

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001264-01

농산물 안전성 제고를 위한 휴대용 잔류농약 검출기
개발(첨단기술개발사업)

(Development of portable detection system of agrichemicals
for the safety enhancement in agricultural products)

중앙대학교

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “농산물 안전성 제고를 위한 휴대용 잔류농약 검출기 개발”의 보고서로 제출합니다.

2016 년 03 월 16 일

주관연구기관명 : 중앙대학교

주관연구책임자 : 박 태 정

세부연구기관명 : 중앙대학교

세부연구책임자 : 박 태 정

연 구 원 : 구 만 복

연 구 원 : 한 민 수

세부연구기관명 : 경상대학교

세부연구책임자 : 심 원 보

협동연구기관명 : 웰코리아(주)

협동연구책임자 : 이 석 원

요 약 문

I. 제 목 : 농산물 안전성 제고를 위한 휴대용 잔류농약 검출기 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 저분자 유해화학물질들은 미량으로도 체내에 축적되어 각종 내분비계의 교란을 유발하는 등의 독성을 보이기 때문에 지속적인 분석 및 모니터링이 가능한 시스템 구축이 요구됨.
- 기존의 잔류 농약의 분석은 많은 시간과 돈을 요하는 기기분석적인 방법(HPLC, GC, GC-MS)뿐이 없어 편의성과 신속성이 떨어져 현장에서 실시간으로 검출할 수 없었기에 간편하고 빠르게 유해물질의 존재를 확인할 수 있는 현장 분석용 실시간 다중 센싱 시스템의 개발이 요구됨.
- 저분자 물질에 대한 현장분석 기술의 요구가 지속적으로 증대됨에 따라 관련 연구 분야의 선점을 통해 원천 기술 확보 및 지속적인 연구 개발이 요구되며 이 분야의 산업화 가능성이 높음.
- 특히, 고감도 비색 농약 센서는 일반인이 손쉽게 사용할 수 있을 뿐만 아니라 검출한계를 높이면 기존 분석방법들의 단점을 보완하여 일반가정과 다양한 사업장에서 손쉽게 농약의 양을 측정할 수 있을 것으로 기대됨.
- 항체나 효소 등 생화학적 물질을 이용한 바이오센서를 통해 유해물질을 검출하거나 저분자 유해물질의 경우까지 나아간다면 다양한 저분자 잔류농약들의 검출을 위한 나노바이오센서 시스템의 적용이 필요함.
- 국민의 건강이나 보건, 위생 더 나아가 웰빙산업과 신뢰할 수 있는 농산물 유통 문화 등의 도출을 위한 휴대성 및 편의성을 제공할 수 있는 필요충분조건임.
- 해당 산업의 법·규제·정책적 제약요인 및 장려요인
: 거의 모든 시·도의 농수산물도매시장의 조례를 보면 농산물 안전성 검사를 해야 하거나, 할 수 있는 것으로 표기하고 있음. 현재 기술의 한계로 인해 지방정부 기관이 관리 중인 곳에서만 운영되고 있으나, 향후 급식소 시장 등으로 조례 확대 가능성 있음.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발의 내용

- 잔류 농약에 대한 검출용 바이오리셉터 및 고감도 비색 센서 기술 개발
- 농산물 잔류 농약(유기인계, 카바메이트계, 특이농약)에 대한 검출용 앵타머 개발
- 잔류 농약 현장·다중 분석용 고감도 광학 나노바이오센서 칩(스트립) 개발

- 잔류농약 검출을 위한 고감도 휴대용 광학 검출 시스템 개발

2. 연구개발의 범위

- 농산물 및 가공식품에 잔류하는 농약(유기인계, 카바메이트계, 특이농약) 검출용 DNA 앵타머 10종 이상 개발 및 앵타머 성능향상 연구
- 잔류 농약에 대한 검출용 바이오리셉터 개발 및 나노입자를 이용한 융합기술 연구
- 잔류 농약에 대한 현장·다중 분석용 고감도 정성·정량분석 비색 광학 나노바이오센서 칩(스트립) 개발
- 잔류농약 검출을 위한 고감도 분광 광학 나노바이오센서 시스템 개발
- 잔류농약 검출을 위한 휴대형 장치의 소형화 및 제품화 기술 개발

IV. 연구개발결과

1. 제 1 세부과제 (주관) : 잔류농약 검출용 바이오리셉터 개발 및 나노입자에 의한 성능향상 융합기술 개발.

나노입자를 활용한 고감도 신호검출 원천 기술 개발의 일환으로서 금 나노입자의 물리화 관측을 통한 농약 검출법과 금 나노입자를 이용한 발광 활성 측정 방법을 개발하였다. 또한 단백질과 금 나노입자를 이용한 잔류농약 검출용 고감도 비색 센서 원천기술도 개발하였다. 이후 여러 가지 농약에 대한 검출 가능성을 확인하고 재현성 확보 및 검출 가능한 농약의 신호에 대한 정량적 검정식을 도출하였다.

2. 제 1 세부 위탁과제 : 농산물 및 가공식품에 잔류하는 농약(유기인계, 카바메이트계, 특이농약) 검출용 DNA 앵타머 10종 이상 개발 및 앵타머 스크리닝 효율 개선을 위한 스크리닝 최적화 연구 및 구조분석을 통한 성능향상 연구.

농산물에 잔류하는 유기인계, 카바메이트계, 농약 선정 및 앵타머 개발을 진행하였다. 농약은 이프로벤포스, 테뷰코나조르 메페나셋, 이나벤파이드, 카프로파미드, 펜시큐론, 에디펜포스 등 벼농사용 농약들을 사전 분석을 통해 선정하였으며, 각각에 특이적으로 결합하는 앵타머를 개발하였다. 개발된 앵타머는 m-fold 프로그램으로 깃스프리에너지를 통한 2차 구조 분석을 진행하였으며, 금 나노입자 기반 색도 분석을 통해 앵타머의 특이성과 결합성 또한 분석하였다. 선별된 앵타머 서열은 모두 특허로 등록하여 앵타머 라이브러리를 구축하였다. 이후 추가적으로 농산물에 잔류하는 농약인 아세타미프리드, 아세페이트, 부타에 대한 앵타머를 추가적으로 스크리닝하여 벼 농약 앵타머와 같은 방법으로 앵타머를 분석 및 특허화하여 라이브러리를 구축하였다.

3. 제 1 협동과제 : 잔류 농약에 대한 검출용 고감도 정성·정량분석용 비색 광학 나노바이오센서 칩(스트립) 개발.

앵타머-효소 복합반응을 이용하여 현장에서 손쉽게 여러 종류의 농약을 손쉽게 동시분석할 수 있는 다채널 스트립 센서를 개발하였다. 1세부 위탁으로부터 개발된 10여종의 농약

앱타머를 이용하여 정량 및 정성분석법을 최적화하였고, 이를 이용하여 농약 동시 검출 시 각각의 특이성과 검출한계를 확인하였다. 실제 시료를 이용한 스트립 센서 모의테스트를 진행하여 문제점을 보완 및 개선하였다. 이후 10종의 농약 별 cut-off value 평가를 진행하였으며 산업화를 위한 scale up 조건도 확립하였다.

4. 제 2 협동과제 : 잔류농약 검출을 위한 광학 신호를 통해 검출성분을 처리하기 위한 신호처리기술 개발.

잔류농약 검출을 위한 휴대형 과학 검출 장치를 고안하였다. CCD 모듈 설계 및 제작과 알고리즘 개발을 하고 PD 측정모듈을 설계하였다. 따라서 휴대형 분광 광학 검출 장치 알고리즘을 구현하여 광학시스템을 제작하였다. 제작한 휴대형 광학 검출 장치에 대한 검증을 하고 스마트폰 application과의 통신을 위한 무선 통신 환경을 구축하였다. 또한, User interface 구현을 위한 임베디드 시스템을 설계 및 제작하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 농산물 집하장, 대형농산물 시장, 대형마트 등과 같은 현장에서 소비자 및 분석 담당자들이 농산물 및 가공식품에 잔류하는 다양한 유해 잔류 농약에 대한 신속 정확한 현장 분석에 활용. (추후, 유기농, 무농약, 친환경, 무해 농산물 식품의 품질 보증을 위한 유통분야 등으로 범위를 확대)
- 기존의 농산물 유통관리 시스템 솔루션 필요업체 및 공급 업체, 자율적인 농산물 안전 관리를 원하는 개인 생산자, 농산물 유통관리 서비스 제공업체들이 잔류농약 검출 관리 시스템을 구축하는데 활용.
- 앱타머 기술, 나노센서기술 등의 융합 원천기술을 확보하고 이를 이용하여 기술 발전 단계상 아직 태동기에 머무르고 있는 다중 정성이나 정량 검출용 휴대형 검출시스템과 관련한 바이오센서 시장에서의 국제경쟁력 향상에 기여.

SUMMARY

I. Project Title

Development of portable detection system of agrichemicals for the safety enhancement in agricultural products

II. Purpose and Necessity of the Project

- As accumulation of harmful chemical substances with low molecular weight in one's body can cause disorders of endocrine systems even in trace amounts, continuous monitoring and analyzing system is highly required.
- Conventional methods of pesticide residues detection are expensive and require a lot of time as they are mainly based on instrumental analysis (HPLC, GC, GC-MS) that are limited for rapid detection in the field. Thus, development of a multiplex real-time sensing system is needed for simple and rapid detection of harmful substances.
- Increase in the need of field detection technology for low molecular weight substances has led to the need in securing the source technology and continuous development with a high possibility of industrialization in this field.
- In particular, a highly sensitive colorimetric sensor for agricultural pesticides detection can not only be easily handled by the public but also applied for real-time analysis in many households and companies with low detection limit.
- Biosensors based on biomolecules such as antibodies and enzymes can be used to detect harmful substances. Similarly, application of nano-biosensor is highly required to detect various low molecular weight pesticide residues.
- Necessary and sufficient conditions to have wellness industry and trustworthy agricultural marketing culture for public health and sanitary with portability and convenience.
- Regulations and encouraging factors of the industry
: according to the regulations of agricultural and marine products market, most of cities and provinces require safety tests on agricultural products. Due to the limitation of current technology, application of safety tests are restricted and managed by local governments only. To overcome this, there is a possibility to enact an ordinance due to the needs.

III. Scope and Concepts of the Project

1. Concepts of the Project

- Research and development of bio-receptors and highly sensitive colorimetric sensor for pesticide residues detection
- Development of aptamers specific to pesticide residues (organophosphorous, carbamate and other types of pesticides)
- Development of highly sensitive optical nano-biosensor chips (strips) for multiplex real-time detection of pesticide residues
- Development of highly sensitive and portable optical detection system for pesticide residues detection

2. Scope of the Project

- Development and improvement of more than 10 types of DNA aptamers specific to pesticide residues (organophosphorous, carbamate and other types of pesticides) present in agricultural products and processed food
- Research and development of bio-receptors and improvement of efficiency using nanoparticles for pesticide residues detection
- Development of multiplex and real-time colorimetric and optical nano-biosensor chips (strips) with high sensitivity for qualitative and quantitative analysis of pesticide residues
- Development of highly sensitive optical nano-biosensor system for pesticide residues detection
- Development of portable devices and miniaturization and commercialization for pesticide residues detection

IV. Results

1. 1st sub-team (supervision) : **Research and development of bio-receptors and improvement of efficiency using nanoparticles for pesticide residues detection**

Research was conducted on development of highly sensitive signal detection using nanoparticles. Detection methods based on the observations of gold nanoparticles aggregation and its luminescence intensity were developed. Moreover, antibodies and gold nanoparticles based colorimetric sensor with high sensitivity was developed for the detection of pesticide residues. With this, great positive

potential of such sensor was confirmed with different types of pesticides and its signal reproducibility was secured with a standard equation for quantification of pesticides. In addition, research was also conducted on specific detection method for Carap using fluorescence dyes and metal ions complex.

- 2. 1st sub-team commissioned task : Development of more than 10 types of DNA aptamers specific to pesticide residues (organophosphorous, carbamate and other types of pesticides) present in agricultural products and processed food and research on improvement of its efficiency through screening optimization and structure analysis**

Organophosphorous and carbamate pesticide residues present in agricultural products were selected and their specific aptamers were developed. These pesticides were selected through pre-analysis on pesticides used on rice cultivation such as Iprobenfos, Tebuconazole, Mefenacet, Inabenfide, Carpropamid, Pencycuron and Edifenphos with development on specific binding aptamers. The secondary structures of developed aptamers were analyzed by m-fold program based on Gibbs free energy. Moreover, binding affinity and specificity of aptamers were confirmed through colorimetric detection based on gold nanoparticles. Patents on sequences of selected aptamers were registered and from this, aptamer library was established. Additional screening of aptamers for Acetamidrid, Acephate, and Butachlor was performed and analysis of aptamers was done in the same way.

- 3. 1st collaborative team : Development of highly sensitive optical nano-biosensor chips (strips) for multiplex real-time detection of pesticide residues**

Multiplex strip sensors were developed for real-time analysis of different types of pesticides using aptamer-enzyme complex reaction. Aptamers for pesticides developed from 1st sub-team commission task were used for optimization of quantitative and qualitative analysis and with this, specificity and limit of detection of each pesticide were confirmed. Drawbacks were improved through trial tests on real samples using strip sensors. Afterwards, cut-off value evaluation on 10 types of pesticides was performed and scale-up conditions for industrialization were established.

- 4. 2nd collaborative team : Development of highly sensitive and portable optical detection system for pesticide residues detection**

Portable and optical analyzing device was contrived for pesticide residues detection. Algorithm for design and production of CCD modules was developed and PD measuring modules were designed. Therefore, optical system was produced through the algorithm. The produced portable device was evaluated and wireless communication system for smart-phone applications was established. Embedded system for materialization of user interface was designed and produced.

V. Project Results and Performance Utilization Plan

- In the real field such as agricultural product depository, big agricultural markets and supermarkets, consumers and product quality managers can utilize on rapid and accurate detection of pesticide residues present in agricultural and processed products. (Furthermore, the applicability may be expanded to quality assurance of organic, pesticide-free, eco-friendly and chemical free agricultural products)
- Individual manufacturers and distribution service managers desiring autonomous safety management on agricultural products and solution for existing agricultural product distribution system, respectively, may utilize on establishment of pesticide residues detection system.
- To secure original integrative technologies such as aptamer and nano-sensor technology and improve global competitiveness in biosensor market related to portable measuring system of multiplex qualitative or quantitative detection.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	13
Section 1. Necessities of Project	13
Section 2. Objectives and Content of Project	14
Section 3. Scope of Project	15
Chapter 2. Review of Previous Studies	19
Section 1. Domestic Products Production and Market Situation	19
Section 2. International Allied Products Production and Market Situation ..	20
Chapter 3. Content and Result of Project	21
Section 1. Summary of Result	21
Section 2. Implementation Report of research funds	212
Chapter 4. Achievement of Project	221
Chapter 5. Application Plan of Project	225
Section 1. Achievement of Project	225
Section 2. Application Plan of Project	234
Section 3. Expected Effects	235
Section 4. Opinion for Improved Application of Achievement	236
Chapter 6. Status of research equipment	237
Chapter 7. References	238

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	13
제 1 절 연구 개발의 필요성	13
제 2 절 연구 개발 목표 및 내용	14
1. 연구 목표	14
2. 연구 내용	14
3. 연구개발에 따른 기대성과	14
제 3 절 연구 개발의 범위	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황	19
제 1 절 국내 제품생산 및 시장 현황	19
제 2 절 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황	20
제 3 장 세부연구수행 내용 및 결과	21
제 1 절 세부연구수행 결과	21
제 2 절 연구비 집행실적	212
1. 제 1세부	212
2. 제 1세부 위탁	214
3. 제 1협동	217
4. 제 2협동	219
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에 대한 기여도	221
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	225
제 1 절 연구 성과	225
1. 연구 성과	225
2. 관련사진	233
제 2 절 연구 성과 활용계획	234
1. 구체적 성과물의 명칭	234
2. 성능	234
3. 용도	234
4. 수요처	234
제 3 절 기대효과	235
1. 학술적 의의	235
2. 기술적 측면	235
3. 경제적 측면	235
4. 산업적 측면	235
5. 잔류농약의 최소화로 인한 농업청정국가로 성장	235

6. 녹색 산업 창출	235
7. 사람들의 안전한 먹거리에 대한 인식 전환	236
제 4 절 성과 활용성 제고를 위한 의견	236
제 6 장 연구시설장비 현황	237
제 7 장 참고문헌	238
별첨) 특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서	241

최종보고서

발간 등록 번호	11-1543000- 001264-01	보안등급 분류	<input type="checkbox"/> 보안과제 <input checked="" type="checkbox"/> 일반과제		공개가능여부	<input checked="" type="checkbox"/> 가 <input type="checkbox"/> 부	
사업명		첨단기술개발사업		실용화대상여부	<input type="checkbox"/> 기술이전 <input checked="" type="checkbox"/> 자체사업화		
사업추진형태		<input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제 <input type="checkbox"/> 자유응모과제		국가과학기술 표준분류체계	F1707. 식품기기분석/관능검사		
과제명	국문	농산물 안전성 제고를 위한 휴대용 잔류농약 검출기 개발					
	영문	Development of portable detection system of agrichemicals for the safety enhancement in agricultural products					
주관연구책임자		(소속기관 명칭)중앙대학교					
		(이름)박태정					
		(지역)서울	(전공)나노바이오공학	(학위)공학박사			
세부(협동) 연구과제		기관명	연구책임자		연구개발비(단위: 천원)		
		중앙대학교	박태정		1,160,000		
		광주과학기술원	심원보		280,000		
		웰코리아(주)	이석원		1,246,700		
연구개발비 및 참여연구원수 (단위: 천원, 명)							
연도	정부출연 연구개발비	기업체부담금			정부 외 출연금	합계	참 여 연구원수
		현금	현물	소계			
1차 년도	400,000	13,334	120,006	133,340	0	533,340	28
2차 년도	800,000	26,668	240,012	266,680	0	1,066,680	33
3차 년도	800,000	26,668	240,012	266,680	0	1,066,680	33
합계	2,000,000	66,670	600,030	666,700	0	2,666,700	94
총연구기간	2012.12.18. ~ 2015.12.17 (3년)						
참여기업	기업체명		기업유형	소재지	연락책임자	전화번호(FAX)	
	웰코리아(주)		중소기업	대전	이석원		
<p>관계규정과 모든 지시사항을 준수하면서 이 연구개발과제를 성실히 수행하고자 해당과제의 연차실적·계획서를 제출합니다.</p> <p style="text-align: center;">2016년 1월 30일 주관연구책임자 : 박 태 정 ①</p> <p style="text-align: center;">주관연구기관장 : (중앙대학교 산학협력단) 김원용 직인</p> <p style="text-align: center;">농림축산식품부 장관 · 농림수산식품기술기획평가원장 귀하</p>							

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구 개발의 필요성

- 잔류 농약과 같은 저분자 유해화학물질들은 적은 양으로도 체내에 농축되어 내분비계를 교란하는 등의 독성을 나타내기 때문에 반드시 지속적인 분석 및 모니터링이 필요하여 이를 위한 시스템의 도입이 요구됨.
- 기존의 잔류농약의 분석에는 기존의 많은 시간과 돈이 드는 기기분석적인 방법(GC, HPLC, GC-MS)을 바탕으로 하기 때문에 현장에서 신속하게 이들을 검출하는 데는 한계가 있으므로 신속하고 간편하게 유해물질의 존재를 확인할 수 있는 현장 분석용 실시간 다중 센싱 시스템의 개발이 필요함.
- 저분자 화학물질에 대한 현장분석 기술의 요구가 지속적으로 증대됨에 따라 관련 연구 분야 선점을 통해 원천 기술 확보 및 지속적 연구 개발이 요구되며, 이 분야의 산업화 가능성이 높음.
- 특히, 일반인도 손쉽게 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 검출한계도 낮출 수 있는 고감도 비색 농약 센서의 개발은 기존의 복잡하고 휴대성이 용이하지 않은 수은 측정방법을 대체할 수 있으며, 일반가정과 다양한 사업장에서 손쉽게 농약의 양을 측정할 수 있을 것으로 기대됨.
- 항체나 효소를 이용한 바이오센서를 통해 유해물질을 검출하거나 저분자 유해물질의 경우 다양한 저분자 잔류농약들의 검출을 위한 나노바이오센서 시스템의 적용이 필요함.
- 국민건강, 보건위생, 웰빙산업, 믿을 만한 먹거리, 신뢰할 수 있는 농산물 유통문화 등의 도출을 위한 휴대성 및 편의성을 제공할 수 있는 필요충분조건임.
- 해당 산업의 법·규제·정책적 제약요인 및 장려요인
: 거의 모든 시도의 농수산물도매시장 조례를 보면 농산물 안전성 검사를 해야 하거나, 할 수 있는 것으로 표기하고 있음. 현재 기술의 한계로 인해 지방정부 기관이 운영하는 기관에서만 운영되고 있으나, 향후 급식소 시장 등으로 조례 확대 가능성 있음.
 - 서울특별시 조례
 - ▶ 서울특별시 농산물 잔류농약검사 및 손실 보상 등에 관한 조례 (조례 제4564호)
 - ▶ 서울특별시 농산물 잔류농약검사 및 손실 보상 등에 관한 조례에 관한 시행 규칙 (규칙 제3593호)
 - 광주광역시 조례
 - ▶ 광주광역시 농수산물도매시장 업무 조례 (조례 제 3262호)
 - ▶ 제7장 제61조 농산물 안전성 검사
 - 대구광역시 조례
 - ▶ 대구광역시 농수산물도매시장 운영관리 조례 시행규칙 (규칙 제2555호)
 - ▶ 제4장 제43조 농산물 안전성 검사
 - 인천광역시 조례
 - ▶ 인천광역시 농수산물도매시장 조례 시행규칙 (규칙 제2664호)
 - ▶ 제5장 제58조 농산물 안전성 검사 및 반입 제한

제 2 절 연구 개발 목표 및 내용

1. 연구 목표

- 잔류 농약에 대한 검출용 바이ורי셉터 및 고감도 비색 센서 기술개발
- 농산물에 잔류하는 유기인계, 카바마이트계, 농약에 대한 10종의 DNA 앵타머 개발
- 잔류 농약 현장·다중 분석용 고감도 나노바이오센서 칩(스트립) 개발
- 앵타머-효소 복합반응기반 휴대용 다채널 스트립 개발
- 사용자 편이 현장 분석이 가능한 고감도 휴대용 잔류농약 광학 검출 시스템 개발

2. 연구 내용

- 잔류 농약에 대한 검출용 바이ורי셉터 및 고감도 비색 센서 기술 개발[제1세부]
 - 잔류농약 인식용 바이ורי셉터 및 나노입자활용 고감도 융합 기술 개발
- 농산물 잔류 농약(유기인계, 카바메이트계, 특이농약)에 대한 검출용 앵타머 개발[제1세부 위탁]
 - 농약에 대한 고감도 DNA 앵타머 10종 이상 개발
 - 잔류농약 인식용 프로브의 결합력/특이성 최적화 및 고 민감도 인식기술 확보
- 잔류 농약 현장·다중 분석용 고감도 광학 나노바이오센서 칩(스트립) 개발[제1세부 협동]
 - 잔류농약 검출용 고감도 정성·정량분석용 비색 센서 원천기술 도입
 - 앵타머 기반 다중 동시 검출 스트립센서 구현 및 양산용 스케일업과 안정화 테스트
 - 효소반응 기반 잔류농약 다채널 스트립센서 개발 및 제조공정 최적화
- 잔류농약 검출을 위한 고감도 휴대용 광학 검출 시스템 개발[제2협동]
 - 잔류농약 검출용 광학센서 소프트웨어/미들웨어 시스템 구축
 - 잔류농약 검출용 분광 광학센서 하드웨어 시스템 개발
 - 바이오센서의 광학적 반응 신호를 통해 잔류 농약 검출정보를 처리할 수 있는 신호변환 처리기술개발
 - 휴대형 장치의 소형화 및 제품화 기술 개발

3. 연구개발에 따른 기대성과

- 농산물 집하장, 대형농산물 시장, 대형마트 등과 같은 현장에서 소비자 및 분석담당자들이 손쉽게 잔류농약 오염여부를 확인할 수 있는 분석 장비의 개발 가능
- 잔류농약이 오염된 농산물을 소비자가 섭취하지 않도록 차단함으로써 국민보건 향상
- 스트립 타입 잔류농약 1종 현장 분석 kit 기술 이전 및 시제품화
- 다 채널 스트립 타입 잔류농약 다중 현장분석 kit 기술 이전 및 시제품화

제 3 절 연구 개발의 범위

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>[제1세부] 금나노입자와 단백질, 농약간의 화학반응을 이용한 검출법 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 나노입자의 특징과 화학적인 반응과 반응 후의 변화에 대하여 연구 	<ul style="list-style-type: none"> • 금 나노입자는 리간드, 단백질 또는 효소 등의 작용기를 통해 화학반응 하였을 때에 응집되면서 색깔변화를 동반하며 분광기를 통해 미세한 변화의 차이를 탐지할 수 있음 • 단백질과 농약을 이용하여 반응을 확인하고 분광기를 이용하여 금나노입자의 미세한 변화를 탐지하는 실험 진행함
	<ul style="list-style-type: none"> ● 단백질의 구조와 화학적 반응을 이용한 농약 검출방법 연구 	<ul style="list-style-type: none"> • 단백질은 여러 가지 아미노산으로 이루어져 있으며 아미노산의 구성에 따라 구조적 기능적으로 달라지며 효소의 역할도 가능함 • 형광을 발광하는 단백질을 생산하여 농약과의 반응에 따른 변화를 형광 강도의 변화를 통해 탐지할 수 있는지 실험함
	<ul style="list-style-type: none"> ● 금 나노입자와 화학적 반응을 이용한 농약 검출방법 연구 	<ul style="list-style-type: none"> • 이미다졸은 극성이 강한 화합물로 금과 결합을 잘하고 또한 리간드 형성에 강한 반응력을 가지고 있어 금 나노입자와 분자량이 큰 유기물과의 응집 현상을 유도 할 수 있음 • 이미다졸을 이용하여 농약과의 반응에 따른 금 나노입자의 변화를 흡광도 변화를 통해 탐지할 수 있는지 실험하여 잔류 농약에 따라 경향성 확인 및 반응의 최적화 조건 성립
	<ul style="list-style-type: none"> ● 여러 가지 농약의 특이적 검출 확인 및 정량식 도출 	<ul style="list-style-type: none"> • 여러 가지 농약과 농약의 구조와 비슷한 비 농약 화합물을 이용하여 농약 특이적 반응을 확인하고 정량분석을 위한 검정식 도출
<p>[제1세부] 금나노 입자의 공치화 관측을 통한 농약 검출법의 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 금 나노입자를 이용한 thiocarbamate 계열의 농약 분석법의 비색검출 방법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 13nm의 금 나노입자를 이용한 농약검출법 확인 • 금 나노입자의 크기 조절을 통한 향상된 농약검출법에 대한 연구

	<ul style="list-style-type: none"> ● 형광 염료와 금속이온 복합체를 이용한 농약검출법의 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 형광염료와 농약과 결합 가능한 금속이온 복합체 선정 • 농약의 농도별 적정실험 및 선택성과 pH별 반응성의 확인
<p>[제1세부] 금나노 입자를 이용한 luciferase 활성 측정 방법의 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● luciferase와 ATP 반응을 이용한 비색 측정법의 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 금나노 입자를 신호단으로 하는 luciferase 분석법 개발
<p>[제1세부 위탁] 잔류농약 선별</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 실용화 가능성이 높은 비농약 검출 장비를 위해, 광범위하게 쓰이는 비농약 조사. ● 용해도, 반감기, 그래핀과의 흡착반응에 이론적, 실험적 접근을 통해 7종의 비농약 선별. 	<ul style="list-style-type: none"> • 현재 가장 많이 쓰이는 비농약 리스트를 메카시스로부터 제공 받음. • 주요 농약 선별을 위해 실험을 통해 선별과정을 거침.
<p>[제1세부 위탁] 애타머 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 개발 완료된 비고정화 방식 그래핀 기반 방식으로 애타머 개발. 	<ul style="list-style-type: none"> • 목표 농약과 비슷한 구조의 다른 농약을 카운터 타겟으로 설정하여 특이성 향상을 꾀함
<p>[제1세부 위탁] 애타머 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 금나노입자와 애타머를 이용하면 색도분석이 가능 	<ul style="list-style-type: none"> • 개발된 애타머와 금나노를 이용하여 애타머의 특이성 및 결합력 분석
<p>[제1협동] 모델 애타머와 효소반응 기반 단일 잔류농약 검출 스트립 센서 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 모델 애타머를 이용한 스트립 센서 구축 <ul style="list-style-type: none"> -dsDNA 기반 곰팡이독소 (aflatoxin B1; AFB1) 스트립 센서 모델 개발 -애타머 기반 AFB1 분석용 dipstick 모델 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • Double strand DNA(dsDNA; 애타머-상보DNA) 기반한 곰팡이독소(aflatoxin B1; AFB1) 스트립 센서 모델 개발 <ul style="list-style-type: none"> - dsDNA기반 스트립 센서 디자인 - Nitrocellulose membrane 상 dsDNA 구축 방안 모색 :top-down 방식과 bottom-up 방식연구 - Top-down 방식의 스트립고정용 액상 기반 dsDNA - streptavidin 복합체 개발 - dsDNA-streptavidin strip 상 고정 조건 확인 - AFB1 검출을 위한 strip 제작 및 최적조건 확립 - 최적화된 dsDNA 기반 스트립 센서의 검출한계 확인 • 애타머 기반 AFB1 분석용 dipstick 모델 개발 <ul style="list-style-type: none"> -애타머 기반 dipstick 디자인 -애타머 기반 dipstick 최적화 <ul style="list-style-type: none"> ·상보DNA의 길이 선정 ·애타머 및 상보DNA의 농도 선정 ·애타머 및 AFB1 유동성 향상을 위한 버퍼 조건 선정 ·반응 조건 및 반응 시간 선정 ·최적화된 애타머 기반 스트립의 검출한계 확인
	<ul style="list-style-type: none"> ● 효소반응 기반 단일 잔류농약 	<ul style="list-style-type: none"> • 잔류농약 검출을 위한 효소기반 chemiluminescence 스트립센서

	<p>검출 스트립 센서 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> -잔류농약 검출을 위한 효소기반 chemiluminescence 스트립 센서 개발 -잔류농약 검출을 위한 효소기반 colorimetric 스트립센서 개발 	<p>개발</p> <ul style="list-style-type: none"> -Chemiluminescence 농약분석용 스트립 센서 디자인 -각 시약의 최적화 조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> ·각 효소별 농도 최적화 ·HRP 최적 적하량 선정 ·시료 적용 후 반응시간 결정 ·농약 첨가 후 반응시간에 따른 영향 확인 ·농약 3종에 대한 검출한계 측정 • 잔류농약 검출을 위한 효소기반 colorimetric 스트립센서 개발 -Colorimetric 스트립센서 디자인 -Pad 선정 -Colorimetric 스트립센서 검출한계 측정
	<ul style="list-style-type: none"> ● 스트립상 농약의 유동성 최적화 	<ul style="list-style-type: none"> • 버퍼종류 별 농약 등의 케미컬 이동성 최적화 • 계면활성제의 첨가에 따른 유동성 최적화
<p>[제1협동] 개발된 4종의 농약 앵타머를 이용한 다채널 스트립센서 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 개발된 4종의 농약 앵타머를 이용한 각각의 스트립센서 구현 -금나노입자에 붙여 놓은 앵타머가 타겟인자인 농약과 결합하여 떨어짐의 정도를 측정함으로써 농약의 정량성 및 정성성을 확인 	<ul style="list-style-type: none"> • 금 나노입자에 붙여 놓은 앵타머가 타겟인자인 농약과 결합하여 떨어짐의 정도를 측정함으로써 농약의 정량성 및 정성성을 확인 - 금 나노입자의 표면에 DNA, Protein같은 바이오 물질이 잘 흡착되는 성질을 이용 - 금 나노입자에 결합시켜놓은 DNA 앵타머의 경우 타겟인자인 농약이 들어가는 경우 금 나노입자의 표면으로부터 떨어지는 성질을 가짐 - DNA 앵타머에 형광물질을 결합시킴으로써 인해 떨어진 DNA를 스트립 상단부에서 검출함으로써 농약의 정성 및 정량적인 농도를 산출함 - 반응시간 최적화
	<ul style="list-style-type: none"> ● 다채널 스트립설계 및 패터닝 기술을 이용한 센서포맷제작 -동시에 4종 및 효소반응을 유도하기 위해 다양한 형태의 스트립센서 포맷제작을 위해 스크린프린팅 기술 적용 	<ul style="list-style-type: none"> • 동시에 4종 및 효소반응을 유도하기 위해 다양한 형태의 스트립센서 포맷제작을 위해 스크린프린팅 기술 적용 - 동시에 다종의 농약의 정성적 확인 및 기타 농약에 의한 정량적 성질을 확인하기 위한 패터닝 실시 - 실버 스크링 기술을 이용하여스트립센서 상에서 다채널 패터닝 실시 - 단일 스트립에서 동시 3종 분석 가능 기술 개발
	<ul style="list-style-type: none"> ● 앵타머 효소 복합반응에 대한 	<ul style="list-style-type: none"> • 앵타머기반 기술과 효소기술 기

	<p>정량 및 정성 분석법 최적화 -엠타머기반 기술과 효소기술 기반의 기술의 복합 사용시 요구되는 버퍼 및 염 농도의 최적화</p>	<p>반의 기술의 복합 사용시 요구되는 버퍼 및 염 농도의 최적화 - 엠타머와 최적의 효소반응에 필요한 buffer와 염 농도의 Universal화</p>
<p>[제1협동] 엠타머-효소 복합반응을 이용한 잔류농약 현장 다중 동시분석용 다채널 스트립 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 4종 농약의 동시 검출 시 검출한계 확인 	<ul style="list-style-type: none"> • 개발된 시스템을 이용하여 동시에 1-4종의 농약을 이용한 농약의 정량성 확인 - 1-4종의 농약을 이용하여 검출한계 및 정확성 확인
	<ul style="list-style-type: none"> ● 다채널 스트립 센서의 평가 및 개선 	<ul style="list-style-type: none"> • 실제 시료를 이용한 스트립 센서의 평가 • 실제 시료 중 10종 농약 별 cut-off value 평가 • 농장, 농산물 시장 등의 현장에 적용 • 실제시료 및 현장분석 적용 시 야기되는 문제점 도출 및 해결 • 스트립 센서의 신속성 개선 : 총 분석 소요시간 1시간 이내 목표
<p>[제2협동] 잔류농약 검출을 위한 휴대형 광학 검출 장치 고안 (형화 및 품화 기술 개발)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 산업화를 위한 scale up 조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> • 대량생산을 위한 각 시약 처리 조건 확인 • 외부환경에 따른 스트립 센서 영향확인 (온도, 습도 등) • 각종 안정제 처리를 통한 유효기간 증대 방안 강구 • 보관환경에 따른 유효기간 확인 • 센서 제조공정 최적화 및 간소화 전략수립 (㈜메카시스와 협의)
	<ul style="list-style-type: none"> ● 잔류농약 검출용 휴대형 분광 광학 검출 장치 설계 및 스트립 측정 모듈 설계 	<ul style="list-style-type: none"> • Liquid 샘플의 분광 특성 분석을 위한 분광 광학시스템 설계 및 제작/검증(파장 정확도, Photometric Accuracy, Baseline Flatness 등) • 잔류농약 스트립 센서의 측정을 위한 측정 모듈을 이미지 센서를 이용하여 설계 및 제작 • 스마트 폰 Application과의 통신을 위한 무선 통신 환경 구축 • User Interface 구현을 위한 임베디드 시스템 설계 및 제작
	<ul style="list-style-type: none"> ● 잔류농약 검출용 광학 신호 변환 처리기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 분광 광학시스템의 분광 측정을 위한 CCD 구동 모듈 설계 및 제작 • CCD 측정 알고리즘 개발 및 구현 • PD 측정 모듈 설계 및 제작 • 이미지 센서 모듈 설계 • 스트립 센서 측정용 이미지 모듈 설계 및 구현

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 제품생산 및 시장 현황

- 현재 진성 유니텍에서 판매되고 있는 제품은 Agri-Screen Ticket, 간이속성 검사 Kit, 농약단일 성분 정량 Kit, 잔류농약 검사용 Kit이 있음.



그림 1. 진성유니텍에서 현재 판매 중인 잔류농약 키트

- 저분자 유해물질 검출과 관련하여 UV-visible 흡광분광검출기, 전기화학 검출시스템이 상용화 되어 시판되고 있으나 대형장비이고, 소형화 되어 휴대용으로 개발된 바는 없음.
- 분광기의 경우 소형화 장비가 상용화 되었으나 HPLC 등의 크로마토그래피의 검출기 장비로 국한되어 있고, 유기물질 검출의 경우 검출한계가 수 ppm 수준에 머무르고 있음.
- 또한, 현재 판매 중인 잔류농약 키트는 각 농약별 감도가 달라 농약 중 일부는 과량이 있어야 검출이 가능할뿐더러 스크리닝 키트이므로 정량적인 분석을 위해서는 기기분석 실험을 수행해야 함.
- 우리나라의 바이오센서 시장은 (주)에스디, (주)올메디쿠스, (주)인포피아 (주)아이센스, (주)바이오포커스 등 몇 군데의 벤처기업에서 제품을 출시하고 있는 상태로 최근 매출이 상승하고 있으며, 현재 국내 바이오센서 기업들이 주로 관심을 가지고 있는 분야는 90% 이상이 의료용 바이오센서로, 아직 식품분석용과 환경용 및 그밖에 다른 분야의 바이오센서에 대한 관심 정도가 상대적으로 낮은 상태임.
- 향후 전망을 살펴보면 국내의 경우 국산 바이오센서가 상용화 되고 있으나, 아직 외국 제품의 의존도가 높은 실정임. 국내에서는 혈당 바이오센서 제품 외에는 시장이 매우 미미하나, 최근 들어 건강에 대한 관심이 고조되고 있으므로 젯산이나 콜레스테롤 등 다양한 바이오센서 관련 수요가 커질 것으로 전망됨.
- 국내 바이오센서 내수시장은 2012년 54억 달러 규모에서 2020년 99억 달러 규모로 연평균 10.4% 성장할 전망이다. 정부는 첨단 스마트 센서 육성사업 등을 추진하여 2020년 기준 42억 달러 생산과 21억 달러 수출을 달성할 계획임. 국내 나노 기술 연구 등의 활성화에

따른 연구용 바이오센서의 수요 증가를 고려할 때 국내 시장 성장률은 세계 시장 성장률보다 더 클 수 있을 것으로 예상됨.

제 2 절 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

- 미국 EPA(Enviromental Protection Adgency)에서 사용되고 있는 효소 기반 테스트 키트는 EcloxT-Pesticide Strips (Severn Trent Services), Neuro-IQ Tox Test KitT (Aqua Survey, Inc.), OP-Stick Sensor (Protein-Biosensor), Organophosphate/Carbamate Screen Kit (Abraxis LLC)가 대표적임.
- 이 외에도 SDI(Strategic Diagnostics Inc. USA)에서 생산하고 있는 각종 잔류농약 성분 에 따라 단일 EnvironGard® 96-well plate 또는 EnvironGard® 20 Tube Kit가 있음.
- 저분자 유기물질에 대한 핵산 앵타머 개발 관련 보고는 많지 않으며 핵산 앵타머 기반 마이크로 어레이, 바이오센서 및 바이오칩(주로 의학용) 개발이 보고되고 있으나 아직 상용화되어 있지 있음.
- 비표지 검출법으로 소형 SPR을 Texas Instrument 사에서 개발한 바 있으나 민감도가 낮고 재현성이 낮아 바이오칩에 응용되지 못하고 있는 실정임.
- 전기화학적 검출법, 형광분광법 등은 소규모 형태로 개발되어 바이오칩 검출 시스템으로 적용된 바 있으나 신호 발생을 위한 표지물질을 분석 시료에 접합시키기 위한 공정과 이에 따르는 시약의 reservoir 및 pump 등으로 인해 휴대용 수준으로 소형화 되지 못하고 생화학적 물질의 경우 측정한계가 수 $\mu\text{g/ml}$ 의 수준임.
- 외국 시장분석 전문기관 데이터모니터에 따르면 오는 2024년 세계 바이오시장은 2조6천억 달러(한화 약 3천 100조원)에 달할 전망이다. 이는 반도체, 자동차, 화학제품 분야의 예상 시자 규모를 합한 금액(약 2조5천억 달러)보다 많은 것으로 보고됨. 바이오센서와 밀접한 관련이 있는 나노바이오 하이브리드 기술의 응용 제품은 대부분 개발 초기단계이나 기술개발이 활발히 진행되어 상용화가 빠르게 진전될 것으로 예상됨. 따라서 생체 친화성 나노 바이오 하이브리드 프로브의 개발은 시장 선점 효과와 함께 원천 기술의 확보를 가능하게 할 것으로 판단됨.

제 3 장 세부연구수행 내용 및 결과

제 1 절 세부연구수행 결과

[제1세부]

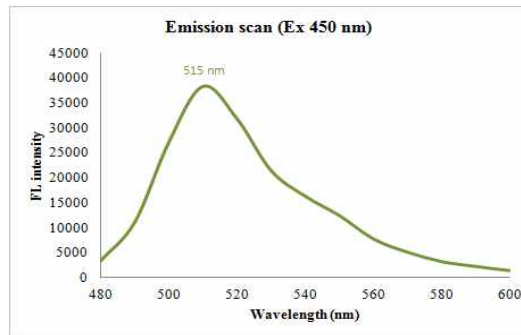
[1차년도 연구수행 결과]

가. 금 나노입자와 Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)을 이용한 비색센서의 개발

1) EGFP를 이용한 형광 센서의 개발

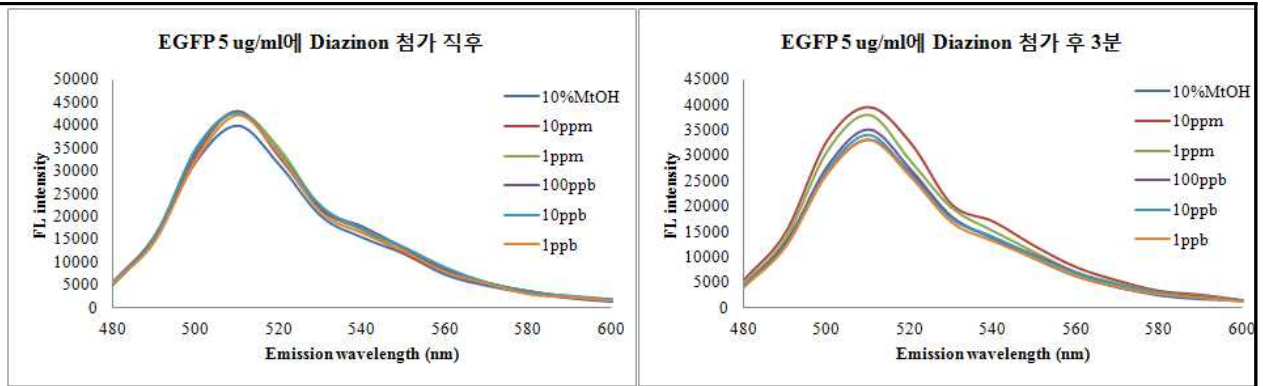
(가) EGFP의 발현과 구조, 형광

- ◆ EGFP를 생산하기 위해 *Escherichia coli*에 EGFP를 발현시키는 유전자를 형질전환을 통해 클로닝을 하고, 이로부터 IPTG를 통하여 과발현을 유도하여 생산함.
- ◆ EGFP는 480 nm 파장의 외부 광원으로부터 515 nm에서 발광하는 형광 단백질이며 형광의 세기가 아주 강함.

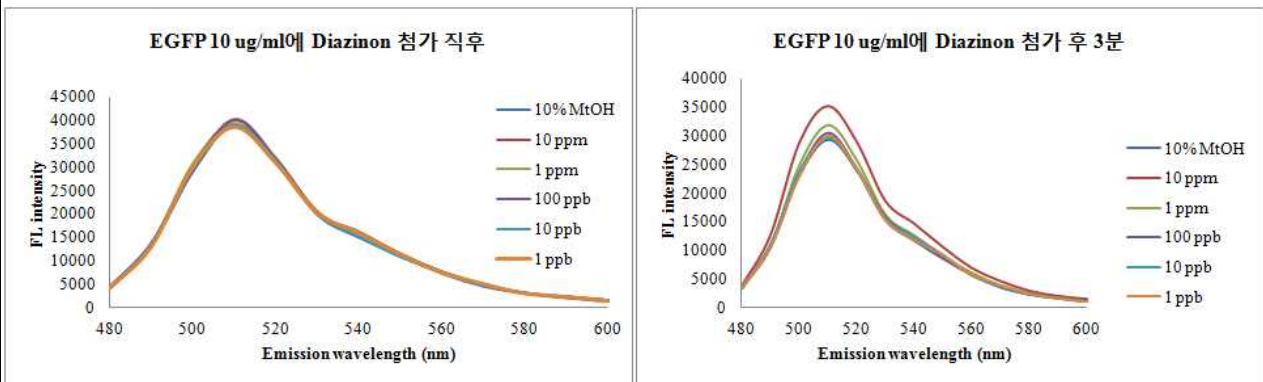


(나) EGFP와 Diazinon과의 반응에 의한 형광의 변화

- ◆ EGFP가 농약검출 센서로서 가능성을 알아보기 위하여 EGFP에 Diazinon을 첨가하여 형광을 측정한 결과 농약 첨가 후 3분 후에 농약의 농도별로 EGFP의 형광이 차이나는 것을 확인하였으며 EGFP가 메탄올에 의해 시간 경과에 따라 형광이 감소하게 되고, 이 때 Diazinon의 농도가 높을수록 형광이 감소하는 속도가 줄어드는 결과가 나타남.



- EGFP의 농도에 따라 Diazinon이 주는 영향을 알아보고 최적의 농도를 알아보기 위하여 여러 가지 EGFP농도로 실험한 결과 5-10 ng/ml농도의 EGFP에서 Diazinon과의 농도별 반응이 가장 잘 나타남.

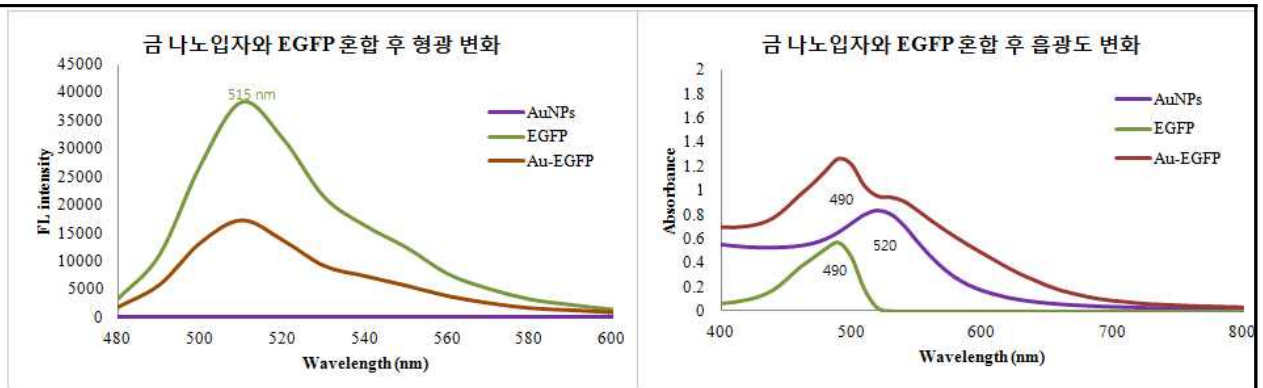


2) EGFP와 금 나노입자를 이용한 비색센서의 개발

- EGFP를 이용한 센서보다 정확성과 정량성을 더 민감하고 재현성 있는 센서로 개발하기 위하여 조금의 변화에도 광학적인 변화가 나타나는 금 나노입자를 이용하여 EGFP와의 반응에 따른 광학적인 변화를 관찰하고 Diazinon과의 반응을 통해 센서로서의 가능성을 확인하고자 실험함.

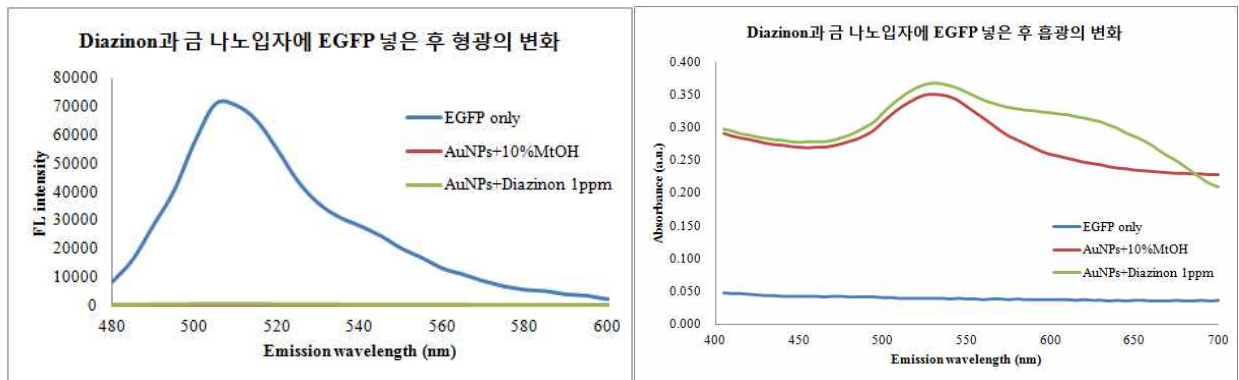
(가) 금 나노입자와 EGFP 혼합 후 형광과 흡광도의 변화

- 금 나노입자와 EGFP 혼합 후 EGFP의 형광이 감소되었으며, 이는 금 나노입자의 흡광과장이 EGFP의 형광 파장과 거의 일치하기 때문에 일어나는 효과임.
- 금 나노입자와 EGFP의 흡광도는 각각 490 nm와 520 nm에서 peak를 나타내었으며, 혼합 후 흡광도는 금 나노입자와 EGFP의 흡광도 값을 합친 것과 유사한 값을 나타냄. 또한 이를 통하여 EGFP가 직접적으로 금 나노입자의 aggregation나 색 변화에 영향을 주지 않는 것을 확인함.



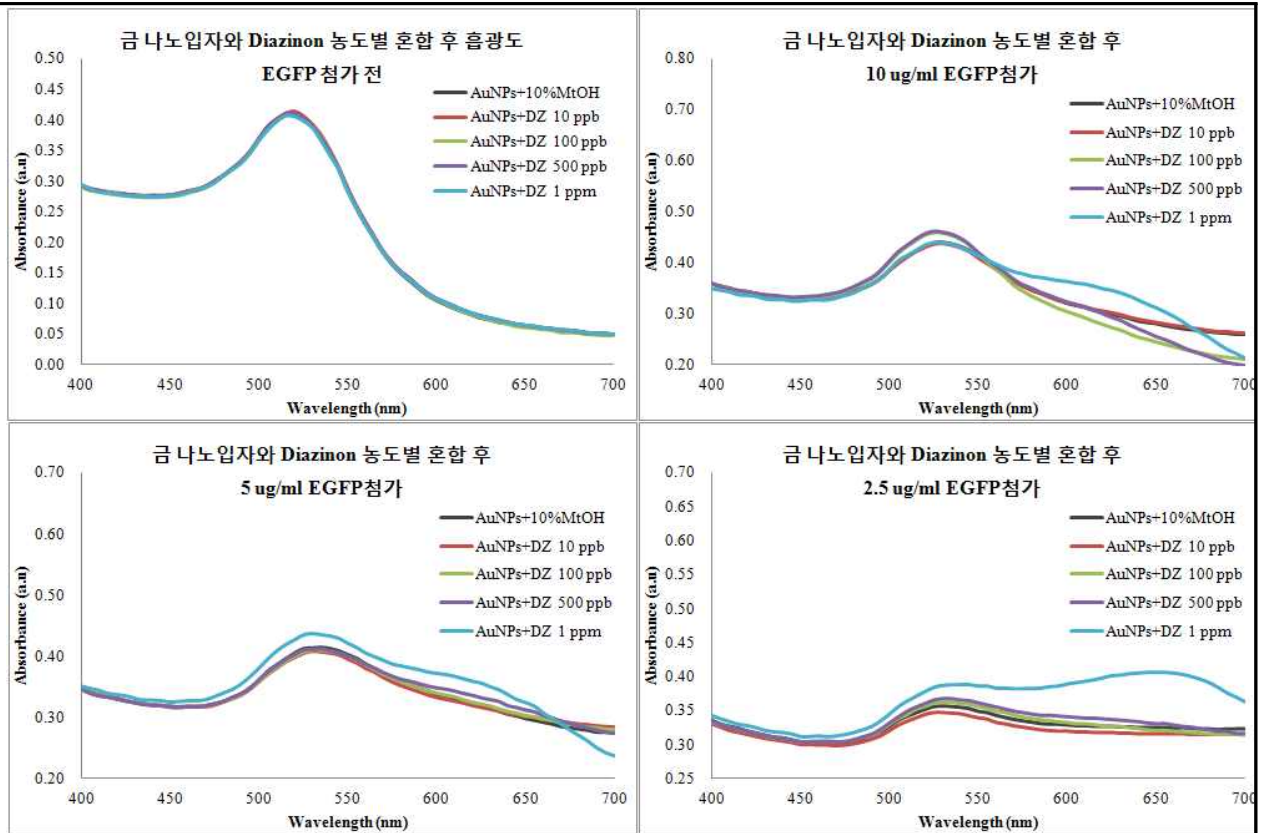
(나) Diazinon을 이용한 금 나노입자와 EGFP 혼합에 따른 형광과 흡광도 활성 측정

- ◆ 금 나노입자에 10% 메탄올과 1ppm 농도의 Diazinon을 각각 1:1로 혼합 후 10 ug/ml의 EGFP와 반응 하였을 때 형광의 변화를 측정하였으나 금 나노입자의 흡광이 비교적 크게 나타나 Diazinon의 유무와 상관없이 형광이 소광되어 활성 측정이 어려움을 확인. 금 나노입자와 EGFP의 흡광도 측정을 통해 비색 측정을 해보기로 함.
- ◆ 금 나노입자에 10% 메탄올과 1 ppm 농도의 Diazinon을 각각 1:1로 혼합 후 10 ug/ml의 EGFP와 반응 하였을 때 흡광도의 변화를 측정한 결과 금 나노입자에 10% 메탄올을 넣은 처리구와 1ppm의 Diazinon을 넣은 것과의 흡광도 차이가 나는 것을 확인하였고 EGFP의 농도를 바꾸어가면서 흡광도의 변화가 급격해지는 지 확인하기 위한 실험을 진행함.

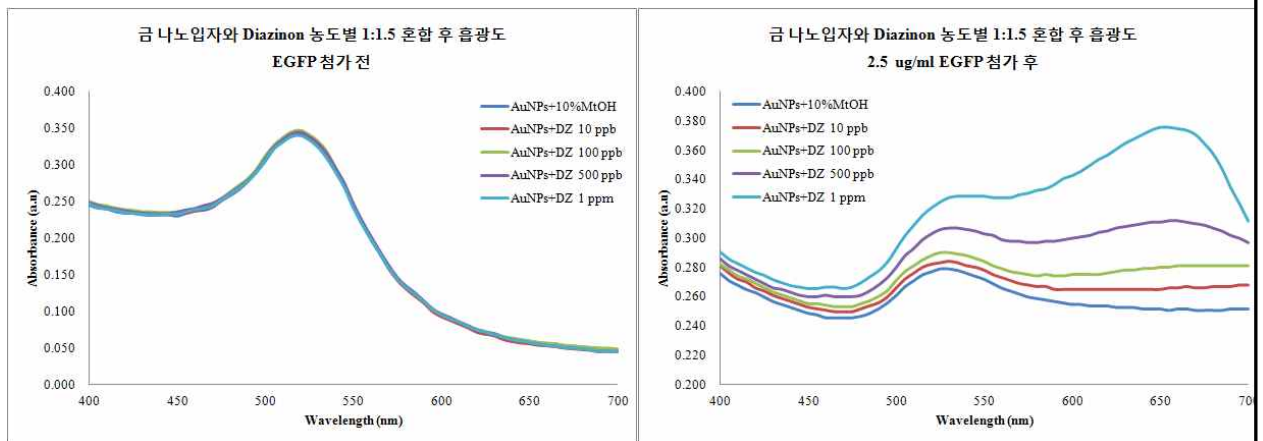


(다) EGFP의 농도에 따른 금 나노입자 비색센서의 최적화

- ◆ EGFP의 농도별 첨가에 따라 금 나노입자와 Diazinon의 반응에 의해 일어나는 금 나노입자의 응집화를 통한 흡광도의 변화가 Diazinon의 농도에 따라 다르게 변하는 EGFP의 농도를 확인하고 금 나노입자와 농약과의 혼합 비율을 바꾸어 보는 최적화 실험을 진행함.
- ◆ 금 나노입자와 Diazinon과의 반응에서 금 나노입자의 변화가 생기지 않는 것을 확인하였고 이에 따라 금 나노입자와 농약을 농도별로 하여 1:1 비율로 섞어 반응 한 후 EGFP를 첨가하여 흡광도 변화를 비교해보기로 함.
- ◆ EGFP의 농도가 낮을수록 금 나노입자의 흡광도 변화가 변화하였고, EGFP농도가 2.5 ug/ml일 때 Diazinon 농도에 따른 차이가 나는 것을 확인하였고 금 나노입자와 농약의 반응 비율을 1:1에서 1:1.5로 바꾸어 실험함.



- ◆ 금 나노입자와 농약의 비율을 1:1.5로 먼저 반응 후 2.5 ug/ml EGFP를 넣은 후 흡광도를 측정 한 결과 금 나노입자는 농약과의 반응은 일어나지 않았지만 EGFP의 첨가 후에 농약과 EGFP의 반응에 의해 금 나노입자의 응집화가 일어났고 Diazinon의 농도가 높을수록 응집화가 많이 일어나 흡광도 변화가 더 크게 일어난 것을 확인할 수 있었음.

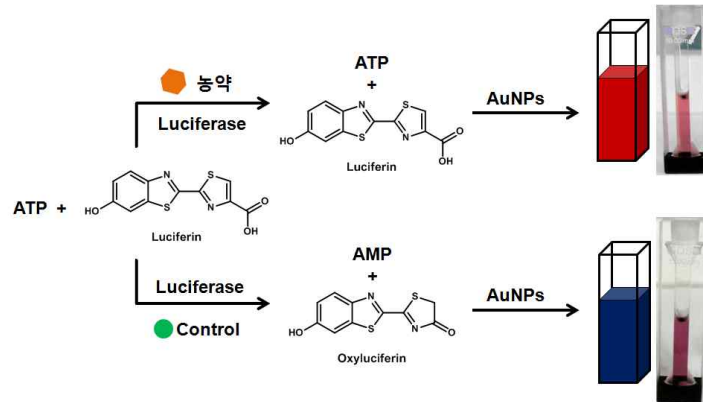


나. 금 나노입자를 이용한 Luciferase 효소의 고감도 비색 활성 측정법의 개발

1) Luciferase 비색 활성 측정법의 원리

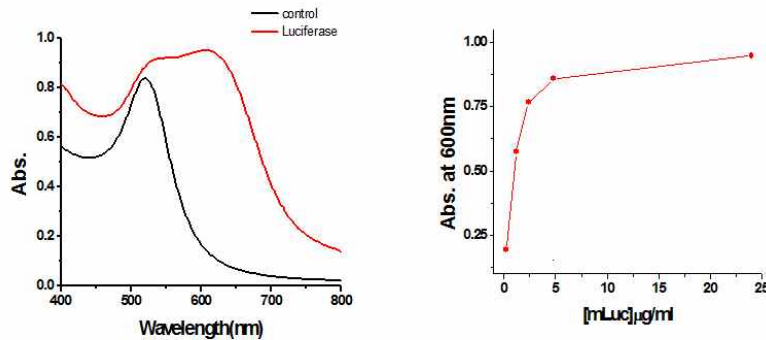
- ◆ 금나노입자는 ATP 존재 하에서는 Mg^{2+} 이온을 포함한 완충 용액에서 매우 안정한 반면 AMP 존재 하에서는 매우 불안정해져 응집화가 일어나 붉은색에서 파란색으로 색깔이 변하게 됨.
- ◆ 루시페레이즈(luciferase)는 루시페린을 ATP의 존재하에서 옥시루시페린으로 산화시킴과 동시에 ATP를 AMP로 가수분해 시킴.

- 루시페레이스에 의해 ATP가 AMP로 가수분해 됨으로 금나노입자를 가할시 루시페레이스에 의해 ATP가 AMP로 가수 분해 되는 정도에 따라 색깔변화 정도가 달라진다.



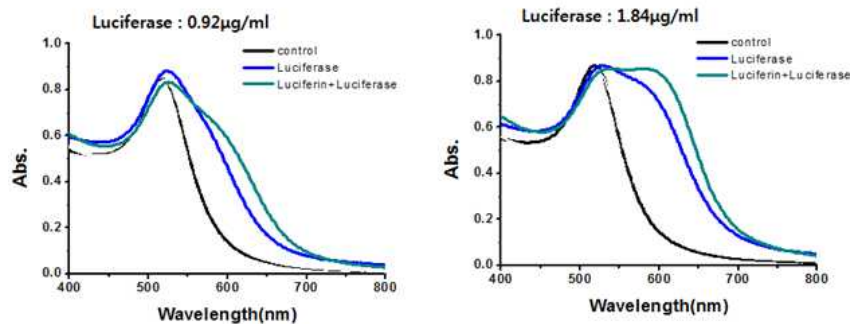
2) Luciferase 비색 활성 측정 결과

- ATP 50 μ M, Luciferin 50 μ M, Mg^{2+} 100 μ M가 들어 있는 pH 7.4 HEPES 용액에 다양한 농도의 m-luciferase를 가한 후 일정 시간 후에 금나노입자의 최종 농도가 3 nM가 되도록 만든 후 15분후 그 때의 흡광도를 측정함으로써 m-luciferase의 활성을 측정하였다.



[루시페레이스 존재시 금나노입자의 흡광도 변화]

- 금나노입자의 600 nm에서의 흡광도가 루시페레이스의 양이 증가할수록 증가함을 알 수 있었고 이를 통해 루시페레이스의 활성에 따라 금나노입자의 색깔변화가 비례적으로 일어남을 알 수 있었다.

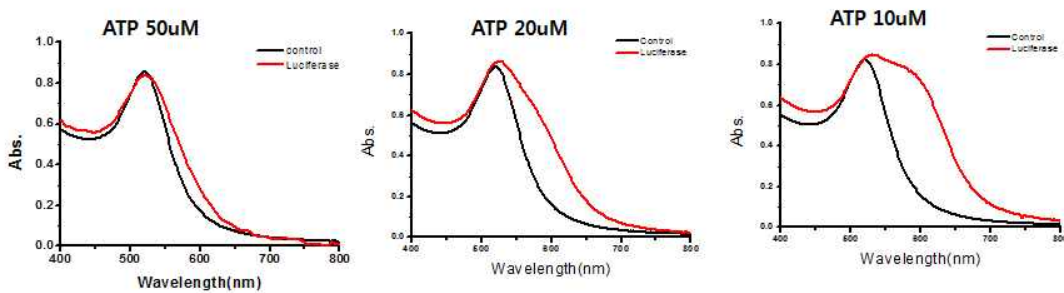


[루시페레이스 양에 따른 금나노입자의 흡광도 변화]

3) Luciferase 비색 활성 측정 방법의 최적화

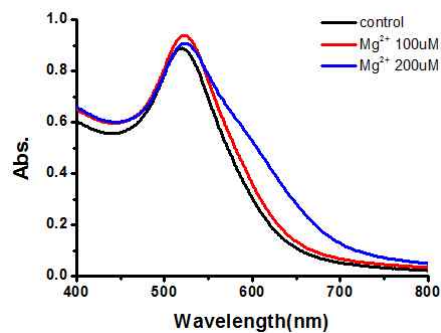
(1) 완충용액내의 ATP 양

- ◆ 금나노입자의 안정성은 ATP 농도에 매우 민감하므로 완충 용액 내 ATP의 양에 따른 luciferase에 의한 금나노입자의 색깔 변화정도를 측정하여 luciferase 활성 측정법의 조건의 최적화를 시도함.
- ◆ 완충 용액 내 ATP 농도가 낮아질수록 luciferase에 의한 금나노입자의 색깔 변화가 급격이 증가함.



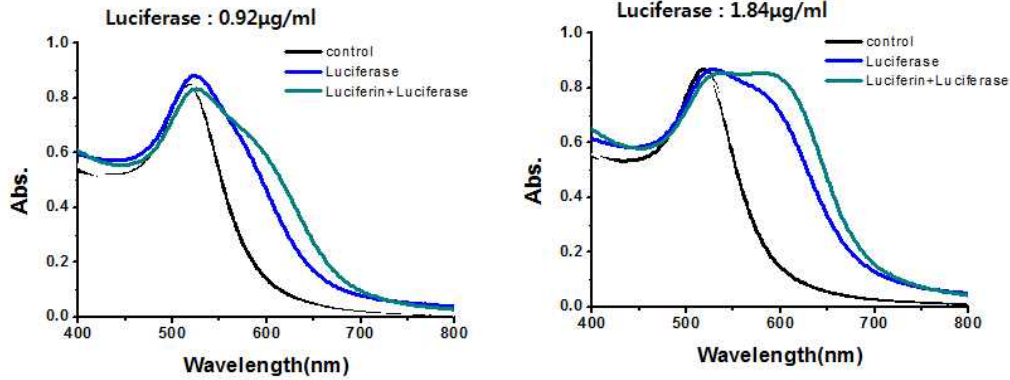
(2) 완충용액내의 Mg²⁺ 양

- ◆ 금나노입자의 안정성은 Mg²⁺의 농도에 매우 민감하므로 완충 용액 내 Mg²⁺의 양에 따른 luciferase에 의한 금나노입자의 색깔 변화정도를 측정하여 luciferase 활성 측정법의 조건의 최적화를 시도함.
- ◆ 완충 용액 내 Mg²⁺ 농도가 높아질수록 luciferase에 의한 금나노입자의 색깔 변화가 급격이 증가함.



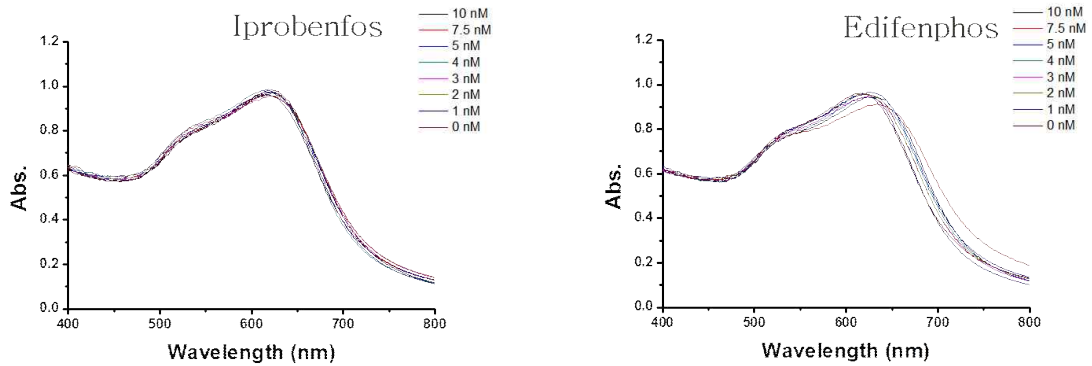
(3) Luciferin의 존재 유무

- ◆ m-Luciferase가 10 mg에 348,000원 (Sigma-Aldrich 가격)으로 매우 고가의 luciferin이 없어도 ATP를 AMP로 가수분해 할 수 있음을 확인하고 luciferin 없이 m-Luciferase의 활성화를 측정함.
- ◆ Luciferin이 존재 시 m-Luciferase의 활성과 비 존재시의 활성을 비교해본 결과 luciferin의 존재 시 m-Luciferase의 활성이 다소 크지만 고가의 luciferin이 존재하지 않을 시에도 m-Luciferase의 활성 측정에는 큰 문제점이 없음을 확인함.



(4) Luciferase 비색 활성 측정 조건 및 이를 이용한 농약검출 결과 및 추후 연구 방향

- ◆ 앞의 실험을 이용하여 최종적인 Luciferase 비색 활성 측정 조건(AuNP 3 nM / pH 7.4 HEPES 10 mM / Luciferase 1.8 µg/ml / Mg²⁺ 200 µM)을 이용하여 thioether 계열의 농약인 iprobenfos와 edifenphos의 검출에 응용하고자함
- ◆ 하지만 두 농약은 luciferase의 활성 저해를 확인하지 못함.

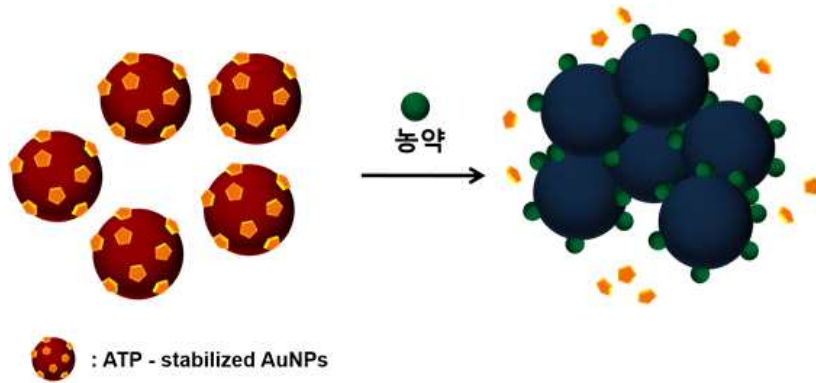


다. ATP로 안정화된 금 나노입자를 이용한 thioether계열의 농약 검출법의 개발

1) ATP로 안정화된 금 나노입자를 이용한 농약 검출법

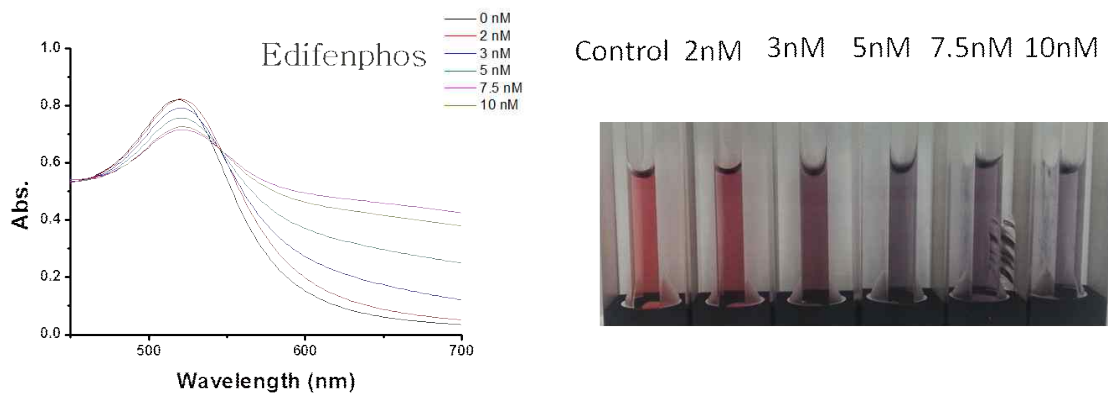
- ◆ 금나노 입자는 일반적인 유기 염료에 비하여 10³-10⁵ 정도의 큰 extinction coefficient를 가지고 있으며, 화학적 물리적인 변화에 대하여 입자간에 거리 변화에 따라서 급격한 색변화를 가지는 특징을 가짐.
- ◆ 금나노 입자는 특정 물질로 금나노 입자의 표면을 활성화 시켜 특정물질에 반응하여 색변화를 유도하는 시스템을 구성 할 수 있음.
- ◆ Thiolate 작용기는 여러 농약에 포함되어 있는 농약의 대표적인 작용기로 edifenphos 등의 다양한 농약에 포함되어 있는 구조임.
- ◆ ATP로 안정화된 금나노 입자는 완충 용액 상에서 매우 안정하지만 thiolate가 존재 시에는 thiolate의 S원자와 결합을 하게 되고 이를 통해 매우 불안정한 상태가 됨.

- ◆ 위 반응 통해 ATP로 안정화된 금나노 입자는 결국에는 thiolate에 의해 나노 입자의 뭉치화 반응이 일어나 색변화가 관찰됨.
- ◆ 본 연구에서는 이러한 성질을 이용하여 thiolate구조를 가지는 대표적 농약인 edifenphos의 검출 시스템을 개발함.
- ◆ Edifenphos는 벼 살균제로 사용되며 잔류허용기준은 곡류 기준 0.2 mg/kg (0.2 ppm)으로 강력한 독성을 가지는 농약이다.



[금나노 입자를 이용한 농약분석법의 모식도와 농약의 농도별 색변화]

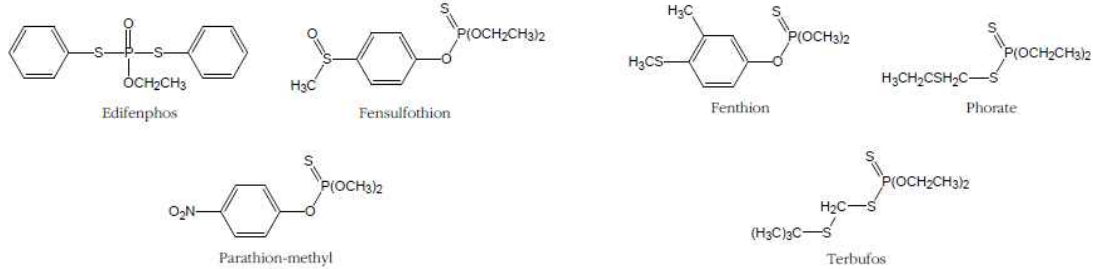
- ◆ 개발된 시스템에서 금나노 입자의 색변화를 통하여 edifenphos를 정량 가능하며 이때 검출한계는 약 2 nM로써 0.62 ppb 수준의 검출한계를 가짐.
- ◆ 이는 잔류허용기준 0.2 ppm에 비하여 매우 적은 양을 검출할 수 있음.
- ◆ 무엇보다도 이 방법은 아래 그림에서 볼 수 있듯이 다른 기기의 도움 없이도 단지 눈으로도 농약의 양을 2 nM까지도 손쉽게 구별해 낼 수 있는 장점을 가지고 있음.



[ATP로 안정화된 금나노입자를 이용한 edifenphos의 검출]

2) 향후 연구 방향

- ◆ 추후 연구에서는 thioether계열 뿐만 아니라 아래와 같은 다양한 형태의 황 함유 농약에 대하여 ATP로 안정화된 금나노입자를 이용한 비색 검출 방법에 대하여 연구를 진행하고자 함.



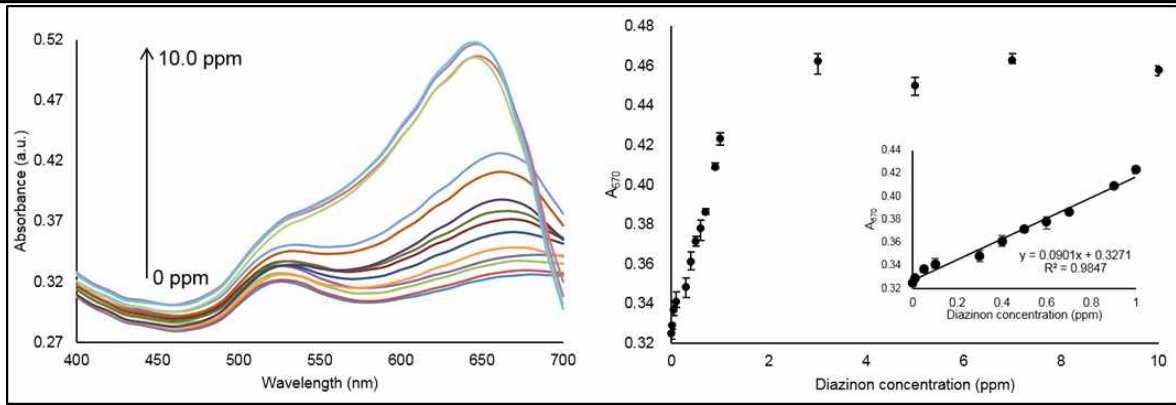
[Thiolate구조를 가지는 농약]

[2차년도 연구 수행 결과]

가. 금 나노입자와 이미다졸(Imidazole)을 이용한 비색센서의 개발

1) 금 나노입자, 농약, imidazole의 농도와 반응 volume 비율 최적화

- 기존의 농약 검출 시 micro 96-well plate에서 혼합 농도와 비율은 금 나노입자 (10 nM) 40 μ l에 농약을 각 농도 별로 60 μ l를 혼합한 후 이미다졸 (2.5 mM) 100 μ l를 넣어 UV/vis spectrum을 400 nm에서 700 nm 까지 측정하여 비교하였으나, 똑같은 조건에서 반복 실험 시에 재현성이 떨어지는 결과가 나왔고 낮은 농도에서의 검출 가능성이 떨어져 검출 한계 값의 수준이 좋지 못하였음.
- 금 나노입자와 이미다졸을 이용한 농약의 검출 실험에서 금 나노입자와 이미다졸의 농약과의 반응 농도 및 비율을 조절하여 낮은 농도의 농약에서도 민감하게 검출이 가능하고, 재현성을 높게 만들기 위하여 최적화가 요구됨.
- 농약의 농도에 따른 이미다졸과 금 나노입자의 반응에 따라 다르게 aggregation되면 이를 금 나노입자의 광학 특성을 이용하여 측정하므로 금 나노입자의 비율이 증가함에 따라 신호의 세기와 농약의 농도에 따른 처리구 간의 차이가 커질 것으로 기대됨.
- 금 나노입자의 농도는 합성 시 농도가 10 nM이고 더 높은 농도를 이용할 수 없으며, 이미다졸의 경우 높은 농도를 사용하게 되면 사용 양을 줄일 수 있으므로 혼합 비율을 조정하여 최적의 조건 탐색
- 금 나노입자와 이미다졸의 비율을 이용하여 실험한 결과 아래의 그림과 같이 재현성이 좋으며 낮은 농도에서 검출이 가능한 최적의 농도를 결정하였고, 낮은 농도에서도 검출 가능하며 재현성 실험에서도 오차가 크지 않게 나타나 최적의 조건을 확립

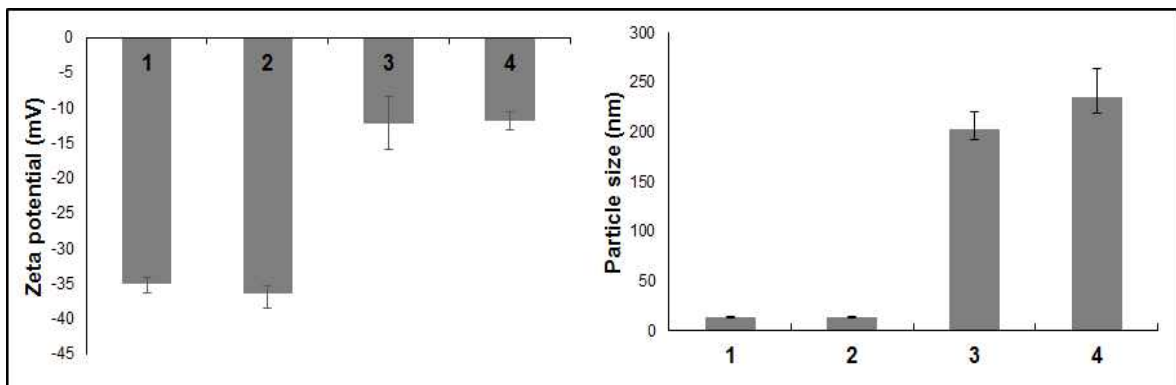


[금 나노입자 50 μ l와 각 농도별 농약(Diazinon) 100 μ l를 섞은 후, 이미다졸(0.3 mM) 50 μ l을 넣은 후 UV/vis spectrum 측정 결과(좌), 670 nm에서의 흡광도 값으로 나타낸 그래프(우)]

- 위 그림의 670 nm의 흡광도 값으로 나타낸 그래프에서 1 ppm 이하의 농도 구간에서 R^2 값이 0.9847인 선형곡선과 y값에 대한 수식을 얻었고, 3-시그마 법을 이용하여 검출한계 값을 계산하였음. 그 결과 디아지논의 검출 한계는 53.3 ppb로 나타남.
- 금 나노입자와 농약, 이미다졸의 혼합 후 금 나노입자의 변화가 농약 검출에 가장 효율적인 반응 시간을 표준화하기 위하여 금 나노입자의 aggregation에 따른 크기의 변화를 시간에 따른 kinetic 과 ZETA sizer를 통하여 실시간으로 측정하고, 이를 통하여 최적의 반응 시간을 확정하기로 함.

2) 금 나노입자, 농약 및 Imidazole의 반응 시 제타전위 및 입자 크기 변화 확인

- Zeta sizer를 통하여 금 나노입자의 aggregates에 따른 제타전위 변화와 크기의 변화를 측정함으로써 이미다졸이 금 나노입자의 응집에 미치는 영향을 확인하고자 함. 금 나노입자 용액에 농약과 이미다졸 용액을 순차적으로 첨가한 후, 각각 첨가 시 금 나노입자의 제타전위와 나노 입자 크기를 제타전위입자측정기로 측정함.

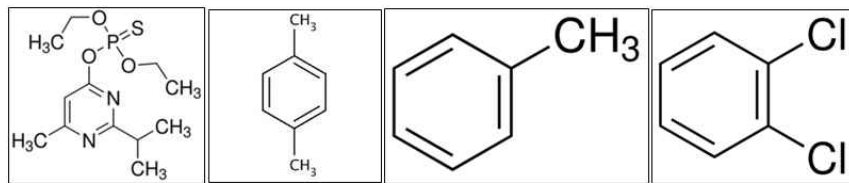


[금 나노입자에 Diazinon(1 ppm), 또는 이미다졸(0.3 mM)을 첨가 후 제타전위 측정 결과(좌), 크기 변화 측정 결과(우). 1: 금 나노입자, 2: 금 나노입자+Diazinon, 3: 금 나노입자+이미다졸, 4: 금 나노입자+Diazinon+이미다졸]

- ◆ 금 나노입자의 제타전위는 금 나노입자 표면의 citrate ion 때문에 -35 mV로 (-)전하를 띠고, 농약 Diazinon을 첨가했을 때도 -36 mV로 거의 변화가 없었음. 그러나 금 나노입자에 이미다졸을 첨가하거나, 금 나노입자와 농약 혼합물에 이미다졸을 첨가 시 금 나노입자의 제타 전위가 크게 중화되어 두 경우 모두 -12 mV로 크게 증가함. 이를 통하여 이미다졸의 첨가로 인하여 금 나노입자의 표면 전위가 바뀌는 것을 알 수 있고, 금 나노입자의 (-)전위가 이미다졸의 (+)전위에 의해 전위가 변화한 것을 확인함.
- ◆ Dynamic light scattering (DLS)를 측정하여 얻은 금 나노입자의 크기는 13 nm이고, 농약 Diazinon을 첨가했을 때도 13 nm로 동일함. 그러나 금 나노입자에 이미다졸을 첨가하거나, 금 나노입자와 농약 혼합물에 이미다졸을 첨가 시 각각 202 nm와 235 nm로 크기가 크게 증가함. 이로써 이미다졸이 금 나노입자의 aggregation을 유도하는 것을 입증하고, 농약이 존재 할 때에 나노입자의 크기가 농약의 양에 따라 더 크게 응집되는 것을 알 수 있었음.
- ◆ 위의 결과를 토대로 이미다졸이 금 나노입자의 응집을 유도하고, 이 때 농약이 존재하게 되면 농약에 의해 금 나노입자의 응집 크기가 더 커지는 것을 토대로 흡광 스펙트럼의 측정 결과와 일치하는 결과임을 확인하였음.

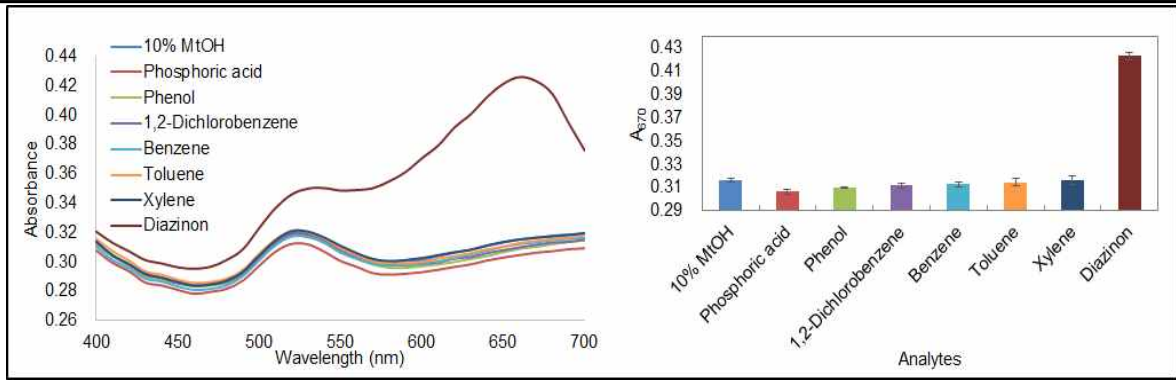
3) 비 농약 실험을 통한 농약과의 특이성 확인

- ◆ 농약 검출을 위한 금 나노입자와 이미다졸을 이용한 검출 실험에서 농약의 기본 구조식과 유사한 화합물 중에서 비 농약 화합물들과의 반응을 통해 농약과의 특이적 검출 가능성을 확인함.
- ◆ 농약의 화학적 구조 중에서 가장 핵심이 되는 벤젠고리를 가지고 있는 화합물 (Xylene, Toluene, 1,2-dichlorobenzene, phenol, benzene)과 phosphate 기를 가진 화합물 (phosphoric acid)을 이용하여 실험함. Diazinon과 각각의 비 농약 화합물의 구조는 다음과 같으며 Diazinon 농약의 기본적인 구조식과 유사한 형태를 가짐.



[좌측에서 우측으로 Diazinon, Xylene, Toluene, 1,2-dichlorobenzene의 구조]

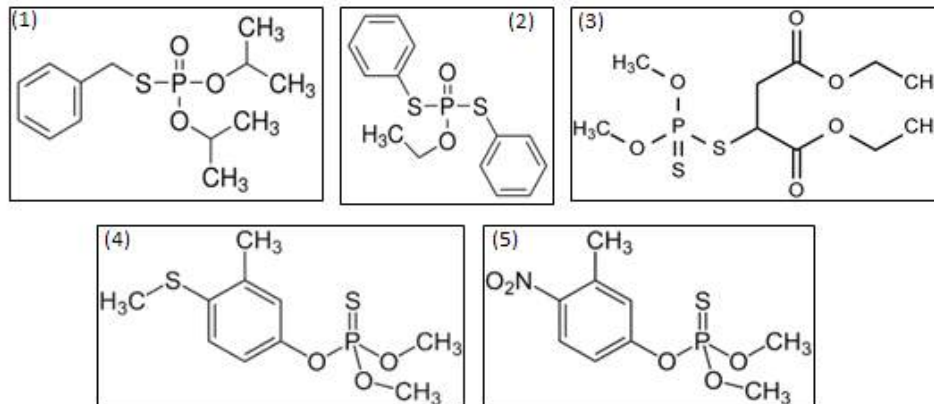
- ◆ 각각 1 ppm 농도의 Diazinon 및 비 농약 화합물에 금 나노입자와 이미다졸을 순차적으로 첨가하여 비교한 결과 다음 그림에서 농약 Diazinon에 특이적으로 검출 가능하다는 것을 잘 나타냄. 670 nm에서의 흡광도를 비교한 결과, 비 농약 화합물에서는 흡광도가 0.33이하로 농약이 없는 대조구와 비슷하게 측정되었으며, 농약 Diazinon의 흡광도만이 0.41로 이들과 차이를 두고 높은 흡광도를 나타내며 농약에 특이적인 반응을 확인할 수 있었음.



[Diazinon과 비 농약 화학물에 대한 금 나노입자와 이미다졸을 이용한 검출 스펙트럼(좌)과 670 nm에서의 Absorbance 비교(우)]

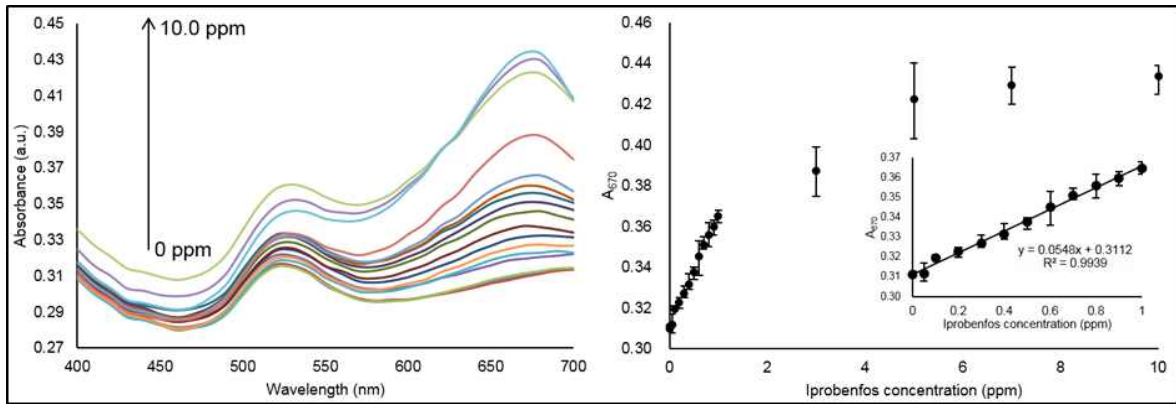
4) 검출 가능한 농약 Screening

- Diazinon 이외에 금 나노입자와 이미다졸을 이용한 검출 시스템의 다른 여러 가지 농약 검출 가능성을 알아보기 위하여 유기인계 농약을 중심으로 실험
- Iprobenfos, Edifenphos, Malathion, Fenthion 그리고 Fenitrothion은 다음과 같은 화학 구조식을 갖는 유기인계 농약으로, 모두 organothiophosphate로 벤젠링과 황으로 치환된 phosphate를 가진 화학 구조식을 갖고 있음.

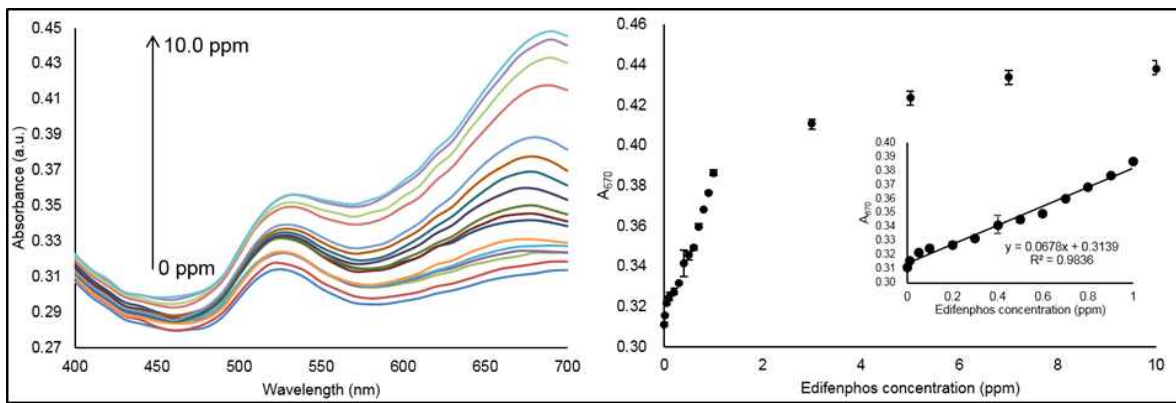


[(1) Iprobenfos, (2) Edifenphos, (3) Malathion, (4) Fenithion, (5) Fenitrothion의 화학 구조식]

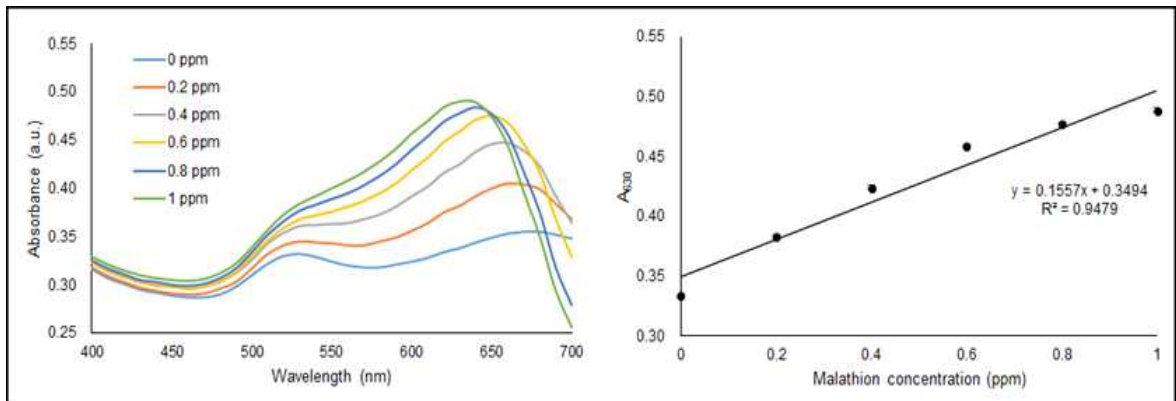
- Iprobenfos 농약의 농도를 다양하게 하여 금 나노입자와 이미다졸을 이용하여 흡광 스펙트럼을 측정한 결과, Iprobenfos의 농도에 따라 흡광 스펙트럼의 변화가 순차적으로 잘 나타나 있는 것을 확인하였고, 특히 1 ppm 이하의 농도 구간에서 신뢰도 값이 0.9939로 높은 값을 나타내었음. 또한, 각 측정 값에 대한 검정식을 얻었고, 3-시그마 룰을 통하여 최저 검출 한계를 계산한 결과 53.6 ppb까지 검출이 가능한 것으로 확인됨.
- Edifenphos 농약의 농도 별 검출 실험 결과에서도 Edifenphos 농도에 따라 스펙트럼의 변화가 아주 잘 분리되어 측정되었으며, 특히 1 ppm 이하의 농도 구간에서 신뢰도 값이 0.9836인 선형 곡선과 y값에 대한 검정식을 얻었음. 3-시그마 룰을 통하여 최저 검출 한계를 계산한 결과 27.9 ppb로 낮은 값에서도 측정이 가능함을 확인함.



[Iprobenfos 농약의 농도 별 스펙트럼의 변화(좌)와 670 nm에서의 흡광도 값으로 나타낸 그래프(우)]

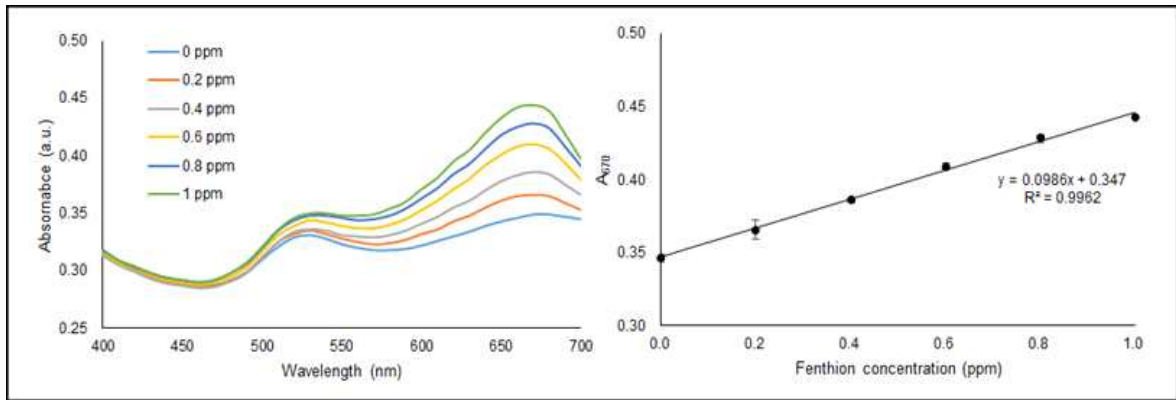


[Edifenphos 농약의 농도 별 스펙트럼의 변화(좌)와 670 nm에서의 흡광도 값으로 나타낸 그래프(우)]



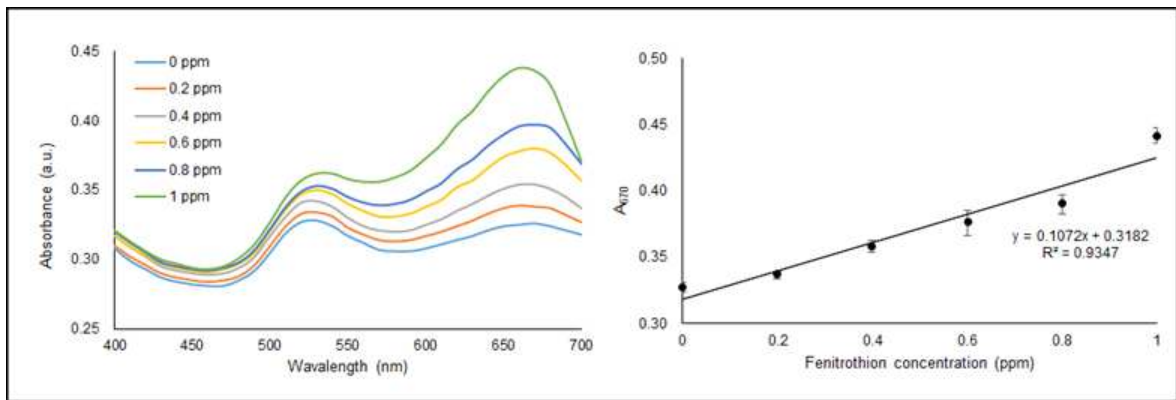
[Malathion 농약의 농도 별 스펙트럼의 변화(좌)와 670 nm에서의 흡광도 값으로 나타낸 그래프(우)]

- ◆ Malathion 농약의 농도 별 검출 실험 결과, 농도에 따른 변화가 순차적으로 잘 나타나 있는 것을 확인하였으며, 1 ppm 이하의 농도 구간에서 R^2 값이 0.9479인 선형 곡선과 y값에 대한 수식을 얻었고, 3-시그마 물을 통하여 검출 한계를 계산한 결과 8.6 ppb까지 검출이 가능한 것으로 확인됨.
- ◆ Fenthion 농약의 농도 별 검출 실험 결과, 농도에 따라 스펙트럼의 변화가 아주 잘 일어나며, 1 ppm 이하의 농도 구간에서 R^2 값이 0.9962인 선형 곡선과 y값에 대한 수식을 얻었고, 3-시그마 물을 통하여 검출 한계를 계산에서 5.0 ppb로 가장 낮은 값에서도 측정이 가능함을 확인함.



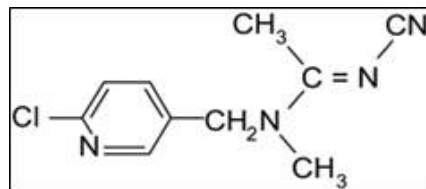
[Fenthion 농약의 농도 별 스펙트럼의 변화(좌)와 670 nm에서의 흡광도 값으로 나타낸 그래프(우)]

- Fentrothion 농약의 농도 별 검출 실험 결과, 농도에 따라 스펙트럼의 변화가 아주 잘 일어나며, 1 ppm 이하의 농도 구간에서 R² 값이 0.9347인 선형 곡선과 y값에 대한 수식을 얻었고, 3-시그마를 통하여 검출 한계를 계산에서 100 ppb로 낮은 값에서도 측정이 가능함을 확인함.

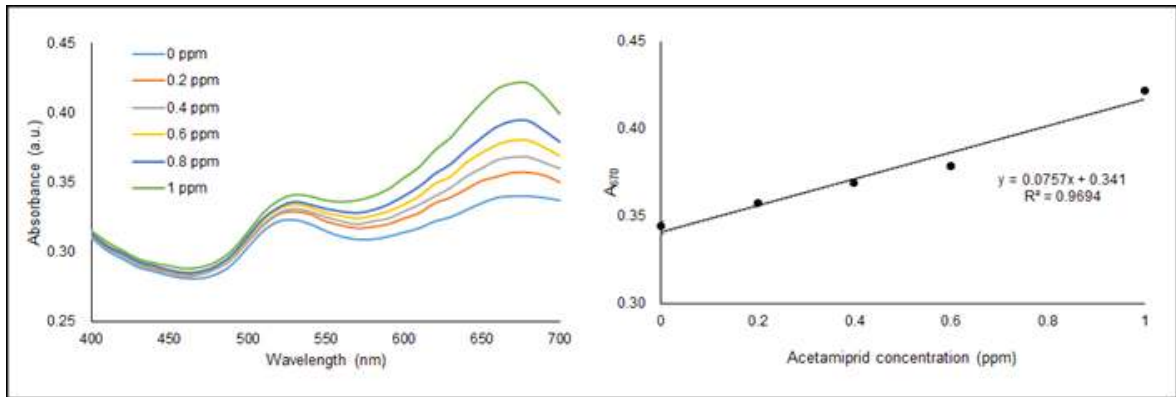


[Fenitrothion 농약의 농도 별 스펙트럼의 변화(좌)와 670 nm에서의 흡광도 값으로 나타낸 그래프(우)]

- 금 나노입자와 이미다졸을 이용한 검출 시스템의 다른 여러 가지 농약 검출 가능성을 알아보기 위하여 비 유기인계 농약을 대상으로 실험을 진행하였음.



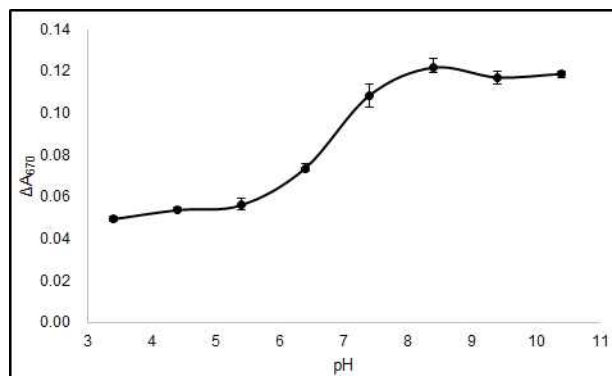
- Acetamidrid는 비 유기인계 농약으로 phosphate를 포함하고 있지 않으며, 벤젠 고리에 chloride를 가짐.
- Acetamidrid 농약의 농도 별 검출 실험 결과, 농도에 따라 스펙트럼의 변화가 아주 잘 일어나며, 1 ppm 이하의 농도 구간에서 R² 값이 0.9694인 선형 곡선과 y값에 대한 수식을 얻었고, 3-시그마를 통하여 검출 한계를 계산에서 150 ppb로 측정이 가능함을 확인함.



[Acetamiprid 농약의 농도 별 스펙트럼의 변화(좌)와 670 nm에서의 흡광도 값으로 나타낸 그래프(우)]

5) 이미다졸 용액의 pH에 따른 흡광도 변화

- ◆ 실제 농산물을 이용한 검출 시, 시료의 종류에 따라 변할 수 있는 환경 중 하나인 pH가 금 나노입자와 농약과 이미다졸의 반응에 영향을 주는 지 알아보기 위해 여러 가지 pH에 따른 금 나노입자의 스펙트럼을 측정하고 가장 값의 차이가 크게 나타났던 670 nm에서의 흡광도 변화를 측정하고 분석함.
- ◆ 농약의 농도를 1 ppm으로 하고 pH를 조절하기 위하여 PBS(phosphate buffered saline)를 완충용액으로하고 pH를 3.4에서 10.4까지 적정하여 흡광도를 측정한 결과, pH가 증가할수록 농약 0 ppm과 1 ppm의 670 nm에서 흡광도 값의 차이가 또한 증가하는 경향을 보임. pH 8.4에서 가장 큰 흡광도 차이 값을 보였으며, 그 이상의 pH에서는 큰 차이를 보이지 않음.

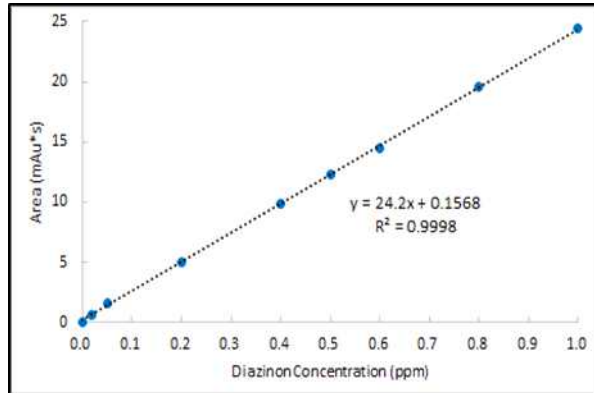


[금 나노입자, 농약, 이미다졸 혼합물의 pH에 따른 흡광도 변화]

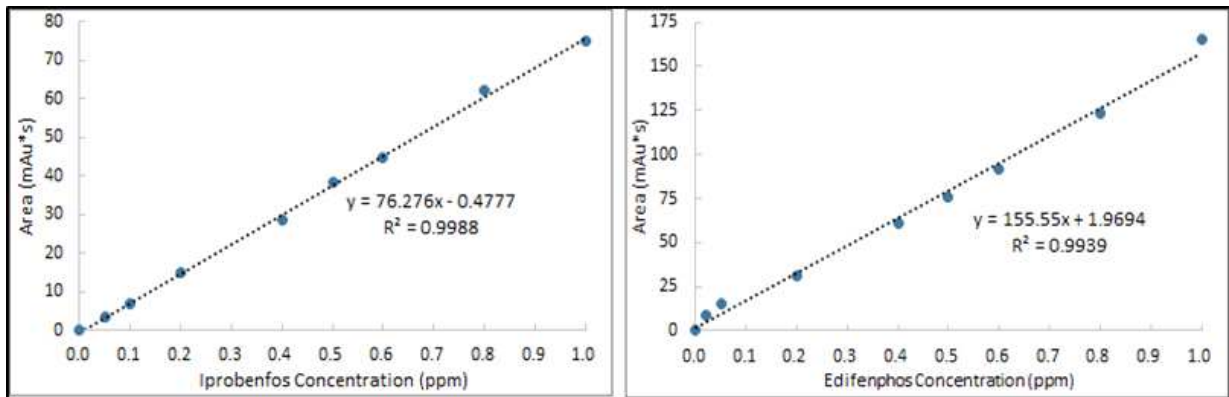
6) HPLC를 이용한 농약의 정량 분석

- ◆ 일반적으로 사용하는 농약의 정량 검출 방법인 HPLC(High-performance liquid chromatography)를 이용하여 0~1 ppm의 낮은 농도에서 농약의 표준곡선과 그에 대한 방정식을 얻었음.
- ◆ Diazinon의 경우 $y=24.2x+0.1568$ 의 방정식을 얻었고, R^2 값은 0.9998로 높은 신뢰도를 나타내었음.

- ◆ Iprobenfos와 edifenphos의 경우 각각 $y=76.276x+0.4777$ 과 $y=155.55x+1.9694$ 의 방정식을 얻었고, R^2 값은 0.9988과 0.9939로 역시 높은 신뢰도를 나타내었음.



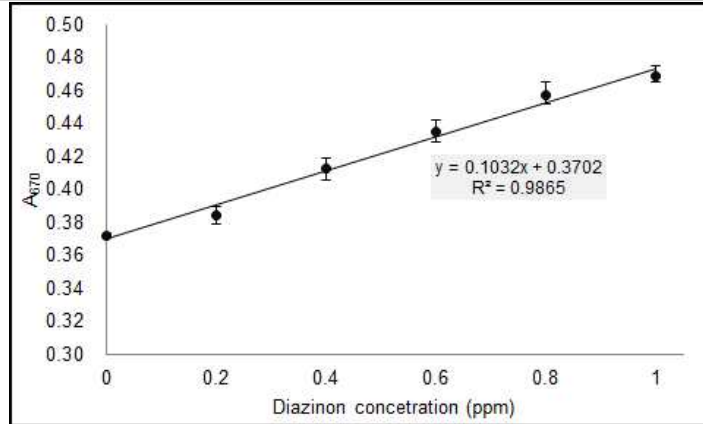
[Diazinon의 HPLC 정량 분석 결과]



[Iprobenfos와 Edifenphos의 HPLC 정량 분석 결과]

7) 현재 방법을 탈이온수(deionized water), 수돗물(tap water)에 적용한 농약 정량 결과와 HPLC를 이용한 농약 정량 결과의 비교

- ◆ 탈 이온수를 대신하여 수돗물을 이용하여 잔류농약을 분석함으로써 수돗물 또는 강물에서의 잔류 농약 측정 가능성을 확인하였음.
- ◆ 수돗물에 임의로 Diazinon 농약을 농도별로 첨가하여 금 나노입자의 응집에 의한 스펙트럼을 측정 한 결과를 토대로하여 방정식을 도출하였고 $y=0.1032x+0.3702$ 의 검출 방정식을 얻었음.



[수돗물을 이용한 잔류농약 분석에 대한 검정곡선 결과]

- ◆ 탈 이온수와 수돗물, 그리고 HPLC에서 얻은 각각의 방정식을 이용하여 금 나노입자를 농약 및 이미다졸과 반응시킨 후 흡광도를 측정하여 농약의 농도를 정량한 결과를 HPLC (High-performance liquid chromatography) 분석에 의해 얻어진 정량 결과와 비교함. 각각의 실험에 대한 결과를 비교하기 위해 임의로 Diazinon의 농도를 0.08, 0.17, 0.30 ppm의 세 가지로 하여 측정 후 각각의 방정식에 측정 결과를 대입하여 재현성 및 신뢰성을 비교 확인하였음.
- ◆ 표 1에서와 같이 세 가지 농도에서 큰 차이 없이 비슷한 결과를 얻었으며, 탈 이온수를 이용하여 농약의 농도를 측정 한 결과 평균 recovery는 100.1%, 수돗물을 이용한 측정 결과 평균 recovery는 99.4%, 그리고 HPLC 정량법의 경우 평균 recovery는 90.5%로 나타났음.
- ◆ 이는 현재 방법의 농약 정량결과가 HPLC 만큼 정확할 뿐만 아니라, 시간과 고가의 장비 및 고급 기술을 필요로 하는 HPLC보다 훨씬 신속하고 효율적이며 아주 간단한 방법으로 농약을 검출 할 수 있는 것을 확인하는 동시에 HPLC 정량 법을 대체 가능성을 확인함.

Samples	Diazinon conc.	In deionized water	Recovery	In tap water	Recovery	HPLC	Recovery
	Added (ppm)	mean ± SD (ppm)*	(%)	mean ± SD (ppm)*	(%)	mean ± SD (ppm)*	(%)
1	0.080	0.080 ± 0.024	100.4	0.079 ± 0.012	98.5	0.082 ± 0.002	96.2
2	0.170	0.173 ± 0.056	101.6	0.146 ± 0.012	86.3	0.149 ± 0.004	87.6
3	0.300	0.295 ± 0.042	98.3	0.340 ± 0.001	113.5	0.263 ± 0.064	87.7
Average	-	-	100.1	-	99.4	-	90.5

[탈 이온수와 수돗물을 이용한 농약의 검출 결과 및 HPLC 분석 결과와의 비교]

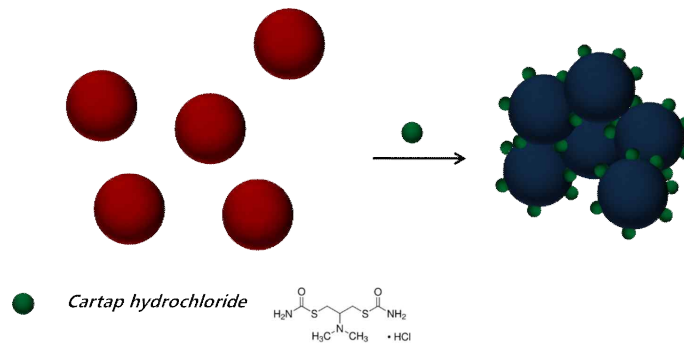
나. 금 나노입자를 이용한 thiocarbamate 계열의 농약 검출법의 개발

1) 금 나노입자를 이용한 농약 검출법

- ◆ 금 나노입자는 일반적인 유기 염료에 비하여 10^3 - 10^5 정도의 큰 extinction coefficient를 가지고 있으며, 화학적 물리적인 변화에 대하여 입자 간에 거리 변화에 따라서 급격한 색변화를 가지는 특징을 가짐.
- ◆ 금 나노입자는 특정 물질로 금 나노입자의 표면을 활성화 시켜 특정물질에 반응하여 색변화를 유

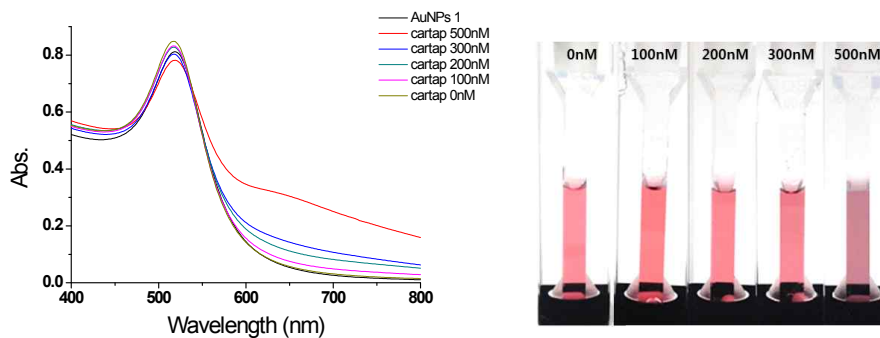
도하는 시스템을 구성 할 수 있음.

- ◆ Thiocarbamate 작용기는 여러 농약에 포함되어 있는 농약의 대표적인 작용기로 cartap 등의 다양한 농약에 포함되어 있는 구조임.
- ◆ 금 나노입자는 용액 상에서 매우 안정하지만 thiocarbamate가 존재 시에는 thiocarbamate의 S원자 및 N와 결합을 하게 되고 이를 통해 매우 불안정한 상태가 됨.
- ◆ 결과적으로 금 나노입자는 thiocarbamate에 의해 금 나노입자의 뭉치화 반응이 일어나 색변화가 관찰됨.



[금 나노입자를 이용한 Cartap의 검출방법 모식도]

- ◆ Cartap은 분자 내 thiocarbamate 구조를 갖는 살충제로 곤충 니코틴성 아세틸콜린 수용체의 이온 채널 차단제작용을 하여 상당한 신경 근육 독성을 일으키고 결과적으로 멀티 시스템 장기부전을 야기하기 때문에 WHO에 의하여 0.5 ppm의 허용기준이 정해짐.
- ◆ 개발된 시스템은 안정한 금 나노입자에 thiocarbamate계 농약인 cartap을 투입하게 되면 금 나노입자의 불안정성을 야기하여 금 나노입자의 뭉치화를 유도하게 되고 이 때 용액의 색이 바뀌는 것을 관찰함으로써 육안으로도 쉽게 농약의 유무를 관측할 수 있는 특징을 지니고 있음.



[13nm 금나노 입자를 이용한 Cartap 분석 시스템]

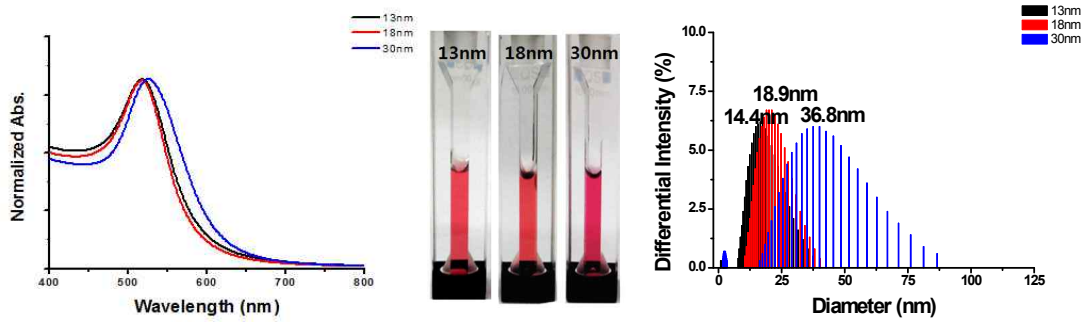
2) 금 나노입자의 크기에 따른 검출한계의 조정

- ◆ 금 나노입자는 합성방법에 따라 sodium citrate와 HAuCl₄의 농도비에 따라서 수 nm에서 수십 nm까지 손쉽게 size를 조정 할 수 있다.
- ◆ 금 나노입자는 통상적으로 크기가 커질수록 보다 민감하게 주변 환경에 반응하는 특징을 가지며

로 이를 이용하여 다양한 크기의 금 나노입자를 이용하여 다양한 검출 한계를 지니는 검출방법을 개발하는 연구를 수행하였음

(1) 다양한 size를 가지는 금 나노입자의 합성

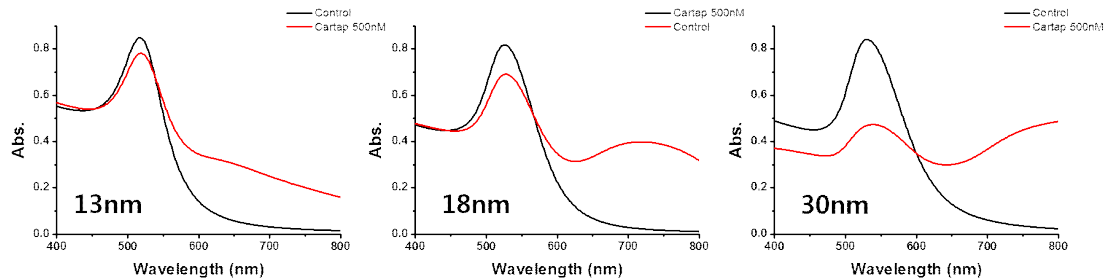
- ◆ Sodium citrate와 H₂AuCl₄의 농도를 조정하여 각각 13nm, 18nm, 30nm의 사이즈를 가지는 금 나노입자를 합성하였으며, 이를 UV/Vis spectroscopy와 particle analyzer를 통하여 분석하였다. particle analyzer를 통하여 분석한 결과 각각 14.4nm, 18.9nm, 36.8nm의 size를 가지는 것으로 분석되었다.



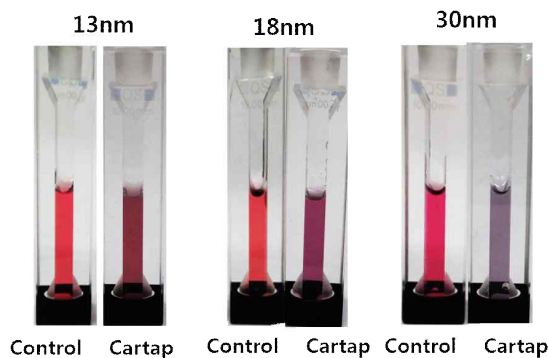
[size별 금 나노입자의 스펙트럼과 색 및 particle analyzer 데이터]

(2) 다양한 size를 가지는 금 나노입자를 이용한 농약검출법의 개발

- ◆ 금 나노입자가 커질수록 감도가 증가하는 경향성을 확인하였으며, 신호의 차이 또한 확연하게 증가하는 것을 확인하였다.



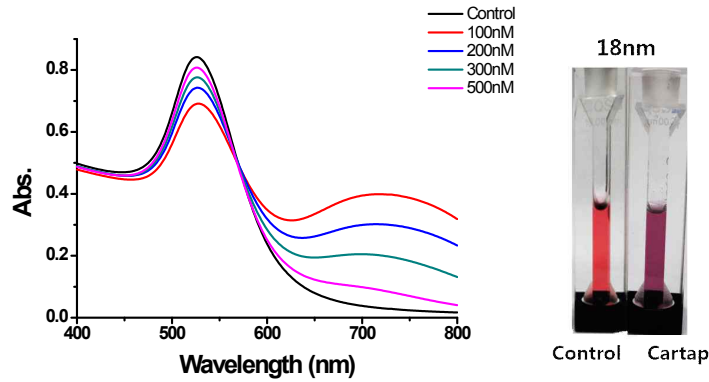
[Size별 금 나노입자와 cartap에 대한 반응 스펙트럼]



[금 나노입자의 크기별 cartap 500nM과의 반응 전후 색]

- ◆ 18nm 크기의 금 나노입자가 육안으로 가장 구분하기 쉬웠으며, 정량적인 신호를 나타내었다. 본 시스템의 검출한계는 13.6 nM의 검출한계를 가지는 것을 확인하였으며 이것은 4 ppb 수준의 매

우 높은 감도를 나타낸다.

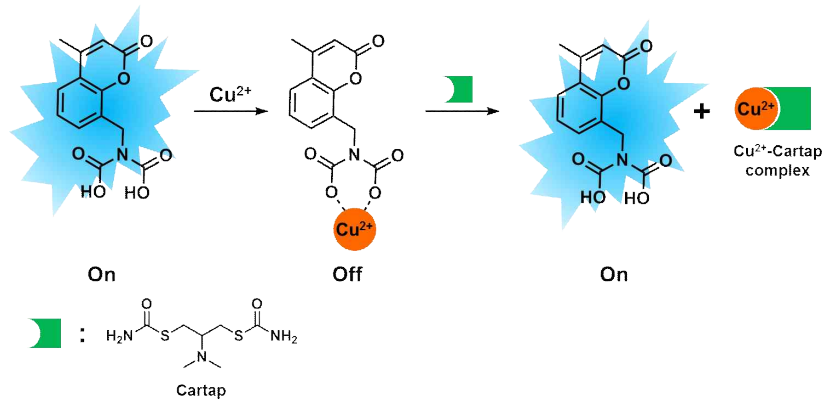


[18nm의 금 나노입자와 cartap의 농도별 스펙트럼과 반응 전후의 색]

다. 형광 염료를 이용한 thiocarbamate계열의 농약 검출법의 개발

1) 형광 염료를 이용한 농약 검출법의 개발

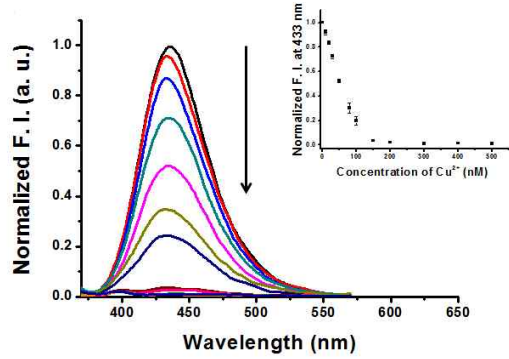
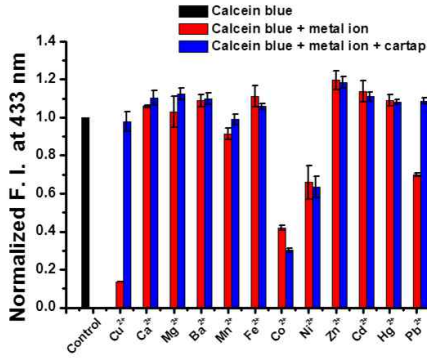
- 특정 금속이온들은 형광 염료와 결합하여 형광 염료의 형광을 변화시킬 수 있으며 thiocarbamate 구조는 N, S 원자의 비 공유 전자쌍으로 인하여 금속이온과 강한 결합이 가능하므로 금속이온으로 소광된 형광 염료-금속이온 복합체에 농약이 들어가게 되면 금속이온과 농약이 결합하게 되어 다시 형광 증가하는 것을 이용하여 농약 검출법을 개발하였다.
- 개발된 형광염료-금속이온 복합체를 이용한 분석방법은 기존의 cartap분석방법인 GC, HPLC, MS 등의 방법에 비하여 훨씬 저렴하고 손쉬운 검출 방법이며, 0.036ppm의 좋은 검출 한계를 가진다.



[형광 염료를 이용한 농약 검출법의 모식도]

(1) 형광 염료와 금속이온의 결합 확인

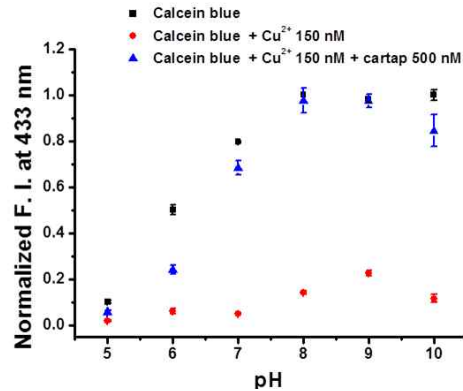
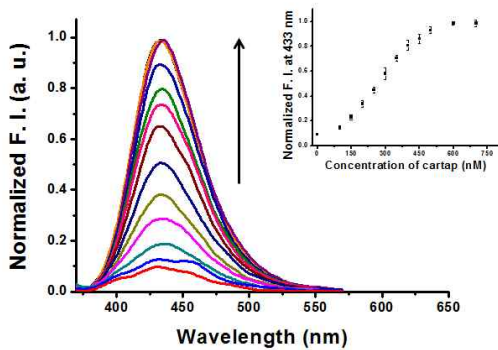
- Calcein blue를 이용하여 다양한 금속이온과의 결합을 확인하였다. Calcein blue와 다양한 금속과의 결합전후의 형광 특성을 관찰 하였을 때 Cu^{2+} 에 의하여 Calcein blue의 형광이 가장 효과적으로 감소하는 것을 확인하였다.
- 가장 효율이 좋았던 Cu^{2+} 와의 결합정도를 확인하기 위하여 완충용액 상에서 Cu^{2+} 를 농도별로 적정하였을 때 150 nM 이상의 농도에서 형광이 완전 소광된 것을 확인하였다.



[금속 이온 별 calcein blue와의 반응성과 Cu²⁺의 농도별 적정 스펙트럼]

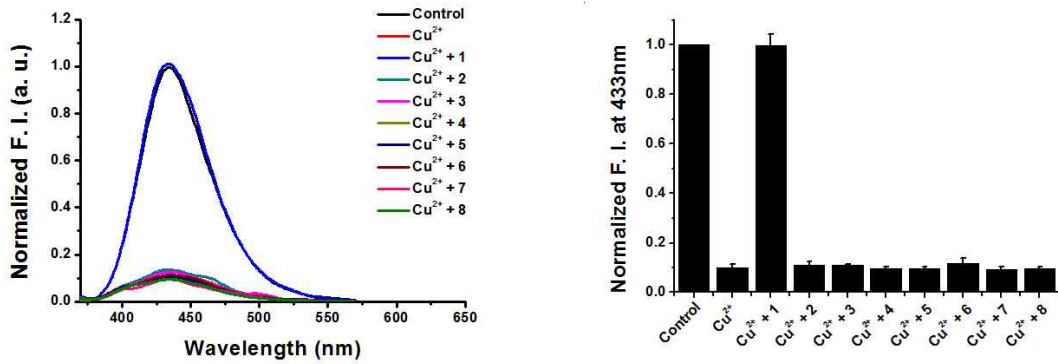
(2) 형광 염료-금속 이온 복합체를 이용한 농약 검출법의 개발

- ◆ 완충 용액상에서 Calcein blue-Cu²⁺ complex에 농약을 넣어주면 다시 형광이 증가하는 것을 확인 하였으며, 이때 검출한계는 **0.036 ppm**으로 WHO에서 정한 허용한계인 0.5 ppm보다 낮은 농도 수준에서 cartap의 확인이 가능하다. 또한 Calcein blue-Cu²⁺ complex를 이용한 cartap 검출방법은 pH 7이상에서 원활히 작동하는 것을 확인할 수 있다.



[Calcein blue-Cu²⁺ complex와 cartap의 농도별 적정 데이터와 pH반응]

- ◆ 또한, 유사한 구조를 지니는 Acephate(2), Thiocyclam(3), Pendimethalin(4), Bensultap(5), Benfuracarb(6), Iprobenfos(7), Edifenphos(8)에 대하여 실험하였을 때 다양한 농약 종류 중 오직 Cartap(1)에만 특징적으로 반응하는 것을 확인하였다.



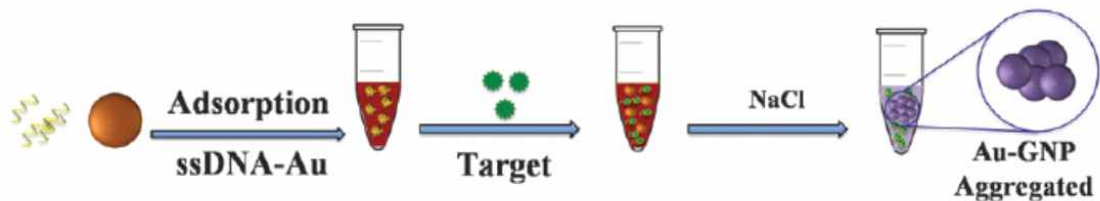
[Calcein blue-Cu²⁺ complex의 Cartap에 대한 선택성]

[3차년도 연구 수행 결과]

가. 농약-특이적 앵타머/금나노 입자를 이용한 농약 검출법.

1) 앵타머/금나노 입자를 이용한 농약 검출법 개발.

- 여러 농약과 앵타머를 이용하여, 특정 농약과 앵타머가 서로 특이적으로 결합할 수 있는 것을 확인하여 금 나노입자의 엉킴현상으로부터 색의 변화에 의해 검출이 가능하다는 것을 확인.
- 앵타머가 결합된 금 나노입자에 특정 농약이 들어가게 되면 앵타머와 농약을 결합이 되고 금 나노입자는 NaCl에 의해 자주색이던 용액은 엉킴현상으로부터 보라색으로 변한다. 만약 농약이 들어가지 않으면 앵타머는 그대로 금 나노입자에 결합이 되어있는 상태에서 NaCl이 들어가도 엉킴현상이 일어나지 않아 용액의 색은 자주색으로 유지 됨.

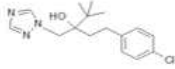
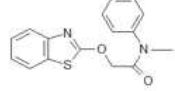
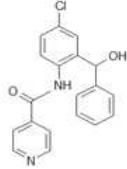
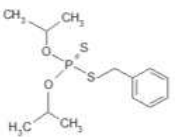
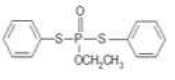


[농약 검출을 위한 앵타머와 금나노입자를 이용하여 엉킴현상에 의한 반응으로 확인할 수 있는 비색분석법]

Aptamer	Sequence (5' → 3')
T1	CGTACGGAATTCGCTAGCAGCGTCCACGAGTGTGGTGTGGATCCGAGCTCCACGTG
T2	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTTGGTCCCACATGCGCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
T3	CGTACGGAATTCGCTAGCAGCGTTGACGCTGGTGCCCGGTTGGTGGCGAGTGTGTGGATCCGAGCTCCACGTG
I11	CGTACGGAATTCGCTAGCAGCGTTGACGCTGGTGCCCGGTTGGTGGCGAGTGTGTGGATCCGAGCTCCACGTG
E1A2	CGTACGGAATTCGCTAGCTAAGGATTCTGTAGAAGGAGCAGTCTGGATCCGAGCTCCACGTG

<사용한 농약-특이적 앵타머 서열>

- Tebuconazole 이외에 금나노입자와 앵타머를 이용한 검출 시스템의 다른 여러 가지 농약 검출 가능성을 알아보기 위하여 유기인계 농약을 중심으로 실험을 진행했음.

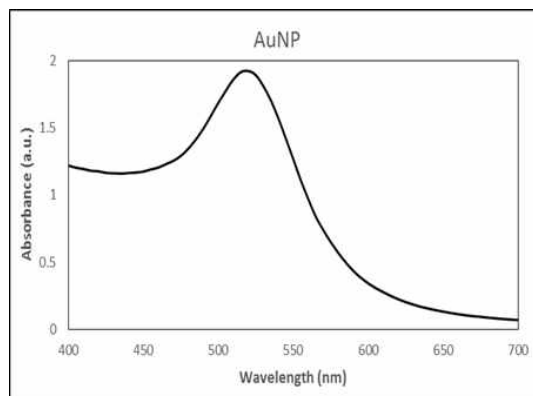
	농약	화학구조	구매처
살균제	Tebuconazole		Sigma Aldrich
제초제	Mefenacet		Sigma Aldrich
생조제	Inabenfide		Sigma Aldrich
살균제	Iprobenfos		Sigma Aldrich
살균제	Edifenphos		Sigma Aldrich

[농약의 화학구조]

2) 금나노입자의 합성 분석

- 본 실험을 위해 합성한 금나노입자는 UV/vis 스펙트럼, 동적 광산란분석(zeta potential analysis), 및 주사현미경 분석을 통해 분석하였음.

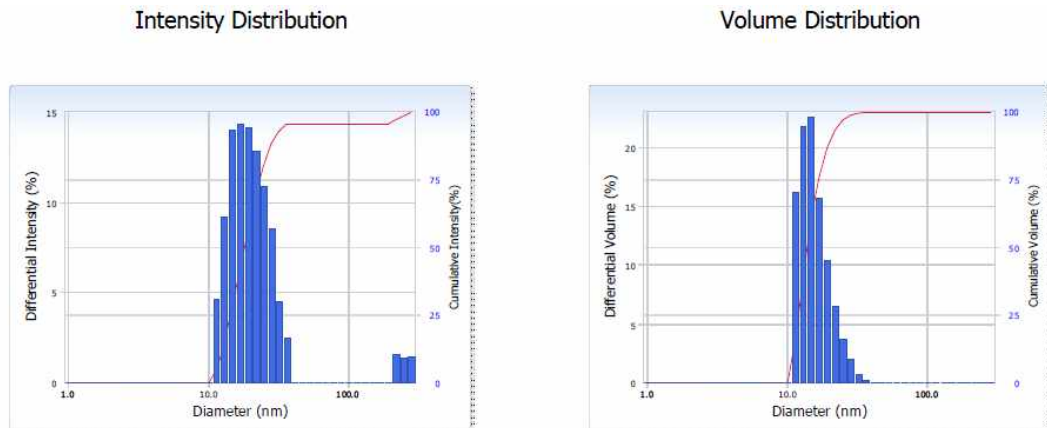
① UV/vis spectroscopy 분석



[UV/vis를 이용한 금 나노입자의 흡광도 그래프. 520 nm에서 흡광도 확인]

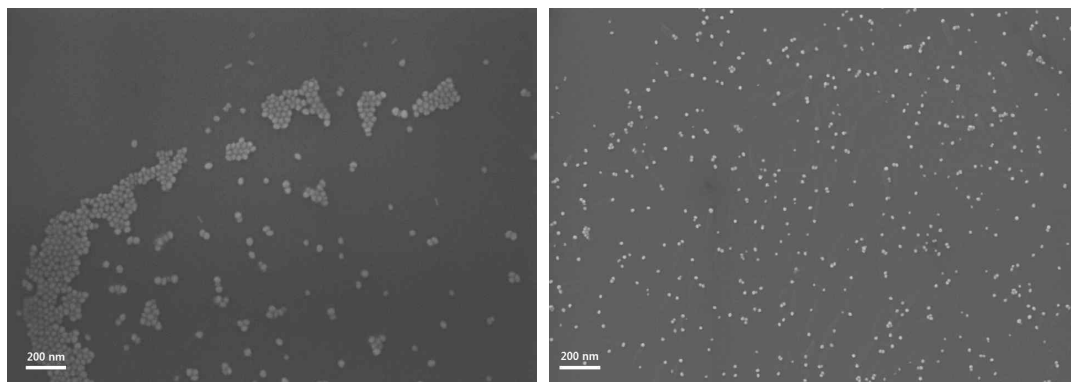
- 금 나노입자가 제대로 합성이 된 것을 확인하기 위하여 UV/Vis 스펙트럼 장비를 이용하여 금나노입자에 의해 520 nm에서 증가된 흡광도를 확인하였음.

② 동적광산란분석방법을 이용한 금나노입자의 크기분석



[Zeta potential 분석을 이용한 금나노입자의 크기 측정 (평균 15 nm)]

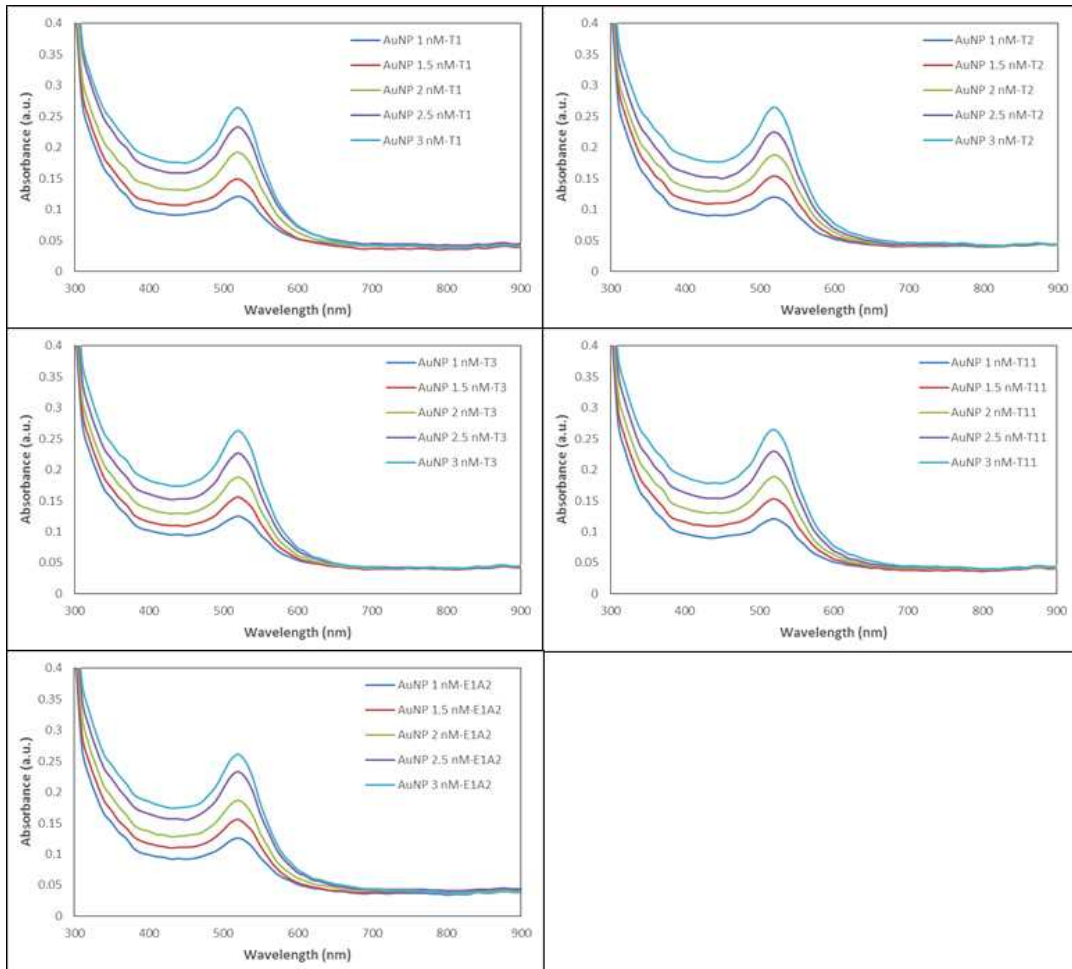
③ 주사전자현미경 (SEM)을 통한 금나노입자의 형태와 크기 분석



[주사전자현미경 (SEM)을 이용하여 금 나노입자의 크기와 형태를 분석한 결과]

- ◆ 15 nm 의 균일한 크기와 구형을 가진 금 나노입자가 제대로 합성이 이루어졌음을 주사전자 현미경 (SEM)을 통해 확인할 수 있었다.

3) 금나노입자와 앵타머의 결합 후 흡광도 그래프 측정

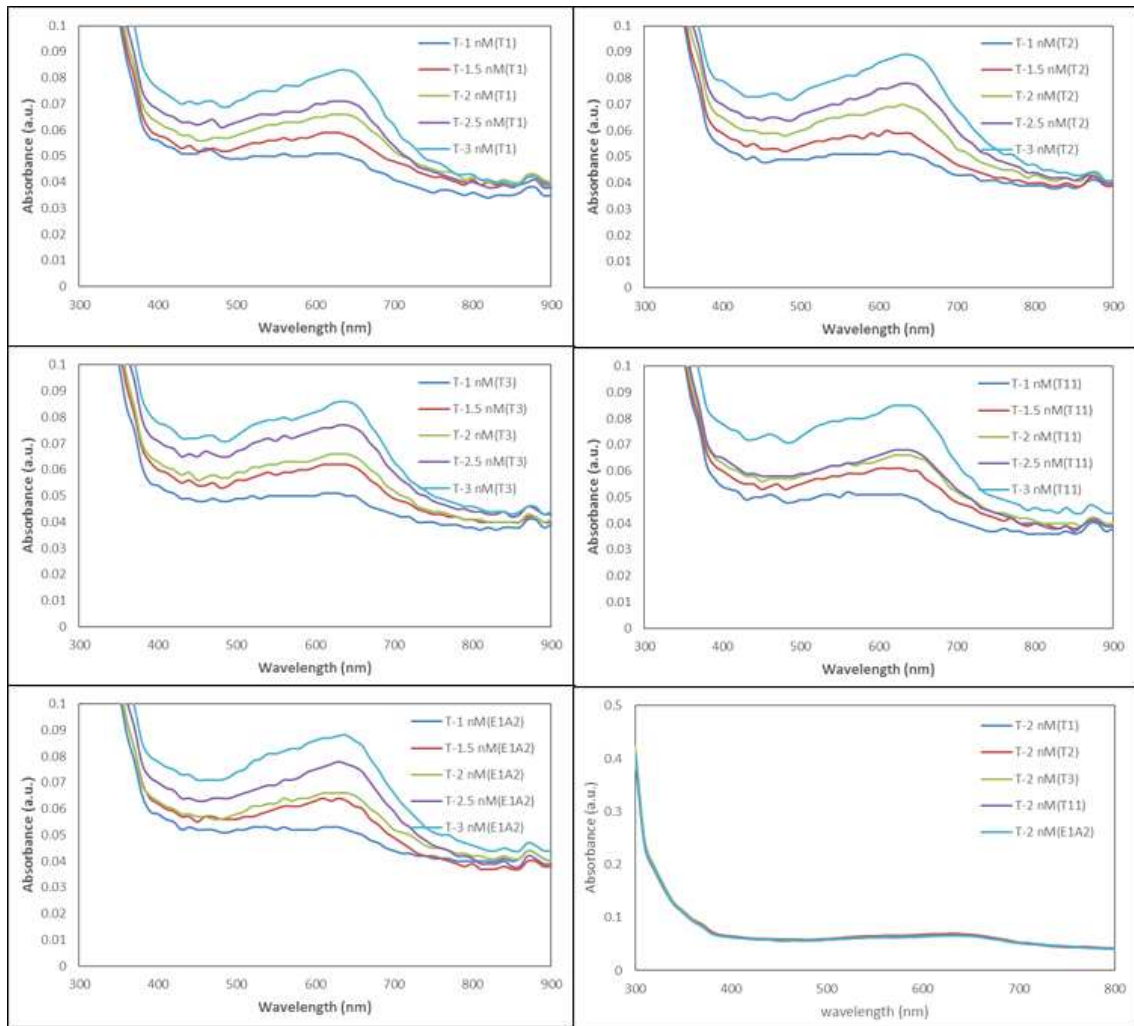


[5 종의 농약 특이적 앵타머와 결합한 금나노입자의 농도에 따른 흡광도 그래프]

- 농약이 들어가지 않았을 때, 5종의 농약 앵타머가 금 나노입자에 결합을 확인하기 위해, 흡광도를 측정했음.
- 모든 조건에서, 앵타머가 붙지 않은 기존의 금 나노입자의 흡광도는 520 nm에서 나타난 반면, 각 앵타머가 결합된 후로는 10 nm가 이동된 530 nm에서 흡광도를 나타냄으로서 제대로 결합이 되었다고 판단할 수 있었음. 또한 금 나노입자의 농도에 따라 앵타머-금나노입자의 흡광도 값은 비례적으로 증가한 것을 확인할 수 있었음.

4) 앵타머-금나노입자를 이용한 농약 검출 분석

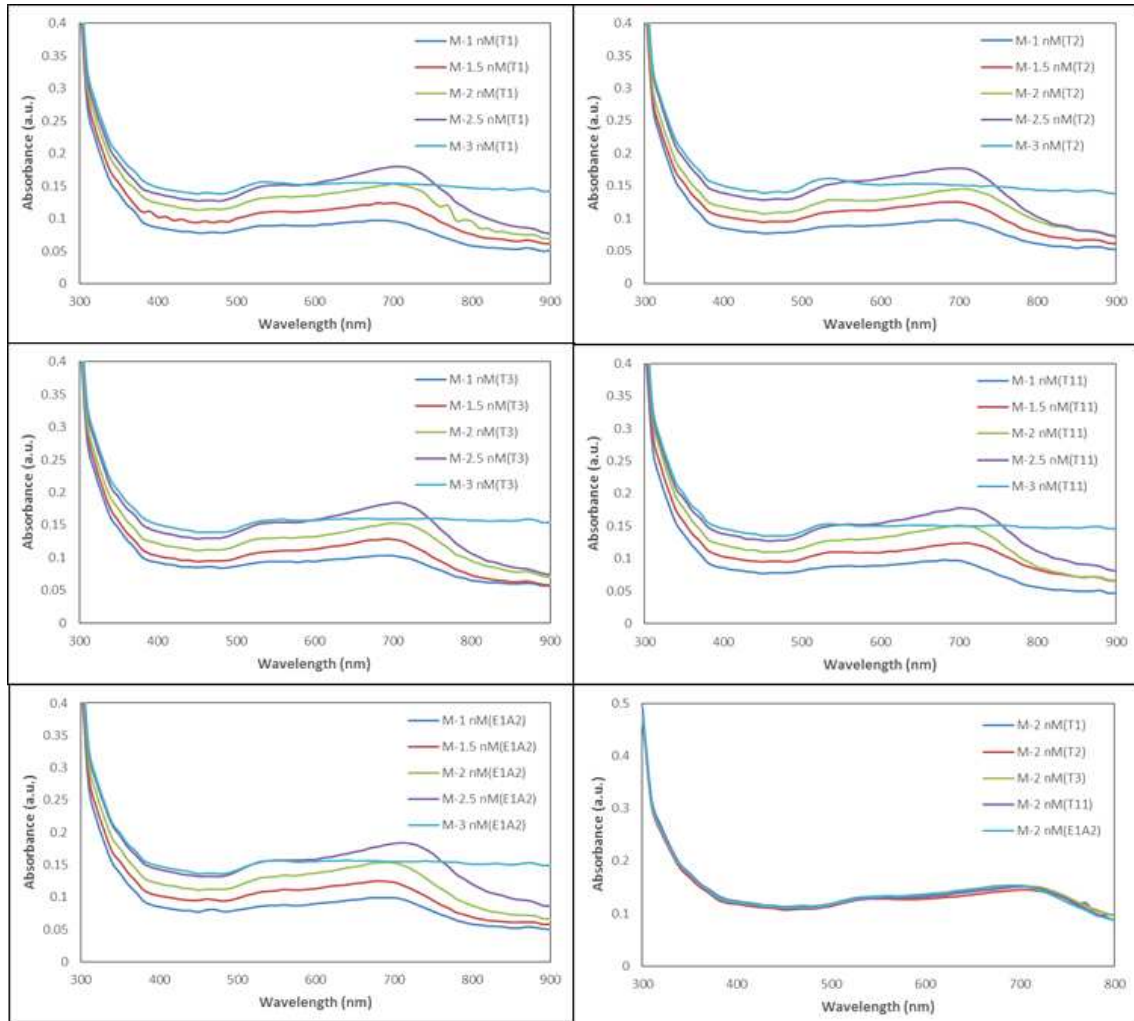
① Tebuconazole



[앵타머-나노입자와 Tebuconazole의 흡광도 그래프]

- ◆ Tebuconazole과 테스트한 모든 앵타머와 결합하여 금나노입자의 농도에 비례하여 흡광도가 나타났다.
- ◆ 이 농약에서 다른 농약과 달랐던 점은 앵타머가 결합된 금나노입자에 결합을 도와주는 용액이 들어간 농약을 넣고 30 분간 배양한 후 용액의 색이 자주색 (원래 금나노입자의 색) → 파란색으로 바뀌었다. 색이 변한 것은 영김현상이 일어난 것으로 유추할 수 있음. 이는 영김현상을 유도시킬 1 M NaCl 을 넣기 전.

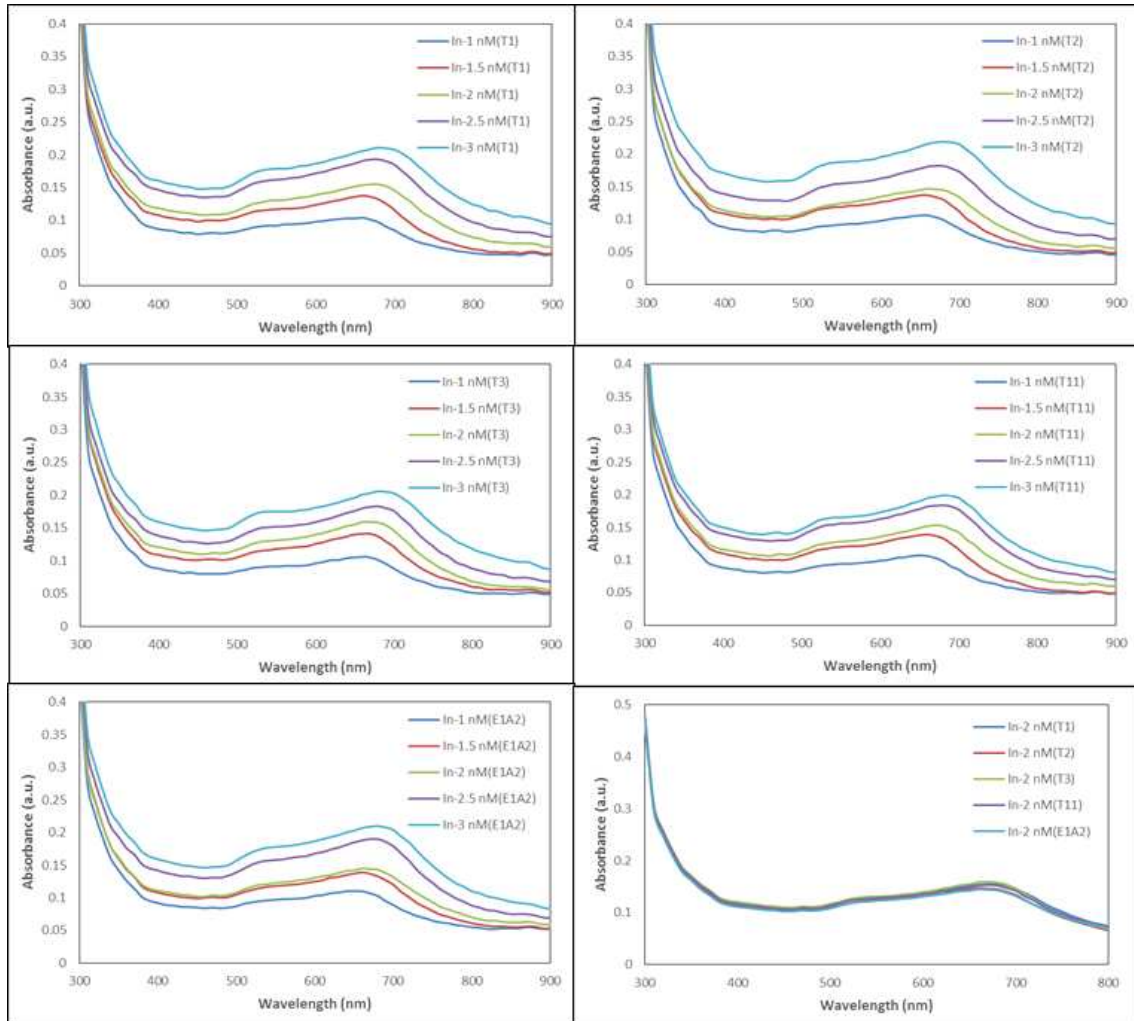
② Mefenacet 분석



[엡타머-나노입자와 Mefenacet의 흡광도 그래프]

- ◆ Mefenacet와 결합된 엡타머는 흡광도의 값이 금 나노입자의 농도와 비례하게 나타났음. 하지만 그래프를 잘 살펴보게 되면 금 나노입자의 농도가 3 nM일 때의 그래프는 금 나노입자의 흡광도 (520 nm)만 뜨고 측정선이 일직선으로 유지되는 것을 확인할 수 있음.
- ◆ NaCl을 넣고 나서 영김현상이 일어나게 되면 다른 농도들처럼 700 nm의 파장에서 흡광도가 나타나는데 3 nM의 경우에는 다른 것 보다 농도가 매우 짙어 비교적 영김현상이 상당히 많이 진행되어 측정선이 일직선으로 뜬 것으로 유추할 수 있음.

③ Inabenfide



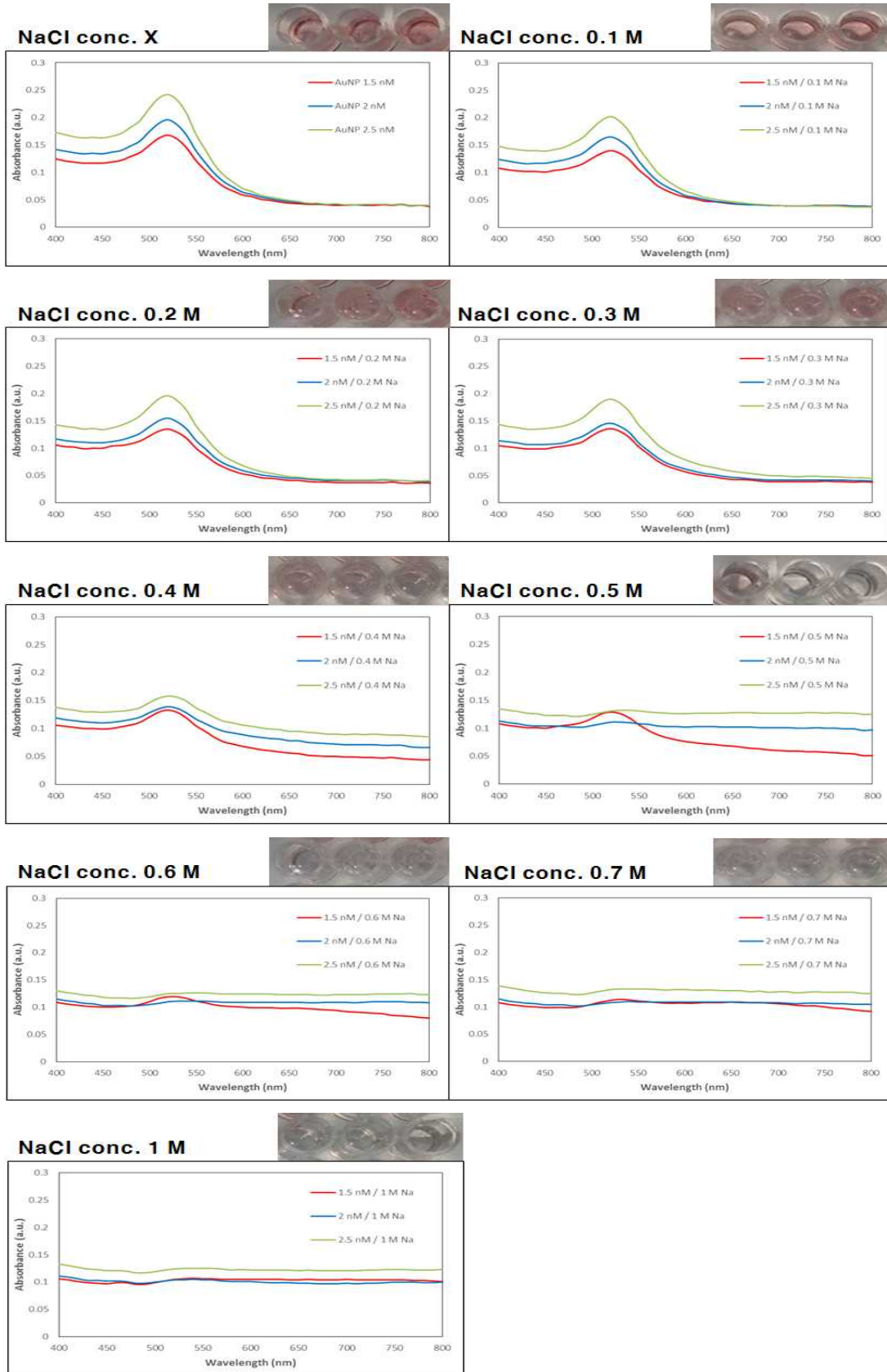
[애타머-나노입자와 Inabenfide의 흡광도 그래프]

- ◆ Inabenfide와 결합된 애타머는 흡광도의 값이 금나노입자의 농도와 비례하게 나타났음.
- ◆ 마지막 그래프는 금 나노입자의 농도가 2 nM 일 때를 기준으로 각 애타머의 흡광도 변화를 보기 위해 나타낸 것으로서 농약과 금나노입자 모두 같은 농도이며 애타머만 다르게 진행했음. 애타머가 다르다고 해서 absorbance의 변화가 없는 것을 확인할 수 있었음.

5) NaCl의 농도에 따른 금 나노입자의 영김현상

- ◆ 금 나노입자에 결합된 애타머에 농약을 넣은 결과 각 농약과 특정 애타머의 특별한 결합이 이루어지지 않는 것으로 판단하였음. 그 이유는 1M라는 높은 농도의 NaCl이 들어가서 애타머와 농약의 결합에 상관없이 금 나노입자의 영김현상을 유도했기 때문이라 생각하여 NaCl의 농도를 낮추어 금 나노입자의 영김현상을 나타낼 수 있는 최소한의 농도를 찾기위해 최적조건을 잡는 실험을 진행했음.
- ◆ 금나노입자가 어느 정도의 NaCl 농도가 있을 때 영김현상이 일어나는 지 확인하기 위해 애타머를 넣지 않고 실험을 진행했음. NaCl의 농도는 0 M ~ 1 M 까지 0.1 M씩 간격을 두어 금나노입자에 넣었을 때의 흡광도 변화를 관찰했음. 이 실험에서 금나노입자의 농도는 2 nM을 이용하지만 농도

에 따른 정확한 결과를 얻기 위하여 1.5 nM ~ 2.5 nM 까지 0.5 nM씩 간격을 두어 실험을 진행했음.

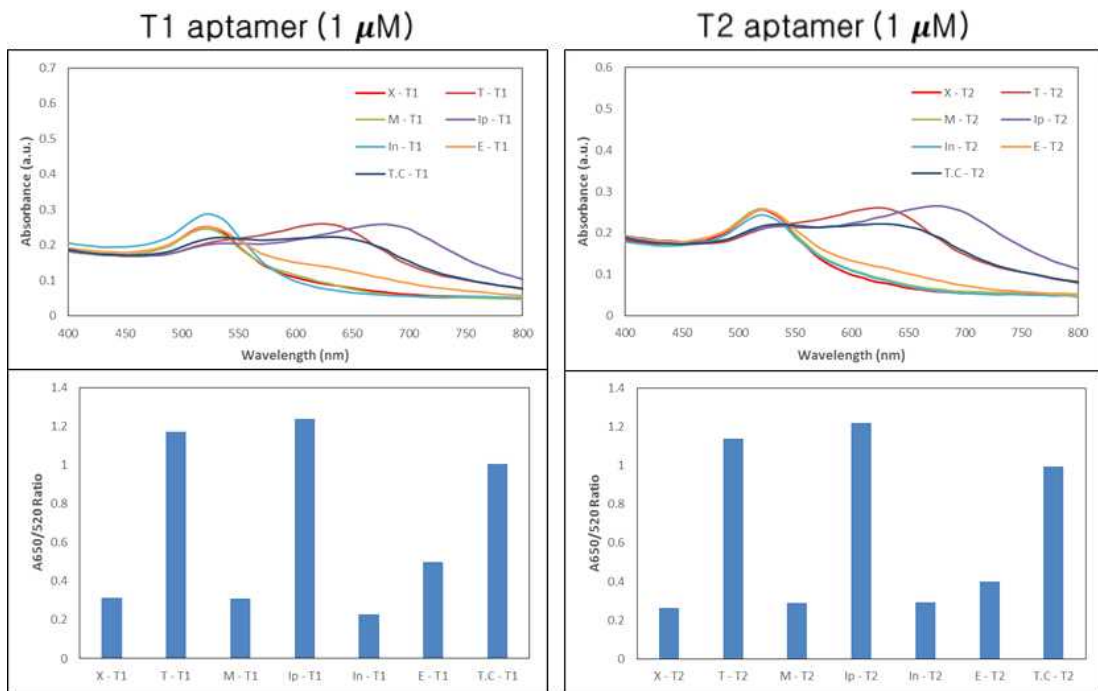


[금나노입자에 농도에 따른 NaCl을 넣어 영김현상을 확인하기 위한 흡광도 그래프]

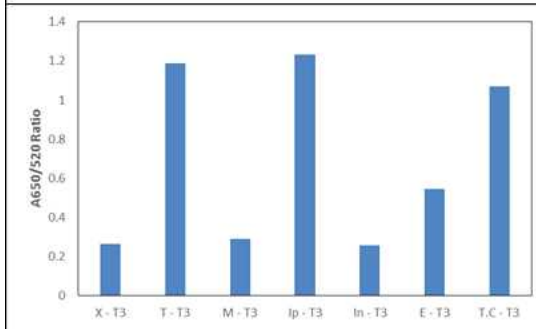
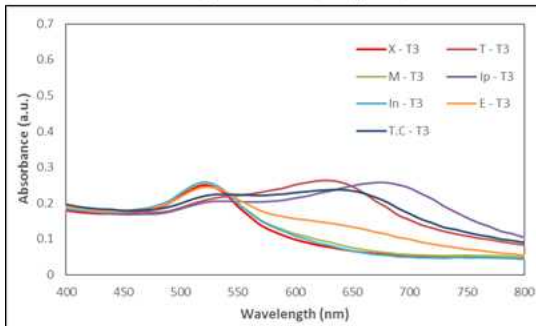
- ◆ NaCl의 농도가 0.5 M이 되면서부터 금 나노입자는 응집현상이 일어나 흡광도에서 변화가 일어나는 것으로 확인할 수 있었음.
- ◆ 또한 그래프와 함께 첨부한 이미지를 보면, NaCl의 농도가 높아짐에 따라 금 나노입자가 갖고 있던 기존의 자주색이 점점 옅어지면서 응집현상이 일어나게 되면 점차 푸른색으로 변하는 것 또한 확인함으로써 NaCl이 0.5 M 들어갔을 때 금 나노입자는 응집현상이 일어나는 것으로 확인했음.
- ◆ 0.5 M에서의 금 나노입자 1.5 nM은 아직 520 nm의 흡광도를 유지하고 있으나 본 실험에서는 2 nM의 금 나노입자를 사용하게 되므로 NaCl의 농도는 1 M이 아닌 0.5 M을 이용하도록 진행했다.

6) 농약 앵타머의 특이적 결합성 확인.

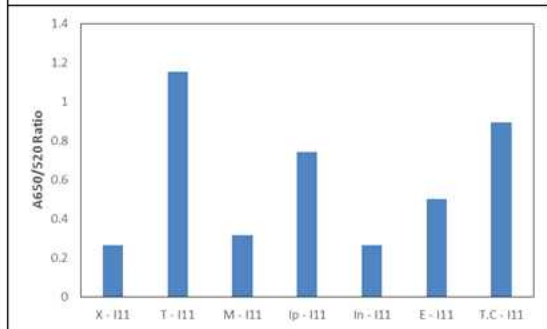
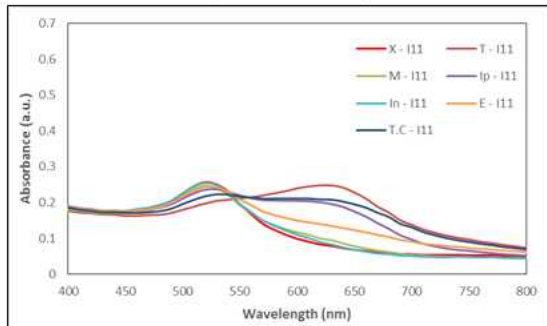
- ◆ 본 실험에서는 0.5 M NaCl을 이용하여 실험을 진행했음. 이 결과로 Tebuconazole과 Iprobenfos, Tetracycline에서 각 앵타머마다 강한 반응이 나타난다는 것을 확인할 수 있었음. 이 반응은 표 1에서 나타나는 결과와는 조금 다른 결과다.
- ◆ 위 결과들은 표 1에서 예상했던 특이적 결합이 제대로 이루어지지 않은 것으로 확인하였음.



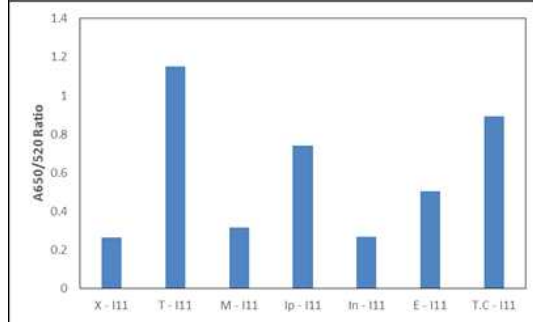
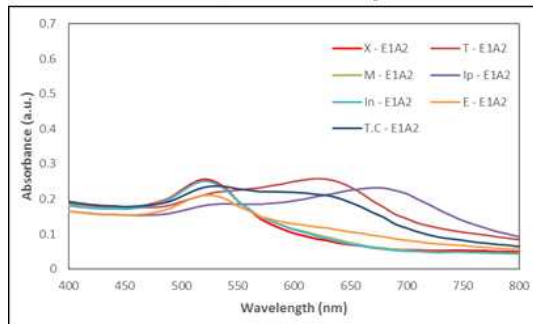
T3 aptamer (1 μM)



I11 aptamer (1 μM)



E1A2 aptamer (1 μM)



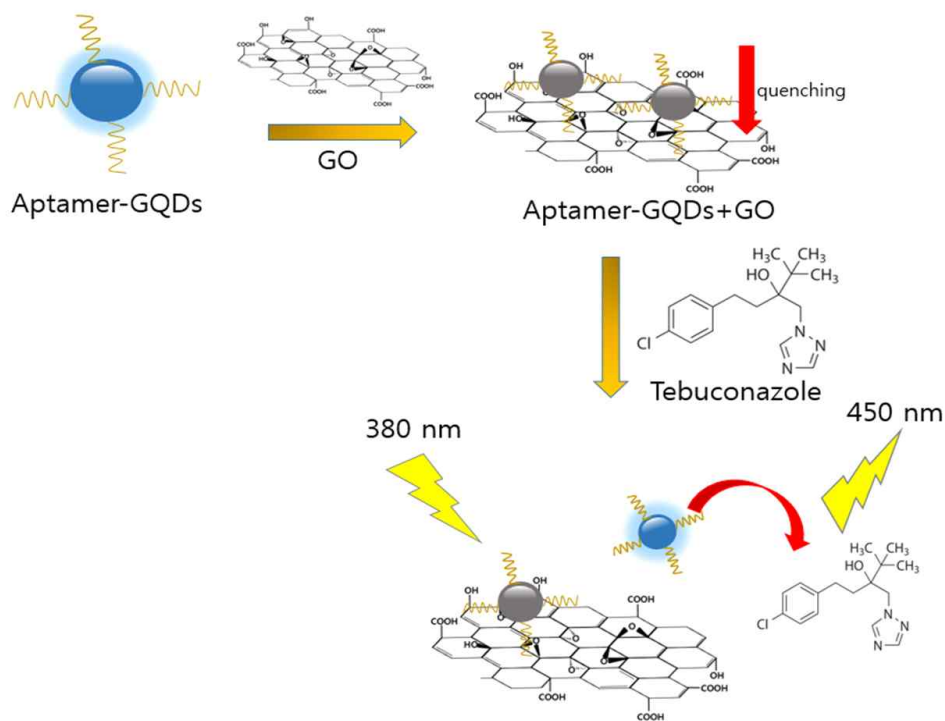
[최적화된 조건들을 적용하여 금 나노입자와 결합된 앵타머에 농약을 넣어 특이적 결합을 확인한 결과. X: No pesticides (control), T: Tebuconazole, M: Mefenacet, Ip: Iprobenfos, In: Inabenfide, E: Edifenphos, T.C: Tetracycline]

나. 앵타머와 에틸렌 다이아민-그래핀 양자점(ethylene diamine graphene quantum dot) 이 용한 Tebuconazole 검출.

- ◆ 산화그래핀(Graphene oxide)을 양자점(quantum dot)의 크기로 만들게 되면 에지 효과로 형광을

볼 수 있음.

- ◆ 또한, 그래핀 양자점은 carboxyl group, hydroxyl group이 있기 때문에 앵타머와 쉽게 EDC-NHS coupling을 해서 결합 할 수 있음(Aptamer-GQDs).
- ◆ Aptamer-GQDs 용액에 산화그래핀을 넣으면 π - π 상호작용으로 결합됨. 산화 그래핀은 소광 물질로서 Aptamer-GQD의 형광이 소광됨.
- ◆ 그러나 Tebuconazole(TB)이 용액안에 존재 하게 되면 Aptamer-GQD와 산화그래핀의 π - π 상호작용 보다 TB하고 결합 강도가 더 강하기 때문에 π - π 결합을 끊고 TB에 결합됨. 그렇게 되면 산화 그래핀에 의해서 소광 되었던 Aptamer-GQD의 형광이 다시 발광하면서 쉽게 잔류 농약(TB)를 검출 할 수 있다.
- ◆ 앵타머 서열 (T1) :
5'-CGTACGGAATTCGCTAGCAGCGTCCACGAGTGTGGTGTGGATCCGAGCTCCACGTG-3'

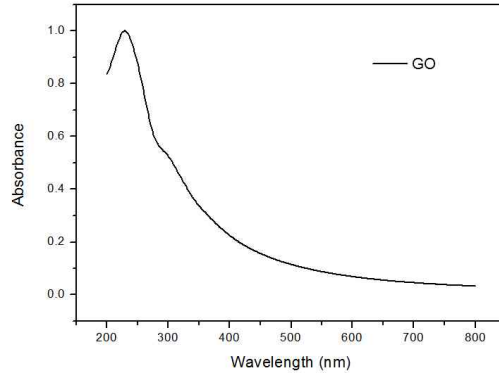


[산화 그래핀과 에틸렌 다이아민-그래핀 양자점을 이용하여 잔류 농약 검출을 형광으로 확일 할 수 있는 형광분석법]

1) 산화 그래핀 (Graphene oxide)특성 분석.

① 자외 가시광선 분광광도계 (Uv-vis)

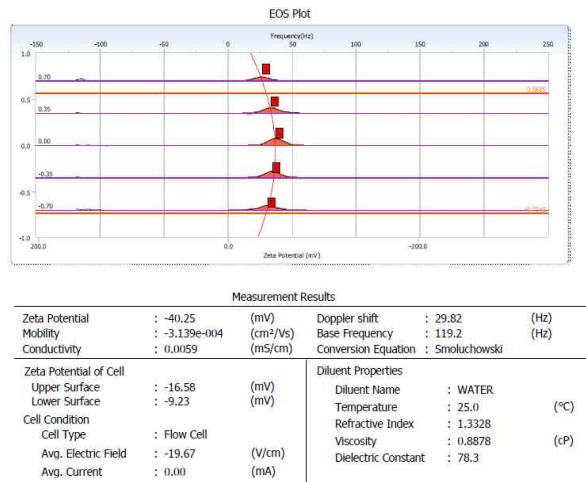
- ◆ Uv-vis로 확인한 결과 230 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$), 300 nm ($n \rightarrow \pi^*$)에서 흡광도 피크가 나왔음. 따라서 산화 그래핀이 합성이 되었다는 것을 확인할 수 있었음.



[Uv-vis을 이용한 산화 그래핀 흡광도 그래프]

② 제타전위 분석 (zeta potential analysis)

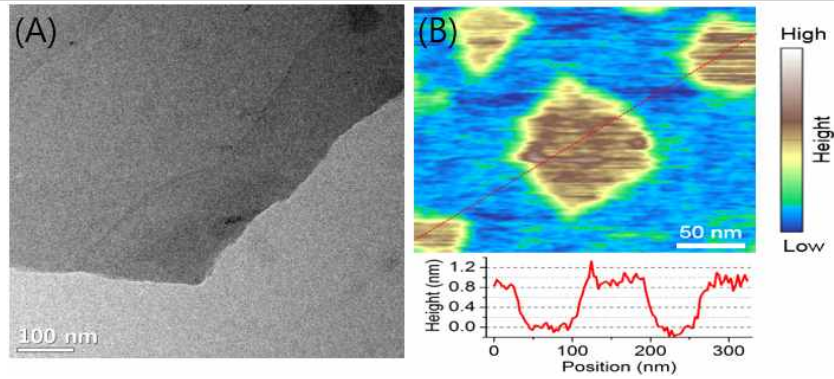
- ◆ 그래핀은 탄소 구조로만 되어있기 때문에 전위 값이 0에 가까워짐. 하지만 그래핀이 산화되면서 carboxyl group, hydroxyl group 만들어 짐. carboxyl group은 용액상에서 음전하상태로 되어있음. 그렇기 때문에 산화 그래핀이 되었는지 판단하기 위해서 제타전위 분석을 하였음. 음전하로 분석이 되면 그래핀이 산화 되었다는 것을 알 수 있음. 그래서 합성한 산화 그래핀을 측정 한 결과 - 40.25 mV 나온 것을 확인하였음.



[zeta potential을 이용한 산화 그래핀의 전위 분석]

③ 투사전자 현미경 (TEM) & 원자 현미경(AFM)

- ◆ 산화 그래핀은 여러층으로 되어있는 것 보다 단층으로 되었을 때 물리적 성질이 더 좋다. 그렇기 때문에 합성한 산화 그래핀이 단층인지 여러층으로 된 시트인지 확인 하기 위해서 TEM, AFM으로 분석하였음.
- ◆ TEM 으로 확인 한 결과 넓은 시트와 단층으로 된 산화 그래핀을 확인할 수 있었음. 좀 더 확실한 방법으로 산화 그래핀이 단층으로 되어있는지 확인 하기 위해 AFM으로 측정 하였음. 그 결과, 0.8 ~ 1.2 nm로 산화 그래핀이 단층인 것을 확인 하였음.

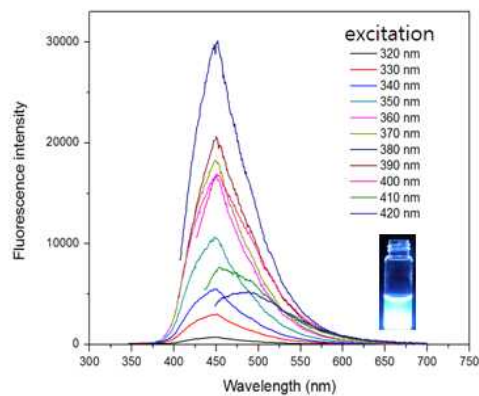


[(A) TEM을 이용한 산화 그래핀의 시트분석과 (B) AFM을 이용한 산화 그래핀의 단층 분석]

2) 에틸렌 다이아민-그래핀 양자점 (EGQD) 특성 분석

① 형광 분석

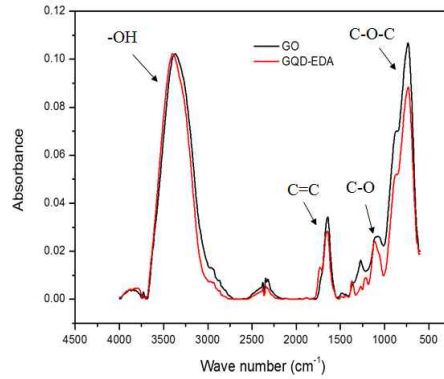
- ◆ 형광 강도가 강한 excitation 값을 찾기 위해서 합성한 에틸렌 다이아민-그래핀 양자점 (EGQD)을 형광 스캐닝 했음.
- ◆ 산화 양자점과 비교하여, 에틸렌 다이아민-그래핀 양자점은 더 높은 380 nm의 excitation에서 형광의 세기가 가장 높게 나온 것을 확인했음.



[에틸렌 다이아민-그래핀 양자점의 형광 스캐닝]

② 적외선 분광법 (FT-IR)

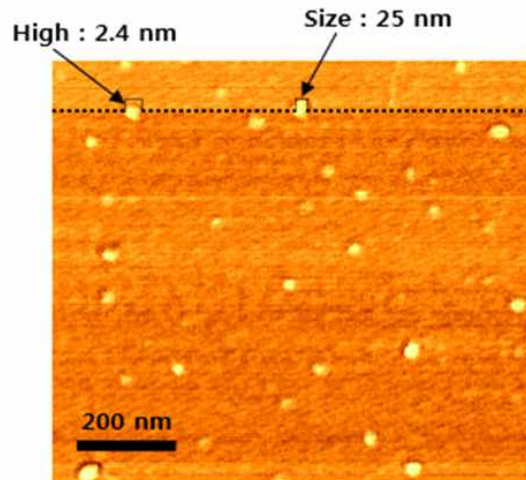
- ◆ 래핀은 탄소 구조로만 되어있기 때문에 FT-IR 측정시 흡광도가 나오지 않음. 반면에 그래핀이 산화 되면서 carboxyl과 hydroxyl group이 만들어 짐. 그 결과, FT-IR로 분석하면 carboxyl groups(C=C, C-O, C-O-C)과 hydroxyl group (OH) 피크를 확인할 수 있음. 따라서 산화 그래핀, 에틸렌 다이아민-그래핀 양자점 (EGQD)를 FT-IR로 측정 하여 carboxyl과 hydroxyl group이 있는 것을 확인 하였음.



[FT-IR을 이용한 에틸렌 다이아민-그래핀 양자점의 작용기 분석]

③ 원자 현미경(AFM) 분석

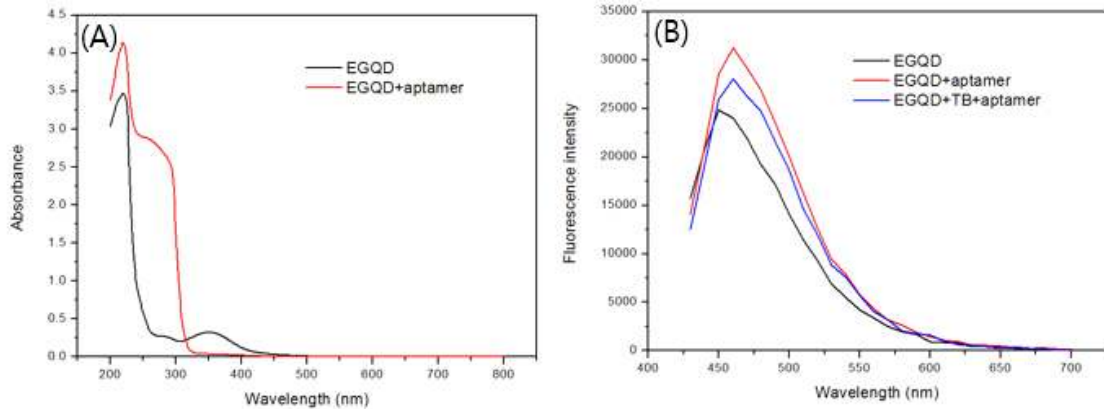
- ◆ AFM으로 측정된 결과 에틸렌 다이아민-그래핀 양자점의 평균 크기는 25 nm로 측정되었음. 또한 단층이 아닌 2~4층으로 되어있는 것을 확인했음.



[AFM을 이용한 에틸렌 다이아민-그래핀 양자점의 크기와 단층 분석]

3) 에틸렌 다이아민-그래핀 양자점(EGQD)의 앵타머 결합 효율 측정

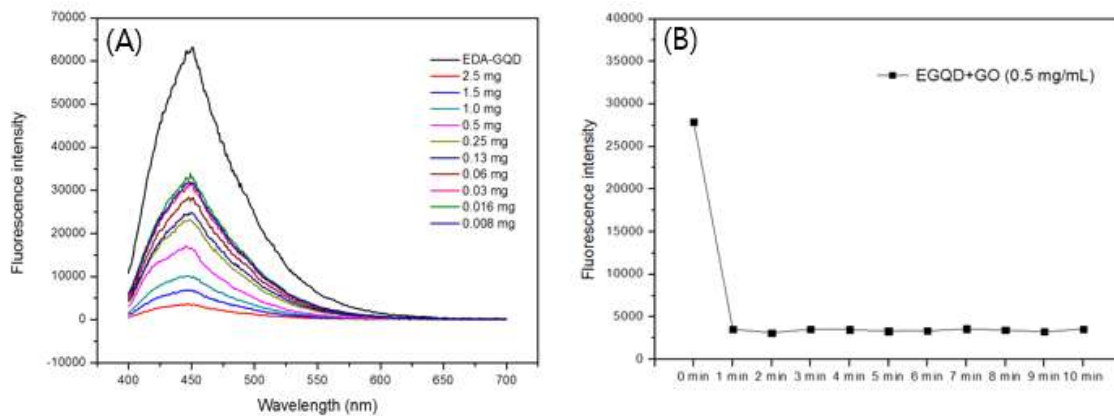
- ◆ EGQD 자체는 220 nm에서 흡광도 피크가 나왔고, EGQD에 T1 농약 앵타머가 결합되었기 때문에 260 nm에서도 흡광도 피크가 나온 것을 확인했음(앵타머의 흡광도 피크: 260 nm).
- ◆ 또한 T1 농약 앵타머가 EGQD에 결합되면서 EGQD 형광에 영향을 미치는지 알아보기 위해 실험을 진행하였음. 그 결과 EGQD는 460 nm에서 emission peak가 나왔지만 EGQD에 T1 앵타머가 결합하였을 때 10 nm 정도 오른쪽 이동(red shift)가 되었음.
- ◆ 또한 농약 tebuconazole (TB)이 있을 경우에도 앵타머만 결합한 조건과 동일한 양상을 보였음. 따라서 aptamer가 EGQD에 binding이 되어도 형광 측정에 영향이 없는 것을 확인하였음.



[(A) EGQD와 앵타머 결합에 의한 Uv-vis 흡광도 변화 (B) 형광 파장 변화 분석]

4) 산화그래핀 (Graphene oxide) 농도에 따른 에틸렌 다이아민-그래핀 양자점(EGQD)의 소광 측정

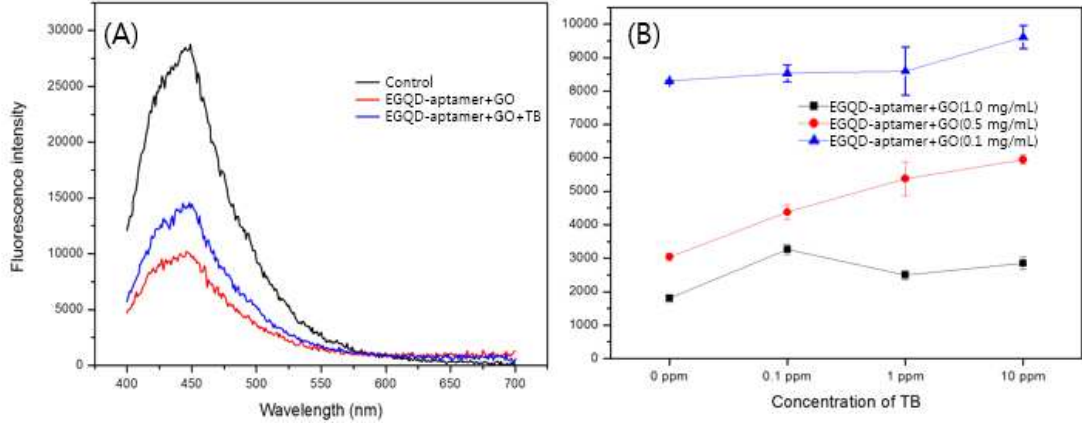
- EGQD 용액에 산화그래핀 농도별로(0.008 ~ 2.50 mg/mL) 넣었을 때 EGQD의 형광이 소광 되는 지 알아보기 위해 실험을 진행하였음. 그 결과 산화그래핀의 농도가 높아질수록 EGQD의 형광이 줄어드는 모습을 확인할 수 있었음.
- 또한 산화그래핀을 (0.05 mg/mL) 넣고 시간별로 형광 측정을 했음. 1 min만에 EGQD의 용액이 quenching 되는 것을 확인하였다.



[(A) 산화 그래핀의 농도에 따른 EGQD의 소광 분석 (B) 소광 반응 시간 분석]

5) 에틸렌 다이아민-그래핀 양자점(EGQD)을 이용한 Tebuconazole 검출

- EGQD에 aptamer를 binding 하고, Tebuconazole (TB)이 있을 경우 형광이 다시 회복되는 알아보기 위해 실험을 진행하였음. 그 결과 TB가 있을 경우 형광이 다시 회복되는 것을 확인할 수 있었음.
- TB 농도를 0, 0.1, 1.0, 10 ppm으로 형광 회복되는 정도를 측정하였음. 산화 그래핀(GO)농도가 0.5 mg/mL이였을 때 TB농도에 따라 형광세기가 증가하는 경향성을 보였음. 따라서 선택성이 있는지 다른 농약과 비교실험을 진행할 예정.



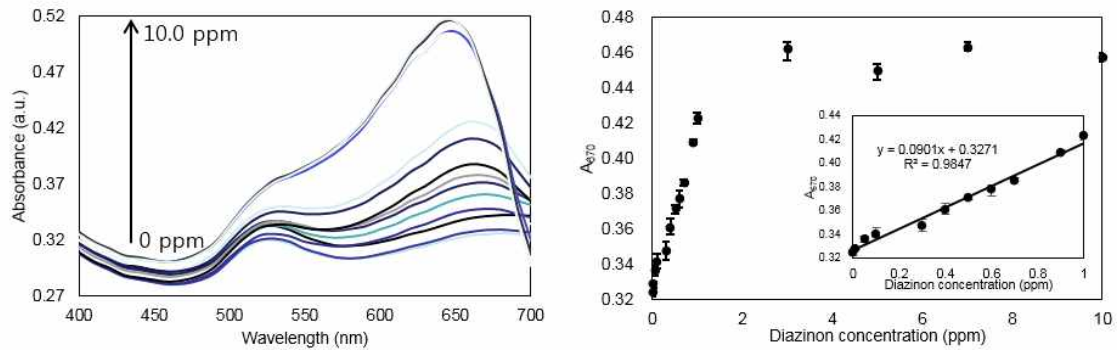
[(A) Tebuconazole(TB) 유무에 따른 형광 강도 분석 (B) Tebuconazole(TB) 농도에 따른 형광 강도 증가 분석]

다. 실제 농산물로부터 잔류농약 검출 검증

※ 검출 대상 농산물 잔류농약 허용치 기준 (식품공전)

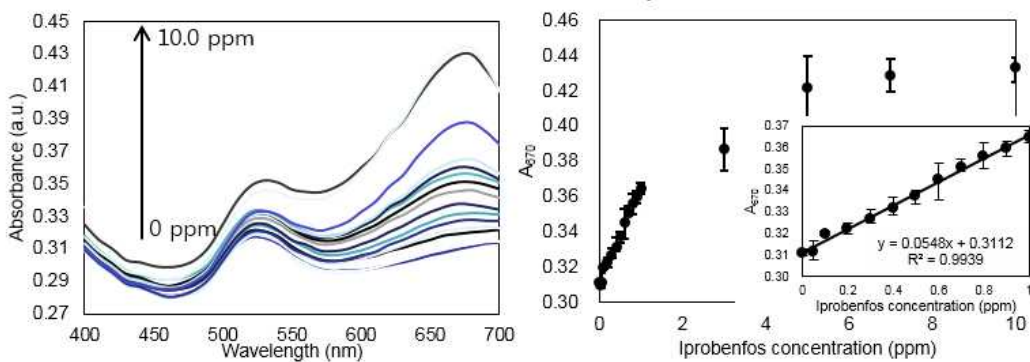
우선 순위	구분	농약 리스트	잔류허용 기준[벼(쌀)]	잔류허용 기준(딸기)	잔류허용 기준(상추)	잔류허용 기준(들깨잎)
1	제초제	butachlor	0.1 ppm			
1	살균제	carpropamid	1.0 ppm	0.05 ppm	0.05 ppm	0.05 ppm
1	살균제	edifenphos	0.2 ppm			
1	살균제	iprobenfos	0.2 ppm			
1	제초제	mefenacet	0.01 ppm			
1	살균제	pencycuron	0.3 ppm	2.0 ppm	0.1 ppm	0.1 ppm
1	살균제	tebuconazole	0.05 ppm	0.5 ppm	0.05 ppm	15.0 ppm
1	살균제	tricyclazole	0.7 ppm	0.05 ppm	0.05 ppm	0.05 ppm
1	살충제	Diazinon	0.1 ppm	0.1 ppm	0.1 ppm	(0.1 ppm)
1	생육조절제	chlormequat (chloride)	0.05 ppm	1.0 ppm	(1.0 ppm)	(1.0 ppm)
1	생육조절제	inabenfide	0.05 ppm			
2	살충제	acephate	0.3 ppm	1.0 ppm	5.0 ppm	3.0 ppm
2	살충제	dinotefuran	1.0 ppm	2.0 ppm	10 ppm	30.0 ppm
2	살충제	fipronil	0.01 ppm			

1) 금 나노입자를 활용한 신속 비색 검출법 검증



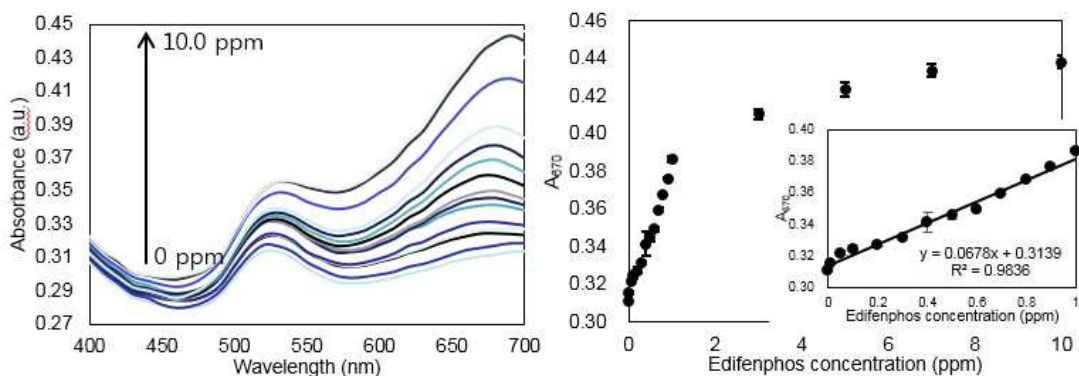
[벼(쌀)에 diazinon 살충농약을 처리한 후 농약 농도별 측정값]

- 10.0 ppb - 10.0 ppm 까지의 농도로 측정 (3.0 ppm 이상에서 saturation됨)
- 0-1.0 ppm 까지 선형으로 측정됨.
- 측정 민감도: 53.3 ppb까지 측정됨 (3-sigma rule 방법으로 계산)



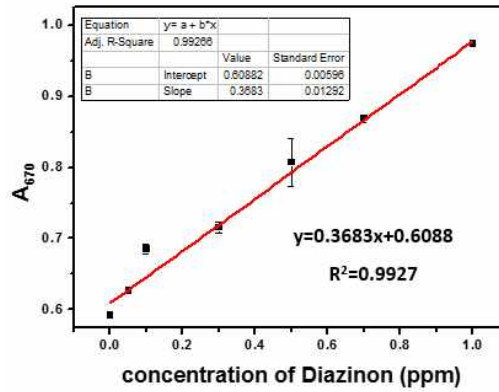
[벼(쌀)에 Iprobenfos 살균농약을 처리한 후 농약 농도별 측정값]

- 10.0 ppb - 10.0 ppm 까지의 농도로 측정 (5.0 ppm 이상에서 saturation됨)
- 0-1.0 ppm 까지 선형으로 측정됨.
- 측정 민감도: 53.6 ppb까지 측정됨 (3-sigma rule 방법으로 계산)



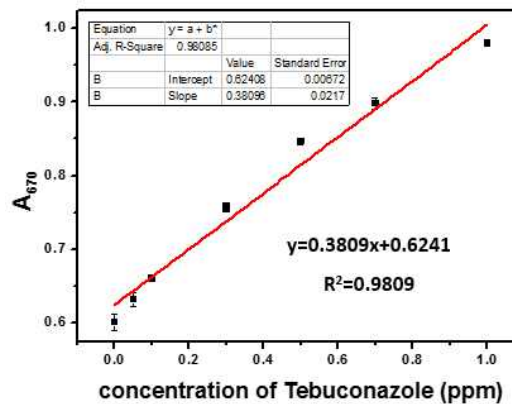
[벼(쌀)에 edifenphos 살균농약을 처리한 후 농약 농도별 측정값]

- 10.0 ppb - 10.0 ppm 까지의 농도로 측정 (5.0 ppm 이상에서 saturation됨)
- 0-1.0 ppm 까지 선형으로 측정됨.
- 측정 민감도: 27.9 ppb까지 측정됨 (3-sigma rule 방법으로 계산)



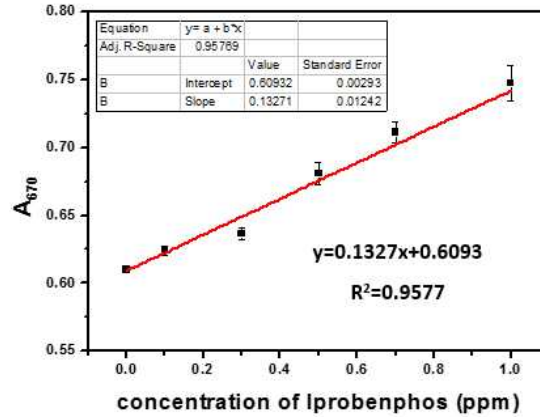
[딸기에 diazinon 살충농약을 처리한 후 농약 농도별 측정값]

- 0-1.0 ppm 까지 선형으로 측정됨.
- 측정 민감도: 52.6 ppb까지 측정됨 (3-sigma rule 방법으로 계산)



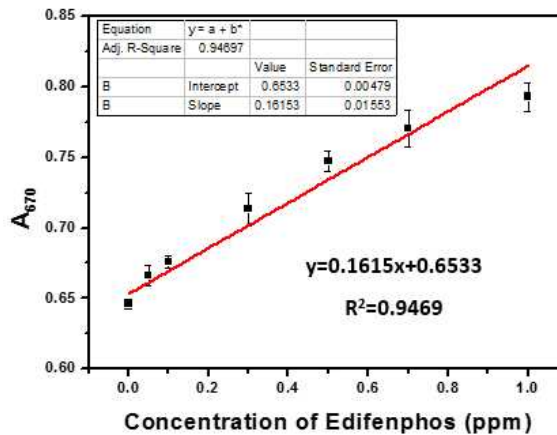
[딸기에 tebuconazole 살균농약을 처리한 후 농약 농도별 측정값]

- 0-1.0 ppm 까지 선형으로 측정됨.
- 측정 민감도: 22.5 ppb까지 측정됨 (3-sigma rule 방법으로 계산)



[딸기에 Iprobenfos 살균농약을 처리한 후 농약 농도별 측정값]

- 0-1.0 ppm 까지 선형으로 측정됨.
- 측정 민감도: 7.0 ppb까지 측정됨 (3-sigma rule 방법으로 계산)



[딸기에 edifenphos 살균농약을 처리한 후 농약 농도별 측정값]

- 0-1.0 ppm 까지 선형으로 측정됨.
- 측정 민감도: 12.0 ppb까지 측정됨 (3-sigma rule 방법으로 계산)

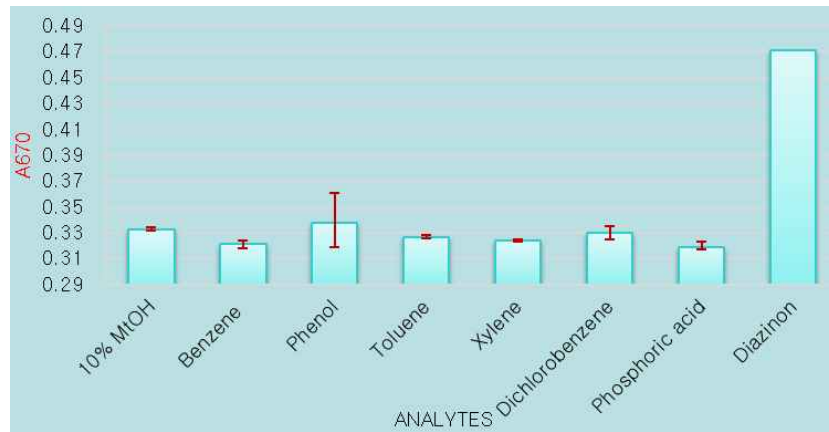
2) HPLC 검사 결과와의 비교 검증

Samples	Diazinon conc.	In deionized water	Recovery	On rice bran	Recovery	HPLC	Recovery
	Added (ppm)	mean ± SD (ppm)*	(%)	mean ± SD (ppm)*	(%)	mean ± SD (ppm)*	(%)
1	0.080	0.080 ± 0.024	100.4	0.079 ± 0.012	98.5	0.082 ± 0.002	96.2
2	0.170	0.173 ± 0.056	101.6	0.146 ± 0.012	86.3	0.149 ± 0.004	87.6
3	0.300	0.295 ± 0.042	98.3	0.340 ± 0.001	113.5	0.263 ± 0.064	87.7
Average	-	-	100.1	-	99.4	-	90.5

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

experiments.

- 나노입자를 활용한 비색법으로 검출한 값들과 HPLC 결과값의 유사도가 매우 높다는 결론을 얻어서 본 시스템의 유효성을 확인함.



[유사 화학구조체들과의 검출 선택성 테스트 결과]

- 농약과 유사한 구조체들과 비교하여 선택적으로 검출됨을 확인함.

3) 사용자 매뉴얼 (딸기 및 채소류 총 측정시간: 약 6분 소요)

◆ Sol I : 99% 메탄올

◆ Sol II : 금 나노입자액 (금 나노입자 350 μ L + 증류수 630 μ L 포함)

◆ Sol III : 압타머 희석액

◆ 구성품 : 1.5~3.0 mL tube, Sol I/II/III, Na_2SO_4 이 담긴 병, 1-cm cuvette, 잔류 농약 검출기 (WellKeeper™), 스포이드.

- ① 잔류 농약검사를 위한 시료 혹은 절편 준비하여 Sol I 용액에 2분간 담귀둔다. (대략 1 g당 Sol I 용액 1 mL 사용)
- ② 시료로부터 생성된 이물질 및 수분 제거를 위해 Na_2SO_4 이 담긴 병에 거즈로 입구를 막고 ①의 메탄올을 부어준다.(메탄올 30 mL당 Na_2SO_4 1g)
- ③ 수분이 충분히 제거 될 수 있도록 흔들어 준 뒤, 3분여 간 Na_2SO_4 분말을 가라앉힌다.
- ④ 상층액(농약이 포함된 Sol I 용액)을 스포이드로 1회 따서 Sol II와 섞어 희석한다.
- ⑤ 위 ④ 용액을 Sol III와 함께 순차적으로 큐벳에 넣어준 뒤 잘 섞어주고 30 초 동안 반응시킨다.
- ⑥ 휴대용 농약 측정 장치(WellKeeper™)에 큐벳을 꽂고 화면에서 측정하고자 하는 농약을 선택한 뒤 값을 측정한다.

4) 사용자 매뉴얼 (짧 총 측정시간: 약 3분 소요)

- ◆ Sol I : 99% 메탄올
- ◆ Sol II : 금 나노입자액 (금 나노입자 350 μL + 증류수 630 μL 포함)
- ◆ Sol III : 앵타머 희석액
- ◆ 구성품 : 1.5~3.0 mL tube, Sol I/II/III, 1-cm cuvette, 잔류 농약 검출기(WellKeeper™), 스포이드.

- ① 잔류 농약검사를 위한 시료 혹은 절편 준비하여 Sol I 용액에 2분간 담궈둔다. (대략 1 g당 Sol I 용액 1 mL 사용)
- ② 농약이 추출된 시료 상층액(농약이 포함된 Sol I 용액)을 스포이드로 1회 따서 Sol II와 섞어 희석한다.
- ③ 위 ② 용액을 Sol III와 함께 순차적으로 큐벳에 넣어준 뒤 잘 섞어주고 30 초 동안 반응시킨다.
- ④ 휴대용 농약 측정 장치(Wellkeeper™)에 큐벳을 꽂고 화면에서 측정하고자 하는 농약을 선택한 뒤 값을 측정한다.

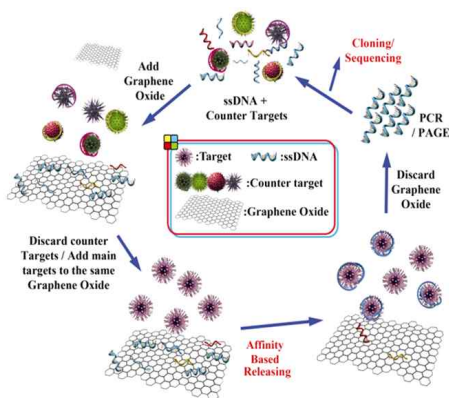
[제1세부 위탁]

[1차년도 연구수행 결과]

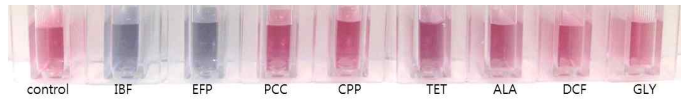
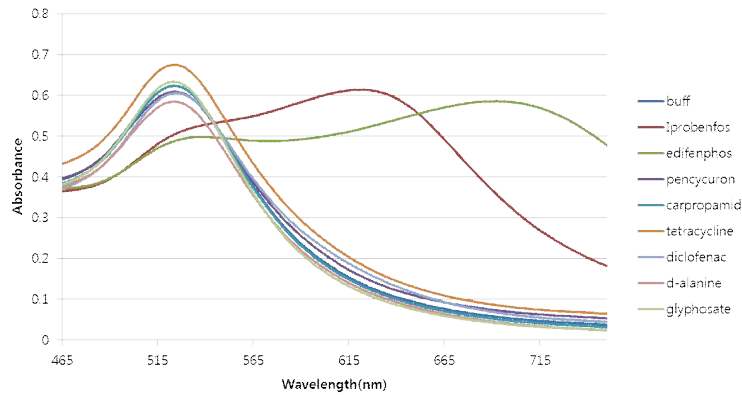
가. 그래핀 기반, 비교정화 방식의 앵타머 스크리닝 기술 개발

1) 비교정화 방식의 멀티 타겟 앵타머 스크리닝 기술 개발을 위한 preliminary 앵타머 스크리닝

- ◆ 타겟 설정
 - 벼농약 이프로벤포스(Iprobenfos)
- ◆ 타겟과 유사한 저분자 물질 카운터 타겟 선별
 - 벼농약 카프로과미드, 펜시큐론
 - 제초제 글라이포세이트
 - 아미노산 알라닌
 - 의약품 디클로페낙
- ◆ 기존의 그래핀 기반 앵타머 스크리닝을 변형하여 싱글 타겟 앵타머 스크리닝



◆ 선별된 앵타머의 타겟에 대한 특이성



[이프로벤포스와 에디펜포스 두 개의 타겟에 동시에 특이적인 앵타머의 타겟 특이성]

2) preliminary 싱글 타겟 앵타머 스크리닝을 바탕으로 비교정화 방식의 멀티 타겟 앵타머 스크리닝 기술을 통해 3개 타겟 특이적 앵타머 개발

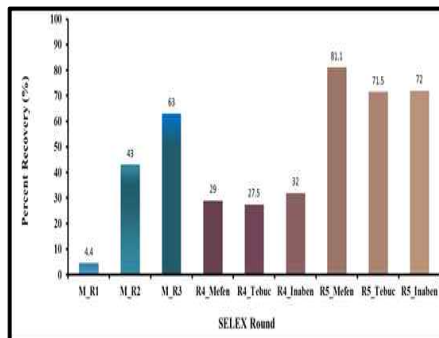
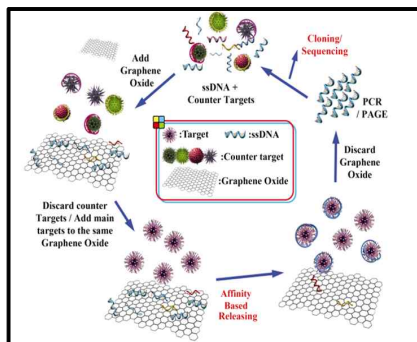
◆ 타겟 설정

- 벼농약 테뷰코나졸, 메페나셋, 이나벤과이드

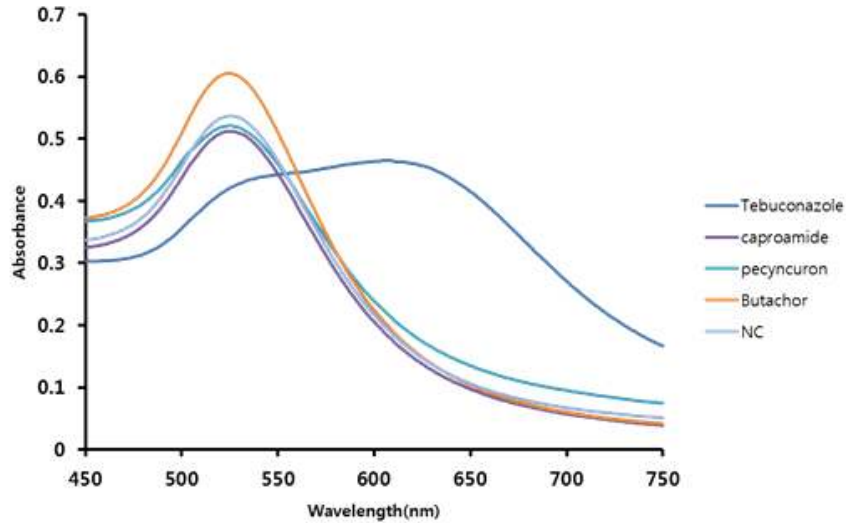
◆ 타겟과 유사한 저분자 물질 카운터 타겟 선별

- 벼농약 펜시큐론, 에디펜포스
- 제초제 부타클로르

◆ 기존의 그래핀 기반 앵타머 스크리닝을 변형하여 싱글 타겟 앵타머 스크리닝



◆ 선별된 앵타머의 타겟에 대한 특이성



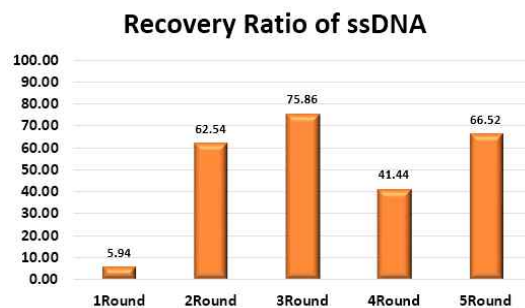
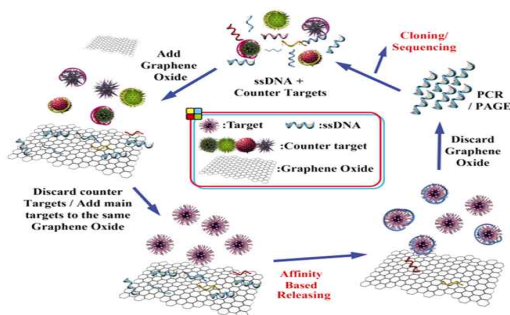
[테부코나졸 특이적 앵타머의 특이성]

[2차년도 연구수행 결과]

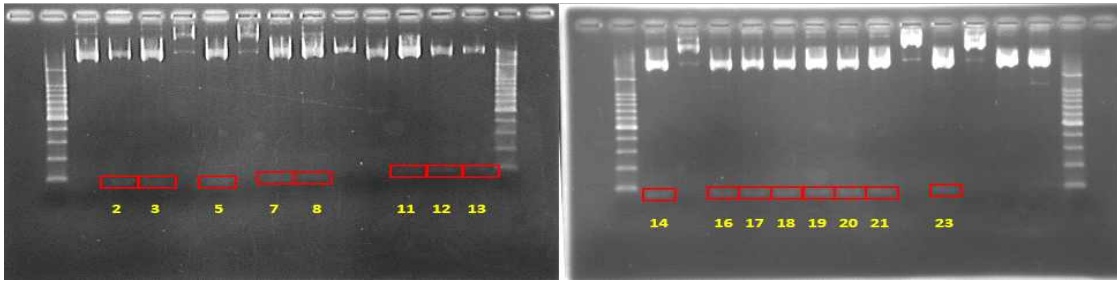
가. 그래핀 기반, 비고정화 방식의 앵타머 스크리닝 기술 개발

1) 비고정화 방식의 타겟 앵타머 스크리닝 기술 개발에 의한 preliminary 앵타머 스크리닝

- ◆ 타겟 설정 (벼농약)
 - 아세페이트(Acephate)
- ◆ 타겟과 유사한 저분자 물질 카운터 타겟 선별 (벼농약)
 - 아세타미프리트(Acetamiprid), 메페나셋(Mefenacet), 테부코나졸(Tebuconazole) 펜시큐론(Pencycuron)

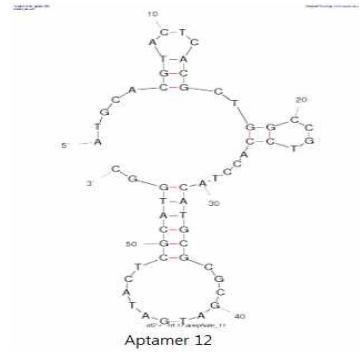


① 클로닝 후 엔자임 커팅 결과

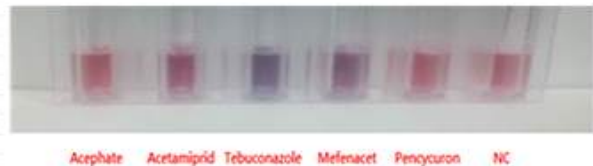
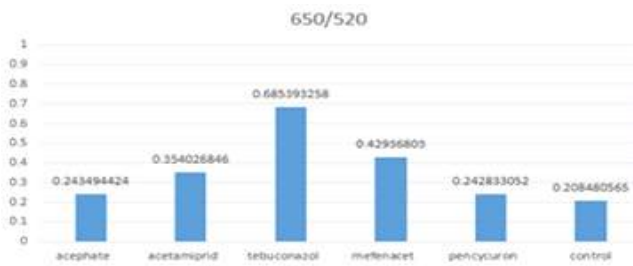


② 선별된 앵타머의 서열분석

Aptamer_12	ATGCACGTA CTCA CGCTGTGAGCGGGCTCTACTCGCGATGATACTCGCATGGC	55mer	$\Delta G = -11.59$ kcal/mol
Aptamer_11	ATGCACGTA CTCA CGCTGGCCGTCACCTACATGCGCGATGATACTCGCATGGC	56mer	$\Delta G = -10.17$ kcal/mol
Aptamer_8	ATGCACGTA CTCA CGCTGGTTGGGGGTGGGCGTGTACGATGATACTCGCATGGC	56mer	$\Delta G = -9.20$ kcal/mol
Aptamer_21	ATGCACGTA CTCA CGCTGGCTGTACCCCTCTTCGCTTCGATGATACTCGCATGGC	56mer	$\Delta G = -7.94$ kcal/mol
Aptamer_7	ATGCACGTA CTCA CGCTGGGTGATGACGCCCGTGTACGATGATACTCGCATGGC	56mer	$\Delta G = -7.83$ kcal/mol
Aptamer_13	ATGCACGTA CTCA CGCTGGTTATGCTCTGTGCGGGAGCGATGATACTCGCATGGC	56mer	$\Delta G = -7.55$ kcal/mol
Aptamer_14	ATGCACGTA CTCA CGCTGGATGCGCGTAGATGCTGGCTCGATGATACTCGCATGGC	56mer	$\Delta G = -7.42$ kcal/mol
Aptamer_17	ATGCACGTA CTCA CGCTGGCGGGGAACTACATGCGCGATGATACTCGCATGGC	56mer	$\Delta G = -7.40$ kcal/mol
Aptamer_18	ATGCACGTA CTCA CGCTGGGGAAATTTGGGTACGAGTCGATGATACTCGCATGGC	56mer	$\Delta G = -6.66$ kcal/mol
Aptamer_16	ATGCACGTA CTCA CGCTGGGGGGCTGTGGGGTGTGTGATGATACTCGCATGGC	56mer	$\Delta G = -5.81$ kcal/mol
Aptamer_20	ATGCACGTA CTCA CGCTGGGTAAACGGGAGGGTACAAGATGATACTCGCATGGC	56mer	$\Delta G = -5.27$ kcal/mol
Aptamer_5	ATGCACGTA CTCA CGCTGGGTCAAATGCTGCTGCGCGATGATACTCGCATGGC	56mer	$\Delta G = -5.14$ kcal/mol
Aptamer_19	ATGCACGTA CTCA CGCTGCCCTATATGTTGATGAGACGATGATACTCGCATGGC	56mer	$\Delta G = -5.03$ kcal/mol
Aptamer_2	ATGCACGTA CTCA CGCTGACTATTTGGCCCTGGTCATTGATGATACTCGCATGGC	56mer	$\Delta G = -4.73$ kcal/mol
Aptamer_3	ATGCACGTA CTCA CGCTGACTATTTGGCCCTGGTCATTGATGATACTCGCATGGC	56mer	$\Delta G = -4.73$ kcal/mol
Aptamer_23	ATGCACGTA CTCA CGCTGAAGGGGAGGGGATGACGGGTGATGATACTCGCATGGC	56mer	$\Delta G = -4.28$ kcal/mol



③ 선별된 앵타머의 특이성

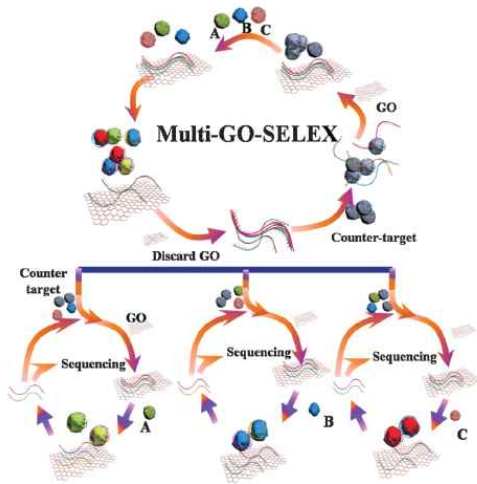


2) 1차년도에 개발하여 논문에 게재된 비고정화 방식의 멀티 타겟 앵타머 스크리닝을 변형시켜 멀티플렉스 PCR기술을 통해 4개 타겟 특이적 앵타머 개발

- ◆ 기존의 그래핀 기반 멀티타겟 앵타머 스크리닝을 변형으로, 여러종류의 프라이머를 통해서, 4종류의 랜덤 라이브러리를 한번의 PCR로 증폭시킨 후 4개의 타겟에 대해 특이적인 앵타머를 스크리닝.
- ◆ 기존 싱글 라이브러리 multi-SELEX와 비교하여 서로 다른 프라이머를 가진 multi 라이브러리를 사용하기 때문에 서로 다른 멀티 라이브러리의 multi-SELEX라고 할 수 있으며 시간감축 효과는 그대로 유지하되, 다양한 시퀀스의 앵타머를 개발 할 수 있을것으로 사료됨.
- ◆ 타겟 설정
 - 벼농약 아세타미프리트, 카프로파미드, 펜시큐론, 에디펜포스
- ◆ 타겟과 유사한 저분자 물질 카운터 타겟 선별
 - 벼농약 테부코나졸, 메페나셋, 이나벤파이드, 아세페이트

- 제초제 부타클로르

- ◆ 기존의 그래핀 기반 멀티타겟 애평타머 스크리닝을 변형하여 멀티플렉스 PCR 멀티 타겟 애평타머 스크리닝



[멀티타겟 애평타머 스크리닝]



[Selection Progress]

[3차년도 연구수행 결과]

가. 그래핀 기반, 비고정화 방식의 애평타머 스크리닝 기술 개발

1) 1차년도에 개발하여 논문에 게재된 비고정화 방식의 멀티 타겟 애평타머 스크리닝을 변형시켜 멀티플렉스 PCR기술을 통해 4개 타겟 특이적 애평타머 개발

- ◆ 기존의 그래핀 기반 멀티타겟 애평타머 스크리닝을 변형으로, 여러종류의 프라이머를 통해서, 4종류의 랜덤 라이브러리를 한번의 PCR로 증폭시킨 후 4개의 타겟에 대해 특이적인 애평타머를 스크리닝.
- ◆ 기존 싱글 라이브러리 multi-SELEX와 비교하여 서로 다른 프라이머를 가진 multi 라이브러리를 사용하기 때문에 서로 다른 멀티 라이브러리의 multi-SELEX라고 할 수 있으며 시간감축 효과는 그대로 유지하되, 다양한 시퀀스의 애평타머를 개발 할 수 있을것으로 사료됨.

◆ 타겟 설정

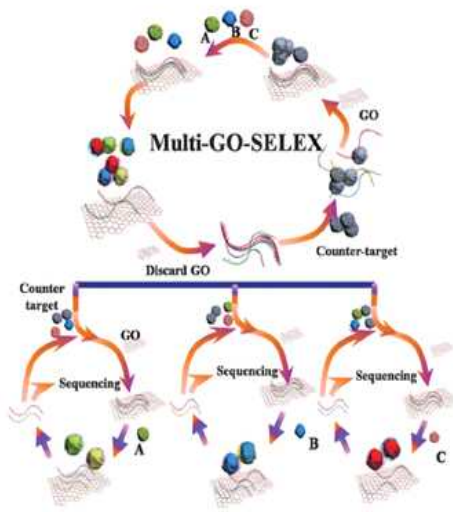
- 벼농약 카프로파미드, 펜시큐론, 클로로메퀏 클로라이드
- 제초제 부타클로르

◆ 타겟과 유사한 저분자 물질 카운터 타겟 선별

- 벼농약 아세페이트, 이프로벤포스, 글라이포세이트

◆ 기존의 그래핀 기반 멀티타겟 애평타머 스크리닝을 변형하여 멀티플렉스 PCR 멀티 타겟 애평타머 스크리닝

크리닝



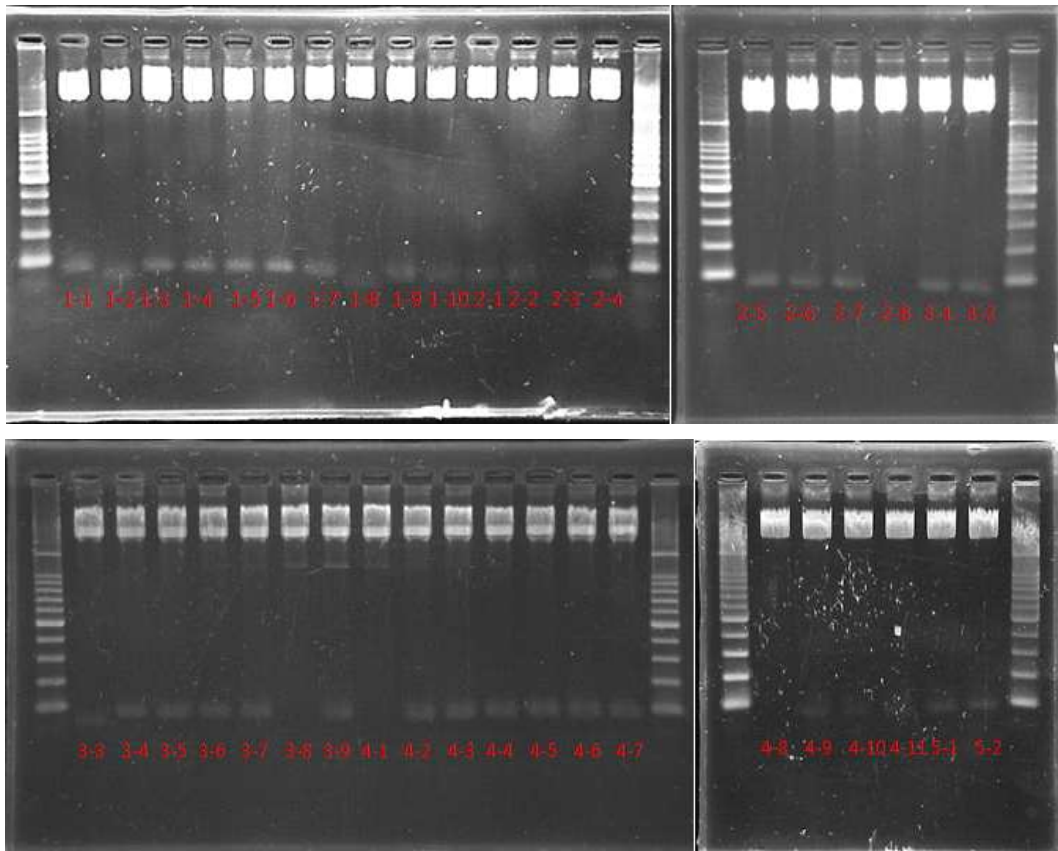
[멀티타겟 앵타머 스크리닝]

Selection Progress



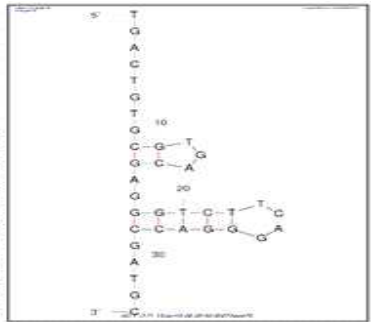
[Selection Progress]

① 클로닝 후 엔자임 커팅 결과

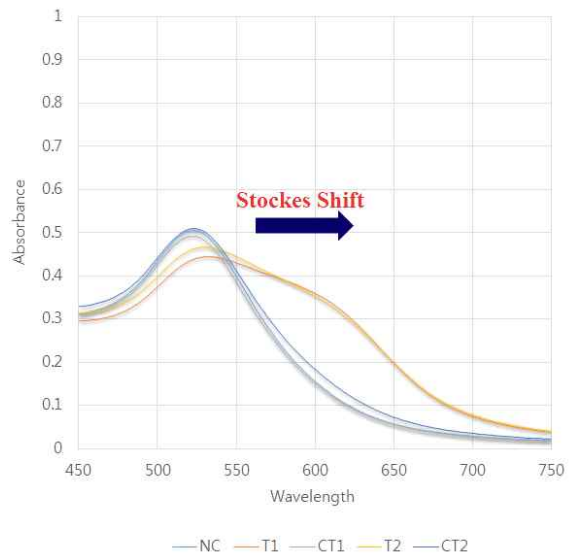
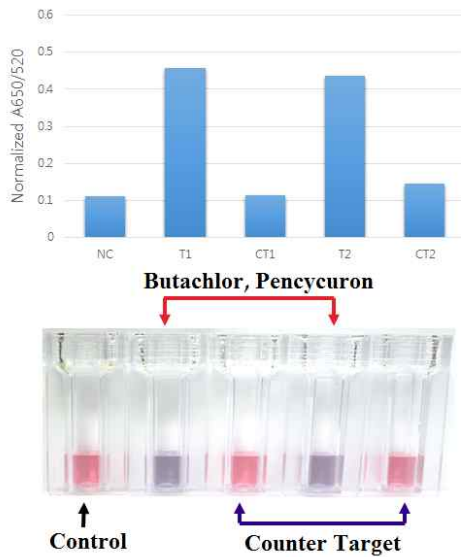


② 선별된 앵타머의 서열 분석

TGACTGTGOSTGA	CGA9GT	TGCTGCTATCGCA	GGGGT	GTCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	aptamer set 4	$\Delta G = -7.90$ kcal/mol	PCBA1				
CGTGGAGACT	TGTGCCTG	GAGAGCCCGTATA	TGGCTT	AGTCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	primer set 2	$\Delta G = -7.27$ kcal/mol	PCBA2				
CGAGCCGT	GAGAT	CAACA	KCAAGCCGTAT	TGGT	TGTCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	primer set 3	$\Delta G = -6.90$ kcal/mol	PCBA3			
CGAGCCGT	GAGAT	CAACA	TGGT	TAGAACT	GTCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	primer set 3	$\Delta G = -6.88$ kcal/mol	PCBA4			
CGAGCCGT	GAGAT	CAACA	TGGSA	TGT	GGAA	TGT	TGTGTCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	primer set 3	$\Delta G = -6.54$ kcal/mol	PCBA5	
CGAGCCGT	GAGAT	CAACA	TGGSA	TGT	GGAA	TGT	TGTGTCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	primer set 3	$\Delta G = -6.29$ kcal/mol	PCBA6	
TGACTGTGOST	GAGAT	CAACA	TGGSA	TGT	GGAA	TGT	TGTGTCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	primer set 4	$\Delta G = -5.86$ kcal/mol	PCBA7	
TGACTGTGOST	GAGAT	CAACA	TGGSA	TGT	GGAA	TGT	TGTGTCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	aptamer set 3	$\Delta G = -5.67$ kcal/mol	PCBA8	
CGAGCCGT	GAGAT	CAACA	CCGCA	TGGT	TGT	GGAA	TGT	TGTGTCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	primer set 3	$\Delta G = -5.59$ kcal/mol	PCBA9
CGAGCCGT	GAGAT	CAACA	CTA	AGCT	GGAT	GAAT	GGCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	primer set 3	$\Delta G = -5.54$ kcal/mol	PCBA10	
TGACTGTGOST	GAGAT	CAACA	CTA	AGCT	GGAT	GAAT	GGCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	primer set 4	$\Delta G = -5.46$ kcal/mol	PCBA11	
CGAGCCGT	GAGAT	CAACA	CTA	AGCT	GGAT	GAAT	GGCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	primer set 3	$\Delta G = -5.40$ kcal/mol	PCBA12	
CGAGCCGT	GAGAT	CAACA	CTA	AGCT	GGAT	GAAT	GGCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	primer set 3	$\Delta G = -5.33$ kcal/mol	PCBA13	
TGACTGTGOST	GAGAT	CAACA	CTA	AGCT	GGAT	GAAT	GGCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	aptamer set 3	$\Delta G = -4.87$ kcal/mol	PCBA14	
CGAGCCGT	GAGAT	CAACA	CTA	AGCT	GGAT	GAAT	GGCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	primer set 3	$\Delta G = -4.80$ kcal/mol	PCBA15	
TGACTGTGOST	GAGAT	CAACA	CTA	AGCT	GGAT	GAAT	GGCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	aptamer set 4	$\Delta G = -4.66$ kcal/mol	PCBA16	
TGACTGTGOST	GAGAT	CAACA	CTA	AGCT	GGAT	GAAT	GGCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	primer set 4	$\Delta G = -4.42$ kcal/mol	PCBA17	
TGACTGTGOST	GAGAT	CAACA	CTA	AGCT	GGAT	GAAT	GGCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	primer set 4	$\Delta G = -4.19$ kcal/mol	PCBA18	
CGAGCCGT	GAGAT	CAACA	CTA	AGCT	GGAT	GAAT	GGCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	primer set 3	$\Delta G = -4.16$ kcal/mol	PCBA19	
TGACTGTGOST	GAGAT	CAACA	CTA	AGCT	GGAT	GAAT	GGCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	primer set 4	$\Delta G = -3.99$ kcal/mol	PCBA20	
TGACTGTGOST	GAGAT	CAACA	CTA	AGCT	GGAT	GAAT	GGCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	56	aptamer set 4	$\Delta G = -3.96$ kcal/mol	PCBA21	
TGACTGTGOST	GAGAT	CAACA	CTA	AGCT	GGAT	GAAT	GGCT	TCAGGGAC	CGSAT	GC	36	primer set 4	$\Delta G = -3.71$ kcal/mol	PCBA22	



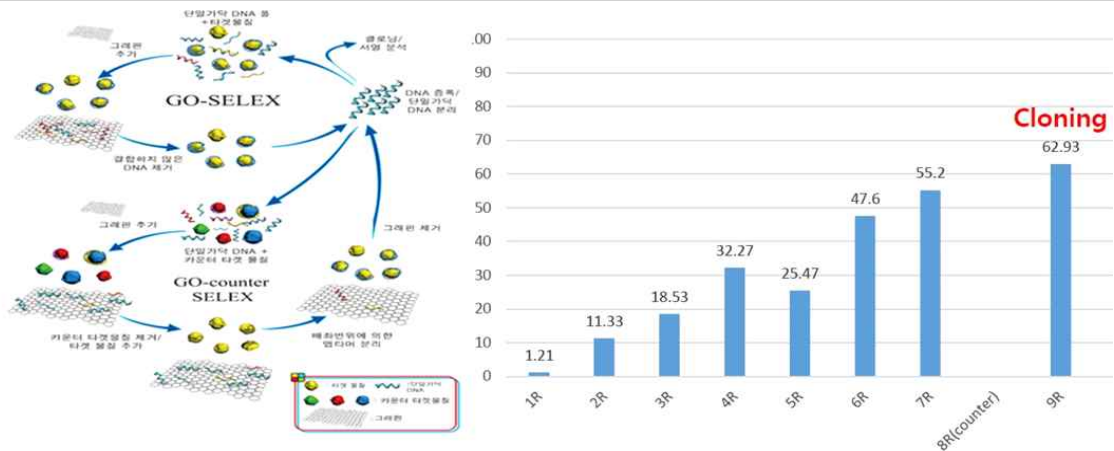
③ 선별된 앵타머의 특이성



(나) 그래핀 기반, 비교정화 방식의 앵타머 스크리닝

1) 1차년도에 개발하여 논문에 게재된 비교정화 방식의 그래핀 옥사이드 스크리닝을 이용하여, 디노테퓨란, 아자디락틴, 피프로닐 3개의 타겟에 대한 앵타머 스크리닝 진행 중에 있음.

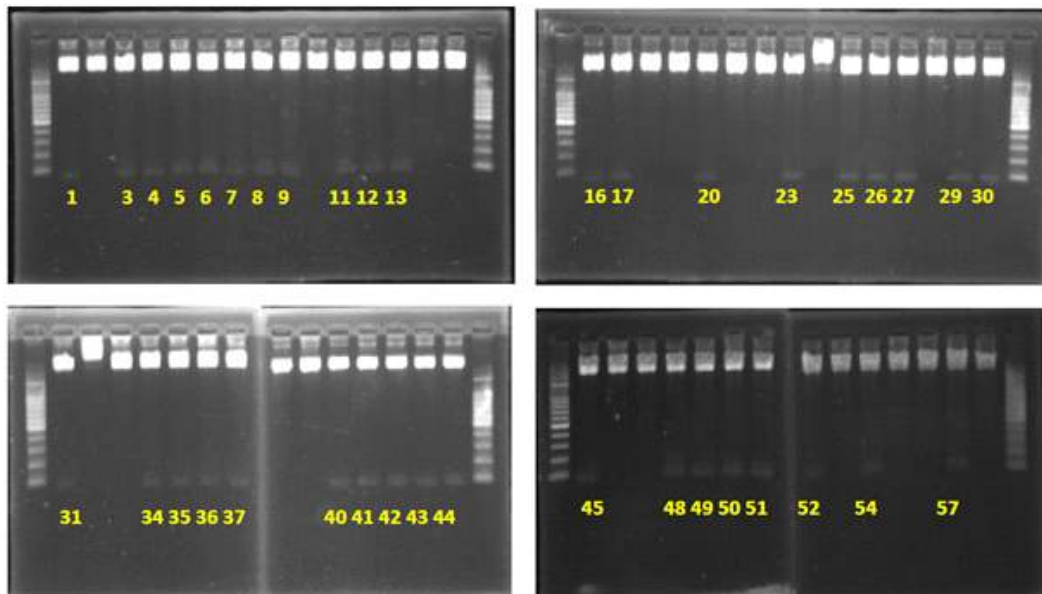
- ◆ 타겟 설정
 - 다이노테퓨란
- ◆ 타겟과 유사한 저분자 물질 카운터 타겟 선별
 - 클로티아니딘, 카프로파미드, 펜시큐론, 클로로메캇 클로라이드



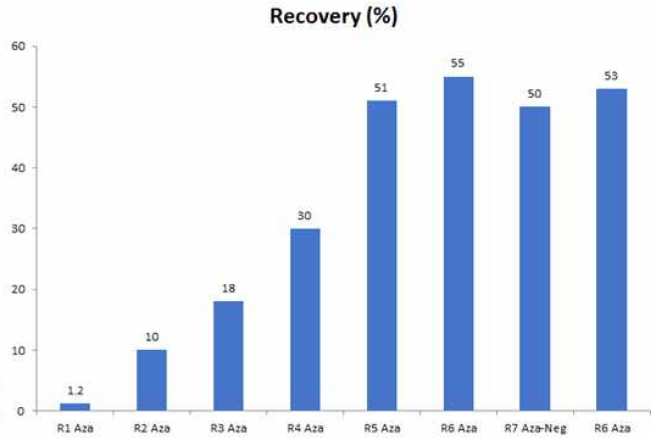
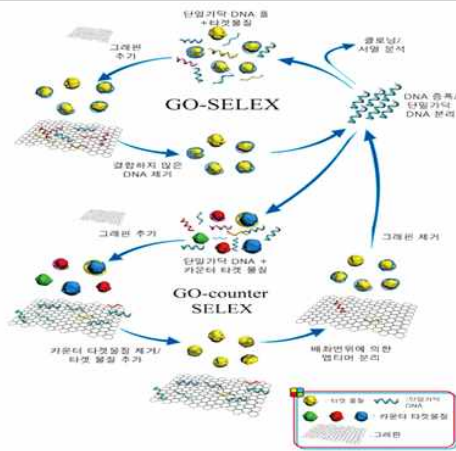
[비고정화 방식의 앵타머 스크리닝]

[Selection Progress]

① 클로닝 후 엔자임 커팅 결과



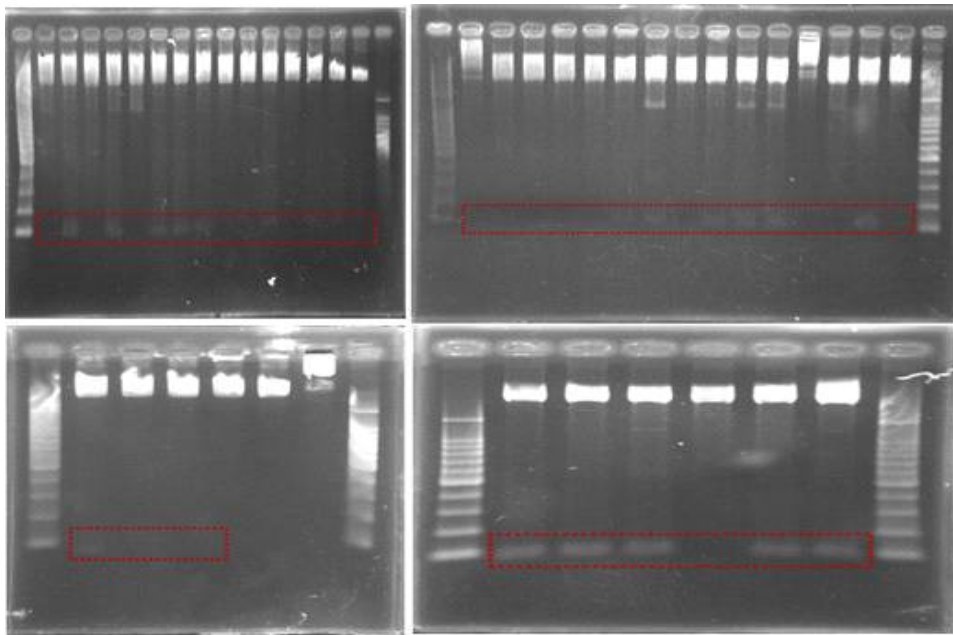
- ◆ 현재 디이노테퓨란에 대한 특이적인 앵타머 스크리닝 과정은 끝났으며, 앵타머 후보군에 대한 시퀀싱 진행했음.
- ◆ 앵타머 후보군에 대한 테스트 진행 중임.
- ◆ 타겟 설정
 - 아자디락틴
- ◆ 타겟과 유사한 저분자 물질 카운터 타겟 선별
 - 부타클로르, 클로로페닛 클로라이드, 이부프로펜, 디클로페낙, 피프로닐



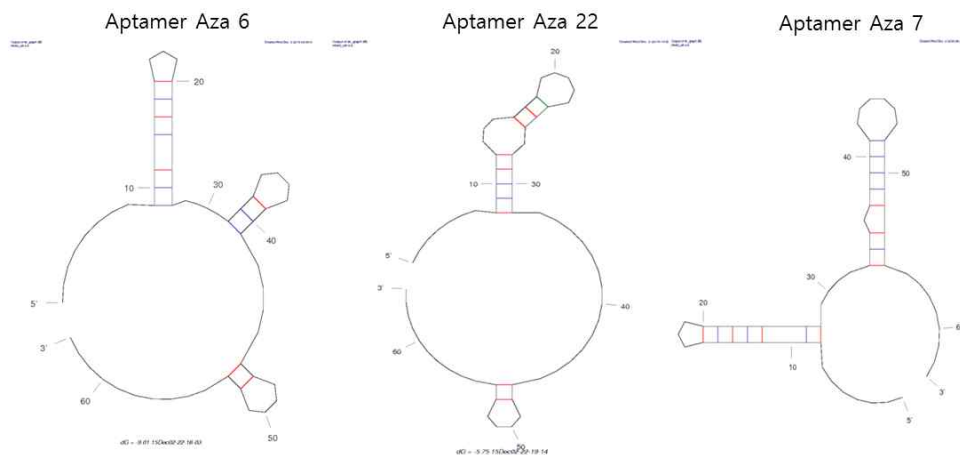
[비고정화 방식의 앵타머 스크리닝]

[Selection Progress]

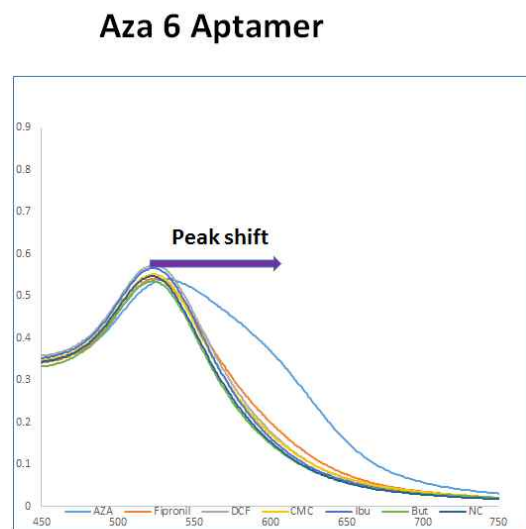
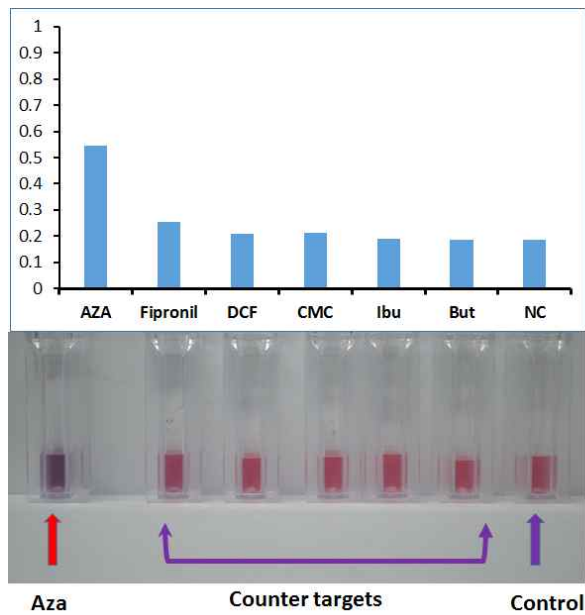
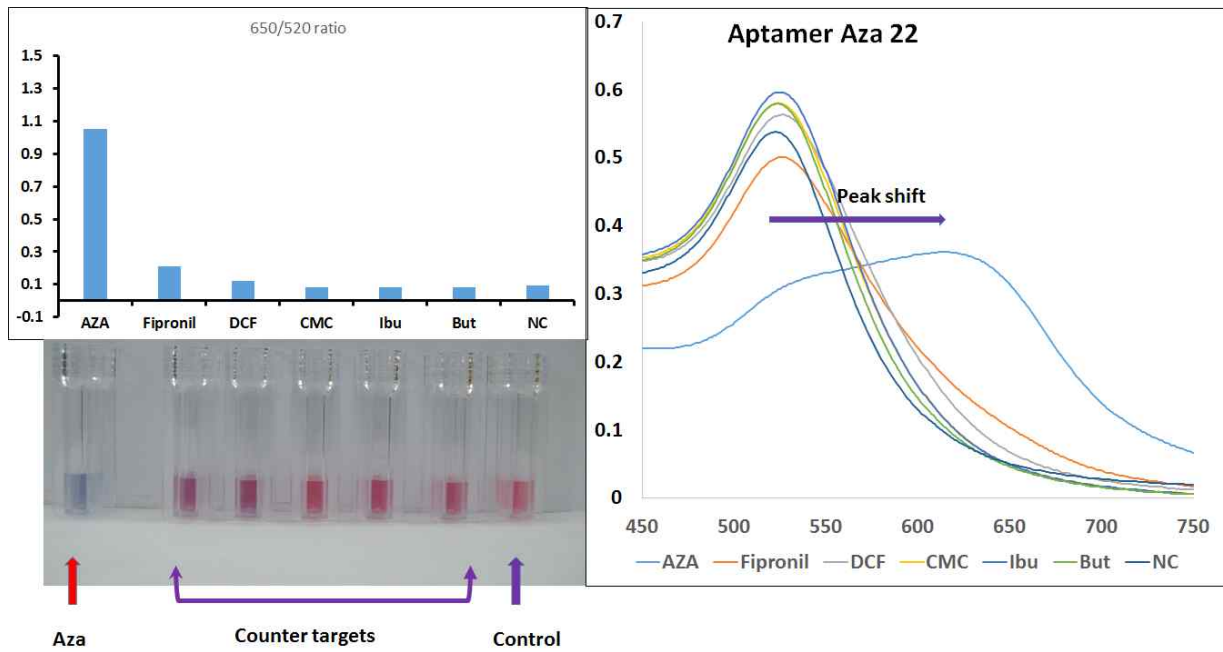
① 클로닝 후 엔자임 커팅 결과

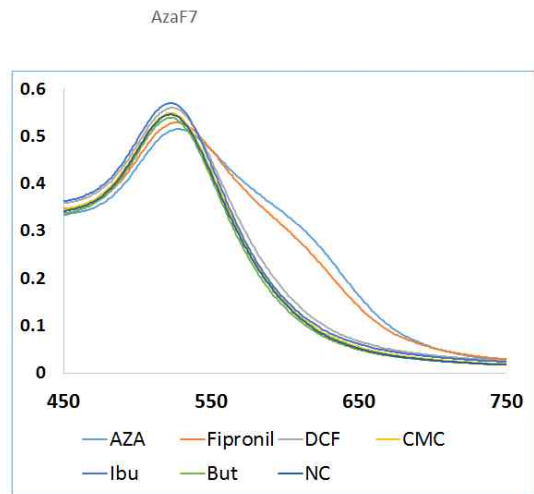
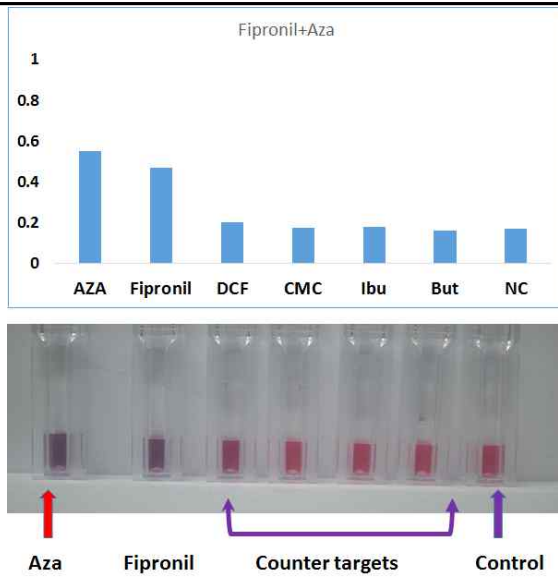


② 선별된 앵타머의 서열 분석



③ 선별된 애포머의 특이성 분석 결과

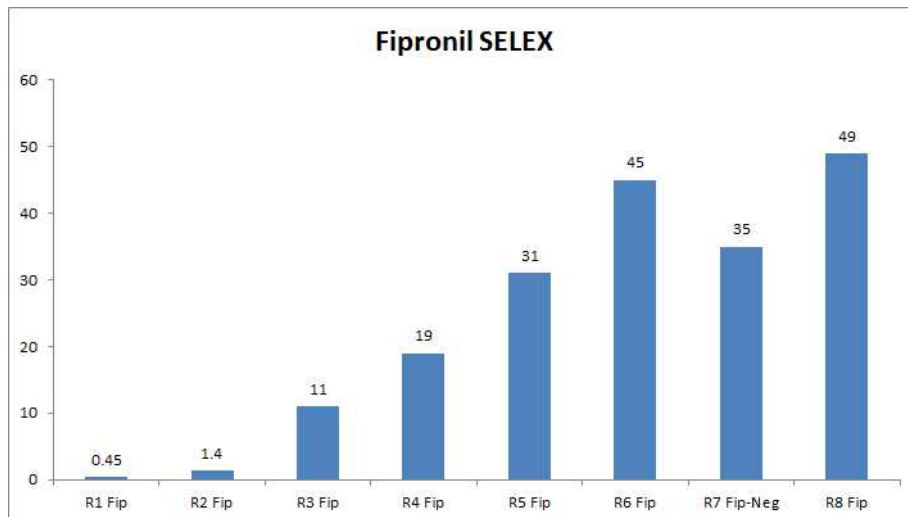




- ◆ 아자디락틴에 대한 앵타머 스크리닝을 통하여, 아자디락틴에 특이적인 앵타머를 선별함.
- ◆ 아자디락틴 및 피프로닐 두 개의 타겟과 결합하는 앵타머를 개발함.
- ◆ 아자디락틴, 피프로닐에 특이적인 앵타머 후보군에 대해서 선별함.

- ◆ 타겟 설정
 - 피프로닐

- ◆ 타겟과 유사한 저분자 물질 카운터 타겟 선별
 - 부타클로르, 클로로베켓 클로라이드, 이부프로펜, 디클로페낙



[Selection Progress]

- ◆ SELEX 8라운드 진행하여 클로닝, 미니프렘 등을 통해 앵타머 후보군 선별
- ◆ 선별한 앵타머 후보군을 금나노입자 기반 색도분석을 이용해 타겟에 대한 affinity 유무 판별

Target	Aptamer Sequence (5'→3')
Tebuconazol	CGTACGGAATTCGCTAGCAGCGTCCACGAGTGTGGTGTGGATCCGAGCTCCACGTG(T1) CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTTGGTCCCCTGCGCGTGGATCCGAG CTCCACGTG(T2) CGTACGGAATTCGCTAGCAGCTTGACGCTGGTCCCGGTTGTGGTGCAGTGTGGTGTGGATCCGAG CTCCACGTG (T3)
Mefenacet	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTTGGTCCCCTGCGCGTGGATCCGAG CTCCACGTG(T2)
Inabenfide	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTTGGTCCCCTGCGCGTGGATCCGAG CTCCACGTG(T2) CGTACGGAATTCGCTAGCAGCTTGACGCTGGTCCCGGTTGTGGTGCAGTGTGGTGTGGATCCGAG CTCCACGTG (T3)
Iprobenfos	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGGGGCCTGGGGCGGGCCCGATGGGATCCGAGCTC CACGTG(EIA1) CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGGGGCCTGGGGCGGGCCCGATGGGATCCGAGCTC CACGTG(EIA2)
Edifenphos	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGGGGCCTGGGGCGGGCCCGATGGGATCCGAGCTC CACGTG(EIA1) CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGGGGCCTGGGGCGGGCCCGATGGGATCCGAGCTC CACGTG(EIA2)
Azadirachtin	GAAGAGCCAAGGACAGGTAAGTGTGCTTAGATAAGTTTGCTGCTGCTATTGGTCTATTTTCC (Aza6) GAAGAGCCAAGGACAGGTAAGTGTGCTTAGATAAGTTTGCTGCTGCTATTGGTCTATTTTCC (Aza7) GAAGAGCCAAGGACAGGTAAGTGTGCTTAGATAAGTTTGCTGCTGCTATTGGTCTATTTTCC (Aza15) GAAGAGCCAAGGACAGGTAAGTGTGCTTAGATAAGTTTGCTGCTGCTATTGGTCTATTTTCC (Aza22) (Patent in Prep.)
Fipronil	GAAGAGCCAAGGACAGGTAAGTGTGCTTAGATAAGTTTGCTGCTGCTATTGGTCTATTTTCC (Aza7) CGTACGGAATTCGCTAGCAAAGATAACATCAAACACGTGGATCCGAGCTCCACGTG (Fip6) CGTACGGAATTCGCTAGCATAGATTACACTAATCACGTGGATCCGAGCTCCACGTG (Fip8) (Patent in Prep.)
Butachlor	GAAGAGCCAAGGACAGGTAAGTGTGCTTAGATAAGTTTGCTGCTGCTATTGGTCTATTTTCC (Aza15) (Patent in Prep.)

[선별된 농약에 대해 개발된 aptamer 10종 이상 개발]

[제1협동]

[1차년도 연구 수행 결과]

가. 모델 aptamer를 이용한 스트립센서 구축

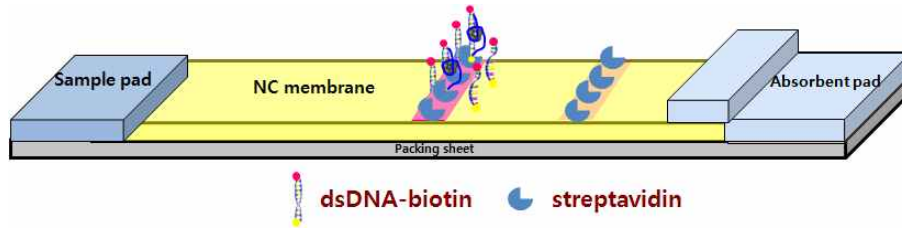
- 차년도에는 농약에 대한 aptamer 개발이 위탁기관에서 진행되고 있기 때문에 농약과 특성이 유사한 곰팡이독소 ochratoxin A와 aflatoxin B1을 대상으로 기 보고된 aptamer를 이용하여 스트립센서 개발에 관한 연구를 수행하였음
- 팡이독소에 특이적으로 반응하는 aptamer와 aptamer에 상보적인 결합을 하는 상보DNA를 이용하여 이중가닥 DNA(double strand DNA; dsDNA)를 니트로셀룰로스 멤브레인에 적용하여 aptamer 기반 스트립 센서를 개발하는 연구를 다음과 같이 수행하였음

1) dsDNA (aptamer-상보 DNA) 기반 스트립 센서 개발

가) dsDNA기반 스트립 센서 디자인

- 개발하고자 하는 dsDNA기반 스트립센서의 구조는 아래와 같이 packing sheet 상에 sample pad, NC membrane, absorbent pad를 부착하여 제작하는 형태로 총 3부분으로 구성하였음
- NC membrane 상에는 dsDNA(control line)와 streptavidin(test line)을 처리하였음
- 타겟 물질이 존재하면 dsDNA의 결합이 붕괴되고 떨어져 나간 single strand DNA(ssDNA)가 test line의 streptavidin에 결합하게 되고 ssDNA상에 있는 형광마커에 의해 형광이 나타내게 됨

- ◆ 분석에 사용되는 알고리즘을 이용해서 control line과 test line 형광의 증감에 따른 비교를 통하여 분석하도록 설계하였음



[dsDNA 기반 스트립 센서 디자인 및 구조]

- ◆ 본 연구에서 사용된 고휘광이독소 압타머는 캐나다 Neoventure Biotechnology Inc. (<http://neoventures.ca/aptamer-database/>)에서 개발한 압타머로 앞서 제시한 스트립 센서 모델을 개발하기 위해 제작하였음
- ◆ 디자인한 스트립 센서의 개발을 위해 사용된 압타머 및 상보 DNA의 염기서열은 아래와 같음

[표. 스트립센서 모델 개발을 위해 사용한 압타머 및 상보 DNA 염기서열]

Name	Sequence (5' -> 3')
압타머	AFB_Str_Temp
	Biotin-AAA AAA AAA AGT TGG GCA CGT GTT GTC TCT CTG TGT CTC GTG CCC TTC GCT AGG CCC ACA
상보DNA	AFB_Str_Target_14_Cy5
	Cy 5-AAA TGT GGG CCT AGC GA-Biotin
	AFB_Str_Target_23_Cy5
	Cy 5-AAA TGT GGG CCT AGC GAA GGG CAC GA-Biotin

나) NC membrane 상 dsDNA 구축 방안 모색

- ◆ Membrane 상에 압타머와 상보DNA가 hybridization되어 dsDNA를 membrane 상에 구축하기 위한 방법으로 top-down방법과 bottom-up 방법을 이용하여 구축하는 연구를 수행하였음



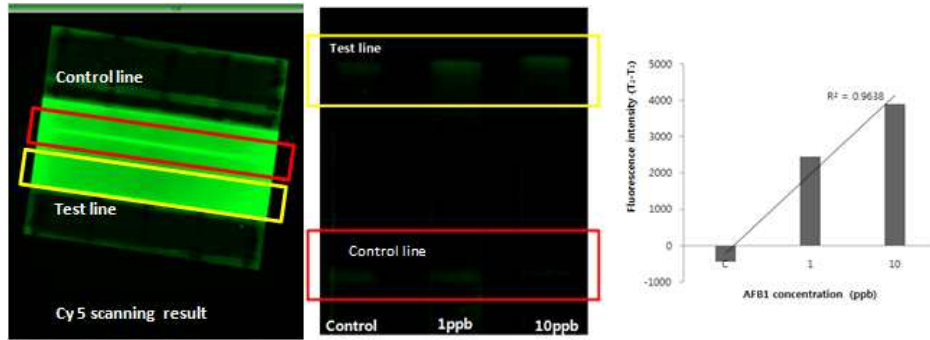
[dsDNA를 membrane 상에 구축하기 위한 top-down과 bottom-up 원리]

(1) Bottom-up 방법을 통한 membrane 상 dsDNA 구축

- ◆ NC membrane 상에 bottom-up 방법을 이용하여 dsDNA를 구축하기 위해 먼저 streptavidin을

처리하고 biotin-aptamer를 결합시킨 후 상보DNA를 반응시켜 dsDNA를 NC membrane상에 구축하였음

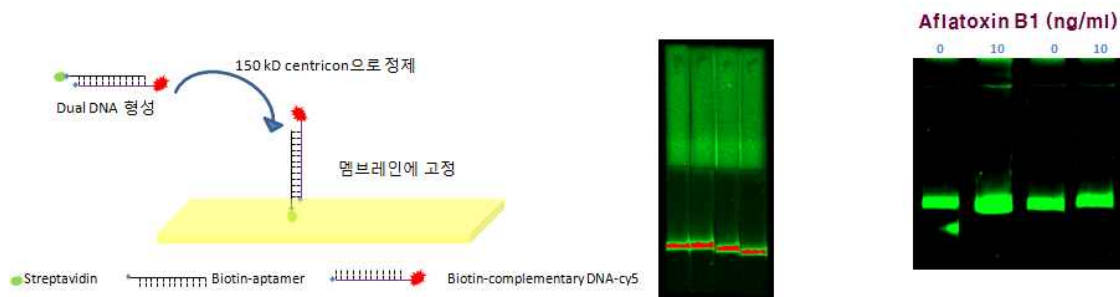
- ◆ 그 결과 아래 그림에서 보는바와 같이 dsDNA상의 형광입자에 의해 형광을 띤 라인이 형성된 것을 확인
- ◆ 그러나 membrane 전체에 형광입자-상보DNA에 의한 비특이적인 형광이 관찰되었고, membrane 세척이나 dsDNA를 구축하는데 소요시간과 과정이 복잡한 단점이 있음
- ◆ 그러므로 액상에서 dsDNA를 구축한 후 이를 membrane에 흡착시키는 top-down 방법을 고안하였음



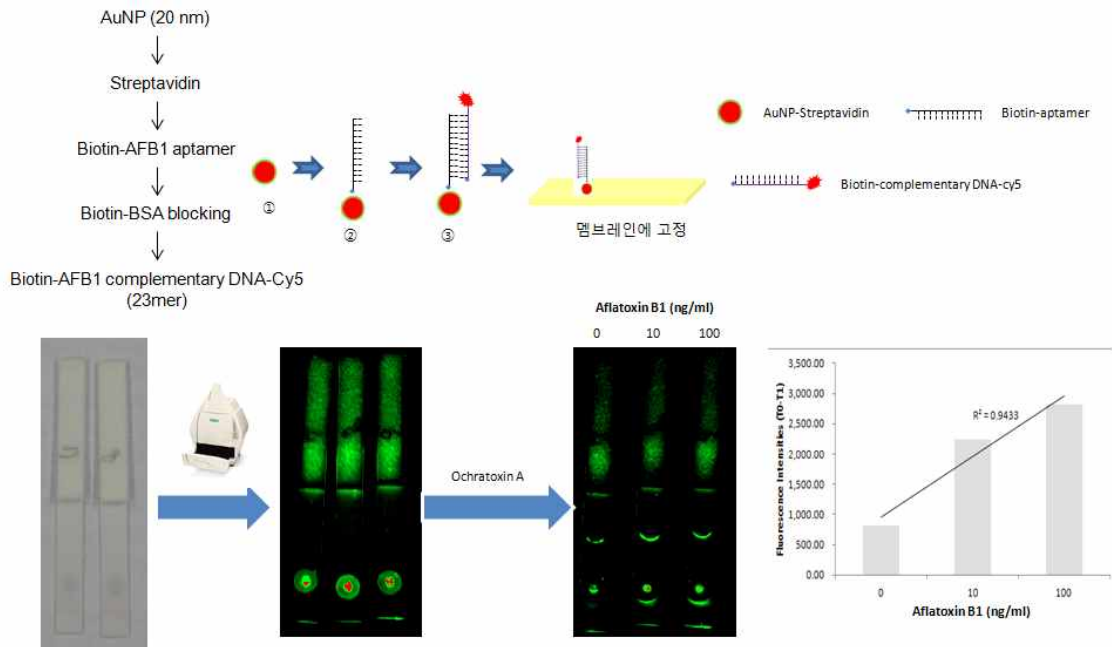
[Bottom-up 방식으로 구축된 dsDNA기반한 스트립센서의 예비실험결과]

(2) top-down 방법을 통한 membrane 상 dsDNA 구축

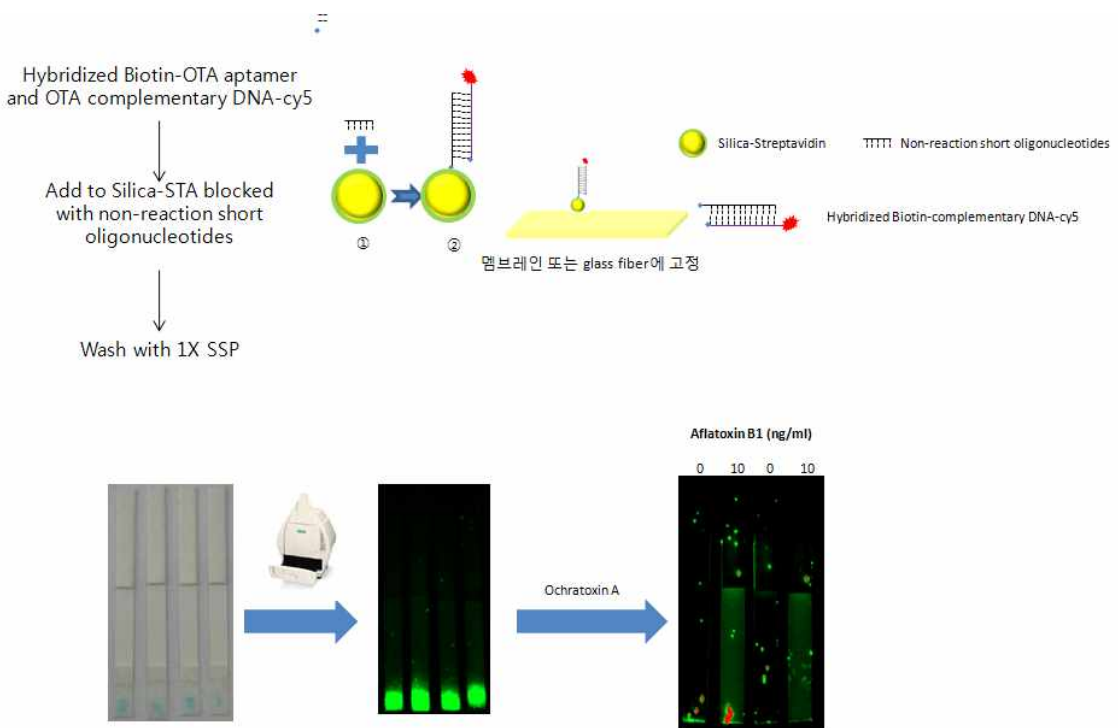
- ◆ dsDNA를 액상에서 먼저 구축을 하고 membrane 상에 고정하기 위해 먼저 단백질인 streptavidin, streptavidin이 고정되어 있는 금나노입자(40 nm)와 실리카 입자(100 um)를 이용하였음



[Streptavidin상에 구축된 dsDNA를 membrane에 고정하는 방법]



[Streptavidin에 둘러싸인 금나노입자 상에 구축된 dsDNA를 membrane에 고정하는 방법]



[Streptavidin에 둘러싸인 실리카 입자상에 구축된 dsDNA를 membrane에 고정하는 방법]

- ◆ 위의 세 가지 top-down 방식으로 스트립 센서를 구성한 결과 모든 방법이 dsDNA를 membrane 상에 고정되는 것을 확인할 수 있었고, 이전의 bottom-up 방법보다는 효과적인 것인 것으로 판단됨
- ◆ 그러나 금나노입자와 실리카입자를 이용하여 membrane 상에 고정한 경우 타겟 물질이 없는 경우에도 입자상에 dsDNA 붕괴되어 test line으로 이동하는 것으로 확인되었음
- ◆ 그러므로 streptavidin상에 dsDNA를 구축하여 고정시킨 방법이 가장 효율적이고 안정적인 것으로

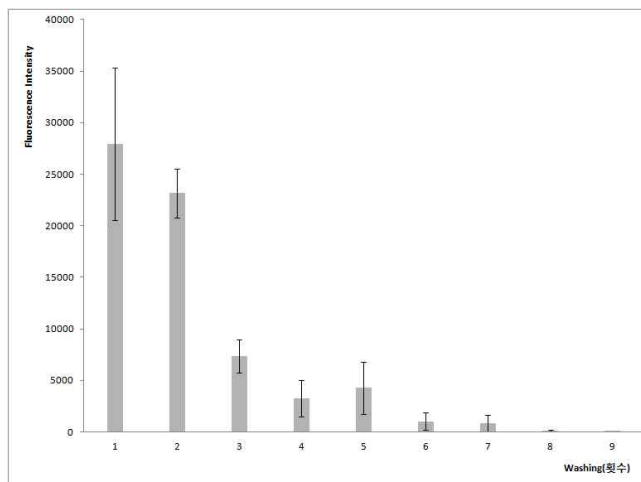
판단되어 이후의 실험에 있어 streptavidin 상에 dsDNA를 구축한 후 membrane에 고정시키는 조건으로 실험하였음

다) Streptavidin으로 구축한 Top-down 방식을 이용한 dsDNA Strip sensor 구축

- ◆ 1차년도에서는 농약 기반 aptamer에 대한 평가가 2세부 위탁기관에 의해 진행되고 있기 때문에 본 기관은 농약과 유사한 특성을 가진 곰팡이독소 aflatoxin B1의 aptamer를 이용하여 dsDNA 기반의 aptamer 기반 스트립 센서를 개발하였음

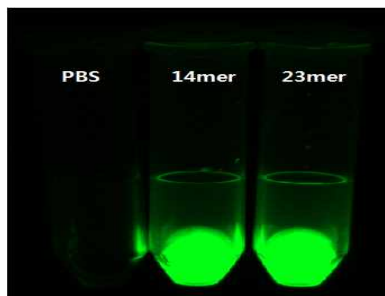
(1) Top-down 방식의 스트립고정용 액상 기반 dsDNA-streptavidin 복합체 개발

- ◆ dsDNA와 streptavidin의 복합체의 경우 복합체가 형성되었을 때 분자량이 최소 52kD 이상을 가지게 됨을 이용하여 Biotin modified aptamer와 streptavidin을 먼저 반응을 시킨 후 Pure biotin을 이용하여 blocking 시키고 상보적인 서열을 가지는 biotin modified DNA를 혼성화 시킨 후 Centri-con을 이용하여 정제를 실시함



[Washing 횟수에 따른 미반응 형광물질량 측정 결과]

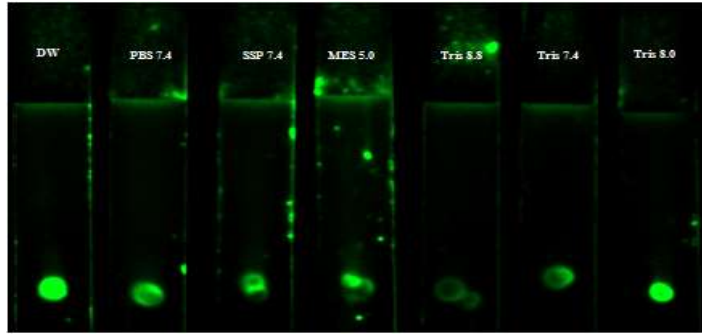
- ◆ dsDNA와 streptavidin의 복합체 합성 후 Centricon으로 계면활성제가 포함된 용액을 이용하여 washing 실시하였을 때, 9회 부터는 더 이상의 형광물질들이 나타나지 않음을 확인하였음
- ◆ dsDNA의 혼성화 길이에 따라 반응물질(AFB1)과 반응성의 차이가 생길 것으로 판단되어 14mer, 23mer를 디자인하여 dsDNA-streptavidin 복합체를 위의 방법으로 합성을 실시함
- ◆ 결과 아래에서와 같이 14mer, 23mer 모두 반응 후 형광이미지로 확인하였을 때 복합체에 남아있는 것을 확인 할 수 있었음



[dsDNA-streptavidin complex 구축 결과 (좌 : PBS, 중 : 14mer complementary DNA, 우: 23mer complementary DNA)]

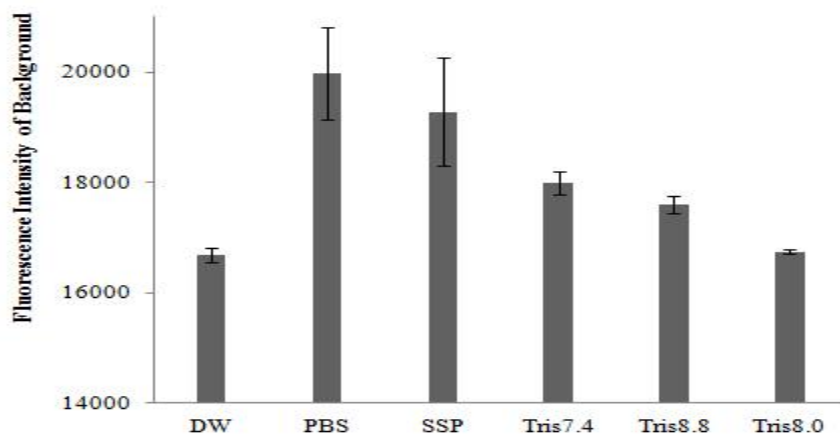
(2) dsDNA-streptavidin의 Strip상 고정 및 최적 buffer 선택

- ◆ 구축된 dsDNA-streptavidin을 표면에 고정화 시키고 고정화된 복합체가 반응용액에 의해 membrane으로부터 탈착되는지에 확인하기 위해 다양한 종류의 buffer를 이용하여 확인하였음, 그 결과 아래에서와 같이 Tris-HCl(ph 8.0)에서는 탈착정도가 거의 보이지 않고 매우 강한 신호를 유지하고 있는 것을 확인하였음
- ◆ 기본적으로 저분자물질의 경우 대부분이 NC membrane에 흡착되는 성질이 있기 때문에 실험의 진행에는 계면활성제를 0.01% SDS를 모두 섞어서 사용하였음



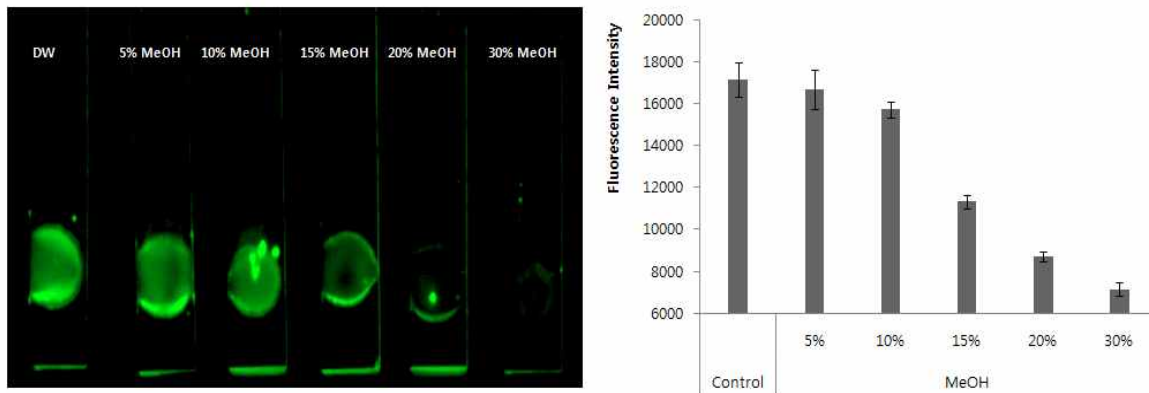
[Buffer에 따른 Membrane에서의 detach정도 확인 결과]

- ◆ 그리고 buffer에 성질에 따라서 strip 상에서 background 즉 noise signal이 생성될 수 있기 때문에 buffer에 따른 형광물질의 membrane 흡착정도를 확인하였음. 아래서 확인 할 수 있듯이 이 결과에서도 Tris-HCl(ph 8.0)의 조건에서 가장 낮은 흡착도를 보임을 확인하여 이를 이용하여 이후 실험을 진행하였음



[NC membrane상 형광 DNA의 흡착정도 확인 결과]

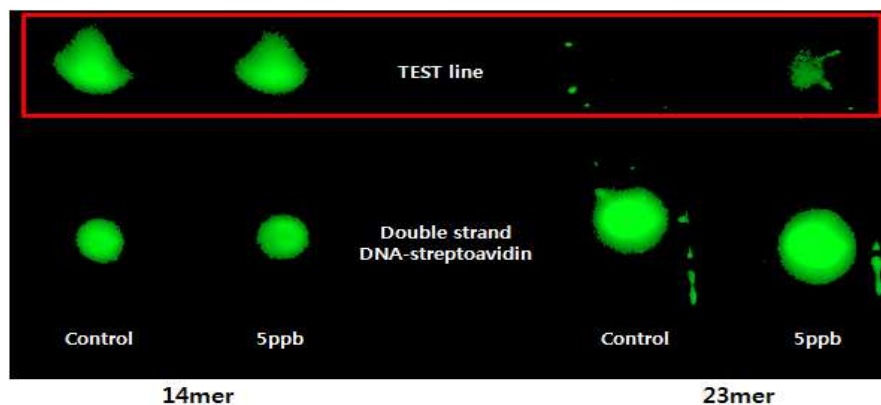
- ◆ 또한, 반응용액에서는 곰팡이독소를 추출하기 위한 methanol이 사용이 되므로 methanol에 의한 탈착율도 같이 확인해보았음. 그 결과 아래에서 확인할 수 있듯이 methanol의 농도가 높아질 수록 dsDNA-streptavidin 복합체가 membrane으로부터 떨어져 나오는 것을 확인 할 수 있었음, 이후 실험에서는 Methanol의 농도를 최종 10%로 고정하여 개발을 진행함



[Methanol에 농도에 따른 dsDNA-streptoavidin의 detach 정도 확인 결과]

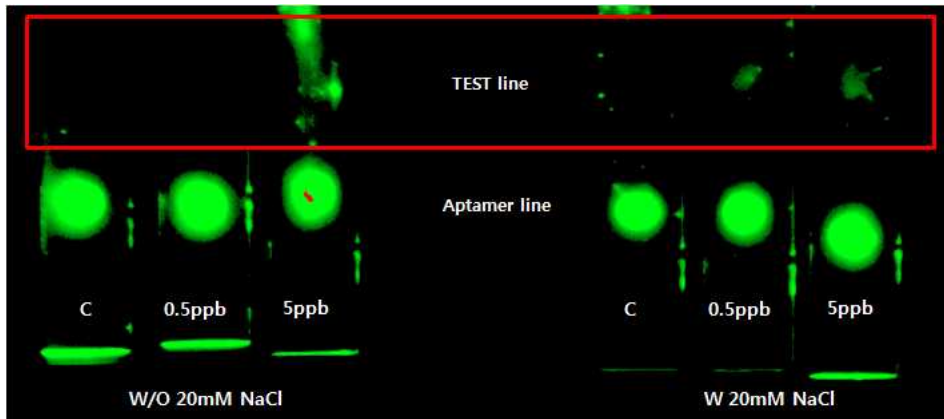
(3) AFB1의 검출을 위한 strip 제작 및 최적 조건 확립

- ◆ dsDNA를 구축할 때 압타머와 상보적인 서열을 가진 DNA는 14mer와 23mer의 길이를 가지는 DNA사용하였고 이를 이용하여 AFB1 검출에 효율적인 길이의 DNA를 확인하였음
- ◆ 아래 그림에서 확인 할 수 있듯이 14mer의 경우에는 0.01 SDS/Tris-HCl(ph 8.0) buffer에서는 경향성이 나타나지 않지만, 23mer의 경우에는 control과 5ppb 수준에서도 차이를 명확하게 확인 할 수 있는 결과를 얻을 수 있었음. 23mer를 이용하여 이후 실험을 진행하였음



[AFB1 검출을 위한 최적 상보적 DNA 길이 확인 결과 (좌:14mer, 우: 23mer)]

- ◆ 그리고, aptamer로부터 떨어진 상보적 biotin DNA가 test line의 streptavidin과 반응이 효율적으로 이루어지게 하기 위해 NaCl을 첨가하여 test를 실시하였음. 결과 20mM의 농도의 NaCl을 사용하였을 때 경향성이 좋은 결과를 얻을 수 있었음

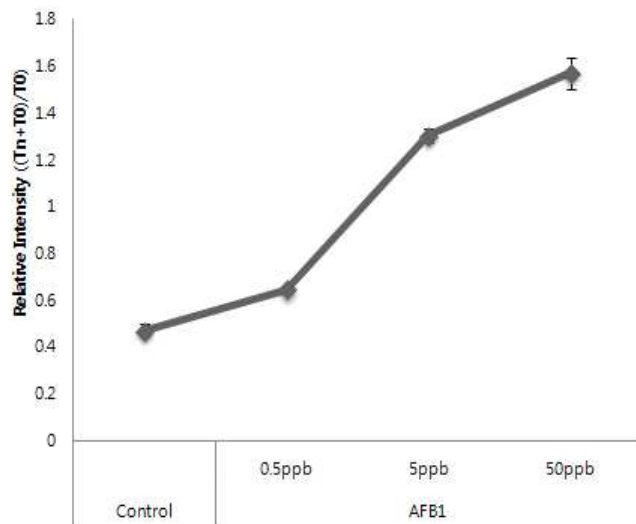
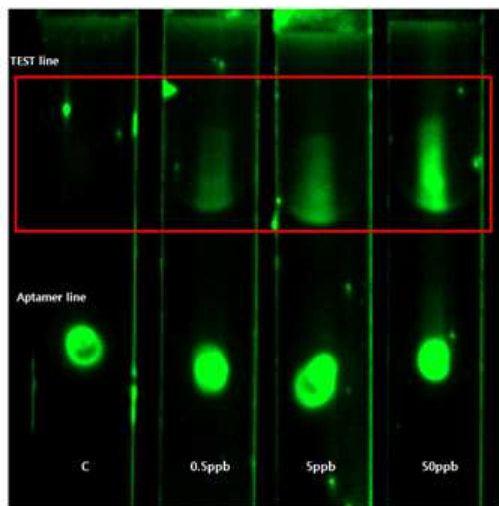


[NaCl의 유무에 따른 반응 경향성 확인 결과]

- ◆ 계면활성제인 SDS에 따라 형광 DNA의 상태가 달라질 수 있기 때문에 확인해보았으나 0.01%가 가장 좋은 결과를 보여주었음

(4) 최적화된 합성 조건 및 반응용액을 이용하여 농도별 검출한계 확인 결과

- ◆ 위에서 확립된 최적 조건을 이용하여 농도별 검출한계를 확인해보았음. 사용 반응 용액의 최종 조건은 5% MeOH, 0.01% SDS, 20 mM NaCl임. 확인 결과 사용 반응용액 상에서 0.5 ppb까지의 검출이 성공적으로 됨을 확인할 수 있었음



[Strip sensor를 이용한 AFB1농도별 검출한계 확인 결과]

2) aptamer 기반 dipstick 개발

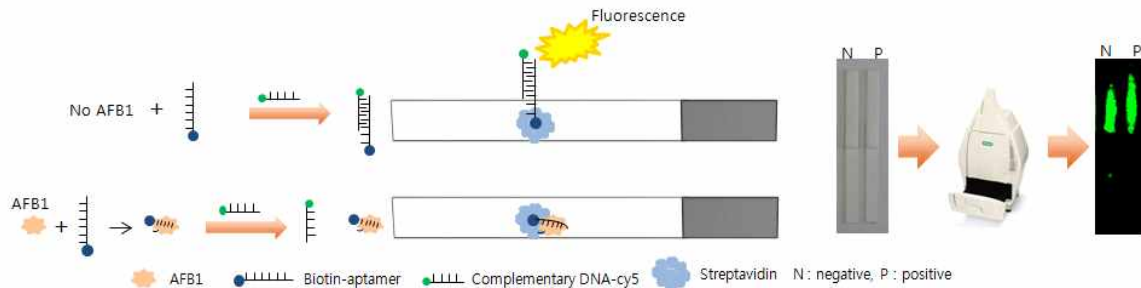
앞서 개발한 스트립 센서 이외에도 액상에서 반응시킨 반응물에 스트립을 담귀 손쉽게 분석할 수 있는 dipstick을 개발하였음

가) aptamer 기반 dipstick 원리 및 디자인

- ◆ 곰팡이독소와 aptamer가 결합을 하도록 먼저 충분히 반응을 시킨 후 형광 물질이 달린

상보DNA를 첨가하면 곰팡이독소와 결합하지 않은 압타머와 상보DNA 사이에 상보적인 결합이 이루어져 double-strand DNA를 형성

- ◆ 반면에 곰팡이독소 충분히 많아 모든 압타머와 반응하면 상보DNA는 압타머와 결합하지 못하고 dipstick 상에 streptavidin과 결합하지 못함
- ◆ 상보DNA가 dipstick 상에 streptavidin과 결합하고 상보 DNA 상의 형광 물질 형광량을 측정하여 곰팡이독소의 존재 여부를 확인

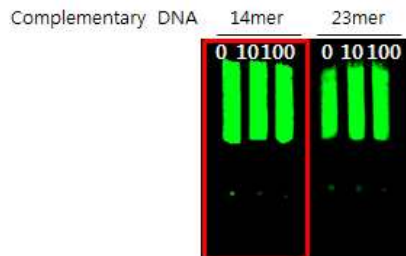


[압타머 기반 dipstick 원리 및 디자인]

나) 압타머 기반 dipstick 최적화

(1) 상보DNA의 길이 선정

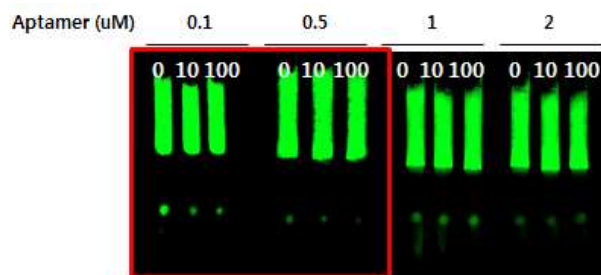
- ◆ 길이가 다른 두 가지의 상보DNA (14mer, 23mer)를 이용하여 실험 수행
- ◆ 두 종류의 상보DNA 모두 형광 정도를 감소시켰으나, 14mer를 이용하였을 때의 차이가 더 크게 나므로 14mer인 상보DNA를 최적의 상보DNA 길이로 선정



[압타머와 상보결합을 하는 상보DNA의 길이 선정]

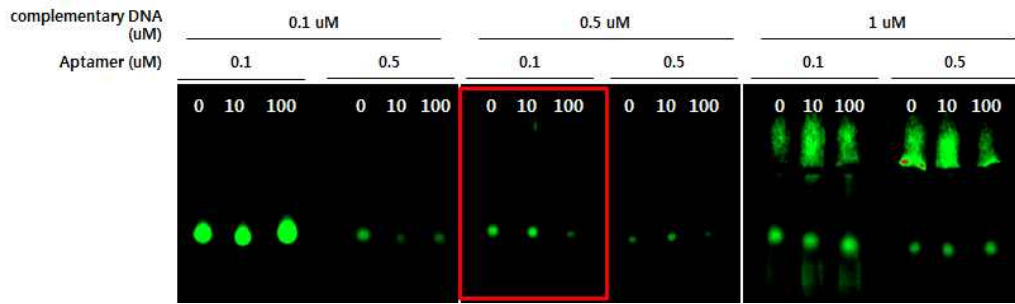
(2) 압타머 및 상보DNA의 농도 선정

- ◆ 0.1, 0.5, 1, 2 uM의 압타머로 실험을 수행하여 최적의 압타머 농도 선정
- ◆ 0.1, 0.5 uM의 압타머를 사용하였을 때의 결과가 좋음



[압타머 농도 선정]

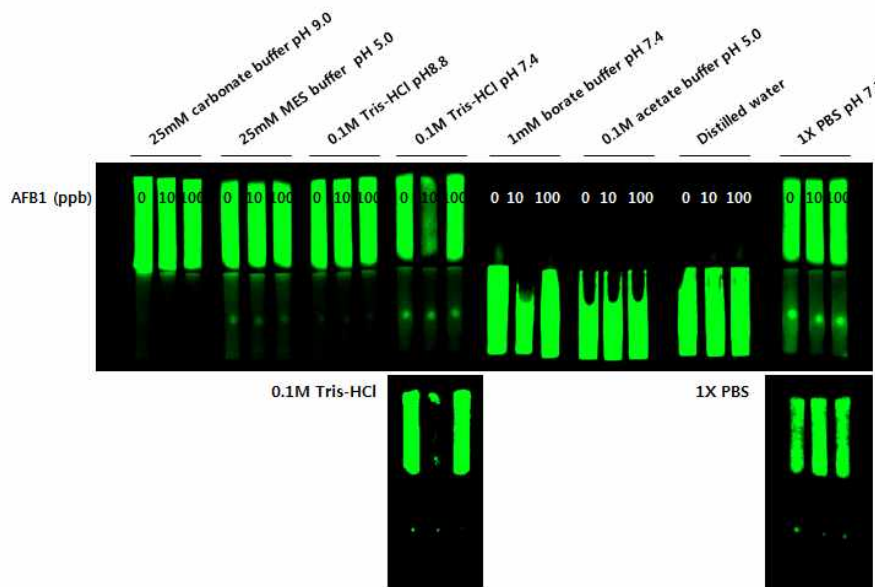
- ◆ 0.1, 0.5 uM의 압타머에 각각 0.1, 0.5, 1 uM의 상보DNA를 반응시켜 실험 수행
- ◆ 0.1 uM의 압타머와 0.5 uM의 상보DNA를 최적의 압타머 및 상보DNA의 농도로 선정



[상보DNA 농도 선정]

(3) 버퍼 조건 선정

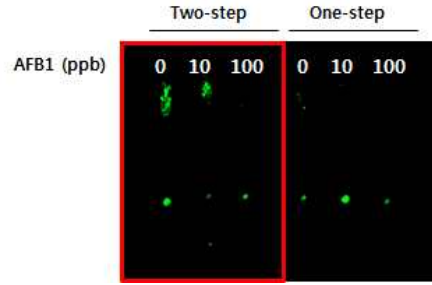
- ◆ 1X PBS와 Tris-HCl이외의 여러 종류의 버퍼 상에서 압타머 기반 스트립 센서의 결과 확인
- ◆ Borate buffer, acetate buffer, distilled water를 버퍼로 이용하였을 때, 흡착이 일어나는 결과를 보임
- ◆ 0.1M Tris-HCl과 1X PBS를 버퍼로 이용하였을 때, AFB1의 농도가 증가함에 따라 형광이 감소하는 경향성을 보임
- ◆ 결과를 토대로 0.1M Tris-HCl을 최적의 버퍼 조건으로 최종 선정



[버퍼별 dipstick에 대한 영향 확인]

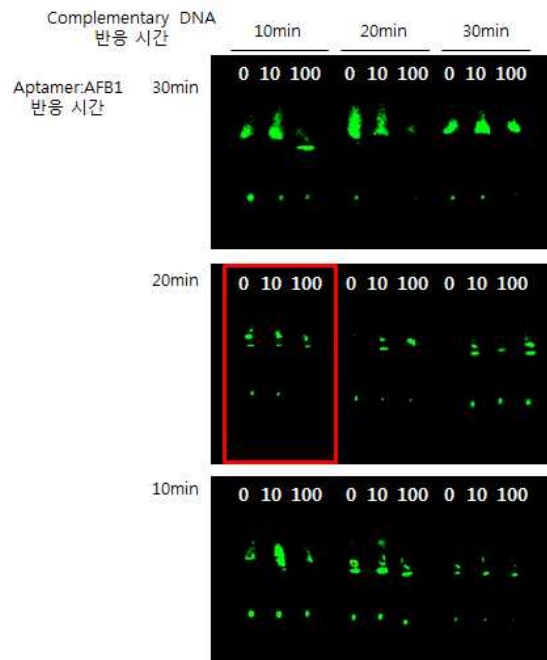
(4) 반응 조건 및 반응 시간 선정

- ◆ 현재까지의 방법대로 2회에 나누어 AFB1과 압타머를 반응시킨 후, 상보DNA를 넣어주는 방법(two-step)과 AFB1, 압타머, 상보DNA를 한 번에 반응시키는 방법(one-step)을 비교하여 실험 수행
- ◆ 2회에 나누어 반응을 시켰을 때의 결과가 더 안정적으로 감소하는 것을 확인
- ◆ 반응 조건은 한 번에 반응시키는 것보다는 2회에 나누는 방법을 최적화 조건으로 선정



[압타머와 상보DNA의 반응단계별 dipstick의 영향 확인]

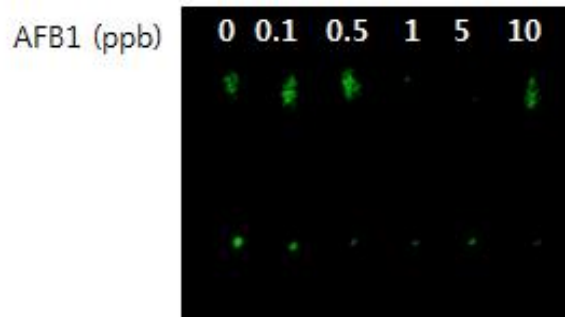
- ◆ 최적의 반응 시간을 선정하기 위하여 압타머와 AFB1의 반응 시간과 상보DNA의 반응 시간을 조절하여 실험 수행
- ◆ 압타머와 AFB1을 20분 동안 반응시킨 후, 상보DNA를 10분 동안 반응시켰을 때, AFB1의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 형광 정도가 감소하는 경향을 보임



[압타머-타겟, 압타머-상보DNA 반응시간 별 영향 확인]

(5) 최적화된 압타머 기반 스트립의 검출한계 확인

- ◆ 최적화된 압타머 기반 스트립의 검출 한계 확인은 위하여 저농도인 0.1ppb부터 시작하여 0.5, 1, 5, 10, 100ppb의 AFB1의 농도에 따른 형광 정도의 변화를 확인
- ◆ 0.1 ppb의 AFB1을 넣어주었을 때에도 0 ppb와 차이가 보임
- ◆ 최적화된 압타머 기반 스트립은 0.1 ppb의 저농도까지도 검출할 수 있음



[압타머 기반 dipstick의 검출한계 확인]

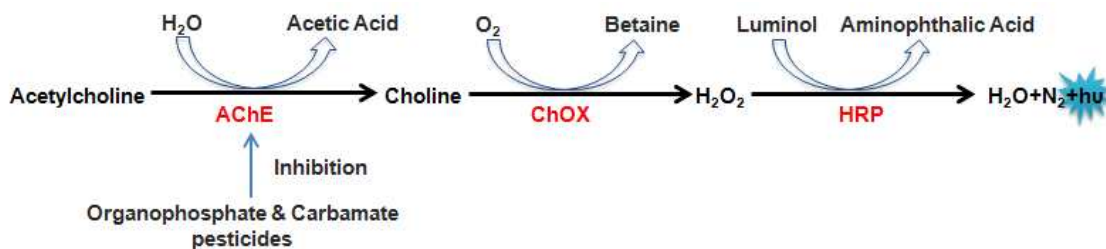
나. 효소반응 기반 단일 잔류농약 검출 스트립 센서 개발

-효소반응을 기반으로 하는 잔류농약 검출 스트립 센서를 개발하기 위해 유기인계 농약이 acetylcholinesterase(AChE)의 활성을 저해하는 원리를 이용하여 chemiluminescence 원리와 colorimetric 방법으로 수행하였다.

1) 잔류농약 검출을 위한 효소기반 chemiluminescence 스트립 센서 개발

가) Chemiluminescence 분석법 원리

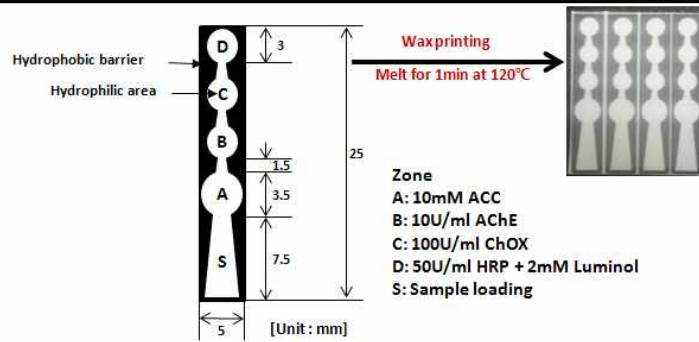
- ◆ 아세틸콜린이 AChE에 의한 acetic acid와 choline으로 분해되고 choline은 choline oxidase(ChOX)에 의해서 Betaine과 H₂O₂로 분해됨
- ◆ 생성된 H₂O₂의 존재하에서 horse radish peroxidase(HRP)이 기질인 luminol과 반응하여 화학발광반응(chemiluminescence; CL)을 일으킴
- ◆ 농약의 표준물질이나 시료는 10% methanol in carbonate (pH 9.0)버퍼를 사용하였음



[Chemiluminescence 스트립 센서 원리]

나) Chemiluminescence 분석법 디자인

- ◆ 나이트로셀룰로스 멤브레인을 파라핀으로 아래와 같이 4개의 hole로 구성된 스트립으로 디자인하였음
- ◆ 각각의 홀에 아세틸콜린(hole A), AChE(hole B), ChoX(hole C), luminol과 HRP(hole D)을 처리하여 스트립을 구성하였음



[Chemiluminescence 스트립 센서의 디자인]

다) 각 시약의 최적화 조건 확립

(1) 각 효소별 농도 최적화

- 화학적 발광을 위한 스트립센서에 사용되는 3가지 효소농도 최적화와 버퍼의 선정을 실시하였음
- 효소는 AChE(0.1, 1, 10 U/ml), ChoX (25, 50, 100 U/ml), 그리고 HRP (25, 50, 100 U/ml)로 처리하여 스트립상에 CL을 발생할 수 있는 최소의 양을 선정한 결과, AChE는 10 U/ml, ChoX 100 U/ml, 그리고 HRP 50 U/ml로 선정함
- 기질로 사용되는 luminol의 경우는 알칼리영역에서 반응성이 좋기 때문에 버퍼를 carbonate 버퍼(pH 9.0)과 Tris-HCl버퍼(pH 8.8)로 테스트한 결과 carbonate버퍼가 CL의 발생에 더 효과적인 것을 판단되어 이를 이후의 실험에 사용하였음

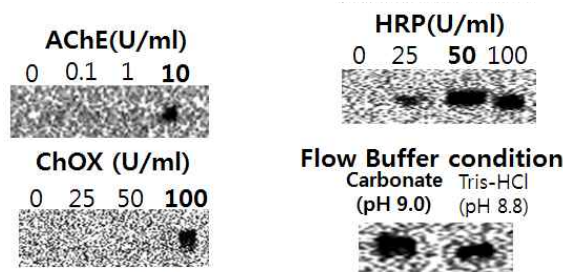
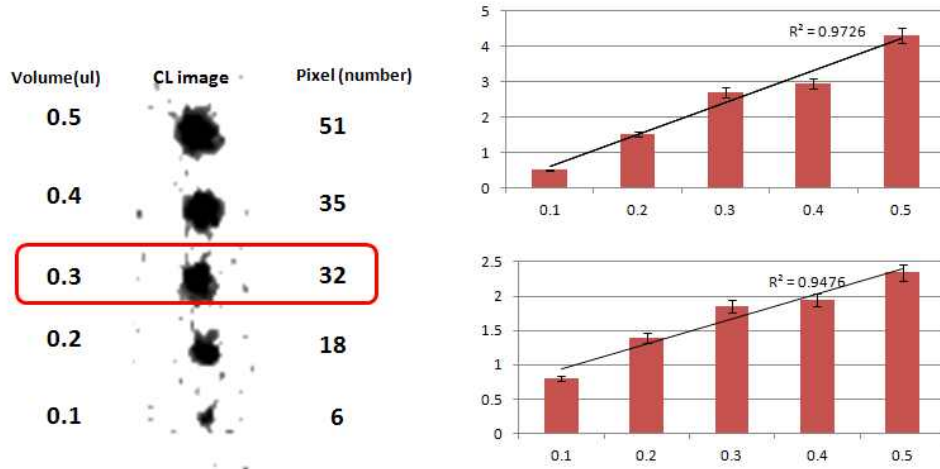


그림 25. 스트립 개발을 위한 효소농도 및 버퍼 선정결과

(2) HRP 최적 적하량 선정

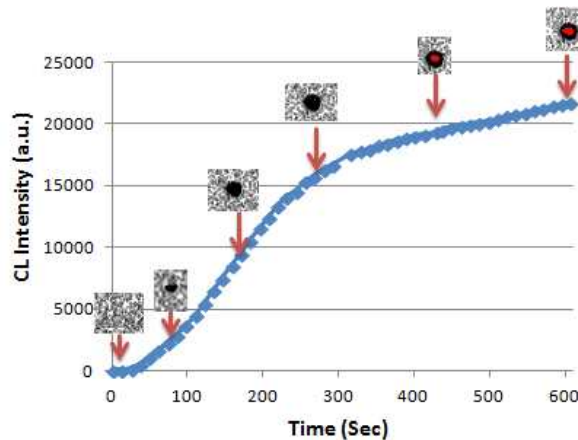
- 50 U/ml 농도의 HRP 용액의 적하량을 0.5 (0.5 μ g), 0.4(0.4 μ g), 0.3(0.3 μ g), 0.2(0.2 μ g), 그리고 0.1(0.1 μ g) μ l 점적하여 건조 후 최적 적하량 확인 결과 0.3 μ l(0.3 μ g) 첨가하여도 스트립을 구현하는데 문제가 없는 것으로 판단됨



[스트립 구현을 위한 HRP 최소량 측정결과]

(3) 시료 적용 후 반응시간 결정

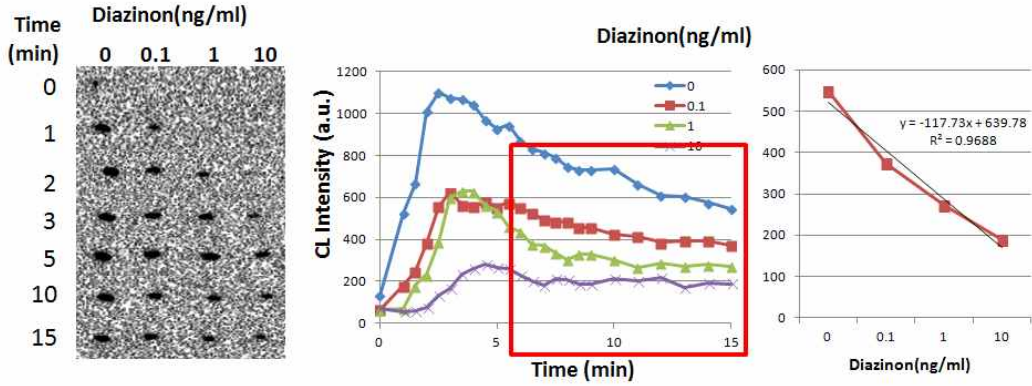
- ◆ 스트립 상에 발생하는 chemiluminescence을 측정장비(Geldoc)로 CL 값을 노출시간에 따라 측정한 결과 표준액을 떨어뜨린 후 5분동안 노출시켰을 때 최대 CL값을 나타냈었음
- ◆ 그 이후로 노출시간을 늘려도 CL값의 증가는 급격하게 이루어지지 않는 것으로 확인되어, 결과를 측정하는 시간은 5분이 적당한 것으로 판단됨



[반응시간 경과에 따른 CL 값의 변화 측정]

(4) 농약 첨가 후 반응시간에 따른 영향 확인

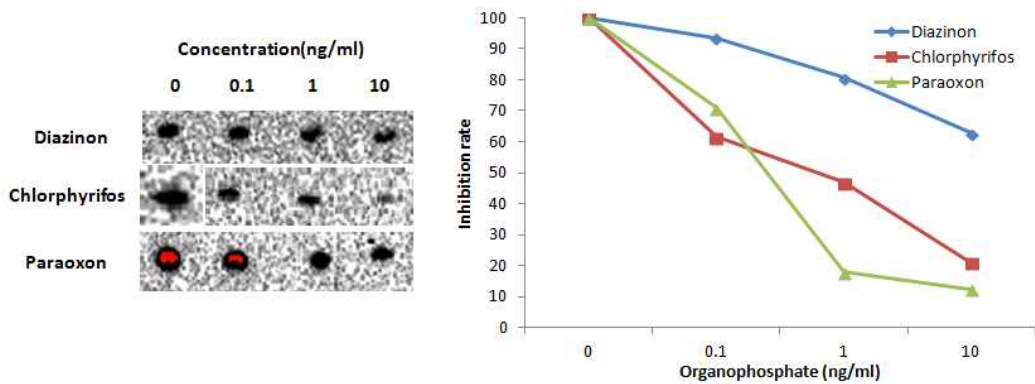
- ◆ 유기인계 농약의 존재하에서 AChE의 활성이 저하되어 CL의 발생이 저해되는 원리이지만 시간의 경과에 따른 비특이적인 CL의 발생이 야기됨
- ◆ 그러므로 시료 첨가 후 CL 측정하는 시간을 선정하는 것이 필요하므로 각 농도의 농약 표준물질(diazinon) 첨가 후 15분 동안 CL값을 측정한 결과 6분 이후부터 농약 농도가 증가함에 따라 CL 값이 줄어드는 것을 확인할 수 있었음
- ◆ 15분까지도 농도별 CL 값의 차이가 있었으나, 결과를 측정하는 시간을 10분으로 선정하였음



[농도별 농약의 첨가 후 CL 측정에 있어 최적 시간 확인]

(5) 농약 3종에 대한 검출한계 측정

- 유기인계 농약 3종(diazinon, chlorphyrifos, 그리고 paraoxon)에 대한 각 농도 표준용액을 준비한 후 스트립에 적용한 후 10분에 결과를 측정하여 검출한계를 측정한 결과, 3종의 유기인계 농약 모두 0,1 ng/ml까지 측정이 가능한 것으로 확인되었음



[농약 3종에 대한 효소기반 chemiluminescence 스트립 센서의 검출한계 확인]

2) 잔류농약 검출을 위한 효소기반 colorimetric 스트립센서 개발

가) Colorimetric 스트립 센서 디자인

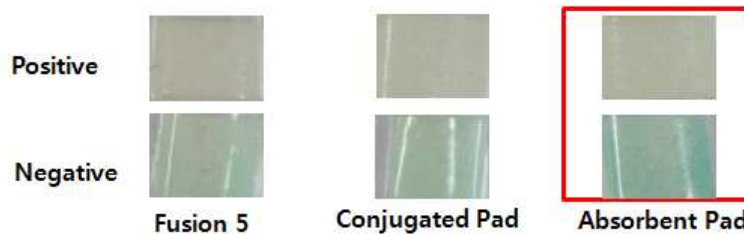
- 개발한 화학발광 스트립센서의 경우는 민감도는 높으나 측정기기가 요구되는 문제점이 있음
- 그러므로, 연구계획서에 제시한 것에 추가로 발색의 정도를 눈으로 측정할 수 있는 colorimetric 스트립 센서를 개발하였음
- 현재 특허 출원을 준비 중에 있기 때문에 실험원리 및 사용시약에 대한 언급을 본 보고서에서는 않음
- 아래 그림에서 보는바와 같이 colorimetric 스트립 센서의 구조는 membrane과 pad 두 부분으로 구성시켰음
- 농약의 표준물질이나 시료의 준비는 10% Methanol을 선택하였음
- 스트립 센서에 처리된 pad 부분에 발생하는 색의 정도로 유기인계 농약의 농도를 측정하도록=디자인하였음 (예: 음성 = 파란색, 양성 = 무색)



[Colorimetric 스트립 센서의 디자인]

나) Pad 선정

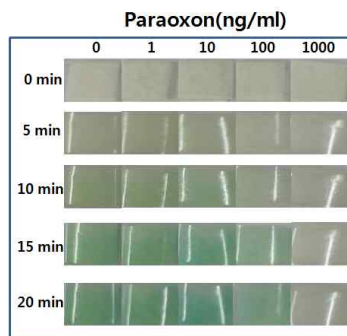
- ◆ 발색이 최종 이루어지는 pad의 종류에 따른 발색정도의 영향을 확인하기 위해 시판하고 있는 pad Fusion 5(Whatman), Conjugate와 Absorbent pad(Milipore) 총3종을 선정하여 테스트하였음
- ◆ 아래 결과에서 보는바와 같이 Milipore 사에 판매하는 absorbent pad로 스트립센서를 제작하였을 때 농약의 양성과 음성시료의 색 구분이 가장 뚜렷하였음



[Colorimetric 스트립 센서 개발을 위한 pad 선정]

다) Colorimetric 스트립 센서 검출한계 측정

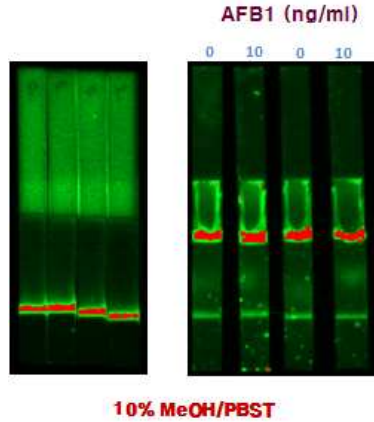
- ◆ 유기인계 농약 paraoxon 농도별 표준물질 (0, 1, 10, 100, 1000 ng/ml)을 colorimetric 스트립 센서에 적용 후 분석에 소요되는 최적의 시간을 결정하였음
- ◆ 아래 그림에서 나타나 바와같이 농약 적용 5분 후부터 0 ng/ml 농도에서 발색이 일으켰으나 농도에 따른 차를 확인할 수 없었음
- ◆ 10분과 20분의 결과에서는 농약의 농도가 증가할수록 pad에 발색 정도가 저해되는 것이 확인되었음
- ◆ 10분 정도의 발색정도는 15분과 20분 반응시킨 발색정도보다 약한 것으로 판단되어, 시료 적용 후 15분 후 측정하는 것이 적당한 것으로 판단됨



[Paraoxon에 대한 colorimetric 스트립 센서 검출한계 측정]

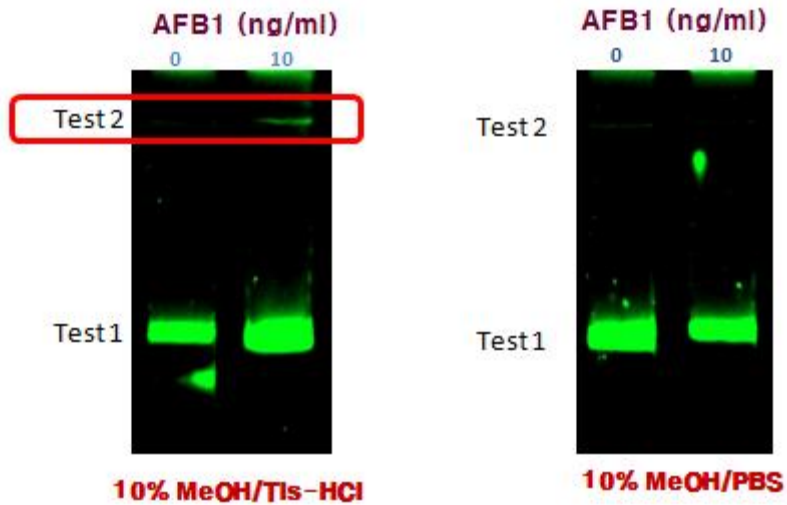
다. 스트립상 농약의 유동성 최적화

- ◆ 일반적으로 스트립 상에 인지인자의 유동성 향상을 위해 사용하는 Tween 20으로 인해 Dual DNA의 결합이 끊어지는 것으로 판단됨



[계면활성제(Tween 20)에 의한 dsDNA 붕괴 확인]

- ◆ 아래의 결과에서 알 수 있듯이 Tween 20이 들어 있지 않은 버퍼 조건에서는 Dual DNA의 결합이 끊어지지 않고 유지됨
- ◆ 10% MeOH/Tris-HCl (pH 8.0)가 좋은 것으로 판단됨
- ◆ 그러나 PBS상에서는 곰팡이독소가 멤브레인상에서 이동하지 못하는 것으로 판단됨(test 2 상에 형광이 나타나지 않음)



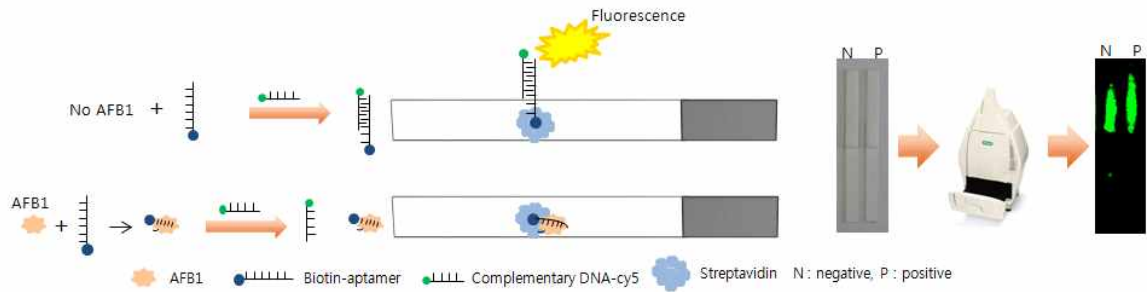
[버퍼에 따른 곰팡이독소의 멤브레인상 이동성 확인]

- ◆ 곰팡이독소의 경우 농약과 같은 화학물질로 멤브레인상에서 이동하는 특성이 유사할 것으로 판단되며, 1차년도 연구결과를 토대로 농약의 멤브레인상의 유동성 확인과 향상이 손쉽게 이루어질 것으로 판단됨

[2 차년도 연구수행 결과]

가. 개발된 4종의 농약 압타머를 이용한 각각의 스트립센서 구현

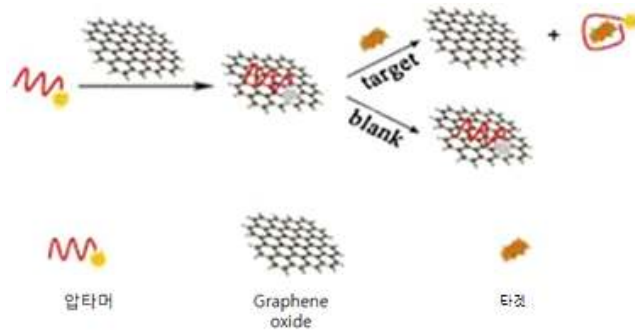
1) Double strand 기반 압타머를 이용한 농약 스트립센서 구현



[압타머 기반 dip-stick 원리 및 디자인]

(가) 개발된 40종의 압타머 중 시스템 구현을 위한 최적 서열 확보 실시

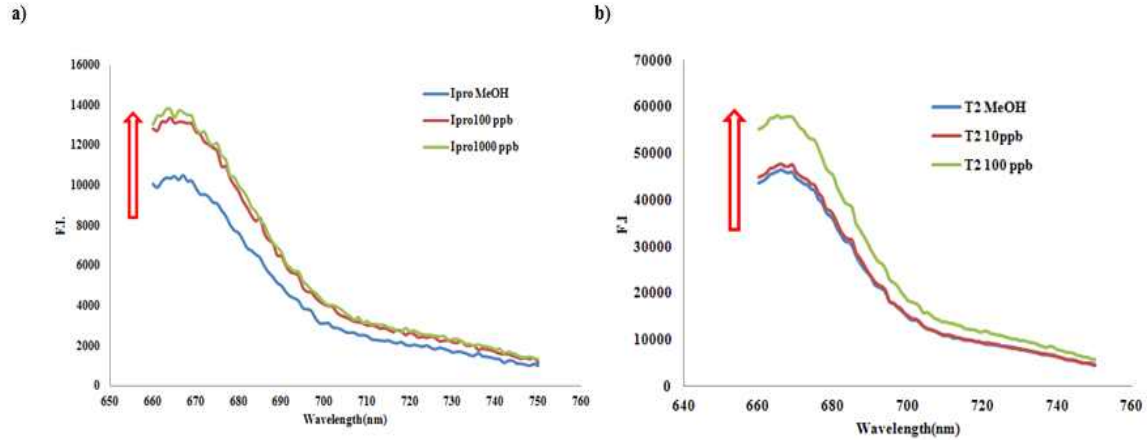
- 1세부 위탁기관에서 발굴한 4종의 농약에 대한 압타머 서열 20종을 대상으로 graphene oxide의 표면에 형광물질이 붙은 DNA 압타머를 고정 한 후 타겟 물질에 따라 graphene oxide의 표면에 해리된 cy5 압타머를 이용하여 형광신호의 수복정도를 확인하여 최적 압타머를 선정 실시



[압타머 반응성 확인을 위해 사용된 측정방법 원리]

[농약 4종에 대한 압타머 염기서열]

Pesticide	Aptamer name	Sequence (5' → 3')
Iprobenfos	Ipro0	CGTACGGAATTCGCTAGCTAAGGGATTCCTGTAGAAAGGAGCAGTCTGGATCCGAGCTCCACGTG
	Ipro1	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGGGGCCCTGGGGCGGGCCCGATGGGATCCGAGCTCCACGTG
	Ipro2	CGTACGGAATTCGCTAGCTAAGGGATTCCTGTAGAAAGGAGCAGTCTGGATCCGAGCTCCACGTG
	Ipro3	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGATCCGAGCTCCACGTG
	Ipro5	CGTACGGAATTCGCTAGCGCGGGCCGTTTACCGTCTGACTGCGCCGGGATCCGAGCTCCACGT
	Ipro6	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGCCAGTGTCCGTATATGTAGGTGCGCATCTACGATGGATCCGAGCTCCA
	Ipro9	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGCGGGGTGCTGGGGGAATGGAGTGTGCTGCTGCGGGATCCGAGCTCCA
	Ipro16	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGGATCCGAGCTCCACGTG
	Tebuconazole	T1
T3		CGTACGGAATTCGCTAGCACGTTGACGCTGGTGCCCGGTTGTGGTGGAGTGTGTGTGGATCCGAGCTCCA
T4		CGTACGGAATTCGCTAGCACGTTGACGCTGGTGCCCGGTTGTGGTGGAGTGTGTGTGGATCCGAGCTCCACGTG
T10		CGTACGGAATTCGCTAGCGAGTCATGTACCGTCCCTGTGGATCCGAGCTCCACGTG
Tn1		CGTACGGAATTCGCTAGCACGTTGACGCTGGTGCCCGGTTGTGGGCGAGTGTGTGTGGATCCGAGCTCCACGTG
Tn3		CGTACGGAATTCGCTAGCGTGTCAATAATGGTCTCTGGGATCCGAGCTCCACGTG
T2		CACGTGGAGCTCGGATCCACGCGCAGTGGGACCAACCCAAGCCGTGGCTGCCGGGGGCTAGCGAATTCGGT
Tc3	ACG	
Inabenfide	i11	CGTACGGAATTCGCTAGCACGTTGACGCTGGTGCCCGGTTTGGTGGAGTGTGTGTGGATCCGAGCTCCACGTG
	i13	CGTACGGAATTCGCTAGCACGTTGACGCTGGTGCCCGGTTGTGGTGGAGTGTGTGTGGATCCGAGCTCCACGTG
	I18	CGTACGGAATTCGCTAGCACGTTGACGCTGGTGCCCGGTTGTGGTGGAGTGTGTGTGGATCCGAGCTCCA
		CGT
Mefenacet	MBA	CGTACGGAATTCGCTAGCCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTTGGTCCCACATGCGGTTGGATCCGAGCTCCACGTG

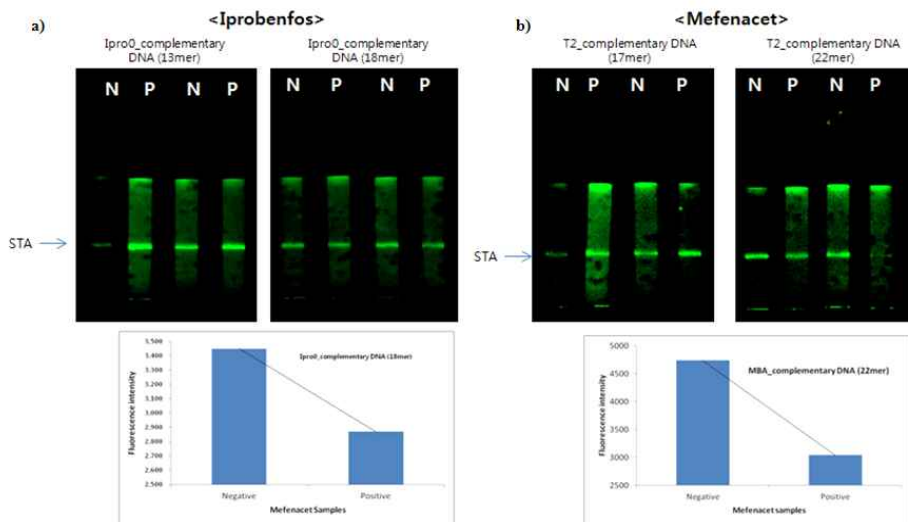


[Iprobenfos를 이용한 Ipro0 압타머가 고정된 Graphene oxide에 의해 해리정도에 따른 형광신호 확인 결과(a), Mefenacet을 이용하여 T2 압타머가 고정된 Graphene oxide에 의한 시료의 농도에 의한 해리정도에 따른 형광 신호 확인 결과(b)]

- ◆ M과 T1: Mefenacet., T2: Mefenacet, Inabenfide, Tubecunazole, T3: Inabenfide, Tubecunzole, Ipro0: Iprobenfos에 각각 Specific 하게 결합하는 특성을 확인함.
- ◆ 각각을 이용하여 이후 농도별 경향성 및 검출한계 확인 실시함

(나) 최적 길이의 Double strand DNA pair 확립

- ◆ 위의 그림처럼 Double strand DNA 포맷에서는 biotin이 고정되어 있는 상보적인 서열의 길이가 결합력을 결정하는 중요한 요소 중 하나임
- ◆ 본 연구진은 1세부위탁기관에서에서 개발된 압타머 서열인 T2, Ipro0를 이용하여 최적의 상보적인 서열의 길이를 확인함, T2 서열의 경우 3개의 농약 물질에 특이적 반응성을 동시에 가지고 있음. 실험에 사용한 농약은 Mefenacet으로 선택함

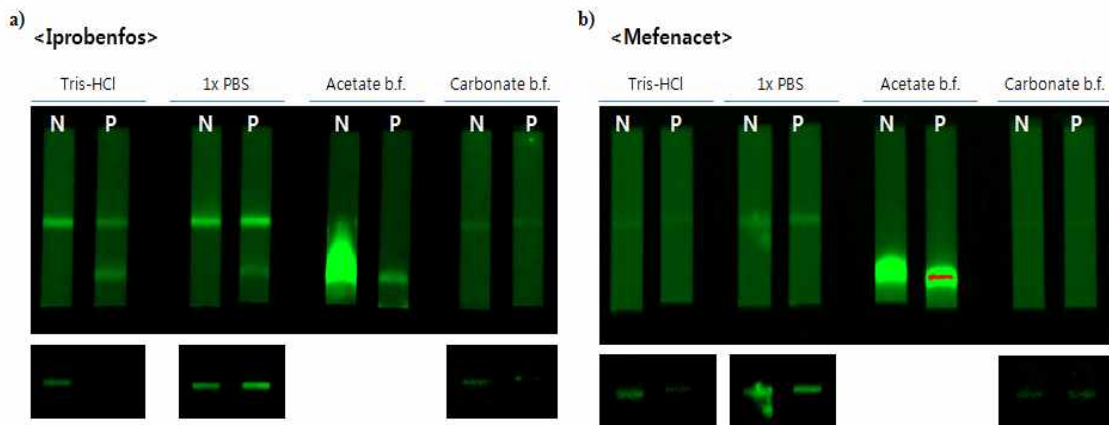


[Ipro0 압타머를 이용한 Iprobenfos 측정을 위한 최적의 상보적 서열 확인 결과(a), T2 압타머를 이용해 Mefenacet의 측정을 위한 최적의 상보적 서열 확인 결과 (b)]

- ◆ Ipro0와 T2 압타머를 이용하여 디자인한 상보적인 서열을 이용하여 확인한 결과, Iprobenfos를 검출하기 위한 최적의 상보적 서열의 길이는 18mer임을 확인 할 수 있었고, mefenacet을 검출 할 수 있는 T2 압타머의 상보적인 서열은 22mer의 길이를 가져야 함을 확인할 수 있었음
- ◆ 이후 농도별 확인 실험에는 위에 결정된 상보적인 길이를 가진 double strand(ds) DNA 플랫폼의 dipstick assay를 진행함

(다) Universal buffer의 최적화

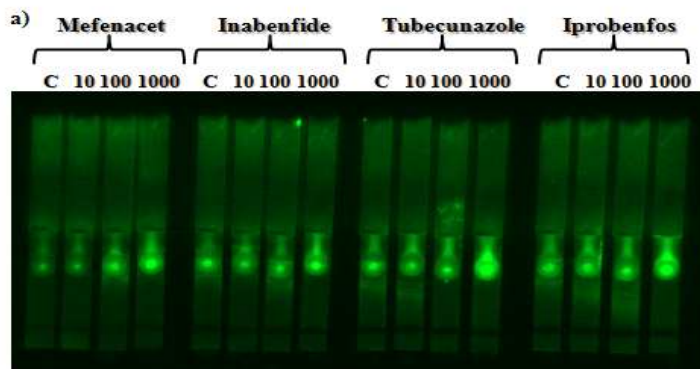
- ◆ 동시에 다종의 농약을 압타머 기반으로 분석하기 위해서는 동일한 조건에서 다종의 압타머의 반응이 일어나는 조건을 확립하기 위해 반응 buffer의 최적화를 실시함
- ◆ 아래 그림에서 확인 할 수 있듯이 개발된 농약의 압타머들을 이용한 ds DNA기반 스트립상에서 최적의 조건은 Tris-HCl (pH 7.4)임을 확인함.

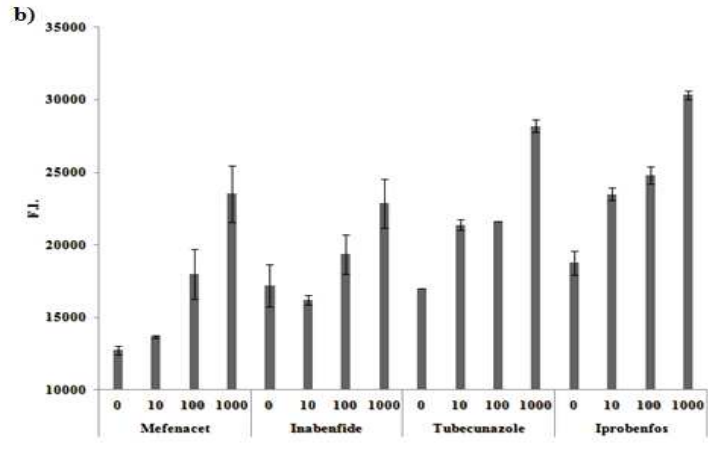


[Buffer에 따른 ds DNA기반 시스템 작동여부 확인]

- ◆ M농도별 확인 실험에서도 Tris-HCl 7.4를 이용하여 진행함.

(라) 개발된 농도별 농약의 스트립센서의 검출 한계 확인

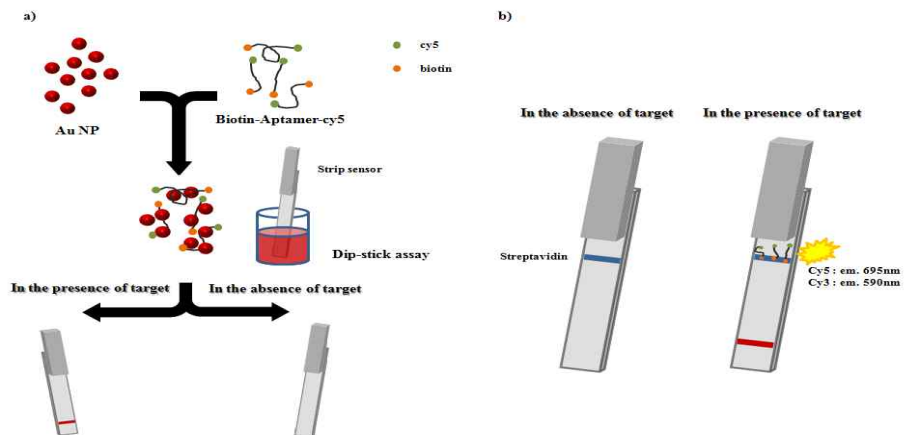




[ds DNA system을 이용하여 농약 농도별 assay 확인 결과(a), 데이터 분석결과(b)]

- 위의 결과에서 확인할 수 있듯이 개발되어진 4종 농약을 타겟으로 하는 aptamer를 이용한 농도별 검출 결과 Mefenacet, Tubecunazole, Iprobenfos의 경우에는 일반적인 농약 검출 규제치인 100ppb 이하인 10ppb도 성공적으로 분석해냄을 확인할 수 있었으나, Inabenfide경우는 검출 규제치인 100ppb 정도까지만 분석이 되는 것을 확인하였음.

2) Single strand 기반의 금나노입자 및 형광을 이용한 스트립센서 구현



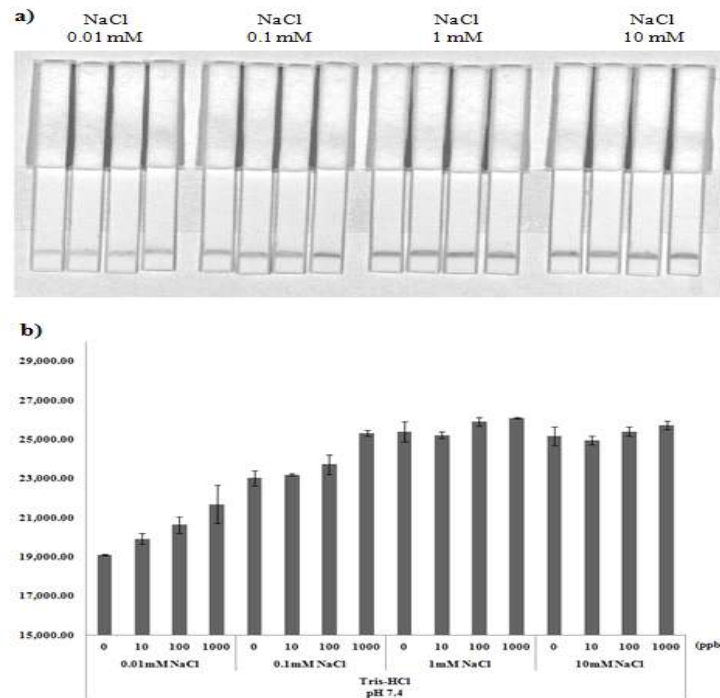
[금나노입자와 형광 DNA를 이용한 single strand (ss) DNA 농약 검출 스트립 모식도]

- 1차년도 지적사항인 금나노입자를 사용한 연구결과의 미진함에 대해 본 연구진은 스트립상에서의 금나노입자 표면에 흡착시킨 aptamer를 이용한 직접적인 센싱 방법을 진행함을 통해 금나노입자의 영김으로 생기는 발색 현상을 통한 측정을 진행함
- 위의 그림은 본 연구진이 single strand aptamer와 금나노입자를 이용한 새로운 방법에 대한 모식도임

(가) 최적 buffer 선정

- 시스템의 구현을 위해 모델 스터디를 OTA aptamer를 이용하여 실시함
- Buffer는 기존의 ds DNA 시스템에서 사용한 Tris-HCl pH7.4를 이용하였고 금나노입자의 영김현상을 유도하기 위해서는 염의 농도가 매우 중요하기 때문에 염농도(NaCl)의 농도를 다양하게 조절하여 실험을 진행함

- OTA 압타머를 금나노입자에 붙이고 여기에 OTA 곰팡이 독소를 이용하여 금나노입자의 영김현상으로 생기는 신호의 결과와 형광신호의 결과를 확인함

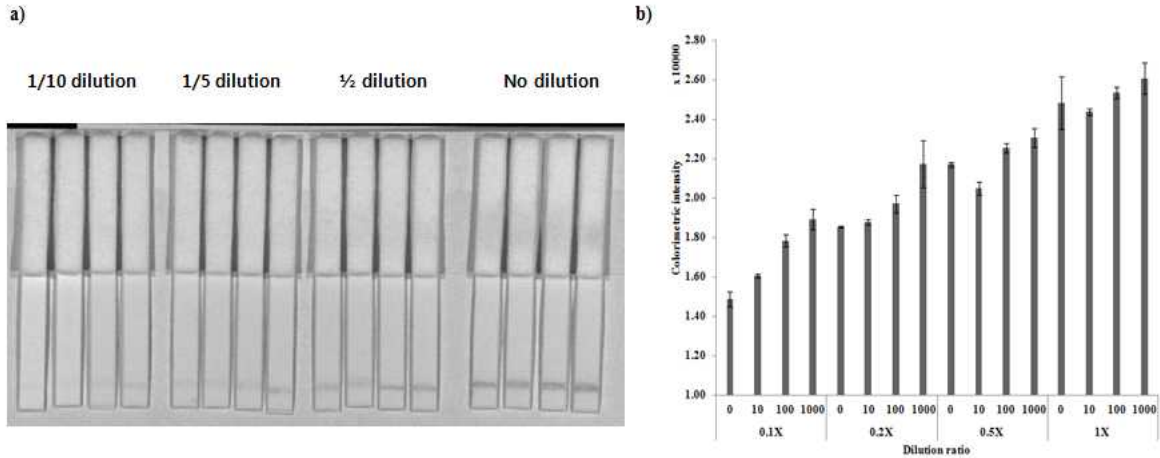


[나노입자의 영김현상에 의한 OTA 농도별 및 염농도별 경향성 확인 결과(a), 이미지 분석장비(Chemi Doc)를 통해 금나노입자의 영김정도를 확인한 결과(b), n=3]

- 위의 결과에서 확인 할 수 있듯이 가장 고농도인 1000ppb에서의 결과는 control대비하여 다 높게 나오는 것을 확인 할 수 있었음. 하지만 높은 농도의 염이 있는 경우에는 경향성을 확인할 수 없었음
- a), b) 결과에서도 확인 할 수 있듯이 최적의 NaCl의 농도는 0.01mM에서 가장 좋은 경향성을 나타내는 것을 보임
- 최적의 buffer 조건은 Tris-HCl pH 7.4, 0.01mM NaCl로 결정함.

(나) 최적 DNA/Au nanoparticle 농도

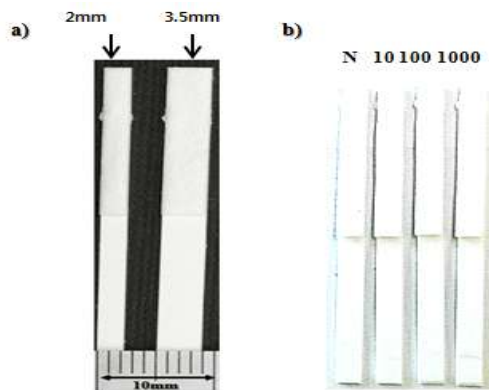
- Control test에서 금나노입자의 영김현상에 의한 발색 정도를 낮추기 위해서 금나노입자 및 압타머의 농도를 낮추어 실험을 진행함
- 그 결과 아래 그림에서 보이는 것처럼 금나노입자의 결과를 확인한 결과 1/10으로 dilution 된 결과에서 가장 좋은 선형적인 결과를 나타냄을 확인할 수 있었음



[금나노입자와 ssDNA의 최적 농도 확인 결과]

(다) 스트립 시스템의 최적화

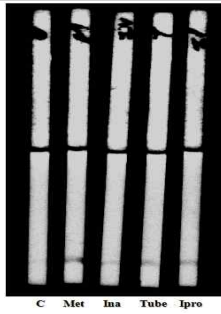
- ◆ Negative 시료 적용 시 금나노 입자의 엉킴에 의한 발색은 나타나지 않는 조건은 찾았지만 Positive 시료에서 보다 확실한 금나노 입자의 엉킴으로 인한 발색정도를 확인하기 위해서 스트립의 좌우 폭을 줄여 실험을 진행함. 아래 그림에서 확인 할 수 있듯이 기존에 사용한 스트립의 좌우 폭은 3.5mm였고 줄인 스트립의 좌우 폭은 2mm임
- ◆ 스트립의 폭이 줄어들수록 위 부분에 위치한 absorbance pad의 흡수되는 속도가 증가함으로 스트립 내 유속이 빠르게 되어 negative 시료를 적용하는 경우 아래 그림에서 확인 할 수 있듯이 금나노입자의 엉킴현상이 줄어들음을 확인할 수 있었음



[스트립 너비(2, 3.5mm)별 금나노입자의 엉킴현상 확인 결과, 단위 ppb]

(라) 농약 압타머를 이용한 금나노입자 엉킴을 이용한 발색검출 기술 개발

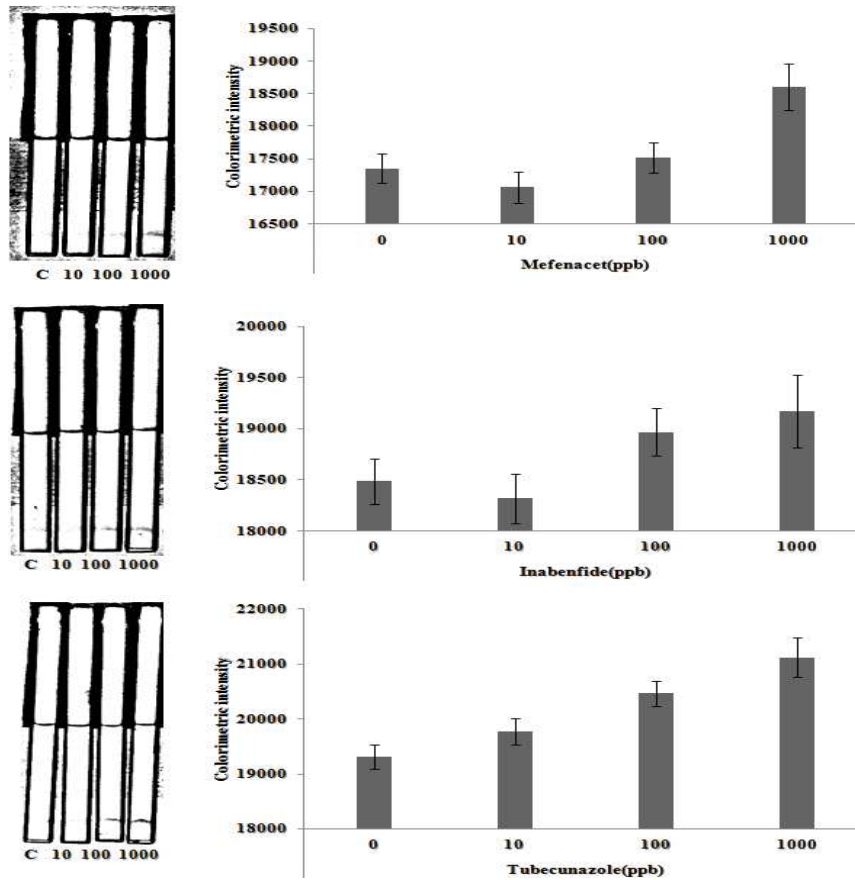
- ◆ OTA 압타머를 이용하여 개발한 금나노입자 엉킴 발색기술을 이용하여 검출하고자 하는 농약의 검출 실시
- ◆ Control시료는 일반적으로 농약을 용출하기 위해 사용하는 100% methanol을 처리해주었고, test 시료는 각각의 압타머에 해당 농약 100ppb씩을 각각 적용하여 확인하였음
- ◆ 그 결과 아래서 확인 할 수 있듯이 4개 농약에 대해 ssDNA aptamer와 금나노입자의 엉킴현상을 이용하여 성공적으로 농약 검출 규제치인 100ppb의 농도를 측정할 수 있음을 확인하였음



[금나노입자의 영김현상을 통한 농약의 검출확인]

(마) ssDNA 압타머와 금나노입자영김현상을 이용한 농약의 농도별 검출 실험 실시

- ◆ 농약의 정성성은 확인할 수 있었으며, 이를 이용하여 정량적 검출을 확인하기 위해서 3종의 농약의 농도별로 실험을 실시 함



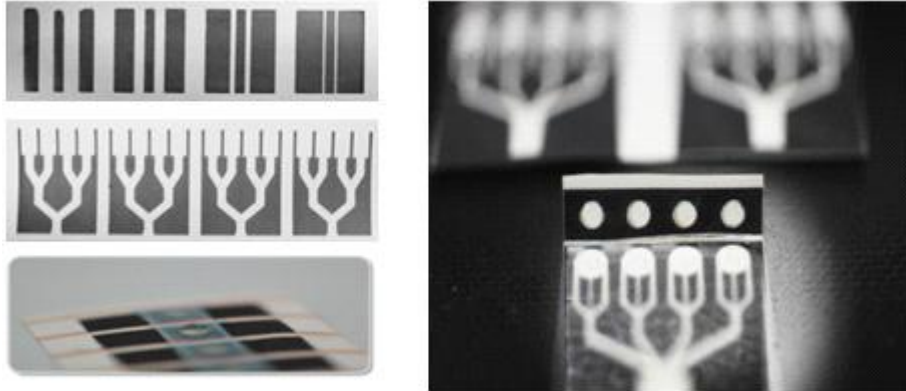
[ssDNA와 금나노입자의 영김현상을 이용한 농약 종류 및 농도별 금나노입자 검출 결과]

- ◆ 위의 결과에서 확인할 수 있듯이 본 연구진이 개발한 기술을 이용하여 3종의 농약을 금나노입자를 이용하여 측정할 수 있었으며 이 중 2종인 Mefenacet, Inabenfide는 일반적인 규제치인 100ppb까지 검출이 성공적으로 이루어짐을 확인할 수 있었고, 나머지 1종인 Tubecunazole은 10ppb까지 측정이 가능함을 확인할 수 있음

나. 다채널 스트립 설계 및 다양한 프린팅을 이용한 센서 포맷 제작

1) Screen printer patterning을 이용한 센서 포맷 제작

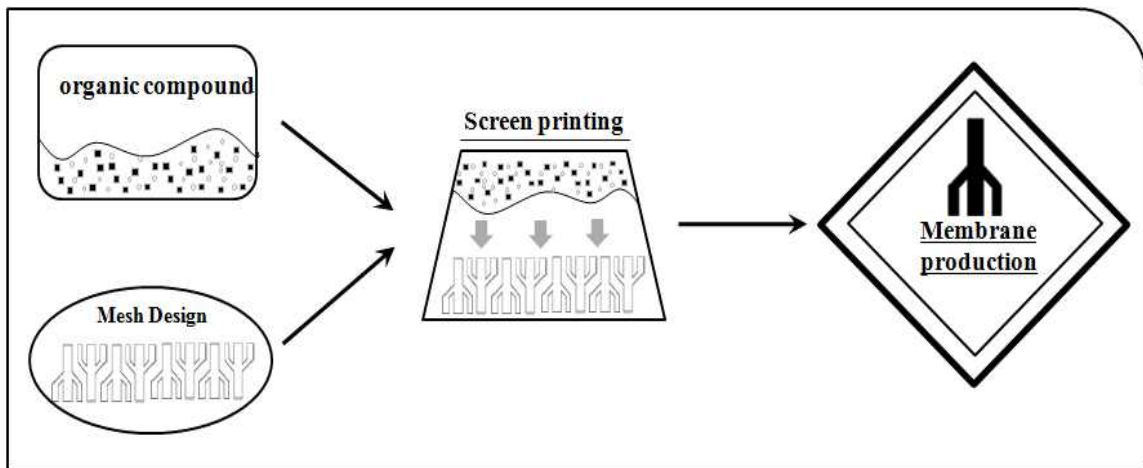
(가) Wax printing 기술을 이용한 다양한 센서 포맷 design 및 제작



[Wax printing을 이용한 파라핀 패턴닝]

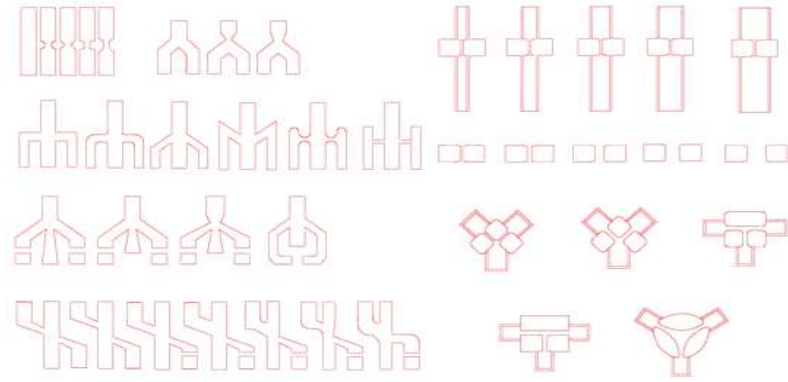
- ◆ 위에서 확인할 수 있듯이 다양한 형태의 패턴을 제작하였고 이후 실험에 진행하고자 하였으나 파라핀 패턴닝의 경우 membrane을 고온에서 가열(120℃)을 진행해서 굳히는 과정을 진행 중 손실되는 경우가 발생하여 다른 방안을 모색하기로 함

(나) 스크린 프린팅을 이용한 다양한 센서 포맷 제작을 위한 designing 실시

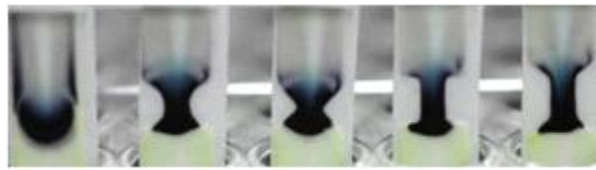


[스크린프린팅을 이용한 patterning 방법 모식도]

- ◆ 위의 모식도에서 확인할 수 있듯이 다양한 patterning을 위해 본 연구진은 Craft cutter를 이용하여 다양한 patter의 mesh를 디자인 한 후 이후 organic compound를 이용하여 스크린프린팅을 실시하여 다양한 형태의 센서 포맷을 제작함
- ◆ 해당 기술의 장점은 기존의 Ink-jet 방식의 membrane에 screen printer를 이용한 patterning이 자유롭다는 점과 고온의 열처리 가공을 제외하여 종이인 membrane의 손상을 최소화 시킬 수 있다는 점 마지막으로 소수성, 친수성 구간을 명확히 나눌 수 있어 센서 포맷에서의 유속제어 및 다양한 센싱방법들을 유도 할 수 있다는 점임
- ◆ Craft cutter를 이용한 다양한 형태의 Mesh의 제작을 아래의 그림과 같이 실시함



[다양한 형태의 센서 포맷 designing 실시]

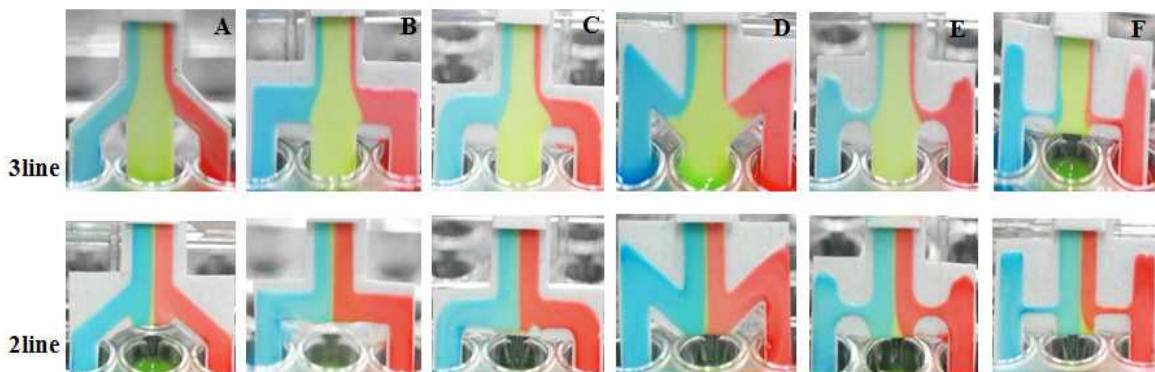


[중간 부분의 patterning의 폭과 길이를 조절함으로써 스트림의 flow가 제한됨을 확인할 결과]



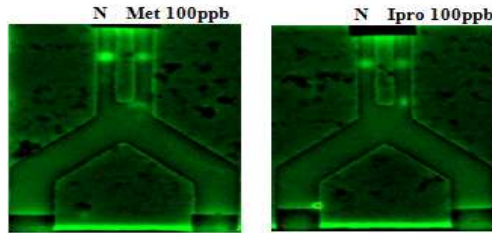
[서로 다른 사이즈로 patterning 된 membrane에서의 flow 확인 결과]

- ◆ 위위의 결과에서 확인할 수 있듯이 중간 patterning 사이즈를 고정하고 좌우의 flow를 조절한 결과 중간 부분에 형성되는 형상이 달라짐을 확인할 수 있었음
- ◆ 이러한 patterning의 결과를 기반으로 추후 효소 기반 기술을 이용한 정성성을 확인하기 위한 enzymatic assay에 적용하기 위한 two channel patterning을 실시함



[Patterning에 따른 유체이동상에 대한 확인 결과]

- ◆ 개발된 two channel 포맷을 이용하여 ds DNA 압타머를 이용한 센싱을 실시함.

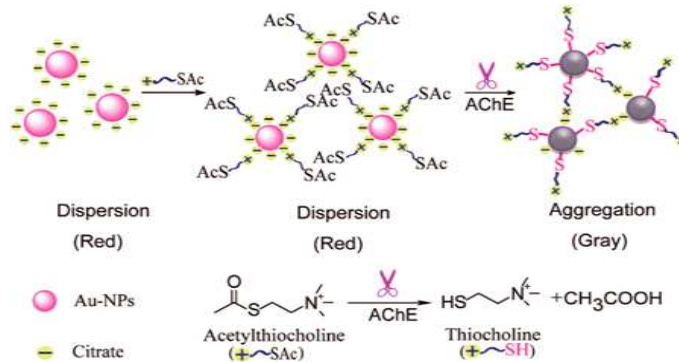


[dsDNA 압타머 시스템을 이용한 patterning된 포맷에서의 기준치 농약의 검출 결과]

- ◆ 본 연구진이 개발된 pattern을 이용하면 단일 스트립상에서 control 대비 positive 시료의 양을 정량적으로 정성적으로 확인할 수 있음을 확인함

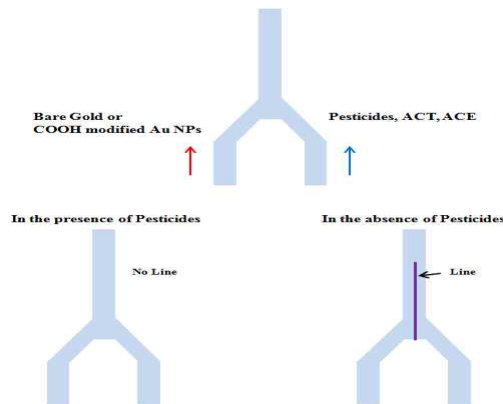
다. 압타머-효소 복합반응에 대한 정량 및 정성 분석법 최적화 실시

- ◆ 기존의 효소반응에 의한 발색법 경우에는 현재 본 연구진이 진행하고자 하는 동시진단 부분에 다른 용매를 사용해야하는 단점이 있어 이를 통합하여 단일 용매를 이용한 시스템을 제작하였음
- ◆ 압타머 시스템을 고정화하고 효소반응에 의한 정성적인 검출 가능한 포맷을 디자인하였음



[금나노입자를 이용하여 영검현상으로 인한 금나노입자의 색변화로 농약을 검출한 내용]

- ◆ 본 연구진은 ssDNA 기반의 금나노입자의 영검현상을 이용하여 농약을 정량적으로 측정할 수 있는 기술을 개발하였고 이와 유사한 형태의 효소기반 실험을 진행하였음
- ◆ 위의 참고문헌에서 설명된 것처럼 일반적으로 알려진 achetylcholinesteras를 이용하는 방식으로 AChE가 농약에 의해 억제되고 억제되는 경우에는 금나노입자의 영검현상이 나타나지 않은 특성을 이용하여 스트립에 구현하였음



[효소반응을 이용한 금나노입자 영검현상을 통한 농약유무 확인 모식도]

- ◆ 표적인 농약 중 하나인 100ppb의 Malaoxon을 이용하여 해당 시스템을 검증 실시하였음
- ◆ 실험 조건은 압타머를 이용한 방식에서 이용한 Tris-HCl 7.4, 0.1mM NaCl, 5mM KCl에서 진행하였음
- ◆ 아래 결과에서 확인할 수 있듯이 농약에 의해 억제된 효소에 의해 금나노입자의 엉김현상이 적어져 중간 부분의 라인 형성이 덜 되는 것을 확인 할 수 있을 뿐 아니라 금나노입자가 엉김형태가 아닌 붉은 색을 띄는 것을 확인할 수 있었음
- ◆ 하지만, 농약에 의해 억제되지 않은 효소의 경우에는 금나노입자가 효소의 활성이 높아져 ATC의 분해를 활발하게 진행하여 금나노입자의 엉김현상을 유도하게됨에 따라 금나노입자의 라인 색이 어두운 색을 띄게 되고 해당 입자의 라인의 길이도 길게 형성됨을 확인하는 방식을 통해 효소반응을 통한 농약의 정성적인 확인을 진행함



[효소를 이용한 농약 검출 결과, P : Malaoxon 100ppb in MeOH, N : MeOH]

- ◆ 본 연구진은 같은 용매 조건에서 압타머와 효소반응을 통한 농약 검출 방안을 수립완료 하였고 이를 이용하여 동시검출 방법을 진행함.

라. 4종 농약의 동시검출 시 검출한계확인

- ◆ 동시 진단이 가능한 포맷의 스트립형태 제작 실시
- ◆ 1세부 위탁기관에서 개발된 압타머의 경우 일부 cross-activity가 확인됨에 따라 아래 표에 의거하여 센싱을 진행함

	T1 aptamer	T2 aptamer	T3 aptamer	Iproθ aptamer	OTA aptamer
Mefenacet		○			
Tebuconazole	○	○	○		
Inabenfide		○			
Iprobenfos				○	
Ochratoxin A					○

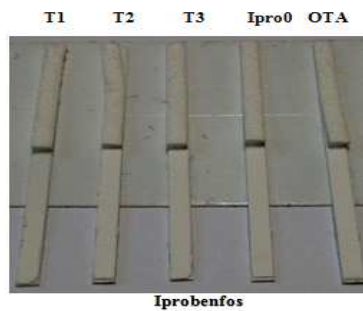
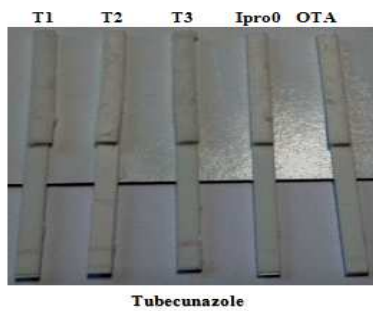
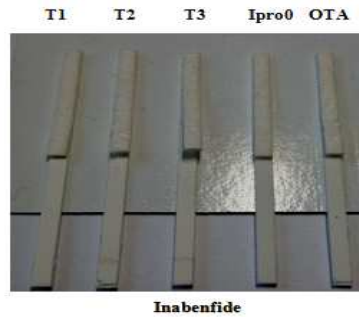
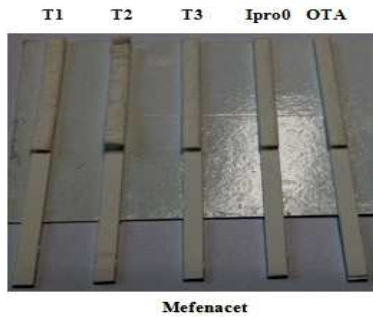
○: Line 형성

[4종 농약 동시 분석시 라인형성에 따른 해당 농약 검증표]

- ◆ 위의 표에서 확인 할 수 있듯이 해당 라인에 라인이 형성됨에 따라 해당 농약의 유무를 확인 할 수 있음
- ◆ OTA는 control 라인으로 농약에 의해서는 항상 금나노입자의 엉김 라인이 형성되지 않은 것임
- ◆ 본 연구진은 해당 농약들의 검출을 위해 일반적인 규제치인 100ppb의 농도로 위의 표를 검증을 실시하였음
- ◆ 검증결과 아래 그림에서 보이듯이 mefenacet은 T2 압타머를 사용한 경우에만 나오는 것을 확인

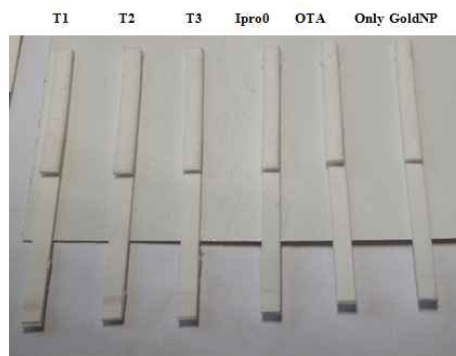
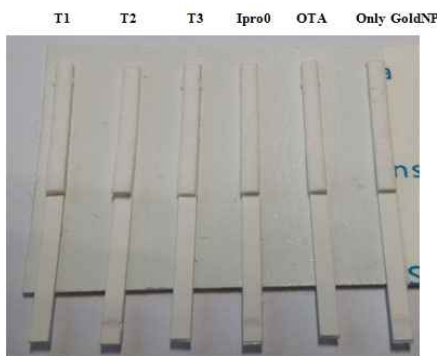
할 수 있었고, inabenfide는 T2, T3 압타머를 사용한 곳에서 라인이 형성됨을 확인할 수 있었음

- ◆ 마찬가지로 tubecunazole, iprobenfos도 각각에 해당하는 압타머를 사용하는 경우에만 특이적으로 라인이 형성되는 결과를 확임함을 통해 4종을 동시에 검출할 수 있는 시스템 확립을 함



[각 농약에 따른 압타머의 반응성 확인 결과]

- ◆ 해당 결과를 바탕으로 서로 다른 2종의 농약을 바탕으로 센싱을 실시함. (100 ppb Iprobenfos와 Tubecunazole, 100 ppb Iprobenfos와 Mefenacet)



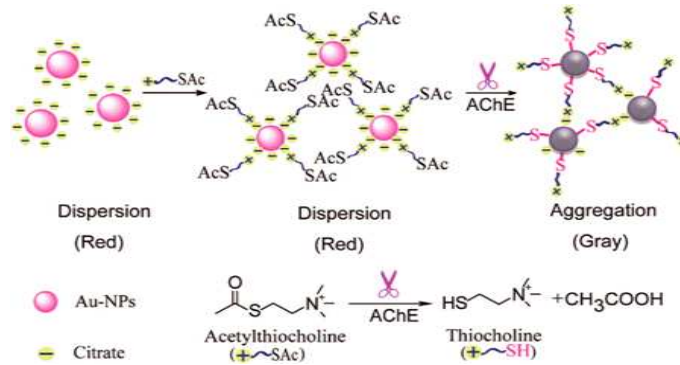
[동시 2종 분석 결과, Only GoldNP는 control line]

- ◆ 위의 결과에서 처럼 농약을 동시 2종을 분석한 경우에도 금입자의 영감이 해당 압타머가 있는 경우에만 생기는 것을 확인할 수 있었음
- ◆ 본 연구를 통해 동시에 4종의 특이적 압타머에 대한 스트립센싱법을 구축하였고 이 기술을 통해 현재 상용화 포맷 및 대량 생산이 가능한 포맷에 대한 연구를 진행하였음

[3차년도 연구수행 결과]

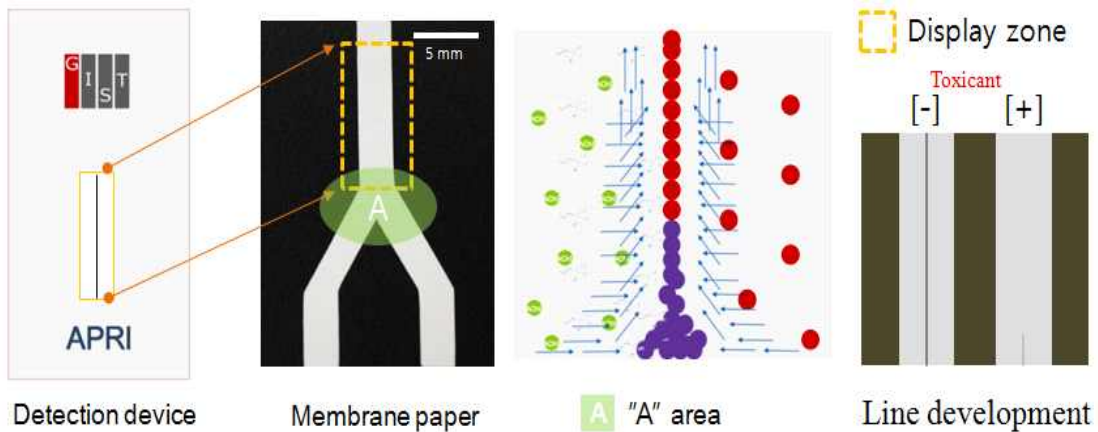
가. 정성적 측정을 위한 효소기반 농약 검출 센서검증 및 실제시료 적용(특허출원/논문투고예정)

- 본 연구진은 기보고한 아래와 같은 시스템으로 농약을 기존의 효소기법과 본 연구진이 개발한 기법을 이용하여 정량적, 정성적 측정이 가능한 형태의 센서로 개발을 진행하였음



[금나노입자를 이용하여 영김현상으로 인한 금나노입자의 색변화로 농약을 검출하는 원리]

- 본 연구진은 ssDNA 기반의 금나노입자의 영김현상을 이용하여 농약을 정성적으로 측정할 수 있는 기술을 개발하였고 이와 유사한 형태의 효소기반 실험을 진행하였음
- 위의 도식도에서 설명된 것처럼 일반적으로 알려진 acetylcholinesterase를 이용하는 방식으로 AChE가 농약에 의해 억제되고 억제되는 경우에는 금나노입자의 영김현상이 나타나지 않은 특성을 이용하여 스트립에 구현하였음



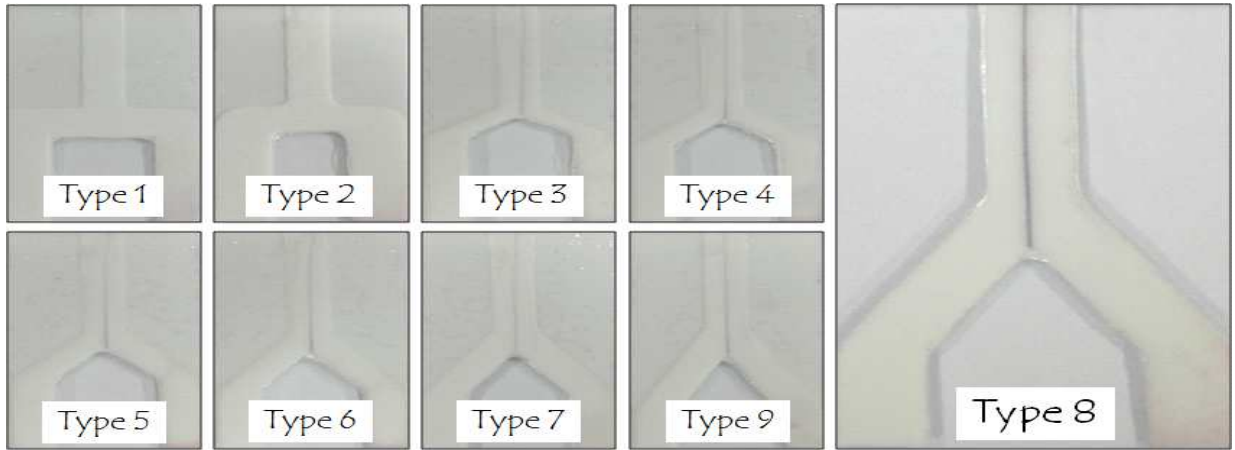
[효소반응을 이용한 금나노입자 영김현상을 통한 농약유무 확인 모식도]

- 본 연구진은 위의 모식도에 의한 농약검출 시스템이 구현됨은 전년도에 보고하였음
- 금년도에 본 연구진은 다양한 농약에 대한 위 시스템의 검증을 우선적으로 실시하여 정량적 정성적 분석 유무를 검증하였음

1) 스트립형태의 최적 형태 검증 실시

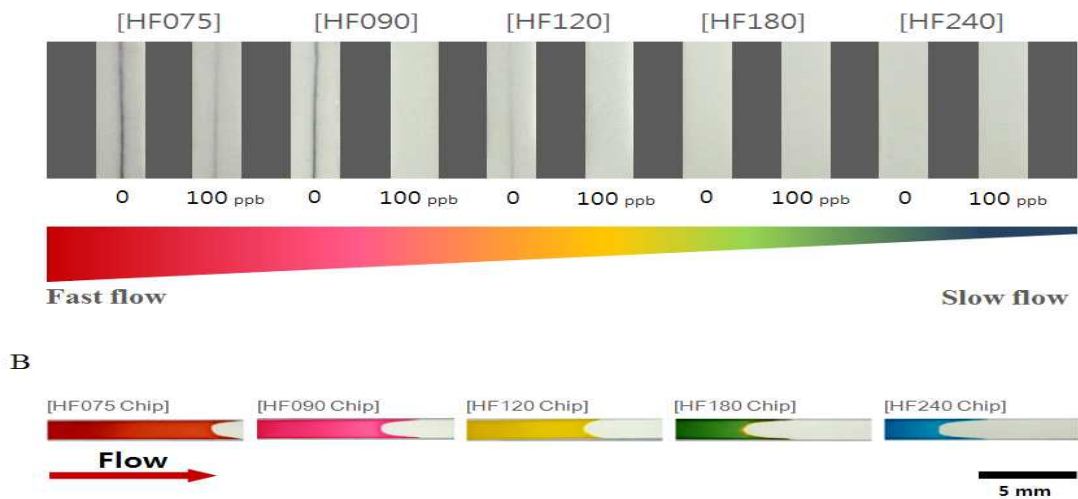
- 본 연구진은 위의 모식도의 형태를 현장에서 재현성을 높이고 결과의 신뢰도를 높이는 중요한 요

소로 위 모식도의 A 부분의 각도로 판단함. 그 이유는 A 부분의 각도에 따라 서로 다른 두 부분의 스트립에서 진행되는 물질의 유속이 달라짐으로 인해 반응성의 저해를 가져올 수도 있기 때문임



[모식도 상의 A 부분의 각도에 따른 농약 검출을 위한 control 실험. (A 부분의 angle 각도 ; Type 1=180°, Type 2=180°, Type 3=120°, Type 4=104°, Type 5=90°, Type 6=80°, Type 7=72°, Type 8=64°, Type 9=60°)]

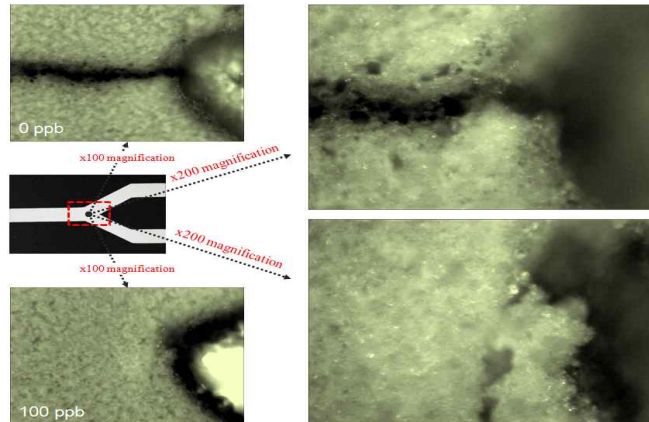
- 위의 결과는 농약을 검출하기 위해 금나노입자의 영김으로 인해 띠가 얼마나 형성되는지를 확인한 것으로 결과에서 볼 수 있듯이 **금나노입자의 영김이 효율적으로 일어나는 형태는 angle이 64도일 때가 가장 좋은 결과를 보여줌을 확인** 할 수 있었음
- 또한, 본 연구진은 스트립센서의 재료가 되는 Nitro-cellulose membrane의 다양한 형태에 따른 유속의 변화를 확인하였음



[NC membrane의 유속형성능에 따른 농약 검출 실험 결과]

- 결과에서 확인할 수 있듯이 **HF090의 조건에서 control 대비 농약 검출 한계치인 100ppb에서의 띠 형성 정도가 가장 낮은 것으로 확인** 할 수 있었음. 동일한 시간조건에서 HF075이 가장 멀리 유체가 이동하였고 line도 선명하지만 농약이 있는 시료에서도 line이 미세하게 나타나는 경향을 보여주어 검출제한 되고 유속이 가장 느린 HF240의 경우는 가장 짧게 이동하였으며 line이 나타나지 않아 농약검출을 위한 시스템에 적절치 않음을 확인하였음

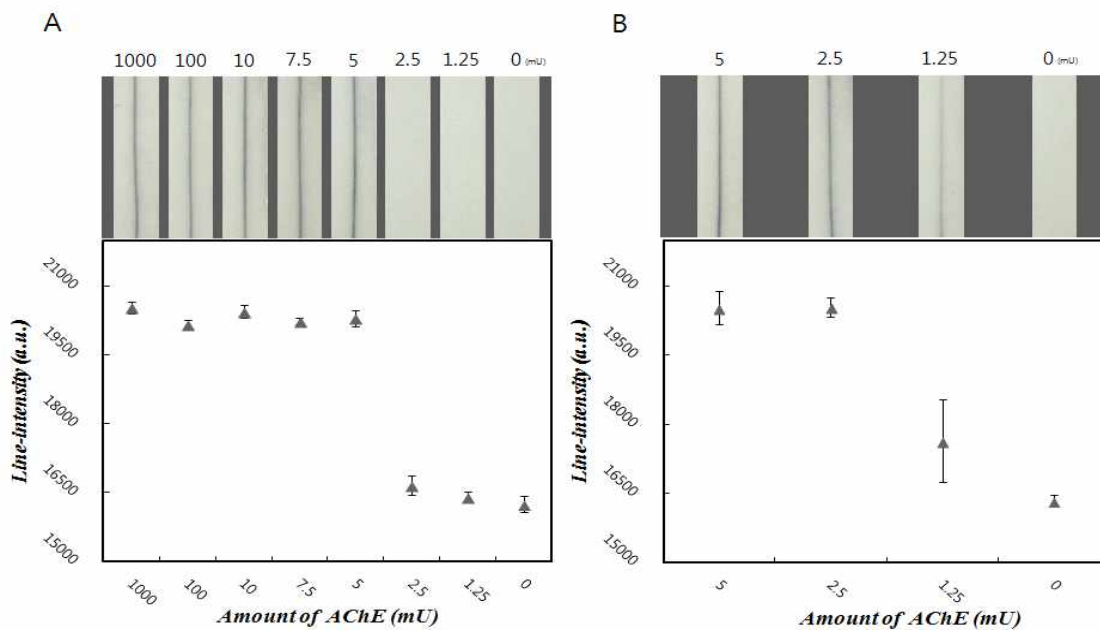
- ◆ 모식도의 A 부분의 금나노입자의 형성을 광학현미경을 통하여 확인한 결과 확연하게 A 부분에서 농약의 유무에 따라서 금나노입자의 엉킴현상이 진행되는 확인 할 수 있었음



[모식도 A 부분의 금나노입자의 엉킴현상 발생 유무에 대한 광학현미경 확인 결과]

2) 농약의 정성적 검출을 위한 효소기반을 이용한 농약 스트립센서 최적화

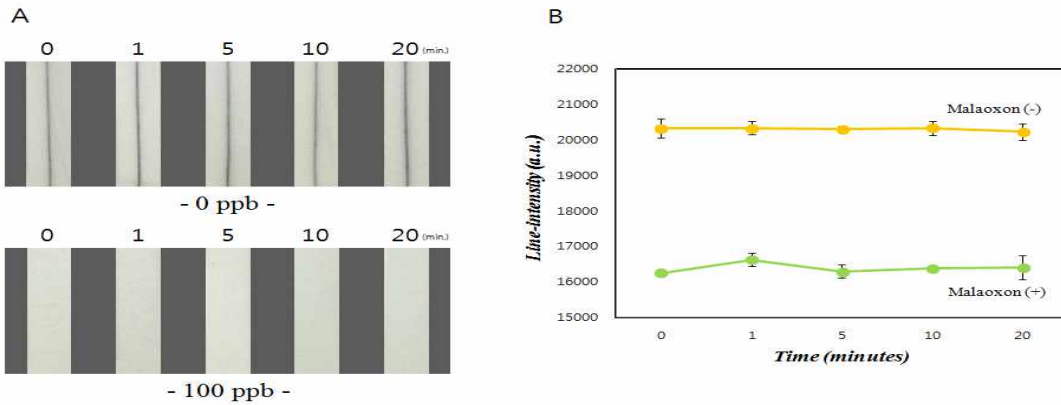
- ◆ 효소기반의 농약 스트립을 구현하기 위해 가장 중요한 요소 중에 하나는 사용되는 효소인 Acetylcholinesterase(AchE)의 농도임. 그래서 본 연구진은 최적 농도에 대한 최적화를 진행하였음



[AchE 농도에 따른 Line 형성 정도 확인 결과 (A. with 100ppb malaoxon, B. without malaoxon)]

- ◆ 위의 결과에서 확인 할 수 있듯이 농약이 있는 경우에 높은 농도의 AchE의 경우에는 금나노입자의 엉킴현상으로 인해 띠가 형성됨을 확인 할 수 있음. 기준 측정치 상의 농약이 있는 경우에 띠가 형성되지 않는 조건은 확인 결과 2.5mU 이하의 AchE임을 확인할 수 있었음
- ◆ 또한, 농약이 없는 시료를 사용해서 확인해본 결과 낮은 농도인 1.25mU AchE를 사용하는 경우에는 띠 형성능력이 현저히 떨어지는 것을 확인 할 수 있었음. 본 연구진은 **농약을 정량적, 정성적 검출하기 위한 최적 조건을 2.5mU AchE로 확정하였음**
- ◆ 또한 효소기반의 Dip-stick 형태의 스트립 센서임으로 용액 내에서 전반응이 일반적으로 중요한

요소에 알려져 있음. 본 연구진은 농약 시료가 들어가고 난 후에 위의 시스템이 구현되는 최적 시간을 확인하였음

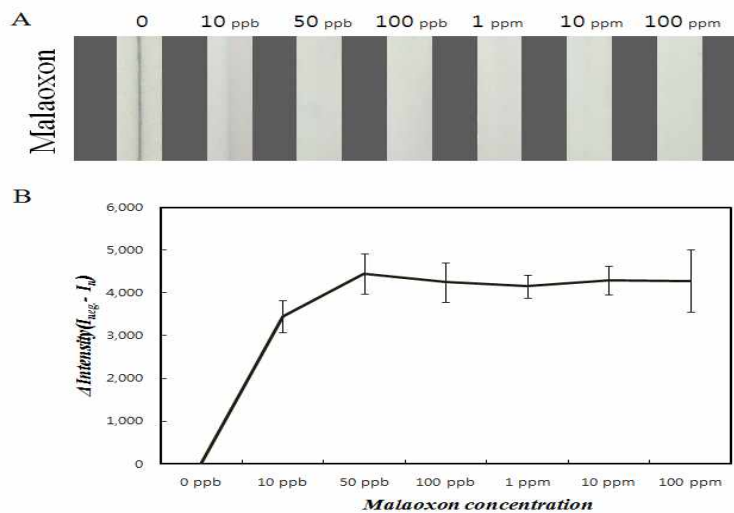


[농약 첨가 후 용액에 dip-stick 스트립 농약 검출 센서를 적용시키기 전 전반응 시간에 대한 확인 결과]

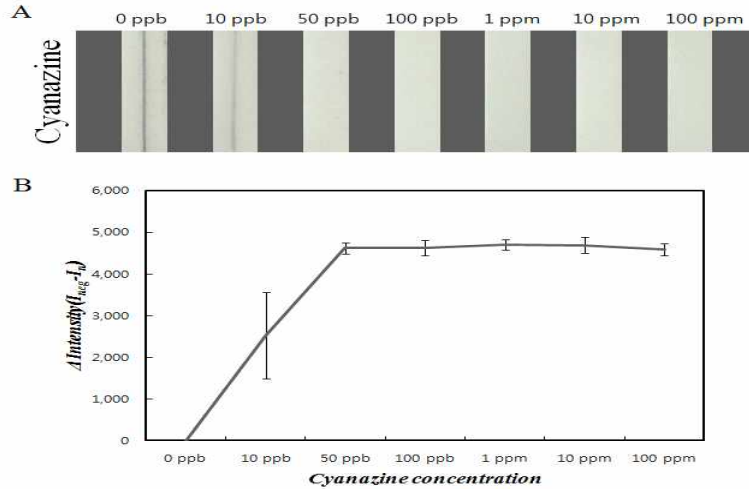
- 위의 결과에서 확인 할 수 있듯이 전반응 시간이 필요로 하지 않음을 확인 할 수 있었고 농약을 첨가한 후 Dip-stick 형태의 스트립을 농약검출 Kit에 바로 적용시켜도 전반응을 충분히 보낸 결과와 다르지 않음을 확인 할 수 있었음
- 본 연구진은 위의 결과를 토대로 농약의 정성적 검출을 위한 Dip-stick 스트립을 개발을 완료하였음.

3) 농약에 따른 정성적 검출 검증 실시

- 단일 농약의 경우 aptamer 검출 타겟이 아닌 두 종의 농약에 대하여 검출 한계 실험을 실시함. (cyanazine, Malaoxon)
- 또한, EPN, Carbofuran, Dichlorvos에 대한 기준치에서의 측정을 실시하여 시스템 검증을 추가로 진행하였음

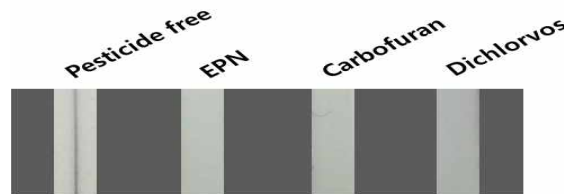


[농약 Malaoxon의 농도에 따른 검출 한계 실험 결과]

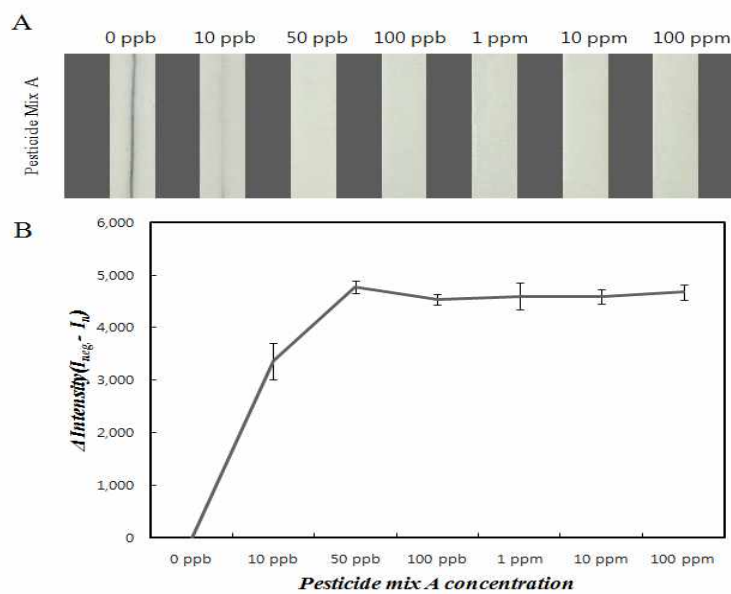


[농약 cyanazine의 농도에 따른 검출 한계 실험 결과]

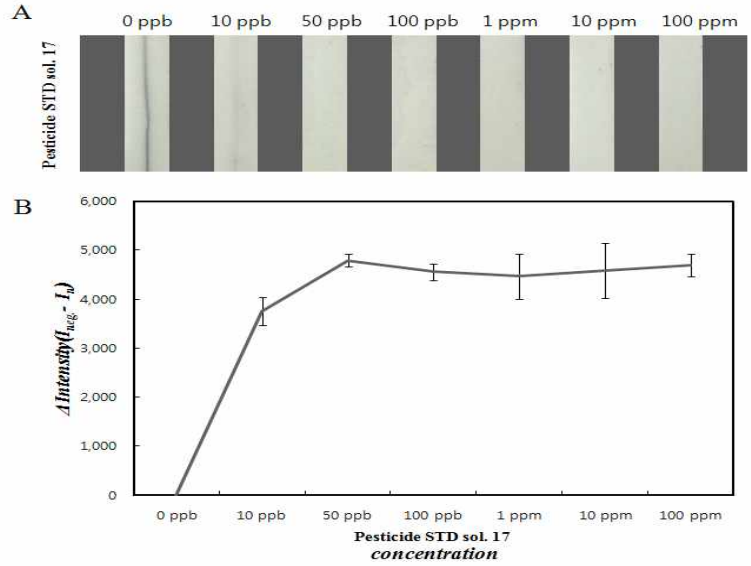
- ◆ 농약의 경우 수백종의 농약이 개발되어 판매되어지고 있고 단일 농약이 아닌 복합농약의 형태로 제품화가 형성되는 경우가 많음
- ◆ 본 연구진은 단일 농약에 대한 검증 뿐 아니라 복합농약의 형태의 경우도 검증을 같이 진행함. (단, 제품화 된 복합 농약의 경우 정확한 성분 확인에 어려움이 있어서 시그마에서 판매하고 있는 복합 농약 시료를 사용하여 검증을 실시함)



[검출 규제치인 100ppb의 EPN, Carbofuran, Dichlorvos에 대한 검출 실험 결과]



[복합농약 시료인 Pesticide mix A에 대한 농도별 검출 한계 실험 결과]



[복합농약 시료 Pesticide STD sol. 17에 대한 농도별 검출 한계 실험결과]

- 복합농약인 Pesticide STD sol. 17(10 ng/μl each: atrazin, atrazin-desethyl, cyanazin, sebuthylazin, simazin, terbuthylazin, hexazinon, chlortoluron, diuron, isoproturon, linuron, methabenzthiazuron, metobromuron, metoxuron, monolinuron, metazoachlor, metolachlor)와 Pesticide Mix A(α-MHC, 4,4-DDT, Decacholrobiphenyl, dieldrin, α-endosulfan, edrin, Hepatchlor, Lindane, Methoxychlor, 2,4,5,6-tetrachlor-m-xylene)을 검증해본 결과 역시 일반적인 규제치인 50~100ppb 이상의 농도에서 부터는 위의 시스템을 이용하여 정성적으로 확인이 가능함을 확인 할 수 있었음

5) 실제 시료에서의 농약 검출 실시

- 농약의 실제시료의 검출을 위해서 시중에서 판매하는 적상추(Lactuca sativa var. crispa)를 구매하여 농약을 적용하여 본 연구진이 개발한 Dip-stick strip 농약센서에 대한 검증을 실시하였음
- 본 연구진은 농약 중 하나인 malaoxon을 시료 내에 적용하여 일반적인 농약 분석법인 HPLC를 이용하여 비교 검증을 실시하였음

[적상추 시료에 적용된 농약 Malaoxon에 대한 HPLC, dip-stick strip sensor간의 정성정 결과 비교]

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

[표. 적상추 시료에 적용된 농약 parathion에 대한 HPLC, dip-stick strip sensor간의 결과 비교]

Parathion spiked (ng/g)	HPLC		Dip-stick strip sensor	
	Parathion detected (ng/g)	Recovery (%)	Parathion detected (ng/g)	Recovery (%)
0	ND	-	ND	-
100	91.8±0.08	91±8	81.2±0.09	81±9
1000	812.9±0.68	81±7	894.3±1.42	89±14
10000	10,832±0.02	108±8	7,462±0.18	74±6
100000	84,244±0.39	84±13	112,036±0.36	112±12

- ◆ 위 결과에서 확인 할 수 있듯이 일반적인 농약 분석법인 HPLC와 비교하여 **Dip-stick strip sensor의 경우에도 recovery가 100%에 가깝게 분석되는 것을 확인 할 수 있었음**
- ◆ 또한, 정량성에 대한 결과도 나타남을 확인함으로 개발된 Dip-stick strip 센서가 정성능 뿐 아니라 정량적 측정이 가능함을 확인함
- ◆ 본 연구진은 위의 결과를 토대로 **논문 및 특허작성을 진행 중에 있음** (각 1건)
- ◆ 마지막으로 개발되어진 Dip-stick strip sensor의 경우에는 시료 회수부터 분석까지 총 30분의 시간으로 정성적 분석이 완료됨을 확인함

나. 정량적 측정을 위한 압타머 기반 농약 검출 센서 검증 및 실제시료 적용

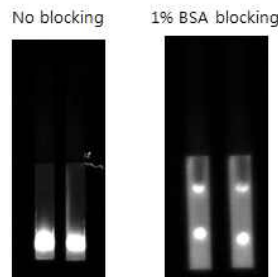
- ◆ 1세부 위탁기관인 고려대학교에서 개발된 농약 특이적 압타머 서열을 이용하여 Dip-stick strip 센서에 적용하여 정량적 측정을 진행함
- ◆ 추후 기술이전을 통해 농약 정량, 정성 Kit을 제작 판매하기로 한 (주)웰코리아와 협의를 통하여 검출 방법은 형광 및 발색을 혼용하기로 결정함
- ◆ 본 연구진은 전년도 보고에서 금나노입자를 이용한 방식과 형광물질을 이용한 방법에 대하여 보고를 진행하였음, 하지만, 금나노입자를 이용하는 경우는 (주)웰코리아에서 개발된 검출기 시스템과 혼용에 어려운 부분이 있어서 농약의 정량적 분석에는 형광물질을 이용한 방식을 차용하기로 함.
- ◆ 기보고 결과에는 LFA 형태와 Dip-stick 형태의 스트립 농약센서에 대한 기술보고를 진행하였으나 대량생산과 초기 투자금의 비율을 낮추고 신속한 시장진입을 위하여 (주)웰코리아와 협의 결과 Dip-stick의 형태의 플랫폼을 선정하기로 함.

1) 정량측정용 Dip-stick aptasensor 개발변형 및 최적화



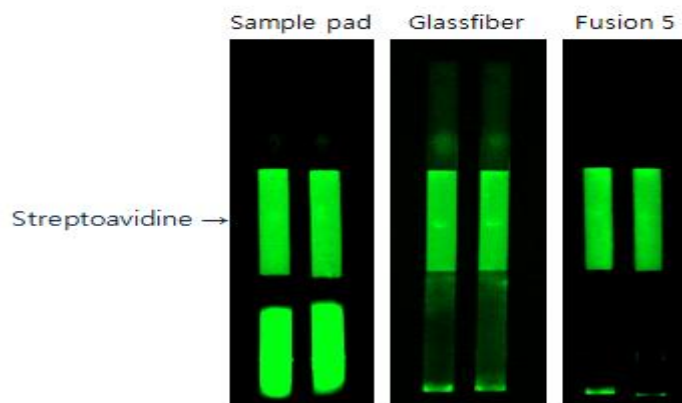
[Dip-stick 형태의 농약스트립센서 모식도]

- ◆ 본 연구진은 1세대 위탁기관인 고려대학교에서 농약압타머를 발굴하기 위해 사용한 Graphene oxide를 이용하여 농약검출용 스트립 개발에 적용시키는 형태의 변형을 진행하였음 (기보고 Dip-stick의 경우에는 Gold nanoparticle을 이용하였음)
- ◆ 첫 번째로는 NC에서 형광-압타머-바이오틴 형태의 DNA가 전개되는지를 확인하는 실험을 진행함



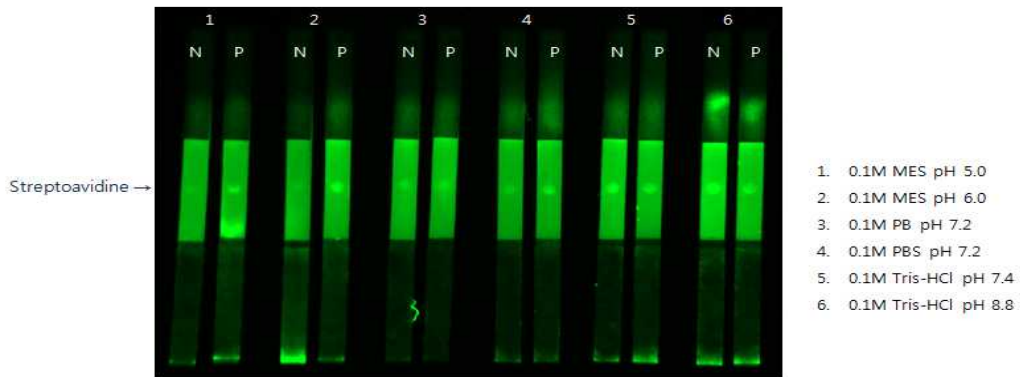
[NC membrane에서 형광 DNA 전개형태 (좌: Bare NC, 우: 1% BSA blocked NC)]

- ◆ 위의 결과에서 확인 할 수 있듯이 NC membrane의 경우 형광 DNA 서열을 전개하기 위해서는 1% BSA를 전개해야만 되는 것을 확인 할 수 있었음, 이후 실험 과정에서는 모두 1% BSA로 blocking 하여 진행함.
- ◆ 두번째는 graphene oxide를 고정시키기에 가장 좋은 형태의 membrane pad의 선정을 실시함, 아래 결과에서 확인할 수 있듯이 일반적인 sample pad의 경우에는 형광물질이 전혀 전개되지 않은 특성을 가지고 있었으며 그나마 glass-fiber 형태와 fusion 5(millipore 제품명) 형태의 pad에서는 형광 압타머가 전개되어 NC membrane으로 전개되는 것을 확인 할 수 있었음



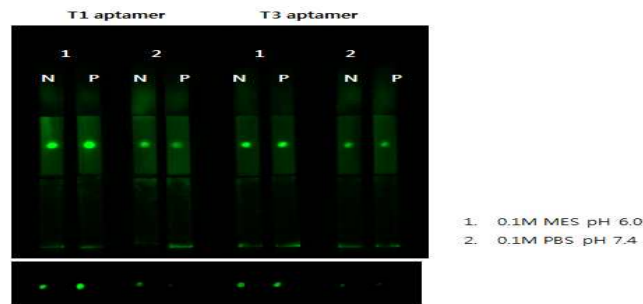
[Graphene oxide 고정용 pad 스크리닝 결과]

- ◆ 본 연구진은 Glass-fiber를 이용하여 이후 최적화를 실시
- ◆ 세 번째로는 농약압타머를 이용하여 최적 전개 용액에 대한 스크리닝을 실시하였음



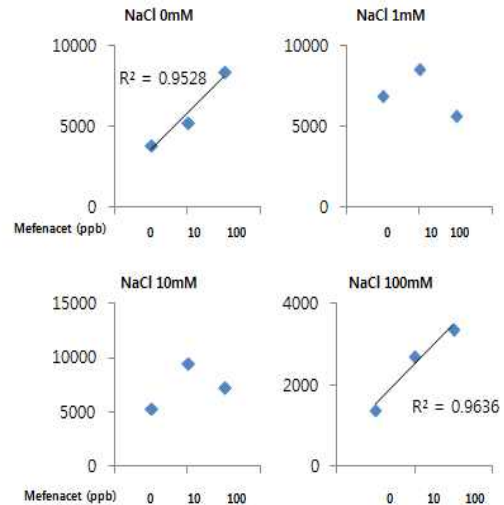
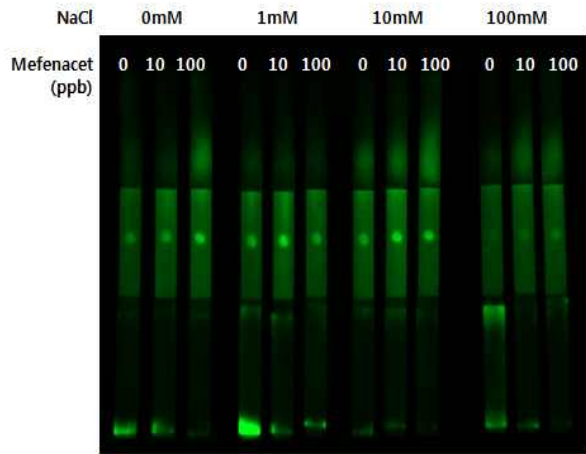
[3가지 농약에 동시반응성을 가지고 있는 T2 aptamer와 결합하는 Mefenacet 100ppb를 이용하여 buffer 스크리닝 결과]

- ◆ 위의 결과에서 확인 할 수 있듯이 농약이 있는 경우와 없는 경우의 결과를 이미지 상에서 비교해 볼 때에 MES 6.0, PB 7.2, PBS 7.2에서 좋은 결과가 나타남을 확인 할 수 있었음
- ◆ 나머지 고려대학교에서 개발한 농약 특이적 aptamer를 이용하여 S/N가 좋았던 buffer 3가지 중 2가지(MES 6.0, PBS 7.2)를 이용하여 전개능 및 반응성에 대한 실험을 진행하였음



[T1, T3 aptamer에 각각 100ppb의 Tubeconazole, Inabenfide를 적용한 최적 buffer 실험 결과]

- ◆ 위의 결과 확인 할 수 있듯이 T1, T3 aptamer 모두 MES 6.0에서는 반응성이 나타남을 확인 할 수 있었음
- ◆ 본 연구진은 이후 실험은 모두 MES 6.0을 적용하여 진행함
- ◆ 일반적으로 aptamer의 안정성 및 반응성을 향상시키기 위해서는 염의 첨가가 중요한 요소 중에 하나임. 본 연구진은 NaCl을 이용해서 염 농도에 따른 안정성 및 반응성 실험을 진행하였음.

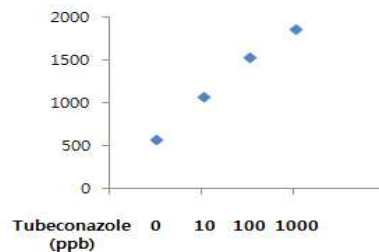
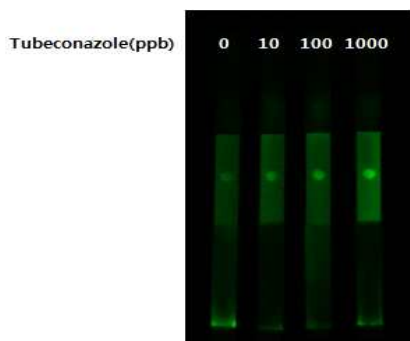


[(좌) 염 농도에 따른 잔류 농약 검출 스트립 확인 결과(Chemi-Doc), (우) 좌의 결과의 분석결과]

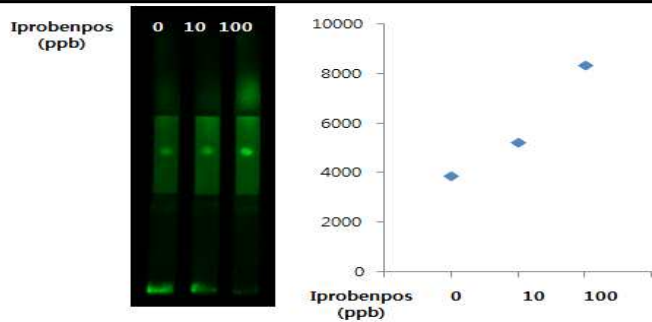
- ◆ 염농도가 높아짐에 따라서 초기 결합 값이 올라가는 경향성을 띄다가 100 mM의 농도 이상 적용되는 경우 더 이상 특이적 반응으로 전환되는 경향성을 보이고 있음
- ◆ 본 연구진이 확인한 결과 농약을 적용하였을 경우 염이 없거나 염이 있거나 비슷한 결과가 도출됨을 확인할 수 있었음. 본 연구진은 안정적인 반응을 유도하기 위해서 100 mM NaCl을 별도로 첨가한 용액을 사용하기로 선택함

2) 정량측정용 dip-stick strip aptasensor를 이용한 농약 실제시료 검증 및 분석소요시간 확인
가) 실제 시료 적용을 통한 cut-off value 평가

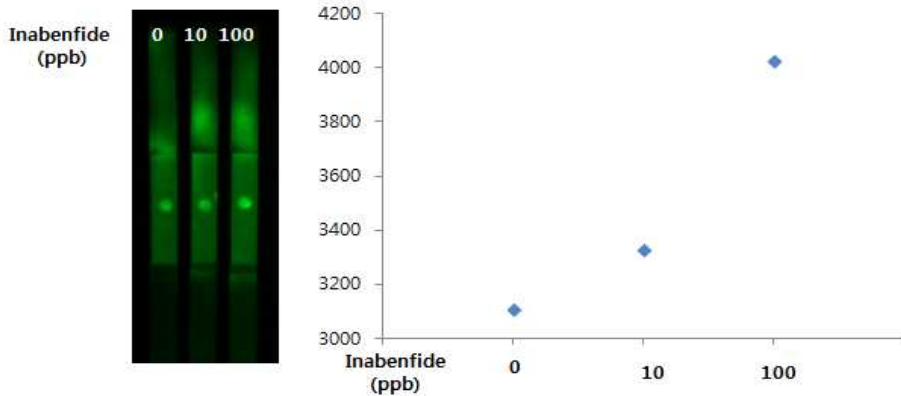
- ◆ T2 압타머를 이용하여 Dip-stick strip 농약센서의 실제시료 실험을 진행함
- ◆ 농약의 실제시료의 검출을 위해서 시중에서 판매하는 적상추(Lactuca sativa var. crispa)를 구매하여 농약을 적용하여 본 연구진이 개발한 Dip-stick strip 농약센서에 대한 검증을 실시함



[T2 압타머 Dip-stick strip aptasensor를 이용하여 적상추에서 Tubeconazole을 농도별로 검출한] 결과



[Iprobenpos를 농도별로 적상추에 적용시킨 시료를 Dip-stick strip aptasensor를 이용하여 검출한 결과]

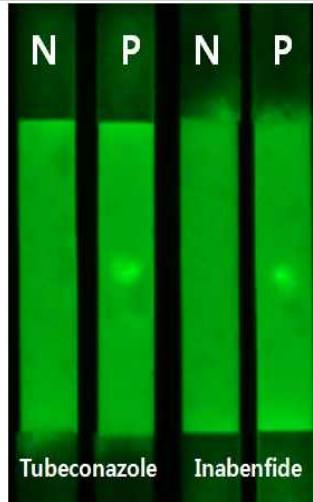


[Inabenfide를 농도별로 적상추에 적용시켜 Dip-stick strip aptasensor를 이용하여 검출한 결과]

- ◆ 위 그림에서 확인 할 수 있듯이 T2 압타머를 이용하여 Tubeconazole을 Ipro0 압타머를 이용하여 Iprobenpos를 T1 압타머를 이용하여 Inabenfide를 각각 상추에 농도별로 적용한 후 실험한 결과 본 연구진이 개발한 시스템에서 실제시료에서도 농도별로 정량적 검출이 형광-압타머-바이오틴 구조를 가진 DNA 서열로 인해 구별됨을 확인 할 수 있었음
- ◆ 이상의 결과에서 알 수 있듯이 본 연구에서 개발된 스트립 센서를 이용하여 tubeconazole, iprobenpos, inabenfide를 각각 10 ppb 수준까지 검출할 수 있는 분석법이 개발된 것으로 확인됨

나) 스트립 센서 분석소요시간 확인

- ◆ 스트립 센서의 신속시료 추출 조건 확립을 위해 문헌에서 농약추출 시 주로 사용되고 있는 메탄올을 20%로 조제하여 임의로 오염시킨 쌀(각 10 ppb)에 대해 10분 동안 추출하는 추출법을 확립함
- ◆ 본 연구진이 개발한 방법을 이용하여 농약 Tubecunazole, Inabenfide 두 개의 농약을 각각 쌀에 10ppb 농도로 오염시킨 후 10분동안 20% Me-OH를 이용하여 추출 한 후 잔류농약 검출 스트립에 적용시킴



[시료 확립된 시료 추출법을 이용한 농약 Tebuconazole, Inabenfide 음성, 양성(10 ppb) 시료 분석]

- ◆ 쌀에 tebuconazole, iprobenpos, inabenfide 그리고 mefenacet에 대해 1, 10, 100, ng/g 농도로 임의로 오염시킨 후 개발된 dip-stick strip sensor를 이용하여 분석한 결과 회수율은 평균적으로 83.8~112.2 %로 확인되어 실제 쌀 중에서 10 ppb 이하까지 분석이 가능한 방법으로 확인이 됨
- ◆ Dip-stick strip sensor를 통해 시료 추출액을 적용 후 소요되는 시간은 최대 15분으로 확인되었기 때문에 쌀 시료 중 농약을 분석하는데 소요되는 시간은 30분 이내일 것으로 예상됨
- ◆ 이상의 결과에서 알 수 있듯이 개발된 스트립 센서의 경우 계획된 목표치 1시간 이내를 충분히 만족하는 것으로 확인되어 현장에서 신속하게 농약의 분석이 가능할 것으로 판단

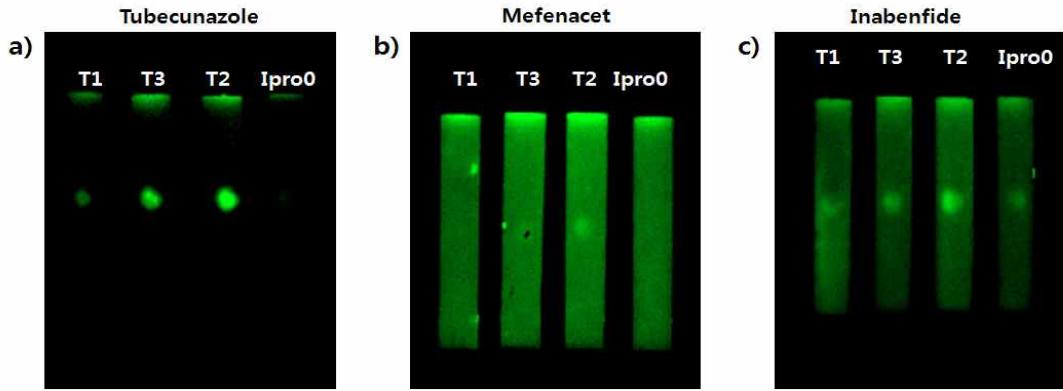
다) WellKorea에서 제작한 Case에 스트립을 적용한 최종제품형태에서의 잔류농약 검출

- ◆ Well-korea에서 제작된 Case에 본 연구진이 개발한 잔류농약 검출용 스트립센서를 적용하여 실제 농약에 대한 검출 실험을 실시하였음.
- ◆ 현재까지 개발되어있는 압타머 4종을 이용하여 스트립을 제작하였고 이를 쌀에 적용한 각각의 잔류 농약 3종에 대하여 최적화된 조건에 입안하여 실험을 진행하였음.

Aptamer name	Target
T1	Tebuconazole
T2	Tebuconazole Inabenfide Mefenacet
T3	Tebuconazole Inabenfide
Ipro0	Iprobenfos

[표. 각 압타머별 검출 농약 리스트]

- ◆ 위의 표에서 확인할 수 있듯이 해당 압타머가 각각의 농약에만 특이적인 것이 아니라 복합적으로 결합력 가지고 있음.

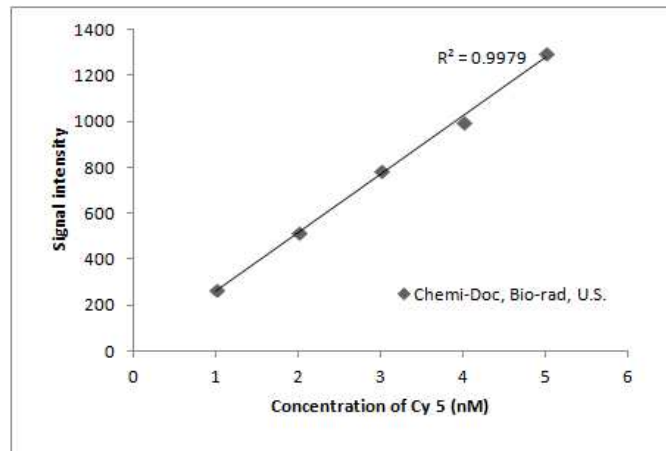


[Case에 넣은 후 최종 제품형태의 잔류농약 검출 Kit에 대한 각각의 농약에 대한 검출 한계치 실험 결과 a) Tubecunazole 10ppb 적용, b) Mefenacet 10ppb 적용, c) Inabenfide 10ppb 적용]

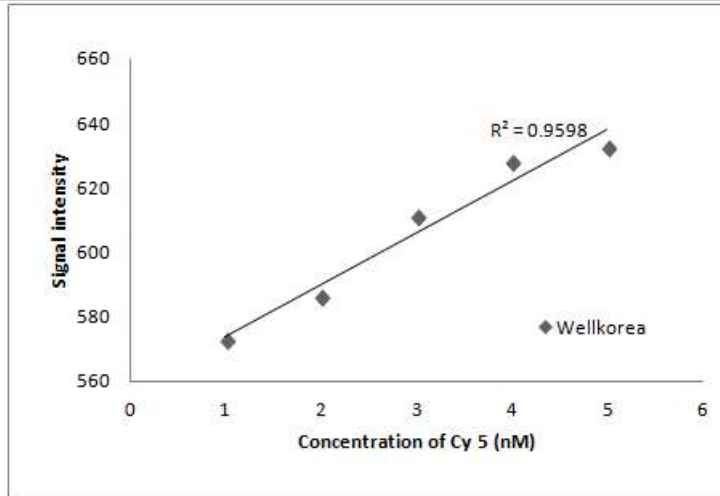
- 위의 결과에서 확인할 수 있듯이 본 연구진이 개발한 시스템의 경우 Tubecunazole의 경우에는 T1, T2, T3 농약에 모두 반응하기 때문에 a)의 결과에서 확인할 수 있듯이 3개의 압타머에서 다 시그널이 나옴을 확인할 수 있었고, Mefenacet의 경우에는 T2 압타머에만 반응하기 때문에 위의 결과에서 확인할 수 있듯이 T2 압타머가 있는 스트립에서만 형광신호가 나옴을 확인할 수 있었음. 마지막으로 Inabenfide의 경우에는 T2, T3에서만 반응성이 나와야함, 결과 비교적 두 개의 스트립영역에서 잘 나옴을 확인함.

다. 정량적 측정을 위한 압타머 기반 스트립센서의 검출기 성능 비교분석

- 현재 상용화 되어 판매되고 있는 본 연구팀에서 연구에 사용한 Bio-rad사의 Chemi-Doc MP(5000천만원)와 dip-stick strip sensor의 현장적용을 위해 Wellkorea(1000만원)에서 제작한 이미지 장비를 이용하여 형광물질을 10~50nM 농도를 각각 스트립위에 적용한 후 결과를 확인한 것임
- 본 연구진이 잔류 농약을 검출하기 위해 사용하는 형광-압타머의 농도가 50nM이기 때문에 해당 농도에서의 검출 선형성이 매우 중요하기 때문에 수행하였음
- 위의 결과에서 확인할 수 있듯이 Bio-Rad사의 Chemi-Doc MP장비에 비해 협동연구기관(WellKorea)이 제작한 이미지 장비로 측정된 결과가 선형성은 낮게 나오는 것으로 확인이 되었으나, 현장에서 dip-stick strip sensor를 이용하여 농약을 검출하는 것은 문제가 없는 것으로 보임

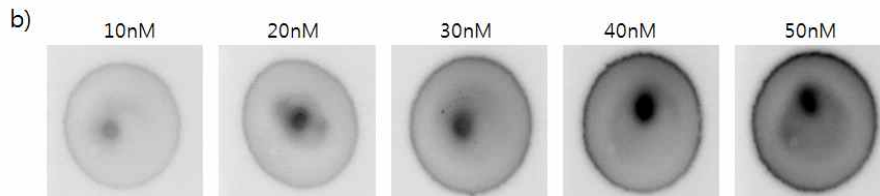
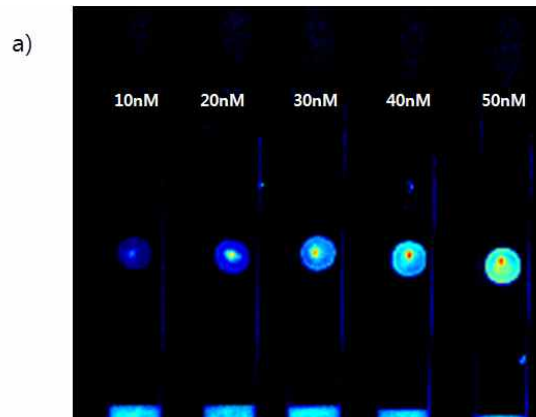


[Bio-rad 사의 Chemi-Doc MP를 이용하여 표준 형광물질 분석 결과]

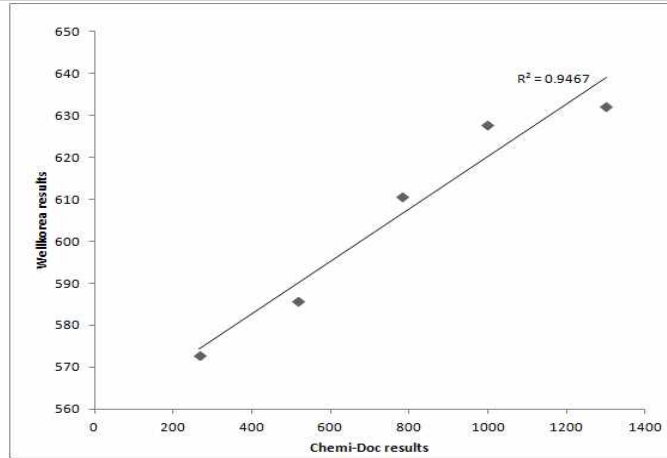


[(주)웰코리아에서 개발된 장비를 이용한 표준 형광물질 분석결과]

- ◆ 추가로 두 장비를 이용한 분석결과를 가지고 상대비교결과를 분석해 본 결과 추세선이 0.9467로 결과에 대한 매우 높은 유사성을 나타내지는 않지만 두 장비 모두 농도에 의존하여 비슷한 형태의 결과를 도출하고 있음을 의미함
- ◆ 이상의 결과에 비추어 본 연구진이 개발한 장비가 기존의 제품화된 장비와의 성능에서 큰 차이를 나타내고 있지 않기 때문에 충분히 사용이 가능할 것으로 판단됨



[a) Chemi-Doc MP(Bio-rad, U.S.)를 이용하여 형광 이미지 결과, b) (주)웰코리아 장비로 분석한 형광 이미지 결과]

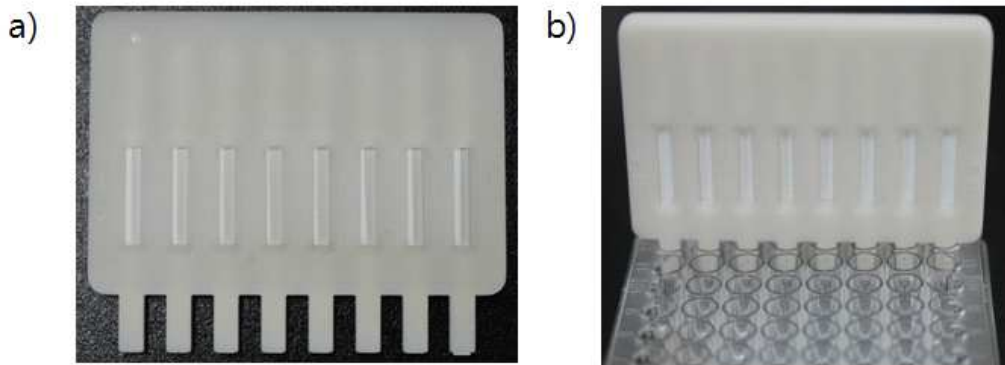


[Chemi-Doc MP vs. WellKorea 형광이미지 장비의 상대비교결과]

라. 잔류농약 검출용 스트립센서 안정화 실시

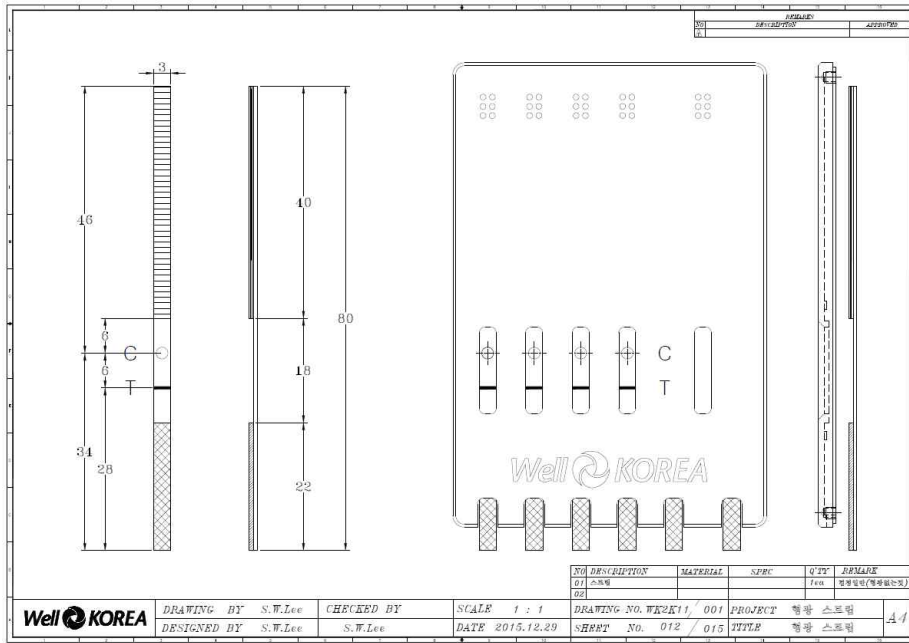
1) 효소-압타머 기반 스트립 센서 case 디자인

- ◆ Dip-stick 스트립센서의 산업화를 위한 가장 중요한 요소 중 하나는 사용시약의 안정성 확보임
- ◆ 본 연구진은 해당 부분에 대한 연구를 진행함
- ◆ 본 연구진은 개발된 잔류 농약 검출용 스트립을 이용하여 보관 온도, 습도 그리고 케이스의 유무 등의 영향에 의한 영향을 살펴보기 위한 연구를 진행하였음
- ◆ 초기의 스트립센서의 case는 아래의 그림과 같이 흰색의 플라스틱을 이용하여 case를 제작하였음.

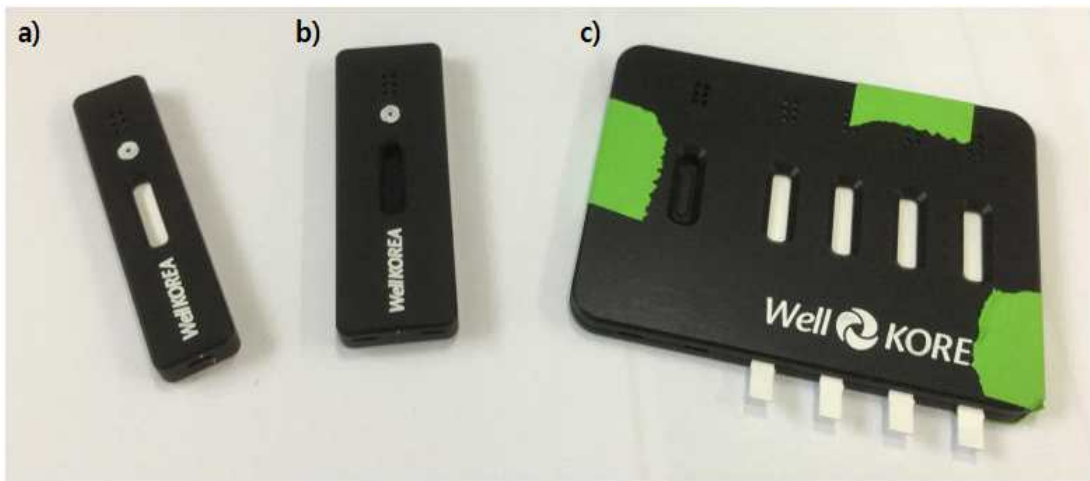


[a) 다채널 Dip-stick strip aptasensor 최초 플랫폼, b) 다채널 Dip-stick strip aptasensor 적용 예시]

- ◆ 그러나 흰색을 기초로한 케이스의 경우 형광측정기 상에서 자체 형광을 나타내는 경우가 발생하여 검은색 바탕의 case를 제작하기로 결정하였고, 효소-압타머 복합반응 기반한 스트립센서의 분석을 위해 아래와 같이 2협동기관인 (주)웰코리아와 같이 공동연구하여 case를 디자인과 제작을 완료하였음
- ◆ 본 연구진은 효소-압타머 복합반응 기반 스트립센서의 최적화된 조건을 이용하여 (주)웰코리아와 협의를 통해 최종 제품화 형태 디자인에 기여하였음



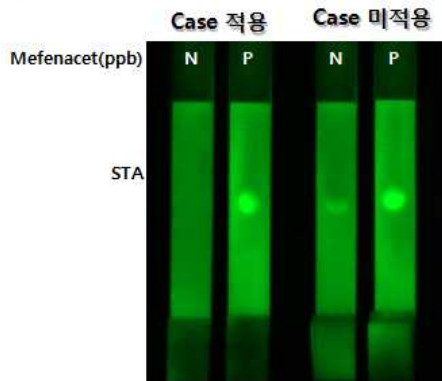
[1,2협동 연구팀의 공동연구를 통한 효소-압타머 기반 스트립센서 케이스 디자인]



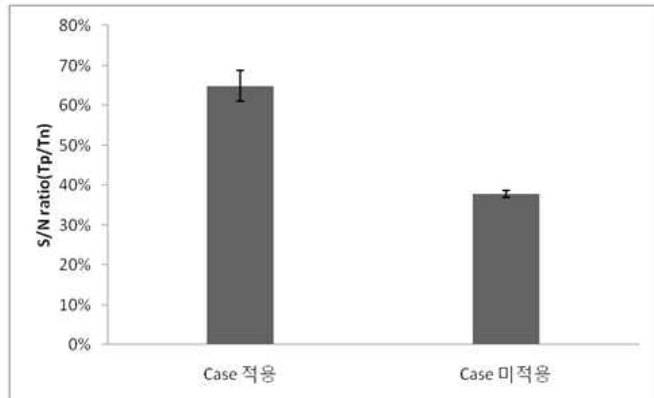
[(a) 압타머 기반의 단일 농약 검출 case 디자인, b) 효소 기반의 농약 정성적 검출 case 디자인, c) 잔류 농약 다중 검출 case 디자인]

- ◆ 실제 스트립센서의 경우에는 case 유무에 따라 결과가 변하는 경우가 존재하기 때문에 본 연구진은 위의 case를 이용하여 본 연구진의 개발된 스트립센서의 구동 여부를 확인 실시하였음
- ◆ 최적화된 형태의 스트립을 이용하여 농약에 대한 성능에 대한 검증을 실시하였음
- ◆ Case를 적용한 것과 적용하지 않은 스트립을 이용하여 성능에 대한 검증을 실시하였으며 검증에는 mefenacet 100ppb를 적용하여 On/Off test를 이용하여 S/N를 분석하여 확인하였음
- ◆ 아래 그림의 결과에서 확인할 수 있듯이 (주)웰코리아와 협의를 통해 만든 case를 사용하는 경우 보다 S/N가 높아져 보다 잔류농약의 잔류 여부를 더 큰 값의 차이로 확인하였음

a)



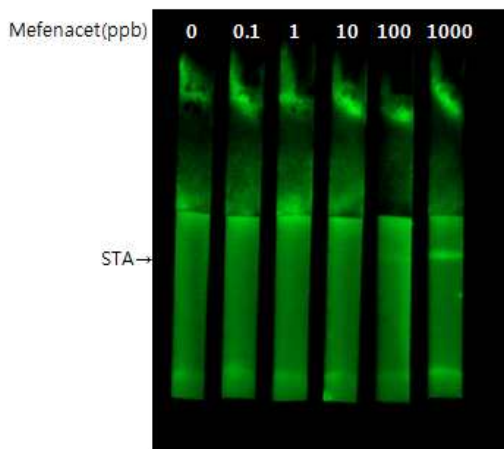
b)



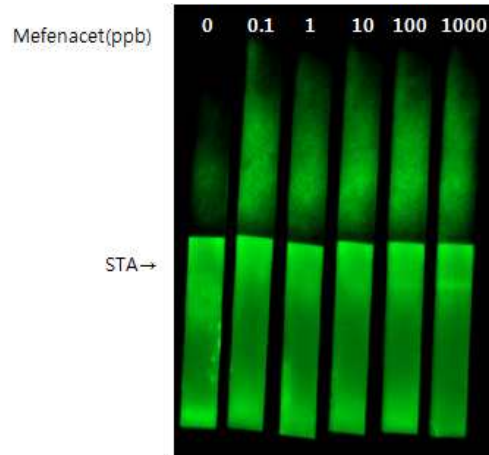
[(a) case 적용 Vs. 미적용 실험결과 이미지 (Chemi-Doc), b) Signal to noise 분석결과]

2) 보관환경에 따른 유효기간 확인

- ◆ 제작된 스트립센서를 일반적으로 스트립을 보관하는 환경인 습도가 5% 미만으로 조절되고 온도는 상온인 환경에 제조 후 1일, 제조 후 60일 된 스트립을 이용하여 보관환경에 따른 유효기간에서 확인이 되는지에 대한 부분의 연구를 진행하였음



제조 1일 후



제조 60일 후

[잔류농약 검출 스트립을 이용한 기간에 따른 성능 확인 결과.,
(좌) 제조 후 1일, (우) 제조 후 60일]

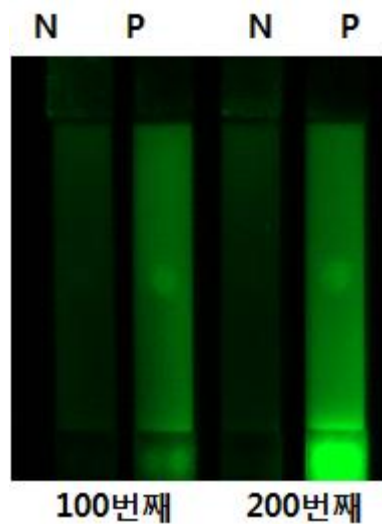
- ◆ 확인은 농약인 Mefenacet을 이용하여 0.1ppb부터 1ppn 농도까지 변화가 있는지에 대한 부분을 확인하기 위해서 농도별로 각각 연구를 진행하였음
- ◆ 위의 그림에서 확인할 수 있듯이 일반적으로 스트립제조 시 보관 조건인 습도 5% 미만의 상온 환경에서 1일 결과에서도 기준 농도치 이상 확인할 수 있었을 뿐 아니라 60일 이후에도 기준 농도치까지 검출됨을 확인할 수 있었음
- ◆ 다만 60일이 지난 경우 스트립에 background가 비교적 높아져서 S/N의 비가 감소하는 경향을 가짐을 확인할 수 있었으나 형광이 검출되는 절대값에서는 차이는 나타나지 않아서 신뢰도에는 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었음

라. 센서 제조공정 최적화 및 간소화 전략 수립 ((주)웰코리아와 협의)

- ◆ Dip-stick 스트립센서에 대한 산업화를 진행하기 위해서 가장 중요한 요소는 사용되는 시약의 안정성 확보 및 스트립 패터닝 기술의 확보임
- ◆ 본 연구진은 해당 부분에 대한 연구를 진행하고 산업화를 위한 scale-up 조건을 위해 실험실 내에서 200 kit 제작에 따른 영향을 확인하였음

1) 대량 생산에 따른 영향 확인

- ◆ 실험실 내에서 200 kit 이상의 제작을 수행하였고 이를 통한 대량에 있어 문제점을 도출하는 연구 진행한 결과 아래와 같이 처음 제작한 kit과 100번째 200번째 제작된 kit에서 동일한 결과를 확인할 수 있어 대량생산에 따른 실온 기간에서의 일정기간의 방치는 kit의 제작에 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었음
- ◆ 본 실험은 T2 압타머를 이용하여 Tubecunazole 100ppb를 적용하여 진행하였음.



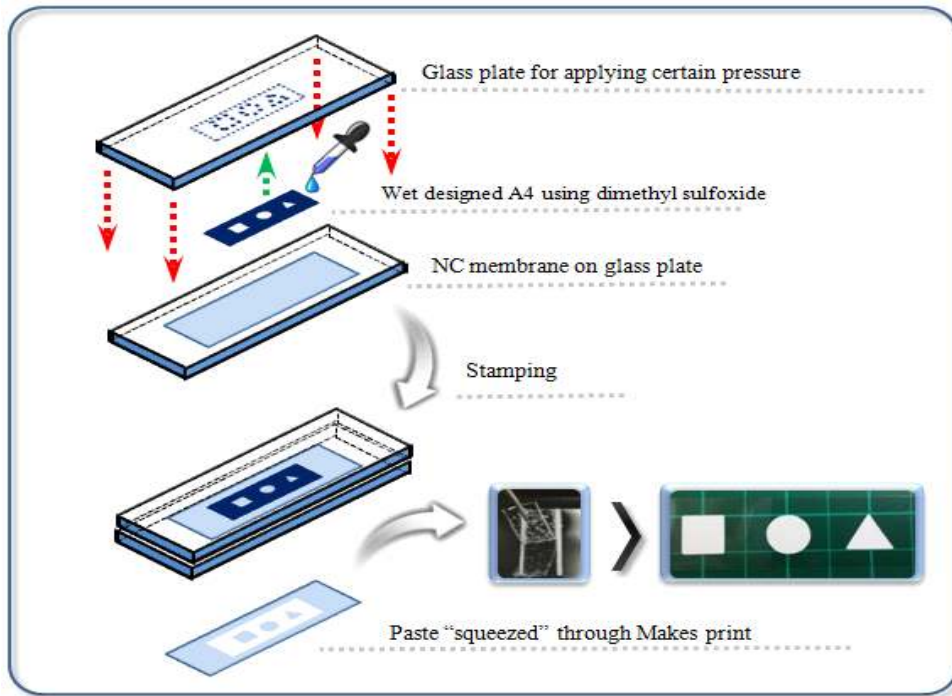
[200 kit 제작 시 초기, 100번째, 200번째 제작 kit에 대한 음성, 양성시료 분석 결과]

- ◆ 추가로 제작된 dip-stick strip을 포장하여 냉장 및 실온 조건에 보관하면서 활성이 유지되는 기간을 확인하는 연구를 진행 중에 있음

Low-cost Dip-stick strip 시스템 제조 시설 구축

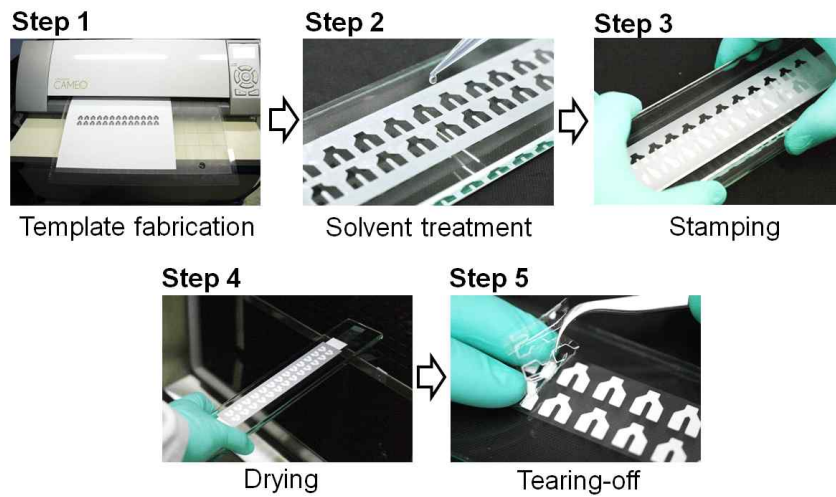
- ◆ Dip-stick strip 시스템을 구축하기 위해서는 위에 언급했듯이 시약과 스트립의 준비과정임. 특히 스트립 제작은 일반적으로 잘 알려진 시약의 안정성에 비해 다양한 형태의 패터닝 및 제조 환경에 대한 설비 투자 등으로 인해 고비용이 발생됨
- ◆ 본 연구진은 (주)웰코리아와 협의 후 (주)웰코리아에서 제조시설 설비를 최소화하여 Dip-stick 스트립 시스템을 구축하게 하기 위해 새로운 플랫폼의 Dip-stick 스트립시스템을 구현함
- ◆ 일반적으로 스트립 패터닝을 하기 위한 기술은 laser 가공, screen-printing, wax-printing 같은 기술을 이용하여야하나 laser 가공 기술 및 screen-printing 기술의 경우에는 시설에 대한 시설 구축 비용이 높으며 비교적 저렴한 wax-printing의 경우에는 대량 생산 시스템에는 적합지 않은 특성이 있음

- ◆ 본 연구진은 이러한 시스템의 단점을 배제 할 수 있는 tear-off patterning 기술을 개발 실시하여 (주)웰코리아의 초기 구축비 절감을 진행하려고 하였음



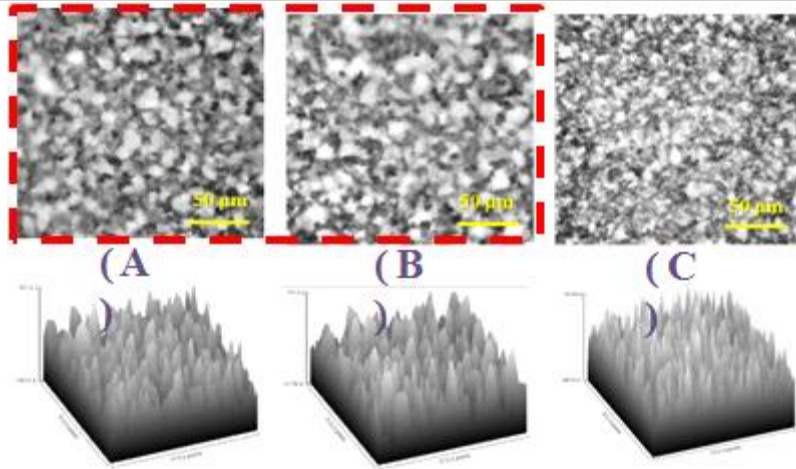
[농약 스트립 대량생산을 위한 Tear-off 패터닝 시스템 모식도]

- ◆ 위의 전략을 이용하여 본 연구진은 대량 생산을 위한 스트립패터닝 기술을 개발하였음



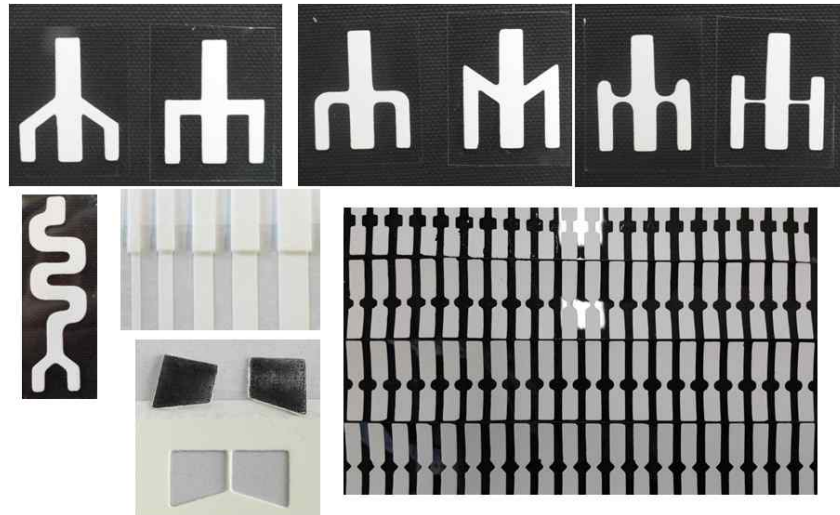
[Tear-off 기술을 이용한 농약검출용 대량생산 생산 과정도]

- ◆ 본 연구진은 NC membrane이 유기용매에 의해서 녹는 특성을 이용하여 원하는 패턴을 시스템 구축비 100여 만원으로 구축할 수 있는 시스템을 개발완료 함
- ◆ 기존의 방법인 Screen-printing 기술과 비교연구를 통하여 본 연구진이 개발한 방법에 대한 유효성을 검증함



[Screen-printing(A), Tear-off(B), Wax-printing(C)으로 patterning 후 NC membrane의 상태 확인 결과]

- NC의 경우 압력이나 생산 시 주변에 환경에 의해 상태가 달라질 수 있는데 위의 결과에서 확인할 수 있듯이 Screen-printing을 한 것과 Tear-off 방법을 이용하여 patterning 한 경우가 NC membrane에 전혀 손상을 주지 않고 patterning을 실시 할 수 있음을 확인함
- 본 연구진은 개발된 Tear-off system을 이용하여 다양한 형태의 patterning을 실시 및 대량생산에 대한 가능성 확인 실시함



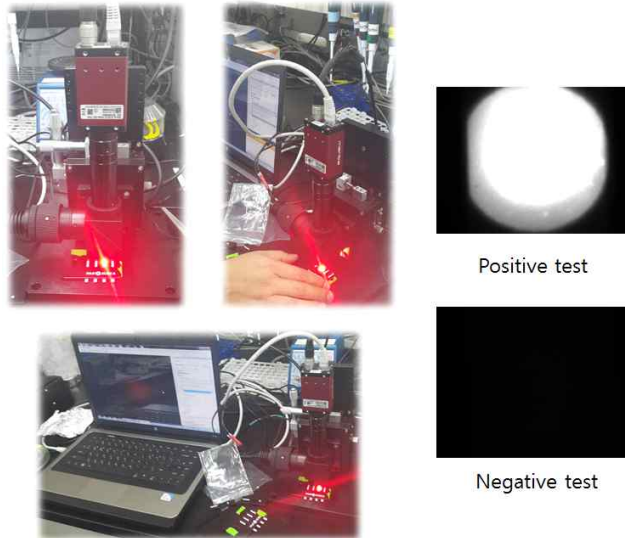
[Tear-off system을 이용한 다양한 형태의 스트립 패턴 형성 결과 및 대량생산성 확인 결과]

마. 압타머-효소 복합반응 기반의 다채널 스트립 센서 평가 및 개선

- 2협동 기관에서 제작하고 있는 스트립센서 검출기를 이용한 압타머-효소 복합반응 기반의 스트립 센서에 대한 평가 및 개선책을 평가하였음
- 2협동 기관 (주)웰코리아에서 제작 중인 검출시스템은 현재 상품화를 진행 중에 있으며, 공동연구를 위해서는 벌크타입의 검출기를 이용하였음
- 벌크타입의 검출기의 형태는 아래와 같으며 현재까지는 가로세로 2 mm 범위를 검출할 수 있는 수준이었음
- 검출기의 경우 1협동기관에서 사용하고 있는 측정기인 Bio-Rad 사의 Chemi-DOC MP system은

1 μM 의 형광물질을 검출할 수 있으나, 제작 중인 검출시스템은 50 μM 농도의 형광물질을 검출할 수 있는 것으로 확인됨

- ◆ 그러므로, 2협동 기관에서 제작 중인 검출기를 이용하여 농약 검출 시스템을 산업화할 경우 시약의 처리농도에 대한 최적화를 조정할 필요가 있음



[현장 측정기를 위한 효소-압타머 기반 농약 스트립센서 평가]

바. 사용자 매뉴얼 (짧은 측정시 총 측정시간: 약 12분 소요)

- ◆ Sol A : MES 6.0 buffer, 100mM NaCl, 15% 메탄올
- ◆ 구성품 : 1.5~3mL tube, Sol A, well plate, 잔류 농약 검출용 스트립, 잔류 농약 검출기 (WellSense™), 스포이드.

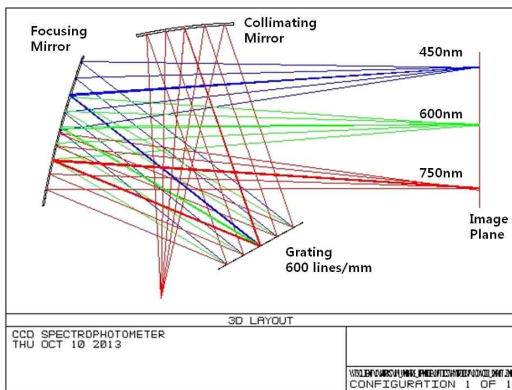
- ① 잔류 농약검사를 위한 시료 혹은 절편 준비 (대략 1mg 정도)
- ② 시료 절편을 1.5~3ml tube에 넣고 Sol A을 채워넣어 준다.
- ③ 5분간 방치 후, 잔류 농약 검출용 스트립이 연결되어 있는 well plate에 스포이드로 2-3회 채워넣어 스트립이 젖을 수 있도록 넣어준다.
- ④ 스트립이 젖기 시작한 후 5분간 방치 한 후 꺼내어 잔류농약 스트립센서 검출기(WellSense™)에 적용하여 검출 유무를 확인한다.

[제2협동]

[1차년도 연구 수행 결과]

가. 분광 광학 시스템 설계

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



[분광분석시스템의 광학 설계 및 시작품]

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

수차를 최소화하기 위하여 Bicon 형태의 오목거울을 이용하였다.

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

[표 M-1. 분광 시스템의 성능표]

Performance Test Report

1) Wavelength Accuracy (Holmium Oxide, Serial No. 15997)

Certified Value	451.36nm	485.21nm	537.21nm	641.15nm
Measured Value1	452.0nm	485.0nm	537.0nm	641.0nm
Measured Value2	452.0nm	485.0nm	537.0nm	641.0nm
Measured Value3	452.0nm	485.0nm	537.0nm	641.0nm
Mean.	452.0nm	485.0nm	537.0nm	641.0nm
STD.	0.00	0.00	0.00	0.00

2) Photometric Accuracy & Reproducibility (Neutral Density Filter, Cert No. 15630)

Wavelength	465.0nm	546(546.1)nm	590.0nm	635.0nm
Certified Value	0.959	0.990	1.028	0.981
Measured Value1	0.945	0.995	1.035	0.995
Measured Value2	0.942	0.993	1.038	0.995
Measured Value3	0.947	0.997	1.039	0.997
Mean.	0.945	0.995	1.037	0.996
STD.	0.003	0.002	0.002	0.001

3) Baseline Flatness (450~750nm, Scan Step = 1nm)

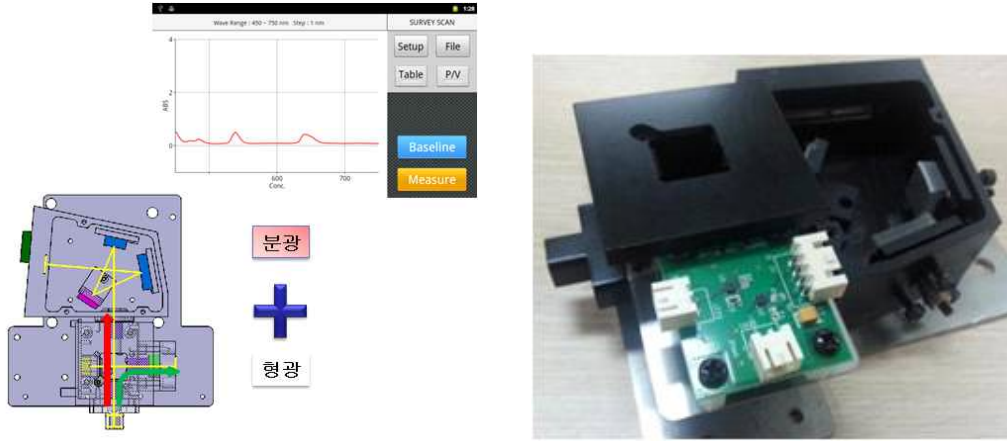
	Max. ABS	Min.ABS	Max.-Min.	(Max.-Min.)/2
Measured Value 1	0.001	-0.003	0.004	0.002
Measured Value 2	0.002	-0.003	0.005	0.003
Measured Value 3	0.001	-0.003	0.004	0.002

[표 M-2. 분광 시스템의 성능결과표]

- Liquid Sample 측정을 위한 앞서 설계한 분광시스템을 기반으로 형광/분광 통합시스템 개발을 위해 Light Source를 LED로 사용하고 PD/CCD 검출기를 이용하여 Spectroscopic Optical System을 Design 하였다. 형광은 UV LED 와 PD 형태, 분광은 White LED 와 Spectrographic(CCD) 형태

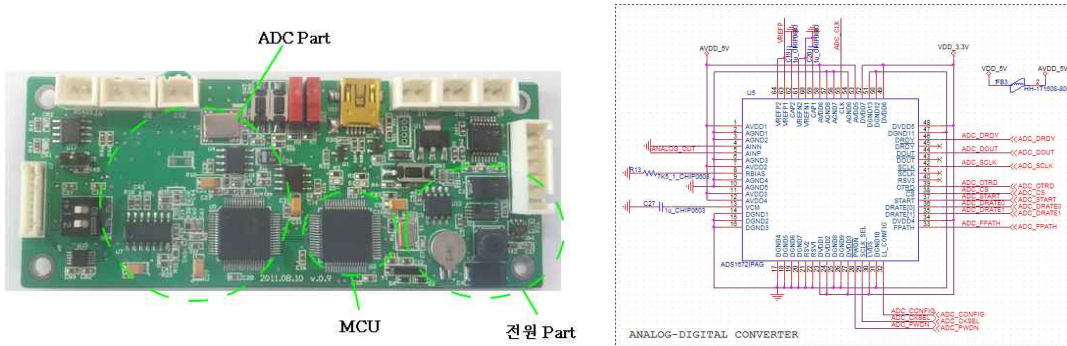
로 450 ~ 750 nm, 10nm Bandwidth, -0.5~2.000 ABS 의 Spec 결정되었다.

- 본 연구에서 사용되는 형광 특성은 아직 정해지지 않아 임의적으로 형광분석시스템의 광원은 분광분석시스템의 광학 설계에 따라 370nm LED를 적용하고 광원의 Bandwidth를 보장하기 위하여 10nm의 Bandwidth를 갖는 370nm 간섭필터를 사용하였으며, 형광 반응 분석 시스템은 400-700nm 영역의 분석이 가능한 분광 분석 시스템을 구성하였다.



[형광/분광 측정 통합 시스템]

나. CCD 모듈 설계



[CCD 측정부 보드(좌) 및 ADC 회로(우)]

- CCD 측정부 보드 구성은 위 그림에서 볼 수 있듯이 CCD 또는 PD 보드에서 측정된 아날로그 신호를 디지털 신호로 변환하기 위한 ADC 구성부와 이 디지털 신호를 처리하는 ST사의 STM32F103을 사용한 MCU, Control 보드의 설정 값들을 저장할 수 있는 EEPROM, BASE 보드와 데이터 송수신을 위한 통신부, 그리고 Control 보드의 전원 관리를 할 수 있는 전원부로 구성되어 있다.
- 아날로그 신호를 디지털 신호로 변환하기 위해서 24-Bit Analog-to-Digital Converter를 사용하였고, CCD 센서에서 측정된 아날로그 DATA를 Digital로 변환하여 SPI 통신으로 MCU로 DATA를 전송한다. ADC는 MCU의 IO포트와 SPI 통신을 통해서 제어가 가능하다.
- 이 ADC 회로를 통해 얻을 수 있는 샘플링 속도는 78.125kSPS(=12.5us)이고, 이 샘플링 속도에서 얻을 수 있는 DATA의 수는

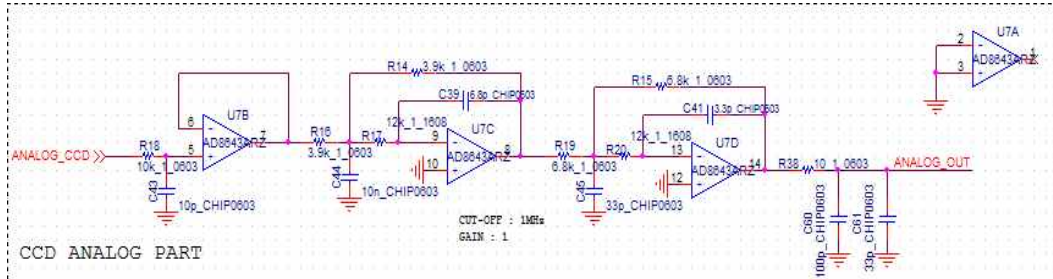
CCD pixel 수 : 3648(약 3700)

CCD Master Clock : 0.8MHz(=1.25us)

CCD DATA Rate : 0.2MHz(=5us)

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

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



[아날로그 필터 회로]

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



CCD 모듈



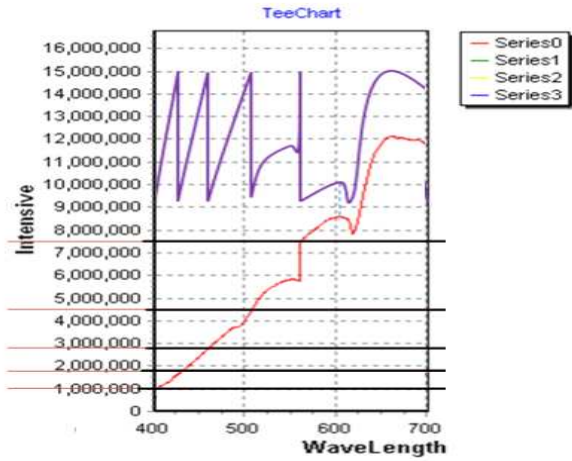
Analog Part

[CCD 센서 보드]

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

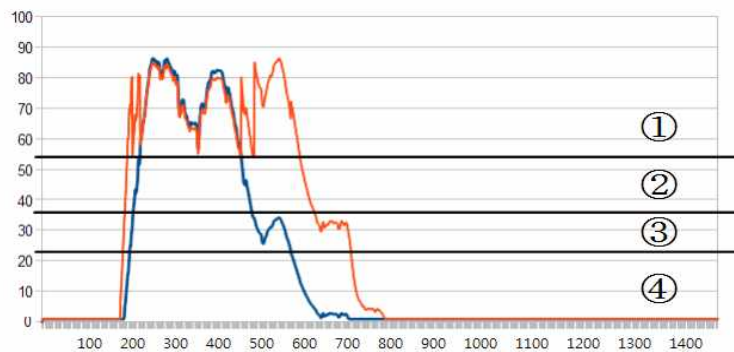
[표 M-3. CCD 이미지 센서 주요 특징]

다. CCD 측정 알고리즘



[CCD 알고리즘 원리]

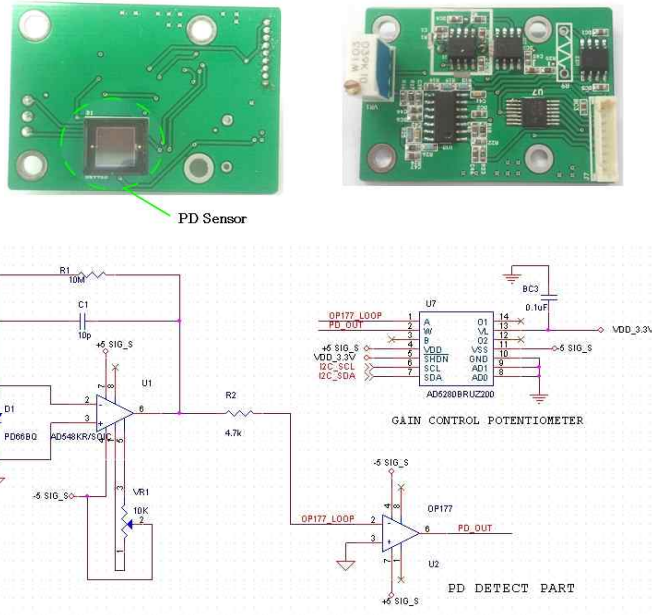
- ◆ 위 그림에서 붉은색으로 표시한 선은 기본 광량에서 측정한 데이터이고, 이 기본 광량을 6개의 구간으로 나누어 (그림에서 5개의 검은 선) 각 구간별로 최대값들이 설정한 목표 범위에 들어갈 수 있도록 노출시간을 조정하여 데이터를 측정한다. 노출시간을 달리해서 측정한 6개의 데이터를 합하면, 그림M-6에서 보라색 선으로 표시할 수 있다.
- ◆ 이렇게 기본 광량에서 구간을 설정한 후 목표 범위에 도달할 수 있도록 노출시간을 조절하여 충분한 광량을 나타낼 수 있게 하는 방법을 FULL AUTO GAIN CONTROL(이하 Full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



[Full AGC DATA]

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

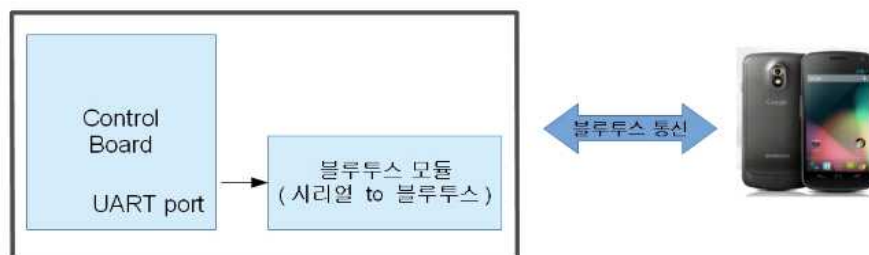
라. PD 측정 모듈



[PD 센서보드 구성도(위) 및 회로도(아래)]

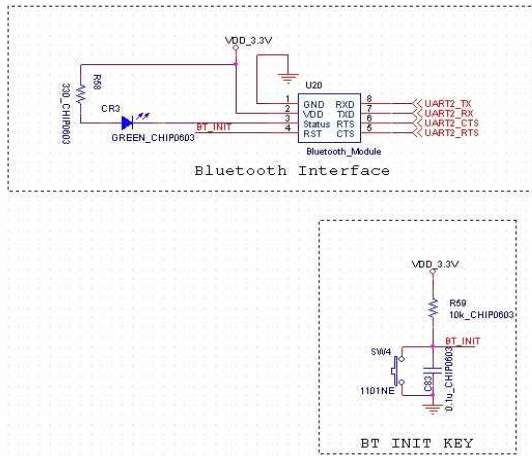
- 위 그림은 PD 센서보드로 HAMAMATSU사의 S1336BR Visible 영역 PD 센서를 사용하여 형광량을 측정하도록 사용하였다. DIGITAL Potentiometer를 적용하여 Reference 측정시 최적의 광량을 회로상의 Gain 조절을 통하여 이루어지도록 구현하였으며 이와 같은 구성시의 장점으로는 보다 높은 분해능의 저해율을 계산할 수 있으며, 시료별 Reference 값이 달라짐에 따른 Gain 튜닝 작업을 SW를 통하여 쉽게 적용할 수 있다. AD5280BRUZ200 은 내부 저항값이 최대 200kΩ으로 총 255단계까지 MCU와 I2C 통신을 통하여 조절이 가능하게 되어 있다. 최대 증폭율은 200kΩ / 4.7kΩ 으로 입력 신호 대비 약 42배까지 증폭할 수 있다.

마. 무선 통신(B/T) 환경 구축



[무선 통신 환경 구축의 예]

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

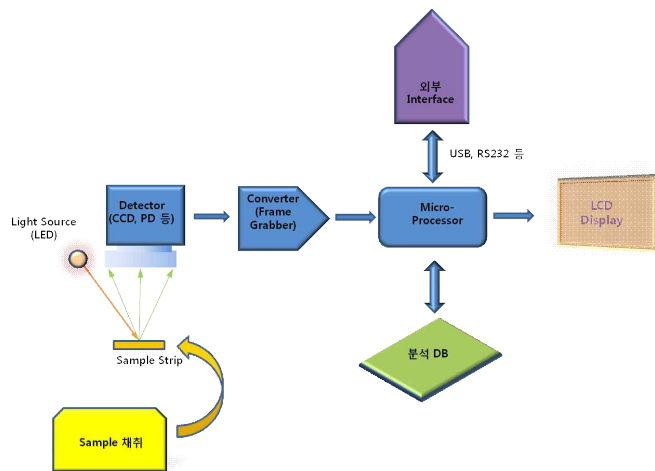


[BT Interface 회로도(좌) 및 사용 모듈(우)]

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

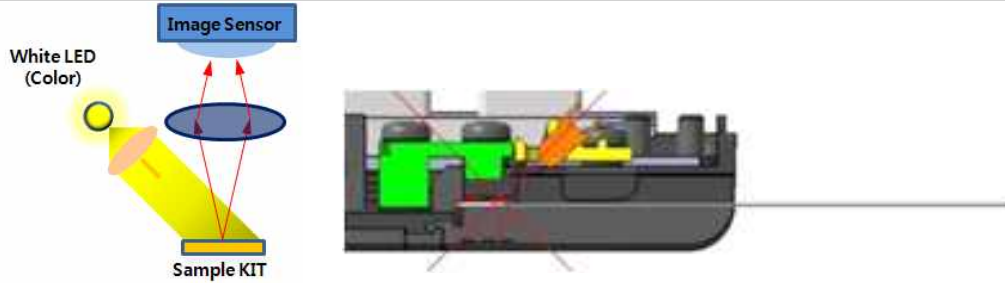
바. 스트립 측정 모듈

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



[스트립 측정 원리]

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



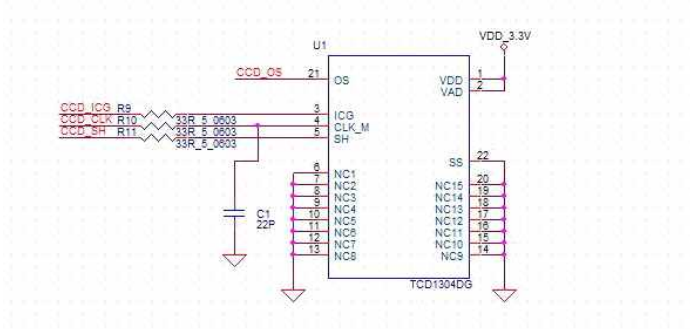
[스트립 측정 모듈 개략도(좌) 및 설계 모듈(우)]

- 설계된 스트립 측정 모듈의 검증 을 위하여 상용 스트립(수질 정도 측정용)을 이용하여 스트립의 색 변화를 측정하였다. 측정 모듈의 측정 재현성 확인을 위하여 동일 스트립으로 120회 반복 측정하여 측정 재현성을 확인하였다. 측정 결과 표준편차가 0.105로 측정 평균값에 비하여 매우 작은 값으로 측정 재현성이 우수하다고 할 수 있겠다. 실제 샘플의 반복 측정에서는 위 그림에서와 같이 반응 시간에 따른 재현성이 확보되지 않아서 측정 모듈의 반응 재현성을 확인할 수는 없었지만 샘플 농도별 발색 정도를 구분하고 시간별 변화율을 감지할 수 있음을 알 수 있다. 향후, 시간별 발색 변화율을 이용하여 반응시간을 단축하고 측정 재현성을 높일 수 있는 알고리즘을 개발할 예정이다.

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

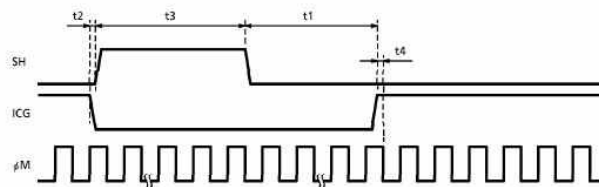
[표 M-4. 스트립 발색반응 재현성 측정 결과]

사. 이미지 센서 모듈 설계



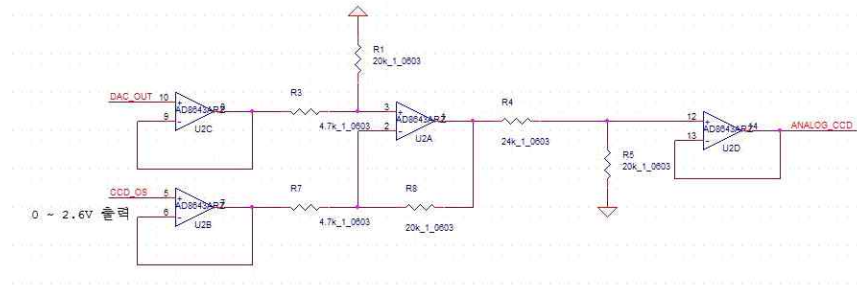
[M-14. 이미지 모듈 main 부]

TIMING REQUIREMENTS



[이미지 모듈 타이밍도]

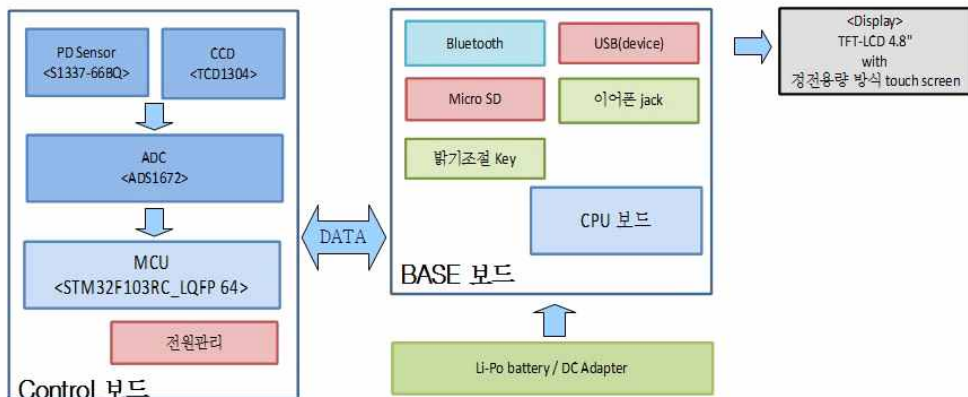
- MCU의 IO를 통해서 이미지 모듈의 제어 IO(ICG / CLK / SH)에 신호를 보냅니다. 여기서 제어 IO에 보내는 신호는 이미지 모듈의 타이밍 조건에 맞도록 보내고, 이미지 모듈에서 처리된 신호(CCD_OS)는 아날로그 필터를 거쳐서 Control Board의 ADC에 의해서 디지털화를 합니다.



[아날로그 필터 회로]

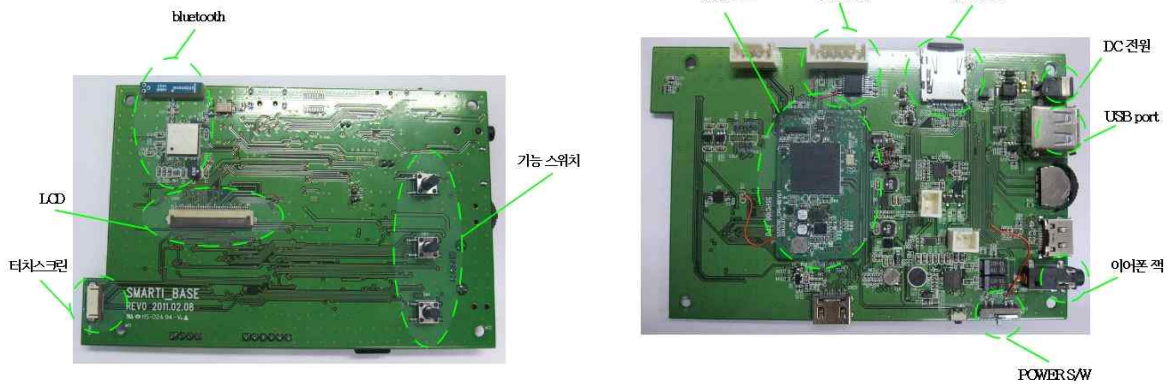
- 이미지 모듈에서 나오는 신호(CCD_OS)는 Control Board로 가기 전에 아날로그 필터를 거치는데, 이 부분에서는 REF 값을 Controller의 DAC 신호를 통해서 조절을 합니다. 이 REF값을 통해서 OFFSET 조절을 할 수 있습니다.

아. 전자 H/W 개발



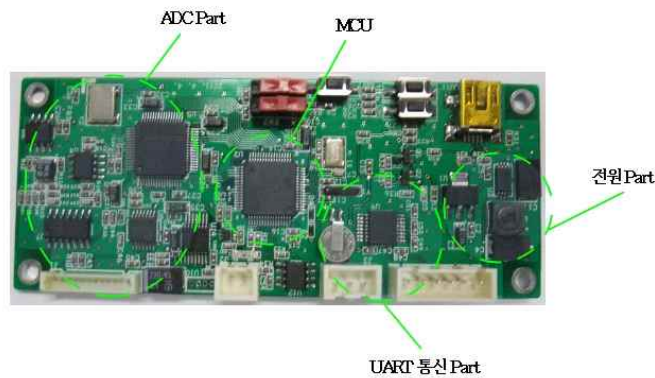
[전자 H/W 구성도]

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



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

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



[Control 보드 구성]

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

[2차년도 연구 수행 결과]

가. 고감도 광학 센서 시스템 개발1) 카메라 보드 렌즈 모듈 설계

- ◆ 스트립의 이미지 측정을 위해서는 이미지 취득을 위한 이미지 센서 모듈과 이미지면으로 스트립의 영상을 전달하는 렌즈 모듈이 필요하다. 아래 사진은 렌즈 부품, 조립된 렌즈모듈, 카메라 보드에 렌즈 모듈이 조립된 이미지이다. 카메라 렌즈 모듈을 구성하기 위해 Diameter 12.0mm, Focal Length 10.5mm 의 Aspheric Condenser Lens 2개를 사용하였으며, 별도의 가공품 base 를 이용하여 조립된 렌즈모듈을 카메라보드 이미지 센서 앞에 위치시켰다. Light Tool을 이용한 렌즈 광학계 설계 자료를 바탕으로, 이미지센서와 각 렌즈 부품의 전후 거리 조절을 통해 align을 진행, 가장 선명한 상을 갖는 초점거리 정보를 얻고 이를 기준으로 조립시 렌즈의 위치를 적용했다. Align된 각 렌즈 부품은 조절된 거리에 위치를 고정시킬 수 있는 측면 고정 볼트를 갖는다. 다음 그림은 마운트에 장착된 카메라 렌즈 모듈과 측정샘플간의 간격을 확인할 수 있는 3D 모델링 도식화 이미지이다.

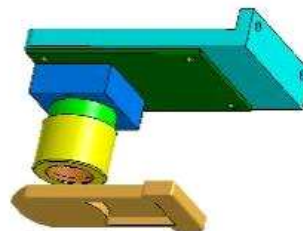
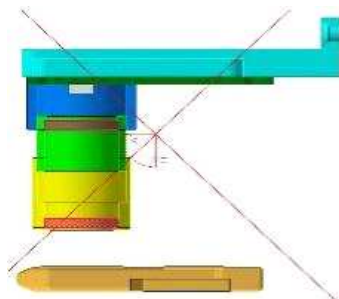


렌즈 및 렌즈 모듈



카메라 보드 및 렌즈 모듈 조립도

[카메라 보드와 렌즈 모듈 조립도]

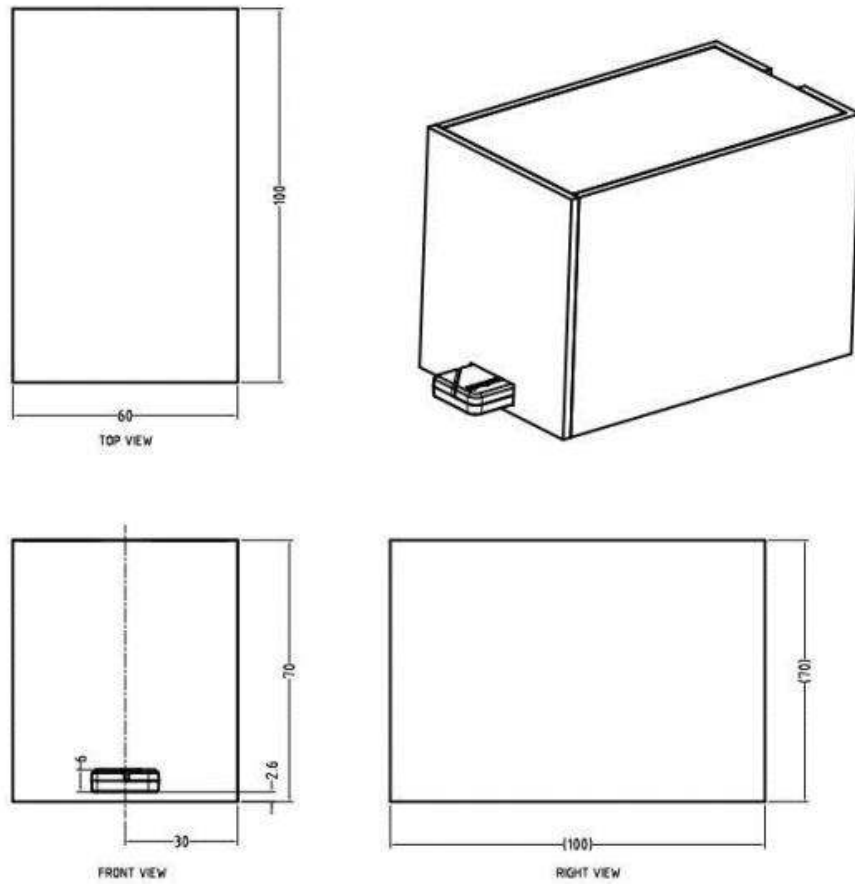


[마운트 장착 카메라 모듈 및 샘플 위치 참조도]

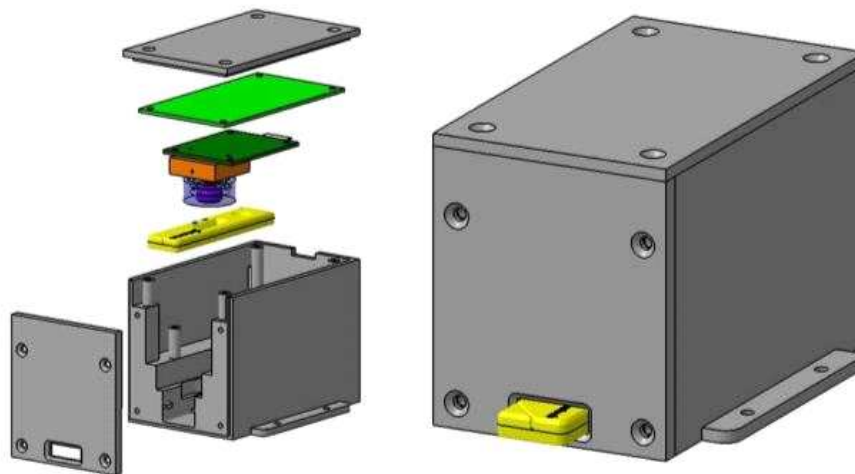
2) 측정 모듈 설계

- ◆ 측정 모듈이 휴대형 광학 검출 장치임을 고려하여 각 부품 및 외관 크기는 소형화에 초점을 맞추어 설계하였다. 광원으로 사용한 White LED 장착을 위해 LED Holder를 스트립 삽입 방향 대칭형으로 2개 장착하고, 각 LED에 가변저항을 추가하여 광의 세기를 조절하여 테스트할 수 있도록 구성하였다. 또한, 외부 잡광(Stray Light)을 차단하기 위해 스트립 투입구를 제외한 전체를

암막 형태로 밀폐시키는 구조로 설계되었다. 아래 그림은 스트립 측정 모듈의 외관 사이즈 참고 도면과 모듈의 분해 및 조립 3D 모델링 이미지이다.

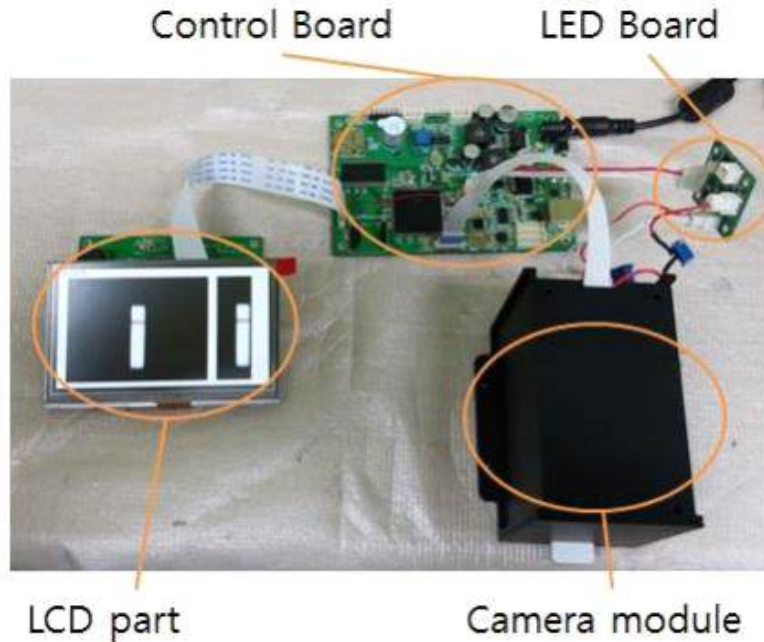


[스트립 측정 모듈 크기]



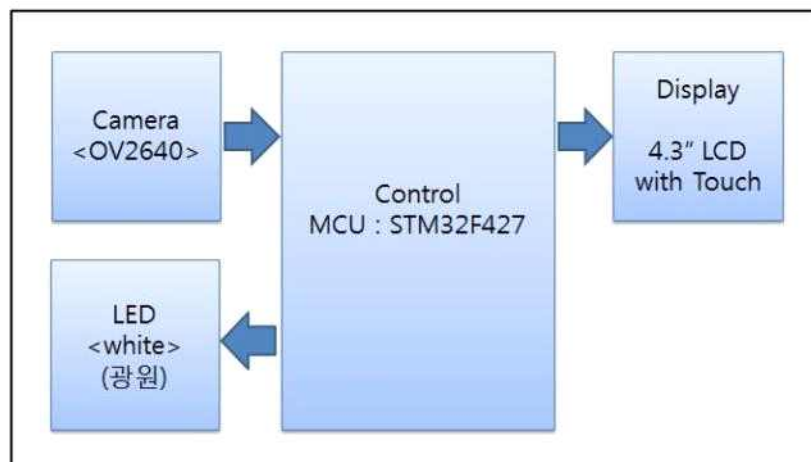
[스트립 측정 모듈 분해, 조립도 3D 모델링]

3) 스트립 측정 모듈 Proto-type 제작



[스트립 측정 모듈 테스트 시스템 구성]

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

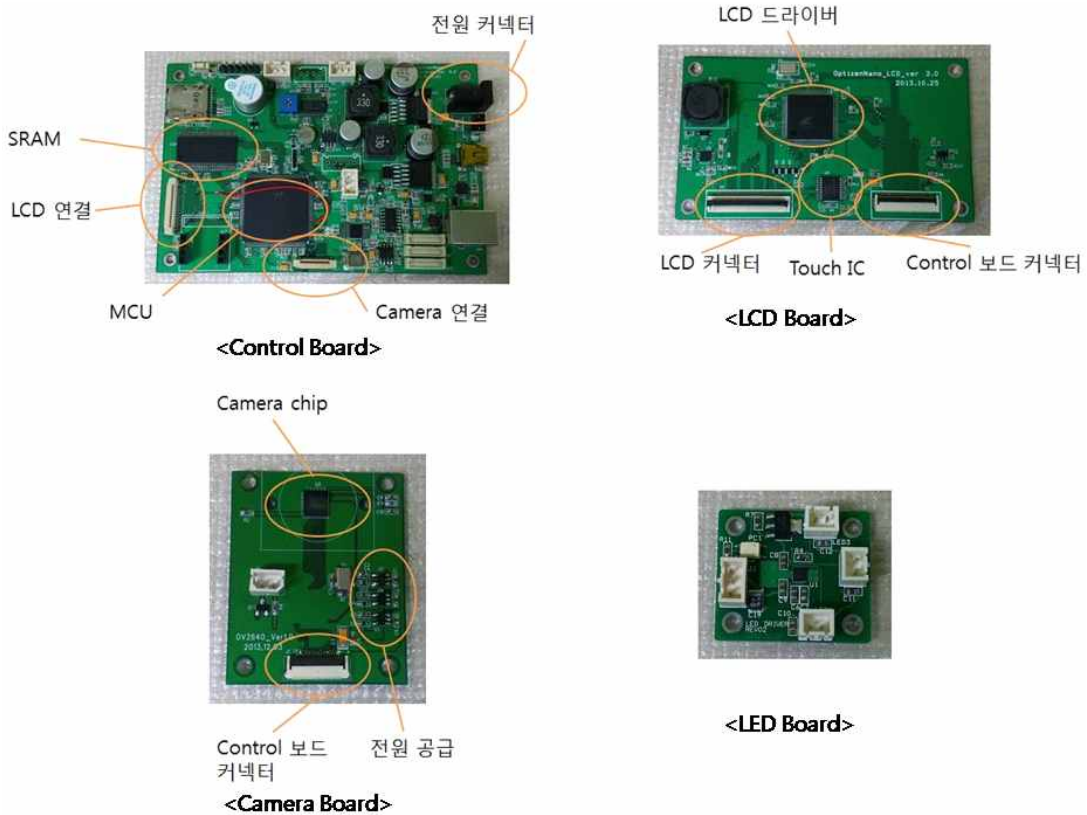


[테스트 시스템의 구동 시스템 구성]

- ◆ Control 보드에서는 Camera 모듈에서 찍은 스트립의 이미지를 LCD보드로 보내서 화면에 출력

할 수 있도록 하고, LED보드에 제어신호를 보내서 광원을 On/Off 할 수 있도록 한다.

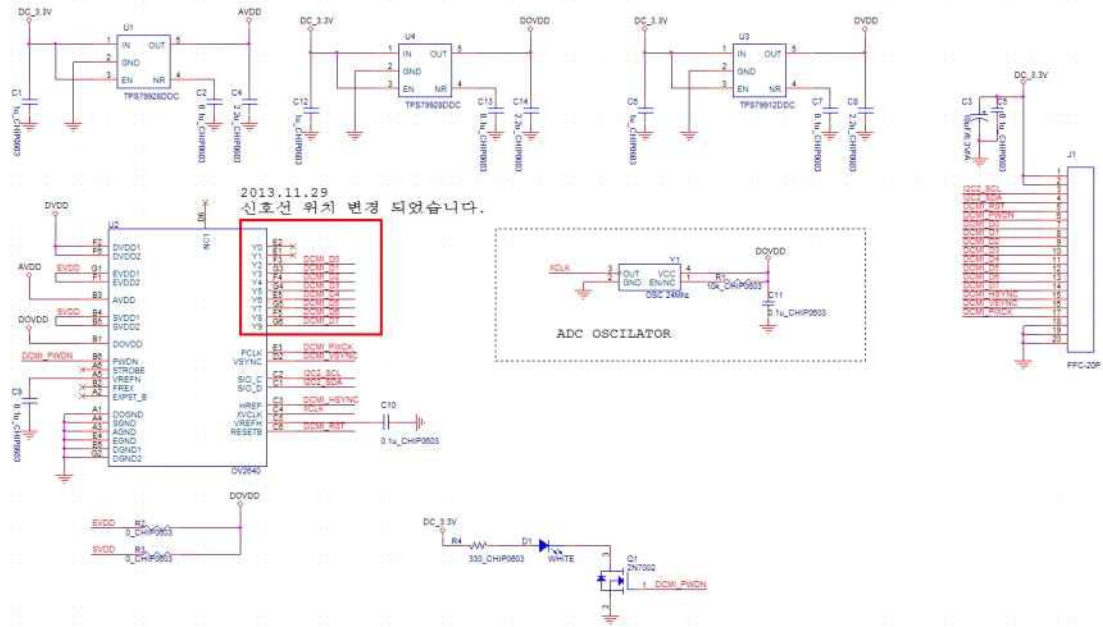
- ◆ 또한 터치스크린의 반응이 있으면, Control 보드의 프로그램에 의해서 촬영한 스트립의 이미지 처리를 진행하여, 이 결과를 시리얼 통신으로 전송한다.



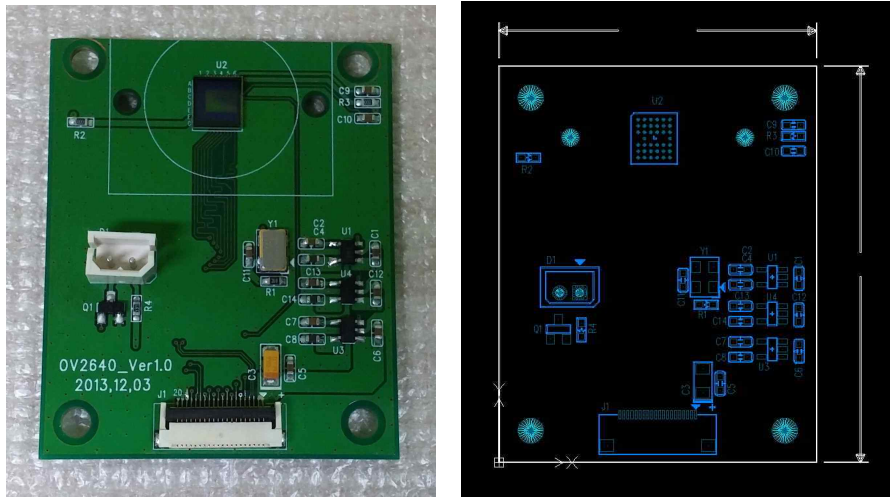
[스트립 측정 모듈 구동 시스템의 개발 Board 사진]

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

(가) Camera Board



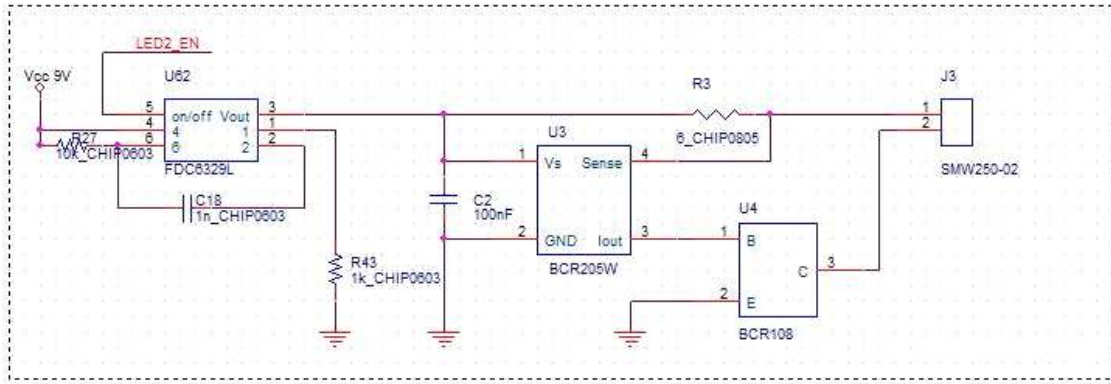
[Camera Board 회로도]



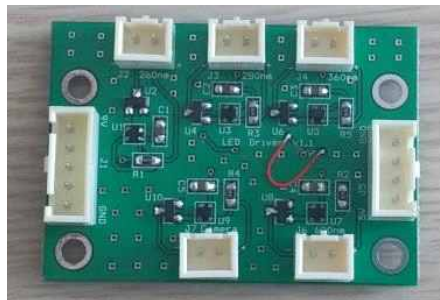
[Camera Board 사진]

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

(나) LED Driver Board



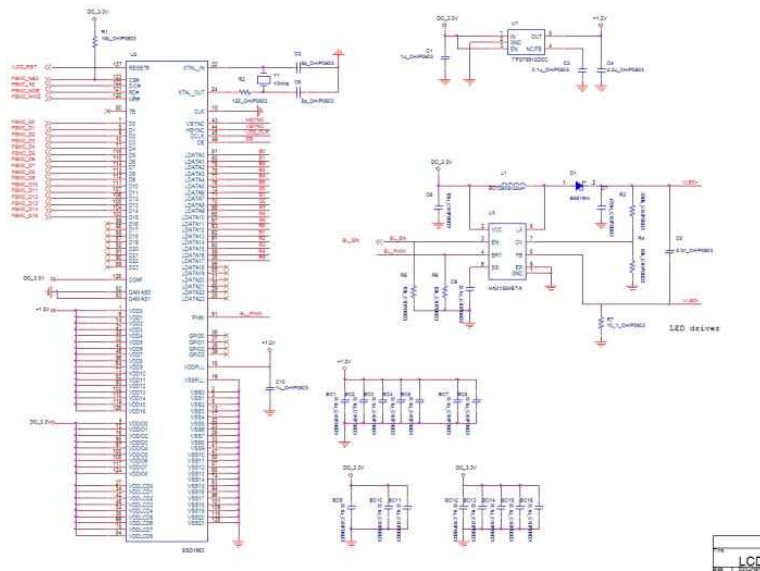
[LED Driver Board 회로도]



[LED Driver Board 사진]

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

(다) LCD Board



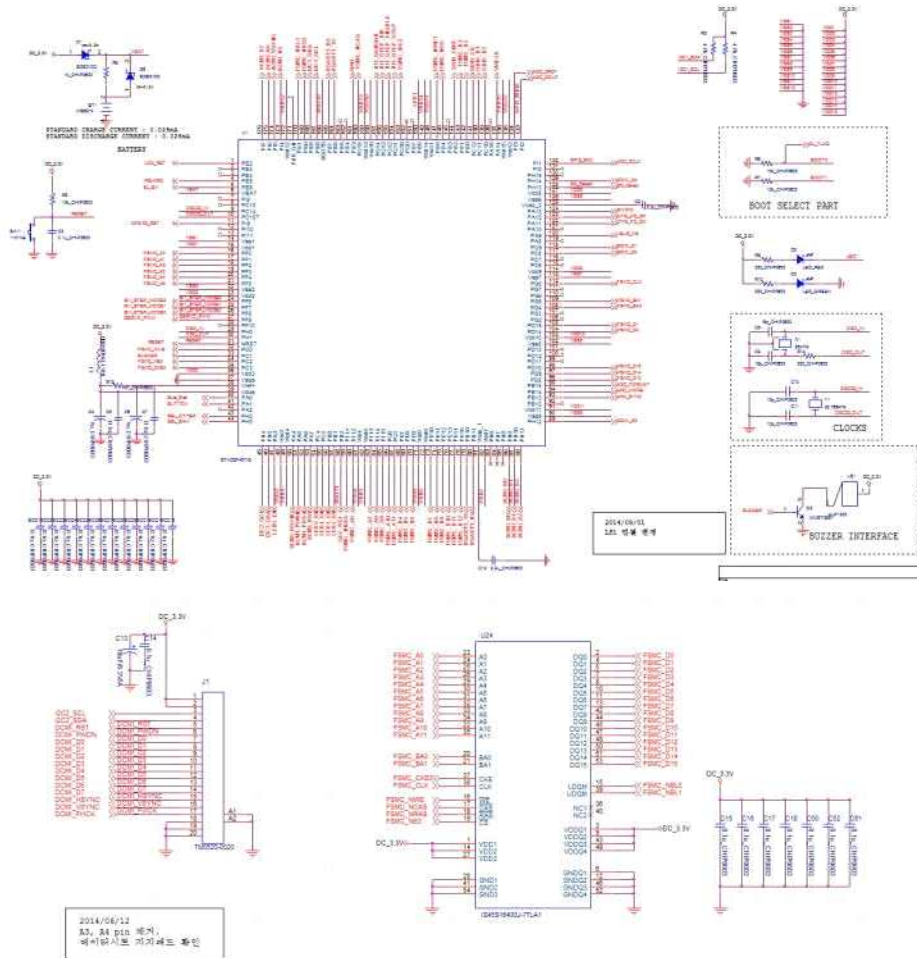
[LCD Board 회로도]



[LCD Board 사진]

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

(라) Control Board



[Control Board 회로도]

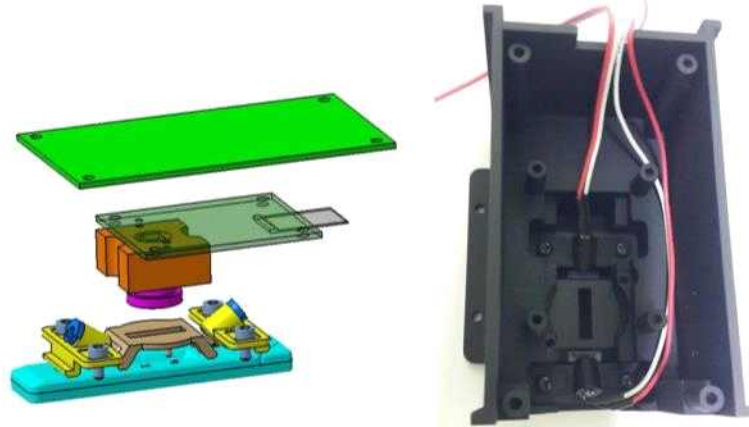


[Control board 사진]

- ◆ Control 보드의 MCU는 ST사의 Cortex-M4 계열의 STM32F427 모델을 사용하고 있다. Control 보드에서는 광원 LED의 제어를 담당하고 있고, Camera의 기능 제어를 담당하며, 카메라로부터 들어오는 이미지를 LCD로 출력을 하고, 알고리즘을 통해서 처리하고 그 결과를 출력하는 역할을 담당하고 있다.
- ◆ 입력전원으로는 12V의 전압을 사용하고 있고, 이 전압은 레귤레이터를 통해서 각각의 IC에 맞는 전압으로 다운하여 분배를 한다.

(마) 스트립 측정 모듈

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



[스트립 측정 모듈 3D 모델링 및 Mock-up 조립도]

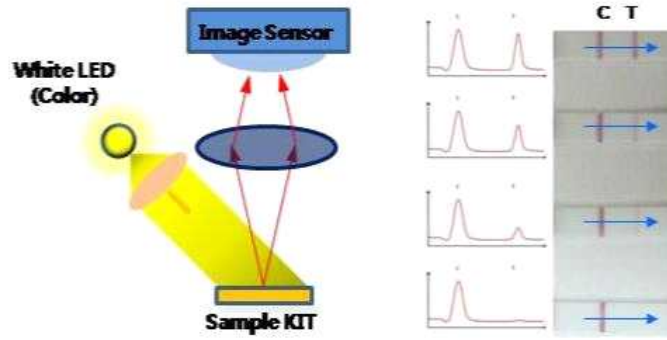
- ◆ 광원은 Diameter=Ø3mm White LED 를 사용하였다. LED가 장착되는 부분의 각도를 조절하여 카세트 상 측정되는 2개의 밴드에 각각 직접 LED의 빛이 조사될 수 있는 각도로 설계하였다.
- ◆ 이미지 센싱 카메라 모듈도 설계 변경되었다. 1차 카메라 모듈 구성에서 사용하던 카메라 렌즈는 거리 조절이 어렵고 측정 이미지가 선명하지 못한 문제가 발생하여 이를 해결하고자, 카메라 모듈 1차에서 시뮬레이션 되었던 초점거리와 유사한 거리 및 성능을 지닌 기성품 렌즈로 교체하였다.
- ◆ 아래 그림은 변경된 카메라 모듈 렌즈 및 카메라 보드와의 실제 조립 이미지이다. 변경된 렌즈는 기구물 일체형으로 외곽에 Tap 형상이 구비되어 있어 조립 공차 발생이 적고 기구적 흔들림이 적어 교정 작업이 용이하고, 더 선명한 이미지를 얻을 수 있다.



[카메라 모듈 렌즈 및 조립 이미지]

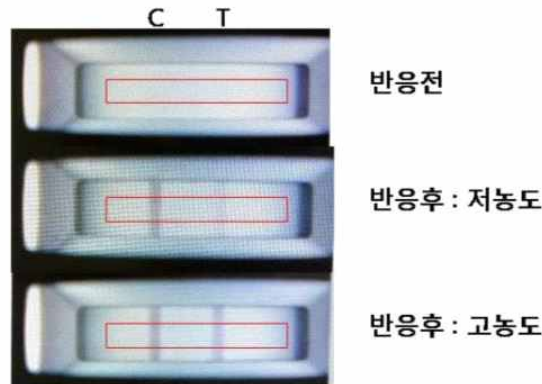
나. 측정 결과 도출을 위한 알고리즘 개발 및 검증

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



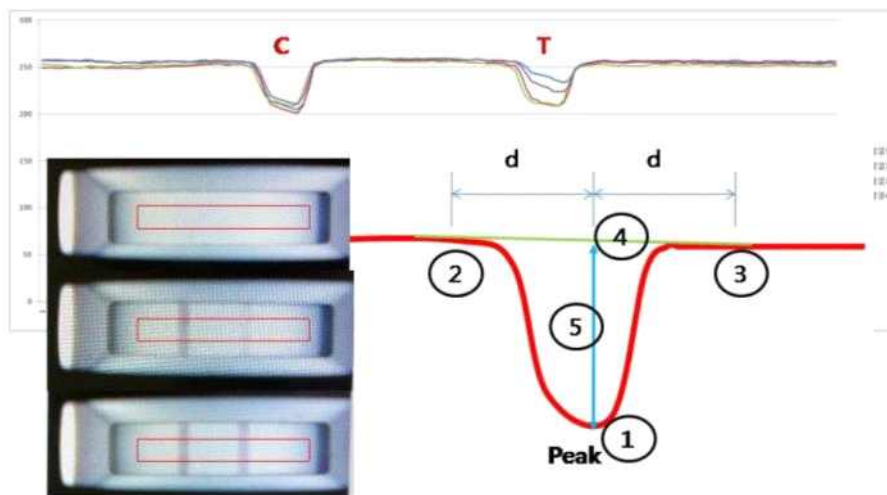
[스트립 측정 Scheme]

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



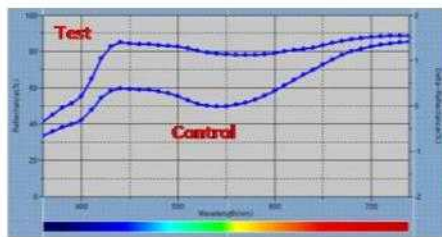
[농도별 반응 스트립 이미지]

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

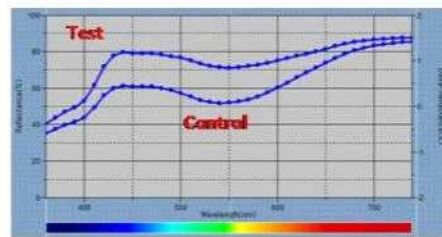


[측정값 추출 방법]

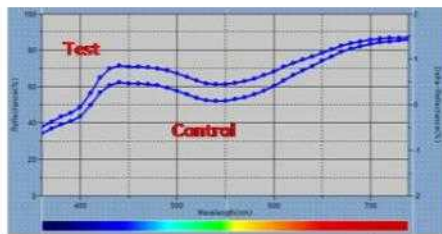
- ◆ 또한, 측정 환경 및 스트립의 위치 등에 덜 민감할 수 있도록 아래와 같이 측정값을 추출한다. 측정된 이미지에서 측정하고자 하는 스트립의 특정 범위를 선정하여 가로 방향의 위치별 측정 신호를 추출한다. 추출된 측정 신호에서 Peak 1 위치를 찾는다. Peak 1로부터 특정 거리 d 만큼의 좌우 위치 2, 3에서 측정값을 도출한다. 위치 2, 3의 측정값으로부터 평균값을 취하여 중간 위치 4에서의 Background 값을 추정한다. 1에서의 Peak값과 4에서의 Background 값의 차이를 측정값으로 계산한다.
- ◆ 위에서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



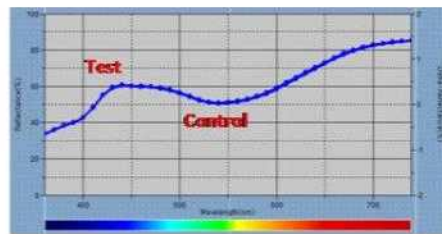
< 샘플 1 >



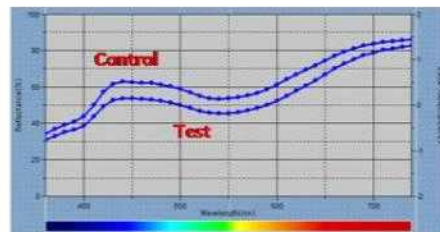
< 샘플 2 >



< 샘플 3 >



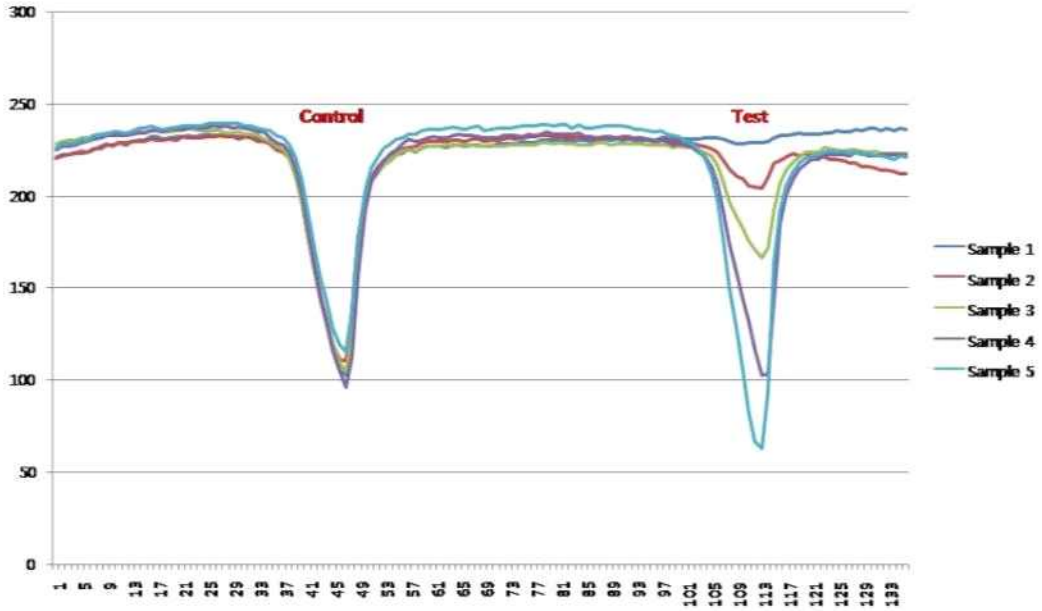
< 샘플 4 >



< 샘플 5 >

[기준장비로 측정한 결과]

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



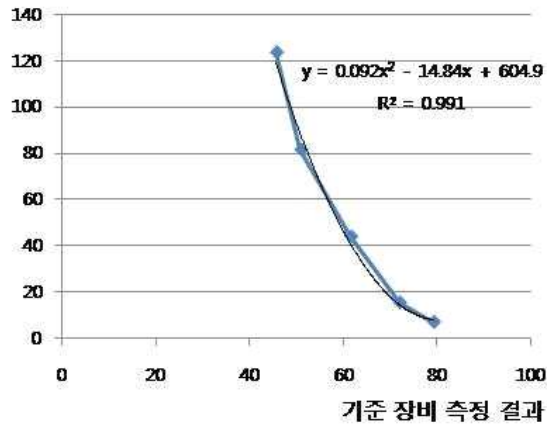
[스트립 측정 모듈로 측정한 결과]

- ◆ 아래 표에서 기준장비와 개발장비 간의 측정 결과를 비교하였다. 아래 그림에서 알 수 있듯이 두 장비간의 Test 밴드의 측정결과는 높은 상관관계를 가지고 있다. 이를 통해서 본 과제에서 개발한 스트립 측정 모듈에 대한 신뢰성을 확인할 수 있으며 위에서 제시한 측정 결과 도출 알고리즘에 대한 검증은 확인할 수 있다. 또한, Control 밴드의 측정 결과에서도 기준장비와 개발장비의 결과가 같은 경향성을 보이고 있다. 측정 결과를 단순 비교할 수는 없지만 Control 밴드의 샘플별 변화 경향이 동일함을 확인할 수 있다.

[기준장비와 개발장비의 샘플 측정 결과 비교]

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

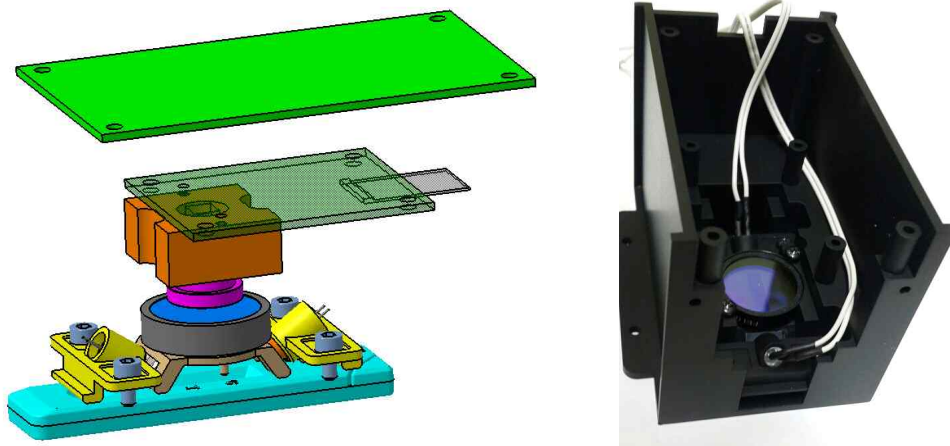
개발 장비
측정 결과



[기준장비와 개발장비의 측정결과 비교]

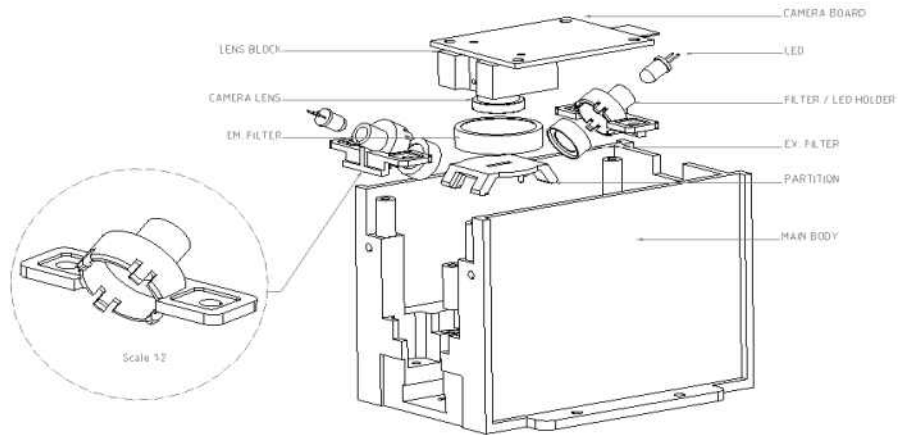
다. 형광 스트립 측정 모듈 Proto-Type 제작

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



[형광 측정 모듈 3D 모델링 및 실제 조립 상태]

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

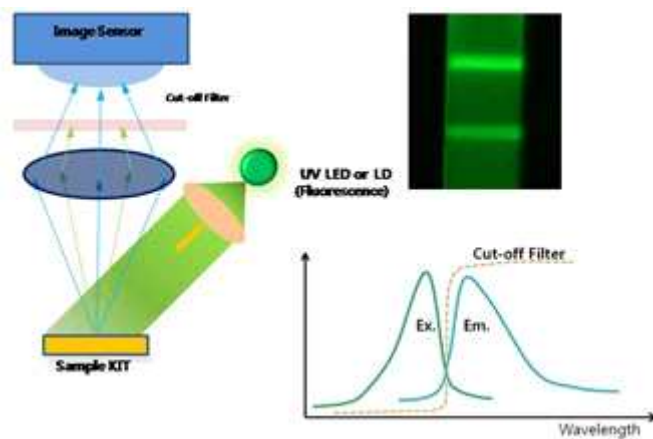


[변경된 Filter 고정부와 측정 모듈 분해도]

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



[형광 측정 모듈 시스템 구성]



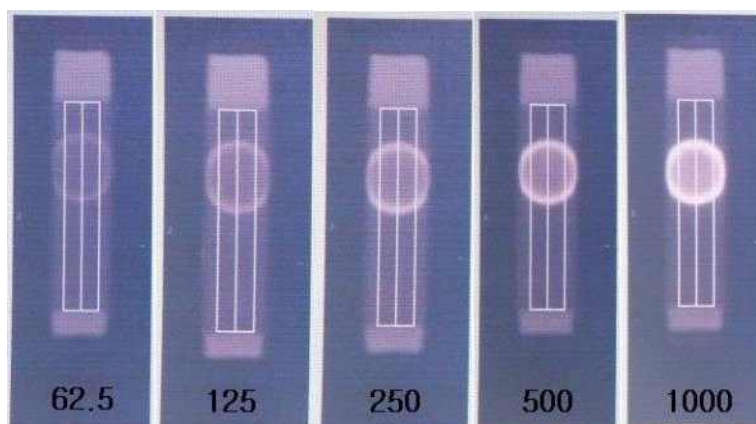
[형광 스트립 측정부 구조]

- ◆ 형광의 측정 방법은 반사형 장비의 측정방법과 동일하다. 스트립에 625nm LED를 조사하고 스트립에 나타나는 반응을 이미지 센서를 통해 촬영한 후 스트립의 형광발색 정도를 분석하여 샘플의 농도를 정량화 하는 방법이다.
- ◆ 아래는 Aptamer-cy5(형광물질)을 농도별로 1ul씩 떨어뜨린 스트립 이미지이다. 왼쪽부터 차례대로 농도 1000, 500, 250, 125, 62.5 (nM)로 1/2씩 농도를 낮춰서 스트립의 같은 위치에 떨어뜨렸다. 이미지에서 보는 것과 같이 육안으로는 형광물질의 농도를 확인하기는 어려운 상태이다.

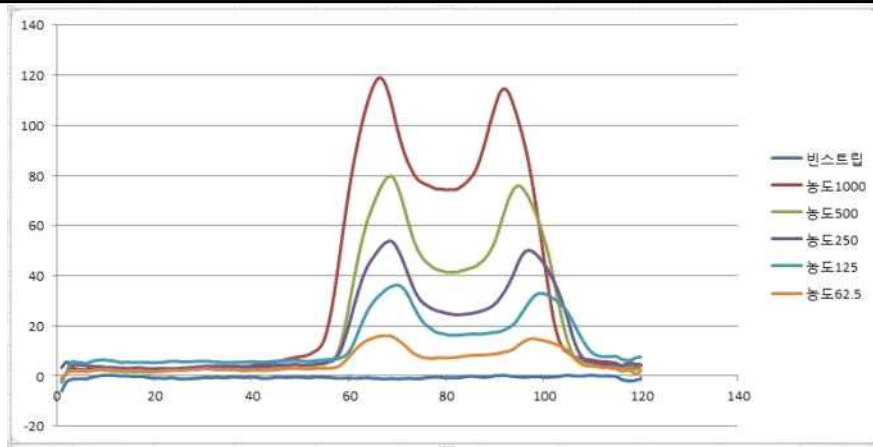


[농도별 형광 스트립 이미지]

- ◆ 위 스트립을 형광 proto-type에 넣고 카메라 촬영을 한 이미지를 아래에 표시하였다. 각 농도별로 형광의 차이가 나타나는 것을 볼 수 있다.
- ◆ 반사형과 같은 띠형식의 스트립이 아닌 형광물질을 스트립에 직접 떨어뜨려서 테스트를 진행을 하게 되었다. 그래서 아래와 같은 동그란 모양의 형상이 되었고, 형광물질이 중앙부보다 끝라인쪽으로 몰리는 현상이 발생하였다. 이 현상은 앞으로 띠 형식의 스트립을 사용하게 되면 개선될 것으로 보인다.

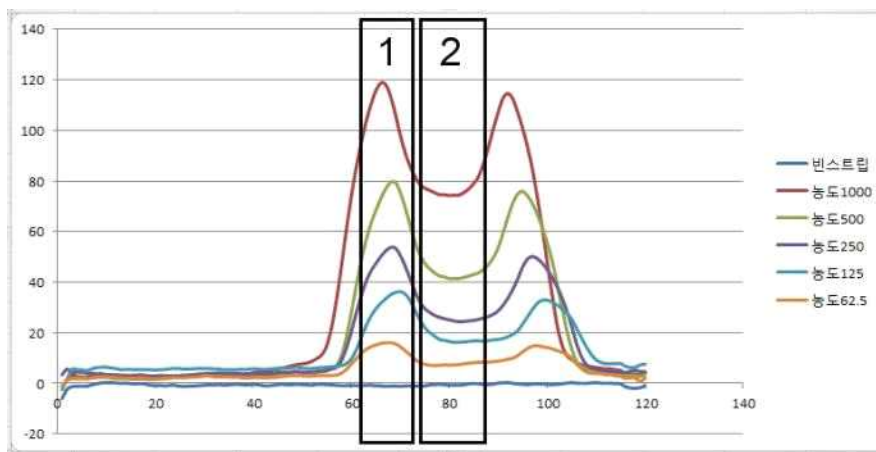


[농도별 형광 스트립 측정 이미지]



[농도별 형광 스트립 측정 결과]

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

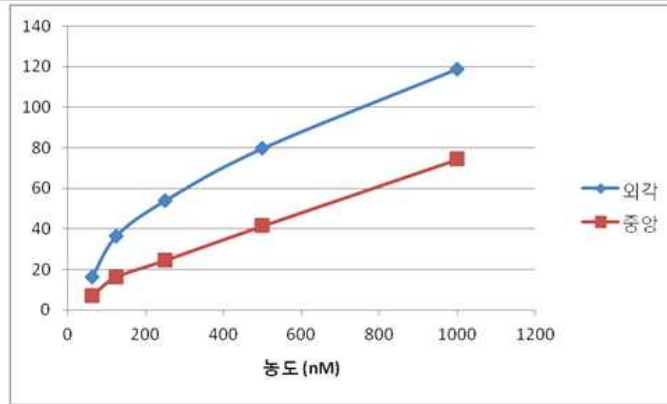


[농도별 최대최소 측정 결과 위치]

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

[스트립 측정 결과치 (외각, 중앙)]

농도(nM)	1(외각)	2(중앙)
62.5	16.1	7
125	36.3	16.2
250	53.7	24.4
500	79.5	41.4
1000	118.7	74.3



[농도별 형광 측정 결과 상관관계]

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

라. 잔류농약 전처리 방법

1) 식품공전 규격

- ◆ 식품 중 잔류농약분석은 식품공전 규격에 의하여

1. 다중농약다성분 분석법1
2. 다중농약다성분 분석법2
3. 다성분 분석법
4. 단일성분 분석법

등으로 분리되며, 다중농약다성분 분석법1 으로 약 400여종의 농약을 분석, 다중농약다성분 분석법2 으로 약 200여종의 농약이 분석된다. 그 외 농약의 경우 다성분 분석법과 단일성분 분석법으로 구분되어 분석된다.

잔류농약분석에 사용되는 기기로는 GC, HPLC, GCMS, LCMS, UV 등이 사용된다. 다중농약다성분 분석법의 경우 GC와 HPLC를 이용하게 되는데 GC와 HPLC는 대상성분을 고감도로 검출하고 정량하는 미량 분석화학분야로 다양한 검체 형태로부터 혼입되는 방해성분들의 제거방법이 복잡하다. 제거 방법으로는 추출, 추출물의 분리 및 정제로 나눌 수 있으며, 이는 농약별로 다양하게 채용되는 선택성 분석기와 검체 추출 및 정제과정에 대한 깊은 이해가 필수적이다.

- ◆ 검체

잔류농약 분석을 위한 검체는 아래 표에서와 같이 처리한 것을 검체로 하며 이 표에서 정하지 아니한 식품은 원칙적으로 가식부를 시험 부위로 한다.

식품	검체
곡류 쌀, 보리, 밀, 메밀, 호밀, 수수, 귀리, 조, 율무 옥수수 기타곡류	탈각한 것 포엽, 수염 및 이삭 속을 제거한 것 탈각한 것
서류 감자, 고구마, 토란, 기타서류	잔뿌리를 제거하고 물로 가볍게 씻어 흙을 제거한 것
콩류 대두, 팥, 녹두, 완두, 강낭콩, 잠 두 땅콩 기타콩류	각지를 제거한 것 각지를 제거한 것 각지를 제거한 것
채소류 무의 뿌리, 생강, 당근 무의 잎, 케일 배추, 양배추, 상추, 양상추 썩갓, 셀러리 양파, 파, 마늘, 부추 아스파라거스, 고사리 고추, 토마토, 피망, 가지 수박, 참외, 메론, 오이, 호박 시금치 기타 채소류	물로 가볍게 씻어 흙을 제거한 것 변질 잎을 제거한 것 바깥 변질 잎 및 심을 제거한 것 뿌리 및 변질 잎을 제거한 것 겉껍질 및 잔뿌리를 제거한 것 뿌리 및 변질 잎을 제거한 것 받침을 제거한 것 꼭지를 제거한 것 잔뿌리 및 변질 잎을 제거한 것 가식부분
과실류 사과, 배, 모과 복숭아, 살구, 자두, 매실, 체리 딸기 포도 감 바나나 키위 밀감, 레몬, 자몽, 오렌지, 감귤 류	심 및 양쪽 오목한 부분을 제거한 것 꼭지(果柄) 및 씨(核)를 제거한 것 받침을 제거한 것 꼭지를 제거한 것 받침 및 씨를 제거한 것 꼭지 부분을 제거한 것 꼭지를 제거한 것 과실전체

식품	검체
과과야 아보카도, 망고 파인애플 기타 과실류7-	과실전체 씨를 제거한 것 왕관(Crown)부분을 제거한 것 가식부분
버섯류 표고버섯, 기타버섯류	가식부분
종실류 참깨 해바라기씨, 면실 기타 종실류	종자 외피를 제거한 것 종자
견과류 아몬드, 은행, 밤, 피칸, 호 두 기타 견과류	외과피를 제거한 것 외과피를 제거한 것
호 프	건조된 꽃
건포도	건조된 포도
건조채소류	건조된 채소류
차	건조된 차
인삼	수삼, 건조삼 또는 인삼농축액 (장뇌삼 포함)

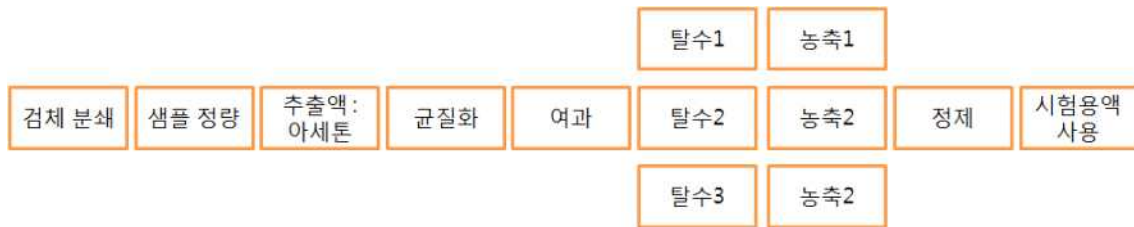
◆ 식품 잔류농약 분석을 위한 검체 선별은 식품공전에서 제시하듯 가식부위로 선별하여야 하며, 식품공전에서 제시한 표를 따르도록 해야 한다.

◆ 추출

잔류농약 분석을 위한 추출단계의 경우 농약별로 선택성 검체 추출 과정 및 정제 과정이 필요하다. 대표적인 다중농약다성분 분석법(Multi class pesticide multiresidue methods) 의 추출의 과실, 야채 등 비지방성 식품 과정은 아래와 같다.

검체를 잘게 썰거나 갈아서 잘 섞은 후 100 g을 달아 균질기의 용기에 넣고 이에 아세톤 200 mL를 넣고 2분간 고속으로 균질화한 후(셀라이트는 넣지 않는다) 바닥에 여과지(Sharkskin paper)를 깔은 12 cm의 부호너깔때기에 흡인여과하여 500 mL의 감압플라스크(Suction flask)에 모으고(이 때 여과는 1분안에 마치고 사용하는 여과지는 분석시 방해성분을 제거하기 위하여 검체를 여과하기 전에 아세톤으로 씻은 후 사용한다) 여액의 양을 기록한다. 이 여액중 80 mL를 취하여 1 L의 분액깔때기에 옮기고 ★ 이에 석유에테르 100 mL 및 디클로로메탄 100 mL를 넣고 1분간 심하게 흔들어 섞은 후 정치하여 층을 분리시킨다. 아래층(물층)은 다른 1 L의 분액깔때기에 옮긴다. 위층은 무수황산나트륨을 약 4 cm 충전하고 유리솜(아세톤 및 에탄올로 씻어 말린 것)으로 막은 깔때기(10 cm)에 통과시켜 탈수하고 쿠데르나다니쉬 농축기에 넣는다. 물층(아래층)이 남아있는 분액깔때기에 염화나트륨 7 g을 넣고 염화나트륨이 녹을 때까지 30초간 심하게 흔들어 섞은 후 이에 디클로로메탄 100 mL를 넣고 1분간 심하게 흔들어 섞은 후 정치하여 층을 분리한다. 용매층(아래층)을 위와 같은 방법으로 탈수하여 쿠데르나다니쉬 농축기중에 넣고 물층(상층)에는 디클로로메탄 100 mL를 넣고 위와 같은 조작을 되풀이한 후 쿠데르나다니쉬 농축기중에 합하고 깔때기중에 무수황산나트륨을 디클로로메탄 50 mL로 씻고 이 씻은 액은 쿠데르나다니쉬 농축기중에 합친다. 비등석을 넣어 100~150 mL까지는 낮은 온도에서 천천히 농축시키고 이후 온도를 높여 약 2 mL까지 농축한다. 석유에테르 100 mL를 쿠데르나다니쉬 농축기의 스나이더 칼럼을 통하여 넣고 다시 약 2 mL까지 농축한다. 다시 석유에테르 50 mL를 위와 같은 방법으로 넣고 약 2 mL까지 농축시키고 아세톤 20 mL를 넣어 약 2 mL까지 농축한다. 이 때는 용매를 완전히 날려보내지 않은 상태(소량남김)에서 아세톤으로 일정량으로 하여 시험용액으로 한다.

* 식품공전 4. 식품중 잔류농약분석법 발췌



[다중농약다성분 분석법 - 1 추출 및 정제 단계]

- ◆ 기존 잔류농약 정밀 분석의 경우 GC 및 HPLC 사용을 위해 많은 탈수 단계, 농축, 정제 과정을 거쳐야 하므로, 검체 전처리 시 많은 시간을 소요되었다.
- ◆ 휴대용 잔류농약 검출기 개발을 위해 현재 개발 진행 중인 단백질 반응 기반 비색센서방법과 앵타머 스크리닝법을 고려하여 추출, 정제 단계를 확인함으로써 샘플 전처리 검증 및 표준화 연구개발을 해야 할 것이다. 검체의 추출, 정제 방법을 간소화하거나 생략 가능한 부분(탈수2~3, 농축2~3)은 생략하여 기존 분석법보다 시간을 절약할 수 있도록 검체 채취 및 추출, 정제 방법을 검증, 고안해야 한다.
- ◆ 또한, 시장에서의 표준화 사용법 정립을 위해 다양한 사용자의 Field Test 의견을 듣고 반영하여 표준화 사용법을 정립하도록 해야 한다.

2) 속성 분석법에서의 샘플 전처리

- ◆ 현재 잔류농약 속성 검사법 중 acetylcholine esterase 를 이용하여 효소의 저해정도를 판단하는 분석법에서는 엽채류 등의 샘플 추출단계를 아래와 같이 정의하고 있다. 이 잔류농약 속성 검사법

의 경우 현재 일반 농민, 일반인의 경우 20~30분의 교육을 받으면, 누구나 실시할 수 있을 정도의 간편한 분석법이다. 또한 채취에서 추출 단계까지 5~10분이면 추출단계를 완료 할 수 있다.

1. 각 시료별로 3-4장씩 채취한다.
2. 각 시료 3-4장을 한번 접어, 채취봉으로 6-7회 채취하고, 시험관에 넣는다.
3. 시험관에 메탄올 1ml 를 넣어준다.
4. 시약1, 2를 순서에 따라 넣어준 후 추출액만 별도의 시험관에 옮긴다.



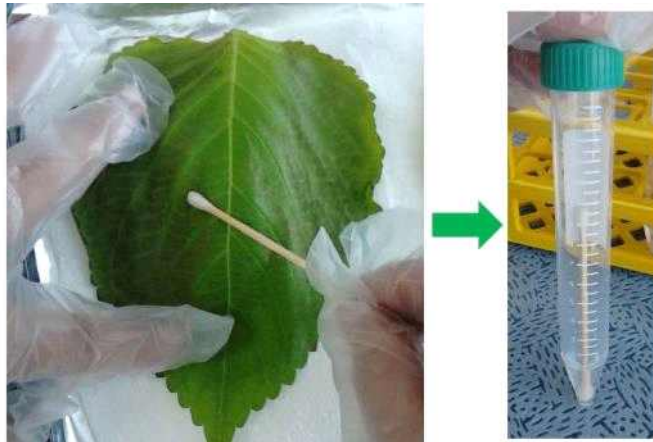
[잔류농약 속성검사기의 샘플 추출 단계]

- ◆ 위 시험법에 대한 농약 농도별 추출 정도를 확인하기 위해 작물(부추)에 임의의 농약 (Chlorpyrifos) 을 유기용매인 Methanol을 이용하여, 10, 1, 0.1, 0.01ppm 로 제조하여 처리 하였다. 처리 방법은 제조된 농약 100ml를 부추 일정량에 담금 처리 하였으며, 처리 시간은 1시간 이었다. 또한 건조를 위해 작물만 꺼내어 1-2시간 방치 한 후 잔류농약 속성 검사에 따라 추출을 진행하였다.



[담금 처리 단계 : 왼쪽부터 10, 1, 0.1, 0.01ppm, 분석 결과 : 왼쪽부터 10, 1, 0.1, 0.01ppm Blank]

- ◆ 채취봉을 이용하여 메탄올에 추출한 간소화된 추출방법으로도 농약 분석 결과의 경향성 있는 결과를 확인할 수 있었다. 위 시험법은농약의 유기인계와 카바마이트계의 검출 가능한 농약 전체에 대한 효소의 저해 정도를 알아보는 방법으로 단일 성분의 정확한 농도를 확인하고자 하는 본 개발 방법에서는 채취봉으로 6-7회 채취 하는 방법 보다는 채취봉으로 채취하되 일정량의 무게를 제어 추출을 하도록 분석법(추출법)을 개발하여야 할 것이다.
- ◆ 별도로 전처리 방법 중 Swipe 방법을 고려해보았다. 방법은 샘플을 Methanol에 담가두었던 면봉 등을 이용하여 샘플을 Swipe 한 후 면봉에 묻은 작물 표면의 농약을 녹여 측정하는 방법이다.



[Methanol에 담가두었던 면봉을 이용하여 작물의 표면을 Swipe 한 후 일정량의 Methanol에 녹이는 방법]

- ◆ 그러나 위 방법은 샘플의 Swipe 면적을 정확히 채취할 수 없는 한계가 있어 실제 분석법으로 정형화 하기 어려울 것으로 보인다.

3) 속성 분석법에서의 추출법 적용

- ◆ 잔류농약 속성검사기에서 정의한 추출법에 따른 추출 능력의 검증을 위해 간이 추출에 의한 용액과 실제 정밀분석법의 추출 단계에 의한 방법의 비교를 위하여 비교 실험을 진행하였다.
- ◆ 작물(깻잎)에 임의의 농약 (Chlorpyrifos) 을 유기용매인 Methanol을 이용하여, 100, 10, 1, 0.1 ppm, Blank 로 제조하여 처리 하였다. 처리 방법은 제조된 농약 100ml를 작물(깻잎) 일정량에 담금 처리 하였으며, 처리 시간은 1시간 이었다. 또한 건조를 위해 작물만 꺼내어 1-2시간 방치 하였다.



[담금 처리 및 건조 : 왼쪽부터 100ppm, 10ppm, 1ppm, 0.1ppm, Blank]

- ◆ 간이추출 용액 군에 대해서는 잔류농약 속성 검사에 따라 추출을 진행하였고, 별도로 샘플의 무게를 측정하여 추출을 진행하였다. 추출 용매의 양은 분석의뢰를 위한 최소 샘플 용량에 맞추기 위해 2.0ml로 맞추었다. 추출용액을 국제공인시험기관 (한국분석기술연구소-대전소재)에 분석 의뢰 하였으며, 정제와 분석 절차는 정밀검사법에 따라 진행하였다.

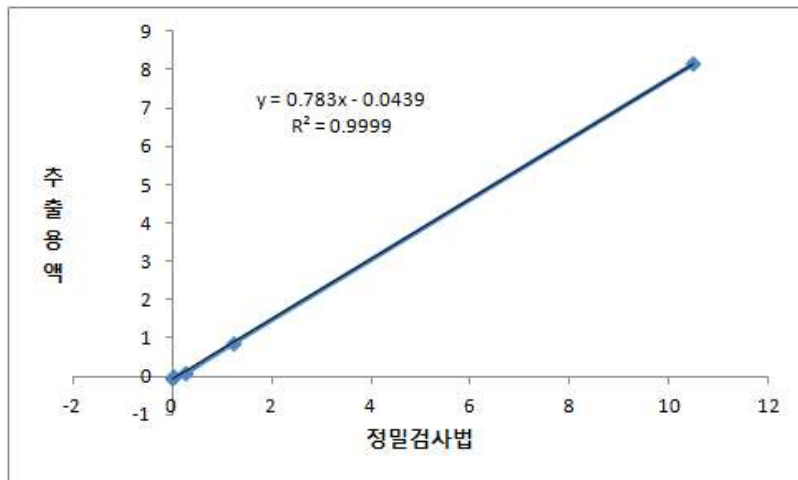
[잔류농약 간이 추출 방법에 대한 추출 - 샘플 채취 무게, 용매량]

	Blank(A)	0.1ppm(B)	1ppm(C)	10ppm(D)	100ppm(E)
샘플 무게 (g)	1.10	1.09	1.13	1.04	1.31
MeOH(ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

[정밀검사 결과와 간이 추출 방법의 추출용액 검사결과]

	A	B	C	D	E
정밀검사	0	0.023	0.246	1.22	10.48
추출용액	0	0.007	0.094	0.885	8.166
추출비율(%)	0	30.4	38.2	72.5	77.9

- ◆ 정밀검사 군에 대해서는 농도별 담금, 건조 처리 된 샘플을 국제공인시험기관 (한국분석기술연구소 - 대전소재)에 샘플을 의뢰하였다. 정밀검사 군에 대해서는 정밀검사법인 HPLC 또는 GC를 이용한 분석이 진행되었다.
- ◆ 검사결과 간이 추출 방법의 추출용액의 경우 정밀검사에 대한 추출비율이 저농도에서는 30~40%의 추출 비율을 보였으며, 고농도에서는 70%대의 추출 비율을 보였다.



[정밀검사법과 추출용액 검사 결과의 상관성 그래프]

- ◆ 전체적인 정밀검사법과 간이 추출 방법의 추출용액 검사 결과 상관성이 일치하는 그래프를 보였으며, 저농도와 고농도에서의 추출비율 차이는 샘플의 대표성에 대해 재점검 해봐야 할 것으로 보인다. 실제 샘플 테스트시 샘플의 양과 추출액의 양을 늘려 샘플 대표성의 정확도를 높이도록 해야 할 것이다. 샘플의 양을 늘리는 방법으로는 추출봉의 크기를 크게 제작 하여 g 수를 늘리고, 추출액의 양도 그에 비례하게 늘리는 방법이 있다.
- ◆ 기존 간이 추출 방법에서의 보완점으로는 1. 대표성을 높이기 위해 추출봉 크기를 늘리거나, 추출 횟수를 늘린다. 2. 추출이 완료된 용액에 대해 Filter를 거쳐 방해 물질을 줄여준다. 3. 추출 vortex 시간을 1~2분 충분히 진행한다. 위와 같은 보완점을 적용하여 시료 추출법을 최적화 한다면 10분이내 추출이 가능하며, 추출비율을 최대로 높일 수 있다.

[정밀 추출법과 간이추출법 적용 비교]

	정밀추출법	간이 추출법 적용
단계	검체분쇄 샘플정량 추출액 넣기 균질화 (mix - 수시간) 여과 탈수 및 농축 반복 정제 Filter	샘플정량 methanol 넣기 추출 vortex Filter
시간	1~2일	10분 이내
난이도	최상 : 전문 교육을 이수한 자로 일정한 경력을 가진자	하 : 일반인으로써 간단한 교육으로 가능함.

- ◆ 차년도에는 실제 샘플을 “벼” 로 테스트를 하고자 한다. 벼의 샘플 검체는 공정시험법에서 “탈각한 것” 으로 정의하고 있으며 탈각이란 벼 이삭에서 껍질(왕겨)를 벗기는 작업으로 정의되어 있다. 도정 전 쌀을 사용하여 테스트를 진행하고자 한다. 엽채류가 아닌 벼를 이용할 경우 추출봉등 기구가 별도로 필요하지 않아 방법은 더욱 간소화 될 것으로 판단된다.

- ◆ 테스트 방법은 아래와 같다. 추출된 용액을 가지고 추출 비율 테스트를 진행하여 추출법 최적화를 확립하고자 한다.

1. 시험관에 도정전 쌀 1g 을 넣고 methanol 1ml (혹은 2ml) 를 넣는다.
2. 추출 vortex 시간을 1~2분 충분히 진행한다.
3. 용액만 Filter 를 이용하여 걸러준 용액을 시험 용액으로 사용한다.

마. 기술이전 및 상품화

- ◆ 상품화를 위한 기술 이전의 경우 분리된 기술이 아닌 통합시스템에 대한 기술이 필요하다. 이에 1~2차년도에는 기술이전이 별도로 진행되지 않았으며, 3차년도 통합시스템 기술이전을 통하여 상품화 및 사업화를 진행하고자 한다.
- ◆ 본 연구를 통해 개발된 비색검출법 및 다채널 스트립 검출을 이용한 휴대용 잔류농약 검출기의인 터페이스를 구성하고 전자회로 개발, 바이오센서의 성능 검증이 마무리 되면, 최종 단계인 휴대형 잔류농약 검출 시스템의 제품화가 가능하다.

제작중인 장비의 제원과 사양은 다음과 같다.

◆ 개발 제품 모듈 사양

1) 분광 광학 측정 모듈 사양

Photometric System	White LED, CCD Array
Wavelength Range	450 ~ 750 nm
Wavelength Accuracy	< 1 nm
Spectral Bandwidth	about 10 nm
Photometric Accuracy	< 0.01 @1.000 ABS
Photometric Range	-0.5 ~ 2.000 ABS
SIZE	140 x 200 x 100 (h)
WEIGHT	1.2 kg

2) 형광 측정 모듈 사양

Detector	CMOS Image Sensor
Light Source	LED
Reproducibility	< 3%
Measure Time	< 10 sec
SIZE	140 x 150 x 100 (h)
WEIGHT	1.2 kg

◆ 소형화, 휴대형

측정 모듈이 휴대형 광학 검출 장치임을 고려하여, 비색, 형광 2개의 측정시스템 모두 각 부품 및 외관 크기를 기구적으로 우선 소형화하는데 초점을 맞춰 설계 예정이다.

분광 광학 측정 장치는 입력 광원으로 LED를 사용하고, 광검출기로 CCD를 사용한 측정 모듈이다. 별도의 고정부에 LED가 장착되며, 이 광원은 렌즈와 광학 필터를 통해 샘플 홀더를 거쳐 CCD로 입사하게 한다. CCD모듈로 구성된 광학부는 하나의 별도 모듈로 시스템에 장착 되게 하여, 조립방법 및 기구적 구성을 단순화시키도록 한다. 이러한 광학 기구부는 전체가 하나의 모듈로 구성된 기구적 일체형태로 광로 틀어짐 방지, 광로의 교정용이, 효율적인 생산 가능성 및 모듈의 소형화를 위한 기본적인 조건을 부여한다. 또한 모듈의 소형화와 더불어 Li-Po 배터리를 이용, 배터리 충전 방식을 지원함으로써 휴대 가능한 기기를 구현할 예정이다.

형광 측정 시스템은 광원으로 LED를 사용하고 이미지 센싱 카메라(CMOS Image Sensor)를 사용하여 별도의 기구적 동작 없이 측정 가능한 시스템으로 구성한다. 복잡한 구동 메커니즘을 없앴으로써 LED, FILTER, DIFFUSER 외에 추가되는 기구적 부품을 줄이고, 이를 통해 모듈의 소형화를 가능하게 한다. 대신 LED, FILTER, DIFFUSER 등을 고정시키기 위한 각 MOUNT는 분리된 형태로 구성, 전체의 효율적인 공간 구성을 갖게 하고, 고정볼트 등도 배제하기 위해 각 부품의 고정은 플라스틱 부품 일체 상태로 Hook 형상을 적용하여 해결하도록 한다.

또한 측정의 신속성을 위해 전처리 시간을 10분 이내로 맞추고 일반인으로써 간단한 교육으로 충분히 사용 가능한 난이도의 수준으로 간소화된 추출법 및 측정법을 적용하고자 한다. 반응시간을 제외한 기기 측정 시간은 분광 광학 측정 장치와 스트립 측정 장치 모두 10초 이내 완료로 측정에 소요되는 시간을 최소화 시키도록 한다.

[3차년도 연구 수행 결과]

1) 잔류 농약 검출 방식의 표준화 연구 개발

- 잔류 농약 검출용 스트립센서 제작 방식의 표준화
- 스트립센서에 내포된 잔류 농약 검출 방식의 표준화
- 잔류 농약 검출용 스트립센서 제조 공정의 표준화

2) 고감도 광학 센서를 이용한 잔류 농약 분석 시스템 개발

- 분광 광학 시스템을 적용한 스트립 이미지 분석 시스템 개발
- 형광 광학 시스템을 적용한 스트립 이미지 분석 시스템 개발
- 잔류 농약 함량에 따른 이미지 필터링 기법 및 알고리즘 개발

3) 광학 검출 시스템이 내장된 휴대용 잔류 농약 검출 장치 개발

- 휴대용 잔류 농약 검출 장치 시제품 제작
- 신뢰성 시험 및 장치 매뉴얼 작성

2. 세부계획별 진행사항

잔류 농약 검출 방식의 표준화 연구 개발	
- 정량의 표준 농약이 내포된 표준 스트립 제작 방식의 표준화	
- 표준 스트립센서에 내포된 농약 검출 방식의 표준화	
- 표준 스트립에서 검출된 잔류 농약 판정 기준 표준화 및 정립	
고감도 광학 센서를 이용한 잔류 농약 분석 시스템 개발	
- 분광 광학 시스템을 적용한 스트립 이미지 분석 시스템 개발	- 4ch Multi 분석 시스템 개발 완료 - 이미징 광학계 적용 분석시스템 개발 완료
- 형광 광학 시스템을 적용한 스트립센서 이미지 분석 시스템 개발	- 4ch Multi 분석 시스템 개발 완료 - Y자형 스트립 적용 분석 시스템 개발 완료
- 잔류 농약 함량에 따른 이미지 필터링 기법 및 알고리즘 개발	- 농약 농도별 이미징 필터링 기법 개발 완료 - 농약 농도별 판정 알고리즘 개발 완료
광학 검출 시스템이 내장된 휴대용 잔류 농약 검출 장치 개발	
- 휴대용 잔류 농약 검출 장치 시제품 제작	- 휴대용 4ch Multi 분석 시스템 개발 완료
- 신뢰성 시험 및 장치 매뉴얼 작성	- 신뢰성 시험 및 장치 매뉴얼 작성 완료

3. 세부 연구 내용

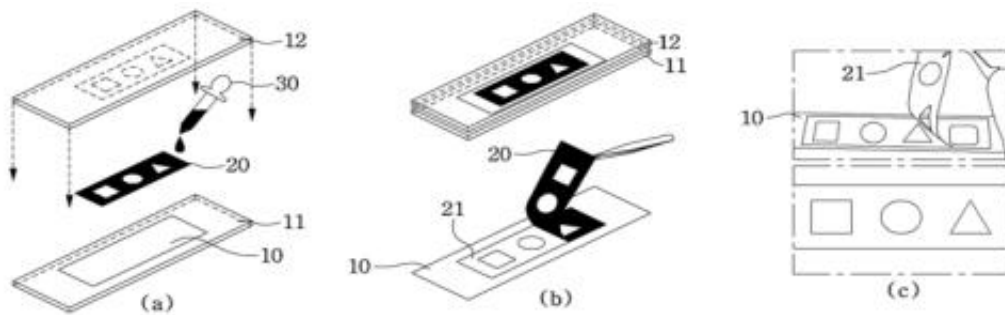
가. 잔류 농약 검출 방식의 표준화 연구 개발

1) 잔류 농약 검출용 스트립센서 제작 방식의 표준화

일정한 성능을 유지하는 잔류 농약 검출용 스트립센서 제작을 위해서는 표준화가 필수 요소 중 하나이다. 스트립센서 제작을 위해서는 스트립센서를 가공할 수 있는 가공시스템이 필요로 한다. 일반적으로 스트립센서 제조에는 재료인 멤브레인을 자르기 위한 cutter, 패터닝을 위한 스크린프린터 혹은 왁스프린터 등의 장비, 시료를 적용시키는 line spotter, dot spotter 등의 장비가 필요로 한다.

그러나, 위의 장비들은 매우 고가이며 현재 본 업체에서 기존의 스트립센서를 제작하는 시스템을 이용하기에는 초기 투자 자본에 대한 부담이 있는 실정이다. 그래서, 본 연구진은 1협동기관인 경상대학교의 도움을 받아 아래 도식도에 표현한 스트립센서 제조의 새로운 방법론 중 하나인 Tear-off 시스템을 도입하여 스트립센서의 생산을 진행하였다.

이 Tear-off 시스템 방식의 경우에는 약 80만원 대의 Craft-cutter 장비만 있으면 기존의 스트립센서 제조 공정으로 제작한 스트립 센서와 동일한 효과의 스트립 센서를 제작 할 수 있다.



[Tear-off 방식을 이용한 스트립센서 제조 공정]

또한, 위의 Tear-off 기법에는 Craft-cutter기 외에 A4, 1~2종의 용매(DMSO, DMF)만 사용되기 때문에 초기 투자 비용이 매우 저렴한 장점이 있다.

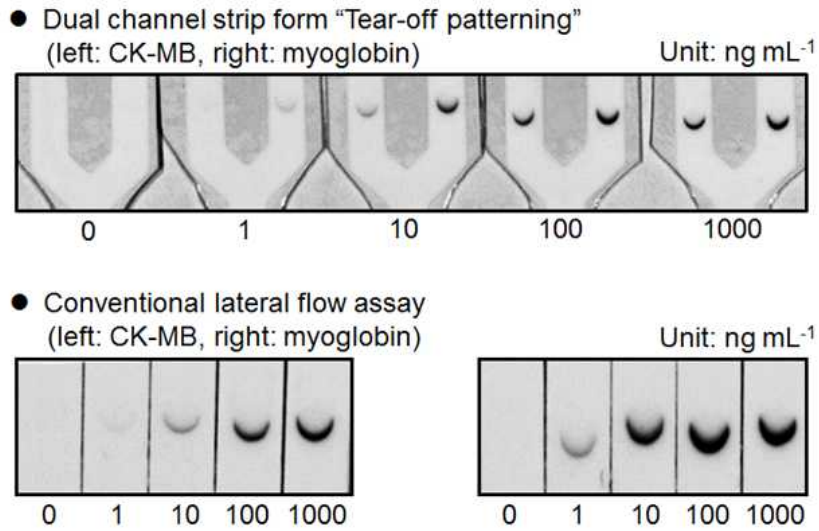


[Craft-cutter 도식도]

본 연구진은 위의 장비 및 시스템을 이용하여 기술적 검증을 실시하고자, 해당 기술을 이용하여 스트립센서를 제작하였을 때와 일반적인 방법론으로 제작하였을 때의 결과를 비교하였다.

두 방식으로 제작된 스트립 센서를 비교하기 위하여 우선 (주)인지바이오에 일반적인 제작 방식의 제품을 주문 제작하였고, Tear-off 방식으로 본 연구진이 스트립센서를 제작하였다.

이렇게 준비한 제작방식이 다른 두 종류의 스트립 센서를 비교 실험한 결과 아래에서 확인할 수 있듯이 본 연구진이 패턴 형태를 이용하여 제작한 스트립과 일반적인 방법론으로 제작된 스트립센서의 실험결과 차이를 보이지 않고 있음을 확인할 수 있었다.



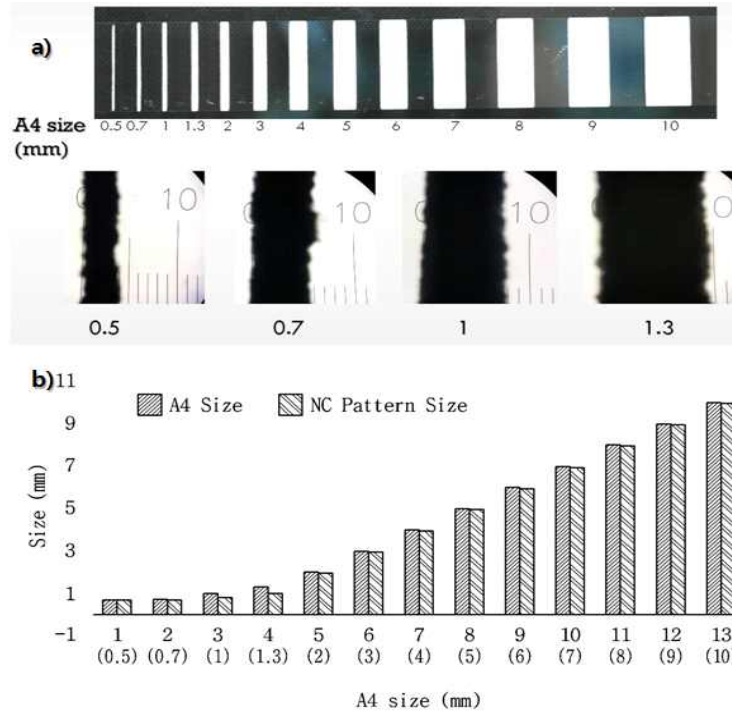
[Tear-off 방법 Vs 일반적인 스트립제조 방법 비교 결과]

본 연구진은 위의 결과를 바탕으로 충분히 잔류 농약을 검출하기 위한 시스템으로 Tear-off 기법의 사용이 충분함을 확인할 수 있었으며, 본 결과를 바탕으로 표준 스트립센서 제작 방식을 Tear-off 제작방식으로 표준화 하였다.

2) 스트립센서에 내포된 잔류 농약 검출 방식의 표준화

향후 양산이 이루어질 경우 스트립 센서를 대량 생산하였을 때 원하는 형태의 patterning이 동일하게 구현되는지 확인하기 위한 실험을 실시하여 잔류 농약 검출 방식을 표준화 하고자 하였다.

우선, patterning 된 Tear-off를 진행하기 위한 용매를 머금고 있는 A4와 patterning된 스트립센서의 사이즈가 동일한지 확인하는 실험을 진행하였다.



[패턴 폭 실험 결과 도식]

그림의 a)는 13개의 서로 다른 폭으로 디자인된 멤브레인 패턴에 대해서 현미경(OLYMPUS uplan 10X 10.30)으로 100 μ m 단위의 PSI-Stage MIC 10mm/0.1mm DIV로 각각의 폭을 확인한 결과이다.

그림의 b)는 멤브레인에 형성된 13개의 패턴에 대해 실제의 폭과 멤브레인 상에 형성된 패턴의 폭을 비교한 결과 그래프이다.

그림의 a)에서 확인할 수 있었던 결과는 0.5~10mm의 사이에서 상이한 값을 갖도록 제작된 패턴 폭은 형성된 NC 패턴의 폭보다 항상 크게 나타남을 확인할 수 있었으며, 이는 A4에 묻혀진 유기용매가 NC 패턴과 접촉할 시에 어느 정도 안쪽으로 파고들면서 멤브레인을 녹인다는 것으로 해석할 수 있다. 즉, 1~4번 샘플인 0.5~1.3mm의 범위로 형성되었을 경우에는 상대적으로 NC 패턴의 폭의 차이가 크지만, 2mm 이상으로 형성한 경우에는 NC 패턴의 폭의 차이가 현저히 감소함을 알 수 있었다.

또한, 5mm이상의 결과에서부터는 A4의 patterning 된 사이즈보다 대략 -3mm 작은 사이즈로 스트립 센서의 patterning이 됨을 확인할 수 있었다.

본 연구진은 Tear-off 기법을 이용하여 스트립을 제작할 경우에는 폭을 적어도 5mm 이상으로 NC 멤브레인에 대한 패턴을 형성하는 것이 표준화에 유리할 것으로 결론짓고, 스트립센서에 내포된 잔류 농약 검출 방식을 표준화하였다. (실제 제품화를 위한 스트립센서의 폭 사이즈는 30mm로 정하고, A4 patterning의 폭은 33mm를 이용하였음)

본 연구진은 위의 결과를 토대로 스트립센서를 이용한 대량생산 시스템의 구축 및 스트립센서 제작 공정도를 수립할 수 있었다.

3) 잔류 농약 검출용 스트립 센서 제조 공정의 표준화

아래 그림은 표준화된 생산 시스템을 이용하여 농약 검출용 스트립센서를 제작하기 위한 제조공정도 디자인입니다.

제 조 공 정 도		Flow chart 기호	모델명	PE-001	제·개정 (Rev)	2015년 12월 1일 (Rev. 0)	작성	검토	승인
		△저장 ◇검수	○작업 ▽출고	문서번호					
순서	공 정 명	공정 기호	작업/검수 주요 Point	관리/합격기준	사용장비명	담당부서	관련 문서명		
1	원자재 입고	-	1. COA, MSDS 수령 2. 시험성적서 수령	-	-	제조부	1. COA, 시험성적서 2. MSDS 자료		
2	원자재 수입검사	◇	1. 센서Case 치수 2. 멤브레인검증 3. 패드 검증 4. 해당 성적서	1. 스트립 case 치수 확인 TOP 가로 기준 9.7mm±0.1mm 이내 세로 기준 22.7mm±0.1mm 이내 Bottom 가로 기준 9.7mm±0.1mm 이내 세로 기준 44mm±0.1mm 이내 2. 육안검수 - 이물질/훼손/변색유무 확인 - 수지 확인 (구매시방서) - 패턴멤브레인 디자인 확인 (구매시방서) 3. COA, MSDS, 시험성적서 확인	1. Vernier calipers 2. Stick 자	제조부	1. 원자재입고검사성적서 2. 작업표준서 3. 구매시방서		
3	저장	△	1. 지정보관 장소 2. 보관 구획 3. 보관 온/습도 4. Tag 부착유무	1. 원자재별 해당 장소에 있을 것 (작업표준서 확인) 2. 보관 구획 구분이 되어 있을 것 3. 온도 -20°C±4°C(enzyme), RT°C / 습도 ≤ 20% 4. 혼입방지를 위한 Tag부착 확인	1. 온도도계 2. 냉장고(냉동실) 3. 제습장치 4. 케이스보관함 5. 시약장	제조부	1. 작업표준서		
4	발색효소 용액제조	○	1. 청결/세척 2. 오염방지 3. 이종검점 4. 용액보관시간 5. 보관온도	1. 용액제조 시 오염되지 말 것(냉장보관원칙) 2. 오염된 것 사용 금지 3. 작업자는 항상 이종검점 할 것 4. 제조 후 24시간이 지난 것은 폐기	1. Valance 2. pH meter 3. 초중류수기 4. 교반기	제조부	1. 작업표준서 2. 제조기록서		

[스트립센서 제조 공정 디자인(1)]

순서	공정명	공정기호	작업/검수 주요 Point	관리/합격기준	사용장비명	담당부서	관련 문서명
5	발색효소토출	○	1. 용액유효일자 2. 토출상태 3. 토출정량 4. 건조이동시간 5. 실내 온/습도	1. 제조 후 24시간 이내 2. cell에 완벽히 토출 3. 0.8(±0.1)uL/sec 4. 토출 후 10분 이내 건조기로 이동할 것 5. 온도 20~28°C / 습도 60% 이하	1. 디스펜서 2. 컴프레서 3. Pipet	제조부	1. 작업표준서 2. 제조기록서
6	건조	○	1. 건조기상태 2. 건조상태 3. 정결상태 4. 멤브레인 혼입여부 5. 실내 온/습도	1. 온도: 35°C ± 5°C Setting 2. 겹쳐서 건조하지 않음 3. 건조기 안은 오염되지 않도록 할 것 4. Lot간 혼입이 되지 않도록 할 것 5. 온도 20~28°C / 습도 60% 이하	1. 건조기	제조부	1. 작업표준서 2. 제조기록서
7	컷팅	○	1. 장비상태 2. 커팅치수 3. 이물질유무 4. 컷팅 후 보관상태 5. 실내 온/습도	1. 녹이나 기타 이물질이 없을 것 2. 멤브레인 : 4×17(±0.05)mm 패드 : 3.3×4(±0.05)mm 3. 1 sheet/패트리디쉬 (제조장치보관) 4. 온도 20~28°C / 습도 60% 이하	1. 스트립 절단기 2. Vernier calipers 3. 제조장치	제조부	1. 작업표준서 2. 제조기록서
8	조립	○	1. 패트리디쉬 수량 2. 패턴상태 3. 조립위치 4. 접합상태 5. 실내 온/습도	1. 멤브레인/패드 보관 패트리디쉬를 하나씩 사용 (혼입 방지) 2. 멤브레인 : 패턴면이 위로 향하게 조립 패드 : 격자무늬가 위로 향하게 조립 3. Bottom<P-M<M-V<M-F<Top 4. 접합이 완벽할 것 5. 온도 20~28°C / 습도 60% 이하	1. 포셋 2. 반제품 보관함	제조부	1. 작업표준서 2. 제조기록서
9	1차 QC	◇	1. 조립상태 2. 직선성 3. 정확성 4. 재현성 5. 실내 온/습도	1. 적중상태, 성상 형결성 확인 2. 직선성(표준물질) Malaoxone 10ppb, 100ppb, 1ppm test 3. 정확성 (Real Sample) Malaone 500ppb -> 기준장비 비교 : CV≤10% 4. 재현성(표준물질) Malaone : CV ≤ 5%	1. 측정기	제조부	1. 작업표준서 2. 제조기록서 3. 제품검사성적서

[스트립센서 제조 공정 디자인(2)]

순서	공정명	공정기호	작업/검수 주요 Point	관리/합격기준	사용장비명	담당부서	관련 문서명
10	최종코드 확인	◇	1. 직선성 2. 재현성	1. 직선성(표준물질) Malaone 10ppb, 100ppb, 1ppm test 2. 재현성(표준물질) Malaone : CV ≤ 5%	1. 측정기	제조부	1. 작업표준서 2. 제조기록서 3. 제품검사성적서
11	라벨인쇄/부착 박스포장/ Lot인쇄	○	1. 내용확인 2. 라벨링상태 3. 포장인쇄상태 4. 부착품 유무 5. 실내 온/습도	1. Lot, Code 등 내용 인쇄가 정확할 것 2. 라벨 부착 위치가 정중앙 밑 것 3. 인쇄 상태가 선명할 것 4. 부착품 모두 있을 것 (Strip, bottle, 설명서) 5. 온도 20~28°C / 습도 60% 이하	1. 컴퓨터	제조부	1. 작업표준서 2. 제조기록서
12	최종출하 검사	◇	1. 외관 2. 내용물 3. 라벨링	1. 포장물 외관에 이상이 없을 것. (이물질, 훼손, 변색유무) 2. 내용물에 이상이 없을 것. 3. 인쇄 상태가 선명할 것.	-	품질보증부	1. 작업표준서 2. 제조기록서 3. 출하검사성적서
13	완제품저장	△	1. 보관상태 2. 보관조건	1. 부적합품과 완제품(합격품) 분리할 것 2. 온도 20~28°C / 습도 60% 이하	1. 온습도계	제조부	1. 제품참고관리기준서 2. 작업표준서
14	출고	▽	1. 포장상태/수량/내용물 2. 출고일정	1. 완제품 포장상태 이상 없을 것 2. 주문에 따른 출고수량 확인 할 것 3. 주문에 따른 일자 확인 할 것	-	제조부/관리팀	1. 출하검사성적서

[스트립센서 제조 공정 디자인(3)]

본 연구진은 위의 방법론을 통하여 잔류 농약 검출을 위한 제품화를 위한 제조공정을 조정하였으며 이를 이용하여 국제 공인 기관(SGS) 등을 통한 인증을 추후 실시할 예정입니다.

나. 고감도 광학 센서를 이용한 잔류 농약 분석 시스템 개발

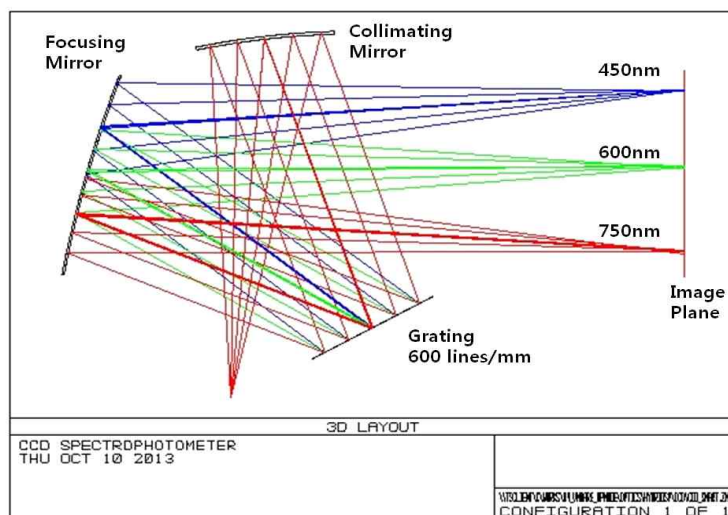
1. 분광 광학 시스템을 적용한 스트립 이미지 분석 시스템 개발

1) 분광 광학용 카메라 모듈 개발

본 연구에서의 분석 시스템은 샘플이 조사되는 광원 시스템과 분광 분석 시스템으로 구분되며 광원은 샘플의 분광 특성을 이용하여 White-LED(450nm ~ 750nm)를 사용하였으며, 분석 시스템도 이와 같이 450 ~ 750 nm 영역의 분석이 가능한 분광 분석 시스템으로 구성하였다. 또한 외부 신호 및 노이즈의 차단을 위하여 대역 통과 필터를 필요로 한다. 분광 분석 시스템에서는 샘플에서 발생한 분광의 강도 및 스펙트럼을 측정한다. 스펙트럼을 측정하기 위해서 다채널 분광 검출기를 채택하였으며, 이 과정에서 다채널 검출기의 구동 회로 및 신호 처리 회로를 개발하였다. 샘플에서 발생하는 분광은 매우 미세한 강도이므로 분광 분석 시스템에 사용되는 광학 시스템은 수차 및 광 손실을 최저로 감소시킬 수 있도록 최적 설계가 되어야 한다.

분광 분석 시스템은 기존에 구성된 spectrometer의 소형화에 초점을 맞추어서 개발 되었다. 기존 분광 시스템의 구조는 여러 가지가 있지만 대표적으로 Czerny-Turner mount type, Seya-Namioka mount type 로 나누어진다. 첫 번째 Czerny-Turner mount의 경우에 있어서 구동하는 부분이 없고 Seya-Namioka mount 형태에 비해서 정확한 측정 정확도를 가지며, 이미지면에서 나타나는 오차를 보정할 수 있다는 장점이 있다. 두 번째 Seya-Namioka mount의 경우에 있어서 Czerny-Turner mount 경우에 비해 사용되는 광학 부품이 작고, 이미지면에서의 오차가 적고, Czerny-Turner mount 경우처럼 구동하는 부분이 없다는 장점이 있지만, 존재하는 에러에 대한 보정이 힘들고 정확한 광학 정렬이 맞아야 원하는 분해능을 얻을 수 있다는 단점이 있다. 이러한 부분을 고려하여 첫 번째 형태인 Czerny-turner mount 형태로 본 연구에서 제안한 소형화된 분광 분석 시스템을 구현하였다.

본 연구에서 제안한 분광 분석 시스템을 제작하기 위해서 광학 설계 프로그램을 이용한 기본적인 구성을 하였다. 그리고 구성된 시스템에 대한 해석을 수행하였다. 광학 설계 프로그램을 이용하여 구성된 시스템은 아래 그림과 같다.



[분광분석 시스템의 광학 설계]



[분광분석 시스템 시작품]

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

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

표. 분광 시스템의 성능표

Performance Test Report

1. Wavelength Accuracy (Holmium Oxide, Serial No. 15997)

Certified Value	451.36nm	485.21nm	537.21nm	641.15nm
Measured Value1	452.0nm	485.0nm	537.0nm	641.0nm
Measured Value2	452.0nm	485.0nm	537.0nm	641.0nm
Measured Value3	452.0nm	485.0nm	537.0nm	641.0nm
Mean.	452.0nm	485.0nm	537.0nm	641.0nm
STD.	0.00	0.00	0.00	0.00

2. Photometric Accuracy & Reproducibility (Neutral Density Filter, Cert No. 15630)

Wavelength	465.0nm	546(546.1)nm	590.0nm	635.0nm
Certified Value	0.959	0.990	1.028	0.981
Measured Value1	0.945	0.995	1.035	0.995
Measured Value2	0.942	0.993	1.038	0.995
Measured Value3	0.947	0.997	1.039	0.997
Mean.	0.945	0.995	1.037	0.996
STD.	0.003	0.002	0.002	0.001

3. Baseline Flatness (450~750nm, Scan Step = 1nm)

	Max. ABS	Min.ABS	Max.-Min.	(Max.-Min.)/2
Measured Value 1	0.001	-0.003	0.004	0.002
Measured Value 2	0.002	-0.003	0.005	0.003
Measured Value 3	0.001	-0.003	0.004	0.002

표. 분광 시스템의 성능결과표

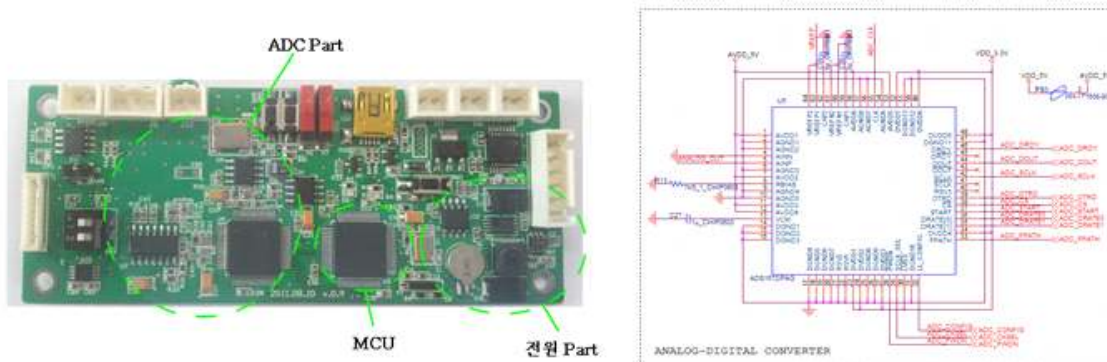
Liquid Sample 측정을 위한 앞서 설계한 분광시스템을 기반으로 형광/분광 통합시스템 개발을 위해 Light Source를 LED로 사용하고 PD/CCD 검출기를 이용하여 Spectroscopic Optical System을 Design 하였다. 형광은 UV LED 와 PD 형태, 분광은 White LED 와 Spectrographic(CCD) 형태로 450 ~ 750 nm, 10nm Bandwidth, -0.5~2.000 ABS 의 Spec 결정되었다.

본 연구에서 사용되는 형광 특성은 아직 정해지지 않아 임의적으로 형광분석시스템의 광원은 분광분석시스템의 광학 설계에 따라 370nm LED를 적용하고 광원의 Bandwidth를 보장하기 위하여 10nm의 Bandwidth를 갖는 370nm 간섭필터를 사용하였으며, 형광 반응 분석 시스템은 400-700nm 영역의 분석이 가능한 분광 분석 시스템을 구성하였다.



[분광측정 시스템]

2) 분광 광학용 CCD 모듈 개발



[CCD 측정부 보드(좌) 및 ADC 회로(우)]

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

아날로그 신호를 디지털 신호로 변환하기 위해서 24-Bit Analog-to-Digital Converter를 사용하였고, CCD 센서에서 측정된 아날로그 DATA를 Digital로 변환하여 SPI 통신으로 MCU로 DATA를 전송한다. 그림 M-3. 에서의 ADC는 MCU의 IO포트와 SPI 통신을 통해서 제어가 가능하다.

이 ADC 회로를 통해 얻을 수 있는 샘플링 속도는 $78.125\text{kSPS}(=12.5\mu\text{s})$ 이고, 이 샘플링 속도에서 얻을 수 있는 DATA의 수는

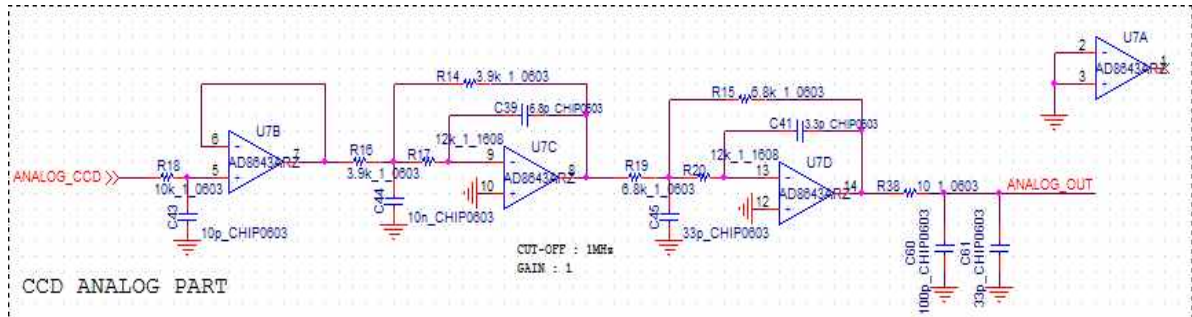
CCD pixel 수 : 3648(약 3700)

CCD Master Clock : $0.8\text{MHz}(=1.25\mu\text{s})$

CCD DATA Rate : $0.2\text{MHz}(=5\mu\text{s})$

CCD가 모든 pixel를 읽는 시간은 $3700 * 5\mu s = 18.5ms$ 가 된다.

취득 가능한 DATA의 수는 $18.5ms / 12.5\mu s = 1480$ 이 된다.



[날로그 필터 회로]

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



CCD 모듈



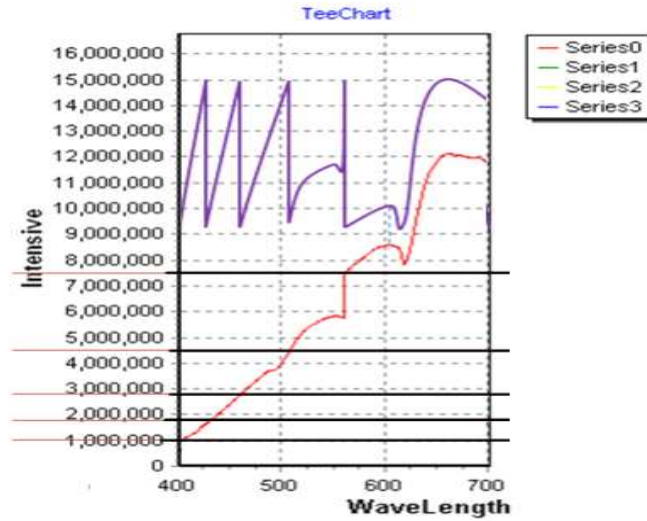
Analog Part

[CD 센서 보드]

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

표. CCD 이미지 센서 주요 특징

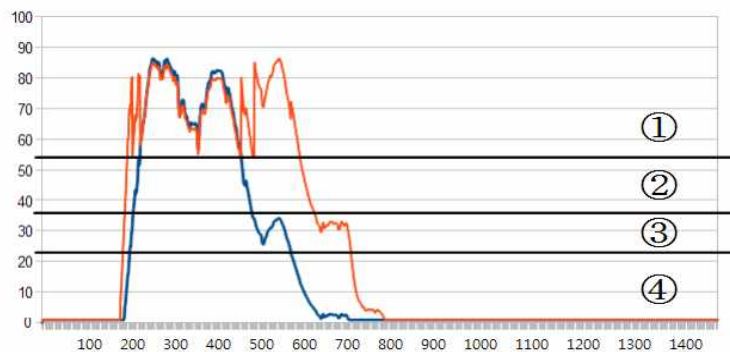
3) 분광 광학용 CCD 측정 알고리즘 개발



[CCD 알고리즘 원리]

아래 그림에서 붉은색으로 표시한 선은 기본 광량에서 측정한 데이터이고, 이 기본 광량을 6개의 구간으로 나누어 (그림에서 5개의 검은선) 각 구간별로 최대값들이 설정한 목표 범위에 들어갈 수 있도록 노출시간을 조정하여 데이터를 측정한다. 노출시간을 달리해서 측정한 6개의 데이터를 합하면, 그림 M-6에서 보라색 선으로 표시할 수 있다.

이렇게 기본 광량에서 구간을 설정한 후 목표 범위에 도달할 수 있도록 노출시간을 조절하여 충분한 광량을 나타낼 수 있게 하는 방법을 FULL AUTO GAIN CONTOLL(이하 Full AGC)라 정의한다. Full AGC를 통해 얻은 각 구간 설정 값과 각 구간에서 설정된 노출시간을 가지고 샘플 측정이 이루어진다.

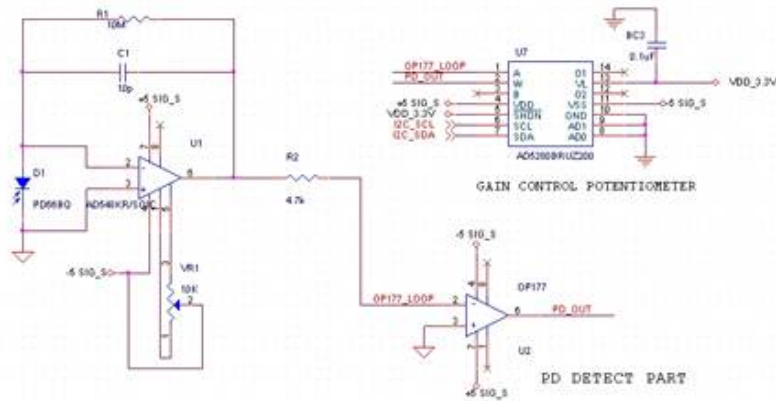
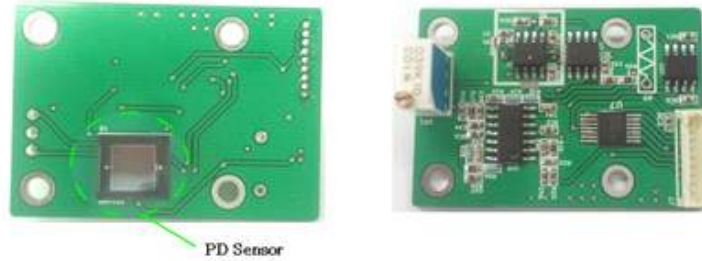


[Full AGC DATA]

아래 그림은 실제 기기를 이용하여 측정한 데이터를 나타낸 것이다. 파란색으로 표시한 선은 기본 광량을 측정한 후 최대값이 목표범위 (90~80) 안에 들어갈 수 있도록 노출시간을 조정한 데이터이다. 이 데이터에서 최대값을 기준으로 Full AGC를 하면, 주황색으로 표시한 결과 데이터를 얻을 수 있다. 이와 같이 구간 별로 노출시간을 조정하여 측정 데이터 값을 증폭시킴으로써 파장에 대한 낮은 데이

터 값에서의 측정보다 노출시간이 조정 된 높은 데이터 값에서의 데이터산출 값이 보다 다 분별력이 있다. 현재 이러한 CCD의 신호처리기법은 특허출원 준비 중에 있다.

4) 분광 광학용 PD 측정 모듈 개발

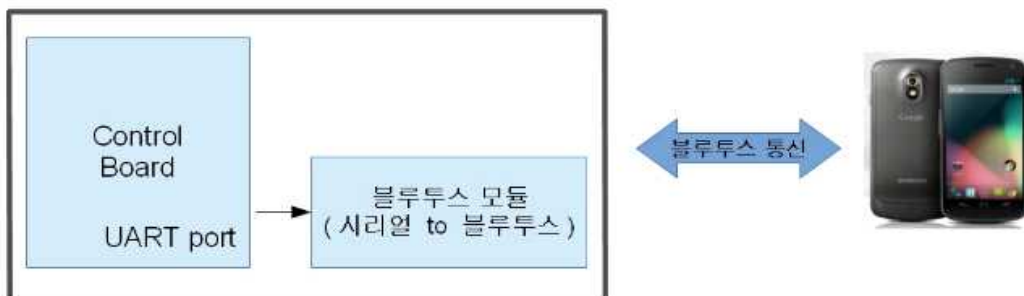


[PD 센서보드 구성도(위) 및 회로도(아래)]

위 그림은 PD 센서 보드로 HAMAMATSU사의 S1336BR Visible 영역 PD 센서를 사용하여 형광량을 측정하도록 사용하였다. DIGITAL Potentiometer를 적용하여 Reference 측정시 최적의 광량을 회로상의 Gain 조정을 통하여 이루어지도록 구현하였으며 이와 같은 구성시의 장점으로서는 보다 높은 분해능의 저해율을 계산할 수 있으며, 시료별 Reference 값이 달라짐에 따른 Gain 튜닝작업을 SW를 통하여 쉽게 적용할 수 있다. AD5280BRUC200은 내부 저항값이 최대 200kΩ으로 총 255단계까지 MCU와 I2C 통신을 통하여 조절이 가능하게 되어 있다.

최대 증폭율은 200kΩ / 4.7kΩ 으로 입력 신호 대비 약 42배까지 증폭할 수 있다.

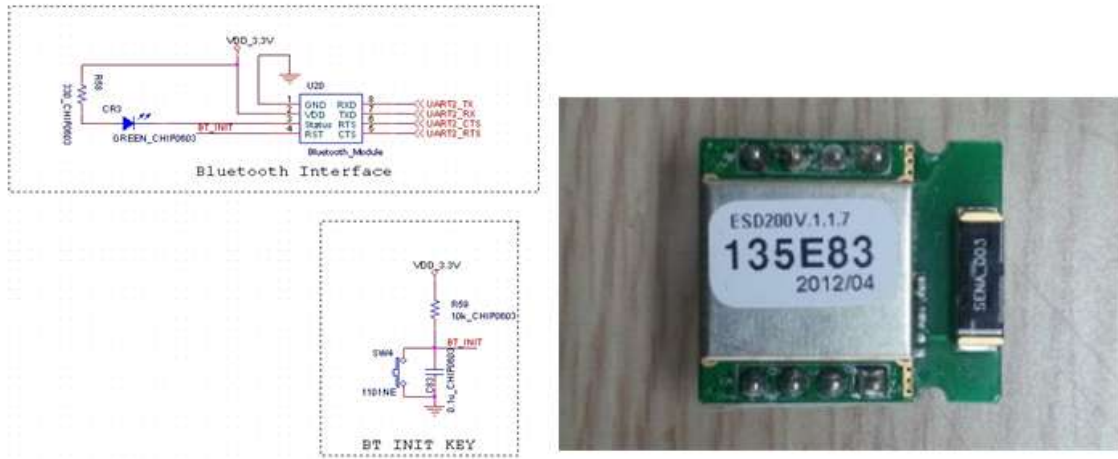
5) 무선 통신(B/T) 환경 구축



[무선 통신 환경 구축의 예]

제어 보드는 UART2 포트를 이용하여 블루투스와의 연결을 하는데, 블루투스의 연결 상태를 확인 할 수 있도록 CR3의 LED를 통해서 확인이 가능하며, 블루투스 모듈의 초기화를 하기 위한 리셋 버튼 SW4를 별도로 설계해 놓았다.

미리 정의된 통신 프로토콜을 이용하여 제어 보드에서 측정한 결과를 스마트폰으로 전송을 하며, 스마트폰에서 제어 보드를 제어할 수 있도록 한다.

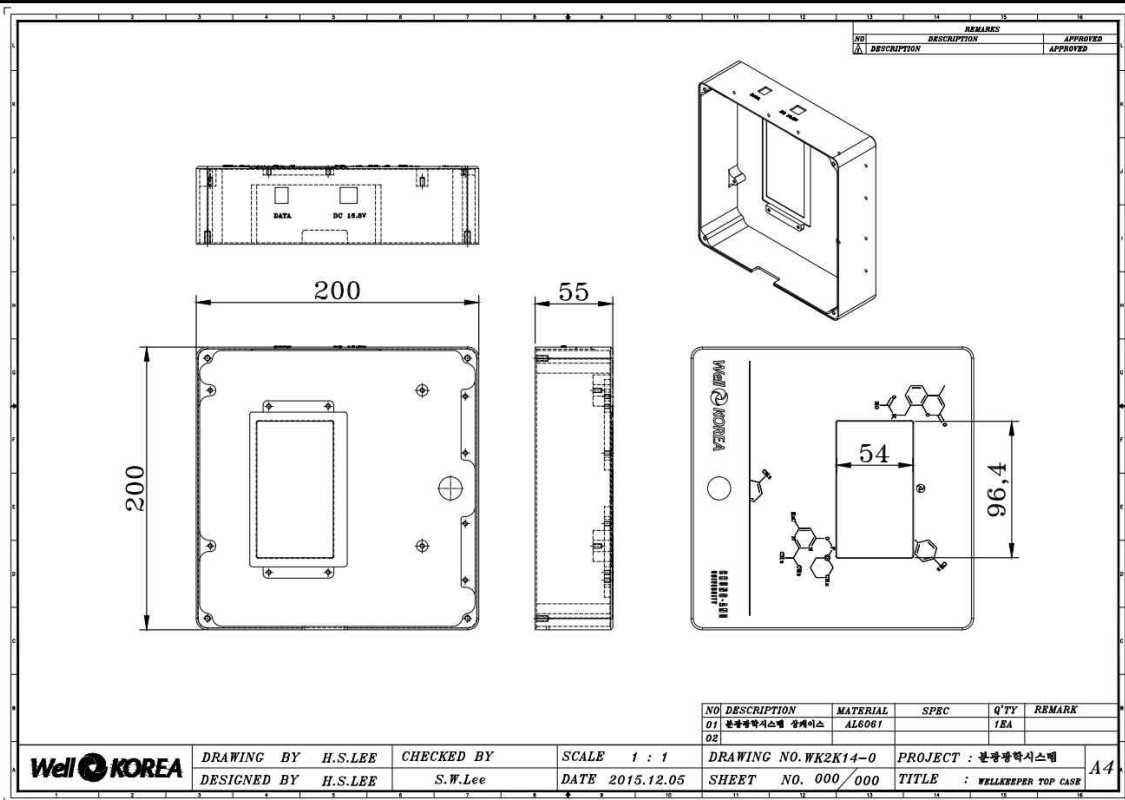


[BT Interface 회로도(좌) 및 사용 모듈(우)]

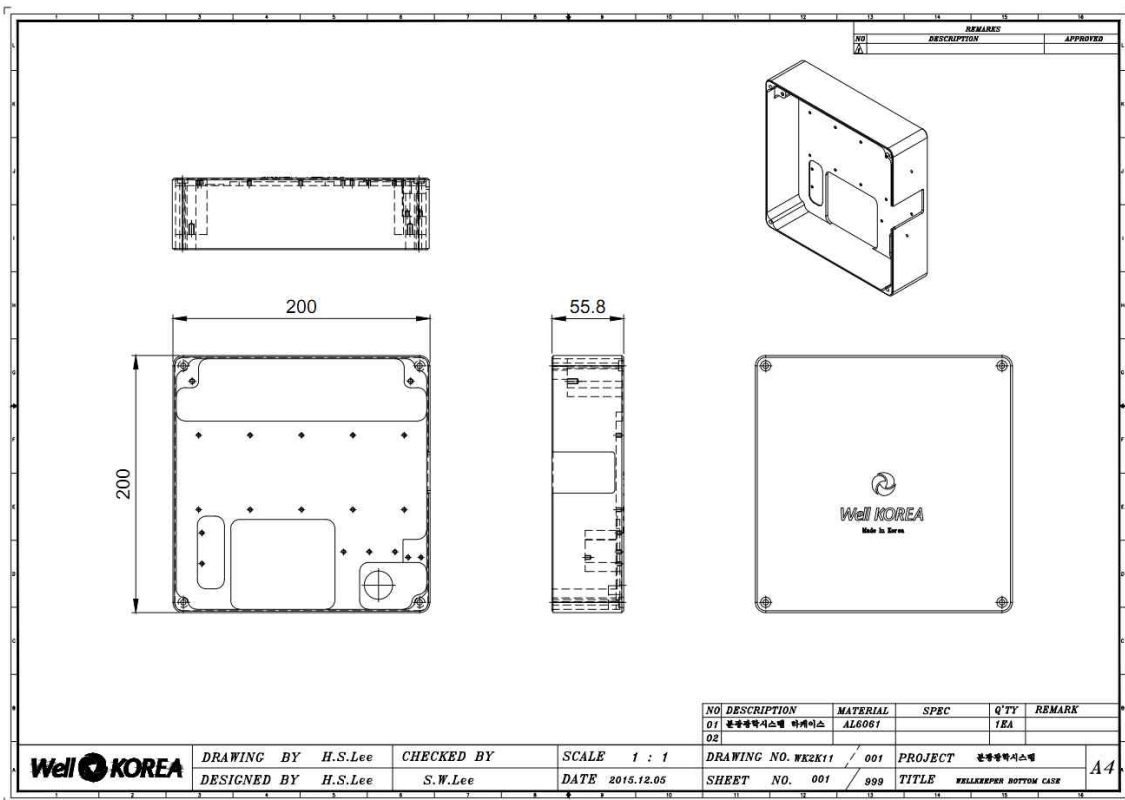
블루투스 모듈은 칩센의 ESD200을 사용하고, 이 모듈은 UART 인터페이스가 있는 장치를 블루투스 무선 네트워크를 통해 통신할 수 있도록 해주며, 동작거리는 30m를 지원한다. 안테나 형태는 고정된 내장형 안테나를 지원하고 있고, 블루투스 v1.2를 지원한다.

6) 휴대용 분광 광학용 분석 시스템 개발 (5ch Multi 분석 시스템)

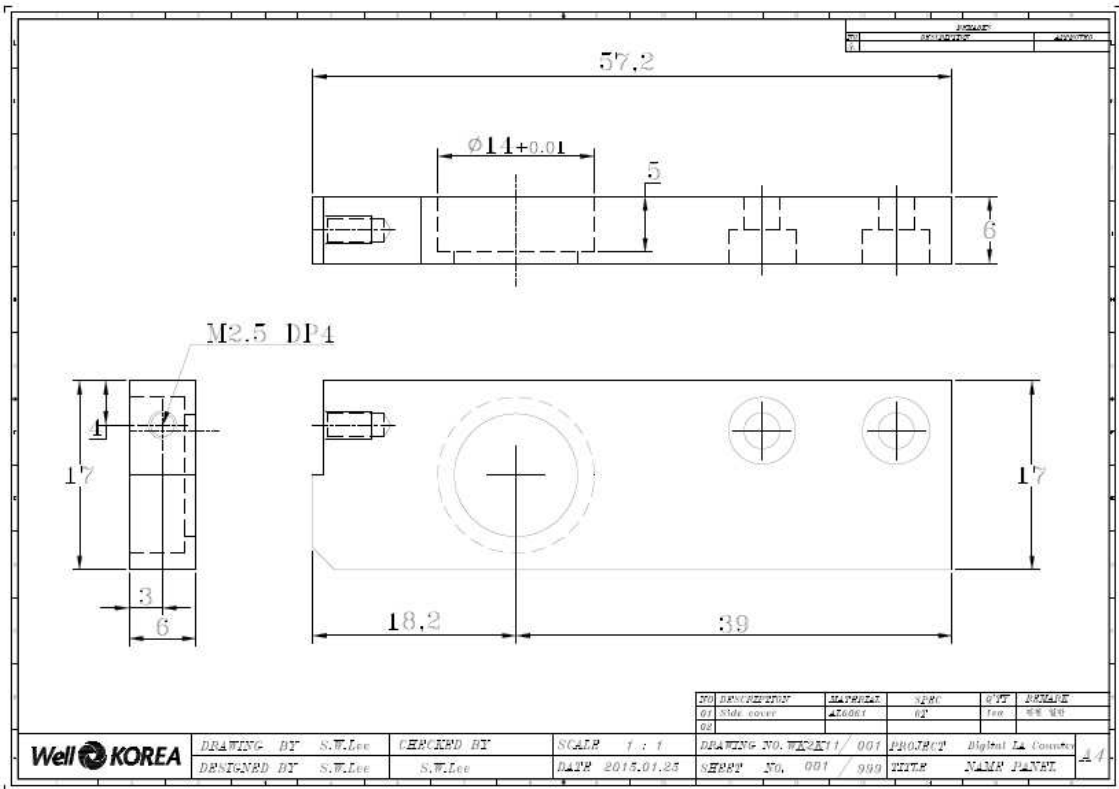
현장에서 측정 및 분석이 용이하도록 소형화 경량화에 중점을 두었고 5채널 동시 측정이 가능한 방식으로 개발하였다. 분광은 암실과 같은 구조에서 영상을 처리해야 선명한 영상을 취득할 수 있으므로 외부에서 유입되는 잡광을 막는데도 중점을 두었다. 사용자의 편리성을 고려하여 10" Touch screen 방식을 적용하였으며, 시료 투입과 배출은 조작키에 의해 자동으로 인출입되는 시스템으로 개발하였다. 제품의 성능을 높이고 액상 상태의 시료를 온전히 인출입하기 위하여 LM Guide Rail을 적용하여 보다 부드럽고 안정적인 구동이 되도록 개발하였다. 아래 그림들은 최종 개발된 분광 광학용 분석 시스템 2D/3D 도면과, 그 아래에는 최종 제품 사진들이다.



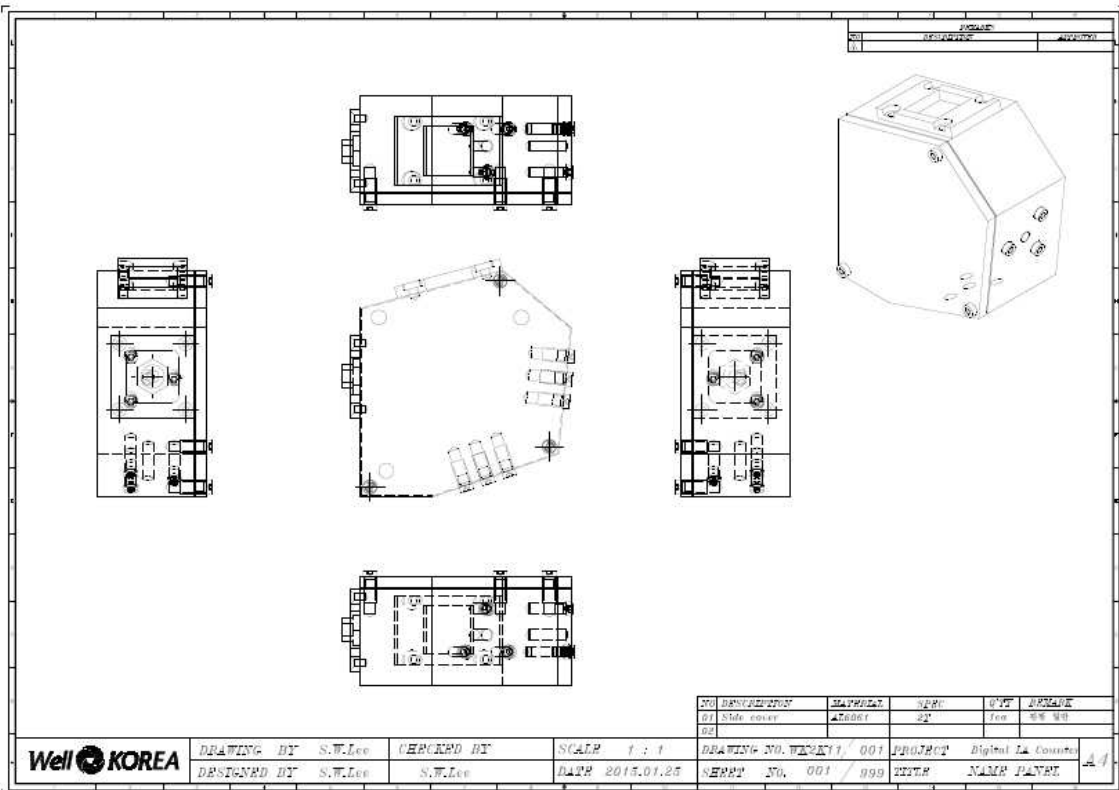
[분광광학 시스템 상케이스 도면]



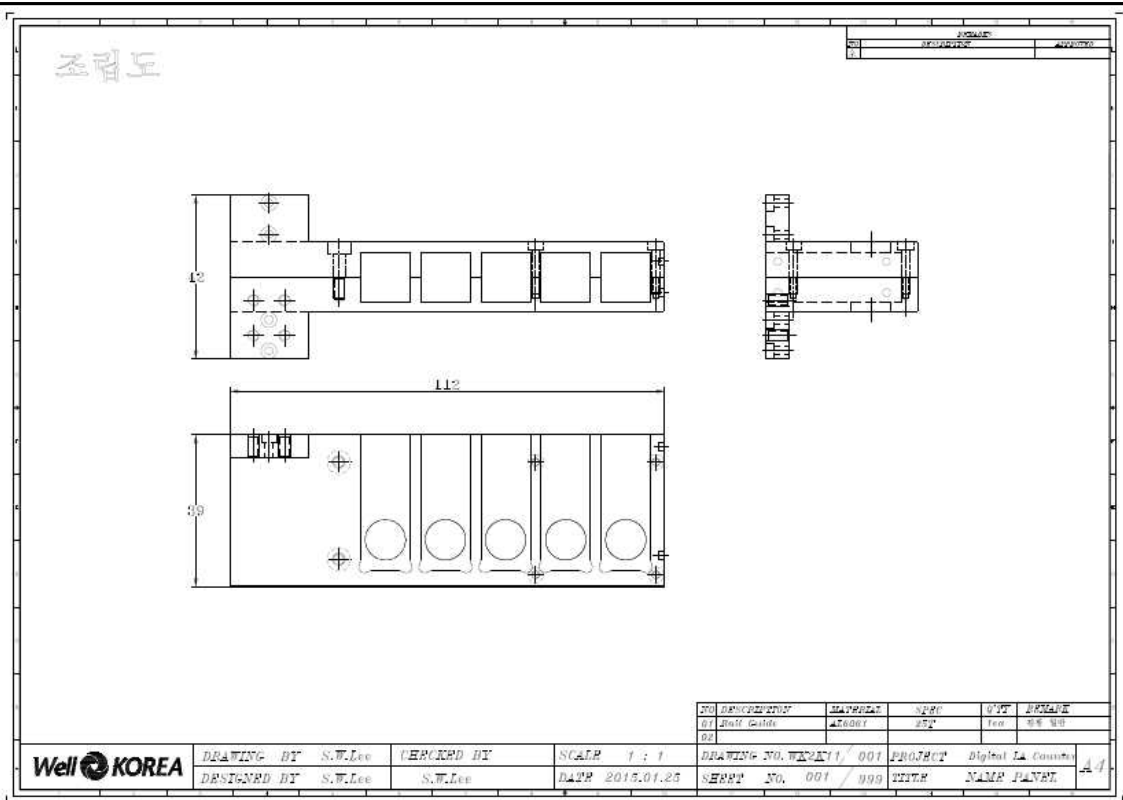
[분광 광학시스템 하케이스 도면]



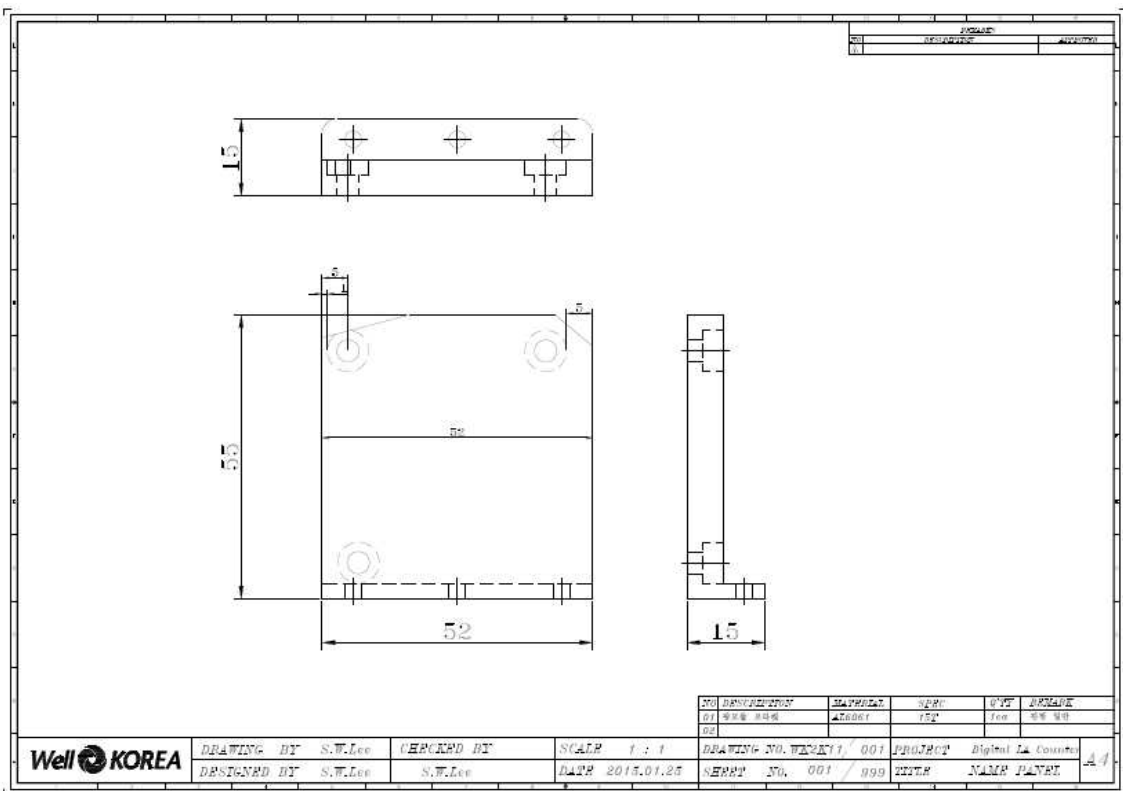
[분광 광학시스템 사이드 커버 도면]



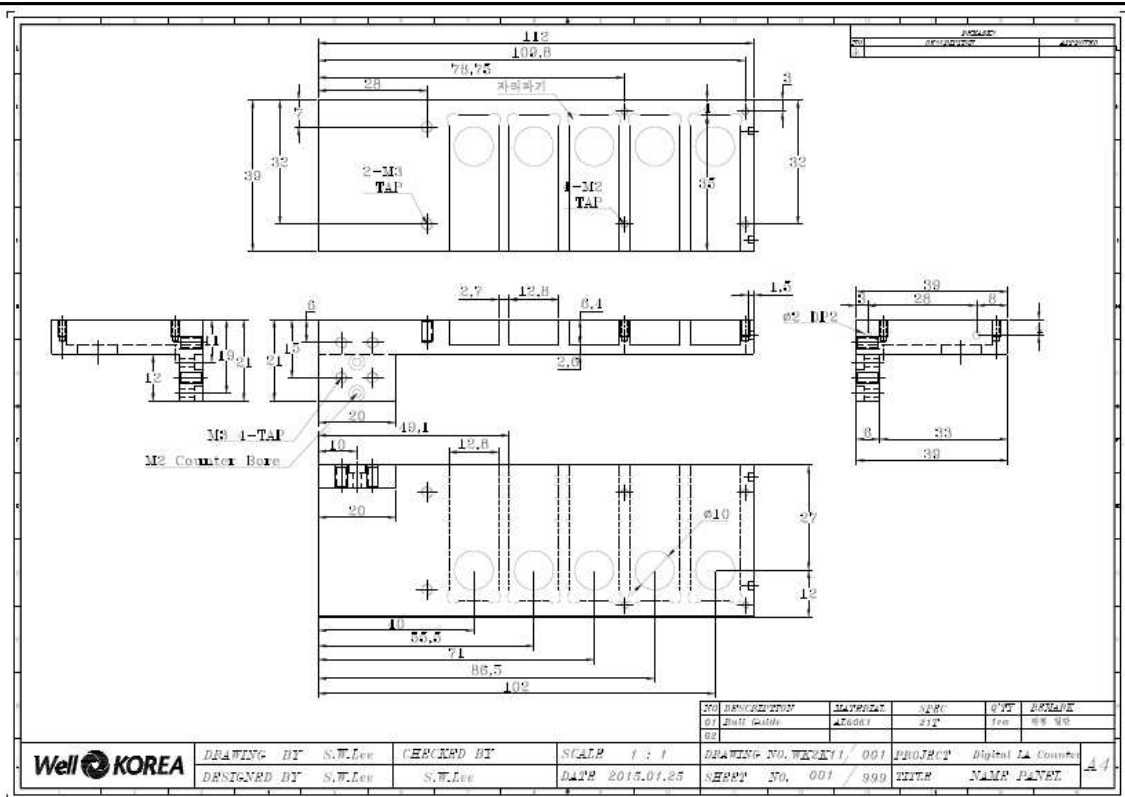
[분광 광학시스템 사이드 커버 도면]



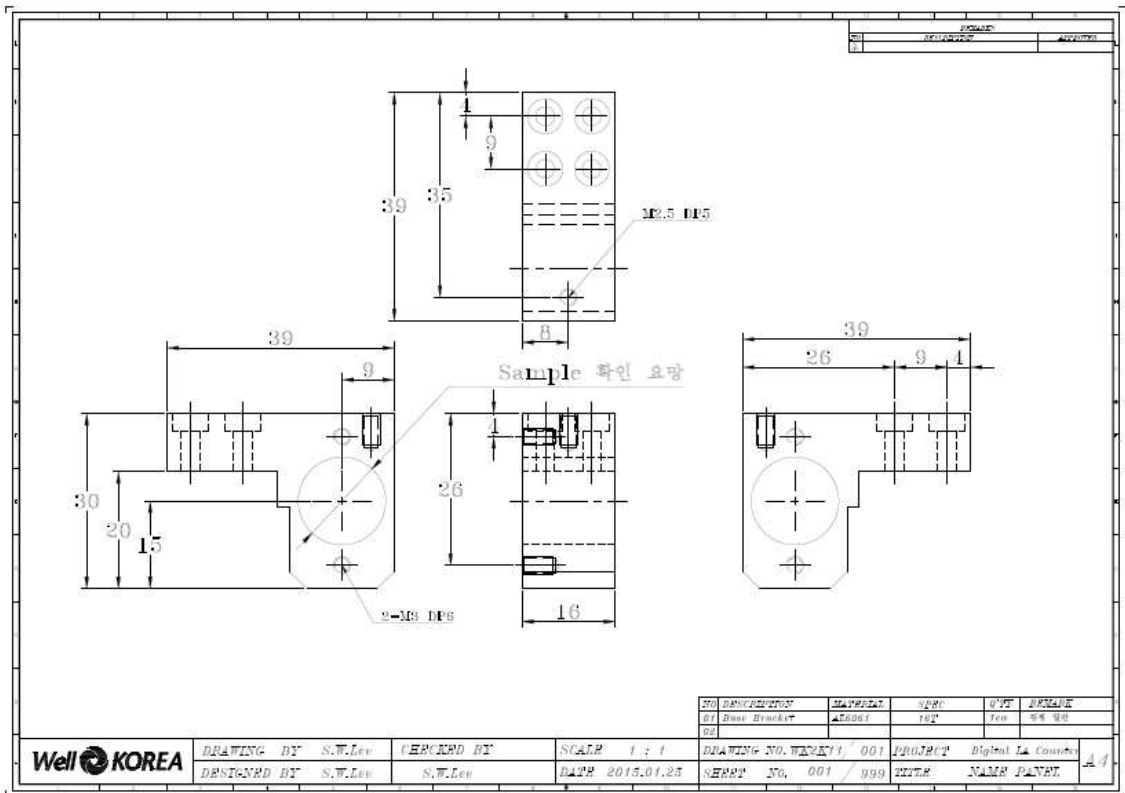
[분광 광학시스템 레일 도면]



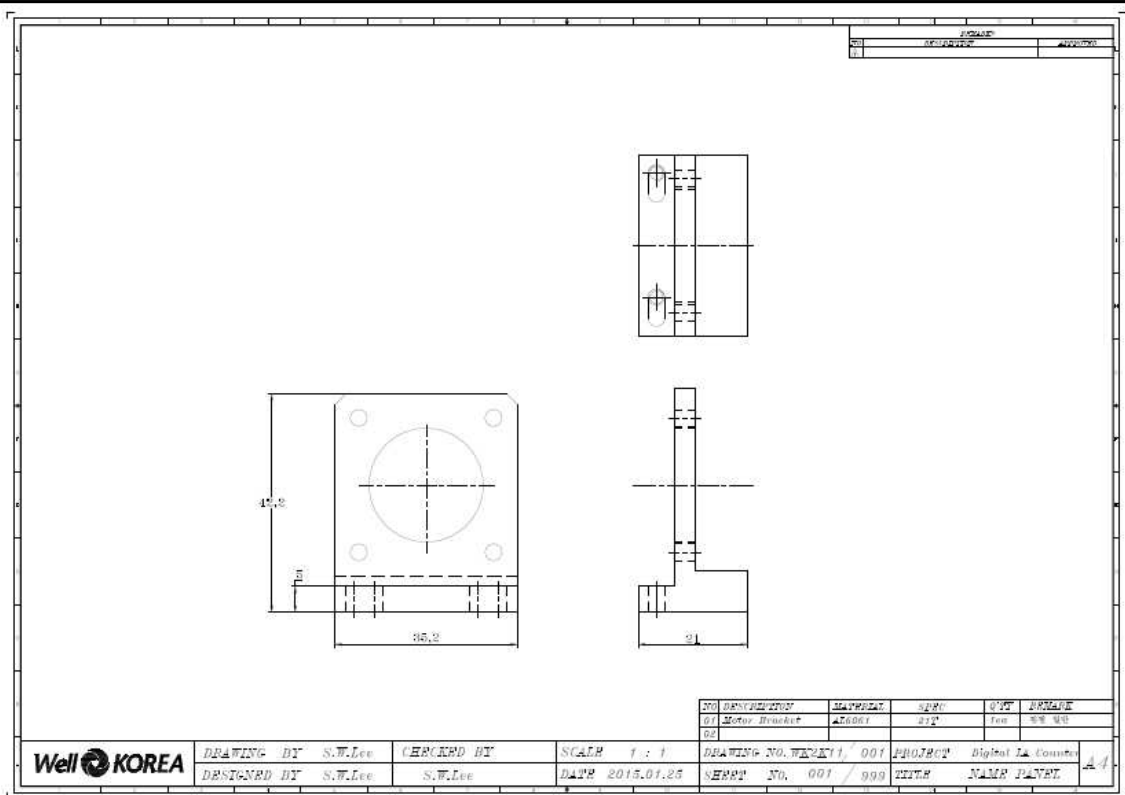
[분광 광학시스템 광모듈 브라켓 도면]



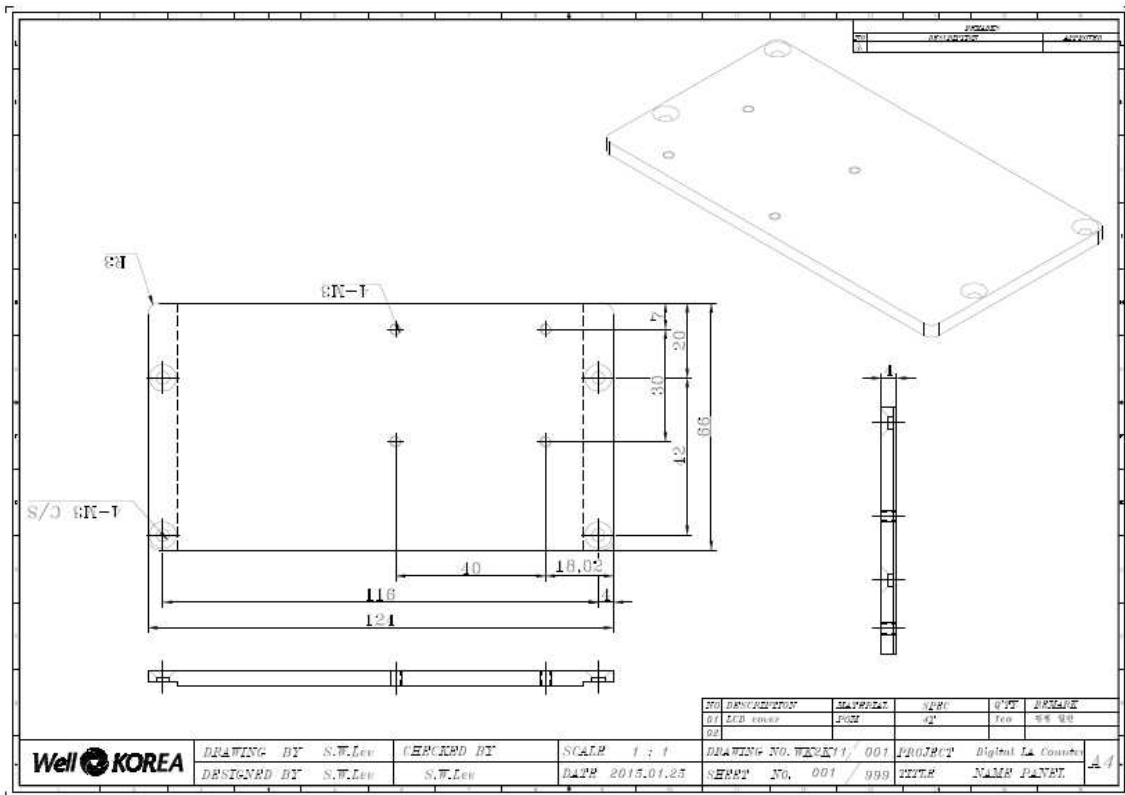
[분광 광학시스템 레일 도면]



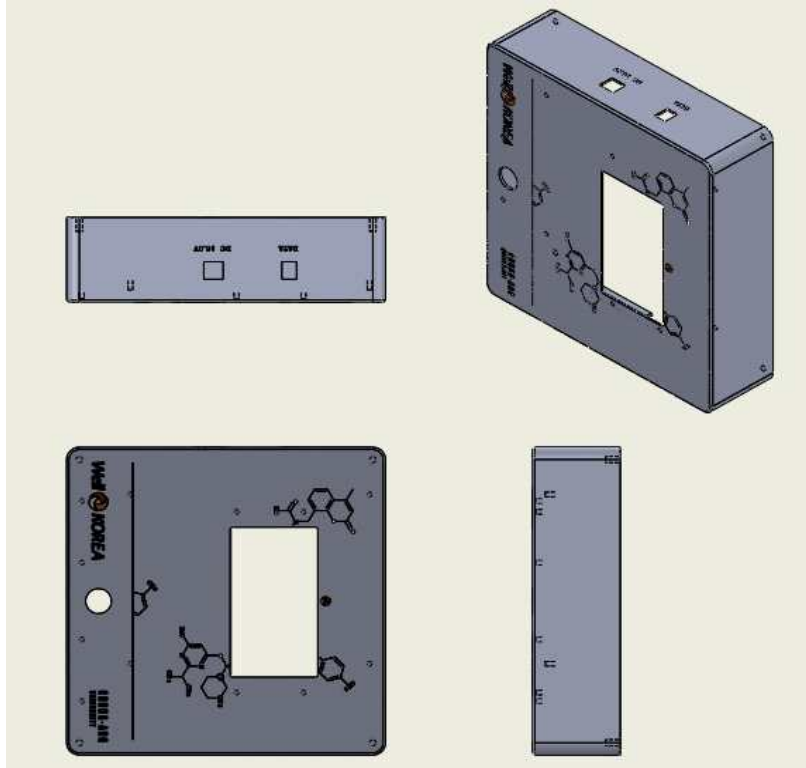
[분광 광학시스템 브라켓 도면]



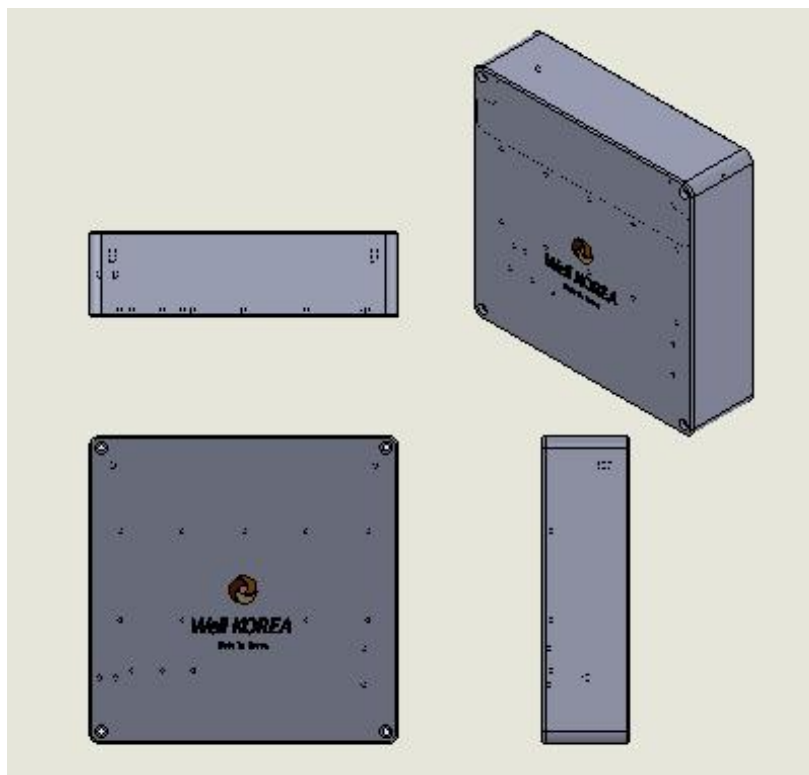
[분광 광학시스템 모터 브라켓 도면]



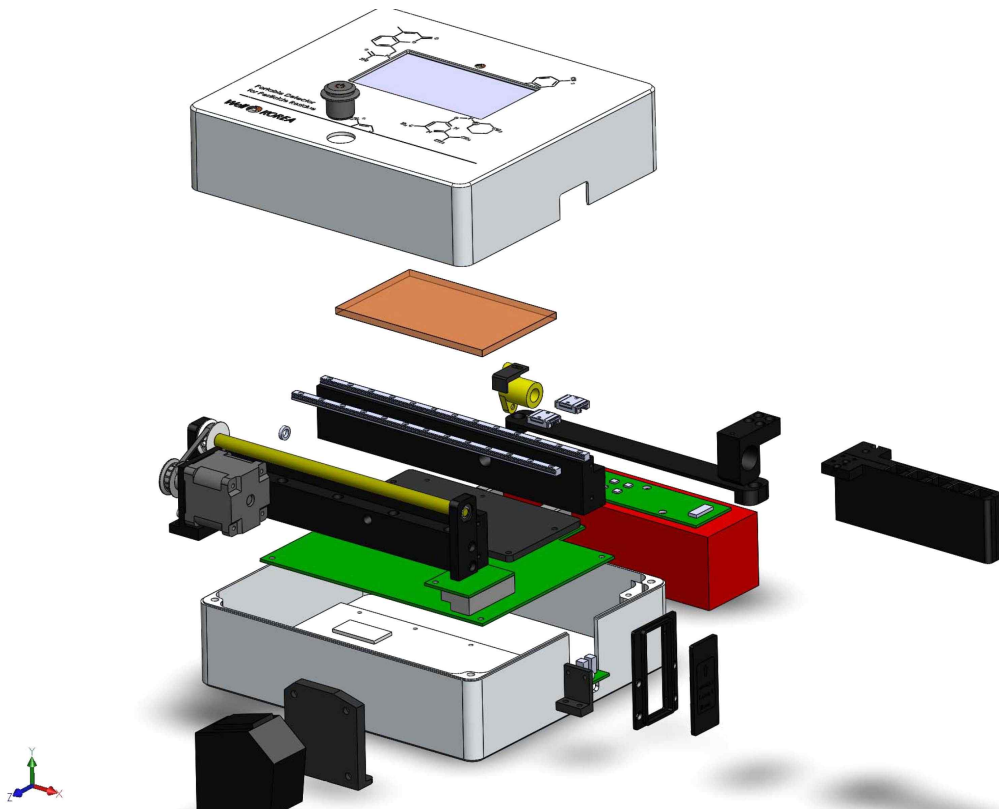
[분광 광학시스템 LCD 커버 도면]



[분광 광학시스템 상케이스 3D 도면]



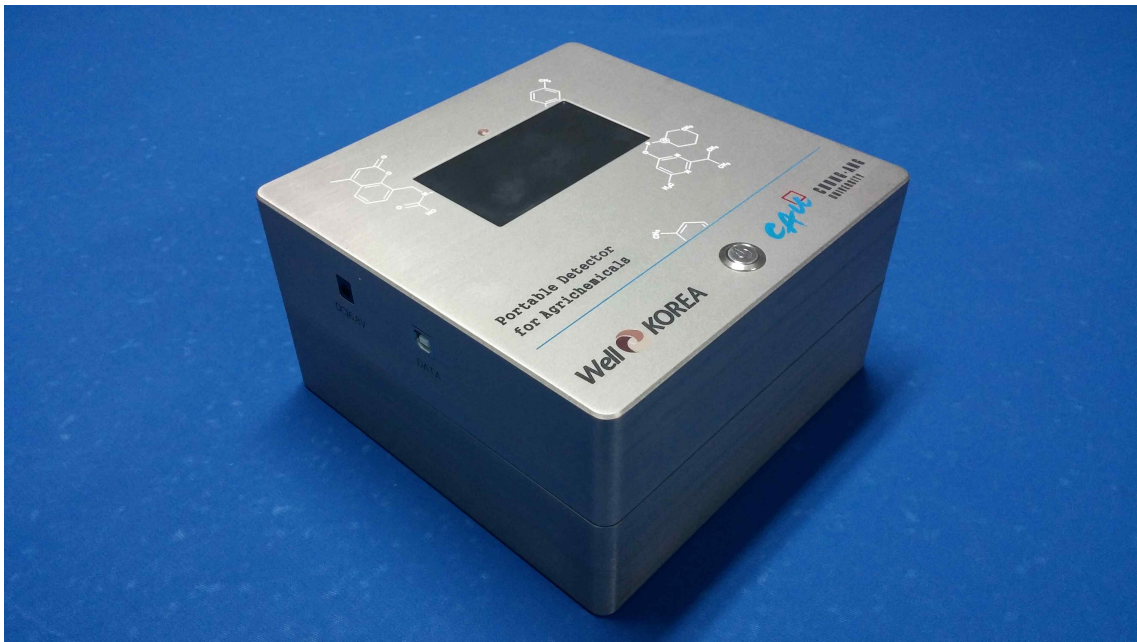
[분광 광학시스템 하케이스 3D 도면]



[분광 광학시스템 3D 구성도]



[분광 광학시스템 조립시 전면부 사진]



[분광 광학시스템 조립시 사진]

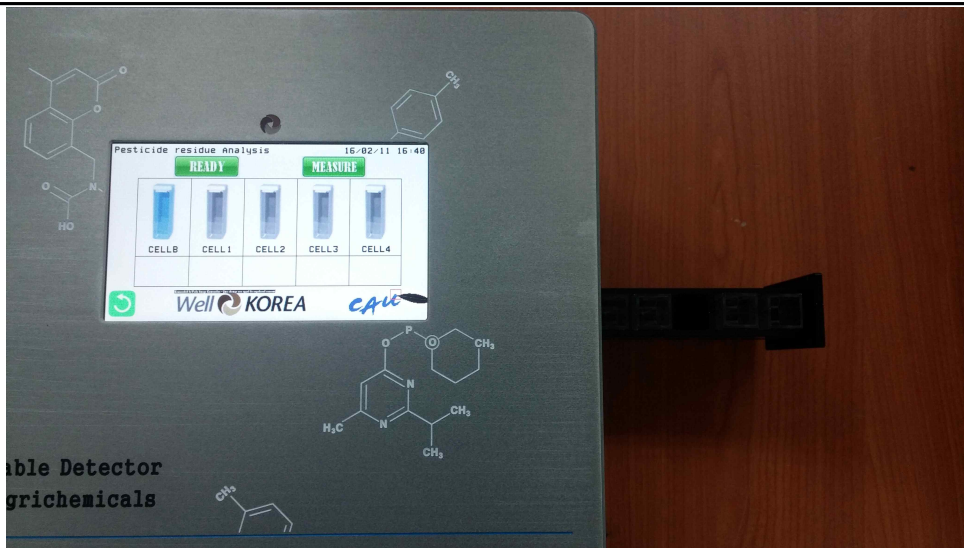
7) 휴대용 분광 광학용 분석 시스템 조작 방법



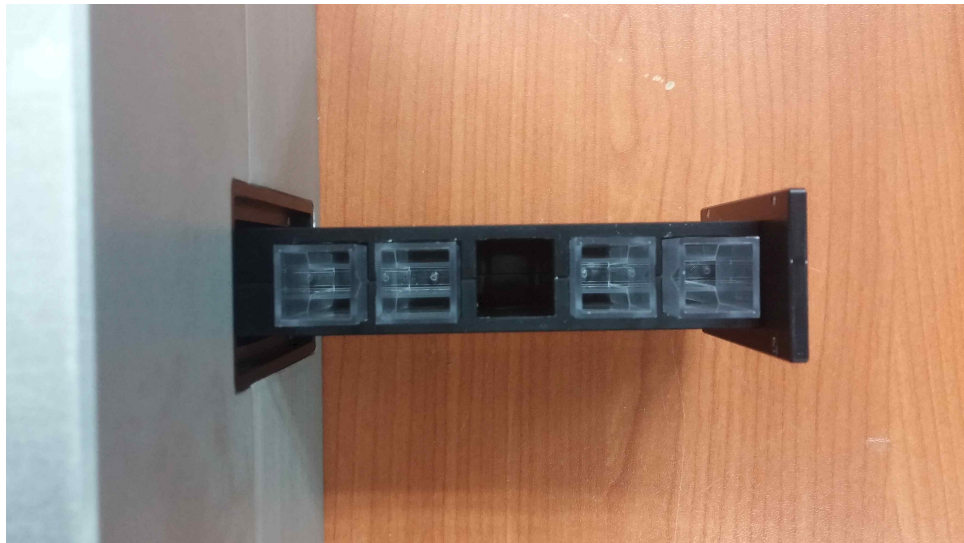
[전원 스위치 ON]



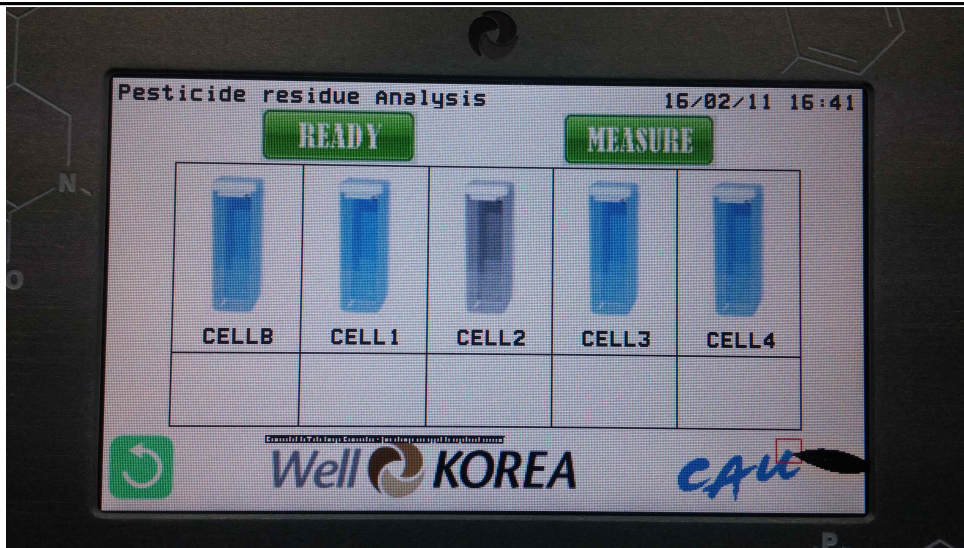
[측정 준비 (측정 버튼 터치)]



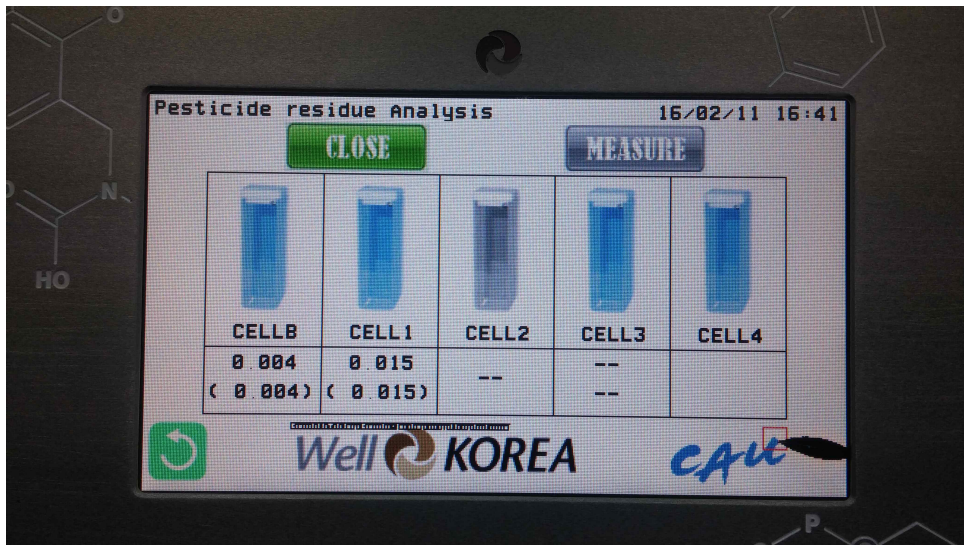
[시료 투입 준비 (측정 버튼 터치 -> 시료 투입구 자동 배출)]



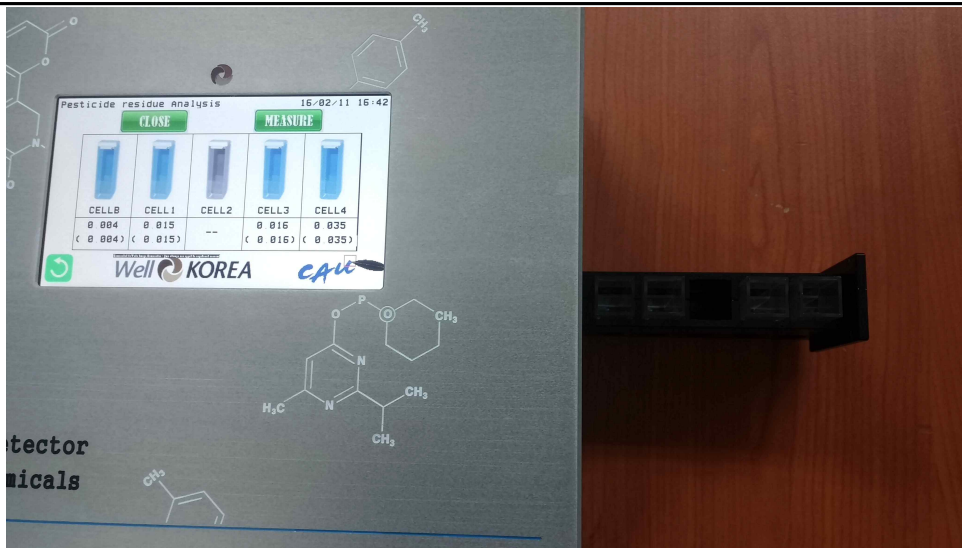
[시료 투입 (설명을 위하여 4개의 시료만 투입)]



[측정하고자 하는 시료 선택 후 “MEASURE” 버튼 터치]



[자동으로 시료 공급 후 자동 측정 개시]



[측정 완료 (시료 투입부 자동 배출)]

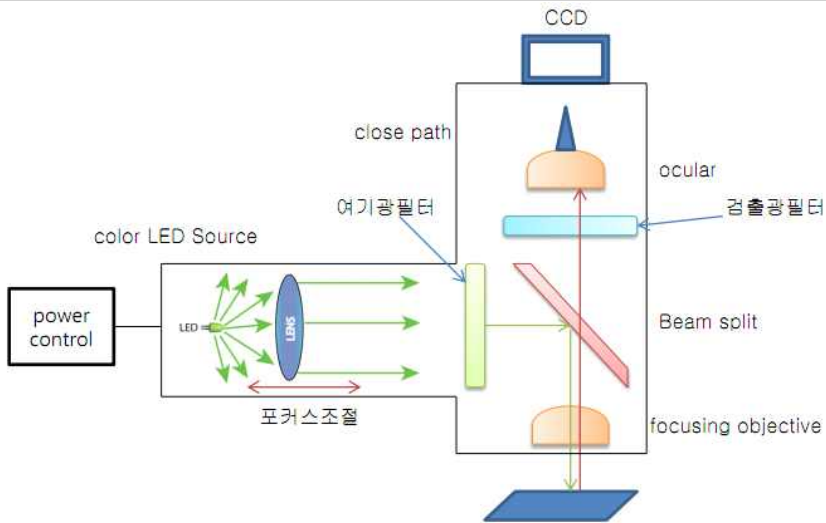
2. 형광 광학 시스템을 적용한 스트립센서 분석 시스템 개발

1) 형광 광학용 카메라 모듈 개발

형광 광학용 분석시스템은 잔류 농약이 내포되어 있는 스트립센서에 LED 빛을 조사하면 일정 파장대의 형광이 방출되는데 이때 방출되는 형광을 카메라로 측정하여 잔류 농약을 검출하는 방식으로 LED 빛의 조사량과 각도 그리고, 반응하는 파장대가 매우 중요한 요소이다. 초기 연구 결과에서 LED 빛에 의해 방출되는 형광의 최적화된 파장대는 650nm ~ 670nm 영역으로 확인되었고, 이와 같이 최적화된 파장대 영역에서 잔류 농약을 검출하기 위하여 LED 전용 필터를 적용한 카메라 모듈을 개발하였다. 카메라 모듈의 구성품 및 사양은 다음의 표와 같고, 그 아래 그림들은 카메라 모듈 개발에 있어 LED의 선정, 필터의 선정, 형광 스펙트럼 분석 기법등을 도식화 하였다.

순번	항목	사양
1	LED 전용 필터	반사 : 640nm / 투과 : 685nm / 빔스플리트 : 655nm
2	RED LED CHIP	640nm 3W
3	LED Collimation lens with mount	coating : 350-700nm / f = 20mm
4	Achromatic lens	EFL : 30mm
5	FM Tube	FOV : 3.43 * 2.57 with 1/3" CCD
6	CCD Camera Set	AVT MAKO G-125C

표. 형광 광학용 카메라 모듈 구성품 및 사양표



- 포커싱렌즈의 배율이 높을 수록 여기광의 에너지가 높아지고 타겟과 거리가 가까워 형광검출이 잘됨
- 반대로 검출영역이 적음
- 포커싱렌즈의 배율이 작으면 타겟과 거리가 멀어지며 검출영역이 넓어짐.
- 반대로 형광신호가 작게 검출됨

[카메라 모듈 개발 컨셉]

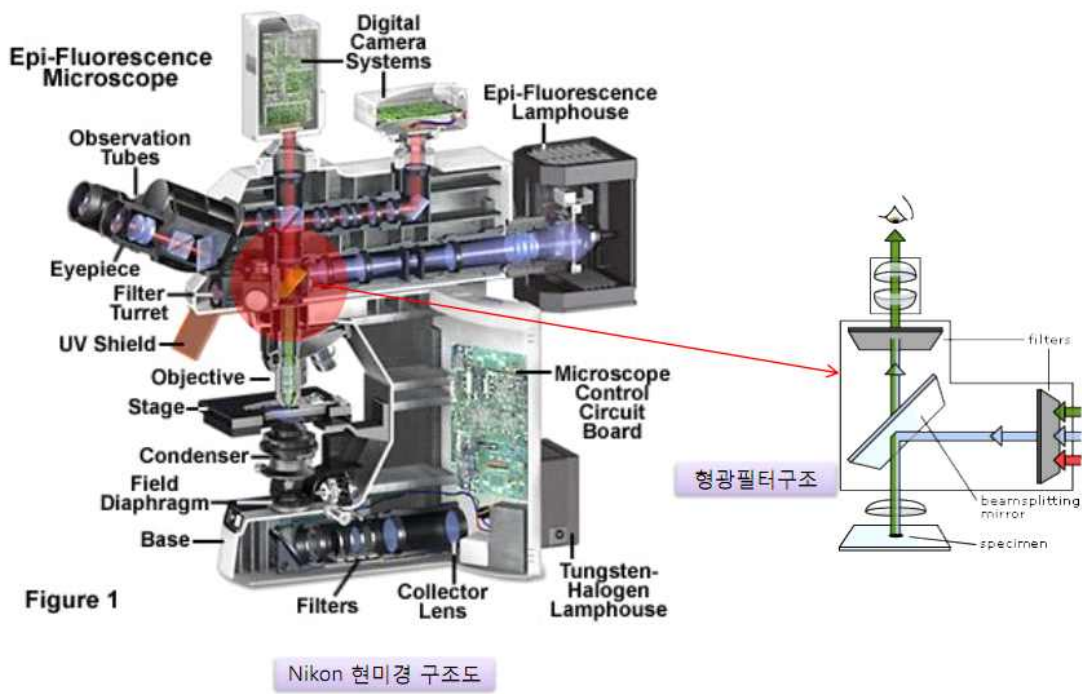


Figure 1

Nikon 현미경 구조도

[카메라 구조 이해도]

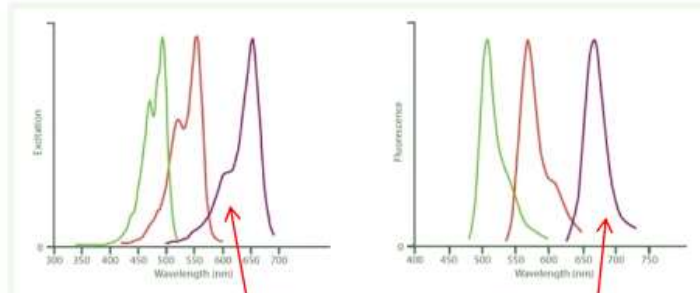


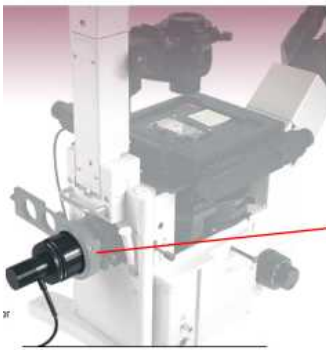
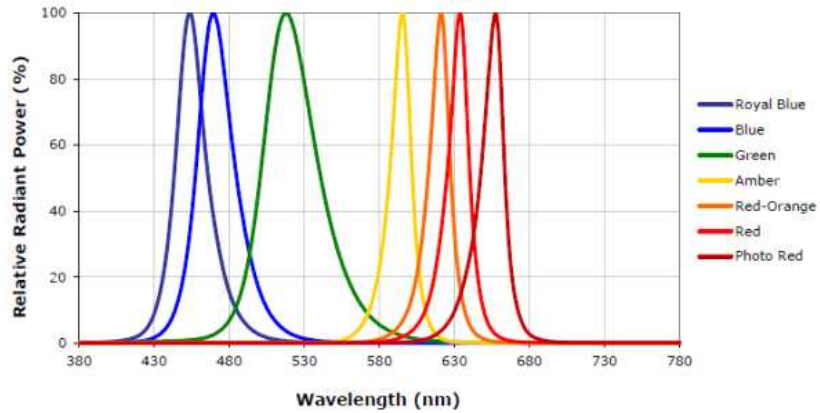
Figure 2. Excitation (left) and emission (right) spectra of Cy2 (green), Cy3 (red) and Cy5 (purple). Peak heights were normalized after the spectra were obtained with an M-series spectrofluorometer system from Photon Technology International, Inc.

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

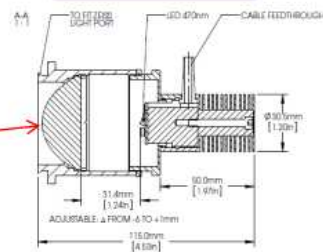
[형광 스펙트럼 검출 영역]

Color

Power LED 스펙트럼

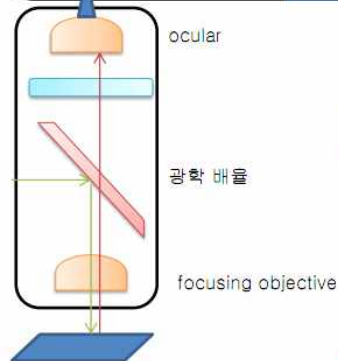
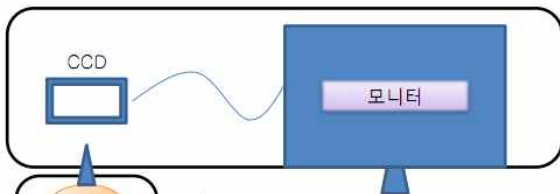


내부구조



[LED Light Source]

비디오 배율



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

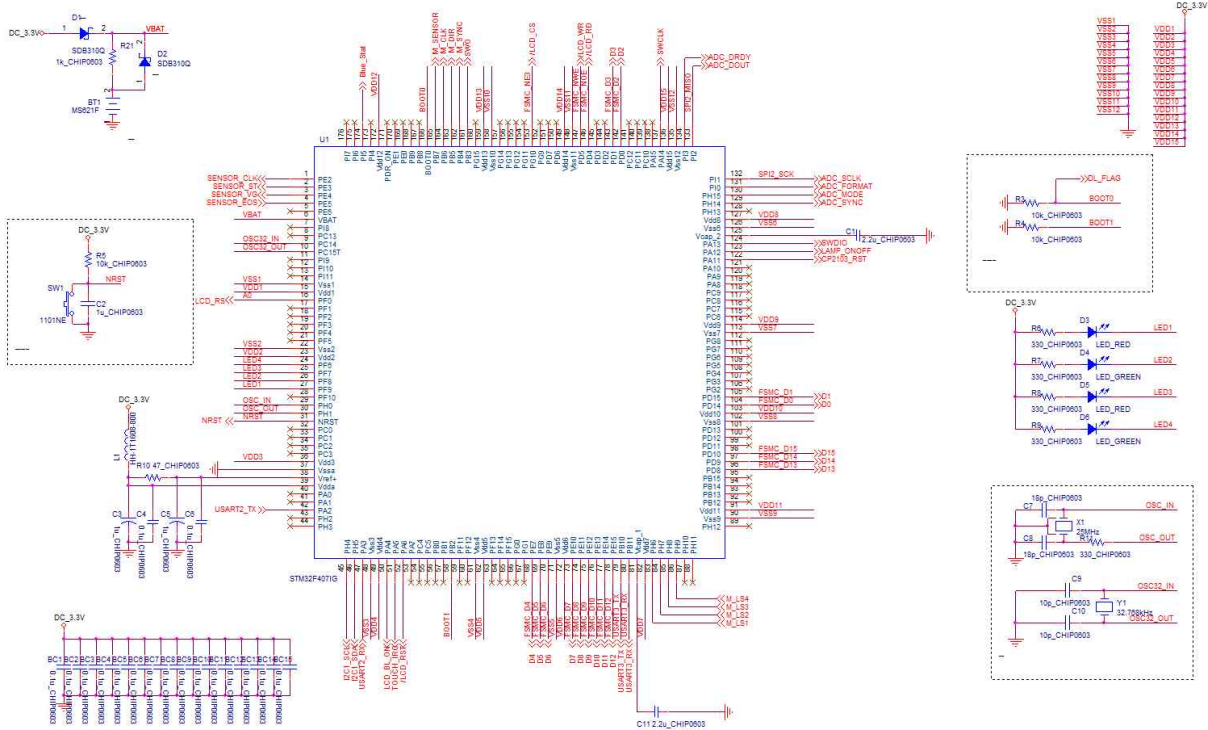
Camera Format	Monitor Size						
	9"	12"	14"	15"	17"	20"	27"
1/4"	57.2X	76.2X	79.0X	85.0X	96.0X	127X	171.5X
1/3"	31.8X	50.7X	59.0X	63.0X	72.0X	84.6X	114.1X
1/2"	28.6X	38.1X	45.0X	48.0X	54.0X	63.5X	85.7X
2/3"	20.8X	27.7X	32.0X	34.0X	39.0X	46.2X	62.3X

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



[CCD 배율 선정 기준표]

2) 형광 광학 시스템 제어 모듈 개발



[MCU]

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

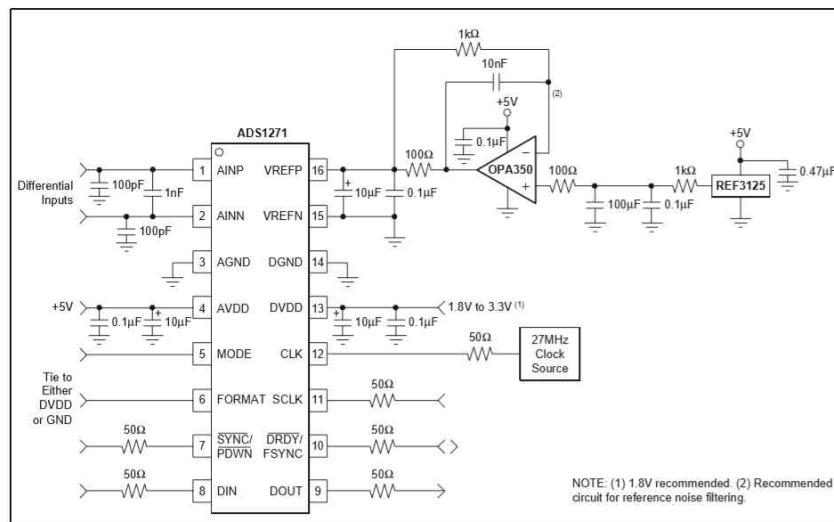
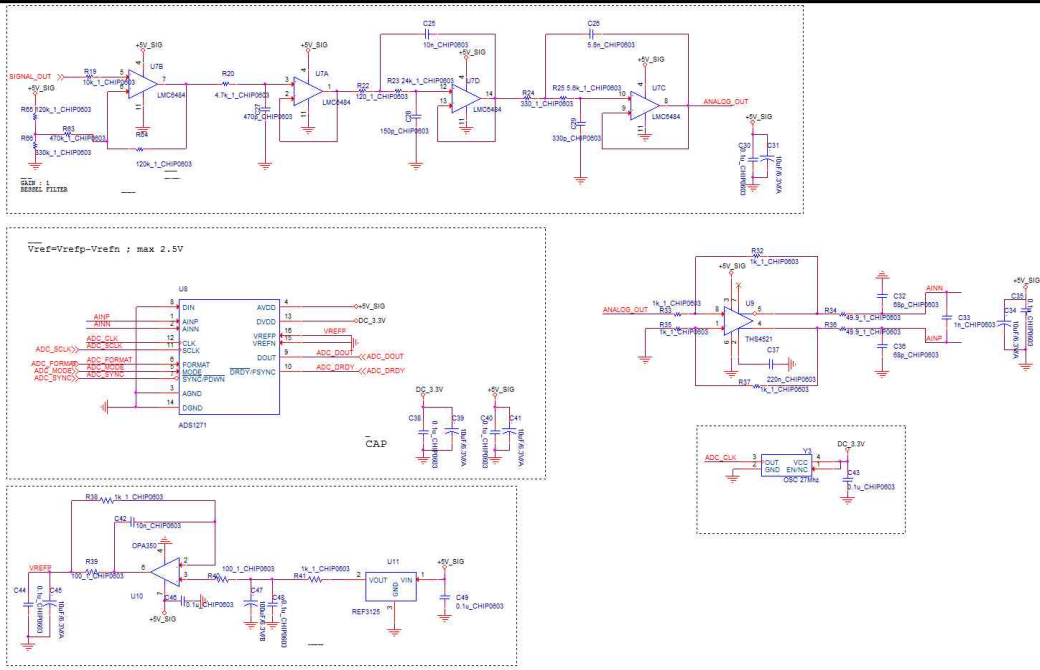


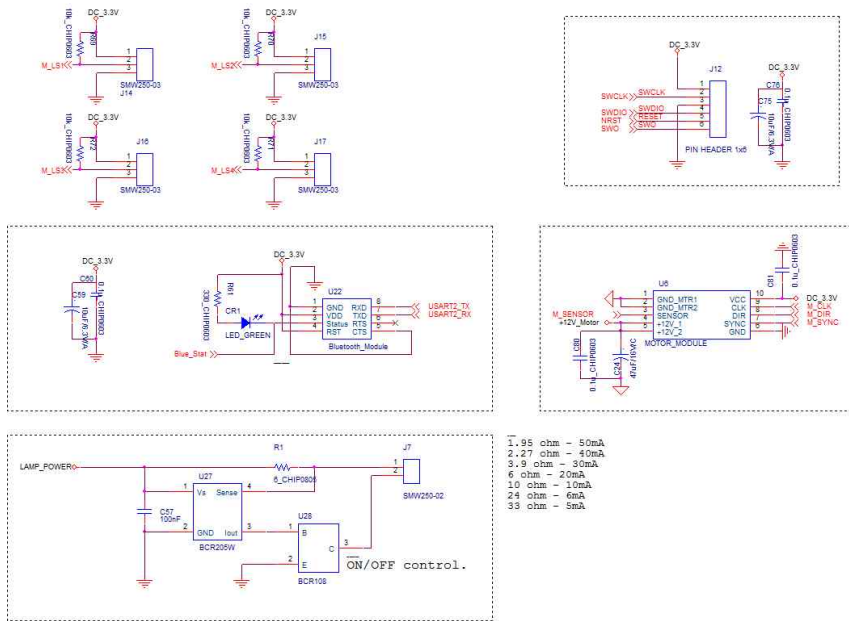
Figure 68. Basic Connection Drawing

[ADS1271 DATASHEET]

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

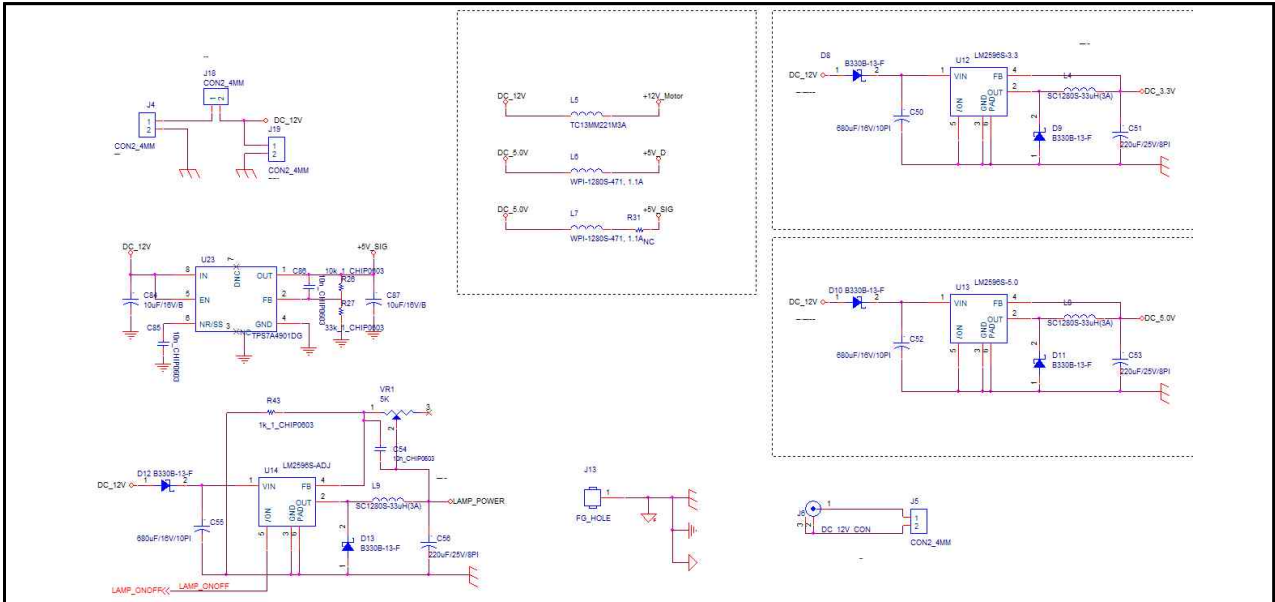


[ADC 회로]

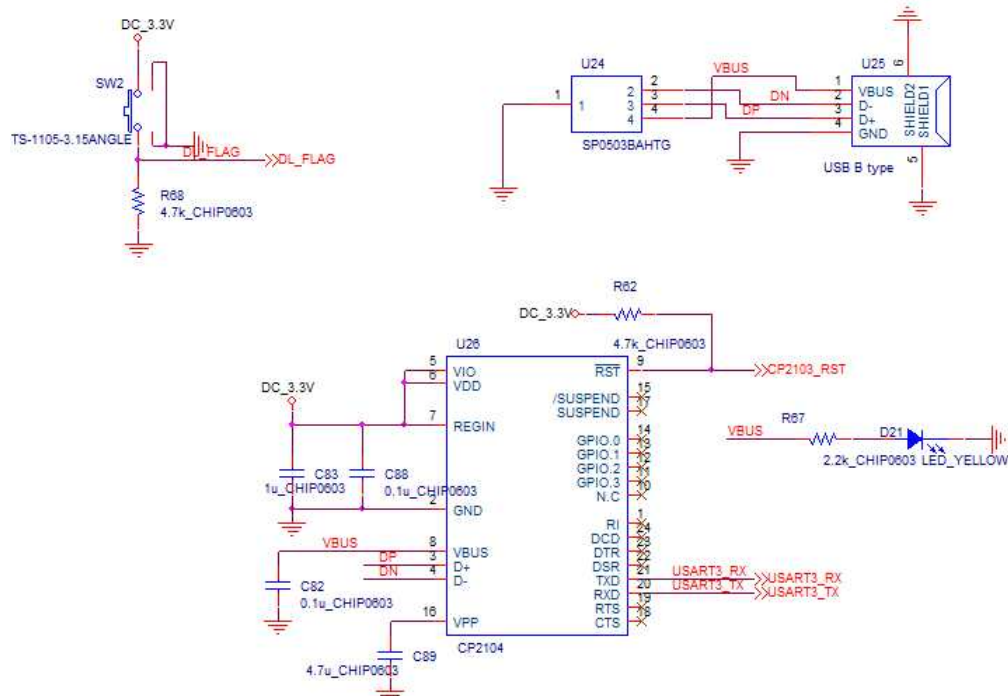


[기타 입출력 회로]

위 그림에서는 외부에서 입력받는 스위치 즉, 리미트 스위치, PhotoDiode SW의 인터페이스 회로와 Vision 사용되는 Lamp 전원 On/Off 회로, Step Motor를 구동하기 위한 인터페이스회로를 설계하였다. 아래 그림에서는 필요한 전원을 공급하기 위한 회로로서 12V를 입력받아 5V/3.3V를 공급하는 회로로 구성하였고 FG(외함접지)에 그라운드를 물려 외부 전자파 노이즈 및 써지 노이즈를 저감하도록 설계하였다.



[POWER BOARD 회로]



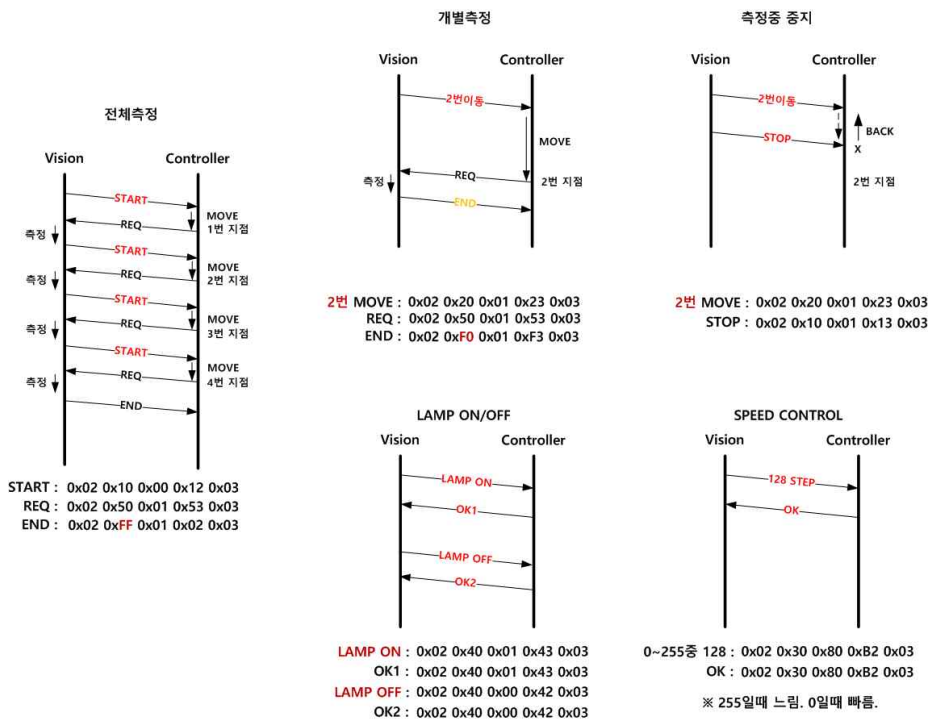
[USB 인터페이스 회로]

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

- 통신방식 : 시리얼 통신, 9600 bps / 8/ 1/ N

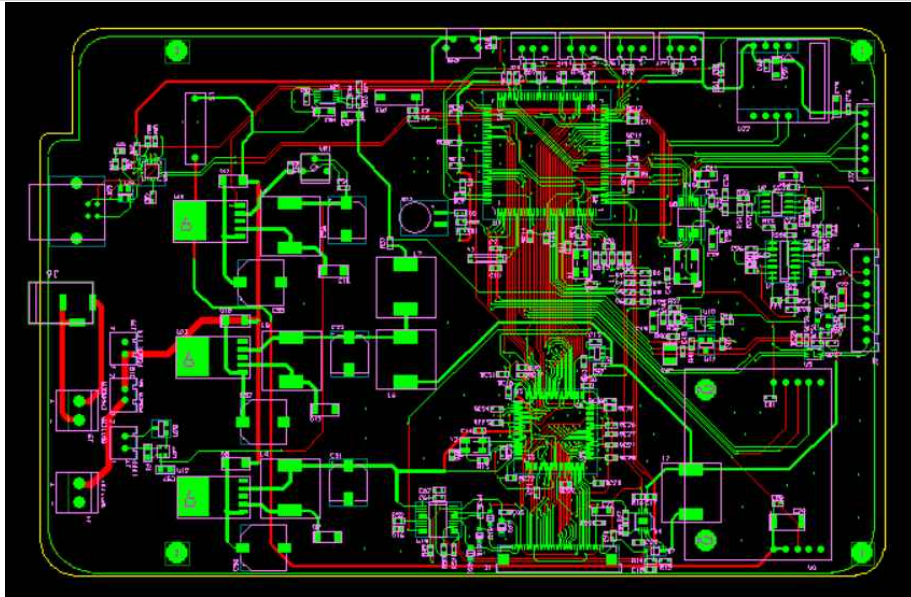
	내용	STX	CMD	DATA	CheckSum	ETX
동작관련	시작(전체측정)	0x02	0x10	0x00	0x12	0x03
	중지	0x02	0x10	0x01	0x13	0x03
	복귀	0x02	0x10	0x02	0x14	0x03
매뉴얼 동작관련	측정끝(auto)	0x02	0xFF	0x01	0x02	0x03
	측정끝(manual)	0x02	0xF0	0x01	0xF3	0x03
	개별	0x02	0x20	0x00~ 0x03	0x22~0x25	0x03
속도관련	Free Scale	0x02	0x30	0x00~0xff	STX~DATA SUM	0x03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

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



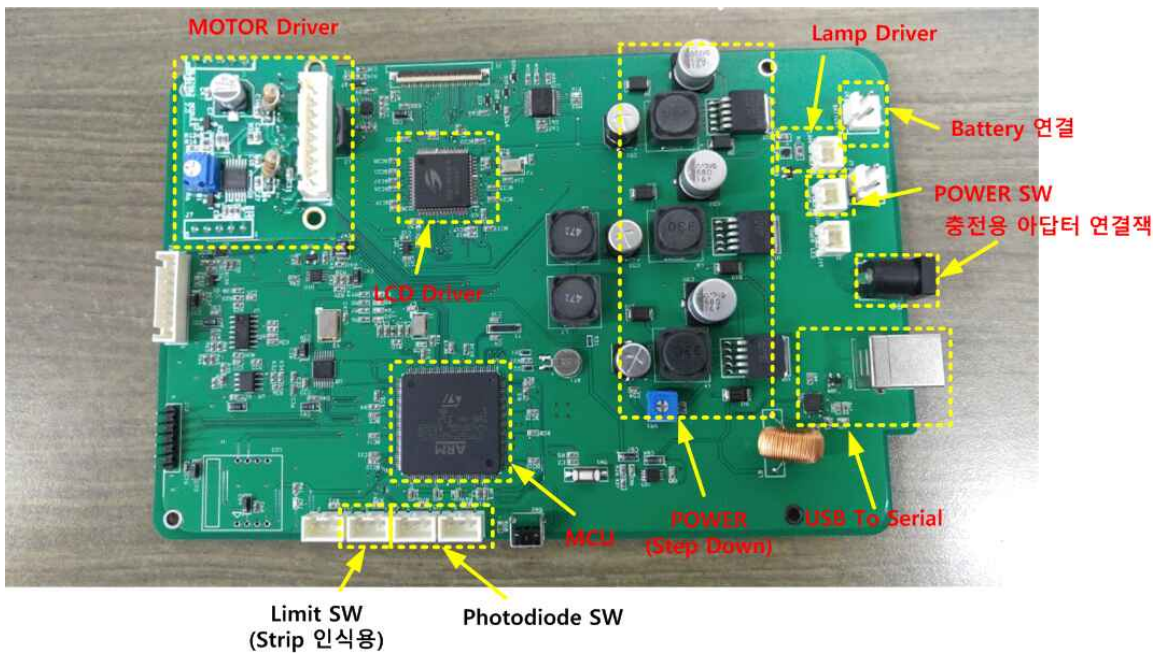
[동작시퀀스]

PCB Artwork 설계는 아래 그림과 같다.



[PCB ARTWORK]

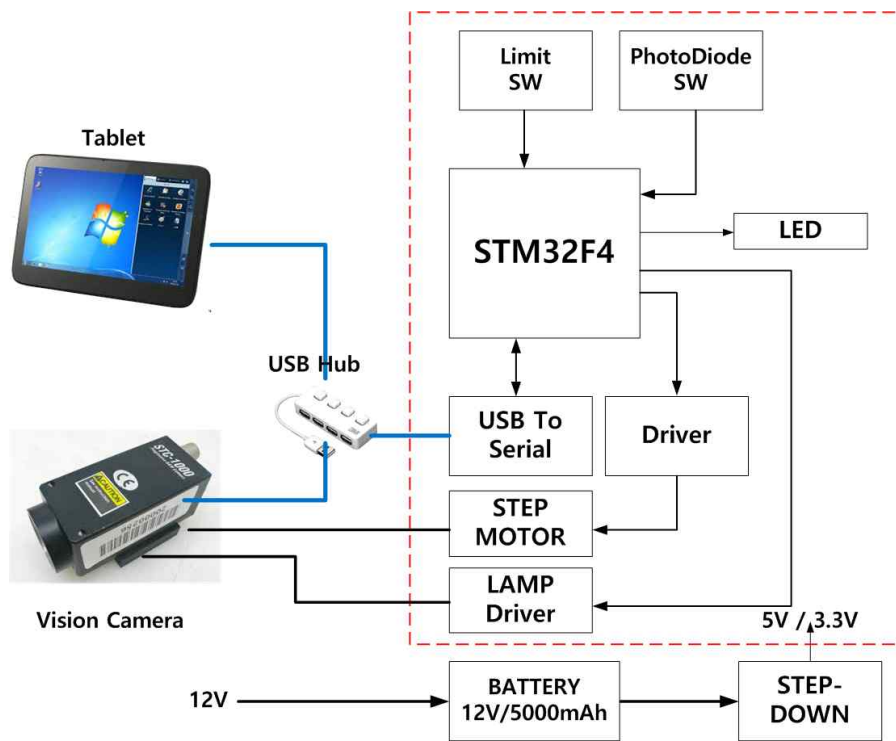
PCB 조립품은 아래 사진과 같다. PhotoDiode SW의 역할은 모터의 시작점과 끝점을 인식하는데 사용되었으며, Limit SW의 역할은 스트립이 없는 것을 인식하도록 하기 위함이다. 스트립이 없는 경우, 측정이 되지 않도록 하였으며, Tablet 비전프로그램에서 인식하여 표시하도록 하였다.



[PCB 사진]

전체적인 Block Diagram은 아래 그림과 같다. 장치간의 통신은 USB Hub를 통하여 이루어지며, Tablet의 비전프로그램과 MCU간 통신은 시리얼 통신을 한다. 전원은 배터리의 전압으로 사용하며, 배터리의 충전은 12V 아답터의 입력을 받아 충전이 이루어진다. 12V의 전압을 입력받아 STEP-DOWN Switching Regulator 소자를 사용하여 회로에 필요한 5V, 3.3V를 만들어 공급한다. 또

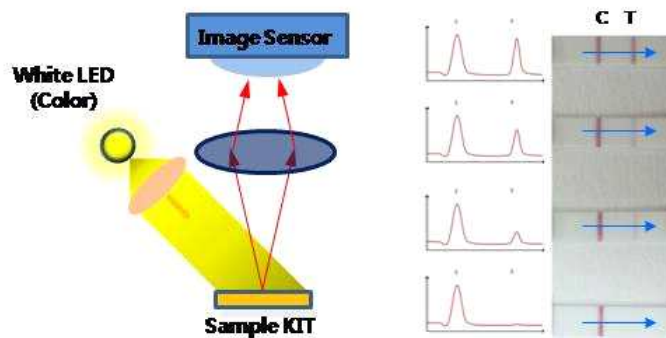
한 MCU는 Tablet의 비전프로그램의 명령을 받아 모터를 제어하거나 Lamp를 제어하도록 설계하였다. Step Motor는 Vision Camera를 움직여 스트립의 위치에 오도록 하는 역할을 하며, 비전프로그램의 명령에 따라 동작의 제어되도록 설계하였다. Lamp를 On/Off 하여 배터리의 전력소모를 줄였다.



[BLOCK DIAGRAM]

3) 형광 광학 시스템 스트립 센서 개발

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

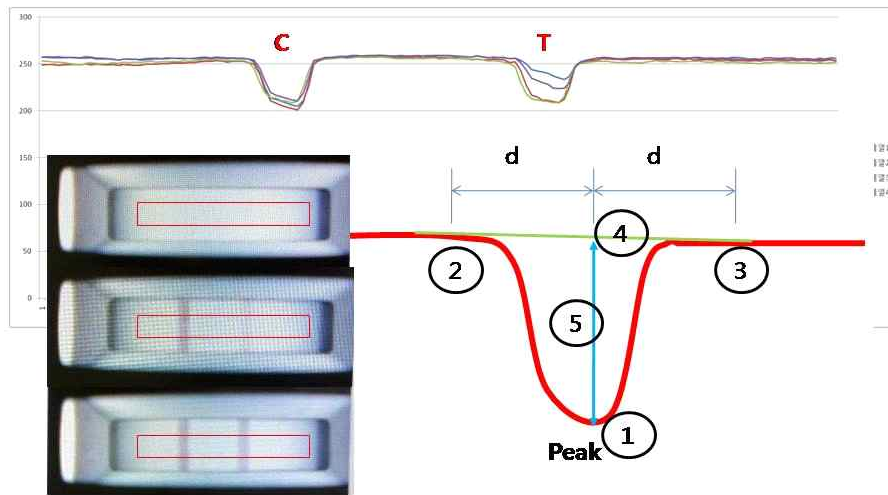


[스트립 측정 Scheme]

카메라로 스트립을 찍으면 320x240의 QVGA의 영상이 찍힌다. 이 이미지를 SRAM에 저장하고, 저장된 데이터 포맷은 RGB565 포맷으로 16bit = R(5bit) G(6bit) B(5bit)로 표현하는 방식을 사용한다. 그림 48은 농도별로 반응 시킨 스트립을 카메라로 촬영한 이미지이다. 저농도와 고농도에서 T 밴드의

발색 정도가 차이가 나는 것을 볼 수 있다.

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

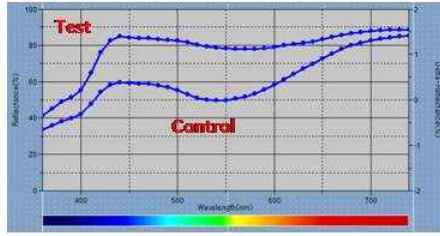


[측정값 추출 방법]

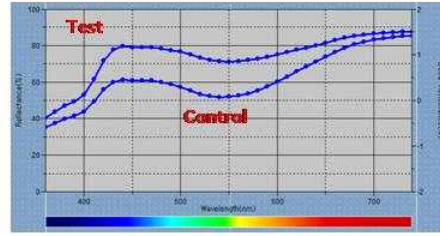
또한, 측정 환경 및 스트립의 위치 등에 덜 민감할 수 있도록 아래와 같이 측정값을 추출한다. 측정된 이미지에서 측정하고자 하는 스트립의 특정 범위를 선정하여 가로 방향의 위치별 측정 신호를 추출한다. 추출된 측정 신호에서 Peak 1 위치를 찾는다. Peak 1로부터 특정 거리 d 만큼의 좌우 위치 2, 3에서 측정값을 도출한다. 위치 2, 3의 측정값으로부터 평균값을 취하여 중간 위치 4에서의 Background 값을 추정한다. 1에서의 Peak값과 4에서의 Background 값의 차이를 측정값으로 계산한다.

위에서 제시한 측정 모듈과 측정 알고리즘을 검증하기 위하여 1~5단계의 농도로 반응시킨 스트립에 대하여 개발한 측정 모듈과 기준 장비(CM-2600d)의 비교 테스트를 진행하였다.

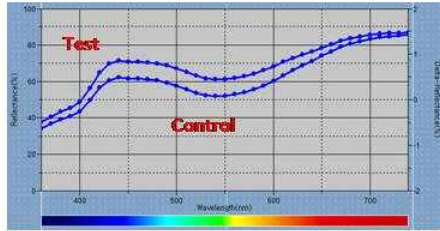
아래 그림은 스트립 샘플 5종에 대한 기준장비로 측정한 결과를 보여주고 있다. 측정 결과는 반사율(%)로 표시된다. 본 과제에서 개발된 반사형 측정 모듈로 샘플 5종을 측정한 결과이며 결과값은 위에서 제시한 방법으로 Control 과 Test 밴드의 Peak 값을 계산한 결과이다.



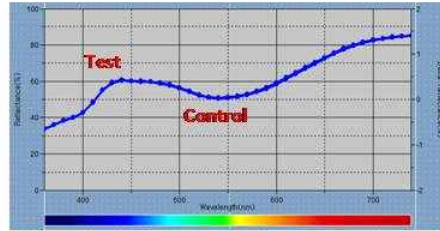
< 샘플 1 >



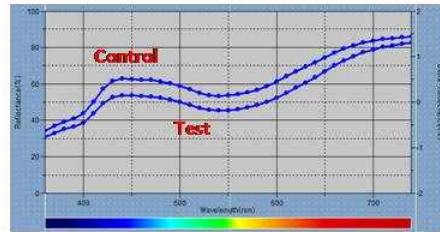
< 샘플 2 >



< 샘플 3 >

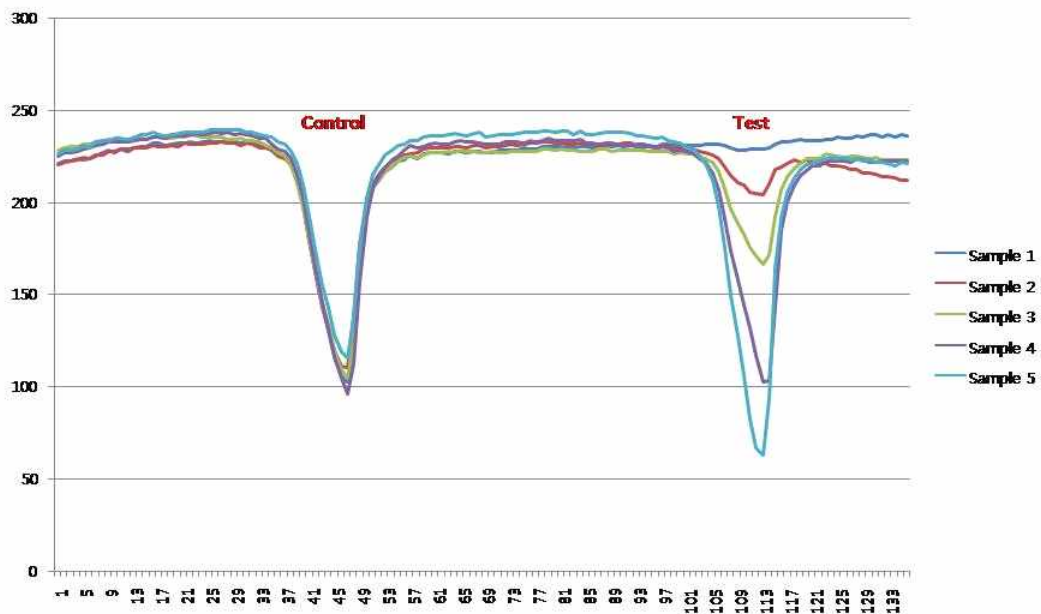


< 샘플 4 >



< 샘플 5 >

[기준장비로 측정한 결과]



[스트립 측정 모듈로 측정한 결과]

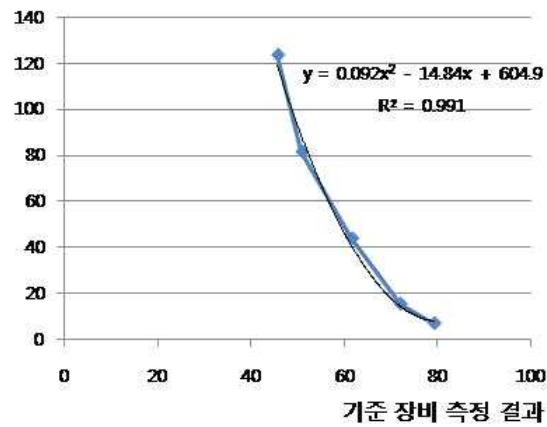
아래 표에서 기준장비와 개발장비 간의 측정 결과를 비교하였다. 아래 그림에서 알 수 있듯이 두 장비간의 Test 밴드의 측정결과는 높은 상관관계를 가지고 있다. 이를 통해서 본 과제에서 개발한 스트립 측정 모듈에 대한 신뢰성을 확인할 수 있으며 위에서 제시한 측정 결과 도출 알고리즘에 대한 검

증을 확인할 수 있다. 또한, Control 밴드의 측정 결과에서도 기준장비과 개발장비의 결과가 같은 경향성을 보이고 있다. 측정 결과를 단순 비교할 수는 없지만 Control 밴드의 샘플별 변화 경향이 동일함을 확인할 수 있다.

<기준장비와 개발장비의 샘플 측정 결과 비교>

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

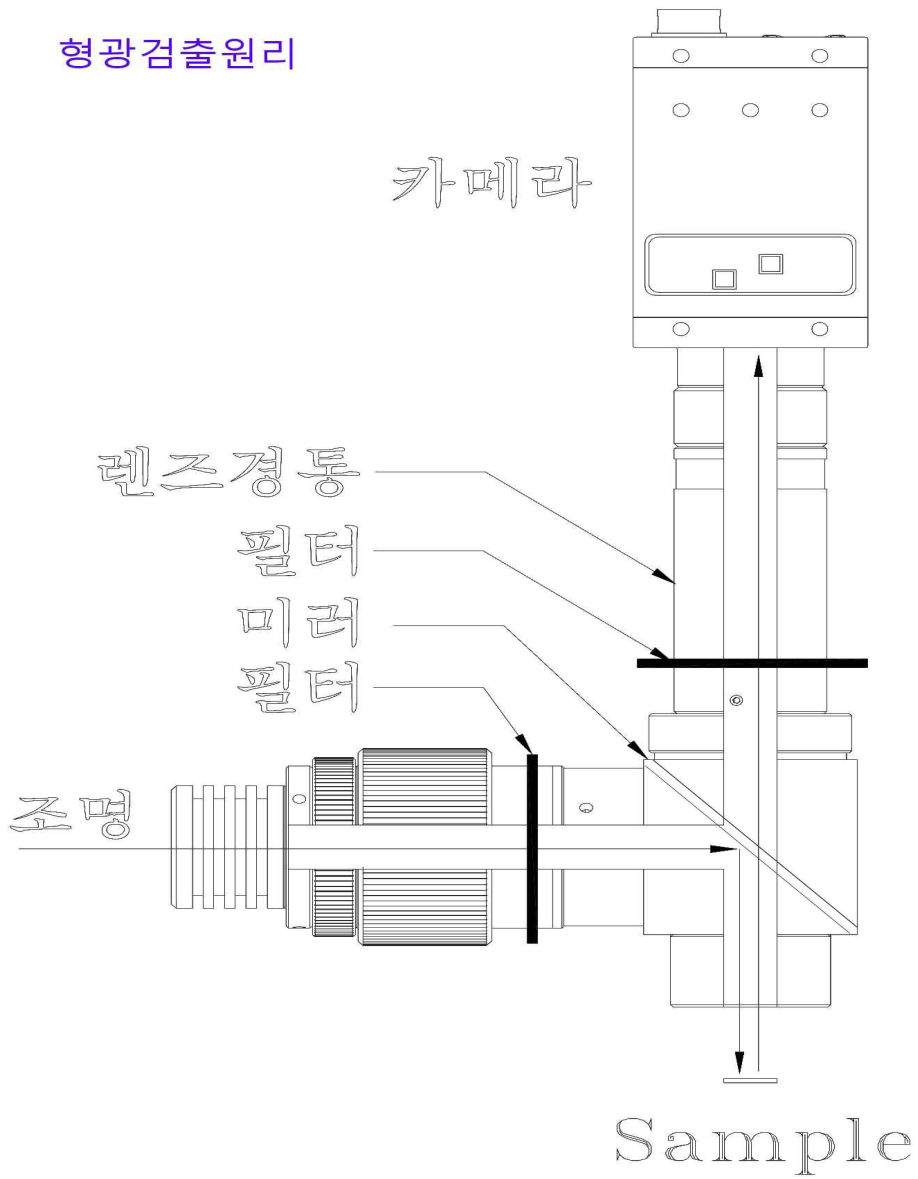
개발 장비 측정 결과



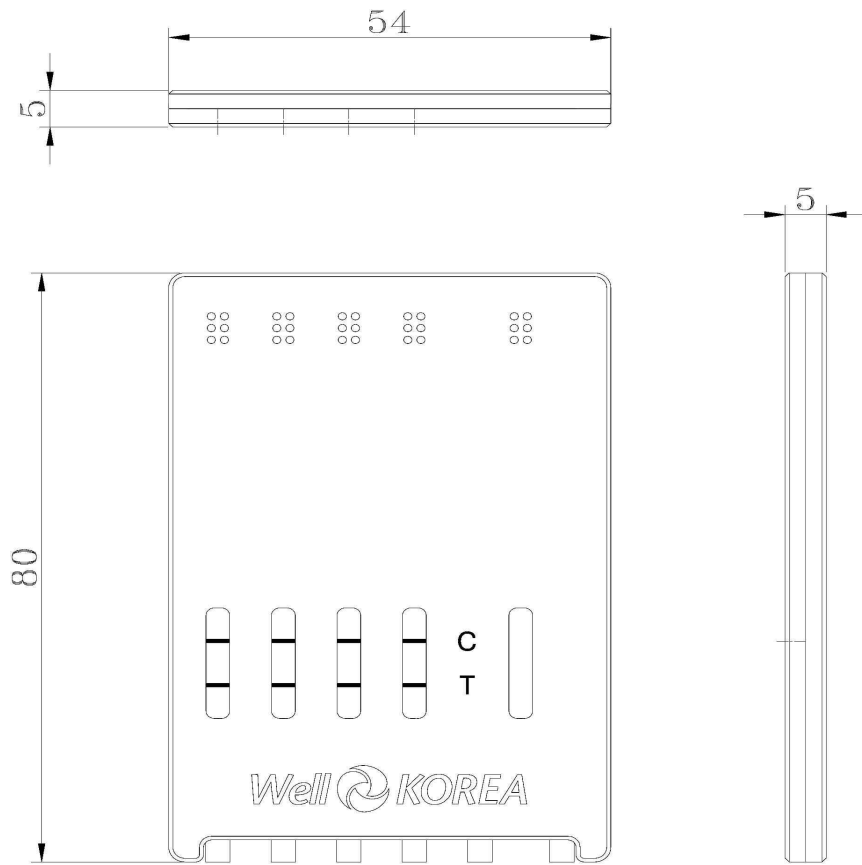
[기준장비와 개발장비의 측정결과 비교]

4) 휴대용 분석 시스템 개발

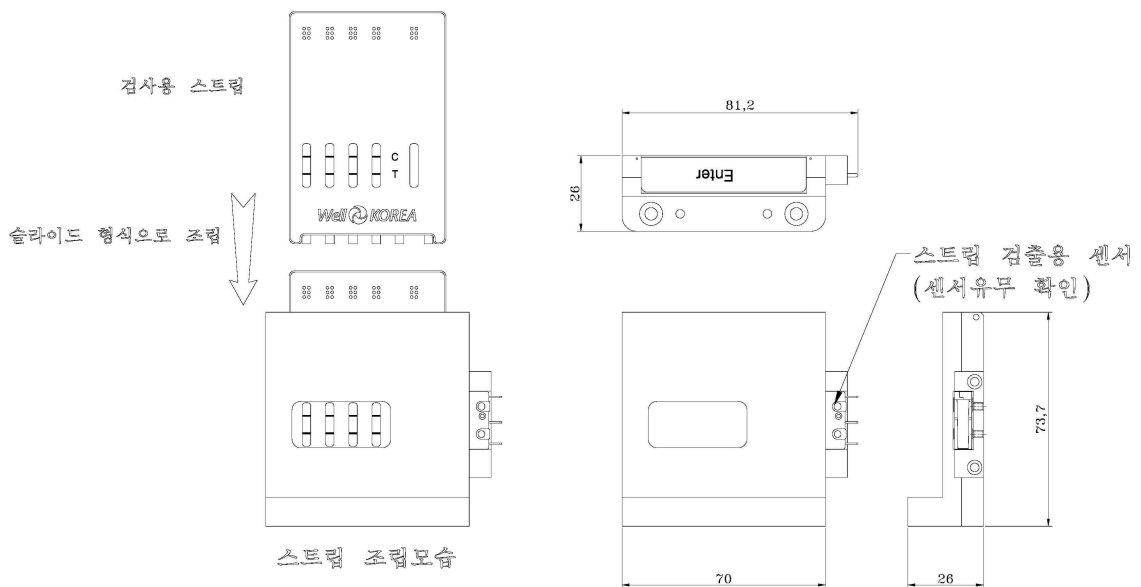
형광검출원리



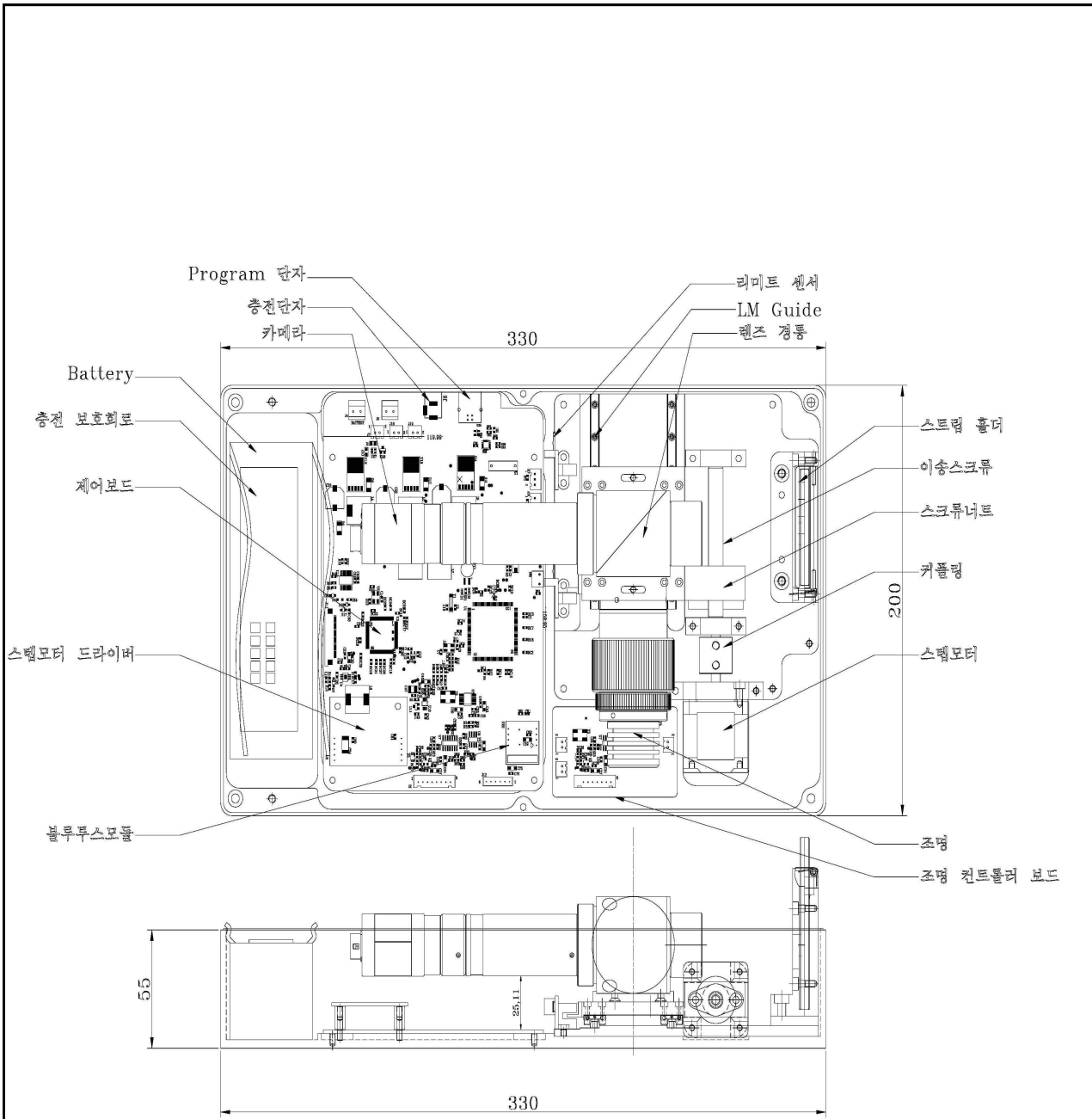
[분광 광학시스템 원리]



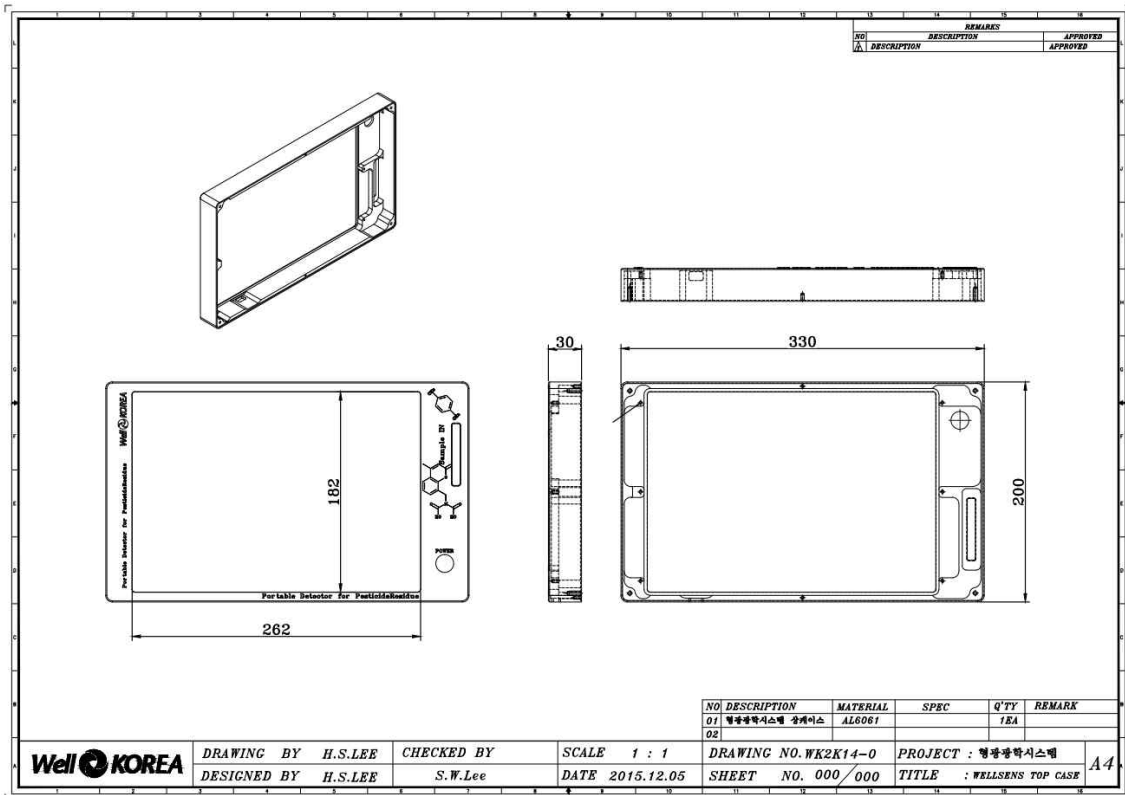
[분광 광학시스템 검출용 스트립 도면]



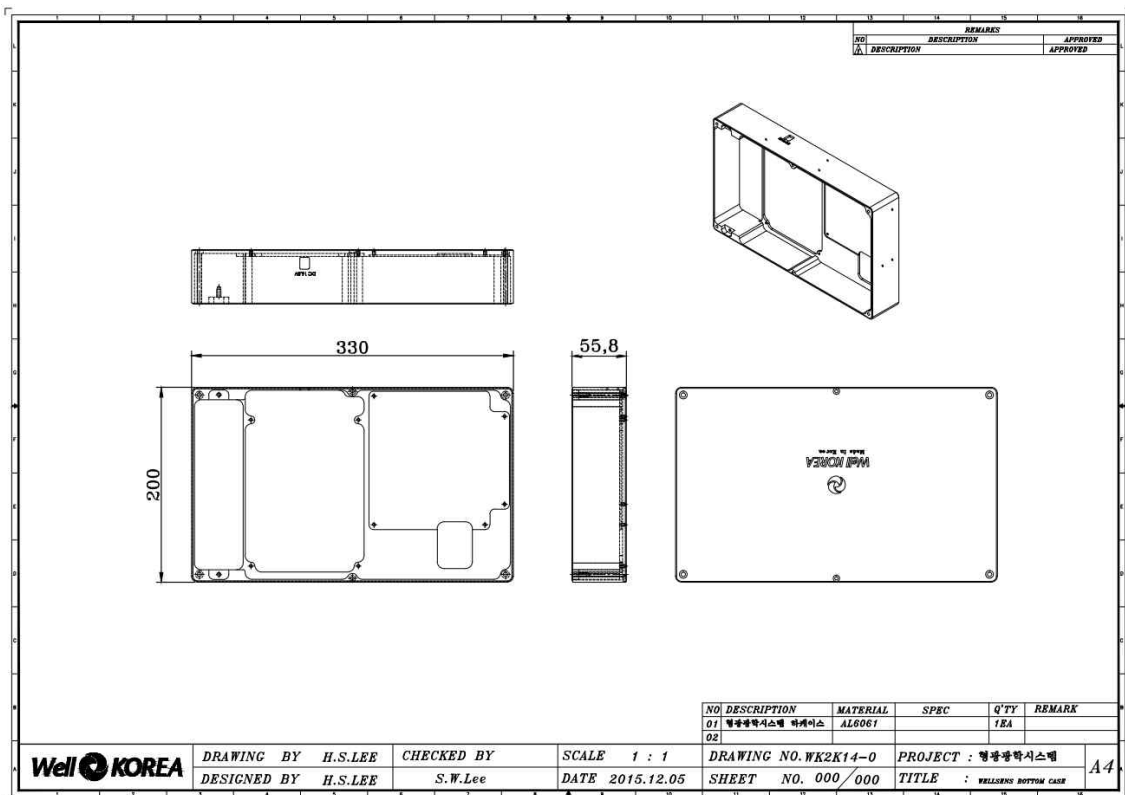
[분광 광학시스템 스트립 도면]



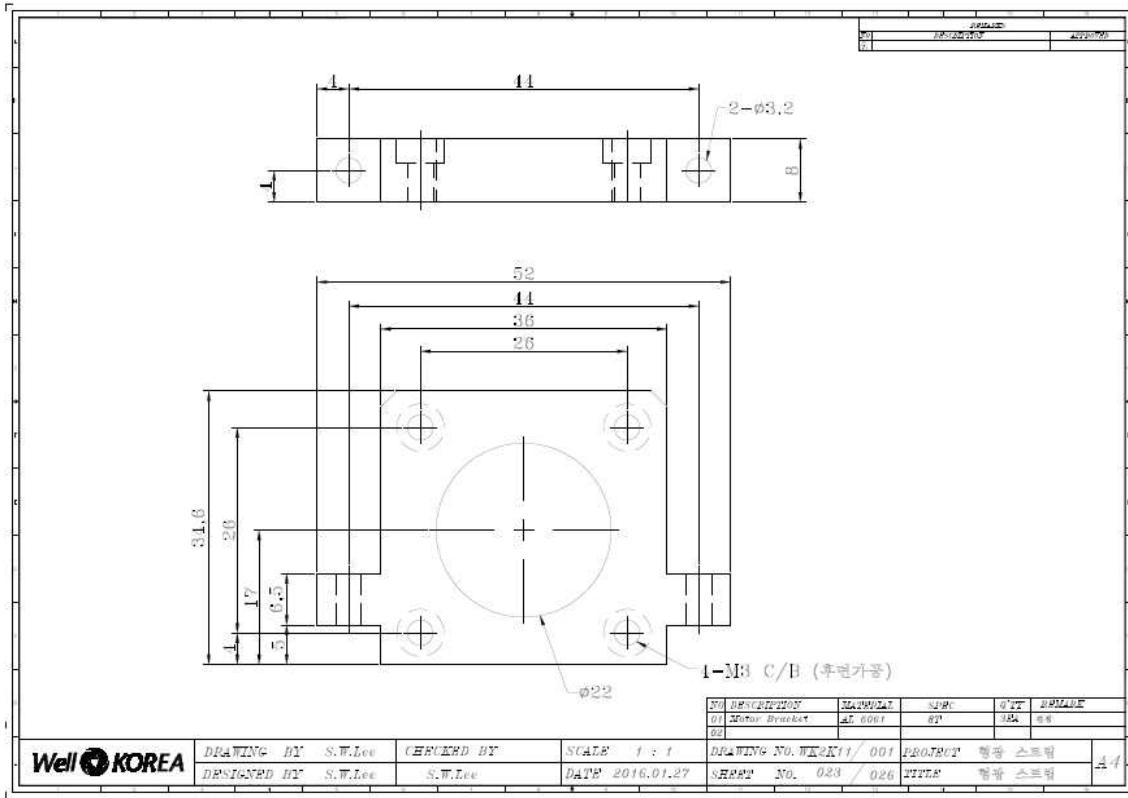
[분광 광학시스템 내부 구조 도면]



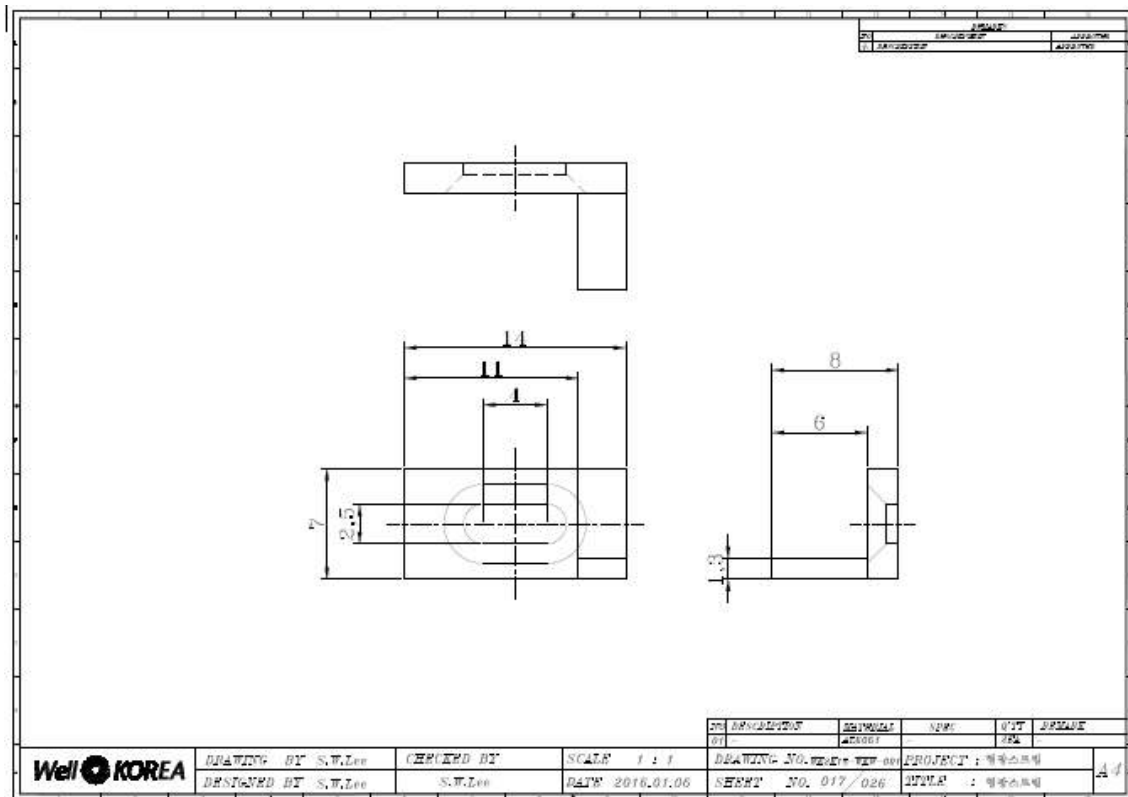
[형광 광학시스템 상케이스 도면]



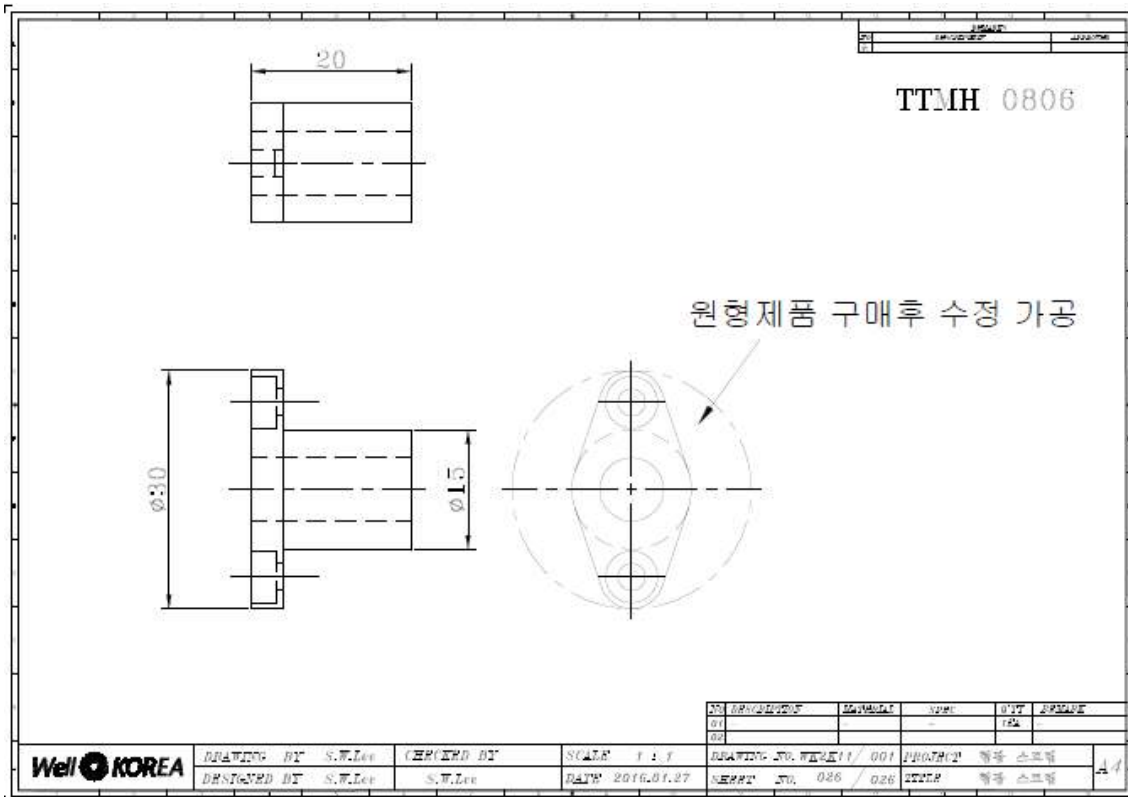
[형광 광학시스템 하케이스 도면]



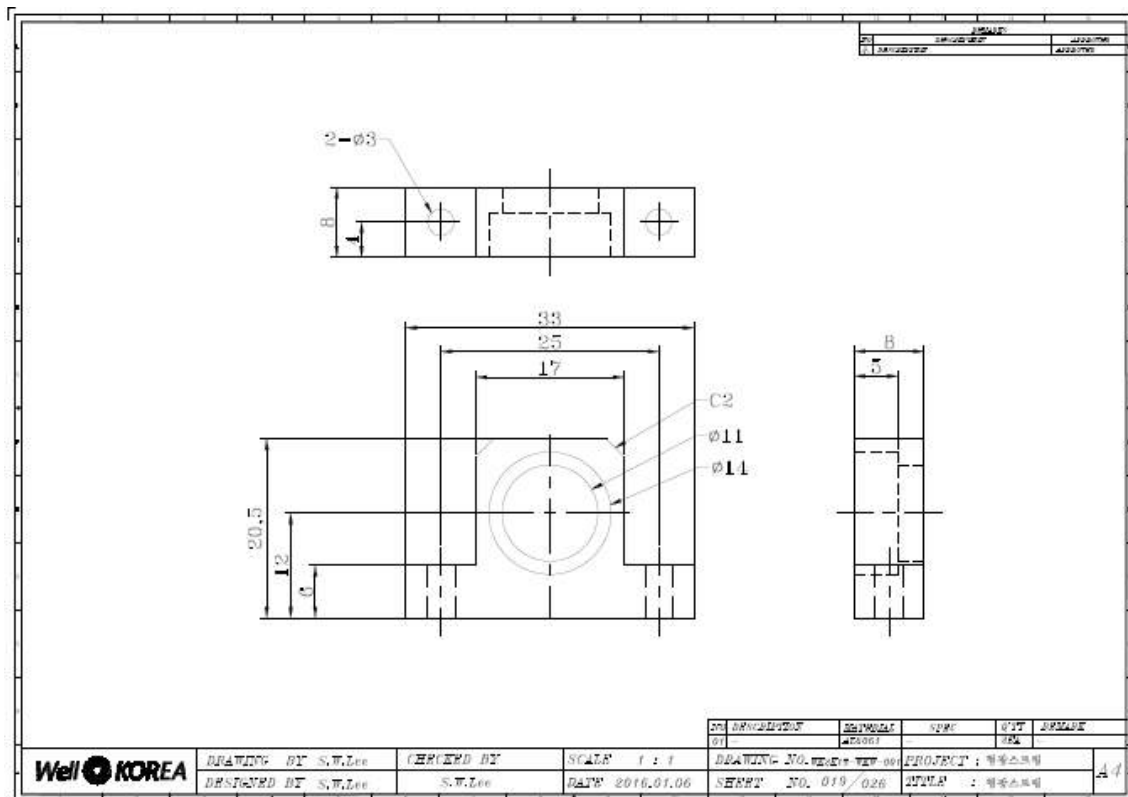
[형광 광학시스템 모터 브라켓 도면]



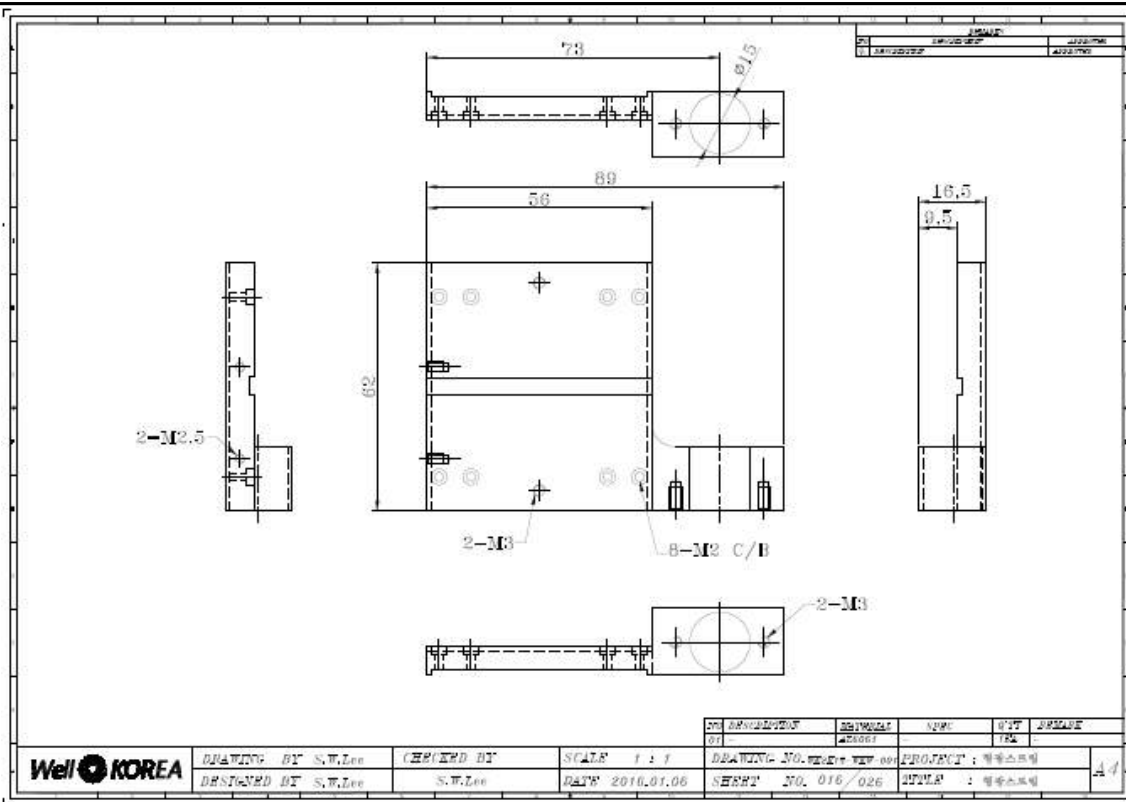
[형광 광학시스템 센서 브라켓 도면]



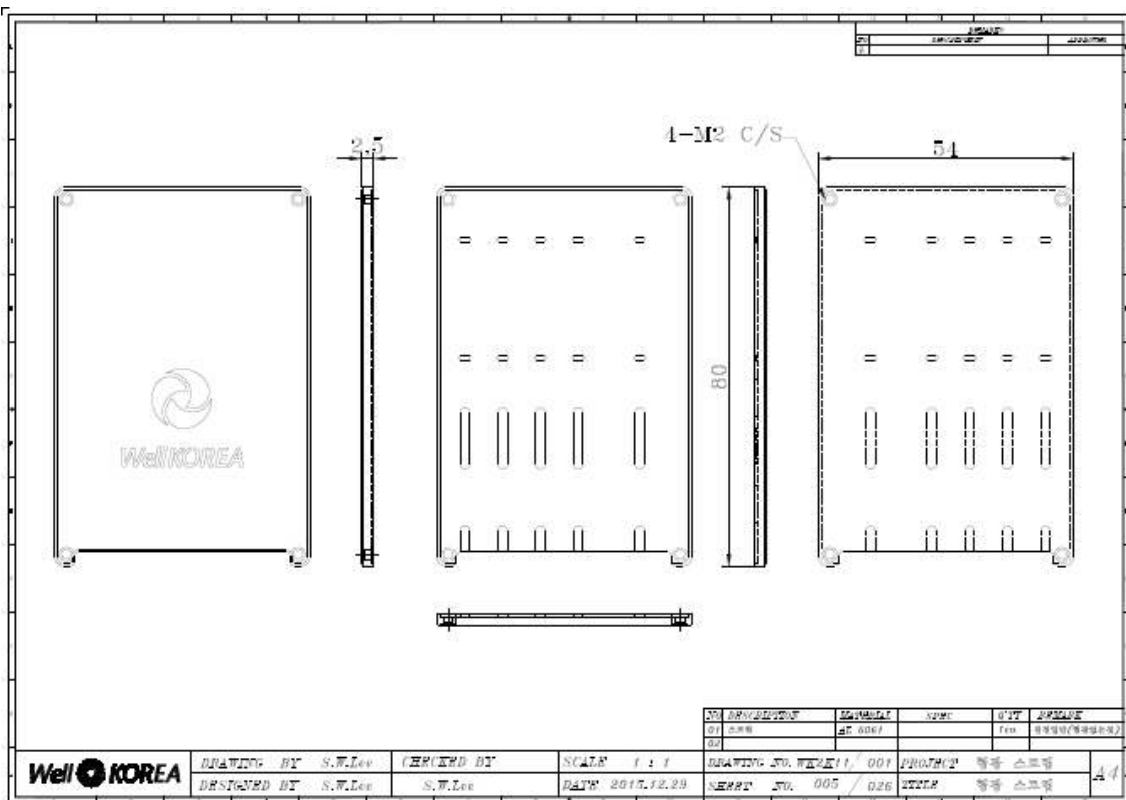
[형광 광학시스템 스크류 도면]



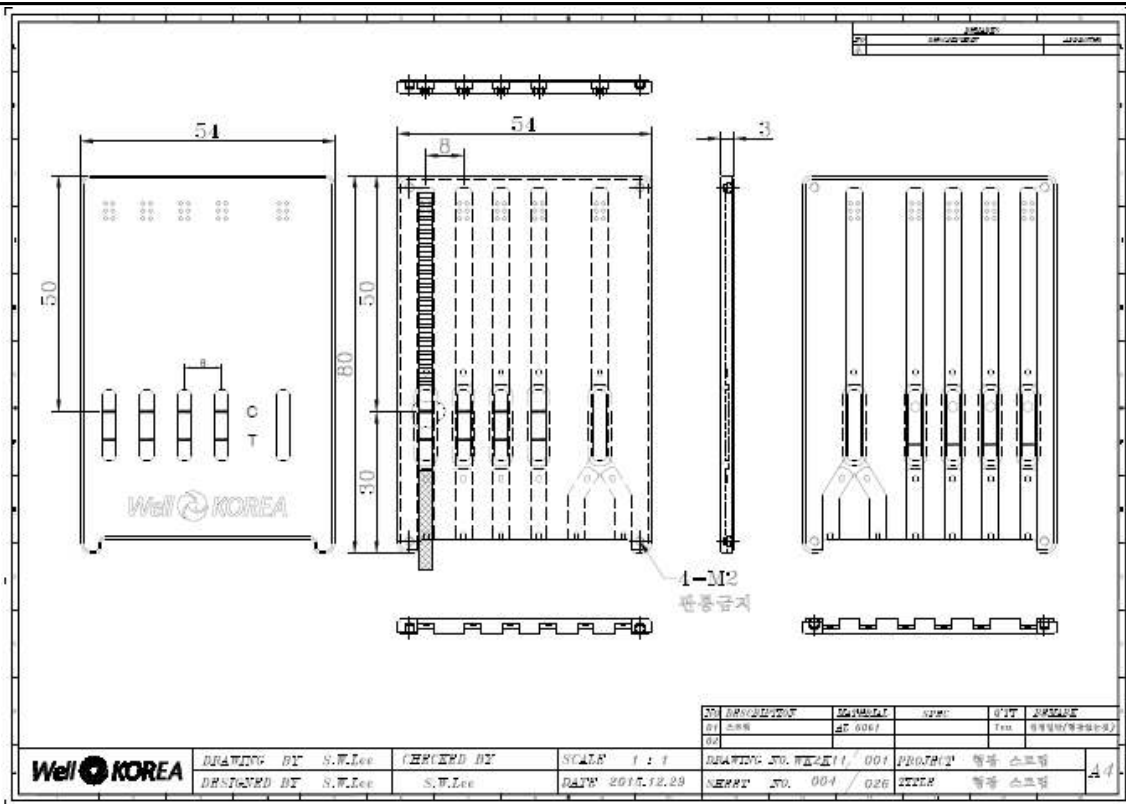
[형광 광학시스템 스크류 브라켓 도면]



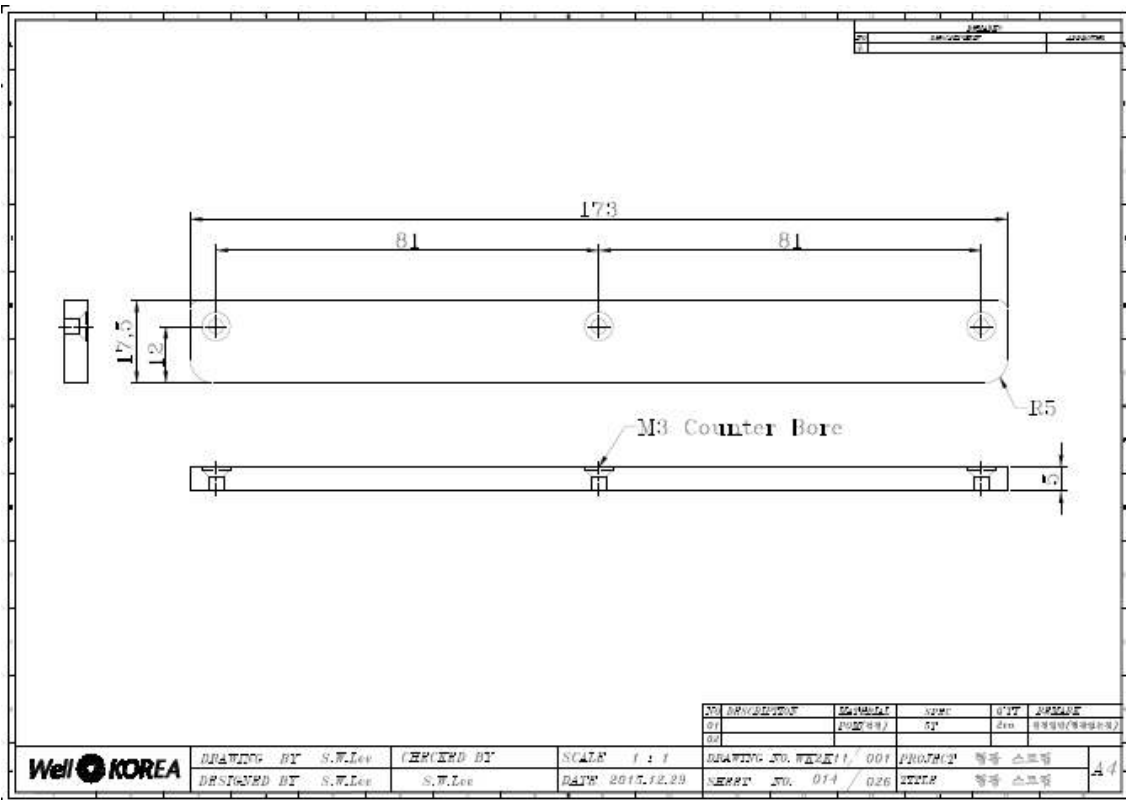
[형광 광학시스템 카메라 고정대 도면]



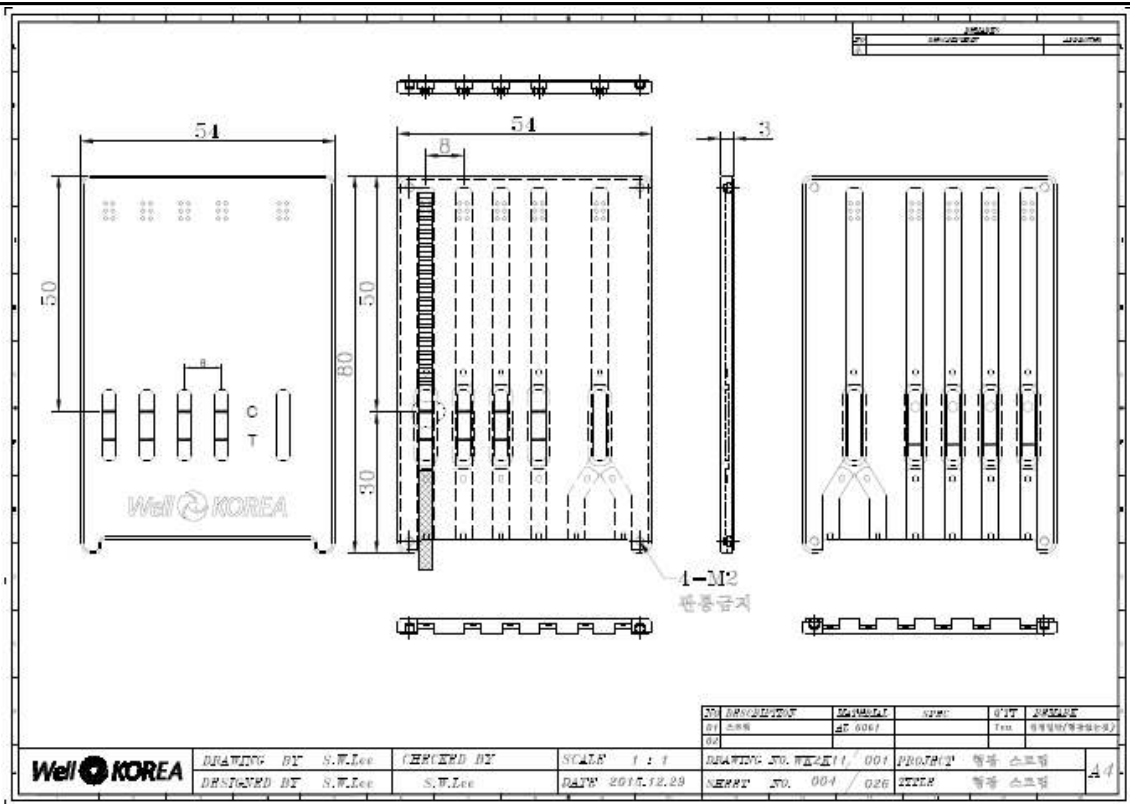
[형광 광학시스템 케이스 뒷면 도면]



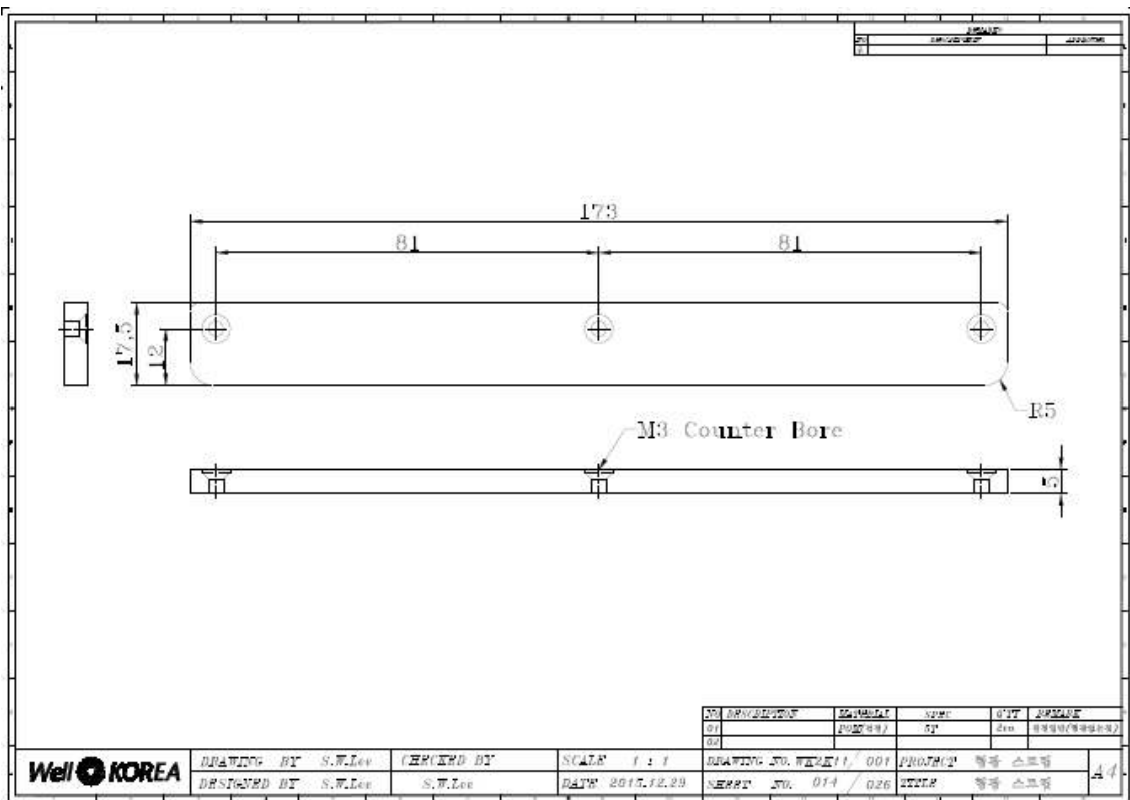
[형광 광학시스템 케이스 앞면 도면]



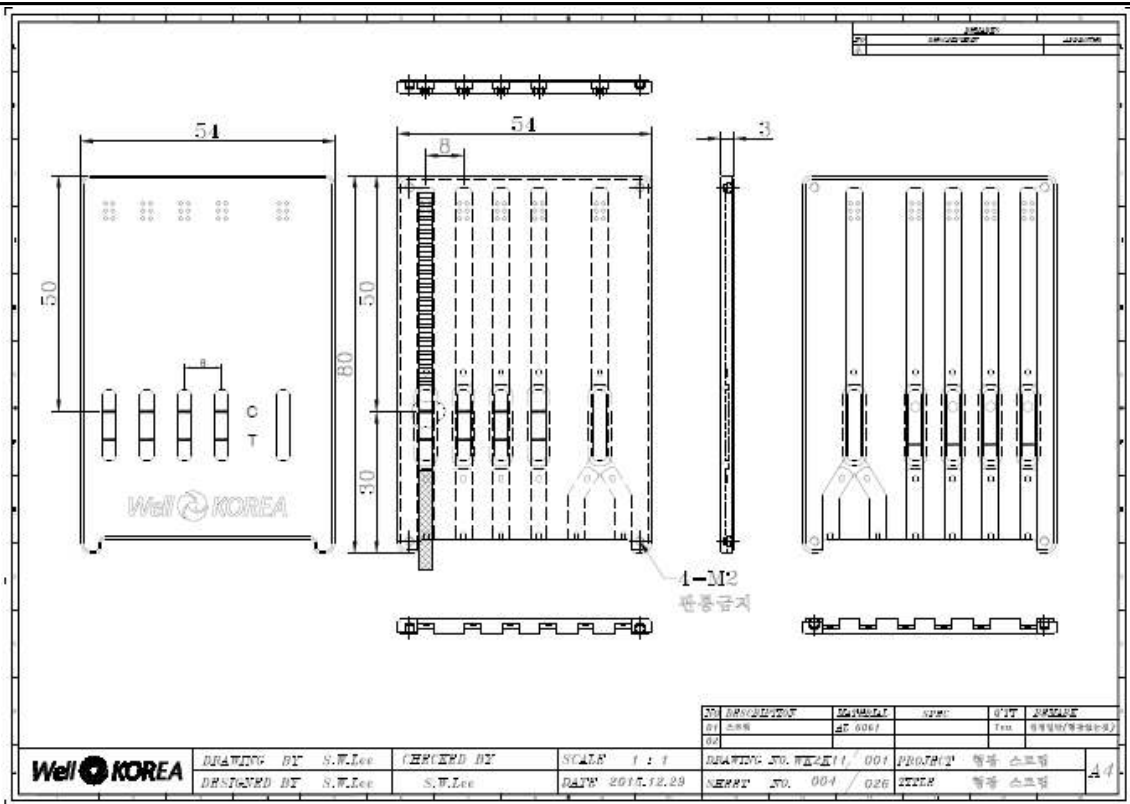
[형광 광학시스템 태블릿 고정 도면]



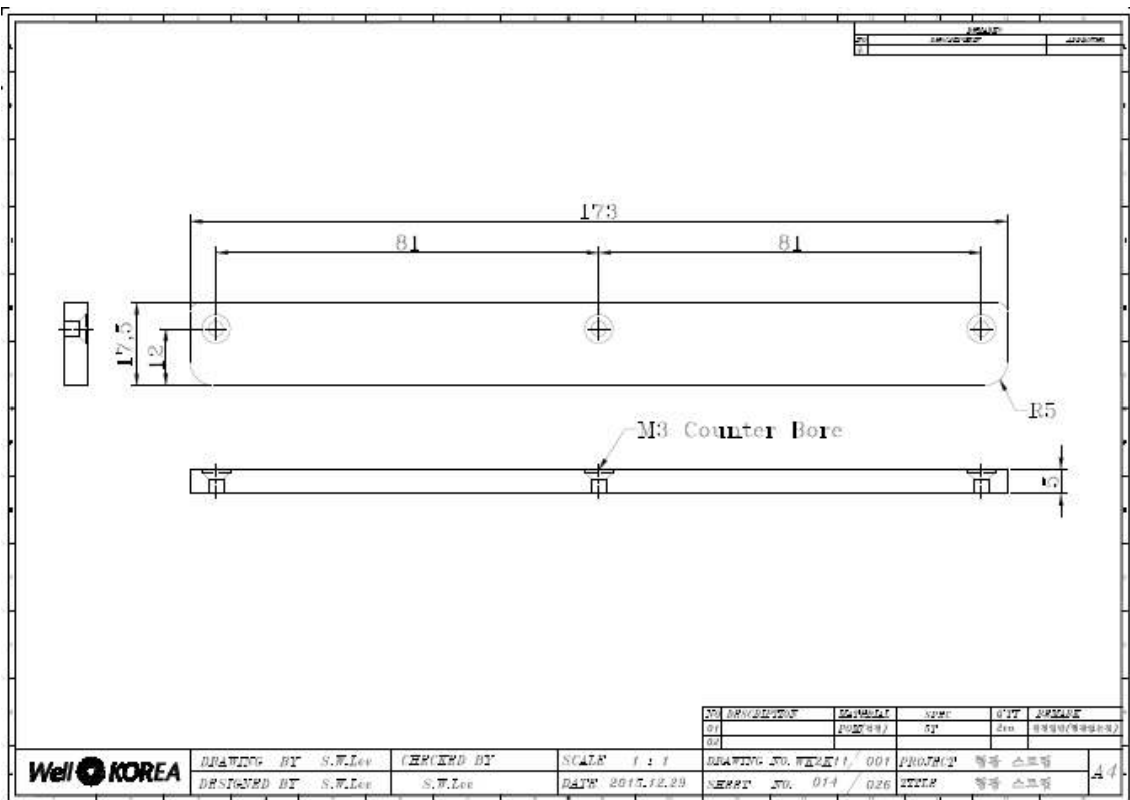
[형광 광학시스템 케이스 앞면 도면]



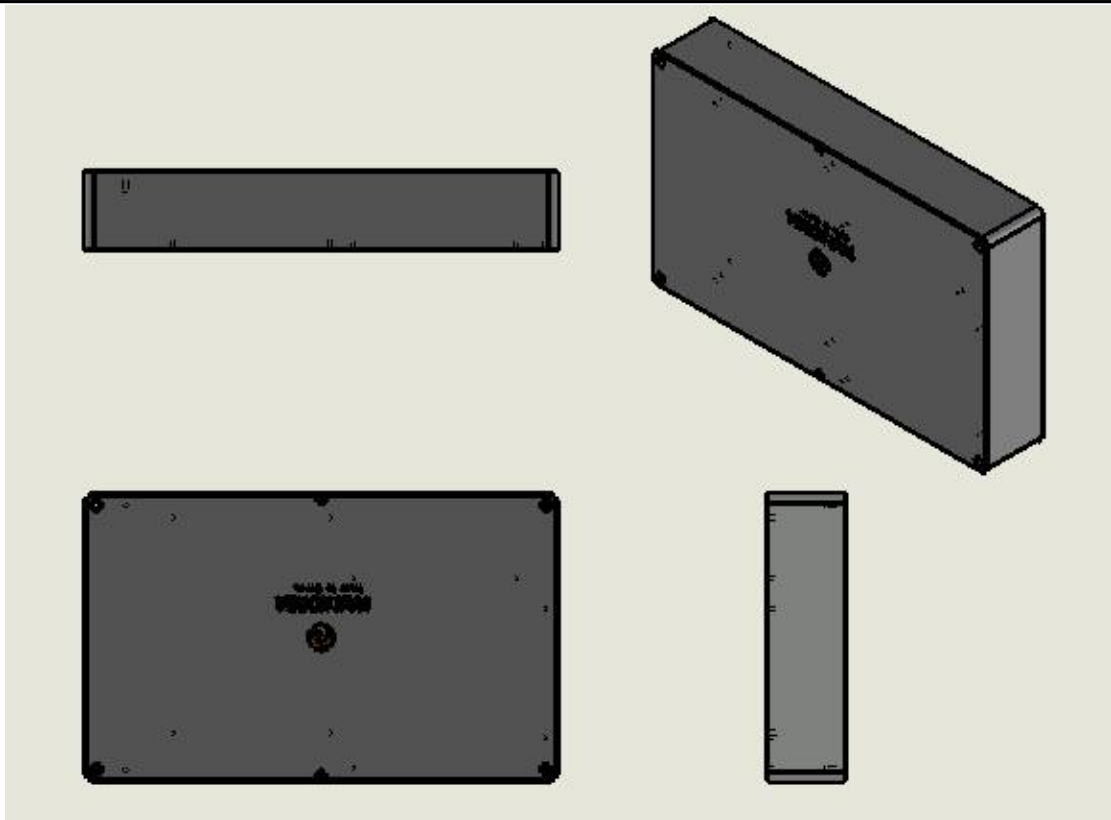
[형광 광학시스템 태블릿 고정 도면]



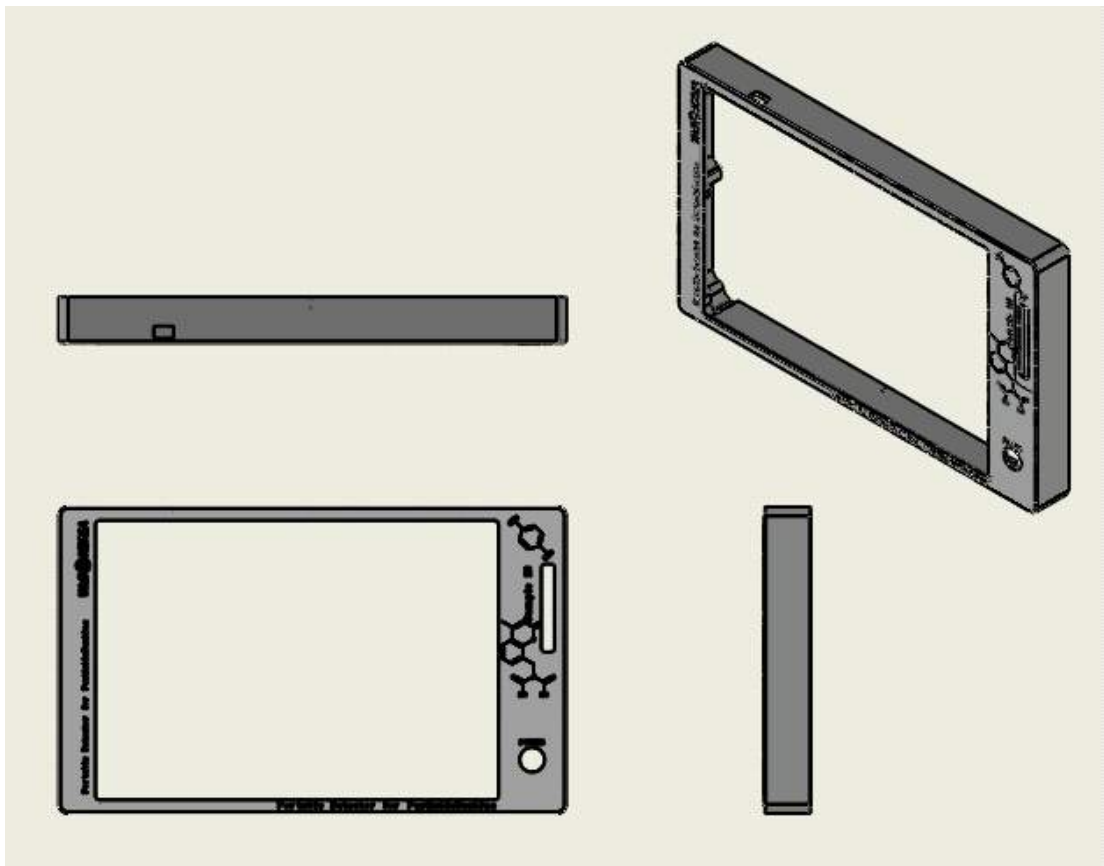
[형광 광학시스템 케이스 앞면 도면]



[형광 광학시스템 태블릿 고정 도면]



[형광 광학시스템 하케이스 3D도면]



[형광 광학시스템 상케이스 3D 도면]



[형광 광학시스템 조립시 전면부 사진]



[형광 광학시스템 조립시 사진]

■ 제품 양산 계획

- 기존 잔류농약 속성 검사기 생산 시스템 대체
- 생산형태는 완제품이며, 핵심 원재료는 검출기와 검출용 시약 및 스트립 KIT임
- 검출기의 경우 기존 생산 시스템을 이용하므로 초기 별도의 생산시설 불필요
- 새로운 개발 시약 및 스트립의 생산을 위해 (주)메텍스와 공급계약 완료 (자료 별첨)
- 생산될 시약 및 스트립 KIT 안정성 향상을 위한 품질 관리는 (주)메텍스와 공급계약 및 품질관리 협의 완료 (자료 별첨)

[별첨. (주)메텍스와의 공급계약서 사본]

외주 공급 계약서

웰코리아(주)(이하 "갑"이라 한다)과 (주)메덱스(이하 "을"이라 한다)는 다음과 같이 외주계약을 체결하고 신의성실로써 준수하기로 한다.

제 1 조 [목적]

이 계약은 "갑"이 요청에 의한 "센서스트립 및 금 나노입자"를 "을"의 시설에 의해 전량 생산하고 공급하는데 있다.

제 2 조 [계약기간]

1. 갑과 을의 외주공급계약기간은 2016년 2월 1일부터 2020년 1월 31일 까지로 한다.
2. 계약 종료일 1개월 전까지 특별한 서면상의 이의가 없는 한, 계약기간은 자동 (2)년씩 연장 을 원칙으로 한다.

제 3 조 [계약금액]

1. 외주가공비는 추후 각 항목별로 세부적으로 별도 계약하여 진행한다.
2. 공급조건은 공장인도가로 정한다.

제 4 조 [발주의 성립]

1. 원칙적으로 갑이 발주하고 을이 수락함으로 성립한다.
2. 개별 계약서에서 따로 약정한 사항 이외의 사항은 이 기본 계약에 의하기로 하고, 만일 이 기본 계약에 정하는 사항과 개별 계약에 정하는 사항간에 차이가 있을 때는 그 상충하는 부분에 한하여는 개별 계약에 정하는 사항이 우선하기로 한다.
3. 다만 을은 수주를 거부할 의사가 있을 때에는 갑의 발주서를 접수한 날로부터 (5)일 이내에 거부사를 표시하여야 하며, 이 기간 중에 거부사를 표시하지 않을 경우에는 발주가 성립한 것으로 본다.
4. 갑은 을에 대하여 물품 등을 발주함에 있어 을이 동 물품을 제조 납품하는데 지장이 없도록 납품일 (30)일 이전에 발주하도록 한다.

제 5 조 [사양서류]

1. 갑은 을에게 제시하는 목적물의 사양서류를 제공한다.
 - 1) 목적물의 규격
 - 2) 성분
 - 3) 포장지시서(포장, 방진, 손상방지 및 보관을 위하여 필요한 방청 등에 관한 조치 사항의 기재포함)

2. 물은 제1항의 사양서류의 내용이나 규격 등이 분명하지 않거나 의문이 있을 경우 그 사실을 지체 없이 감에게 통지하여 협의하여야 한다.
3. 물은 제1항의 사양서류를 선량한 관리자의 주의를 가지고 관리하여야 하고, 이를 분실 하거나 그 내용을 제3자에게 누설하여서는 아니 된다.

제 6 조 [재료 및 부품의 지급]

1. 감은 물에게 생산에 필요한 원재료와 부재료를 납품에 차질 없도록 공급하기로 한다.

제 7 조 [수량, 검사 및 인수]

1. 감은 납품된 물품을 수령한 날로부터 30일 이내에 검사결과를 물에게 서면으로 통지하여야 한다. 이 기간 내에 통지하지 않을 경우에는 검사에 합격한 것으로 한다.
2. 물이 납품한 물품이 감의 검사결과 불량일 경우, 전수 재 납품을 기본으로 한다.

제 8 조 [계약해제]

“감” 또는 “물”은 상대방이 다음의 각 호 중 하나에 해당할 때에는 본 계약을 해제할 수 있다.

1. “감”이 정당한 사유 없이 계약내용을 이행하지 아니할 때
2. 기타 본 계약을 이행할 수 없다고 판단되는 경우

제 9 조 [이의 및 분쟁의 해결]

1. 본 협약 해석상 이견 발생 시에는 법원에 의한 판결이 있기까지는 “감”과 “물”의 서면협의를 원칙으로 하여 조정한다.
2. 본 협약 및 부수협정의 이행과정에서 발생하는 법률상의 분쟁 관할은 “감”의 주소지 관할법원으로 한다.

제 10 조 [기타]

본 계약에 정하지 않은 사항 및 이의가 발생한 사항에 대해서는 “감”·“물” 협의 후 결정한다.

이상 본 계약의 성립을 증명하기 위해 본서 3통을 작성하고 “감”·“물”·“참관인”의 기명날인 후 각각 1통씩 보유한다.

2016년 2월 1일

“갑”

월코리아(주)

주 소 : 대전시 유성구 테크노11로 44(탑림동)

대표이사 신동혁



“을”

(주)메덱스

본 사 : 경기도 성남시 분당구 대왕판교로 700 (삼평동 694-1) 코리아바이오파크 B동 5층

대표이사 김경동



“참관인”

중앙대학교 화학과

주 소 : 서울시 동작구 흑석로 84 중앙대학교 104관 415호

성 명 : 박태정

2. "을"이 발행 또는 배서 지급 보증하여 지급한 수요나 여왕이 부도가 될 때는 "갑"은 "을"에 대하여 별도의 통보 없이 일방적으로 계약을 해지할 수 있다.
3. "을"은 계약이 해지되면 "갑"에 대한 외상매입금 및 미지급금액을 즉시 지급하여야 하며, 부득이한 경우 "을"의 채고상환은 "갑"이 회수할 수 있다.

제 10 조 (계약의 변경 및 종료)

1. "갑"과 "을"은 서면 합의에 의하여만 본 계약의 내용을 변경하여 재 계약할 수 있다.
2. 본 계약은 "갑"과 "을" 형 당사자간의 합의에 따른 서면 합의에 의해서만 파기될 수 있으며, 제 9 조에 해당하는 경우를 제외하고 어느 일방에 의한 통보로써 파기될 수 없다.

제 11 조 (관할법원)

본 계약의 모든 소송에 관한 사항은 "갑"의 본사 소재지를 관할 하는 법원으로 한다.

제 12 조 (기타사항)

이 계약서에 각 조항의 해석에 관하여 상호간의 이의가 있거나 계약서에 명시되지 않은 사항은 일반 상관례에 따라 상호 협의하여 정한다.

상기 합의 내용을 증명하기 위하여 본 계약서 2 부를 작성하여 "갑"과 "을"의 기명 날인 한 후 각 1 부씩 보관하며, 본 계약의 효력을 기명 날인한 날로부터 유효하다.

2016년 2월 2일

"갑"
대전광역시 유성구 테크노 11로 44(합합동)

"을"
대전광역시 동구 대학로 62, 223 호
대전대학교 창업보육센터(용운동)

대표이사명
대표이사 : 신 동 혁

주식회사 에어웍스
대표자 : 김 한 수

- 이후 다양한 농산물에 대한 프로토콜을 적용하고 소비자의 요구사항을 반영하여 현장에 적용하도록 추진할 예정임.
- 시장요구성 반영을 통한 매출 발생을 목표로 추진할 예정임.

제 2 절 연구비 집행실적

1. [제1세부]

1차년도 연구비 집행 실적

(단위 : 천원)

비목	금액		계 획금 액	사 용액	잔액	비고
	세목					
직접비	인건비	미지급용	32,400	32,400	0	
		지급용	8,400	4,550	3,850	
		현물				
	학생인건비		12,000	12,000	0	
	연구 장비· 재료비	현금	109,517	109,397	120	
		현물				
	연구과제추진비		7,994	7,991	3	
	연구활동비		1,560	1,560	0	
	연구수당		7,920	7,343	577	반납
	위탁연구개발비		50,000	50,000	0	
간접비	간접비		42,713	42,713	0	
연구개발비 총액			240,104	235,554	3,973	잔액 이월

2차년도 연구비 집행 실적

(단위 : 천원)

비목	금액		계 획 금 액	사 용 액	잔 액	비 고
	세 목					
직접비	인건비	미지급용	36,000	36,000	0	
		지급용	29,320	27,531	1,789	
		현물				
	학생인건비		30,000	30,000	0	
	연구 장비· 재료비	현금	196,059	196,027	32	
		현물				
	연구과제추진비		16,993	15,744	1,249	
	연구활동비		15,174	14,650	90	
	연구수당		11,000	10,791	209	
	위탁연구개발비		80,000	80,000	0	
간접비	간접비		85,426	85,426	0	
연구개발비 총액			463,972	460,169	3,369	잔액이월

3차년도 연구비 집행 실적

(단위 : 천원)

비목	금액		계 획 금 액	사 용 액	잔 액	비 고
	세 목					
직접비	인건비	미지급용	36,000	36,000	0	
		지급용	51,664	51,645	19	
		현물				
	학생인건비		38,600	38,600	0	
	연구 장비· 재료비	현금	136,826	136,826	0	
		현물				
	연구과제추진비		12,174	12,174	0	
	연구활동비		14,211	14,211	0	
	연구수당		15,209	15,209	0	
	위탁연구개발비		80,000	80,000	0	
간접비	간접비		74,685	74,685	0	
연구개발비 총액			423,369	423,350	19	

2. [제1세부 위탁]

1차년도 연구비 집행 실적

지 원 구 분		당초계획 (A)	변경계획 (B)	사용금액 (C)	증감 (D=B-C)
비목 분류	연구비 비목				
교외연구비					
인건비	외부인건비	0	3,600,000	1,800,000	1,800,000
인건비	풀타임제인건비	23,700,000	23,700,000	23,700,000	0
직접비	연구활동비	6,000,000	6,000,000	2,479,910	3,520,090
직접비	연구시설·장비및 제1	7,000,000	7,000,000	0	7,000,000
직접비	연구수당	1,600,000	1,600,000	0	1,600,000
직접비	연구과제추진비	1,700,000	1,700,000	553,500	1,146,500
간접비	간접경비	10,000,000	10,000,000	10,000,000	0
소 계		50,000,000	53,600,000	38,533,410	15,066,590
합 계		50,000,000	53,600,000	38,533,410	15,066,590

2차년도 연구비 집행 실적

연구비 집행 정산(진행) 내역서

과제번호	R1300802	계약일자	2012.12.18	연구기간	2013.12.18 - 2014.12.17	총연구비	80,000,000 원
과제명	[유타]농산물 잔류 농약에 대한 특이적 앵타머 개발					협약 연구비	80,000,000 원
연구책임자	구만복	생명과학대학 생명과학부		연구소	생명공학연구소		
지원기관	농림수산식품기술기획기 획평가원	지원종류	첨단생산기술개발사업				
결과보고일		관리기관	생명공학연구소	연구비 입금총액	80,000,000 원		

지원구분	연구비 항목	실행예산	2014. 10. 23 현재			잔액	신청가능금액
			청구액	집행금액	진행중금액		
표의연구비	최부인건비	7,200,000	6,000,000	5,400,000	600,000	1,200,000	1,200,000
표의연구비	풀링제인건비	37,920,000	37,920,000	37,920,000	0	0	0
표의연구비	연구활동비	2,400,000	3,180,800	3,180,800	0	-780,800	-780,800
표의연구비	연구시설 장비및 재료비(재료비)	11,200,000	4,796,220	4,796,220	0	6,403,780	6,403,780
표의연구비	연구수당	2,560,000	0			2,560,000	2,560,000
표의연구비	연구과제추진비	2,720,000	8,336,800	8,336,800	0	-5,616,800	-5,616,800
표의연구비	간접경비	16,000,000	16,000,000	16,000,000	0	0	0
	표의연구비 별 계	80,000,000	76,233,820	75,633,820	600,000	3,766,180	3,766,180
합계		80,000,000	76,233,820	75,633,820	600,000	3,766,180	3,766,180

위와 같이 연구비 집행 진행(정산) 내역서를 알려드리오니 연구업무에 참고하시기 바랍니다.

2014년 10월 23일

연구책임자명

구만복 인

3차년도 연구비 집행 실적



연구비 집행 정산(진행) 내역서

과제번호	Q1300803	계약일자	2012.12.18	연구기간	2014.12.18 ~ 2015.12.17	총연구비	80,471,580 원
과제명	[위탁]농산물 잔류 농약에 대한 특이적 애플타머 개발					협약 연구비	80,000,000 원
연구책임자	구만복	생명과학대학 생명과학부		연구소	생명공학연구소		
지원기관	농림수산식품기술기 획평가원	지원종류	첨단생산기술개발사업				
결과보고일		관리기관	생명공학연구소	연구비 입금총액	80,626,886 원		

지원구분	연구비 항목	실행예산	2015.10.14 현재			잔액	신청가능금액
			청구액	집행금액	진행중금액		
교외연구비	외부인건비	0	0			0	0
교외연구비	플링제인건비	37,920,000	37,920,000	37,920,000	0	0	0
교외연구비	연구활동비	2,010,000	295,100	289,000	6,100	1,714,900	1,714,900
교외연구비	연구시설·장비및 재료비(재료비)	12,554,159	7,781,000	7,781,000	0	4,773,159	4,773,159
교외연구비	연구수당	2,150,000	0			2,150,000	2,150,000
교외연구비	연구과제추진비	2,720,000	2,208,735	1,926,461	282,274	511,265	511,265
교외연구비	간접경비	16,000,000	16,000,000	16,000,000	0	0	0
교외연구비	부가가치세	7,272,727	7,272,727	7,272,727	0	0	0
	교외연구비 별 계	80,626,886	71,477,562	71,189,188	288,374	9,149,324	9,149,324
합 계		80,626,886	71,477,562	71,189,188	288,374	9,149,324	9,149,324

위와 같이 연구비 집행 진행(정산) 내역서를 알려드리오니 연구업무에 참고하시기 바랍니다.

연구책임자명

2015년 10월 14일

구만복 인



3. [제1협동]

1차년도 연구비 집행 실적

(단위 : 천원)

비목	금액		계 획금액	사 용액	잔액	비고
	세목					
직접비	인건비	미지급용				
		지급용	23,166	23,166	0	
		현물				
	학생인건비					
	연구 장비· 재료비	현금	12,531	12,531	0	
		현물				
	연구과제추진비		3,500	4,000	0	
	연구활동비		4,960	4,460	0	
	연구수당		4,633	4,633	0	
	위탁연구개발비					
간접비	간접비		11,210	11,210	0	
연구개발비 총액			60,000	60,000	0	

2차년도 연구비 집행 실적

(단위 : 천원)

비목	금액		계 획금액	사 용액	잔액	비고
	세목					
직접비	인건비	미지급용	-	-	-	
		지급용	38,622	16,833	21,789	
		현물	-	-	-	
	학생인건비		-	-	-	
	연구 장비· 재료비	현금	37,776	36,686	1,090	
		현물	-	-	-	
	연구과제추진비		6,476	2,766	3,710	
	연구활동비		6,996	5,177	1,819	
	연구수당		7,699	3,800	3,899	
	위탁연구개발비		-	-	-	
간접비	간접비		22,431	17,633	4,798	
연구개발비 총액			120,000	82,895	37,105	

3차년도 연구비 집행 실적

(단위 : 천원)

비목	세목	금액	협약금액	예산변경 후 금액	사용액	잔액
직 접 비	인건비	미지급용				
		지급용	26,740,000	17,661,000	17,661,000	0
		현물				
	학생인건비					
	연구장비·재 료비	현금	36,647,201	52,256,201	50,456,201	1,800,000
		현물				
	연구과제추진비		6,840,000	10,373,000	9,761,330	611,670
	연구활동비		6,230,000	1,500,000	1,500,000	0
	연구수당		5,333,000	0	0	0
	위탁연구개발비					
간접비	간접비		19,678,000	19,678,000	19,678,000	0
연구개발비 총액		101,468,201	101,468,201	99,056,531	2,411,670	

4. [제2협동]

1차년도 연구비 집행 실적

(단위 : 천원)

비목	금액		계 획 금 액	사 용 액	잔 액	비 고
	세 목					
직접비	인건비	미지급용				
		지급용				
		현물	120,006	94,521	25,485	
	학생인건비					
	연구 장비· 재료비	현금	107,000	98,066	8,934	
		현물				
	연구과제추진비		4,350	2,246	2,104	
	연구활동비		1,984	894	1,090	
	연구수당					
	위탁연구개발비					
간접비	간접비					
연구개발비 총액			233,340	195,727	37,613	

2차년도 연구비 집행 실적

(단위 : 천원)

비목	금액		계 획 금 액	사 용 액	잔 액	비 고
	세 목					
직접비	인건비	미지급용	-	-	-	
		지급용	-	-	-	
		현물	240,012	189,042	50,970	
	학생인건비		-	-	-	
	연구 장비· 재료비	현금	233,918	222,971	10,947	
		현물	-	-	-	
	연구과제추진비		6,850	2,725	4,125	
	연구활동비		2,900	243	2,657	
	연구수당		-	-	-	
	위탁연구개발비		-	-	-	
간접비	간접비		3,000	3,000	0	
연구개발비 총액			486,680	417,981	68,699	

3차년도 연구비 집행 실적

(단위 : 천원)

비목	세목	금액	계 획 금액	사 용 액	잔 액	비 고
직접비	인건비	미지급용	-	-	-	
		지급용	-	-	-	
		현물	240,012		-	
	학생인건비		-			
	연구 장비· 재료비	현금	290,168	290,145	23	
		현물	-			
	연구과계추진비		7,200	6,397	803	
	연구활동비		6,300	5,901	399	
	연구수당		-			
	위탁연구개발비		-			
간접비	간접비	3,000	100	2,900		
연구개발비 총액		546,680	542,555	4,125		

중요 연구변경 사항

해당사항 없음.

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에 대한 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	[제1세부] 나노입자를 활용한 고감도 신호검출 원천 기술 개발	● 나노입자를 활용한 고감도 신호검출 원천 기술 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> 금 나노입자의 뭉치화 관측을 통한 농약 검출법의 개발 금 나노입자를 이용한 lucif- erase 활성 측정 방법의 개발
		● 잔류농약 검출용 단백질 반 응기반 고감도 비색 센서 기 술 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> 단백질과 금 나노입자를 이용한 잔류농약 검출 가능 비색 센서 원천기술 개발
	[제1세부 위탁] 농산물 잔류 농약에 대한 특이적 애타머 개발	● 7종의 농산물에 잔류하는 유기인계, 카바메이트계 농약 선정 및 애타머 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> 이프로벤포스, 테뷰코나졸, 메페 나셋, 이나벤파이드, 카프로파미 드, 펜시큐론, 에디펜포스 등 벼 농약 7종을 사전 분석을 통해 선정함. 이프로벤포스, 테뷰코나졸, 메페 나셋, 이나벤파이드에 각각 특 이적으로 결합하는 애타머 개발 완료. 카프로파미드, 펜시큐론, 에디펜 포스 특이적 애타머 개발 중(1 차년도 종료 전까지 개발 완료 가능)
		● 개발된 애타머 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> m-fold 프로그램으로 애타머의 깁스프리에너지를 통한 2차 구 조 분석 금 나노입자 기반 색도 분석을 통해 애타머의 특이성 분석 금 나노입자 기반 색도 분석을 통해 애타머의 결합성 분석
		● 선별된 애타머 라이브러리 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> 선별된 애타머 서열 모두 특허 화 되어 애타머 라이브러리로 구축됨
	[제1세부 협동] 애타머-효소 복합반응을 이용한 잔류농약 현장 다중 동시분석용 다채널 스트립 개발	● 모델 애타머를 이용한 스트립센서 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> Double strand DNA(dsDNA; 애타머-상보DNA) 기반한 곰팡 이독소(aflatoxin B1; AFB1) 스트 립 센서 모델 개발 dsDNA기반 스트립 센서 디자 인 Top-down 방식의 스트립고정 용 액상 기판 dsDNA-Streptavidin 복합체 개 발 및 스트립 상 고정 조건 확 인 최적화된 dsDNA 기반 스트립 센서의 검출한계 확인
<ul style="list-style-type: none"> 애타머 기반 AFB1 분석용 dipstick 모델 개발 애타머 기반 dipstick 디자인 애타머 기반 dipstick 최적화 최적화된 애타머 기반 스트립의 검출한계 확인 				

		<ul style="list-style-type: none"> ● 효소반응 기반 단일 잔류농약 검출 스트립 센서 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 잔류농약 검출을 위한 효소기반 chemiluminescence 스트립센서 개발 • Chemiluminescence 농약분석용 스트립 센서 디자인 • 각 시약의 최적화 조건 확립 • 농약 3종에 대한 검출한계 측정
		<ul style="list-style-type: none"> ● 스트립상 농약의 유동성 최적화 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 잔류농약 검출을 위한 효소기반 colorimetric 스트립센서 개발 • Colorimetric 스트립센서 디자인 • 최적화 조건 확립 • Colorimetric 스트립센서 검출한계 측정
	[제2협동] 잔류농약 검출을 위한 휴대형 광학 검출 장치 고안	<ul style="list-style-type: none"> ● 잔류농약 검출을 위한 휴대형 광학 검출 장치 고안 ● 잔류농약 검출용 광학 신호 변환 처리기술개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> • CCD 모듈 설계 및 제작과 측정 알고리즘 개발 및 구현 • PD 측정모듈 설계 및 제작 및 이미지 센서 모듈 설계
		<ul style="list-style-type: none"> ● 잔류농약 검출을 위한 휴대형 광학 검출 장치 고안 ● 휴대형 분광 광학 검출 장치 설계 및 알고리즘 구현 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 분광 광학시스템 설계 및 제작/검증 • 스트립 측정 모듈 설계/제작/검증 • 무선 통신(B/T) 환경 구축 • 임베디드 시스템 설계 및 제작
2차 년도 (2014)	[제1세부] 나노입자-효소간 신호증강 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● 나노입자를 이용한 잔류농약 검출 시스템 개발 및 여러 가지 농약 센싱 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 이미다졸을 이용한 금 나노입자의 뭉치화 관측을 통한 농약 검출법의 개발
			100	<ul style="list-style-type: none"> • 여러 가지 농약에 대한 검출 가능성 실험
		<ul style="list-style-type: none"> ● 개발된 시스템의 재현성 확보 및 검정식 도출 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 재현성 확보 및 검출 가능한 농약의 신호에 대한 정량적 검정식 도출
		<ul style="list-style-type: none"> ● 금 나노입자를 이용한 비색 검출법의 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 금 나노입자의 뭉치화 관측을 통한 농약 검출법의 개발 및 금 나노입자의 크기 조절을 통한 검출한계의 향상
	<ul style="list-style-type: none"> ● 형광 염료를 이용한 농약검출법의 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 형광 염료와 금속이온 복합체를 이용한 Cartap에 선택적인 농약 검출법의 연구 	
[제1세부 위탁] 농산물 잔류 농약에 대한 특이적 앵타머 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● 2종의 농산물에 잔류하는 농약 선정 및 앵타머 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 새로운 타겟 아세타미프리드와 아세페이트를 사전분석을 통해 선정함. • 현재 1차년도 타겟이었던 카프로파미드, 펜시큐론, 에디펜포스에 특이적인 앵타머를 다시 스크리닝 중에 있음. 	
	<ul style="list-style-type: none"> ● 개발된 앵타머 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> • m-fold 프로그램으로 앵타머의 깃스프리에너지를 통한 2차구조 	

				<ul style="list-style-type: none"> 분석 금 나노입자기반 색도 분석을 통해 애플타머의 특이성 분석 금 나노입자기반 색도 분석을 통해 애플타머의 결합성 분석
		<ul style="list-style-type: none"> 선별된 애플타머 라이브러리 구축 	100	<ul style="list-style-type: none"> 선별된 애플타머 서열 모두 특허화 되어 애플타머 라이브러리로 구축됨
	<p>[제1세부 협동] 애플타머-효소 복합반응을 이용한 잔류농약 현장 다중 동시분석용 다채널 스트립 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> 개발된 4종의 농약 애플타머를 이용한 각각의 스트립 센서 구현 	100	<ul style="list-style-type: none"> 개발된 4종의 농약 애플타머를 이용한 스트립센서의 최적화 조건 확립 각 애플타머별 운동성 결합조건 확인 각 스트립별 최적화 및 검출한계 조건 확립 각 농약에 대한 특이성 확인 각 스트립센서의 시료 적용 조건 확립 (진행 중) 추출조건 확립 Matrix effect 최소화 조건(희석법) 최저검출한계(cut-off value)
		<ul style="list-style-type: none"> 애플타머 효소 복합반응 기반의 다채널 4종 농약 특이적 동시 정량, 정성적 스트립센서 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> 다채널 스트립 설계 및 제작 파라핀 왁스 프린팅을 이용한 센서 포맷 제작
			100	<ul style="list-style-type: none"> 애플타머-효소 복합반응에 대한 정량 및 정성분석법 최적화 : 유체 흐름 최적화를 위한 용매 선정 및 볼륨, 계면활성제 선정
			100	<ul style="list-style-type: none"> 4종 농약의 동시검출 시 검출한계 확인
	<p>[제2협동] 잔류농약 검출을 위한 휴대형 광학 검출 장치 구성 및 성능평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> 샘플 전처리 검증 및 표준화 연구개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> 현재 사용되고 있는 농약 분석을 위한 전처리 방법 조사 체시된 샘플 전처리 방법의 농약 추출 상관성 확인
		<ul style="list-style-type: none"> 고감도 광학 센서 시스템 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> 스트립 이미징 광학계 설계 및 제작 스트립 이미징 광학계 검증 백그라운드 보정용 알고리즘 제안 및 검증
		<ul style="list-style-type: none"> 잔류농약 검출을 위한 휴대형 광학 검출 장치 구성 및 성능평가 	100	<ul style="list-style-type: none"> 스트립 센싱 시스템 Proto-type 제작 형광/반사 스트립 측정 성능 검증
3차 년도 (2015)	<p>[제1세부] 애플타머 후보군와과 나노물질을 이용한 농약 비색검출기술개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> 애플타머와 금 나노입자를 이용한 각종 농약검출 	100	<ul style="list-style-type: none"> 금나노입자 합성 및 분석 테뷰코나졸, 메페나셋, 이나벤파이드 특이 결합 애플타머와 금 나노입자 간 상호작용 관계 파악 NaCl 농도 최적화 선택성 실험
		<ul style="list-style-type: none"> 애플타머와 에틸렌 다이아민-그래핀 양자점을 이용한 테뷰코나졸 검출 	100	<ul style="list-style-type: none"> 에틸렌 다이아민-그래핀 양자점 (EGQD) 합성 및 분석 산화 그래핀(GO) 합성 및 분석

				<ul style="list-style-type: none"> EGQD의 앵타머 결합 효율 측정 GO 농도에 따른 EGQD의 소광 측정 EGQD를 이용한 테뷰코나졸 검출
<p>[제1섹 워탁] 농산물 잔류 농약에 대한 특이적 앵타머 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> 1종의 농산물에 잔류하는 농약 선정 및 앵타머 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> 새로운 타겟 부타클로르와 클로라이드메캣 클로라이드, 다이노테퓨란, 아자디락틴, 피프로닐를 사전분석을 통해 선정함. 1차년도 타겟이었던 펜시큐론과 3차년도에 새로 선정된 타겟인 부타클로르에 특이적인 앵타머 스크리닝 완료. 현재 앵타머 분석중에 있음. 3차년도에 새로 선정된 타겟인 다이노테퓨란 아자디락틴 및 피프로닐에 특이적인 앵타머 스크리닝 중에 있음. 	
	<ul style="list-style-type: none"> 개발된 앵타머 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> m-fold 프로그램으로 앵타머의 깃스프리에너지를 통한 2차구조 분석 금나노입자기반 색도 분석을 통해 앵타머의 특이성 분석 금나노입자기반 색도 분석을 통해 앵타머의 결합성 분석 	
<p>[제1세부 협동] 앵타머-효소 복합반응을 이용한 잔류농약 현장 다중 동시분석용 다채널 스트립 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> 다채널 스트립 센서의 평가 및 개선 	100	<ul style="list-style-type: none"> 실제 시료를 이용한 스트립 센서의 평가 실제 시료 중 10종 농약 별 cut-off value 평가 농장, 농산물 시장 등의 현장에 적용 실제시료 및 현장분석 적용 시 야기되는 문제점 도출 및 해결 스트립 센서의 신속성 개선 : 총 분석 소요시간 1시간 이내 목표 	
	<ul style="list-style-type: none"> 산업화를 위한 scale up 조건 확립 	100	<ul style="list-style-type: none"> 대량생산을 위한 각 시약 처리 조건 확인 외부환경에 따른 스트립 센서 영향확인 (온도, 습도 등) 각종 안정제 처리를 통한 유효기간 증대 방안 강구 보관환경에 따른 유효기간 확인 센서 제조공정 최적화 및 간소화 전략수립 ((주)웰코리아와 협의) 	

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구성과

1. 연구성과

가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

(1) 연구성과 목표

구분		특허		학술대회	인력양성	기술이전	논문		기타
		출원	등록	발표			SCI	비SCI	
1차 년도	목표	1		4			3	1	
	달성	2		11	5		2		
2차 년도	목표	3		6	3	1	5	1	
	달성	5		11	4		8		
3차 년도	목표	3		6	6	1	5	1	
	달성	3		13	3	2	7	1	
계	목표	7		16	9	2	13	3	
	달성	10		35	12	2	17	1	

(2) 연구성과 활용 실적

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2	2	1	2	1	
	달성	2	6	-	2	1	

나. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Rapid and Sensitive Immunochromatographic Strip for on-site Detection of Sulfamethazine in Meats and Eggs	심원보	정덕화	김정숙, 김민곤	Journal of Food Science	78(10)	국외	SCI
2013	Highly sensitive gold nanoparticle-based colorimetric probe for phytate detection with high selectivity over various phosphate derivatives	김수덕	한민수	엄민식, 서승혁	Tetrahedron Letters	54(39)	국외	SCI
2014	An aptamer-based dipstick assay for the rapid and simple detection of aflatoxin B1	심원보, 김민진	김민곤	문효영	Biosensors and Bioelectronics	62	국외	SCI
2014	Thioether Amide based-fluorescent chemosensors for Pd ²⁺ with high selectivity over Pd ⁰	안상엽	한민수	김수덕, 백경규, 엄민식, 강승훈	Bulletin of the Korean Chemical Society	35(7)	국내	SCI
2014	Chemiluminescence competitive aptamer assay for the detection of aflatoxin B1 in corn samples	심원보	김민곤	문효영, 정효압, Jack Appiah Ofori, 정덕화	Food Control	36(1)	국외	SCI

2014	Development of a simultaneous lateral flow strip test for the rapid and simple detection of deoxynivalenol and zearalenone	김경열	심원보	김정숙, 정덕화	Journal of Food Science	79(10)	국외	SCI
2014	Multiple Go-SELEX for Efficient Screening of Flexible Aptamers	Van Thuan Nguyen, 권영섭	구만복	김재훈	Chemical Communications	139(18)	국외	SCI
2014	Evaluation of the transfer rate of ochratoxin A to decoctions of herbal medicines	심원보	정덕화	하광수, 김민곤, 김정숙	Food Science and Biotechnology	23(6)	국내	SCI
2014	Reaction-based colorimetric and fluorogenic signaling of hydrogen sulfide using a 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole - coumarin conjugate	배지희	장석규	최지영, 박태정	Tetrahedron Letters	55(6)	국외	SCI
2014	A Ligand Exchange-based Fluorogenic Assay for Cartap Using Cu ²⁺ -calcein Blue Complex	신윤진	한민수	엄민식, 강승윤	Bulletin of the Korean Chemical Society	35(12)	국내	SCI
2015	Organic-inorganic hybrid nanoflowers: Types, characteristics, and future prospects	이승우	박태정	전선아, 김문일	Journal of nanobiotechnology	13	국외	SCI

2015	Robust fluorescence sensing platform for detection of CD44 cells based on graphene oxide/gold nanoparticles	정하영	박태정	백승훈, 장성진, 전산아	Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	135	국외	SCI
2015	Development of a separation and detection system for <i>Bacillus anthracis</i> spores based on peptide conjugates identified from peptide library	김기욱	박태정	박종필, 이상엽	Biosensors Journal	4(1)	국외	비SCI
2015	Development of a portable biosensor system for pesticide detection on a metal chip surface integrated with wireless communication	김봉석	박태정	김기욱, 허남수, 김명선, 양기성, 이상엽	Food science and biotechnology	24	국외	SCIE
2015	A facile and sensitive detection of organophosphorus chemicals by rapid aggregation of gold nanoparticles using organic compounds	김명선	박태정	김기욱	Biosensors and Bioelectronics	67	국외	SCI
2015	Detection of Iprobenfos and Edifenphos using a new Multi-aptasensor	Van Thuan Nguyen, 권영섭	구만복	박제건	Analytical Chimica Acta	868	국외	SCI

2016	Advances in microbial biosynthesis of metal nanoparticles	박태정	이상엽	이경균	Applied Microbiology and Biotechnology	100(2)	국외	SCI
------	---	-----	-----	-----	--	--------	----	-----

다. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2013	이 프로벤포스 (Iprobenfos)에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도	고려대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0122777					
2013	테뷰코나졸, 메페나셋 및 이나벤파이드에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도	고려대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0123471					
2014	테뷰코나졸, 메페나셋 및 이나벤파이드에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도	고려대학교 산학협력단	PCT	PCT/KR2014/009696					
2014	금 나노입자의 응집 유도를 통한 잔류 유기인계 농약 검출 센서 시스템	중앙대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0144379					
2014	금 나노입	중앙대학교	대한민국	10-2014-0					

	자 와 G r e e n Fluoresce nt Protein (GFP) 을 이용한 잔 류 유기인 계 농약 검출 비색 센서 시스 템	교 산학협력 단		069980					
2014	카르탑 검 출용 조성 물 및 이 를 이용한 카르탑 의 검출 방법	중앙대학 교 산학협력 단	대한민국	10-2014-0 131592					
2014	이미지 센 서 및 분 광 분석 방법	(주)메카시 스	대한민국	10-2014-0 143555					
2015	파툴린 특 이적 검출 용 압타머 및 이를 이용한 파 툴린 검출 방법	광주과학 기술원	대한민국	10-2015-0 159498					
2015	S e n s o r s y s t e m f o r d e t e c t i n g o r g a n o p h o s p h o r u s r e s i d u e s b y i n d u c i n g c o a g u l a t i o n o f g o l d n a n o p a r t i c l e s	중앙대학 교산학협 력단	미국	14/707,972					
2016	역Y자 형 태의 진단 스트립을 포함하는 잔류농약 검출용 키 트 및 상 기 키트를	경상대학 교 산학협력 단	대한민국	10-2016-0 005352					

이용한 잔류농약 검출 방법									
-------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

라. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해년도 징수액	향후 징수액	합계
30,000,000 원	30,000,000 원	0	30,000,000 원

마. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해년도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			
분광광학용 잔류농약 검 출시스템 상 케이스	케이스 금형제작	웰코리아 (주)	신동혁	22				
분광광학용 잔류농약 검 출시스템 하 케이스	케이스 금형제작	웰코리아 (주)	신동혁	22				
형광광학용 잔류농약 검 출시스템 상 케이스	케이스 금형제작	웰코리아 (주)	신동혁	22				
형광광학용 잔류농약 검 출시스템 하 케이스	케이스 금형제작	웰코리아 (주)	신동혁	22				
분광광학용 잔류농약 검 출시스템	분광검출시스템 시제품	웰코리아 (주)	신동혁	22	검출장비			
분광광학용 잔류농약 검 출 시약	검출 시약	(주)메텍스	김경동	60	소모성 시약			
형광광학용 잔류농약 검 출시스템	형광검출시스템 시제품	웰코리아 (주)	신동혁	22	검출장비			
형광광학용 잔류농약 검 출 스트립	검출 센서 스트립	(주)메텍스	김경동	60	소모성 스트립			

바. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
17	1	16			10	7	11		6

(2) 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

(3) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

사. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계

2. 관련사진

▣ 농약검출 단말기 (2건)

- WellKeeper™ - 용액 상태 검사용 농약 검출 시스템



- WellSense™ - 스트립 리더를 장착한 농약검출 형광단말 시스템



제 2 절 연구성과 활용계획

1. 구체적 성과물의 명칭

- WellKeeper™ : 용액 상태 검사용 농약 검출 시스템
- WellSense™ : 스트립 리더를 장착한 농약검출 형광단말 시스템

2. 성능

- 액상 검출기(WellKeeper™)는 잔류농약 측정시 총 검출시간 3분(쌀), 6분(과채류) 소요

- 스트립 검출기(WellSense™)는 잔류농약 측정시 12분 소요

3. 용도

- 아래 리스트에서부터 잔류농약 검출용으로 활용될 예정임.

※ 검출 대상 농산물 잔류농약 허용치 기준 (식품공전)

우선 순위	구분	농약 리스트	잔류허용 기준[벼(쌀)]	잔류허용 기준(딸기)	잔류허용 기준(상추)	잔류허용 기준(들깨잎)
1	제초제	butachlor	0.1 ppm			
1	살균제	carpropamid	1.0 ppm	0.05 ppm	0.05 ppm	0.05 ppm
1	살균제	edifenphos	0.2 ppm			
1	살균제	iprobenfos	0.2 ppm			
1	제초제	mefenacet	0.01 ppm			
1	살균제	pencycuron	0.3 ppm	2.0 ppm	0.1 ppm	0.1 ppm
1	살균제	tebuconazole	0.05 ppm	0.5 ppm	0.05 ppm	15.0 ppm
1	살균제	tricyclazole	0.7 ppm	0.05 ppm	0.05 ppm	0.05 ppm
1	살충제	Diazinon	0.1 ppm	0.1 ppm	0.1 ppm	(0.1 ppm)
1	생육조절제	chlormequat (chloride)	0.05 ppm	1.0 ppm	(1.0 ppm)	(1.0 ppm)
1	생육조절제	inabenfide	0.05 ppm			
2	살충제	acephate	0.3 ppm	1.0 ppm	5.0 ppm	3.0 ppm
2	살충제	dinotefuran	1.0 ppm	2.0 ppm	10 ppm	30.0 ppm
2	살충제	fipronil	0.01 ppm			

4. 수요처

- 참여기업이 주관기관으로부터 기술이전 받은 기술에 대해 단말기를 양산하고 잔류농약 검출을 위한 부품 및 시약 공급업체와 공급계약을 체결하고, 판매업체와 판매계약을 체결하고 중임.

제 3 절 기대효과

1. 학술적 의의

- 생체분자나 치료물질 등을 표적물질에 전달하거나, 그 자체의 특성인 표면 공명현상을 이용해 바이오센서에 사용하는 금 나노입자에 이미다졸이라는 물질과 만남으로써 영김현상이 가속화 된다는 사실을 발견함으로써, 추후 금 나노입자의 활용성이 더 넓어질 것이다.
- 의약관련 바이오 리셉터 개발은 활발한 반면, 식품, 상수원 및 하천의 잔류독성 물질(예; 잔류의약품, 항생제, 환경호르몬, 잔류농약 등)에 대한 개발은 국내·국외 모두 미진한 상태이다. 이번 연구 성과를 통해 이런 물질들도 충분히 검출할 수 있다는 새로운 가능성을 연다.
- 기존의 앵타머 스크리닝 방법이 지닌 문제점(예; 자성비드나 컬럼과 같은 특정 분리용 물질에 고정함으로써 수율이 낮을 수 있다는 점 및 분리용 물질에 DNA가 직접 결합할 가능성, 타겟에 결합한 DNA를 다시 분리 해내는 과정에서 DNA pool 손실이 생길 수 있다는 점)을 극복하기 위해 그래핀 옥사이드를 사용한 점을 통해 앵타머 스크리닝의 새로운 방법을 제시한다.

2. 기술적 측면

- 농약 애플타머를 스크리닝 하는 기술의 발전을 통해, 농약 뿐 만 아니라 다른 유해물질을 타겟으로 하는 애플타머를 찾을 수 있다. 더 나아가 애플타머의 시퀀스 및 유해 물질의 구조를 파악함으로써 더욱 강한 결합력과 환경에 맞게 변형할 수 있고, 대량으로 생산할 수 있는 기술을 개발한다.
- 농작물 추출액 뿐 만 아니라 토양을 증류시켜 만든 증류수를 넣어 토지에 있는 농약에 대한 검출기술을 통해 적절한 농지에 대한 정보를 제공할 수 있는 기술을 개발한다.

3. 경제적 측면

- 각 농가에서 사용하는 농작물의 특성 및 농약의 종류에 고루 맞춰, 보편적인 검출 뿐만 아니라 농가 맞춤형 컨설팅 및 바이오센서를 제작함으로써 부가가치를 창출한다.
- 기존의 기기를 이용한 잔류농약 분석을 위한 비용을 단순히 스트립과 휴대용 검출기로 할 수 있게 됨에 따라, 분석에 대한 비용을 절감한다.
- 휴대성 및 신속성으로 인해 실시간으로 농작물의 농약의 농도를 파악할 수 있게 됨에 따라 농업청정국으로서의 위상 및 국가경쟁력을 높인다.

4. 산업적 측면

- 기존의 방식 대체 및 해외 수출가능성이 높다.
- 전 세계적으로 상당히 많은 기업체들이 고효율(high-throughput) 스크리닝 기능과 다중검지(multiplexing)기능까지 겸비한 무수한 종류의 마이크로어레이 기술을 상용화하고 있다. 대표적인 예로 Affimatrix (미국), Microarrays, Inc. (미국), Whiteman (미국), Gentel Biosurfaces (미국), Clontech (미국), Veredus Laboratories (싱가폴), Eurogentec (벨기에), 주식회사 지노텍(한국), 지에스 나노텍 (한국), 에스비포스텍(한국), (주)지노믹트리(한국), 이바이오젠(한국) 등이 있다.
- 이에 국내외 특허 출원과 등록을 통해 새로운 산업화 기반을 조성한다.

5. 잔류농약의 최소화로 인한 농업청정국가로 성장

- 휴대성과 편의성에 기인한 잔류농약검출기 개발을 통해 농작물의 유해성으로부터 자유롭게 함.

6. 녹색 산업 창출

- 애플타머 관련 개발을 통해 센싱에 관련된 기타 고부가 바이오 소재 및 바이오센서 산업을 창출함으로써, 세계 시장에서 경쟁력을 끌어올림.

7. 사람들의 안전한 먹거리에 대한 인식 전환

- 올바른 먹거리
- 새로운 일자리 창출

제 4 절 성과 활용성 제고를 위한 의견

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

제 7 장 참고문헌

- [1] Aikpon R, Sezonlin M, Osse R, Akogbeto M. Evidence of multiple mechanisms providing carbamate and organophosphate resistance in field *An. gambiae* population from Atacora in Benin. *Parasites & vectors*. 2014;7:568.
- [2] Aizoun N, Aikpon R, Gnanguenon V, Oussou O, Agossa F, Padonou G, et al. Status of organophosphate and carbamate resistance in *Anopheles gambiae sensu lato* from the south and north Benin, West Africa. *Parasites & vectors*. 2013;6:274.
- [3] Akiner MM. [Malathion and propoxur resistance in Turkish populations of the *Anopheles maculipennis* Meigen (Diptera: Culicidae) and relation to the insensitive acetylcholinesterase]. *Turkiye parazitolojii dergisi / Turkiye Parazitoloji Dernegi = Acta parasitologica Turcica / Turkish Society for Parasitology*. 2014;38:111-5.
- [4] Apilux A, Isarankura-Na-Ayudhya C, Tantimongcolwat T, Prachayasittikul V. Paper-based acetylcholinesterase inhibition assay combining a wet system for organophosphate and carbamate pesticides detection. *EXCLI journal*. 2015;14:307-19.
- [5] Assogba BS, Djogbenou LS, Saizonou J, Milesi P, Djossou L, Djegbe I, et al. Phenotypic effects of concomitant insensitive acetylcholinesterase (*ace-1(R)*) and knockdown resistance (*kdr(R)*) in *Anopheles gambiae*: a hindrance for insecticide resistance management for malaria vector control. *Parasites & vectors*. 2014;7:548.
- [6] Badawy ME, El-Aswad AF. Bioactive paper sensor based on the acetylcholinesterase for the rapid detection of organophosphate and carbamate pesticides. *International journal of analytical chemistry*. 2014;2014:536823.
- [7] Bu C, Peng B, Cao Y, Wang X, Chen Q, Li J, et al. Novel and selective acetylcholinesterase inhibitors for *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae). *Insect biochemistry and molecular biology*. 2015;66:129-35.
- [8] Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*. 2013;11:315-35.
- [9] Cornelie S, Rossignol M, Seveno M, Demette E, Mouchet F, Djegbe I, et al. Salivary gland proteome analysis reveals modulation of anopheline unique proteins in insensitive acetylcholinesterase resistant *Anopheles gambiae* mosquitoes. *PloS one*. 2014;9:e103816.
- [10] Essandoh J, Yawson AE, Weetman D. Acetylcholinesterase (*Ace-1*) target site mutation 119S is strongly diagnostic of carbamate and organophosphate resistance in *Anopheles gambiae s.s.* and *Anopheles coluzzii* across southern Ghana. *Malaria journal*. 2013;12:404.
- [11] Jeon J, Kretschmann A, Escher BI, Hollender J. Characterization of acetylcholinesterase inhibition and energy allocation in *Daphnia magna* exposed to carbaryl. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2013;98:28-35.
- [12] Li J, Qian B, Yin J, Wu S, Zhuan F, Xu S, et al. Surface display of recombinant

Drosophila melanogaster acetylcholinesterase for detection of organic phosphorus and carbamate pesticides. *PloS one*. 2013;8:e72986.

- [13] Lionetto MG, Caricato R, Calisi A, Giordano ME, Schettino T. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *BioMed research international*. 2013;2013:321213.
- [14] Lokeshwari D, Krishna Kumar NK, Manjunatha H. Multiple Mutations on the Second Acetylcholinesterase Gene Associated With Dimethoate Resistance in the Melon Aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of economic entomology*. 2016.
- [15] Luo GH, Li XH, Zhang ZC, Liu BS, Huang SJ, Fang JC. Cloning of Two Acetylcholinesterase Genes and Analysis of Point Mutations Putatively Associated with Triazophos Resistance in *Chilo auricilius* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of economic entomology*. 2015;108:1289–97.
- [16] Maryoung LA, Lavado R, Schlenk D. Impacts of hypersaline acclimation on the acute toxicity of the organophosphate chlorpyrifos to salmonids. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands). 2014;152:284–90.
- [17] Miranda-Contreras L, Gomez-Perez R, Rojas G, Cruz I, Berrueta L, Salmen S, et al. Occupational exposure to organophosphate and carbamate pesticides affects sperm chromatin integrity and reproductive hormone levels among Venezuelan farm workers. *Journal of occupational health*. 2013;55:195–203.
- [18] Neale PA, Escher BI. Coextracted dissolved organic carbon has a suppressive effect on the acetylcholinesterase inhibition assay. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*. 2013;32:1526–34.
- [19] Pohanka M, Adam V, Kizek R. An acetylcholinesterase-based chronoamperometric biosensor for fast and reliable assay of nerve agents. *Sensors* (Basel, Switzerland). 2013;13:11498–506.
- [20] Russom CL, LaLone CA, Villeneuve DL, Ankley GT. Development of an adverse outcome pathway for acetylcholinesterase inhibition leading to acute mortality. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*. 2014;33:2157–69.
- [21] Shamagsumova RV, Shurpik DN, Padnya PL, Stoikov, II, Evtugyn GA. Acetylcholinesterase biosensor for inhibitor measurements based on glassy carbon electrode modified with carbon black and pillar[5]arene. *Talanta*. 2015;144:559–68.
- [22] Singh M, Kaur M, Kukreja H, Chugh R, Silakari O, Singh D. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection. *European journal of medicinal chemistry*. 2013;70:165–88.
- [23] Temeyer KB, Tong F, Totrov MM, Tuckow AP, Chen QH, Carlier PR, et al. Acetylcholinesterase of the sand fly, *Phlebotomus papatasi* (Scopoli): construction, expression and biochemical properties of the G119S orthologous mutant. *Parasites & vectors*. 2014;7:577.
- [24] Tse YC, Sharp CR, Evans T. Mechanical ventilation in a dog with acetylcholinesterase inhibitor toxicosis. *Journal of veterinary emergency and critical care* (San Antonio, Tex

: 2001). 2013;23:442-6.

- [25] Vale A, Lotti M. Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning. Handbook of clinical neurology. 2015;131:149-68.
- [26] Wang Y, Chen C, Zhao X, Wang Q, Qian Y. Assessing joint toxicity of four organophosphate and carbamate insecticides in common carp (*Cyprinus carpio*) using acetylcholinesterase activity as an endpoint. Pesticide biochemistry and physiology. 2015;122:81-5.
- [27] Wu S, Zuo K, Kang Z, Yang Y, Oakeshott JG, Wu Y. A point mutation in the acetylcholinesterase-1 gene is associated with chlorpyrifos resistance in the plant bug *Apolygus lucorum*. Insect biochemistry and molecular biology. 2015;65:75-82.
- [28] Yang L, Wang G, Liu Y, Wang M. Development of a biosensor based on immobilization of acetylcholinesterase on NiO nanoparticles-carboxylic graphene-nafion modified electrode for detection of pesticides. Talanta. 2013;113:135-41.
- [29] Zhao M, Dong Y, Ran X, Wu Z, Guo X, Zhang Y, et al. Point mutations associated with organophosphate and carbamate resistance in Chinese strains of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). PloS one. 2014;9:e95260.

특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

신청과제명	농산물 안전성 제고를 위한 휴대용 잔류농약 검출기 개발		
주관연구책임자	박태정	주관기관	중앙대학교

1. 본 연구와 관련된 기술의 국내외 수준 비교

기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라 관련기술수준	연구사업단 보유기술수준		
저분자 유해물질에 대한 애타머 개발	미국	80%	90%	150%	
고감도 광학바이오센서	미국, 일본	90%	95%	120%	
휴대형 유해물질 검출장비	미국, 유럽	70%	90%	120%	

2. 특허조사분석

가. 특허조사분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허DB	특허정보원(www.kipris.or.k), 국제특허청(www.wipo.int)
검색기간	최근 3년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허 조사·분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		(기술 1)	(기술 2)
Keyword		잔류농약 검출	organophosphate, carbamate, pesticide, acetylcholinesterase inhibition
검색건수		86건	85건
유효특허건수		1건	1건
핵심특허 및 관련성	특허명	마이크로플루이딕스 칩 기반의 잔류농약 검출용 전처리 키트 및 이를 이용한 잔류농약 검출 방법	Apparatus for residual pesticide detection
	보유국	대한민국	미국
	등록년도	2014년	2014년
	관련성(%)	5%	10%
	유사점	빠른 시간 내에 간편하게 농산물의 안전성 여부를 확인	신속한 잔류 농약의 검출
차이점	마이크로플루이딕스 칩 이용 방법	전기화학적 바이오 센서	

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	한국, 미국, 일본, 유럽
논문 DB	Pubmed(www.pubmed.gov)
검색기간	최근 3년간
검색범위	키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

- 1) 기술명은 본 연구사업단과 관련(기보유기술 또는 향후 개발예정기술)된 기술을 기재
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 연구사업단 관련기술과 관련성이 높은 논문을 의미
- 3) 기존논문은 검색된 논문 중 연구사업단 관련기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 상위 3개 논문을 기준으로 작성

기술명		(기술 1)	(기술 2)
Keyword		organophosphate, carbamate, acetylcholinesterase	acetylcholinesterase, chemiluminescence
검색건수		85	16
유효논문건수		3	3
핵심논문	논문명	Development of a biosensor based	Upconversion nanoparticle-based

및 관련성		on immobilization of acetylcholinesterase on NiO nanoparticles-carboxylic graphene-nafion modified electrode for detection of pesticides	fluorescence resonance energy transfer assay for organophosphorus pesticides.
	학술지명	Talanta	Biosensors and Bioelectronics
	저자	Long Yang, <i>et al</i>	Qian Long, <i>et al</i>
	게재년도	2013년	2015년
	관련성(%)	10	10
	유사점	AChE 저해에 의한 유기인계/카바메이트 잔류 농약 검출	유기인계 잔류 농약의 형광 검출
차이점	NiO 나노입자와 그래핀 합성물을 통한 전기화학적인 검출.	UCNP 와 골드나노입자 사이의 FRET 현상을 이용한 유기인계 잔류농약의 검출 및 실제 샘플에 대한 적용. H2O2 필요없는 형광 발광법.	
핵심논문 및 관련성	논문명	The effect of mixtures of organophosphate and carbamate pesticides on acetylcholinesterase and application of chemometrics to identify pesticides in mixtures	A fluorometric biosensor based on H2O2-sensitive nanoclusters for the detection of acetylcholine
	학술지명	Environmental Monitoring and Assessment	Biosensors and Bioelectronics
	저자	K. Mwila, <i>et al</i>	Hongchang Li, <i>et al</i>
	게재년도	2013년	2014년
	관련성(%)	10	20
	유사점	유기인계/카바메이트 잔류 농약 검출	유기인계 잔류 농약의 형광 검출
차이점	AChE 활성도를 이용하여 유기인계/카바메이트 농약 활성의 저해	H2O2에 민감한 금속 나노클러스터를 이용한 ACh의 형광 검출	
핵심논문 및 관련성	논문명	Bioactive Paper Sensor Based on the Acetylcholinesterase for the Rapid Detection of Organophosphate and Carbamate Pesticides	A simple and sensitive fluorescence biosensor for detection of organophosphorus pesticides using H2O2-sensitive quantum dots/bi-enzyme
	학술지명	International Journal of Analytical Chemistry	Biosensors and Bioelectronics
	저자	Mohamed E. I. Badawy, <i>et al</i>	Xianwei Meng, <i>et al</i>
	게재년도	2014년	2013년
	관련성(%)	10	20
	유사점	AChE 저해에 의한 유기인계/카바메이트 잔류 농약 검출	유기인계 잔류 농약의 형광 검출
차이점	생화학 중합체를 통해 ATChI 기질을 고정시킨 스트립 이용한 paper 상에서의 발색 실험	복잡한 센서 없이 CdTe 양자점의 형광 quenching을 이용한 잔류 농약의 검출	

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 현재 진성 유니텍에서 판매되고 있는 제품은 Agri-Screen Ticket, 간이속서 검사 Kit, 농약단일 성분 정량 Kit, 잔류농약 검사용 Kit이 있음.



그림 373. 진성유니텍에서 현재 판매 중인 잔류농약 키트

- 저분자 유해물질 검출과 관련하여 UV-visible 흡광분광검출기, 전기화학 검출시스템이 상용화 되어 시판되고 있으나 대형장비이고 소형화 되어 휴대용으로 개발된 바는 없으며, 형광분광기의 경우 소형화 장비가 상용화 되었으나 HPLC 등의 크로마토그래피의 검출기 장비로서 국한되어 사용되고 있고 감도가 유기물질 검출의 경우 PPM의 수준에 머무르고 있음.
- 또한, 현재 판매 중인 잔류농약 키트는 각 농약별 감도가 달라 농약 중 일부는 과량이 있어야 검출이 가능할뿐더러 스크리닝 키트이므로 정량적인 분석을 위해서는 기기분석 실험을 수행해야 함.
- 우리나라의 바이오센서 시장은 (주)에스디, (주)올메디쿠스, (주)인포피아 (주)아이센스, (주)바이오포커스 등 몇 군데의 벤처기업에서 제품을 출시하고 있는 상태로 최근 매출이 상승하고 있으며, 현재 국내 바이오센서 기업들이 주로 관심을 가지고 있는 분야는 90% 이상이 의료용 바이오센서로, 아직 식품분석용과 환경용 및 그밖에 다른 분야의 바이오센서에 대한 관심 정도가 상대적으로 낮은 상태임.
- 향후 전망을 살펴보면 국내의 경우 국산 바이오센서가 상용화 되고 있으나, 아직 외국 제품의 의존도가 높은 실정임. 국내에서는 혈당 바이오센서 제품 외에는 시장이 매우 미미하나, 최근 들어 건강에 대한 관심이 고조되고 있으므로 젯산이나 콜레스테롤 등 다양한 바이오센서 관련 수요가 커질 것으로 전망됨.
- 국내 바이오센서 내수시장은 2012년 54억 달러 규모에서 2020년 99억 달러 규모로 연평균 10.4% 성장할 전망이다. 정부는 첨단 스마트 센서 육성사업 등을 추진하여 20년 기준 42억 달러 생산과 21억 달러 수출을 달성할 계획임. 국내 나노 기술 연구 등의 활성화

화에 따른 연구용 바이오센서의 수요 증가를 고려할 때 국내 시장 성장률은 세계 시장 성장률보다 더 클 수 있을 것으로 예상됨. (KISTI MARKET REPORT, Vol.3, Issue 4, 2013.)

2) 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

- 미국 EPA(Enviromental Protection Adgency)에서 사용되고 있는 효소 기반 테스트 키트는 EcloxT-Pesticide Strips (Severn Trent Services), Neuro-IQ Tox Test KitT (Aqua Survey, Inc.), OP-Stick Sensor (Protein-Biosensor), Organophosphate/Carbamate Screen Kit (Abraxis LLC)가 대표적임.
- 이 외에도 SDI(Strategic Diagnostics Inc. USA)에서 생산하고 있는 각종 잔류농약 성분 에 따라 단일 EnvironGard® 96-well plate 또는 EnvironGard® 20 Tube Kit가 있음.
- 저분자 유기물질에 대한 핵산 앵타머 개발 관련 보고는 많지 않으며 핵산 앵타머 기반 마이크로 어레이, 바이오센서 및 바이오칩(주로 의학용) 개발이 보고되고 있으나 아직 상용화되어 있지 있음.
- 비표지 검출법으로 소형 SPR을 Texas Instrument 사에서 개발한 바 있으나 민감도가 낮고 재현성이 낮아 바이오칩에 응용되지 못하고 있는 실정임.
- 전기화학적 검출법, 형광분광법 등은 소규모 형태로 개발되어 바이오칩 검출 시스템으로 적용된 바 있으나 신호 발생을 위한 표지물질을 분석 시료에 접합시키기 위한 공정과 이에 따르는 시약의 reservoir 및 pump 등으로 인해 휴대용 수준으로 소형화 되지 못하고 생화학적 물질의 경우 측정한계가 수 $\mu\text{g/ml}$ 의 수준임.
- 외국 시장분석 전문기관 데이터모니터에 따르면 오는 2024년 세계 바이오시장은 2조6천억 달러(한화 약 3천 100조원)에 달할 전망이다. 이는 반도체, 자동차, 화학제품 분야의 예상 시장 규모를 합한 금액(약 2조5천억 달러)보다 많은 것으로 보고됨. 바이오센서와 밀접한 관련이 있는 나노바이오 하이브리드 기술의 응용 제품은 대부분 개발 초기단계이나 기술개발이 활발히 진행되어 상용화가 빠르게 진전될 것으로 예상됨. 따라서 생체 친화성 나노 바이오 하이브리드 프로브의 개발은 시장 선점 효과와 함께 원천 기술의 확보를 가능하게 할 것으로 판단됨.

나. 연구사업단 보유(활용)기술의 산업화 계획 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 제품의 특징

- ◆ 잔류농약 검출용 나노센서 칩 개발
- ◆ 잔류농약 검출용 광학/전기화학센서의 국산화 기술 개발
- ◆ 단거리 통신용 잔류농약 검출 센서 시스템 개발
- ◆ 잔류농약 검출용 휴대용 단말기 개발

○ 제품의 대상

- ◆ 잔류농약 검출을 위한 개인 휴대용
- ◆ 농산물 유통시장 및 농수산물 관리 센터
- ◆ 생산자 자가 모니터링
- ◆ 농산물 판매자

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과				200	700	900
경제적 파급효과				500	1,500	2,000
부가가치 창출액				2,000	7,000	9,000
합계	0	0	0	2,700	9,200	11,900

5. 3P(특허,논문,제품)분석결과 및 연구사업단 사업내에서의 활용

가. 특허분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

- 기존 특허는 나노 리소그래피를 이용한 고가의 공정 등을 이용하여 상대적으로 경제성이 떨어짐.
- 기존의 잔류 농약 검출 분야에서는 민감도가 떨어지는 단점을 보유하고 있으며, 대개 기기분석, 색도분석 등의 고가의 장비를 이용하고 있음.
- 현재 저가의 공정을 이용한 고효율의 기술에 관한 광학 및 전기화학 센서용 전극설계에 대해서 특허가 존재하고 있지 않음.
- 앵타머를 이용한 검출기법에 대한 특허 및 저분자 잔류농약에 대한 앵타머의 개발 분야에서의 특허는 본 연구팀에서 출원, 등록된 건을 제외하고는 거의 없는 실정임.
- 본 연구과제에서는 이와 같은 특허분석 결과를 바탕으로 하여 다양한 저분자 잔류농약에 대한 앵타머를 발굴하고 저가공정인 열화탄소/금박막 전극 공정을 개발하여 지적재산권을 확보할 예정임.

나. 논문분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

- 본 연구과제에서는 이와 같은 특허분석 결과를 바탕으로 하여 다양한 저분자 잔류농약에 대한 애플타머를 발굴하고 저가공정인 열화탄소/금박막 전극 공정을 개발하여 지적재산권을 확보할 예정이다.
- 애플타머를 이용한 저분자 물질의 검출, 진단과 관련한 바이오센서 분야의 논문이 많지 않고, 개발된 애플타머의 수가 적은 문제로, 센서로의 application 쪽으로 치우친 경향이 있음.
- 기존 논문은 나노 리소그래피 혹은 단일 공정을 통해 제작된 광학 및 전기화학 센서의 우수한 특성을 다루고 있음. 이와 같은 공정은 우수한 특성의 센서를 제작할 수 있으나 상업화되기 어려운 측면이 있고 논문에서도 센서의 과학적 측면, 즉 우수한 특성을 중점적으로 다루고 있음.
- 따라서, 본 연구과제에서는 다양한 저분자 잔류농약에 대한 생화학적 바이오리셉터를 다수 확보하고 저가 공정을 이용한 나노전극 센서를 개발하여 이와 같이 개발된 센서가 우수한 특성을 가짐을 학술지에 보고할 예정이다.

다. 제품·시장분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

- 전 세계적으로 환경오염에 대한 규제 및 제한은 더욱 강화되고 있는 추세이므로 환경 오염 감지 시스템에 대한 시장은 계속해서 확장될 것으로 예상됨 (환경정보센싱 기술의 경우 2010년까지의 연평균성장률(CAGR)이 80% 이상에 달함).
- 특히, 현재 대부분의 환경오염 감지 시스템은 많은 시간과 훈련된 인력을 요구하는 분석 장비의 성격을 가지므로 현장에서 쉽고 빠르게 환경오염을 검출할 수 있는 휴대용, 초소형 분석장비의 개발이 시급하다고 볼 수 있음.

주 의

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