

백색 광원과 컬러 센서를 이용한 잔류 농약 검출용 바이오 센서 측정기 개발

조형준 · 유영훈[†]

제주대학교 물리학과 기초과학연구소
☎ 690-756 제주도 제주시 제주대학로 66

현해남

제주대학교 생물산업학부
☎ 690-756 제주도 제주시 제주대학로 66

(2005년 5월 19일 받음, 2005년 8월 22일 수정본 받음)

백색 광원과 컬러 센서를 이용하여 바이오 센서의 발색 정도를 측정하는 측정기를 개발하였다. 컬러 센서의 적색, 녹색 및 청색 영역의 빛의 세기를 비율로 나타냄으로서, 조사 광의 세기가 변하는 경우에도 안정적인 분광 정보를 얻을 수가 있었고, 바이오 센서의 화학적 처리 과정에서 발생하는 수막 등의 영향에 의한 오차를 감소시킬 수 있다. 바이오 센서의 발색 변화율이 작은 경우 컬러 센서의 각 영역에 대한 증폭률을 조정하는 것만으로 시스템의 민감도를 향상시킬 수 있었다.

주제어 : Optical instruments, Color measurement, Detection.

I. 서 론

현재 유전공학의 발전으로 배양을 통한 효소개발 및 생산이 활기를 띠고 있으며, 그에 따라 많은 장점을 갖는 효소들이 개발되고 있다. 더불어 효소의 항원 항체 반응 등을 이용한 바이오 센서들이 개발되고 있으며, 곤충 및 동물들을 통해서만 생산되던 효소들이 배양 및 복제를 통한 대량 생산화가 이루어지고 있어 바이오 센서를 통한 검사 및 측정법은 많은 주목을 받고 있다.^[1-3]

이러한 바이오 센서의 경우 효소의 화학적 반응의 정도를 측정하는 방법과, 효소에 발색을 시켜 발색 정도의 차이를 측정하는 방법이 있다. 화학적 반응의 정도를 측정하는 방법의 경우, 특정 원소의 함량 및 산성도 정도를 측정하는 방법이 주로 이용되고 있으며, 발색을 이용한 바이오 센서는 측정하고자 하는 현상 및 물질의 특성에 따라 그 발색 정도가 달라지도록 만든 것으로, 본 연구에서 사용된 잔류농약 검출용 바이오 센서도 여기에 해당된다. 그러나 현재 상용되어 있는 잔류농약 검출용 바이오 센서는 액체상태 임에 반해, 본 연구에서 사용한 바이오 센서는 액체상태의 바이오 센서를 고체상태로 만들어 스트립 형태로 개발 한 것이다. 기존의 액체 상태에 비하여 바이오 센서의 유통 및 보관이 용이하며, 농약 검출을 위한 전처리 과정의 간소화로 많은 활용이 예상된다.^[4] 이러한 발색 정도의 차를 이용한 바이오 센서의 경우 대부분 분광기를 이용하여 측정한다.^[5] 분광기를 이용하는 경우에는 회절격자를 이용한 분광 방법과 단파장을 이용한 분광 방법이 채택되고 있다. 분광 방법 중 회절격자를 이용한 분광 방법은 그 분해능이 높고, 넓은 파장 범위에

대한 정보를 얻을 수 있다는 장점이 있고, 단파장을 이용한 분광 방법은 특별한 파장에 대한 반응성을 손쉽게 얻을 수 있다. 그러나 회절격자를 이용한 분광 방법은 CCD(Charged Coupled Device) 와 회절격자를 이용하므로 고가 일 뿐 아니라, 파장의 공간적 분리를 통한 분광 방법으로 공간적 제약이 따르게 된다. 이러한 이유로 현재 상용되어지는 잔류농약 검출용 바이오 센서 측정기의 경우 단파장 및 필터를 이용한 분광법을 이용하여 특정 파장에 대한 투과 세기의 차이를 측정하는 방법을 택하고 있으며, 이 분광법의 경우 조사 광원의 세기 변화에 따라 측정값이 달라진다. 또한 본 연구에서 사용한 잔류농약 검출용 바이오 센서의 경우 스트립 형태의 고체이므로, 투과 세기를 측정 할 수 없으며, 반사에 의한 측정을 통하여 발색 정도를 측정하게 된다. 이러한 반사에 의한 측정의 경우, 바이오 센서의 화학적 처리과정에서 발생하는 수막 등의 현상에 따라 반사율이 바뀌게 되어 그 값이 달라져 정확한 정보를 얻기가 어렵다.

본 연구는 스트립 형태의 잔류 농약 검출용 바이오 센서의 발색 정도를 측정할 수 있는 분광방법에 관한 연구이며, CCD 및 회절격자 대신 컬러 센서를 이용하고, 조사 광원으로 백색광원을 이용하는 분광 방법이다. 이 방법은 저렴하며, 공간적 제약이 작은 시스템을 구축할 수 있으며, 컬러 센서의 각 영역으로부터 얻어진 빛의 세기 비율을 계산하여 발색 정도를 수치화하여, 조사 광원의 세기가 변하는 경우 발생하는 오차를 최소화 할 수 있으며, 측정체의 표면상태에 따른 반사율 차이에 의한 빛의 세기 변화 역시 최소화 할 수 있다. 또한 원하는 파장 영역의 변화율을 극대화하여, 바이오 센서 측정기의 민감도를 향상시키고자 할 때, 컬러 센서의 각각의 영역에 다른 증폭률을 적용하거나, 연산을 통하여 가능하다.

[†]E-mail: yyhyoung@cheju.ac.kr

II. 이론적 배경

그림 1은 조사 광원을 피사체에 조사하고, 반사되어 나오는 빛을 검출하는 과정이다. 임의의 면에 조사되는 빛의 파장에 따른 빛의 세기 분포를 $S(\lambda)$, 반사된 빛의 파장에 따른 빛의 세기 분포를 $E(\lambda)$, 검출기의 파장에 따른 민감도를 $\delta(\lambda)$ 라 하면, 검출기에서 검출되는 빛의 세기 $I(\lambda)$ 는 식 (1)과 같다.

$$I(\lambda) = \int \delta(\lambda)E(\lambda)d\lambda \quad (1)$$

$S(\lambda)$ 와 $E(\lambda)$ 사이에는 표면을 구성하는 물질과 그 구조에 의존하는 비례관계가 성립되며, 이러한 관계는 표면에서의 분광 알베도(Spectral albedo) $\rho(\lambda)$ 를 적용하여,

$$E(\lambda) = \rho(\lambda)S(\lambda) \quad (2)$$

로 표현 할 수 있다. 즉 검출된 빛 세기 $I(\lambda)$ 는

$$I(\lambda) = \int \delta(\lambda)\rho(\lambda)S(\lambda)d\lambda \quad (3)$$

가 되고, 일반적인 경우 백색광원이 조사되고 있을때, 물체 표면의 색은 분광 알베도에 의해서 주어지게 된다.^[6-8]

만약 검출기가 적색, 녹색 그리고 청색의 3가지 영역의 빛의 세기를 독립적으로 측정 할 수 있고, 그 영역별 빛의 세기를 I_r , I_g 그리고 I_b 라 하면,

$$\begin{aligned} I_r(\lambda) &= \int \delta_r(\lambda)\rho(\lambda)S(\lambda)d\lambda \\ I_g(\lambda) &= \int \delta_g(\lambda)\rho(\lambda)S(\lambda)d\lambda \\ I_b(\lambda) &= \int \delta_b(\lambda)\rho(\lambda)S(\lambda)d\lambda \end{aligned} \quad (4)$$

가 된다. 조사 광원이 항상 일정하여 S_0 라 하면, 검출되는 빛의 세기 변화는 $\delta(\lambda)\rho(\lambda)$ 에 의하여 결정된다. 즉 각 영역별 빛의 세기는

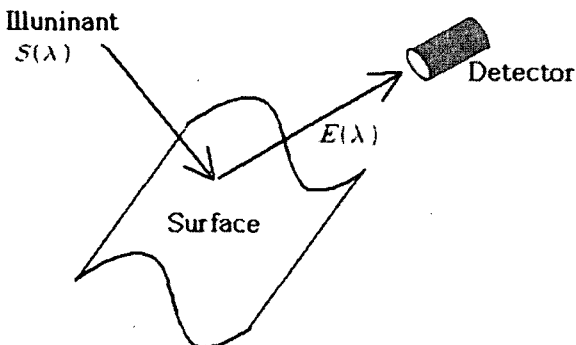


그림 1. 파장에 따른 빛의 검출.

$$\begin{aligned} I_r(\lambda) &= S_0 \gamma_r(\lambda) \\ I_g(\lambda) &= S_0 \gamma_g(\lambda) \\ I_b(\lambda) &= S_0 \gamma_b(\lambda) \end{aligned} \quad (5)$$

로 표현 할 수 있다. 여기서 $\gamma_i(\lambda) = \int \delta_i(\lambda)\rho(\lambda)d\lambda$ 이다. 즉 조사 광원에 대한 컬러 센서의 빛 세기 변화는 측정체의 분광 알베도와 컬러 센서의 영역별 파장에 의해 결정된다. 또한 컬러 센서에서 받아들인 모든 파장에 대한 빛의 세기는 $I_r + I_g + I_b$ 이므로, 모든 파장에 대한 임의의 파장 영역(i)의 빛의 세기 비율 R_i 는

$$R_i = \frac{\gamma_i(\lambda)}{\gamma_r(\lambda) + \gamma_g(\lambda) + \gamma_b(\lambda)} \quad (6)$$

이다. 측정 체 표면의 $i(i=r, g, b)$ 파장에 대한 비율은 조사 광원의 세기 S_0 에 대해서 무관하다.^[9] 즉 조사 광원이 열 및 수명, 잡음 등의 문제로 빛의 세기가 변하더라도, R_b 는 변하지 않는다. 또한 특별한 파장 영역에 대한 비율의 민감도를 높이고자 하는 경우, 증폭률을 다른 영역에 비해 높여 주거나, 연산을 통하여 가능하다. 예를 들어 청색 파장 영역에 증폭률을 다른 파장의 2배로 한 경우

$$R_{2b} = \frac{2I_b}{I_r + I_g + 2I_b} \quad (7)$$

와 같다. 그림 2는 청색 파장 영역의 빛의 세기 변화에 따른 청색 영역의 빛의 세기 비율을 나타낸 그래프로 청색 파장 영역의 빛의 세기에 아무런 연산을 하지 않은 경우와 2를 곱해준 경우이다. 그림 2에서 알 수 있듯이 청색 파장 영역에 2배를 해준 경우가 그렇지 않은 경우에 비하여 청색 파장 영역의 빛의 세기 변화에 대하여 민감도가 증가 하는 것을 알 수 있다.

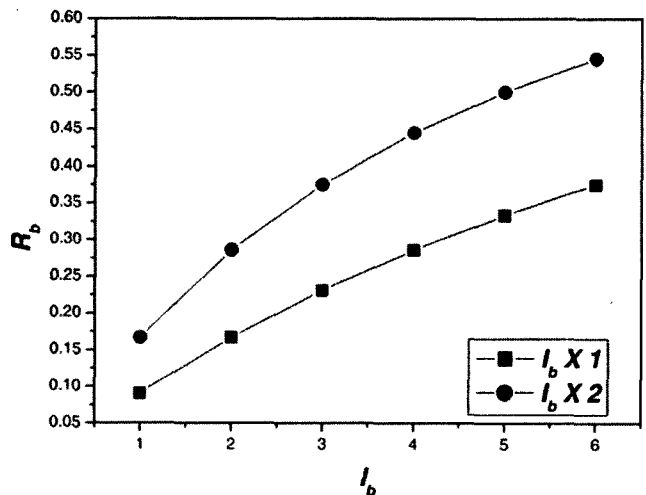


그림 2. 청색 파장 영역의 증폭률 변화에 따른 비율.

—■— : 청색 파장 영역의 증폭률이 다른 영역과 같은 경우
—●— : 청색 파장 영역의 증폭률이 다른 영역 2배 인 경우

또한 입사광의 밝기가 변하거나, 바이오 센서의 화학적 처리과정에서 사용되는 시약에 의하여 측정 표면은 수막과 같은 투과막을 형성하는 경우가 대부분이며, 이는 주변 환경에 따라 매우 불규칙하다. 이런 경우 특정 파장의 빛의 세기를 측정하는 기존의 단파장 분광법으로는 시료의 발색 정도를 판별해내는 것은 매우 어렵다. 그러나 빛의 세기 변화는 $\delta(\lambda)\rho(\lambda)$ 에 의하여 결정된다. 여기서 $\delta(\lambda)$ 는 칼라 센서에 의해 결정되는 고유한 값으로 변하지 않고, 분광 알베도 $\rho(\lambda)$ 에 만 영향을 미친다. 만약 형성된 투과막이 매우 투명하여 빛의 세기가 모든 파장 영역에서 비례적으로 작용 할 때 빛 세기 비율 R 에는 큰 영향을 주지 않는다. 만약 색을 갖는 투과막이 형성된 경우 이에 따른 특정 영역 색의 변화를 τ 라 하고, 영향을 미치는 영역이 녹색 영역이라고 하면,

$$R_b = \frac{I_b}{I_r + I_g(1 + \tau) + I_b} \quad (8)$$

가 된다. 실제 본 연구에서 사용된 바이오 센서는 사용되는 전처리 용액의 경우 거의 투명하여, $\tau \approx 0$ 라 할 수 있다. 즉 $I_r + I_g(1 + \tau) + I_b \approx I_r + I_g + I_b$ 가 되고, 즉

$$\frac{I_b}{I_r + I_g(1 + \tau) + I_b} \approx \frac{I_b}{I_r + I_g + I_b} = R_b \quad (9)$$

가 되어, 투과막의 영향을 감소시킬 수 있으며, 다른 파장 영역에도 적용 될 수 있다.

이와 같은 컬러 센서를 통하여 각각의 파장 영역에 대한 빛의 세기를 측정하고, 비율을 통한 연산을 수행하여 줌으로서, 조사 광원의 세기 변화와 수막 등의 투과막 형성에 따른 오차를 감소시킬 수 있다.

III. 실험결과

본 연구를 위한 실험장치는 그림 3과 같다. 조사 광원(Incident Light)으로는 고휘도 백색 LED(Light Emitting Diode)를 사용하였다. 그림 4는 파장영역이 320~1050 nm이고, 분해능이

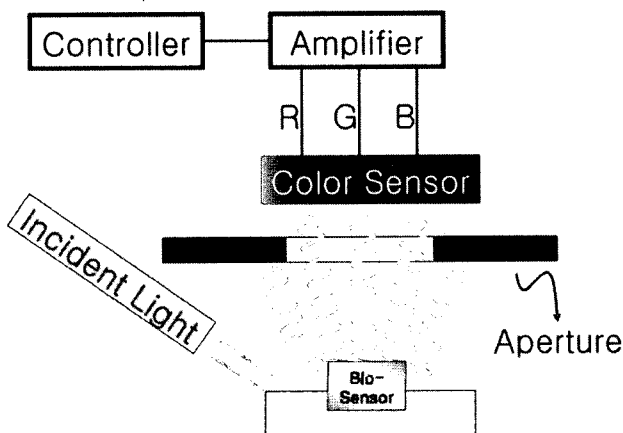


그림 3. 실험장치 계략도

0.7 nm인 분광기(SM-240, Korea Spectral Products)를 사용하여 조사 광원을 측정된 결과이다. 조리개(Aperture)를 사용하여 입사광량을 조절할 뿐 아니라, 그림 3에서와 같이 바이오 센서 이외의 영역에서 반사되는 빛을 차폐하였다. 컬러 센서(Color Sensor)는 Hamamatsu 사의 S7505-01를 사용하였고,^[10] 컬러 센서의 분광 민감도는 그림 5와 같다. 컬러 센서의 증폭기(Amplifier)는 적색(R), 녹색(G), 청색(B)을 개별적으로 증폭할 수 있도록 구성하였다.

또한 시료는 농약의 농도에 따라 발색 정도가 달라지는 잔류 농약 검출용 바이오 센서를 사용하였다. 바이오 센서에 농약의 농도를 각각 6.25%, 12.5%, 25% 그리고 50%로 반응시킨 후 발색시켰으며, 분광기(SM-240)로 측정 하였다. 측정된 결과는 그림 4에서 측정된 조사 광원의 빛 세기로 규격화하여 그림 6에 나타내었다. 그림 6에서 알 수 있듯이 농약의 농도에 따라 빛의 세기 변화가 가장 큰 파장 영역은 450 nm 부근으로 컬러 센서의 청색 영역에 해당한다. 즉 본 연구에서 사용한 잔류 농약 검출용 바이오 센서는 농약의 농도에 따라 청색 영역에서 가장 민감한 반응을 보임으로, 청색 영

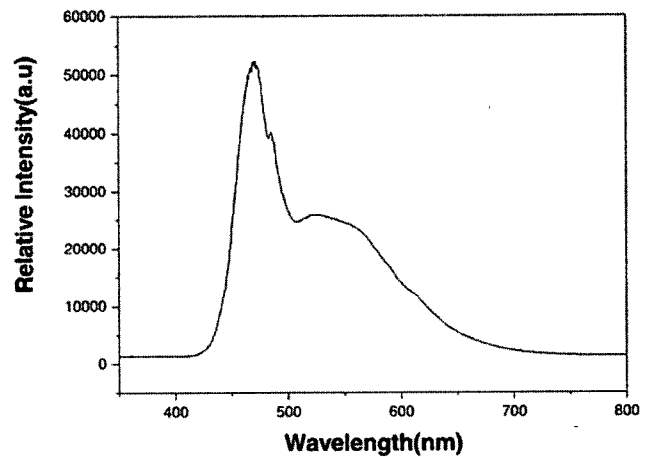


그림 4. 조사 광원의 파장에 따른 빛의 세기 분포

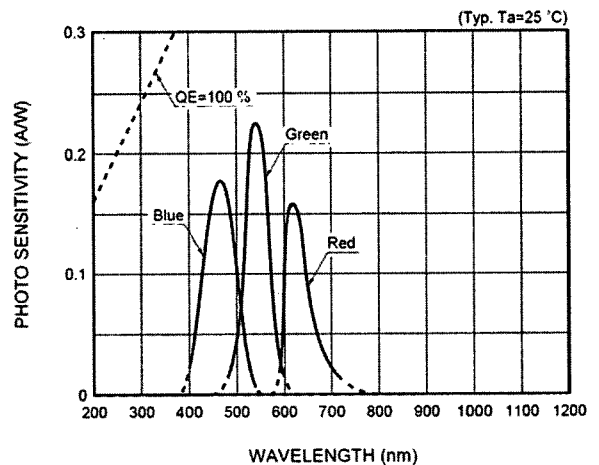


그림 5. 컬러 센서의 분광 민감도

역의 빛 세기 변화 비율 R_b 를 택하였다.

그림 6의 분광기에서 얻어진 결과를 바탕으로, 컬러 센서의 각 영역별 빛의 세기는 그림 5에 따라 I_b 는 400~540 nm 영역, I_r 은 480~600 nm 영역, I_g 는 590~720 nm 영역의 파장에 따른 빛의 세기를 영역별로 합하였다. 이를 이용하여 청색 영역의 빛 세기 변화 비율 ($R_b = \frac{I_b}{I_r + I_g + I_b}$)을 구하였고, 이를 그림 7에 나타내었다. 이 결과로부터 농약의 농도에 따른 R_b 의 값은 비례적으로 감소함을 알 수 있었다. 그림 8은 컬러 센서와 분광기로 측정하여 얻은 결과의 비교이다. 즉 컬러 센서를 통하여 얻은 결과는 분광기를 통하여 얻은 결과와 유사하게 농약 농도에 의존함을 알 수 있다.

그림 9는 조사 광원 세기 변화에 따른 R_b 의 변화이다. 조사 광원의 세기를 각각 90 mW, 75 mW, 60 mW 로 달리 했

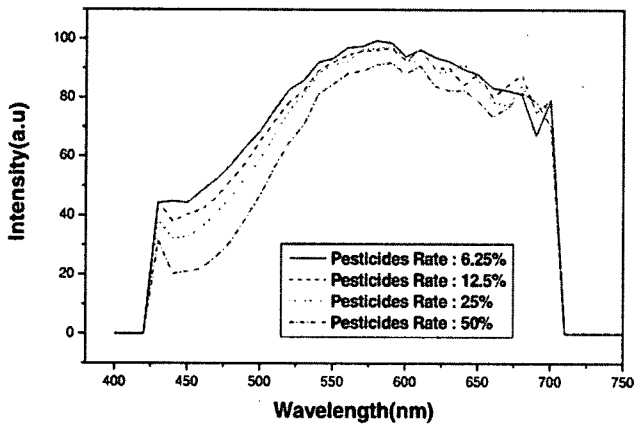


그림 6. 농약의 농도에 따른 분광 측정.

- : 농약의 농도가 6.25% 인 경우
- - - : 농약의 농도가 12.5% 인 경우
- : 농약의 농도가 25% 인 경우
- · - · : 농약의 농도가 50% 인 경우

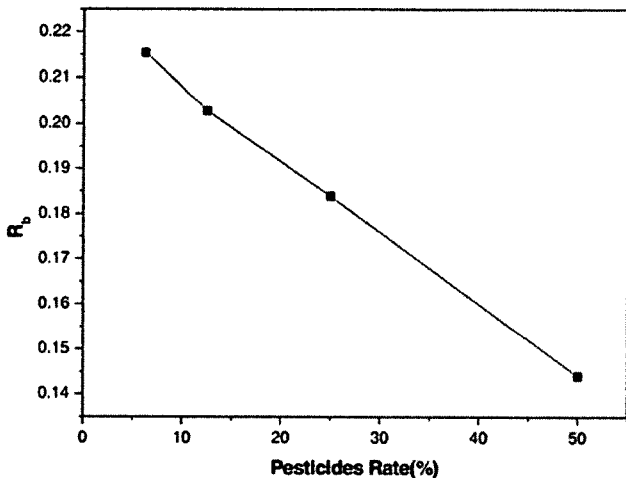


그림 7. 농약의 농도에 따른 청색 빛 세기 비율 R_b .

을 때, 농약의 농도에 따른 I_b 는 조사 광원의 세기에 비례하고, R_b 는 조사 광원의 세기에 큰 영향을 받지 않음을 알 수 있다. 그림 9(a) 와 같이 빛의 세기만을 측정한 경우 조사 광원의 세기에 따라 그 측정 결과가 다르게 나타나게 되므로, 조사 광원의 높은 신뢰성이 유지 되어야 하며, 수명 및 열 발생 등의 문제로 조사 광원의 세기가 변하게 된다면 측정값의 신뢰성을 확보할 수 없다. 그러나 그림 9(b) 와 같은 경우 조사 광원의 세기 변화에 거의 영향을 받지 않으며, 농약 농도의 증가에 따라 R_b 의 값이 1차적으로 감소함을 확인할 수 있다. 즉 빛 세기 비율을 측정값으로 택하는 경우, 조사 광원의 세기 변화에 큰 영향을 받지 않고 정확한 측정 결과를 얻을 수 있었다.

특별한 파장 영역에 대한 비율의 민감도를 높이고자하는 경우, 해당 영역의 증폭률을 다른 영역에 비해 높여줌으로서 가능하다. 그림 10은 I_b 의 증폭률이 I_r 와 I_g 의 증폭률에 비해 2배인 경우와 같은 경우를 나타낸 것으로, 증폭률을 2배로 높인 경우 기울기가 더 크며, 이는 청색 영역의 민감도를 향상시킬 수 있다.

그림 11은 본 연구에서 개발한 잔류 농약 검출용 바이오 센서 측정기이다. 그림 11(a)는 농약의 농도에 따라 발색 정도가 달라지는 잔류 농약 검출용 바이오 센서를 스트립 형태로 제작한 것이다. 그림 11(b)는 바이오 센서용 측정기의 광학 부분으로 백색 광원과 컬러 센서, 조리개를 포함하고 있으며, 그 크기는 35×30×15 mm 로 공간적 제약을 최소화 하였다. 그림 11(c)는 바이오 센서용 측정기의 내부로서, 광학 부분과 제어부분을 포함하고 있다. 제어부분은 컬러 센서의 신호를 $I_r: I_g: I_b = 1:1:2$ 의 비율로 증폭하여 청색 영역의 민감도를 향상 시켰으며, 마이크로컨트롤러를 사용하여 청색 빛 세기 비율 R_b 를 계산하여 잔류 농약의 양을 표시 하여 준다. 그림 11(d)는 바이오 센서 측정기의 외부 사진인

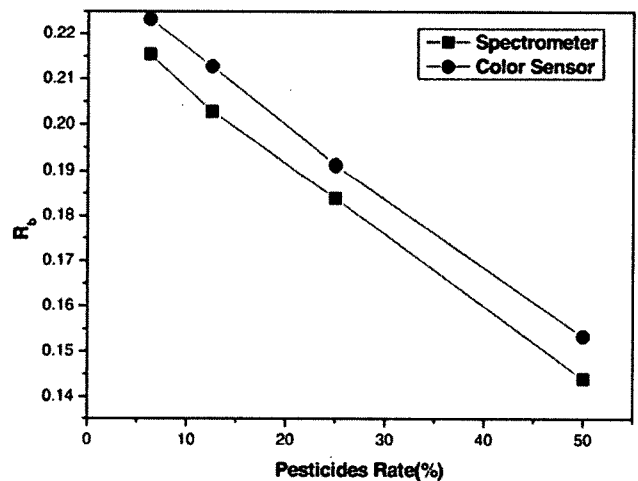


그림 8. 분광기와 컬러 센서의 R_b 비교

- : 분광기로 측정한 청색 빛 세기 비율 R_b
- : 컬러 센서로 측정한 청색 빛 세기 비율 R_b

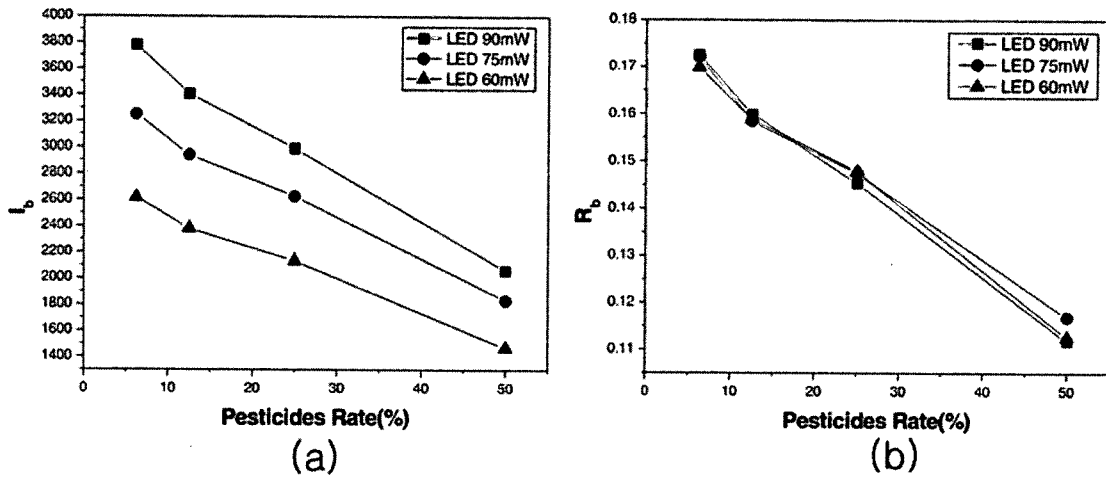


그림 9. 조사 광원 세기에 따른 (a) 청색 빛 세기 I_b , (b) 청색의 비율 R_b .

- : 조사 광원의 세기가 90mW 인 경우
- : 조사 광원의 세기가 75mW 인 경우
- ▲— : 조사 광원의 세기가 60mW 인 경우

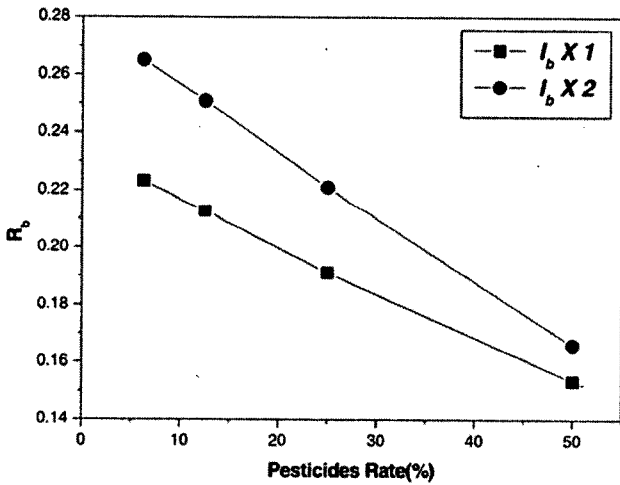


그림 10. 증폭비율에 따른 민감도 향상.

- : 청색 파장 영역의 증폭률이 다른 영역과 같은 경우
- : 청색 파장 영역의 증폭률이 다른 영역 2배 인 경우

로, 제어를 위한 스위치와 정보를 표시해주는 화면, 프린터를 포함하고 있다.

그림 12는 깃잎에 카보후란(cabofuran)성분의 농약을 첨가하여 만든 시료를 상용되고 있는 액체 형태의 잔류 농약 간이 분석기와 본 연구에서 개발한 스트립 형태의 잔류 농약 검출용 바이오 센서 측정기를 비교하여 카보후란 농도에 따른 저해율을 비교한 그래프이다. 여기서 사용된 액체 형태의 잔류 농약 간이 분석기는 중심파장이 450 nm, 파장폭이 6 nm의 밴드패스필터(Band Pass Filter)를 사용하여, 빛이 투과된 세기를 측정하는 방식이다. 그림 12에서 알 수 있듯이 현재 상용되어지고 있는 잔류 농약 간이 분석기와 본 연구에서

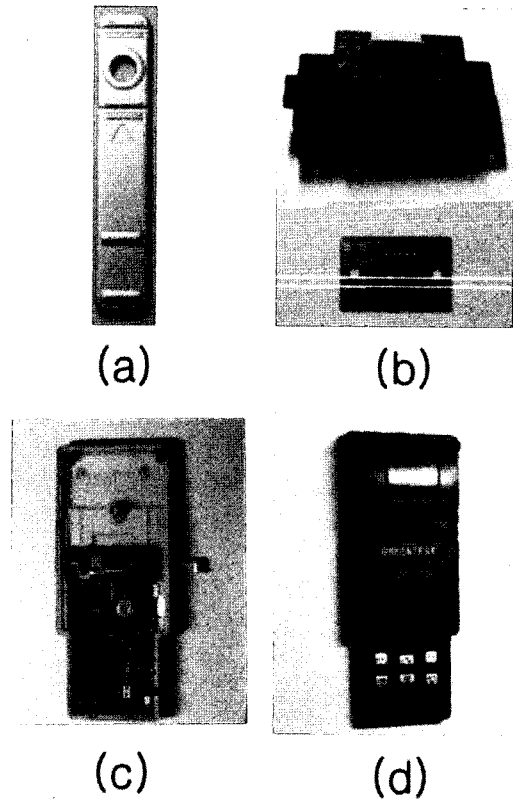


그림 11. 바이어 센서용 측정기.

- (a) 스트립 형태로 개발된 잔류 농약 검출용 바이오 센서
- (b) 검출기의 광학 부분과 컬러 센서
- (c) 검출기의 내부, 광학부분과 제어부 회로
- (d) 잔류 농약 검출용 바이오 센서 측정기

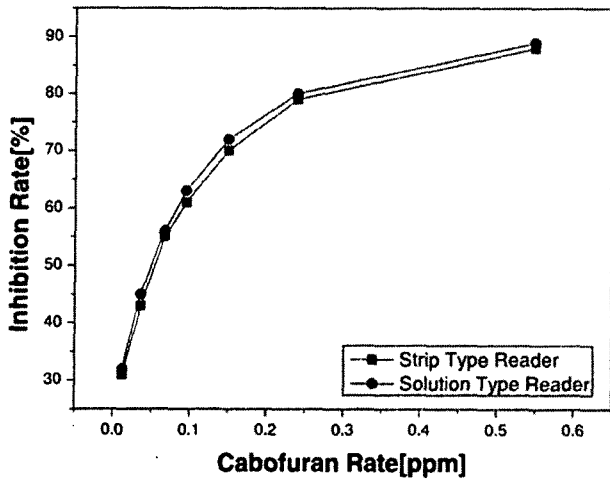


그림 12. 카보후란 농도에 따른 저해율.

- : 본 연구에서 개발한 스트립 형태의 잔류농약 검출용 측정기의 카보후란 농도에 따른 저해율
- : 현재 상용되어 지는 액체 형태의 잔류농약 검출용 측정기의 카보후란 농도에 따른 저해율

개발한 스트립 형태의 잔류 농약 검출용 바이오 센서 측정기의 측정치가 거의 일치함을 알 수 있다.

IV. 결 론

발색되어진 바이오 센서를 백색 광원과 컬러 센서를 이용하여 발색 정도를 측정하였다. 발색 정도를 측정하기 위하여 컬러 센서의 적색, 녹색 및 청색 영역에서 얻어지는 빛의 세기를 비율로 나타내었다. 빛의 세기 비율을 사용하여 바이오 센서의 발색 정도를 측정함으로써, 회절격자를 이용한 분광기와 같은 분광정보를 얻을 수가 있었고, 조사 광의 세기가 변하는 경우에도 안정적인 분광 정보를 얻을 수가 있었다. 그리고 바이오 센서의 발색 등의 과정에서 생기는 수막 등의 영향에 의한 오차를 최소화 할 수 있을 것으로 기대된다. 바이오 센서의 발색 변화율이 작은 경우 증폭률을 조정하여 주

는 것만으로 민감도를 향상시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 백색 광원과 컬러 센서를 이용한 바이오 센서용 측정기를 개발하였다.

참고문헌

- [1] A.N. Reshetilov, "Biosensors 2004 : The Eighth World Congress on Biosensors," *Appl. Biochem. Microbiology*, vol. 41(2), pp. 219-223, 2005.
- [2] Rebecca L. Rich and David G. Myszka, "Survey of the year 2003 commercial optical biosensor literature," *J. Mol. Recognit.*, vol. 18, pp. 1-39, 2005.
- [3] M. M. Spence, S. M. Rubin, I. E. Dimitrov, E. Janette Ruiz, D. E. Wemmer, A. Pines, S. Q. Yaoi, F. Tiani, and P. G. Schultzi, "Functionalized xenon as a biosensor," *PNAS*, vol. 98(19), pp 10654-10657.
- [4] 현해남, 강동일, 조문제, "아세틸콜린에스터라제를 이용한 농산물의 잔류농약 진단방법," 특허 제0441056호, 2004.
- [5] C. A. Savran, T. P. Burg, J. Fritz, and S. R. Manalis, "Micro-fabricated mechanical biosensor with inherently differential readout," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 83(8), 1659 -1661, 2003.
- [6] S. K. Nayar, K. Ikeuchi, T. Kanade, "Surface reflection : Physical and geometrical perspectives," *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. 13(7), pp. 611-634, 1991.
- [7] S. K. Nayar, X. S. Fang and T. Boulton, "Separation of Reflection Components Using Color and Polarization," *Internat. Comp. Vis.*, vol. 21(3), pp. 163-186, 1997.
- [8] D. Scribner, P. Warren, J. Schuler, "Extending color vision methods to bands beyond the visible," *Mach. Vis. Applicat.* vol. 11, 306-312, 2000.
- [9] Robby T. Tan Katsushi Ikeuchi, "Separating Reflection Components of Textured Surfaces using a Single Image," *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. 27(2), 178-193, 2005.
- [10] Hamamatsu Photonics DataSheet, "Si-Photodiode S6428-01, S6429-01, S6430-01, S7505-01" *Hamamatsu Photonics K. K.*, cat. no. KSPD1013E04, 2003.

Development of a Biosensor Reader System for the Residual Pesticides using White Light Source and Color-Sensor

Hyoung-Jun Cho and Young-Hun Yu[†]

Department of Physics, Basic Research Institute, Cheju National University, Jeju City, 690-756

Hea-Nam Hyun

Bioscience and Industry, Cheju National University, Jeju City, 690-756

[†]*E-mail: yyhyoung@cheju.ac.kr*

(Received May 19, 2005, Revised manuscript August 22, 2005)

We have developed a biosensor reading system using a white light source and a color-sensor. To reduce the environmental effect, we used the ratio of specific color intensity to the entire white light intensity. Also we could improve the responsibility of the system by controlling the amplification of the color sensor output.

OCIS Codes : 120.4640, 330.1710, 040.1880.