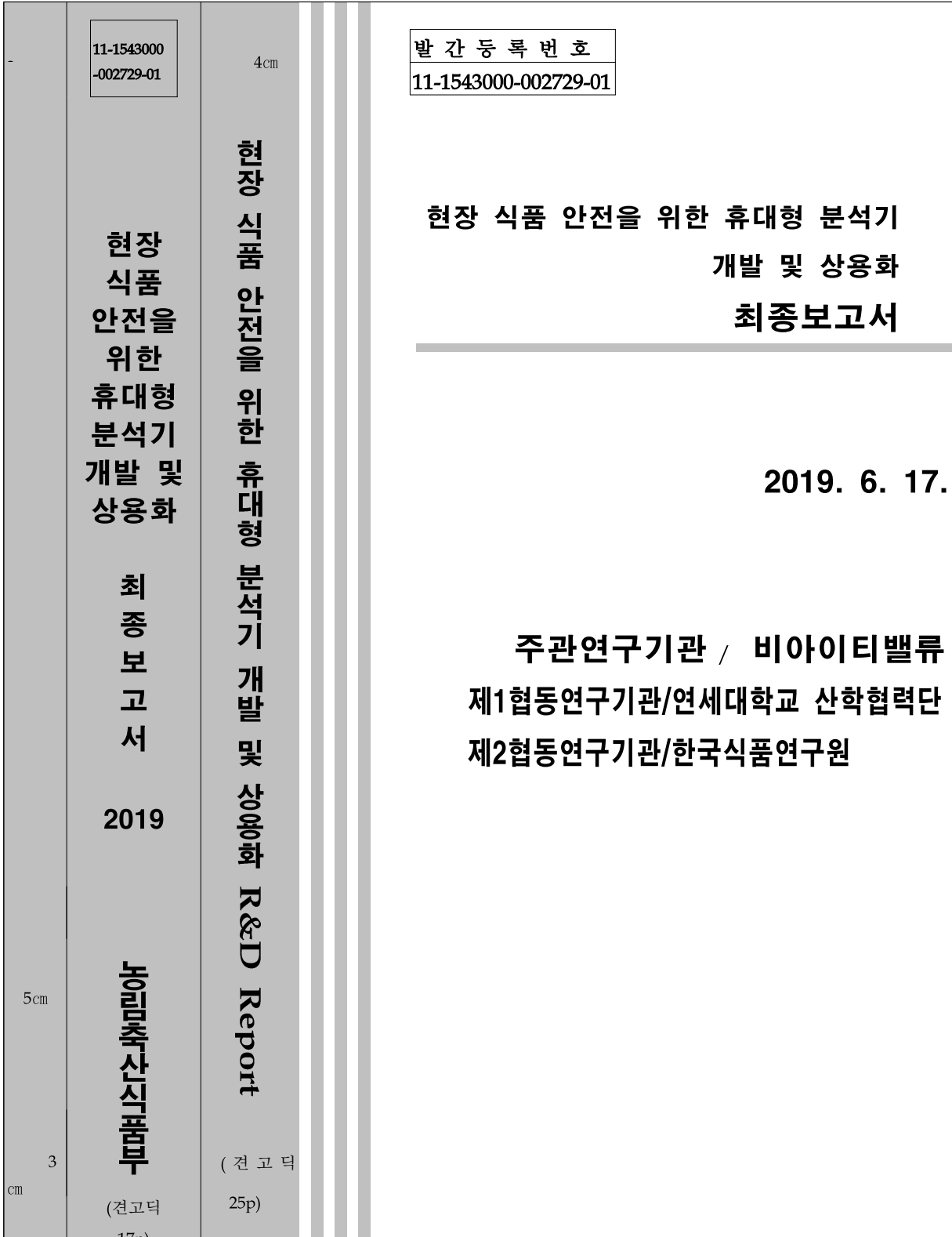


(뒷면) (옆면)

(앞면)



11-1543000  
-002729-01

4cm

발간등록번호

11-1543000-002729-01

현장  
식품  
안전을  
위한  
휴대형  
분석기  
개발 및  
상용화

최  
종  
보  
고  
서

2019

농림축산식품부

(전고딕  
17px)

현장 식품 안전을 위한 휴대형 분석기 개발 및 상용화 R&D Report

(전고딕

25p)

현장 식품 안전을 위한 휴대형 분석기  
개발 및 상용화  
최종보고서

2019. 6. 17.

주관연구기관 / 비아이티밸류  
제1협동연구기관/연세대학교 산학협력단  
제2협동연구기관/한국식품연구원

5cm

3

cm

※ 최종보고서 표지 작성시 과제명이 길 경우 글씨 크기 변경 가능

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “현장 식품 안전을 위한 휴대형 분석기 개발 및 상용화”(개발기간 : 2016. 8. ~ 2018 . 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 06. 17.

주관연구기관명 : 비아이티벨류 (대표자) 조 원 창  
1협동연구기관명 : 연세대학교 산학협력단 (대표자) 이 원 용  
2협동연구기관명 : 한국식품연구원 (대표자) 박 동 준



주관연구책임자 : 조 원 창  
1협동연구책임자 : 정 효 일  
2협동연구책임자 : 박 재 호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	316073-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.08~ 2018.12	단 계 구 분	(총 2 단 계 )
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치 식품기술 개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	현장 식품 안전을 위한 휴대형 분석기 개발 및 상용화			
연구책임자	조 원 창	해당단계 참여연구원 수	총: 19명 내부: 19명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 300,000 천원 민간: 100,053 천원 계: 400,053 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 25명 내부: 25명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 780,000 천원 민간: 206,139 천원 계: 1,040,139 천원
연구기관명 및 소속부서명	비아이티밸류/연세대학교 산학협력단/ 한국식품연구원			참여기업명: 비아이티밸류	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및	
-------------------	--

사유

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 서원문	연구 시설· 장비	기술 요약 정보	소프 트 웨어	화 합 물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정 보	실물
등록·기탁 번호	1. 0925-4005(SCI) 2. 0956-5663(SCI) 3. 1225-5475(SCI) 4. 0003-2654	1. 10-2017-0150214(출원)									
		2. 10-2017-0150215(출원)									
		3. 10-2017-0150216(출원)									
		4. 10-2018-0076070(출원)									
		5. 10-2017-0150214(등록)									
		6. 10-2017-0150215(등록)									
		7. 10-2018-0076070(등록)									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요

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

보고서 면수

<국문 요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>현장 검사가 가능한 식품 안전검사용 분석기기의 개발 및 상용화가 목표이고, 화학적 위해물질과 생물학적 위해물질을 검사할 수 있으며, 검출 소요시간은 1시간이내, 검출 민감도는 1ng/mL 이하이고 민감도 특이도 95% 이상으로 stand alone형으로 현장에서 손쉽게 분석이 가능한 측정시스템을 개발함. 이를 위해 타겟 샘플의 농축용 플루이딕스 칩을 개발하고, 바이오마커 3종 및 화학마커 3종을 적용하기로 한다.</li> </ul>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>본 과제의 연구개발 성과로는 과제기간동안 제품화는 2건, 매출액 32.1백만원을 달성하였고 유전자 증폭장치관련 특허, 잔류농약 측정장치 특허등 출원 4건, 등록 2건을 마쳤으며. 제품화를 위한 식품바이러스 검사 시약업체와 협력을 추진하고 삼성웰스토리, 롯데칠성등 수요 업체를 방문하였다.</li> <li>본 과제의 일환으로 고용창출은 정규인원 2명을 연구기간내에 채용을 하였으며, 논문은 연세대학교에서 SCI 3건, 비SCI 1건을 등록하였고, 학술발표는 총 3회가 있었음.</li> <li>- 제품화 2건</li> <li>- 매출액 32.1백만원</li> <li>- 특허출원 4건</li> <li>- 특허등록 3건</li> <li>- 기술실시 보고서 제출 1건</li> <li>- 고용창출 2명</li> <li>- 논문 SCI 3건, 비SCI 1</li> <li>- 학술발표 3회</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>화학적 위해물질인 잔류농약측정의 경우에 실험실에 진행하였던 기존의 방법에서 FIA방식을 적용한 측정기기 개발로 현장에서 직접 검사가 가능하여, 시장의 요구에 부합할 수 있어서, 시장진입이 용이하며, 2019년 1월부터 전면 시행중인 PLS제도의 적용으로 잔류농약의 현장 검사의 필요성이 증가하여, 본 개발제품을 기반한 적극적인 판매활동을 추진할 계획임. .</li> <li>식품의 생물학적 위해물질검사(식중독균)의 경우에 샘플 배양시간이 길고, 실험실에서만 가능한 상황이었으나 타겟 샘플 농축 및 추출이 가능한 칩을 개발하여 배양과정없이 신속하게 타겟 샘플의 농축이 가능하여 현장에서 검사가 가능한 기반기술을 확보하였다. 추후 농축칩과 연동한 자동 농축 시스템도 별도로 사업화할 계획이며, 분자진단 기술의 핵심인 RT-PCR을 제품화하여 과제 종료후 본격적인 영업활동을 할 계획임.</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	잔류농약	식중독균	식품안전검사	현장검사	전처리
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	residual pesticide	Food poisoning	Food safety inspection	Field inspection	pretreatment

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<영문 요약문>

< SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<p>○ It is aimed to develop and commercialize analytical instruments for food safety inspection which can be conducted on-site, and it is possible to inspect chemical harmful substances and biological harmful substances. The detection time is less than 1 hour, detection sensitivity is less than 1ng / mL, We have developed a measurement system that can be easily analyzed on the spot by stand-alone type at 95% or more. To this end, Fluidix chips for concentration of target samples were developed, and three types of biomarkers and three types of chemical markers were applied.</p>					
Results	<p>○ As a result of research and development achievements of this project, 2 commercialization and 32.1 million KRW sales were achieved during the project period, and 4 patents and 2 registrations were completed for patents related to gene amplification devices and residual pesticide measurement devices. We have been working with food virus testing companies to commercialize them and visited demand companies such as Samsung Wellstory and Lotte Chilsung.</p> <p>○ As part of this project, 2 regular employees were recruited during the study period. The thesis was registered at Yonsei University with 3 cases of SCI and 1 case of non-SCI.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 products</li> <li>- Sales amounted to 32.1 million won</li> <li>- Patent application 4 cases</li> <li>- Patent registration 3 cases</li> <li>- Submission of technical report 1</li> <li>- Job creation 2 people</li> <li>- Thesis SCI 3 cases, Non SCI 1</li> <li>- 3 academic presentations</li> </ul>					
Expected Contribution	<p>○ In the case of residual chemical pesticide, which is a chemical hazard, it is possible to inspect directly on site by developing FIA-based measuring device in the existing method, which has been carried out in the laboratory, The application of the PLS system, which has been in full implementation since January 2019, will increase the need for on-site inspections of residual pesticides and plan to promote sales activities based on the developed products.</p> <p>○In the case of food hazardous substances test (food poisoning bacterium), it is possible to concentrate the target sample quickly without developing culture by developing a chip capable of concentrating and extracting the target sample even though the sample incubation time is long and only possible in the laboratory. Which is the basis of technology. We plan to commercialize an automatic enrichment system that will be linked to concentrated chips later. We plan to commercialize RT-PCR, which is the core of molecular diagnostic technology, and start full-scale sales activities after completing the project.</p>					
Keywords	residual pesticide	Food poisoning	Food safety inspection	Field inspection	pretreatment	



<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	4
1. 주관기관 비아이티밸류	
가. 1차년도 세부 연구내용 .....	4
나. 2차년도 세부 연구내용 .....	8
다. 3차년도 세부 연구내용 .....	27
2. 제1협동기관 연세대학교	
가. 1차년도 세부 연구내용 .....	66
나. 2차년도 세부 연구내용 .....	70
다. 3차년도 세부 연구내용 .....	77
3. 제2협동기관 한국식품연구원	
가. 1차년도 세부 연구내용 .....	87
나. 2차년도 세부 연구내용 .....	91
다. 3차년도 세부 연구내용 .....	94
※ 사업화 성과표 .....	101
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	102
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	103

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서



## <뒷면지>

### 주 의

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

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

- 본 과제의 목적은 현장 검사가 가능한 식품안전 검사용 통합 분석기기의 개발 및 상용화로써 식품 안전을 위해서 화학적 및 생물학적 위해요소를 측정함으로써 생산-유통단계에서 모니터링 및 품질관리를 좀 더 구체적으로 안전하고 편리하게 할 수 있게 하기 위하여 시스템을 개발 하는 것이 목적임.
- 이러한 위해요소를 검사하여 위해요소를 제거하거나 허용치 이하의 단계로 관리가 가능하게 하고 식품 안전을 위하여 생산, 유통과정의 현장에서 측정이 가능한 측정 시스템을 개발 하고자함.
- 검출 소요시간은 1시간이내, 검출 민감도는 1ng/mL 이하이고 민감도 특이도 95% 이상임. 제품은 stand alone형으로 현장에서 손쉽게 측정이 가능한 제품을 개발함. 타겟 샘플의 농축이 가능한 플루이딕스 칩을 개발하고, 바이오마커 3종 및 화학마커 3종을 적용하기로 한다. 이후 현장 실증 및 고객 VOC 활동을 통해 식품 양산이나 유통과정에 적용하고자함.

## 1-2. 연구개발의 필요성

- 식품 안전이란 식품의 안전성을 확보하는 일이 바로 식품위생입니다. 이는 식품으로부터 오는 위해인자를 확인하고 위해발생을 미리 방지하기 위한 수단으로 식품위생법 제2조 제8항에서는 "식품, 식품첨가물, 기구 또는 용기, 포장물 대상으로 하는 음식에 관한 위생"으로, 세계보건기구(WHO)에서는 "재배, 생산, 또는 제조 시부터 사람이 섭취할 때까지 모든 단계에서 모든 식품의 안전성, 완전성 및 건전성이 확보되도록 하기 위한 모든 조치" 로 정의하고 있음.
- 식품안전을 위협하는 인자들은 식중독균, 부정/불량식품, 유해물질(잔류농약, 잔류중금속, 잔류환경호르몬)이 있습니다. 현재 식약청에서 최고의 식품안전관리 방침으로 지정한 제도가 HACCP에서 위해요소 도출이란 기준에 알려져 있던 생물학적위해요소(병원성미생물), 물리적 위해요소(금속, 유리, 등의 이물), 화학적 위해요소(중금속, 잔류농약, 등)을 기본으로 삼고 있음.
- 산업이 발전하고 국민들의 식생활 및 생활 패턴의 변화로 인해 각종 병원균의 감염에 의한 질병이 점점 늘어가고 있는 추세임. 2013년 식품의약품 안전처의 식품안전 동향보고서에 따르면, 화학적 위해요소와 생물학적 위해요인이 식품안전을 위협하는 주요원인이 되는 것을 알 수 있으며, 본 과제에서는 현장에서 식품위해 인자인 식중독균과 잔류농약과 같은 유해물질을 대상으로 포터블 분석기 개발 및 상용화를 목표로 하고 있음.
- 생물학적 위해요소가 되는 살모넬라균이나 노로바이러스는 주로 식중독을 유발시키는 것으로 알려져 있는데, 식중독이란 자연독이나 유해물질이 함유된 음식을 섭취함으로써 생기는 급성 또는 만성적인 건강장애로 세균성, 화학성, 그리고 미생물 독성대사물질에 의한 식중

독 등이 있음. 이러한 식중독균은 Ready-to-use형태의 식품공급 및 소비보편화 추세, 고령인구의 증가에 따른 식중독 노출위험 상존, 지구 온난화 변화로 인한 유해미생물 자연배양조건 조성 및 생산, 유통, 소비의 대형화 추세에 따라 식중독균 감염이 증가하고 있는 상황임. 이러한 식중독 발생은 인간의 건강에 해를 끼칠 뿐 아니라 관련 의료비로 막대한 경제적 손실과 함께 관련 식품산업의 막대한 기회손실을 야기하고 있음.

- 먹거리에 대한 기대와 관심은 식중독관리에 대한 국가적, 국민적 관심사항이며, 식중독 관리에 있어서 검사는 식품 가공, 유통, 포장, 제조(급식)에서 정성적 또는 정량적 검사는 필수적인 식품안전 프로세스가 되고있음. 기존의 식품조리과정중의 온도체크, 소독활동과 같은 기존방식으로는 식중독발생에 대한 불안을 해소하기에는 미흡합니다. 특히 학교급식과 같은 집단급식소등에서 식중독 발생원인의 대부분을 차지하는것이 주로 오염된 지하수(노로바이러스)사용으로 인한것과 불량식자재를 사용으로 기인한 것임. 또한 최근 이슈가 되었던 노로바이러스 같은 경우는 물이나 음식을 통해 주로 전염되어 식중독을 일으키기 때문에 전 세계에 걸쳐 지속적으로 감염이 일어나고 있음.
- 식품 가공기술의 발전과 식품위생법 강화로 식품의 안전성에 대한 소비자의 우려는 감소하고 있으나 다양한 소비자들의 기호 충족을 위해 원자재 수입, 혼합 등의 기회가 커지고 생산량 증산을 위한 농약, 화학비료, 항생물질 등의 과다사용은 식품 원재료 및 가공식품에 대한 안전성 확보가 필요함.
- 식품안전 확보를 위해 식품의약품안전처에서는 기본안전 수칙 (sSOP)를 고시하고 있으며 식품안전관리인증 (HACCP)과 우수건강기능식품제조기준 (GMP)를 운영하고 있음. HACCP 인증 요건 중 하나인 검사관리는 자체 실험실 또는 검사기관과의 협약에 의한 제품검사를 강제하고 있으며 이는 업체에 경제적 부담을 주고 있어 휴대형 분석기기 개발로 자체 검사를 경제적이며 효율적으로 활성화 하여 식품안전 확보에 도움을 줄 것으로 파악되며, 우수건강기능식품 제조기준 고시에서도 시험실과 시험장비 기준이 있어 업체에 경제적 부담이 있음.
- 화학적 위해요소인 잔류농약측정은 샘플을 수거하여 실험실 레벨에서 HPLC/MS등 고가의 장비로 검사하고 있으며, 신속 검사로는 효소-저해 방법의 속성검사가 사용되어지고 있으나 시료나 샘플의 혼합 및 반응 과정이 실험자가 매뉴얼로 실험실에서 진행해야하는 불편함이 있는 상황임. 또한, 국내 생산·유통 식품의 안전성 확보가 강화되고 있으며, 수입 농수산물식품은 현지에서의 시료채취, 운반, 분석 등 한계가 있어 「수입식품안전관리 특별법」에 근거한 해외에서 채취된 시료의 오염을 막고 실시간분석을 진행하여 신속한 판단이 가능하도록 현지에서도 사용할 수 있는 포터블 분석기 개발이 필요함.
- 식품안전을 위협하는 화학적 위해요소를 검출하는 기기의 경우, 체내 독소로 작용할 수 있는 약물에 대한 검출 조사는 일부 상용화되었으나, 직접적으로 모니터링 하는 휴대용 검출 기기는 아직 개발된바 없음.
- 덧붙여 2019년 1월 1일자로 PLS(Positive List System; 농약 허용물질목록 관리제도)법의 시행으로 잔류농약에 대한 보다 광범위한 검출 과정이 필요할 것이며, 본 과제를 통해 개발한 신속 잔류농약 측정기기의 상용화에 우호적인 시장 환경이 조성될 것으로 판

단됨.

### 1-3. 연구개발 범위

- 본 연구 과제에서는 비아이티밸류 (주관), 연세대학교 정효일 교수팀 (제1협동), 한국식품연구원 박재호 박사팀 (제2협동)의 산학연 협동 연구를 통해 식중독균과 같은 생물학적 유해물질과 잔류농약으로 대표되는 화학적 유해물질을 현장에서 측정하고자하는 포터블 측정 시스템을 개발하고자 한다.
- 주관기관인 비아이티밸류에서는 현장 측정기기 개발을, 연세대학교 정효일 교수팀에서는 타겟 박테리아나 바이러스의 농축 및 유전자 추출용 micro-MACS chip 개발을, 한국식품연구원에서는 잔류농약, 항생제 위해인자 특성분석, 화학적 마커 검출 분석 및 현장 채취 시료를 활용하여 식품공전 분석과 비교하는 연구를 수행한다.

#### ○ 총괄 연구범위 및 목표

식품(생물학적 유해물질, 화학적 유해물질)의 현장검사가 가능하도록 하는 농축용 칩과 분석기기 개발 및 상용화

#### 1) 주관기관 (비아이티밸류) :

- 화학적 마커, 생물학적 마커 기반 현장 분석기기 플랫폼 선정
- 시료농축용 플루이딕칩과 연계한 자동농축, 추출시스템 시제품 제작
- 생물학적 마커 측정을 위한 광학계 및 소형 RT-PCR 개발
- 잔류농약 및 항생제 위해인자 분석 시스템 시제품 제작

#### 2) 제1협동기관 (연세대학교)

- 생물학적 위해인자 분석에 따른 바이오마커 3종 선정 및 검출 계획 수립
- 식품 샘플 농축 및 광열효과 기반의 타겟 유전자 추출용 micro-MACS chip 시제품(W/S)제작
- 식품안전 위해요소 기반 측정기기 기본측정 성능 평가

#### 3) 제2협동기관 (한국식품연구원) :

- 식품(원료)의 가공, 유통, 포장등의 특성에 따른 식품 위해인자별 특성분석
- 표준물질 및 식품시료의 화학적 마커 검출 한도 및 분석 비교
- 시제품 활용 현장 채취 시료 분석 및 식품공전 분석 결과 비교

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 1. 주관기관 비아이티밸류

○ 최종목표: 현장검사가 가능한 식품안전 검사용 통합 분석기기 개발 및 상용화

#### 가. 1차년도 세부 연구내용

1) 식품 위해물질의 화학적 마커기반 분석기기 플랫폼 개발의 일환으로서 검사 분석 방법 결정하기 위해서, 측정기기의 핵심기술인 분광계를 설계, 제작 하였다. 화학적 위해물질 검사를 위한 광학모듈 프로토타입은 아래와 같다.

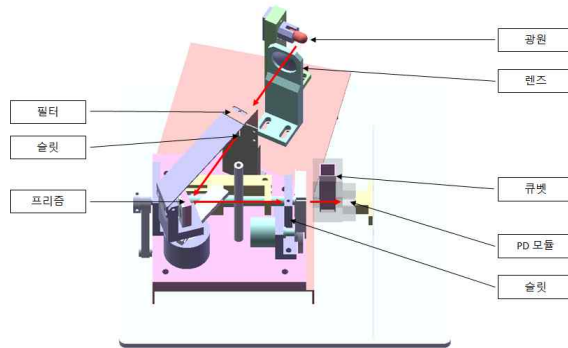


그림1. 광학모듈 프로토타입의 명칭 및 측정 과정

- 화학적 위해물질 검사 분석을 위해서는 다양한 파장영역으로 샘플을 측정할 필요가 있었으며, 이를 위해 분광계를 개발하였다. 분광계 광원은 다양한 파장을 내는 백색광의 light source를 사용하였고, 프리즘을 사용해서 파장별로 스펙트럼으로 분리하여 샘플에 조사 할 수 있도록 설계하여, 분석 플랫폼을 선정 및 검증하는 과정을 추진하였다.
- 광학계의 디텍터로는 PD를 사용한다. 광원에서 나온 백색광은 렌즈를 지나며 초점이 모이게 되고, 이 빛이 슬릿을 지나게 된다. 슬릿을 지난 빛은 필터를 통과하여 프리즘에 닿게 된다. 프리즘에 닿은 빛은 스펙트럼으로 분리가 되어 진다. 스펙트럼으로 분리된 다양한 파장의 빛은 프리즘의 각도를 제어하여 조정 할 수 있다. 스펙트럼으로 분리되어진 빛은 다시 슬릿을 통해 샘플에 담겨 있는 큐벳을 통과하게 되고, 이것을 PD로 읽어 결과를 분석하는 것이다. 아래는 분광계와 PD가 포함된 검출용 보드이다.



그림2. 광학 분광 모듈 프로토타입

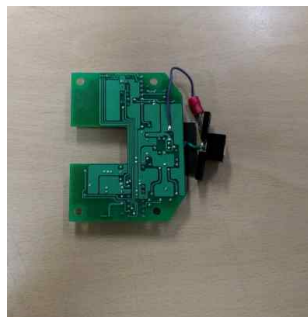


그림3. 광측정 보드 프로토타입

- 화학적 유해물질 검사를 위해 개발한 분광계의 기구적인 구조를 설명하고자 한다. 광원에서 나온 빛은 렌즈와 슬릿을 통하여 프리즘에 닿게 되고, 스펙트럼으로 분리가 된다. 스펙트럼으로 분리된 빛은 약 400nm 에서 700nm 의 파장을 가지게 된다. 스펙트럼으로 분리된 빛을 이용하여 파장별로 샘플을 측정하게 된다. 파장별로 샘플을 측정하기 위해서 볼스크류(Ball screw)에 스텝모터(Step motor)를 연결하고, 스텝모터를 동작시켜 프리즘(Prism)이 붙어 있는 브라켓을 회전시킨다. 변하는 프리즘의 각도에 따라 다양한 파장으로 분광되고, 분광된 파장에 적합한 샘플을 측정할 수 있다. 이 때 포토셀미터를 이용하여 프리즘의 각도를 측정하고 제어 할 수 있도록 하였다.

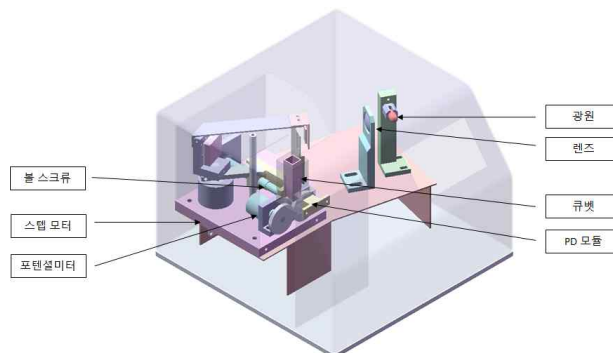


그림4. 화학적 유해물질 검사용 분광장비 3D 모델링

## 2) 생물학적 위해물질 검사 분석 방법 결정 및 검사모듈 프로토타입 개념설계

(1) 생물학적 위해물질인 식품의 식중독균의 검사를 위한 방법으로는 면역진단, 분자진단을 고려할 수 있으나 민감도가 우수하고, 바이러스 검사가 가능한 분자진단 방식을 채택하였으며, 1차년도는 분자진단의 대표격인 RT-PCR의 핵심기술인 형광광학모듈과 히팅부의 프로토타입을 설계, 제작을 수행하였다.

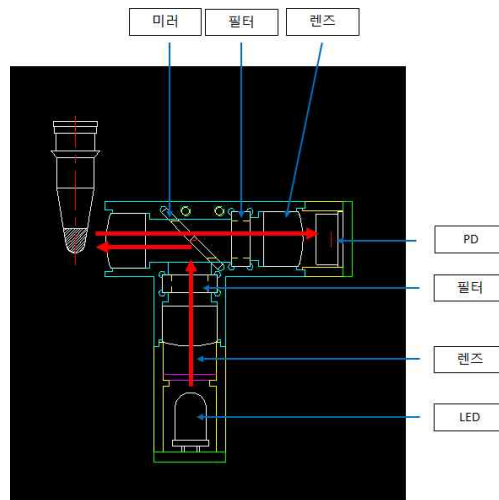


그림5. 생물학적 위해물질 검사용 형광 광학계 명칭 및 원리

- 생물학적 위해물질 검사용 형광 광학계는 PCR튜브에 샘플을 넣고 PCR을 진행하면서 증폭되는 형광신호를 검출할 수 있도록 되어 있다. 광학계의 광원으로는 LED를 사용하며, 디텍터로는 PD(Photo Diode)를 사용하고 있다. LED에서 나온 빛은 렌즈를 거쳐 집광되며, 필터를 거치며 필요한 파장만 필터링 하게 된다. 필터를 지난 빛은 미러에 의해 반사되어 샘플에 조사된다. 여기서 사용되는 미러는 dichroic mirror 로서 선택적으로 빛을 반사 혹은 투과 시키는 성질을 가지고 있다. 조사된 빛은 형광반응을 일으키게 되고, 형광에 의해 발생된 빛은 다시 미러와 필터를 거치고, 렌즈를 지나 검출센서인 PD에 도달하게 되며, 이것을 분석하여 결과를 분석 할 수 있다.
- 형광을 측정하기 위한 형광필터는 Blue계열은 FAM계열과 및 Red 계열(또는 Yellow계열) 적용, 제작하였으며, 신호 측정을 위한 검출보드는 하마마쓰사 PD와 미세한 형광신호를 증폭하기 위한 OP-AMP를 포함한 보드를 제작하여 테스트 하였다.



그림6. 생물학적 위해물질 검사용 광학계

<광학 신호 검출 보드>

(2) 생물학적 위해물질 검사용 RT-PCR 기기부 프로토타입 설계

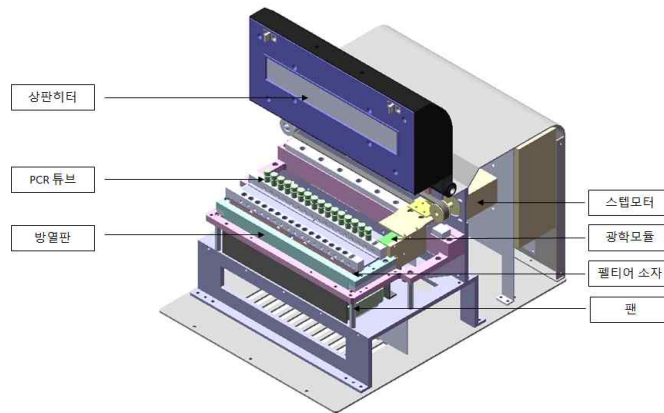


그림7. 생물학적 위해물질 검사용 RT-PCR 내부 구조 및 명칭

- 생물학적 위해물질 검사용 장비(Real time PCR) 는 열원을 이용하여 온도를 상승, 하강시 거중으로서 타겟 유전자를 증폭하고, 이 때 발견되는 형광을 광학계로 측정하여 결과를 분석하는 기기이다. 열원으로서는 펄티어 소자를 사용하며, 펄티어 소자 하부에는 방열판 및 팬을 설치하여 발생하는 열을 제거하는 역할을 한다. 측면에는 광학계가 위치되어 있고, 광학계는 스텝모터 및 LM 가이드에 연결되어 이동 할 수 있어서 여러 샘플을 스캐닝하면서, 거의 동시에 측정 할 수 있다. 광학계는 광원으로는 LED, 디텍터로는 PD를 사용하였으며, 사이즈를 최소화하여 소형화를 달성하였다.
- 히팅 모듈에서 사용한 펄티어 소자는 소자 전류의 방향을 바꾸면서 온도를 상승, 하강시킨다. 온도 하강시 펄티어 소자의 하부에서는 열이 발생하는데, 이를 효과적으로 제거하지 못하면 온도 제어가 어렵게 된다. 따라서, 펄티어 소자의 하부에는 방열판과 팬을 설치하여 발생하는 열을 제거한다. 히팅블럭에는 정밀한 온도 측정을 위해 PT-100 온도센서가 부착되어 있으며, 이를 이용하여 온도 제어를 하게 된다. 1차년도에 제작한 RT-PCR 히팅부를 포함한 프로토타입은 다음과 같다.

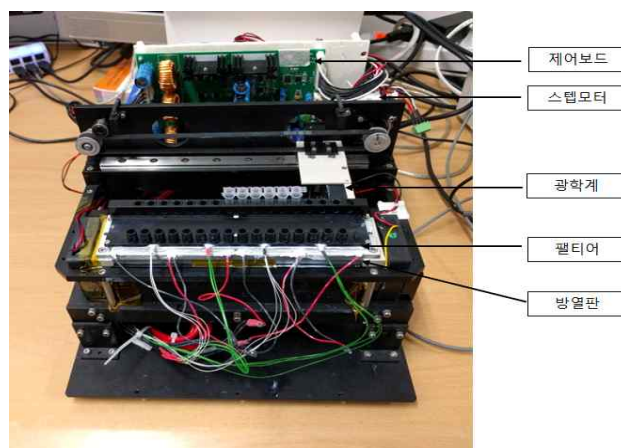


그림8. 히팅부 모듈 프로토타입 구조 및 명칭



### (3) PCR 히팅부 온도제어

- PCR 을 진행하는 주요 요인중 하나는 정밀한 온도제어이다. 온도를 주기적으로 상승, 하강 시키기 때문에 정밀한 온도제어가 동반되지 않으면 PCR이 정상적으로 진행되지 않는다. 히팅블럭에는 PT-100 센서가 부착되어 있으며, 센서에 의해 측정된 값을 이용하여 PWM pulse 폭을 조절하여 온도 제어를 하게 된다. 온도 제어를 하는 방법은 PID 제어 방식을 적용하였다. 온도 센서에서 측정된 값을 바탕으로 원하는 온도 프로파일을 생성할 수 있도록 P,I 및 D 의 gain 값을 조절하며, 정밀 온도 제어를 실행하였다.

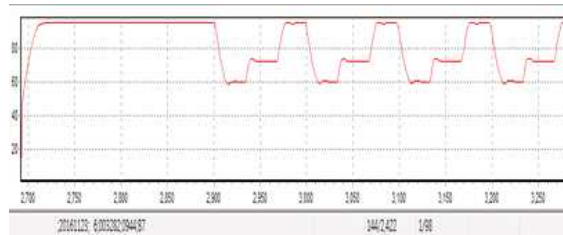


그림9. 히팅부 모듈 프로토타입의 온도 제어 프로파일  
(95도로 유지후 60도/72도/95도의 온도 사이클 반복)

### 나. 2차년도 세부 연구내용

#### (1) 화학적 유해물질 검사를 위한 포터블 잔류농약 측정기기 시제품 제작

- 1차년도에 제작한 분광계를 보완하고, 화학마커 분석기기 시제품 제작 및 시험을 진행하였다. 2차년도 상반기까지는 분광계를 이용한 과장대별 scan을 통한 분석방법과 특정과장대에서 측정하는 효소저해 측정방법의 원리를 비교하는 과정을 거쳐 효소저해법 방식을 적용하기로 하고, 샘플과 시료의 자동 혼합, 반응이 일어나는 Sequential Injection Analysis 방법을 식품의 화학적 유해물질 검사 방법의 최종 플랫폼으로 선정하였다.
- 아래의 사진은 2차년도에 제작한 분광계의 사진이다. 좌측에 큐벳타입의 시료를 장착할 수 있는 모듈과 우측은 LED 램프의 사진이다.



그림 10. 제작한 분광광학계

\* 아래는 LED 광원을 이용한 화학적 위해물질 검사 결과 및 LED광원의 특성이다.

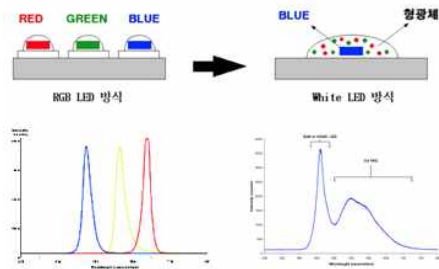


그림11. LED 광원의 특성

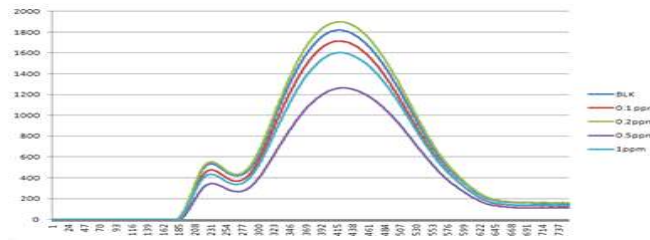


그림 12. LED 다이아지논 농도별 측정(412nm 최적 intensity를 찾음)

- 위와 같이 클로로피리포스에서는 특정 파장에서 농도별 편차를 조금 보였으나, 같은 방식으로 다이아지논을 테스트 했을 때 농도별 측정에서 전 파장대에서 차이가 나타나 분별력 판단 기준에 부합하기 때문에 LED 광원으로만의 테스트는 더 이상 진행하지 않았다. 그리고 이어서 최초 계획서 상에 언급했던 효소 저해 방법을 이용하여 잔류농약을 검사하기로 결정하였다. 시스템은 FIA(Flow Injection Analysis)법을 이용한 multivalve injection 과 효소 저해반응을 이용한 Sequential Injection Analysis method를 사용하기로 결정하였다. 그 내용은 아래와 같다.
- 효소저해법에 의한 잔류농약 측정원리는 효소를 반응액과 연속적으로 섞어주어 잔류농약인 살충제가 있는 경우에는 시간에 흐름에 따라 Absorbance가 줄어드는 경향을 나타나게 되는 원리이다. 반응 메카니즘은 다음과 같다.

### Pesticide Analysis

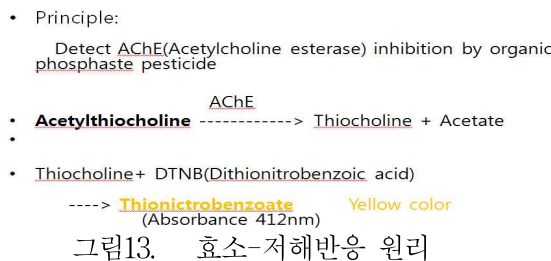
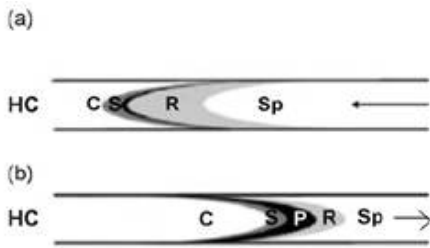


그림13. 효소-저해반응 원리

- 위의 반응처럼 유기인계살충제(잔류농약)의 경우에 아세틸콜린에스테라제를 효소로 사용하여 기질인 아세틸콜린의 반응으로 티오콜린이 생성되는데 이 티오콜린이 발색제 DTNB를 만나 Yellow color를 띠게 되는데 이를 412nm에서 측정할 수 있다. 여기서 유기인계 살충제는 아세틸콜린에스테라제를 농

도에 따라 효소반응을 저해하게 되는데 잔류농약의 농도가 높을 경우에 효소활성을 저해하여 티오펀린이 생성되는 것을 저해하게 되어 반비례로 yellow color의 정도가 작아지게 되는 것을 이용하여 유기인계 살충제를 측정하게 되는 원리이다.

- 즉, 이러한 방법을 잔류농약 속성검사라고 하는데 속성검사는 집파리의 머리에서 생산한 신경전달효소와 농산물에서 추출한 잔류농약의 유무를 판정하는 방법으로서, 효소가 50% 저해받았을 때 양성반응품으로 판정을 하고, 이를 정밀검사를 의뢰하고 있다. 일반적으로 농약은 사용목적과 화학적 성분에 따라 분류되고 있으나, 속성검사는 유기인계와 카바메이트계 살충제 농약을 검사한다.
- 여기에서 측정 기기는 FIA(Flow injection Analysis)기법의 원리를 기반으로 하고, 8-way Multivalve를 자체적으로 설계 제작하여 샘플과 시료의 자동주입 및 측정이 가능하도록 하였다.



C: Carrier, S: sample, R: reagent,  
Sp: spacer, P: product, HC: holding coil,

그림 14. FIA system의 holding coil 내부의 흐름도

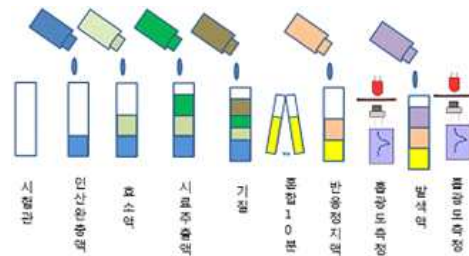


그림 15. 효소-저해법 시약의 구성 및 반응 schem

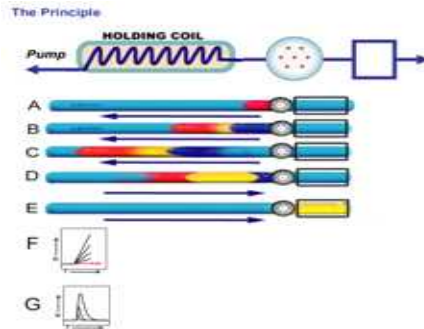


그림 16. 홀딩코일내부의 용액 섞임

- 위와같이 시약과 시료, product가 순차적으로 섞이고, 반응하며 생성이 가능한 FIA방식에서 Holding coil내부에서 분산 반응이 일어나는 것이다. Holding Coil은 일정한 온도가 유지되도록 히터와 온도센서가 설치되어 있으며, 효소반응이 정확히 일어나기 위해서 온도를 일정(37도)하게 유지하도록 하였다.
- 실제 시료를 사용하여 잔류농약을 측정 하기위해서 제2 협동기관인 한국 식품연구원에서 개발, 적용한 실제 샘플 전처리 과정을 구성하는 모듈을 아래와 같이 구성하였다. 전처리 내용을 간단히 요약하면 시료를 녹즙기를 사용 분쇄, 무게 or volume 측정, 거즈 2회 처리,

원심분리, SEP-PAK C18 column 안정화, 로딩 및 샘플 추출단계를 거치는 protocol이다.

- 한국 식품연구원에서 개발한 전처리 protocol을 바탕으로 비아이티밸류에서는 샘플의 전처리를 위해서 실험실에서 사용할 수 있는 Tool kit 플레이트를 제작하여 실험하는데 이용하였다.

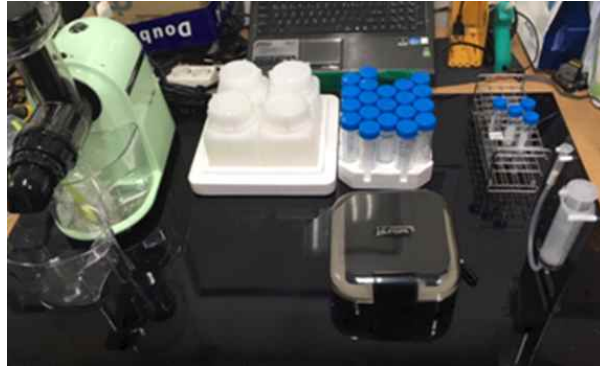


그림 17. 초기 전처리 모듈 플레이트  
(좌로부터 : 녹즙기, 시약통, 50mL tube, SEP-PAK C18 컬럼 및 주사기)

전처리를 위한 순차적 process는 다음과 같다.

- 1) 상추 200~500g 녹즙기사용 분쇄
- 2) 50ml 분주후 무게측정
- 3) 클로로포리포스, 다이아지논 스파이킹
- 4) 거즈2회처리 (45g)
- 5) SEP-PAK 처리(4~5mL)
- 6) 50mL 시린지이용 샘플 컬럼통과  
(컬럼안정화, 5mL Hexane, 2min 5ml 20% acetone in hexane, 2min 5ml 샘플)



그림18. 소형화된 시약 및 전처리 Kit tool kit box

- 아래 사진은 시료나 샘플을 자동으로 주입, 반응을 하지 않고, manual로 진행한 경우의 실험 사진이다. Manual 방식으로 실제 비아이티밸류 연구소에서 항온수조 및 시험관 반응을 하여 분광계로 측정, 잔류농약을 검사할 수 있음을 확인하였으나 현장에서는 manual로 시

약, 시료등을 섞거나 이동하는 작업을 하기에는 현실적으로 쉽지 않아서 multi valve를 자체적으로 설계, 제작 하였다.



그림 19. 초기 효소저해법 매뉴얼 방식 테스트 사진(자체 412nm)

- 아래의 그림은 국내에서 시중에 나와 있는 유일한 잔류농약 측정기인 네오젠사의 Optizen Mini의 사진이다. 효소저해법을 실험실 수준에서 직접 시험관에 매뉴얼로 테스트-반응을 모두 진행한후 최종 결과물만을 얻어서 end-point개념으로 잔류농약을 측정해보았다. Optizen Mini는 410nm 필터를 사용하여 그 흡광도를 측정한다. 소요되는 시간은 매뉴얼 반응에 약 1시간20분 정도가 걸리고 측정시간은 약 3분정도이다.



그림 20. Reference 장비 Optizen-mini (네오젠)

- 위의 데이터는 Reference 장비인 네오젠사의 Optizen Mini로 측정한 클로로피리포스의 농도 데이터 이다. 위의 결과로 봤을 때 410nm에서 흡광도 %T가 7.36~8.6 %로 차이가 있어 흡광도를 차이가 매뉴얼 데이터 보다 낮음을 알 수 가 있다. 또한 이 기기는 단순히 최종 반응결과물만을 측정하는 디텍터 개념의 장비로 검사를 위해서는 별도의 실험실 수분의 장비와 기기가 필요하기 때문에 현장 측정용으로는 적합하지 않다고 할 수 있고 본 과제의 개발로 제작되는 시스템이 이러한 문제를 극복 할 수 있기 때문에 현장 적용력과 제품 경쟁력이 우수하다고 말할 수 있겠다.

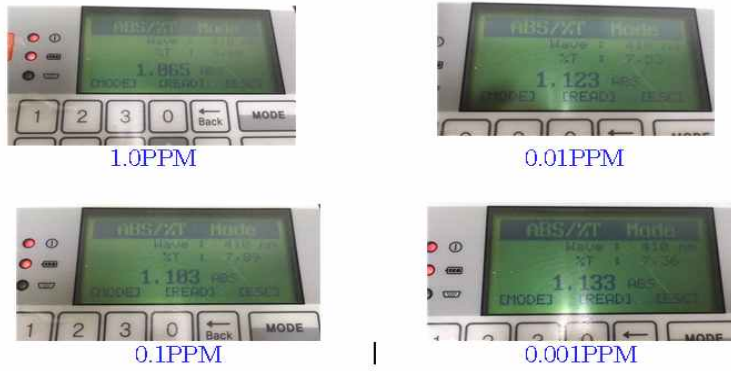


그림 21. 클로로피리포스의 네오젠 Optizen mini 결과 화면

• 잔류농약 시스템의 외관도

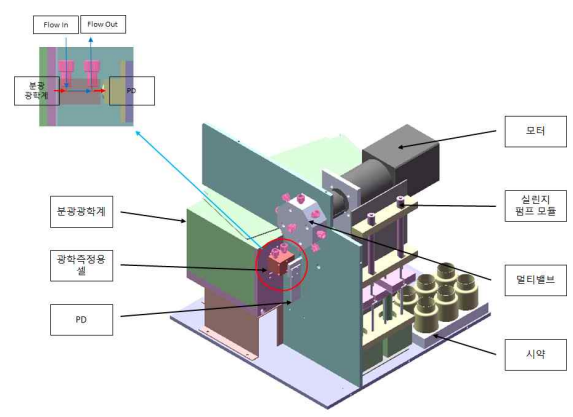


그림 22. 식품 잔류농약 측정 시스템의 외관도(3D)

• 본기관이 개발한 잔류 농약 측정시스템은 멀티밸브, 시약 주입을 위한 실린지 모듈, 분광 광학계등으로 구성되어있다. 멀티밸브는 모터와 커플링으로 축이 연결되어 있어서 모터의 회전에 의해 멀티밸브내의 유로가 변경되어진다. 분광 광학계는 광원을 분광하여 파장 별로 샘플에 조사 할 수 있게 되어 있다. 분광된 광원은 샘플을 조사하게 되고 조사된 빛을 PD 로 읽어서 결과를 분석할 수 있다. 실린지 모듈은 실린지 모터가 연결되어 있어서 모터의 이동에 따라 실린지를 이동하여 시약을 멀티밸브 안으로 주입할 수 있다.

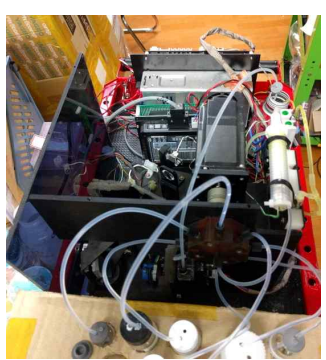


그림 23. 제작된 식품 잔류농약 측정 시스템

- 아래의 그림은 8way multi-valve는 초기에 아크릴로 제작하였는데 사용되는 용매와 잔류농약에 반응 용액에 의해 아크릴이 녹아서 석출되는 상황이 발생하여 valve 내부가 막히는 현상이 발생하여 8way valve의 재질을 Plexiglass로 변경하여 제작하였고, 그 결과 막히지 않음을 확인하였고, 잔류농약측정후 워싱과정이 필요한데, 워싱이 잘되고, 막히는 현상을 방지하기 위해 사용되는 튜빙의 직경도 0.8mm(ID)에서 1.6mm(ID)로 변경하여 막힘현상을 해결하였다.



그림 24. 제작된 식품 잔류농약 측정 시스템의 분광광학계 및 멀티밸브

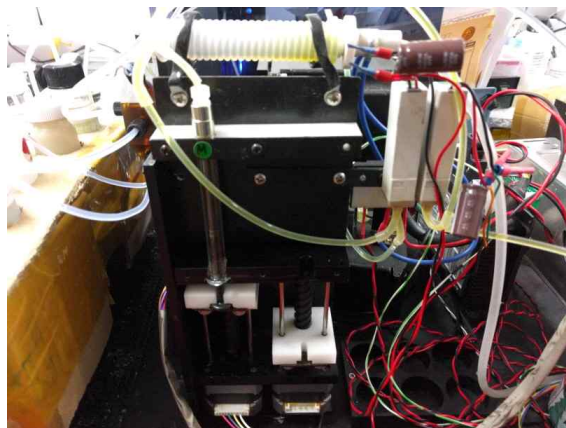


그림 25. 제작된 식품 잔류농약 측정 시스템의 실린지 모듈 및 홀딩코일

- 잔류농약 측정시스템의 멀티밸브는 모터를 이용하여 멀티밸브 내부의 구조물을 돌려 유로를 바꿔주는 역할을 한다. 잔류농약 측정을 위해서는 holding coil 내로 시약 및 샘플을 순차적으로 주입해주어야 하는데 이를 위해 설계된 것이 멀티밸브이다.
- 멀티밸브는 몸통 및 내부 구조물로 이루어져 있다. 몸통에는 시약 및 샘플과 연결된 8 포트의 inlet 과 holding coil 로 시약을 내보내는 1 포트의 outlet 으로 이루어져 있다. 내부 구조물은 모터와 커플링을 이용하여 연결이 되어 있어서, 모터회전에 따라서 내부 구조물이

같이 회전하게 된다. 내부 구조물에는 inlet 과 outlet을 연결하는 유로가 있으며, 이 유로는 내부 구조물의 회전에 따라 1포트의 inlet 만 열고 다른 7포트의 inlet 은 닫을 수 있다. 내부 구조물의 회전에 따라 포트들을 열고 닫으며 시약을 순차적으로 outlet 으로 내보낼 수 있게 하였다.

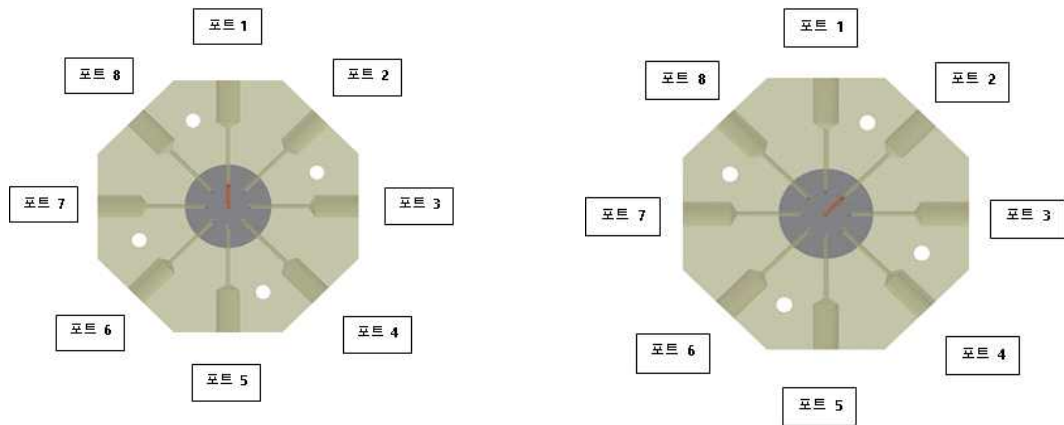


그림 26. 멀티 밸브의 구동 모습(파란색 : 내부구조물, 빨간색 : 내부구조물의 유로), outlet 과 inlet 1번 포트가 연결된 모습(좌), 내부구조물 45도 회전후 outlet 과 inlet 2번 포트가 연결된 모습(우)



그림 27. 제작된 식품 잔류농약 측정 시스템의 멀티 밸브(좌)와 유로를 바꿔주는 역할을 하는 내부 구조물

(2) 생물학적 위해물질 검사시스템 HW 개발 (RT-PCR)

2차년도에서는 RT-PCR의 경우 HW를 최적화한 임베디드 보드 및 이를 구동하기 위한 Firmware개발에 주력하였다. HW 구성은 전체 시스템 제어보드, 광학보드, 펠티어 제어보드로 구성되어지며, 각 보드별로 개발내용은 다음과 같다.

1) 시스템 제어보드

- 시스템 제어보드는 광학보드로부터 수신된 신호를 증폭 하는 광학신호 증폭부, 광학계를 이



동시킬수 있는 스텝모터 구동부, PC로부터 온도 및 증폭 주기를 입력할 수 있는 통신부, WELL의 온도를 측정할 수 있는 온도 측정부, 전원부, MCU MODULE로 구성 되어져 있다.

가. 광학신호 증폭부.

- 광학보드로부터 입력된 값은 OP-AMP를 이용한 증폭 회로를 통하여 증폭된다. OP-AMP에서 신호의 증폭률을 결정하는 저항 값을 Digital Potentiometer를 적용하였다. MCU의 I2C Interface를 통하여 Digital Potentiometer의 저항값을 제어함으로써 증폭도를 조정할 수 있도록 하였다.

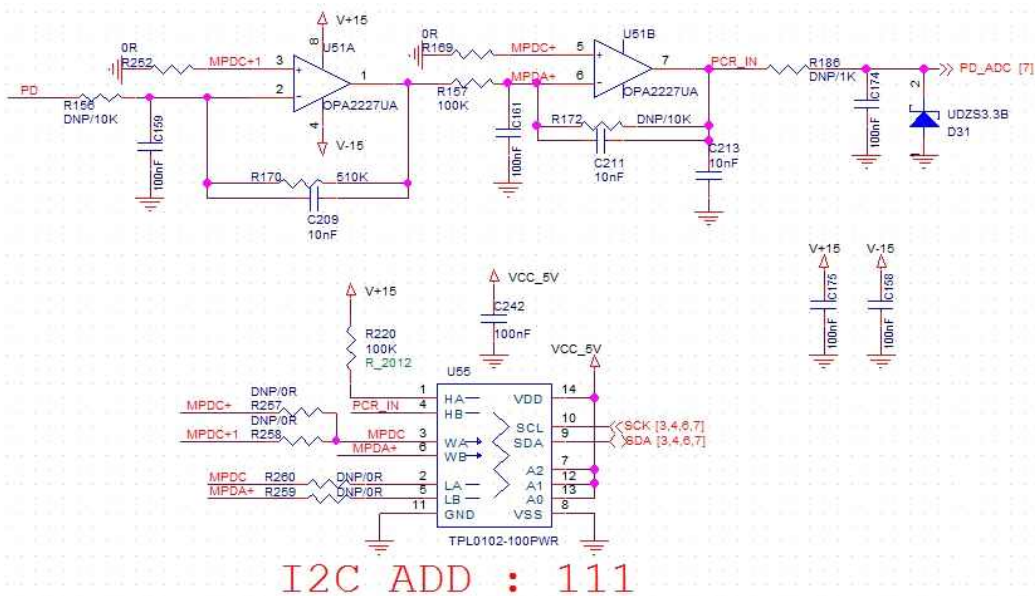


그림 28. 광학보드 회로도

나. 스텝모터 구동부.

- 모터 구동 부는 고정되어 있는 시료에 모터가 이동하여 광학 신호를 검출하는 구조로 설계 되어있다. 1열 16개 Well의 중앙부에서 1개의 광학 부 모듈이 1개의 모터에 의해 좌우로 구동하며 시료의 형광을 측정하는 방식이다. 모터는 정밀 제어에 적합한 스텝핑 모터가 적용 되었으며 모터 컨트롤러는 TI에서 공급하는 DRV8825를 적용하여 32micro step으로 정밀하게 모터를 구동 시킨다. 현재 적용된 제어 방법으로 1step당 0.0083mm 단위로 이동 거리를 제어 할 수 있도록 되어 있다.
- 모터를 구동하는 기본 신호는 MCU에 내장된 PWM Controller를 사용하여 구현 하였다. MCU 내부에서 PWM 주기를 조정하여 모터의 구동 속도를 제어 할 수 있고, PWM에서 Pulse 발생 시 인터럽트를 발생시켜 모터 구동을 위한 펄스 개수를 카운트하여 이동거리를 제한하는 방법으로 모터를 제어 하였다. 아울러 모터의 정역 제어는 적용한 DRV8825에서 제공하는 신호 선을 제어함으로써 구현 하였다.

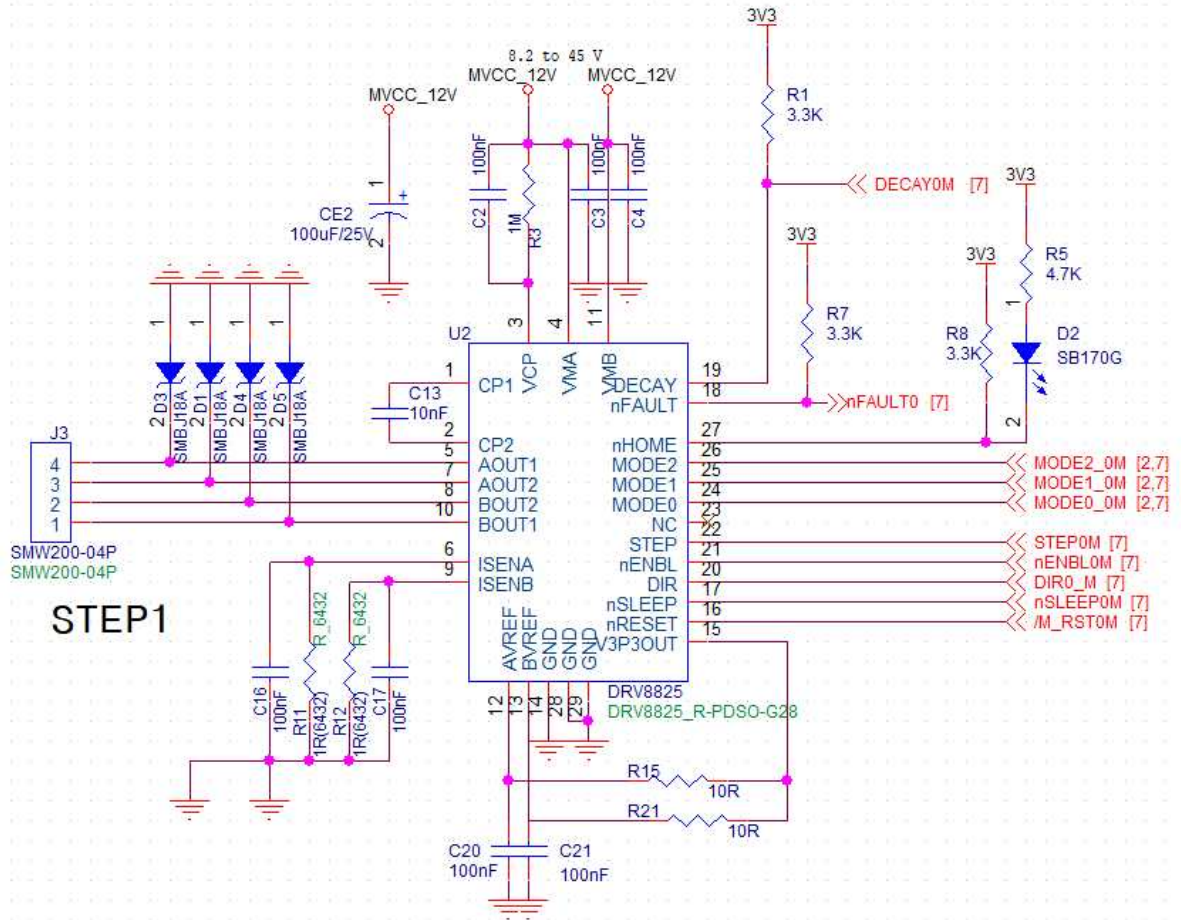


그림 29. 모터구동 회로도

다. RS-232 통신부.

- PC상의 UI를 통하여, 시약별 온도 설정 및 주기를 입력하여 장비를 구동시킬 수 있다.

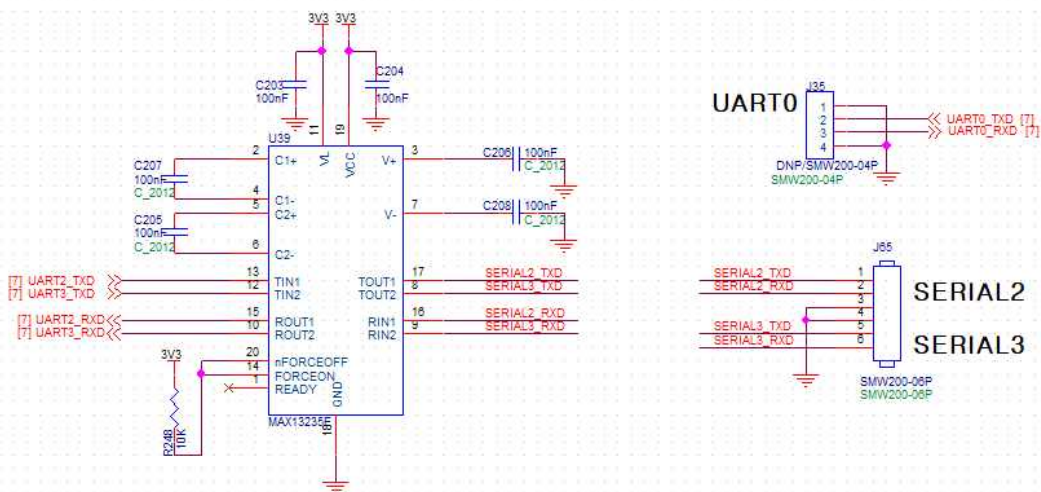


그림 30. 통신부 회로도

라. 온도 측정부.

- 적용된 온도 측정용 ADC는 정밀한 온도 측정을 위하여 16bit ADC를 별도로 사용하였다. TI의 ADC1148 A/D Converter는 16bit 분해능을 가지며 2개의 채널을 통해 Peltier 소자의 온도를 측정하여 수치화 하는 역할을 한다. 다만 적용할 MCU에 내장된 10bit A/D Converter로도 실험적으로 충분한 성능이 확인되면 내장 ADC를 사용한다.

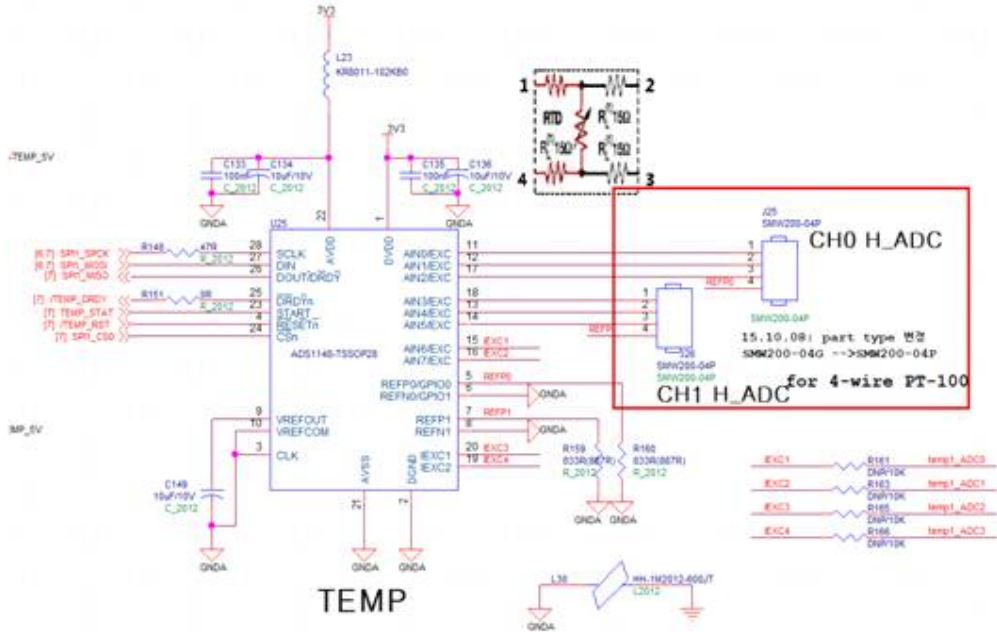


그림 31. 온도측정부 회로도

- 적용된 온도 Sensor는 PT-100 이며 Sensor의 응답 특성이 우수하며 일반적으로 널리 사용되는 온도 Sensor로 입수가 용이하고 정밀도가 높으며 내구성이 강한 장점이 있다. 또한 온도에 따른 저항 값이 다른 센서(NTC 등)에 비해 선형적이며 온도 계수가 크다는 장점도 있다. 스테인리스 재질의 외부 케이스가 씌워져 있는 제품이 일반적이나 외부 온도에 대한 응답 속도가 떨어지는 요인이 되므로 케이스가 적용되지 않은 소자 상태의 제품을 적용한다.



그림 32. PT-100 센서

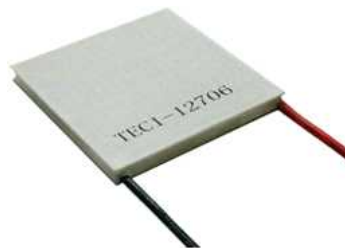


그림 33. Pelier

마. 전원부.

- SMPS로부터 DC 24V를 입력 받아 DC-DC CONVERTER를 이용하여 각 PART에 필요한 공급 전압인 3.3V, 5V, 12V, ±15V를 발생 시켜 준다.

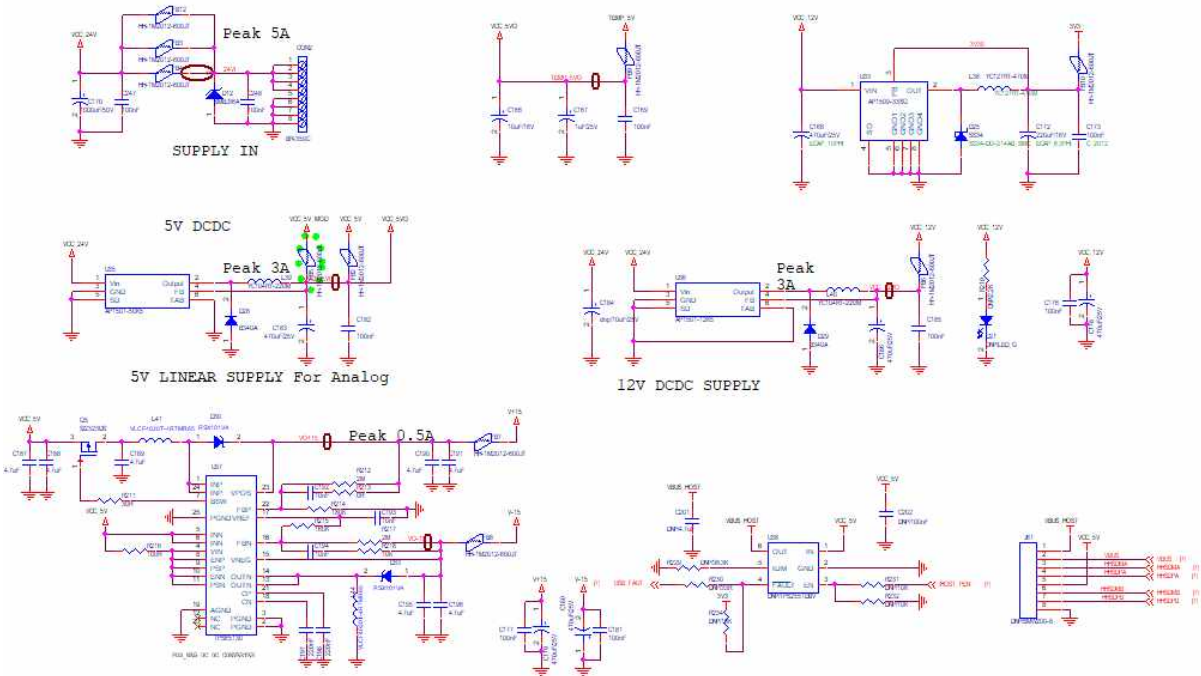


그림 34. 전원부 회로도

바. MCU MODULE.

- MCU는 기능에 따라 신호제어, 처리, 보존의 3부분으로 나뉜다.

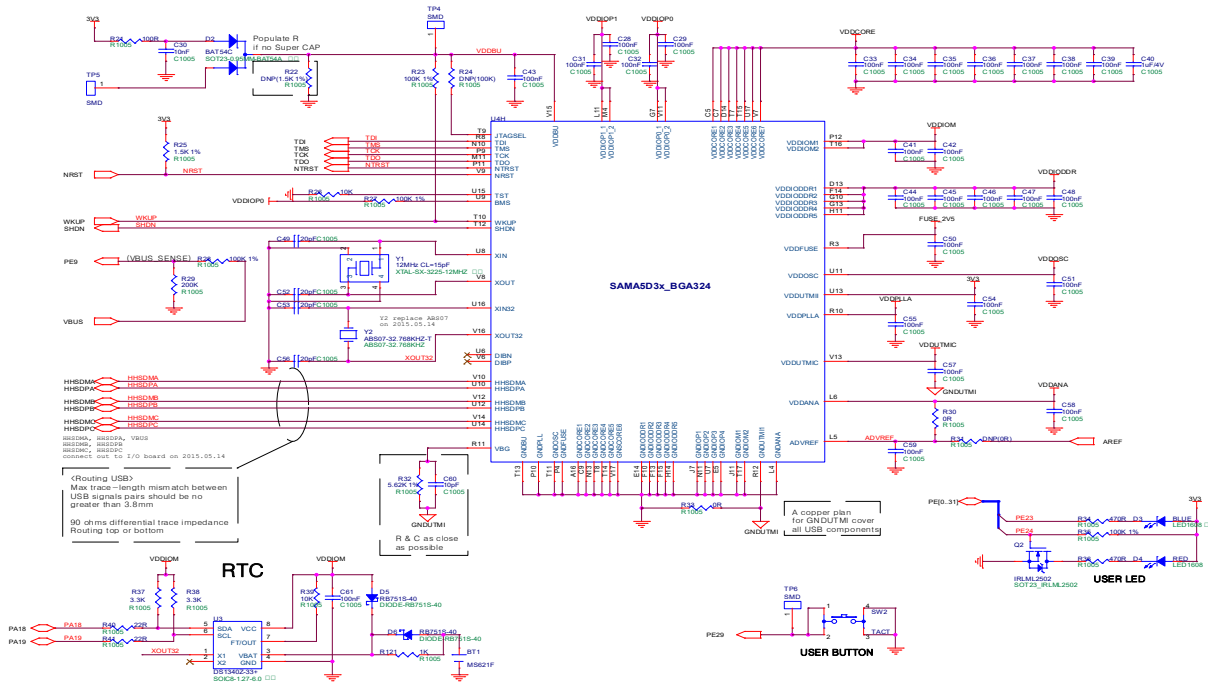


그림 35. 신호제어 중앙처리부 회로도

- 온도 변화량은 실시간으로 디지털 수치화과정을 거쳐 MCU 로 전송되며, 65°C, 72°C, 95°C 온도를 균일한 ±0.2 온도 편차 내에서 제어 되도록 펠티어와 FAN을 조절하는 역할을 한다. 매우 짧은 시간에 온도 데이터 값을 받고, 이 값에 알맞은 제어신호를 수 ms 이내에 온도 컨트롤러 쪽에 전달을 해야 하기 때문에 성능에 핵심을 담당하는 부분이라 할 수 있다.

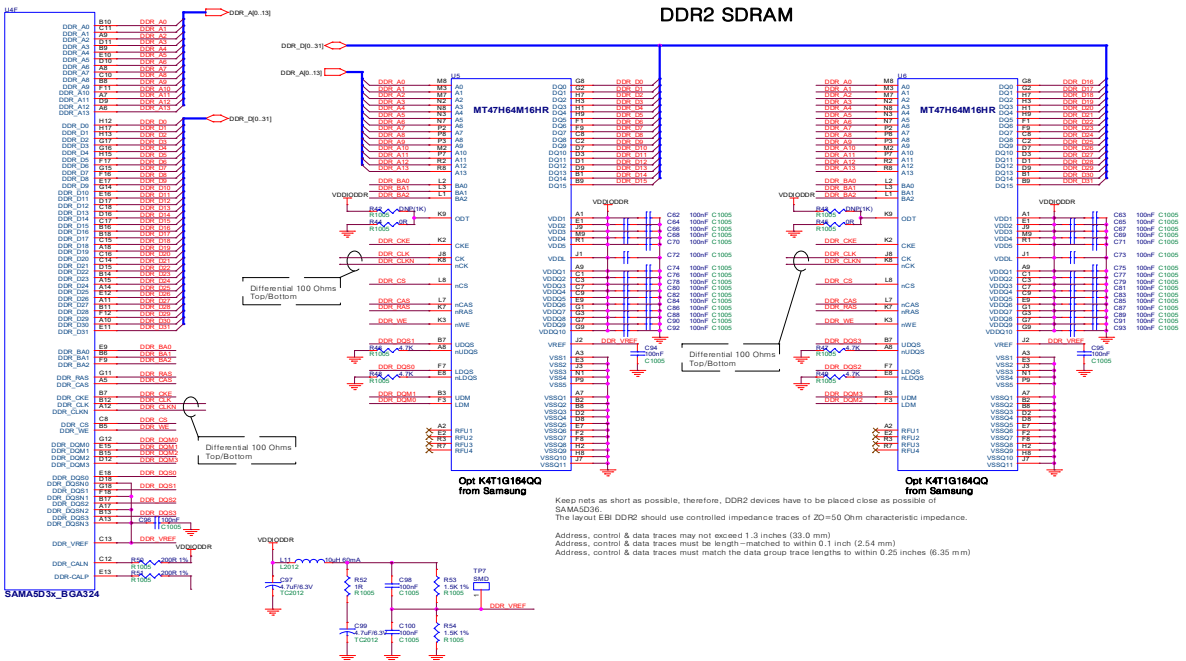


그림 36. DDR 신호 처리부

- 고속의 신호처리를 할 수 있도록 MCU와 고속 동기 신호를 받아 데이터를 처리하는 부분이다. 프로그램 플래쉬 및 자주 쓰는 프로그램을 상주시켜 고속 신호 처리가 가능하다.

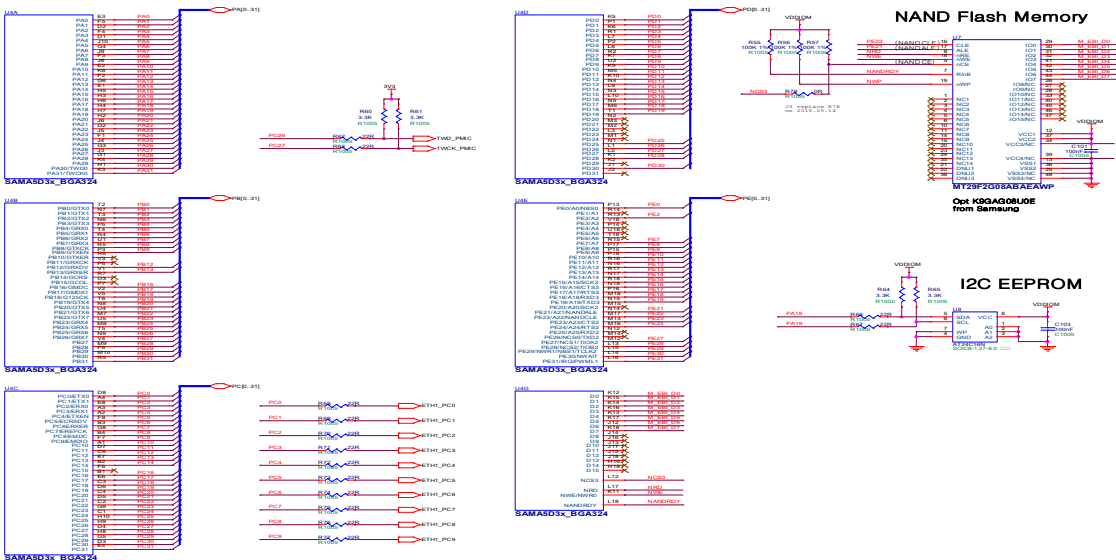


그림 37. 데이터 저장부 회로도

- 전원 OFF 후에도 구동 프로그램 보관하며, 변경된 데이터를 보호 저장하는 역할을 한다.

## 2) 광학보드

가. 광학신호 수신, 증폭부.

- 광모듈에서 조사된 LED 광에 반사된 시료의 형광광을 광학 필터를 통해 Photo Diode에서 수신한다. 광신호는 매우 미약하기 때문에 광학 증폭부에서 OP AMP를 통해 신호를 증폭하고 증폭된 신호를 MCU에서 ADC를 통해 검출 한다.

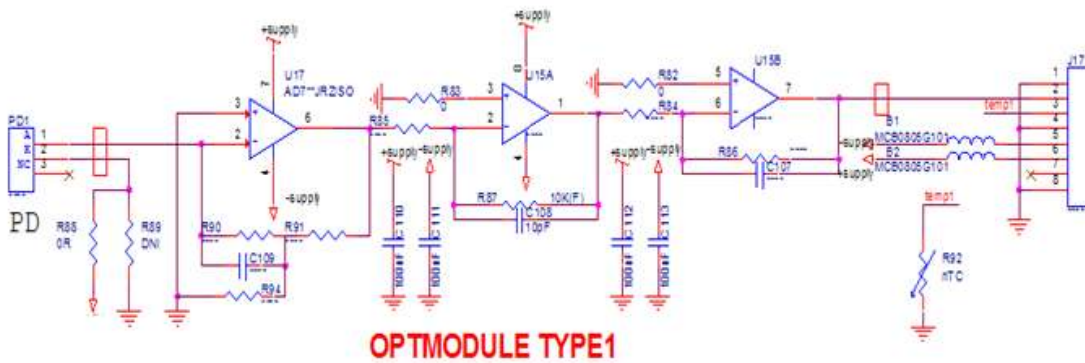


그림 38. 광학신호 수신, 증폭부 회로도

## 3) 펠티어 제어보드

가. 펠티어 제어부

- MCU에서 출력된 PWM 신호를 Half Bridge Driver IC를 통해 FET를 구동 시킨다. 이 회로 2개로 구성되어진 H-Bridge Driver Circuit을 이용하여 Peltier의 온도를 내리거나 올릴 수 있다.
- 장비에 적용된 펠티어 소자 개수는 모두 4개로 2개씩 pair로 처리하여 중앙부와 가장자리에 2개씩 배치한다. 구조상 중앙부와 가장자리의 온도 편차가 발생하므로 각각의 부분에 온도 제어량을 달리해야 시약에 전달되는 열이 전체적으로 균일하게 될 수 있다.
- Peltier 소자 개별적으로 가지는 특성의 편차와 적용된 온도 센서(PT-100)가 가지는 개별 온도 특성편차는 제어되는 온도에 영향을 주는 원인이 된다. Peltier 소자는 제어량을 달리 함으로써 특성 편차를 줄일 수 있으며 기본적으로 적용되는 온도 센서가 해당 온도에서 정확한 값을 취득할 수 있어야 한다. 이를 위하여 온도 센서의 calibration을 적용하였다.

## 4) 상판히터 제어부

- 튜브상단에 시료의 증발을 방지하는 목적으로 히터를 장착하였다.

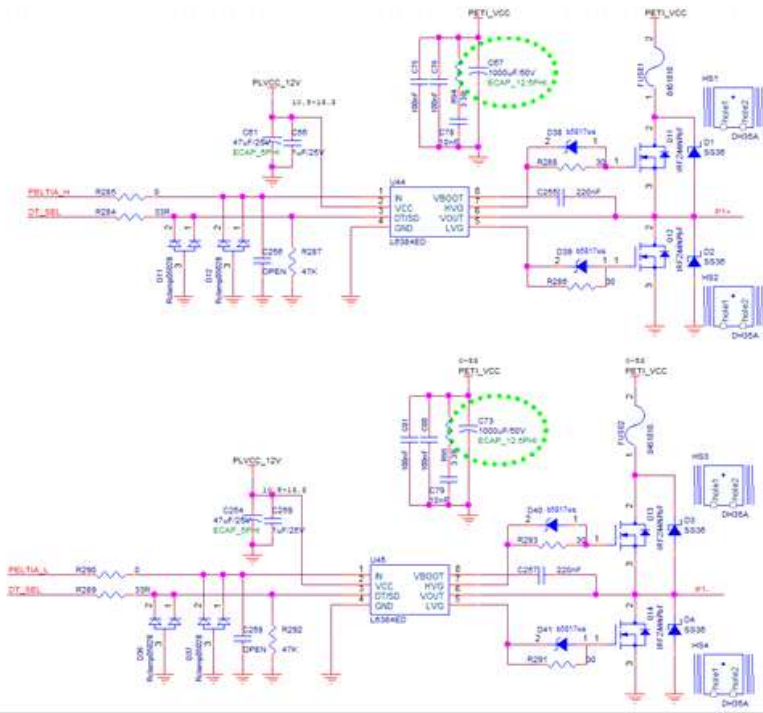


그림 39. 상판히터 제어부 회로도

메인보드에서 on/off신호로 SSR에 신호를 주면 PCB 패턴으로 구성된 히터의 온도를 108도 까지 제어 한다. NTC 소자 2개를 PCB 히터 표면에 장착하여 온도를 측정, 메인보드의 CPU로 전압레벨로 전달 한다. CPU에서는 전달받은 전압을 온도 수치로 환산 하여, 온도가 일정 하도록 제어 한다.

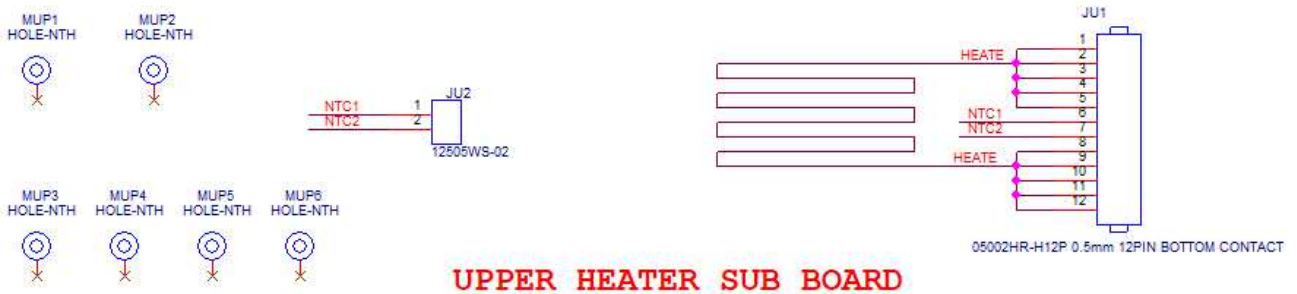


그림 40. 상판 히터제어부 부분도

### 5) 온도 제어 방식 (PID 제어)

- 설정된 온도로 항온을 유지하기 위해서 온도 컨트롤러는 지속적으로 온도 센서(PT-100)를 통해 온도를 측정하고 측정된 온도 값에 따라 펠티어 소자에 가해지는 전류량을 조절함으로써 항온조의 온도를 유지 하도록 한다. 이러한 피드백 제어 방식에 손쉽고 효율성이 높은 PID제어 방식을 채택하였으며 설정된 목표 온도 값에 빠르고 유연하게 도달하여 지속적으로 일정한 온도를 유지 하도록 하는데 있어서 적절한 방법이라 할 수 있다.

## UPPER HEATER IF BOARD

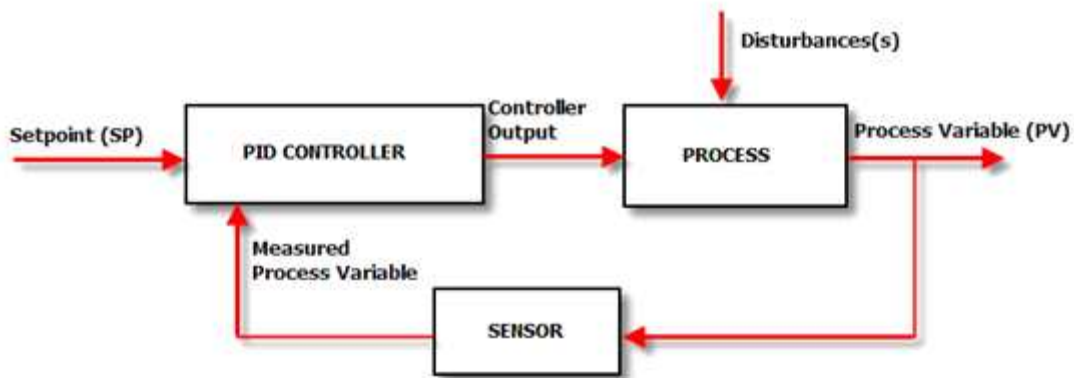
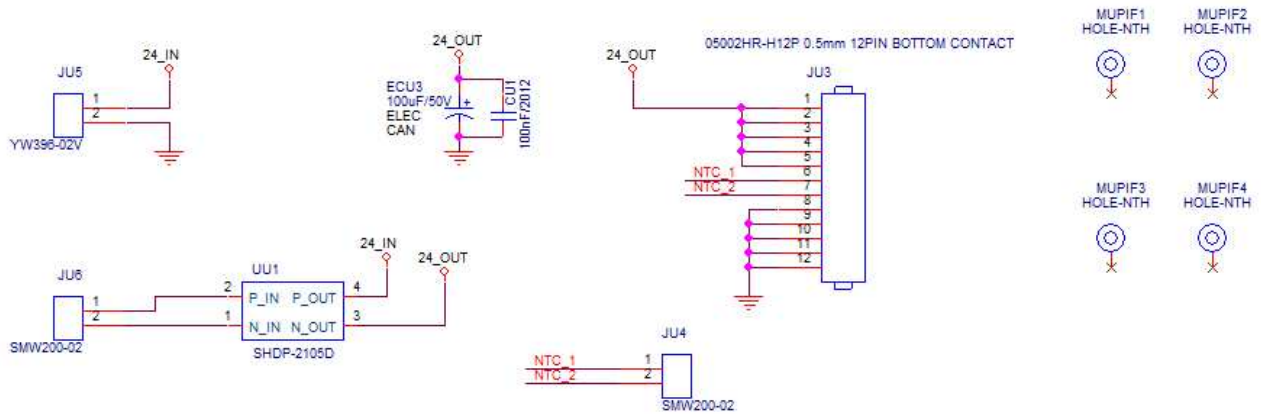


그림 41. PID 제어 회로도 및 흐름도

- 위의 그림에서와 같이 Set point에서 먼저 목표하는 온도 값을 Setting 한다. Process부에서는 최초의 초기화 된 값으로 Peltier 소자를 제어하기 시작하고 동시에 센서는 Peltier 소자에 의해 제어된 항온조의 온도를 측정하여 PID Controller부에 전달한다. PID Controller는 센서로부터 전달 받은 온도 값을 제어 알고리즘을 통해 적절한 제어 값을 산출하게 되고 그 값은 Peltier 소자를 제어하기 위한 PWM값으로 적절히 변화되어 Peltier 소자에 흐르는 전류량을 제어 하도록 되어 있다. 센서를 통해 주기적으로 측정된 항온조의 온도를 PID Controller에 Loop Back 시켜 차기 제어 량을 조정하도록 구성된다. 원리는 비교적 간단한 방법이지만 제어하려는 제어 대상의 응답 속도 등 시스템의 특성과 기구적인 구조에 따라 알고리즘이 튜닝 되어야 하며 튜닝에 따라 온도 제어 품질을 향상 시킬 수 있다.



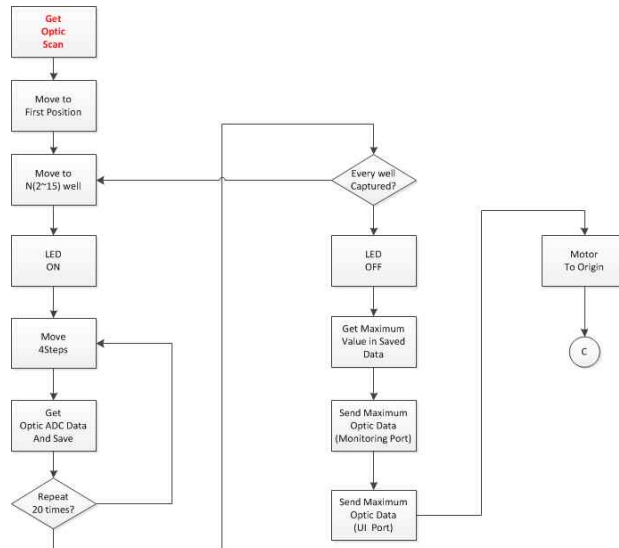


그림 42. 형광 데이터 취득 과정 flow-chart.

- RT-PCR의 모듈은 아래의 사진으로 나타내었다.



그림 43. GenScan PCR

- 프로토 타입 테스트 결과

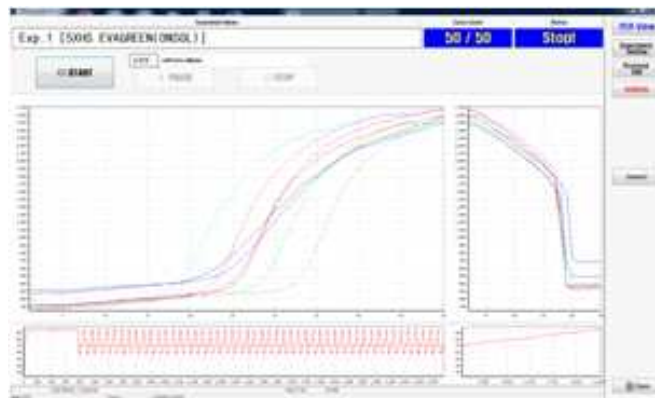


그림 44. RT-PCR 테스트

- Program User Interface는 아래와 같다. 2차년도에 1차 UI 가 개발되었다. (3차년도에 Upgrade Ver.을 개발하였음) 분석 프로그램을 upgrade 하는 작업에 있다.

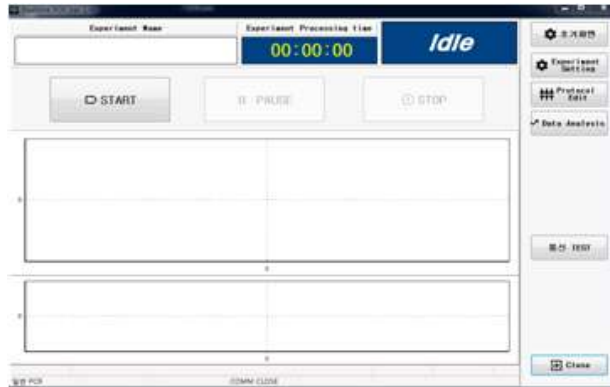


그림 45. 초기 화면 (default)-1차Ver.

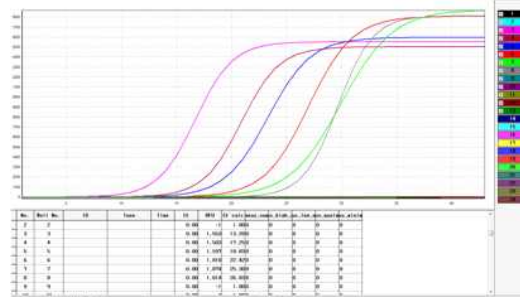


그림 46. Result 화면 (Ct 값 계산)

(3) 생물학적 유해물질 검사를 위해 농축용칩과 연계한 통합형 측정 기기의 프로토타입을 설계, 제작하였고, 주요 개발내용은 다음과 같다.

- 농축, 추출 및 PCR 과정의 개별 시스템 구현 및 최적화
- 개별 구현된 시스템을 통합한 시스템의 설계, 제작
- 농축, 추출 및 PCR 시스템은 농축용 플루이드 칩과 연계하여 샘플+마그네틱비드의 로딩을 하여 설계된 위치의 마그네틱을 이용, 포집된 샘플 바인딩 마그네틱 비드를 칩상에서 시스템의 히팅 구조를 통한 시료의 농축과 추출을 거쳐 시스템에 포함된 PCR 모듈을 사용하여 유전자 증폭결과를 얻어냄이 그 목적이 있다. 이를 위해서 농축, 추출 시스템, PCR 시스템을 모듈화하여 향후에 제품화에 역점을 두고 설계 제작 하였다. 자세히 말하면 미세유동칩에 샘플을 주입하여 농축 및 추출 과정을 수행하고, 이를 옮긴 후 시약을 주입하여 DNA 를 washing 등의 과정을 수행한 후 PCR을 하여 결과를 분석하게 된다. 통합된 시스템은 각 개별 시스템을 구현한 후 시약분주방식을

적용하여 통합된 시스템으로 개발, 제작을 설계 하였다.

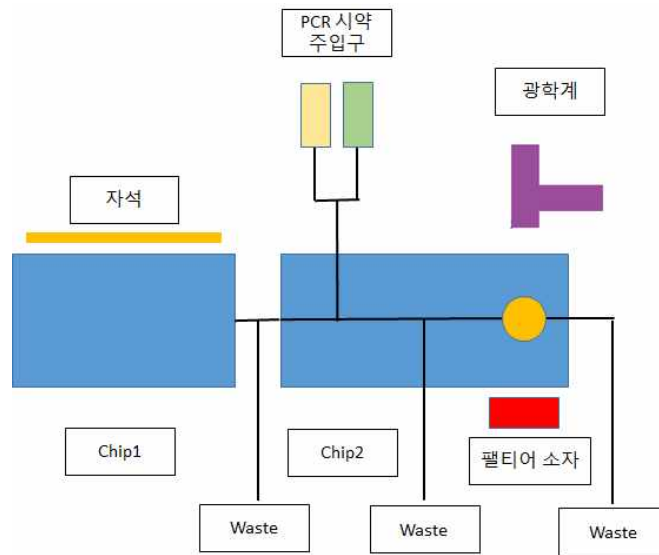


그림 47. 1차 설계의 시스템 개략도

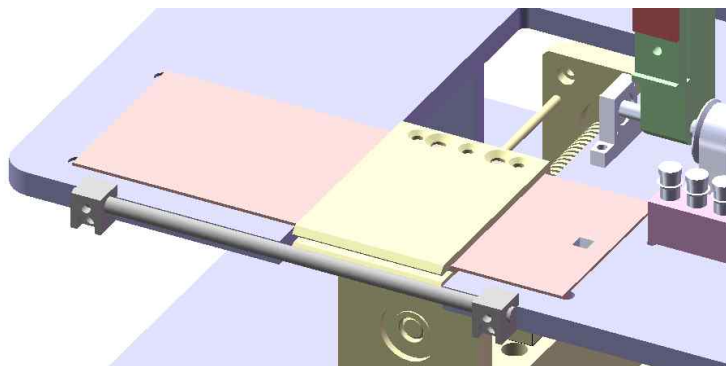


그림 48. chip 장착 부 3D 도면

- 농축, 추출용 미세유체칩을 이용하여 샘플을 농축하는 시스템에서는 실린지 펌프를 이용하여 칩내부로 샘플을 일정속도로 주입해야 한다. 모터의 속도를 조절하여 분당 주입량 및 속도를 제어할 수 있게 하고 연세대에서 사전테스트한 결과와 같을 수 있도록 제어하게끔 User Interface를 개발하여 조절을 할 수 있게 하는 프로그램 작업을 2, 3차년도에 최종으로 작업을 하였다. 자석은 스텝모터에 연결되어 있어서 스텝모터 동작에 의해 샘플과 마그네틱 비드의 결합 및 농축을 위해서 미세유체칩과 결합/분리가 가능하게 설계 하였다. 즉, 마그네틱 비드와 반응한 샘플은 자석이 결합된 상태에서 미세유체칩 내부에 농축이 되고, 자석을 분리하면 농축된 샘플을 얻을 수 있다. 농축된 샘플은 장비의 히팅부가 전동으로 내려와서 칩의 챔버 부분을 95도 이상의 온도로 가열하여 농축된 샘플(박테리아 등)을 lysis 하여 PCR이 가능하도록 하였다.

다. 3차년도 세부 연구내용

1) 화학적 유해물질(잔류농약 중심) 유해인자 분석 시스템 프로토타입, 제품 설계 및 제작

1. 기구부 설계 및 제작 내용

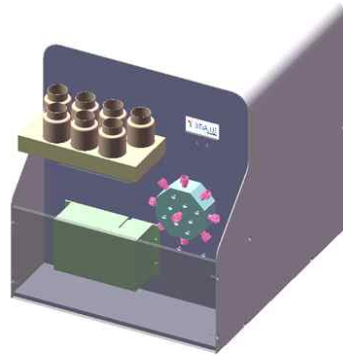


그림 49. 잔류농약 측정 시스템의 상품화 모델 외관도

- 3차년도에서는 2차년도에 제작한 잔류농약 측정 시스템을 개선하여 상품화 모델을 개발하였다. 멀티밸브, 홀딩코일, 광학계등의 위치를 조정하였고, 분광계를 대신하여 LED, PD를 사용한 광학계를 적용하였다. 광학계는 외부 광원을 차단하기 위하여 외부광원 가림막을 설치하였고, 후면에 위치하던 홀딩코일을 전면으로 배치하여 실험이 진행되는 것을 육안으로 쉽게 확인할 수 있게 하였다. 내부 보드 및 하드웨어의 배치를 최적화하여 사이즈를 최소화 하였으며, 멀티밸브의 유지 보수를 용이하게 하기 위하여 조립 방법을 개선하였다.

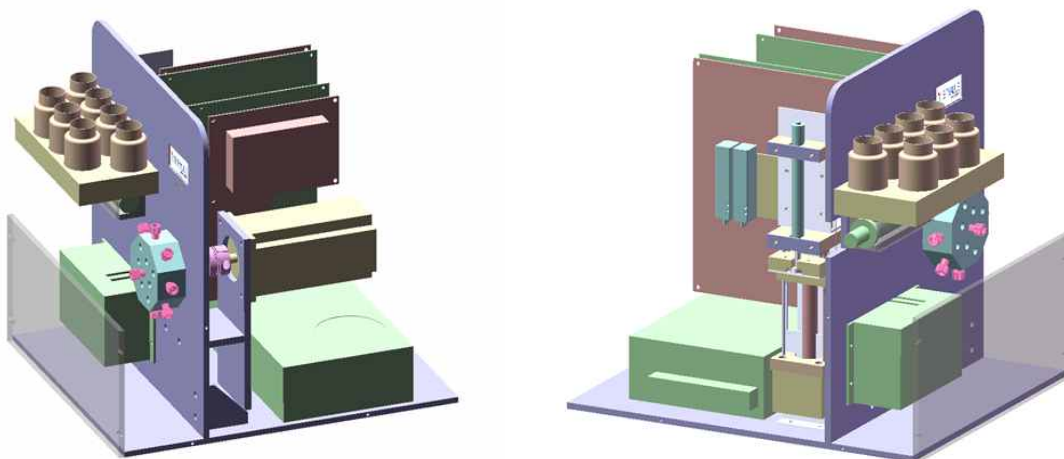


그림 50. 잔류농약 측정 시스템의 상품화 모델 외관도

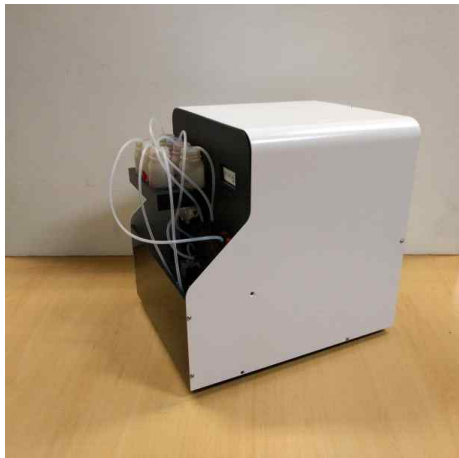
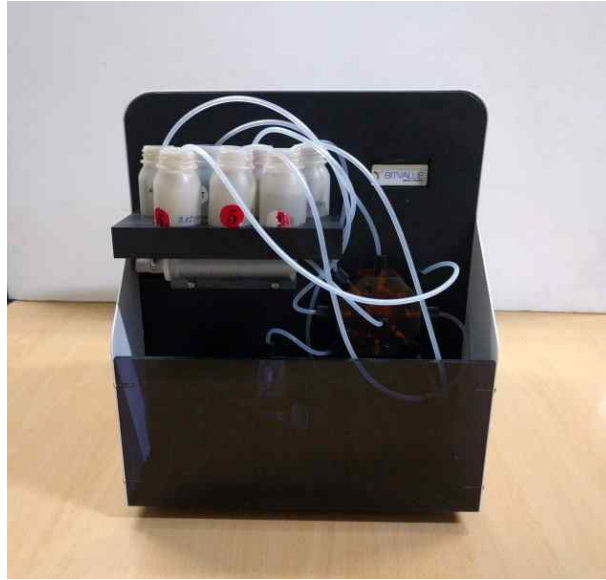


그림 51. 제작된 잔류농약 측정 시스템의 상품화 모델

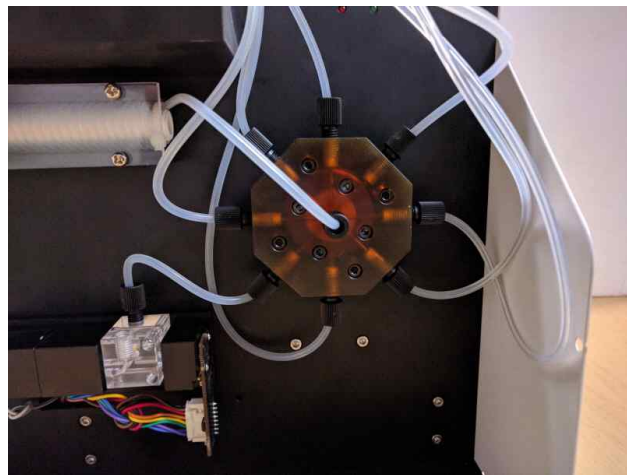


그림 52. 제작된 잔류농약 측정 시스템 상품화 모델의 멀티밸브

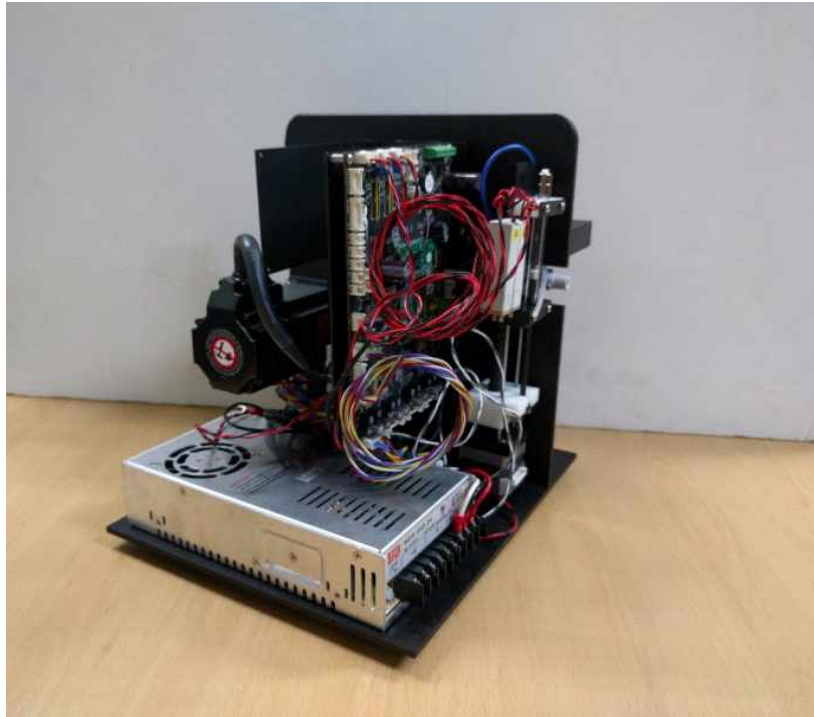


그림 53. 기기 내부의 진장부  
 제작된 잔류농약 측정 시스템 상품화 모델의 내부구조

- 3차년도의 잔류농약 측정 시스템의 상품화 모델에서는 염가화 및 선정된 플랫폼을 적용하여 분광광학계를 대신하여 LED, PD를 사용한 광학계를 적용하였다. LED의 광원은 렌즈 및 필터를 통과하여 반응 셀에 조사되며, 반응 셀을 통과한 빛은 렌즈를 통과하여 PD에 도달하게 된다.

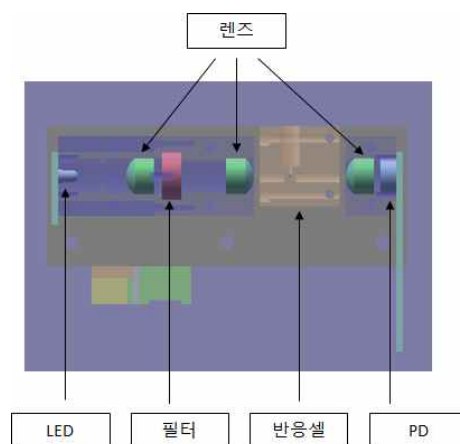


그림 54. 잔류농약 측정 시스템의 광학계 구성도

- 아래의 사진은 3차년도에 제작된 상용화용 잔류농약 측정 시스템의 광학부 사진이다.



그림 55. 제작된 잔류농약 측정 시스템의 광학부

## 2. 잔류농약 측정기기의 S/W 개발내용

### 1) 메인화면

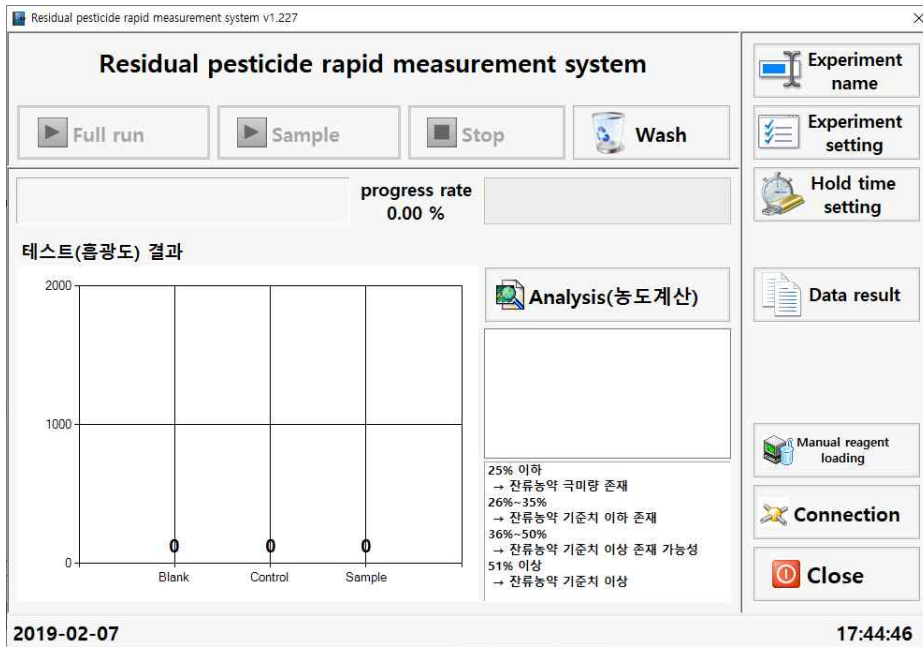


그림 56. Main 화면

한가지 화면에 샘플Run, Stop, Wash 및 실험 setting, data result, Manual loading 의 설정을 다 할 수가 있음.

### 2) 잔류농약 기기에 연결하는 화면(Connection 버튼)

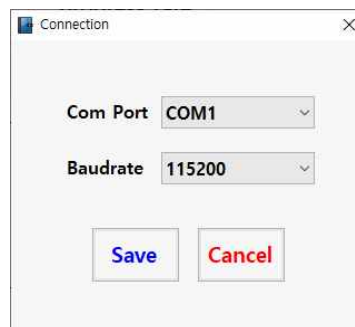


그림 57. Connection 창  
RS-232 port가 설정되어있음.



3) 실험명 입력하는 화면(Experiment name 버튼)



그림 58. Experiment name 창  
실험자, 실험명, 샘플명 기입 가능

4) 시료 입력량을 세팅하는 화면(Experiment setting 버튼)

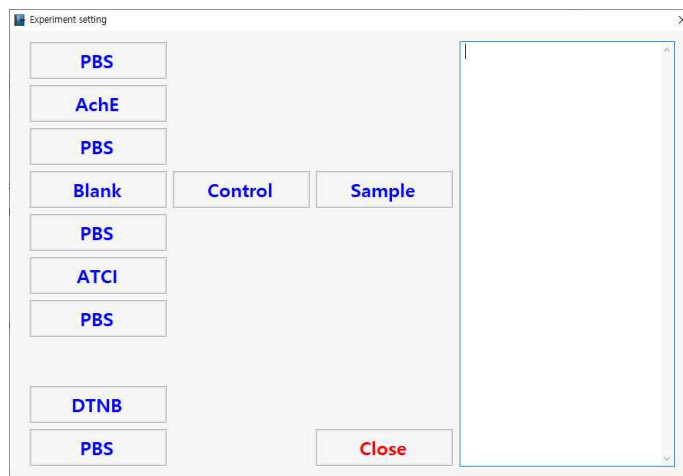


그림 59. Experiment setting 창  
효소-저해 시약의 시약별 주입농도 설정

5) Experiment setting 서브 화면(각각의 시료를 세팅하는 화면)



그림 60. Sub 화면- 각각의 용액 주입량 입력

6) 대기시간 설정화면(Hold time setting 버튼)

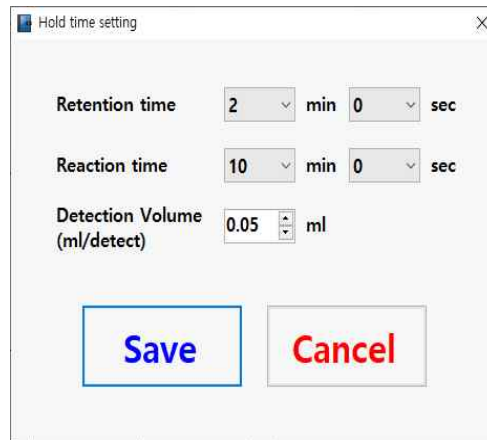


그림 61. Holding time setting 창  
홀딩타임(37도 가온시간 설정) 및 detection volume 설정

7) 수동 입력 화면(Manual reagent loading 버튼)

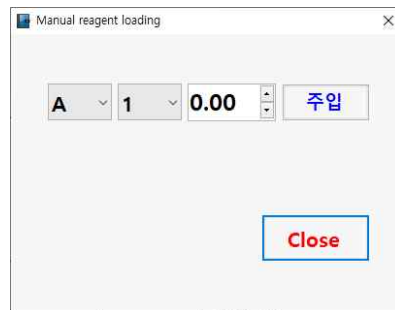


그림 62. Manual 입력 창  
수동입력(시약)-Air 방지 method

8) 저장된 실험결과를 보는 화면(Data result 버튼)

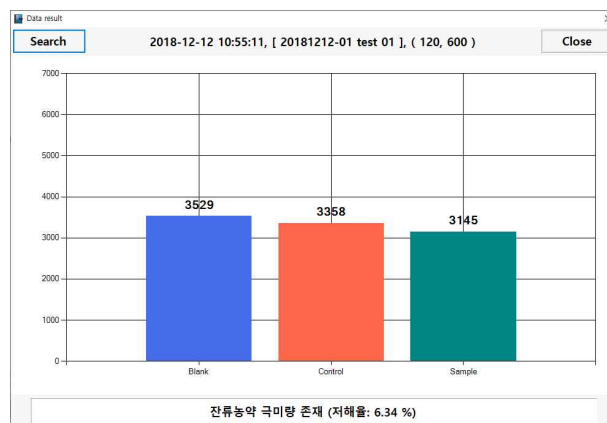


그림 63. Data result 화면.  
실험 데이터를 그래프로 표현

9) 저장된 결과를 검색하는 화면(Data result 서브화면)

Test date	Test name	Contents	Blank	Control	Sample
2018-12-12 14:08:57	20181212-01 New 001 0.01		3216	3088	2988
2018-12-12 12:26:29	20181212-01 test 02		3284	3277	3221
2018-12-12 10:55:11	20181212-01 test 01		3529	3358	3145
2018-11-07 16:01:53	20181107 PBS All Test 03		6945	6478	6648
2018-11-07 13:58:07	20181107 PBS All Test 02		9035	8000	7490
2018-11-07 12:29:24	20181107 PBS All Test 01		9310	9306	9020
2018-11-06 15:36:00	20181106 PBS All Test 02		9460	9458	9237
2018-11-06 14:13:11	20181106 PBS All Test 01		9296	9286	9155
2018-11-05 15:47:30	20181105-02 New 0.001ppm		4306	3597	2730
2018-11-05 15:11:04	20181105-01 New 10.0ppm		4188	3824	2580
2018-11-05 14:38:13	20181105-01 New 1.0ppm		4188	3824	2720
2018-11-05 13:34:40	20181105-01 New 0.1ppm		4188	3824	2877
2018-11-05 12:27:56	20181105-01 New 0.01ppm		4188	3824	3055
2018-11-05 10:55:01	20181105-01 New 0.001ppm		4188	3824	3152
2018-10-24 16:20:35	20181024-01 New 10.0ppm		4727	4577	2813
2018-10-24 15:10:25	20181024-01 New 1.0ppm		4727	4577	3218
2018-10-24 14:30:19	20181024-01 New 0.1ppm		4727	4577	3520
2018-10-24 13:33:20	20181024-01 New 0.01ppm		4727	4577	3864
2018-10-24 11:16:45	20181024-01 New 0.001ppm		4727	4577	4420
2018-10-23 15:56:50	20181023-01 New 10.0ppm		4887	4537	1732
2018-10-23 14:42:21	20181023-01 New 1.0ppm		4887	4537	2032
2018-10-23 13:29:27	20181023-01 New 0.1ppm		4887	4537	2602

그림 64. Raw data 화면

3. F/W 개발내용

1) 시스템 control Protocol

- 시스템에 적용된 모든 구성 요소인 멀티밸브, 실린지 펌프, 솔레노이드밸브, 광학부, 온도 설정 및 제어 등에 관련된 기능은 모두 시리얼포트를 통해 제어될 수 있도록 control protocol에 맞추어 F/W가 설계되어 있다. 따라서 원하는 속도와 펄스로 모터를 제어하고, 멀티밸브의 경로를 제어하는 것은 물론 각각의 솔레노이드 밸브, 광학신호 읽기, 온도 설정 등 장비 운용에 필요한 기본적인 동작이 모두 protocol에 의해 설정되고 동작 가능하다. 미리 설정하여 F/W 레벨에서 검증된 동작에 관련된 command들을 조합하여 UI에서 세밀하게 장비를 구동할 수 있도록 하였다.

command	동작	비고
@S0	8way valve 원점 이동(1번 위치)	valve 위치는 1~8까지 입력 가능
@S1	8way valve 1번 위치로 이동	모든 valve는 고정 위치값을 가짐
@S8	8way valve 8번 위치로 이동	
@L10	1번 솔레노이드 off	'L' 바로 뒤 숫자가 솔레노이드 번호
@L11	1번 솔레노이드 on	그 다음 숫자는 on/off 를 나타냄
@L20	2번 솔레노이드 off	솔레노이드 on 시 해당 솔레노이드를
@L21	2번 솔레노이드 on	통해 시약을 흐르게 할 수 있음
@M0000	실린지 원점으로 이동	절대 좌표로 0에서 4000까지 입력 가능
@M4000	실린지 4000 위치로 이동	현재 위치와 같은 값이 입력되거나 입력 범위를 넘어서는 경우 beep 울림
@O	모터를 움직여 분광값을 측정	측정 data는 serial port로 전송됨
@H0	Heater off	히터 온도는 고정값으로 유지 (37도)
@H1	Heater on	on/off만 시킬수 있음
@P9	Motor Speed	1~9, 기준 속도 10,000~50,000, 5,000 단위
@E	분광기 프리즘 초기 위치 설정	초기치 1720으로 설정. 'E'로 재설정 가능
@G	광학부 gain 설정	초기치 178로 설정. 'G'로 재설정 가능
@Z000	Heater 온도 설정(10~50도 한정)	초기치 42.0도로 설정. 'Z'로 재설정 가능
@P	Motor Speed 설정	10000~65000으로 설정 가능. 클수록 저속
@A,B,C,D	AutoSet~AutoSet4	정의된 autoset값으로 구동

표 1. Control Command

## 2) 모터 제어(실린지 펌프)

- 측정에 투입되는 시료는 멀티밸브를 통해 경로가 설정되고 실린지 펌프를 통해 주입된다. 따라서 실린지 펌프는 시료의 주입 속도와 주입량이 매우 세밀하게 제어될 수 있어야 한다. 실린지 펌프를 제어하기 위해 정밀 제어에 적합한 스테핑 모터가 적용되었고 마이크로스텝 기능이 포함된 모터 드라이버 DRV8825를 적용하여 32micro step으로 정밀하게 모터를 구동할 수 있도록 하였다. 모터를 구동하는 기본 신호는 MCU에 내장된 PWM Controller를 사용하여 구현 하였으며 PWM 주파수에 의해 모터 구동 속도가 결정되고 스텝수에 의해 모터 구동량이 결정된다. PWM으로 모터 구동 신호 발생 시 MCU 내부의 PWM controller에서는 매 한 개의 Pulse가 발생할 때마다 인터럽트를 발생시키며 인터럽트 발생 횟수를 카운트함으로써 모터 구동을 위한 펄스 개수를 제어할 수 있다.
- 실린지 펌프를 제어하기 위해 초기에 원점을 검출하여 초기 위치를 설정할 수 있도록 하였다. 모터 원점 검출 제어 신호를 통해 실린지 펌프 원점이 검출되면 그 때의 위치를 절대 좌표 0으로 설정하여 이후 모터 이동 제어 시 절대 좌표를 통하여 실린지 펌프를 이동시킬 수 있다. 원점 검출 시 모터의 구동 속도를 저속으로 세팅하고 한 스텝씩 미세하게 이동시켜 센서에서 검출이 되는 순간 인터럽트를 발생 시켜 모터가 즉시 멈추도록 하여 원점 검출이 정확히 되도록 하였다.

## 3) 멀티밸브 컨트롤

- 멀티밸브를 컨트롤 하기 위해서 별도의 MCU를 사용하였다. 사용된 모터는 엔코더가 내장된 모터 컨트롤러와 드라이버가 함께 적용되어 있다. 내장된 엔코더의 신호는 MCU에서 인터럽트로 매 펄스마다 검출하여 밸브 동작 시 비정상적인 동작을 검출할 수 있도록 되어 있다. 멀티밸브의 스테핑모터는 MCU에서 control되며 Main으로부터 수신 받은 command를 통해 해당 경로로 밸브를 조정할 수 있도록 하였다.
- 전원 투입 후 멀티밸브 초기화시 원점을 검출하여 초기 위치를 설정할 수 있도록 하였다. 초기 위치를 기준으로 8개의 밸브 위치에 고유 번호를 부여하고 User Interface에서 원하는 밸브의 경로로 시료가 흐를 수 있도록 하였다. 원점 검출 시 모터를 저속으로 구동 시키고 한 스텝씩 미세하게 이동하면서 센서에서 센싱이 되는 순간 인터럽트를 발생 시켜 모터를 정지 시켜 원점을 검출 한다.

## 4) 히터 컨트롤

- 시료 온도를 높이기 위해 적용한 세라믹 히터의 온도를 제어하기 위해 main MCU의 PWM controller를 사용한다. PT-100 센서와 연결된 AD converter를 통해 주기적으로 히터의 온도를 feed-back 받고 그 온도에 따라 적절하게 PWM의 pulse 폭을 조절하여 히터에 가해지는 전류를 조정하여 설정된 온도로 일정하게 온도가 제어될 수 있도록 하였다. 아래 그림과 같이 일정한 레벨의 직류 전압(12V)로 제어량을 조절하기 위해 ON, OFF 구간을 높은 주파수로 Pulse를 가하면 전체적으로 ON구간과 OFF 구간의 평균값으로 제어량이 결정될

수 있다.

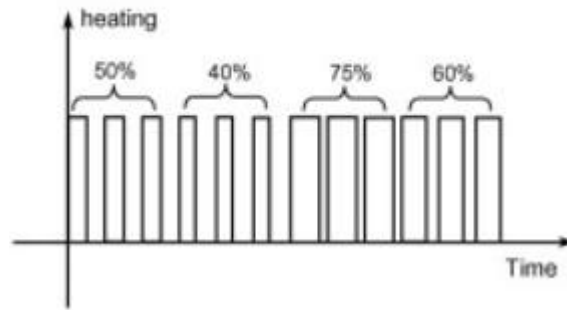


그림 65. PWM Control for Heating

- 온도 제어에는 PID control 방식을 적용하여 목표 온도에 부드럽게 도달하여 안정적으로 제어가 유지되도록 하였다. 아래 그림은 ON, OFF 제어 방법으로 히터를 제어하였을 경우와 PID 방식으로 온도를 제어 하였을 때의 온도 변화 예시로 ON, OFF 제어 시 일정한 구역 안에서 온도가 제어 되지만 목표 온도와 비교했을 때 변화폭이 크므로 등은 유지가 필요한 적용에서는 부적절한 방법이라 할수 있다.



그림 66. ON, OFF 온도 제어

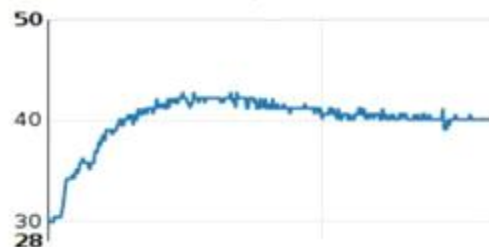


그림 67. PID 온도 제어

5) 솔레노이드 컨트롤

- 솔레노이드의 제어는 MCU 내부 Firmware에서는 Port ON, OFF로 손쉽게 제어가 가능하다. 그러나 기계적으로 접점을 제어하는 방법이므로 제어 신호가 가해진 이후에 일정 시간 delay time을 부여하여 안정되도록 하였다.

6) 광학부

- 광 측정 시 검출해야할 광량의 편차가 시료에 따라 매우 적기 때문에 OP-amp의 gain을 높여 증폭도를 높여 변별력을 키워야 한다. gain의 증대에 따른 신호 레벨의 증가도 함께 발생하기 때문에 off-set을 통하여 측정값을 전체적으로 낮추어 주어야 할 필요가 있다. 현재 시스템에서는 off-set을 하드웨어에서 VR로 조정하여 낮추어 줄 수 있도록 하였다. 또한 증폭에 의해 광신호 뿐만 아니라 노이즈 성분도 함께 증폭되어 검출 data가 다소 편차를 가질 수 있기 때문에 AD converting 된 신호를 500회 누적하여 평균값을 취하였다. Firmware에서는 평균값을 취해 얻어진 raw data를 10회 UI로 전송하고 UI에서 전송 받은 data를 처리한다.

#### 4. H/W 개발내용

##### 1) 시스템 블록다이어그램

- Main MCU는 Atmel의 SAMA5 32bit가 적용되었다. 세라믹 히터, 모터 원점 제어용 센서, 솔레노이드 밸브, PC와 통신 가능한 UART, 실린지 펌프 제어를 위한 Step motor Drive & Controller, 온도 센싱을 위한 ADC 등이 회로에 적용되었다. 정밀도가 중요하고 실시간으로 메인 시스템과 별도로 제어가 가능하도록 하기 위해 멀티밸브에 적용되는 컨트롤 시스템은 별도의 MCU를 적용하였다. 제어 시점이나 제어량 등은 Main에서 command를 수신 받아 처리하지만 실제 제어되는 동작은 전적으로 전용 MCU에서 관할 하도록 설계하였다.

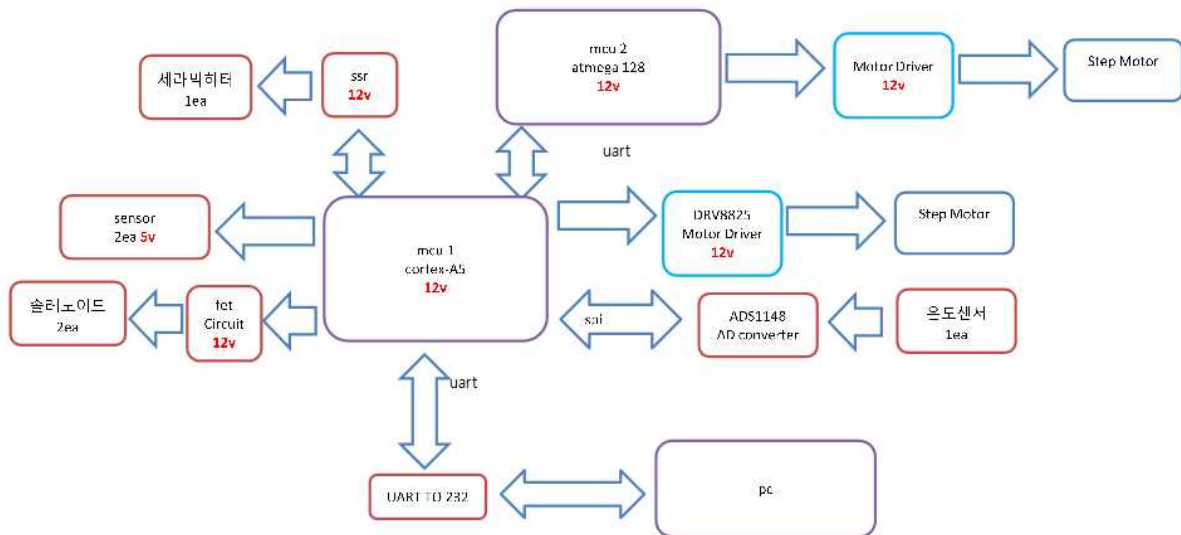


그림 68. 시스템 블록다이어그램

##### 2) 실린지 모터 컨트롤부

- 실린지로 원하는 용량만큼 정해진 속도로 시료가 주입될 수 있도록 기구적으로 실린지와 연결된 모터의 스텝 수 및 모터 구동 속도를 제어한다. 적용된 모터는 스텝모터이며 MCU에서 나온 스텝 신호를 모터 드라이브에서 받아 모터 구동에 필요한 파형과 출력으로 만들어 모터에 전달한다.
- 모터컨트롤 및 드라이브 기능이 있는 DRV8825가 적용되었으며 micro-step 기능이 내장되어 있어 모터를 좀 더 세밀하게 제어할 수 있고 모터 토크도 외부에 저항 값으로 조정할 수 있게 되어 있다. 또한 모터에 과전류가 흐르는 경우 모터 드라이버가 파괴되는 것을 막기 위해 전류를 자동으로 차단하는 기능이 포함된 IC이다. 회로에 적용된 모터 드라이버는 2개로 최대 2개의 스텝핑 모터를 메인 보드에서 컨트롤 할 수 있다.

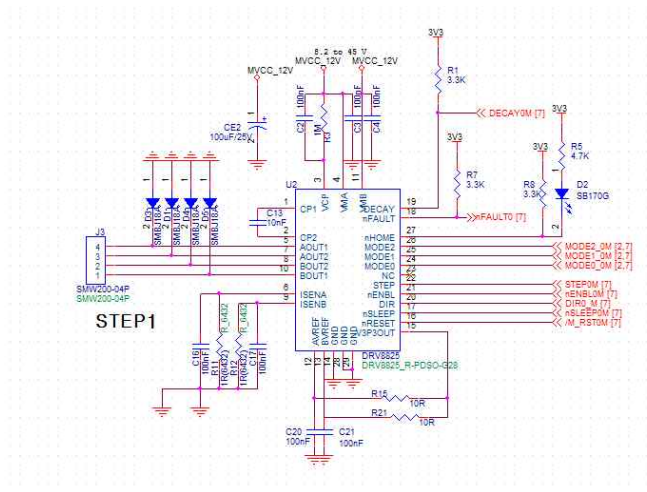


그림 69. 시린지 모터 컨트롤부 회로도

### 3) 멀티밸브 컨트롤부

- 측정에 사용되는 여러 시료를 하나의 멀티 밸브를 통해서 원하는 위치로 경로를 설정하여 이동 시킬 수 있도록 되어 있다. 멀티 밸브에 적용된 모터는 스테핑 모터이며 전용 모터 드라이버를 채용하였다. 여기에 모터의 정확한 제어를 모니터링하기 위해 엔코더가 장착된 스테핑 모터를 선정하였다. 멀티밸브의 경우 액체 상태의 시료의 이동 경로를 제어하기 때문에 시료의 이동 경로에 기밀성이 유지 되어야 하며 그에 따른 마찰을 충분히 커버할 수 있도록 토크가 큰 모터를 채용하였다.



그림 70. Autonic AIS-D Series

### 4) 히터 제어부

- 시료를 반응시키기 위해 원통형 세라믹 히터를 적용하였다. 세라믹 히터는 내구성이 우수하고 쉽게 가열이 가능하며 제어가 용이하다. 세라믹 히터에 감긴 튜브를 가열하면 튜브 내부에 있는 시료가 열을 받아 반응하도록 되어 있으며 세라믹 히터 양 끝 두 군데에 PT-100 센서를 삽입하여 MCU에서 주기적으로 온도를 측정하고 측정된 온도에 따라 PID 제어를





하였다.

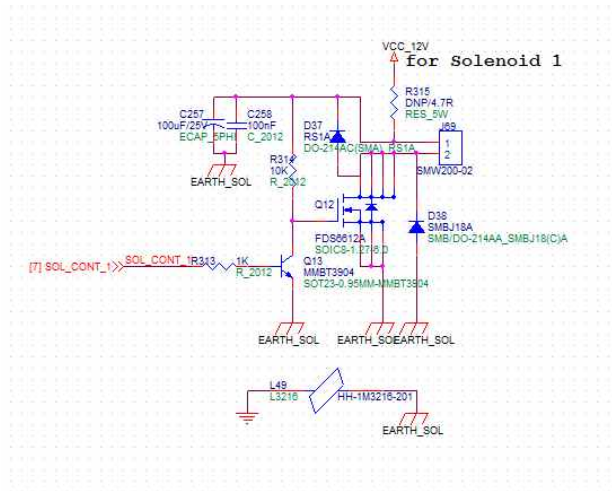


그림 73. 솔레노이드 제어회로도

6) 광학 측정부

- LED로부터 조사된 광이 시료를 거쳐 PD에 들어오는 양을 증폭 소자를 통해 증폭된 신호를 AD Converter를 통해 수치화한다. 시료의 농도에 따른 편차가 크지 않기 때문에 변별력을 키우기 위해서는 PD를 통해 들어온 신호를 OP-amp를 통해 충분히 크게 증폭 시켜야한다. 아래의 회로와 같이 광인식부는 포토다이오드의 입력 부와 그 신호를 증폭하여 처리한다. 기본적인 증폭량은 아래 회로 초단의 저항값을 조절하여 맞출 수 있고 좀 더 세밀한 조정은 메인 보드에 장착된 후단 증폭부에서 가능하도록 되어 있다.

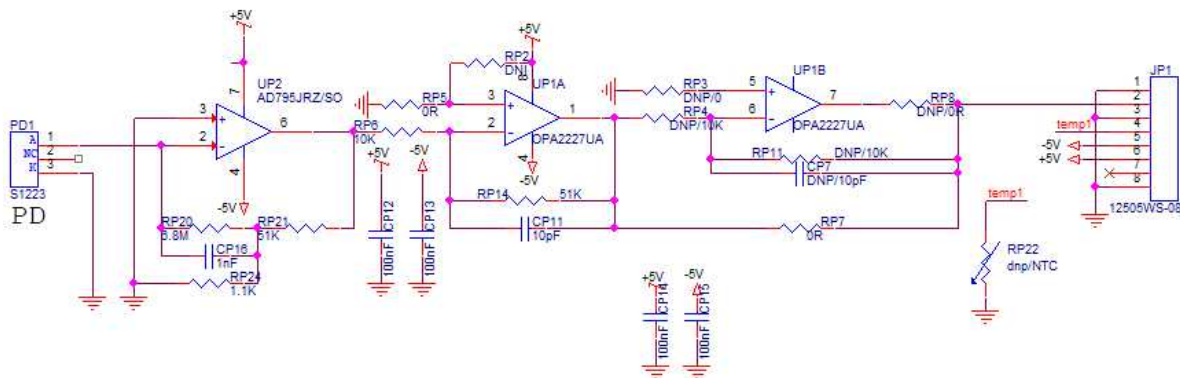


그림 74. 광신호 인식 및 증폭부

- 아래 회로는 메인 보드에 적용된 증폭 및 조정부로 광신호 인식보드에서 1차적으로 증폭된 광신호를 다시 한 번 증폭하는 기능을 하도록 되어있다. potentiometer가 적용되어 2단 증폭부에서는 프로그램을 통해 증폭도를 조절할 수 있다. 사용자는 장비의 User Interface를 통해 Gain을 조절할 수 있으며 1~255 단계로 그 크기를 조절할 수 있다.

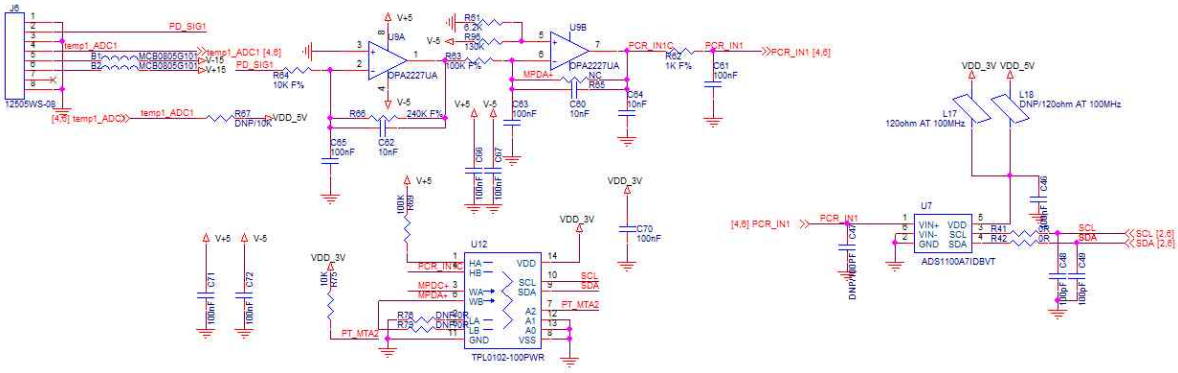


그림 75. 광신호 증폭 및 조정부 회로도

- OP-amp에 사용되는 -15V, +15V를 만들기 위해 TI의 TPS65130을 적용하였다. 양전원 및 음전원 모두 생성 가능하고 주변회로의 저항 등을 통하여 필요한 전원을 만들어 낼 수 있다.

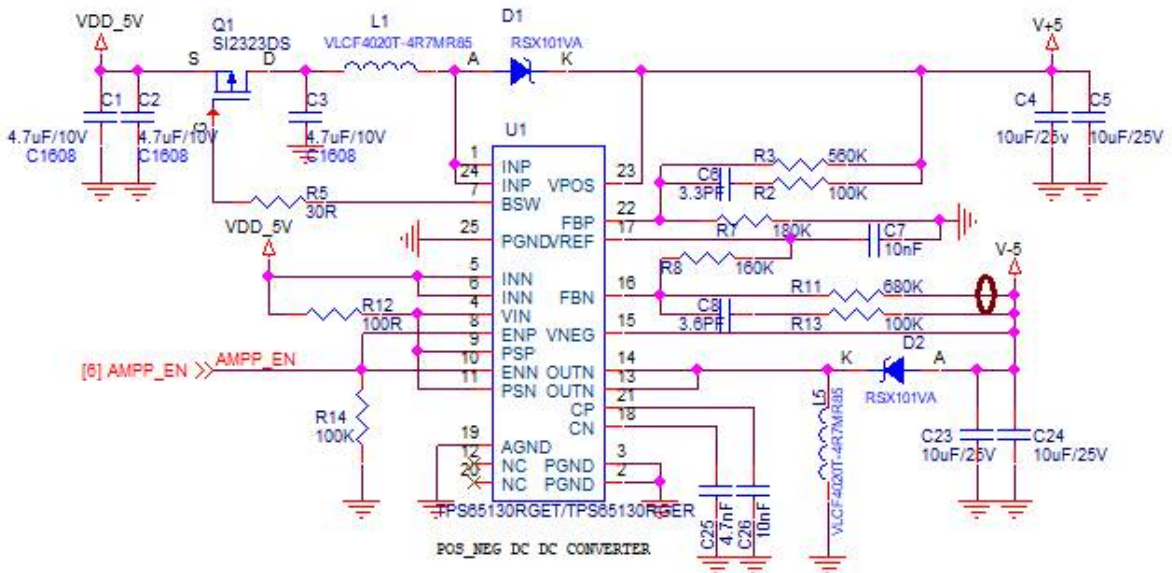


그림 76. 증폭부 전원 회로도

## 5. 테스트 내용

### 1) 잔류농약(다이아지논, 클로로피리포스)

- 아래의 표는 제작된 장비로 측정된 실제의 raw data 모음이다.

Input key	input_time	Blank	Control	Result	hold_time1	저해율	hold_time2	back_volume	test_name	Pesticide
2.0181E+13	17:17:53	3546	3237	1905	120000	42.04	600000	0050	20180906-01	10.0ppm
2.0181E+13	10:06:48	5141	4239	4090	120000	3.51	600000	0050	20180907-01	0.001ppm
2.0181E+13	11:22:12	5141	4239	3706	120000	12.57	600000	0050	20180907-01	0.01ppm
2.0181E+13	12:19:53	5141	4239	2864	120000	32.44	600000	0050	20180907-01	0.1ppm
2.0181E+13	13:40:05	5141	4239	2733	120000	35.53	600000	0050	20180907-01	1.0ppm
2.0181E+13	14:09:16	5141	4239	2344	120000	44.70	600000	0050	20180907-01	10.0ppm
2.0181E+13	09:39:02	5474	4598	4389	120000	4.55	600000	0050	20180911-01	0.001ppm
2.0181E+13	10:56:11	5474	4598	3947	120000	14.16	600000	0050	20180911-01	0.01ppm
2.0181E+13	11:54:35	5474	4598	3898	120000	15.22	600000	0050	20180911-01	0.1ppm
2.0181E+13	15:51:35	5474	4598	3221	120000	29.95	600000	0050	20180911-01	1.0ppm
2.0181E+13	16:28:02	5474	4598	3173	120000	30.99	600000	0050	20180911-01	10.0ppm
2.0181E+13	10:09:28	3211	2477	2355	120000	4.93	600000	0050	20180912-01	0.001ppm
2.0181E+13	11:27:47	3211	2477	2247	120000	9.29	600000	0050	20180912-01	0.01ppm
2.0181E+13	11:56:13	3211	2477	2076	120000	16.19	600000	0050	20180912-01	0.1ppm
2.0181E+13	13:30:16	3211	2477	1484	120000	40.09	600000	0050	20180912-01	1.0ppm
2.0181E+13	14:01:51	3211	2477	1333	120000	46.18	600000	0050	20180912-01	10.0ppm
2.0181E+13	12:23:35	3815	3505	3150	120000	10.13	600000	0050	20181022-01	New 0.001ppm
2.0181E+13	13:20:31	3815	3505	2995	120000	14.55	600000	0050	20181022-01	New 0.01ppm
2.0181E+13	14:38:47	3815	3505	2727	120000	22.20	600000	0050	20181022-01	New 0.1ppm
2.0181E+13	16:06:11	3815	3505	2557	120000	27.05	600000	0100	20181022-01	New 1.0ppm
2.0181E+13	17:27:22	3815	3505	2365	120000	32.52	600000	0100	20181022-01	New 10.0ppm
2.0181E+13	10:38:13	4887	4537	4162	120000	8.27	600000	0100	20181023-01	New 0.001ppm
2.0181E+13	11:59:07	4887	4537	3995	120000	11.95	600000	0100	20181023-01	New 0.01ppm
2.0181E+13	13:29:27	4887	4537	2602	120000	42.65	600000	0100	20181023-01	New 0.1ppm
2.0181E+13	14:42:21	4887	4537	2032	120000	55.21	600000	0100	20181023-01	New 1.0ppm
2.0181E+13	15:56:50	4887	4537	1732	120000	61.82	600000	0100	20181023-01	New 10.0ppm
2.0181E+13	11:16:45	4727	4577	4420	120000	3.43	600000	0100	20181024-01	New 0.001ppm
2.0181E+13	13:33:20	4727	4577	3864	120000	15.58	600000	0100	20181024-01	New 0.01ppm
2.0181E+13	14:30:19	4727	4577	3520	120000	23.09	600000	0100	20181024-01	New 0.1ppm
2.0181E+13	15:10:25	4727	4577	3218	120000	29.69	600000	0100	20181024-01	New 1.0ppm
2.0181E+13	16:20:35	4727	4577	2813	120000	38.54	600000	0100	20181024-01	New 10.0ppm
2.0181E+13	10:55:01	4188	3824	3152	120000	17.57	600000	0100	20181105-01	New 0.001ppm
2.0181E+13	12:27:56	4188	3824	3055	120000	20.11	600000	0100	20181105-01	New 0.01ppm
2.0181E+13	13:34:40	4188	3824	2877	120000	24.76	600000	0100	20181105-01	New 0.1ppm
2.0181E+13	14:38:13	4188	3824	2720	120000	28.87	600000	0100	20181105-01	New 1.0ppm
2.0181E+13	15:11:04	4188	3824	2580	120000	32.53	600000	0100	20181105-01	New 10.0ppm

표 2. 클로로피리포스, 다이아지논 Raw data

- 위와 같이 완성된 잔류농약 측정장치로 테스트하여 얻은 Raw data를 나타내었다. 허용농도 기준은 다이아지논은 0.1PPM, 클로로피리포스는 허용기준 0.01PPM 이다. 다이아지논의 경우에 0.1PPM 허용농도 기준에서 효소-저해반응 저해율 결과가 5회 테스트 기준 평균 31.4%(22.2~44.5%)가 나왔으며 평균 저해율만 봤을때는 log 그래프를 그렸을 때  $R^2$ 값이 0.9788 이 계산되었고, 클로로피리포스의 경우에 0.001PPM 허용농도 기준에서 저해율 결과가 5회 테스트 기준 평균 14.9%(9.3~24.3%)가 나왔으며 평균 저해율을 봤을 때 log 그래프로  $R^2$ 값이 0.9972 로 계산 되었다. 효소-저해반응을 적용하여 기기의 시약 1,2 차 holding time 및 Pump 속도, 주입량을 수개월간 조건을 잡아 테스트한 결과이며, 각각 허용기준을 판별할 수 있는 저해율 편차를 더 줄일 수 있도록 위에서 언급한 조건을 최적화하여 가능할 것으로 판단된다. (Reference 장비인 -네오젠 Optizen Mini 장비경우에 410nm 필터를 사용하여 측정 한 결과는 위에서도 언급했지만 저해율 자체가 10% 미만임. 따라서 농도별 구분을 조금밖에 할 수 없음)
- 자체 실험 결과로는 저해율 10% 미만은 안전, 10~25% 는 잔류농약 미량 함유 추정, 25~45%는 정밀 검사 요망, 45% 이상은 잔류농약 함유 확실시(섭취금지 요망)으로 판단된다.
- 아래의 그래프에서 볼 수 있는 것 같이 잔류농약의 농도가 많을수록 저해율이 커지는 것을 잘 볼 수 있다. 저해율 편차를 더 키우고  $R^2$ 값을 좋게 하기 위해서는 시약의 주입량, holding coil의 온도와 holding time, 시약의 fresh 한 보관 주의등을 통하여 충분히 맞출 수 있을 것으로 판단된다.



표.3-1 다이아진은 저해율 계산

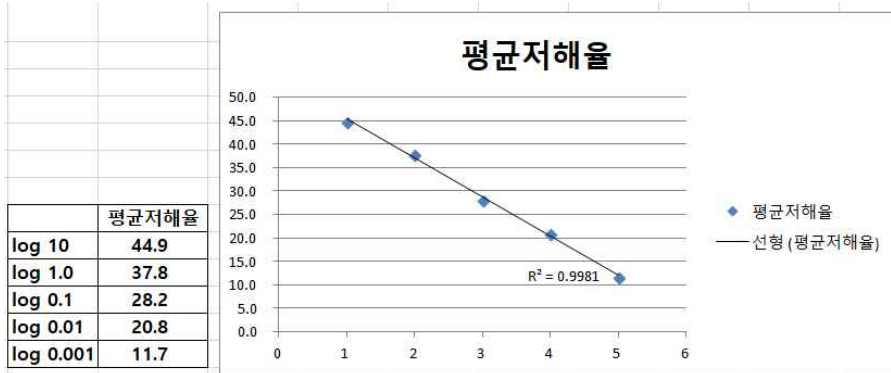


표 3.-2다이아진은 평균 저해율 계산



표4-1. 클로르피리포스 저해율 계산

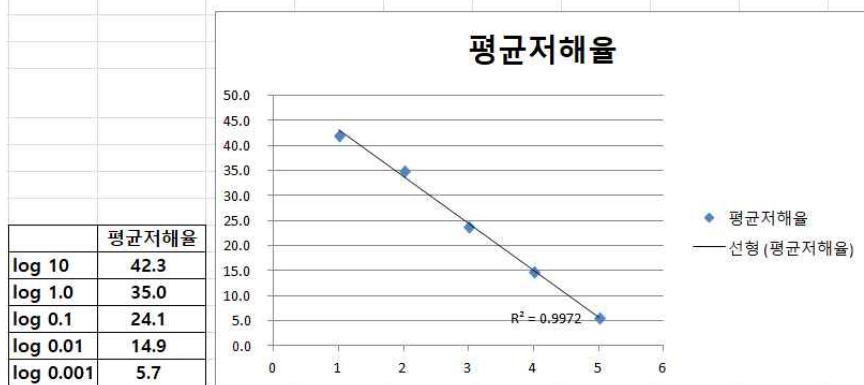


표 4-2 클로르피리포스 평균 저해율 계산

2) 항생제(클로르테트라사이클린, 아목시실린)

- 항생제는 클로르테트라사이클린과 아목시실린을 테스트 하였다. 기초 실험으로 360nm 파장의 분광계 광학부 부분에 DW에 희석한 항생제를 농도별로 주입하여 광학부의 기초테스트를 한 결과 아래와 같은 결과를 얻을 수 있었다.

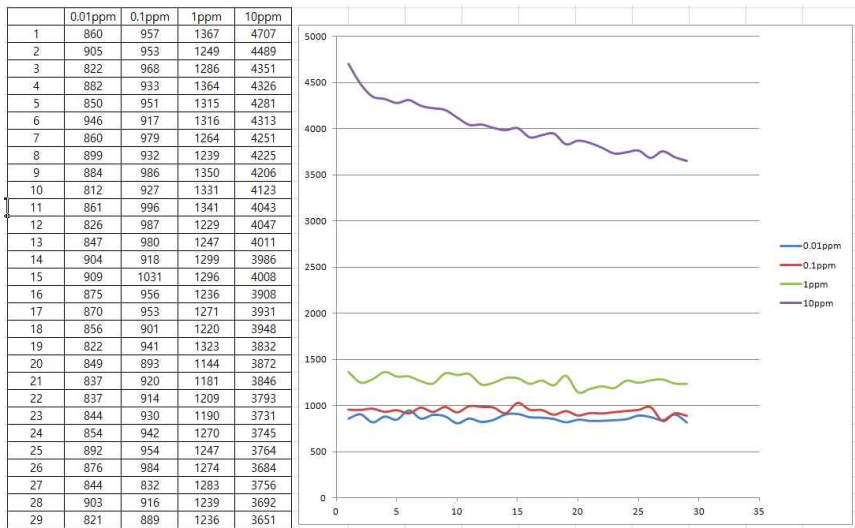


그림 77. 기초 데이터 (아목시실린)

- 이후에 잔류농약 장비의 분광계 360nm 세팅을 하여 장비 측정을 하였다.
- 아래는 장비로 클로르테트라사이클린과 아목시 실린을 측정 한 결과임.

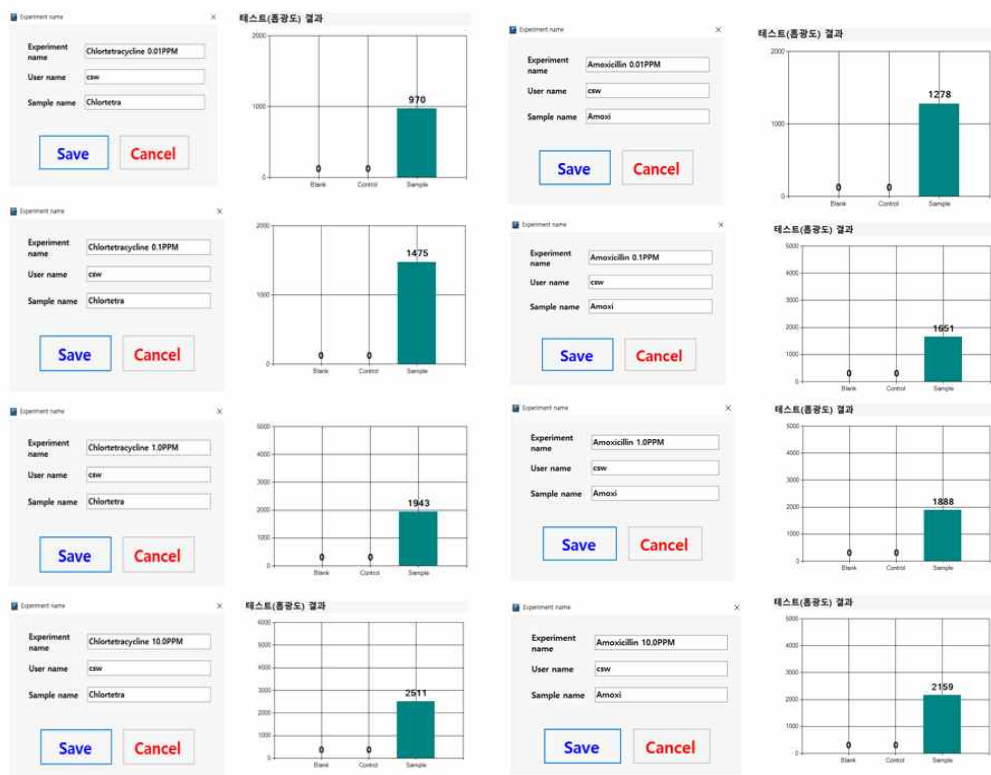


그림 78. 농도별 항생제의 흡광도(개발장비 적용)

- 위의 결과와 같이 항생제의 경우에 농도별로 흡광도 측정값이 증가하는 결과를 얻을 수 있었다.
- .측정시간은 5분이내, 항생제는 클로르테트라사이클린, 아목시실린 0.001~10.0PPM

(2) RT-PCR모듈의 테스트와 2차 Ver. User Interface의 개발 및 테스트

1) RT-PCR 모듈

- 본 과제에서 개발한 RT-PCR을 사용하여 식중독 검사키트로 성능 테스트를 한 결과이다. 비아이티밸류와 협업관계에 있는 PMDx(피엠디엑스)의 살모넬라 진단 kit를 사용하여 Positive를 단계희석(1/10) 3단계를 했을때의 증폭 그래프 화면이다.

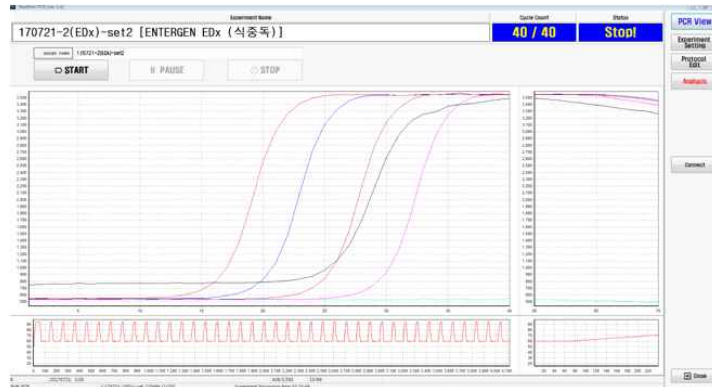


그림 79. PMDx사의 salmonella 감도 비교 희석 테스트결과

- 위의 그래프처럼 Positive가 Ct value 16.5에서 나타남을 알수있으며 희석분의 샘플 값이 serial로 잘 나온 것을 볼 수 있다.
- 위와 같이 본 과제의 일환으로 개발했던 RT-PCR 장치의 성능 테스트로 실제 시약을 적용하여(Enterogen; Salmonella kit) Positive를 단계희석하여 성능 테스트를 하였다. 그리고 많은 업체의 field 요구에 맞게 많은 VOC등으로 보완과정을 거치고 외부에 판매할 수준의 제품으로 진척 되었다. 사용되는 User Interface는 자체 개발한 것이고 화면은 아래와 같이 나타난다.

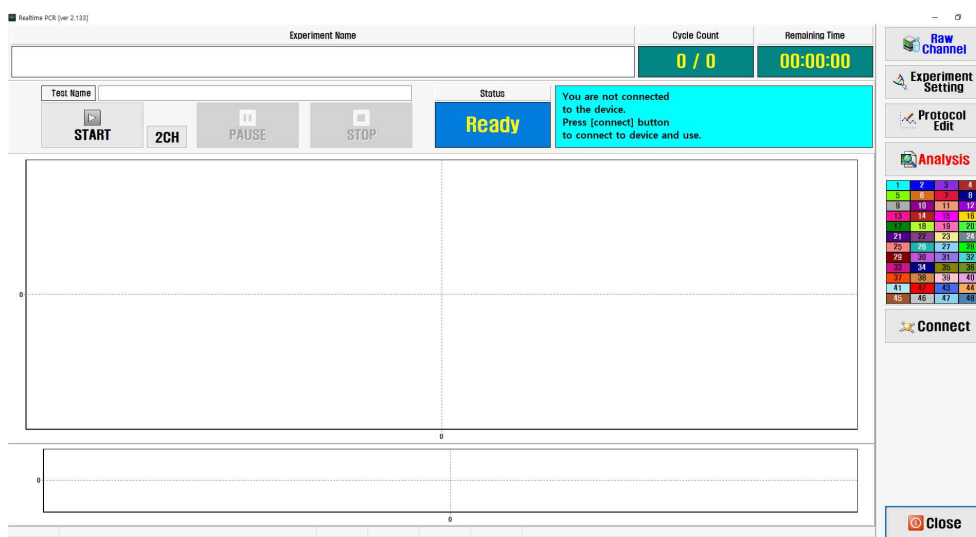


그림 80. RT-PCR Main 화면

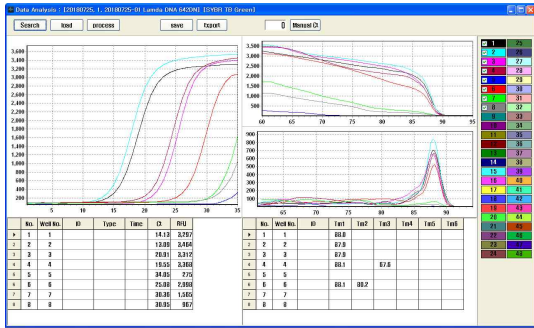


그림 81. Analysis 화면

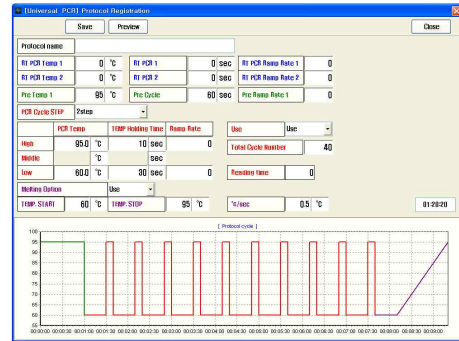


그림 82. Protocol Edit 화면

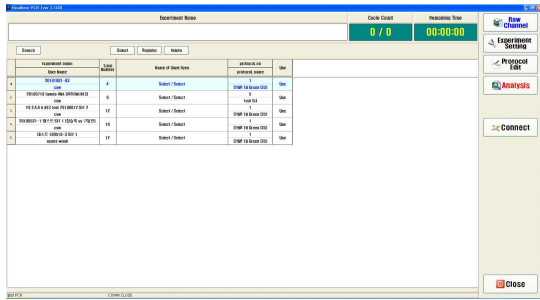


그림 83. Experiment setting 화면

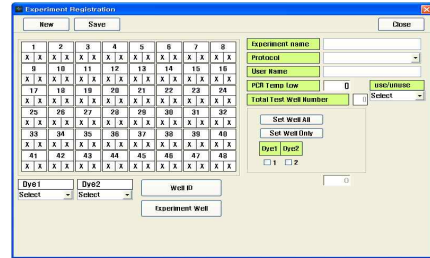


그림 84. Experiment 입력화면

- 위의 장비로 테스트 한 결과를 설명하면 우선 Entergen 사의 Rotavirus kit를 사용하여 Positive를 serial dilution 하여 얻은 결과는 아래와 같다.

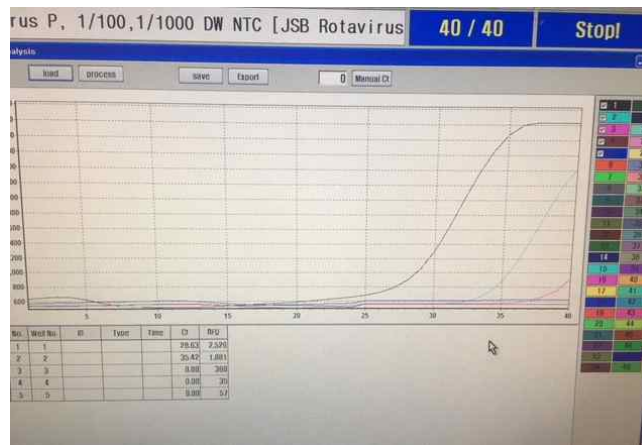


그림 85. Entergen 사 Rotavirus kit test

- 위와같이 serial로 잘 나왔으며 kit내의 Positive가 33Ct값 이전으로 나와야 양성으로 판단하는 기준임.
- 다음은 2018년 5월에 RT-PCR 모듈을 사용하여 외부 연구기관에 Demo test 했던 결과를 보면 선진업체 제품인 Roche LC 480 과 비교하여 증폭 효율이 떨어지지 않음을 알 수 있다. 증폭된 DNA를 확인하기 위해 Agarose gel을 걸어 확인했고 비아이티밸류 연구원(1), 제일병원 연구원(1)공히 교차 실험을 실행 하였다.

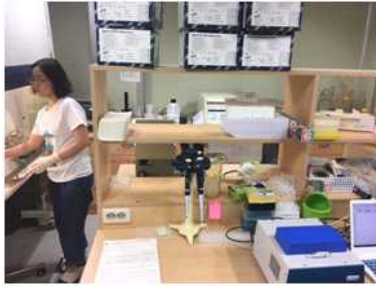


그림 86. 시료 준비



그림 87. RT-PCR 진행

※ GenScan PCR (RT-PCR 제품명)의 Roche LC480 과 비교 테스트  
(2018년 5월 30일 : 서울제일병원)

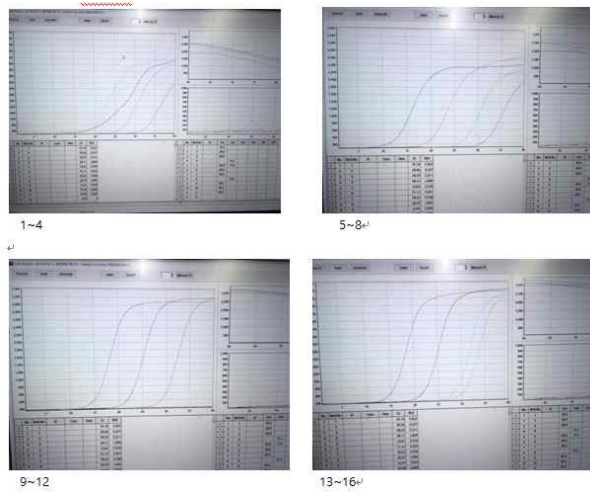


그림 88. RT-PCR data(GenScan PCR)

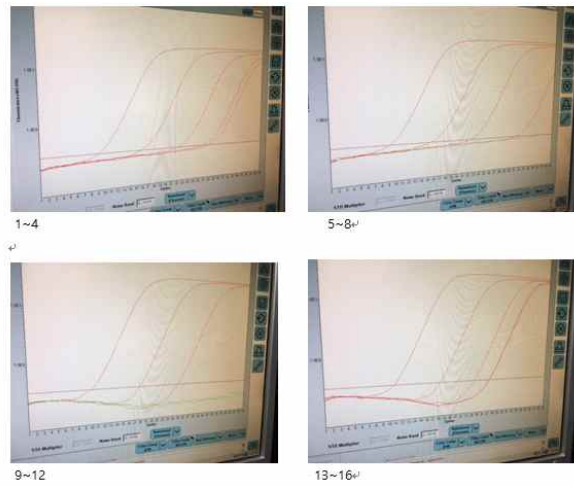


그림 89. Roche LC 480 data



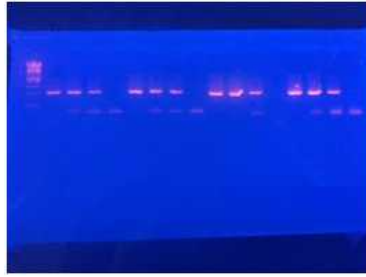


그림 90. 증폭 DNA 확인

- 1) 샘플 1~16 ; 1, 5, 9, 13 :  $10^6$ , 2, 6, 10, 14 :  $10^4$   
3, 7, 11, 15 :  $10^2$ , 4, 8, 12, 16 : DW
- 2) DNA : Lamda DNA

(3) 샘플 농축 및 유전자 추출용 플루이딕칩과 연계한 통합 유전자 분석기기 시제품 제작

1. 기구부 설계 및 제작 내용(도면, 장비 사진)-2차년도 연계진행

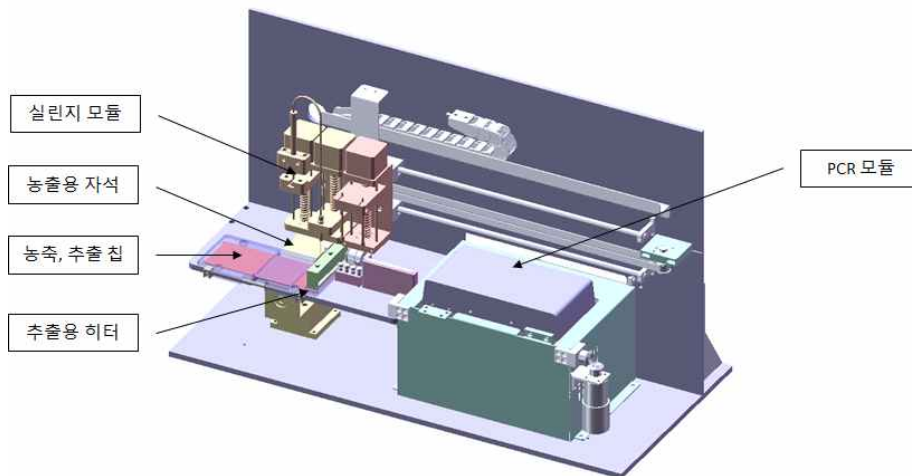


그림 91. 통합 유전자 분석기기의 외관도

- 플루이딕칩과 연계한 통합 유전자 분석기기의 시제품은 농축, 추출 및 PCR을 수행 할 수 있는 각 모듈별 기기를 제작하였고, 이를 통합하여 농축, 추출 및 PCR을 자동으로 진행하는 시스템을 설계, 제작 하였다. 시스템은 샘플 추출, 농축부와 추출 농축에 끝난 샘플을 이송하는 이송부, PCR을 진행하는 PCR 모듈 등으로 구성되어 있다. 기기는 농축, 추출, 샘플 이송, PCR을 순차적으로 자동 진행하게 된다.

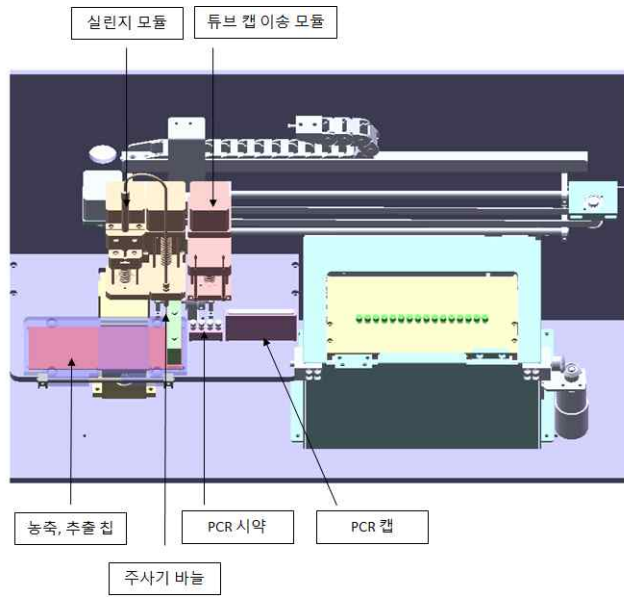


그림 92. 통합 유전자 분석기기 정면도(3D)

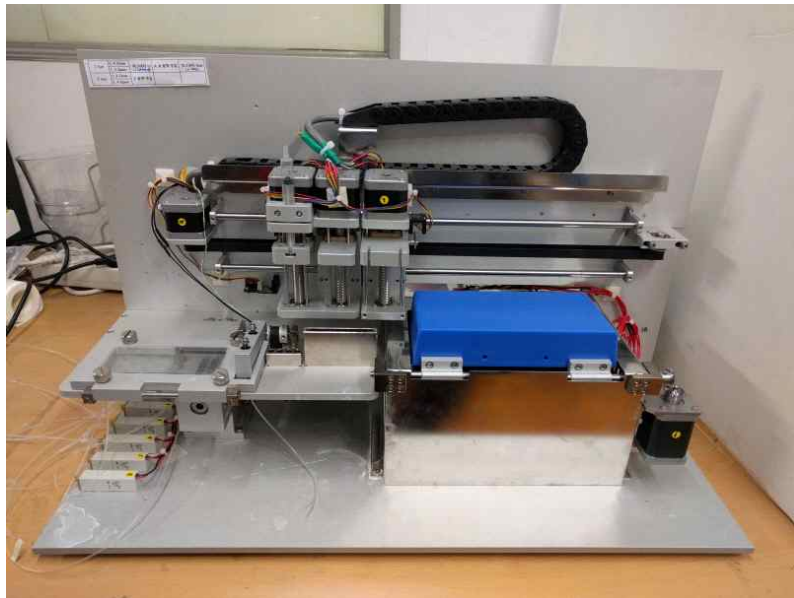


그림 93. 통합 유전자 분석기기 사진 1



그림 94. 통합 유전자 분석기기 사진 2

- 농축, 추출용 진처리용 칩은 튜브연동펌프와 연결이 되며, 튜브연동펌프를 구동하여 칩안으로 샘플 및 시약을 주입하게 된다. 칩의 상부와 하부에는 스텝모터와 연결된 자석이 위치하며, 농축시에 스텝모터를 이동하여 자석을 칩에 위치하게 한다. 농축이 완료되면 자석을 제거하여, 농축된 샘플을 추출위치로 이동하게 한다. 추출위치에는 하부에 자석이 고정되어 있으며, 상부에는 히터가 위치하며 열을 이용하여 추출을 진행하게 된다. 상부의 히터는 스텝모터, 벨트 및 풀리와 연결되어 회전할 수 있는 구조이며, 추출을 진행할 때 칩과 접촉하여 열을 이용한 추출을 진행하게 된다.

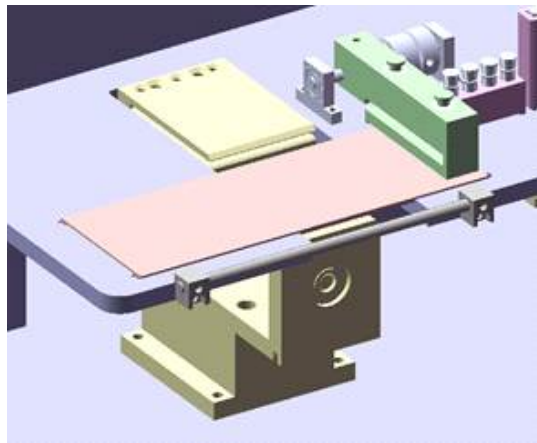
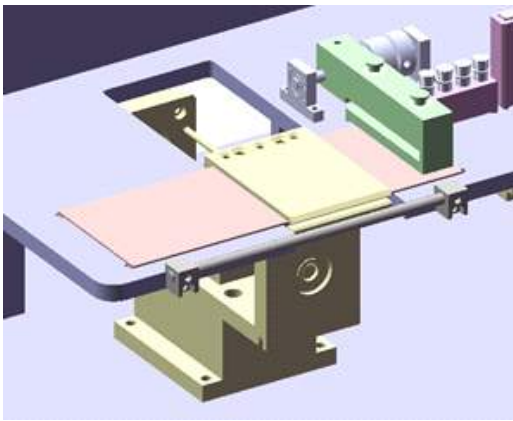


그림 95, 96. 농축용 자석의 결합(좌) 및 분리(우) (3D)

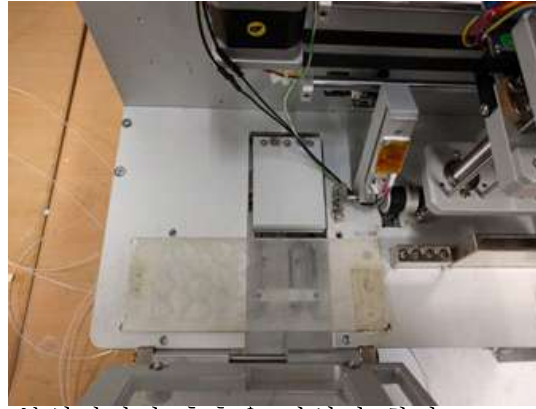


그림 97, 98. 작된 통합 유전자 분석기기의 추출용 자석의 착탈

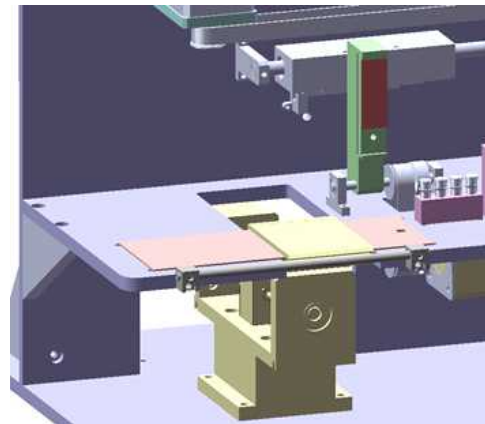
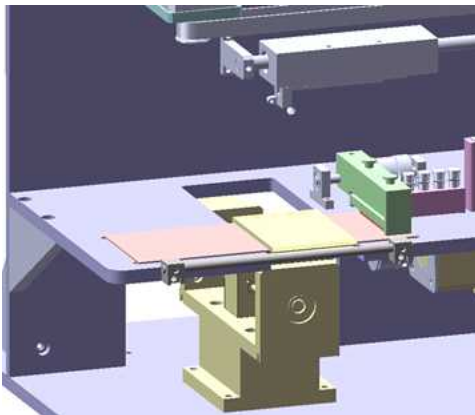


그림 99, 100. 추출용 히터의 칩과의 접촉(좌) 및 분리(우) (3D)



그림 101, 102. 제작된 통합 유전자 분석기기의 추출용 히터의 칩과의 접촉(좌) 및 분리(우)

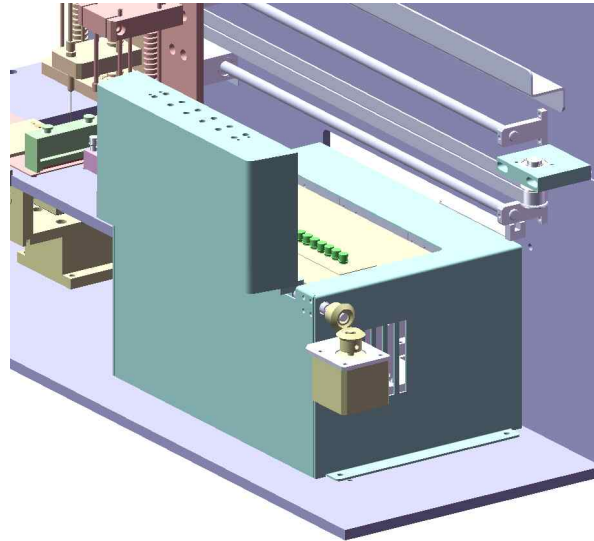


그림 103. 통합 유전자 분석기기의 PCR 모듈

- PCR 모듈은 열원을 이용하여 온도를 상승, 하강시켜줌으로서 타겟 유전자를 증폭하고, 이때 발현되는 형광을 광학계로 측정하여 결과를 분석하는 기기이다. 농축 및 추출용 micro-MACS칩을 이용하여 검사하고자하는 타겟샘플의 농축과 PCR을 진행하기 위한 유전자의 추출이 칩 내부에서 진행되고, 칩내부에 있는 샘플 유전자를 PCR용 Master시약과 혼합한후 이를 RT-PCR내부의 PCR용 튜브에 Liquid Handler를 이용하여 이송하고, PCR튜브의 뚜껑을 자동으로 Close하는 메커니즘을 적용한 Integrated 식품위해물질 측정용 통합 측정장치를 설계 제작하였다. 그러나 이러한 통합 Integrated 시스템을 당장 사업화 하기에는 해결해야할 문제점들이 많이 있어서, 이 부분은 추후 점차적으로 검토할 예정이다. PCR부의 뚜껑 역시 모터와 기어를 이용하여 자동으로 개폐가 가능하도록 하였다.
- 다만, 시료 농축 및 유전자 추출용칩은 식품 뿐만 아니라 휴먼 질병진단 등에서 적용할 수 있는 기술로 조만간 상품화를 추진하여 제품완성도를 높일 계획이다.

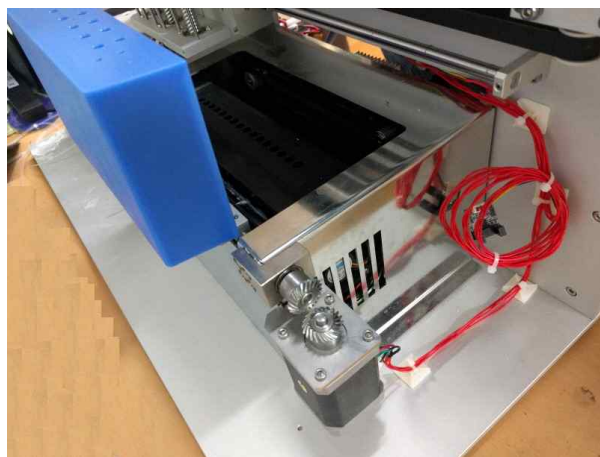


그림 104. 제작된 통합 Integrated 유전자 분석기기의 PCR 모듈

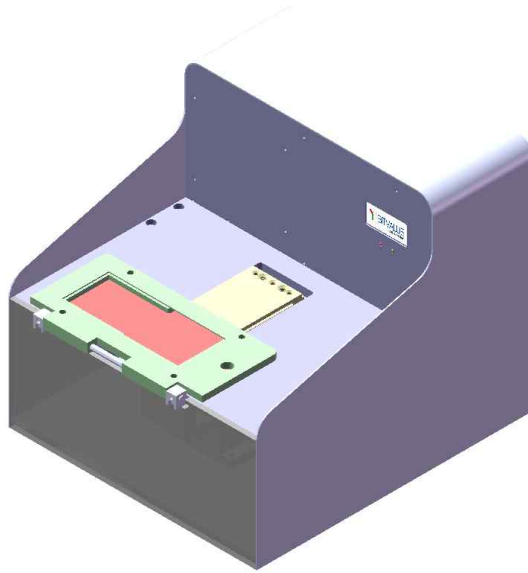


그림 105. 농축 및 추출 시스템의 상품화 모델 외관도

- 과제 종료후 곧바로 샘플 농축 및 유전자 추출부만을 제품화 하여 상용화 할 계획이다. 연세대에서 개발한 칩은 튜브연동펌프와 연결되어 샘플 및 시약이 주입되고, 상부에는 착탈이 가능한 자석이 위치하여 샘플의 농축을 진행하게 된다. 상부에 위치하던 히터를 하부로 이동하여 성능을 개선하였으며, 히터의 열을 이용한 추출후에는 주사기를 이용하여 추출된 샘플을 얻을 수 있다.

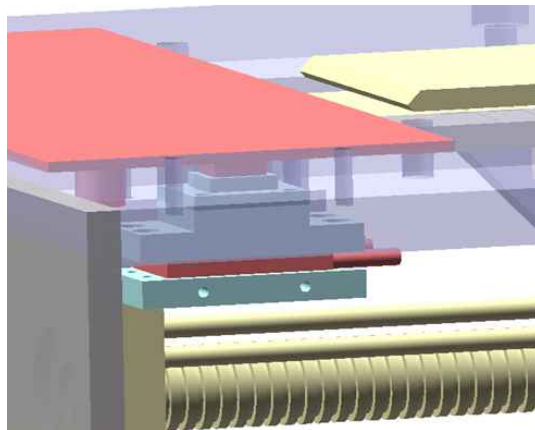


그림 106. 농축 및 추출 시스템의 추출을 위한 히터와 칩의 접촉 구조

- 통합 유전자 분석기기에서는 농축된 유전자를 추출하기 위한 히터가 스텝모터에 연결하여 칩의 상부에 접촉하여 유전자를 얻을 수 있도록 하는 구조였으나 상품화 모델에서는 히터 열의 칩 전달을 개선하고자 히터를 칩의 하부로 이동하였다. 칩의 반응구 주변에 열을 전달할 수 있는 벽면을 세워 칩의 반응구에 열이 잘 전달되어 유전자 추출이 용이하도록 기구

부 구조를 변경하였다.

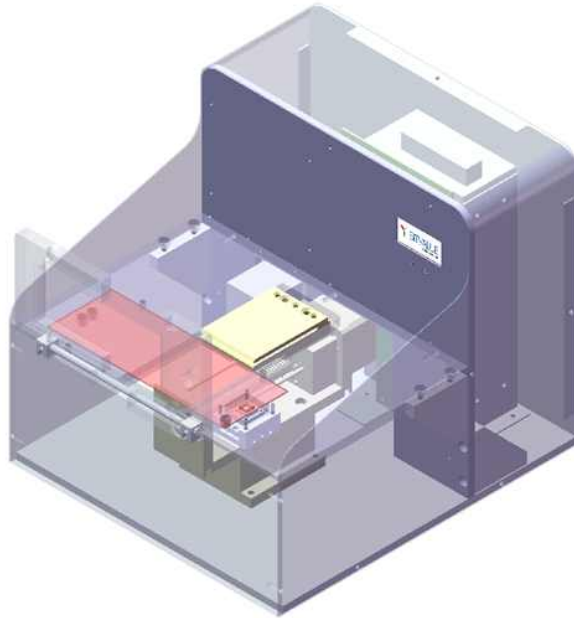


그림 107. 농축 및 추출 시스템의 상품화 모델

- 통합 유전자 분석기기에서 샘플의 농축 및 유전자의 추출부만을 분리하여 상품화 할 계획이다. 칩은 상부의 칩 커버에 의해 지정된 위치에 고정되어 진다. 칩은 튜브로 튜브연동펌프에 연결되며, 튜브연동펌프에 의해 샘플 및 시약이 일정한 속도로 주입된다. 농축시에는 농축용 자석이 칩의 상,하부로 이동하여 칩의 농축부에서 샘플의 농축을 진행하게 된다. 농축이 끝나면 농축용 자석을 제거하여 농축된 샘플을 추출 반응구로 이동시키게 된다. 추출 반응구 하부에는 자석이 위치하여 있어서 농축된 샘플이 추출 반응구에 모이게 된다. 추출 반응구 하부에는 추출용 히터가 있어서, 열에 의한 유전자 추출을 진행하게 된다. 추출 반응구 상부는 얇은 필름으로 덮여있어서 추출이 종료된 후 주사기를 이용하여 추출된 유전자를 얻을 수 있다.

## 2. S/W 개발내용

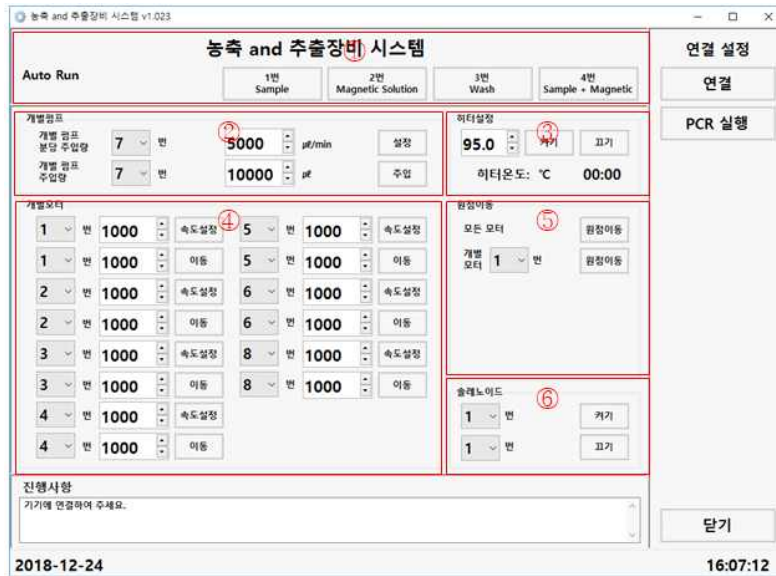


그림 108. Main 화면

- ① 기기가 연속해서 자동으로 실행될 수 있게 명령어를 기기에 보내 주는 부분
- ② 개별펌프에 분당주입량 및 펌프 주입량을 설정해 주는 명령어를 보내 주는 부분
- ③ 히터온도를 설정해 주는 명령어를 보내 주는 부분
- ④ 개별 모터의 속도설정 및 이동량을 설정해 주는 명령어를 보내 주는 부분
- ⑤ 모든 모터의 원점을 전체 및 개별적으로 설정해 주는 명령어를 보내주는 부분
- ⑥ 솔레노이드를 켜기, 끄기 명령어를 보내주는 부분

## 3. F/W 개발 내용

### 1) System Control Protocol

- 제어 되어야할 구성 장치는 솔레노이드 밸브, 펌프, 스텝핑 모터, 히터 등이 있으며 해당 장치는 User Interface를 통해 아래와 같이 미리 정의된 protocol의 command 를 통해 제어할 수 있다. 따라서 실험 시퀀스가 변경 되어도 firmware를 수정할 필요 없이 변경이 용이한 사용자 인터페이스를 통해 대응이 가능하다.



command	Data Flow	동작	비고
2S1005	PC -> 2560	Heater를 100.5도로 Heating	2560에서 128로 보내는 신호는 온도에 관련된 것으로
2E	PC -> 2560	Heater 동작을 중단 시킴	내부적으로 F/W 사이에서 DATA가 관리 됨.
2E	2560->PC	Heater 동작이 중단 되었음을 알림	UI에서는 설정 온도와 시작 명령 전송 및 중단시 응답 확인만 하면됨
1L10		1번 솔레노이드 off	'L' 바로 뒤 숫자가 솔레노이드 번호
1L11		1번 솔레노이드 on	그 다음 숫자는 on/off 를 나타냄
1L80		8번 솔레노이드 off	솔레노이드는 모두 8개
1L81		8번 솔레노이드 on	
1M1H	PC -> 2560	1번 모터를 원점으로	* 7번 모터는 PUMP 동작과 관련되며 별도 관리
1M8H	PC -> 2560	8번 모터를 원점으로	* 원점이 검출된 후 모터의 절대 좌표는 0으로 초기화
1M1H	2560 -> PC	1번 모터가 원점으로 돌아 갔음을 알림	*
1M8H	2560 -> PC	8번 모터가 원점으로 돌아 갔음을 알림	
1MA	PC -> 2560	모든 모터를 원점으로 되돌림	모터 각각 개별 응답: 1번 모터부터 순차적으로 원점 검출
1M104000	PC -> 2560	1번 모터를 절대 좌표 4000으로 이동	
1M805000	PC -> 2560	8번 모터를 절대 좌표 5000으로 이동	
1M104000	2560 -> PC	1번 모터가 4000으로 이동했음을 알림	
1M805000	2560 -> PC	8번 모터가 5000으로 이동했음을 알림	
1P105000	PC -> 2560	1번 모터 속도를 5000으로 설정	
1P802000	PC -> 2560	8번 모터 속도를 2000으로 설정	
1P105000	2560 -> PC	1번 모터 속도를 5000으로 설정 완료	
1P802000	2560 -> PC	8번 모터 속도를 2000으로 설정 완료	
1A01	PC -> 2560	1번 연속 진행 시퀀스 동작 개시	* 연속 진행 시퀀스는 단일 동작 시퀀스로 테스트를 먼저 진행하고
1A02	PC -> 2560	2번 연속 진행 시퀀스 동작 개시	확인이 된 동작에 관하여 Command를 묶어 연속적으로 실행 가능한
1A01	2560 -> PC	1번 연속 진행 시퀀스 동작 완료 알림	시퀀스를 정의후 사용하도록 한다.
1A02	2560 -> PC	2번 연속 진행 시퀀스 동작 완료 알림	

표 5. system control protocol

## 2) 모터 제어

- 적용된 모든 모터는 스테핑 모터로 모터 구동을 위한 펄스 발생 시 MCU 내부에서 감지되는 PWM 인터럽트의 개수를 카운트하여 회전 스텝 수를 제어하고 펄스 주파수를 제어하여 모터 회전 속도를 제어한다. 펄스 주파수가 높아질수록 신호의 주기가 짧아지므로 모터의 회전 속도가 높아지게 된다. 회로에 적용된 DRV8825의 경우 micro step 기능을 지원하므로 모터의 스텝당 기본 회전각에 비해 더 정밀하게 모터를 제어할 수 있다.
- 2개의 pump용 모터를 제외한 나머지 7개의 모터는 모두 초기 위치를 설정하도록 원점 센서가 적용되어 있고 UI를 통해 모터에 연결된 기구물을 원점으로 위치시킬 수 있다. 원점 검출 커맨드를 통해서 모터를 원점으로 이동하는 경우 모터는 원점 방향으로 저속으로 구동되며 센서에 의해 원점 검출 시 모든 모터의 절대 좌표는 0으로 초기화 되며 모터 제어는 원점을 기준으로 절대 좌표를 통해 위치를 제어할 수 있다.

## 3) Pump 제어

- chip에 pump를 통해 시료가 주입된다. User Interface에서 설정된 주입량과 주입속도는 MCU로 serial interface를 통해 수신 되고 수신된 command는 모터 제어에 필요한 PWM 주파수와 모터 구동 시간으로 환산되어 모터가 구동하게 된다. 주입량과 주입 속도는 사용자가 직관적으로 설정 가능하도록 되어 있다. 주입량은 uL 단위로 설정할 수 있고 주입 속도는 uL/min으로 설정할 수 있다. firmware에서는 사용자가 직관적으로 설정한 값을 시스템 상황에 맞게 적절한 제어 값으로 변환하여 장비를 구동한다. 변환 식은 pump를 실제로 구동하여 배출된 시료의 양을 실측하여 산출하였다.
- 주입 경로는 솔레노이드 밸브를 통해 설정 되며 pump 구동 이전에 적절히 경로가 설정 되

어 있어야 한다. 2개의 pump를 통해 시료가 동시에 투입 되어야 하는 경우와 1개의 pump를 통해 시료가 주입되어야 하는 경우가 있으나 두 개의 pump의 주입량과 속도에 튜브나 기구적인 편차에 의한 차이가 발생하므로 pump 구동 개수에 대한 모터 구동 보정 식은 별도로 산출 되어야 한다.

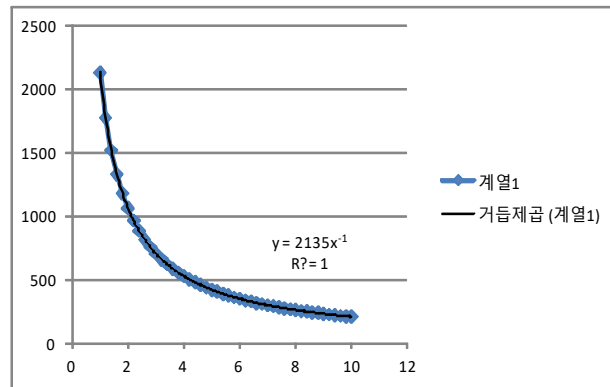


그림 109. pump motor 구동 시간 환산 식

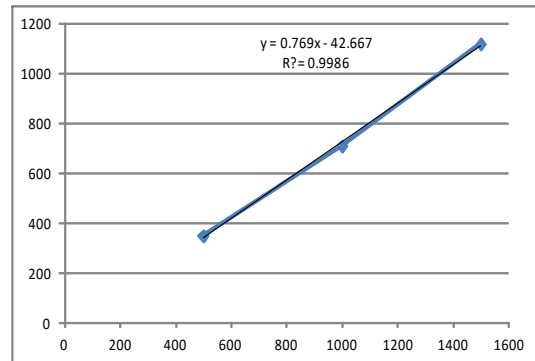
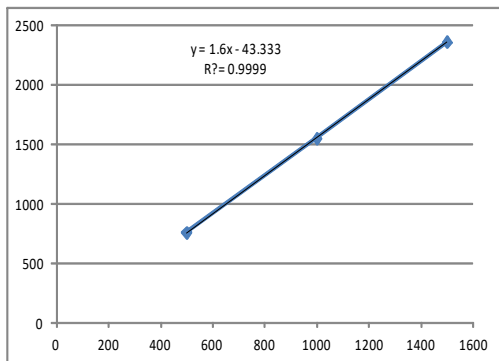


그림 110, 111. pump 1개 구동 시 속도 환산 식, Pump 2개 구동 시 속도 환산 식

#### 4) 히터 제어

- 적용된 세라믹 히터에 삽입된 PT-100 온도 센서를 통해 피드백 된 온도 값을 주기적으로 체크하여 히터를 설정된 온도로 일정하게 유지 시킬 수 있다. PT-100 센서를 통해 측정된 온도는 보다 정확하고 정밀한 분해능으로 온도를 측정하기 위해 별도의 온도센서 모듈을 적용하였다. 온도 센서 모듈과 MCU는 SPI로 연결 되어 있으며 25ms에 한 번씩 온도가 측정된다. 측정된 온도는 PID 제어에 의해 제어량이 산출되며 PWM controller에 의해 pulse 폭을 가변 하여 온도를 제어한다. 히터를 구동 시키는 시점과 설정 온도는 모두 UI에서 설정 가능 하다.
- 아래 그림과 같이 PID 제어 프로그램에 측정된 온도가 set point로 설정되어 히터가 구동 되고 다시 측정되어 피드 백 된 온도와 이전 온도의 비례오차, 미분오차, 적분오차가 합산 되어 다시 히터가 구동된다. 결국에는 설정 온도와 피드 백 되어 되돌아 온 온도가 거의 일

치하게 되면서 제어량이 줄고 안정한 상태로 도달하게 된다. 알고리즘 자체가 심플하고 AVR같은 비교적 저속의 MCU에서도 안정적으로 구현 가능하다.

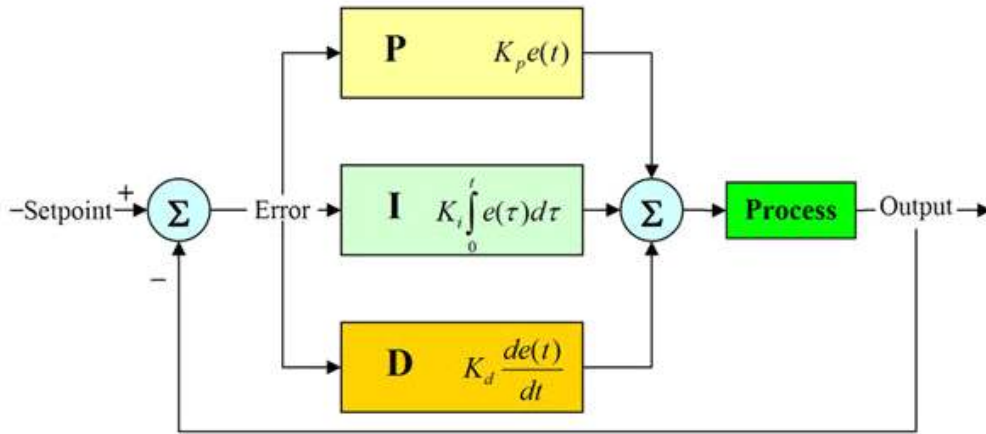


그림 112. PID control

#### 4. H/W 개발내용

##### 1) 전체 시스템 구성

- 전체 시스템을 제어하는 MCU1, 히터 온도를 제어하는 MCU2와 PCR부로 전체 시스템이 구성 되었다. 시료에 온도를 가하는 히터부는 보다 안정적으로 온도 제어가 가능하도록 main MCU에서 분리하여 별도의 회로로 구성하였다. UI에서는 MCU1과 PCR에 각각 별도로 분리된 시리얼 포트를 통해서 전체 시스템을 제어하고 결과를 전달 받도록 구성 되었다.
- 각각의 시스템 구성 요소들은 UI를 통해서 개별적으로 제어 될수 있도록 protocol을 정의 하였으며 protocol에 정의된 command들에 의해 히터제어, 온도 제어, 모터 제어, 솔레노이드 제어 등 구성물들을 제어할 수 있다.

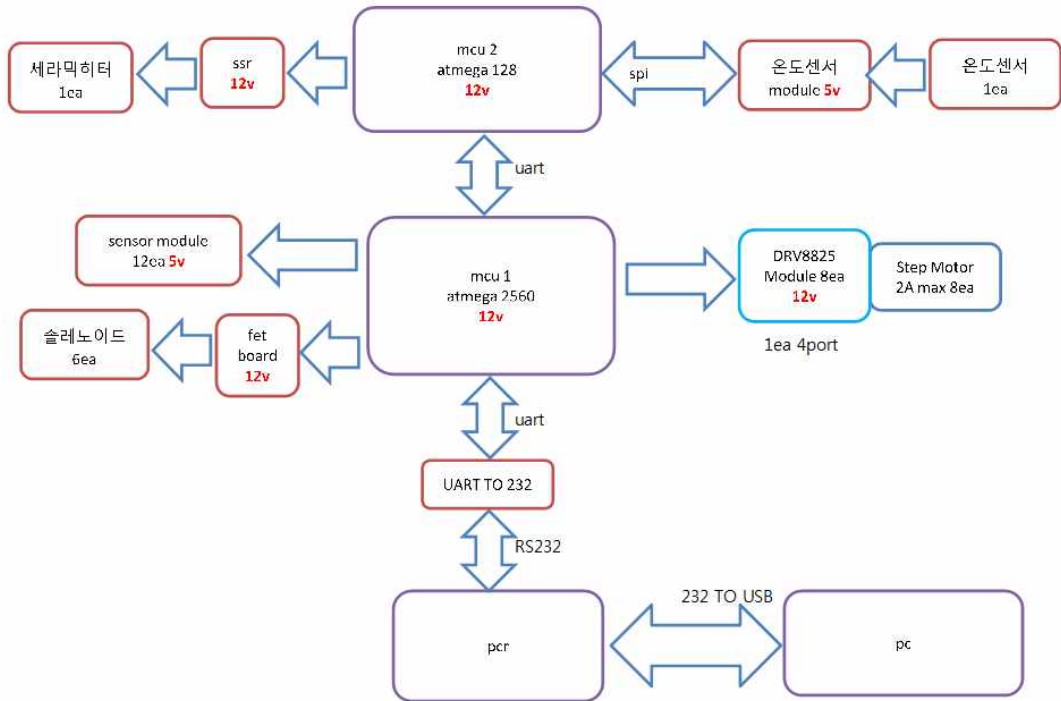


그림 113. 시스템 전체 블록다이어그램

## 2) 히터부

- 시료에 열을 가하기 세라믹 히터가 적용되었으며 PT-100 온도 센서를 통해 피드백된 온도 값을 주기적으로 체크하여 설정된 온도로 일정하게 유지 시킬 수 있다. 세라믹 히터는 MCU에서 직접 드라이브하기에는 출력 전류가 낮기 때문에 SSR(Solid State Relay)을 통해 히터에 전류를 가한다.
- PT-100 센서를 통해 측정된 온도는 보다 정확하고 정밀한 분해능으로 온도를 측정하기 위해 별도의 온도센서 모듈을 적용하였다. 적용된 온도 센서 모듈은 4선식으로 PT-100 센서를 연결하여 외부 노이즈에 대해서 영향을 덜 받도록 구성 가능한 모듈을 적용하였다.

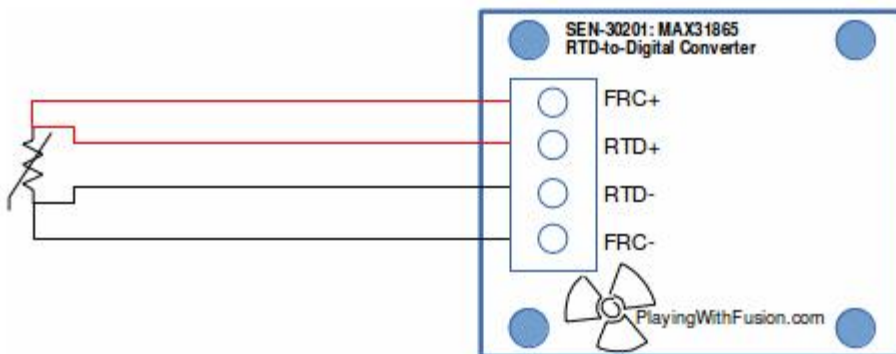


그림 114. PT100 4-wire connection

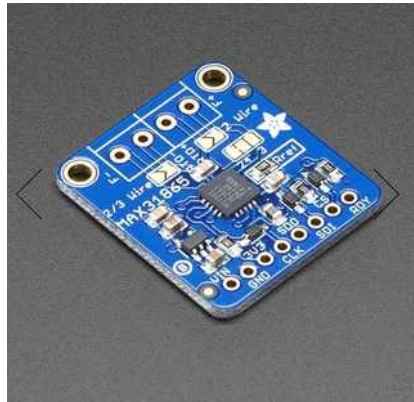


그림 115. PT-100 Temperature Sensor Amplifier - MAX31865

### 3) 모터 제어부

- 시스템에는 전체 9개의 모터를 제어할 수 있도록 설계 되었다. 피스톤 제어용 모터 3개, 피스톤 모듈 이동용 모터 1개, 자석판 제어용 1개, 히터판 접속용 1개, PCR cover 개폐용 1개, 펌프용 2개로 모두 9개의 모터가 제어 가능하다.

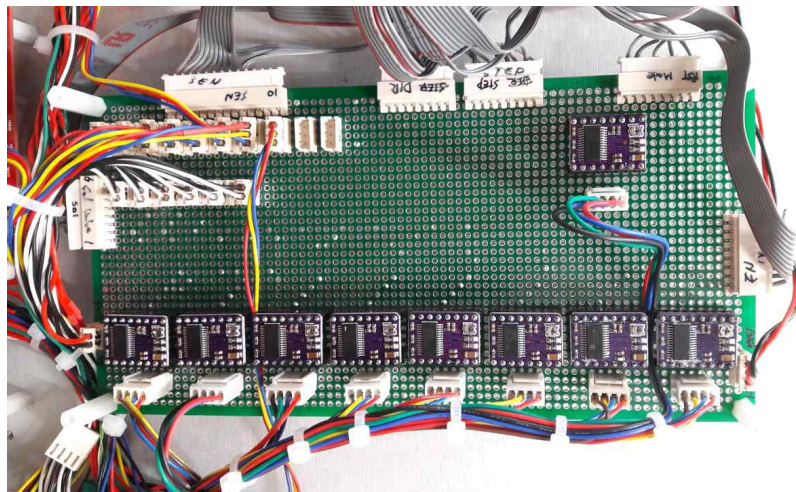


그림 116. 모터제어부 보드

- 모터는 구동 속도, 구동 스텝 수 및 회전방향 제어가 가능하다. 모터 제어는 MCU의 PWM에 의해서 생성된 pulse로 구동되며 모터 컨트롤 및 드라이버 IC DRV8825를 적용하였다. DRV8825는 스텝분해능 32micro step까지 가능하며 장착된 포텐서미터를 통해 토크를 조정할 수 있고 과열 시 shut-down 기능이 있어 컨트롤러가 파괴되거나 모터가 과열되는 것을 막을 수 있다.

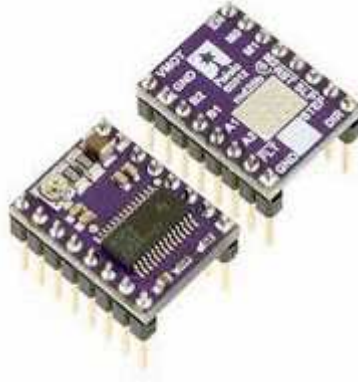


그림 117. DRV8825 Motor Driver Module

#### 4) PUMP 제어부

- Chip에 시료를 주입하기 위해 pump가 적용되었다. 다른 모터들과 마찬가지로 pump 내부의 모터도 스테핑 모터로 구성되어 있으며 다른 모터와 다른 점은 초기 원점을 설정할 필요가 없으므로 원점 센서가 적용되지 않았다.

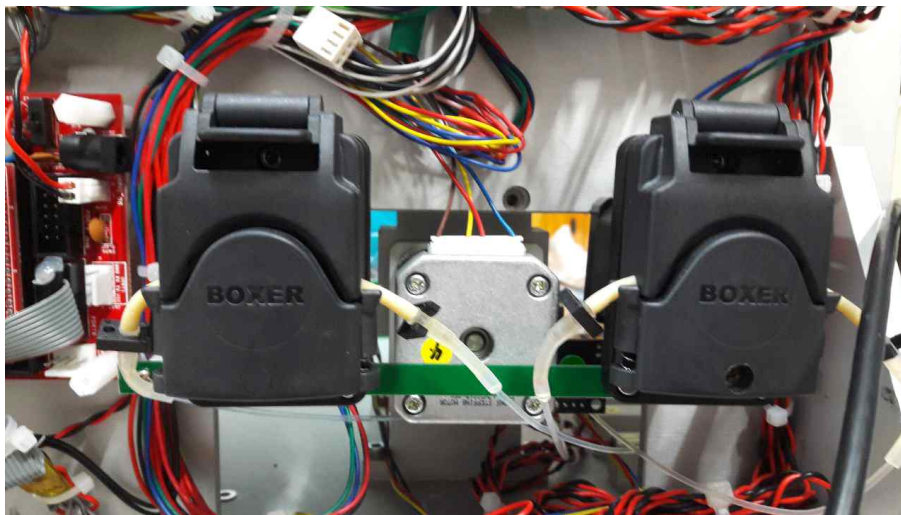


그림 118. pump

#### 5) 솔레노이드 제어부

- 모두 8개의 솔레노이드를 제어할 수 있도록 설계 되었다. 솔레노이드 제어 시 전류 소모가 크기 때문에 MCU I/O port로 직접 제어가 불가능 하다. 따라서 별도의 보드에 FET를 적용하여 솔레노이드에 전류가 충분히 공급될 수 있도록 설계 하였다.

## 5. 농축칩과 연계한 자동 측정 장비 제작 및 준비 테스트

- Micro-MACS chip을 사용하여 샘플 로딩, 농축, 추출을 통하여 RT-PCR 까지 정량분석이 가능하게 설계 제작하여 테스트를 하였다.
- 본 장비는 샘플로딩부터 추출, 농축, RT-PCR 까지 자동화를 구현한 장비임으로 실 사용자가 보다 간단하고 용이하게 real time PCR을 할 수 있도록 설계, 제작되었다. 샘플을 PCR로 자동 주입하는 부분은 향후에 보다 보완이 필요하지만 실현가능할 것으로 판단되며, 유전자 추출, 농축 부분은 모듈화 설계가 완료되어 단일 제품으로 PCR과함께 상용화에 가능할 것으로 보여진다.

<파트별 상세 사진 첨부>

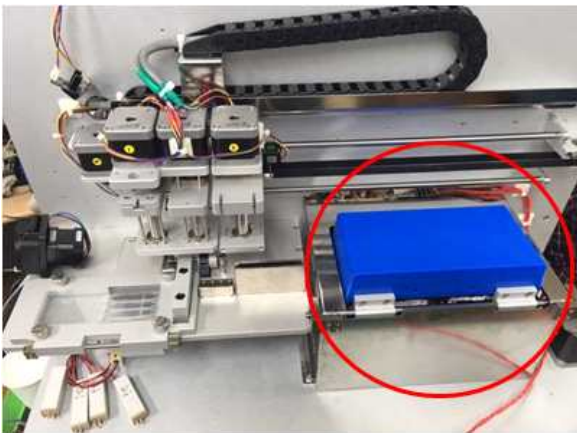
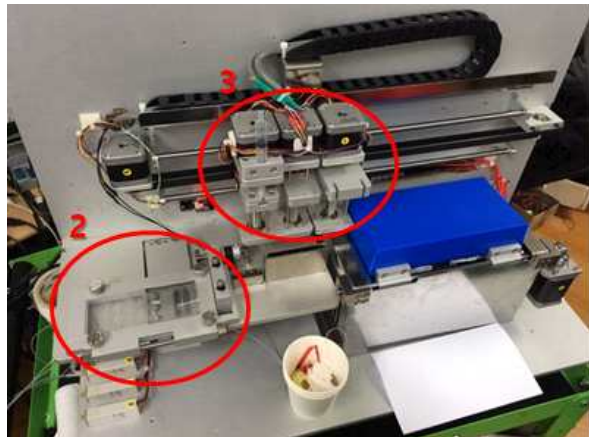


사진. 붉은색 부분 : PCR 부



2: MACS-chip 장착부, 3: 이송부



4: 전장부

그림 119~120. 파트별 상세 그림사진



그림 121. micro-MACS chip 연계 실험테스트

- 위의 사진처럼 연세대학교에서 개발, 제작한 micro-MACS chip을 사용하여 E.coli 의 농축 추출을 진행하고 있는 사진임. 중앙부에 이동식 마그네틱 장치가 보이고 chip에 박테리아와 마그네틱비드가 혼합되어져 들어가고 있는 것을 확인할 수 있는 사진임.



그림 122. Lysis chamber 가열온도 테스트

- 초기 실험에서 lysis chamber의 95℃의 정확한 lysis 온도를 측정하기 위하여 직접 chamber 내부에 온도센서를 넣어서 온도 측정장비로 테스트 하고 있는 모습.



<통합유전자 추출장비로 농축률 계산 결과 >

- 본 과제를 통해 개발한 전처리용 통합 미세유체칩을 자동화 장비와 연동하여 *E. coli*의 농축 실험을 진행하였다. OD600이 1.0인 *E. coli* 시료를 준비한 후 Serial dilution 한 후 약  $10^4$  CFU/mL 농도의 시료를 사용하여 5mL/min의 유속으로 주입하여 미세유체칩 내부에 농축한 뒤 outlet으로 배출되는 시료를 모은 뒤 유전자를 추출하여 real-time PCR을 진행하여서 농축률을 확인하였다. outlet으로 배출되는 시료는 농축되지 않은 loss에 해당하는 부분으로 real-time PCR 결과 Ct 값의 평균값이 약 40.7 로써 인렛으로 주입한 시료의 Ct 값은 약 28인 것에 비해 약 12.7의 Ct 값 차이가 발생하였다. 이전 실험결과 *E. coli*의 농도가 10배 높아질 때 Ct 값은 약 4 빨라진다. 이를 바탕으로 농축률 (칩 내부 recovery)을 계산해 보았을 때 농축되지 않고 칩 외부로 배출된 *E. coli*의 농도는 약 10 CFU/mL로 농축률은 약 99.9% 인 것으로 확인되었다.

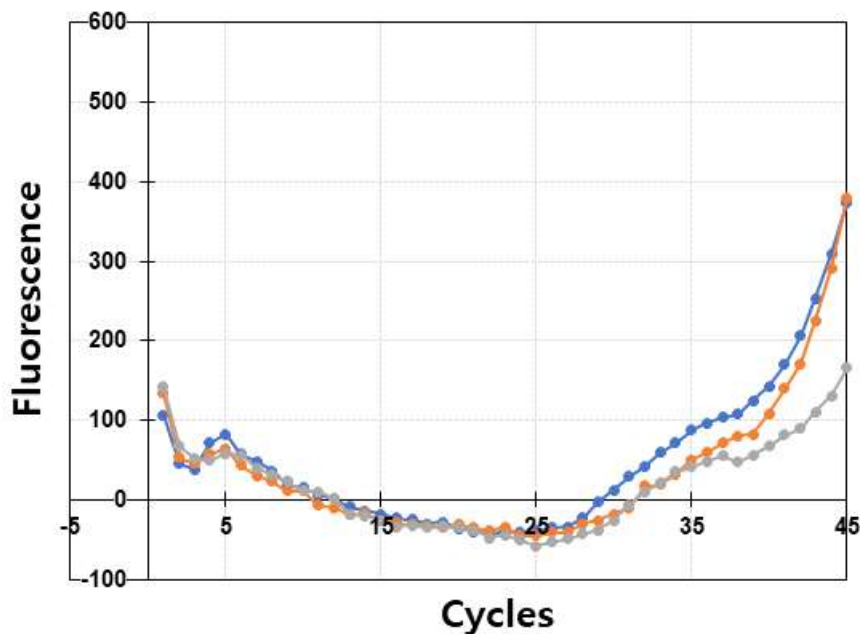


그림 123. 칩 외부로 배출된 박테리아의 real-time PCR 결과

- 본 통합장비의 향후 계획은 상용화를 위해서 농축 및 추출 모듈을 먼저 상용화 할 것이며, 추후 농축&추출부의 상용화이후 RT-PCR까지 포함한 Integrated full 자동화 제품을 사업화 할 계획임.

- 아래의 자료는 잔류농약테스트와 RT-PCR 테스트당 단가의 계산설명표이다.

※잔류농약 및 RT-PCR 의 테스트당 단가 계산

\* 잔류농약

No	품목	규격	가격(원)	내용	T당 단가(원)	비고
1	시약(효소저해법)	test	260,000	1Set/40Test	6,500	업체구입
2	피팅 라인	set	10,000	1set/500Test	20	업체구입
3	8way multi-valve	set	100,000	1set/1000test	100	가공부품
4	기타 파이펫 팁	set	6,000	set/98test	61	업체구입
합계					<b>6,681</b>	T당단가

표 6. 잔류농약 테스트당 단가

(잔류농약 검사시스템의 경우에 시약을 자체 개발하였을 경우에 Test당 단가를 2,000원대에서 맞출 수 있을 것으로 기대됨)

\* RT-PCR

No	품목	규격	가격	내용	T당 단가(원)	비고
1	ConA conjugation	test	20,000	1Set/10Test	2,000	자체제조
2	micro-MACS Chip	set	500	1set/500Test	500	가공부품
3	PCR 시약(Sal.)	set	300,000	1set/98test	3,061	업체구입
4	기타 파이펫 팁	set	6,000	set/98test	61	업체구입
합계					<b>5,622</b>	T당단가

표 7. RT-PCR 테스트당 단가

\* 간단하게 성능 분석을 언급하자면,

1. 농축 유전자 추출 RT-PCR (통합유전자 분석장치)의 경우에는 전처리 포함하여 1시간 30분 이내에 PCR까지 수행이 완료될 수 있고(35cycle 기준), 신속 잔류농약 검사시스템 장비의 경우에 최초 Blank, Control의 테스트를 50분 내에 측정 할 수 있고 이후 5회의 샘플 테스트까지 175분이 소요, 이후에 5샘플 기준으로 샘플당 35분 이내에 검사를 완료 할 수 있다. 참고로 잔류농약의 전처리의 경우에 20분 이내가 소요됨(검사 35분, 전처리 20분)

2. 특이도 부분은 농축, 추출, 유전자 증폭을 통한 RT-PCR의 경우에 99.9% (적용 primer 사용시), 그리고 대표적 유기인계 살충제의 경우는 효소-저해법의 시약이 화학적 반응의 원리임에 따라 일반적으로 95%이상으로 알려져 있음.

## 2. 제1 협동연구기관 연세대학교

### 가. 1차년도 세부 연구내용

#### (1) 자성입자 기반의 노로바이러스 농축용 미세유체칩 개발

- 식품 샘플 속에 존재하는 미생물이나 바이러스를 검출하기 위한 방법으로는 미생물 또는 바이러스 속에 존재하는 유전자 (DNA 또는 RNA)를 추출하여 Polymerase Chain Reaction (PCR) 과정을 통해 추출된 유전자를 증폭하여 검출하는 방법이 있다. 본 과제에서 바이러스 연구 모델로 선정한 노로바이러스(Norovirus, NoV)는 RNA를 유전자로 가지는 RNA 바이러스이므로 RNA를 추출하여 PCR 진행이 필요하였다. 일반적으로, 노로바이러스를 포함하여 식품 속에 존재하고 체내로 흡수될 경우 심각한 질병을 일으킬 수 있는 전염성 병원균들은 매우 소량(저농도)으로 존재하면서도 질병을 유발할 수 있다. 따라서 대용량의 시료 속에 포함된 병원균을 소용량, 고농도로 농축하는 전처리 기술이 동반된다면 이어지는 검출의 민감도를 크게 증가시킬 수 있는 핵심기술이다. 본 연구에서는 Concanavalin A (Con A)라는 렉틴을 병원균과 자성입자를 결합시키는 매개체로 활용하여 자성입자에 표지된 노로바이러스 또는 미생물을 빠른 속도로 효율적으로 농축 할 수 있는 미세유체칩을 개발하였다.
- Con A는 Jack-bean (*Canavalia ensiformis*)에서 추출 할 수 있는 렉틴 (carbohydrate 결합 단백질)로써 다양한 당류, 당단백질, 당지질 등과 특이적으로 결합 할 수 있는 특성을 가진다. 특히, 다양한 박테리아, 바이러스의 표면의 마노스(mannose) 와 결합할 수 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 Con A의 이러한 특성을 이용하여 자성입자에 Con A를 결합 시킨 후 병원균과 반응 시켜 자성입자에 병원균을 결합하였다. 또한, 이렇게 자성입자에 표지된 병원균을 농축하기 위해 강한 자기력을 가지는 자석 어레이(array)와 샌드위치 형태로 조립되어 있는 미세유체칩 (Micro-MACS chip)을 개발하였다.
- 미세유체칩은 4개의 넓은 챔버 타입 미세유체채널이 직렬로 연결되고 채널 면의 위, 아래로 네오디뮴 자석 시트가 고정된 형태이며 얇고 투명한 Polymethylmethacrylate (PMMA, 아크릴) sheet의 양면에 3M 양면테이프를 부착한 후 CO2 레이저 커팅기를 이용하여 설계된 미세유체 채널 패턴을 따라 절단한 뒤 투명한 친수성(Hydrophilic)의 필름을 부착하여 채널을 제작한다. 그리고, inlet과 outlet 부분에 편치를 이용하여 구멍을 뚫은 뒤 튜브를 연결하며 각각 18개의 네오디뮴 자석이 고정된 자석 어레이 시트를 미세유체칩의 상/하단에 조립하여 완성하였다.

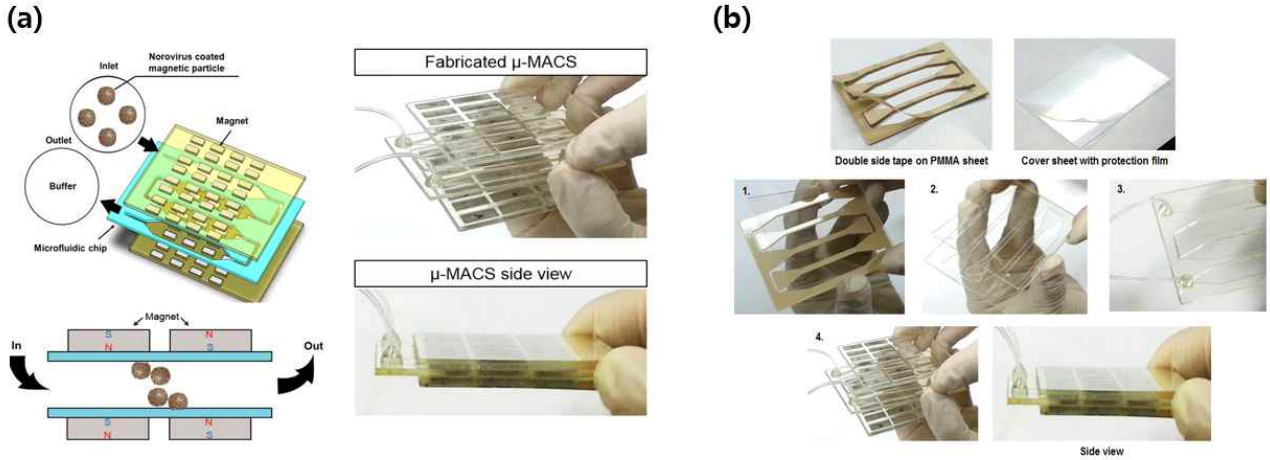
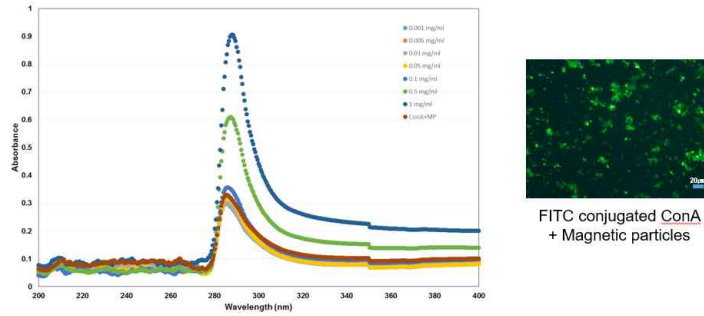


그림 124. (a) Micro-MACS chip을 이용한 자성입자 표지 병원균 농축칩의 개요와 실사진 (b) Micro-MACS 칩 제작 과정

- 자성입자에 표지된 병원균은 미세유체칩 내부로 주입되면 샌드위치 형태로 조립되어 있는 자석에서 발생하는 자기력에 의해 채널의 윗면 또는 아랫면으로 끌려가 채널 내부에 지속적으로 농축되게 된다. 이 때, block 형태의 자석을 어레이 형태로 연결 했을 때 각 자석의 꼭지점 부분에서 자기력의 세기가 최대화 되므로 자석의 꼭지점 부분이 미세유체 칩 내부의 농축 챔버와 잘 연결될 수 있도록 결합하여야 한다.
- 일반적인 미세유체칩 제작은 Biocompatible하며 제작 공정이 단순화 되어 있는 Polydimethylsiloxane (PDMS)의 Soft-lithography를 통해 이루어지지만, 본 연구에서는 자기력이 손실없이 미세유체 채널 내부에 영향을 미칠 수 있는 얇은 두께로 제작하기 위해 PMMA와 투명 친수성 필름을 이용한 공정 방법으로 연구를 진행하였다. 또한, 위 방법은 절단, 조각 등 레이저를 통한 기계적인 가공이 가능하며 접착, 도장 등이 용이하며 가공성이 뛰어난 아크릴 재질을 사용하기 때문에 미세유체칩 제작 비용또한 크게 감소시킬 수 있었다.
- 본 1차년도 연구에서는 자성입자와 자석 사이에 작용하는 자기력을 통해 자성 입자에 표지된 노로바이러스를 미세유체칩 내부에 포획 및 농축하기 위한 연구를 진행하였으며 개발한 미세유체칩의 농축 효율을 검증하기 위해 FITC (Fluorescein isothiocyanate) 가 표지된 Con A를 이용하였다. 먼저, FITC conjugated Con A (이하 FITC-Con A)를 DI water를 통해 희석하며 스펙트로포토미터를 통해 각각의 경우 흡광도를 측정하였다. 이를 기반으로 Con A 농도와 흡광도 사이의 선형적인 관계를 도출 할 수 있었고 이를 참조하여 미세유체칩의 농축 효율을 확인하였다.
- 자성 비드에 FITC-Con A를 coupling 시킨 후 주입하기 전과 주입 후 outlet으로 배출되는 시료의 흡광도 차이를 이용하여 효율을 측정하였다. 아래 결과에서 볼 수 있듯이, 1mg/mL의 Con A를 자성비드와 반응 시켰을 때 약 63.53%의 Con A가 자성비드에 효과적으로 부착된 것을 확인하였다.



- Using FITC-conjugated Con A, absorbance measurement depending on concentration
- Coupling efficiency between Con A and magnetic particle

$$\text{Coupling efficiency} = \frac{A-B}{A} \times 100 = 63.53\%$$

A = Absorbance of ConA solution    B = Absorbance of supernatant solution after conjugation

그림 125. FITC-Con A의 농도별 흡광도 스펙트럼 및 농축 효율 측정 방법

- 또한, 마찬가지로 자성입자를 희석하여 농도별로 준비한 뒤 그에 따른 흡광도를 측정하여 선형적인 관계를 도출한 뒤 inlet으로 주입된 시료의 흡광도와 outlet으로 배출되는 시료의 흡광도의 차이를 측정하여 미세유체칩 내부에 포획, 농축되는 자성입자의 농도를 확인하였고, 이에 따라 미세유체칩의 자성입자 농축 효율을 측정할 수 있었다.

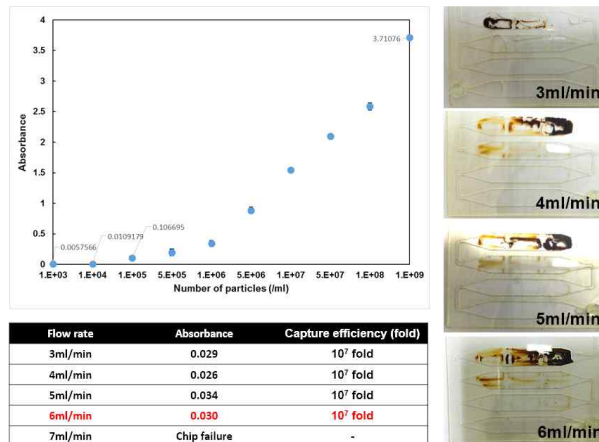


그림 126. 유속에 따른 노로바이러스 농축 실험 결과 및 사진

(2) 광열 효과 기반의 노로바이러스 RNA 추출용 미세유체칩 개발

- Micro-MACS 미세유체칩을 통해 내부에 농축된 노로바이러스에서 PCR 검출에 필요한 유전자를 추출하기 위해 Micro-MACS 칩과 이어지는 유전자 추출용 미세유체칩을 개발하였다. 이는 직선 형태의 간단한 미세유체 채널과 중앙에 용해 챔버가 포함된 구조이다. 마찬가지로 자성입자를 포획할 수 있도록 용해 챔버 하단면에 네오디뮴 자석을 조립하여 자기력을 가해주었다. Micro-MACS 칩에서 농축한 노로바이러스가 표지된 자성 입자를 추출용 칩으로 이송시킨 후 자기력에 의해 레이저 스팟인 용해 챔버로 재 농축하였다. 이처럼 2차적으로 농축된 자성입자와 노로바이러스를 532nm 레이저와 자성입자 사이의 광열 효과에 의해 순간적으로 발생하는 강한 열로써 노로바이러스의 세포막을 파괴시켜 용해하여

RNA를 추출한 뒤 노로바이러스의 RNA를 추출할 수 있었다. 자성 입자는 금 나노입자와 같이 금속 나노 입자와 마찬가지로 특정 파장의 레이저에 노출 될 경우 레이저에서 전달되는 에너지를 열 에너지의 형태로 변화하여 순간적으로 주변에 강한 열을 방출 할 수 있다. 따라서, 작은 챔버 속에 농축된 자성입자에 532nm 파장의 레이저를 조사하여 농축된 노로바이러스를 용해하고 RNA를 추출할 수 있다.

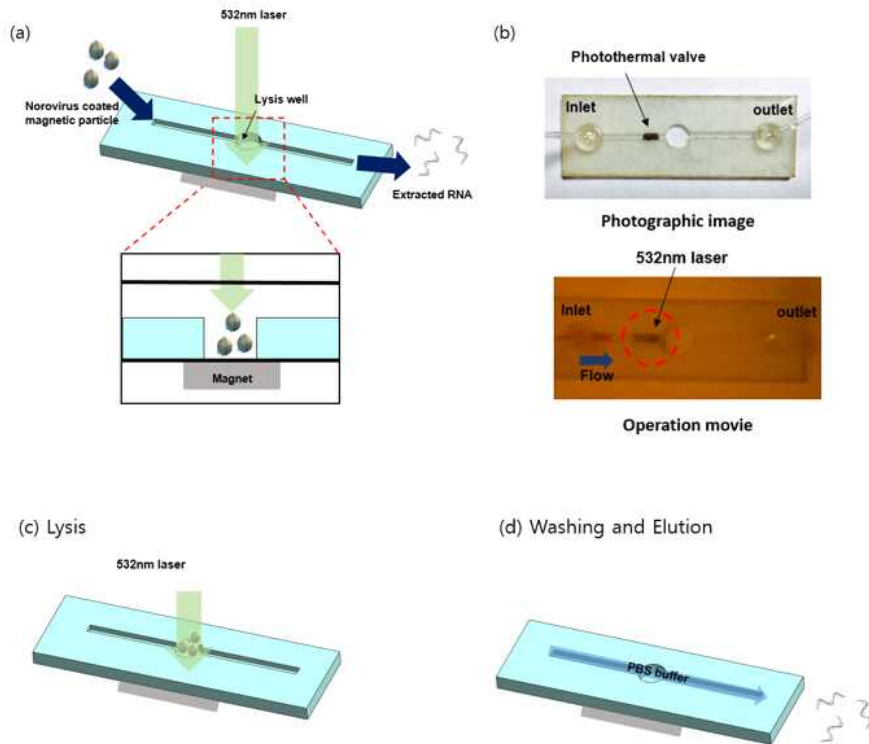


그림 127. 노로바이러스 RNA 추출용 미세유체칩의 개요

- 자성입자의 광열 효과를 이용하여 노로바이러스를 RNA를 효과적으로 추출하기 위해 실험에 사용된 자성입자의 광열 효과의 정성, 정량적인 실험을 진행하였고, 532nm 파장 레이저의 <sup>1)</sup>Intensity(W/cm<sup>2</sup>) 와 <sup>2)</sup>자성입자의 농도 (#/mL) 그리고 <sup>3)</sup>레이저 조사 시간에 따른 자성 입자 용액의 온도 변화를 측정하여 그래프로 나타내었다. 그래프에 따르면, 레이저 파워에 상관없이 레이저를 약 180초 이상 시료에 조사 할 경우 온도가 더 이상 증가하지 않고 일정 온도를 유지하였으며, 레이저 파워가 증가할수록 saturation 되는 온도가 점점 증가하였다.

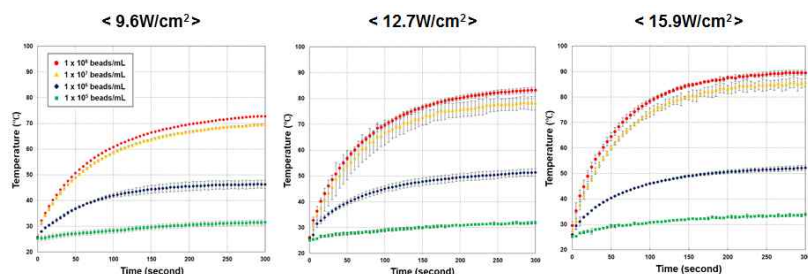


그림 128. 자성 입자의 농도 및 레이저 파워에 따른 주변 용액의 온도-시간 그래프

- 노로바이러스의 경우 문헌 조사결과 바이러스가 90%이상 inactivation 되기 위해서는 온도와 시간에 관계가 있는데, 60 °C에서 25분 이상, 80 °C에서 4.84분 이상, 100 °C에서 1.3 분의 시간이 소요되기 때문에 노로바이러스 내의 RNA를 효율적으로 추출하기 위해서  $10^8$  beads/mL의 농도로  $15.9W/cm^2$  파워의 532nm 레이저를 6분 30초 이상 조사하여야 한다는 결과를 얻을 수 있었다.
- 일반적으로, 바이러스의 RNA를 추출하는 방법으로 Magnetic silica beads 기반의 화학적 RNA extraction kit가 상업화되어 있다. 따라서, 기존의 Viral RNA extraction kits를 이용한 방법과 본 연구의 광열 효과 기반의 추출 방법을 비교하기 위해 각각의 방법으로 추출된 유전자를 통해 real-time PCR을 진행한 후 정량적 판단 기준으로 Threshold cycle (Ct) 값을 통해 비교하였다. (그림 6.) 아래 그래프에서 결과를 확인 할 수 있듯이, 기존 키트를 이용한 방법의 경우 Ct 값이 약 23, 광열 효과를 이용한 추출 방법의 경우 Ct 값이 약 33으로 광열 효과를 이용하였을 때 기존 방식보다 효율이 다소 떨어지지만 성공적으로 RNA를 추출 할 수 있음을 확인하였다. 이는 기존 키트를 사용할 시 약 1시간 정도 걸리며 번거로운 반복 과정이 필요하지만 미세유체칩에 주입하여 간단하게 추출 할 수 있으므로 큰 장점을 가진다. 또한, 레이저 조사 시간을 최적화하여 키트와 비슷하거나 더 뛰어난 농축 효율을 가질 수 있도록 이후 2, 3차년도에서 연구를 진행하였다.
- 또한, 1차년도에서는 개발한 Micro-MACS (농축용) 칩과 추출용 칩을 하나의 미세유체칩으로 통합하여 이송과정에서의 샘플 loss를 최소화하고 전체 프로세스를 최소화하기 위해 설계를 진행하였다. 그 모식도는 아래와 같으며 1차년도에서 설계한 아래 미세유체 칩을 기반으로 하여 차후 년도에서 통합 미세유체칩 개발을 진행하였다.

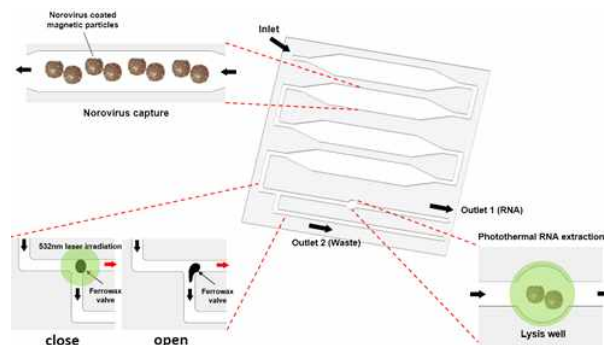


그림 129. 자성 입자의 농도 및 레이저 파워에 따른 주변 용액의 온도-시간 그래프

#### 나. 2차년도 세부 연구내용

##### (1) 미생물 농축 및 DNA 추출을 위한 통합형 미세유체칩 프로토타입 개발

- 1차년도에서 진행한 노로바이러스 농축 및 추출용 미세유체칩 개발에 이어 2차년도에서는 미생물의 농축 및 추출을 위한 미세유체칩 개발을 진행하였다. 타겟 박테리아 균주로는 일반적인 식품 유해 균주

인 E. coli, Salmonella를 선정하여 연구를 진행하였다. 이러한, 전염성 박테리아를 검출하기 위해서 마찬가지로 식품 내에 존재하는 저농도의 박테리아를 포획하고 소용량으로 농축 한 후에 유전자를 추출하는 전처리 과정이 필요하다. 이에 따라, 후단에서 이어지는 PCR의 검출 효율을 크게 향상 시킬 수 있다.

- 본 연구진이 기 개발하였던 기술은 Con A가 코팅된 자성입자와 병원균 시료를 미세유체칩 외부 튜브에서 15분동안 천천히 믹싱 시켜 준 후 병원균을 Con A와 충분히 결합시킨 후 미세유체칩으로 한 번에 주입하는 방식이었다. 하지만, 2차년도 연구에서 통합용 전처리 미세유체칩을 개발하기 위해 위와 같은 믹싱 프로세스를 미세유체칩 내부로 포함시킬 수 있는 방법에 대해 연구하였다.
- 직선형태의 미세유체 채널에서는 외력이 없을 경우 그 스케일에 의해 레이놀즈 수 (Reynolds number, Re)가 매우 낮기 때문에 일반적으로 규칙적인 흐름인 층류 (laminar flow)가 일어나지만, 곡선형태의 채널, 좁아졌다 넓어졌다를 반복하는 orifice형태의 채널을 통해 불규칙적인 흐름인 난류 (turbulent flow) 혹은 와류 (vortex)를 유발할 수 있다. 이런 난류 유동을 통해 채널 내부의 유체를 섞어주는 micro-mixer 역할을 수행할 수 있으며 유체 내부의 입자들의 접촉 확률을 크게 증가 시킴으로써 결합을 촉진 할 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 박테리아와 자성입자의 결합 효율을 늘리고 시간을 단축시킬 수 있는 믹서 구조 설계를 진행하였으며 믹싱 효율을 확인하기 위해 빨간색 형광 입자와 파란색 형광입자를 이용하여 혼합 효율 연구를 진행하였다.
- 커브 형태의 미세유체 채널은 채널에서 수직으로 수직면 방향으로 Dean vortices가 발생하고 좁아지고 넓어지는 orifice 형태의 채널에서 수평면 방향으로 Expansion vortices가 발생한다.

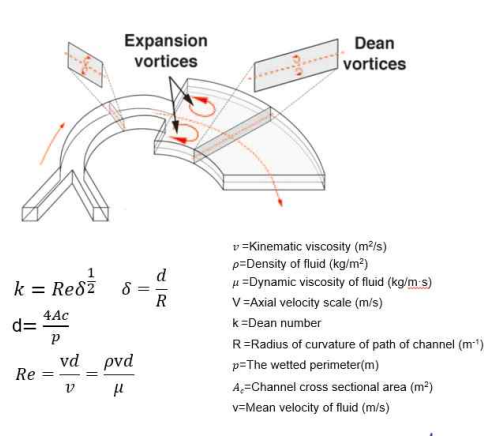


그림 130. 미세유체채널에서의 다양한 유체 혼합 원리의 개요

- 위의 구조로 인해 발생한 vortex에 의해서 서로 다른 두 유체가 혼합되는데 두 유체를 효과적으로 혼합하기 위해서는 Dean number ( $k$ ) 값이 10 이상을 만족하여야 한다는 기존 연구 결과에 따라 미세유체채널 설계를 진행하였다. Dean number는 유속이 증가할수록 증가하는데 유속 50  $\mu$ l/min ( $k = 7.39$ ), 200  $\mu$ l/min ( $k = 29.57$ )에서 실험을 진행하였다. 두 개의 미세유체칩 inlet에 빨간색 형광입자와 파란색 형광입자를 각각 주입하여 실험을 진행하였으며 채널의 높이 50  $\mu$ m, 좁은 채널 폭 500  $\mu$ m, 넓은 채널 폭 500  $\mu$ m 곡률반경 600  $\mu$ m 로 설계하였다.



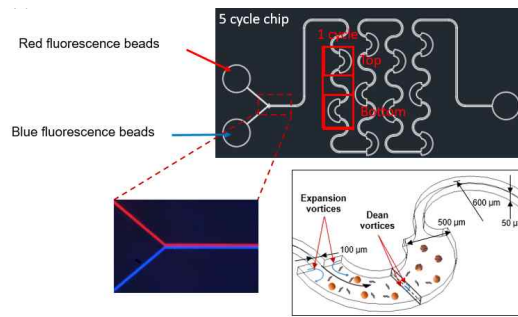


그림 131. 서로 다른 두 유체의 혼합을 위한 믹싱 채널의 개요 및 각 구조의 크기

- 유속이 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  일 때 cycle 1에서 유체가 섞이지 않고 주입한 위치의 유체의 streamline을 따라 이동하고 있으나 cycle 4부터 두 유체가 혼합되기 시작하면서 보여지는 색깔변화를 확인할 수 있다. 또한, 유속이 증가할수록 높은 믹싱 효율을 보이며 혼합되기 시작하는 cycle 이 앞당겨지는 결과를 나타내었다.

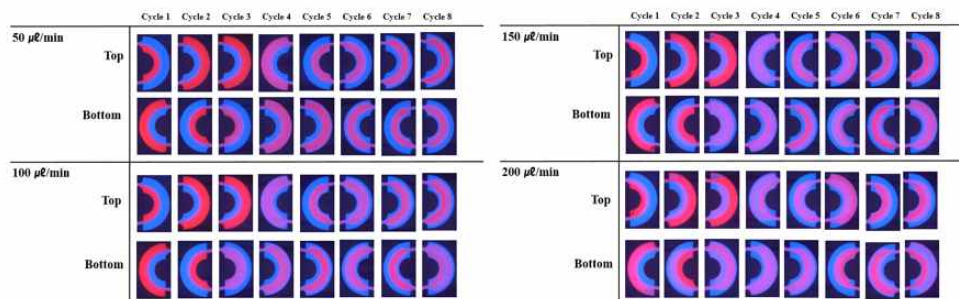
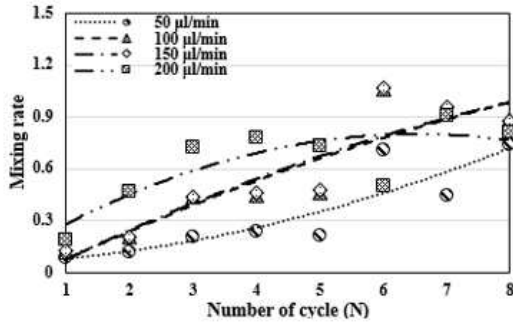


그림 132. 형광 입자를 이용한 유속에 따른 미세유체채널에서의 혼합 효율 확인

- 위의 형광 사진을 통해 이미지 분석 툴인 ImageJ를 이용하여 채널 내에 유체가 얼마나 확장 되는지를 확인하여 믹싱 효율 (Mixing rate)을 계산하였다. 유속이 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ , 150  $\mu\text{l}/\text{min}$ 에서 다른 유속보다 효율이 높게 측정 되었고 cycle 4 이상 6 부터는 혼합률이 saturation 되는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서, 유속이 증가할수록 saturation 되는 cycle이 감소하는 것을 확인하였고 완전히 혼합된 이후에도 박테리아와 자성입자가 충분히 반응하여 결합할 incubation 시간을 최대화하기 위해 15 cycle 이상의 채널을 필요로 할 것으로 판단하였다.

(a) Red fluorescent particles



(b) Blue fluorescent particles

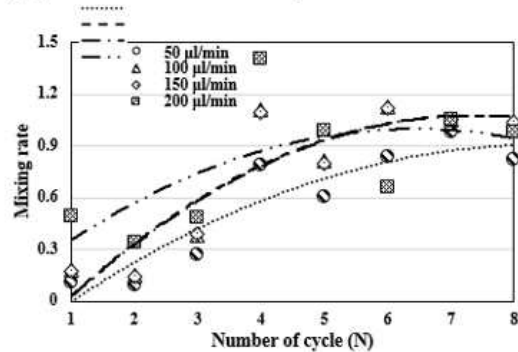


그림 133. 믹서 구조 cycle 수에 따른 (a) 빨간색 형광 입자, (b) 파란색 형광입자의 믹싱 효율 변화

- 또한, MACS 채널의 경우 최대한 많은 양의 박테리아를 농축하기 위해서는 최대한 많은 양의 박테리아를 농축하기 위해서는 긴 챔버 채널이 필요하지만, 본 연구에서는 이후 농축된 박테리아를 가열하여 DNA를 추출하기 위한 용도도 있기 때문에 채널의 최종 부피를 감소시키는 설계가 중요하였다. 따라서, MACS 채널을 stage 1개에서 4개까지 나누어 각각의 자성입자 포획 효율 실험을 진행하였으며 inlet에서의 자성입자 농도는 105 beads/mL, 주입 유속은 100 µl/min 으로 진행하였다.

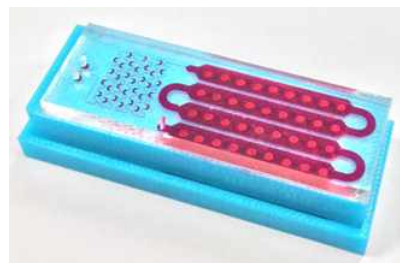


그림 134. 자석홀더와 결합된 통합 미세유체칩 프로토타입

- 자성입자의 농도와 흡광도의 선형적 관계에 따라 standard curve를 통해 inlet에서의 흡광도와 outlet으로 배출된 시료의 흡광도의 차이를 측정하여 미세유체칩 내부에 농축되는 자성입자의 농도를 역산하여 농축 효율을 측정하였다.

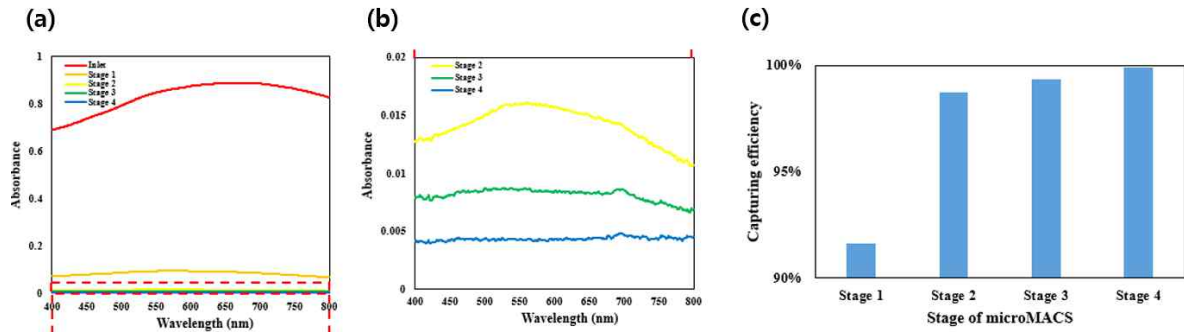


그림 135. (a,b) MACS 챔버 개수에 따른 outlet으로 배출된 시료의 흡광도 변화 (c) MACS 챔버 개수에 따른 캡처 효율 측정

## (2) Con A 와 자성입자의 결합 프로토콜 정립

- 본 연구에서 자성입자와 Con A를 결합시키기 위해 일반 자성입자와 Con A 용액을 섞어 천천히 반응시키는 방법을 사용하였지만 통합형 미세유체칩에서 믹서 구조를 통해 빠르게 결합시키기 위해 자성입자와 Con A 사이에 흡착력이외에 화학적인 바인딩 물질을 필요로 하였다. 따라서, 표면에 카르복시기 (carboxyl group,  $-\text{COOH}$ )가 결합되어 있는 자성입자를 기반으로,
- EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) 와 같은 Carbodiimides 계열 zero-length crosslinkers를 사용하여 결합 시키는 연구를 진행하였다.
- 먼저, (1) pH 5인 Phosphate buffer saline (PBS)에 400mM의 EDC와 100mM의 NHS (N-Hydroxysuccinimide)를 첨가하였다. 그리고, (2) 특정 농도의 자성 입자 용액을 1:1 부피 비율로 첨가한 후 자성 입자가 중력에 의해 가라앉지 않을 정도로만 가볍게 흔들며 2시간 동안 반응 시킨 후 (3) 10mg/mL 농도의 Con A 용액을 첨가하고 4 °C에서 500 rpm으로 overnight incubation을 진행하여 최종적으로 Con A가 자성 입자 표면에 결합 하는 것을 확인하였다. 그리고 난 후, 박테리아와 Con A가 결합된 자성입자를 반응 시키기 위해 자석 분리를 이용하여 자성 입자의 버퍼를 pH 7.4의 PBS로 전환한 후 미세유체칩에 주입하였다.

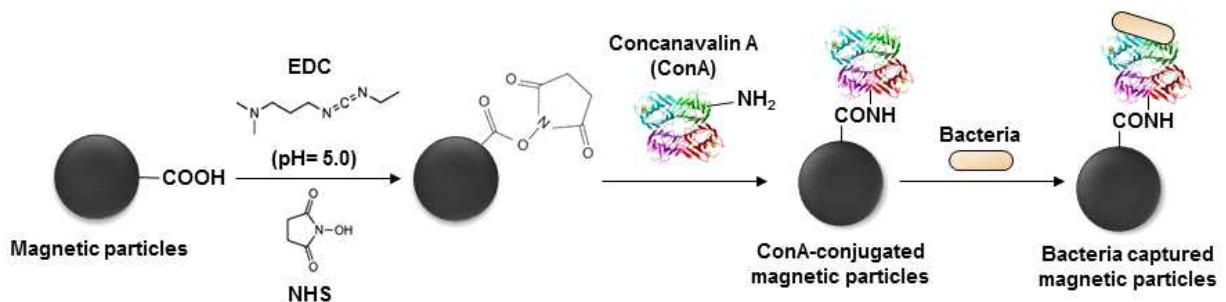


그림 136. EDC/NHS activation을 통한 Con A 와 자성입자의 결합 방법

## (3) 미세유체칩을 이용한 박테리아 농축 및 추출 실험

- 위 연구에서 개발한 자성입자와 Con A를 conjugation 시킨 후 자성 입자를 이용하여 박테리아 샘플과

결합을 유도하였다. 그 후 미세유체칩으로 주입하여 미세유체칩으로의 주입 유속에 따른 자성입자의 농축 실험을 진행하였고 박테리아의 농도를 확인할 수 있는 600nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 농축 효율을 확인 하였다. *E. coli*와 Con A conjugated 자성입자 (이하 ConA-MP)를 튜브에서 15분간 간헐적으로 흔들어주며 반응 시킨 뒤 1차년도에서 개발한 농축용 미세유체칩을 통해 농축 효율 확인 실험을 진행하였다. 결과를 분석해 보았을 때, 유속이 증가할수록 빠른 유속으로 인해 shear force가 높아지게 되어 자기력에 의해 캡처되지 못하고 채널을 빠져나가 결과적으로 outlet으로 배출되는 자성입자가 많아지게 된다. 따라서 농축효율을 감소하지만 그 영향은 미세하여 1-3 ml/min 의 유속 조건에서는 평균 81%의 농축효율을 측정하였다.

Sample	Flow rate (mL/min)	Before	After	Enrichment efficiency(%)
<i>E. coli</i>	1	2.788	0.5064	81.84
	2	2.788	0.5045	81.90
	3	2.788	0.5270	81.10

그림 137. 유속별 박테리아 농축 효율

- 또한, *E. coli*와 *S. typhimurium*를 미세유체칩을 통해 농축 한 뒤 용해 후 추출 실험 또한 진행하였으며 박테리아를 1/10 씩 희석해가며 농도별 샘플에 따라 가열을 통한 박테리아 유전자 추출효율을 측정 하였다. 추출된 DNA는 Qubit 3.0 Fluorometer 장비를 통해 형광으로 측정되었으며, DNA 농도는 박테리아의 농도가 감소할수록 추출된 유전자의 농도또한 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 열 에너지를 통해 세포막을 파괴하여 내부 유전자를 추출할 수 있음을 확인하였다.

(CFU/ml)	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>
<i>S.typhimurium</i>	1566 ng/ml	132 ng/ml	19.4 ng/ml
<i>E.coli</i>	2760 ng/ml	163 ng/ml	27.8 ng/ml

그림 138. 박테리아 (*E. coli* , *S. typhimurium*) 농도별 유전자 추출량

- 본 연구에 사용한 자성 입자는 지름이 2  $\mu\text{m}$  이므로 수치상으로 1  $\mu\text{m}$  지름의 박테리아가 최대 16개까지 결합할 수 있을 것으로 계산되었는데, 따라서 10<sup>8</sup> 개의 자성입자에 최대 1.6 $\times$ 10<sup>9</sup> 개의 박테리아가 결합이 가능할 것으로 예상되었다. 또한, 두 박테리아의 경우 600nm 파장에서 측정한 흡광도 (OD<sub>600</sub>) 가 1.0 일 때, 약 10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup> CFU/mL 의 농도를 가지는 것으로 콜로니 계수를 통해 확인하였다. 실험에 사용된 자성입자의 개당 부피는 4.19 $\times$ 10<sup>-9</sup> mm<sup>3</sup> 으로써 박테리아 농축 후 추출 할 경우 최종 부피에 따라 용해 효율이 차이날 것으로 예상되어 각각의 박테리아를 부피에 따라 유전자 추출 실험을 진행하였을 때 부피당 DNA 총량이 50  $\mu\text{L}$ 의 샘플을 용해하였을 때 적게 측정되었다.

▪ E.coli

Lysis Volume( $\mu$ l)	DNA concentration(#/mL)	DNA amount(ng)
50	1460	73
200	1650	330

▪ Salmonella

Lysis Volume( $\mu$ l)	DNA concentration(#/mL)	DNA amount(ng)
50	1650	82
200	692	138

그림 139. Lysis volume 에 따른 유전자 추출 효율 변화

- 확인된 최소 용해 부피에 따라서 농축 및 유전자 추출용 미세유체칩의 최종 추출 부피를 270  $\mu$ L로 설계하였으며 미세유체 채널의 최적화를 위해 MACS 챔버의 개수를 1개에서 5개까지 증가시켜가면서 농축 효율을 측정하였다. 농축 효율은 이전 연구결과와 마찬가지로 흡광도를 통해 측정되었고 1mL/min 으로 유속으로 총 10mL의 부피를 주입하였다. 그 결과 챔버 개수가 1개일 때 흡광도가 다른 칩의 약 세 배 이상 높은 것으로 보아 손실되는 미생물의 양이 가장 큰 것으로 나타났다. 따라서, outlet으로의 손실을 최소화하고 처리량을 증가시킬 수 있도록 챔버 개수가 2개인 미세유체칩을 사용하기로 결정하였다.

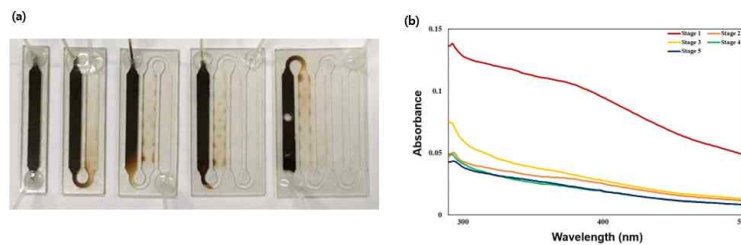


그림 140. MACS 챔버 개수에 따른 자성입자-박테리아 농축 결과 사진과 흡광도 스펙트럼

- 또한, 미세유체칩으로 주입되는 유속에 따른 자성입자의 캡처 효율을 비교하기 위한 연구를 진행하였다. 총 10mL의 자성입자 용액을 1~5 mL/min의 유속으로 주입한 후 흡광도를 통해 배출구에서의 자성입자 농도를 비교하여 농축 효율을 측정하였다. 아래에서 볼 수 있듯이, 1mL/min의 유속으로 주입하였을 때 손실을 최소화하고 약 100%에 가까운 포획 효율을 나타내었고 유속이 증가함에 따라 outlet으로의 손실이 증가하고 빠른 유속으로 인해 칩의 안정성이 감소하였다.

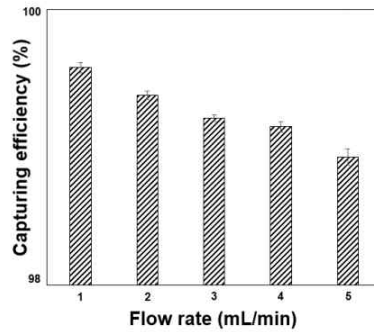


그림 141. 유속에 따른 미세 유체칩의 자성 입자 캡처 효율

- 또한, 본 연구에서 실험에 사용한 미생물의 용해 효율을 real-time PCR을 통해 측정하기 위해 *E. coli* 와 *S. enterica* 두 종의 박테리아에 적절한 프라이머 디자인 및 PCR 조건 설정에 관한 실험을 진행하였다. (1) *invA for1*+ *invA rev1*, (2) *invA for3* + *invA rev3*, (3) ECA75F + ECR619R, 그리고 (4) 16E1 + 16E2 의 총 4가지 프라이머 세트를 사용하여 real-time PCR의 안정성을 테스트하였다. 타겟 미생물의 qPCR을 통해 정량 테스트를 진행하기 위해 미생물의 농도를 1/10 씩 희석하여 농도에 따른 PCR 검사를 진행하였다. PCR 결과 *S. enterica* 균에 특이적인 프라이머 2종의 경우 negative control에서 커브가 발생하였고 *invA for1* + *invA rev1* 프라이머 세트의 경우 농도별 Ct값 차이가 크지 않아 정량화에 부적합하고 *invA for3* + *invA for3* 프라이머 세트의 경우 농도별 Ct값 차이가 정량화하기에 적절한 수치로 확인되었다. 또한, *E. coli* 특이적인 프라이머 세트인 ECA75F + ECR619R 프라이머 세트의 경우 모든 경우 커브가 되지않아 실험에 사용한 균주와 겹치는 서열이 없는 것으로 확인되었고 16E1+ 16E2 프라이머 세트의 경우 *invA for1* + *invA rev1* 프라이머 세트와 마찬가지로 프라이머 크기가 real-time PCR용 프라이머 보다 큰 편에 속해 더 작은 크기의 프라이머 세트 설계가 필요한 것으로 판단되었다.

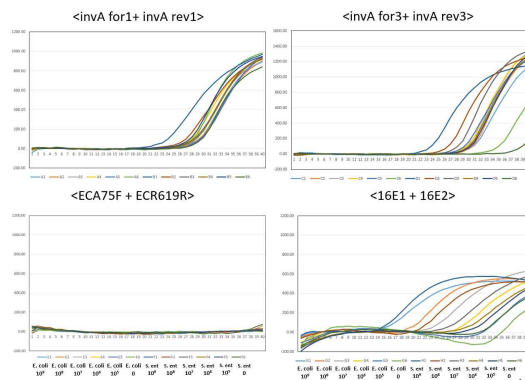


그림 142. 프라이머 세트 종류에 따른 미생물 농도별 real-time PCR 결과

다. 3차년도 세부 연구내용

- (1) 믹서 구조를 포함한 전처리용 통합 미세유체칩 개발 및 자동화 장비와의 연계

- 2차년도에서 개발한 작은 스케일에서의 통합형 미세유체칩 프로토타입을 기반으로 식품 위해 마커 전처리 및 검출에 적합한 대용량의 통합형 미세유체칩을 설계하였다. PDMS 미세유체칩의 마이크로 스케일의 채널 구조 크기를 PMMA 기반의 대용량 미세유체칩으로 설계하면서 믹서 구조의 Reynolds number와 Dean number를 변경하며 믹싱 채널의 설계를 진행하였다. 믹서 구조의 경우 넓어지고 좁아지는 orifice 구조의 구조를 변경하여 시뮬레이션을 통해 최적의 믹서 디자인을 도출하였다. 그 결과 채널의 높이는 1,000 $\mu$ m, 채널 반경이 7,500 $\mu$ m으로 변경하였을 때 Dean number (k) 가 유속이 1ml/min 일 때는 12.15, 유속이 5ml/min 일 때 60.74로 빠른 믹싱이 가능함을 확인하였다.

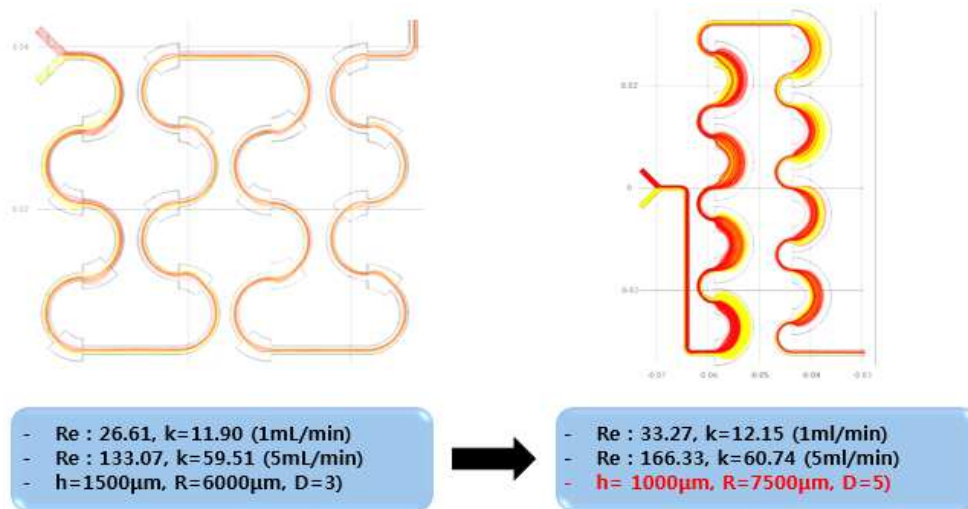


그림 143 컴퓨터 시뮬레이션을 통한 미세유체칩 믹서 구조의 최적화

- 따라서, 위에서 최적화한 믹서 구조를 포함하는 대용량의 전처리용 미세유체칩을 설계하였으며 따라서 본 연구에서는 박테리아와 Con A conjugated MP (ConA-MP)의 급속한 혼합, 자성 농축 그리고 열 용해를 포함하는 식품 위해 박테리아 및 바이러스용 전처리 미세유체칩을 개발하였다. 본 연구를 통해 개발한 미세유체칩은 총 3단계로 구성되어 있는 통합 전처리 칩이며 자동화 장비에 적합하도록 설계되었다.
- 첫 번째 단계로써는 각각 2개의 inlet으로 주입되는 ConA-MP와 병원균이 급격하게 혼합되면서 결합할 수 있게 하는 믹싱 채널이 있다. 이후 믹싱 채널을 통과하며 결합된 자성입자와 병원균 결합체는 최적화된 2개의 MACS 챔버를 통과하게 된다. 이 MACS 챔버 구조의 상/하단에는 block형태의 네오디뮴 자석으로 이루어진 자석 어레이가 각각 조립되어 채널 내부에 강력한 자기력을 미치고 이로써 자성입자는 채널 내부에 효율적으로 포획, 농축될 수 있다. 모든 박테리아 시료가 주입 되면 조립된 자석 어레이 2개를 모두 분리하고 inlet으로 washing buffer 주입하여 미세유체칩의 가장 말단에 있는 3번째 단계인 용해 챔버로 2차 농축이 이루어진다. 용해 챔버에 농축된 자성입자가 모두 모이게 되면 inlet과 outlet을 완전히 밀폐한 후 미세유체칩의 하단에서 열을 가해 용해 챔버 내에서 유전자를 추출할 수 있도록 하였다.

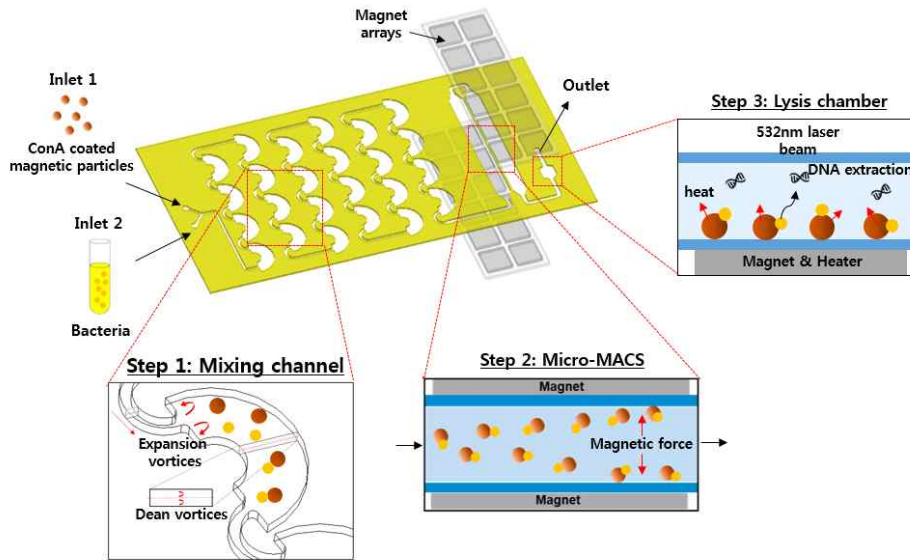


그림 144. 전처리용 통합 미세유체칩의 개요도

- 또한, 미세유체칩으로 주입하기 전 Con A와 자성입자를 conjugation 시키는 기존의 프로토콜을 보완, 수정하여 기존 10시간 정도 소요되는 과정을 30분으로 단축하는 성과가 있었다. 기존 프로토콜에서 EDC 이외에 NHS를 추가하는 과정을 생략하고 최적화된 농도로 EDC와 ConA를 빠르게 섞어주면서 반응을 촉진하였다. ) 아래 그림의 프로토콜을 간략히 서술하면, 카르복실기가 발현되어 있는 자성 입자를 pH5 PBS 용액에  $10^7$  #/mL 농도로 첨가 한 뒤 자성입자 1mL 당 EDC (pH5 PBS, 10mg/mL) 0.5mL, ConA (pH5 PBS, 10mg/mL) 8.5mL을 섞어주어 상온에서 가볍게 섞어주면 15분간 반응 시킨다. 이후 자석으로 용액 내 ConA가 코팅된 자성입자를 분리하고 남은 용액을 버린 뒤 pH7 PBS로 옮겨 준다.

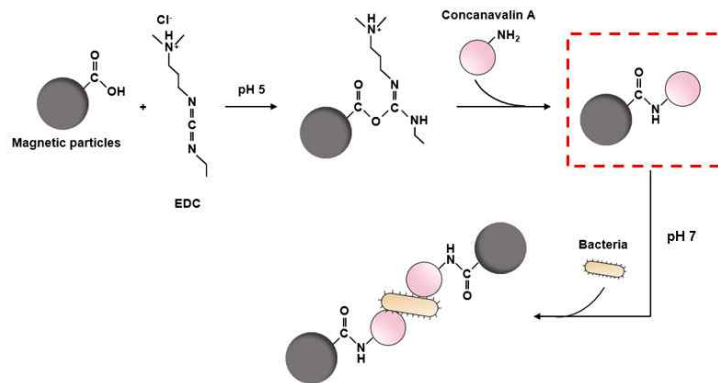


그림 145. 최적화 자성입자와 Con A conjugation 프로토콜

- 그리고 미세유체칩 내 첫 번째 단계인 믹서 구조의 혼합 성능과 Con A-MP와 박테리아 결합 촉진 성능을 확인하기 위해 먼저 튜브 상에서 반응 시간에 따른 박테리아가 ConA-MP에 결합 효율을 측정하였다. 결합 효율을 박테리아의 농도를 확인할 수 있는 600nm 파장의 흡광도 (OD600)를 통해 측정하였다. 반응 전 각 박테리아의 농도를 흡광도를 통해 측정하고 반응 후에 자석으로 자성 입자를 분리한 뒤 남은 시료의 흡광도를 측정하여 차이를 비교하는 것으로 결합 효율을 측정하였다. 그리고 Con A는 대



부분의 박테리아와 결합 할 수 있는 비특이적인 결합 물질이기 때문에 타겟 박테리아를 대폭 늘려 총 4종 (*E. coli*, *S. enterica*, *S. aureus*, *B. cereus*)을 테스트 하였으며 반응 후 각각 1, 5, 10, 15, 20분 간격으로 분리하여 시간에 따른 결합 효율을 측정하여 그래프로 나타내었다.

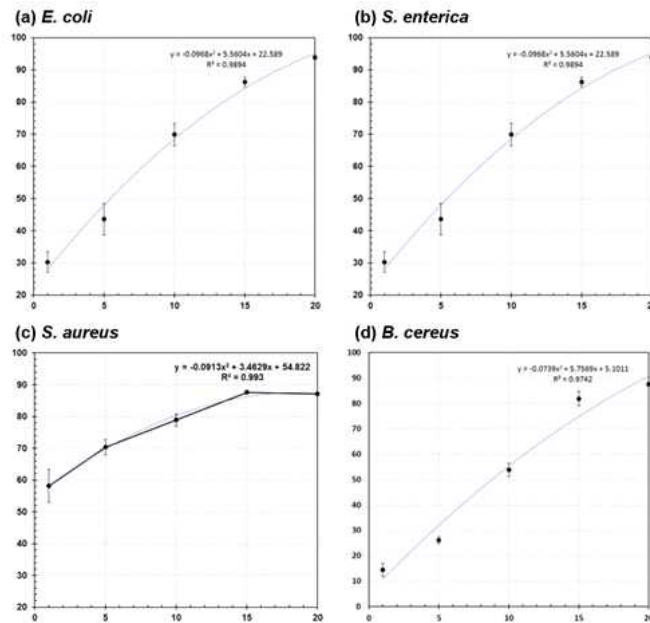


그림 146. 반응 시간에 따른 4종 박테리아의 Con A와의 결합 효율 측정

- 그리고, 결합하지 않은 ConA-MP와 박테리아를 각각 미세유체칩에 주입하여 믹싱 채널을 통해 결합시켰을 때의 결합 효율을 측정해보았다. 다만, 이때는 미세유체칩의 후단에 포함되어 있는 MACS 챔버와 용해 챔버에서 자성 분리를 진행하지 않고 믹싱 챔버만 통과하여 outlet으로 배출된 시료를 모아 튜브 상에서 자석을 통해 분리함으로써 튜브상 결합 효율 결과와 비교할 수 있도록 실험을 진행하였다. 그래프에서 볼 수 있듯이, 튜브상에서 15분 이상 반응시켜야만 80 - 90%의 결합효율을 나타내는 반면 미세유체칩에서는 유속을 증가시킬수록 채널내부에 발생하는 vortex가 더욱 활발해져 결합을 촉진하기 때문에 유속이 증가할수록 결합효율이 증가하는 것으로 확인되었다. 또한, 믹싱 채널 내부를 통과하는데 걸리는 시간인 불과 20초 정도로도 약 90%의 결합효율을 보이는 것으로 측정되었다.

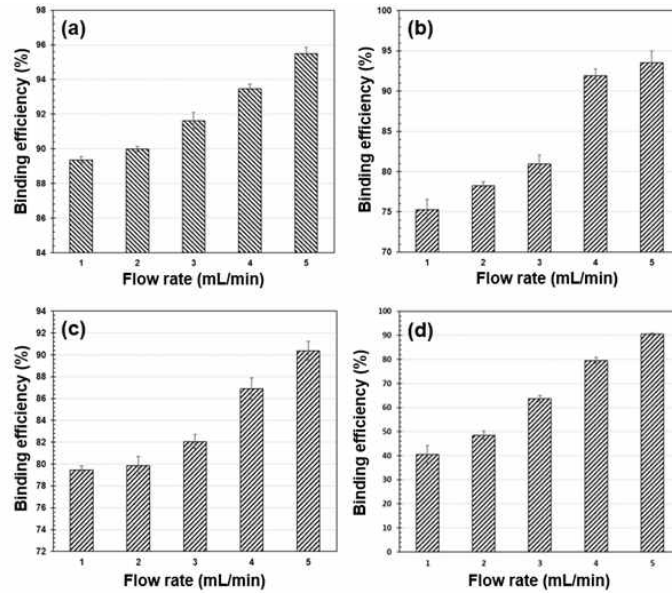


그림 147. 믹싱 채널을 통한 유속별 ConA-MP 와 박테리아의 결합효율 비교 (a) *E. coli*, (b) *S. enterica*, (c) *S. aureus*, (d) *b. cereus*

- 믹싱 채널의 성능을 확인한 후 마찬가지로 미세유체칩의 각각에 인렛에 박테리아와 ConA-MP를 따로 주입한 뒤 MACS 챔버를 통해 농축시킨 후 농축 효율을 측정하였다.

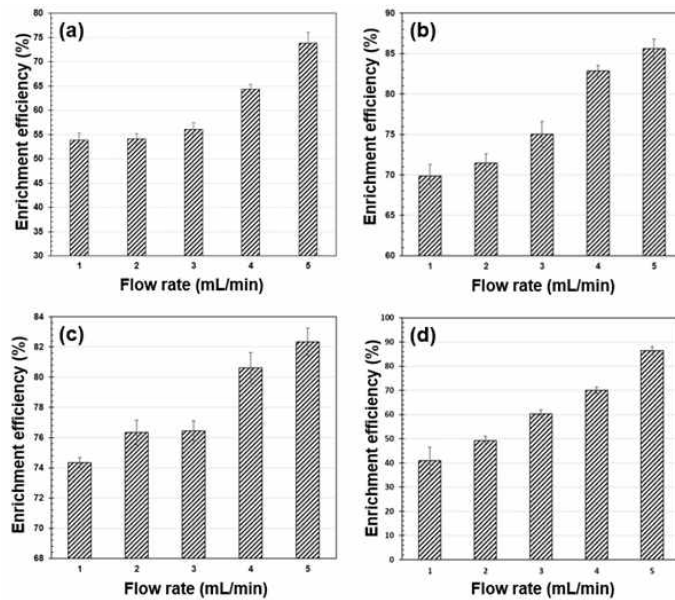


그림 148. 미세유체칩을 통한 유속별 박테리아의 농축 효율 비교 (a) *E. coli*, (b) *S. enterica*, (c) *S. aureus*, (d) *b. cereus*

- 위 결과 또한 마찬가지로 흡광도를 통해 비교하였으며 유속에 따라 채널을 통과하는 시간을 계산하여 튜브상에서의 결합 효율과 비교하였으며 이를 통해 농축률을 산정하였으며 이를 표로 정리하였다. 기존 결과에 따르면 유속이 증가할수록 채널 내부에 가해지는 전단력이 크게 상승하기 때문에 자기력으로

포획되지 못하고 outlet으로 손실되는 자성입자가 많은 것으로 보였지만, 빠른 유속으로 인해 vortex가 느린 유속에 비해 훨씬 활발하게 생성되고 이에 따라 믹싱 채널내부에서 박테리아와 자성입자가 접촉하는 횟수가 급격하게 증가하여 결합 효율이 크게 증가한 것이 유속이 증가할수록 농축률이 증가하는 큰 원인으로 분석된다.

Strain	Flow rate (mL/min)	Passing time (min)	Binding efficiency (%)	Binding efficiency (%)	Enrichment fold
<i>E. coli</i>	1	1.500	29.197	89.365	3.060
	2	0.750	27.798	89.990	3.237
	3	0.500	27.346	91.628	3.351
	4	0.375	27.123	93.475	3.446
	5	0.300	26.990	95.494	3.538
<i>S. enterica</i>	1	1.500	30.712	75.250	2.450
	2	0.750	26.705	78.244	2.930
	3	0.500	25.345	80.938	3.193
	4	0.375	24.661	91.916	3.727
	5	0.300	24.248	93.513	3.856
<i>S. aureus</i>	1	1.500	59.811	79.451	1.328
	2	0.750	57.368	79.875	1.392
	3	0.500	56.531	82.047	1.451
	4	0.375	56.108	86.891	1.549
	5	0.300	55.853	90.362	1.618
<i>B. cereus</i>	1	1.500	13.570	40.530	2.987
	2	0.750	9.377	48.485	5.170
	3	0.500	7.961	63.636	7.993
	4	0.375	7.250	79.545	10.972
	5	0.300	6.821	90.530	13.271

표 8. 유속에 따른 반응 시간 대비 결합 효율 및 농축률 측정

- 이후 모든 시료를 주입한 후 박테리아가 성공적으로 MACS 챔버에 농축되면, MACS 챔버의 상하단에 연결되어 있던 자석 어레이를 분리하고 워싱 버퍼(PBS)를 주입하여 농축된 자성입자를 밀어주어 통합 미세유체칩의 3단계 과정인 용해 챔버에 2차적으로 농축한다. 이 때, 용해 챔버의 하단에는 네오디뮴 자석을 부착하여 자기력으로 농축 될 수 있게 한다. 이후 농축된 자성입자가 모두 용해 챔버에 모이면 유체 및 내부 입자의 유동을 방지하기 위해 inlet과 outlet의 튜브를 막아 채널 내부를 밀폐시킨 후 용해 챔버의 하단면에서 95 °C 로 15분동안 가열하여 유전자를 추출하였다. 이 후 용해가 완료된 후 챔버 내로 1mL 주사기 바늘을 주입하여 약 200 µL를 추출한 뒤 그 샘플을 이용하여 real-time PCR을 진행하였다.

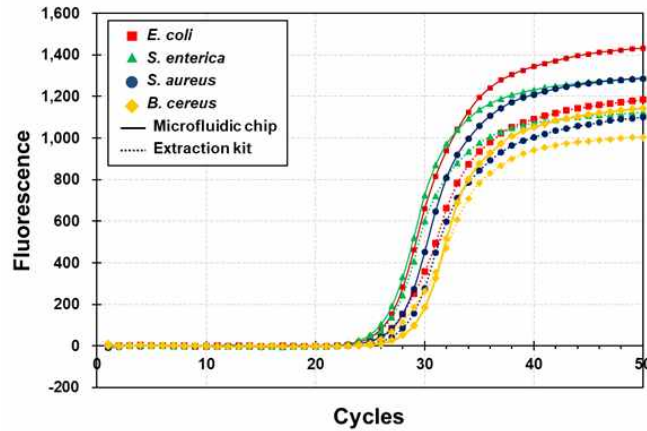


그림 149. 전처리용 통합 미세유체칩을 통해 추출한 박테리아 유전자 샘플의 real-time PCR 결과

- 또한 이를 사용화된 유전자 추출 키트와 성능을 비교하기 위해 측정된 농축률을 기반으로 계산한 박테리아 농도와 동일한 농도의 박테리아 시료를 준비하여 상용화된 화학적 박테리아 유전자 추출 키트를 이용한 유전자 추출 결과와 비교하였다. 미세유체칩을 통해 바인딩, 농축, 추출까지 진행한 시료는 실선으로 표기하였고 농축된 시료와 동일한 농도를 준비하여 유전자 추출 키트로 유전자를 추출한 경우의 결과는 점선으로 표기하였다. 또한, 아래 real-time PCR 결과의 Ct 값을 통해 분석해보았을 때 각각의 박테리아의 경우 전처리용 미세유체칩을 통한 경우에 유전자 추출 키트를 통한 경우보다 약 1.38 (*E. coli*), 0.49 (*S. enterica*), 1.02 (*S. aureus*) 사이클을 단축 시켰으며 이는 미세유체칩을 통한 전처리 및 추출이 훨씬 간편하고 시간을 약 30분 이상 단축시키는 데에 비해 큰 성과라고 할 수 있다. 반면, *B. cereus*의 경우 약 0.28 사이클이 뒤로 밀리는 것을 확인하였는데 이는 Gram positive 박테리아의 특성상 다른 박테리아에 비해 열에 강한 특성을 띄기 때문인 것으로 보인다. 하지만 매우 근소한 차이로 편의성과 시간 단축에 큰 의미를 가진다고 판단된다.

Strain	Iteration	Threshold cycles (C <sub>t</sub> )	
		Microfluidic chip	Extraction kit
<i>E. coli</i>	1	27.31	30.19
	2	28.49	27.61
	3	28.15	30.29
	Average	27.98±0.25	29.36±0.62
<i>S. enterica</i>	1	26.82	30.19
	2	28.07	28.02
	3	28.20	28.38
	Average	27.70±0.31	28.19±0.07
<i>S. aureus</i>	1	28.84	29.92
	2	28.52	29.25
	3	29.71	31.08
	Average	29.02±0.25	30.08±0.38
<i>B. cereus</i>	1	30.37	31.61
	2	31.04	31.66
	3	30.57	27.87
	Average	30.66±0.14	30.38±0.89

그림 150. 4종 박테리아의 미세유체칩 전처리와 추출 키트 이용시 Ct 값 차이

## (2) 냉면 육수 내의 미생물 전처리 연구

- 본 과제를 통해 개발한 전처리용 통합 미세유체칩이 실제 식품 시료 내에 존재하는 미생물을 농축하고 추출하여 최종적으로 real-time PCR을 통해 검출 할 수 있는지 검증하기 위해 식당에서 판매하는 물냉면의 육수를 일부 채취한 후 실험을 진행하였다. 부득이하게 일반적으로 시중에 판매되는 냉면 육수는 관련 검사 기관의 검사를 통과한 제품들로 전염성 박테리아들이 존재하는 시료를 확보하기 힘들기 때문에 냉면 육수에 이전 실험을 진행하였던 4가지 박테리아를 스파이킹 한 후 미세유체칩을 통해 전처리과정을 진행하였다.
- 아래와 같이 실험에 사용된 박테리아와 동일한 농도의 시료를 냉면 시료에 스파이킹 한 후 같은 조건으로 미세유체칩에 주입하였다. 이어서 추출된 유전자를 real-time PCR을 통해 실험을 진행하였지만 현저히 PCR 결과의 Ct 값이 증가하는 결과를 얻었고 이는 충분히 농축되지 못함으로 판단되었다. 원인을 분석한 결과, 본 연구에서 자성입자와 박테리아의 결합 매개체로 사용되는 Con A는 중성 조건에서는 4량체로 존재하지만 산성 조건에서 2량체로 분리되어 존재하는 것으로 알려져있다. 하지만, 실험에 사용한 냉면 육수는 측정결과 pH가 약 3.8~4.0 인 산성 시료로 ConA와 박테리아간 결합력이 약 50% 이상 감소된 상태이다. 따라서, NaOH를 통해 냉면 육수를 pH 7로 중화시킨 후 동일 전처리를 반복하였다. 그 결과 중화 시킨 경우 그렇지 아니한 경우보다 Ct 값이 각각 5.17 (*E. coli*), 3.68 (*S. enterica*), 3.8 (*S. aureus*), 3.47 (*B. cereus*) 사이클이 감소한 것으로 보아 농축 효율이 크게 차이나는 것으로 확인하였다.

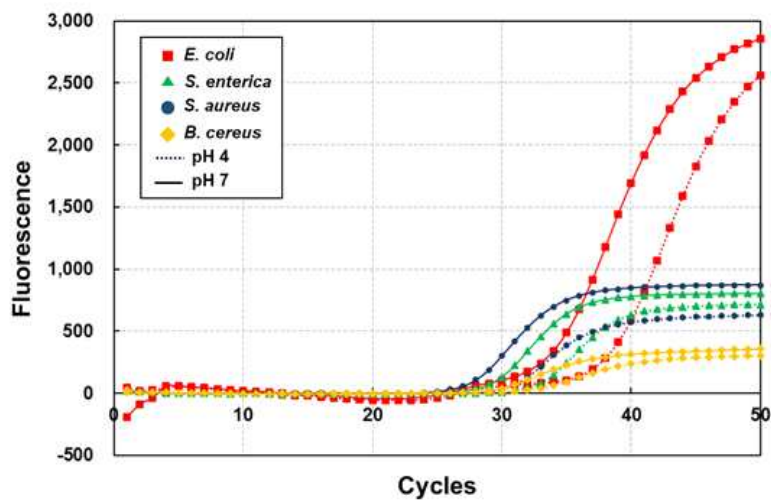


그림 151. 냉면 육수에 박테리아 4종을 스파이킹 한 후 미세유체칩을 통해 전처리하였을 때 real-time PCR 결과 그래프

Strain	Iteration	Threshold cycles (C <sub>t</sub> )	
		pH 4	pH 7
<i>E. coli</i>	1	34.52	31.42
	2	36.60	28.81
	3	34.68	30.05
	Average	35.26±0.47	30.09±0.53
<i>S. enterica</i>	1	31.13	27.89
	2	31.83	27.88
	3	32.00	28.13
	Average	31.65±0.19	27.97±0.06
<i>S. aureus</i>	1	33.56	29.42
	2	33.40	29.78
	3	33.25	29.62
	Average	33.41±0.06	29.61±0.07
<i>B. cereus</i>	1	34.89	31.85
	2	35.50	32.03
	3	36.00	34.08
	Average	35.46±0.46	31.99±0.05

그림 152. 냉면 육수에 박테리아 4종을 스파이킹한 후 미세유체칩을 통해 전처리하였을 때 real-time PCR 의 Ct 값 차이

<노로바이러스 파트-3차년도>

- 본 과제에서 개발한 전처리용 통합 미세유체칩이 4종 박테리아에서 좋은 전처리 효율을 나타내는 것을 확인한 후 노로바이러스 샘플을 이용해 미세유체칩에 주입한 뒤 믹싱, 농축, 용해 단계를 거쳐 추출된 RNA를 이용하여 real-time PCR을 진행하였다. 또한, 미세유체칩의 성능을 비교, 평가 하기 위해 viral extraction kit를 이용하여 미세유체칩으로 주입하기 전 시료에서 RNA를 추출한 뒤 real-time PCR 결과를 비교하였다. 그 결과 미세유체칩을 이용한 방식에서 Ct 값이 평균 20.5를 나타낸 것에 비해 extraction kit를 사용하였을 때 Ct 값이 29.2 로 약 8.7 빨라졌으며 이는 미세유체칩을 통해 노로바이러스를 약 100배 이상 농축하는데 성공하였으며 약 99%의 농축 효율(recovery)를 나타내는 것을 확인하였다.

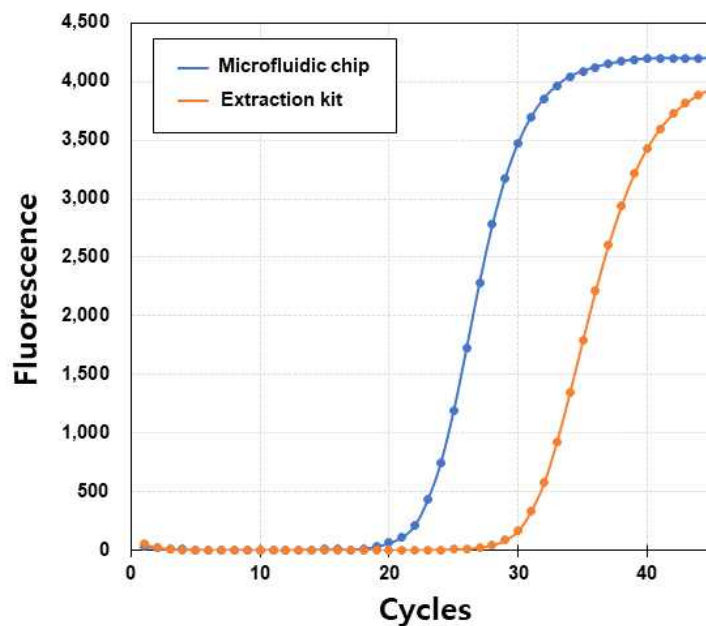


그림 153. 미세유체칩 방식과 키트 방식을 사용하여 각각 추출된 노로바이러스 RNA 시료의 real-time PCR curve

- 위의 식품 안전 위해 바이오마커에 관한 다양한 농축, 용해 및 검출 방법에 대한 연구 결과들을 바탕으로 “Kirok Kwon et al., Sensors and Actuators B: Chemical, 248, 480-899, 2017”, “Leila Kashefi-Kheyraadi et al., Biosensors and Bioelectronics, 117, 457-463, 2018”, “Joonchul Shin et al., Analyst, 143, 1515-1525, 2018” 등 미세유체기술 및 화학적 검출 기술 관련 상위 SCI 저널들에 논문들을 게재하였으며, 또한, “Kirok Kwon et al., Journal of Sensor Science and Technology, 27, 2018” 등 국내 저널에 논문을 게재하는 성과를 달성하였다.

### 3. 제2 협동연구기관 한국식품연구원

#### 가. 1차년도 세부 연구내용

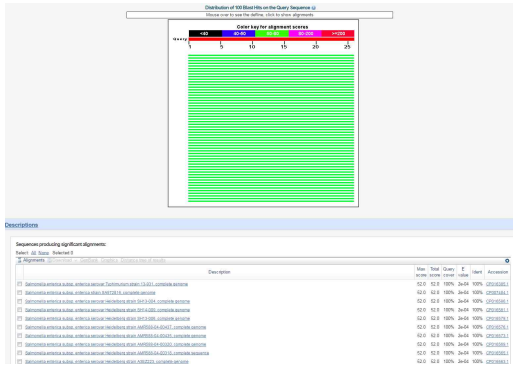
##### (1) 화학적 유해인자 분석에 따른 화학마커 4종 이상 선정 및 검출 계획 수립

- 식품에 잔류하는 농약, 항생제의 특성 및 현황 파악을 진행하였다. 잔류농약은 “2014 수입식품 등 검사연보” (식품의약품안전처 발간, 11-1471000 -000034-10), “농림축산식품부 보도자료” (2016.1.19.) 등을 바탕으로 3,219톤 수입식품 부적합 현황 및 국내농수산물 9만 건 이상에 대한 안전성 자료를 참고하여 클로르피리포스, 다이아지논이 식품 잔류 농약에 큰 문제가 됨을 확인하였다. 또한 대상 품목 중 가공없이 소비되는 농산물에서 잔류 농약의 문제점이 클 것으로 판단되어 상추에서 잔류농약 분석을 진행하였다. 잔류농약은 12-14년 농산물별 잔류농약 부적합 발생현황 (식품의약품안전처) 통계를 활용하여 깻잎, 쪽파, 부추, 상추 등 77개 농산물에서 부적합 판정을 받은 횟수를 합하여 잔류농약 부적합 전체 건수 (1435건) 중 가장 많은 클로르피리포스 (143건), 다이아지논 (134건)을 확인하여 선정된 농약 및 대상 품목이 소비되는 식품 및 농약의 문제점을 반영하는 것을 확인하였다.
- 항생제의 경우 유용한 통계 부족으로 2013년도 “국가 항생제 사용 및 내성 모니터링” (농림축산식품부, 농림축산검역본부, 식품의약품안전처 공동 발간, 11- 1543061-000088-10)을 참고로 항생제 판매실적을 바탕으로 테트라사이클린계 (269톤), 페니실린계 (187톤) 항생제가 많은 축산 농가에서 사용됨을 확인하였다. 이 중 페니실린계에서는 판매가 가장 많은 아목시실린 (112톤)을 선정하여 실험을 진행하였다. 테트라사이클린계에서는 판매가 가장 많은 옥시테트라사이클린 (192톤) 대신 2번째로 판매가 많은 클로르테트라사이클린 (75.5톤)을 선정하여 실험을 진행하였다. 이는 옥시테트라사이클린의 경우 3종 이상의 화학물이 포함되어 분석의 오류를 줄이기 위해 단일화학물인 테트라사이클린을 우선 선정하였다.
- 이를 바탕으로 잔류농약은 상추를 대상으로 클로르피리포스, 다이아지논을 분석 대상으로 선정하였으며, 잔류 항생제는 가금류의 근육에서 아목시실린과 클로르테트라사이클린을 분석 대상으로 실험을 진행하였다.

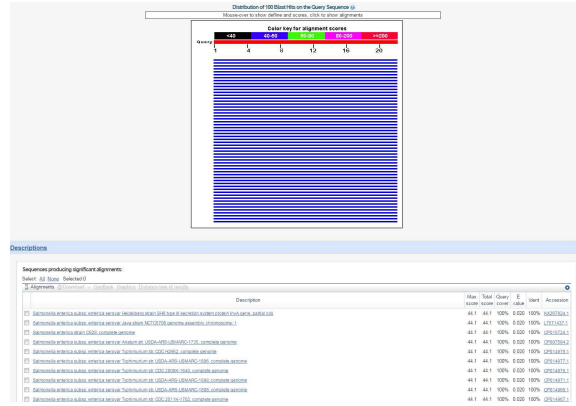
##### (2) 생물학적 타겟유전자 증폭 부위 선별 및 검증

- 식품에 포함된 생물학적 유해인자인 살모넬라의 검출을 위해 유전자 증폭에 필요한 프라이머 디자인, 제작 및 검증을 진행하였다. 먼저 여러 미생물에서 살모넬라만을 구별할 수 있는 살모넬라 특이적 유전자를 문헌을 통해 확인하였으며, 이 중 *invA*, *16s rDNA*, *stn*, *ompC*를 살모넬라 특이적 유전자로 활용하였다. 문헌 및 primer bank를 통해 검증된 프라이머 6개 set의 염기서열 정보를 GeneBank에서 다른 박테이라 유전자와의 중복 검사를 통해 살모넬라 특이적 유전자만을 증폭하는 프라이머임을 확인하였다.

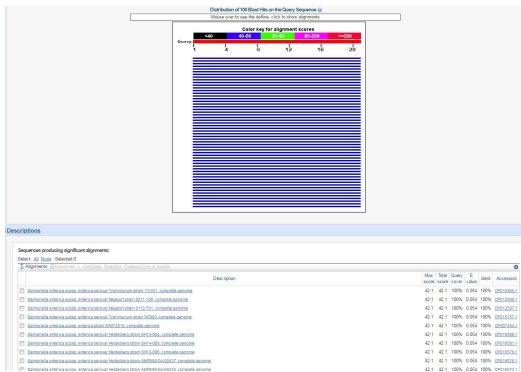




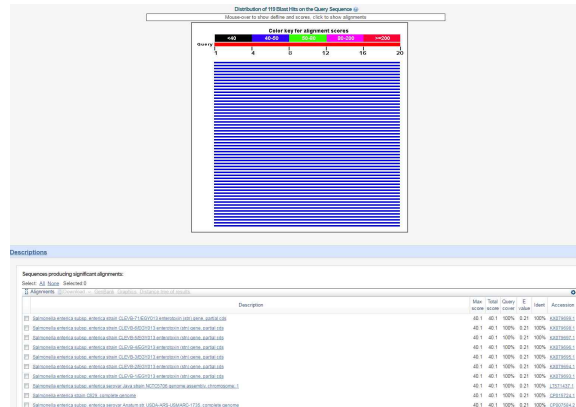
<invA forward primer1>



<invA reverse primer1>



<stn forward primer>



<stn reverse primer>

그림 154. 살모넬라 특이적 유전자 증폭을 위한 프라이머의 중복 분석

- 살모넬라 특이적 유전자 증폭을 위한 6개 set 프라이머를 이용하여 유전자 증폭을 PCR 수행 조건을 다음과 같은 방법으로 확립하였다. PCR 반응을 위해 살모넬라 엔테리카, 엔테로티시스 DNA 5 ng, 10  $\mu$ M forward 프라이머 0.5  $\mu$ l, 10  $\mu$ M reverse 프라이머 0.5  $\mu$ l, Taq polymerase mix 12.5  $\mu$ l (BioRad iTaq universal SYBR green supermix, BioRad, Hercules, CA, USA), 2차 증류수 10.5  $\mu$ l 혼합액을 200  $\mu$ l 튜브에 넣어 잘 섞어 준다. 혼합액이 있는 튜브를 유전자 증폭기 (CFX Connet Real-Time System, BioRad)에 넣고 그림2와 같은 조건으로 증폭을 한다. 증폭은 35회 반복을 하였으며 annealing 온도는 58 $^{\circ}$ C로 증폭은 진행한다. 증폭 시간은 살모넬라 유전자의 증폭 길이에 따라 20-60초 사이로 진행한다.

**PCR**

Bio Rad iTaq Universal SYBR Green Supermix

Cycle condition: regular

94 °C	94 °C	58 °C	72 °C	Melting curve	End
3min	30 sec	30 sec	30 sec	65-95 °C	



35cycles

Mixture	Stock	Used vol. (50 ul)	25 ul
DNA (10 ng/50ul reaction)		1 ul or 2 ul (if band would be weak)	1 ul
Forward primer	10 uM	1 ul (200 nM)	0.5 ul
Reverse primer	10 uM	1 ul (200 nM)	0.5 ul
Taq Mix	2 X	25 ul	12.5 ul
D.W.		22 ul	10.5 ul

**Product Size**

			Ext. time
invA for1	+ invA rev1	: 284 bp	20-30 sec
invA for2	+ invA rev2	: 389 bp	20-30 sec
invA for3	+ invA rev3	: 226 bp	20-30 sec
stn for1	+ stn rev1	: 260 bp	20-30 sec
ompC for1	+ ompC rev1	: 159 bp	20-30 sec
16s for1	+ 16s rev1	: 574 bp	30-60 sec

그림 155. 유전자 증폭을 위한 혼합액 프로토콜 및 product 크기

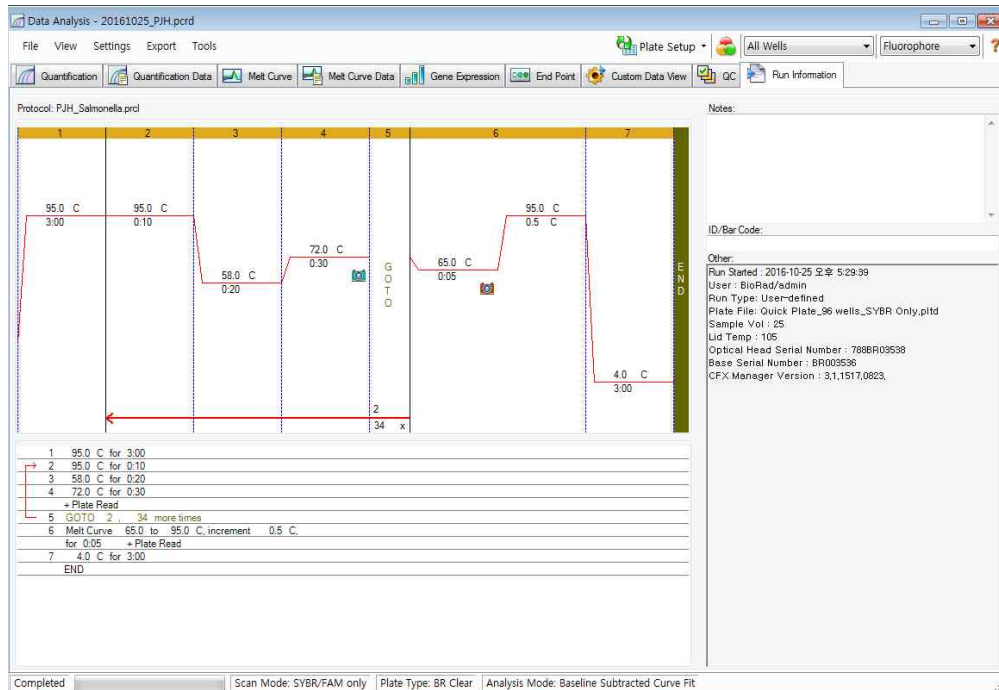
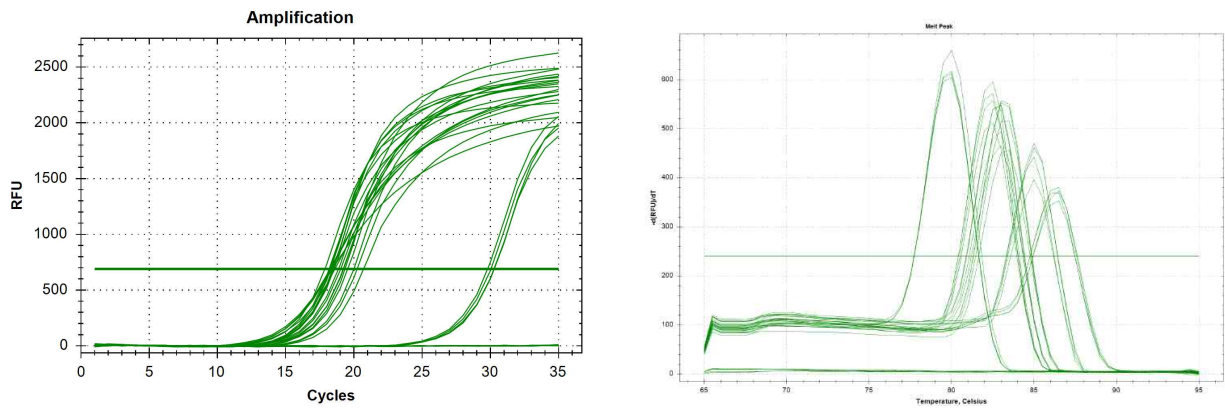


그림 156. 유전자 증폭기 반복 횟수, 온도, 형광 분석 프로토콜

- 오염에 의한 유전자 증폭 여부를 판단하기 위해 살모넬라 DNA 없이 증폭 실험 결과를 확인하여 증폭된 신호가 없음을 확인한다. 또한 멜팅 커브에서 단일 신호인지 여러 개의 신호인지를 확인하여 비특이적 유전자 증폭이 없음을 확인 한다. 살모넬라 DNA를 이용한 실험에서는 멜팅 커브에서 단일 신호만이 증폭되었음을 확인하여 6개 set 프라이머를 이용하여 살모넬라 유전자 증폭을 실시하였을 경우 비특이적 유전자 증폭이 없음을 확인하였다.



<Amplification curve>

<Melting curve>

그림 157. 유전자 증폭 그래프 분석

- PCR수행 결과, 6개 프라이머 set 모두 살모넬라 특이적 유전자 증폭을 확인하였으나 이중 5개 프라이머 set의 민감도가 높아 살모넬라 특이적 감지에 사용하기 적합한 것으로 확인 되었다. 유전자 증폭에서 민감도가 높은 유전자는 *invA1*, *invA2*, *invA3*, *stn*, *16s rDNA*로 증폭 15회 이전에 유의한 신호를 확인하였으며, *ompC*의 경우 증폭 25회에 유의한 신호를 확인하였다.

Output:  Content  Sample  Cq

		1	2	3	4	5	6	7
A	Content	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn
	Sample							
	Cq	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
B	Content	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn
	Sample		Enterica 1	Enterica2	Enterotidis 1	Enterotidis2	Blank	
	Cq	N/A	19.03	18.54	18.18	18.42	N/A	N/A
C	Content	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn
	Sample		Enterica 1	Enterica2	Enterotidis 1	Enterotidis2	Blank	
	Cq	N/A	18.46	18.24	17.87	18.28	N/A	N/A
D	Content	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn
	Sample							
	Cq	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
E	Content	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn
	Sample		Enterica 1	Enterica2	Enterotidis 1	Enterotidis2	Blank	
	Cq	N/A	19.34	19.21	18.86	19.23	N/A	N/A
F	Content	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn
	Sample		Enterica 1	Enterica2	Enterotidis 1	Enterotidis2	Blank	
	Cq	N/A	20.70	20.23	19.54	20.00	N/A	N/A
G	Content	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn
	Sample		Enterica 1	Enterica2	Enterotidis 1	Enterotidis2	Blank	
	Cq	N/A	30.04	30.26	29.79	30.28	N/A	N/A
H	Content	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn	Unkn
	Sample		Enterica 1	Enterica2	Enterotidis 1	Enterotidis2	Blank	
	Cq	N/A	18.60	18.32	18.42	18.25	N/A	N/A

표 9. 살모넬라 특이적 유전자 증폭 민감도

(3) 시료와 혼합되었을 때 생물학 마커 타겟 유전자 증폭 효율 검증

- PCR 방법을 이용한 유전자 증폭은 반응성이 매우 좋아 다른 시료에 의해서도 쉽게 증폭될 수 있어 반응 온도, 반응 시간, 프라이머 염기서열 등에 변화를 주어 최적화가 필요하다. 본 실험에서는 DNA 없이 반응을 진행하여 오염에 의한 비특이적 반응이 없음을 검증하였으며, 인체 유래 포유류 세포주 DNA를 사용하여 혼합된 시료에서도 살모넬라 특이적 유전자 증폭이 확인되었다.

나. 2차년도 세부 연구내용

(1) 현장 분석을 위한 전처리 방법 개발

- 휴대형 식품 및 식품재료에 포함된 화학적 마커 분석 기기 개발을 위해 식품공전법에 기반한 전처리 방법은 4시간 이상의 전처리 시간이 소요되어 현장 분석에 활용되기 어렵다. 또한 전처리에 사용되는 분석기기의 운반에도 문제가 있어, 사용기기 및 전처리 시간 최소화를 반영한 새로운 전처리 방법 개발이 필요하다.
- 시료 분쇄를 위해서 믹서기를 사용하였으나 채소류의 경우 균질한 분쇄가 이루어지지 않았음을 확인하였다. 이를 해결하기 위해 채소류 분쇄 시에 아세톤 용매를 첨가하여 분쇄를 진행하는 전처리 방법을 개발하였다. 본 실험에서는 상추 200 g과 아세톤 200 ml를 혼합한 후 믹서기 대신 녹즙기를 사용하여 분쇄하였다. 믹서기의 경우 균질한 분쇄가 이루어지지 않아 녹즙기를 사용하였으며, 믹서기에서 보다 균질한 분쇄가 이루어 짐을 확인하였다. 이후 거즈를 사용하여 잔여물 제거를 2회 진행하였다. 많은 잔여물이 제거가 되었으나 색소와 미립 잔여물은 제거되지 못함을 확인하였다. 이러한 잔여물의 제거를 위해 SEP-PAK C18 컬럼을 사용하여 색소 및 미립 잔여물 제거를 진행하였다. SEP-PAK C18 컬럼에 헥산 5 ml를 2분 동안 흘린 후 20% 아세톤이 포함된 헥산 5 ml를 2분 동안 흘려 보내 컬럼 안정화를 진행하였다. 컬럼을 사용한 경우 유체속도는 2.5 ml/분으로 동일한 속도를 유지하였다. 이후 샘플 5 ml를 흘려 보내 흡착 시킨 후 아세톤 5 ml를 이용하여 추출하였다. 추출된 샘플은 개발된 분광분석기 분석에 사용되었다.



<p>농약 분석 전처리 프로토콜</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 상추 200 ~ 500 g과 동일 양의 아세톤을 잘 혼합</li> <li>• 녹즙기 사용하여 분쇄</li> <li>• 50 ml 분주한 후 무게 측정</li> <li>• 거즈 필터 2회</li> <li>• 부피 및 무게 측정 (약 10% 내외 손실: 50 g 처리 시 45 g 회수) 후 상온보관</li> <li>• 컬럼과 시린지 준비</li> <li>• SEP-PAK C18-1g 컬럼 안정화             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 시린지 이용하여 5 ml hexane을 2분 동안 흘려 보냄</li> <li>• 시린지 이용하여 5 ml 20% aceton in hexane을 2분 동안 흘려 보냄</li> <li>• 거즈 필터 후 보관 중인 샘플에서 5 ml (전체 1/10) 컬럼 통과</li> </ul> </li> <li>• 4~5 ml 샘플 회수</li> <li>• 효소반응 후 분광계 분석: 1 ml, 3 회</li> </ul>	 
-------------------------------	---	--

그림 158. 잔류 농약 검사를 위한 상추 전처리 1차 프로토콜

(2) 개발된 전처리 방법을 이용한 식품공전 분석법에 의한 잔류농약 분석

- 시료 전처리 과정의 검증을 위해 클로르피리포스 0, 0.0056, 0.011, 0.028, 0.056 ppm 이 함유된 상추를 용매없이 녹즙기에 분쇄하여 컬럼 및 MS 분석을 진행하였다.

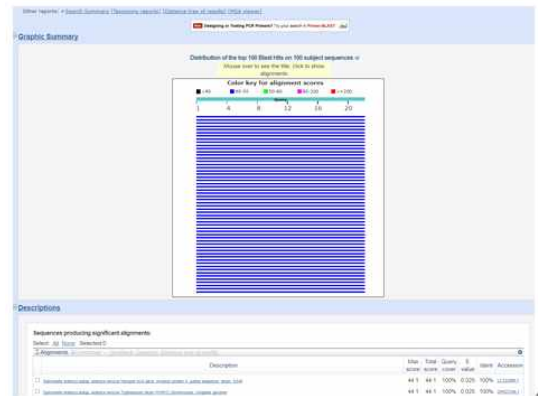
클로르피리포스		SA-1	SA-2	SA-3	SA-4	SA-5
표기값		0	0.0056	0.0110	0.0280	0.0560
GC DB-5 NPD	검량선 결과	0	0.0138	0.0266	0.0625	0.1179
	계산값	0	0.0028	0.0053	0.0125	0.0236
GC DB-5 ECD	검량선 결과	0	0.0113	0.0232	0.0570	0.1094
	계산값	0	0.0023	0.0046	0.0114	0.0219
GC DB-17 NPD	검량선 결과	0	0.0125	0.0244	0.0541	0.1067
	계산값	0	0.0025	0.0049	0.0108	0.0213
GC DB-17 ECD	검량선 결과	0	0.0145	0.0286	0.0652	0.1232
	계산값	0	0.0029	0.0057	0.0130	0.0246
GC MS/MS	검량선 결과	0	0.0414	0.0680	0.1381	0.2558
	계산값	0	0.0083	0.0136	0.0276	0.0512

표 10. 농도 분석 방법에 따른 클로르피리포스 농도

- NPD, ECD 방법을 사용하였을 경우 계산값은 표준시약 농도의 1/2 수준으로 확인되어 실제 함유된 클로르피리포스보다 낮은 농도가 검출됨을 확인하였으나, GC MS/MS를 이용한 분석에서는 실제 함유된 클로르피리포스 농도와 근접한 값이 검출됨을 확인하여, 이후 식품공전 분석에서는 질량값에 의한 분석을 기준으로 진행하였다.

(3) 유전학적 타겟의 증폭을 위해 sensitivity, specificity 확보

- 1차년도 살모넬라 유전자 증폭에 사용된 프라이머의 specificity 확인을 위하여 GeneBank에 수록된 모든 유전자의 염기서열과 비교를 실시하여, *invA for1+invA rev1*, *invA for3+invA rev3*, *stn for1+stn rev1* 프라이머 3개 세트는 사용된 균주 살모넬라 엔테리카 특이적 유전자 증폭임을 확인하여 이후 실험에서 사용하였다.

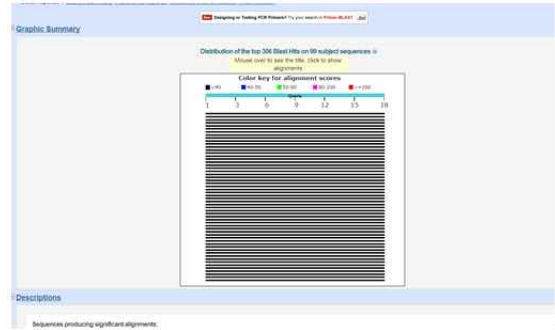
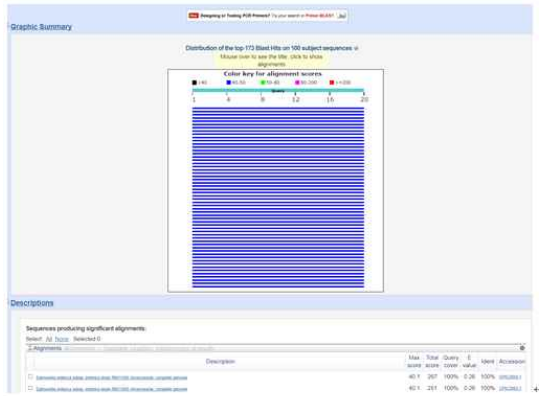


<invA for1: 살모넬라 엔테리카와만 일치> <invA rev1: 살모넬라 엔테리카와만 일치>

그림 159. *invA* 유전자 증폭을 위한 프라이머의 중복 분석

- *16s rRNA for1* 프라이머는 살모넬라, enetrobacter, klebsiella, citobacter 등과 반응을 하여

유전자를 증폭 시킬 수 있는 염기서열을 포함하고 있었으며, *16s rRNA rev1* 는 살모넬라를 포함하여 *limnohabitans* 박테리아와도 반응을 할 수 있음을 확인하여 이후 살모넬라 특이적 유전자 증폭 분석에서 배제하였다.

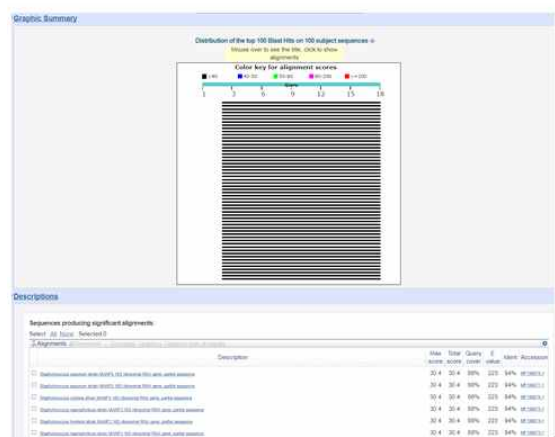
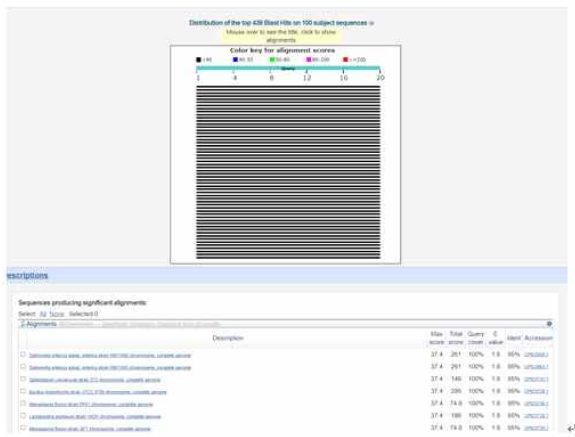


<16s rDNA for1: 살모넬라, enterobacter, klebsiella, citrobacter 등과 일치>

<16s rDNA rev1: 살모넬라, limnohabitans, 여러 박테리아 종과 일치>

그림 160. *16s rDNA* 유전자 증폭을 위한 프라이머의 중복 분석

- *16s rRNA 27F* 프라이머의 경우 살모넬라, 엔테리카, 바실러스, 비브리오, 대장균의 유전자 염기서열과 유사한 부분이 많아 살모넬라 특이적 반응에서 배제하였으며, *16s rDNA 518R* 프라이머도 살모넬라를 포함한 스타필로코쿠스, 할로시오바실러스 등과 반응 할 수 있어 살모넬라 검출 반응에서 배제하였다. 그러나 이러한 프라이머 set은 다양한 종류의 박테리아 검출에 활용 될 수 있어 식품의 오염 또는 부패 분석에 활용될 것으로 판단된다. 염기서열 중복 분석을 통해 살모넬라 특이적 유전자 증폭을 위한 프라이머 set의 특이도를 높였다.



<16s rRNA 27F: 살모넬라, 엔테리카, 바실러스, 비브리오, 대장균과 일치>

<16s rRNA 518R: 스타필로코쿠스, 에피카디시움, 할로시오바실러스와 일치>

그림 161. *16s rDNA* 유전자 증폭을 위한 프라이머의 중복 분석

- 대장균 검출을 위해 앞선 염기서열 비교 방식으로 *16s rRNA*, *Stn*, *InvA*, *ECA* 유전자 특

이적 프라이머를 확인하였으며, sensitivity 증가를 위해 PCR product 크기 최적화 작업을 수행하였다. 테이블 1에서와 같이 유전자 증폭 부위가 108 bp에서 574 bp 까지 다양한 길이가 되도록 프라이머를 제작하여 유전자를 증폭한 결과 *16s rRNA86 + 16s rRNA193r*, *16s rRNA440 + 16s rRNA551r*, *16s rRNA + 16s rRNA728r* 프라이머 set에서 대장균 특이적, 높은 감도의 유전자 증폭을 확인하여 이후 실험에 적용하였다.

Name	Length	Length	MW	Tm	μM	Seq
invA for1	284	26	OK			GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA
invA rev1		22	OK			TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C
invA for2	389	20	OK			GCT GCG CGC GAA CGG CGA AG
invA rev2		19	OK			TCC CGG CAG AGT TCC CAT T
16s rDNA for1	574	20	OK			TGT TGT GGT TAA TAA CCG CA
16s rDNA rev1		18	OK			CAC AAA TCC ATC TCT GGA
stn for1	260	21	OK			CTT TGG TCG TAA AAT AAG GCG
stn rev1		20	OK			TGC CCA AAG CAG AGA GAT TC
invA for3	226	20	OK			GCC ACG GTA CAA CGT ATA TC
invA rev3		20	OK			CCT CAA CTT CAG CAG ATA CC
ompC for1	159	21	OK			ACC GCT AAC GCT CGC CTG TAT
ompC rev1		24	OK			AGA GGT GGA CGG GTT GCT GCC GTT
16s rRNA 27F						AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG
16s rRNA 518R						GWA TTA CCG CGG CKG CTG
ECA75F						GGA AGA AGC TTG CTT CTT TGC TGA C
ECR619R						TTC CCG AAG GCA CCA ATC
16 E1						GGG AGT AAA GTT AAT ACC TTT GCT C
16 E2						TTC CCG AAG GCA CAT TCT
InvA270	147	20		62.05		GAT TGA AGC CGA TGC CGG TG
InvA416r		20		62.07		ACT TCC GCG ACA CGT TCT GA
InvA771	121	20		61.88		CCG CGT AAA TGG CGA TAC GG
InvA891r		20		61.91		GAA TCC CGG CAG AGT TCC CA
Stn43	147	20		62.12		GGA CGA GAG CGG GTT ACG AA
Stn189r		20		62.03		CGT TAT CAG CGC TCG CAC AG
Stn610	117	20		61.93		AAA GAC CGC GCC TTT ACC CT
Stn726r		20		62.07		CCG GAT CAG TTG GAG GCG AT
16rRNA86	108	20		61.91		GCT CTT TGC TGA CGA GTG GC
16rRNA193r		20		62.02		GGT CTT GCG ACG TTA TGC GG
16rRNA440	112	20		62.18		AGC GGG GAG GAA GGG AGT AA
16rRNA551r		20		62.18		AAC GCT TGC ACC CTC CGT AT
16rRNA602	127	20		62.78		TGT GAA ATC CCC GGG CTC AA
16rRNA728r		20		62.96		TTC GCC ACC GGT ATT CCT CC

표 11. 살모넬라, 대장균 특이적 유전자 증폭을 위한 프라이머 set 정보

### 다. 3차년도 세부 연구내용

#### (1) 현장에서 채취한 시료를 대상으로 시제품 분석력 검증

- 잔류농약 분석을 위해 마트에서 판매되는 상추를 구입하여 200g을 녹즙기로 분쇄하였다. 이중 50g을 취하여 특정 농도의 표준물질과 혼합한 후 한국기능식품연구원에 의뢰하여 식품공전법에 따른 클로르 피리포스, 다이아지논 농도를 확인하였다. 시험·검사성적서 (제D2018041225호 - 제D2018041234호)를 분석해 보면, 클로르피리포스의 경우 5개농도의 (0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 ppm) 표준물질을 혼합하였을 경우 분석값과 혼합된 표준물질의 농도에서 큰 차이를 보이지 않았다. 최종 회수율은 72 ~ 113%로 확인되어, 권장 회수율 80%와 거의 동일함을 확인하였다. 그러나 다이아지논의 경우 표준물질을 혼합하지 않았음에도 0.0047 ppm이 검출이 됨을 확인하였다. 또한 다이아지논의 경우 혼합된 표준물질의 농도와 분석값에서 큰 차이를 보이고 있음을 확인하였다. 최종 회수율은 56~225%로 확인되었다. 이러한 큰 차이는 판매되는 상추에서 다이아지논이 균질하게 분포되어 있지 않아서 발생하는 오류일 것으로 예상된다.

농약	함유량 (ppm)	식품공전 (ppm)
	0	0
클로르피리포스 (허용치: 0.01 ppm)	0.01	0.0113
	0.02	0.0144
	0.05	0.0472
	0.1	0.0965

표 12. 클로르피리포스 표준물질 혼합액 분석

농약	함유량 (ppm)	식품공전 (ppm)
	0	0.0047
다이아지논 (허용치: 0.1 ppm)	0.1	0.2253
	0.2	0.2326
	0.5	0.3652
	1	0.5559

표 13. 다이아지논 표준물질 혼합액 분석

- 잔류항생제 분석을 위해 마트에서 판매되는 HACCP 인증 생닭을 구입하여 200g을 녹즙기로 분쇄하였다. 이 중 25g을 취하여 특정 농도의 표준물질과 혼합한 후 아목시실린은 한국기능식품연구원에, 클로르테트라사이클린은 한국식품과학연구원에 의뢰하여 식품공전법에 따른 클로르테트라사이클린, 아목시실린의 농도를 확인하였다.

항생제	함유량 (ppm)	식품공전 (ppm)
	일반시료	0.01
클로르테트라사이클린 (허용치: 0.2 ppm)	0.2	0.07
	0.6	0.15
	1.8	0.27

표 14. 클로르테트라사이클린 표준물질 혼합액 분석

항생제	함유량 (ppm)	식품공전 (ppm)
	일반시료	불검출
아목시실린 (허용치: 0.05 ppm)	0.05	0.01
	0.15	0.1
	0.45	0.25

표 15. 아목시실린 표준물질 혼합액 분석

- 시험·검사성적서 (클로르테트라사이클린: 제13371호 - 13374호, 아목시실린: 제D2018102618호 - 제D2018102621호), 를 분석해 보면, 클로르테트라사이클린의 경우 4개 농도의 (0, 0.2, 0.6, 1.8 ppm) 표준물질을 혼합하였을 경우 분석값과 표준물질의 농도에서 큰 차이를 보이고 있다. 또한 판매 제품에 클로르테트라사이클린이 허용치 보다 적은 농도이지만 포함되어 있음을 알 수 있었다. 최종회수율은 15 ~ 25%로 매우 낮음을 확인하였다. 아목시실린의 경우 4개 농도의 (0, 0.05, 0.15, 0.45 ppm) 표준물질을 혼합하였을 때, 분석값과 표준물질의 농도에서 약 2배 차이를 보이고 있음을 확인하였다 최종회수율은 50~66%로 권장 회수율과 매우 유사한 결과를 얻었다.
- 식품공전법에 따른 농약, 항생제 분석에서 시료가 농약 및 항생제로 오염되었을 경우 분석값에서 표준물질 농도와 큰 차이를 보이는 현상을 확인하였다. 이러한 것은 앞서 설명한 것과 동일하게 비균질인 잔류 농약 또는 항생제가 분석 결과값에 영향을 주었던 것으로 예상된다.

(2) 현장에서 채취한 시료를 대상으로 시제품 분석력 검증 (총 4종 이상)

- 잔류 농약 분석을 위한 상추 시료는 대부분 가공없이 소비되는 형태로 HACCP 등 가공 인증제품의 구매가 어려워, 마트 2곳의 (L, H 마트) 신선식품에서 구매한 시료를 분석하였다. 잔류항생제 분석을 위한 생닭의 경우 HACCP 인증 제품으로 MO사와 MA사 두 곳에서 생산된 제품을 구매하여 분석을 진행하였다.



- 식품공전법에 따른 잔류 농약 분석을 위해 마트에서 구입한 상추 50 g을 녹즙기로 분쇄하여 한국기능식품연구원에 식품공전법에 따른 분석을 의뢰 하였으며, 식품공전법 회수율 확인을 위해 허용치의 5배인 0.05 ppm 클로르피리포스, 0.5 ppm 다이아지논 표준물질을 혼합한 분쇄된 상추도 동시에 분석하였다. 시험·검사성적서 (제D2018102606호 - 제D2018102609호)를 살펴보면, 클로르피리포스는 L마트에서 구매한 상추에서 불검출 되었으나, H마트 상추에서는 비록 허용치 보다 낮은 수치이지만 클로르피리포스 0.0006 ppm이 검출 되었다. L마트 상추와 0.05 ppm 표준물질을 포함한 혼합물질에서는 0.0298 ppm 클로르피리포스가 함유됨으로 확인되어 최종 수율은 약 60% 임을 확인하였다. H마트 상추에서는 0.05 ppm 표준물질은 포함한 시료의 분석에서 0.0274 ppm 분석 결과를 얻어 최종 55% 회수율을 확인하였다. 구입한 시료와 허용치 5배의 표준물질을 혼합하였을 때 분석 결과는 약 60% 내외의 최종 회수율을 보여 식품공전법에 의한 큰 차이를 보이지 않았다.

농약	함유량 (ppm)		식품공전 (ppm)
클로르피리포스 (허용치: 0.01 ppm)	L 마트	일반시료	불검출
		0.05	0.0298
	H 마트	일반시료	0.0006
		0.05	0.0274

표 16. 현장 채취 시료에서 클로르피리포스 식품공전법에 따른 분석

- 현장 채취 시료에서 잔류 다이아지논 분석을 동일한 방법으로 진행하였다. 이 경우 표준물질은 허용치의 5배인 0.5 ppm 다이아지논을 혼합하여 분석하였다. 시험·검사성적서 (제D2018102610호 - 제D2018102613호)를 살펴보면, L, H 마트에서 구입한 상추 모두에서 다이아지논은 검출 되지 않았다. 다이아지논 표준물질을 혼합한 경우 L, H 마트 모두 약 25%의 최종 회수율을 확인하였다. 이러한 회수율은 클로르피리포스 분석보다 낮은 수치로, 앞서 설명한 결과와 동일하게 클로르피리포스에서 최종 회수율이 높은 것과 일치함을 확인하였다. 이러한 결과는 식품공전법에 따른 분석법이 농약의 종류에 따라 분석 효율에서의 차이가 있음을 확인한 결과로 판단된다.

농약	함유량 (ppm)		식품공전 (ppm)
다이아지논 (허용치: 0.1 ppm)	L 마트	일반시료	불검출
		0.5	0.1320
	H 마트	일반시료	불검출
		0.5	0.1228

표 17. 현장 채취 시료에서 다이아지논 식품공전법에 따른 분석

- 잔류 항생체 분석을 위해 다른 2곳의 제조사에서 생산된 HACCP 인증 생닭을 구입하여 근육 50 g을 녹즙기로 분쇄하여 한국기능식품연구원에 식품공전법에 따른 분석을 의뢰하였다. 시험·검사성적서 (제D2018102614호 - 제D2018102617호)를 살펴보면, MO, MA사 제품 모두에서 클로르테트라사이클린은 검출 되지 않았으며, 식품공전분석의 효율을 위해 허용치의 3배인 0.6 ppm을 첨가한 혼합물에서는 7~8%의 낮은 회수율을 확인하였다.

항생제	함유량 (ppm)		식품공전 (ppm)
클로르테트라사이클린 (허용치: 0.2 ppm)	MO 사	일반시료 0.6	불검출 0.05
	MA 사	일반시료 0.6	불검출 0.04

표 18. 현장 채취 시료에서 클로르테트라사이클린 식품공전법에 따른 분석

- 아목시실린의 경우 1차 분석에서 모두 불검출로 확인이 되어 식품공전법에 따른 분석의 최적화가 필요한 것으로 확인되었다. 아목시실린 분석을 위해 동일 시료 5 g을 녹즙기로 분쇄한 후 한국기능식품연구원에 미량 분석을 의뢰하여 아래에서 알 수 있듯이 분석결과 약 70% 내외의 회수율을 확인하였다 (시험·검사성적서 제D2018102622호 - 제D20181026125호). 두 제품 모두에서 아목시실린을 검출 되지 않았다. 이를 통해 항생제의 효율적 분석을 위해서는 미량의 시료를 사용하는 것이 매우 정확한 결과를 나타냄을 알 수 있어, 전처리 프로토콜 작성 시 반영하였다.

항생제	함유량 (ppm)		식품공전 (ppm)
아목시실린 (허용치: 0.05 ppm)	MO 사	일반시료 0.15	불검출 0.11
	MA 사	일반시료 0.15	불검출 0.1

표 19. 현장 채취 시료에서 아목시실린 식품공전법에 따른 분석

## (2) 채취 시료의 전처리 과정 최적화

- 앞서 수행된 시료에 농약 (클로르피리포스, 다이아지논)이 혼합된 분석과 구매 시료 분석을 통해 현장에서 신속한 전처리를 할 수 있는 프로토콜을 제시한다. 시료의 양은 50 g을 넘을 경우 현장에서 처리하기 어려움이 있어 반영하였다. 잔유물 제거를 위해 거즈 처리 후 원심분리 과정을 추가하였다. 현장에서는 원심분리기 준비가 어려울 수 있어 기기 사용이 가능한 경우에 한하였다. SEP-PAK 컬럼의 사용으로 휴대용 기기를 활용한 현장 분석이 가능하였으며 이후 분석 기기의 자동화에도 큰 도움이 되는 과정이다. 전처리의 모든 과정은 시료분석 및 분석용액 추출까지 약 15분 소요된다.

농약 분석 프로토콜	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 상추 100 g 녹즙기 사용 분쇄 (용매 사용 없음)</li> <li>• 50 g 분주 후 무게 측정</li> <li>• 필터링: 거즈 2회 처리</li> <li>• 원심분리 8000 g, 5분 (기기 사용 가능한 경우)</li> <li>• SEP-PAK C18 컬럼 안정화: 5ml hexane, 2 min</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SEP-PAK C18 컬럼 안정화: 5ml 20% acetone in hexane, 2 min)</li> <li>• 컬럼에 샘플 10 ml 로딩</li> <li>• 샘플 추출: 5ml 20% acetone in hexane</li> <li>• 효소 반응 후 분광계 분석</li> </ul>

그림 162. 농약 분석 전처리 프로토콜

- 항생제 분석은 농약보다 과정이 추가되었으며 그 주된 내용은 항생제와 다른 물질과의 반응을 막아 항생제 분석을 효율적으로 하는 방법 들이다. 항생제 분석에 있어서도 원심분리 과정을 추가하여 분석 효율을 높이는 과정을 추가 하였다. 항생제의 경우 시료는 10 g을 넘을 경우 분석 효율 및 정확성이 매우 낮아져 5 g의 시료를 갖고 분석을 진행하는 프로토콜을 제시한다. 아목시실린은  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 에 의해 저해가 되며 사용되는 컬럼은 SEP-PAK HLB 컬럼이다. 테트라클로르싸이클린은 EDTA/트리클로르아세트산에 의해 저해가 되며 SEP-PAK C18 컬럼을 사용한다. 잔류 항생제 분석을 위한 전처리 과정은 분쇄에서 분속용액 추출까지 약 30분 소요된다. 아목시실린 분석을 위한 전처리와 클로로테트라사이클린 분석을 위한 전처리를 아래와같이 나타내었다.

아목시실린 분석 프로토콜	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 생담 10 g 녹즙기 사용 분쇄 (용매 사용 없음)</li> <li>• 균질화: 10 ml 아세토니트릴:물 (8:2) 첨가, 상온 5 min 방치</li> <li>• 필터링: 거즈 2회 처리 후 상온 10 min 방치</li> <li>• 원심분리 8000 g, 5분 (기기 사용 가능한 경우)</li> <li>• 반응저해: 10 ml 상층액에 10 ml 0.1M <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math> 첨가, 상온 5 min 방치</li> <li>• SEP-PAK HLB 컬럼 안정화: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 ml MeOH : <math>\text{H}_2\text{O}</math> : <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math> (1 : 1 : 1)</li> </ul> </li> <li>• 5 ml 샘플 로딩</li> <li>• SEP-PAK HLB 컬럼 세척, 2회 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 ml 0.05M <math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math></li> </ul> </li> <li>• 시료 추출: 5ml 0.05M <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> : 아세토니트릴 (1 : 1)</li> <li>• 분광계 분석 (360 nm)</li> </ul>
------------------	--

그림 163. 항생제 아목시실린 분석 전처리 프로토콜

클로르테트라사이클린 분석 프로토콜	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 생닭 10 g 녹즙기 사용 분쇄 (용매 사용 없음)</li> <li>• 필터링: 거즈 2회 처리 후 상온 10 min 방치</li> <li>• 원심분리 8000 g, 5분 (기기 사용 가능한 경우)</li> <li>• 반응저해: 10 ml 상층액에 10 ml 0.5% EDTA/5% 트리클로로아세트산</li> <li>• 상온 10 min 방치</li> <li>• 10 ml 상층액에 10 ml hexan : 클로로포름 (9 : 1) 첨가, 상온 5 min 방치</li> <li>• SEP-PAK C18 컬럼 안정화:             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 ml hexan : 클로로포름 (9 : 1)</li> <li>• 5 ml 샘플 로딩: 하층액 로딩</li> </ul> </li> <li>• SEP-PAK C18 컬럼 세척, 2회: 5 ml H<sub>2</sub>O</li> <li>• 시료 추출: 5ml MeOH</li> <li>• 분광계 분석 (360 nm)</li> </ul>
-----------------------	--

그림 164. 항생제 클로르테트라사이클린 분석 전처리 프로토콜

(3) 통합안전관리 시스템 제안 및 ERP SAP 연계방안

- 본 과제에서 제시한 휴대형 분석기기 개발은 제품의 품질관리와 제조공정에 반영할 수 있는 기초 자료를 제공할 수 있다. 허용치를 초과한 농약이 농산물에서 확인되면 유통에서 제외를 시켜야 한다. 즉 현장에서 휴대형 분석을 통해 실시간 모니터링하고 ERP와 같은 전사적 자원관리 시스템 중 영업관리, 자재관리 모듈과 연계시켜 부적합 농산물이 유통 되거나 제조 공정에 투입되는 상황을 원천적으로 막을 수 있도록 해야 한다. 또한 잔류 항생제의 제품화 이후 시판되는 시료를 현장에서 분석하여 부적합 식품의 유통을 막고 ERP의 생산관리 모듈과 실시간 연동을 시켜 제품의 원물인 닭을 공급하는 업체에서 납품되는 모든 원물에 대해 사전적 조치를 취하여 소비자의 피해를 줄이면서 기업의 이미지를 향상 시킬 수 있는 시스템 개발에 적용될 수 있다. 간단히 도식화 하면 다음과 같다.

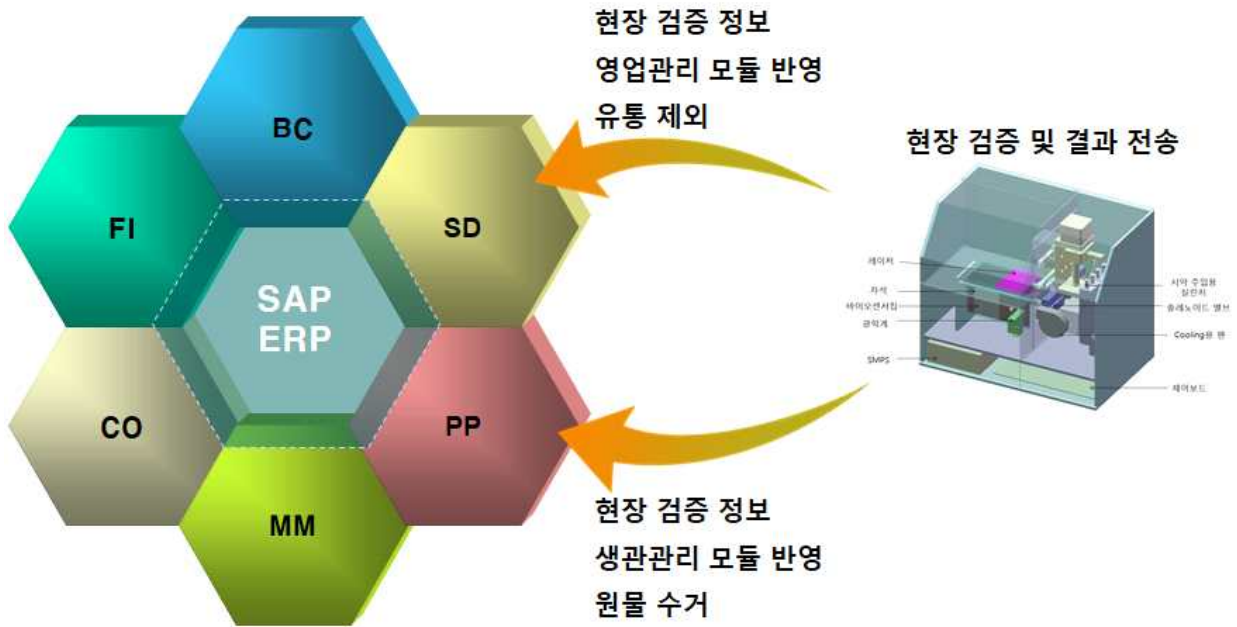


그림 165. 통합안전 관리 시스템 연동 휴대용 기기

※ 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.3억원	
			향후 3년간 매출	2억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0.2억원	
			향후 3년간 매출	1억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.1% 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 5% 국외 : %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 5% 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 3% 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			5위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			3위

항 목	세 부 항 목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	본 과제 내에 개발제품 및 관련제품의 사업화 성공 (2.4년)			
	소요예산(백만원)	300			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0.3	3.0	10.0	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0.1	5	20
국외		-	-	3	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	생물학적 유해물질 검사 장비 모듈인 농축/추출 모듈 상품화 계획중			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	-	5	
	수 출	-	-	5	

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

(1) 주관기관 (비아이티밸류)

- 화학적 마커, 바이오마커 기반 정성, 정량 현장 분석기기 플랫폼 선정
- 전처리용 플루이딕칩과 연계한 통합 유전자분석기기 시작품제작
- 잔류농약 및 항생제 유해인자 분석 시스템 프로토타입, 제품 설계 및 제작

(2) 제1 협동연구기관(연세대학교)

- 생물학적 유해인자 분석에 따른 바이오마커 3종 선정 및 검출 계획 수립
- 식품 샘플 농축 및 광열효과 기반의 타겟 유전자 추출용 micro-MACS chip 시작품제작
- 식품안전 위해요소 기반 측정기기 기본측정 성능 평가

(3) 제2 협동연구기관(한국식품연구원)

- 식품(원료)의 가공, 유통, 포장등의 특성에 따른 식품 위해인자별 특성분석
- 표준물질 및 식품시료의 화학적 마커 검출 한도 및 분석 비교
- 시제품 활용 현장 채취 시료 분석 및 식품공전 분석 결과 비교

#### 3-2. 목표 달성여부

- (1) 주관기관(비아이티밸류): 모두 달성
- (2) 제1 협동연구기관(연세대학교): 모두 달성
- (3) 제2 협동연구기관(한국식품연구원): 모두 달성

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

- (1) 주관기관(비아이티밸류): 해당없음
- (2) 제1 협동연구기관(연세대학교): 해당없음
- (3) 제2 협동연구기관(한국식품연구원): 해당없음

#### 4. 연구결과의 활용 계획 등

##### (1) 주관기관(비아이티밸류)

- 본 연구과제기간동안 제품화한 2건의 제품은 영업마케팅 계획 수립과 자금확보를 통해 본격적인 사업화를 추진할 계획임. RT-PCR 장치의 상용화에 성공으로 보다 전문적인 진단장비회사로의 발돋움을 목표로 하고 있으며, 잔류농약 검사장치의 개발로 신규 시장 창출이 가능한 잔류농약 신속 검사 시장에 뛰어들게 되어, 회사의 차기 주력 제품으로 성장할 수 있는 potential을 가지고 있음.
- 농축, 추출용 칩을 적용한 유전자 검사용 전처리장비는 빠른 기간내에 추가 제품화할 계획이며, 이 제품은 식품뿐만아니라 휴면질병진단용 전처리 제품으로 적용할 수 있어, 파급효과가 클것으로 기대됨. 중기적으로는 RT-PCR과 연계한 Full 자동 측정장비의 제품화도 추진할 계획임.

##### (2) 제1 협동기관(연세대학교)

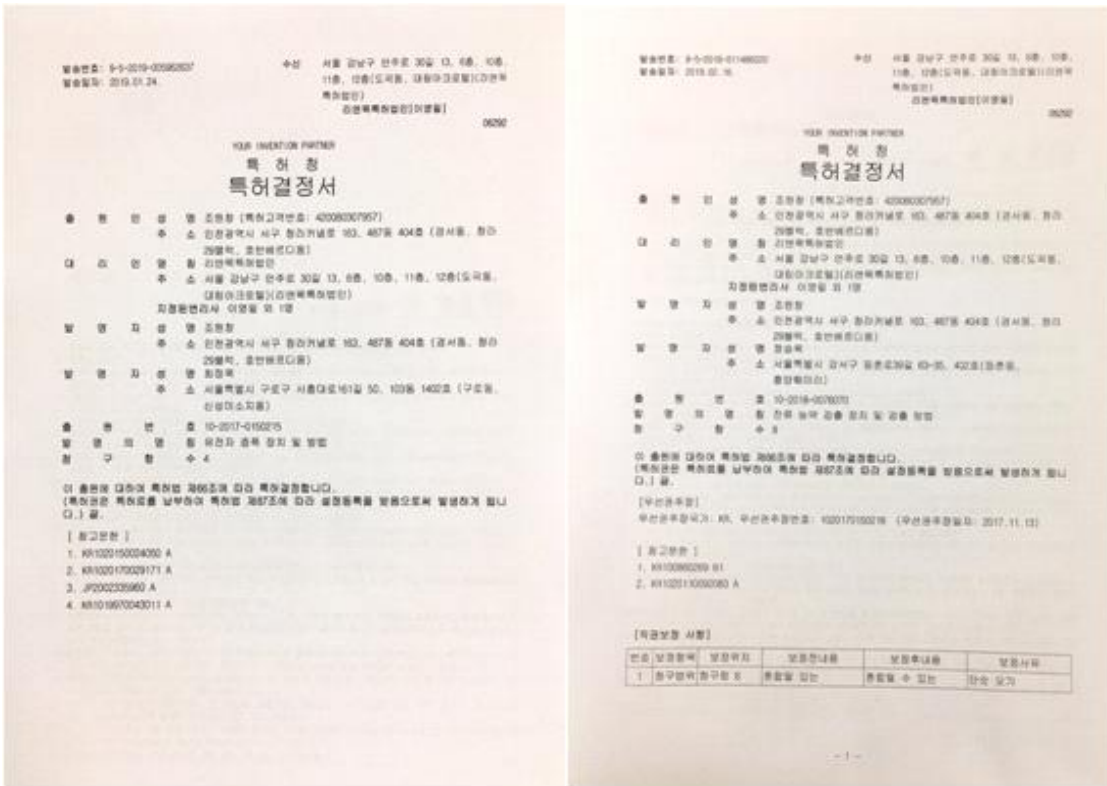
- 유전자 농축, 추출 장비에 적용하는 micro-MACS chip의 개발로 특허 출원을 계획중이며, 나아가서 비아이티밸류의 장비와 연계하여 field에서 바로 적용될 수 있는 chip을 개선, 제작할 계획임.

##### (3) 제2 협동연구기관(한국식품연구원)

- 휴대형 분석기기 개발은 제품의 품질관리와 제조공정에 반영할 수 있는 기초 자료를 제공할 수 있다. 허용치를 초과한 농약이 농산물에서 확인되면 유통에서 제외를 시켜야 한다. 즉 현장에서 휴대형 분석을 통해 실시간 모니터링하고 ERP와 같은 전사적 자원관리 시스템 중 영업관리, 자재관리 모듈과 연계시켜 부적합 농산물이 유통 되거나 제조 공정에 투입되는 상황을 원천적으로 막을 수 있도록 해야 한다. 또한 잔류 항생제의 제품화 이후 시판되는 시료를 현장에서 분석하여 부적합 식품의 유통을 막고 ERP의 생산관리 모듈과 실시간 연동을 시켜 제품의 원물인 닭을 공급하는 업체에서 납품되는 모든 원물에 대해 사전적 조치를 취하여 소비자의 피해를 줄이면서 기업의 이미지를 향상 시킬 수 있는 시스템 개발에 적용될 수 있다.



※ 특허사진



1. 유전자 증폭장치 및 방법

2. 잔류농약 검출장치 및 검출 방법



3. 통합 유전자 분석장치

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호		316073-3	
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야	식품 유해물질 검사		과제구분	단위	
사업명	고부가가치 식품기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	현장 식품 안전을 위한 휴대형 분석기 개발 및 상용화		과제유형	(응용)	
연구기관	비아이티밸류, 연세대학교, 한국식품연구원		연구책임자	조원창	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2016.08~2016.12	180,000	60,032	240,032
	2차년도	2017.01~2017.12	300,000	100,053	400,053
	3차년도	2018.01~2018.12	300,000	100,053	400,053
	4차년도				
	5차년도				
	계	2016.08~2018.12	780,000	260,138	1,040,138
참여기업	비아이티밸류				
상대국			상대국연구기관		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2019.01. 28

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
비아이티밸류	대표/연구소장	조원창

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

<b>확약</b>	
-----------	--

## I. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 2019년 1월 1일부터 전면 시행되고있는 PLS법(농약허용물질목록관리)이 시행되고 있는바 기존에 실험실 레벨에서 검사하던 식품의 잔류농약측정을 본 과제기간동안 개발한 장비는 현장에서 측정이 가능하도록 매뉴얼로 하던 시약 효소반응을 장비내에서 자동화 하여 실험실에 의존하지 않고, 현장에서 측정이 가능하도록 한 국내 최초제품으로 당장 시장 창출 및 진입이 가능함.

- 특정 시료나 균을 농축할 수 있는 Mixing존을 포함한 micro-MACS칩은 국내최초를 넘어 세계에서 적용사례가 많지 않은 기술임. 본 기술은 조만간 식품위해물질은 물론 현장 질병검사용 전처리 기기로 적용할 수 있는 파급효과가 큰 기술이며, 자체 국산화한 소형 RT-PCR과 연계하면 전 세계적으로 상용화 제품이 몇 안 되는 Integrated 검사 기기를 개발할 수 있는 핵심기술임.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 식품의 생물학적 위해물질검사의 경우에 샘플 배양시간이 길고, 실험실에서만 가능한 상황이었으나 샘플 농축 및 추출이 가능한 칩과 장비를 이용하면 배양과정없이 샘플의 전처리 및 RT-PCR을 통한 측정이 가능하여 현장에서 검사가 가능하여, 시장진입은 물론 식중독균의 조기검사가 가능하여 국가적으로도 피해를 줄 일 수 있을것임.

- 화학적 위해물질인 잔류농약측정의 경우에 실험실에 진행하였던 기존의 방법에서 FIA방식을 적용한 측정기기 개발로 현장에서 직접 수행할 수 있게됨에 따라 시장창출이 용이하며, 2019년 1월부터 전면 시행중인 PLS제도에 따른 잔류농약의 현장 측정검사 니즈에 적극 대응할 수 있을것임.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 과제를 통해 확보한 기술로 2건의 상용화 달성

- 현장에서 측정이 어렵게 하는 요인들을 극복할 수 있는 기술을 개발하여 현장용 검사기기로 활용

- 화학적 위해물질 검사의 경우 PLS 법 시행으로인해 활용할 수 있는 제도적 환경 조성으로 수요처 확대 및 매출 증대 가능.

- 우수한 독자 기술 확보로 해외시장 진출 가능과 함께 고용창출 가능

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 연구과제의 수행과정 중 3기관 세미나를 총 10회 이상 실시 하였고, 특히 과제기간동안 제품화2건, 제품화 후보 1건을 도출하였으며, 특허(출원4, 등록2) 및 논문(4건)을 게재하여 제품화를 뒷받침할 수 있는 기술을 확보하는등 최선을 다해 연구개발을 수행함.
- 특히 연구개발기간동안 매출을 32.1백만원이 달성한 만큼 2년4개월 과제기간동안 공히 모든기관 충실히 연구과제에 성실하게 임했다고 판단됨.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 특허 실적 : 출원 4건, 등록 2건 (1건 추가 등록 가능)

1. 통합 유전자 분석 장치 (2017.11.13)
2. 유전자 증폭장치 및 방법 (2017.11.13.)
3. 잔류농약 검출장치 및 검출 방법(2017.11.13.)
4. 잔류농약 검출장치 및 검출방법(2)(2018.06.29.)
5. 유전자 증폭 장치 및 방법(2019.01.24.)
6. 통합 유전자 분석 장치(2018.10.24.)

- 논문

1. Continuous adsorption and photothermal lysis of~ (2017.09.01.)
2. Mobile diagnostics : next generation technologies for in vitro diagnostics(2018.02.10.)
3. A microfluidic electrochemical aptasensor for enrichment~(2018.06.03.)
4. Development of Microfluidic Chip for Enrichment and detection~(2018.07.06.)

- 학술발표

1. 정효일 : Enrichment and photothermal Lysis of the Airborne Bacteria~ (2017.02.22.)
2. 정효일 : Continuous enrichment and lysis of airborne bacteria using ~ (2017.05.18.)
3. 박재호 : Antimicrobial resistance and virulence factors of Escherichia ~ (2018.06.27.)

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체 평가
전처리용 플루이딕 칩과 연계한 유전자 분석기기의 제작	25	100	전처리용 칩을 적용한 자동 전처리 기기 시제품 제작 및 테스트완료. 생물학적 위해물질을 검사하기 위한 RT-PCR 개발 및 판매.
잔류농약 및 항생제 유해인자 분석 시스템 제작	25	100	신속 잔류농약 측정용 시스템 제작 및 판매
타겟 유전자 추출용 micro-MACS chip 시제품 제작	20	100	타겟 유전자 추출용 micro-MACS chip 개발 제작 및 성능 확인
생물학적 유해인자 선정 및 검출계획 수립	10	100	생물학적 유해인자 검출계획 수립후 MACS Chip에 적용, 테스트 완료
식품의 가공, 유통 포장등의 특성에 따른 유해인자별 분석 및 검출한도 분석 비교	20	100	생물학적 타겟유전자 증폭 부위 선별 및 검증, 개발된 전처리 방법을 이용한 식품공진 분석법에 의한 잔류농약 분석
합계	100점		

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 과제의 목적에 근간한 현장적용이 가능한 기술 개발 및 제품화를 달성한 것으로 판단함. 본 과제의 연구개발 결과인 신속 잔류농약 측정시스템의 개발로 PLS법 시행등 상용화 환경이 우호적으로 조성되어, 신시장 창출과 매출증대 및 고용창출이 가능하게됨. 생물학적 위해물질 검사를 위해서는 칩 및 자동전처리기기 시제품의 성공적 개발을 하였고, 측정기기인 RT-PCR의 제품화를 달성하였는등 많은 성과를 내는등 성공적인 연구개발을 수행한 것으로 판단하고 있음.

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

제품화를 위해서는 길지않은 개발기간과 사업비 규모임에도 불구하고, 제품화 2건을 달성하였고,, 제품화 후보 1-2건(시제품개발)확보하여 매출을 확대할 수 있는 품목으로 다수 확보하는등 성실하고, 경쟁력이 있는 연구개발을 수행했다고 자체 판단하고 있음. 아울러 관련 특허확보 및 논문게제도 성공적으로 진행함.

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본과제는 성공적으로 마무리를 했다고 판단하고 과제 종료후부터 본격적인 사업화를 추진할 것이며, 추가 제품화가 가능한 분야도 상용화가 가능하도록 세심한 검토를 통해 추진할것이며, 이를 위한 개발, 생산 및 판매를 위한 자금확보가 가능한 프로그램이 있으면, 더욱 탄력을 받을것으로 사료됨.

#### IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

--

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

--