보안과제( ), 일반과제(●) 과제번호 109146-3

발 간 등 록 번 호
11-1541000-001339-01

농식품 안정성을 위한 U-Farm 센싱 기술 개발

(U-Farm Sensing Systems for the Safety of Agricultural Foods)

서울대학교 화학부

농 림 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “농식품 안정성을 위한 U-Farm 센싱 기술 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 7월 24일

주관연구기관명 : 서 울 대 학 교
주관연구책임자 : 이 진 규
세부연구책임자 : 박 승 범
세부연구책임자 : 정 택 동
세부연구책임자 : 최 영 찬
참여기업명 : ㈜ 이 지 팜
참여기업대표자 : 김 태 완

요 약 문

Ⅰ. 제 목

농식품 안전성을 위한 U-Farm 센싱 기술 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라 축수산업에서의 항생제 사용량은 덴마크, 일본, 미국 등 몇 선진국과 비교할 때 축수산물 생산량에 대비하여 최고 수준이며 이는 가축 뿐 아니라 국민의 건강에 심각한 영향을 미치는 사회적 문제이다. 항생제 사용감축을 위해서는 사료제조 시 뿐만 아니라 사육농가에서의 규제가 절실히 필요한 상황이며 이의 용이성과 신속성을 제공 할 수 있는 "남용 또는 규제 항생제 검출 시스템"을 구축함으로써 국민의 건강 안전에 기여하는 것이 본 연구의 목표이다. 이를 위하여 농약 및 항생제의 선택적 검출을 위한 새로운 분석 기술을 개발하고, 항생제 물질 검출 센서의 proto-type을 개발하여 육계 계열화된 농장에서 시범적용을 실시하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1) 농약 및 항생제 사용을 계측·모니터링 할 수 있는 센서기술 개발
2) 농약 및 항생제 등 농식품 위해요소 주요 성분들의 센싱 기술 개발
   - 생물화학적 접근: Phage Display를 활용 affinity selection과 error prone PCR system을 활용하여, 위해성분에 강한 특이적 결합력을 가지는 저분자 물질을 개발
   - 전기화학적 접근: 위해 화학적 분자들이 공통으로 포함하고 있는 활성기들에 대한 전기화학적 시그날 측정, 일차적 스크리닝 가이드 센싱 자료 도출
   - 나노화학적 접근: 자성체 나노입자 표면에 특이적 결합력을 가진 물질 도입, 외부자기장에 의해 농축/분리 후 고감도 전기적 특성 또는 형광 특성을 분석, 형광분석/전기분석 센서접목 고감도 현장형 항생제 센싱기술의 개발

Ⅳ. 연구개발결과

본 연구조직은 서울대학교 화학부의 생물화학적 접근 방법론과 전기화학적 접근 방법론, 나노화학적 접근방법론을 통해 농식품 항생제 물질의 분리 및 검출, 나아가 다양한 분야에서 목표 물질의 물질들의 분리, 정제, 검출 및 농축을 통한 선택적인 물질에 대한 감도의 증가의 결과를 도출하였다. 또한 본 연구를 통해 개발된 현장형 검출기를 실제적인 현장에서 사용해 보았고, 이를 통해 항생제를 포함한 저분자 화합물의 현장 검출함을 확인하였다.

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구과제에서 개발된 proto-type 현장형 검출기는 기존의 항생제 검출기에 비해 휴대가 가능하고, 현장에서 사용가능한 편의성이 있다. 특정 항생제뿐만이 아니라 다른 농축산계에서 사용하고 있는 물질들에 대한 연구가 뒷받침된다면 다양한 항생제에 적용 가능한 것으로 기대되고, 정부나 관련 기업체의 추가적인 재정적인 지원을 통해 제품화 및 산업화가 충분히 가능하다고 판단된다.

본 연구를 통한 결과들을 효과적으로 이용하게 되면, 1) 농식품 안전 실시간 진단으로 안전·안심 먹거리 대한 신뢰감 향상, 국민건강 향상, 국내 농산물의 경쟁력 증진과 수출촉진을 기여하고, 2) 원재료 수입의존도가 높은 농약 및 항생제의 과용을 억제로 사용비용의 절감할 수 있으며, 3) 실시간 농약 및 항생제 검출 기법 특허 획득과 기술수출로 인한 수익 창출이 발생되고, 4) 농식품위해요소 모니터링 기술의 개발로 농식품 안전성 불안의 사전대처를 통해 사회적 비용을 최소화하고, 향후 수입 농산물에 대한 위해요소 모니터링 시스템 구축에 확대 적용하여 국민의 먹거리 안전에 기여할 수 있다.

SUMMARY

(영문요약문)

Ⅰ. Title

U-Farm Sensing Systems for the Safety of Agricultural Foods

Ⅱ. Purpose and necessity of research and development

The amount of antibiotics used in livestock and fishing industry of korea is the world's highest, and this is a social problem which affects national health seriously. For reducing antibiotics use, it needs to restrict the abuse of antibiotics. In order to contribute to a national health and safety, we set the goal at building a sensing system of antibiotics, which makes antibiotics detection a more easily and quickly. In this project, we intend to develop the new sensing technology for specific detection of antibiotics and to prepare proto-type sensor for point of care detection of antibiotics at an animal farmhouse.

Ⅲ. Content and scope of research and development

1) Development of the sensing technology for measuring and monitoring of agricultural pesticides and antibiotics.

2) Development of new sensing technology of the harmful chemicals in pesticides and antibiotics.

- Biochemical approach: Development of low molecular weight compound having strong and specific bonding force to harmful ingredient by using affinity selection of phase display and error prone PCR system.
- Electrochemical approach: Measurement of electrochemical signal for active functional group of harmful chemical compound and deduction of results of primary screening guide sensing data.
- Nanochemical approach: Conjugation of specific ligands on the surface of magnetic nanoparticles, analysis of electric or fluorescent properties of antibiotics after enrichment/seperation with external magnetic field, and development of high sensitive portable sensing technology for detection of antibiotics.

Ⅳ. Result of research and development

Our research group deducted seperation and detection of antibiotics of agricultural food through biochemical, electrochemical, and nanochemical approach as well as increment of detection limit of specific target molecules through seperation, purification, detection, and enrichment. Also, our point of care detector was used in the animal farmhouse; it is possible to detect low molecular weight compound including antibiotics.

Ⅴ. Utilizing plan of results of research and development

The proto-type detector prepared from our project can be potable and easy compared with the existing antibiotics detector. We expect that varous antibiotics can be detected if other antibiotics used in the farmhouse were studied and that the proto-type detector can be commercializable if financial supports are existed from the government or related companies.

If our results are utilized, the contribution for national healthy and safety includes following benefits as described below; 1) Imporoving confidence about agricultural food through real-time detection, improving national healthy, and contributing to accelerate export and competitiveness of domestic agricultural products. 2) Reduction of costs of agricultural pesticides and antibiotics. 3) Generating profits from acquisition of patents about real-time detection of agricultural pesticides and antibiotics and exportation of the new sensing technology. 4) Minimizing the social costs from anxiety about safety of agricultural food through development of monitoring technique of agricultural hamful chemicals, and futhermore building the monitoring system for importation of foreign agricultural food.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Outline of project of research and development

Verse 1. Necessity of research and development
1. Technical side
2. Economical and industrial side
3. Social and cultural side

Verse 2. Purpose and content of research and development
1. Purpose of research and development
2. Main content
3. Purpose and content of research and development

Chapeter 2. Current state of technical development

Verse 1. Domestic products and market state
Verse 2. Foreign products and market state

Chaper 3. Content and result of performance of research and development

Verse 1. Plans of research and development
Verse 2. Purpose and content of reesearch and development
Verse 3. Scope and method of research performance
Verse 4. Result of research and development

Chapter 4. Achievement degree of goal and contribution of relative field

Chapter 5. Results and application plan of research and development

Chapter 6. Scientific and technical information collected during process of reseach and development

Chapter 7. Reference

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 필요성
1. 기술적 측면
2. 경제・산업적 측면
3. 사회・문화적 측면

제 2절 연구개발 목표 및 내용
1. 연구개발의 목표
2. 주요내용
3. 과제별(세부・협동) 연구개발의 목표 및 내용

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내 제품생산 및 시장 현황
제 2절 국외 제품생산 및 시장 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 세부별 연구개발의 추진계획
제 2절 연차별 연구개발의 목표 및 내용
제 3절 연차별 연구범위 및 연구수행 방법
제 4절 세부별 연구수행 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장　연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

○ 농림수산식품부의 식품업무 확충과 FTA를 대비하여 U-IT기술을 활용한농식품 안전성·품질관리가 우리 농업·농촌 경쟁력 기반의 핵심

○ 국민 소득증대, 생활 수준향상 등으로 안전·안심 먹거리에 대한 관심이 그 날로 증가하고 있으나 농산물의 경우 농약의 과다사용으로(2005년 기준 ha당 12.80kg으로 일본의 3배, 호주의 5배) 축산물의 경우 항생제 과용으로 (육류 1t당 항생제 사용량이 2006년 기준 0.75㎏으로 호주의 37배로 심각한 수준, 연합뉴스 2008. 10. 16.) 소비자 건강 위협. 이로 인해 중금속잔류와 식중독균의 항생제 내성 강화로 2차피해 증가.

○ 잦은 농약 및 항생제 검출은 국내 농식품의 수출경쟁력 확보에 장애요소가 되고 있으며 (2006년 1월 파프리카 농약검출로 대일수출 피해 등), 중국 등 수입농산물의 위해요소 잔류로 국민건강 위협 및 국내농가피해

○ 생산·가공·유통·판매 전 단계에서 농약 및 항생제 사용여부를 실시간 검출과 추적할 수 있는 유비쿼터스 센서네트워크(USN) 기술 개발이 시급함

○ 이를 위해 농식품 유해물질 센싱 기술 필수 (항생제, 잔류농약 등)

○ 유기농업, 유기축산, 이력추적 시스템 확대를 위한 기반기술 부족

- 유기농업 및 유기축산은 확대되고 있으나 인증 및 신뢰성 제고를 위한 실시간 검증기술의 부족

- HACCP, GAP, 이력추적 등 고급 농식품 제공을 위한 시스템의 구축에 필요한 기반기술 확보 필요

2. 경제·산업적 측면

○ 친환경 유기농 식품산업으로 농촌경제 새로운 원동력

- 농식품 Farm to Table 실시간 안전성 확보로 부가가치 증대
- 축산물 항생제의 과다사용으로 인한 비용절감
- 농약과다사용 방지를 통한 비용절감

○ 농식품의 수출증대를 위해 안전성 제고는 필수

- 축산물의 경우 각종질병과 항생제 과다 사용 등 안전성 문제로 수출 난망
- 경종농산물의 경우 검역 여건을 충족하지 못하는 경우 심각한 수출타격 (예: 2005-06 파프리카 농약검출로 일본수출 급감)

3. 사회・문화적 측면

○ 먹거리에 대한 국민 신뢰성 회복과 국민건강권 확보

○ 무농약, 무항생제 농식품의 가치 확신을 통한 농업의 신뢰제고.

○ 국내 타산업뿐만 아니라 전세계에서 앞서나가는 농업의 새로운 무형적 가치 창출

○ 중국, 동남아 등에서 수입되는 농식품의 위해성 차단

제 2 절 연구개발 목표 및 내용

1. 연구개발의 목표

○ 항생제 물질의 선택적 검출을 위한 새로운 분석 기술 개발

○ 항생제 물질 검출 센서의 proto-type 개발

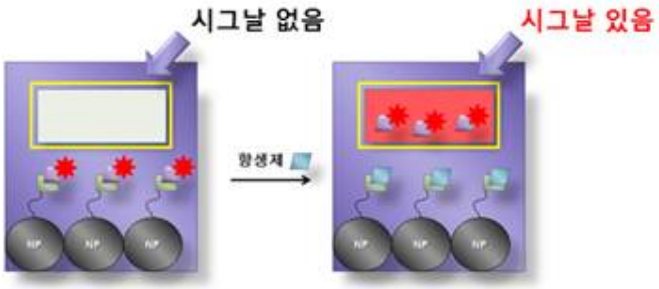
○ 육계 계열화 농장 및 도계장에 시범적용

○ 개발된 항생제 센서를 현장에 실 적응가능한 다양한 비즈니스 모델의 개발

○ 축수산업에서의 항생제 오남용 방지를 위한 항생제 센서 개발을 위한 현장의 명확한 니즈 분석

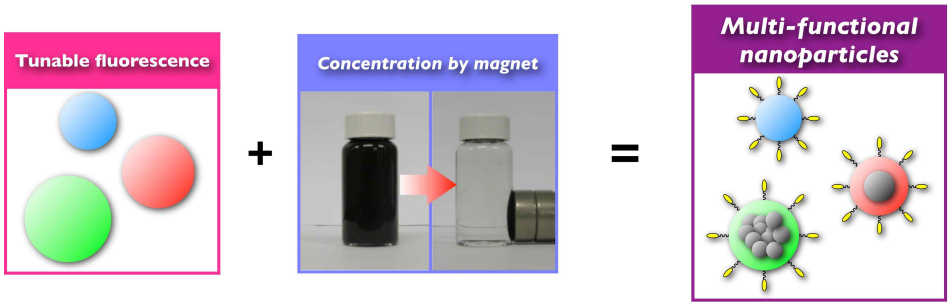
2. 주요내용

○ 항생제 물질의 선택적 검출을 위한 리셉터 물질 개발 및 형광분석 기술 개발



○ 항생제 물질의 선택적 검출을 위한 전기화학분석 기술 개발

○ 나노입자를 이용한 항생제 물질 검출 및 농축



○ 항생제 검출 센싱 기술과 USN 시스템 연결을 위한 기반연구

3. 과제별(세부・협동) 연구개발의 목표 및 내용

가. 주관연구기관(제1세부): 나노입자를 이용한 항생제 물질 검출 및 농축

(1) 연구개발의 목표

○ 축수산업계에서 오남용 되고 있는 항생제 중 퀴놀론계 항생제를 검출할 수 있는 물질을 결합한 다기능성 형광 나노입자의 개발

(2) 주요 연구 내용

○ 축수산업계에서 오남용 되고 있는 항생제 중 퀴놀론계 항생제를 검출할 수 있는 물질을 결합한 다기능성 형광 나노입자의 개발

○ 항생제를 검출할 수 있는 물질과 나노입자를 결합하기 위한 linker의 합성

○ 합성된 linker 물질을 이용한 나노입자의 표면처리

○ 용이한 검출을 위한 형광 나노입자의 합성 및 크기 조절을 통한 검출 효율성 증대

○ 용이한 검출을 위한 형광과 미량물질의 농축이 가능한 다기능성 형광 다중핵-실리카 껍질 나노입자의 개발

나. 제2세부: 항생제 물질의 선택적 검출을 위한 리셉터 물질 개발 및 형광분석 기술 개발

(1) 연구개발의 목표

○ 축수산업에서의 항생제 오남용을 방지하기 위해서 배합사료 제조회사 및 사육농가에서의 즉각적인 검출을 통한 규제를 위해서 닭 사육과정 중 투여되는 항생제, 특히 엔로삭신과 노르플로삭신을 효과적으로 감지해 낼 수 있는 고감도 현장형 센서 기술의 개발

(2) 주요 연구 내용

○ 축수산업에서의 항생제 오남용을 방지하기 위해서는 배합사료제조회사 또는 사육농가에서의 즉각적인 검출을 통한 규제가 가장 용이하므로, 본 연구를 통해 저

분자 합성, 파지 디스플레이 라이브러리 및 나노입자 기술의 조합을 통해 다양한 항생제의 선택적 또는 일반적 현장 검출이 가능한 “저분자 센서시스템”을 구축

○ 닭 사육과정 중 음용수를 통해 투여되는 항생제 센싱 기술 개발에서는 주로 조류에 대한 항생제로 많이 쓰이는, 엔로삭신과 노르플로삭신이 축산용수에 포함되어 있는 농도를 현장에서 신속하게 측정할 수 있는 on-site sensor를 개발

○ 가장 많이 사용되는 퀴놀론계 항생제에 대한 센서를 개발한 다음, 다른 항생제 또는 다양한 농약 분자들로 적용 범위의 확산 추진

○ 이를 통해 항생제가 함유된 사료나 물을 넣을 경우 색깔이 바뀌어 육안으로 쉽게 관찰이 가능하는 항생제 센서의 proto-type 개발

○ Affinity selection과 error prone PCR을 활용한 phage display라는 생물화학적 접근을 통해 항생제에 강한 특이적 결합력을 가지는 scFv 단백질을 개발하고, 이와 선택적으로 결합할 수 있는 형광 저분자를 합성하여, 계사의 음용수에 들어있는 항생제를 선택적으로 센싱할 수 있는 센서를 개발

다. 제3세부: 항생제 물질의 선택적 검출을 위한 전기화학분석 기술 개발

(1) 연구개발의 목표

○ 닭사육농가에서 항생제의 사용에 있어서 닭 사육과정 중 투여되는 항생제 중, 퀴놀론계 항생제의 총량을 전기화학적인 방법으로 현장에서 효과적으로 감지해 낼 수 있는 고감도 현장형 센서 기술의 개발

(2) 주요 연구 내용

○ 축산현장에서의 항생제 사용을 관리하기 위하여, 축산용수에 포함된 퀴놀론계 항생제의 농도를 현장 측정할 수 있는 전기화학 센서 기술 개발

○ 축산 현장에서 사용되고 있는 항생제는 다양한 구조를 가지고 있으나 퀴놀론 작용기를 보유하고 있는 공통점이 있으므로, 본 개발에서는 항생제들이 공통으로 보유하고 있는 퀴놀론 작용기가 전기화학적 반응성이 뛰어나 전기화학적 방법으로 검출할 수 있음에 착안

○ 현재 닭 항생제 검출을 위한 항생제 센서로써 HPLC (high performance liquid chromatography)와 UV-Visible Spectrometer 등을 사용하고 있음.

○ HPLC 및 UV-Visible Spectrometer는 오랜 기간의 연구와 개발로 다양한 항생제에 대한 정량 및 정성 분석이 가능함.

○ 그러나 HPLC 및 UV-Visible Spectrometer는 고가의 장비이며 또한 별도의 공간이 필요하여, 닭 사육 농가에 개별적으로 구비하는 것이 비현실적이며, 또한 사용하는 데 있어서 해당 장비에 충분히 숙련된 전문가가 필요함.

○ 여타 검출 방식에 비해 저렴한 비용으로 매우 낮은 농도의 닭 사육 중 음용수 속의 항생제를 검출할 수 있는 센서를 개발할 수 있으므로, 상용화 가능성이

아주 높음.

- ○ 화학생물학적 기술, 나노화학적 기술과 유기적으로 결합하여 시너지 효과를 낼 수 있음.
- ○ 전기화학 센서를 닭 사육농가에서 직접 사용함으로써 항생제 오남용에 대한 경각심을 가지게 할 수 있으며 궁극적으로 항생제 사용량의 수준을 감소시켜 건강하고 믿을 수 있는 식재료의 공급과 건전한 음식 문화 발전에 기여하고자 함.

라. 제4세부: 항생제 USN 시스템 개발 및 현장적응 비즈니스 모델 개발

(1) 연구개발의 목표

- ○ 축수산업에서의 항생제 오남용 방지를 위한 항생제 센서 개발을 위한 현장의 명확한 니즈 분석
- ○ 개발된 항생제 센서를 현장에 실 적응가능한 다양한 비즈니스 모델의 개발
- ○ 항생제 센서 및 USN 시스템의 농수축산 및 식품, 유통분야로의 확산 및 상업화 방안 연구

(2) 주요 연구 내용

- ○ 축수산업에서의 항생제 오남용 방지를 위한 항생제 센서 개발을 위한 닭, 젖소, 한우, 돼지 등 축종별, 품목별 항생제 적용가능한 현장의 명확한 니즈 분석
- ○ 비용과 센싱효과 분석을 통해 가장 효과적이고 효율적인 육계, 산란계 농장의 항생제 센서시스템 적용 방안 도출
- ○ 항생제 센서 및 USN 시스템의 농수축산 및 식품, 유통분야로의 확산 및 상업화 방안 연구

제 2 장　국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 제품생산 및 시장 현황

○ 최근 정부는 축산물의 안전성을 높이기 위한 조치로서 [가축분뇨의 관리 및 이용에 관한 법률] 제정('07. 9.28 시행)에 따른 환경친화축산농장지정제도 도입, [친환경농업육성법] 개정('07. 3.28)에 따른 무항생제 축산물인증제도 도입 등 축산물 위해요소제거를 위하여 정책적으로 노력하고 있음.

○ 그러나 현재 도축과정에서 축산물의 위해성을 검출하기 위한 연구는 거의 없는 실정이며 특히 유통 중인 축산물 및 축산가공식품의 품질 및 안전성을 평가할 수 있는 기술 및 제품의 개발은 매우 미흡함.

제 2 절 국외 제품생산 및 시장 현황

○ 국제식품규격위원회(Codex Alimenterius Commission, CAC)에서는 각국 정부가 안전한 식품 공급을 보장하기 위한 지침으로서 '식품의 동물약품 잔류관리를 위한 규제 프로그램 설정에 관한 지침(CAC/GL 16-1993)'을 제정하여 각국의 공통기준으로 사용할 것을 권장하고 있음.

○ 미국에서는 이미 1967년부터 국가잔류검사프로그램 (National Residue Program, NRP)을 실시하여 오고 있으며, EU 등 선진 각국에서도 농장단계의 살아있는 가축에서부터 유통단계의 축산물에 이르기까지 각종 동물약품이나 다이옥신 등 환경유래 유해물질로부터 축산물의 안전성 확보를 위하여 자국산 뿐만 아니라 수입산 축산물에 대하여도 잔류검사프로그램을 도입하여 잔류물질 검사체계를 구축해 나가고 있음.

○ 한편 미국에서는 식중독으로 인한 경제적 손실이 연간 최대 $67억 달러에 이르러 연방정부 차원에서 예방 및 검사 장비 개발을 수행하고 있음. 특히 식품 안전성, 특히 부패를 일으키는 병원균을 감지해내거나 예방하는 문제가 식품 안전에 관한 대통령 특별령으로 선포되면서 미 농무부 농업연구청에서는 식품안전성연구 프로젝트를 통해 식중독을 일으키는 병원균을 검색하고 제거하기 위해 생산단계에서 소비단계에 이르는 전 과정에 걸쳐 식품 병원균을 예방, 검사하기 위한 연구를 수행하고 있음.

○ 또한 미국의 FSIS (Food Safety and Inspection Service)에서는 위해요소중점관리기준에 기반한 검사모델 프로젝트 (HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point)-Based Inspection Models Project (HIMP))를 개발하여 보다 효율적인 축산물 및 식육의 안전성 검사기준을 제공하고 있음. HIMP로 명명된 미국농무성의 새로운 검사시스템은 축산가공공정에서 질병발생율과 오염율을 획기적으로 저감시킬 수 있었으며 2001년도

USDA 보고에 의하면 닭고기 가공공장에서 오염된 닭고기의 발생량이 1.5%에서 0.1%로 감소되었음. 축산물 가공공정에 적용된 오염물 검출 시스템은 초분광형광영상 기술을 이용하여 실시간 온라인으로 닭고기에 묻은 배설물이나 오염물질을 검출하는 시스템으로서 오염물질에 대한 90% 이상의 판별율을 나타냄.

○ EU 각국의 축산물에 대한 유해 잔류물질에 대한 잔류검사체계는 1996년에 제정된 Council Directive 96/23/EC을 기본으로 하여 각국마다 검사프로그램을 설정하고 있음. 영국의 경우 검사프로그램은 크게 농장, 도축장 및 집하장에서 채취하는 시료를 대상으로 검사하는 법령에 의한 검사프로그램(statutory surveillance scheme)과 관련 법령에 명시되지 않은 물질이나 품목(수입품과 가공품)을 확대하여 검사하는 프로그램(non-statutory surveillance scheme)으로 분류하여 수행하고 있음.

- 항생제의 경우, 유럽 18개국은 EU의 지원 아래 '유럽 항생제 내성 감시 시스템(EARS)' 를 운영 중임.
- 또한, 1996년 우리나라를 비롯, 아시아 지역 13개국도 '항생제 내성 감시를 위한 아시아 연합 (ANBORP)' 결성에 참여함

○ 일본은 미국이나 EU와 달리 규제검사나 탐색조사는 없고 모니터링 검사만 실시하는 형태임. 잔류검사는 후생노동성에서 고시하는 '축수산식품의 잔류유해물질 모니터링 검사 실시요령'에 근거하여 매년 4월부터 시작하여 이듬해 3월말까지 1년 단위로 실시함.

제 3 장　연구개발수행 내용 및 결과

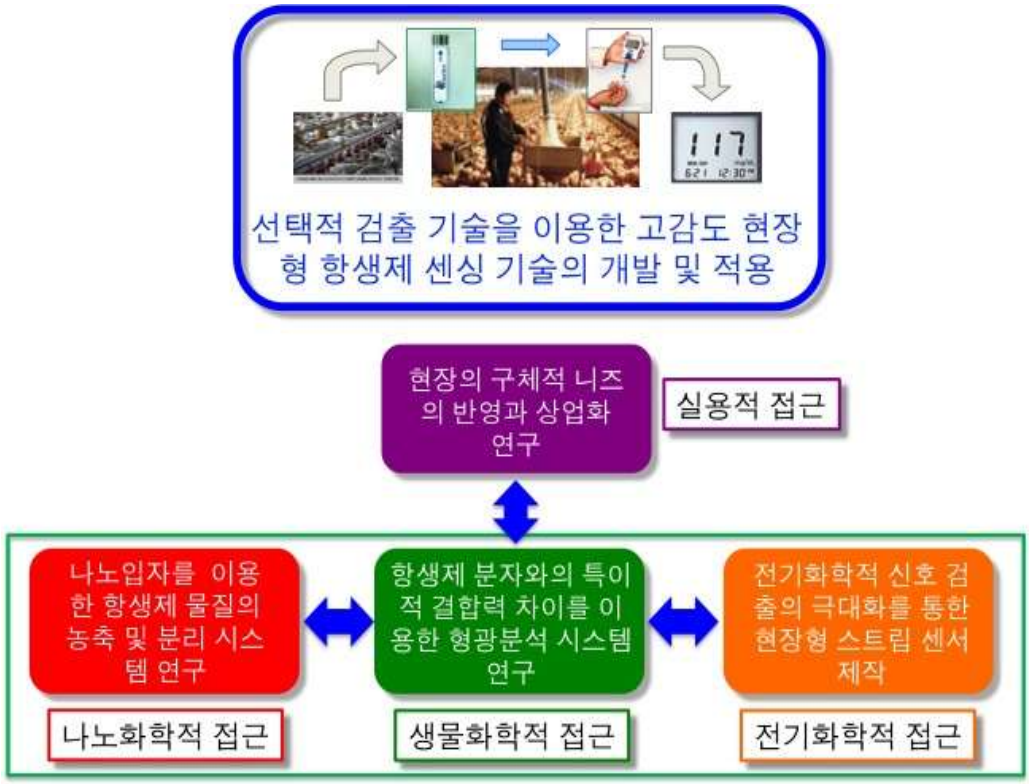
제 1 절 연구개발의 추진전략·방법

○ 본 사업의 목적은 농약 및 항생제 사용을 계측·모니터링하는 센서기술 개발

○ 위의 목적을 달성하기 위하여 본 연구조직은 서울대학교 화학부의 생물화학적 접근 방법론과 전기화학적 접근 방법론, 나노화학적 접근방법론을 농식품 항생제 물질의 분리 및 검출, 나아가 다양한 분야에서 목표 물질의 물질들의 분리, 정제, 검출 및 농축을 통한 선택적인 물질에 대한 감도의 증가를 통해 결과를 도출해 내는 방향으로 연구를 추진

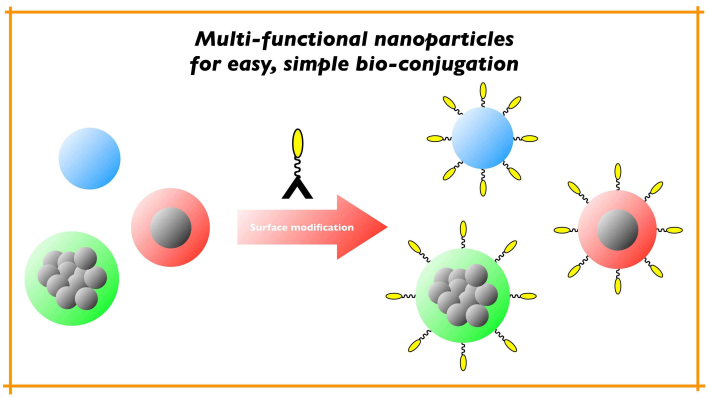
○ 본 연구를 수행함에 있어 현장의 니즈를 정확히 반영하고, 신속한 산업화를 위하여 (주)이지팜이 본 과제에 참여하고, 연구결과물을 (주)이지팜과의 협력을 통해 시범적용하여 항생제 센서와 현장형 검출기, USN 센서시스템의 신뢰도를 높이기 위한 연구 추진

○ 본 연구결과를 통해 개발될 항생제 센서시스템이 돼지, 젖소, 산란계 등 타 축종 및 축산물에도 적용이 가능하도록 개발 결과물 활용의 확장을 도모하며, 개발된 기술이 농장, 도축, 가공, 유통 및 소비 단계에 걸쳐 적용 및 활용 가능한 다양한 비즈니스 모델을 개발 추진



제1세부 - 나노입자를 이용한 항생제 물질 검출 및 농축

- ○ 나노입자 내의 실리카 매트릭스와 화학적인 결합을 만들 수 있는 기능기를 가진 다양한 파장의 형광을 가지는 유기 염료들의 합성
- ○ 화학적인 결합을 하지 않은 유기 염료의 경우에는 실리카 매트릭스와의 결합력이 존재하지 않아 수초 ~ 수 시간 내에 거의 대부분의 유기 염료가 용매로 녹아 나와 실제적으로 응용이 어려움
- ○ 화학적인 결합을 통해 실리카 매트릭스에 존재하는 유기 염료는 열적, 광적 안정성 및 화학물질에 대한 저항성이 향상되고, 특히 광탈색(photo-bleaching)에 의한 형광이 사라지는 것을 막는데 탁월한 효과가 있음
- ○ 다양한 형광을 가지는 실리카 나노입자의 합성 및 열적, 광적 안정성 및 화학물질에 대한 안정성 조사
- ○ 항생제 검출물질과 결합 가능한 기능기를 가지고 용매에 안정적으로 분산되도록 고안된 표면처리 물질의 합성 및 분석 (기능기로는 primary amine, halide, carboxyl group, thiol group 등)
- ○ 합성된 표면처리 물질을 이용한 실리카 나노입자의 표면처리 및 표면처리 조건의 최적화
- ○ 표면 처리된 실리카 나노입자의 기능기에 대한 정량 및 용매에 대한 안정성 등과 같은 표면 처리된 실리카 나노입자에 대한 분석
- ○ 표면 처리된 실리카 나노입자의 기능기에 대한 정량을 바탕으로 항생제 검출 물질과 표면 처리된 실리카 나노입자의 결합 및 결합 조건의 최적화
- ○ 항생제 검출 물질이 결합된 실리카 나노입자를 이용한 실제적인 target 항생제 검출 및 feedback을 통한 최적화
- ○ 용이한 검출을 위한 형광과 미량 물질의 경우 농축이 가능한 다기능성 다중핵-실리카 껍질 나노입자의 합성

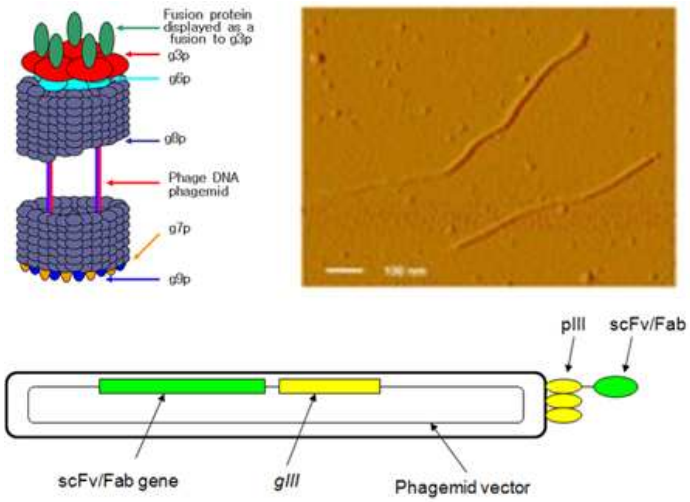


- ○ 합성된 다기능성 다중핵-실리카 껍질 나노입자의 표면은 실리카로 이루어져 있어 기존의 개발된 표면처리 물질을 그대로 사용할 수 있고, 다중 핵을 이루고 있는 자성으로 인해서 미량 물질을 손쉽게 농축할 수 있는 장점을 가지고 있음

제2세부 - 항생제 물질의 선택적 검출을 위한 리셉터 물질 개발 및 형광분석 기술 개발

○ 박테리오 페이지 (Bacteriophage) 또는 페이지 (Phage)는 박테리아를 감염시키는 바이러스로서 DNA 또는 RNA를 유전자로 가지고 있으며, 약 1mL 안에 10^9개 이상의 virion이 존재하게 된다.

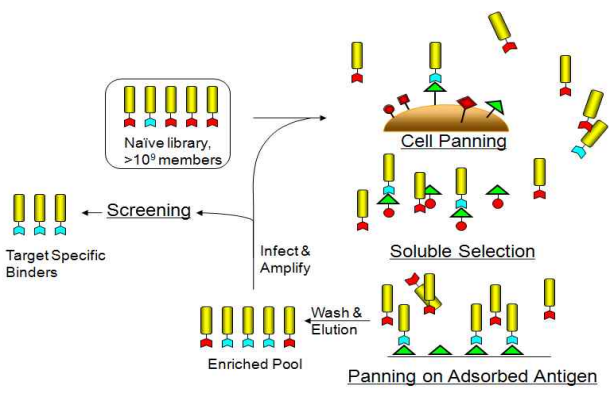
○ 본 실험에서 사용하게 될 M13 Bacteriophage는 필라멘트 형태의 모양을 가지고 있으며 ssDNA로 유전정보가 구성되어 있으며, 2700여개의 표면 단백질 (pVIII)과 5여개의 끝 부분의 표면 단백질 (pIII)을 가지고 있음



○ 항체의 일부분 (scFv: single chain Fv; 또는 Fab: antigen-bonding domain)이 pIII에 연결이 되어 phagemid vector 유전자에 연결이 되어 있기 때문에 Phenotype과 Genotype을 서로 연결할 수 있는 것이 가능하게 됨.

○ Phagemid vector의 *gIII* 유전자 바로 위쪽에 연결되어 있는 scFv/Fab gene 들에 의해 분자다양성이 극대화되고, phage assembly가 phagemid vector를 통해서 선택적인 결합 단백질을 발현할 수 있도록 함.

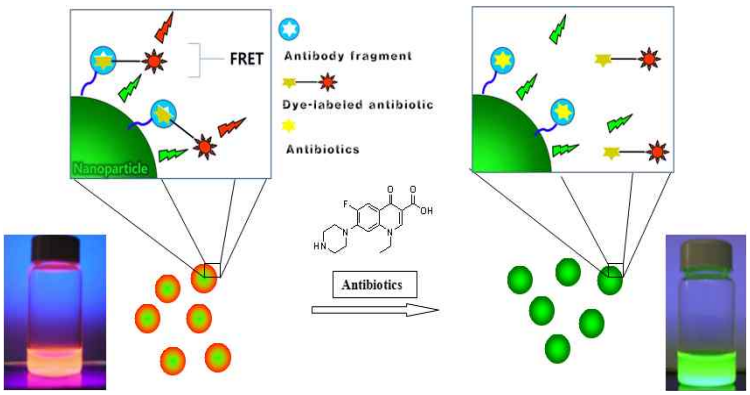
○ 아래의 모식도에서 설명하는 것처럼 affinity selection과 error prone PCR을 활용하는 phage display system을 이용하여 강한 결합력을 가지는 항생제 결합단백질을 개발하고자 함.



○ Phage Display를 활용하여 항생제를 선택적으로 결합하는 scFv 도출 방법. (1) 항생제(엔로삭신 또는 노플로삭신)를 albumin이란 단백질에 고정화한 다음에, 이와 선택적으로 결합하는 M13 phage를 우선 선별해 낸다. (2) 선별된 M13 phage에서 DNA를 뽑아내고, 이를 error-prone PCR를 통해서 그 다양성을 높여준 다음, 이렇게 얻어진 DNA를 M13 phage에 다시 넣어주고, 이렇게 만들어진 phage를 증폭시킨 다음에 2차적인 결합 과정을 진행한다. (3) 이렇게 몇 번의 selection cycle을 거치고 난 다음에 높은 affinity를 가지고 결합하는 scFv fragment를 만들어낸 다음에 그 유전자를 이용하여 많은 양의 단백질을 발현하게 된다.

○ 우선적으로 상대적인 결합력을 가지고 있는 phage를 선택하고 Selection Process를 거쳐서 확보된 선택적 저분자 결합 단백질 (scFv)의 결합도를 검증.

○ 얻어진 결합 단백질 (~25 kDa)과 상대적으로 작은 결합도를 갖는 형광 저분자 물질과 결합을 하여 FRET을 이용한 새로운 검출방법을 고안하고자 함. 즉 형광물질이 고정화되어 있는 nanoparticle에 위에서 얻은 항생제 결합 단백질 (scFv)를 선택적으로 고정화하고, 이와 결합할 수 있는 형광 항생제 유도체를 넣게 된다. 이러한 시스템에서는 쪼여진 빛의 FRET 현상을 통해서 원래의 녹색은 나타나지 않고 겉에 붙어있는 붉은 색만이 나타나게 된다. 그러나 검출 대상이 되는 샘플 안에 존재하는 항생제의 존재하게 되면, 그 형광 항생제 유도체와의 결합 정도의 차이에 따라서 떨어지게 됨으로서 나노입자는 붉은 색이 아닌 원래의 초록색으로 되돌아가게 된다. 따라서 on-site에서 색깔의 변화를 통해서 손쉽게 검출할 수 있는 시스템을 개발함으로서 현장에 바로 적용할 수 있는 센서 시스템을 개발하고자 함.



○ FRET을 활용하여 물속에 들어있는 항생제의 존재 여부를 색깔로 판별하는 방법

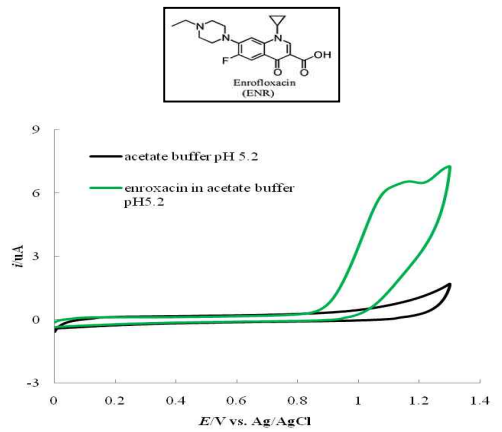
○ 파지 디스플레이 라이브러리: “저분자 센서시스템”을 구성하는데 있어서 저분자 인식인자의 적절한 도입은 매우 중요한 요소임. scFv는 25KDa정도의 항체의 일부분을 차지하는 단백질로서 DNA 분자, 효소 또는 핵산과 같은 인식인자에 비해 센서시스템의 선택성과 민감성 면에 있어우수한 특징이 있음. 이러한 scFv는 파지 디스플레이 라이브러리로부터 저렴한 비용으로 비교적 빠른 시간 내에 선별해

낼 수 있음.

- Phage Display: Phage display technique은 virus의 coat protein을 coding하는 gene과 발현을 원하는 gene을 murge 시켜 특정 gene에 해당하는 protein이 phage의 바깥쪽에 나오게 하는 technique. Phage display technique은 affinity selection이 가능하기 때문에, 우리가 원하는 property를 지니는 gene이나 protein을 빠른 시간 안에 찾아낼 수 있는 technique임.
- FRET: 둘 이상의chromophore가 충분히 가까이 있을 때 (10nm 이하) excited state에 있는 donor chromophore의 에너지가 acceptor chromophore로 전달되는 현상을 FRET (Förster resonance energy transfer) 라고 명명함. 이때 전달되는 에너지는 그 거리에 매우 밀접한 연관관계가 있음. 이를 이용하게 되면, 우리는 두 물체간의 거리 차이를 매우 sensitive하게 detection 할 수 있음. 이러한 FRET현상은 fluorescence technique과 접목되면서 매우 powerfull한 tool로서 활용되고 있는 추세임.
- 저분자 합성: 검출하고자 하는 항생제의 구조-활성관계 정보를 바탕으로 하여 선택적 또는 일반적 항생제 검출이 가능하다. 이를 위해 저분자 합성을 통하여 인식인자가 되는 scFv를 찾고, 또한 육안으로 검출 가능한 시스템을 위하여 저분자 합성을 통해 Dye-Labeled Analogs를 획득하는 과정이 필요함.
- 나노입자(NP) 기술: Dye-Labeled Analogs가 결합된 인식인자인 scFv를 위한 지지체로서 나노입자가 사용될 수 있음.

제3세부 - 항생제 물질의 선택적 검출을 위한 전기화학분석 기술 개발

- 퀴놀론계 항생제는 다른 종류의 항생제와는 달리 분해 효소 없이 전극 표면에서 직접 산화될 수 있는 전기화학적 반응성을 가지고 있음.
- 따라서 아주 단순한 전기화학 시스템에서 퀴놀론계 항생제의 산화 전류를 측정할 수 있음.



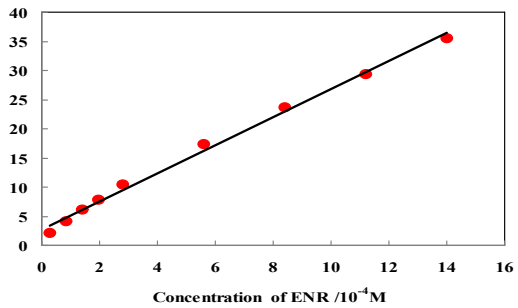
Cyclic voltammogram response of ENR

○ +1 V vs. Ag/AgCl 근방에서 많이 사용되고 있는 퀴놀론계 항생제 중 하나인 enrofloxacin의 산화 피크가 나타나는 것을 알 수 있음.

○ 퀴놀론계 항생제가 충분히 산화될 수 있는 산화 전위를 걸고 그때의 산화 전류를 측정하여 항생제의 양을 측정하고자 함.

○ 아래 그림은 일반적으로 널리 사용되는 glassy carbon 전극을 센서로 하여 enrofloxacin의 산화 전류를 농도 별로 측정한 결과임.

○ 일반적인 전극을 사용할 경우 약 20 μM 까지 측정 가능함. enrofloxacin 20 μM의 농도는 <10 ppm이하의 양을 의미함.



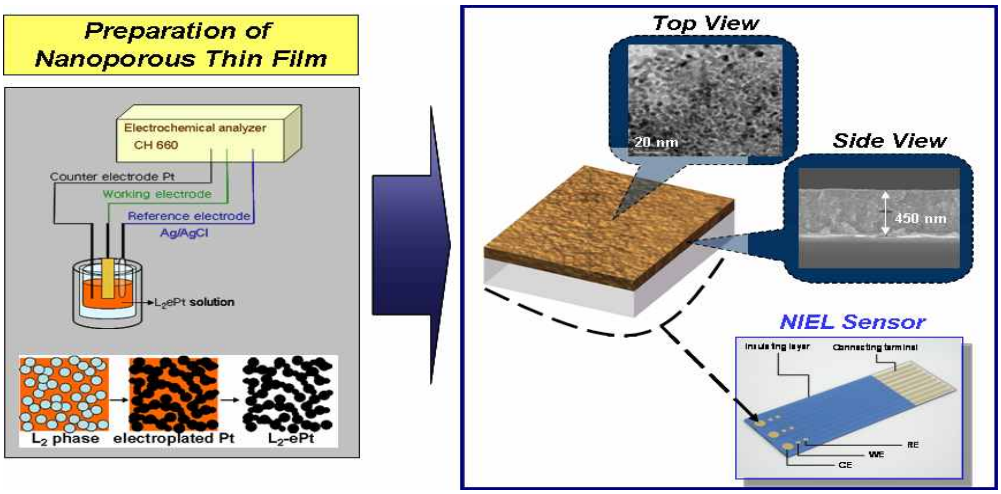
Calibration curve of ENR oxidation (28 μM~1.4 mM)

○ 본 연구에서는 퀴놀론계 항생제의 감도를 극대화하기 위하여 나노다공성 백금 전극을 도입할 계획임.

○ 나노다공성 백금 전극은 전극 고유의 다공성으로 인하여 일반적인 전극들에 비하여 똑같은 넓이라 하더라도 100배 이상의 반응 면적을 가질 수 있음.

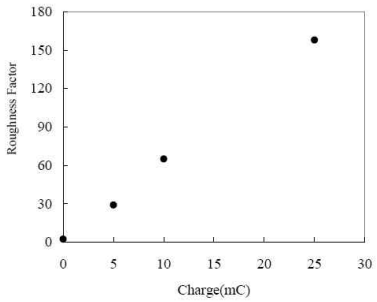
○ 나노다공성 백금 전극은 백금산 용액과 계면활성제를 적정 비율로 혼합하여 특정 페이즈(L_2 phase)에서 전기화학적으로 도금하여 제작할 수 있음.(아래 그림)

○ 제작된 나노다공성 백금 전극의 미세 구조를 보면 두께는 수백 nm이며, 표면은 2 nm 내외의 작은 동공들이 형성되어 있음을 알 수 있음.



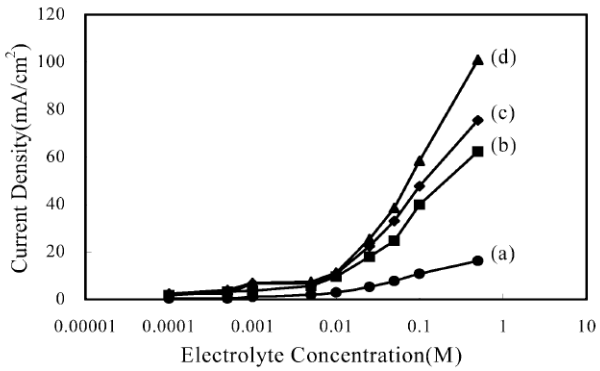
○ 나노다공성 백금 전극의 장점은 작은 크기의 전극의 활성 표면을 극대화하여 검출 감도를 획기적으로 향상시킬 수 있으며, 센서의 소형화가 가능하여 휴대가 가능한 고성능 검출 시스템의 개발을 가능하게 함.

○ 나노다공성 백금 전극의 활성 표면의 거칠기 인자(roughness factor)는 인가하는 전하량에 의하여 조절 가능함.



Plot of roughness factor vs. charge passed for Pt deposition

○ 이와 같이 제작된 나노다공성 백금 전극들로 용존 산소량을 검출시 다양한 전해질 환경에서 거칠기 인자가 클수록 검출 신호가 증폭됨을 확인할 수 있음.



The results of O_2 detection at (a) flat and (b-d) nanoporous Pt electrodes at various electrolyte concentrations. The roughness factors of nanoporous Pt electrodes are (a) 2.37, (b) 29.1, (c) 65.1, and (d) 158.

○ 나노포러스 백금 전극의 이러한 특성을 이용하여 퀴놀론계 항생제들의 검출 한계를 대폭 낮추고, 쉽게 소형화할 수 있는 전기화학 type의 항생제 센서 기술을 개발하고자 함.

제4세부 - 항생제 USN 시스템 개발 및 현장적응 비즈니스 모델 개발

○ 육계 생산 및 도계 과정에서 항생제의 검출과 진단이 꼭 필요한 프로세스에 항생제 센서시스템을 적용할 프로세스 분석을 우선적으로 실시하여, 센서 개발과 육계 농장에 대한 현장적용을 통해 연구결과의 타당성 확보

○ 본 세부과제의 참여기업으로 (주)이지팜이 참가하여, 농식품에 사용되는 항생제 센싱에

대한 DB화 및 시스템 구축을 위해 (주)이지팜이 연구과정 전반에 걸쳐 현장의 니즈 분석과 결과의 적용 및 테스트를 수행

○ 본 연구결과를 통해 연구될 항생제 센서시스템이 육계 및 산란계 산업을 비롯한 돼지, 젖소, 산란계 등 타 축종 및 축산물에도 적용이 가능하도록 각 축종별 센서시스템의 도입가능성 및 농장, 도축, 가공, 유통 및 소비 단계에 걸쳐 적용 및 활용 가능한 다양한 비즈니스 모델을 개발하여 신속한 제품 개발 및 상용화 전략을 수립

제 2절 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용
1차년도	2009	제1세부 이진규	○ 크기 조절 가능한 다양한 형광을 가지는 나노입자의 합성	○ 실리카 나노입자의 합성 및 크기 조절 ○ 형광 나노입자의 합성을 위한 형광 염료의 합성 ○ 형광 실리카 나노입자의 합성
		제2세부 박승범	○ Phage Display를 활용하여 항생제에 선택적으로 결합하는 단백질을 도출하고 이의 생물리화학적 성질을 규명	○ 대상 항생제의 유도체 합성과 이를 활용한 선택적 결합 단백질(scFv)의 도출 ○ 도출된 항생제 결합 단백질의 결합력 및 선택성을 정량화 하고 이를 활용한 센서 개발의 기술적 기반 구축
		제3세부 정택동	○ 항생제의 전기화학적 거동 확인	○ 대상 항생제가 전기화학적인 센서 시그널을 발현할 수 있는 이상적인 조건 탐색 ○ 보다 구체적으로, 센서 전극의 재질과 형태, 인가하는 전압의 크기와 파형, 대상물질 이외의 물질에서 오는 시그널을 제외하는 방법론 일반에 대해 탐색
		제4세부 (최영찬)	○ 현장의 명확한 니즈 분석 ○ 실증농가 가상적용 니즈분석	○ 육계농장의 급수, 사료 급이 등 항생제 사용 단계별 센싱 적용 방안 분석 ○ 현장적용 시뮬레이션을 통한 사전점검

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용
2차년도	2010	제1세부 이진규	○ 표면처리 물질의 고안 및 합성 ○ 항생제 검출물질과 결합 가능한 표면처리 물질의 개발 및 나노입자의 표면처리	○ 항생제 검출물질과 결합이 가능한 기능기를 가진 표면처리 물질의 개발 ○ 항생제 검출물질과 표면 처리된 나노입자와의 결합 ○ 항생제 검출물질이 결합된 나노입자를 이용한 실험실에서 항생제 검출조건 최적화
		제2세부	○ FRET을 이용하여	○ 1차년에 개발한 항생제 선택적 단백질

		박승범	시료내의 항생제 존재 여부를 광학적 방법를 이용하여 검출, 또는 biochip 개념을 도입하여 형광 검출법 개발	을 고정화하여 해당 항생제 검출을 위한 proof-of-concept 실험 완료 ○ 개발된 기술을 활용하여 현장에서 활용 가능한 형광 검출법 개발 ○ 검출 한계를 늘리기 위하여 표면 처리된 나노입자와의 접목을 시도함
		제3세부 정택동	○ 전기화학에 기반한 항생제 검출기술 완성	○ 항생제의 종류와 관계없이 항생제의 총량을 측정함으로써, 축산용수에 포함된 항생제의 농도 수준을 일차적으로 스크리닝하고 경보할 수 있는 기술을 개발함 ○ 항생제의 종류와 종류별 농도에 대한 정보는 부재하지만, 그 총량을 규제할 수 있는 빠르고 간편한 방법론을 제시함 ○ 정량/정성 기능의 부여는 물론, 검출한도의 개선, 검출 선택성의 향상을 지향함
		제4세부 (최영찬)	○ 육계, 산란계 농장의 항생제 센서시스템 적용방안 도출	○ 비용과 센싱 효과 분석을 통해 가장 효과적이고 효율적인 육계, 산란계 농장의 항생제 센서시스템 적용 방안 도출

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용
3차년도	2011	제1세부 이진규	○ 항생제 검출물질이 결합된 나노입자를 이용한 target 항생제 검출 ○ 다기능성 나노입자의 개발 및 응용성 타진	○ 항생제 검출물질이 결합된 나노입자를 이용한 실제적인 사용조건에서의 항생제 검출 ○ 다기능성 다중핵-실리카 껍질 나노입자의 개발 및 그 응용성 타진
		제2세부 박승범	○ 나노입자 표면의 선택적 modification을 통하여 새로운 고감도 센서시스템의 개발	○ 개발된 proto-type 센서의 현장 적용 가능성 타진 (실험실 수준의 감도 및 정확도 측정 및 실제 사용 조건에서의 감도 및 정확도 확인) ○ 센서의 감도 및 시료의 다양성을 위하여 다양한 template에 적용을 시도함
		제3세부 정택동	○ 전기화학에 기반한 proto-type 항생제 검출기의 제작 및 test 실시	○ 전기화학에 기반해 제작된 proto-type 검출기의 작동 및 실험실 수준의 항생제 검출의 여부 및 감도 확인 ○ 실제적인 사용 조건에서의 정확도 및 감도 확인을 통한 현장 적용 가능성 타진
		제4세부 (최영찬)	○ 육계, 산란계 농장의 항생제 센서시스템 적용방안 최적화	○ 비용과 센싱효과 분석을 통해 가장 효과적이고 효율적인 육계, 산란계 농장의 항생제 센서시스템 적용 방안 최적화

제 3절 연차별 연구범위 및 연구수행 방법

1차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적・실험적 접근방법)	구체적인 내용
다중핵 자성나노입자의 크기 조절	○ 다중핵 자성나노입자의 형성 과정을 다양한 측정 기기들(예를 들어, TEM, XRD 및 FT-IR)을 이용하여 알아 보았음. ○ 형성 과정의 이해를 토대로 반응물의 양을 조절함으로써 쉽게 콜로이드의 크기를 조절할 수 있었음.	○ 다중핵 자성나노입자는 자성 단자구가 무리지어 크기가 30nm 이상에서 500nm 이하로 형성되었고, 분산성이 탁월하며, 우수한 자기적 특성을 가지고 있음을 확인하였음.
자성 코어 - 실리카 껍질 나노 구조 복합체의 합성	○ 자기적 특성이 우수한 자성 나노클러스터 콜로이드를 양쪽성 고분자를 중간 매개체로 이용하여 복잡한 표면 처리 과정 없이 간단하고 용이하게 실리카 껍질을 형성시킴.	○ 나노 물질에 실리카와 같은 비활성 재료의 껍질을 형성시키면 수용액에서 그들의 뭉침을 막아주고 화학적 안정성을 증가시킴. ○ 실리카 껍질의 다른 이점은 표면이 Si-OH 기로 되어 있어 쉽게 원하는 특성을 가진 특별한 리간드들을 공유 결합시킬 수 있다는 것이며, 이로 인해 생체에서 기능을 발휘하는 다양한 생분자들을 쉽게 접합시킬 수 있으므로, 생 분야로의 응용에 큰 도움이 될 수 있음.
항생제에 선택적으로 결합가능한 단백질의 도출 여부 및 생물리화학적 성질 규명	○ 퀴놀론 작용기를 보유하고 있는 항생제 유도체를 합성하고, 이와 선택적으로 결합하는 단백질을 phagy display 방법을 통해 찾아내어 단백질-항생제간의 생물리화학적 성질을 규명함.	○ 퀴놀론계열 항생제의 유도체를 합성함. 이때 퀴놀론 작용기를 갖고 있는 모든 항생제에 대해 공통적으로 적용할 수 있는 단백질과(scFv F9), enrofloxacin에만 선택적으로 결합할 수 있는 단백질(scFv A2)를 phagy display를 통해 도출함. 도출된 단백질과 항생제간의 선택성과 결합력은 ELISA와 SPR을 통해 검증됨.
항생제의 전기화학적 거동 확인	○ 퀴놀론 작용기를 보유하고 있는 항생제들은 전기화학적 반응성이 뛰어나 특정전위에서 산화반응이 일어나며 이를 이용하여 전기 화학적 방법으로 측정이 가능함.	○ 순환 전압전류법을 이용하여 산화 전위를 확인함. ○ 네모파 흡착 벗김 전압 전류법을 이용하여 각 항생제들의 농도별 산화전류를 측정하고 선형계산됨. ○ 파라미터 조절로 산화전류를 극대화 시킴.
센서 전극의 재질선택과 형태연구	○ 탄소 계열의 전극이 퀴놀론계 항생제의 산화전류를 선택적으로 감응함.	○ 탄소 파우더와 오일의 혼합 비율을 달리하여 최적의 전극 조건 탐색. ○ 전극의 모양과 크기를 다양화 하여 연구됨.

2차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적 · 실험적 접근방법)	구체적인 내용
항생제 검출 물질과 결합이 가능한 기능기를 가진 표면처리 물질의 개발	○ 항생제를 검출하기 위해서는 수용액에 대한 분산성과 항생제 검출물질과 결합 가능한 기능기가 필요함. 일반적으로 아민 기는 항생제 검출물질과 결합될 수 있는 기능기이므로, 이를 기반으로 표면처리를 하였음.	○ 실리카 껍질 표면에 많이 존재하는 실란올 기를 이용하여 아민 기가 존재하는 실리콘 화합물인 3-(Trimethoxysilyl) propyl diethylenetriamine를 이용하여 표면처리하였고, 정량적으로 분석하였음. 또한 수용액에서의 분산성을 증가시키기 위하여 methoxy(polyethyleneoxy)propyltrimethoxysilane을 함께 표면처리 하였음.
항생제 검출 물질과 표면처리된 나노입자와의 결합	○ 퀴놀론 작용기를 보유하고 있는 항생제에 선택적으로 결합하는 단백질을 아민 기로 표면처리된 자성 나노복합체와 결합하였음.	○ 1차년 제2세부에서 개발된 퀴놀론 작용기를 보유하고 있는 항생제에 선택적으로 결합하는 단백질을 아민 기로 표면처리된 자성 나노복합체와 화학반응을 통하여 공유적으로 결합되었고, 정량적으로 분석되었음.
항생제 검출 물질이 결합된 나노입자를 이용한 실험실에서 항생제 검출조건 최적화	○ 단백질과 결합된 자성 나노복합체를 이용하여 퀴놀론 작용기를 보유하고 있는 항생제를 선택적으로 결합시킴.	○ 나노입자 표면에 도입되는 아민 작용기의 정량적인 분석과 재현성을 위한 연구결과 확보를 위해 전체적인 연구 속도가 지연되어 항생제 검출 조건 최적화 결과는 확보되지 못하였음.
1차년에 개발한 항생제 선택적 단백질을 고정화하여 해당 항생제 검출을 위한 proof-of-concept 실험 완료	○ Pyridone Carboxylic acid의 Pharmacophore를 가지고 있는 퀴놀론계열 항생제에 대해 보편적으로 사용될 수 있는 센서의 개발 빛 특정 퀴놀론항생제만을 선택적으로 인지할 수 있는 센서 개발	○ Ciprofloxacin, Ofloxacin과 같은 퀴놀론계열 항생제에 대해서는 competitive displacement가 일어나 ELISA signal이 확연히 감소되었으나, b-lactam 계열의 항생제를 처리하였을때는 F9 scFv와 binding하지 않기 때문에 displacement가 일어나지 않았고 ELISA signal이 control 수준으로 유지되었음. A2 scFv의 경우 enrofloxacin을 처리하였을 경우에만 competitive displacement가 일어나 ELISA signal이 감소하였음.
CNBr resin을 활용하여 시료내의 항생제 존재 여부를 형광 신호로 검출함	○ 도출된 scFv (A2, F9)을 각각 CNBr resin에 고정화 시키고 형광유도체와의 competitive displacement에 의해 수용액 상으로 녹아나오는 형광 신호를 검출함	○ Cy3 형광 염료가 결합된 퀴놀론 유도체를 합성하고, CNBr agarose resin에 A2와 F9 각각을 고정화시켰음. scFv와 형광 유도체를 먼저 binding 시킨후, 시료를 처리하였을때 시료내의 항생제와 scFv간의 competitive binding에 의해 형광 유도체가 CNBr resin으로부터 떨어져나가 수용액상에서 검출되나 그 신호세기가 약함. 동시에 시료내 항생제의 농도에 따른 CNBr resin자체의 형광세기의 감소는 형광 현미경을 통해 정량함.

감도 향상을 위한 다양한 검출 시스템 개발	○ 민감도가 높은 검출법중 하나인 라만 분광법을 이용하여 항생제 검출 및 감도 극대화를 위해 농축 기술을 이용한 감지 모듈 구현	○ 퀴놀론 계열 항생제를 라만 분광법으로 검출함. 항생제의 존재여부는 알 수 있으나, 정량적으로 검출하는데에는 부적합함. 또한 감도 향상을 위해 농축 기술을 접목시켜 감지 모듈을 구현함.
육계, 산란계 농장의 항생제 센서시스템 적용방안 도출	○ 육계, 산란계 농장의 항생제 센서시스템 적용방안 도출	○ 국내외 학술지 및 저널에서 연구된 항생제 센싱기술의 적용 방안에 대한 선행연구 수행 및 국내 육계농장에 적합한 센서시스템 적용방안 도출

3차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연 구 범 위	연구수행방법 (이론적・실험적 접근방법)	구체적인 내용
항생제 검출 물질이 결합된 나노입자를 이용한 실제적인 사용 조건에서의 항생제 검출	○ 다중핵 자성나노입자의 표면에 카르복실 기능기를 부여하고, 이 기능기에 항체를 고정함. 항체에는 결합이 약한 형광물질을 표지하고, 표적물질로 치환하는 방법을 통하여 표적물질을 정량함.	○ 다중핵 자성나노입자의 표면에 카르복실 기능기는 화학적 공유결합을 통하여 형성하고, 이것은 dynamic light scattering method를 통하여 크기와 제타전위를 알아봄으로써 확인하였음. 항체 고정은 잘 알려진 EDC coupling을 통하여 이루어 졌고, 결합이 약한 형광물질을 표지한 후 표적물질에 의해서 치환되었을 때 형광을 관찰함으로써 표적물질을 정량함.
다기능성 다중핵-실리카 껍질 나노입자의 개발 및 그 응용성 타진	○ 다중핵 자성나노입자의 표면에 표면개질이 용이한 실리카를 형성시킴. 이렇게 준비된 다중핵 자성-실리카 나노입자 표면에 카르복실 기능기를 부여한 후 표적물질 검출 실험을 진행함.	○ 다중핵 자성나노입자는 표면을 polyvinylpyrrolidon, PVP를 매게체로 하여 실리카 껍질을 형성시킴. 잘 알려진 실리콘 화합물을 이용하여 표면에 아민 기능기를 부여하고, 이 아민기를 다시 카르복실 기능기로 바꿔 주었음. 이 카르복실 기능기에 항체를 고정하고, 결합력이 약한 형광물질을 표지함. 표적물질에 의해서 치환되었을 때 형광을 관찰함으로써 표적물질을 정량함.
개발된 proto-type 센서의 현장 적용 가능성 타진 (실험실 수준의 감도 및 정확도 측정 및 실제 사용 조건에서의 감도 및 정확도 확인)	○ 두 종류의 proto-type sensor를 이용하여 여러가지 항생제를 다양한 농도로 처리함으로써 현장에서 실제 사용할 수 있을지 확인함. 특히 항생제 배출 환경기준을 고려해 실험을 설계하고 진행함.	○ 항생제의 형광 유도체에서 얻을 수 있는 형광을 감지하거나, CNT-FET 기판에 결합된 scFv와 항생제 사이의 상호작용에 의한 전류변화를 관찰함으로써 센서의 감도를 확인함. 여러가지 fluoroquinolone 계열의 항생제, 특히 많이 남용되는 대표적 항생제인 enrofloxacin을 형광, ELISA, 전기화학적 방법으로 검출하고, 환경기준에 비해 낮은 detection limit을 가질 수 있도록 연구를 진행함.
센서의 감도 및 시료의 다	○ 항체와 선택적으로 결합하는 scFv를 전혀 다른 센서 플랫폼인	○ 단백질의 아민 작용기를 이용해 A2, F9 scFv를 agarose bead에 고정시키고 여기에

양성을 위하여 다양한 template에 적용을 시도함	agarose bead, 그리고 carbon nanotube-FET 소자 위에 고정시키고, 각 센서의 성능을 다양한 항생제 검출을 통해 테스트함.	항생제의 형광 유도체를 결합시킨 센서를 제작함. 실제 항생제가 들어있는 sample을 흘려줌에 따라 scFv로부터 떨어져 나오는 형광 유도체로부터 얻어지는 형광을 측정함으로써 항생제의 농도를 측정할 수 있음. 혹은 ELISA를 통해 측정하는 것도 가능함. Carbon nanotube 기판위에 scFv를 고정시키고 항생제 샘플을 흘려주어 서로 결합함에 따라 소자의 전류가 바뀌는 것을 관찰하여 항생제를 검출 감도를 측정함. 두 센서에서 얻은 결과를 비교함으로써 각 센서의 신뢰가능성을 확인하고, 감도와 linear range를 비교함.
전기화학에 기반해 제작된 proto-type 검출기의 작동 및 실험실 수준의 항생제 검출의 여부 및 감도 확인	○ carbon paste 전극을 스트립 형태로 제작하여 퀴놀론계 항생제를 검출하며, 이러한 전극을 현장에서 사용 가능하도록 portable type의 검출기를 제작함.	○ 잘 정제된 carbon powder를 미네랄 오일과 적정 비율로 혼합하여 paste 형태로 만든 후, 폴리이미드에 패턴이 형성된 전극면에 도포하여 carbon paste 전극을 만들고, 이 전극을 센서로 하여 수용액 상에서 항생제의 농도를 측정함. 또한 이 전극을 현장에서도 사용 가능하도록 배터리로 작동하는 portable type의 검출기를 제작함.
실제적인 사용 조건에서의 정확도 및 감도 확인을 통한 현장 적용 가능성 타진	○ 닭 농가에서 사용하는 닭 음용수를 대상으로 음용수에 녹아있는 항생제를 검출하는 기술을 개발하며 각종 방해 물질의 영향을 최소화하는 기술 개발	○실제로 닭을 사육하고 있는 농장에서 사용하는 닭 음용수를 확보하여 농장에서 사용하고 있는 항생제를 다양한 농도로 준비하여 검출 한계 및 검출 범위를 확인함. 또한 닭 농장 및 유통 업체의 검역 검사실을 방문하여 현장에서 직접 성능 평가 및 개선점 도출함.
비용과 센싱 효과 분석을 통해 가장 효과적이고 효율적인 육계, 산란계 농장의 항생제 센서시스템 적용 방안 최적화	○ 국내 및 해외의 센서를 사용한 USN 시스템 구축사례 및 비즈니스 모델 분석을 실시함 ○ 비즈니스 모델 구축을 위한 현장 답사 및 관련 전문가의 인터뷰를 진행함	○ 항생제 센서 관련 시장주체의 분석을 통해, 소비자, 축산농가, 축산브랜드별로 항생제 센서에 대한 서로 다른 니즈를 갖고 있음을 확인하였음. ○ 아직 항생제 센서를 적용한 사례는 존재하지 않기 때문에 국내의 머쉬하트와 제주도 가두리양식장의 사례 및 스페인의 토양센서 사례를 분석하였으며, 이를 통해 비즈니스 모델의 벤치마킹 사례로 활용하였음.

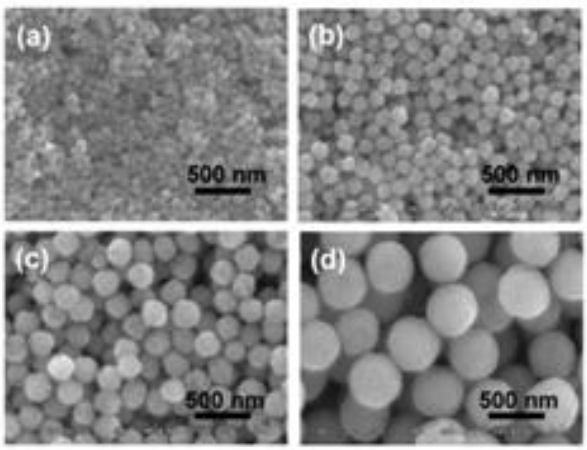
제 4절 세부별 연구수행 결과

제1세부: 나노입자를 이용한 항생제 물질 검출 및 농축

○ 다중핵 자성나노입자의 합성과 크기 조절

자성나노입자는 고밀도 자성 정보 저장체, 촉매 지지체, 생-물질 분리, 약물 전달 운반체, 바이오이미징 등 부품 소재 산업 분야뿐만 아니라, 바이오 산업에 다양하게 응용되고 있다. 자성 나노입자의 크기 증가는 포화 자기값을 증가시킬 수 있지만, 입자의 자기적 특성이 초상자성에서 강자성으로 변화될 수 있고, 이러한 나노입자는 용액에서 분산될 수 없다. 이러한 이유로 최근 수년 전부터 초상자성 나노입자들을 응집시킴으로써 크기를 증가시켜 자성 세기를 증가시키고, 초상자성은 유지함으로써 분산성이 우수한 자성 나노클러스터를 합성하는 시도가 이루어지고 있었다. 본 연구에서는 분산성과 자기적 특성이 우수한 다중핵 자성나노입자의 합성과 크기 조절을 시도하였다.

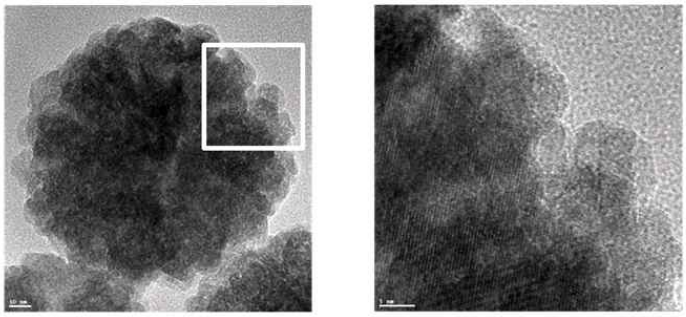
다중핵 자성나노입자의 합성은 Fe^{3+}이온의 약염기에 의한 가수분해 및 축합(hydrolysis/condensation), 가열에 의한 상변화 및 폴리올을 통한 Fe^{3+}의 부분적인 Fe^{2+}로 환원을 통해 합성이 된다고 생각되며, 아래 화학식 중 (1) 과정은 용액의 염기도를 결정하기 때문에 초기에 형성되는 의 젤의 크기를 결정하게 되고, 이것은 최종적으로 형성이 되는 자성 나노클러스터의 크기를 결정하게 된다. 즉 입자의 크기는 염화철, 소듐 아세테이트, 물, 에틸렌글라이콜 등의 반응물 비율에 의해서 조절될 수 있다.



다양한 크기의 자성 나노클러스터 입자. (a) 50 nm, (b) 100 nm, (c) 200 nm and (d) 400 nm

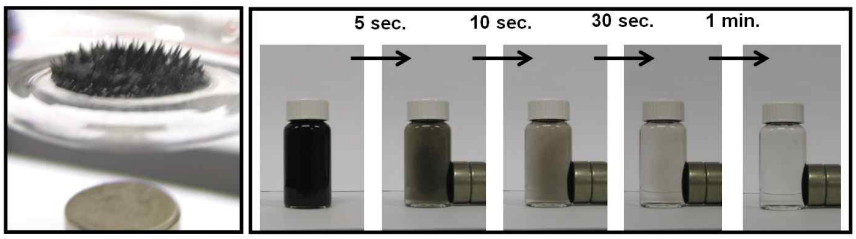
자성 나노클러스터 입자를 HR-TEM 으로 확인해 보면 높은 결정성을 가지고 있고, 여러 개의 작은 나노 입자들이 뭉쳐져서 하나의 클러스터를 형성하고 있음을 알 수 있다.

에탄올에 젖은 상태의 자성 나노클러스터 입자는 상용 자석에 가까이 가지고 갔을 때, 자기력선에 의해 나노클러스터 입자들이 정렬된 모습을 볼 수 잇고, 10 mg/mL 로 에탄올에 분산된 나노클러스터 입자가 들어 있는 유리 바이알 측면에 상용 자석



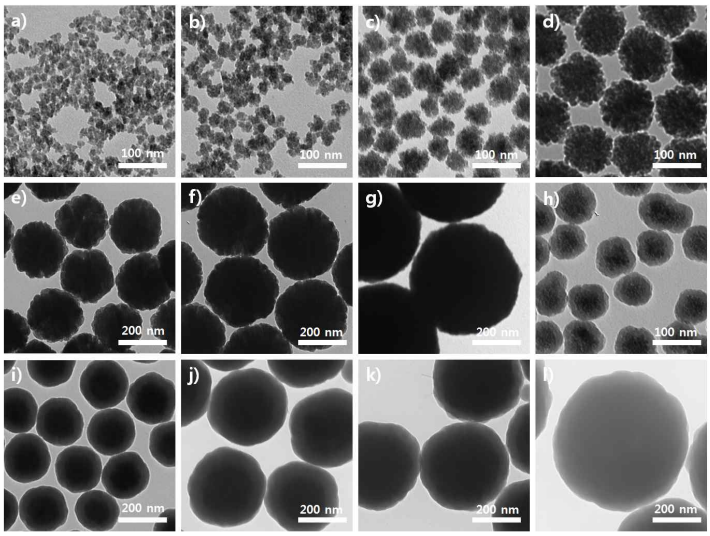
다중핵 자성나노입자의 HR-TEM 이미지

을 놓아두게 되면, 즉시 용액이 출렁이며 바이알이 끌려 오고, 5 초가 지나게 되면 거의 모든 콜로이드가 수집되며, 1분이 지나면 완전하게 수집되는 것을 확인하였다.



다중핵 자성나노입자의 자기 응답성

○ 다중핵 자성나노입자의 표면개질

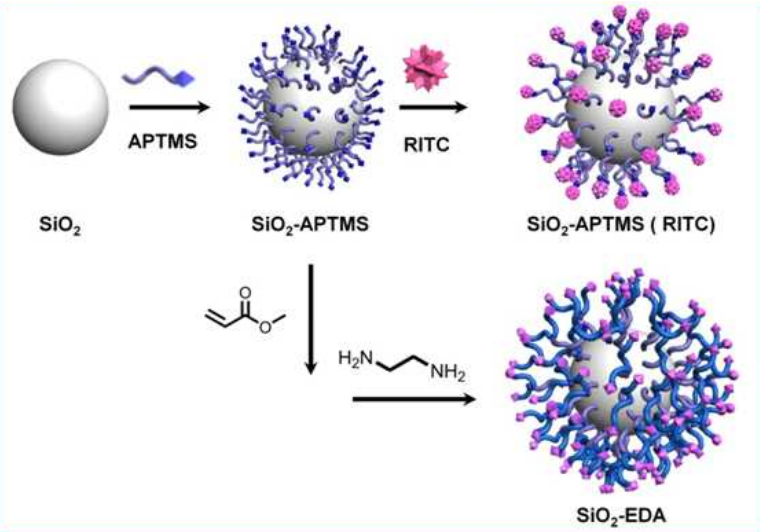


표면개질된 다중핵 자성나노클러스터의 TEM 이미지; a) 15 nm MGNC/PAA, b) 30 nm MGNC/PAA, c) 50 nm MGNC/PAA, d) 100 nm MGNC/PAA, e) 200 nm MGNC/PAA, f) 300 nm MGNC/PAA, g) 400 nm MGNC/PAA, h) 50 nm MGC/SiO_2, I) 100 nm MGNC/SiO_2, j) 200 nm MGNC/SiO_2, k) 300 nm MGNC/SiO_2, l) 400nm MGNC/SiO_2.

다중핵 자성나노입자는 에틸렌 글라이콜 용액에서 염화철 전구체의 환류를 통한 상변화를 통하여 합성되었다. 다중핵 자성나노입자의 수용액에 대한 우수한 분산성이 요구되므로, 합성된 다중핵 자성나노입자는 친수성을 가지지만 표면에 계면 활성제가 존재하지 않기 때문에 수용액에서 분산성이 떨어진다. 따라서 표면을 개질함으

로써 다중핵 자성나노입자의 분산성을 높일 필요가 있으며, 다중핵 자성나노입자 표면에는 계면 활성제가 존재하지 않기 때문에 표면 개질 과정이 비교적 간단하다. 고분자를 이용한 표면 개질의 경우 PAA를 이용하였고(그림 a-g), 실리카 껍질의 형성은 폴리바이닐피롤리돈으로 다중핵 자성나노입자를 에탄올에 이동시킨 후 TEOS의 염기 촉매 하 가수분해-축합 과정을 통하여 이루어 졌다 (그림 h-l).

○ 나노입자의 표면 기능기 정량분석

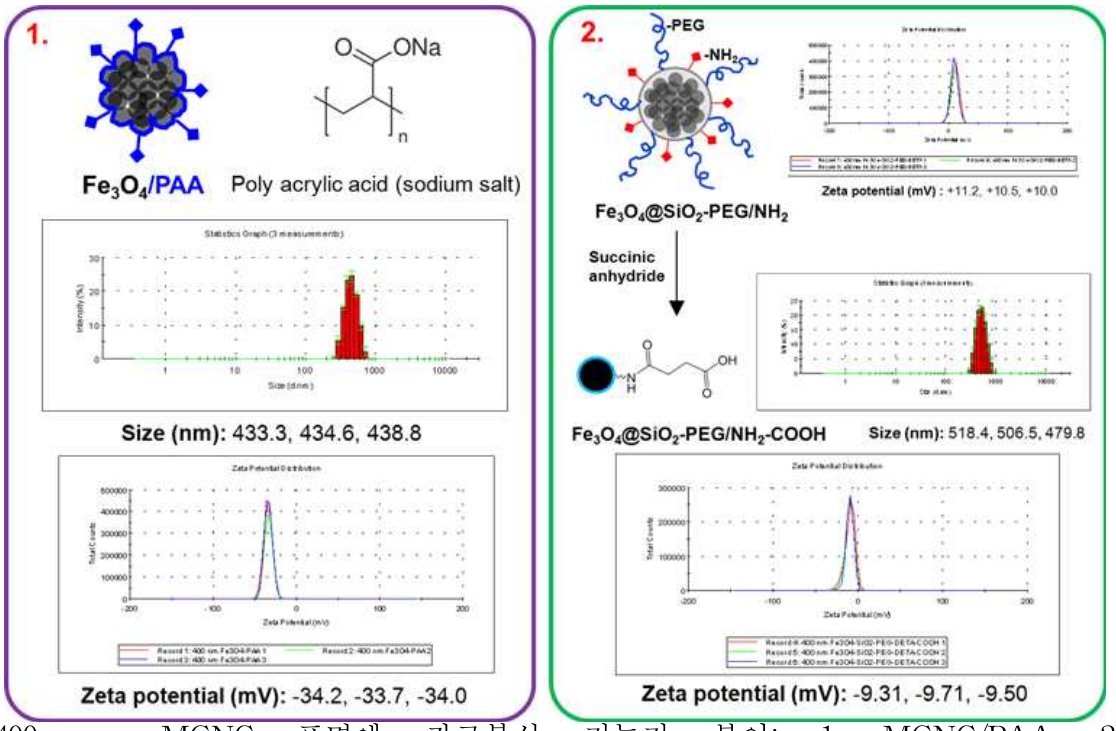


실리카 나노 입자에 amine 작용기를 가진 organosilane 화합물을 표면 처리 하게 되면 실리카 나노 입자 표면에 amine group 이 노출되게 된다. 이렇게 표면 처리 된 실리카 나노 입자 표면에 존재하는 amine group 이 얼마나 되는지에 대해 형광과 산-염기 적정을 통해 확인할 수 있었다. 기존에 보고된 실리카 표면의 OH group 의 개수는 Aerosol 이 4.8 ea/nm^2, fumed silica 가 7 ea/nm^2, colloidal silica 는 3.8~6.6 ea/nm^2 로, 표면에 존재하는 OH group 과 반응하는 표면 처리 물질은 3 개의 OH group 에 하나의 표면 처리 물질이 결합하기 때문에 앞서 언급한 값에 대해 3 으로 나누게 되면 표면에 존재하는 표면 처리 물질의 개수가 되고 표면 처리 물질에 하나의 amine group 이 존재한다면 표면 처리 물질의 개수가 곧 amine group 의 개수와 같게 됨을 알 수 있다. 따라서 보고된 자료에 의한 amine group 의 개수는 Aerosol 1.6 ea/nm^2, fumed silica 2.3 ea/nm^2, colloidal silica 1.2~2.2 ea/nm^2 임을 알 수 있다. 형광 실험을 통해 얻은 amine group 의 개수는 amine group 이 하나 존재하는 표면 처리 물질(APTMS)이 0.44 ea/nm^2, amine group 이 세 개 존재하는 표면 처리 물질(DETAS)에서는 1.3 ea/nm^2 로 앞서 구한 값과 비교해 보았을 때 2.7 ~ 5.2 배 가량 차이가 나는데 이러한 결과는 실험에 사용한 organic dye 의 구조가 bulky 하여 표면에 존재하는 모든 amine group 과 반응하지 못했기 때문이라 여겨진다. 따라서 산-염기 적정을 통해 정량을 하게 되면 이러한 문제를 해결할 수 있을 것으로 생각하여 산-염기 적정으로 앞서 표면 처리했던 실리카 나노 입자들을 정량해 보았다. 그 결과 SiO_2-APTMS 의 경우 2.7 ea/nm^{2}로 보고된 값과 비슷한 값을 갖는 다는 것을 확인할 수 있었고, SiO_2-DETAS 는 7.7 ea/nm^2 로 SiO_2-APTMS 보다 약 3배 가량 많은 amine group 이 존재한다는 것을

알 수 있었다. 또한 SiO_2-APTMS 에 2 차적인 반응을 통해 amine group 의 개수를 증가시킨 SiO_2-EDA 의 경우 6.8 ea/nm^2 로 SiO_2-APTMS 보다 약 2.5 배 가량의 amine group 이 증가하였음을 확인할 수 있었다.

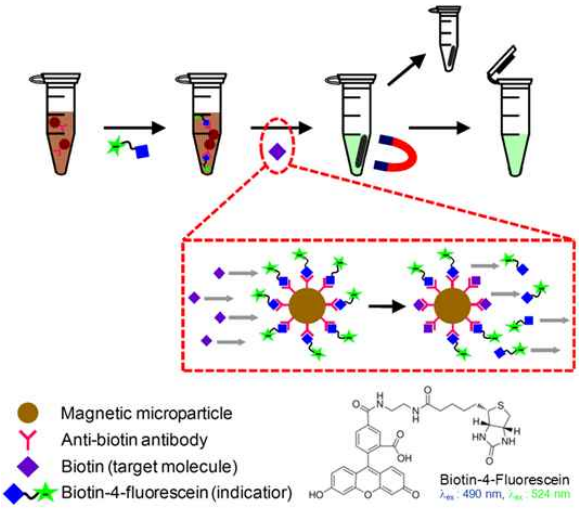
○ 형광 표지된 다중핵 자성나노입자를 이용한 저분자 검출 기술 개발

본 연구는 검출 대상의 특징을 활용하며 감도를 향상 시킬 수 있는 측정 기술을 도입한 것으로서 저분자 검출하는데 유용하게 쓰일 분석 기술로 발전시킨다는데 그 목표가 있다. 일반적으로 생물학적 활성을 띠는 저분자들을 검출하는데 임상적 혹은 환경 분석 특히 항생제 검출에 있어서 매우 중요하다. 이러한 저분자들은 크기가 작아 항체와 반응하는 항원 요소가 매우 적기 때문에 면역분석법 중 경쟁적인 면역학적 분석법으로만 검출이 가능하다. 그러나 경쟁적인 면역학적 분석법은 감도가 좋지 않다는 단점을 가지고 있다. 항생제 물질의 대부분도 저분자에 속하기 때문에 일반적인 면역학적 분석법으로는 감도 향상에 있어서 한계를 나타낸다. 그렇기 때문에 이러한 경쟁적인 면역학적 분석법의 감도를 향상시키기 위해 농축 기술을 접목시켜 저분자 검출에 있어서의 발전가능성을 보였다.

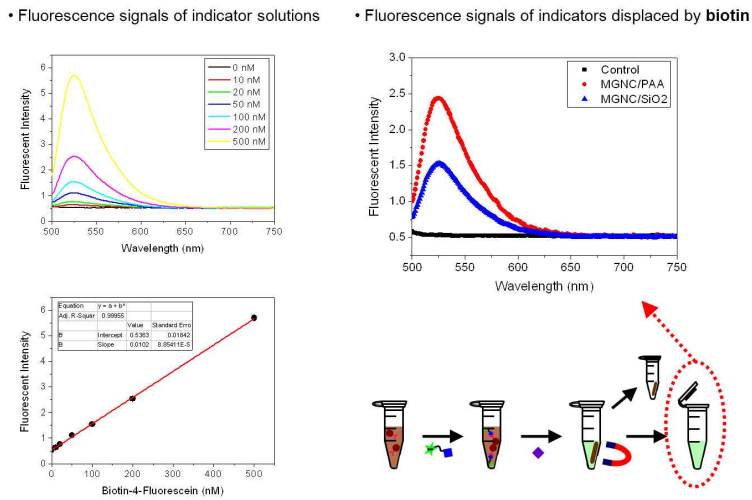


400 nm MGNC 표면에 카르복실 기능기 부여; 1. MGNC/PAA, 2. MGNC@SiO2-PEG/NH2-COOH

다중핵 자성나노입자에 항체를 붙이기 위해 입자의 표면에 카르복실 기능기가 필요하므로, 400 nm 다중핵 자성나노입자 표면에 Poly(acrylic acid), PAA 고분자를 코팅하거나 실리카 껍질을 형성시킨 후 실리콘 화합물을 이용하여 카르복실 기능기를 부여하였고, 표면에 존재하는 카르복실 기능기는 제타 전위를 통하여 확인되었다.



항체가 고정된 다중핵 자성나노입자 표면에 형광 표지와 저분자 검출 과정을 나타낸 모식도.



형광 표지된 다중핵 자성나노입자를 이용한 저분자 검출 결과; 왼쪽 그림은 Biotin-4-Fluoroscein의 검정선이고, 오른쪽 그림은 표적 저분자에 의해서 치환된 후의 Biotin-4-Fluoroscein의 형광 세기를 보여주고 있음.

본 실험에서는 항생제와 같은 저분자를 농축 시술을 통하여 검출을 시도하였다.. 저분자인 biotin과 저분자 형광 유도체인 biotin-4-fluorescein 간의 anti-biotin antibody 결합력 차이를 이용하였다. 다중핵 자성나노입자에 anti-biotin antibody를 결합하고, 그 이후에 형광을 띤 저분자 유도체와 반응을 시켰다. 그 후 검출하고자 하는 저분자인 biotin과 반응시켜, 저분자 형광 유도체를 anti-biotin antibody 결합력 차이로 인해 다중핵 자성나노입자에서 떨어뜨린다. 외부 자기력을 이용해 다중핵 자성나노입자를 분리시키고 형광을 띤 저분자 유도체가 녹아 있는 용액을 덜어내서 형광 정량을 시도하였다. 같은 양의 다중핵 자성나노입자를 사용했을 때, MGNC/PAA가 MGNC/SiO2 보다 두배 이상의 더 많은 저분자를 검출할 수 있었고, 이것은 MGNC/PAA에 더 많은 카르복실 기능기가 존재하기 때문이다. 즉

MGNC/PAA에 더 많은 항체를 고정할 수 있게 되어 더 많은 저분자 형광 indicator (biotin-4-fluorescein)이 표적 저분자 (biotin)에 의해서 치환되었기 때문이다.

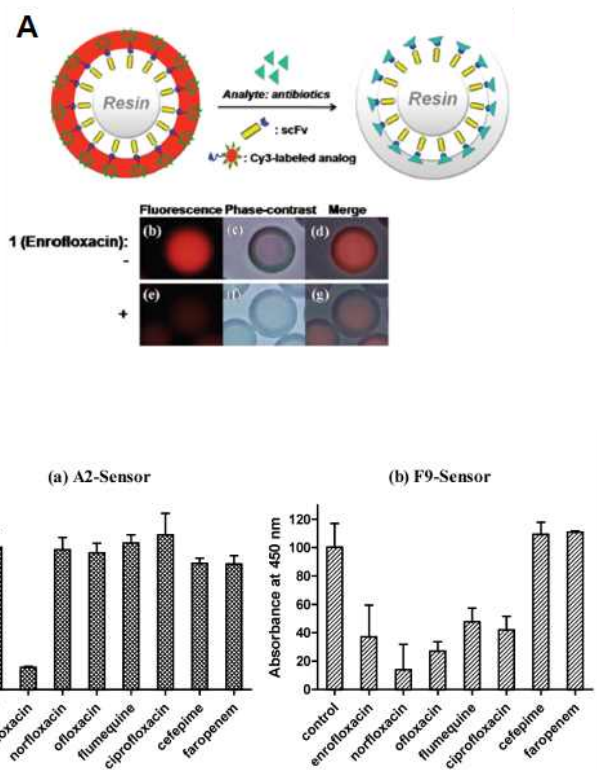
저분자의 선택성을 알아보기 위해 biotin을 이용하여 같은 실험을 수행하였고, 표적 저분자인 biotin이 훨씬 농축이 잘 되는 것을 확인함에 따라 뛰어난 선택성과 감도를 보였다. 이 실험은 저분자를 검출하는데 있어서 경쟁적인 면역반응의 감도가 좋지 않는 단점을 극복하고자 형광 저분자 유도체의 특징을 활용며 감도를 향상시킬 수 있는 농축 기술을 도입한 새로운 분석 플랫폼으로 실제 항생제를 이용해서도 적용할 수 있는 가능성을 타진하였다. 또한 항생제뿐만 아니라 시료의 다양성 적용이 가능할 것이며, 개념 증명으로서 저분자의 biotin과 저분자 형광 유도체인 biotin-4-fluorescein을 이용하여 분석이 가능함을 검증할 수 있었다.

나. 제2세부: 항생제 물질의 선택적 검출을 위한 리셉터 물질 개발 및 형광분석 기술 개발

○ Single-chain variable fragment (scFv) 기반 바이오 센서 시스템

본 연구에서는 오남용된 fluoroquinolone 항생제를 형광 검출법 방법을 통해 정량적으로 센싱하고자 하는데 그 목표가 있다. 이를 위해 항체의 일부분인 single-chain variable fragment (scFv)를 이용하여 Pyridone Carboxylic acid를 pharmacophore로 갖는 모든 fluoroquinolone 계열 항생제를 검출하기 위한 general sensor (F9 scFv sensor)와 특정 fluorequinolone 항생제 (예: enrofloxacin) 만을 특이적으로 검출하기 위한 specific sensor (A2 scFv sensor) 를 개발하였다. Fluoroquinolone의 pharmacophore의 합리적인 구조 변형을 통해 유도체를 합성하였고, 이를 phage display를 이용해 합성된 다량의 scFv 라이브러리와의 binding 여부를 ELISA를 통해 검색하므로 써 이러한 바이오센서의 fluoroquinolone 항생제에 대한 보편성 (F9 scFv) 과 특이성 (A2 scFv) 을 얻는 scFv를 발굴하였다. 이렇게 얻어진 scFv와 fluoroquinolone 비오틴 유도체에 대한 친화력은 SPR을 통해 검증되었다. (A2와 enrofloxacin 비오틴 유도체는 2.5 uM, F9과 norfloxacin 비오틴 유도체는 1.58 uM의 친화력을 갖는 것으로 확인되었다.) 또한 설계했던 대로, A2는 enrofloxacin만을 특이적으로 인지하고, F9은 pyridone carboxylic acid를 pharmacophore로 갖는 fluoroquinolone 항생제는 인지하지만 위의 구조를 갖지 않는 β-lactam과 같은 항생제는 인지하지 않는 보편성을 ELISA를 통한 competition assay를 통해 확인하였다. 마지막으로 비오틴 대신에 Cy3 형광 염료를 도입하여 enrofloxacin-Cy3 유도체와 norfloxacin-Cy3 유도체를 합성하여, 형광 센서 시스템을 구축하고자 하였다. scFv는 CNBr agarose resin과 같은 고체 지지체에 공유결합을 통해 고정화 되었고, 고정화된 scFv와 binding 하고 있던 Cy3 유도체들이 시료내의 fluoroquinolone 항생제에 의해 경쟁적으로 치환됨으로써 resin의 형광 세기가 감소하게 되는 turn-off sensor 시스템을 개발하였다. 이 연구의 결과는 2011년 1월에 ACS의 Bioconjugate Chem.에 보고되었고 (Bioconjugate Chem. 2011, 22, 88—94), 국내 특허 출원중이다. (출원번호: 10-2010-0029849, 출원일 :2010년 4월1일) 또한 후속 연구로 본 시스템을 카본나노튜브에 적용하여 전기 신호로 검출할 수 있는 고감도의

센서 시스템 개발을 진행하고 있다.

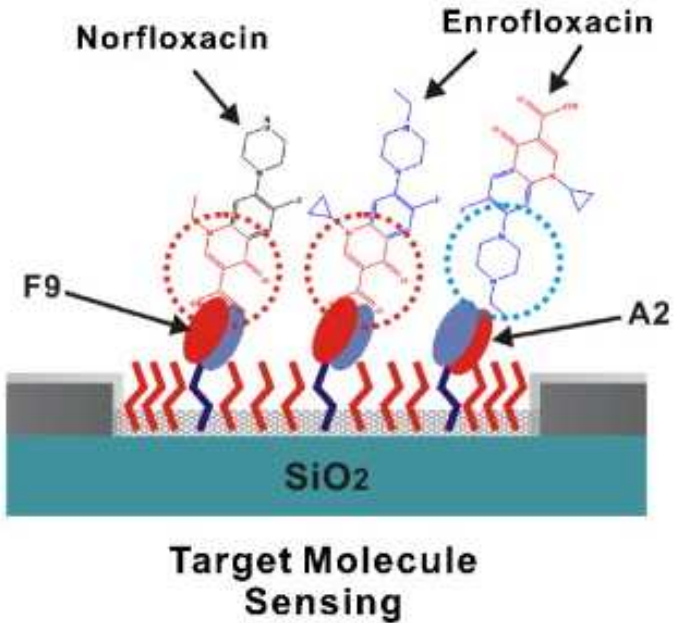


A: 형광 유도체와의 경쟁적 치환을 이용한 시료내의 fluoroquinolone 항생제를 정량적으로 검출하기 위한 형광 센서 시스템, B: enrofloxacin에 특이성을 갖는 A2 센서와 (a), fluoroquinolone 항생제에 보편성을 갖는 F9 센서(b)

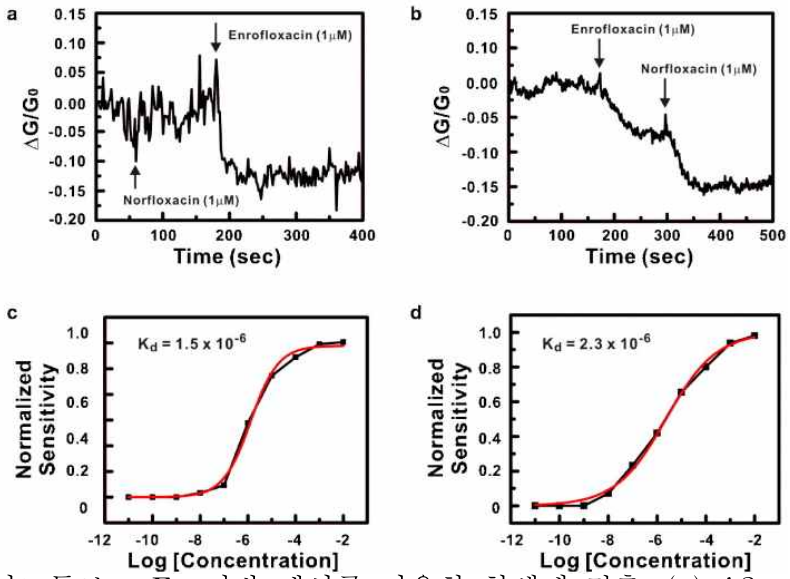
○ 전기 신호의 변화를 통해 타켓 항생제를 검출하는 새로운 센서시스템을 개발

본 연구에서는 2010년의 연구성과로 얻어진 single-chain variable fragment (scFv) 기반 바이오 센서 시스템을 카보나노튜브에 적용하여, 전기 신호의 변화를 통해 타켓 항생제를 검출하는 새로운 센서시스템을 개발하였다. 지금까지 확보된 scFv는 두 가지로써 하나는 Pyridone Carboxylic acid를 pharmacophore로 갖는 모든 fluoroquinolone 계열 항생제를 검출할수 있는 general sensor (F9 scFv sensor), 또 다른 하나는 fluorequinolone 계열 항생제 중 enrofloxacin만을 특이적으로 검출할 수 있는 specific sensor (A2 scFv sensor)이다. 이를 바탕으로 실용적인 휴대용 센서를 제작하기 위해 카본나노튜브 기반 센서에 관한 연구가 진행되었다. 먼저 산화실리콘(SiO2)기판 위에 single-wall carbon nanotube (swCNT)를 단일층으로 흡착시킬 수 있었다. 그리고 일반적인 photolithography 방법을 통해 source 전극과 drain 전극을 형성해준다. 이 전극은 버퍼를 통한 전류 새어나감을 막기 위해 photoresist로 감싸 보호하게 된다. 이렇게 제작된 CNT 기판에 scFv를 고정화 시키기 위해 linker로 1-pyrenebutanoic acid succinimidyl ester (PBSE), spacer로

1-pyrenbutanol (PB)을 사용한다. 이 두 분자는 모두 pyrene을 포함하고 있기 때문에 CNT위에 pi-pi 상호작용을 통해 흡착될 수 있다. 여기서 succinimidyl ester는 scFv를 고정화하기 위한 작용기로 이용되며, 1-pyrenbutanol은 단백질과 항생제가 CNT에 비특이적으로 결합하는 것을 막아준다. 이렇게 제작된 기판 위에 단백질을 넣고 반응시키면 단백질에 존재하는 amino group에 의해 scFv가 고정화된 전기화학적 바이오 센서가 완성된다. 아래 그림에서 이렇게 제작된 전기화학 바이오센서의 성능을 살펴볼 수 있다. scFv는 analyte가 결합함에 따라 결합 표면의 음전하가 줄어들기 때문에 그에 따른 기판 위 전하의 변화로 전류의 흐름이 바뀌게 된다. 여기서 제작된 센서의 경우, 항생제가 결합함에 따라 전류가 줄어들게 되고 이를 관측함으로써 특정 항생제의 존재 여부를 검출할 수 있다. 예상했던 대로 A2 기반 센서는 enrofloxacin만을 검출할 수 있었고 (그림 (a)), F9 기반 센서는 같은 fluoroquinolone 계열인 enrofloxacin과 norfloxacin을 모두 검출할 수 있었다 (그림 (b)). 한편, fluoroquinolone계열이 아닌 beta-lactame 계열의 항생제는 A2, F9 기반 센서 모두에서 전류변화를 일으키지 않았다. 또 이 센서를 통해 얻은 scFv와 항생제 사이의 평형 상수가 이전 연구에서 SPR을 통해 얻은 값과 아주 유사한 것으로 보아 본 연구 결과를 신뢰할 수 있다고 판단하였다. 위의 연구결과는 2012년 2월 Elsevier사의 Sensors and Actuators B: Chemical에 게재 승인되었다. (Family-selective detection of antibiotics using antibody-functionalized carbon nanotube sensors, 2012,SensorsandActuatorsB:Chemical.InPress)



카본나노튜브와 scFv를 이용한 전기화학적 항생제 센서 시스템



카본나노튜브-scFv 기반 센서를 이용한 항생제 검출. (a) A2 scFv기반 센서는 enrofloxacin이 존재할 때에만 전기화학적 신호의 변화를 나타낸다. (b) F9 scFv기반 센서는 enrofloxacin, norfloxacin 모두에 반응한다. (c) A2 scFv기반 센서를 이용해 측정한 A2-enrofloxacin 사이의 평형상수. (d) F9 scFv기반센서를 이용해 측정한 F9-norfloxacin 사이의 평형상수.

다. 제3세부: 항생제 물질의 선택적 검출을 위한 전기화학분석 기술 개발

(1) 1년차 연구 내용 및 결과

(가) 연구 내용 : 항생제의 전기화학적 거동 확인

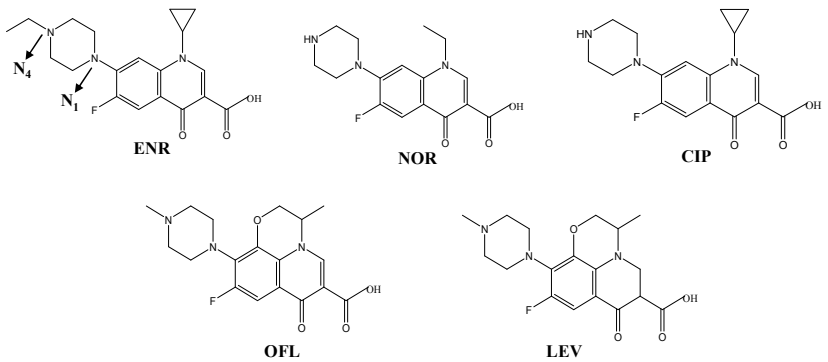
- 대상항생제가 전기화학적인 센서 신호를 발현할 수 있는 이상적인 조건 탐색
- 전극의 재질과 형태, 인가하는 전압의 크기 및 파형 등 방법론의 일반화

(나) 연구 결과

- 날리딕식산 (nalidixic acid)으로부터 합성되는 플루오로퀴놀론(fluoroquinolone)계 항생제는 이종방향족, 이중환을 가지고 있어 DNA 복제에 필요한 효소인 DNA 자이레이스 (DNA gyrase)와 결합하여 DNA 합성 자체를 막아 세균의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 그람 양성 세균, 그람 음성 세균 등의 미생물에 탁월한 효과를 가지는 것으로 보고되고 있어 의학과 수의학 분야에서 치료 목적으로 널리 사용되고 있음.
- 또한, 축산물과 수산물의 세균성 질병의 방지 및 치료를 위해서 축수산용 항생제로 플루오로퀴놀론 계 항생제를 많이 사용하고 있음.
- 반면, 본 연구에서 보고하는 전기화학적 검출법은 기존의 검출 방법들이 가지고 있는 성능을 유지하면서, 사용의 편리성, 낮은 비용 등의 장점을 가지고 있음. 더욱이 퀴놀론 계 항생제들은 전기화학적으로 활성을 지니고 있어서 전기

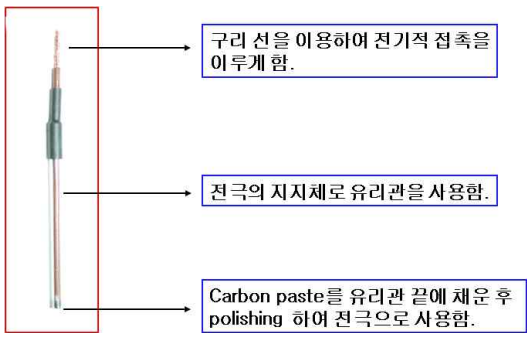
화학적 방법을 이용한 검출법을 적용하는데 아주 유리한 장점이 있음.

- 본 과제에서는, 플루오로퀴놀론 계 항생제인 Enrofloxacin(1-Cyclopropyl-7-(4-ethyl-1-piperazinyl)-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolone carboxylic acid ; ENR), Norfloxacin(1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazinyl-1H-quinoline-3-carboxylic acid ; NOR), Ciprofloxacin (1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazinyl-quinoline-3-carboxylic acid ; CIP), Ofloxacin (9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-de]-1,4-benzoxacine-6-carboxylic acid; OFL), Levofloxacin ((-)-(S)-9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazine-6-carboxylicacidhemihydrate(I); LEV) 등의 5 가지의 물질에 대한 전기화학적인 거동을 확인하고 네모파 흡착 벗김 전압전류법으로 각 항생제들을 검출하였음. 실험에 사용한 5 가지 항생제의 구조식은 아래 그림에 나타내었음.



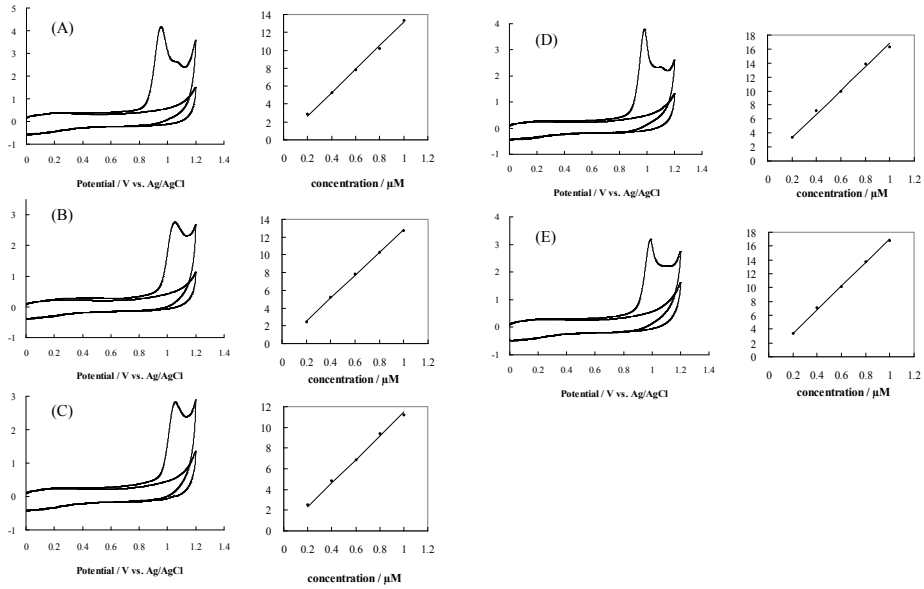
실험에 사용한 항생제의 화학적 구조.

- 검출에 사용하기 위하여 제작한 전기화학 센서로는 carbon paste electrode(CPE)를 사용하였으며 그 형태는 아래 그림과 같음.



항생제 검출에 사용한 carbon paste electrode의 구조

- 정확한 검출을 위하여 매 실험 후, 전극 표면을 polishing하여 새 전극 면이 노출되도록 하였음.
- 각 항생제에 대한 전기화학적 산화 반응에 대한 전압전류곡선과 농도 별 측정에 따른 보정 곡선은 다음과 같음.



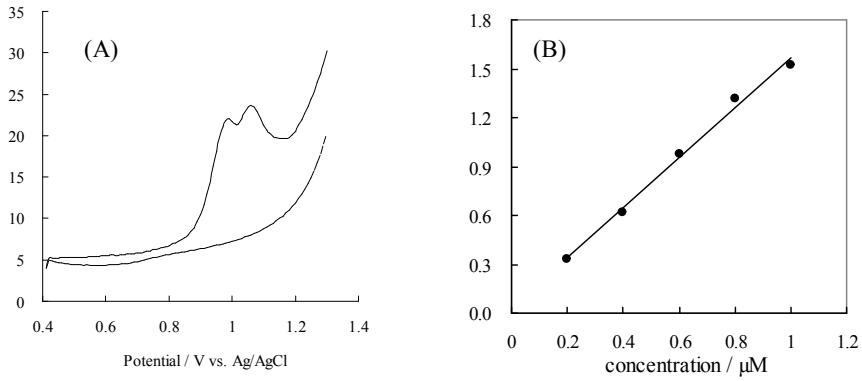
acetate 완충 용액(0.1 M, pH 4.5) 내에서 각 항생제에 대한 전기화학적 산화 반응에 대한 전압전류곡선과 농도 별 측정에 따른 보정 곡선 (0.1 M, pH 4.5). (A) ENR, (B) NOR, (C) CIP, (D) OFL, (E) LEV.

- 실험 결과, 전해질 용액의 pH가 산화 반응에 크게 영향을 미침. 본 실험에서는 각 항생제들이 혼합되어 있는 시료에서의 총량 분석을 고려하여 0.1 M 아세트산 완충용액 (pH 4.5)을 전해질로 사용하였음.
- 또한 항생제 검출의 민감도를 높이기 위하여 각 항생제가 녹아 있는 용액에 CPE에 0 V vs. Ag/AgCl 에서 120초 동안 노출하여 항생제가 전극 표면에 충분히 흡착되도록 한 후 순환 전압전류법을 이용해 산화 거동을 관찰하였음.
- 실험 결과는 0.2 μM 에서 1.0 μM 사이의 농도 범위에서 얻었으며, 아래 표에 각 항생제의 산화 전위와 항생제 별 감도를 표시하였음.

	ENR	NOR	CIP	OFL	LEV
potential / V vs. Ag/AgCl	0.952	1.052	1.055	0.983	0.990
sensitivity / μA/μM	13.36	12.72	11.20	16.32	16.77

각 항생제의 산화 전위와 감도

- 다섯 가지 항생제를 균등하게 섞어 총 농도가 1 μM 인 상태로 만들어 아세트산 완충용액 (pH 4.5)에서 네모파 흡착 벗김 전압전류법으로 얻은 전압전류도와 항생제의 총 농도가 0.2 μM 에서 1 μM 사이의 범위에서 얻은 보정 곡선을 보여주고 있음.



다섯 가지 항생제의 혼합 용액의 네모파 흡착 벗김 전압전류도(A)와 농도 변화에 따른 보정 곡선(B).

- 혼합된 항생제 용액의 경우, 산화 피크가 하나로 나타나지 않고 각 항생제들의 산화 피크가 혼재한 형태로 전압전류도가 나타남을 알 수 있으며, 산화 전위 영역이 0.95V~1.05V vs. Ag/AgCl 에서 존재하고 있음.
- 이렇게 혼합된 시약의 산화 피크가 하나로 나타나지 않는 경우, 각 농도에서 산화 전류가 흐르는 면적을 측정하여 보정 곡선을 얻었음. 이런 방법을 통하여 얻은 결과로부터 항생제의 총 농도와 측정한 면적 간에 비례 관계가 있음을 확인하였으며 항생제의 총량 검출 실험에서 얻은 민감도는 1.52 C μM−1임.
- 이와 같은 실험 결과가 축수산 현장에서도 의미가 있는지 검증하기 위하여 실제로 농장에서 닭들이 마시는 축산용 음용수를 채취하여 실험하였다. 이 음용수에는 ENR이 항생제로 포함되어 있는데, 실험해 본 결과 산화 전위 영역 내에서 ENR에 해당하는 산화 반응 외에 다른 산화 반응은 관찰되지 않았음.
- 즉, 네모파 흡착 벗김 전압전류법과 같은 전기화학적 측정법으로 항생제의 개별적인 검출뿐만 아니라 축수산 현장에서 개별적인 항생제에 대한 정보가 없다 하더라도 현장에서 사용하고 있는 항생제의 총량을 검출해 낼 수 있는 가능성을 확인하였음.

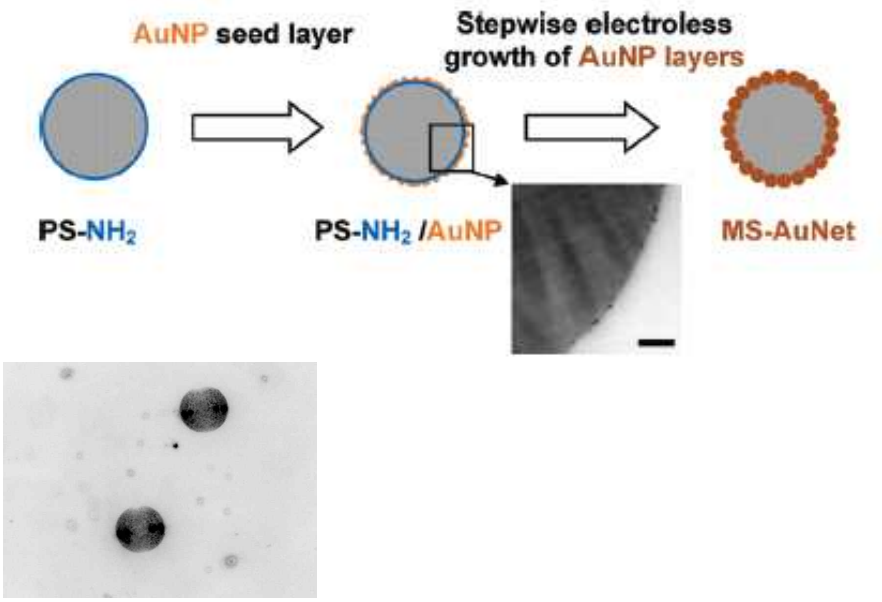
(2) 2년차 연구 내용 및 결과

(가) 연구 내용 : 감도 향상을 위한 다양한 검출 시스템 개발
- 라만분광법을 이용한 항생제 검출
- 감도 향상을 위한 미세 농도 물질 농축 기술 접목

(나) 연구 결과

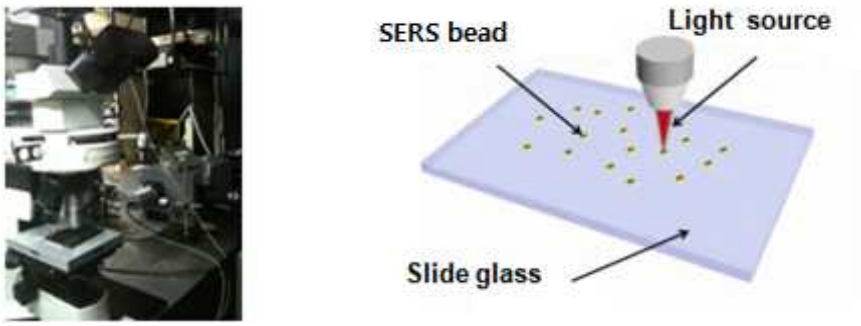
① 라만 분광법을 이용한 항생제 검출

- 전기화학적인 검출 방법 이외의 검출 방법을 개발하여 1 년차 연구에서 얻은 전기화학적 검출 방법과 상호 보완적인 검출 시스템을 구축하고자 하였음.
- 그러한 방법들 가운데 하나로 표면 증강 라만 분광법(surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)을 시도하였음.
- SERS 신호를 증폭하기 위하여 금 또는 은이 코팅된 마이크로 미터 크기의 비드(SERS 비드)를 사용하였음. 사용한 SERS 비드의 개념도과 형태는 아래 그림에 나타내었음.



SERS를 사용한 항생제 검출에 사용한 SERS 비드의 구조와 현미경 사진.

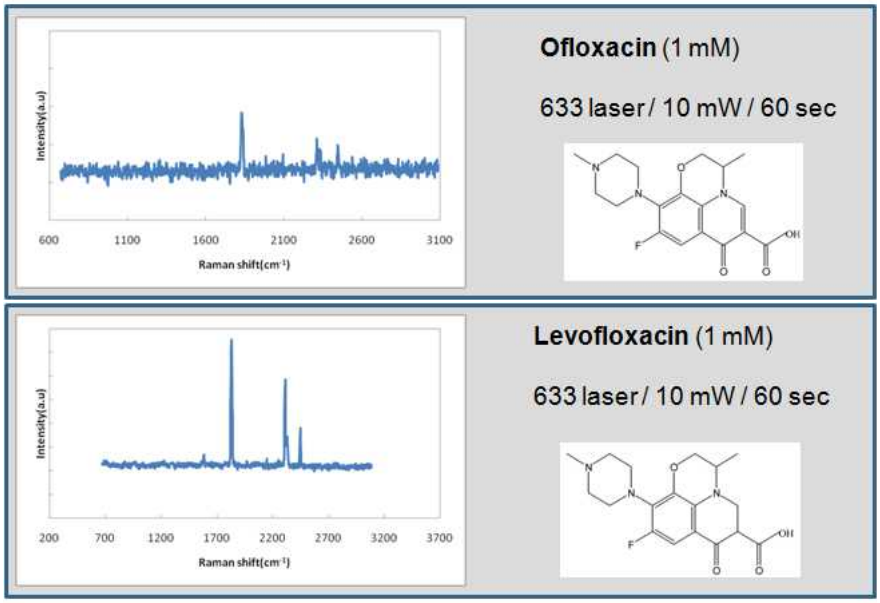
- 일반적으로는 검출 물질이 녹아있는 샘플에 SERS 비드를 분산시켜 현미경 등으로 관찰하면서 SERS 신호를 얻을 수 있음.



현미경이 장착된 라만 분광기와 SERS 측정에 대한 개념도.

- 위와 같은 방법으로 퀴놀론 계 항생제의 검출을 시도하였음. 1년차 연구에서 테스트 하였던 다섯 가지 항생제들에 대하여 SERS 신호를 검출하였는

데, 그 중 LEV와 OFL 두 종류에 대하여 검출 성공함.

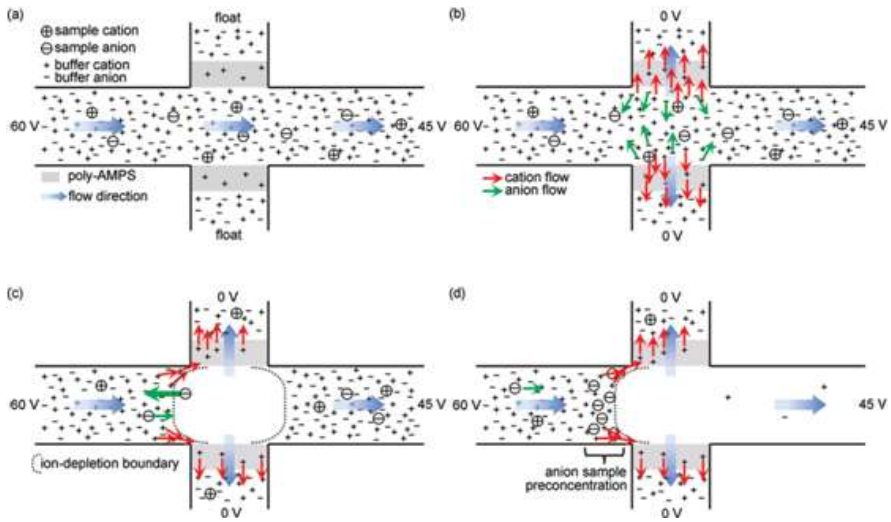


퀴놀론계 항생제에 대한 SERS 검출 스펙트럼.

- 실험 결과 보다 정확한 검출을 위해서는 농축을 위한 전처리 기술을 적용하여 항생제의 농도를 농축할 필요성이 확인됨.

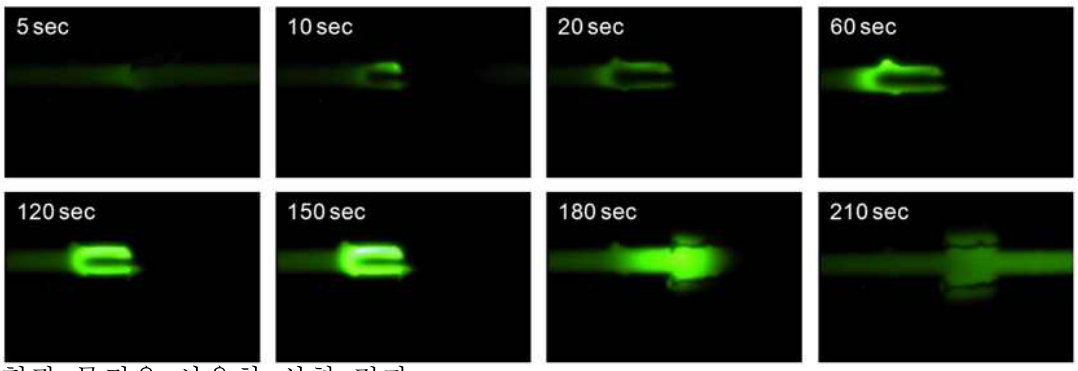
② 감도 향상을 위한 미세 농도 물질 농축 기술 접목

- 마이크로 칩 상에서 특정 검출 물질을 농축할 수 있는 기술을 개발하였음.
- 개발된 내용은 아래 그림에 나타내었음. (a) ~ (d)의 단계를 거쳐 특정 물질(그림에서는 음이온 물질)을 결핍 영역 좌측에 농축할 수 있었음.



검출 감도를 향상하기 위하여 대상 물질을 마이크로 칩 상에서 농축시키는 기술의 개념도.

- 형광 물질을 이용하여 그림 8과 같은 단계에 따라 실험한 결과 예상대로 형광물질이 농축되어 형광의세기가 점점 더 커지는 것을 확인함.



형광 물질을 사용한 실험 결과.

- 본 결과를 항생제의 분광학적 검출에 사용할 경우, 보다 향상된 검출 결과를 얻을 것으로 예상됨.

(3) 3년차 연구 내용 및 결과

(가) 연구 내용 : 전기화학에 기반한 고감도 항생제 검출 기술 완성

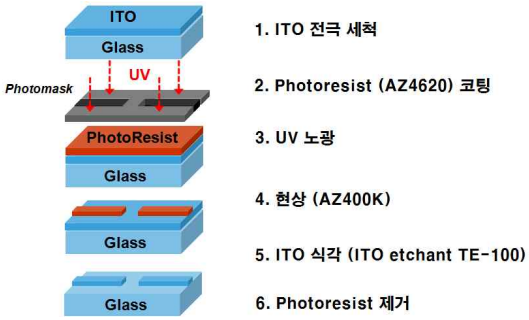
- 낮은 배경전류를 갖고 큰 신호 증폭을 얻기 위한 ITO 전극 개발 및 집적화 전극을 통한 전기화학신호 증폭 극대화
- 검출 한계를 낮추고 소형화 할 수 있는 전기화학 기반 항생제 센서 개발

(나) 연구 결과

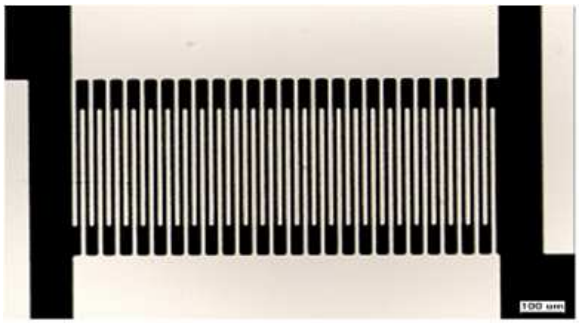
① 낮은 배경전류를 갖고 큰 신호 증폭을 얻기 위한 ITO 전극 개발 및 집적화 전극을 통한 전기화학신호 증폭 극대화

- 반도체 공정을 이용하여 마이크로 스케일의 선폭을 갖는 ITO전극을 제작함.
- 집적화된 전극 어레이는 마이크로 전극 고유의 특성상 낮은 배경 전류를 가지는 장점이 있으며, 검출 물질이 극미량의 농도로 존재하는 경우, 센서 부분을 반복 노출시키는 효과가 있어 검출 한계를 향상할 수 있음. 제작 과정 및 제작된 전극 형태는 다음과 같음.

(A)



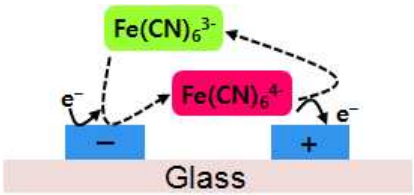
(B)



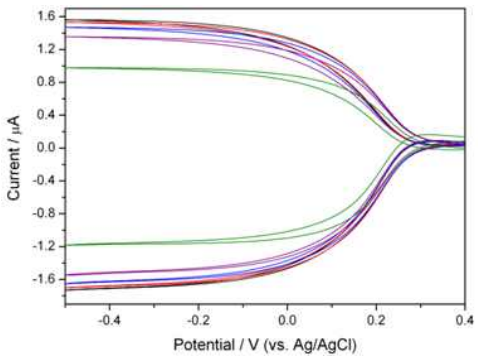
집적화 전극 어레이의 제작. (A) 전극 제작을 위한 공정, (B) 제작된 집적화 전극 어레이의 형태.

- 위와 같이 제작된 전극 어레이의 성능을 확인하기 위하여 ferricyanide의 산화/환원 반응을 관찰함.

(A)



(B)



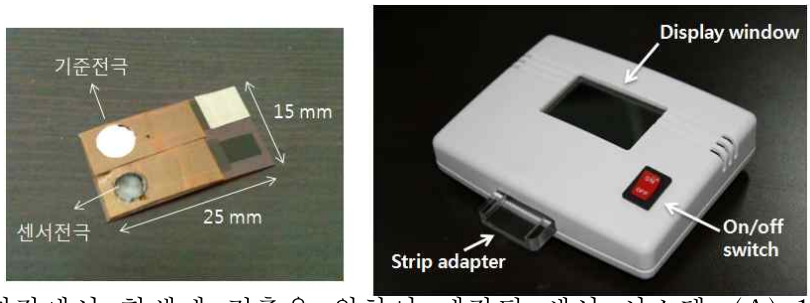
집적화된 전극 어레이에 의한 전기화학 신호 검출. (A) 전극에서 ferricyanide의 산화/환원 반응의 모식도, (B) ferricyanide의 산화/환원 반응의 전압전류도.

- 실험 결과 마이크로 전극에서 관찰할 수 있는 전형적인 ferricyanide의 산화/환원 반응을 전극 어레이에서도 확인할 수 있었으며, 또한 집적된 전극 구조의 결과로 전기 신호가 크게 증폭됨을 확인할 수 있었음.

② 검출 한계를 낮추고 소형화 할 수 있는 전기화학 기반 항생제 센서 개발

- 1년차 연구 결과를 바탕으로 carbon paste electrode를 이용하여 현장에서도 사용 가능한 항생제 센서를 개발하였음.
- 현장에서 전문가 및 비전문가 모두 쉽게 사용할 수 있도록 센서의 형태를 1회용 스트립 형태로 제작하였음.
- 1회용 스트립 센서는 2전극 시스템인데, 센서 전극은 carbon paste이며 기준전극은 Ag/AgCl paste 로 제작되었음.
- 또한, 이렇게 제작된 스트립 센서를 장착하여 항생제를 검출할 수 있는 기기를 제작하였다.

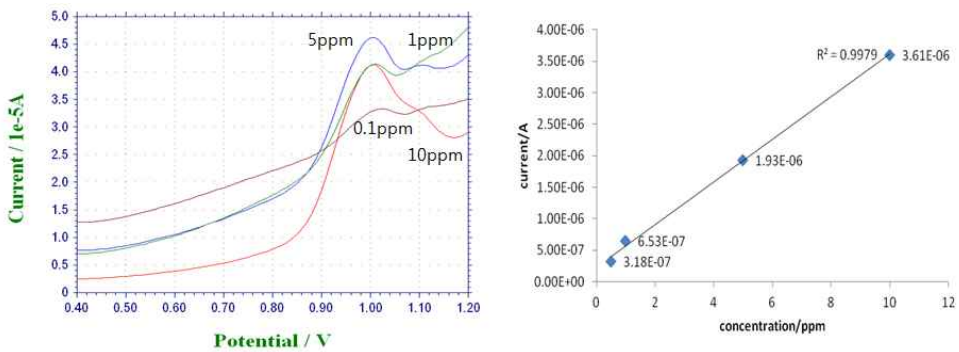
(A) (B)



현장에서 항생제 검출을 위하여 제작된 센서 시스템. (A) 1회용 스트립 센서, (B) 1회용 스트립 센서를 장착하여 항생제를 검출하는 기기.

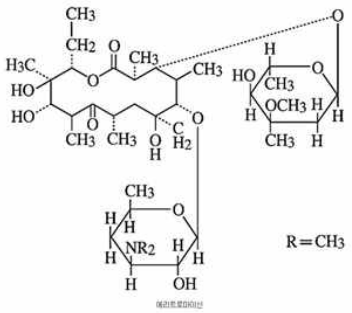
- 위의 스트립 센서와 검출기기를 이용하여 항생제 들 가운데 ENR에 대하여 테스트한 결과, 아래 그림과 같은 결과를 얻을 수 있었음. 현재 0.1 ppm까지 검출 가능함을 확인.

(A) (B)



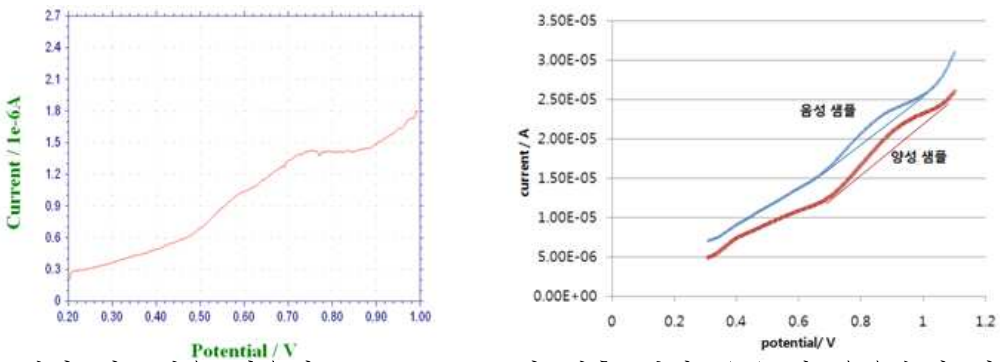
센서 시스템으로 ENR을 측정한 결과. (A) 농도별 전압전류도, (B) 전압전류도로부터 얻은 보정 곡선.

- 위의 시스템이 현장 적용이 가능한지 확인하기 위하여 2012 년 2월 16일 닭 유통기업인 하림 연구소 및 관리 농장을 방문하였음.
- 현재 하림 연구소 및 관리 농장에서는 퀴놀론계 항생제가 아니라 다른 계열인 erythromycin을 닭 항생제로 사용하고 있으며 구조는 아래와 같음.



- 농가에서 사육된 닭의 잔류 항생제 검출을 위한 과정은 다음과 같음. 농가에서 납품받아 도축한 닭에서 샘플을 추출하여 육질을 으깨어서 육즙을 만든 후 연구소에서 사용하는 키트로 항생제에 대한 양성 테스트를 약 3시간에 걸쳐 시행함. 테스트 결과 양성으로 판정되는 샘플은 다시 정량 분석을 위하여 분석을 대행해주는 곳으로 발송하여 결과를 기다렸다가 확정 판정을 내림.
- 우선 본 센서 시스템으로 퀴놀론계 항생제가 아닌 erythromycin이 검출 가능한지 테스트 하였음. 테스트 결과, erythromycin도 본 센서 시스템에서 검출 가능한 것으로 확인됨(그림 14 (A)). 테스트는 닭의 음용수에 약 1 ppm이 녹아 있는 erythromycin에 대한 측정 결과임.
- 다음으로 연구소에서 테스트 결과 각각 양성과 음성 판정을 받은 두 가지의 육즙 샘플에 대하여 본 센서 시스템으로 측정한 결과, 양성 샘플에서의 신호 크기(갈색 피크의 최대 크기)가 음성 샘플에서의 신호 크기(파란색 피크의 최대 크기)에 비하여 약 3배 정도 크게 나타나는 것을 확인하였음.

(A) (B)



본 센서 시스템을 이용한 erythromycin의 검출 결과. (A) 닭 음용수에 약 1 ppm 존재하는 erythromycin의 측정 결과, (B) 양성 및 음성 판정을 받은 육즙에 대한 측정 결과.

- 본 과제를 통하여 개발된 전기화학적인 항생제 검출 시스템이 닭 사육 농가 및 기업의 분석 센터 등 현장에서도 사용 가능함을 알 수 있었음.
- 본 센서 시스템은 검출 시간에 있어서 기존 방식(3시간의 양/음성 테스트 후 정량 분석)에 비하여 훨씬 짧은 시간(5분 이내)에 1 ppm까지 정량 분석이 가능한 이점을 가지고 있음.
- 또한, 1회용 스트립 센서의 단가는 제작이 쉬울 뿐 아니라 양산할 경우 아주 낮은 가격으로 생산이 가능하여 기준 검출 시스템과 비교하여 경제적인 이점도 클 것으로 예상됨.
- 앞으로 추가적인 연구 지원을 받아서 지속적인 개발을 한다면 전기화학적인 항생제 검출 시스템의 상용화가 충분히 가능하다고 판단됨.

라. 제4세부 - 항생제 USN 시스템 개발 및 현장적응 비즈니스 모델 개발

(1) 항생제 센서 현장테스트

○ 테스트 개요

- 테스트 일시 : 2012년 2월 16일
- 테스트 장소 : 전라북도 익산시 여산면 제남리 하림 육계농장 1개소, 전라북도 익산시 춘포면 신동리 하림연구소
- 테스트 진행
  - 하림 육계농장에서 음용수에 포함된 항생제 센싱 테스트 1회
  - 닭고기 육즙 내 잔류항생제 센싱 테스트 1회

○ 테스트 결과

- 음용수에 포함된 항생제 센싱 테스트
  - 테스트를 위해 방문한 A 육계농가의 경우 평소에 항생제를 사용하지 않는 농가로서 항생제 센서 테스트를 위해 항생제를 구입하여 실험하였다.
  - 평소 육계가 마시는 음용수에 구입한 항생제를 소량 넣고 본 과제에서 개발한 센서로 테스트한 결과 음용수에 항생제가 포함되어 있다는 결과가 나와 센서의 정상적인 작동을 확인하였다.
- 육즙 내 잔류항생제 센싱 테스트(추가)
  - 육계의 경우 음용수를 통해 항생제를 주입하게 된다. 따라서 이번 과제의 계획된 목표 또한 음용수에 포함된 항생제를 검출하는 센서를 개발하고 이를 테스트하는 것이었으나, 다양한 비즈니스 모델의 개발 가능성을 열어놓고, 기존에 시판되어 육계 브랜드 업체에서 사용하고 있는 항생제 센싱 기법과 비교하여 본 과제를 통해 개발된 항생제 센서의 작동에 걸리는 시간 및 정확도 등을 측정하기 위해 추가 실험을 실시하였다.
  - 미리 테스트를 통해 항생제가 잔류해 있다고 판정된 닭고기 샘플의 육즙을 추출하여 항생제 센서를 테스트하였으며, 그 결과 센서가 정상적으로 항생제를 검출해 내는 것으로 나타났다.
  - 또한 기존에 육계 브랜드 업체에서 사용하던 항생제 검출기의 경우 완전한 검출

에 걸리는 시간이 약 3시간 정도 소요되는데 비해, 본 과제에서 개발된 항생제 센서의 경우 검출에 1~2분정도가 소요되어 기존의 시판 제품보다 더 빠른 작동시간을 보였다.

(2) 육계, 산란계 농장의 항생제 센서시스템 적용방안 최적화 및 비즈니스 모델 개발

(가) 국내 및 해외의 센서시스템 비즈니스 모델 사례

① 사례분석 개요

○ 본 연구과제의 개발 목표인 항생제 센서시스템 비즈니스 모델 개발을 위하여 항생제 센서와 USN(Ubiquitous Sensor Networks) 시스템을 결합한 해외 비즈니스 모형을 탐색하였음.

○ 하지만 항생제의 유무를 탐지하는 센서는 현재 개발된 기술로는 센서의 소형화, 경량화가 불가능하여 대부분 연구실 내 설치하여 활용하고 있는 실정이며, 따라서 항생제 센서와 USN을 결합한 비즈니스 모델은 존재하지 않았음

○ 따라서 항생제 센서 USN 시스템의 비즈니스 모델을 개발하기 위해 USN과 결합한 다양한 기술을 활용한 사례들을 찾아 분석하였음

○ 국내에서는 u-Farm 사업의 일환으로 수행된 'u-명품브랜드 G마크 머쉬하트 이력추적관리시스템 구축사업'과 '청정 제주 고품질 u-수산양식 지원시스템 구축사업'을 분석하였으며, 해외사례로 Computers and Electronics in Agriculture 저널을 출판된 한 개의 사례논문을 분석하였음.

② 국내 사례

㉮ u-명품브랜드 G마크 머쉬하트 이력추적관리시스템

○ 시스템 추진 배경

- 버섯은 자연조건으로부터 격리시켜서 배양-발이(發耳)-생육 등의 단계에 적합한 온·습도 등의 재배조건을 인위적으로 조절할 수 있는 기술력과 자본력을 요구함.
- 버섯의 발이와 생육을 똑같이 유지하기 어렵고, 수확과 포장 등의 상품화 작업에 많은 노동력이 필요로 하는 노동집약적 농업임.
- 국내 부정 친환경 농산물 및 생산지 위·변조 적발사례가 증가하고 있어, 농산물 생산·유통에 대한 신뢰도 저하 우려.
- 선진국들은 '90년대 후반부터 Food Chain 전반에 걸친 종합안전관리 체계를 수립함에 따라, 적극적인 국제동향에 부응할 수 있는 대응력 요구.

○ 시스템 내용

- 이 사업에서 사용된 USN 시스템은 고품질의 균등 버섯생산을 위해 버섯재배사의 온도, 습도, 이산화탄소, 화재, 컴퓨레셔 센서로서 센서와 중앙관리서버를 Wireless Networks로 연결하였음.
- 재배 중 온도와 습도를 실시간으로 감지하여 중앙 서버에 저장되며,

시스템 사용자들은 이를 실시간으로 모니터링 할 수 있음.

- 또한 이산화탄소, 화재 센서를 통해 이상징후 발생시 즉각 조치를 할 수 있도록 설계하였음.

○ 시스템의 성과

- 이 시스템을 통해 물류관리의 효율화 및 생산경영합리화를 달성하고, 재배환경을 실시간 모니터링하는 등 경영개선의 효과가 높았음.
- 또한 인건비, 직접재료비를 절감하고 생산성 향상을 통해 매출의 증가 효과를 얻었으며 품질향상과 제품신뢰를 통해 브랜드 이미지를 향상시킬 수 있었음.
- 특히 ROI(투자수익률분석; Return On Investment) 분석 결과 NPV(순현재가치)는 37억7천만원, ROI(투자수익성)는 413%로서 높은 성과를 달성한 것으로 나타났음.

u-명품브랜드 G마크 머쉬하트 이력추적관리시스템 서비스 개념도

㉯ 청정 제주 고품질 u-수산양식 지원시스템

○ 시스템 추진 배경

- 생산 측면에서 수산식품에 대한 안전성 확보와 소비자가 안심하고 먹을 수 있는 상품의 생산 및 어민의 소득 증대를 위한 청정 생육환경 조성 및 관리를 통한 고품질의 수산물 생산, 공급 기반을 조성할 필요가 있음
- 유통 측면에서 수산식품에 대한 신뢰성 확보를 위한 방안으로 수산물의 생산에서 유통에 이르는 과정의 이력정보를 기록 및 관리하여 소비자에게 투명하게 공개하는 수산물 이력추적제도의 필요성이 대두되고 있음
- 앞으로 세계 양식 시장이 회유성 어류 중심으로 재편될 가능성이 높으며, 우리나라가 이 부문에서 한발 앞서 나가기 위해서는 외해가두리 양식을 통한 명품 수산물 생산이 필수적(제주해양수산자원연구소)

○ 시스템 내용

- 육상수조식 양식장에 생태환경정보를 수집할 수 있는 센서 (수온, 염도, 용존산소량 등)를 설치하여 실시간 모니터링 기능 제공.
- 태풍, 해일, 폭풍과 같은 자연재해 발생으로 해수의 탁도가 나빠지는 경우 이를 감지하여 급이를 중지할 수 있도록 알림 서비스 제공
- 해수탱크에 설치된 용존산소량 센서와 연동 후 용해기를 자동 제어하여 산소 용해농도 조절.
- 액화산소통 자동 농도조절기의 정상 작동 여부를 지속적으로 모니터링하여 이상상황 발생시 관리자에게 SMS통보할 수 있는 기능 제공.
- 양식장내 모든 수조에 USN기반 최저수위 감지 센서를 부착하여 안전수위 이하의 위험상황 발생 시 경보기, SMS를 통한 알림 기능 제공
- 수조내의 수위 실시간 모니터링을 통한 대량폐사의 위험을 자동으로 감지하여 알려주는 서비스
- 현황판을 통한 수조내 생태환경 실시간 모니터링
- 수조번호, 입하군, 개체수, 평체, 폐사량, 급이량, 수위정보 등 수조내부 정보 제공
- 만조시간, 간조시간, 온도, 풍향/풍속 등 외부기상정보 제공

청정 제주 고품질 u-수산양식 지원시스템 서비스 개념도

○ 시스템의 성과

- 이 시스템을 통해 수조환경에 대한 실시간 모니터링이 가능해지고, 사료급이 상태와 개체수의 실시간 관리로 항생제 등의 적정한 투약관리가 가능해짐.
- 폐사율이 감소하여 생산성이 향상되었으며, 제주산 수산물의 고품질화

를 통해 매출향상의 효과를 가져왔음

- 특히 ROI(투자수익률분석; Return On Investment) 분석 결과 NPV(순현재가치)는 5억2천만원, ROI(투자수익성)는 409%로서 높은 성과를 달성한 것으로 나타났음.

③ 해외 사례

㉮ 남부 스페인의 정밀농업을 위한 무선 센서 네트워크 시스템(Wireless Sensor Networks for precision horticulture in Southern Spain)

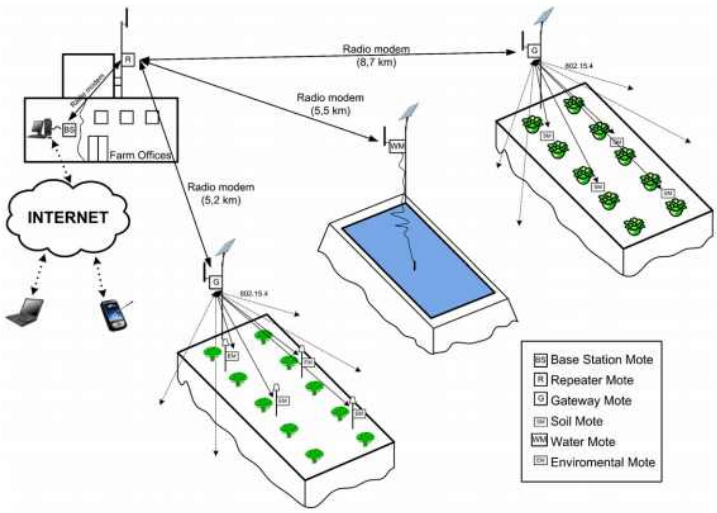
○ 국가: 스페인

○ 적용기술: 무선 센서 네트워크(Wireless sensor network), 토양센서

○ 적용범위: 테스트베드 단계

○ 내용

- 원예를 재배하는 노지에 토양의 온도, 습도, 염도를 감지하는 센서를 설치.
- 저수지에 물의 온도 및 염도를 감지하는 센서를 설치.
- 노지 주변의 공기의 온도 및 습도를 감지하는 센서를 설치.
- 모든 센서들은 Radio model을 통해 농장에 위치한 중앙서버와 연결되어 있으며, 센싱된 정보들은 사용자가 인터넷을 통해 컴퓨터, 스마트폰 등으로 확인가능함.
- 토양과 저수지의 센서를 통해 원예를 재배하는 데 필요한 최적의 재배환경을 조절하였음.



Wireless Sensor Networks 시스템 개념도

(나) 관련 주체별 니즈 분석

○ 축산 브랜드 경영체(도드람, 하림, 지역한우브랜드 등)의 입장

- 수의과학검역원의 조사결과에 따르면 2008년 기준으로 연간 1,200톤 이상의 항생제가 가축의 질병치료・예방뿐만 아니라 성장촉진 목적으로 과도하게 사용되고 있음

- 또한 우리나라 축산업계의 항생제 사용량은 미국 등 농업선진국과 비교해 매우 높은 수준으로 국민건강을 해치고 축산제품의 해외 수출의 장애물이 되고 있음

구 분	연도별 항생제 판매실적 (kg)						
	2008	2007	2006	2005	2004	2003	2002
항생제	956,841	1,244,416	1,181,901	1,248,965	1,106,004	1,126,911	1,164,917
항균제	253,775	282,297	275,907	304,517	262,007	321,622	376,356
계	1,210,616	1,526,713	1,457,808	1,553,482	1,368,011	1,438,533	1,541,273

자료 : 국립수의과학검역원, 2009

동물용 항생 (항균)제 사용실태

구 분	미국	일본	덴마크	한국	뉴질랜드	스웨덴
축산물 생산량[1)]	39,821,515	3,045,510	2,150,318	1,690,879	1,324,205	547,850
항생제 사용량[2)]	5,799	1,084	94	1,541	53	17

1) FAO: 소, 돼지, 양, 염소, 가금류 statistics
2) AHI (항생제 중독, 시금치출판사), DANMAP, 한국수의과학검역원, NZFSA, SVARM

2002년 선진각국의 축산물 생산량 및 항생제 사용량

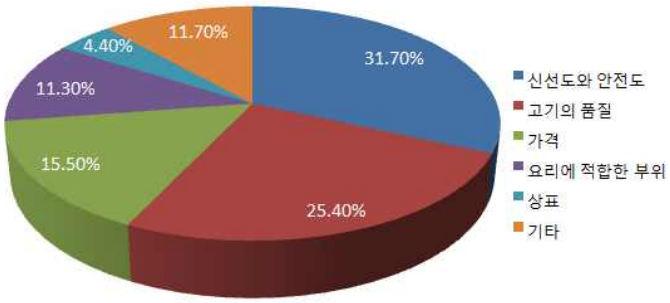
- 많은 비용에도 불구하고 이와 같이 항생제를 사용하는 것은 궁극적으로 생산성 향상 및 유지에 항생제가 그만큼의 기여를 하고 있기 때문이라고 농가들은 생각하고 있음.
- 그러나 사실 축산업 생산성은 항생제가 아닌 질병예방, 사양관리, 사육환경 개선 등으로 향상시킬 수 있으며, 항생제의 관행적인 과다사용은 가축의 내병성을 크게 떨어뜨려 생산성에 치명적인 악영향을 미치게 됨.
- 무항생제 사양관리를 위해 여러 가지 전산프로그램이 개발되고 실행되고 있지만 (Pigplan, 내추럴시리즈), 사료 또는 음용수 내에 유입될 수 있는 항생제에 대한 감지가 불가능한 실정으로써, 브랜드가 관리하고 농가의 가축이 의도치 않게 항생제를 복용하고 있는지 여부를 알 수가 없는 문제가 발생함.
- 또한 농가가 브랜드 관리 감시망을 피해 항생제를 사용하는 경우 이를 현실적으로 모니터링을 통한 감시가 어려우며, 잔류 항생제 사건사고 발생 시 브랜드에 직접적인 타격이 발생함.

○ 소비자의 입장

- 최근 산업화에 따른 항생제, 다이옥신 등 환경유래 오염물질이 증가하고 있으며, 생산성 향상을 목표로 한 가축사육농가들의 과도한 항생제의 사용으로 인해 국내 소비자들이 다양한 식품위해물질에 노출되고 있음.
- 2011년 국내 식품위해물질에 의한 식품사고현황을 살펴보면, 항생제는 농약, 다이옥

신, 환경유래 식품사고와 같은 카테고리로서 총 11건(14.3%)를 차지하는 등 (정기혜 등, 2011) 항생제에 의한 식품사고가 발생하여 소비자들의 불안감을 증가시키고 있음.

- 이에 따라 소비자들의 식품안전성에 대한 관심이 높아지고 있음. 2007년 기준 국내 소비자들의 돈육구매 기준은 신선도와 안전도가 31.7%로 가장 높은 빈도를 나타냈으며(축산신문, 2008), 한국농촌경제연구원에 의하면 국내 도시민들은 관심있는 농업정책으로 '안전한 식품 공급'(23.1%), '친환경농산물 생산, 유통'을 지적하여 식품안전성에 대한 요구도가 높은 것으로 나타났음.
- 이처럼 현재까지 국내산 육제품에 대한 소비자의 선호도는 상당히 높지만, 외산에 비해 낮은 가격경쟁력, 가축사료 내 항생제 사용의 규제로 인한 생산비 상승 및 축산물의 소비자 가격 상승으로 소비자의 물가상승에 대한 부담이 가속화될 예정.



자료 : 축산신문, 2008
2007 국내 소비자들의 돈육 구매 기준

자료 : 한국농촌경제연구원, 농업, 농촌에 대한 2011년 국민의 조사결과
도시민이 가장 관심있는 농업정책분야

- 또한 무항생제 인증 등의 최소한의 안전장치를 통해 소비자들이 국내산 육제품을 구매하고 있지만, 무항생제 인증이 가축을 인증받을 때 1회성으로 이루어지는 점, 주기적으로 인증관리가 되고 있지 못하다는 점에서 소비자의 불안감이 줄어들지 않고 있음

(다) 비즈니스 모델의 개발

① 기존 항생제 센싱 프로세스

○ 육류 샘플의 배송

- 계열화된 축산 브랜드 업체에서는 농가의 항생제 사용여부를 테스트하기 위하여 축산농가로부터 각 농가에서 생산한 육류의 샘플을 요구
- 축산농가들은 요청에 응답하여 농가에서 생산한 육제품을 브랜드 업체 연구소로 배송

○ 항생제의 검출

- 축산 브랜드 업체 내 항생제 연구소에서 샘플을 분석하여 잔류항생제 유무를 검출
- 잔류항생제 유무 결과를 본사에 전송

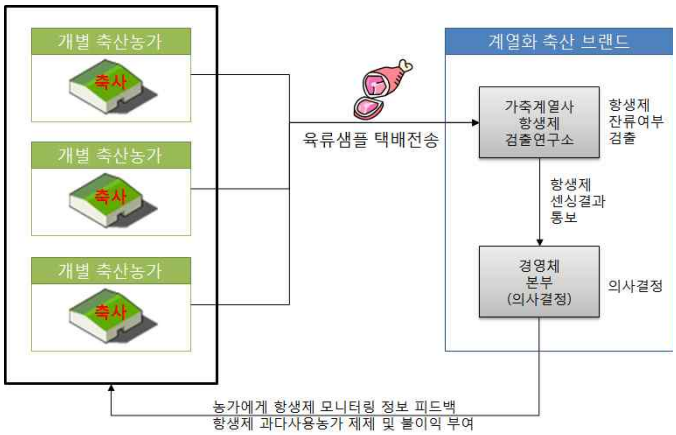
○ 농가 피드백 및 지도

- 항생제 검출내용을 농가에게 피드백
- 결과를 바탕으로 농가 경영지도 실시
- 항생제가 검출되었거나 규정된 양보다 과도하게 항생제가 검출된 농가에 불이익 제공하는 등 항생제 관리를 위한 다양한 전략 시도

○ 기존 항생제 센싱 프로세스의 문제점

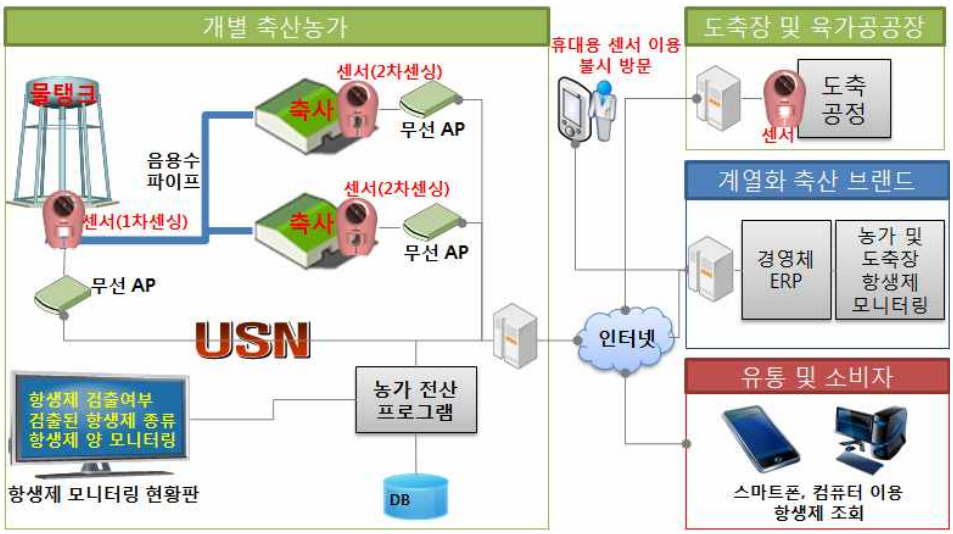
- 음용수에 대한 항생제 센싱 불가
  - 브랜드 축산업체에서 사용하는 항생제 센싱 테스트기기의 장비의 가격이 높아 항생제 검출작업에 많은 비용 소요
  - 또한 항생제 센싱 장비의 크기가 매우 커서 휴대하기 불편하여 육계농가의 음용수에 대한 항생제 센싱이 어려움
  - 따라서 중규모 브랜드 업체의 경우 잔류항생제 테스트기를 연구소에 설치하여 중앙집중적 항생제 검출작업을 수행
- 실시간 모니터링 불가
  - 현재 각 브랜드 축산업체에서 사용중인 항생제 센싱기의 경우 항생제 유무를 테스트하는데 많은 시간이 소요됨 (H사에서 사용하는 P제품의 경우 검출에 3시간 이상이 소요)
  - 또한 장비의 크기문제로 실제 농장을 방문하여 불시에 항생제 사용여부를 점검하기가 현실적으로 어려움
  - 이로 인해 계열화된 축산 브랜드 업체는 농가의 항생제 사용을 실시간으로 모니터링하기 어렵워 농가의 항생제 관리에 어려움을 겪고 있음
- 소비자 단계에서 항생제 유무정보 파악이 불가
  - 항생제의 과다 사용으로 인해 가장 많은 피해를 입는 주체는 소비자이며, 최근 발생한 각종 식품안전사고로 인해 소비자들은 식품 안전성 문제에 매우 민감함.
  - 축산 브랜드 업체에서 무항생제 제품을 출시하고 있지만, 현재 소비자들이 항생제의 유무를 알아낼 방법이 전무함.
  - 이로 인해 소비자의 불안감이 커지게 되어 국산 축산물의 소비에 저해

요인으로 작용하게 됨.



기존 항생제 검출 프로세스

② 새로운 비즈니스 모델의 서비스 개념도



새로운 비즈니스 모델의 서비스 개념도

○ 물탱크 및 음용수 파이프에 무항생제 센서 설치(1차 센싱)

- 음용수를 공급하는 물탱크 및 파이프에 항생제 센서 설치하여 항생제 첨가여부, 첨가된 항생제의 종류 및 양 계측하여 USN 망 통해 중앙 축사 전산프로그램에 전송

○ 축사 내 음용수에 무항생제 센서 설치(2차 센싱)

- 축사내 음용수 급이기에 센서를 통해 2차 센싱
  - 물탱크에서 미처 감지하지 못한 항생제 감지
  - 음용수 급이 직전 항생제 첨가행위 미연에 방지

○ 농가 내 USN을 통해 항생제 센싱정보 전송 및 중앙관리

- 장소별 기간별, 시간대별 센서분석 데이터
- 투입여부 또는 표준지표 대비 초과 데이터 분석 및 문제상황 발생정보
- 각 센서 작동상황 및 이상유무 정보
- 이상발생 알리미 로그분석
- 무선통신을 이용하여 센서/센서노드/서버간 데이터 전송시스템 등

○ 도축장 및 육가공공장에 무항생제 센서 설치

- 도축장의 도축공정에 센서를 설치하여 도축시 발생하는 가축의 혈액, 육즙 등 액체화된 물질에 항생제, 항균제의 잔류여부를 파악

○ 계열화된 축산 브랜드업체의 농가 무항생제 사양관리(브랜드 단계)

- 축산 브랜드업체(도드람, 하림 등)에서 농가의 항생제 정보를 실시간으로 모니터링
- 브랜드가 관리하고 있는 전 축산농가의 항생제 관리가 가능
  - 자사 ERP의 농가 관리메뉴에 항생제 사용여부, 사용량, 사용하는 항생제 종류 DB화 하여 구성
- 휴대용 항생제 센서를 소지한 감시직원이 농가 및 도축장을 불시에 방문하여 농가가 무항생제 사양관리를 잘 지키고 있는지 여부를 감시 가능
  - 항생제 검출된 농가에 패널티를 부여하고, 사용하지 않고 잘 지키는 농가에 수매가격을 높여주는 등의 동기부여 제공가능
  - 브랜드에서 항생제 사용여부를 감시하고 있다는 느낌을 주게 함으로써 농가가 브랜드 몰래 항생제 사용하는 것을 미연에 방지
- 자사 제품의 항생제 정보를 QR코드, 바코드에 담아 포장용기에 기록하여 소비자에게 제공

○ 스마트폰, 컴퓨터를 이용한 항생제 첨가여부 파악(소비자단계)

- 유통단계에서 유통업자 및 소비자가 QR코드를 통해 육제품의 항생제 잔류여부를 파악
- 핸드폰, 컴퓨터 등 인터넷에 접속가능한 기기를 사용하여 정보조회가 가능하도록 설계
- 육제품 무항생제에 대한 신뢰를 높이고 안전농산물의 소비확대에 기여

③ 기존 정책과의 연계

○ 친환경농어업 육성

- 배경 : 환경 보전 및 안전 농수산물 공급의 확대
- 내용
  - 환경친화적 농업의 확산으로 소비자가 원하는 고품질 안전농산물 공급 확대
  - 친환경 축산 확대 및 자연순환농업 체계 구축
  - 친환경 양식생산 기반 구축, 고부가가치 전략 품종 개발 등을 통해 경쟁력을 강화하고 수급균형의 안정적 생산체제 구축
- 관련근거 : 2010년도 농림수산식품부 성과관리시행계획

○ 농식품 안전관리 시스템 강화

- 배경 : 과학적인 안전관리의 기반이 되는 위험평가 기능 대폭 강화
- 내용
  - 위험평가, 위험관리, 위험정보교류의 균형적인 발전을 통하여 과학적이고 소비자 지향적인 농식품 안전관리 추진
  - 위해요소 사전예방에 중점을 둔 위험관리 선진화 추진
- 관련근거 : 2011년도 농림수산식품부 주요 업무계획

④ 기대효과

○ 기술적 측면

- 유해물질(잔류 농약, 환경오염물질, 항생제, 방부제 등)에 대한 on-site 센싱 기술이 개발되어 IT 기반기술과 접목될 경우 농식품 관련 이력관리, 품질인증 등에 적용되어 새로운 패러다임으로의 도약의 원동력이 될 수 있다.
  - 농축수산물에 대한 이력추적시스템과 연동됨으로써 제공정보의 신뢰성을 제고할 수 있다.
  - 유통업체와 소비자 역시 on-site 센싱 기술이 접목한 휴대가능한 검출기를 활용하여 판매와 소비에 있어 안전성 검증이 가능해진다.
- 닭 사육 및 도축 후 유통과정에서의 모니터링은 농축산식품 안전성 관리의 대표적 모델
  - 향후 축산 식품 뿐만 아니라 농식품 전반의 안전성 관리 시스템 및 요소 기술을 확보하는데 가장 적절한 시발점이 될 수 있다.

○ 경제·산업적 측면

- 친환경 유기농 식품산업으로 농촌경제 새로운 원동력
  - 농식품 Farm to Table 실시간 안전성 확보로 부가가치를 증대시킬 수 있다.
  - 무항생제 축산물에 대한 신뢰성이 높아지게 되고, 이에 따른 농가의 무항생제 상품의 생산을 가속화하게 되어 축산물 항생제의 과다사용으로 인한 비용을 절감하고 농약과다사용 방지를 통해 비용을 절감할 수 있다.
  - 또한 원재료의 수입의존도가 높은 농약 및 항생제의 무분별 과다사용을 억제함으로써 사용비용의 절감할 수 있다. (2006년 현재 농약 1조 4백억원, 2005년 항생제 년간 5000억원 사용)

○ 농식품의 수출증대를 위해 안전성 제고는 필수

  - 국내산 축산물의 경우 각종질병과 항생제 과다사용 등 안전성 문제로 인해 수출에 난망을 겪고 있다.

- 확보된 기술의 상업화 및 수출을 통한 국내경제 활성화 기여
  - 현재 농식품 안전성 실시간 검출기술은 세계적으로 확보된 바 없으며 농식품 실시간 검출기술의 확보와 유비쿼터스 기술의 접목 시 시스템 수출 효과를 기대할 수 있다.

○ 사회·문화적 측면

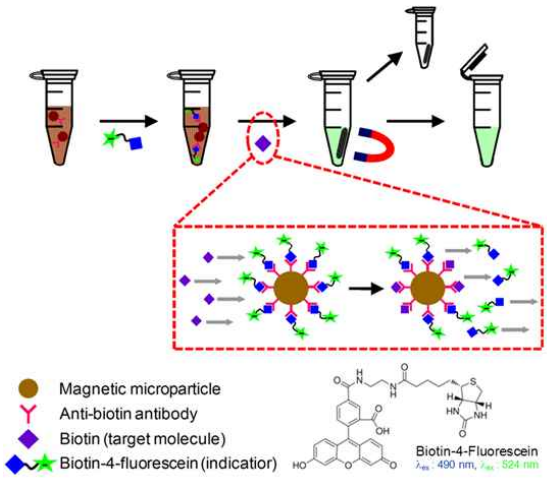
- 먹거리에 대한 국민 신뢰성 회복과 국민건강권 확보
  - 농식품 위해요소 모니터링 기술의 개발로 농식품 안전성 불안의 사전대처를 통해 사회적 비용 최소화하고, 향후 수입농산물에 대한 위해요소 모니터링 시스템 구축에 확대 적용하여 국민의 먹거리 안전에 기여한다.
- 무농약, 무항생제 농식품의 가치 확신을 통한 농업의 신뢰제고
- 국내 타산업 뿐만 아니라 세계적으로 앞서 나가는 농업을 통하여 새로운 무형적 가치 창출
- 중국, 동남아 등에서 수입되는 농식품의 위해성 차단

제 4 장　목표달성도 및 관련분야에의 기여도

○ 항생제 물질의 선택적 검출을 위한 새로운 분석 기술 개발

- 나노입자를 이용한 항생제 물질 검출 및 농축

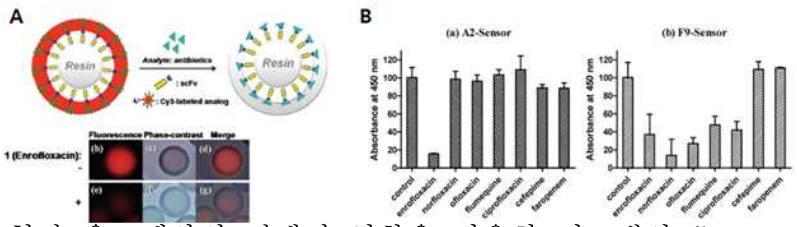
저분자인 biotin과 저분자 형광 유도체인 biotin-4-fluorescein 간의 anti-biotin antibody 결합력 차이를 이용하여 항생제와 같은 저분자의 검출을 시도하였다. 저분자의 선택성을 알아보기 위해 biotin을 이용하여 같은 실험을 수행하였고, 표적 저분자인 biotin이 훨씬 농축이 잘 되는 것을 확인함에 따라 뛰어난 선택성과 감도를 보였다. 이 결과는 저분자를 검출하는데 있어서 경쟁적인 면역반응의 감도가 좋지 않는 단점을 극복하고, 감도를 향상시킬 수 있는 농축 기술을 도입한 새로운 분석 플랫폼으로 실제 항생제를 이용해서도 적용할 수 있는 가능성을 타진하였다.



항체가 고정된 다중핵 자성나노입자 표면에 형광 표지를 이용하여 항생제와 같은 저분자 물질을 검출할 수 있는 분석기술

- 항생제 물질의 선택적 검출을 위한 리셉터 물질 개발 및 형광분석기술 개발

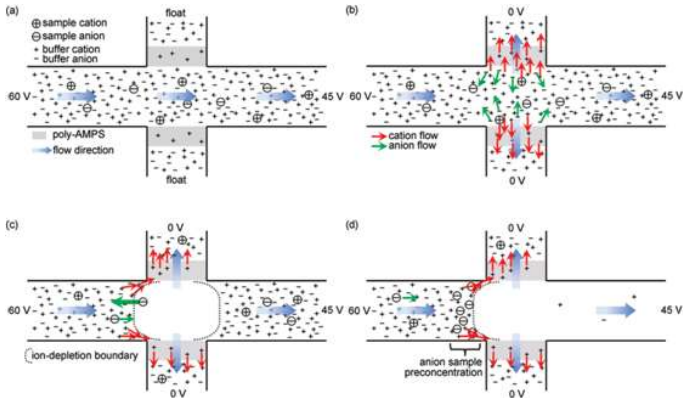
Fluoroquinolone 항생제를 형광 검출법 방법을 통해 정량적으로 센싱하고자 하는데 그 목표가 있으며, 이를 위해 항체의 일부분인 single-chain variable fragment (scFv)를 이용하여 Pyridone Carboxylic acid를 pharmacophore로 갖는 모든 fluoroquinolone 계열 항생제를 검출하기 위한 general sensor (F9 scFv sensor)와 특정 fluorequinolone 항생제 (예: enrofloxacin) 만을 특이적으로 검출하기 위한 specific sensor (A2 scFv sensor) 를 개발하였다.



A: 형광 유도체와의 경쟁적 치환을 이용한 시료내의 fluoroquinolone 항생제를 정량적으로 검출하기 위한 형광 센서 시스템, B: enrofloxacin에 특이성을 갖는 A2 센서와 (a), fluoroquinolone 항생제에 보편성을 갖는 F9 센서(b)

- 항생제 물질 검출 감도 향상을 위한 전기화학적 기술 개발

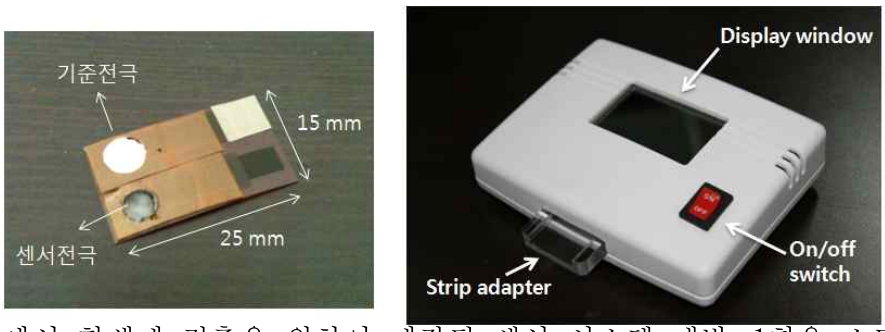
마이크로 칩 상에서 특정 검출 물질을 농축할 수 있는 기술을 개발하였였고, 형광물질을 이용하여 단계에 따라 실험한 함으로써 형광물질이 농축되어 형광의세기가 점점 더 커지는 것을 확인하였다. 본 결과를 항생제의 분광학적 검출에 사용할 경우, 보다 향상된 검출 결과를 얻을 것으로 예상된다.



검출 감도를 향상하기 위하여 대상 물질을 마이크로 칩 상에서 농축시키는 기술

○ 항생제 물질 검출 센서의 proto-type 개발

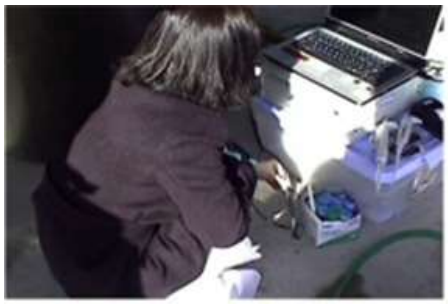
Carbon paste electrode를 이용하여 현장에서도 사용 가능한 항생제 센서를 개발하였고, 현장에서 전문가 및 비전문가 모두 쉽게 사용할 수 있도록 센서의 형태를 1회용 스트립 형태로 제작하였다. 개발된 스트립 센서와 검출기기를 이용하여 항생제 가운데 ENR에 대하여 테스트한 결과 0.1 ppm까지 검출 가능함을 확인하였다.



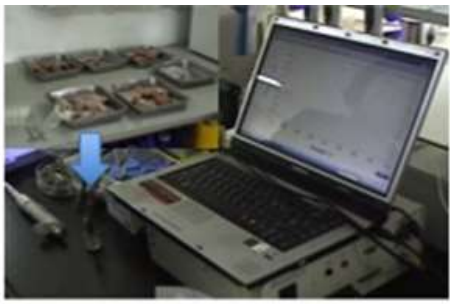
현장에서 항생제 검출을 위하여 제작된 센서 시스템 개발. 1회용 스트립 센서와 1회용 스트립 센서를 장착하여 항생제를 검출하는 기기.

○ 육계 계열화 농장 및 도계장에 시범적용

시험 제작된 휴대용 항생제 검출기를 이용하여 농장 및 하림 연구소에 방문하여 시범적용하였으며, 현재 존재하는 기기는 이동이 용이하지 못할 뿐만 아니라, 측정시간이 수십분이 소요되는 것에 비하여 시험 제작된 검출기의 측정시간은 5분 미만으로 측정을 확인하였다. 또한 기존의 방법은 정성적 판독이 가능한 반면, 본 연구에서 개발된 센서의 경우 정량적 판독이 가능함을 기대할 있었다.



농장에서 측정



하림 연구소에서 측정

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	**나노입자를 이용한 항생제 물질 검출 및 농축 (제1세부)**	크기 조절 가능한 자성 나노클러스터 콜로이드의 합성	100	○ 자성 나노클러스터 콜로이드의 크기 조절 및 자성 코어 - 실리카 껍질 나노 구조 복합체의 합성
	항생제 물질의 선택적 검출을 위한 리셉터 물질 개발 및 형광분석 기술 개발 (제2세부)	Phage display를 활용하여 항생제에 선택적으로 결합하는 단백질을 도출하고 이의 생물리화학적 성질을 규명	100	○ 항생제에 선택적으로 결합 가능한 단백질의 도출 여부 및 생물리화학적 성질 규명
	항생제 물질의 선택적 검출을 위한 전기화학 분석 기술 개발 (제3세부)	항생제의 전기화학적 거동 확인	100	○ 센서 전극의 재질과 형태, 인가하는 전압의 크기와 파형, 대상물질 이외의 물질에서 오는 시그널을 제외하는 방법론의 일반화

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	**나노입자를 이용한 항생제 물질 검출 및 농축 (제1세부)**	표면처리 물질의 고안 및 합성	100	○ 항생제 검출물질과 결합이 가능한 기능기를 가진 표면처리 물질의 개발
		항생제 검출물질과 결합 가능한 표면처리 물질의 개발 및 나노입자의 표면처리	100	○ 항생제 검출물질과 표면 처리된 나노입자와의 결합 ○ 항생제 검출물질이 결합된 나노입자를 이용한 실험실에서 항생제 검출조건 최적화
	항생제 물질의 선택적 검출을 위한 리셉터 물질 개발 및 형광분석 기술 개발 (제2세부)	시료내의 항생제 존재 여부를 Biochip을 활용한 형광 검출법 개발	100	○ 1차년에 개발한 항생제 선택적 단백질을 고정화하여 해당 항생제 검출을 위한 proof-of-concept 실험 완료 ○ 개발된 기술을 활용하여 현장에서 활용 가능한 형광 검출법 개발
	항생제 물질의	감도 향상을 위한 다양한 검	100	○ 라만 분광법을 이용한 항생

	선택적 검출을 위한 전기화학 분석 기술 개발 (제3세부)	출 시스템 개발		제 검출, 감도 향상을 위한 농축 기술 접목
	항생제 USN 시스템 개발 및 현장 적용 비지니스 모델 개발 (제4세부)	육계, 산란계 농장의 항생제 센서시스템 적용방안 도출	100	○ 비용과 센싱 효과 분석을 통해 가장 효과적이고 효율적인 육계, 산란계 농장의 항생제 센서시스템 적용 방안 도출

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2010)	**나노입자를 이용한 항생제 물질 검출 및 농축 (제1세부)**	항생제 검출물질이 결합된 나노입자를 이용한 실제적인 사용조건에서의 항생제 검출	90	○ 다중핵 자성나노입자의 표면에 카르복실 기능기를 부여하고, 이 기능기에 항체를 고정함. 항체에는 결합이 약한 형광물질을 표지하고, 표적물질로 치환하는 방법을 통하여 표적물질을 정량함.
		다기능성 나노입자의 개발 및 응용성 타진	100	○ 다중핵 자성나노입자의 표면에 표면개질이 용이한 실리카를 형성시킴. 이렇게 준비된 다중핵 자성-실리카 나노입자 표면에 카르복실 기능기를 부여한 후 표적물질 검출 실험을 진행함.
	항생제 물질의 선택적 검출을 위한 리셉터 물질 개발 및 형광분석 기술 개발 (제2세부)	나노입자 표면의 선택적 modification을 통하여 새로운 고감도 센서시스템의 개발	100	○ 카본나노튜브 기반 소자에 항생제를 선택적으로 검출할 수 있는 scFv를 고정화 시킴. 특정 항생제가 scFv에 결합함에 따라 변화하는 전류를 측정함으로써 고감도로 항생제를 검출할 수 있었음.
	항생제 물질의 선택적 검출을 위한 전기화학 분석 기술 개발 (제3세부)	전기화학에 기반한 proto-type 항생제 검출기의 제작 및 test 실시	100	○ 과제 목표의 퀴놀론계 항생제에 대한 전기화학적 검출 기술 완료하여 스트립형 센서와 휴대용 측정기의 proto-type을 제작하였음. 또한 proto-type 측정기로 닭의 음용수 및 도축된 닭의 육질 추출액에 대한 테스트 진행함.
	항생제 USN 시스템 개발 및 현장 적용 비지니스 모델 개발 (제4세부)	육계, 산란계 농장의 항생제 센서시스템 적용방안 최적화	100	○ 개발된 항생제 센서의 현장 검증을 실시하였음. 전북 익산에 위치한 하림농장에서의 실험결과 센서가 이상없이 작동을 함을 확인하였음. 또한 항생제 센서를 활용한 비즈니스 모델을 개발하였음.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절. 연구성과 목표 및 성과요약

(단위 : 건수)

구분		특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
		출원	등록	품종 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차년도	목표								1		
	달성								1		
2차년도	목표	1							1		
	달성	1							2	1	
3차년도	목표	1							1	1	
	달성	0							4	0	
계	목표	2							3	1	
	달성	1							7	1	

제 2절. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2009	Calcium ion-calixauinone complexes adsoebed on a silver electrode	S. K. Kang	T. D. Chung	O. -S. Lee, S. -K. Chang, D. S. Chung, H. Kim	J. Phys. Chem. C	113 (46)	국외	SCI
2010	네모파 흡착 벗김 전압전류법에 의한 플루오로퀴놀론계 항생제의 검출	부한길	정택동	송연주, 박세진	J. Korean Electrochem. Soc.	13 (1)	국내	비SCI
2010	Structural and Electrochemical Features of 3D Nanoporous	S. Park	T. D. Chung	Y. J. Song, J. -H. Han, H. Boo	Electrochimica Acta	55 (6)	국외	SCI

	Platinum Electrodes							
2010	Mesoporous Platinum Electrode for Amperometric Determination of Sugars with Anion Exchange Chromatography	J. H. Han	W. Y. Lee	H. N. Choi, S. Park, T. D. Chung	Anal. Sci.	26 (9)	국외	SCI
2011	Pharmacophore-based Strategy for the Development of General and Specific scFv Biosensors for Abused Antibiotics.	M.Y. Cha	S.B. Park, H. Shim	H.Y. Lee, Y. Ko,	Bioconjugate Chem.	22(1)	,국외	SCI
2012	Family-selective detection of antibiotics using antibody-functionalized carbon nanotube sensors.	B. Kim	S.B. Park, S. Hong	D. Lim, H.J. Jin, H.Y. Lee, S. Namgung, Y. Ko	Sensors and Actuators B: Chemical	166-167o	국외	SCI
2012	Precise Size-control of Silica Nanoparticles via Alkoxy Exchange Equilibrium of Tetraethyl Orthosilicate (TEOS) in the Mixed Alcohol Solution	Joohyun Lim	Jin-Kyu Lee	Shin-Woo Ha	Bull. Korean Chem. Soc.	33(3)	국내	SCI
2012	Quantitative Analysis and Efficient SurfaceModification of Silica Nanoparticles	Hak-Sung Jung	Jin-Kyu Lee	Doo-Sik Moon	Journal of Nanomaterials	2012	국외	SCI

제 3절. 특허 성과

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2010	유해화학물질 검출용 센서의 제조 방법, 이러한 방법에 의해 제조된 센서 및 이러한 센서를 이용하여 유해화학물질을 검출하는 방법	박승범, 차미영, 이향연, 고연진	대한민국	10-2010-0029849

제 4절. 사업화를 위한 시범 적용 예

1. 항생제 검출을 위한 proto-type 센서의 현장 시범 적용

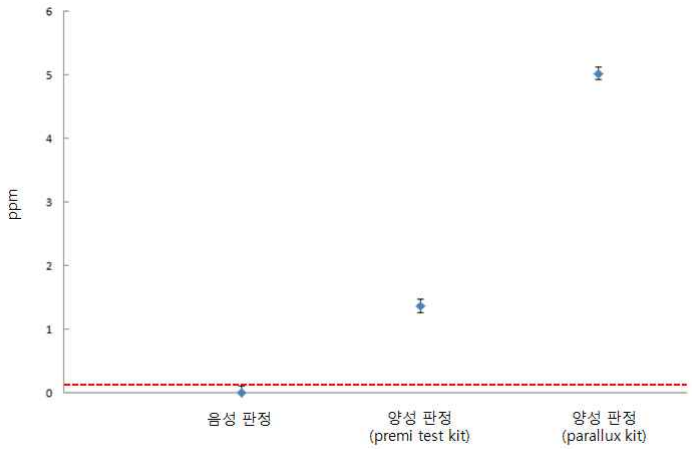
○ 농가에서 하림 연구소로 보내진 시료 중에서 하림 연구진이 정성적으로 항생제 잔류 농도의 음성, 양성 판정이 된 시료를 정량 분석함을 목적으로 시행됨.
○ 정성 분석에 사용된 test kit은 parallux kit(3M, 퀴놀론계 항생제 측정)과 premi kit(DSM, 일반 항생제 측정)을 사용하고 있음.
○ 실험에 사용된 음성으로 판단된 결과의 시료는 퀴놀론계 항생제(parallux kit 이용)와 일반적으로 사용되는 다양한 항생제의 검출(premi kit 이용)이 정성적으로 기준치 이하로 판정된 것임.
○ 실험에 사용된 퀴놀론계 양성으로 판단된 결과의 시료는 parallux kit에서 퀴놀론계 항생제가 정성적으로 기준치 이상으로 판정된 것임.
○ 실험에 사용된 일반 양성으로 판단된 결과의 시료는 premi kit에서 일반적으로 사용되는 다양한 항생제가 정성적으로 기준치 이상으로 판정된 것임.
○ 본 연구그룹에서 개발된 일회용 항생제 센서를 이용하여 음성, 일반항생제 양성, 퀴놀론계 항생제 양성 시료에 대하여 측정한 결과임.

N = 20

	음성 시료	일반항생제 양성 시료	퀴놀론계 항생제 양성 시료
test kit	premi, parallux	premi	parallux
평균 (ppm)	0.0072	1.3662	5.0232
표준 편차	0.0013	0.0015	0.0489

<음성/양성 시료에 대한 항생제 측정 결과>

○ 측정 결과는 음성 시료의 경우 식약청 권고 기준치 0.1ppm 보다 낮은 0.0072 ppm이 관찰 되었으며, 양성 시료의 경우에는 1.3662ppm (일반항생제), 5.0232 ppm (퀴놀론계 항생제)으로 분석되어짐.



<음성/양성 시료에 대한 항생제 측정 결과, 적색 점선: 기준치>

○ 기존의 방법은 음/양성으로 정성적 판독만 가능 ○ 본 연구에서 개발한 센서는 **정량적으로 판독**이 가능함을 확인

2. Proto-type 센서의 사업화 가능성 고찰

○ 현재 농가에서 사용되는 항생제는 크게 퀴놀론계 항생제와 일반 다양한 항생제 계열로 분류 됨. 이를 분석하기 위해서 parallux test kit과 premit kit을 사용하고 있음.

○ 퀴놀론계 항생제를 분석하는 parallux test kit의 경우는 rapid kit 형태로 구성되어 있으며, 분석 시간은 약 15분에 해당되며, 가격은 카트리지 1개당 만원임.

○ 일반항생제(퀴놀론계가 아닌 일반 다양한 항생제를 말함.)를 분석하기 위해서는 permit kit을 사용하며, 배지에 세균을 넣어두어 3시간 배양후, 항생제 유무에 따른 세균 유무를 이를 배지의 색으로 확인함.(일반적으로 세균의 활성도와 pH와 연관되어있는데, 이를 배지의 색으로 구분함.)

○ 하림연구소 의견: 퀴놀론계도 정량적으로 만드는 것도 큰 의미가 있지만, 다양한 일반항생제를 분석하는 키트가 더 도움이 될 수 있음. Premi kit의 경우, 분석 방법이 배지의 미생물 배양이다 보니 외부에서 예측하지 못한 상황들이 많이 발생되며, 또한 색이 변한다 하더라도 어떤 항생제가 얼마만큼 포함되어 있는지는 모름.

○ Premi/ parallux kit 모두 분석 전에 전처리 단계(닭고기 해동-육즙-원심분리) 과정이 복잡하고, 번거로움.

○ Premi kit의 경우 배지의 색 변화를 단순히 사람이 관찰하기 때문에, 극과 극인 음성/양성 구별은 어렵지 않지만, 기준치에서의 음성/양성은 색 구별이 어렵기 때문에 실험자의 노하우에 의해서 결정됨. 이러한 이유로 현재의 정성적 분석보단, 본 연구 그룹의 정량적 분석이 장점이 될 수 있음.

○ 향후, 실험 과정이 단순화 된다면 하림 연구소가 아닌 농가에서 농가 관리인들이 직접 사용하는 형태가 발전적이며, 하림에서는 전체 농가의 항생제 사용 현황을 전체적으로 모니터링 수준으로 가는 것도 좋을 방향이라고 판단됨.

제 6 장　연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

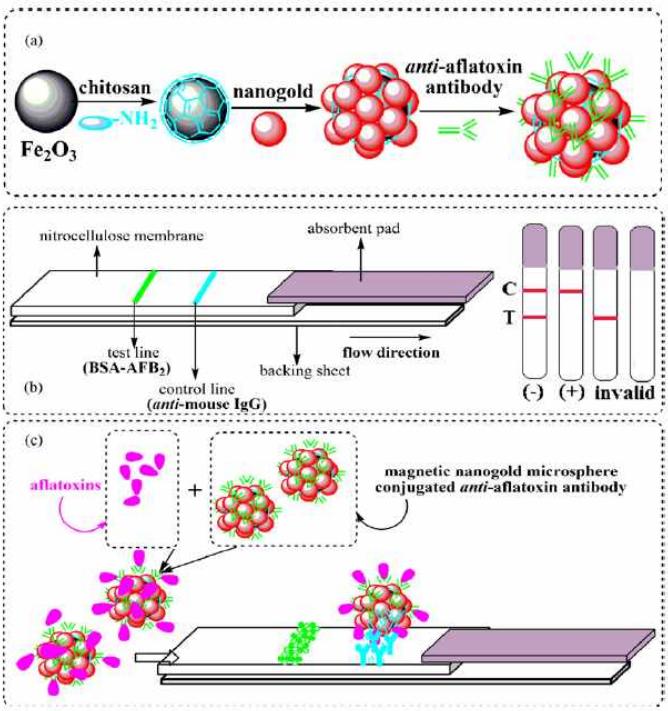
○ MeRA(Meat Rapid Antibiotic) Test

- 육류에 있는 항생제와 설파계 잔류물질 검출을 위해 Geobacillus stearothermophilus 포자로 된 세균 시험법.
- 항생제는 감염에 대한 치료를 위해 가축에게 제공되고 있는 잔류성 약제로 육류에 존재할 수 있음. 육류 속 잔류항생물질의 존재는 이들 물질들이 장내세균을 해치기 때문에 알러지 반응을 일으킬 수 있고 내성 세균의 확산에 기여할 수 있기 때문에 소비자에게 잠재적인 위험이 됨. 육류에 존재하는 억제 물질의 검출은 유럽에서 EEC 2377/90 규제조항과 하부 수정안으로 정해져 있음.
- 사용방법 및 원리: 이 제품은 64±0.5 °C에서의Geobacillus stearothermophilus 성장 억제작용을 통해서 잔류항생제와 설파계를 식별한다. 배양 배지에 들어 있는 발효성 당과 pH 지시제의 존재에 의해서 세균의 성장억제가 증명된다.

병1: 검출한도보다 높은 농도의 항생제가 포함된 육류 샘플
병2: 검출한도보다 높은 농도의 항생제가 포함되지 않은 육류 샘플

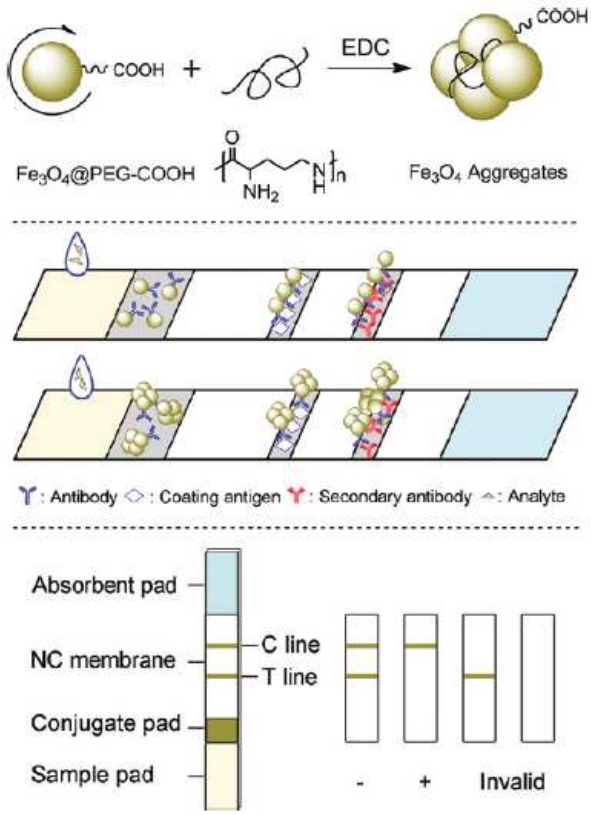
○ 자성나노입자의 농약 검사측정 응용

- Lateral flow immunochromatographic assay (LFIA) 또는 lateral flow test는 thin layer chromatography와 immune recognition reaction이 결합한 solid-phase immunoassay로, medical diagnosis, home testing, point of care testing, 그리고 detection of various environmental and agricultural contaminations에서 타 방법에 비하여 간단하고 빠른 응답과 값산 기술임.
- 금, 셀레늄, 카본, 라텍스, 리포좀, 양자점과 같은 색을 가진 입자에 표적물질을 감지할 수 있는 항체를 고정하여 사용. 특히 금 나노입자는 플리즈몬 공명으로 효과적인 검출이 가능하기 때문에 많이 사용되고 있음.
- 금 나노입자가 높은 흡광계수를 가지고 있지만, 금 나노입자를 이용한 LFIA의 한계 검출 농도가 높기 때문에 한계 검출 농도를 높일 필요가 있음. 이러한 이유로 이종의 나노입자를 함께 사용하거나, 응집을 유도하여 검출 한계를 낮추는 방법이 보고되고 있음.
- D. Knopp과 co-workers는 자성나노입자에 금나노입자를 붙인 후, LFIA를 이용하여 음식물에 있는 aflatoxin B2 측정 감도를 높였음을 보고하였다.



(a) The fabrication process of the synthesized MnGMs, (b) the schematic illustration of the immunodipstick(left) and read out(right), and (c) principle of the detection method.

- M. Gao와 co-workers는 자성나노입자를 응집시켜서 사용함으로써 LFIA를 이용하여 음식물에 있는 paraoxon methyl을 1.7 ng/mL 까지 측정할 수 있다고 보고하였다.

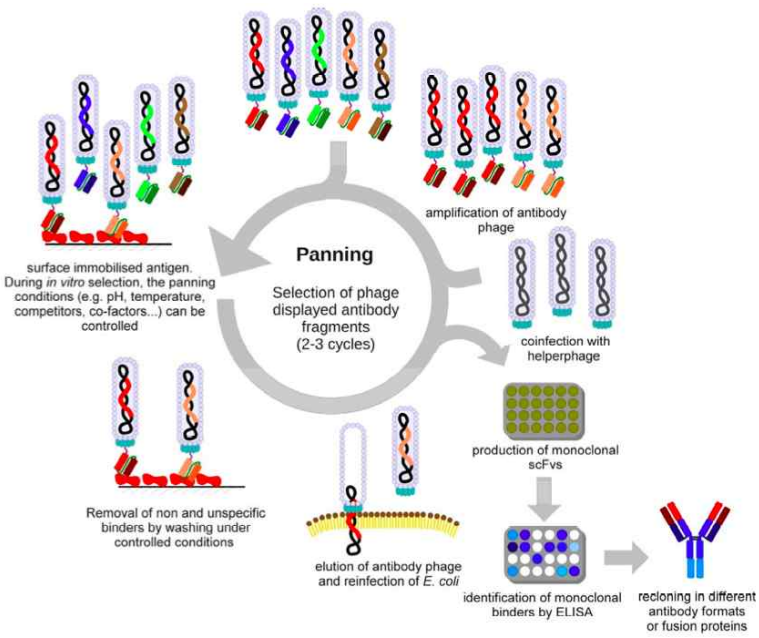


Schematic Drawings for the Preparation of Fe3 O4 Agregates (Upper Panel), LFIA Principle Based on Fe3 O4 Particles and Their Aggregates (Middle Panel), and the Structure of a LFIA Strip Together with the Illustrations for Detecting Results (Lower Panel)

○ Phage display

- 관심의 대상이 되는 물질을 선택적으로 검출하기 위해서는 그 물질에만 선택적으로 결합하는 receptor를 확보해야 한다. 검출하고자 하는 물질의 종류는 매우 다양한데 단백질, 핵산 같은 생체 고분자일 수 있고, 저분자 화합물이 될 수도 있다. 가장 쉽게 생각할 수 있는 선택적 receptor는 antibody이다. Antibody는 높은 선택성 때문에 다양한 분야에서 가장 많이 이용되고 있지만, 단점 역시 가지고 있다. 무엇보다도 특정 target에 대한 antibody를 selection하는 데에는 많은 시간과 노력이 소모된다. 또한 antibody는 분자량이 상당히 큰 편이며, 이황화결합의 안정성 등으로 인해 사용하기 어려운 경우가 있다. Antibody 생산 자체에도 비교적 많은 비용이 소요된다. 이러한 antibody의 단점을 보완하고자 antibody의 항체 결합부위만으로 이루어진 antibody fragment를 대신 사용하려는 노력들이 다방면에서 시도되어 왔다. 그 중 하나가 바로 single chain variable fragment (scFv)인데, scFv는 antibody의 heavy chain과 light chain의 항체결합부위만 peptide linker로 연결된 구조를 가지고 있다. 이러한 scFv는 antibody의 선택성을 상당부분 유지하면서도, 크기가 작고 또 비교적 안정하다는 장점이 있다. 또한 대장균에서도 생산될 수 있다는 사실과 더불어 phage display를

통해 특정 항원에 선택적으로 결합하는 scFv를 상당히 빠른 시간 내에 쉽게 선택할 수 있기 때문에 다방면에 응용할 수가 있다. 예를 들어, 이번 과제에서는 검출대상인 fluoroquinolone 계열 항생제에 일반적으로 결합하는 scFv, 혹은 그 중에서도 enrofloxacin에만 결합하는 scFv들을 비교적 쉽고 빠르게 얻어낼 수 있었다. Phage display를 이용한다면 다른 계열의 항생제에 대해서도 그에 상응하는 scFv를 얻어낼 수 있을 것이다. Phage display에 의한 scFv selection기술은 그림 1에 자세히 소개되어 있다. Selection의 전과정을 panning이라고도 부르며 이를 위해서는 먼저 scFv 유전자 라이브러리가 확보되어야 한다. 보통10^9개 이상의 다양성을 가진 scFv 유전자가 각각 박테리오파지의 표면 단백질을 coding하는 유전자의 위치에 삽입되어 있다. 그러면 이 유전자가 박테리오파지에서 발현되었을 때 각각의 scFv는 박테리오파지의 표면에 발현되어 겉으로 드러나게 된다. 이제 검출하고자 하는 타겟 항원을 일반적으로 사용하는 plate에 고정화시키고 이 위에 scFv 라이브러리를 각각 발현하는 박테리오파지를 넣고 일정시간 두면, 그 항원에 대한 결합력이 좋은 scFv는 washing 후에도 여전히 항원에 붙어있을 것이다. 따라서 결합력이 없는 scFv는 일반적인 washing 과정을 통해 제거하고 결합력이 좋은 scFv를 포함하는 박테리오파지만 base를 이용한 강한 washing을 통해 얻어낸다. 이렇게 얻은 박테리오파지는 대장균에 넣어 증폭시키고 이후 helper phage를 추가적으로 넣어주면 온전한 박테리오파지가 대장균 밖으로 나오게 된다. 이를 정제해 얻어내고 비특이적으로 결합하는 scFv를 확실히 제거해주기 위해 위에서 서술한 과정을 2-3 번정도 더 진행한다. 최종적으로 얻어낸 scFv는 일반적으로 ELISA를 통해 antigen과의 결합능력을 검증하고, 여기서 검증된 후보 scFv는 SPR이나 ITC 등을 통해 추가적으로 binding을 확인한 후 실제 원하는 실험에 이용하게 된다. 이러한 새로운 기술을 이번 연구를 통해 적용하였고, 특정 항생제에만 선택적으로 결합하는 scFv를 성공적으로 얻어내고 이용할 수 있었다.



Phage display에 의한 antibody selection

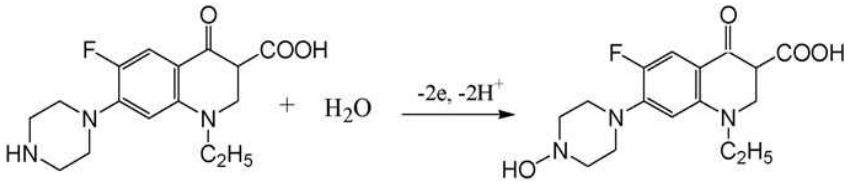
○ 비천연 아미노산이 들어있는 단백질

- scFv에 기반한 센서를 만들기 위해서는 단백질을 고정화시키는 과정이 반드시 필요하다. 예를 들어 나노입자에 단백질을 고정화 시킬 경우, 보통 나노입자 표면에 NHS ester를 도입하고 이를 단백질의 amino group과 반응하게 해주는 경우가 대부분이다. NHS ester가 아닌 다른 작용기를 이용해 단백질을 결합시키더라도 대부분 단백질의 lysine에 있는 amino group을 이용하게 된다. Cystein의 thiol을 이용하는 경우도 있지만 cystein은 단백질마다 존재하는 비율이 상당히 차이가 난다. 하지만 lysine은 일반적으로 단백질에 비교적 풍부하게 존재하기 때문에 좋은 고정화 매개체가 되는 것이다. 하지만 그에 따른 단점이 존재하는데, 무엇보다도 단백질을 고정화하는 orientation이 무작위점이라는 사실이다. 단백질은 다른 물질과 결합하거나 혹은 효소작용을 하는 특정 활성부위가 존재한다. 따라서 단백질을 고정화시키더라도 이 활성부위는 가려지지 않아야 한다. 하지만 amino group을 통한 단백질 고정화는 활성부위에 대한 고려가 없기 때문에 활성부위를 막아버릴 수 있게 된다. 그렇기 때문에 단백질을 원하는 위치에서만 고정화시킬 수 있는 방법이 단백질 기반 센서를 만드는 데에 필요하며, 이를 위해서는 단백질에 새로운 작용기를 넣어주어, 이 작용기를 통해서만 단백질을 고정화시킬 수 있으면 된다. 이러한 목적에 부합하는 가장 대표적인 기술이 단백질에 비천연 아무노산을 유전적으로 넣어주는 것이다. Scripps 연구소의 Schultz group에서 처음 개발된 이 기술은, 종결코돈의 하나인 UAG를 인식하는 tRNA와 그에 상응하는 새로운 비천연 아미노산, 그리고 역시 이에 맞는 amino-acyl tRNA synthetase를 특정 selection 과정을 통해 얻어내는 것이다. 단백질을 코딩하는 유전자에 UAG codon이 등장하면 단백질 합성이 종결되는 것이 아니라 새로운 비천연 아미노산이 들어간 단백질이 만들어지게 된다. 이를 통해 70 개가 넘는 비천연 아미노산이 단백질에 포함될 수 있음을 증명하였다. 새로운 작용기를 가지는 비천연 아미노산의 대표적인 예는 p-acetylphenylalanine, p-aziodephenylalanine이다. Acetyl group은 단백질에 존재하지 않으면서 hydrazide나 aminooxy group과 선택적으로 반응할 수 있다. Azido group 역시 단백질에 존재하지 않고, 여러 alkyne과 선택적으로 반응한다. 따라서 단백질에 이러한 작용기가 들어 있을 경우 단백질 고정이 필요한 표면에 그에 맞는 작용기를 도입해 줌으로써 결국 단백질의 특정 위치를 통한 고정화가 가능하다. 단백질의 활성부위 반대편에 이러한 작용기를 도입해주고 고정화하면 활성부위가 확실히 밖으로 노출될 것이기 때문에 단백질 센서의 성능이 한결 나아질 것이라고 예상해 볼 수 있다.

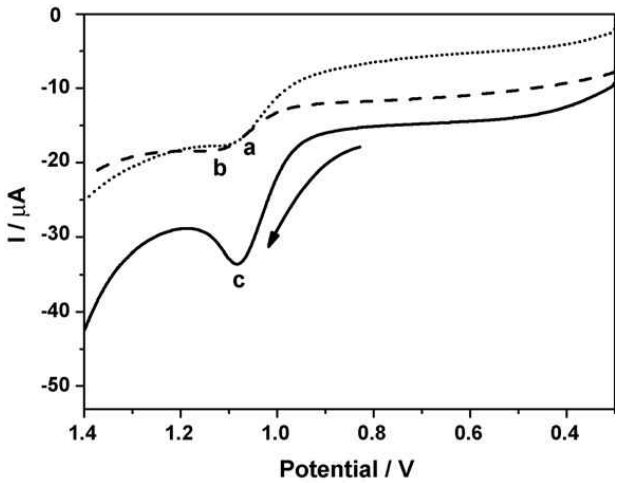
○ multi walled carbon nanotubes로 표면이 수식된 glassy carbon 전극을 이용하여 norfloxacin을 전기화학적으로 검출하는 방법

- multi walled carbon nanotube(MWCNTs)를 nafion 용액에 분산시킨 후, glassy carbon 전극에 떨어뜨려 고정시킨 센서를 이용하여 퀴놀론 계 항생제 중 하나인 norfloxacin(NFX)의 산화 반응을 일으켜 그 신호로부터 NFX를 검출함.

- NFX의 전기화학적 산화반응의 메카니즘은 아래와 같음.



- 이 논문에서 제작한 센서의 감도를 bare glassy carbon 전극과 비교하였음.



- 위 그림에서 곡선 a는 bare glassy carbon에서 NFX가 산화될 때 얻은 결과이며, 곡선 b는 bare glassy carbon 전극에 nafion만 코팅하였을 때의 NFX 산화 곡선임. 마지막으로 곡선 c는 bare glassy carbon 전극에 MWCNTs가 분산된 nafion을 코팅한 후에 NFX가 산화될 때 얻은 결과임. 세 가지 곡선을 비교하면 약 1.1 V에서 곡선 c에서의 산화 전류가 가장 크게 나타나고 있음을 알 수 있음.
- 방해 물질의 영향을 확인하기 위하여 다음과 같은 물질에 대하여 NFX 의 산화 신호에 대한 변화 여부를 확인함.
  (1) 이온종: Na^+, K^+, Mg^{2+}, Pb^{2+}, Ca^{2+}, Al^{3+}, Fe^{3+}, Cl^-, NO_3^-, SO_4^{2-}
  (2) 유기물: uric acid, oxalic acid, citric acid, glucose, lactic acid, tartaric acid
  (3) vitamin: B1, B2, B12, C
- 실험 결과 위의 물질의 영향이 5% 이내로 미미함을 확인함.
- 이러한 전기화학 센서의 검출 한계는 5.0×10^{-8} mol/L이며, 검출 범위는 1.0×10^{-7} - 10×10^{-4} mol/L 임.

제 7 장 참고문헌

M. Gao et al., Lateral Flow Immunochromatographic Assay for Sensitive Pesticide Detection by Using Fe3O4 Nanoparticle Aggregates as Color Reagents, Anal. Chem. 2011, 83, 6778.

D. Knopp et al., Magnetic nanogold microspheres-based lateral-flow immunodipstick for rapid detection of aflatoxin B2 in food, Biosensors and Bioelectronics 2009, 25, 514

S. B. Park et al., Pharmacophore-based Strategy for the Development of General and Specific scFv Biosensors for Abused Antibiotics. BioconjugateChem. 2011, 22, 88 - 94.

Family-selective detection of antibiotics using antibody-functionalized carbon nanotube sensors. SensorsandActuatorsB:Chemical 2012, inpress.

K. Colwill et al., A roadmap to generate renewable protein binders to the human proteome. Nature Methods 2011, 8, 551.

M. Hust et al., Phage Display for the Generation of Antibodies for Proteome Research, Diagnostics and Therapy. Molecules 2011, 16, 412.

P. G. Schultz et al., An Enhanced System for Unnatural Amino Acid Mutagenesis in E. coli. J. Mol. Biol. 2010, 395, 36.

P. G. Schultz et al., Adding New Chemistries to the Genetic Code. Annu. Rev. Biochem. 2010, 79, 413.

K. Drlica and X. Zhao, 'DNA gyrase, topoisomerase Ⅳ, and the 4-quinolones'. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997, 61, 377.

G. J. Heo, K. S. Shin and M. H. Lee, 'Diseases of aquaculture animals and prevention of drug residues'. Kor. J. Food. Hygiene. 1992, 7, 7.

M. K. Hassouan, O. Ballesteros, J. Taoufiki, J. L. Vilchez, M. Cabrera-Aguilera and A. Navalon, 'Meltirrsidue determinat ion of quinolones in eggs of laying hens by liquid chromatography with fluo rescence detection'. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007, 852 625.

Z. Zeng, A. Dong, G. Yang, Z. Chen and X. Huang, 'Simultaneous determina tion of nine fluoroquinolones in egg white and egg yolk by liquid chroma tography with fluorescence detection'. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed LifeSci. 2005, 821, 202.

C. M. Karbiwnyk, L. E. Carr, S. B. Turnipseed, W. C. Andersen and K. E. Miller, 'Determination of quinolone residues in shrimp using liquid chromatography with fluorescence detection and residue confir mation by mass spectrometry'. Anal. Chim. Acta. 2007, 596, 257.

M. J. Schneider, A. M. Darwish, and D. W. Freeman, 'Simultaneous multiresidue determination of tetracycline and fluoro quinolones in catfish muscle using high performance liquid chrom atography with fluorescence detection'. Anal. Chim. Acta. 2007, 586, 269.

B. Roudaut, and J. C. Yorke, 'High-performance liquid chromatographic method with

fluorescence detection for the screening and quantification of oxolinic acid, flumequine and sarafloxacin in fish'. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed LifeSci. 2002, 780, 481.
N. Gorla, E. Chiostri, L. Ugnia, A. Weyers, N. Giacomelli, R. Davicino and H. G. Ovando, 'HPLC residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in eggs of laying hens'. Int. J. Antimicrob. Agents 1997, 8, 253.
V. Hormaza´ bal and M. Yndestad, 'Rapid Assay for Monitoring Residues of Enrofloxacin in Milk and Meat Tissues by HPLC'. J. Liquid Chromatogr. 1994, 17, 3775.
D. C. Johnson, S. G. Weber, A. M. Bond, R. M. Wightman, R. E. Shoup and I. S. Krull, 'Electroanalytical voltammetry in flowing solutions'. Anal. Chim. Acta 1986, 180, 187.
M. Ghoneim et al. 'Determination of Norfloxacin by square-wave adsorptive voltammetry on a glassy carbon electrode'. J. Pharm. Biomed. Anal. 2001, 25, 205.
A. Radi and Z. El-Sherif,'Determination of levofloxacin in human urine by adsorptive square-wave anodic stripping voltammetry on a glassy carbon electrode' Talanta 2002, 58, 319.
S. Zhang and S.Wei, 'Electrochemical Determination of Ciprofloxacin Based on the Enhancement Effect of Sodium Dodecyl Benzene Sulfonate'. Bull. Korean Chem. Soc. 2007, 28, 543.
Lopez Riquelme, J., Soto, F., Suardiaz, J., Sanchez, P., Iborra, A., et al. Wireless sensor networks for precision horticulture in southern Spain. Computers and Electronics in Agriculture. 2009, 68, 25.
Park, H. D., Kim, H., Moon, J. and Choe, Y. C. Integration of RFID and Sensor Networks into ERP: Innovation of Mushroom Farm's Decision Making. Journal of Information. 2011, 14, 3049.
한국농촌경제연구원 (2011). 농업, 농촌에 대한 2011년 국민의식 조사결과.
정기혜 (2011). 우리나라 사회기반 강화를 위한 식품안전관리의 정책방향. 한국보건사회연구원. 179. pp. 51-63.
농림수산식품부 (2011). 차세대 농림수산식품정책 IT융합 마스터플랜.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 국가연구개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 국가연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.