

## 생물 광자의 이차원 영상을 위한 렌즈계 최적화와 장치 구성

이승호

경희대학교, 한의대 경혈학교실  
Ⓣ 130-701 서울특별시 동대문구 회기동 1 번지

심성보 · 김재순<sup>†</sup>

서울대학교 자연과학대학 물리학부 광학 연구실  
Ⓣ 151-747 서울특별시 관악구 신림동 산 56-1 번지

양준모 · 이창훈 · 소광섭

서울대학교 자연과학대학 물리학부 한의학 물리 연구실  
Ⓣ 151-747 서울특별시 관악구 신림동 산 56-1 번지

(2004년 8월 24일 받음, 2004년 10월 26일 수정본 받음)

초 미약 생물광자의 이차원적 영상을 얻기 위해 고속 초고감도 CCD 사진기를 검출기로 사용한 실험 장치를 고안하였다. 본 장치에는 식물의 잎으로부터 방출하는 지연광 (delayed luminescence)를 발생시키기 위한 조명 장치를 설치하였으며, 조명 장치와 검출기에 있는 셔터들은 서로 연동되어 동작하도록 이루어졌다. CCD 사진기에 사용된 렌즈계는, 상용렌즈들로만 구성되었는데, 시료에서 나오는 생물광자의 집광 효율 (collection efficiency)을 높이도록 최적화된 렌즈 설계에서 나온 결과를 기초로 하였다. 이 장치들을 다용도 암 상자에 장착하여 사철나무 잎에서 나오는 지연광의 영상을 성공적으로 얻었다.

주제어 : biophoton, CCD camera, delayed luminescence, lens system, optimization.

### I. 서 론

생물체에서 나오는 초미약 광자인 생물광자가 1930년대 러시아의 A. Gurvich<sup>[1]</sup>에 의해서 처음 보고 되었다. 유사 분열 중인 양파의 뿌리에서 나오는 자외선이 다른 양파의 유사분열을 촉진함을 실험적으로 밝혀낸 그는 이 현상을 유사분열 방사(mitogenetic radiation)이라고 불렀다. 이 실험 결과가 공표된 후 많은 반론이 이어졌으며, 실험상의 난점에 의해 1970년대까지 유사 분열 방사 존재 자체에 대한 회의론이 지배하였다. 그러나 단광자까지 검출 가능한 광전자 증배관(PMT)이 도입되면서 이에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 지금까지의 연구에 의하면 생물광자는 200~800 nm의 넓은 파장대에 있으며, 그 세기는 550 nm를 기준으로 할 경우  $10^{-16} \sim 10^{-14} \text{ W/cm}^2$  정도 된다고 알려져 있다. 이 생물 광자의 기원에 대해서는 현재까지 두 가지 가설 즉, DNA의 변형 과정에서 발생한다는 설과<sup>[2]</sup> 활성산소(ROS)에 의한다는 설이<sup>[3]</sup> 제시되고 있다. DNA 관련설은 70년대 중반부터 독일의 F. A. Popp 등에 의해서 주창되었다. 그는 생물 광자는 결맞음 상태(coherent state)에 있는 생물체에서 나오는 빛이며 이 빛들은 따라서 서로 결맞다(coherent)라고 가정했다. 생물체 내

DNA를 이루는 염기들이 외부 요인에 따라 변형되어 excimer 구조를 이루며 이 것들이 바닥상태로 떨어지면서 여분의 에너지를 생물광자의 형태로 방출하게 된다. 그의 가설에 따르면, 생물광자는 자발광(spontaneous emission)과 지연광(delayed luminescence)으로 나누어 진다. 그는, 레이저 물리에서 사용되는 용어와는 달리, 생물체가 외부적 요인 없이 내는 빛을 자발광이라고 불렀다. 이 빛은 모든 생물체에서 나오며 생물체에 따라 고유한 성질이 있으며, 그 세기가 매우 낮다. 지연광은 외부 광원의 자극에 의해 생물체가 들뜬 상태로 올라갔다가 다시 바닥 상태로 전이하면서 방출하는 것으로 자발광에 비해 상대적으로 높은 세기를 가졌으며, 생물체에 따라 수 초에서 수 시간까지의 감소 시간(decay time)을 보인다. 결맞은 생물 광자가 가지는 통계적인 특징은 생물광자의 방출이 포아송 분포(Poissonian distribution)를 가지며<sup>[4]</sup>, hyperbolic decay를<sup>[5]</sup> 한다고 알려져 있다. 활성산소에 의해서 발생한다는 가설은 생물광자가 생물체 조직의 불완전성(imperfection)에 기인한다는 설에 기초하여 일본의 H. Inaba에<sup>[3,6]</sup> 의해서 제기되었다. 생체내에 존재하는 생화학적으로 불안정한 HO<sub>2</sub> 같은 자유기(free radical)들이 결합하면서 빛을 방출하게 되는데<sup>[7]</sup> 이 것이 생물광자라는 설이다. 따라서 생화학적 반응에 의해서 방출되는 빛은 Popp의 주장처럼 결맞지 않으며, 포아송 분포를 가질 필요가 없다. 그러나 생물광자에 대한

<sup>†</sup> E-mail: jskim@phy.snu.ac.kr

상반된 설명에도 불구하고 생물광자가 생물이나 생체조직의 상태를 반영할거라는 관점에서 두 가설 모두 일치하고 있다. 생물광자가 미약광이란 특성에 기인하여 이에 대한 연구에 PMT를 광자검출기로 주로 사용하고 있다. PMT는 특성상 생물에서 나오는 생물 광자의 총량을 측정하는데 사용되므로 생물 광자의 2 차원 분포를 얻기에는 부적합하다. PMT를 이용한 소수의 생물 광자의 이차원 영상 구현 시도는 공초점 현미경에 적용되는 방식으로 진행되었다. 그러나 생물 광자 신호가 미약하며, 그 신호가 광섬유를 포함한 여러 광학 장치를 거쳐 검출기에 도달하는 동안 손실이 많아 의미있는 영상을 구현하기 힘들었다. 따라서 대개의 경우 PMT의 gate time을 조정하여 지연광을 측정 한 후 그 감쇄 경향을 분석하여 생물 광자의 특성을 연구한다. 현재까지 살아 있는 세포들, 조직, 인간을 대상으로 한 많은 생물 광자 실험들이 행해졌는데, 이 연구에 의하면 암 조직들은 정상 조직에 비해서 상대적으로 많은 생물 광자를<sup>[8,9]</sup> 방출하는 경향을 보인다. 식물의 잎을 대상으로 한 실험에서는 상처부위에서 더 많은 생물광자를 방출됨이 확인되었다.<sup>[10]</sup>

본 연구는 생물광자의 이차원 영상을 구현하기 위한 고감도 고속 CCD 사진기를 검출기로 사용한 이차원 영상 장치의 개발과 그 응용에 관한 것이다. 생물광자의 이미지를 얻는 것에 있어서 일반 필름 카메라, CCD 카메라, 디지털 카메라 등의 렌즈계로는 요구하는 만큼의 영상을 취득하는데 NA, field of view, Spectrum, Resolution 등의 문제가 있다. 그렇기 때문에 요구사항에 맞는 성능을 내기 위해서는 새로운 광학계를 설계·제작 해야 하는데, 대량 생산이 아닌 한 개의 시스템을 제작하기 위해서 새로운 렌즈를 만들기에는 경제적인 측면을 비롯한 문제들이 있다. 그래서 본 장치를 제작함에 있어서 기존에 시판되고 있는 상용렌즈들의 조합만으로 요구하는 최소 성능 이상을 낼 수 있도록 광학계를 설계·제작하였다. 광학계 설계는 상용 프로그램<sup>[11]</sup>을 이용해 최적화 조건을 도출해 내었으며, 조건에 따라 제작한 렌즈계의 성능 평가를 위해 사철 나뭇잎을 촬영해 렌즈 성능이 만족할 수준임을 실험적으로 검증하여 생물광자 측정장치로서의 가능성을 확인하였다.

## II. 생물광자 이차원 영상 장치

초 미약 광자인 생물광자의 영상을 얻기 위해선 검출기인 CCD 뿐만 아니라 실험에 사용되는 여러 가지 장치에 대한 세심한 주의가 요구된다. 본 실험을 위해서 낮은 세기의 생물광자를 효율적으로 검출하기 위해 고, 집광 효율을 높이기 위해 렌즈를 자체적으로 설계하였다. 조명계에서 자체적으로 방출되는 지연광이 검출기에 입사되지 않도록 조명 장치를 설계 제작하였다. 이것들을 anodized Al으로 제작된 다용도 암상자에 설치하여 지연광 영상 장치를 구현하였다. 그림 1은 생물광자 이차원 영상 장치의 개략도이다.

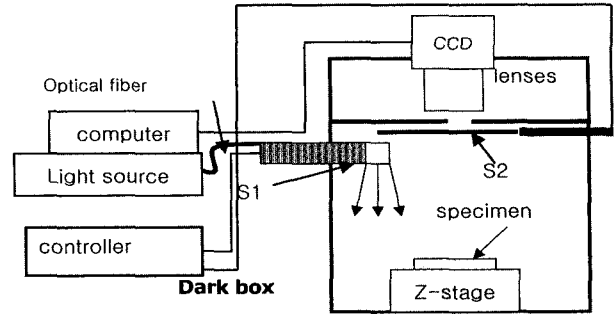


그림 1. 생물광자 이차원 영상 장치의 개략도

### a) CCD camera

생물광자 영상 장치에 사용된 CCD 사진기는 EMCCD(electron multiplication CCD, iXon DV887A, Andor, UK)로 E2V Technology사의 L3Vision FT CCD chip을 사용한다. Pixel size는 16 um × 16 um으로 총 512 × 512 pixel로 구성되어 유효 검출기 면적은 8.2 x 8.2 mm<sup>2</sup> 이다. 이 사진기의 스펙트럼 영역은 250~800 nm로 최대양자 효율이 650 nm에서 45%이다. 자외선 영역의 효율을 높이기 위해 UV 코팅이 되어 있으며 이 영역의 양자 효율은 대략 13% 정도이다. 열전쌍과 냉각수를 순환시킴으로써 최저 -80도까지 CCD 소자를 냉각시킬 수 있으며 이 온도에서 한 pixel에서 시간당 4.1 개 정도의 암 전자가 발생한다. 암 전자는 6-7°C의 온도 상승에 따라 대략 두 배로 증가한다고 알려져 있으며, 신호대 잡음비(S/R)에 주요한 요인이므로 일정한 온도 유지가 요구된다. 또 다른 신호대 잡음비에 많은 영향을 미치는 Read out noise는 5 MHz의 clock rate 경우 13 e<sup>-</sup> 이다. 그러나 electron multiplication 기능을 사용하면 유효 read out noise (effective read out noise)를 1 e<sup>-</sup> 이하로 만들 수 있다. 따라서 -80°C 정도에선 암전자가 주로 신호대 잡음비를 결정한다. 복수의 단일 pixel들을 합하여 하나의 큰 pixel처럼 동작하게 하는 binning 기능을 가지고 있어서 초미약 광자의 검출에 유용하게 사용된다.

### b) Light source and shutters

시료에 빛을 조사하는 장치는 광원, 광섬유, 렌즈와 구동 장치로 구성되었다. 메탈 할라이드(metal halide) 램프를 사용한 조명 장치 (KLS-150W-NC, ZenoSys, Korea)에서 나오는 빛이 광섬유( A2873, 1-0403009, Hamamatsu, Japan)을 통해 암 상자 내에 있는 시료에 입사된다. 균일한 조명을 위해서 광섬유 앞에 자체 설계한 렌즈계를 부착하였으며, 사진기 렌즈 초점거리에서 조명 영역은 직경 15 cm 정도이므로 나뭇잎이나 사람의 손을 측정하기에 적합하다. 광섬유를 포함한 조명부가 암 상자 내로 이동하여 시료에 빛을 조사하며, 조사가 끝난 후에 암 상자 바깥으로 이동하게 된다. 이 때 이동시간은 100 ms 미만이며, 조명부가 완전히 암상자 바깥으로 나간 후에 사진기 렌즈 앞에 부착된 기계적 셔터 (S1)가 열리게 되어, 사진기 렌즈가 외부 광원에 노출되는 것을 막

았다. 불필요한 잔광을 방지하는 이 개념은 초미약 광자를 대상으로 하는 실험에선 아주 중요하다. blade 서터는 빛을 완전히 차단시킬 수 없기 때문에 anodized Al plate를 이용한 기계적 서터(S1)를 사용하였으며, 이 것의 개폐 시간은 대략 100 ms 정도이다. S2가 완전히 열리게 되면 TTL signal을 CCD 사진기에 보내 external trigger을 할 수 있게 전체 회로를 구성하였다. TTL signal을 받은 사진기는 먼저 CCD 사진기 자체에 장착된 서터 (S2)를 열어 생물광자를 받아들리게 된다. 이 서터의 개폐시간은 10 ms 이다. 이 서터를 항상 열어 놓아 서터에 의해 발생하는 시간 지연을 줄일 수 있으나 과도한 입사광과 낮은 동작 온도에 의해 발생하는 electron sticking 현상을 줄이기 위해 S1이 열린 후에 S2가 열릴 수 있도록 조정되어 있다.

**c) Lens**

생물광자 스펙트럼 영역에 속하는 자외선을 검출하기 위해 렌즈 재질로 Fused Silica를 사용하였으며. 렌즈계 때문에 발생하는 입사광 손실을 줄이기 위해 여러 요구 조건을 설정하였다. 이 조건을 바탕으로 상용 프로그램을 이용하여 최적 렌즈계를 설계한 후 그 결과를 상용렌즈 사양과 비교하여 묘사 조건을 재조정함으로써, 상용렌즈를 사용한 최적의 렌즈계를 설계하였다. CVI catalogue에 있는 상용 렌즈를 사용해서 구성한 렌즈계의 성능은 기대 이상으로 좋아 새로운 렌즈를 만들어 시스템을 구성할 필요가 없을 만큼 충분히 요구 사항을 만족해내었다. 다음은 렌즈 설계시 고려 사항과 묘사 결과이다.

① 시스템 요구 사항

초미약 광자의 이차원 영상을 얻기 위한 중요한 요소중의 하나는 CCD chip의 특성과 조화되는 집광 효율이 높은 렌즈계를 확보하는 것이다. 일반 필름 카메라, CCD 카메라, 디지털 카메라 등과 같은 상용 렌즈계 중에는 이런 요구 조건을 만족하는 것이 없어 본 실험 장에 필요한 렌즈계를 직접 설계 · 제작 하였다. 이 때 사용된 렌즈계 요구 사항은 표 1과 같다.

위의 요구 사항 외에도 시스템의 특성상 몇 가지 조건을 설정하였다. 첫 번째는 시스템의 대량 생산이 아니라 단 한

개를 만들기 때문에 제작시 기술적, 비용적 측면을 고려하여 구입 가능한 상용 렌즈를 사용하는 범위 내에서 최대의 성능을 얻을 수 있도록 하였다. 두 번째는 집광 효율을 고려하여 전체 길이(overall length)를 150 mm 이하로 정했다. 마지막으로 초미약 광자인 특성을 고려하여 렌즈에 의한 반사 손실을 최대한 줄이기 위해 사용하는 렌즈의 수를 최소화 하는 것이다.

② 묘사 결과

앞에서 언급한 조건들을 바탕으로 상용 프로그램을 사용해 최적화를 시행하였다. 렌즈의 수를 최대한 줄이기 위해서 단일 렌즈로 구성되는 렌즈계부터 시작을 하여 렌즈를 추가해가는 방향으로 최적화 과정을 거쳤다. 그러나 단일 렌즈계로 얻은 Modulation transfer function(MTF) curve에 의하면 resolution이 요구되는 성능에 크게 미치지 못하였다.

두 개의 렌즈를 사용한 경우, 최적화 과정을 시행하기에 앞서 가장 좋은 initial value를 찾기 위해 몇 가지 작업을 선행하였다. 먼저 Effective focal length와 F/#를 요구사항에 최대한 가깝게 갖는 렌즈 쌍을 찾기 위해 직접 프로그램을 코딩해 결과를 얻었으며, 그 결과들을 initial value로 하여 최적화 과정을 시행하였다. 이 때 combination lens system의 effective focal length는 1<sup>st</sup>-order theory<sup>[12,13,14]</sup>를 이용하여 계산하였다. 렌즈 쌍 중에서 두 번째 렌즈를 bi-convex로 고정하면 첫 번째 렌즈는 최적화 과정을 통하여 plano convex에서 bi-convex로 바뀔 수 있었다. 광축과 나란한 입사광에 대해선 6 lp/mm에서 40% 정도의 MTF 특성을 보였으나 경사각에 대해선 여전히 단일렌즈와 비슷한 결과를 보여 생물 광자 측정 시스템으로 사용하기엔 성능이 부족했다.

세 개의 렌즈를 사용한 경우에 세 개의 렌즈를 모두 같은 종류(convex-convex-convex 혹은 concave-concave-concave)로 설계한 경우와 두 개의 concave를 사용한 경우는 시스템의 전체 길이와 F/# 조건을 만족시키지 못하게 됨을 쉽게 예상할 수 있었으며, 이론상 Petzval sum이 커져 성능도 나오지 못하게 되므로 일단 initial value를 찾는 과정에서 제외를 하였다. 위와 같은 렌즈 배열 경우를 제외하는 범위 내에서 Effective focal length와 F/#, 그리고 렌즈 간격을 조건으로 하여 새로운 프로그램을 코딩해 최적의 initial value를 얻은 후 최적화 과정을 수행하였다. 먼저 convex-convex-concave로 묘사를 시작하였으나, 예상대로 최적화 과정을 거치면서 convex-concave-convex로 변하였다. 후자의 렌즈계는 Cooke triplet<sup>[13,14]</sup>이라 하여 렌즈 세 장으로 최적의 성능을 낼 수 있는 렌즈계로 이미 잘 알려진 시스템이다. 다시 말해 이번 최적화 과정을 통해 Cooke triplet의 의미를 다시 확인할 수 있었다. 그 결과 layout(그림 2(a))과 MTF성능(그림 2(b))은 다음과 같다.

MTF 특성이 6 lp/mm에서 30% 이상의 성능을 나타내므로 요구하는 성능을 충분히 만족한다고 할 수 있지만, 위의 최적화 설계에서 사용된 각 렌즈와 power가 같은 상용 렌즈를

표 1. 렌즈 설계시 요구 사항

Item	Requirement
Detector(CCD)	12 mm of diameter
Wavelength	300 - 650 nm (center at 500 nm)
Material	Fused Silica (index 1.4623 at 500 nm)
Focal length of the objective lens	15 mm
F/# of the objective lens	< 3
Resolution	6 lp/mm

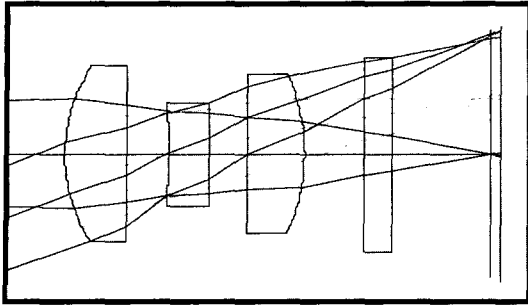


그림 2 (a). Layout of triplet.

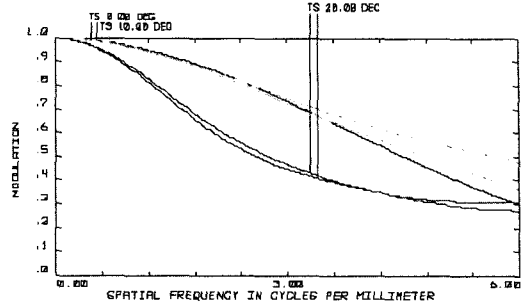


그림 2 (b). MTF curve of triplet.

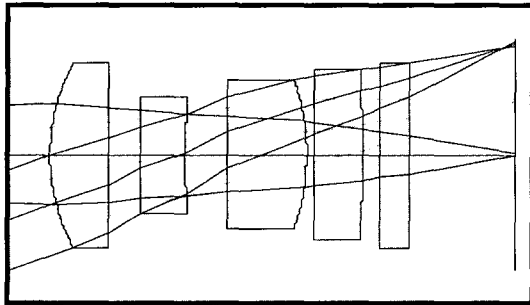


그림 3 (a). Lay out of 4 lenses system.

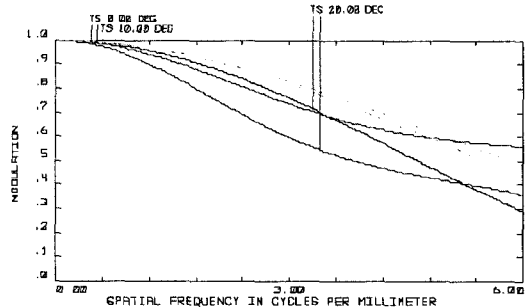


그림 3 (b). MTF curve of 4 lens system.

찾아본 결과 반경이 너무 작아 실제 제작이 불가능했다. 렌즈의 반경을 실제 제작이 가능한 조건을 만족하는 상용 렌즈들을 이용해 다시 최적화해 모사한 결과 MTF특성이 급속이 나빠져 세 장으로 구성된 상용 렌즈 시스템으로는 요구 성능을 만족할 수 없음을 알았다. 결국 렌즈 한 장을 더 추가해 보았다. 아래 그림은 모사상의 최적화된 결과이다.

그림 3(a)에서 세 번째 렌즈에 high negative power lens를 사용했을 때 성능이 좋았지만 조건을 만족하는 상용렌즈가 존재하지 않았고 CVI catalog 상의 최대 negative power lens를 사용해 보았음에도 분해능이 만족스럽지 않았다. 그래서 두 번째 렌즈에 negative power를 가지게 하여 위와 같은 성능을 얻을 수 있었다. 하지만 다른 렌즈들은 모두 상용 렌즈에서 찾을 수 있었지만, 첫 번째 렌즈의 경우 설계상의 power를 가진 상용 렌즈의 반경이 너무 작아 결국 위의 최적화 모델에 가장 가까운 상용 렌즈 모델로 수정을 해야 했다.

이 모사 결과에 가장 근사한 상용렌즈의 사양으로 묘사 변수를 조정하여 최종 결과를 도출하였으며 그 결과는 표 2에 나타나 있다. 표 2(a)는 상용렌즈로 최적화된 System prescription data를 나타냈으며, 렌즈계를 구성하는 렌즈들의 사양은 표 2(b)에 나타내었다.

표처럼 구성된 렌즈계의 묘사 결과는 그림 4(c)에서처럼 생물광자 영상 장치에 사용될 렌즈계의 요구 조건을 충족시켰다.

표 2 (a). System prescription

General	Elements (Surfaces)	4(8)	
	Stop Surface	No 4	
	Field Angle	$\pm 20.4^\circ$	
	Spectrum	300 -650 nm	
	Material	Silica (1.4623)	
Paraxial	Infinite Conjugate	EFL (@ 500 nm)	14.65 mm
		F/#	2.27
	Finite Conjugate	Objective Distance	100 mm
		Magnification	-0.15
		Image Space F/#	2.06
	Image Height	6 mm	

표 2 (b). Surface data for the lens assembly (mm)

Surface	Radius	Thickness	Glass	Diameter
OBJECT	Infinity	100		80.38
1	12.9	4.9	SILICA	
2	Infinity	1.58		8.91
3	-20.9	2	SILICA	7.35
STOP	20.9	1.52		5.81
5	Infinity	3.9	SILICA	7.09
6	-10.3	0.5		9.09
7	19.7	4.9	SILICA	10.40
8	-19.7	10.98		11.09
9	Infinity	-0.3		12.40
IMAGE	Infinity			12.10

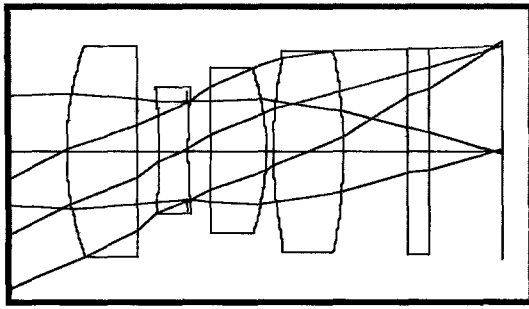


그림 4 (a). layout of final 4-lens system

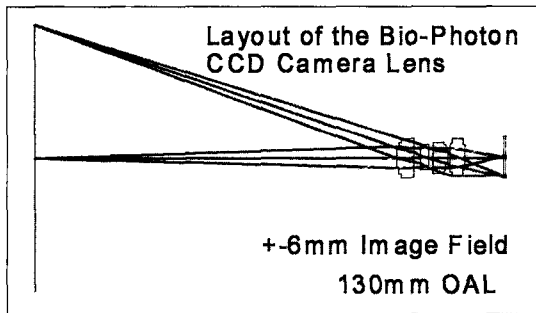


그림 4 (b). Overall length of the layout

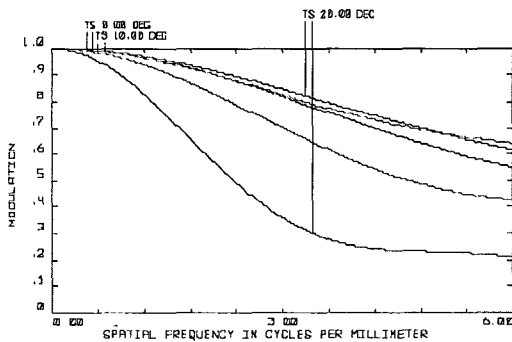


그림 4 (c). MTF curve

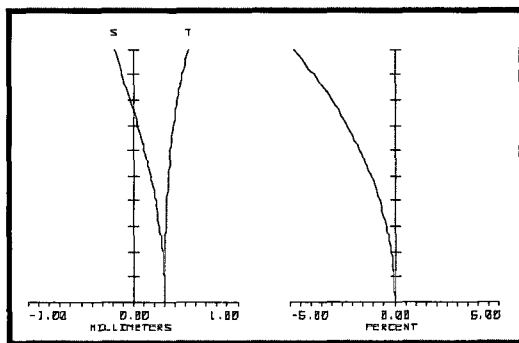


그림 4 (d). Field curve/distortion

**d) Data acquisition**

지연광은 자발광에 비해 상대적으로 높은 세기를 가지나, 감쇄가 진행될수록 그 세기가 지수적으로 줄어들어 자발광 수준으로 떨어지므로 영상을 구현하는데 어려움이 많다. 이

런 이유로 약한 빛을 비춘 상태에서 시료의 영상을 획득하여 지연광 영상과 비교하게 된다. 이런 목적으로 얻어진 영상을 기준 영상(reference image)라고 한다. 본 실험의 경우 암 상자 내부에 LED를 설치하여 기준 영상 촬영시 조명으로 사용했다. 주의할 점은 저온에서 기준 영상을 촬영할 경우 조명의 세기에 따라 과도한 빛이 CCD pixel에 입사되어 electron sticking 현상이 나오는 경우가 있다. 이 현상이 있으면 시료의 영상이 CCD에 잔류하게 되어 실험시 잘못된 결과를 초래한다. 이 경우 다시 CCD의 온도를 올려 pixel에 잔류하는 전하를 제거 시켜 주어야 한다. 따라서 생물광자 측정 실험 전에 미리 기준 영상을 얻은 후 CCD를 냉각시키는 순서를 지켜야 한다. 기준 영상을 확보한 후 암 적용 기간을 가지게 되는데, 시료에 따라 그 기간은 다르다. 적정 온도에 도달하면(-80도), 전체 실험 동안 이 온도를 유지한다. 지연광의 세기와 영상의 분해능을 고려하여 4 × 4 binning을 사용하였다. 전자 증폭은 1000배까지 가능하나, standard deviation을 고려하여 150배로 사용하였다. 실험 조건을 설정한 후, 모든 셔터가 닫힌 상태에서 background를 측정하였으며 모든 실험 결과는 자동으로 background 보정이 되게 프로그램을 설정하였다.

**e) Sample preparation**

엽록소가 많이 들어있는 식물의 잎은 지연광을 많이 방출하므로 지연광 측정 장치의 성능 시험용으로 아주 적합하다. 뿐만 아니라 상대적으로 구하기 쉽고 다루기 쉽다는 장점도 가지고 있다. 본 실험에선 특이한 흠이 없는 사철나무 잎(222.9 ± 27.0 mg, 10.1 ± 0.4 cm<sup>2</sup>) 8개를 시료로 사용하였다. 면도날을 사용하여 잎꼭지 쪽을 잘라 잎을 떼다. 판 잎을 증류수로 세척한 후 암 상자내에 보관되었던 anodized Al 판 위에 배열했다. 잎에서 나오는 지연광은 수시간 지속되므로 태양광에 노출된 잎을 시료로 사용할 경우, 시료 준비를 위한 여러 조건들을 동일하게 유지하는 것이 필요하다.

**III. 장치 특성 실험 결과**

다용도 암상자의 외부 광선 차단 정도를 조사하기 위해 먼저 암실의 조명을 밝게 하기 전후의 백 그라운드를 측정하였으나 변화가 없는 것을 확인했다. 암 상자 내부 벽에는 25 mm 간격으로 M5 탭들이 있어, 여러 가지 광학 도구를 필요시 탈 부착이 용이하도록 하여 다용도로 사용할 수 있게 제작되어 있다.

**a) resolution**

6 lp/mm의 분해능으로 설계된 렌즈계가 형성하는 영상의 질이 생물광자 측정 장치에 적합한지를 실험적으로 검증하기 위해 미약한 빛을 조사한 상태에서 사철 나무 잎의 이차원 영상을 촬영했다. 그림 5는 그 결과를 나타낸다. 그림에서 나뭇잎의 가장자리와 잎맥이 뚜렷이 구별되는 것을 확인할

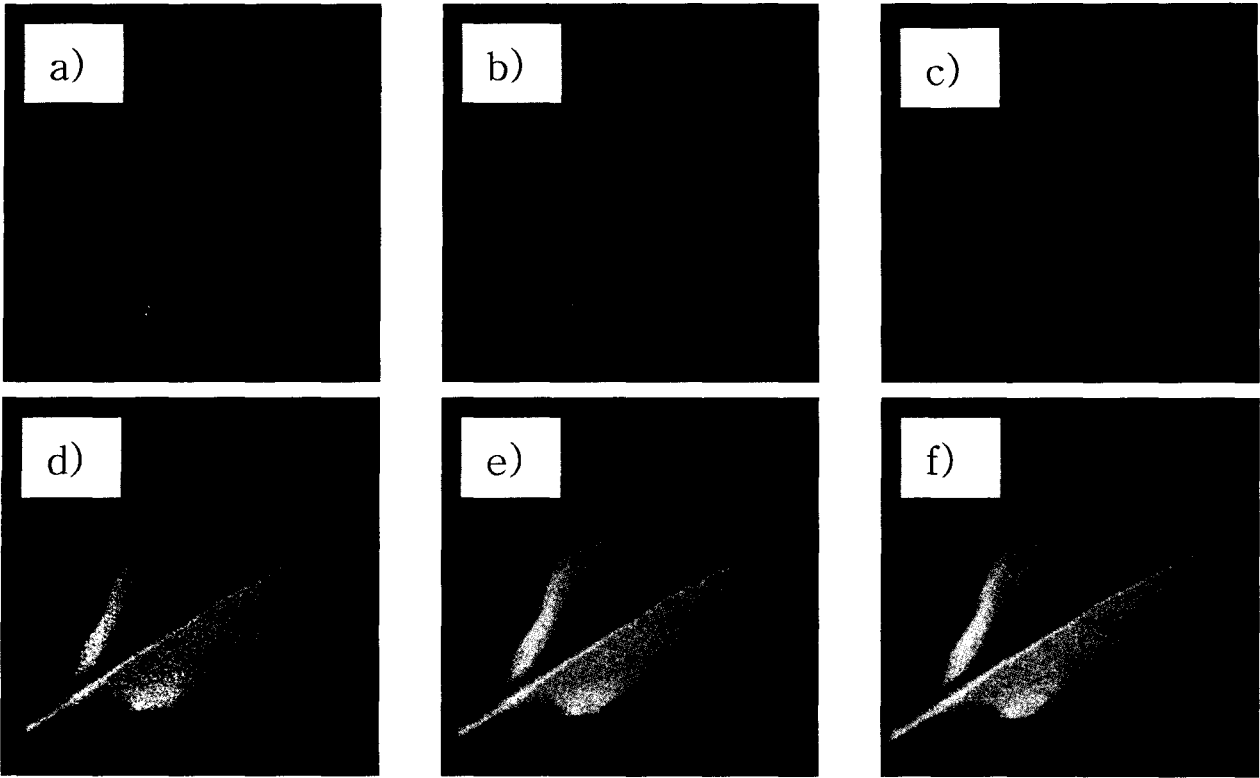


그림 5. (a)~(c)는 조리개를 부분적으로 열어서 얻은 사철나무잎의 영상이고, (d)~(f)는 조리개를 완전히 개방한 상태에서 얻은 영상이다.

수 있다. 본 실험의 목적은 시료의 구조를 분석하는 것이 아니라 초 미약 광자인 생물광자를 측정하는 것이 목적이므로 그림에서 보이는 영상 수준이면 충분하다. 또한 사철나무 잎 전부가 들어가는 field of view를 가지고 있음을 알 수 있다. 추후 실험 대상으로 예정된 동물의 조직이나 장기 조직의 크기를 고려하면 현재의 field of view가 식물 잎과 동물 장기 조직으로부터 나오는 생물광자를 측정하는데 적당하다.

**b) depth of focus**

지연광 실험은 일반적인 현미경 관찰과는 달리 cover glass를 사용하지 않으므로 시료가 3차원적으로 구성되 있다. 예를 들어 본 실험에서 사용된 사철 나무 잎의 표면 굴곡은 대략 3 mm 정도이며, 추후 사용될 암 조직의 경우 5 mm 정도의 굴곡이 있다. 따라서 각 표면에서 나오는 영상을 제대로 측정하기 위해선 렌즈계의 초점 심도가 시료의 굴곡보다 큰 것이 실험상 유리하다. 이를 확인하기 위하여, STAGE에 부착된 마이크로 미터를 이용하여 설계 제작된 렌즈계와 물체 간의 거리를 다양하게 조절하여 영상을 얻은 후 초점 심도를 비교하였다. 입사되는 빛의 양을 고려하여 조리개를 완전히 개방한 경우와 (10 mm)와 일부를 연 경우로 (5 mm)로 나누어서 얻은 결과는 그림 5에 나와 있다.

이 실험 결과에 의하면, 그림 5(a)~(c)처럼 조리개가 일부 개방된 경우, 최적 초점거리  $\pm 2$  mm의 범위내에서 잎의 줄기를 충분히 관측할 수 있다. 따라서 이 조건에서 초점 심도

는 잎의 표면 굴곡차 보다 큼을 알 수 있다. 조리개가 완전히 개방된 경우인 그림 5(d)~(f)에는  $\pm 1$  mm에서 같은 영상을 얻을 수 있었다. 그러나 입사광의 양이 중요시 되는 지연광 측정을 고려하면 전체적으로  $\pm 2$  mm 정도의 초점 심도가 있는 것으로 평가되어, 식물의 잎이나 생체 조직의 지연광 측정에 적합한 렌즈계를 구현했음을 알 수 있다.

**c) 잎의 지연광 영상**

사철나무 잎의 지연광을 측정해 본 결과는 그림 6에 나타나 있다. 잎을 anodized Al petri dish 위에 올려 놓고 메탈 할라이드 램프에서 나온 빛을 3분간 조사한 후 지연광을 시간의 함수로 측정하였는데, 노출 시간은 1초이며 각 노출 간의 간격은 0.042초이다. 그림 6(a)는 기준 영상이며 다른 그림들은 decay시간에 따른 지연광을 보여준다. 그림 6에서처럼 지연광은 급격히 감소하여 자발광 수준으로 떨어지며 그 때 걸리는 시간은 시료마다 다르다. 그림 6(d)는 영상이 거의 보이지 않으나 약간의 이미지 프로세싱을 통하여 선명한 영상을 얻을 수 있다. 본 실험에서, 광원을 제거한지 1분이 지난 후에도 지연광이 분석 가능한 수준으로 관측되었다.

**IV. 결 론**

생물물리화계에서 새롭게 부상하고 있는 생물 광자의 이차원 영상을 얻기 위한 장치 개발하였다. 집광 효율을 높이고

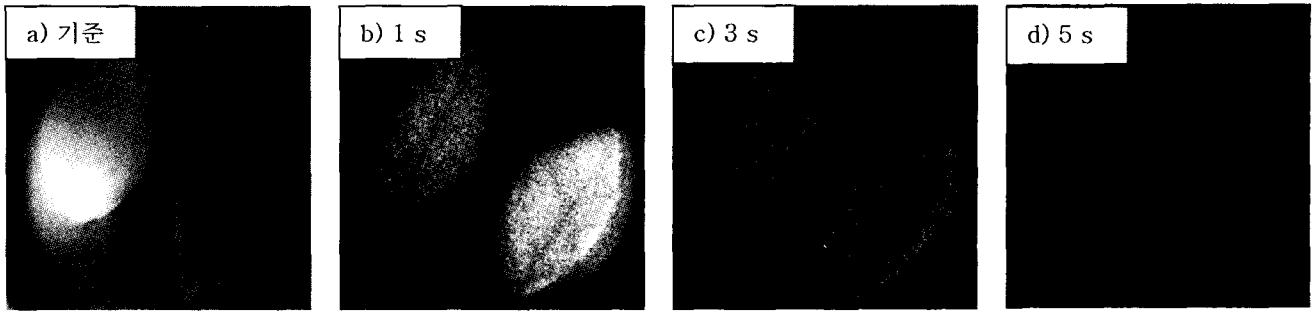


그림 6. 암적응된 사철 나뭇잎에 메탈 할라이드 빛을 3분간 조사한 후 광원을 제거하고 지연광을 시간의 함수로 측정하였다. 노출 시간 1초 측정간의 간격은 0.042초로 연속 6회 촬영하였는데, 60초 후에도 의미있는 영상을 얻을 수 있었다. 녹색 식물의 경우 엽록체가 주 지연광원으로 작용한다고 알려져 있다. 동물 조직의 지연광은 식물에 비해서 빨리 감소하고, 그 세기도 작으므로, 더욱 정밀한 실험을 요한다.

자 상용렌즈로 구성되는 새로운 렌즈계를 설계 제작하여 장착하였으며, 지연광 실험을 위한 새로운 조사계를 구성하였다. 장치의 성능과 유효성을 검증하고자 사철 나뭇잎을 이용하여 일반 영상을 성공적으로 얻었다. 뿐만 생물광자 중의 하나인 지연광 영상을 성공적으로 얻었다. 이렇 바탕으로 체계적인 식물에 대한 연구와 동물 조직 특히 암조직에 대한 연구를 심도 있게 진행할 예정이다. 렌즈계에 관해서는, triplet 외에 Petzval, D-Gauss 등의 다른 형태에 관해서도 최적 상용 조합 모듈 성능을 비교 검토할 계획이다.

### 감사의 글

이 연구는 산업자원부(ITEP, A19-02-03-10005512)에서 일부 지원되었음.

### 참고논문

[1] A. G. Gurvich, "Ueber den Begriff des embryonalen Feldes," *Arch. Entw. Mech. Org.*, vol. 51, pp. 383-415, 1922.  
 [2] F. A. Popp, et. al. "Biophoton emission, new evidence for coherence and DNA as source," *Cell Biophysics*, vol. 6, pp. 33-52, 1984.  
 [3] M. Kobayashi, et. al. "Two-dimensional photon counting imaging and spatiotemporal characterization of ultraweak photon emission from a rat's brain in vivo," *J. of Neuroscience Methods*, vol. 93, pp. 163-168, 1999.  
 [4] F. A. Popp, J. J. Chang, A. Herzog, Z. Yan and Y. Yan, "Evidence of non-classical (squeezed) light in biological systems," vol. 293, no. 1-2, pp. 98-102, 2002.

[5] F.-A. Popp, K. H. Li, W. P. Mei, M. Galle and R. Neurohr, "Physical aspects of biophotons," *Experimentia*, vol. 44, pp. 576-585, 1988.  
 [6] M. Kobayashi, B. Devaraj, M. Usa, Y. Tanno, M. Takeda and H. Inaba, "Two-dimensional imaging of ultraweak photon emission from germinating soybean seedlings with a high sensitive CCD camera," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 65 no. 3, pp. 535-537, 1997.  
 [7] V. Vladimir, "Reactive oxygen species, water, photons, and life," *Rivista di Biologia/Biology Forum.*, vol. 94, no. 2 pp. 237-258. 2001.  
 [8] F. Musumeci, A. Triglia, and F. Grasso, "Experimental evidence on Ultraweak photon emission from normal and tumour human tissues," in *Recent Advances in Biophoton Research* (F. A. Popp et. al ed. World Scientific, Singapore, 1992) pp. 307-326.  
 [9] M. Takeda, Y. Tanno, M. Kobayashi, M. Usa, N. Ohuchi, S. Satomi and H. Inaba, "A novel method of assessing carcinoma cell proliferation by biophoton emission," *Cancer Lett.*, vol. 127, pp. 155-160, 1998.  
 [10] B. Devaraj, M. Usa and H. Inaba, "Biophotons: ultraweak light emission from living systems," *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, vol. 2, pp. 188-193, 1997.  
 [11] ZEMAX, *Optical Design Program, User's Guide*, Ver10, Focus software, Incorporated : July, 2002.  
 [12] Francis A. Jenkins, Harvey E. White, *Fundamentals of Optics*, 4<sup>th</sup> edition, pp.150. 1976  
 [13] Warren J. Smith, *Modern Optical Engineering*, 3<sup>rd</sup> edition, 2001.  
 [14] Rudolf Kingslake, *Lens Design Fundamentals*, 1978.

## **Optimum Lens Organization and System Set-up for 2-Dimensional Imaging of Biophoton**

Seung-Ho Yi

*Dept. of Meridian & Acupuncture, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 130-701, KOREA*

<sup>†</sup>*E-mail: jskim@phya.snu.ac.kr*

Seong-Bo Shim and Jai-Soon Kim<sup>†</sup>

*Optics Lab, School of Physics, Seoul National University, Seoul 151-747, KOREA*

Joon-Mo Yang, Changhoon Lee, and Kwang-Sup Soh

*Biomedical Lab, School of Physics, Seoul National University, Seoul 151-747, KOREA*

(Received August 24, 2004, Revised manuscript October 26, 2004)

We developed a 2-D imaging system to detect ultra weak biophoton by using a high sensitive fast CCD camera. We installed an illumination apparatus to generate delayed luminescence from plant leaves. Shutters at the illumination system and detector were synchronized to each other. The lens system of the CCD camera was newly designed to accommodate the specific requirements to enhance the collection efficiency for biophoton. Based on the lens simulation, commercial lenses were chose for the lens system. All the equipment was installed in a multi-purpose dark box and the delayed luminescence of *Euonymus japonica* was successfully acquired.

OCIS Codes : 110.0110, 110.2970, 120.3620, 120.4570, 120.4640.