between 0.001 and 0.01, (\*):p-values between 0.01 and 0.05,(·):p-values between 0.05 and 0.1

표 1. 임계치 설정방법을 이용한 공간가중행렬 적용한 경우의 추정결과

변수	k=2		k=3		k=4	
	Estimate	p값	Estimate	p값	Estimate	p값
4월누적일조시간	4.7780	0.0433*	4.5544	0.0520·	4.5999	0.0511·
4월평균상대습도	-35.0186	0.0027**	-31.8509	0.0001**	-32.6139	0.0053**
5월누적강수량	2.2439	0.0521·	2.1392	0.0847·	2.1936	0.0570·
9월평균지면온도	98.8533	0.0142*	93.9574	0.0088*	93.3541	0.0202*
10월누적강수량	5.3212	0.0020**	5.1500	0.0050**	5.1669	0.0026**
12월누적강수량	-6.3772	0.0178*	-5.8068	0.0532·	-5.9649	0.0263*
$\phi$	0.3132	0.0775·	0.3244	0.0726·	0.3327	0.0708·
$\rho$	0.1409	0.1058	0.2001	0.0320*	0.1902	0.0682·
Hausman	0.9162		0.9455		0.9504	
AIC	2049.131		2047.332		2048.526	
BIC	2069.204		2067.405		2068.599	
$corr^2$	0.469		0.474		0.468	

(\*\*):p-values between 0.001 and 0.01, (\*):p-values between 0.01 and 0.05,(·):p-values between 0.05 and 0.1

표 2. 최근거리 설정방법을 이용한 공간가중행렬 적용한 경우의 추정결과

변수	Direct	Indirect	Total
4월누적일조시간	4.612877	1.080655	5.693532
4월평균상대습도	-32.259969	-7.5575175	-39.817486*
5월누적강수량	2.166695	0.5075899	2.674285·
9월평균지면온도	95.16407	22.2940119	117.458082*
10월누적강수량	5.216128	1.2219782	6.438106**
12월누적강수량	-5.881398	-1.3778305	-7.259229*

(\*\*):p-values between 0.001 and 0.01, (\*):p-values between 0.01 and 0.05,(·):p-values between 0.05 and 0.1

표 3. 추정모형의 한계효과

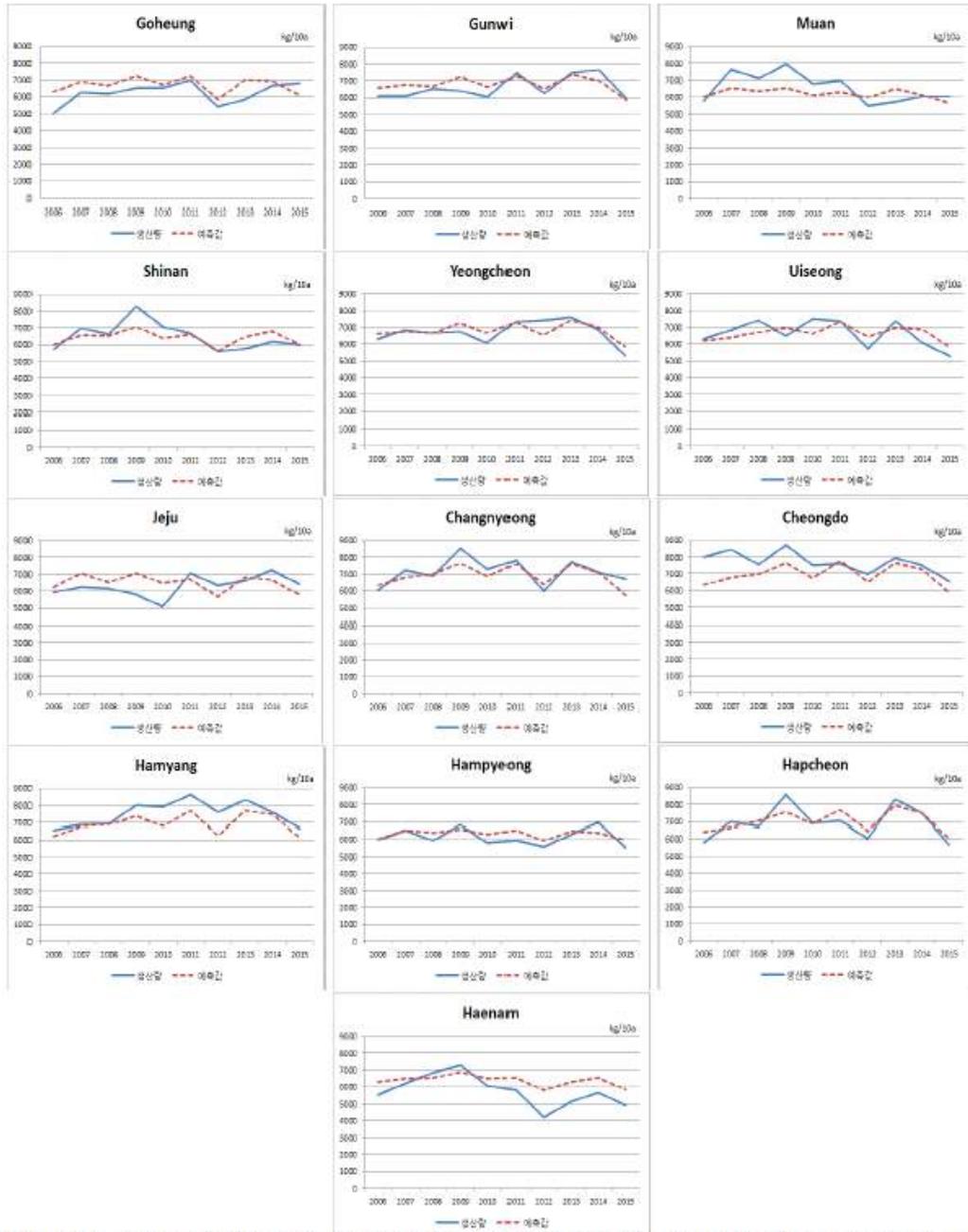


그림299. 연도별, 지역간의 10a당 실제 생산량과 k=3인 방법으로 생성한 공간가중치 행렬을 활용하여 추정한 양과 생산량 예측값의 비교

## (2) 2차년도 연구내용 및 결과

- 병균에 의하여 작물이 감염된 후 병징의 발현 정도는 온도, 습도 등 여러 가지 기상요인에 의하여 영향을 받음. 양파와 마늘의 대표적 병해발생 정도와 기상요인과의 상관성을 분석하고 관련성이 있는 기상요인들의 정보를 이용하여 병해발생 예측모형을 개발함.
- 국가농작물병해충관리시스템의 병해충예찰자료와 기상청의 기상자료를 이용하여 양파와 마늘의 대표적 병해인 노균병, 흑색썩음균핵병, 잎마름병의 발생확률을 예측할 수 있는 프로빗 일반화 가법 통계적 모델을 개발함.

### 가. 분석모형

$\pi(\mathbf{x})$ 를 특정 병해의 발병주율이고,  $\Phi(\cdot)$ 을 표준정규분포 누적분포함수라고 할 때,  $0 \leq \pi(\mathbf{x}) \leq 1$  이므로  $\Phi^{-1}(\pi(\mathbf{x}))$ 는  $(-\infty, \infty)$ 의 실수 값을 갖게 됨. 따라서  $\Phi^{-1}(\pi(\mathbf{x}))$ 를 반응변수로 이용한 다음과 같은 프로빗(Probit) 일반화가법모형(GAM)을 이용함.

$$\Phi^{-1}(\pi(\mathbf{x})) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_q x_q + f_{q+1}(x_{q+1}) + \dots + f_p(x_p) + \epsilon$$

- GAM 모형적합을 위해서는 모수적 요소인  $\beta = (\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_q)'$ 와 비모수적 함수인  $f_j$ 를 추정해야 함. 본 연구에서는 backfitting 알고리즘을 이용하여 추정하였음.
- GAM 모형의 모수적 요소인  $\beta = (\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_q)'$ 와 비모수적 함수인  $f_j$ 가 모두 추정된 후 발병률  $\pi(\mathbf{x})$ 에 대한 추정치는 다음과 같음:

$$\hat{\pi}(\mathbf{x}) = \Phi(\hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_1 + \dots + \hat{\beta}_q x_q + \hat{f}_{q+1}(x_{q+1}) + \dots + \hat{f}_p(x_p))$$

### 나. 분석자료

- 양파의 대표적 병해는 노균병과 흑색썩음균핵병이며, 마늘의 주요병해는 잎마름병임. 농촌진흥청의 국가농작물병해충관리시스템에서는 양파와 마늘의 주요병해의 예찰자료(발병주율)를 제공하고 있음. 조사기준일 2016년 3월 1일, 3월 16일, 4월 1일, 4월 16일, 5월 1일, 5월 16일에 관찰포(센터)에서 수집한 병해주율 자료를 전라남도, 전라북도, 경상남도, 경상북도, 대구광역시 등 5개 지자체별로 정리 제공하고 있음. 본 연구에서는 양파에 대해서는 위의 조사기준일에 대한 5개 지자체별 노균병과 흑색썩음균핵병의 병해주율을 3월, 4월, 5월 평균을 계산하여 그 평균병해주율을 해당 월의 병해주율로 사용하였으며, 마늘에 대해서는 동일 조사기준일과 동일 5개 지자체 난지형마늘의 잎마름병 병해주율 자료를 월별 평균을 계산하여 사용함.

- 병해주율을 예측하기 위한 기상요인으로는 월평균기온(°C), 월평균최저기온(°C), 월평균최고기온(°C), 월누적강수량(mm), 월평균상대습도(%), 월누적일조시간(hr), 월평균지면온도(°C)을 고려함. 2016년 1월 - 4월까지 기상청 기상자료로부터 위의 5개 지자체별 자료를 계산함. 각 월별 병해주율에 대응하는 기상요인은 해당병해가 발생하기 전 기상여건을 반영해야하기 때문에 1개월과 2개월 전 기상요인자료를 설명변수로 사용함. 즉, 예를 들어 반응변수 3월 전라남도 병해주율에 대응하는 기상요인은 1월과 2월의 전라남도의 월평균기온, 월평균최저기온, 월평균최고기온, 월누적강수량, 월평균상대습도, 월누적일조시간 월평균지면온도(°C) 등 모두 14가지 임.

## 다. 결과

- 위의 14개 설명변수들을 사용하여 양파의 노균병과 흑색썩음균핵병 발병주율과 마늘의 잎마름병 병해주율을 예측하기 위한 프로빗 일반화가법모형을 각각 적합함. 발병율 예측에 유의한 설명변수를 가진 최적의 모형을 선택하기 위하여 우선 최대 6개 설명변수를 가진 모형을 모형설명력( $R^2$ )이 높은 순서로 정리한 결과 3개 모형 모두  $R^2 > 0.98$ 로서 과적합 됨. 특히 선택된 설명변수들 중에는 월평균기온, 월평균최저기온, 월평균최고기온 사이에 상호 상관관계가 높아서 이들 중 많아야 2개만 모형에 사용되도록 모형선택을 하여 모형식을 개발함.

### 3-1) 양파 노균병

- 노균병 발병주율을 예측하기 위한 프로빗 일반화가법모형의 설명변수로는 1개월 전의 평균습도(평균습도1), 강수량(강수량1), 일조시간(일조시간1)과 2개월 전의 평균기온(평균기온2)이 유의수준  $\alpha = 0.05$  하에서 모두 유의하게 ( $p$ -값  $< 0.05$ ) 선택되었으며, 결정계수( $R^2$ )는 0.694로 나타남.

최종추정모형은 다음과 같음:

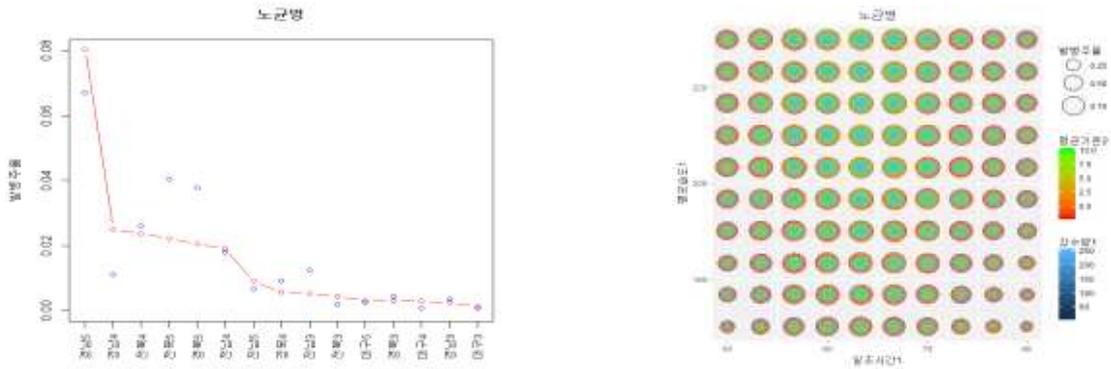
$$\Phi^{-1}(\hat{\pi}(\mathbf{x})) = -2.92 + 0.02 * \text{강수량1} - 0.30 * \text{평균기온2} + \hat{f}(\text{평균습도1}) + \hat{f}(\text{일조시간1})$$

따라서 노균병 발병주율에 대한 추정치는 아래와 같음.

$$\hat{\pi}(\mathbf{x}) = \Phi(-2.92 + 0.02 * \text{강수량1} - 0.30 * \text{평균기온2} + \hat{f}(\text{평균습도1}) + \hat{f}(\text{일조시간1}))$$

- 그림300 (a)는 추정된 프로빗 일반화가법모형으로 실제 관측된 5개 지자체의 3월부터 5월까지의 발병주율을 추정한 결과(빨간색 동그라미와 실선)와 실제 평균발병주율(파란색 동그라미)이 비교되어있음. 0.02이하 낮은 발병율이 나타난 지자체들에서는 대체로 잘 적합함을 알 수 있음. 1개월 전의 평균습도(평균습도1), 강수량(강수량1), 일조시간(일조시간1)과 2개월 전의 평균기온(평균기온2) 등 네 가지 설명변수의 종합적인 값의 조합에 따른 발병주율의 변화를 그림2 (b)에 표시함. 일조시간1과 평균습도1의 중간값 근처로 갈수록 발병주율이 높아지며,

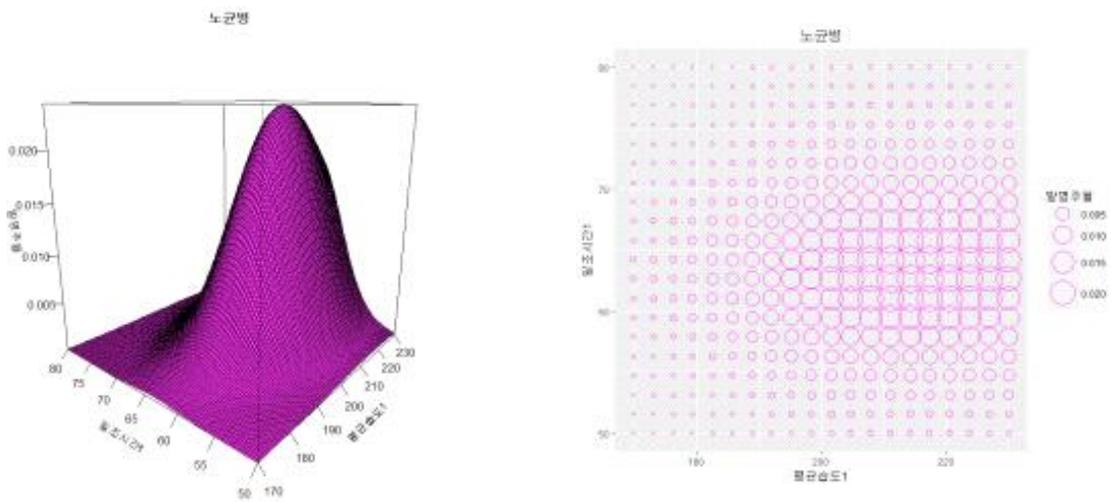
또한 강수량<sup>1</sup>이 높아질수록 발병주율이 높아지는 반면, 평균기온<sup>2</sup>가 높아지면 반대로 발병주율이 낮아지는 현상을 나타냄.



(a) (b)

그림 300. (a) 발병주율을 추정된 결과와 실제 평균발병주율 비교, (b) 네 가지 설명변수의 종합적인 값의 조합에 따른 발병주율의 변화

- 설명변수 중에서 특별히 1개월 전의 평균습도와 일조시간의 두 변수 조합 값에 따른 발병주율의 변화를 표시해 보면 그림301과 같음. 그림301 (a)에는 발병주율 추정치를 3차원 함수로 나타낸 것이며, 그림301 (b)에는 발병주율의 추정값을 2차원 평면 위에 동그라미의 크기로 표시함. 두 그림 모두에서 알 수 있듯이 1개월 전 평균습도와 일조시간 각각의 중간값에서 가장 발병률이 높은 경향이 있으며, 중간값에서 멀어질수록 발병률이 낮아지는 것을 알 수 있음.



(a) (b)

그림 301. (a) 발병주율 추정치를 3차원 함수 그래프, (b) 발병주율의 추정값을 2차원 평면 위에 동그라미 크기로 표현

### 3-2) 양파 흑색썩음균핵병

- 흑색썩음균핵병 발병주율을 예측하기 위한 프로빗 일반화가법모형의 설명변수로는 1개월 전

의 평균습도(평균습도1), 평균기온(평균기온1), 최고기온(최고기온1)과 2개월 전의 일조시간(일조시간2)이 유의수준  $\alpha = 0.05$  하에서 모두 유의하게 ( $p$ -값  $< 0.05$ ) 선택되었으며, 결정계수 ( $R^2$ )는 0.741로 나타남.

○ 최종추정모형은 다음과 같음:

$$\Phi^{-1}(\hat{\pi}(x)) = -10.15 + 0.01 * \text{평균습도1} - 0.57 * \text{평균기온1} + 0.03 * \text{일조시간2} + 0.55 * \text{최고기온1}$$

따라서 흑색씩음균핵병의 발병주율에 대한 추정치는 아래와 같음.

$$\hat{\pi}(x) = \Phi(-10.15 + 0.01 * \text{평균습도1} - 0.57 * \text{평균기온1} + 0.03 * \text{일조시간2} + 0.55 * \text{최고기온1})$$

○ 그림302 (a)에는 추정된 프로빗 일반화가법모형으로 실제 관측된 5개 지자체의 3월부터 5월 까지의 발병주율을 추정한 결과(빨간색 동그라미와 실선)와 실제 평균발병주율(파란색 동그라미)이 비교되어있음. 모든 지자체들에서는 대체로 잘 적합함을 알 수 있음. 1개월 전의 평균 습도(평균습도1), 평균기온(평균기온1), 최고기온(최고기온1)과 2개월 전의 일조시간(일조시간2) 등 네 가지 설명변수의 종합적인 값의 조합에 따른 발병주율의 변화를 그림302 (b)에 표시함. 최고기온1, 평균습도1, 일조시간2가 높아질수록 발병주율이 높아지지만 평균기온1이 높아지면 반대로 발병주율이 낮아지는 것을 확인 할 수 있음.

○ 평균기온1과 최고기온1의 조합에 따른 발병주율의 변화는 그림303 (a)와 그림303 (b)에 표시 됨. 평균기온1이 낮고 최고기온1이 높은 삼각형 지역의 범위에서 발병주율이 최대로 높아지는 것을 확인 할 수 있음.

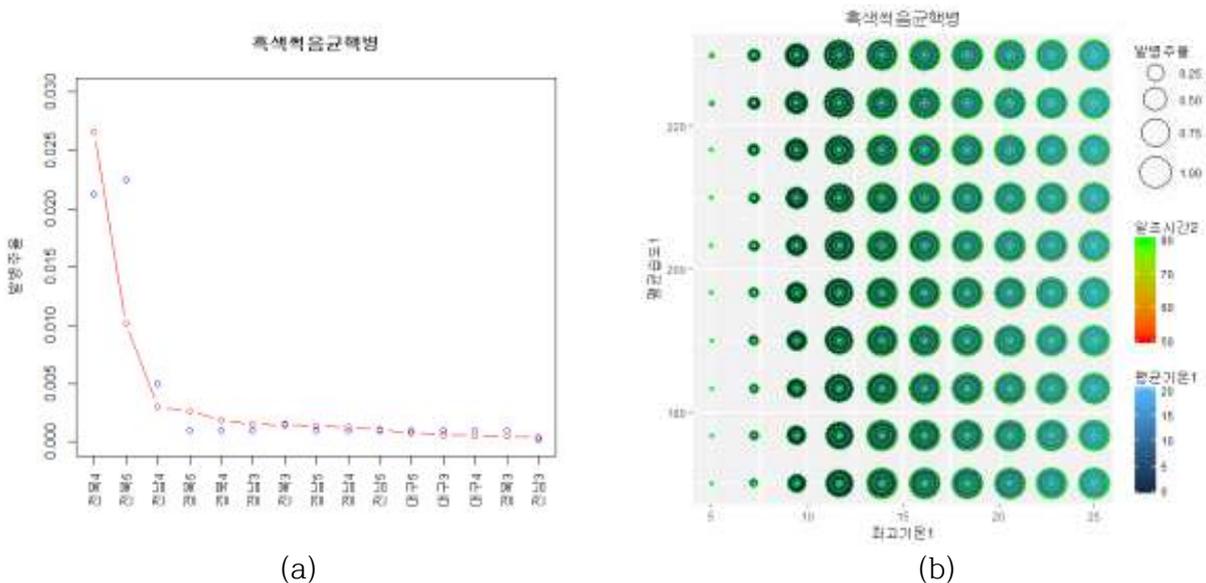


그림302. (a) 추정된 프로빗 일반화가법모형, (b) 네 가지 설명변수의 종합적인 값의 조합에 따른 발병주율의 변화

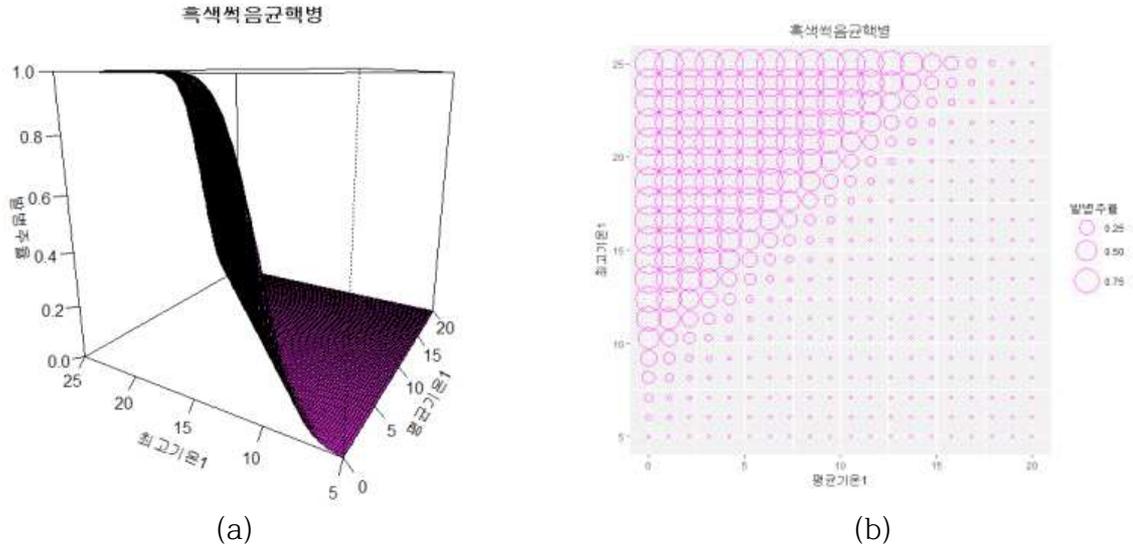


그림303. 평균기온1과 최고기온1의 조합에 따른 발병주율의 변화

### 3-3) 마늘 잎마름병

○ 잎마름병 발병주율을 예측하기 위한 프로빗 일반화가법모형의 설명변수로는 1개월 전의 일조 시간(일조시간1)과 2개월 전의 평균습도(평균습도2)가 유의수준  $\alpha = 0.05$  하에서 모두 유의하게 ( $p$ -값 < 0.01) 선택되었으며, 결정계수( $R^2$ )는 0.727로 나타남.

○ 최종추정모형은 아래와 같음:

$$\Phi^{-1}(\hat{\pi}(\mathbf{x})) = -4.39 + 0.01 * \text{평균습도2} + \hat{f}(\text{일조시간1})$$

따라서 잎마름병 발병주율에 대한 추정치는 다음과 같음.

$$\hat{\pi}(\mathbf{x}) = \Phi(-4.39 + 0.01 * \text{평균습도2} + \hat{f}(\text{일조시간1}))$$

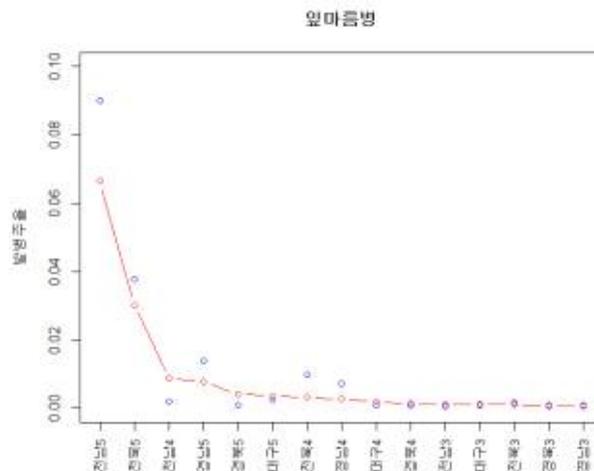


그림304. 5개 지자체의 3월부터 5월까지의 잎마름병의 발병주율 추정한 결과

- 그림304는 추정된 프로빗 일반화가법모형으로 실제 관측된 5개 지자체의 3월부터 5월까지의 앞마름병의 발병주율을 추정한 결과(빨간색 동그라미와 실선)와 실제 평균발병주율(파란색 동그라미)이 비교되어 있음. 모든 지자체들에서 대체로 잘 적합함을 알 수 있음.
- 1개월 전의 일조시간과 2개월 전의 평균습도의 값의 조합에 따른 발병주율의 변화를 표시해 보면 그림305와 같음. 그림305 (a)는 발병주율 추정치를 3차원 함수로 나타낸 것이며, 그림 305 (b)는 발병주율의 추정값을 2차원 평면 위에 동그라미의 크기로 표시함. 두 그림에서 알 수 있듯이 1개월 전 일조시간과 2개월 전의 평균습도가 동시에 높아졌을 때 발병률이 급격히 증가하는 경향이 있음을 확인할 수 있음.

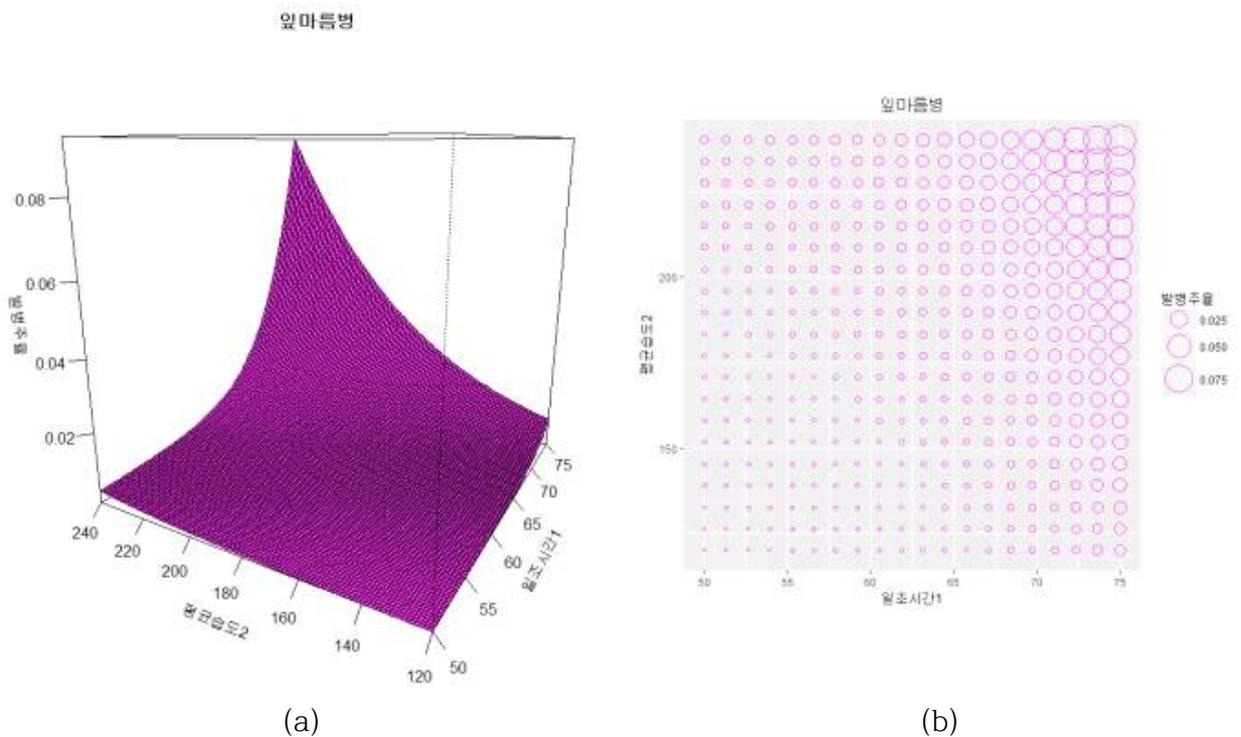


그림305. (a) 발병률 추정치를 3차원 함수, (b) 발병주율의 추정값을 2차원 평면 위에 동그라미 크기로 표시함

### (3) 3차년도 연구내용 및 결과

- 기상요인, 환경장해 및 병해 정보의 통합을 통한 빅 데이터 기반의 작황 예측 모델을 개발하고, 성능평가 통한 최적 모형을 선정함.
- 양파와 마늘의 작황을 예측하기 위해 사용된 기상데이터는 전년도 7월부터 당해 연도 6월까지의 평균기온, 평균최저기온, 평균최고기온, 누적강수량, 평균상대습도, 누적일조시간, 평균지면온도 등임. 작황예측모형에 사용된 병해정보로는 각각 양파의 경우 3, 4, 5월의 노균병과

흑색썩음균핵병 발병주율이며, 마늘의 경우 3, 4, 5월의 잎마름병 발병주율임.

- 단수예측을 위한 최종모형 선택은 모형의 예측력 측도에 의하여 판단하며, 각 지역별 특성과 단수의 차이가 있으므로 상대적인 평균오차 측도인 평균절대 백분율 오차(Mean Absolute Percentage Error : MAPE)를 사용함.

## 가. 분석모형

- 반응변수  $y$ 를 예측하기 위하여  $p$ 개의 설명변수를 사용하여 예측모형을 구축하고자 할 때, 일반화법모형(Generalized Additive Model: GAM)은 설명변수  $x_1, \dots, x_p$  중에서 반응변수와 선형적인 관계를 가진 설명변수들이  $q$ 개 있고 나머지  $p-q$ 개는 비선형적인 관계를 갖고 있다고 할 때  $y$  반응변수와 설명변수간의 관계식을 다음과 같이 설정함.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_q x_q + f_{q+1}(x_{q+1}) + \dots + f_p(x_p) + \epsilon$$

- 본 예측모형의 반응변수  $y$ 는 작물(양파, 마늘)의 10a당 생산량이며, 설명변수들  $x_1, \dots, x_p$  은 각 작물의 해당 병해들의 발병주율과 기상요인들임.
- GAM 모형적합을 위해서는 모수적 요소인  $\beta = (\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_q)'$ 와 비모수적 함수인  $f_j$ 를 추정해야 함. 본 연구에서는 다음과 같은 backfitting 알고리즘을 이용하여 추정하였음.

(i) 초기화 :  $\hat{f}_j = f_j^{(0)}, \quad j = q+1, \dots, p$

(ii) 반복 :  $\ominus \Phi^{-1}(\hat{\pi}(\mathbf{x})) - \sum_{j=q+1}^p \hat{f}_j$ 를  $x_1, \dots, x_q$ 에 대하여 선형회귀 적합하여  $\hat{\beta} = (\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1, \dots, \hat{\beta}_q)'$  추정

$$\ominus \hat{f}_j = S_j(\Phi^{-1}(\hat{\pi}(\mathbf{x})) - \mathbf{x}_j' \hat{\beta} - \sum_{k \neq j} \hat{f}_k | x_j), \quad \mathbf{x}_j = (1, x_1, \dots, x_q)', \quad j = q+1, \dots, p$$

이 때  $S_j(\cdot | x_j)$ 는 비모수적 함수추정치임.

(iii)  $\hat{\beta}$ 와  $\hat{f}_j$ 들이 수렴할 때까지 단계 (ii) 반복함.

- GAM 모형의 모수적 요소인  $\beta = (\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_q)'$ 와 비모수적 함수인  $f_j$ 가 모두 추정된 후 생산량  $y$ 에 대한 추정치는 다음과 같음:

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_1 + \dots + \hat{\beta}_q x_q + \hat{f}_{q+1}(x_{q+1}) + \dots + \hat{f}_p(x_p)$$

- 예측모형에 사용해야하는 기상자료는 충분하지만 실제 병해 발병주율에 대한 활용정보는 5개 시도(경상남도, 경상북도, 대구광역시, 전라남도, 전라북도)에 대한 2016년과 2017년 자료(10개)밖에 없어서 매우 제한적임. 따라서 본 연구에서는 먼저 매우 제한적이지만 실제 가용한 병해자료와 기상자료를 활용하여 병해변수 1개와 기상변수 2개인(자료가 소표본이므로 모형 적합이 가능하기 위해서는 총 3개의 설명변수밖에 사용할 수 없음) GAM모형(모형I: 2016-2017년 자료 활용)을 먼저 시도하고, 보다 다양한 기상요인들이 생산량에 어떻게 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 병해변수와 더불어 예측모형에 사용되는 기상변수의 수가 3

개(모형II)와 4개(모형III)인 GAM모형을 적합함. 모형의 설명변수가 늘어남에 따라 모형적합을 위해 필요한 자료의 수가 더 많아야하지만 추가적인 병해자료가 부족하므로 2차 년도 연구결과를 활용하여 병해 발병주율을 추정하여 추정된 병해자료를 모형II와 모형III에서 사용함. 모형II와 모형III에서는 2010-2017년 기상 및 병해자료를 활용하며, 2010-2015년 병해자료는 추정자료를 사용함.

- 최적예측모형을 선택하기 위하여 세 가지 모형 각각의 최적모형을 추출하고 최종적으로 그 중에 가장 작은 MAPE값을 가진 모형을 최적모형으로 판단함.

## 나. 분석자료

- 모형에 사용된 기상데이터는 전년도 7월부터 당해 연도 6월까지의 월평균기온(°C), 월평균최저기온(°C), 월평균최고기온 (°C), 월누적강수량(mm), 월평균상대습도(%), 월누적일조시간(hr), 월평균지면온도(°C) 등 총 84개임. 모형I을 구축하는데 이용한 자료는 2016~2017년 전라북도, 전라남도, 경상북도, 경상남도, 대구광역시의 양파와 마늘 10a당 생산량, 2016~2017년 전라북도, 전라남도, 경상북도, 경상남도, 대구광역시의 3~5월 흑색썩음균핵병과 노균병 발병주율, 2015년 7월부터 2017년 6월까지의 위에 언급된 7가지 기상자료를 이용함. 예를 들어 2016년 전라남도의 10a당 생산량을 예측하기 위해 2016년 전라북도의 3~4월 흑색썩음균핵병과 노균병 발병주율, 2015년 7월부터 2016년 6월까지의 기상자료를 이용함. 2015년 7월부터 2016년 6월까지의 기상자료를 이용한 이유는 재배하기 전 12달의 기상요인과 생산량의 관계를 알아보기 위해서임.
- 병해자료는 양파의 경우 노균병과 흑색썩음균핵병의 발병주율이며, 마늘은 잎마름병 발병주율임. 농촌진흥청의 국가농작물병해충관리시스템에서 제공하는 양파와 마늘의 주요병해의 예찰자료(발병주율)로서, 2016년과 2017년 조사기준일 3월 1일, 3월 16일, 4월 1일, 4월 16일, 5월 1일, 5월 16일에 관찰포(센터)에서 수집되어 전라남도, 전라북도, 경상남도, 경상북도, 대구광역시 등 5개 지자체별로 정리 제공되고 있음. 모형I의 양파에 대해서는 2016-2017년 위의 조사기준일에 대한 5개 지자체별 노균병과 흑색썩음균핵병의 병해주율을 3월, 4월, 5월 평균을 계산하여 그 평균병해주율을 해당 월의 병해주율로 사용하였으며, 마늘에 대해서는 동일 조사기준일과 동일 5개 지자체 난지형마늘의 잎마름병 병해주율 자료를 월별 평균을 계산하여 사용함.
- 모형II와 모형III에서 필요한 2010-2015년도 병해주율 추정자료는 1개월, 2개월 전의 월평균기온(°C), 월평균최저기온(°C), 월평균최고기온 (°C), 월누적강수량(mm), 월평균상대습도(%), 월누적일조시간(hr), 월평균지면온도(°C)을 고려한 프로빗일반화방법모형에 의하여 생성함. 양파의 노균병과 흑색썩음균핵병의 병해발병주율과 마늘의 잎마름병 병해발병주율은 다음과 같은 추정식(2차년도 보고서)에 의하여 각각 추정함.

양파 노균병 발병주율 추정식:

$$\hat{\pi}(\mathbf{x}) = \Phi(-2.92 + 0.02 * \text{강수량1} - 0.30 * \text{평균기온2} + \hat{f}(\text{평균습도1}) + \hat{f}(\text{일조시간1}))$$

양파 흑색썩음균핵병 발병주율 추정식:

$$\hat{\pi}(\mathbf{x}) = \Phi(-10.15 + 0.01 * \text{평균습도1} - 0.57 * \text{평균기온1} + 0.03 * \text{일조시간2} + 0.55 * \text{최고기온1})$$

마늘 잎마름병 발병주율 추정식:

$$\hat{\pi}(\mathbf{x}) = \Phi(-4.39 + 0.01 * \text{평균습도2} + \hat{f}(\text{일조시간1}))$$

- 따라서 모형I에서 사용된 자료는 2016 - 2017년도 7가지 기상변수의 12개월 자료와 실측 병해발병주율 자료이며, 모형II와 모형III에서 사용된 자료는 2010 - 2017년도 7가지 기상변수의 12개월 자료, 2010 - 2015년도 병해발병추정자료와 2016 - 2017년 병해발병주율 실측자료의 병해발병주율 통합자료임.

## 다. 결과

- 양파 생산량 예측모형I:

양파질병인 노균병 3, 4, 5월의 발병주율, 흑색썩음균핵병 3, 4, 5월의 발병주율 중에 1개를 모형의 설명변수에 포함하고 기상변수 7가지에 대한 전년도 7월부터 당해 연도 6월까지의 84개 기상자료 중에서 두 가지를 설명변수로 포함하는 모든 조합의 GAM 모형을 적합시킨 후, 양파생산량에 유의한 기상변수로 밝혀진 전년도 9월 지면온도, 전년도 10월 강수량, 전년도 12월 강수량, 당해 연도 4월 일조량(시간), 4월 상대습도, 5월 강수량(Choi and Baek 2016(a))이 적어도 1개 이상 설명변수로 포함되어있는 모형들을 선별하여 결정계수( $R^2$ )가 높은 순서로 상위 20개를 순서대로 정렬함. 정렬된 20개 모형의 각 설명변수의 편회귀 추정식을 검토한 후 비합리적인 관계식을 보이는 모형을 배제하여 그 중에서 가장 높은 결정계수를 갖는 최적의 모형을 추출함. 추출된 최적 모형은 아래와 같이 4월 노균병 발병주율, 전년도 10월 평균습도, 전년도 10월 강수량이 양파 생산량에 영향을 주는 유의한 변수로 판단됨. 모형의 결정계수는  $R^2 = 0.864$ 로서 설명력이 높으며, 그림306에서 볼 수 있듯이 4월 노균병 발병주율과 10월 평균습도가 높아지면 양파 생산량은 점차 감소하는 추세를 보이며, 10월 강수량이 증가함에 따라 생산량은 증가하다가 대략 125(mm) 수준을 넘어서면 생산량은 정체 혹은 약간 감소하는 관계를 보여줌. 그림307는 5개 시도의 양파 생산량에 대한 2016년과 2017년 실제값과 모형I의 추정식에 의해서 추정된 추정치를 겹쳐서 표시한 것임. 2017년도 전라남도 양파 생산량 추정치를 제외하고는 대체로 잘 추정하고 있음을 알 수 있음.

### (1) 추정모형식

$$\text{생산량} = f(\text{노균병4}) + f(\text{평균습도10}) + f(\text{강수량10})$$

### (2) 모형의 추정결과

```

Parametric coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  6674.0      109.6    60.91 4.32e-07 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Approximate significance of smooth terms:
              edf Ref.df      F p-value
s(노균병4)   1.418  1.635 14.519  0.0241 *
s(평균습도10) 1.659  1.856 11.591  0.0279 *
s(강수량10)  1.921  1.992  9.657  0.0320 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

R-sq.(adj) =  0.864  Deviance explained =  94%
GCV = 3.0002e+05  Scale est. = 1.2007e+05  n = 10

```

(3) 편회귀 그림

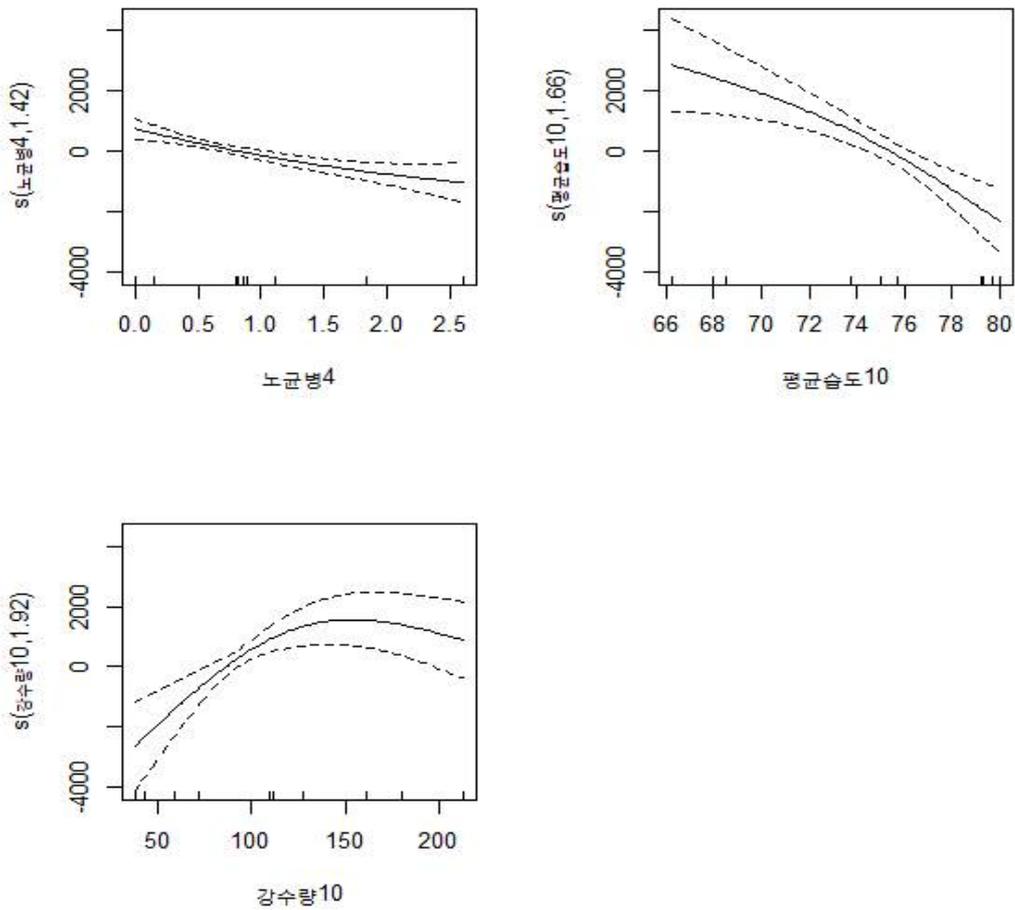
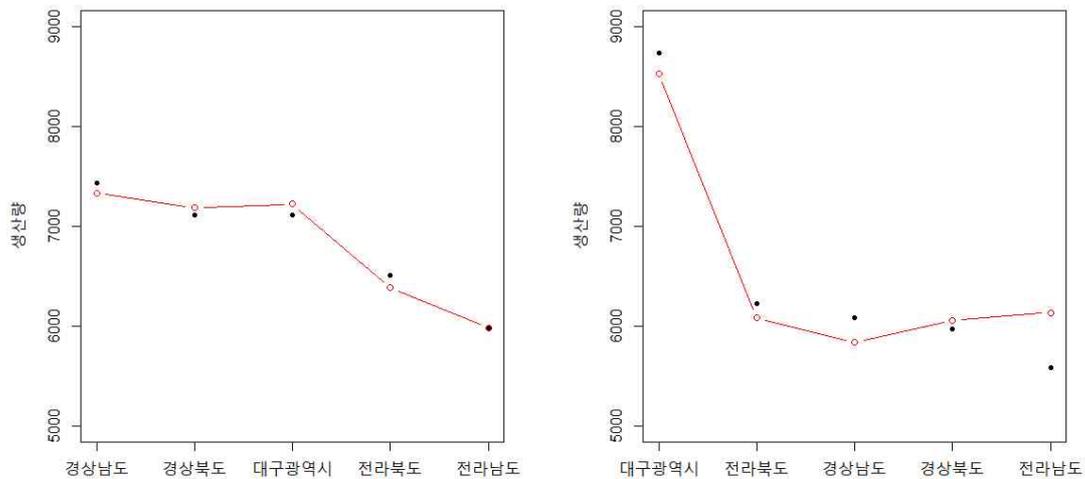


그림306. 양파 생산량과 설명요인과의 편회귀식 추정치 (모형I)



(a) 2016년 양파 (b) 2017년 양파  
 그림307. 양파 생산량과 추정치 (● : 생산량, ○ : 추정치(모형I))

○ 양파 생산량 예측모형II:

양파질병인 노균병 3, 4, 5월의 발병주율, 흑색썩음균핵병 3, 4, 5월의 발병주율 중에 1개를 모형의 설명변수에 포함하고 기상변수 7가지에 대한 전년도 7월부터 당해 연도 6월까지의 84개 기상자료 중에서 세 가지를 설명변수로 포함하는 모든 조합의 GAM 모형을 적합시킨 후, 양파생산량에 유의한 기상변수로 밝혀진 전년도 9월 지면온도, 전년도 10월 강수량, 전년도 12월 강수량, 당해 연도 4월 일조량(시간), 4월 상대습도, 5월 강수량이 적어도 1개 이상 설명변수로 포함되어있는 모형들을 선별하여 결정계수( $R^2$ )가 높은 순서로 상위 20개를 순서대로 정렬함. 정렬된 20개 모형의 각 설명변수의 편회귀 추정식을 검토한 후 비합리적인 관계식을 보이는 모형을 배제하여 그 중에서 가장 높은 결정계수를 갖는 최적의 모형을 추출함. 추출된 최적 모형은 아래와 같이 4월 노균병 발병주율, 전년도 9월 평균습도, 당해 연도 3월 평균온도, 당해 연도 4월 일조량이 양파 생산량에 영향을 주는 유의한 변수로 판단됨. 모형의 결정계수는  $R^2 = 0.563$ 로서 설명력이 보통이며, 그림308에서 볼 수 있듯이 4월 노균병 발병주율이 높아지면 양파 생산량은 점차 감소하는 추세를 보이며, 당해 연도 3월 평균온도와 4월 일조량이 증가함에 따라 생산량은 증가함. 전년도 9월의 평균습도가 대략 75%까지 증가하면 생산량도 함께 증가하지만 그 수준을 넘어서면 생산량이 감소하는 추세를 보여주고 있음. 그림309는 5개 시도의 양파 생산량에 대한 2016년과 2017년 실제값과 모형II의 추정식에 의해서 추정된 추정치를 겹쳐서 표시한 것임. 2016 - 2017년도 경상남도 양파 생산량은 과소추정, 전라남도는 과대추정하고 있음을 알 수 있음.

(1) 추정모형식

$$\text{생산량} = -101.9 * \text{노균병4} + f(\text{일조량4}) + f(\text{평균습도9}) + f(\text{평균온도3})$$

(2) 모형의 추정결과

Parametric coefficients:				
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	6506.7	117.6	55.349	< 2e-16 ***
노균병4	-101.9	32.6	-3.126	0.00367 **
---				
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				
Approximate significance of smooth terms:				
	edf	Ref.df	F	p-value
s(일조량4)	1.225	1.398	5.524	0.0222 *
s(평균습도9)	2.000	2.000	23.053	1.72e-07 ***
s(평균온도3)	1.510	1.759	3.737	0.0224 *
---				
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				
R-sq.(adj) = 0.563    Deviance explained = 62.7%				
GCV = 4.9103e+05    Scale est. = 4.0835e+05    n = 40				

(3) 편회귀 그림

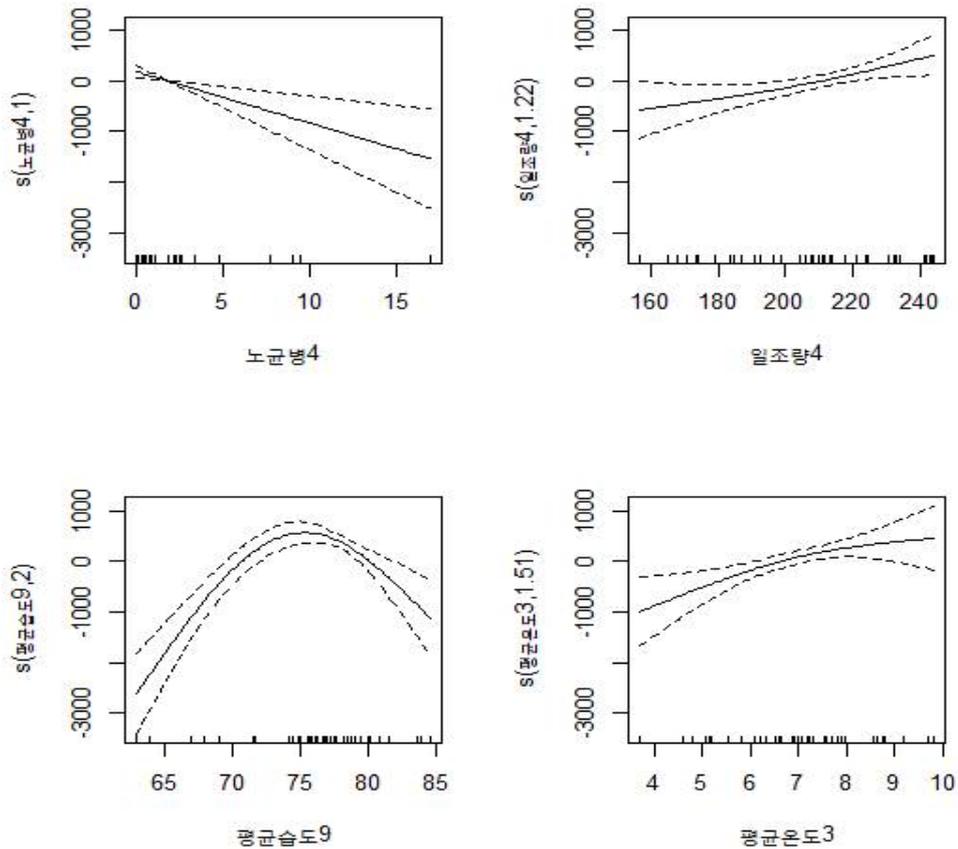
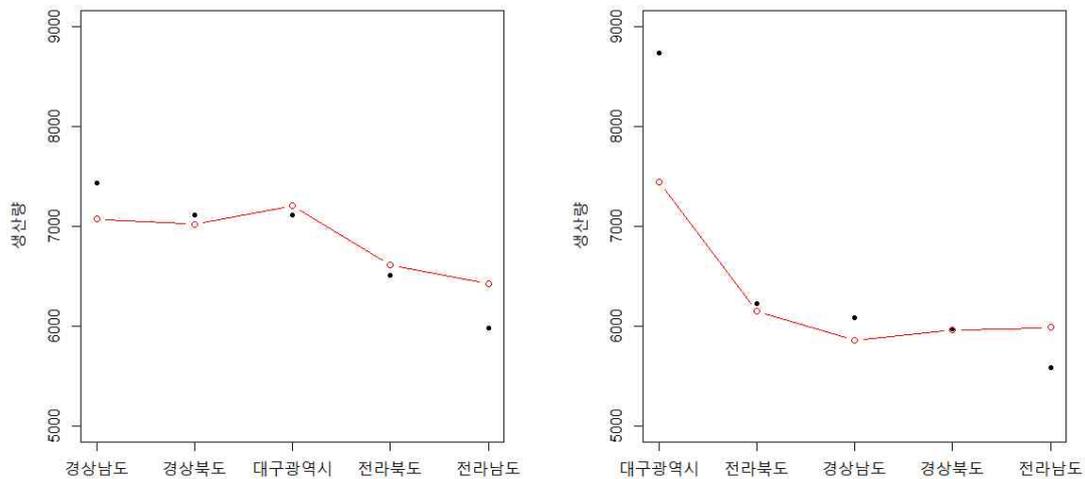


그림308. 양파 생산량과 설명요인과의 편회귀식 추정치 (모형II)



(a) 2016년 양파 (b) 2017년 양파  
 그림309. 양파 생산량과 추정치 (● : 생산량, ○ : 추정치(모형II))

○ 양파 생산량 예측모형III:

양파질병인 노균병 3, 4, 5월의 발병주율, 흑색썩음균핵병 3, 4, 5월의 발병주율 중에 1개를 모형의 설명변수에 포함하고 기상변수 7가지에 대한 전년도 7월부터 당해 연도 6월까지의 84개 기상자료 중에서 네 가지를 설명변수로 포함하는 모든 조합의 GAM 모형을 적합시킨 후, 양파생산량에 유의한 기상변수로 밝혀진 전년도 9월 지면온도, 전년도 10월 강수량, 전년도 12월 강수량, 당해 연도 4월 일조량(시간), 4월 상대습도, 5월 강수량이 적어도 1개 이상 설명변수로 포함되어있는 모형들을 선별하여 결정계수( $R^2$ )가 높은 순서로 상위 20개를 순서대로 정렬함. 정렬된 20개 모형의 각 설명변수의 편회귀 추정식을 검토한 후 비합리적인 관계식을 보이는 모형을 배제하여 그 중에서 가장 높은 결정계수를 갖는 최적의 모형을 추출함. 추출된 최적 모형은 아래와 같이 4월 노균병 발병주율, 전년도 8월 강수량, 전년도 9월 평균 습도, 전년도 12월 일조량, 당해 연도 4월 평균습도가 양파 생산량에 영향을 주는 유의한 변수로 판단됨. 모형의 결정계수는  $R^2 = 0.75$ 로서 설명력이 비교적 높은 편이며, 그림310에서 볼 수 있듯이 4월 노균병 발병주율, 4월 평균습도, 전년도 8월 강수량이 이 증가하면 양파 생산량은 점차 감소하는 추세를 보이며, 전년도 12월 일조량이 증가하면 생산량은 선형적으로 증가하지만, 전년도 9월 평균습도는 대략 75% 조금 넘을 때까지 증가하면 생산량도 증가하지만 그 수준을 지나면 생산량이 감소하는 추세를 보여줌. 그림311은 5개 시도의 양파 생산량에 대한 2016년과 2017년 실제값과 모형III의 추정식에 의해서 추정한 추정치를 겹쳐서 표시한 것임. 2016년도는 전라남도를 제외하고 모두 다소 과소추정하고 있으며, 2017년도는 경상남도에서는 과소, 경상북도에서는 과대 추정하지만 다른 지역은 대체로 잘 추정하고 있음.

(1) 추정모형식

$$\text{생산량} = -50.8987 * \text{노균병}4 - 1.9983 * \text{강수량}8 + 11.1117 * \text{일조량}12 + f(\text{평균습도}9) + f(\text{평균습도}4)$$

(2) 모형의 추정결과

Parametric coefficients:					
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )	
(Intercept)	5107.0123	681.3843	7.495	1.48e-08	***
노균병4	-50.8987	24.1730	-2.106	0.043109	*
강수량8	-1.9983	0.5209	-3.837	0.000548	***
일조량12	11.1117	4.1819	2.657	0.012154	*
---					
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Approximate significance of smooth terms:					
	edf	Ref.df	F	p-value	
s(평균습도9)	2.000	2.000	46.360	9.77e-13	***
s(평균습도4)	1.732	1.928	9.882	0.000422	***
---					
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
R-sq.(adj) = 0.75    Deviance explained = 79.3%					
GCV = 2.8976e+05    Scale est. = 2.3374e+05    n = 40					

(3) 편회귀 그림

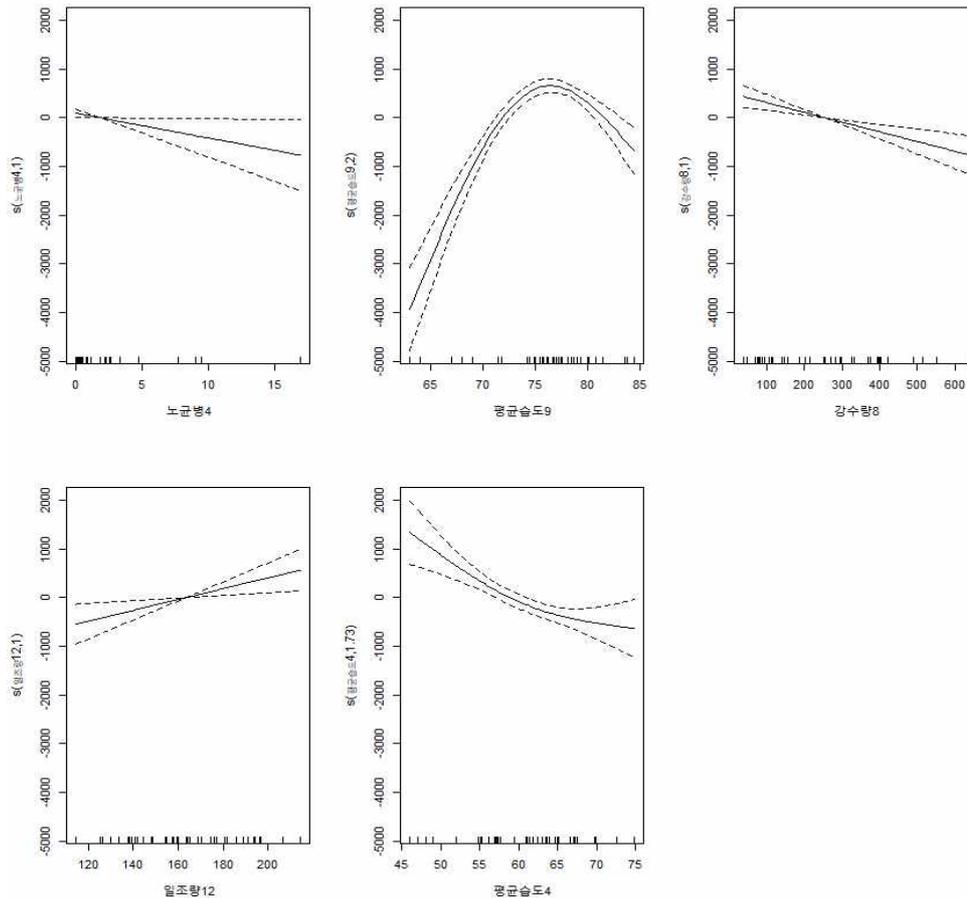
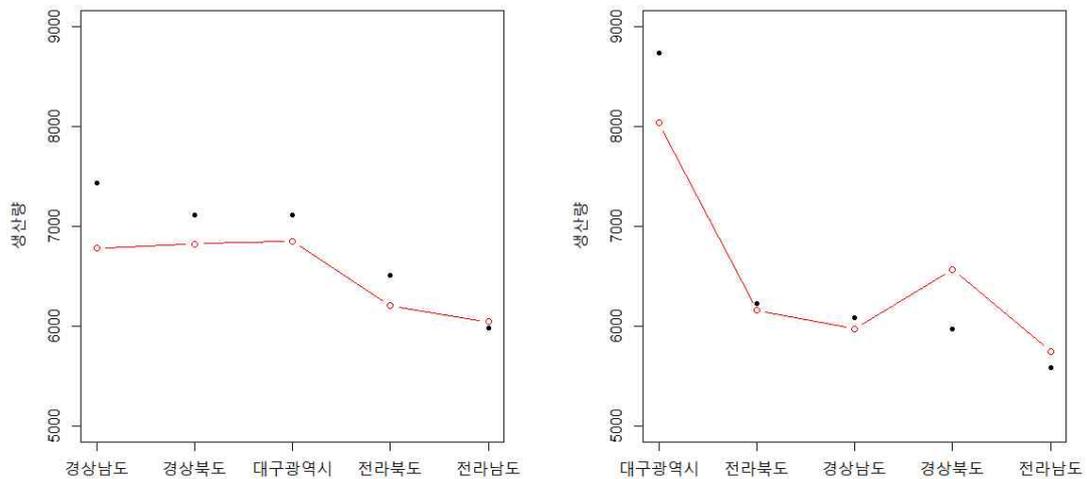


그림310. 양파 생산량과 설명요인과의 편회귀식 추정치 (모형III)



(a) 2016년 양파 (b) 2017년 양파  
 그림311. 양파 생산량과 추정치 (● : 생산량, ○ : 추정치(모형III))

○ 양파 생산량 최적 예측모형 선택:

양파 생산량 예측을 위한 최적모형을 선택하기 위하여 각 지역별 특성과 단수의 차이가 있으므로 상대적인 평균오차 측도인 평균절대 백분율 오차(Mean Absolute Percentage Error : MAPE)를 사용함.

$$MAPE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{y_i - \hat{y}_i}{y_i} \right|,$$

이 때  $y_i$ :  $i$ 번째 시도 생산량,  $\hat{y}_i$ :  $i$ 번째 시도의 생산량 추정치임.

모델명	MAPE
모형I	0.026
모형II	0.044
모형III	0.046

표 4. 양파 모형에 따른 MAPE

모형I의 MAPE가 0.026으로서 비교 모형들 중에서 최소값을 나타내므로 본 연구에서는 양파 생산량 예측모형I을 병해정보와 기상정보를 이용한 양파 생산량 최적예측 모형으로 판단함.

양파 생산량 최적예측 모형:

$$\text{양파 생산량} = f(\text{노균병}4) + f(\text{평균습도}10) + f(\text{강수량}10)$$

○ 마늘 생산량 예측모형I:

마늘질병인 잎마름병 3, 4, 5월의 발병주율 중에 1개를 모형의 설명변수에 포함하고 기상변수 7가지에 대한 전년도 7월부터 당해 연도 6월까지의 84개 기상자료 중에서 두 가지를 설명변수로 포함하는 모든 조합의 GAM 모형을 적합시킨 후, 마늘생산량에 유의한 기상변수로 밝혀진 전년도 10월 일조량(시간), 전년도 10월 강수량, 당해 연도 1월 평균습도, 1월 최고온도, 3월 강수량, 4월 일조량(시간), 5월 평균습도(최성천, 백장선 2016(b)) 중 적어도 1개 이상 설명변수로 포함되어있는 모형들을 선별하여 결정계수( $R^2$ )가 높은 순서로 상위 20개를 순서대로 정렬함. 정렬된 20개 모형의 각 설명변수의 편회귀 추정식을 검토한 후 비합리적인 관계식을 보이는 모형을 배제하여 그 중에서 가장 높은 결정계수를 갖는 최적의 모형을 추출함. 추출된 최적 모형은 아래와 같이 5월 잎마름병 발병주율, 전년도 10월 일조량, 당해 연도 4월 평균온도가 마늘 생산량에 영향을 주는 유의한 변수로 판단됨. 모형의 결정계수는  $R^2 = 0.903$ 으로서 설명력이 높으며, 그림312에서 볼 수 있듯이 5월 잎마름병 발병주율이 높아지면 마늘 생산량은 점차 감소하는 추세를 보이며, 전년도 10월 일조량과 당해 연도 4월 평균온도가 높아지면 생산량도 함께 증가함. 그림314는 5개 시도의 마늘 생산량에 대한 2016년과 2017년 실제값과 모형I의 추정식에 의해서 추정된 추정치를 겹쳐서 표시한 것임. 2016 - 2017년도 전라남도 마늘 생산량 추정치를 제외하고는 대체로 잘 추정하고 있음을 알 수 있음.

(1) 추정모형식

$$\text{생산량} = f(\text{잎마름병5}) + 1.1988 * \text{일조량10} + f(\text{평균온도4})$$

(2) 모형의 추정결과

Parametric coefficients:				
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	1122.9160	60.1084	18.682	9.93e-06 ***
일조량10	1.1988	0.3249	3.689	0.0148 *
---				
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				
Approximate significance of smooth terms:				
	edf	Ref.df	F	p-value
s(잎마름병5)	1.633	1.862	8.221	0.0218 *
s(평균온도4)	1.485	1.732	8.437	0.0213 *
---				
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				
R-sq.(adj) = 0.903    Deviance explained = 94.8%				
GCV = 6323    Scale est. = 3086.6    n = 10				

(3) 편회귀 그림

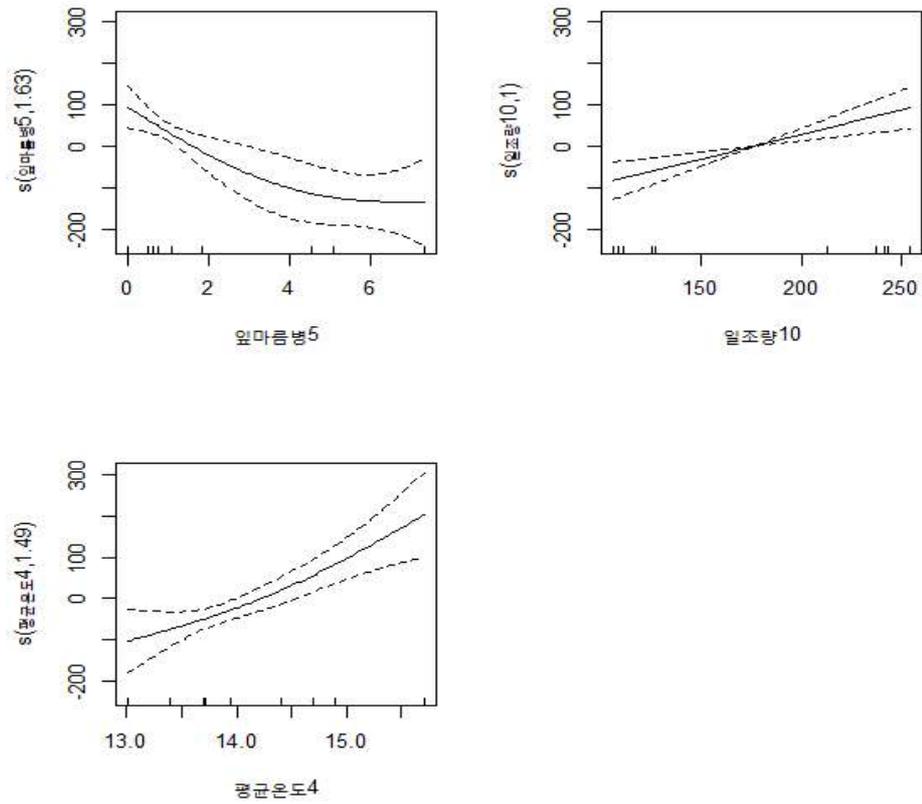
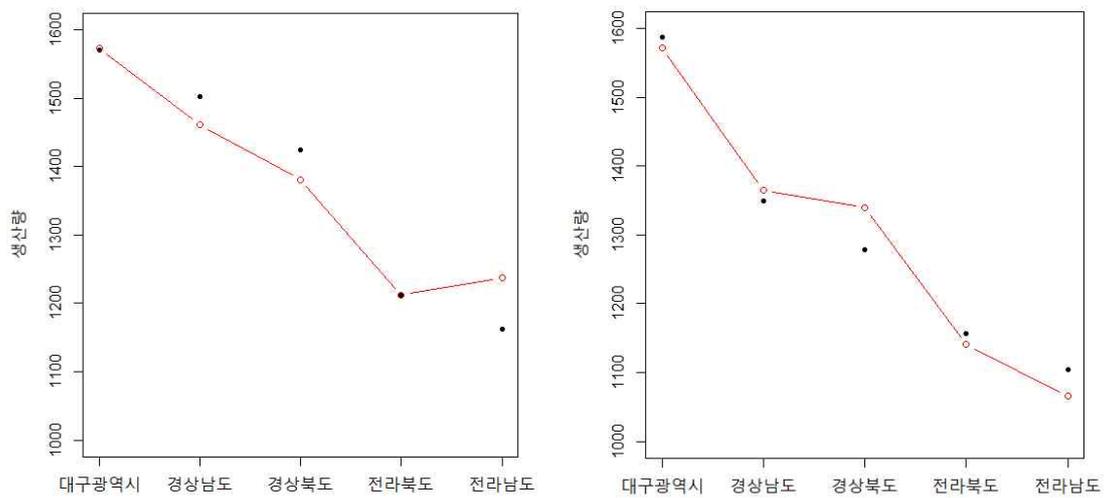


그림312. 마을 생산량과 설명요인과의 편회귀식 추정치 (모형I)



(a) 2016년 마을 (b) 2017년 마을  
그림313. 마을 생산량과 추정치 (● : 생산량, ○ : 추정치(모형I))

○ 마늘 생산량 예측모형II:

마늘질병인 잎마름병 3, 4, 5월의 발병주율 중에 1개를 모형의 설명변수에 포함하고 기상변수 7가지에 대한 전년도 7월부터 당해 연도 6월까지의 84개 기상자료 중에서 세 가지를 설명변수로 포함하는 모든 조합의 GAM 모형을 적합시킨 후, 마늘생산량에 유의한 기상변수로 밝혀진 전년도 10월 일조량(시간), 전년도 10월 강수량, 당해 연도 1월 평균습도, 1월 최고온도, 3월 강수량, 4월 일조량(시간), 5월 평균습도(최성천, 백장선 2016(b)) 중 적어도 1개 이상 설명변수로 포함되어있는 모형들을 선별하여 결정계수( $R^2$ )가 높은 순서로 상위 20개를 순서대로 정렬함. 정렬된 20개 모형의 각 설명변수의 편회귀 추정식을 검토한 후 비합리적인 관계식을 보이는 모형을 배제하여 그 중에서 가장 높은 결정계수를 갖는 최적의 모형을 추출함. 추출된 최적 모형은 아래와 같이 3월 잎마름병 발병주율, 당해 연도 1월 평균습도, 2월 평균온도, 3월 강수량이 마늘 생산량에 영향을 주는 유의한 변수로 판단됨. 모형의 결정계수는  $R^2 = 0.679$ 으로서 설명력이 보통이며, 그림314에서 볼 수 있듯이 3월 잎마름병 발병주율과 1월 평균습도가 높아지면 마늘 생산량은 점차 감소하는 추세를 보이며, 당해 연도 2월 평균온도와 3월 강수량이 일정 수준까지 상승하면 생산량도 증가하지만 일정 수준을 넘어서면 생산량이 정체하거나(평균온도) 감소한다(강수량). 그림315은 5개 시도의 마늘 생산량에 대한 2016년과 2017년 실제값과 모형I의 추정식에 의해서 추정된 추정치를 겹쳐서 표시한 것임. 전라북도과 대구광역시에서는 과소추정을 보이고, 전라남도에서는 다소 과대 추정을 나타냄.

(1) 추정모형식

$$\text{생산량} = -162.59 * \text{잎마름병3} + f(\text{강수량3}) + f(\text{평균습도1}) + f(\text{평균온도2})$$

(2) 모형의 추정결과

Parametric coefficients:				
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	1355.79	25.12	53.969	<2e-16 ***
잎마름병3	-162.59	71.27	-2.281	0.0291 *
---				
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				
Approximate significance of smooth terms:				
	edf	Ref.df	F	p-value
s(강수량3)	1.787	1.954	4.12	0.0437 *
s(평균습도1)	1.445	1.690	34.22	2.37e-07 ***
s(평균온도2)	1.742	1.932	3.65	0.0252 *
---				
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				
R-sq.(adj) = 0.679    Deviance explained = 72.8%				
GCV = 14743    Scale est. = 12172    n = 40				

(3) 편회귀 그림

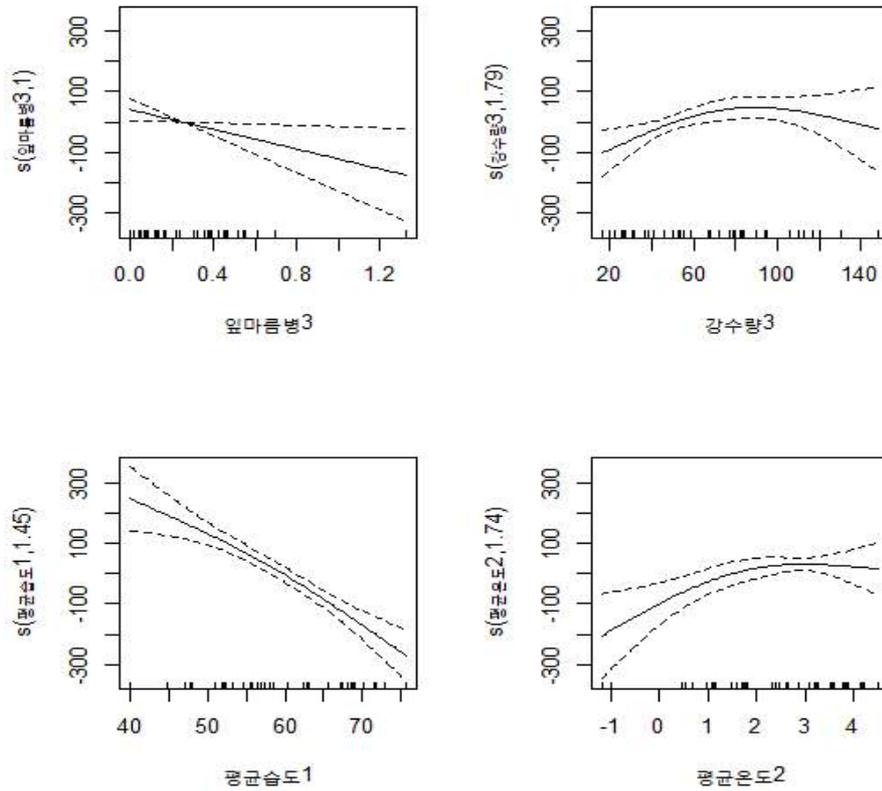
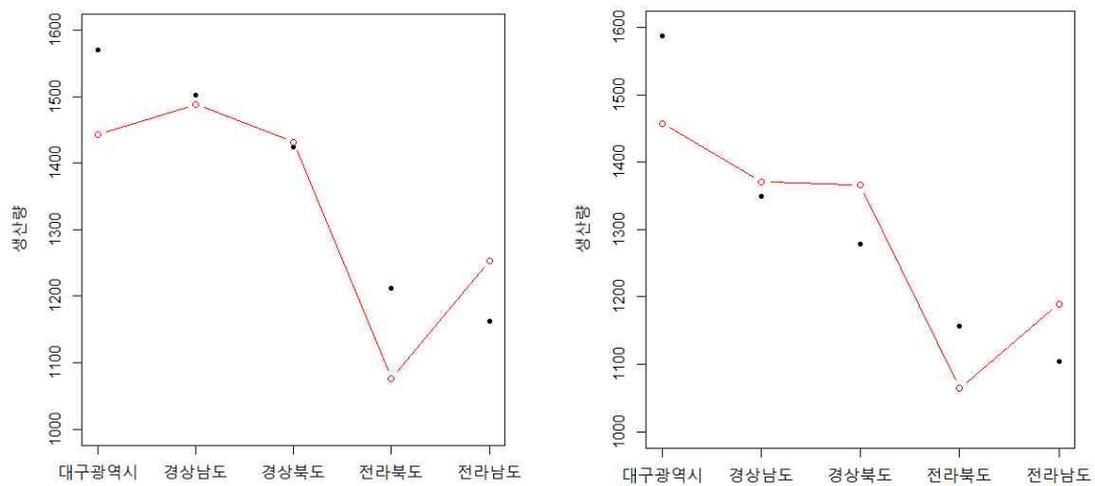


그림314. 마늘 생산량과 설명요인과의 편회귀식 추정치 (모형II)



(a) 2016년 마늘 (b) 2017년 마늘  
 그림315. 마늘 생산량과 추정치 (● : 생산량, ○ : 추정치(모형II))

○ 마늘 생산량 예측모형III:

마늘질병인 잎마름병 3, 4, 5월의 발병주율 중에 1개를 모형의 설명변수에 포함하고 기상변수 7가지에 대한 전년도 7월부터 당해 연도 6월까지의 84개 기상자료 중에서 네 가지를 설명변수로 포함하는 모든 조합의 GAM 모형을 적합시킨 후, 마늘생산량에 유의한 기상변수로 밝혀진 전년도 10월 일조량(시간), 전년도 10월 강수량, 당해 연도 1월 평균습도, 1월 최고온도, 3월 강수량, 4월 일조량(시간), 5월 평균습도(최성천, 백장선 2016(b)) 중 적어도 1개 이상 설명변수로 포함되어있는 모형들을 선별하여 결정계수( $R^2$ )가 높은 순서로 상위 20개를 순서대로 정렬함. 정렬된 20개 모형의 각 설명변수의 편회귀 추정식을 검토한 후 비합리적인 관계식을 보이는 모형을 배제하여 그 중에서 가장 높은 결정계수를 갖는 최적의 모형을 추출함. 추출된 최적 모형은 아래와 같이 3월 잎마름병 발병주율, 전년도 7월 일조량(시간), 당해 연도 1월 평균습도, 2월 최고온도, 3월 강수량이 마늘 생산량에 영향을 주는 유의한 변수로 판단됨. 모형의 결정계수는  $R^2 = 0.741$ 으로서 설명력이 조금 높으며, 그림316에서 볼 수 있듯이 3월 잎마름병 발병주율과 1월 평균습도가 높아지면 마늘 생산량은 점차 감소하는 추세를 보이며, 당해 연도 2월 최고온도가 상승하면 생산량도 증가하지만 나중에는 완만하게 증가함. 전년도 7월 일조량(시간)과 당해 연도 3월 강수량은 어느 정도 상승할 때까지 생산량도 함께 증가하지만 일정 수준을 넘으면 생산량은 감소하는 추세를 보임. 그림317는 5개 시도의 마늘 생산량에 대한 2016년과 2017년 실제값과 모형I의 추정식에 의해서 추정된 추정치를 겹쳐서 표시한 것임. 전라북도와 대구광역시에서는 과소추정을 보이고, 전라남도와 2017년 경상북도에서는 다소 과대 추정을 나타냄.

(1) 추정모형식

$$\text{생산량} = -174.87 * \text{잎마름병3} + f(\text{평균습도1}) + f(\text{최고온도2}) + f(\text{강수량3}) + f(\text{일조량7})$$

(2) 모형의 추정결과

Parametric coefficients:				
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	1358.90	24.46	55.56	<2e-16 ***
잎마름병3	-174.87	74.11	-2.36	0.0246 *
---				
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				
Approximate significance of smooth terms:				
	edf	Ref.df	F	p-value
s(평균습도1)	1.075	1.144	49.732	6.83e-09 ***
s(최고온도2)	1.638	1.867	4.942	0.00904 **
s(강수량3)	1.800	1.958	6.272	0.01048 *
s(일조량7)	1.854	1.978	3.691	0.03274 *
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				
R-sq.(adj) = 0.741 Deviance explained = 79%				
GCV = 12390 Scale est. = 9798.3 n = 40				

(3) 편회귀 그림

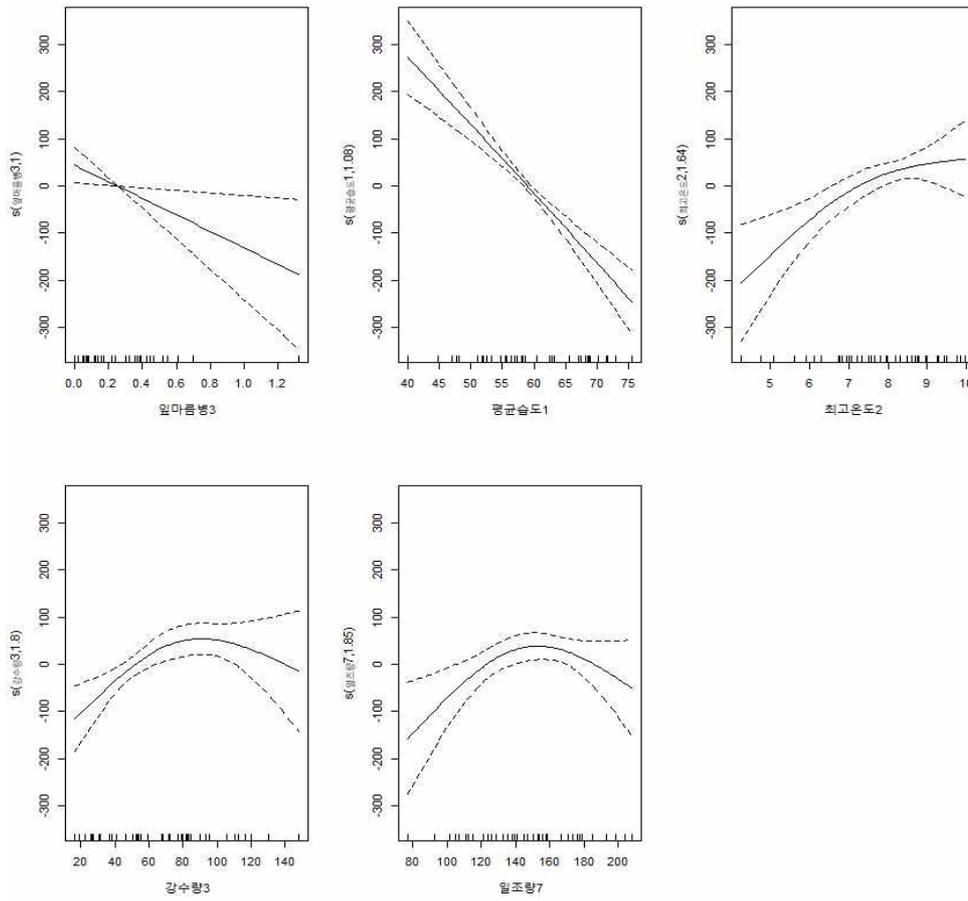
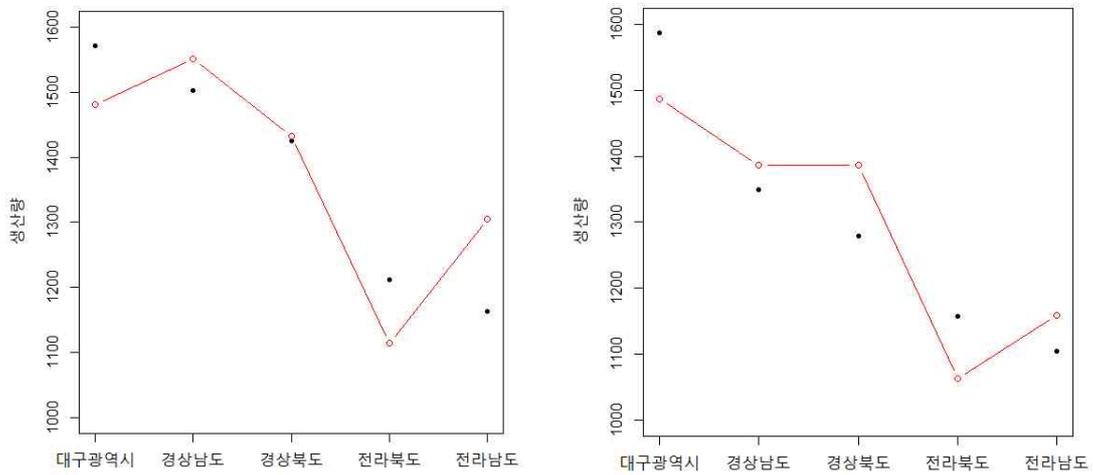


그림316. 마늘 생산량과 설명요인과의 편회귀식 추정치 (모형III)



(a) 2016년 마늘 (b) 2017년 마늘  
그림317. 마늘 생산량과 추정치 (● : 생산량, ○ : 추정치(모형II))

○ 마늘 생산량 최적 예측모형 선택:

마늘 생산량 예측을 위한 최적모형을 선택하기 위하여 각 지역별 특성과 단수의 차이가 있으므로 상대적인 평균오차 측도인 평균절대 백분율 오차(Mean Absolute Percentage Error : MAPE)를 사용함.

모델명	MAPE
모형I	0.024
모형II	0.061
모형III	0.060

표5. 양파 모형에 따른 MAPE

모형I의 MAPE가 0.0264로서 비교 모형들 중에서 최소값을 나타내므로 본 연구에서는 마늘 생산량 예측모형I을 병해정보와 기상정보를 이용한 마늘 생산량 최적예측 모형으로 판단함.

마늘 생산량 최적예측 모형:

$$\text{마늘 생산량} = f(\text{잎마름병5}) + 1.1988 * \text{일조량10} + f(\text{평균온도4})$$

나. 연구개발 성과

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표											연구기반지표							
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료 (백만원)	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
최종목표	7	7	-	2	-	2	-	-	-	-	2	6	6	-	1	-	1	2	-
1차년도	목표	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
	실적	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	10	-	-	-	-	-
2차년도	목표	4	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	1	-
	실적	4	1	-	1	15	-	-	-	-	-	1	2	14	-	-	-	1	-
3차년도	목표	-	4	-	2	-	2	-	-	-	2	3	2	-	1	-	1	1	-
	실적	4	5	-	3	4.7	2	-	-	-	(1)	3 (4)	2 (2)	11	2	5	1	2	-
소계	목표	7	7	-	2	-	2	-	-	-	2	6	6	-	1	-	1	2	-
	실적	11	8	-	4	19.7	3	-	-	-	1 (1)	4 (4)	6 (2)	35	2	5	1	3	-
종료 1차년도	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	2	1	1	-
종료 2차년도	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-
종료 3차년도	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	2	-	-	-
종료 4차년도	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-
종료 5차년도	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	-	-	-
소계	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	5	1	6	1	1	-
합계	8	8	-	2	-	2	-	-	-	-	2	8	9	5	2	6	2	3	-

\* ( )계재 예정 및 심사중인 논문을 나타냄.

(1) 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	코드번호		C-06-01		
					국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	PCA22 acts as a suppressor of atrzf1 to mediate proline accumulation in response to abiotic stress in Arabidopsis	Journal of Experimental Botany	김아름	7	영국	Oxford	SCI	2017.03.21	
2	Reduced expression of Gongdae Ring Zinc Finger 1 (GdRZF1) enhances drought stress tolerance in watermelon (Citrullus lanatus)	Horticultural Science and Technology	정정성, 박승현	5	대한민국	한국원예학회	SCI	2017.10.31	
3	Loss of Ribosomal Protein L24A (RPL24A) suppresses proline accumulation of Arabidopsis thaliana ring zinc finger 1 (atrzf1) mutant in response to osmotic stress	Biochemical and Biophysical Research Communications	박승현	3-4	미국	Academic Press INC Elsevier Science	SCI	2017.12.01	
4	Optimization of the ninhydrin reaction and development of a mutiwell plate-based high-throughput proline detection assay	Analytical Biochemistry	이미라	556	미국	Elsevier Inc.	SCI	2018.09.01	
5	The detection of proline using a novel paper-based analytical device for on-site diagnosis of drought stress in plants	Review of Scientific Instruments	최영수	심사중	미국	American Institute of Physics(AIP)	SCI	심사중	
6	Development of a Rapid Detection Method for <i>Peronospora destructor</i> using Loop - Mediated Isothermal Amplification (LAMP)	The Plant Pathology Journal	In-Seong Lee	심사중	대한민국	The Korean Society of Plant Pathology	SCI	심사중	
7	A quantitative assay of proline using an enclosed microfluidic paper-based sensor with high sensitive for on-site diagnosis of drought stress in plants	Biosensors and Bioelectronics	임민규	심사중	미국	Elsevier Inc.	SCI	심사중	

8	A highly sensitive paper-based sensor with fast sensing and low power consumption	Sensors and Actuators B	최영수	심사중	미국	Elsevier Inc.	SCI	심사중	
9	공간 패널 회귀모형을 이용한 양파 생산량 추정	응용통계연구	최성천, 백장선	29(5)	대한민국	한국통계학회	비SCI	2016.10.	
10	기장자료를 이용한 마늘 생산량 추정	Journal of Korean Data & Information Science Society	최성천, 백장선	27(4)	대한민국	한국데이터정보과학회지	비SCI	2016.07.22	
11	지리시간가중 회귀모형을 이용한 주택가격 영향요인 분석	한국데이터정보과학회지	박세희, 김민수, 백장선	28(1)	대한민국	한국데이터정보과학회	비SCI	2017.01.19	
12	작물의 병해 모니터링을 위한 영상획득 시스템 개발	Korean Society of Precision Agriculture	김두한, 이경환, 최창현, 최태현, 김용주	4(1)	대한민국	한국정밀농업학회	비SCI	2017.08.20	
13	Control Efficacy of Several Fungicides against Downy Mildew of Onion at Nursery Seedling Stage	Research in Plant Disease	모청용	22(3)	대한민국	식물병리학회	비SCI	2016.10.01	
14	Development of Real-time Onion Disease Monitoring System using image acquisition	FASE(Frontiers of Agricultural Science and Engineering)	김두한	-	중국	FASE(Frontiers of Agricultural Science and Engineering)	비SCI	2018.03	-
15	Development of Environment Field Monitoring System for Crop Growth Measurement	Korean Journal of Agricultural Science	김두한	-	대한민국	Korean Journal of Agricultural Science	비SCI	2019.03 (계재예정)	-
16	일반화기법모형을 이용한 농작물 병해발생확률 예측	한국데이터정보과학회지	김태경, 백장선	심사중	한국	한국데이터정보과학회	비SCI	심사중	

(2) 국내 및 국제학술회의 발표

			코드번호	C-06-02	
No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2015년 추계 한국농업기계학회	정진태 (우수논문상 수상)	2016. 10. 30	변산 대명리조트	한국
2	ASABE 2016	정진태	2016. 07. 20	Disney's Coronado Springs Resort Orlando, Florida	미국
3	The 5th International Conference of Bionic Engineering	정진태	2016. 06. 22	The University of Nottingham	중국
4	Proceedings of the 8th International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agriculture and Biosystems Engineering (ISMAB)	정진태	2016. 05. 23	TOKO MESSE Niigata Convention Center Niigata, JAPAN	일본
5	Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress	민지희	2016. 06. 26 ~ 2016. 06. 30	Prague	체코
6	Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress	박승현	2016. 06. 26 ~ 2016. 06. 30	Prague	체코
7	Plant Biology Europe EPSO/FESPB 2016 Congress	김철수	2016. 06. 26 ~ 2016. 06. 30	Prague	체코
8	2016 한국식물병리학회 춘계 국제 학술발표회	모청용, 김수현	2016. 04. 21	농촌진흥청	한국
9	2016년 춘계 한국농업기계학회	김두한 (우수논문상 수상)	2016. 04. 29	국립농업과학원 농업공학부	한국
10	2016년 한국통계학회 춘계학술논문발표회	최성천(SG 대학원생 발표논문상 수상), 백장선	2016. 05. 21.	경북대학교	한국
11	2016년 추계 한국농업기계학회, 한국정밀농업학회 공동학술대회	임민규	2016.11.02	천안 상록리조트	한국
12	한국정밀공학회 2017 춘계학술대회	최영수	2017.05.18	제주 라마다프라자 제주 호텔	한국
13	ASABE 2017 Annual International Meeting	임민규	2017.07.17	Spokane convention center	미국
14	Cold Spring Harbor Asia Plant Cell & Developmental Biology	Van Tinh Nguyen	2017.05.22 ~ 2017.05.26	Suzhou	중국

15	Cold Spring Harbor Asia Plant Cell & Developmental Biology	김철수	2017.05.22 ~ 2017.05.26	Suzhou	중국
16	2017 Internation Symposium and Annual Meeting of the KSPS	Chung-Yong Mo	2017.04.06	여수	한국
17	2016년 추계 한국농업기계학회, 한국정밀농업학회 공동학술대회	김두한	2016.11.03	천안상록리조트	한국
18	2016년 추계 한국농업기계학회, 한국정밀농업학회 공동학술대회	김두한	2016.11.03	천안상록리조트	한국
19	2016년 한국데이터정보과학회 추계학술논문발표회	박세희(논문발표 우수상), 백장선	2016. 11. 18.	대구	한국
20	2017년 춘계 한국정밀농업학회	김두한	2017.03.22	농촌진흥청 농촌인적자원개발센터	한국
21	2017년 춘계 한국정밀농업학회	MD Nasim Reza	2017.03.22	농촌진흥청 농촌인적자원개발센터	한국
22	한국농업기계학회/발농업기계개발연구센터 2017년 춘계 공동학술대회 초록집	MD Nasim Reza	2017.04.06	경북대학교 발농업기계개발 연구센터	한국
23	2017 American Society of Agricultural and Biological Engineers	김두한	2017.07.18	Spokane, Washington	미국
24	2017년도 한국통계학회 - 호남제주지회 학술논문발표회	김태경, 백장선	2017. 06. 23.	제주도	한국
25	2017 ASHS Annual Conference	양광열	2017.09.22	빅아일랜드	미국
26	2017 ASHS Annual Conference	이인성	2017.09.22	빅아일랜드	미국
27	2018 ISEAS Annual Conference	양광열	2018.08.06	괌	미국
28	The International Tri-Conference for Precision Agriculture in 2017 (ACPA)	김두한	2017.10.16	해밀턴	뉴질랜드
29	The International Tri-Conference for Precision Agriculture in 2017 (ACPA)	임민규	2017.10.16	해밀턴	뉴질랜드
30	The 14th International Joint Symposium between Japan and Korea	김두한	2017.11.07	Kyushu University	일본
31	한국농업기계학회/농업생산무인 자동화연구센터 2017년 추계 공동학술대회	이미라	2017.10.27.	광주 김대중컨벤션센터	한국
32	한국데이터정보과학회	김태경	2017.11.17.	경북대학교	한국
33	2018 한국정밀농업학회 춘계학술대회	최영수	2018.04.13	경상북도 상주농업기술센터	한국
34	20 <sup>th</sup> KMEMS conference	최영수	2018.04.06	제주도 KAL호텔	한국
35	The 9 <sup>th</sup> ISMAB Conference	최영수	2018.5.29	제주도 KAL호텔	한국

(3) 생명자원(생물자원)/화합물: 해당사항 없음

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

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원						코드번호		기여율
			출원			등록			C-06-04		
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호			
1	환경장애 현장 진단키트	대한민국	전남대 학교 산학협 력단	2015. 09.11	10-2015- 0129326	전남대학교 산학협력단	2015. 12.14	10-1579045	100%		
2	탈부착형 센서모듈을 구비한 환경장애 예방용 진단키트	대한민국	전남대 학교 산학협 력단	2016. 06.21	10-2016-0 077015	전남대학교 산학협력단	2017. 01.18	10-1699667	50%		
3	양파의 병해충 모니터링 시스템	대한민국	충남대 학교 산학협 력단	2016. 06.29	10-2016-0 081942	충남대학교 산학협력단	2017. 11.23	10-1803198	100%		
4	환경장애 진단용 종이센서	대한민국	전남대 학교 산학협 력단	2017.04. 21	10-2017-0 051872	전남대학교 산학협력단	2018. 01.16	10-1821093	50%		
5	가뭄 진단용 전기화학적 바이오 센서 및 그 제조방법	대한민국	전남대 학교 산학협 력단	2017.04. 21	10-2017-0 051877	전남대학교 산학협력단	2018. 01.16	10-1821094	50%		
6	가뭄 진단용 종이기반 전기화학적 바이오 센서 및 그 제조방법	대한민국	전남대 학교 산학협 력단	2017.04. 21	10-2017-0 051881				50%		
7	양파노균병균 검출용 프라이머 세트, 이를 포함하는 검출키트 및 이를 이용한 검출 방법	대한민국	양광열, 이인성, 남승희, 이경환	2017.03. 21	10-2017-0 035266				100%		
8	다층구조의 환경장애 진단용 종이센서	대한민국	전남대 학교 산학협 력단	2017.12. 01	10-2017-0 164186	전남대학교 산학협력단	2018. 08.31	10-1896007	40%		
9	히터 및 온도센서가 집적된 다층구조의 환경장애 진단용 종이센서	대한민국	전남대 학교 산학협 력단	2017.12. 15	10-2017-0 172977	전남대학교 산학협력단	2018. 07.17	10-1881009	40%		
10	분무입경 모니터링을 통한 방제기의 방제성능 최적 제어 시스템 및 그 방법	대한민국	충남대 학교 산학협 력단	2018.02. 19	10-2018-0 019581	-	-				
11	직파기용 복토장치	대한민국	충남대 학교 산학협 력단	2018.02. 28	10-2018-0 024888	충남대학교 산학협력단	2018.9.1 3	10-1900262	100%		

(5) 저작권(소프트웨어, 서적 등): 해당사항 없음

(6) 전문연구 인력양성

No	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
		2017		2			2			1			1	
		2018		2	1		2	1		1			2	

(7) 산업기술 인력양성: 해당사항 없음

(8) 기술거래(이전) 등

No.	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술표준 (당해연도 발생액)	
					기술료	누적 징수현황
1	노하우기술	농작물 생육환경 센싱 기술	긴트	2016.12.19	7,500 천원	-
2	노하우기술	작물의 가뭄 스트레스를 고감도로 측정하기 위한 시약 제조 노하우	(주)케이에스	2017.12.20	1,500천원	-
3	노하우기술	가뭄 스트레스를 측정하기 위한 최적화 종이센서 제작 노하우	(주)케이에스	2017.12.20	1,500천원	-
4	특허	환경장애 현장 진단키트	(주)케이에스	2017.12.20	1,700천원	-

(9) 사업화 투자실적: 해당사항 없음

(10) 사업화 현황: 해당사항 없음

(11) 표준화: 해당사항 없음

(12) 기술요약정보: 해당사항 없음

(13) 보고서 원문: 해당사항 없음

(14) 기타

(가) 홍보(3건)

- 1) 실시간 작물의 생육 및 병해 영상획득 시스템, 한국정밀농업학회 기술지, 2017.11
- 2) 실시간 작물의 생육환경 모니터링 시스템, 한국정밀농업학회 기술지, 2018.09 게재예정
- 3) 환경계측 모니터링 동향, 한국정밀농업학회 기술지, 2018.09 게재예정

(나) 교육지도(2건)

- 1) 전라남도 농업기술원 주최 “기술보급사업 활성화 업무 연찬회” 교육, 2018년 4월 19  
일, 주요채소류 병해충 발생소장 및 방제.
- 2) 고흥군농업기술센터 주최 “고흥군 여름철 현장영농기술교육” 교육, 2018년 7월 11일,  
양파 주요 병해 발생소장 및 방제.

## 다. 연구개발 결과

### (1). 기술적 성과

- 기존 작물의 가뭄, 저온 및 병해를 진단하기 위해서는 실험실 내에서 다양한 시약과 고가의 측정 장비를 사용하여 작물의 가뭄 유·무를 숙련된 연구자들만 진단할 수 있어 현장에서 실질적으로 필요로 하는 농민들에게 활용이 되지 않는 문제점을 가지고 있음. 제 1세부과제에서는 이러한 문제점을 개선하기 위해 현장에서 비숙련자들도 편리하게 사용할 수 있는 가뭄진단용 종이센서, 병해진단용 종이센서 및 가뭄/병해를 동시에 진단할 수 있는 종이센서를 개발하였으며 이를 바탕으로 현장에서 간편하게 사용할 수 있는 가뭄/질병 현장진단기 키트를 개발함.
  
- 먼저, 제1세부과제에서는 가뭄 및 저온을 현장에서 진단할 수 있는 종이기반 센서를 개발하였음. 가뭄을 진단하기 위한 바이오 마커로는 2세부과제에서 찾아낸 가뭄 진단 마커인 프롤린을 사용하였으며 프롤린-닌히드린 발색반응을 통한 비색법을 통해서 프롤린의 농도를 검출함. 1차년도에는 프롤린-닌히드린 반응을 종이센서에 적용 가능성에 대해서 실험을 진행했으며 다양한 실험을 통해 닐히드린이 센서에 코팅된 종이센서를 개발하여 현장 가능성을 확인했지만 최소측정감도 3mM로 감도가 낮다는 문제점을 가짐. 1차년도에 개발된 종이센서의 감도를 개선하기 위해서 2차년도에는 샘플로드부와 센서부만 외부에 노출된 밀폐된 형태의 종이기반 센서를 제작 했으며 감도를 개선하기 위해 내부에 채널을 만들어 샘플이 닐히드린과 균일하게 혼합되어 센서부에서 발색반응이 잘 이루어질 수 있도록 센서를 개발함. 2차년도에 개발된 밀폐된 형태의 종이기반 센서는 최소측정감도가 25 $\mu$ M로 1차년도에 비해서 감도가 100배 정도 우수해졌지만 측정온도가 높아지고 측정시간이 1차년도에 비해 길어져 센싱속도가 늦어지고 파워소비가 늘어나서 현장에 적용하는데 문제점이 발생함. 이를 개선하기 위해 3차년도에는 2차년도에 개발된 센서와 같은 형태지만 센서부의 위치를 4층에서 2층으로 변형한 밀폐된 종이기반센서를 개발함. 개발된 센서는 2차년도에 개발된 센서와 비교해서 측정감도가 25 $\mu$ M로 같지만 측정시간이 1/4로 감소하여 샘플을 빠른 시간에 저파워 소모를 하면서 고감도로 분석 할 수 있으며 파워소모가 낮기 때문에 현장에서 많은 샘플을 분석할 수는 장점을 가져 현장진단기 사용할 센서로 적합함.
  
- 다음으로, 병해를 현장에서 진단할 수 있는 종이기반 센서를 개발함. 2차년도에는 병해를 검출하기 위해 PGA-RR complex 기반의 종이센서를 개발함. 제안된 종이 기반 센서는 샘플의 로드, 분석을 동시에 할 수 있는 샘플로드부 및 센서부(3층), PGA(polygalacturonic acid)-RR(Rhuthenium red)결합에 의해 생선된 침전물이 균일하게 로드된 PG반응부(2층) 및 측정 샘플의 정밀한 분석을 위해 샘플의 누설을 방지하기 위한 방수층(1층) 3개의 종이 층으로 구성됨. 제작된 센서를 사용하여 *Botrytis cinerea*에서 분리한 샘플에서 PG의 활성도를 분석하였으며 실험결과 0.1unit까지 측정 가능성을 확인함. 이를 통해 종이센서를 이용한 PG 활성 측정 및 현장에서 작물의 병해 진단 가능성을 확인함. 3차년도에는 2차년도에 개발된 병해 검출을 위한 종이기반 센서의 기본 재료인 종이를 Whatman filter grade 1chr에서 4chr로 변경해서 센서의 감도를 개선함. 또한, 병해를 검출하기 위해서 3세부과제에서 제공한 항체를 이용한 PG검출을 위한 종이기반의 효소 결합 면역 반응(paper based ELISA) 센

## 서를 제작함

- 위 기술적인 성과를 바탕으로 가뭄, 저온 및 병해를 동시에 측정하기 위한 가뭄 및 병해 센서를 하나의 센서에 집적화하여 동시에 가뭄 및 병해를 검출할 수 있는 종이기반 센서를 개발함.
- 개발된 종이센서를 사용하여 현장 적용 가능성을 확인하기 위해 가뭄 및 저온 스트레스를 받은 양파 샘플을 채취하였으며 채취된 샘플을 개발된 종이기반 센서를 사용하여 프롤린 농도를 정량적으로 분석함. 실험한 결과 양파 잎 번호, 하나의 잎에서 위치에 따라서 프롤린 농도가 검출되는 것을 확인할 수 있었으며 양파가 가뭄 및 저온 스트레스를 받을 경우 프롤린 농도가 증가되는 것을 확인함. 이를 토대로 BT 기반으로 하는 ICT 현장 진단 키트를 제작 가능성을 확인하였으며 현장 진단 키트를 설계 및 제작함.
- 개발된 휴대용 진단키트는 PCB와 접사렌즈가 집적화된 본체, 종이센서에 열을 가하기 위한 두 개의 세라믹 히터가 집적화된 센서모듈, 가뭄, 저온 및 병해를 진단할 수 종이센서, 종이센서의 발색반응을 촬영 분석하기 위한 스마트폰으로 구성됨. 개발된 휴대용 진단키트를 사용하여 양파에서 샘플을 채취하여 샘플 내의 프롤린 및 PG를 검출하였으며 실제 현장 사용 가능성을 확인하였으며 사용자들이 진단키트를 쉽게 사용하기 위해서 매뉴얼을 제작함.
- 식물체 내 가뭄과 저온스트레스의 수분 항상성 기작은 매우 유사하며, 특히 프롤린은 보습효과가 뛰어난 삼투조절물질로서 가뭄 및 저온 등 작물 환경스트레스에 대해 농작물이 생장하는데 있어서 매우 중요한 물질임. 그러나 식물의 비생물적 스트레스에 대해 프롤린의 역할은 자세히 알려지지 않고 있음. 따라서 우리는 파속작물 (양파·마늘)로부터 프롤린 수용체가 가뭄·저온 진단 마커로 이용할 수 있음을 밝혀냈으며, 이에 따른 연구실적물로서 3 편의 우수 SCI 논문을 출판하였음. 프롤린 외 PAP phosphatase, AMP 및 시스테인 구성 물질들이 가뭄·저온 진단 마커로 이용될 수 있음을 알 수 있었고, 특히 PAP phosphatase는 황 대사에도 관련되어 있으므로 작물 발달 최적화 및 사료작물 기술 개발에 이용할 수가 있을 것으로 사료됨. 또한 시스테인 물질은 높은 농도에서 식물체 잎의 마름 현상 혹은 괴사 반응을 유도함으로써 가뭄에 대한 진단 마커일 뿐만 아니라, 스트레스 내성 유도제로 이용할 수가 있음. 따라서 시스테인 스트레스 내성 유도제 기술 개발은 작물 바이러스 방제 기술 도입에 필요하다고 판단됨.
- 양파 노균병에 대한 연구는 병원균이 절대활물기생균이라는 특성 때문에 전 세계적으로 소수의 그룹에서만 진행하고 있을 정도로 연구 기반이 빈약한 실태임. 따라서 본 연구팀에서 수행한 LAMP 기법을 활용한 양파 노균병 조기 진단 기술과 살균제를 이용한 육묘상 및 본밭의 방제력개발은 양파 노균병으로 인해 많은 피해를 입고 있는 농업 현장에 많은 도움이 될 수 있을 것으로 생각됨.
- 양파 흑색썩음균핵병은 양파의 대표적인 토양성 병해로 그 어떠한 병해 보다 토양 관리가 중요하며 토양에 잠재되어 있는 병원균 균핵의 밀도의 조절이 방제에 매우 중요함. 따라서

본 연구팀에서 수행한 흑색썩음균핵병균 *S. cepivorum* 검출용 항체 개발과 LAMP 기법을 활용한 양파 흑색썩음균핵병 조기 진단 기술 개발을 통해 흑색썩음균핵병균을 조기에 검출하거나 토양에서 검출할 수 있다면 토양소독이나 농약을 통한 적절한 방제 방법을 이용하여 방제 효과를 극대화 할 수 있을 것으로 생각됨.

○ LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification) 기법을 활용한 양파 노균병 조기 진단 기술 개발

양파 노균병은 공기 전염성병으로 절대활물기생균인 노균병균(*Peronospora destructor* Berk.)에 의해 발병하여 양파 주산단지에서 지속적으로 심각한 수량 감소를 초래하고 있음. 그러나 노균병균은 인공배양이 되지 않아 아직까지 연구가 제대로 이루어지지 않고 있는 실정이며 양파 육묘상이나 월동 전, 후 양파에 1차적으로 감염되어 잠복해 있는 상태에서 초봄에 피해가 심해지므로 노균병균의 조기 진단에 따른 적절한 방제가 매우 중요하함. 따라서 농업현장에서 노균병균을 조기에 신속하게 진단 및 검출하기 위해 loop-mediated isothermal amplification(LAMP)용 프라이머 세트와 이를 포함한 조성물을 개발함. 이 LAMP 방법은 검출 능력이 우수하여 소량의 노균병균을 2시간내에 검출이 가능할 뿐만 아니라 부수적인 장비 없이 육안으로 HNB(Hydroxy naphthol blue)를 통해 자연광에서 검출 유·무 판단이 가능하므로 양파의 전 생육기에 발생하여 큰 피해와 수량감소를 야기하는 노균병균을 농업현장에서 조기 진단의 소재로서 활용한다면 효과적인 노균병 방제에 많은 도움이 될 수 있을 것으로 생각되어 현재 “양파노균병균 검출용 프라이머 세트, 이를 포함하는 검출키트 및 이를 이용한 검출 방법”이라는 제목으로 특허를 출원하여 심사 중에 있으며 특허와 관련된 연구내용 뿐만 아니라 병원균이 포함된 토양에서 노균병균을 검출한 결과까지 포함해서 SCI급 국제저널에 투고하여 심사중에 있음.

○ LAMP 기법 기반 양파 육묘상 및 본밭 양파 노균병 방제력 개발

양파 노균병 진단용 LAMP 기법 활용하여 농업 현장에 적용하기 위해 우선적으로 감염 증상이 보이지 않는 양파 육묘에서 LAMP 방법을 이용하여 노균병균 검출 실험을 수행하였음. 양파 정식 전, 감염 증상이 보이지 않는 시료를 무작위 선택하여 끝 마름 증상의 부위만 시료 절단용 가위로 절단 후 액체질소에서 마쇄하여 genomic DNA를 추출하여 이를 주형으로 사용함. LAMP 기법을 통해 양파 노균병균 검출 실험을 수행 한 결과, 10개의 시료 중 2개의 시료에서 이미 노균병에 감염되었음을 밝힘으로써 초기 생육 단계인 육묘단계에서 잠복하고 있는 노균병균을 확인하였음. 이러한 결과를 바탕으로 양파를 본밭에 정식하기 전에 육묘상의 노균병을 방제하기 위해 살균제를 사용한 적극적인 노균병 방제 방법을 “Control Efficacy of Several Fungicides against Downy Mildew of Onion at Nursery Seedling Stage”라는 제목의 논문에 제시함.

○ 양파와 마늘 흑색썩음균핵병균 *S. cepivorum* 검출용 항체 개발

양파와 마늘의 흑색썩음균핵병을 일으키는 곰팡이 병원균인 *S. cepivorum*을 조기에 진단하기 위해 감염초기에 병원균이 대량으로 생산하고 분비하는 단백질로 알려져 있는

polygalacturonase을 이용하여 항체를 제작하였음. 대량의 재조합 PG 단백질을 생산한 후 이를 항원으로 항체를 제작하였음. 항체의 특이성을 확인하기 위해 *S. cepivorum* 이외에 양파에 감염을 일으키는 토양 곰팡이인 *Sclerotinia minor*, *Sclerotium rolfsii* 의 전체단백질에 대해 Western blot을 수행한 결과 다른 곰팡이의 단백질에 대해서는 뚜렷한 밴드를 볼 수 없었고, 아주 희미한 비특이적 밴드만이 존재함. 제작된 항체는 다중클론성항체이며 PG 단백질이 곰팡이에 특이적인 단백질이 아니며 식물 및 다른 곰팡이 병원균에도 존재하는 단백질이기 때문에 그들의 PG 와도 반응할 가능성이 존재함. 그러나 항원의 농도를 낮추면 이러한 비특이적 밴드도 나타나지 않음을 확인하였다(그림 7(B)). 이러한 연구결과들을 종합하여 “양파 흑색썩음균핵병의 조기 진단을 위한 *Sclerotium cepivorum*이 분비하는 Polygalacturonase에 대한 항체 개발”이라는 제목으로 특허 출원 및 SCI급 논문을 준비 중임.

#### ○ LAMP 기법을 활용한 양파 흑색썩음균핵병 조기 진단 기술 개발

양파 노균병균의 조기 진단을 위해 확립된 LAMP 기법을 흑색썩음균핵병균 검출을 위해 적용하여 LAMP primer 세트를 제작함. FIP는 두 개(F1c, F2)의 Anti-sense sequence의 상보적인 염기서열(inner-sense)과 TTTT spacer 그리고 고리(Loop)를 형성하는 염기서열(loop-sense)의 부분을 합한 것으로 설계되었으며, Backward Inner Primer(BIP)도 마찬가지로 두 개(F1c, F2)의 sense sequence의 상보적인 염기서열(inner-antisense)과 TTTT spacer, loop를 형성하는 염기서열(loop-antisense)의 부분으로 설계됨. 또한 F3와 B3 프라이머는 각각 Inner primer의 바깥쪽에 위치하도록 설계하였음. LAMP의 최적 반응조건을 확립하기 위해 각각의 온도별, 시간별 조건을 다르게 하여 PCR을 수행하였음. 같은 시간조건(60분)에서 60.1, 62.1, 63, 64.6, 65.1°C의 각각 다른 온도조건에서 PCR을 수행한 결과 모든 온도조건에서 HNB상의 색변화, 그리고 전기영동상에서도 밴드를 확인 할 수 있었음. 또한 같은 60°C 온도조건에서 각 반응시간별(15, 30, 45, 50, 55, 60분)로 PCR을 수행한 결과 45분부터 반응이 나타나며 50분부터는 전기영동상에서 밴드가 명확하게 나타나는 것을 확인하였음. 그리고 LAMP 방법의 민감성을 확인하기 위해 흑색썩음균핵병균의 genomic DNA 원액(100 fg)을 단계적으로 1/10배씩 희석하여 10-4까지 총 7개 농도에서 기존의 PCR과 함께 검출 테스트를 한 결과 LAMP의 경우에는 1 fg의 농도까지 검출이 가능한 반면 기존의 PCR 방법은 그보다 10배 낮은 10 fg 에서 아주 희미한 밴드를 보이며 검출의 민감도에서 큰 차이를 보여줌. 또한 양파 흑색썩음균핵병균 검출용 LAMP 프라이머 세트가 *S. cepivorum*에 특이적인지 확인하기 위하여 본 병원균을 포함하여 양파에 병을 일으키고 있는 다른 9개의 곰팡이인 *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia minor*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis aclada*, *Alternaria porri*, *Rhizoctonia solani*, *Peronospora destructor* 등과 같은 병원균들의 genomic DNA를 추출하여 주형으로 사용하여 각각 샘플에 대해 검출 테스트를 한 결과 LAMP primer는 특이적으로 흑색썩음균핵병균 이외의 나머지 병원균들에서는 검출반응이 나타나지 않았음을 확인하였음. 따라서 이러한 결과를 종합하여 “양파 흑색썩음균핵병균 검출용 프라이머 세트, 이를 포함하는 검출키트 및 이를 이용한 검출 방법”이라는 제목으로 특허 출원을 준비중임.

## (2). 경제적성과

- 차별화된 기술 확보로 해외 시장에서 작물 병해 진단 기술의 국가 경쟁력을 향상.
- 원격 관리 및 실시간 자동 측정을 통해 농민의 작업 시간을 경감시켜 다른 경제 활동을 가능하게 할 뿐만 아니라 작물 생육 환경을 개선하고 농산물 생산의 효율을 높여 농가의 수익을 증대시킬 수 있음.
- 농가에 가장 많은 피해를 주는 방제가 어려운 병들을 진단할 수 있는 진단 마이크로센서 키트를 개발함으로써 지적재산권 선점이 가능함.
- 병원균이 잠복하는 기간이 비교적 길어 초기 진단의 어려움 피해가 심한 다른 작물들의 주요 병에 적용이 가능하므로 파급 효과가 높음.
- 주요 병 조기진단 예찰로 발병적기 방제 실시로 무분별한 약제 살포를 줄여 방제 효율을 제고하며, 병피해 방지로 연간 100억원 이상의 경제적 파급효과 기대.
- 국내 작물 병해 조기 진단 기술은 연구개발용 등이 일부 개발되고 있으나 관련 원천 기술을 보유하고 있지 못한 것으로 평가되며, 자체 기술 개발과 라이선스 등을 통하여 조기에 원천 기술을 확보하여 국내외 시장 공략 가능.
- 수급 균형과 경쟁력을 갖춘 안정된 농가소득 작물로 자리 매길 수 있으며, 안정적인 농산물 생산 및 공급 기반 구축으로 인한 국민 식생활 안정에 크게 기여함.
- 양파·마늘 파속작물 뿐만 아니라 경제적 중요 타 작물에서도 지속적 모니터링에 의한 기상장해의 피해 예방.
- 복합 환경장해 제어, 생체정보 계측, 성장모델 모듈 개발, 기상재해 진단 키트 등에 의한 환경관리 기술이 상용화 될 수 있음.
- 농업 외 타 산업과의 연계로 새로운 분야의 산업 발전 유도.

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 가. 목표

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표
1차년도 (2016)	작물의 가뭄, 저온 현장진단을 위한 키트 개발 (1세부)	- 환경장해에 의해 생성되는 프롤린을 닌히드린 분석방법을 이용하여 정량적으로 검출할 수 있는 종이센서 개발
	색상 강도 측정 방식의 스마트폰 기반 진단 키트 리더기 개발 (1세부)	- 반도체공정을 기반으로 종이센서의 닌히드린 반응을 유도할 수 있는 소형 히터 개발
		- 종이센서의 가열 온도 제어 및 스마트폰과 무선통신으로 연결할 수 있는 키 트 리더기 개발
	양파·마늘 환경장해 표현형에 대한 수용체 센싱 최적화 시스템 개발 (2 세부)	- 양파·마늘로부터 가뭄·저온 수용체 동정 개발
		- 환경장해 심화 기반에 따른 프롤린 분석 시스템 개발
	양파·마늘의 병해 진단 분자마커 및 탐침 표지 개발 (3세부)	- 노균병균·흑색썩음균핵병균 분리 및 최적의 배양 조건 확립
		- 노균병균·흑색썩음균핵병균 특이적 항체 및 양파와 병원균의 상호작용 관련 특이적 항체 개발
	노지 현장적용이 가능한 필드 서버 플랫폼 개발 (1협동)	- 생육 환경을 측정할 수 있는 환경 계측 모니터링 시스템 개발
	작물 표현형 (색상, 형상)의 이동식 측정을 위한 영상획득 시스템 개발 (1협동)	- 상/하 이동식 측정이 가능한 스탠드형 CCD 카메라 개발
	생육 환경 정보 (온도, 습도, 조도) 센싱 시스템 개발 (1협동)	- 마이크로컨트롤러를 이용하여 온도, 습도, 조도 등의 센싱 시스템 개발
양파·마늘 환경장해, 병해 발생 모니 터링 및 작화예측 시스템 개발 (1협 동)	- 양파, 마늘의 생산량, 기상요인을 이용한 작황 예측의 패널 회귀 모형 개발 (위탁)	

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표
2차년도 (2017)	양파-마늘 환경장해 및 병해진단 마이크로 키트 개발 (1세부)	- 작물의 환경장해 및 병해 현장 진단을 위한 종이 센서 개발
		- 작물의 병해 현장 진단을 위한 스마트폰 기반 진단 키트 개발
		- 작물의 가뭄 스트레스 및 병해 현장 진단을 위한 스마트폰 기반의 리더기 개발
	양파-마늘 환경장해 표현형에 대한 수용체 센싱 최적화 시스템 개발 (2세부)	- 가뭄, 저온 및 병해 스트레스 센싱 물질인 프롤린 수용체 함량 데이터 확립
		- 환경장해 심화 기반에 따른 프롤린 분석 시스템 확립 - 가뭄스트레스 센싱에 대한 프롤린 외 시스템인 수용체 개발
	양파-마늘의 병해 진단 분자마커 및 탐침 표지 개발 (3세부)	- 항체의 항원에 대한 특이적 결합, 민감성 및 반응성 검정
		- LAMP 기법을 활용한 양파 노균병균 조기 검출
	생육 모니터링을 위한 영상처리 알고리즘 개발 (1협동)	- 영상처리 장치의 영상 판독, 변형 등을 통한 작물의 영상처리 알고리즘 개발
생육 모니터링 플랫폼의 데이터 획득 및 제어 시스템 개발 (1협동)	- 생육 모니터링 영상획득 시스템은 모터를 구동시키는 구동 시스템과 작물을 촬영하는 영상 입력부로 구성되어 이동식 측정 시스템 개발	
필드 서버를 이용한 기후정보 및 작물 표현형 데이터 측정 : 주/야간, 측정위치, 생육 단계별 (1협동)	- 영상촬영 시간간격을 각각 다른 위치의 양파를 선정하여 30분 주기로 측정	
양파-마늘 환경장해, 병해 발생 모니터링 및 작황예측 시스템 개발 (위탁)	- 다양한 모델 기반의 환경장해, 병해 발생 예측 모형 개발	
3차년도 (2018)	환경장해 및 병해진단을 위한 휴대용 진단키트 개발 (1세부)	- 최적화된 종이센서를 이용하여 작물의 다양한 환경장해 진단과 병해에 따른 스트레스 분석
		- 최적화된 종이센서의 반응을 유도하고 반응 결과를 현장에서 진단할 수 있는 휴대용 키트의 개발 및 매뉴얼 제작
	양파-마늘 환경장해 표현형에 대한 수용체 센싱 최적화 시스템 개발 (2세부)	- 냉해 스트레스에 대한 양파-마늘의 프롤린 수용체 함량 데이터 확립
		- 파속작물의 현장적용 진단 실험 및 진단 키트에 대한 민감도 분석
	양파-마늘의 병해 진단 분자마커 및 탐침 표지 개발 (3세부)	- 노균병과 흑색썩음균핵병에 조기 진단 최적화 시스템 확립 및 현장 적용
	생육 데이터 송수신을 위한 무선/원격 통신 기술 개발 (1협동)	- 생육환경 모니터링시스템을 이용하여 무선/원격 통신 기술 개발
작물 표현형 데이터 기반 생육정보 알람 및 경보 플랫폼을 개발 (1협동)	- 딥러닝 기반 양파, 마늘의 질병 데이터 학습 및 양파, 마늘의 질병 발생을 인식 및 알람체계 구축	
생육 모니터링 현장 적용 및 작황 예측 기술 개발 (위탁)	- 빅 데이터 기반의 작황 예측 모델 개발 및 성능평가를 통한 최적 모형 선정	

나. 목표 달성여부

구분 (연도)	연구목표	연구내용	달성도
1차년도 (2016)	작물의 가뭄, 저온 현장진단을 위한 마이크로 키트 개발 (1세부)	- 종이센서 내에서 최적의 난히드린 반응을 일으키기 위한 조건은 100 °C에서 3분 동안 가열했을 때임을 확인. 제작된 종이센서는 100 $\mu\text{mol}$ 부터 400 $\mu\text{mol}$ 까지 실제 양파 샘플의 프롤린 농도 측정이 가능하였으며 조기 진단이 가능함	100%
		- 종이센서를 이용해 가뭄 스트레스 현장진단이 가능한 키트 리더기 플랫폼 제작. 실제 리더기를 제작한 후 현장에서 가뭄 스트레스 진단이 가능하도록 스마트폰 어플 개발	100%
	양파-마늘 환경장해 표현형에 대한 수용체 센싱 최적화 시스템 개발 (2세부)	- 1차년도 연구결과, 가뭄스트레스 처리 후, 파속작물 (양파-마늘) 및 애기장대로부터 불량환경에 대한 수용체를 동정한 결과, 프롤린과 3'-phosphoadenosine-5'-phosphate (PAP) phosphatase 효소가 수용체로 이용할 수 있음을 알 수 있었음. 이러한 수용체들은 BT 기반으로 하는 ICT 현장 진단 키트를 제작 가능함을 제시하고, 특히 PAP phosphatase는 항 대사에도 관련되어 있으므로 작물 발달 최적화 및 사료작물 개발에 이용할 수가 있음.	100%
		- 1차년도 연구 성과에 의해 개발된 가뭄 수용체인 프롤린을 이용, 가뭄 처리 기간별, 양파 품종별, 품종간 양파부위별 등 프롤린 함량을 분석하여, 토양 습도 보존량에 따른 프롤린 농도 분석 시스템을 개발 할 수 있었음.	100%
	- 노균병균-흑색썩음균핵병균 분리 및 최적의 배양 조건 확립 - 노균병균과 흑색썩음균핵병균 최적의 배양 조건 확립 및 특이적 항체 개발 (3세부)	- 이병엽이나 토양으로부터 순수 분리하여 genomic DNA를 추출하여 ITS 프라이머를 이용해서 병원균을 확인하였음 - 양파와 양파 껍질을 적절히 혼합한 배지를 새롭게 조성하여 흑색썩음균핵병균의 최적 배양 조건을 확립하였음 - 흑색썩음균핵병균의 polygalacturonase 유전자를 PCR 방법으로 클로닝한 후 재조합 단백질을 이용하여 항체 제작을 위한 조건을 확립하였음	100%
		생육 환경을 측정할 수 있는 환경 계측 모니터링 시스템 개발 (1협동)	- 현장에서 환경 정보를 주기마다 데이터 값을 얻을 수 있도록 개발
	상/하 이동식 측정이 가능한 스탠드형 CCD 카메라 개발 (1협동)	- 영상획득 시스템 시제품을 개발하였으며 상/하는 모터를 이용하여 좌/우는 카메라 tilting을 이용하여 영상획득이 가능하도록 개발	100%
	마이크로컨트롤러를 이용하여 온도, 습도, 조도 등의 센싱 시스템 개발 (1협동)	- 외기 센서와, 토양의 온-습도, 전도도, 조도 센싱 및 기상청 데이터와의 통계 분석을 통한 신뢰성 확보	100%
	양파, 마늘의 생산량, 기상요인을 이용한 작황 예측의 패널 회귀 모형 개발 (위탁)	- 기상 빅데이터를 이용한 양파 생산량 예측 공간가중패널회귀 모형 개발	100%
		- 기상 빅데이터를 이용한 마늘 생산량 예측 공간가중패널회귀 모형 개발	100%

구분 (연도)	연구목표	연구내용	달성도
2차년도 (2017)	작물의 병해 현장 진단을 위한 종이센서와 스마트폰 기반 진단 키트 및 리더기 개발 (1세부)	- 다양한 병해에 의해 생성되는 polygalacturonase (PG)를 Ruthenium Red (RR) 방법을 이용하여 병해 정도를 정량적으로 검출할 수 있는 종이센서 개발 .1차 년도에 제안한 가뭄 진단을 위한 종이기반 센서의 구조 변경을 통해서 센서의 감도를 개선함. 가뭄 및 병해를 동시에 진단할 수 있는 종이기반 센서 개발	100%
		- 반도체공정을 기반으로 종이센서의 다투드린 반응 및 RR 반응을 유도할 수 있는 마이크로 히터 개발. MCU기반의 회로를 사용한 히터의 온도 제어 및 스마트폰과 무선통신이 가능한 키트 리더기 개발	100%
		- 가뭄 및 병해를 동시에 분석할 수 있는 스마트폰 어플리케이션을 제작	100%
	가뭄, 저온, 병해 스트레스 센싱 물질인 프롤린 수용체 함량 데이터 확립 및 가뭄스트레스 센싱에 대한 프롤린 외 시스테인 수용체 개발 (2세부)	- 가뭄과 저온 처리에 의한 토양 수분량의 손실을 측정과 프롤린 함량의 정량적 분석을 수행 결과, 가뭄 및 저온 정도에 따른 프롤린 농도를 계상 할 수 있었음. 또한 병해 스트레스에도 프롤린 함량이 차이가 있었음. 저온에 따른 양파 품종별, 생육단계별 및 가뭄에 따른 마늘 중단부와 하단부 부위별의 상대적 프롤린 농도를 계상 할 수 있었음.	100%
		- 가뭄스트레스 센싱 수용체인 프롤린 외 애기장대 식물체로부터 새로운 센싱 수용체 시스테인 물질을 개발 할 수 있었음. 건조스트레스에 대한 시스테인을 진단 수용체 및 스트레스 내성 유도제로 사용하기 위하여, 우선 식물체로부터 생존을 실험을 실시하였음. 높은 농도 (50 mM 및 100 mM)의 시스테인을 스프레이 한 결과, 식물체 잎의 마름 현상 혹은 괴사 반응을 유도함을 알 수 있었고, 이러한 결과들로부터, 높은 농도의 시스테인 처리는 식물체의 괴사를 유도함을 알 수 있었음.	100%
	- 항체의 항원에 대한 특이적 결합, 민감성 및 반응성 검정 - LAMP 기법을 활용한 양파 노균병균-흑색썩음균핵병균 조기 검출 방법 개발 (3세부)	- 흑색썩음균핵병균의 polygalacturonase 재조합 단백질의 순수 정제한 후 이를 항원으로 하는 항체를 제작하였음 - 제작된 PG 항체의 특이적인 결합 및 민감성을 확인하였음 - 노균병원 조기 진단을 위한 LAMP primer 제작 및 최적의 온도 및 반응시간 조건 확립, 민감성, 특이성 등을 확인하였음	100%
	영상처리 장치의 영상 판독, 변형 등을 통한 작물의 영상처리 알고리즘 개발 (1협동)	- 현장에서 측정된 데이터의 영상을 선정하여 영상처리 알고리즘을 개발하여 분석함	100%
	생육 모니터링 영상획득 시스템은 모터를 구동시키는 구동 시스템과 작물을 촬영하는 영상 입력부로 구성하여 이동식 측정 시스템 개발 (1협동)	- 영상처리부가 보낸 신호를 모터 구동 PC가 수신을 한 후 모터를 회전시켜 모터를 제어함	100%
	영상촬영 시간간격을 각각 다른 위치의 양파를 선정하여 30분 주기로 측정 (1협동)	- 각각 다른 위치의 양파를 주/야간 측정이 가능하며, 시간에 따른 양파 잎의 각도 및 갈변 발생 측정	100%
	다양한 모델 기반의 환경장해, 병해 발생 예측 모형 개발 (위탁)	- 기상요인을 이용한 양파의 병해발생 예측 프로빗 일반화방법 모형 개발	100%
- 기상요인을 이용한 마늘의 병해발생 예측 프로빗 일반화방법 모형 개발			

구분 (연도)	연구목표	연구내용	달성도
3차년도 (2018)	작물에서 다양한 환경장애(냉해, 저온, 가뭄) 및 병해 진단을 위한 밀폐된 종이센서의 제작과 현장에서 스트레스 분석을 위한 휴대용 진단키트 및 매뉴얼 제작 (1세부)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 현장진단을 위해 외부 환경의 오염물 및 시료의 증발을 최소화하기위한 밀폐된 형태의 종이센서를 제작하였음. 종이센서는 최적화과정을 통해 향상된 검출한도를 보이며, 보다 짧은 시간과 낮은 온도에서 분석이 가능함. 진단키트의 동작은 환경장애 및 병해를 진단하기 위한 종이센서가 모듈에 장착되어 있는 상태에서 센서의 샘플 로딩부에 샘플을 로드한 후 센서모듈을 본체에 슬라이딩 방식으로 삽입하여 히터의 온도를 일정하게 유지해 발색반응을 평가함.</li> <li>- 개발된 현장진단기 키트를 사용하여 실제 작물에서 샘플을 채취하여 환경장애 및 병해 진단을 하여 현장 사용 가능성을 확인하였으며 진단기 키트의 사용 매뉴얼을 제작함.</li> </ul>	100%
	냉해 스트레스에 대한 양파·마늘의 프롤린 수용체 함량 데이터 확립 및 파속작물의 현장적용 진단 실험 및 진단키트에 대한 민감도 분석 (2세부)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 양·파·마늘 작물들은 모든 잎에 시들음 현상을 초래한 것을 알 수 있었고, 구근의 발달은 거의 이루어지지 않았음. 잎 상단부와 하단부로 구분하여 프롤린 함량을 측정함 결과, 잎상단부의 프롤린 함량이 하단부보다 높았음을 알 수 있었음. 이러한 결과들은 냉해스트레스와 건조스트레스가 파속작물에 있어서 유사한 기작으로 생리적 표현형을 유도함을 알 수 있었음.</li> <li>- 제 1세부과제에서 제작한 종이 진단 키트를 가지고 스트레스 인지 수용체 프롤린 탐침을 진단한 결과, 정량적 데이터와 유사하게 색깔 변화가 나타남을 알 수 있었음. 이러한 결과들은 프롤린이 작물 스트레스에 대한 종이 센서 진단 마커로 이용될 수가 있음을 알 수 있었음.</li> </ul>	100%
	노균병과 흑색썩음균핵병에 조기 진단 최적화 시스템 확립 및 현장 적용 (3세부)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- LAMP 기법을 활용해 이병엽이나 육묘상태의 양파, 그리고 토양으로부터 노균병균 검출 및 토양으로부터 흑색썩음균핵병원균 검출을 확인함.</li> <li>- 최적의 노균병과 흑색썩음균핵병 조기 진단법을 활용하여 육묘 관리부터 본밭까지의 효율적인 양파 주요 병해 방제력을 확립하여 농업현장에 적용하였음.</li> </ul>	100%
	생육환경 모니터링시스템을 이용하여 무선/원격 통신 기술 개발 (1협동)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 노지에서 현장적용을 통하여 실시간 작물의 생육환경 정보 수집.</li> <li>- 스마트폰 어플을 이용한 대기 온·습도, 토양 온·습도, 토양 EC, 조도의 데이터 실시간 확인.</li> </ul>	100%
	딥러닝 기반 양파, 마늘의 질병 데이터 학습 및 양파, 마늘의 질병 발생을 인식 및 알람체계 구축 (1협동)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 양파, 마늘의 질병 인식을 위한 학습데이터 구축 및 양파 재배 시 질병 발생율을 측정.</li> <li>- 양파, 마늘의 재배의 실시간 모니터링 및 질병 인식, 알람체계 구축을 위해서 학습단위 영상의 통합 및 전체영상 내 질병 의심영역 시각화를 수행함.</li> </ul>	100%
	빅 데이터 기반의 작황 예측 모델 개발 및 성능평가를 통한 최적 모형 선정 (1협동)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 병해와 기상요인을 이용한 양파의 생산량 예측 일반화기법모형 개발.</li> <li>- 병해와 기상요인을 이용한 마늘의 생산량 예측 일반화기법모형 개발.</li> </ul>	100%

- 다. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)  
- 해당사항 없음

## 4. 연구결과의 활용 계획 등

### 가. 연구개발결과의 활용계획

- 개발된 양파, 마늘 작황 예측용 실시간 원격 모니터링 시스템 및 진단키트/리더기의 핵심부품과 통합 시스템 개발 기술의 특허/실용신안 등록 및 논문, 학술대회 발표 등의 학술적 활동을 통해 과제의 성과 달성.
- 기술이전과 제품 양산화를 통해 국내 및 국외 농가 보급으로 시장 활성화 및 국가경쟁력 상승에 기여.
- 실용화를 위한 상세 설계도면을 각 관련 기업에 배포하여 양산을 위한 협력업체 확보.
- 최초의 양파, 마늘용 작황 예측 기술로 다른 밭작업 환경 등에 기술 확대 적용을 통한 밭작업 작물의 고효율/고품질 수확 기대.
- 본 과제 종료 후 노지에 성장한 양파·마늘 작물의 가뭄정도에 따른 프롤린 함량의 변화를 정량화 하여 진단키트의 정확성 및 신뢰성을 향상시키는 연구를 진행하여 진단키트 최적화 통한 신속한 가뭄진단 기대.
- 현장에서 수집된 데이터와 진단키트 데이터를 비교 분석해서 진단 키트의 감도를 향상시켜 진단키트의 활용 및 국내외 병해 조기 진단기기 시장 활성화에 기여 가능함.
- 독자적인 기술이 적용된 제품 개발을 통한 해외 수출 증진이 가능할 뿐만 아니라 판매용 제품 양산을 통한 국내 관련 제품 시장 활성화 및 국외 판매를 통한 외화유지.
- 기상장해 마이크로 진단 키트는 간단히 확인 가능하므로, 중·고등학교 과학교실 및 가정에서 가꾸는 소규모 화단에서도 사용할 수 있는 홈 진단키트로도 사용할 수 있음.
- 원예식물의 실내외 이용 기술 개발이 발달됨에 따라 기상장해 마이크로 진단 키트는 생리장해 및 환경장해 제어를 위한 기반 기술을 확보할 수 있음.
- 특히, 화훼분야의 고온장해 극복 기술 등 불량 환경 극복 재배기술 개발 및 수분의 효율적 관리 체계를 확립할 수가 있음.
- 파속작물 재배에 맞게 설계된 개발품은 다른 농작물 환경에 적용하여 다양하게 활용 가능함. 특히 병징이 발현되기까지의 잠복기가 긴 병원균의 경우 유용하게 적용될 수 있음.
- 개발된 국소적 기상 정보 모니터링 및 병해 경보시스템 기술, ICT 기술이 내장된 현장용 바이오센싱 진단기, 병해 맵핑 기술의 통합 시스템 개발을 통한 해외 수출 증진 및 국내외 병해 조기 진단기기 시장 활성화에 기여 가능함.

- 프롤린 외 PAP phosphatase, AMP 및 시스테인 구성 물질들이 가뭄·저온 진단 마커로 이용될 수 있음을 제시하였으며, 특히 PAP phosphatase는 황 대사에도 관련되어 있으므로 황 대사 조절에 따른 작물 발달 최적화 및 사료작물 기술 개발에 활용할 수가 있을 것으로 사료됨. 또한 시스테인 물질은 높은 농도에서 식물체 잎의 괴사 반응을 유도함으로써, 가뭄에 대한 진단 마커일 뿐만 아니라, 스트레스 내성 유도제로 이용할 수가 있음. 따라서 시스테인 스트레스 내성 유도제 기술 개발은 작물 바이러스 방제 기술에 응용할 수 있다고 판단됨.
- 양파 노균병과 흑색썩음균핵병으로 인해 많은 피해를 입고 있는 양파 농가의 살균제 사용 빈도 감소 및 방제 효과 상승으로 농가 소득 증대 기여
- 양파 육묘상과 본밭의 토양으로부터 노균병균 및 흑색썩음균핵병균 존재 유, 무를 파악하여 파종 및 정식 전 태양열 소독 또는 토양 훈증제 등의 토양 소독 방법 적용으로 병원균의 밀도 감소에 크게 기여
- 파속작물 재배에 맞게 설계된 개발품은 다른 농작물 환경에 적용하여 다양하게 활용 가능하며 특히 병징이 발현되기까지의 잠복기가 긴 병원균에 유용하게 적용 가능
- 양파, 마늘의 노균병 특성 및 방제 방법, 식물과 병원균 상호작용 관련 연구 경험 등 본 연구 수행과 연관된 기초 연구 경험이 풍부한 연구진 배치를 통해 연구 개발 프로세스 중 발생하는 시행착오를 최소화
- 모니터링 시스템의 핵심부품 설계 및 통합 시스템 개발은 각각의 요소에 대한 layout 설계 결과를 토대로 시뮬레이션 수행하고 이를 통해 실제 설계에 앞서 동작 가능성 및 성능을 예측해봄으로써 연구의 효율성과 제품의 정확성 및 신뢰도를 향상시킴.
- 국내 농업 생산량 조사(통계청)에서 대상으로 정한 양파, 마늘 재배지에 대해 다양한 환경 측정 및 생육 상태의 빅 데이터를 구축하여 개발 제품의 예측 성능을 향상시킬 뿐만 아니라 연구 전반에 걸쳐 측정된 데이터와 제품화 이후에도 지속적인 데이터 관리를 통해 최적화시킬 예정임.
- 마늘, 양파 뿐만 아니라 다양한 파속 작물에 적용이 가능하도록 시스템을 설계 및 개발하여 모니터링 시스템, 진단기/리더의 확장성을 향상시켜 이를 통해 매출 향상을 극대화 할 예정임.
- 작황 예측 모니터링 시스템은 시작품 제작 후 본 연구의 종료 시점까지 지속적인 보완과 검증을 통해 최적화시킬 것이며 과제 종료 후에도 지속적인 이력 관리를 통해 문제점을 보완할 예정임.
- 생육환경 모니터링 시스템은 시작품 제작 후 본 연구의 종료 시점까지 지속적인 보완과 검증을 통해 최적화시킬 것이며 과제 종료 후에도 지속적인 이력 관리를 통해 문제점을 보완할

## 예정임

- 핵심 부품 대한 체계적인 신뢰성 검증을 위해 전문 외부 평가 기관에 의뢰하고 전체 시스템에 대해서는 성능 지표 및 평가 기준을 마련하여 양산을 고려한 내구성 및 성능에 대한 검증을 실시함
- 본 과제에 요구되는 목표와 참여 연구팀의 역량 분석을 통해 최적으로 달성 가능한 목표를 산정하여 이를 통해 양적, 질적 모두 우수한 성과물을 발생시킴
- 연구개발 결과물의 기술 실시 경험이 풍부한 참여기업을 이용하여 원활한 제품화를 진행하고 주요 결과물(모니터링 시스템, 영상획득 시스템 등)별로 제품화를 진행함
- 기계 장치 및 전자 제어 장치의 양산 설계를 통한 모니터링 시스템의 소형화
  - 1) 기계 장치 : 전체 구동부를 모듈형으로 하여 분해 조립이 용이하도록 부피 최소화
  - 2) 전자 제어 장치 : I/O 인터페이스 및 제어기 설계를 통한 단일 제어기 보드 설계
- 수확량 수급 안정 측면에서는 병해 발생 초기에 진단 및 조치가 가능하기 때문에 병해의 2차 확산을 통한 피해 최소화가 가능하며(수급 변동량 5% 이내 유지), 이를 통해 양파, 마늘 수확의 안정화를 도모함

## 붙임. 참고문헌

- Choi, S. and Baek, J., (2016 a), Onion yield estimation using spatial panel regression model, *The Korean Journal of Applied Statistics*, 29(5), 873-885.
- Choi, S. and Baek, J., (2016 b), 기상자료를 이용한 마늘 생산량 추정, *한국데이터정보과학회지*, 27(4), 969-977.

주 의

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