

발간등록번호

11-1543000-000575-01

즉석식품 유통 중 주요 식중독균 (*L. monocytogenes*)의
신속 검출 시스템 및 식중독균 저감화를 위한
천연 복합저해제의 개발

(Development of a rapid detection system for a major
foodborne pathogen(*L. monocytogenes*) and mixed natural
antimicrobial agent of foodborne pathogens in a
ready-to-eat food distribution)

(주)차바이오메드

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “즉석식품 유통 중 주요 식중독균(*Listeria monocytogenes*)의 신속 검출 시스템 및 식중독균 저감화를 위한 천연복합저해제의 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 10 월 10 일

주관연구기관명 : (주)차바이오테드

주관연구책임자 : 정 광 회

연 구 원 : 이 광 형

연 구 원 : 김 옥 환

연 구 원 : 김 성 중

연 구 원 : 정 영 훈

협동연구기관명 : 차의과학대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 고 성 호

협동연구기관명 : 경희대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 이 주 훈

요 약 문

I. 제 목

즉석식품 유통 중 주요 식중독균(*Listeria monocytogenes*)의 신속 검출 시스템 및 식중독균 저감화를 위한 천연복합저해제의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 본 연구는 식중독균을 현장에서 신속 정확히 검출하기 위한 시스템 및 전자신호 검출기를 개발하는 것이며, 또한 천연 미생물 저해물질을 이용하여 천연복합저해제를 개발하는 것이다.

○ 즉석식품 생산공정 및 각각의 유통단계에서 식중독균을 신속히 현장 모니터링을 할 수 있는 시스템의 개발이 필요하고, 이들의 존재 시 천연식품 보존제를 이용하여 각 단계별로 식중독균을 억제하는 시스템을 확보하여 식품의 안전성과 보존성의 확보가 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 검출시스템에 사용되는 GBP-Protein G 의 대량 생산 및 정제 방법 확립
- 주요 식중독균인 *Listeria monocytogenes* 검출을 위한 항체제작 및 검출용 바이오센서 판독기 개발
- 나노입자 기반 시료 전처리 시스템과 고감도 전기화학식 바이오센서가 일체화된 시스템 개발
- 천연미생물저해제인 락토페린, 나이신 및 키토산을 활용한 최적화된 천연복합저해제의 개발

IV. 연구개발결과

○ GBP-Protein G를 대장균에서 발현하고, 친화 크로마토그래피를 사용하여 간단하게 정제할 수 있는 방법을 확립하였다. 식중독균 *Listeria monocytogenes*에 대한 단클론 항체를 제작하였으며, hybridoma 세포로부터 항체를 생산, 정제하여 COC 칩에서 작용할 수 있는지를 보였다. 또한 이러한 항원-항체 반응을 전기화학 신호로 관찰할 수 있는 검출기를 개발하였다.

○ 플라스틱 기반 골드 칩과 미세유체 채널의 제작 및 효과적 항체 고정화 방법을 개발하였으며, 일체화된 전기화학 면역-바이오센서에 의한 식중독균 검출 시스템을 개발하였다.

○ 즉석식품의 안전성 및 보존성 증대를 위한 스프레이형태의 천연복합저해제를 개발하였으며, 천연복합저해제 처리 및 비처리 샘플의 비교분석과 함께 관능평가를 수행하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

○ 고감도 바이오센서의 개발로 다양한 식품내에 존재하는 *Listeria monocytogenes*의 현장 검출 가능성을 보였으며, 천연복합저해제의 개발로 식품의 보존성을 증대시키고 식중독 예방효과를 기대할 수 있다.

○ 방향성 있는 항체 고정화 방법과 이를 이용한 전기화학식 면역-바이오센서 개발은 다양한 질병 검사와 병원균 발견에 활용이 가능할 것으로 보인다.

SUMMARY

I. Title

Development of a rapid detection system for a major foodborne pathogen (*Listeria monocytogenes*) and mixed natural antimicrobial agent of foodborne pathogens in a ready-to-eat foods distribution.

II. Research purpose and necessity

- This research is to develop an electrochemical device system detecting foodborn pathogens on fields and a mixed antimicrobial agent via natural materials.
- It is necessary to develop real-time monitoring system of foodborn pathogens in a manufacturing process and every stage of distribution of ready-to-eat food and to guarantee food safety by their inhibition system using natural antimicrobial agents.

III. Research contents

- Establishment of a mass production and purification method of GBP-Protein G used in detection system.
- Manufacturing of antibodies and a biosensor for detection of major foodborne pathogen, *Listeria monocytogenes*.
- Development of jointed system of nanoparticle-based sample pre-treatment system and a sensitive electrochemical biosensor.

IV. Results

- Plastic-based gold patterned immunochip and microfluidic channel was fabricated, and an effective antibody immobilization method was developed. Accordingly, electrochemical immunosensor was developed for rapid detection of foodborne pathogens.
- A natural antimicrobial agent as a spray form was developed to enhance the safety of ready-to-eat foods, and a comparison and sensory assay of the sample with/without treatment of a natural antimicrobial developed here were performed.

V. Achievement

○ The electrochemical biosensor was developed here for rapid detection and real-time monitoring of foodborne pathogens in field, and can be used to detect a *Listeria monocytogenes* on various foods. Also, the antimicrobial agents here can enhance the safety of foods, thus preventing the outbreaks of foodborn pathogens.

○ The electrochemical biosensor developed with the effective antibody immobilization can be used not only to diagnosis various diseases, but also to detect various pathogens.

CONTENTS

I. General description of the project	14
1. Project objectives	14
2. Necessity	14
3. Scopes of the project	16
1) Main organization	16
2) First cooperative institution	17
3) Second cooperative institution	18
II. Current R&D status in Domestic and Foreign	19
1. Current status in Domestic and Foreign	19
1) Internal and external condition	19
2) Current research in domestic and foreign	20
(1) Biochip	20
(2) Natural antimicrobial agent in ready-to-eat food	22
3) Vulnerability in present technology and Prospect	25
2. Analysis of product and market	25
1) Product and market condition in domestic	25
2) Product and market condition in foreign	28

III. Contents and Results	31
1. Theoretical and experimental approach to research	31
1) Strategies	31
2) Methodology	32
(1) Biosensor	32
(2) natural antimicrobial agent	36
(3) Research cooperation system	43
2. Research contents	44
3. Results	45
3-1. Main organization performed	45
1) Basic production establishment in (GBP-Protein G) fusion protein and anti- <i>Listeria</i> antibody relating to <i>L. monocytogenes</i> detection system	45
(1) Optimization in production of (GBP-Protein G) fusion protein	45
(2) Antibody production via use of dead <i>L. monocytogenes</i> cell	49
2) Antigen specificity test of the prepared mAb in SPR system	70
3) Performance test of the prepared mAb with COC chip	77
4) Detection system development	81
3-2. First cooperative institution performed	85
1) Experimental methods	85

(1) Production of (SiMB/mAb anti- <i>Listeria</i>) complex	85
(2) Food sample selection and inoculation of <i>L. monocytogenes</i>	87
(3) Fabrication of COC chip	87
(4) Immobilization of pAb anti- <i>Listeria</i> onto upper gold surface of COC chip	88
(5) Detection of <i>L. monocytogenes</i> via COC chip	89
2) Experimental results	90
(1) Electrochemical signal measurements of COC chip in BSA-containing buffer dependent on CFU/mL of <i>L. monocytogenes</i>	90
(2) Electrochemical signal measurements of COC chip in BSA-containing buffer dependent on CFU/mL of <i>Salmonella typhimurium</i> (<i>S. Typhimurium</i>)	91
(3) Detection tests of <i>L. monocytogenes</i> in food samples	92
(4) Electrochemical signal measurements of COC chip in food samples dependent on CFU/mL of <i>L. monocytogenes</i>	94
3-3. Second cooperative institution performed	95
[1st year research results]	95
[2nd year research results]	112
[Re-validation of 2nd year research results and preliminary experiments of 3rd year research]	132
[3rd year research results – Food application of natural microbial agents]	143

1) Inhibition test of the remaining foodborne pathogens in ready-to-eat food with selection plates and PCR using pathogen-specific primers ..	143
2) Comparative experiments of developed natural antimicrobial agent to check effect	151
3) Availability evaluation of developed natural antimicrobial agent in prevention of foodborne pathogens	156

IV. Degrees of accomplishment and contributions in relative fields

1. Point of evaluation and Degrees of accomplishment	186
2. Contribution on technical development of relative fields	187

V. Research outcomes and applications

1. Research outcomes	188
1) Research outcomes and Performance against targets	188
(1) Patent outcomes	188
(2) Paper outcomes	189
2) Utilization of research results and Performance against targets	189
2. Plan for further application	189

VI. Foreign information collected during research

190

VII. Reference

191

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	14
제 1 절.	연구개발의 목적	14
제 2 절.	연구개발의 필요성	14
제 3 절.	연구개발의 범위	16
1.	제1세부과제	16
2.	제1협동과제	17
3.	제2협동과제	18
제 2 장	국내외 기술개발 현황	19
제 1 절.	국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황	19
1.	국내·외 현황	19
2.	연구개발대상 기술의 국내·외 현황	20
가.	바이오칩 기술 현황	20
나.	천연복합저해제 기술 현황	22
3.	기존 연구의 문제점과 전망	25
제 2 절.	제품 및 시장분석	25
1.	국내 제품생산 및 시장 현황	25
2.	국외 제품생산 및 시장 현황	28

제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	31
제 1 절.	이론적, 실험적 접근방법	31
1.	추진전략	31
2.	연구수행방법	32
가.	바이오센서 부분	32
나.	천연복합저해제 개발 부분	36
다.	연구추진체계	43
제 2 절.	연구내용	44
제 3 절.	연구결과	45
3-1절.	제1세부과제	45
1.	검출시스템에 관련된 골드 융합 단백질 및 항체생산 기반확립	45
가.	골드융합 단백질의 최적 생산조건 확립	45
나.	사균체를 이용한 항체제작	49
2.	제작된 단클론 항체의 항원 특이성 시험 : SPR system 이용	70
3.	제작된 항체를 이용한 COC chip에서의 성능시험	77
4.	검출시스템 개발	81
3-2절.	제1협동과제	85
1.	실험방법	85
가.	SiMB/monoclonal anti- <i>Listeria</i> complex의 제조	85
나.	식품 샘플(양상추)의 선정 및 <i>L. monocytogenes</i> 접종	87

다. COC chip의 제작	87
라. COC chip 상판 골드 표면으로의 polyclonal anti- <i>Listeria</i> (pAb <i>Listeria</i>)고정	88
마. COC chip을 통한 <i>L. monocytogenes</i> 검출	89
2. 실험결과	90
가. BSA가 포함된 샘플 버퍼내의 <i>L. monocytogenes</i> 의 CFU/mL에 따른 COC chip의 신호 변화측정	90
나. <i>Salmonella typhimurium</i> (<i>S. Typhimurium</i>)의 CFU/mL에 따른 COC chip의 신호 변화 측정	91
다. 식품 내에 존재하는 <i>L. monocytogenes</i> 의 검출 가능성 실험	92
라. 식품 샘플 내 <i>L. monocytogenes</i> 의 CFU/g에 따른 COC chip의 신호 변화 측정	94
3-3절. 제2협동과제	95
[1차년도 연구결과]	95
[2차년도 연구결과]	112
[2차년도 연구결과의 재검증 및 3차년도 연계예비실험]	132
[3차년도 연구결과 - 천연복합저해제의 RTE 식품 적용]	143
1. 선택배지 및 각 식중독균 검출을 위해 제작된 특이적인 프라이머를 이용한 PCR을 통하여 실제 RTE 식품 내 잔존하는 식중독균의 저해 유무 확인	143
2. 개발된 복합 천연미생물저해제의 효과를 확인하기 위한 비교실험 수행	151
3. 개발된 복합 천연미생물저해제의 식중독균 예방제로서의 유용성 평가	156

제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	186
제 1 절.	평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도	186
제 2 절.	관련분야의 기술발전예의 기여도	187
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	188
제 1 절.	연구개발 성과	188
1.	연구개발결과의 성과 및 목표 대비 실적	188
가.	특허 성과	188
나.	논문게재 성과	189
2.	연구성과 활용 목표 대비 실적	189
제 2 절.	성과활용계획	189
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	190
제 7 장	참고문헌	191

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 목적

즉석식품(Ready-to-eat food)의 생산 및 유통 단계에서 식중독균을 현장에서 신속 정확히 검출하기 위한 나노입자 기반 시료 전처리 시스템과 고감도 전기화학식 바이오센서가 일체화된 시스템 개발 및 전자신호 검출기의 개발.

- 천연미생물저해물질인 락토페린, 나이신 및 키토산의 식중독균저해 최적배합을 연구하고 이를 응용하여 냉장유통중 Ready-to-eat 식품의 안정성 및 보존성을 확보하여 저장기간을 증가시킬 수 있는 천연복합저해제 개발을 목표로 함.

제 2 절. 연구개발의 필요성

- 세계적으로 ready-to-eat 식품의 경우 60% 이상의 식품에서 *Listeria monocytogenes*가 존재하는 것으로 보고되어지고 있지만 식품 위해 미생물 검출 시스템의 경우 *E. coli*나 *Salmonella*와 같은 균에 치중되어 있음. 이에 따라 냉장온도에서도 생장 가능한 *L. monocytogenes*의 신속하고 정확한 검출 시스템 구축을 통해 소비자의 식중독 발병을 예방함으로써 국민 건강 증진에 기여할 필요가 있음.
- 식중독균을 모니터링 하기 위한 기존의 방법은, 균을 배양하여 수를 증대시켜 정량적 분석을 하는 것으로, 균별로 자라나는 배지의 특성이 달라 이들을 이용하여 균을 식별해 내었음. 그러나 이러한 방법은 최종 결과를 얻는데 있어, 장비가 갖추어진 실험실에서 교육 받은 전문가에 의해 복잡한 과정을 거쳐 2-3일 정도의 긴 시간이 필요한 단점이 있음. 이에 대안적인 PCR 방법인 경우, 균의 DNA외의 외부 DNA가 샘플에 존재할 경우 이들을 주형으로 하여 PCR을 하게 되면 전혀 다른 결과가 나올 수 있는 false positive의 우려가 커 이에 대안적인 식중독균 검출 방법이 절실함.
- 기존의 전기화학 면역-바이오센서는 항체를 골드 전극표면에 결합시키기 위해 다양한 화학적 처리 방법을 광범위하게 사용하고 있으나, 이는 항체가 원래의 삼차원적 구조를 가지며 본래의 기능을 유지한 채 고정화되기가 쉽지 않고, 긴 시간과 여러 단계의 복잡한 화학적 처리를 거쳐야 하는 번거로움이 있으며, 전문적 인력이 또한 필요한 단점을 보이고 있음. 따라서 항체를 항원과 결합하기에 적절한 방향성(orientation)과 고유기능을 유지 하면서 신속 간단히 바이오칩 표면에 고정화 시키는 새로운 방법의 개발이 절실함.
- 또한, 전기화학 바이오센서의 전극표면에 항체를 결합시키기 위해 사용되는 기존의 방법

은 전극표면에 부착물막(fouling)을 형성하여 분석물질 검출에 의해 생성된 전자가 전극 표면에 전달되는 것을 방해함으로써, 검출신호가 감소하게 되고 이는 전기화학 바이오센서의 민감도를 감소시키게 됨. 따라서 전극 표면에 fouling이 생기지 않도록 하는 기술개발이 절실히 필요함.

- 식품에서 검출물질을 분리하는 기존의 방법은, 원심분리기로 질량에 따른 분리와 용매 또는 버퍼와 같은 기존의 희석액을 통한 균의 분리 및 동정 과정과 같이 전문가들에 의해 이틀 이상 소요되어 현장에서 바로 사용이 힘들었음. 이에 식품 유통 단계에서 식품 내 미생물 분리 과정을 신속 정확하게 하는 기술 개발이 절실히 필요함.
- 특히 냉장유통되는 Ready-to-eat 식품의 안전성 확보 및 저장성 증대를 위해서 현재 인체 내 안전성이 검증되지 않은 다양한 화학합성 식품보존제를 다량 사용해 왔음.
- 화학합성 식품보존제의 안전성 문제로 말미암아 전세계적으로 천연복합저해제에 관한 다양한 연구가 활발히 진행되어져 왔음.
- 해외에서는 이미 개발되고 안전성이 확보된 천연저해제의 식품사용이 FDA에 의해서 허가되었으며 다양한 식품적용이 조금씩 현실화되고 있으나, 단일 천연저해제의 사용은 인체에 안전하나 화학합성 식품보존제에 비하여 낮은 항균성 및 협소한 저해능에 의해서 현재 식품적용영역이 아직 미비함.
- 최근의 연구결과는 나이신의 경우 그람양성균만을 저해하는 단점을 가지고 있으며 락토페린의 경우 다양한 식중독균 및 바이러스까지도 저해할 수 있으나 철분이 상당량 포함된 식품의 경우 수명이 짧은 단점이 있고 키토산의 경우에는 항균성은 높으나 물에 불용성이며 떫은맛을 낸다는 단점이 있음.
- 따라서 국내에서 현재 개발되어진 대표적인 천연저해제인 박테리오신(나이신), 락토페린, 수용성 키토산 등을 선도적으로 혼합 및 최적화하여 각 천연저해제의 문제점인 협소한 미생물저해능 및 짧은 수명을 보완하고 식중독균의 저감능을 극대화하여 냉장유통되는 Ready-to-eat 식품의 안전성 및 보존성 확보가 필요함.
- 또한 이러한 천연미생물저해성분들은 높은 항균력 이외에도 면역력 증강 및 생체기능조절 등의 많은 장점을 가지고 있어서 인간친화적이며 산업적으로 유용한 천연복합저해제 소재로서 각광받을 것임.

- 또한 최적화된 천연복합저해제 혼합물은 사용상 편의를 위해서 스프레이형태로 개발하여 식품생산현장 및 다양한 식품소비장소에서 간편하게 사용할 수 있도록 개발될 예정이다.
- 따라서, 본 연구에서는 나노입자를 이용한 간편 식품 전처리 시스템 및 효과적 항체 고정화 방법이 융합된 고감도 전기화학 바이오센서를 개발하여, 즉석식품에 있는 식중독균을 각각의 유통 단계에서 바로 간단히 검출하는 시스템을 개발하고 즉석식품 생산공정중에 스프레이 형태의 천연식품 보존제를 이용하여 식품의 안전성과 보존성을 확보하고자 함.
- 본 과제에서 개발될 시스템으로 즉석식품 생산공정 및 각각의 유통단계에서 식중독균을 신속히 현장 모니터링 한 후, 이들이 존재 시 식품 천연보존제를 함유한 스프레이를 이용하여 각 단계별로 식중독균을 억제하는 연계 시스템을 개발 하고자 함.

제 3 절. 연구개발의 범위

1. 제1세부과제

. 연구개발의 최종목표

- Ready-to-eat 식품의 냉장 유통중 식중독의 원인이 되는 *Listeria* 검출을 위한 항체제작 및 검출용 바이오센서 판독기 개발

나. 연구개발의 주요내용

(1) *Listeria monocytogenes* 식중독균의 사균체를 이용한 단클론 항체의 제작

- 현재 알려진 *Listeria* 항체보다 감도가 우수한 단클론 항체의 제작

: mouse에 사균체 또는 균체 파쇄물을 마리당 100ug을 4회 반복하여 복강에 1달간 투여 함.

4주 후 마우스 혈청으로부터 항체생성 여부를 판별한 후 mouse 내의 비장을 적출하여 항체 생산용 SP2/0 cell과 융합하여 단클론 항체 생산용 세포주 확립

- 기존의 상용화된 *Listeria monocytogenes* 식중독균의 항체 또는 검출 kit와 제조된 항체에 대한 역가 비교

(2) 골드표면에 항체를 신속 간단히 고정 시킬 수 있는 바이오링커 최적 생산 조건 확립

- 유전자 재조합 방법을 이용한 골드결합단백질(GBP)과 protein G(ProG)의 융합단백질

(GBP-ProG) 재조합 생산

○ 온도, 배양시간, 발현유도, 정제 조건 확립

(3) 신호 측정을 위한 검출기 개발

○ 표준화된 전극 칩에 항체가 융합단백질에 의해 균일도와 재현성을 가지면서 결합하는지를 cyclic voltammetry (CV) 데이터를 이용하여 확인할 수 있는 검출기 개발

(4) *Listeria monocytogenes* 식중독균에 대한 고감도 휴대형 전기화학 바이오센서 검출기 및 센서에 대한 시스템 구축 및 상용화

○ 골드가 박막된 전극 칩과 미세유체 채널을 제작하고, 이 전극 칩에 항체가 융합단백질에 의해 균일도와 재현성을 가지면서 결합하는지를 cyclic voltammetry (CV) 데이터를 확인하면서 분석

○ 마이크로 채널 내의 유체 흐름 분석

○ 자성 나노입자에 의한 전기적 신호 증가 유무 분석

(5) *Listeria monocytogenes* 식중독균에 대한 천연식품 보존제 상용화

○ 스프레이형태의 천연복합저해제의 식품공장, 냉장유통, 소비장소 등에서 유용성 및 활용도 조사 및 상품화

2. 제1협동과제 연구개발 목표 및 내용

가. 자성 나노입자를 이용한 식품전처리 시스템의 개발 및 융합단백질 합성

(1) 실리카 코팅된 자성 나노입자 표면의 protein G를 이용한 최적의 항체 고정화 조건 확립

(2) 자성입자/항체 복합체와 *Listeria*균의 특이적 결합 정도 확인

(3) 즉석식품 샘플과 자성입자/항체/균 복합체의 분리를 위한 전처리 시스템 개발

(4) 골드표면에 항체를 신속 간단히 고정 시킬 수 있는 바이오링커 기술 개발

나. 전극과 미세유체채널이 일체화된 바이오센서 제작

(1) 플라스틱 기반 바이오센서 칩 제작

○ 전극 및 미세유체 채널의 설계 조건 확립(골드 패턴의 두께, 넓이, 간격 결정 및 채널의 넓이 및 높이 결정)

○ 융합단백질 및 항체의 전극칩 표면에 고정화 균일도, 재현성 분석

(2) 제작된 플라스틱 기반 바이오센서의 *Listeria* 검출 성능 테스트(버퍼용액내 1000 cells/ml)

○ 자성 나노입자에 의한 신호 증가 유무 확인(10% 증가)

다. 일체화된 검출 시스템 개발 및 시작품 제작

- (1) 시료 전처리 디바이스와 바이오센서가 일체화된 시스템에 의한 즉석 식품내 *Listeria* 검출 성능 테스트(100 cells/ml) 및 다중 검출 시스템 개발을 위한 *E. coli* O157:H7 검출 테스트(100 cells/ml)
- (2) 시작품 제작 및 현장 성능 평가

3. 제2협동과제 연구개발 목표 및 내용

. 연구개발의 최종목표

- Ready-to-eat 식품의 냉장유통중 안전성 및 보존성 확보를 위하여 천연미생물저해제인 락토페린, 나이신 및 키토산을 활용한 최적화된 천연복합저해제를 개발하고 이를 응용하여 식품안전성 및 저장기간을 증대시킴을 최종목표로 함.

나. 연구개발의 주요내용

- (1) 식중독균에 의해 오염되기 쉬운 Ready-to-eat 식품을 냉장유통중 화학합성 식품보존제가 아닌 천연미생물저해제를 활용한 천연복합저해제를 개발하여 식품의 유해성을 저감하고 안전성을 증대시킴.
 - 현재 알려진 천연미생물저해제 중 몇가지를 선별하여 Ready-to-eat 식품에서 발견되는 주요한 식중독균에 대하여 저해능을 평가하고 선별된 저해제를 혼합하여 최적화 과정을 거쳐 가장 우수한 천연복합저해제를 개발함.
 - 개발되는 천연복합저해제를 스프레이형태로 만들어 여러 Ready-to-eat 식품에 적용하여 실제적으로 식품내 식중독균의 저해효과와 저장성 증대에 관련된 연구를 진행하여 확인함. 저해능은 5 log를 목표로 함.
 - 다양한 식품현장에서 적용하여 활용도를 조사하여 제품화하고 생산판매함을 목적으로 함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

1. 국내외 현황

- 국내의 즉석섭취(ready-to-eat), 즉석요리(ready-to-cook)와 같이 조리과정 없이 바로 섭취가 가능하거나, 간단한 조리 만으로도 식사가 가능한 식품은, 국내의 맛별이 부부의 증가와 핵가족화에 의한 소비문화의 변화로 그 판매량이 매년 50%이상 급증하고 있으며 예로서 2007년에는 즉석밥시장 2000억원 및 즉석죽시장 500억원에 달하여 전체적으로 엄청난 시장규모를 형성하고 있음.
- 국내의 식품 유통망이 확대됨에 따라 즉석식품의 수출 및 수입이 증가하고 있음. 이들 식품의 유통과정 내에서 발생할 수 있는 유해 세균의 침입, 냉장·냉동식품의 온도 유지 등에 대한 안전망 구축이 체계화 되어 있지 않다면 국내 식품 산업은 막대한 손해를 입게 될 것임. 이에 따라 유통과정 중에 체계적 유해세균 검출 시스템의 구축과 유해균의 오염예방 및 저해를 통한 본 연구과제의 개발은 국내 식품의 안전성 확보뿐만 아니라 국내 식품 산업의 세계화에 필요함.
- 즉석식품의 경우 소비자가 섭취하기 전에 미생물을 파괴하는 뚜렷한 가열공정이 없기 때문에 균에 오염되어 있을 경우 심각한 식중독을 유발할 수 있음. 따라서 즉석섭취식품에 대한 위해미생물과 같은 위생규격의 설정 및 검출과정은 소비자의 식중독 및 식품사고 예방에 필수적이라 할 수 있으며, 이에 따라 국내에서 현재 개발되어진 대표적인 천연저해제인 박테리오신 (나이신), 락토페린, 수용성 키토산 등을 선도적으로 혼합 및 최적화하여 각 천연저해제의 문제점인 협소한 미생물저해능 및 짧은 수명을 보완하고 식중독균의 저감능을 극대화하여 냉장유통되는 Ready-to-eat 식품의 안전성 및 보존성 확보가 필요함.
- 바이오센서는 항체, 효소, 핵산 등의 생체감지물질이 표면에 고정화되어 생물학적 인식 반응에서 나타나는 변화를 물리 화학적 신호로 전화하는 분석용 장치임. 전기화학 바이오센서는 극소량의 분석물질을 신속하게 고민감도로 측정할 수 있을 뿐만 아니라 소형화에 용이하다는 장점이 있어, 현장에서 쉽고 신속·정확한 시료의 분석이 가능함. 이러한 시스템은 유통 중인 즉석식품의 안전성 평가에 아주 용이할 것으로 사료됨.
- 바이오센서는 제작 과정이 간단하여 현재 다국적 기업들을 중심으로 전 세계적으로 경쟁력 확보와 세계 시장 점유율 향상을 위하여 센서의 소형화, 다중 센서, 대량생산 등 여러 분야를 연구, 개발 중에 있으며, 바이오센서 산업은 전자공학, 화학, 생물학, 식품과학

등 과학 전반에 걸친 기술을 융합할 수 있는 미래형 융합산업으로 높은 성장성이 전망되고 있어 타 산업분야의 발전을 위해서도 바이오센서의 시장 성장이 필요함.

- 국내의 바이오칩 기술은 부분적으로는 세계적인 수준을 확보하고 있음에도 불구하고 플랫폼 기술을 해외에서 고가로 도입해야 하기 때문에 치명적 취약점을 안고 있으며, 관련 산업의 국제경쟁력 확보를 위해서는 플랫폼 기술을 국산화 할 뿐만 아니라 더 우수한 원천기술을 확보하는 것이 시급함.

2. 연구개발대상 기술의 국내· 현황

가. 바이오칩 기술 현황

- 나노바이오칩, 나노바이오센서, 나노바이오멤스, 나노생체소재, 나노생체 분석 등과 같은 핵심기술개발 연구가 활발히 진행되고 있음.
- 미국, EU의 경우 반도체 기술을 이용하여 초소형, 고감도를 목적으로 LOC (Lab-On-a-Chip), Micro-TAS(Micro-Total Analysis System)의 개념을 구현하기 위한 연구를 수행 중임.
- 미국 NIH는 나노미터 단위인 생물 분자를 이용해 집적화 밀도가 기존 실리콘 칩의 천만 배 이상 향상되는 장점이 있는 생물 전자소자, 혈액 내의 성분이나 생물반응기 내의 각종 성분을 측정 하는 바이오센서, 바이오메트릭 분자 펌프나 장비를 개발하는 나노바이오기계공학 등의 연구가 활발함.
- 일본의 경우 종합 과학기술회의에서 ‘2003년 과학기술에 관한 예산, 인재 자원배분의 방침’을 2002년 7월 24일에 발표하였으며, 그중에서 ‘경제활성화를 위한 연구 개발 프로젝트의 추진’을 방침 결정의 하나로 명시하였음. 융합연구 분야는 맞춤형 의료의 실현, 질환관련 단백질 해석, 재생 의료를 위한 줄기 세포기술과 신재료 개발, 나노 재료에 의한 인공장기의 개발, IT와 BT를 활용한 바이오센서와 같은 바이오분석, 측정기기 개발, 세포/생체기능 시뮬레이션, 생체구조를 나노수준으로 해석하는 극저온 전자현미경개발, 나노 캡슐형 인공 산소운반체의 개발에 역점을 두고 있음.
- Aclara BioSciences, GeneOhm, Affymetrix, Hewlett Packard, Agilent Tech., Nanogen, Zymix, CIPHERGEN Biosystems, Zeptosens사 등이 마이크로 PCR, DNA 칩, 단백질 칩, Cell 칩, 메타볼릭 칩, LOC 등 4세대 바이오센서 칩 연구개발에 주력하고 있음.

- 최근에는 단순한 생화학적 측면의 목적 외에도 대량검색, 다중동시 측정 또는 동시 진단, 조기 진단, 고감도 감지 등 기존 기술의 한계를 극복하기 위한 시도가 주목받고 있음.
- Innovative Biosensors Inc.는 미국내 많은 대학들과 공동 연구를 통해 식중독 균과 관련된 바이오센서를 제작 판매하고 있음. Georgia tech와 공동 연구한 Interferometric biosensor는 waveguide surface에 포획항체를 올려 대장균과 결합 시 발생하는 도파관 내에서의 빛의 빠르기를 측정하여 500~5000 cfu/ml의 *Salmonella*와 *Camphylobacter* 캄필로박터균을 검출하는 센서이고, Michigan state university와 공동 제작한 바이오센서는 *E. coli* 및 *Salmonella*가 특이적 항체에 결합했을 시 발생하는 전기적 신호를 인지하는 전기화학 바이오센서임. 이 뿐 아니라 Penn state university와 연계하여 100 cells/ml의 *E. coli* O157:H7을 검출할 수 있는 magnetic field impulse를 이용한 바이오센서 제작에 성공하였음.
- ARSOlux®사의 *E. coli* K12 검출용 portable luminometer는 수질오염도를 측정하는 바이오센서로 arsenic (luminescence)의 형광 세기를 측정함으로써 WHO기준 식수 가능 여부를 판단함.
- Millipore, invitrogen 등의 기업에서는 단백질과 미생물을 샘플로부터 자성입자를 이용하여 회수율을 높일 수 있는 kit를 판매하고 있음.
- 현재 판매되고 있는 식중독균 검출 바이오센서는 대장균과 살모넬라에 집중되어 있어 리스테리아에 대한 센서 시장이 구축되지 않았고, 식품으로부터 균을 분리해내는 과정이 복잡함. 따라서 간단한 전처리 시스템과 검출 시스템이 동시에 이루어지는 리스테리아를 신속히 검출하는 고감도 바이오센서의 개발이 시급함.
- 바이오센서 전문업체인 (주)올메디쿠스, (주)인포피아, (주)아이센서 등은 전기화학적 방법을 이용해 적은양의 혈액으로 혈당을 정확히 측정할 수 있는 혈당측정기를 개발하고 있음.
- 제니스 라이프 사이언스사에서는 제니스 래피드티비라는 결핵균을 검사하는 키트를 개발하여 민감도와 특이도가 높은 결핵균 항원을 선정하여 최적의 배합비로 제조함으로써 높은 민감도와 특이도를 나타내고 있음. 검사시간도 15분으로 매우 짧으며 기존의 결핵균 항체진단 시약과는 달리 발색제등의 시약이 필요 없어 사용법이 매우 쉬운 것이 특징임.

○ 디지털 바이오테크놀러지는 암 진단용 키트인 ‘RBC-해마토사이토미터’와 초소형 자동 혈액 응고 측정기인 ‘PT/APTT assay’라는 장비를 개발, 상용화에 성공하였음. 신약탐색에 필요한 DNA 분리, 검증과정을 한꺼번에 처리할 수 있는 랩온어칩 연구를 하고 있음.

○ 바이오칩 전문 벤처 제노프라는 단백질칩 ‘GP-ABB’를 응용해 대장균만을 골라 감지할 수 있는 핵산 가닥인 앵타머 (Aptamer) 물질을 센서에 장착하여 먹는 물속에 포함된 대장균을 현장에서 바로 검사 가능한 바이오센서를 개발하였음.

○ 국내 기업들의 주 관심 분야의 90% 이상이 의료용 바이오센서로, 식품분석용과 환경용 및 그 밖의 다른 분야에서의 관심도가 매우 낮음. 이로 인해 ready-to-eat, ready-to-cook 과 같은 식품의 소비 증가 추세에 비해 식중독균 검출 관련 국내제품은 아직 생산되지 않고 있음.

. 천연복합저해제

<락토페린의 기능성 및 항균력>

○ 락토페린은 포유류의 초유에 7 g/liter 함유되어 있으며 주로 세균의 생장에 필수요소인 철분의 흡착 및 제거를 통한 강한 **및 항바이러스성 물질**로 알려져 있음.

○ 특히 락토페린은 유용균으로 알려진 락토바실러스나 스트렙토코커스의 생육에는 영향을 미치지 않고 식중독균인 대장균, 포도상구균 및 살모넬라 등의 초기 생육을 억제하는 효과가 있음.

○ 그람음성균인 경우 세포막에 존재하는 Pore-formaing protein에 결합하여 직접적으로 미생물을 사멸시키는 작용도 있음.

○ 철분의 흡착에 의한 항균력을 보이므로 철분이 풍부한 육류제품의 경우에는 항균력이 다소 감소되는 면을 보이나 Food-grade galactose-rich polysaccharide (GRP)에 고정시켜 특수처리한 **activated lactoferrin**의 경우에는 항균력이 월등하게 뛰어나며 육류등에서도 뛰어난 항균력을 보임.

○ 예로서 철분이 많은 소고기의 표면에도 1%의 락토페린을 처리하였을 때 *E. coli* O157:H7의 경우 **최소 2.5 log 정도 더 감소**하였다는 연구가 보고됨에 따라 FDA에서 육류 보존제로서 65.2 mg/kg 이하의 범위에서 식품사용이 허가 되었음.

- 각종 면역세포와의 병합으로 증가 및 매크로파지(Macrophage)의 활성을 높이고 면역 단백질의 분비를 촉진시켜 면역 분비기관의 강화를 도우며 강력한 항산화 물질로 신체의 방어역할에도 일조함.
- 이러한 락토페린의 최근 연구는 또한 부분적으로 후천성면역결핍 바이러스 (AIDS), C형 간염 바이러스 (HCV), 헤피스 바이러스 (HHV) 등에 저항성을 띄므로 광범위한 천연복합저해제로서의 가능성을 보여줌.
- 최근 초유의 분리정제 기술이 발달됨에 따라서 우유의 유청 (Whey)로부터 락토페린의 대량생산이 가능해져서 항균성 및 항산화 기능을 강화한 국내 분유제품에 전체성분의 0.05% 및 이유식에는 0.001% 정도 첨가되고 있음.

<나이신의 기능성 및 항균력>

- 나이신은 락토코커스 락티스로부터 생산되는 **박테리오신의 일종**으로 천연항생물질임.
- 나이신은 **그람양성균 중 식중독균인 바실러스, 클로스트리움 및 리스테리아와 그들의 포자에 대하여 강한 항균활성을 보여주지만** 그람음성균과 효모 및 곰팡이류이 생육에는 영향을 주지 못함.
- 이러한 항균력은 나이신이 그람양성균이 세포막에 있는 phospholipid에 결합하여 천공 (pore)를 형성하므로 세포내 물질의 유출현상으로 말미암아 cell lysis를 유발하여 생김.
- 미국 FDA에서 1988년에 식품첨가제로 사용이 승인되었고 전세계 80개국에서 허가되었으며 **박테리오신의 일종이므로 내산성, 내열성 및 단백질분해효소에 대한 내성도 높은 편이며 상온시 상당히 안정적**이므로 다양한 식품에 천연식품보존료로서 사용되어지고 있음.
- 근래에는 다른 항생물질인 유기산, 라이소자임 등과 함께 혼합하여 항균력의 보완 및 강화를 위한 연구가 진행중임.

<키토산의 기능성 및 항균력>

- 키토산은 게나 새우 등의 갑각류 및 곤충류, 버섯류 등에서 주로 발견되는 천연항균물질로서 **항암작용, 면역강화작용, 콜레스테롤 저하작용 등의 여러 부가기능도** 보고되어 식품소재, 화장품소재 및 의료소재로 이용되고 있음.

- 고밀도의 양전하를 띠는 선형의 polyelectrolyte 구조이므로 양이온성인 아민기가 음전하를 띠는 미생물의 macromolecule에 부착하여 물질의 투과성에 영향을 주어 항균력을 나타냄.
- 또한 미생물의 DNA와 직접 결합하여 transcription 및 translation에 직접적으로 영향을 준다는 보고가 있음.
- 식중독균의 생육을 저해하며 특히 바실러스, 대장균, 포도상구균, 비브리오, 캄필로박터 및 효모 등에 강한 항균력 (1% 사용시 8 log까지 억제)을 보이며 이러한 항균력은 냉장온도에서 더욱 탁월함.
- 예로서 냉장유통되는 생면에 극소량의 키토산 (0.5 µg/ml)을 첨가해 줄 경우 보존기간을 1-2주 정도 늘리는 것으로 보고됨.
- 한국, 일본, 미국 등에서는 키토산이 식품첨가제로서 식품사용에 허가되었으나 일반적으로 물에 불용성이며 특유의 짙은 맛과 점성을 지니고 있어 식품사용에 어려움이 있었으나 최근에는 맛과 점성을 제거한 수용성 키토산 대량생산이 확충되어서 기능성 식품 소재로서 다양하게 사용되고 있음.

<천연미생물저해제를 혼합한 천연식품보존복합제의 국내외 연구동향>

- 나이신과 락토페린을 혼합하여 처리했을 경우가 나이신만을 처리했을 경우보다 리스테리아, 살모넬라 및 대장균의 수를 각각 50% 이상 저감했을 뿐만 아니라 특히 냉장유통되는 Ready-to-food에서 가장 문제가 되는 리스테리아의 경우에는 락토페린 2 mg/ml의 용액에 극소량의 나이신 (1.95 µg/ml)을 첨가해준 혼합제재에서는 완벽하게 억제되었음.
- 최근 키토산 및 나이신의 혼합처리는 각각 별도로 분리하여 처리했을 때보다 살모넬라, 바실러스, 대장균, 프로테우스 등의 식중독균에 대하여 최소저해농도 (MIC)가 2-10배이상 낮아짐을 보였으며, 또한 나이신의 약점인 그람음성균에 대한 저해능도 혼용에 따라서 상당히 향상되었고 키토산이 저해하지 못하는 식중독균인 푸사리움 (*Fusarium*)도 혼용후 저해됨을 보여주어 뛰어난 시너지효과가 있음을 입증함.
- 락토페린과 키토산의 혼합처리는 주로 키토산을 바탕으로한 식품용 필름에 락토페린과 라이소자임을 동시처리해주어 라이소자임을 처리해주었을 때보다 *E. coli* O157:H7 및 리스테리아에 대하여 3 log 정도의 항균력 증대가 관찰되어 키토산과 락토페린과의 시너지효과가 있음을 입증함.

○ , 키토산 및 나이신은 각각 천연미생물저해제이며 두 물질이 혼합되었을 때 항균력이 배가됨을 최근의 연구들이 보여주었으나 세가지 물질을 혼합하여 최적화를 통하여 항균력이 극대화된 천연식품보존복합체는 아직 보고된 바 없음.

○ 현재까지 락토페린, 키토산 및 나이신 등은 식품보존제로서 인식이 되어왔으나 식품안전성 확보를 위한 식중독균 저해 목적의 식품표면 도포용 혼합제제로서는 개발이 미흡한 실정임.

3. 기존 연구의 문제점과 전망

○ 나노바이오센서에 대한 연구개발을 위해 가장 큰 문제는 원천적인 핵심기술이 소수의 개발자들의 특허로 인해 후발주자들의 개발이 원천적으로 봉쇄당하고 있어 플랫폼 기술을 해외에서 고가로 도입해야 하는 치명적 취약점을 안고 있다는 것임. 관련 산업의 국제경쟁력 확보를 위해서는 플랫폼 기술을 국산화 할 뿐만 아니라 더 우수한 원천기술을 확보하는 것이 시급함.

○ 현재 바이오센서에 대한 수요가 가장 많은 분야는 의료부문으로 90%의 시장을 차지하고 있음. 그러나 최근 식중독균, 곰팡이독소, 조류독감, 멜라닌 과동과 같은 전 세계적으로 식품위생에 대한 관심이 증폭하고 있으므로 식품안전성 검사, 고품질 식품생산 및 생산단가를 낮추기 위한 식품공정향상과 같은 식품관련 분야에서도 바이오센서 연구가 활발해질 것으로 전망됨.

○ 기술경쟁의 관건은 원천 플랫폼 기술 개발 및 상업적 가치를 높이기 위한 반복재현성, 정확성, 그리고 저비용의 간단한 바이오칩의 제조 방법에 의한 대량생산의 문제가 대두되고 있고, 새로운 개념의 바이오물질 고정화 기술과 나노기술을 접목하면 다양한 생물학적 분석평가시스템에 적용 가능한 나노바이오 센서 칩을 개발할 수 있는 기술경쟁력을 가질 것으로 전망됨.

제 2 절. 제품 및 시장분석

1. 국내 제품생산 및 시장 현황

○ 핵가족화의 보편화, 맞벌이 부부의 증가에 따른 여성의 사회진출 확대 및 혼자 사는 20-30대 젊은층들의 증가, 가공 기술의 발달에 따라 편의성을 중시하는 식품 소비 형태가

증가하면서 식품 소비 패턴은 3S(Simple, Speedy, Saving) 시대를 맞이 하였음. 이로 인해 2005년도에 ready-to-eat 식품 중 즉석밥 시장이 1,200억원으로 급성장하기 시작하면서 주)CJ, 주)농심, 주)오뚜기, 주) 동원 F&B 등 대기업들이 ready-to-eat 시장에 뛰어들고 있음

○ 우리나라 ready-to-eat 식품의 440품목을 수거하여 위생지표세균 검사 및 식중독균 검사를 실시한 결과 제품별로는 초밥이 20.4%로 가장 높은 미생물 검출을 보였으며, 다음으로 13.3%의 김밥, 12.5%의 회, 6.9%의 샐러드, 2.8%의 샌드위치 순으로 나타났음. 검출된 미생물로는 황색포도상구균이 6.6%로 가장 많이 검출었으며, 다음은 2.7%의 대장균군, 2.3%의 리스테리아균, 0.7%의 바실러스 세레우균, 0.5%의 대장균 순서로 검출되었음.

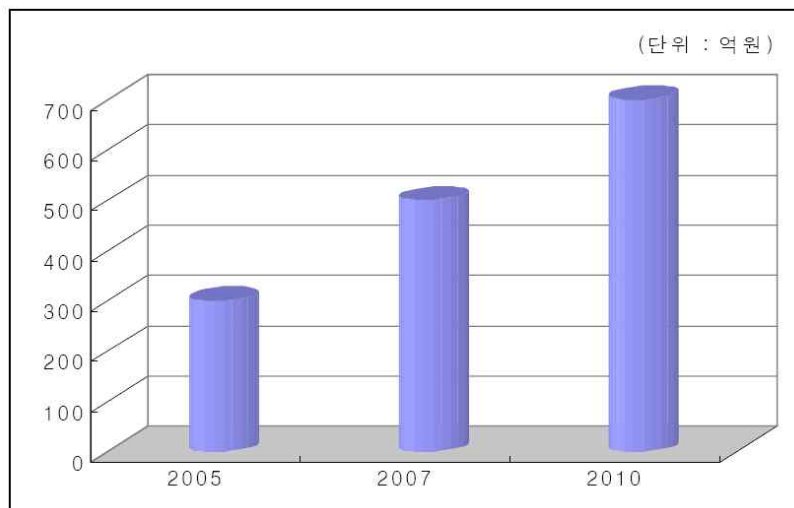
Samples	Food borne pathogen				
	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V. para-haemolyticus</i>	<i>B. cereus</i>
Kimbab	3/108(2.8%) ¹⁾	ND ²⁾	2/108(1.9%)	ND	2/108(1.9%)
Sushi	15/108(13.9%)	ND	3/108(2.8%)	ND	1/108(0.9%)
Salad	2/72(2.8%)	ND	4/72(5.5%)	ND	ND
Sandwich	2/72(2.8%)	ND	ND	ND	ND
Sashimi	7/80(8.8%)	ND	1/80(1.3%)	ND	ND
Total(%)	29/440(6.6%)	ND	10/440(2.3%)	ND	3/440(0.7%)

¹⁾ No. of detected sample/Total sample(%)

²⁾ Not Detected(negative)

<표 1> ready-to-eat 식품에서의 식중독균 검출(Kim, H.K. et al., J.Fd Hyg. safety. 2008)

○ 2002년 한국과학기술정보연구원과 보건산업기술 동향에서 보고한 자료에 따르면 국내 바이오센서의 시장규모는 2001년에 약 50억원이었고, 2003년에는 약 100억원 정도의 시장이 형성될 것이라 예상하였음. 국내 바이오센서의 시장 성장률이 향후 세계 시장의 연평균 성장률(CAGR 10.45)과 비슷하다고 할 때 국내 바이오센서 시장 규모는 2005년 약 300억, 2007년에 약 500억, 2010년에 약700억으로 2005년에서 2010년 사이의 누적 연평균 성장률은 18.5%로 예상되고 있음.



<그림 1> 바이오센서 국내시장 규모(자료: 한국과학기술정보연구원, 2002)

○ 우리나라의 바이오센서 시장은 (주)올메디쿠스, (주)인포피아 (주)아이센스, 바이오포커스 등 몇 군데의 벤처기업에서 전기화학적 방법을 이용해 적은양의 혈액으로 혈당을 정확히 측정할 수 있는 혈당측정기를 제품으로 출시하고 있는 상태로 최근 매출이 상승하고 있음.

○ 제니스 라이프 사이언스사에서는 제니스 래피드티비라는 결핵균을 검사하는 키트를 개발하였음

- 민감도와 특이도가 높은 결핵균 항원을 선정하여 최적의 배합비를 선정하여 제조함으로써 높은 민감도와 특이도를 나타냄

- 검사시간도 15분으로 매우 짧으며 기존의 결핵균 항체진단 시약과는 달리 발색제등의 시약이 필요 없어 사용법이 매우 쉬운 것이 특징

○ 디지털 바이오테크놀러지

- 암 진단용 키트인 'RBC-해마토사이토미터'와 초소형 자동 혈액 응고 측정기인 'PT/APTT assay'라는 장비를 개발, 상용화

- 신약탐색에 필요한 DNA 분리, 검증과정을 한꺼번에 처리할 수 있는 랩온어칩 연구

- 고객이 원하는 용도의 시약 형상에 따라 플라스틱 재질의 미세유동채널 및 소형 정밀 튜브로 구성된 플라스틱 마이크로 랩온어칩을 제작, 공급할 계획임

○ 국내 기업들의 주 관심 분야의 90% 이상이 의료용 바이오센서로, 식품분석용과 환경용 및 그밖의 다른 분야에서의 관심도가 매우 낮음. 이로 인해 ready-to-eat, ready-to-cook과 같은 식품의 소비 증가 추세에 비해 식중독균 검출 관련 국내제품은 아직 생산되지 않고 있음.

○ 2004년 기준 국내 식품첨가물 전체시장은 9392억원이며, 수출 225백만달러 수입은 418백만달러였음.

○ 그러나 해마다 전체 식품첨가물 시장은 5.2%씩 성장하고 있음¹.

○ 방부제, 보존료, 향미생물제재 등을 포함하는 국내 식품보존제 전체 시장은 식품첨가물 시장의 약 30% 수준으로 예측되고 있고 그 중에 천연물식품보존제의 경우에는 이제 막 산업화의 시작으로 들어가는 단계이므로 아직 통계적으로 잡혀있지 않음².

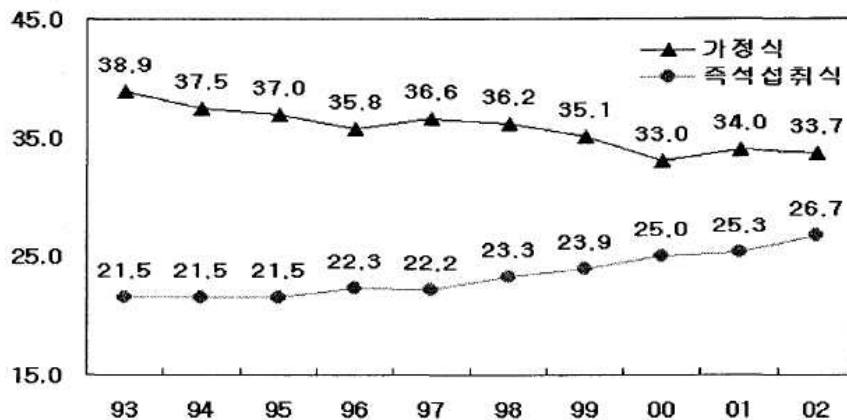
○ 2010년에는 항진균성이 우수한 천연항생물질인 Natamycin이 경북바이오산업연구원에서 개발되어 Natam이라는 제품으로 천연저해제로 상품화함³.

○ 현재 국내의 천연복합저해제로서는 주로 주정이나 식물유래 항균오일류, 아이소프레노이드, 피놀린, 황화계열 물질 등의 단독 또는 혼합제 수준에서 활용되고 있으나 특히 식물유래제품의 경우 저해효과가 약하고 저해기작이 명확하지 않는다는 단점이 있음⁴.

○ 락토페린이나 나이신 또는 키토산을 이용한 직접적인 식중독균저해 제품은 극소수의 경우를 제외하고는 아직 시장에서 유통되고 있지 않음.

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

○ 미국의 경우, 즉석섭취편의식품의 지난 8년간 평균 성장률은 7.5%에 달하고 슈퍼마켓을 통하여 판매된 즉석섭취편의식품이 \$ 24 billion에 달하는 것으로 보고됨(IRI, 2002). 또한 구입하여 그대로 섭취할 수 있는 신선한 야채샐러드도 매년 23%를 성장하여 1997년도에 \$ 1.7 billion에서 2003년도 \$ 16 billion까지 성장함.



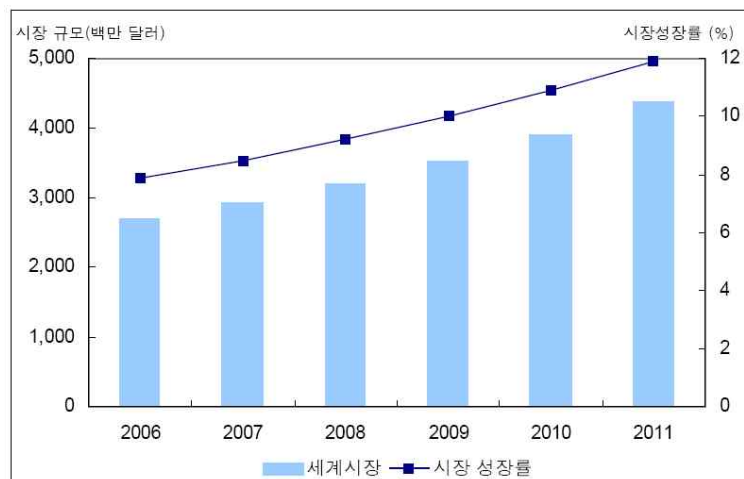
<그림 2> 미국 연도별 가정식과 즉석섭취식의 비율 추이 (NPD Group, 2002)

○ 인도의 경우 ready-to-eat 식품 시장은 2009년도 기준 약 3350만 달러 규모로 형성되어 있으며 지난 5년간 연평균 15%의 성장률을 기록함. 인도 즉석식품 시장은 2014년까지 두배 규모로 성장할 것으로 예상됨.

○ 영국의 경우 ready-to-eat 식품 중 과일, 채소 시장은 연간 602백만 파운드로 과채류 시장의 8.1%를 차지하고 있으며 2003년에서 2005년 사이에 소비율이 75.6% 증가함. 일본의 경우 2005년 KGF International Inc.에서 추정된 결과 전체 과채류 시장의 약 10% 수준인 3,000억엔으로 6년 사이에 2배 이상의 시장을 형성한 것으로 나타남.

○ 미국 FDA에서는 즉석섭취 식품에 의한 식중독 사고 중 *Listeria monocytogenes*세균에 의해 매년 2,500 건의 심각한 식중독이 발생하고 약 500여명이 생명을 잃고 있어, 즉석식품에 대해 *Listeria monocytogenes*의 규격을 “zero tolerance”로 관리하고 있음.

○ 바이오센서 세계 시장의 90%는 의료용으로 사용되고 있으며, 2006년 약 27억 달러규모에서 2007년에 약 29억 달러, 2008년에 약 32억 달러, 2009년에 약 35억 달러, 2010년에 약 39억 달러, 2011년에는 약 43억 달러로 2006년 대비 약 61.7%가 증가할 것으로 전망되고 있음. 또한 2006년에서 2011년 사이의 누적 연평균 성장률은 10.09%로 예상되고 있음.



<그림 3> 바이오센서 세계시장 규모(자료: Frost and Sullivan, 2005)

○ 식품 테스트용 바이오센서의 시장은 2002년에 약 1억 1,220만 달러 규모였으며, 2004년까지 연평균 12.7%의 성장으로 약 1억 4,250만 달러 정도임. 한편, 식품용 바이오센서 분야에서 오염물질 테스트용 센서 시장은 2002년에 약 4,170만 달러에서 2004년에 5,340만 달러로 전체 시장에서 약 37.5%를 차지하는 것으로 나타났음. (Fuji-Keizai USA Inc., 2004. p72).

(단위 : 백만달러)

구분	2002	2003	2004
Chemical Contaminants	41.7	47.3	53.4
Food Pathogens	19.4	22.4	25.6
GMO Testing	9.7	10.6	11.4
Chemical Test of Food Compounds	12.2	13.5	15.0
Spoilage Microbes	20.6	23.7	27.1
기타	8.6	9.3	10.0
합계	112.2	126.8	142.5

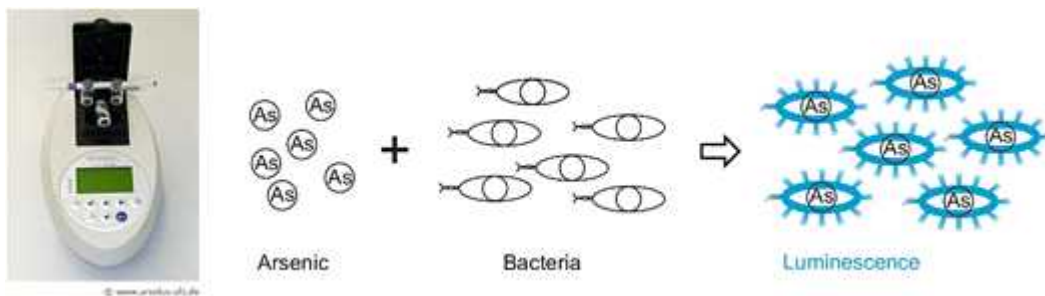
<표 2> 세계 식품 바이오센서 시장 (출처: Fuji-Keizai USA Inc., 2004. p72).

○ Innovative Biosensors Inc.는 미국내의 많은 대학들과 공동 연구를 통해 식중독 균과 관련된 biosensor를 제작 판매하고 있음. Georgia tech와 공동 연구한 Interferometric biosensor는 waveguide surface에 포획항체를 올려 대장균과 결합시 발생하는 도파관 내에서의 빛의 빠르기를 측정하여 500~5000 cfu/ml의 살모넬라와 캄필로박터균을 검출하는 센서이고, Michigan state university와 공동 제작한 바이오센서는 E. coli 및 *Salmonella*가 특이적 항체에 결합했을 시 발생하는 전기적 신호를 인지하는 electrochemical biosensor임. 이 뿐 아니라 Penn state university와 연계하여 100 cells/ml의 E. coli O157:H7을 검출할 수 있는 magnetic field impulse를 이용한 바이오센서 제작에 성공하였음.



<그림 4> 오른쪽부터 Georgia Tech Interferometric Biosensor, Michigan State Electrochemical Biosensor, and Penn State Magnetoelastic Sensor Reader.

○ ARSOLux®사의 E. coli K12 검출용 portable luminometer는 수질오염도를 측정하는 바이오센서로 arsenic (luminescence)의 형광 세기를 측정함으로써 WHO기준 식수 가능 여부를 판단함.



<그림 5> ARSOLux® Biosensor

○ Millipore, invitrogen 등의 기업에서는 protein과 cell을 샘플로부터 magnetic beads를 이용하여 회수율을 높일 수 있는 kit를 판매하고 있다.

○ 판매되고 있는 식중독을 일으키는 식품내 유해균 검출 바이오센서는 대장균과 살모넬라

에 집중되어 있어 리스테리아에 대한 센서 시장이 구축되지 않았고, 식품으로부터 균을 분리해내는 과정이 추가적으로 필요하여 분리 시스템과 센서 시스템이 동시에 이루어지는 리스테리아를 검출하는 전기화학 바이오센서의 개발이 시급함.

○ 2007년도 국제 식품보존제의 시장규모는 5750억 달러로 추산되며 2008년도에는 7100억 달러로 예상됨⁵.

○ 외국의 경우 락토페린, 나이신 및 키토산의 경우 활발히 기능성 식품소재 및 식품보조제로서 사용되어지고 있음.

○ 부분적 및 전체 정제된 락토페린, 나이신 및 키토산 제품을 직접 식품보존제로서 사용할 수 있도록 다양한 제품화가 되어 있음.

○ 그러나 이러한 천연미생물저해제들을 최적조합하여 식품보존제 및 식중독균 저해제 목적으로 개발되어 제품화되고 상업화한 제품은 아직 적은 상태임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 이론적, 실험적 접근방법

1. 추진전략

- 융합단백질(GBP-ProG)은 유전자재조합 방법에 의한 대장균 발현 시스템을 통해 분자생물학분야와 단백질 합성 분야에 전문성을 갖추고 있는 본 주관기관(차바이오메드)에 의해 합성될 것임. 또한 인유두종바이러스(HPV) 유전자 칩과 형광판독기를 기 개발한 경험이 있는 차바이오메드 연구팀에서 바이오센서용 전기화학신호 검출기를 제작 할 것임.
- 자성 나노입자는 나노입자 합성에 전문적 경험을 보유하고 있는 동 대학의 윤태종 교수로부터 공급 받을 것임. 전기화학 신호 분석에 이용되는 플라스틱 기반 전극 칩 및 미세 유체(microfluidic) 채널은 이 분야에 관한 다양한 경험을 보유하고 있는 제1협동 고성호 교수 연구팀의 아이디어로 설계 및 디자인 된 후, MEMS 및 나노기술 관련 최첨단 장비들과 우수한 인력을 보유하고 있는 “국가나노종합팩센터”에 의뢰 해 제작하기로 상호 동의가 이루어진 상태임.
- 본 연구는 이러한 추진체계를 바탕으로 즉석식품에서 발견되어지는 식중독 균의 하나인 *Listeria monocytogenes*를 검출할 수 있는 고감도의 휴대형 전기화학 바이오센서의 산업화를 촉진하고자 함.
- 제2협동 이준호 교수 연구팀은 (주)이지바이오시스템 생물자원연구소 및 미국 University of Minnesota에서 천연복합저해제 및 천연항생제대체제의 개발과 관련하여 락토펜리신 및 비피더스 박테리오신과 같은 천연미생물저해의 발굴, 개발 및 상품화에 밀접하게 관련하여 다년간 연구경험 및 개발경험을 축적해옴.
- 냉장유통중 Ready-to-eat 식품에 존재하는 다양한 식중독균에 관련된 항균력 및 저감능 연구는 서울대 식품공학과 유상렬교수 연구팀, 최상호교수 연구팀 그리고 미국 Washington State University의 강동현교수 연구팀 (현 서울대 식품공학과)과의 긴밀한 공조를 바탕으로 정기 세미나 및 빈번한 연구회의 등을 통해서 식중독균 및 천연복합저해제에 관련된 다양한 정보 및 연구기술력을 확보할 수 있음.
- 천연보존제인 락토펜린의 경우 주생산기업인 뉴질랜드의 Southern Country나 남양유업, 매일유업 등의 분유제조회사와 긴밀히 협조하여 도움을 받을 것이며 수용성 키토산의 경우 국내제조업체인 태평양, 키토바이오 및 건풍바이오 등에서 도움을 받을 예정임.
- 최종적으로 주관연구기관인 차바이오메드에서는 3개의 세부과제로부터 도출되는 결과물

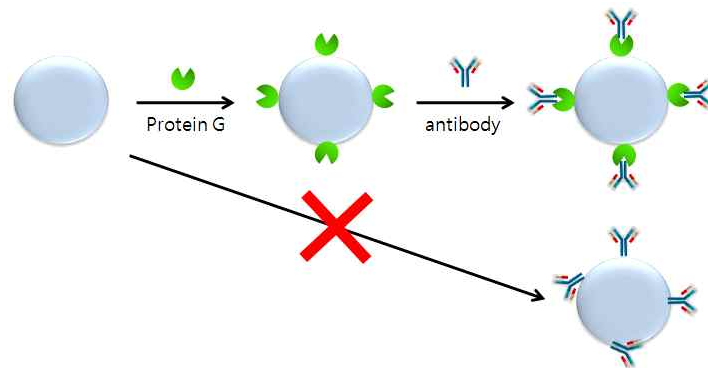
을 하나의 시스템으로 구성하고 상용화 개발을 완료할 예정임.

2. 연구수행 방법

가. 바이오센서 부분

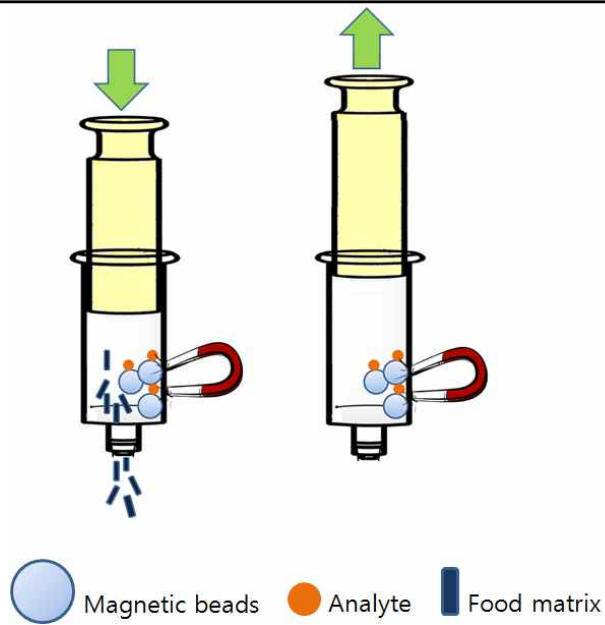
(1) 나노 자성입자에 의한 식품 전처리 기술 개발

- 기존의 식품내 위해 세균 분리 및 검출 방법은 식품을 PBS 버퍼와 같은 희석 용액을 이용하여 $10^1 \sim 10^{10}$ 으로 희석한 뒤 희석액을 선택배지에 도말하여 30℃에서 48시간 이상 배양하여 관찰하였음. 식품 유통 단계에 있어서 48시간은 식품이 이미 소비자들에게 판매되어 섭취할 정도의 시간이므로 식중독균 검출을 위한 신속하고 정확한 분리 및 검출 방법이 필요함.
- 따라서 본 연구진은 자성입자에 항체의 배향성을 유지시켜 줌과 동시에 항체의 Fc 부위와 특이적으로 결합하는 Protein G를 고정화 시킨 후 항체와 반응시켜 자성입자/항체 복합체를 형성하고 공초점 현미경으로 복합체 형성 정도를 분석할 것임.



<그림 6> 자성입자/항체 복합체 모식도

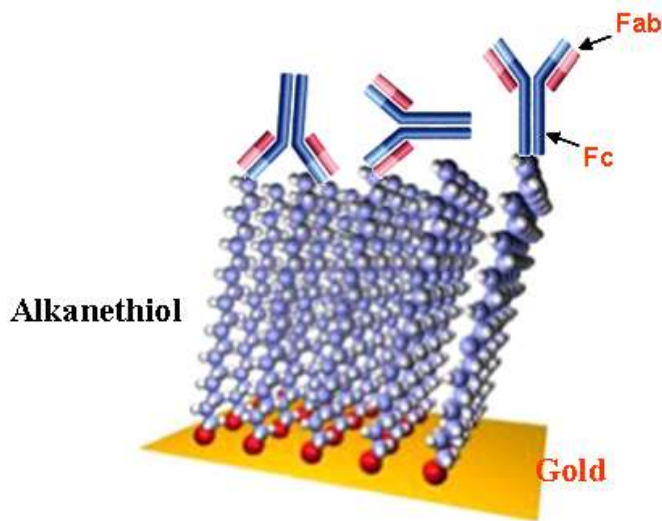
- 이러한 자성입자/항체 복합체를 필터, 자석이 일체화된 주사위 시스템에 도입하여, 주입구로부터 압력을 가해 줌으로서 자석과 결합한 자성입자/항체/미생물 결합체를 제외한 식품 시료에 있는 부산물을 제거하는 방법을 통해 *Listeria* 균을 신속하고 간편하게 분리할 수 있는 시스템을 구축하고자 함.



<그림 7> 자성입자에 의한 분리 모식도

(2) 골드 표면에 효과적 항체 고정화 방법 구축

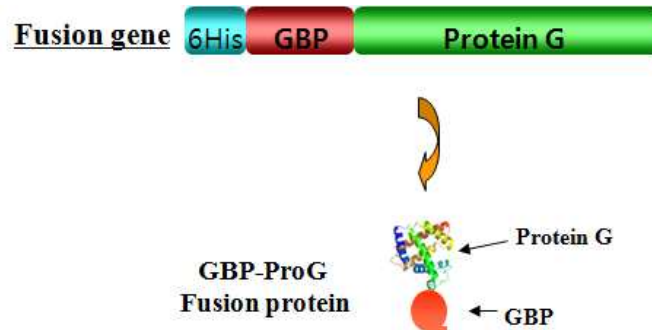
○ 금속 전극칩을 이용한 바이오센서 중에서는 골드 칩이 대표적인데, 지금까지 진행되어온 골드 칩을 이용한 단백질, DNA, 탄수화물 고정화 방법은 골드 칩 표면에 복잡한 화학적인 방법으로 항체를 고정시켜 항체의 항원 결합부위인 Fab 부위가 항원과 결합할 수 있는 방향성을 갖지 못하는 경우가 생김.



<그림 8> 자기조립방법(SAMs)에 의한 항체의 고정화 모식도

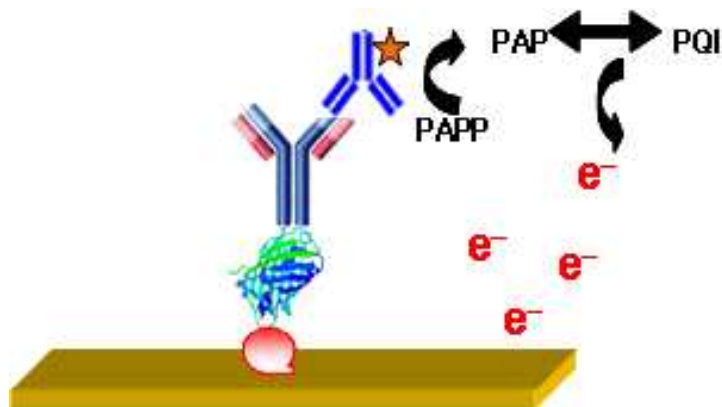
○ 따라서 그림 9에서 나타낸 바와 같이, 골드에 선택적으로 결합하는 단백질인 골드결합단백질(GBP, Gold Binding Protein)과 항체의 Fc 부분과 특이적으로 결합하는 protein G(ProG)가 융합된 형태인 융합단백질(GBP-ProG)을 유전자 재조합 방법으로 합성하여 간

단한 항체 고정화를 위한 바이오링커로 개발 하고자 함.



<그림 9> GBP-Protein G 융합단백질 모식도

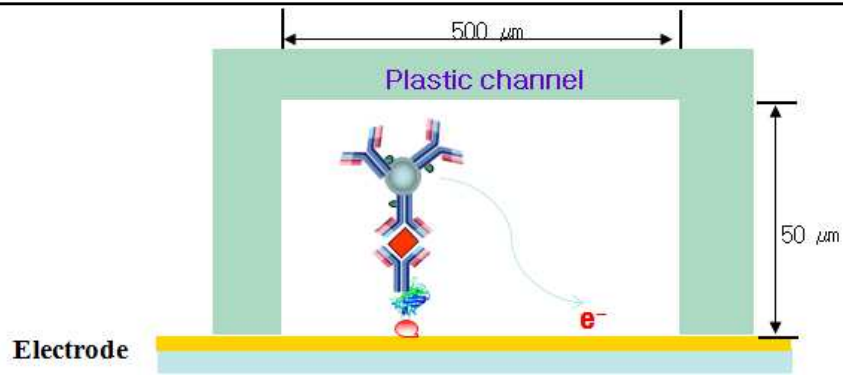
- 표준화된 전극 칩에 항체가 융합단백질에 의해 균일도와 재현성을 가지면서 결합하는지를 cyclic voltammetry (CV) 데이터를 확인하면서 분석함.



<그림 10> 골드 전극 표면에 융합단백질에 의한 항체 고정화

(3) 전기화학식 골드 전극 칩 및 미세유체 채널 제작

- 대량생산에 용이한 COC(Cycli olefin copolymer) 플라스틱으로 초미세공정시스템(MEMS) 기술을 이용하여 골드가 박막된 전극 칩과 미세유체 채널을 제작하고, 이 전극 칩에 항체가 융합단백질에 의해 균일도와 재현성을 가지면서 결합하는지를 cyclic voltammetry (CV) 데이터를 확인하면서 분석함.
- 마이크로 채널 내의 유체 흐름 분석
- 자성 나노입자에 의한 전기적 신호 증가 유무 분석



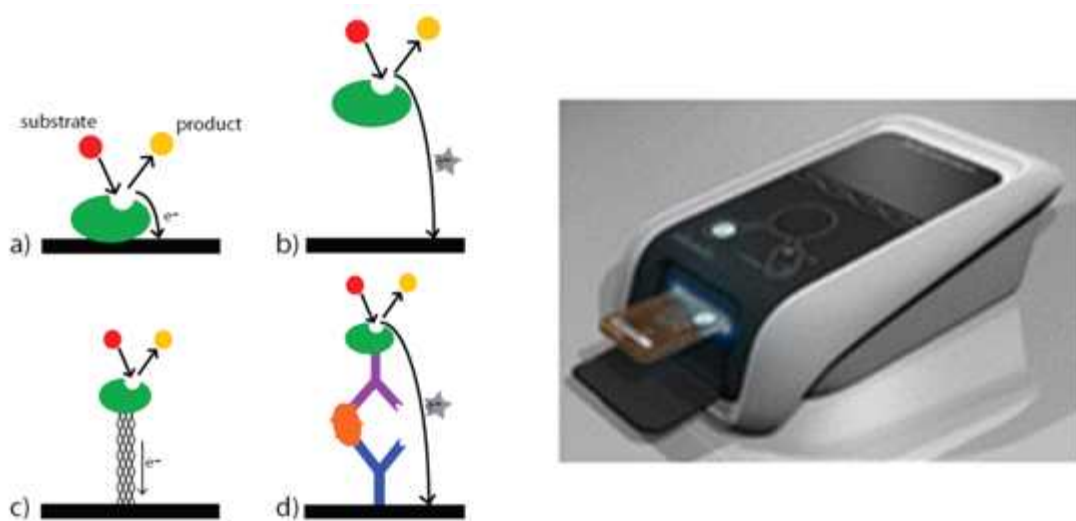
<그림 11> 전기화학 나노바이오센서 모식도

(4) 시료 전처리 시스템과 전기화학식 바이오센서에 의한 *Listeria monocytogenes* 검출 테스트

- 본 연구에서 개발될 나노입자 기반 시료 전처리 디바이스와 플라스틱 바이오센서가 일체화된 시스템에 의한 즉석식품내 *Listeria monocytogenes* 검출 성능 분석(민감도, 선택도 분석)

(5) 검출기 시제품 개발

- 그림 12에서와 같이 다양한 형태의 전자의 변환을 감지할 수 있는 검출기의 개발



<그림 12> 직/간접적 전자 변환예와 검출기 시제품(예시)

나. 천연복합저해제 개발 부분

(1) 식품용 선정

- 식품에 사용가능한 동물, 식물 및 미생물유래 천연미생물저해제에 관련된 자료를 수집하고 인체에 안전하고 식품에 적용가능하며 우수한 항균력을 가진 물질을 세가지 선별하여 혼용했을 경우 시너지효과를 가지는 물질로 최종 결정함.

○ 식품에 사용가능한 천연미생물저해제 및 원재료

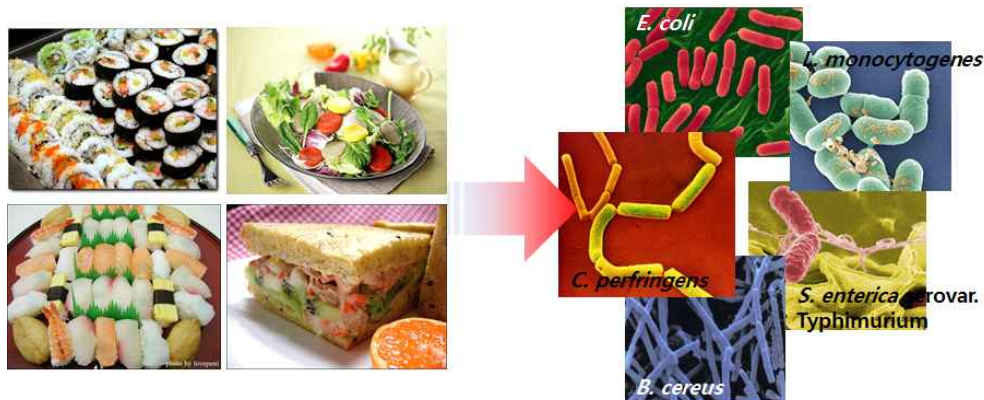
	원재료	천연미생물저해제
동물유래	초유 및 우유	Lactoferrin
	우유 및 계란	Lysozyme
	꿀	Glucose oxidase
	게, 새우	Chitosan
식물유래	향신료, 허브	Isoprenoid, phenolic
	양파, 마늘, 고추냉이	Sulfur compound
	겨자	Isothiocyanate
	포도씨	Grapefruit seed extract
	호프	Hop oil
미생물유래	<i>Lactococcus</i>	Nisin
	<i>Pediococcus</i>	Pediocin
	<i>Lactobacillus</i>	Lactocin, helveticin, sakacin
	<i>Leuconostoc</i>	Leucocin, mesentericin
	<i>Streptomyces natalensis</i>	Natamycin
	<i>Streptomyces albulus</i>	ε-polylysine

<표 3> 천연미생물저해제 및 원재료

○ 최근의 천연미생물저해제의 항균력 연구결과를 바탕으로 우수한 항균력 및 다른 물질들과의 시너지 효과, 그리고 인체내 안전성 및 식품내에서의 항균력 보존 및 식품내 사용승인여부, 그리고 식품 자체에 미치는 영향 등을 고려하여 락토페린, 나이신 및 키토산을 후보로 함.

(2) 각 천연미생물저해제의 식중독균에 대한 저해범위 (Inhibition host range) 및 저해능 평가

○ Ready-to-eat 식품에 일반적으로 존재하는 식중독균인 대장균, 리스테리아, 살모넬라, 바실러스, 클로스트리디움 등을 지표균으로 선정하고(그림 13), 각 식중독균의 최적한천배지에 미리 배양된 각 식중독균의 배지 100 µl 도달한 후 각 천연미생물저해제를 네 종류의 일정농도 (1, 10, 100, 1000 µg/ml)로 희석 후에 각 희석된 농도를 페이퍼디스크에 각기 20 µl를 적시고 식중독균이 도달된 한천배지에 올려놓아 최적 온도에 배양 후 저해환을 관찰함 (그림 14).



<그림 13> Ready-to-eat 식품에서 발견되는 식중독균들에 대한 지표균의 선정



<그림 14> 각 천연미생물저해제의 지표균에 대한 저해범위 및 저해능 실험

(3) 각 천연미생물저해제의 최소저해농도 결정

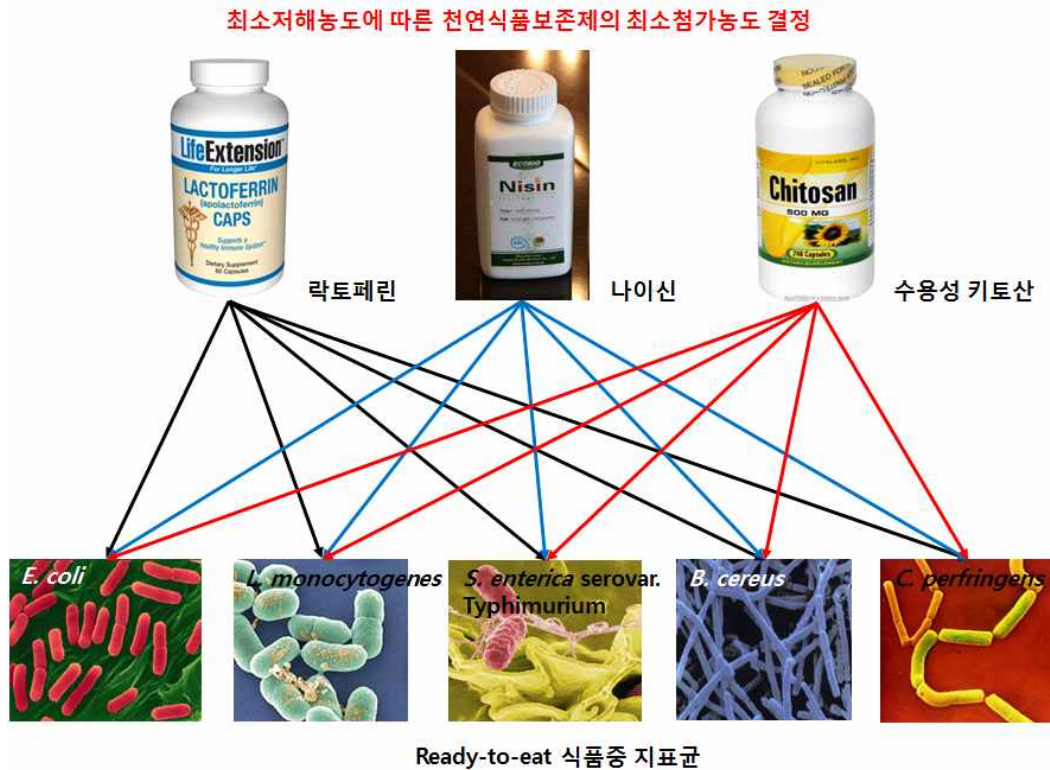
○ Ready-to-eat 식품에 일반적으로 존재하는 식중독균인 대장균, 리스테리아, 살모넬라, 바실러스, 클로스트리디움 등을 지표균으로 선정하고 락토페리신, 나이신 및 수용성 키토산 용액을 제조 후 액상배지 및 한천배지에 희석하여 농도별로 제조 후 각 식중독균주의 최소저해농도를 결정함 (그림 15).



<그림 15> 각 천연미생물저해제의 지표균에 대한 액상배지에서 최소저해농도 실험

(4) 각 천연미생물저해제의 최소첨가농도 결정

○ 각 지표균 (총 5가지 지표균)에 대한 천연미생물저해제 (총 3가지 저해제)의 최소저해농도를 기준으로 한 저해제가 가능한 모든 지표균을 저해할 수 있는 최소저해농도를 천연복합저해제 개발을 위한 최소첨가농도로 결정하고 실험을 통해 검증함 (그림 16).



<그림 16> 천연미생물저해제의 지표균에 대한 최소저해농도를 바탕으로한 최소첨가농도 결정

(5) 선정된 각 천연미생물저해제의 최적조합 평가

○ Ready-to-eat 식품내 5가지의 지표균에 대해 선정된 천연미생물저해제의 저해범위 및 저해능 그리고 최소저해농도를 고려하여 락토페린, 나이신 및 키토산의 가능한 모든 조합 (1, 2, 3, 1+2, 1+3, 2+3, 1+2+3)을 만들어서 각 조합의 저해범위 및 저해능 그리고 최소저해농도를 재평가하여 시너지효과를 평가함 (그림 17).



1. 락토페린



2. 나이신



3. 수용성 키토산

1. 락토페린
2. 나이신
3. 수용성 키토산
4. 락토페린 + 나이신
5. 락토페린 + 수용성 키토산
6. 나이신 + 수용성 키토산
7. 락토페린 + 나이신 + 수용성 키토산



<그림 17> 천연복합저해제 개발을 위한 천연미생물저해제의 최적조합 평가

(6) 천연식품보존혼합제의 상품화를 위한 스프레이형태의 천연복합저해제 및 식중독예방제 개발연구

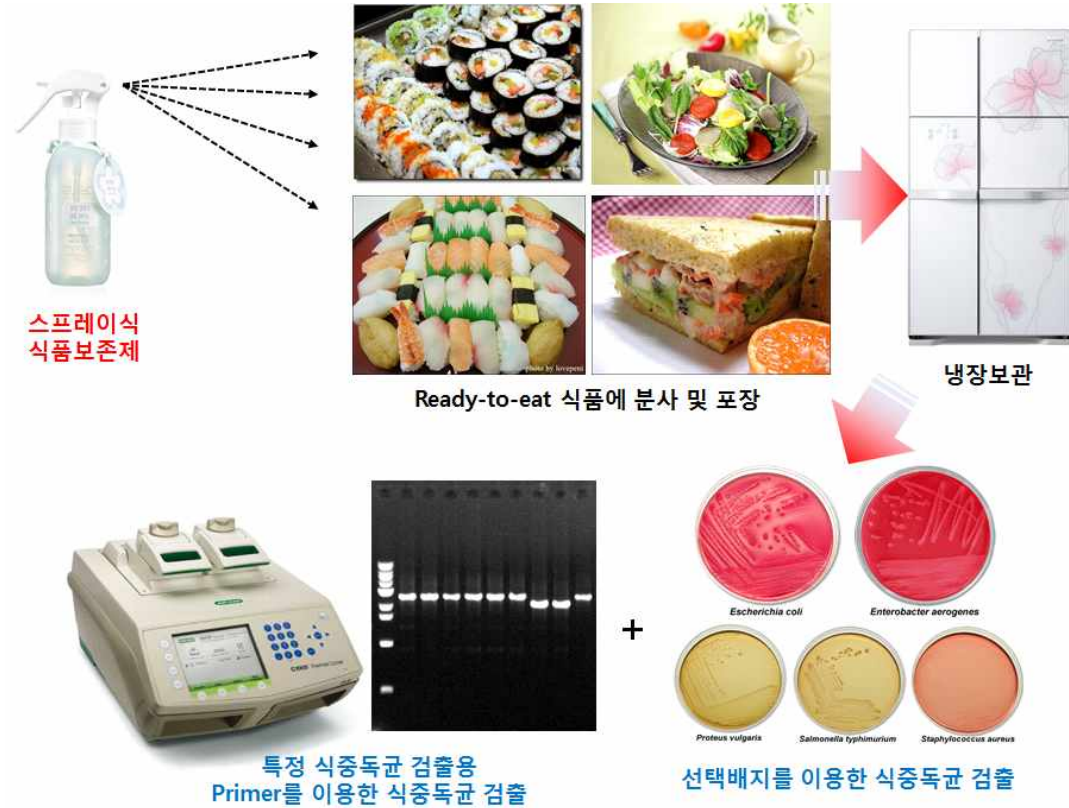
○ 최적화된 천연미생물저해제의 조합 및 농도를 바탕으로 냉장유통중 Ready-to-eat 식품의 안전성 및 저장성 증대 그리고 식품제조 및 소비현장에서 식중독을 예방하기 위한 예방제로서 스프레이형태의 새로운 천연복합저해제 및 식중독예방제를 개발연구함 (그림 18).



<그림 18> 최적화된 식품보존혼합제를 활용한 스프레이식 천연복합저해제의 개발

(7) 천연복합저해제의 실제 Ready-to-eat 식품에 적용 시험

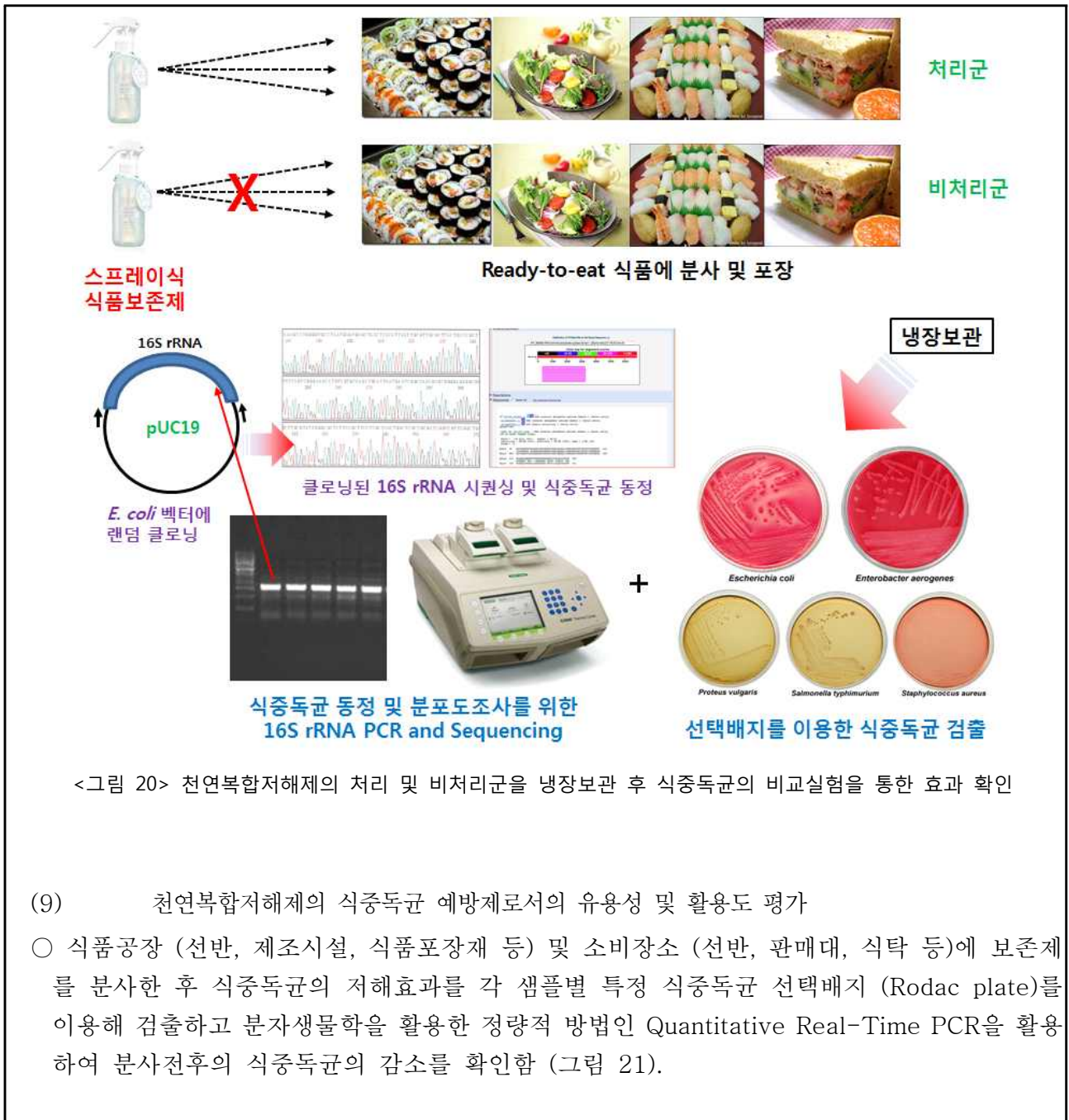
○ 테스트용 Ready-to-eat 식품으로 김밥, 초밥, 야채샐러드 및 샌드위치를 선정하고 포장 전에 식품표면에 분사하여 일정기간 냉장보관한 후 보관된 식품으로부터 선택배지를 이용한 잔존미생물 분리 또는 특정 primer를 이용한 PCR로 식중독균의 존재유무 및 저해를 확인한다 (그림 19).



<그림 19> 개발된 천연복합저해제의 Ready-to-eat 식품에의 실제적용을 통한 식중독균 저해 확인

(8) 개발된 천연복합저해제의 효과를 확인하기 위한 비교실험 수행

○ 보존제 처리 및 비처리 샘플을 일정기간 냉장보관하고 선택배지 및 16S rDNA sequencing을 이용한 샘플내 식중독균의 검출 여부 및 Random 16S rDNA PCR 및 대장균 벡터 클로닝 후 insert DNA sequencing 방법을 이용한 비교식품내에 존재하는 미생물 분포를 비교 분석함 (그림 20).



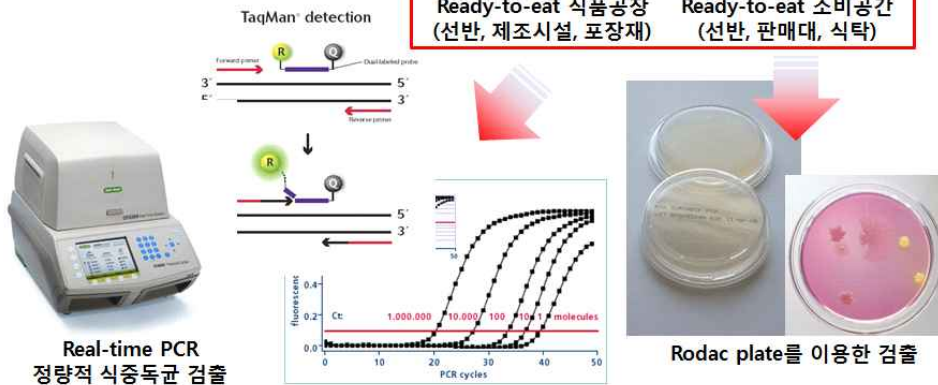


스프레이식
식품보존제



Ready-to-eat 식품공장
(선반, 제조시설, 포장재)

Ready-to-eat 소비공간
(선반, 판매대, 식탁)



Real-time PCR
정량적 식중독균 검출

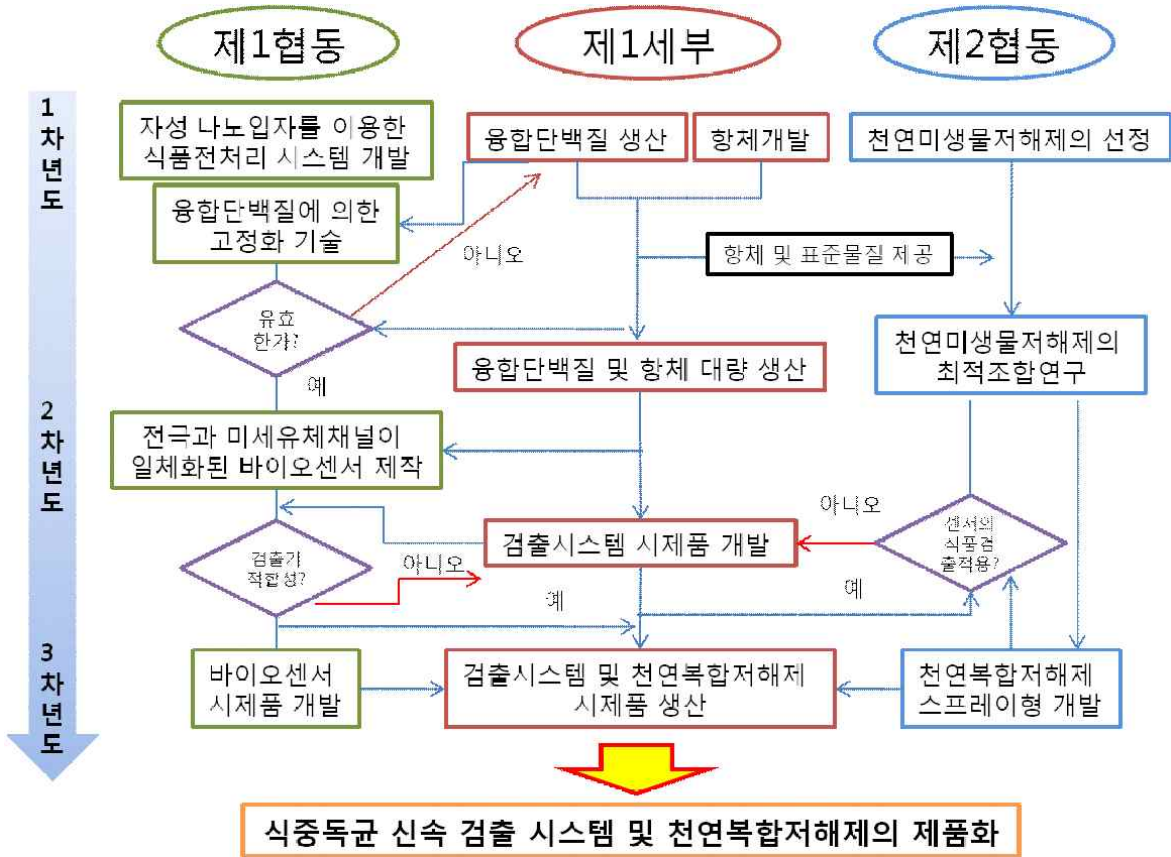
Rodac plate를 이용한 검출

<그림 21> 식품공장 및 편의점에서의 식중독균 예방제로서의 유용성 및 활용도를 평가

(10) 스프레이형태로 개발된 천연식품복합저해제의 식품적용 후 관능 평가

- 개발된 천연식품복합제재 스프레이를 4가지 즉석식품(김밥, 초밥, 야채샐러드, 샌드위치)에 식중독균저해를 위한 최적양으로 표면에 도말한 후, 스프레이를 뿌리지 않은 즉석식품과 함께 섭씨 4도에서 24시간 냉장보관함
- 냉장보관된 즉석식품들을 10명의 패널군에게 스프레이 적용 및 미적용 식품들을 각각 blind-test를 통해서 맛, 향미, 식감 및 색감 등을 비교하여 식품과 스프레이간의 전반적인 조화도 및 관능적 특성 변화를 평가함.
- 평가결과를 바탕으로 스프레이의 분무량 및 각 천연미생물저해제의 조화도를 평가하고 스프레이의 기호도 증가 및 소비증진을 위해서 색소 및 향료에 대한 첨가도 고려되어질 것임.

다. 연구추진체계



<그림 22> 연구추진체계

제 2 절. 연구내용

- 자성 나노입자를 이용한 식품 시료의 전처리 과정을 간소화 시키는 시스템 개발
 - 자성입자 표면에 식중독균에 특이적인 항체 코팅
 - 주사기 원리의 전처리 시스템 도입
- 플라스틱 기반 골드 전극 칩과 미세유체 채널 제작
 - 값싼 플라스틱으로 초미세가공기술과 사출성형 방법으로 제작
- 전극 칩 표면에 융합단백질에 의한 효과적 항체 고정화 방법 개발
 - 골드결합단백질(Gold binding protein, GBP)과 항체의 Fc 부분과 특이적으로 결합하는 Protein G(ProG)가 유전공학적으로 융합된 GBP-ProG 융합단백질 합성
 - 융합단백질을 링커로 하여 항체를 골드 전극 표면에 간단히 고정 시키는 조건 확립

- 일체화된 전기화학 면역-바이오센서에 의한 식중독균(*Listeria monocytogenes*) 검출 조건 확립
 - 자성 나노입자에 의한 신호 증가 유무 테스트
- 일체화된 전처리 디바이스와 바이오센서에 의한 즉석식품내 식중독균(*Listeria monocytogenes*) 검출 테스트 및 *E. coli* O157H:7 검출 테스트
- 다양한 천연미생물저해물질 중 락토페린, 나이신 및 키토산을 이용하여 대장균, 살모넬라, 리스테리아 등의 식중독균을 저해하기 위한 배합비율의 최적화
- 최적화된 식중독균 천연복합저해제를 활용하여 Ready-to-eat 식품의 냉장유통중 식중독균의 저해능을 평가하고 이를 바탕으로 안전성 및 보존성 확보를 통한 저장기간 증대를 확인
- 바이오센서와 식중독균 저해용 스프레이 시작품 제작 및 현장 적용을 위한 최적 조건 확립

제 3 절. 연구결과

3-1 절 제1세부과제

1. 검출시스템에 관련된 골드 융합 단백질 및 항체생산 기반확립

가. 골드융합 단백질의 최적 생산조건 확립

(1) 골드 융합단백질의 생산을 위한 균주의 생산 및 저장

○ pET-GBP-ProG 플라스미드를 이용하여 형질전환된 대장균 균주를 생산함. 대장균은 BL21 을 사용하였으며, LB 배지에 100 ug/ml 농도로 엠펜실린(Ampicillin)을 첨가하여 37 °C에서 배양하였음. 각 균주에 대하여 골드 융합 단백질의 발현을 확인한 후, 글리세롤(glycerol)을 최종 30 %로 사용하여 -70 °C 에 보관함. 이것은 빠른 생산을 위한 균주의 보관 방법으로, DNA를 통한 형질전환 과정을 단축할 수 있음.

(2) 균주를 이용한 세포배양

○ 저장된 균주를 3 ml LB 배지에 접종하여 16시간 배양 후, 1 L 규모로 옮겨서 소규모 배양함. 10 L 규모시에는 최초 10 ml LB 배지에 접종하여 시작하였음. 골드 융합단백질의 유도를 위하여 OD₆₀₀=0.8에서 IPTG를 1 mM 농도로 첨가하였으며, 3.5 시간 추가 배양한 후 세포를 회수하였음.

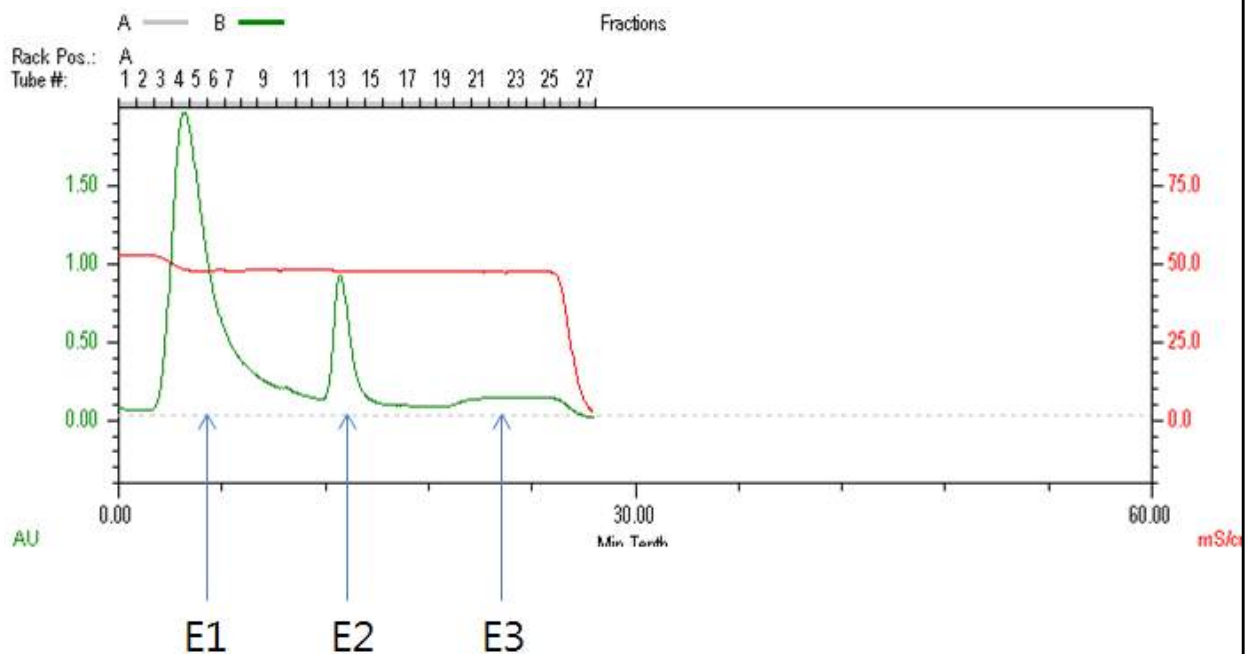
(3) 정제를 위한 세포 전처리

○ 골드 융합단백질의 발현을 유도하여 추가 배양한 후, 배양액을 원심분리하였음. 원심분

리는 4000 rpm, 4 °C에서 15분동안 실시하였으며, 그 후 상등액을 버리고 세포에 친화 크로마토그래피 binding buffer (PBS, 0.2 M NaCl, 5 mM imidazole)를 처리하였음. 그 후 sonication을 통하여 대장균 세포를 파쇄하였으며, 파쇄된 세포는 13,000 rpm, 4 °C에서 30 분간 원심분리하였음. 여기서 상등액을 취하고, 0.45 μm 필터링을 실시하여 컬럼에 주입하기 위한 시료를 확보함.

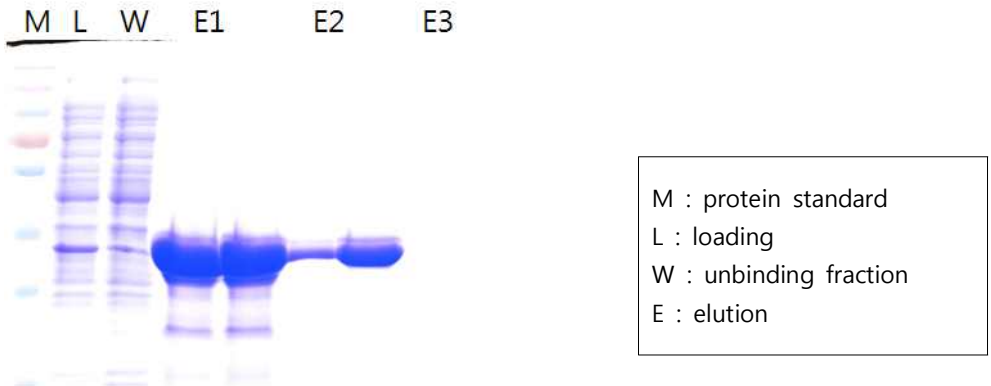
(4) 친화 크로마토그래피를 이용한 골드 융합 단백질의 정제

○ 소규모 세포 배양을 했을 경우 Econo 컬럼(1.5×10 cm, Bio-rad)에 3 ml Ni-NTA chelating agarose CL-6B(Peptron)를 넣어 사용하였으며, 10 L 규모로 세포 배양했을 시에는 MT10 컬럼(12×88 mm, Bio-rad)을 사용하였음. 컬럼에 시료를 주입하기에 앞서서, 친화 크로마토그래피 binding buffer를 사용하여 컬럼을 평형화하였음. 여기에 시료를 주입하여 단백질을 붙게 한 후, imidazole의 농도를 조절하여 순차적으로 단백질을 용출하였음. (그림 23,24)



Step	용액
Elution1	50 mM imidazole (PBS, 0.2 M NaCl)
Elution2	200 mM imidazole (PBS, 0.2 M NaCl)
Elution3	400 mM imidazole (PBS, 0.2 M NaCl)

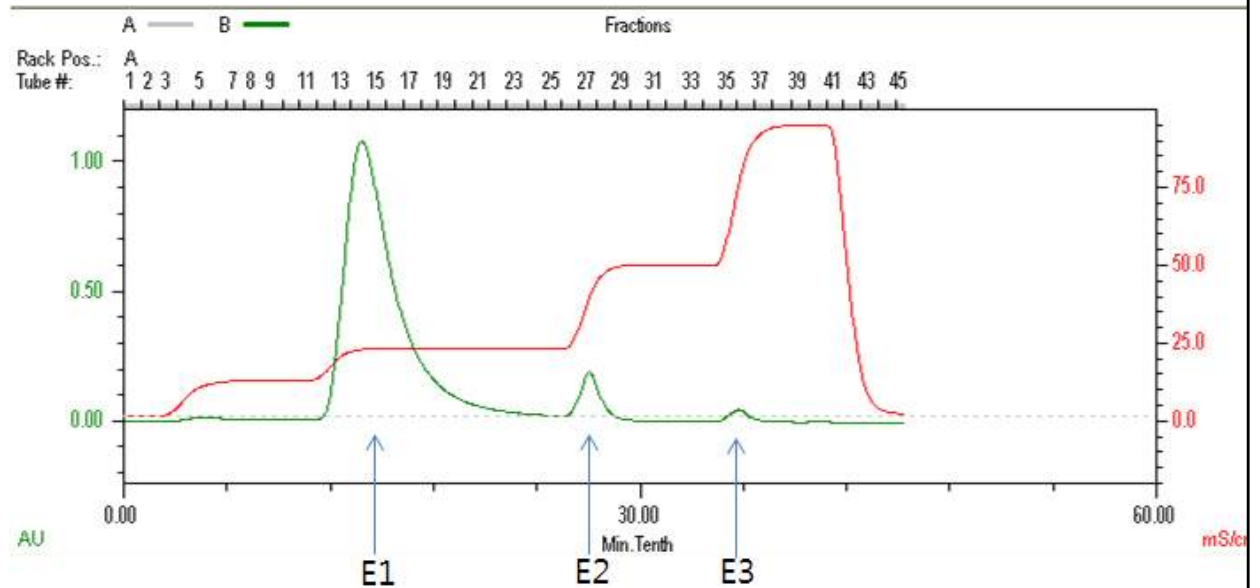
<그림 23> GBP-Protein G 융합 단백질 정제과정의 크로마토그램 및 단계별 용출 용액



<그림 24> 친화 크로마토그래피를 이용한 단백질 정제 후 전기영동 그림

(5) 이온교환 크로마토그래피를 이용한 골드 융합 단백질의 정제

○ 친화 크로마토그래피를 통하여 얻은 시료 중, 골드 융합 단백질을 포함하는 시료를 따로 모으고 투석을 실행하여 버퍼를 교환하였음. 투석을 실행하기 위한 버퍼는 20 mM Tris-HCl pH 8.0 을 사용하였음. 이렇게 얻은 시료를 음이온 교환 크로마토그래피(Q, anion chromatography)에 적용한 후, NaCl의 농도를 달리하여 용출하였음. (그림 25, 26)



Step	용액
Elution1	0.2 M NaCl (20 mM Tris pH 8.0)
Elution2	0.5 M NaCl (20 mM Tris pH 8.0)
Elution3	1.0 M NaCl (20 mM Tris pH 8.0)

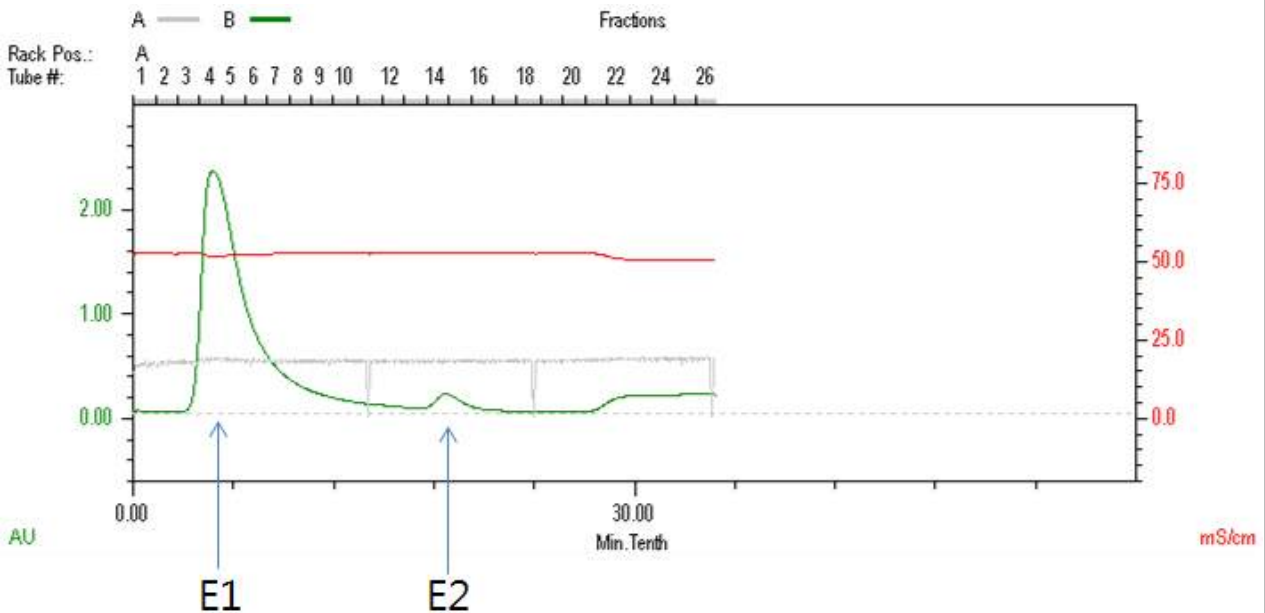
<그림 25> GBP-Protein G 융합 단백질 정제과정의 크로마토그램 및 단계별 용출 용액



<그림 26> 이온교환 크로마토그래피를 이용한 단백질 정제 후 전기영동 그림

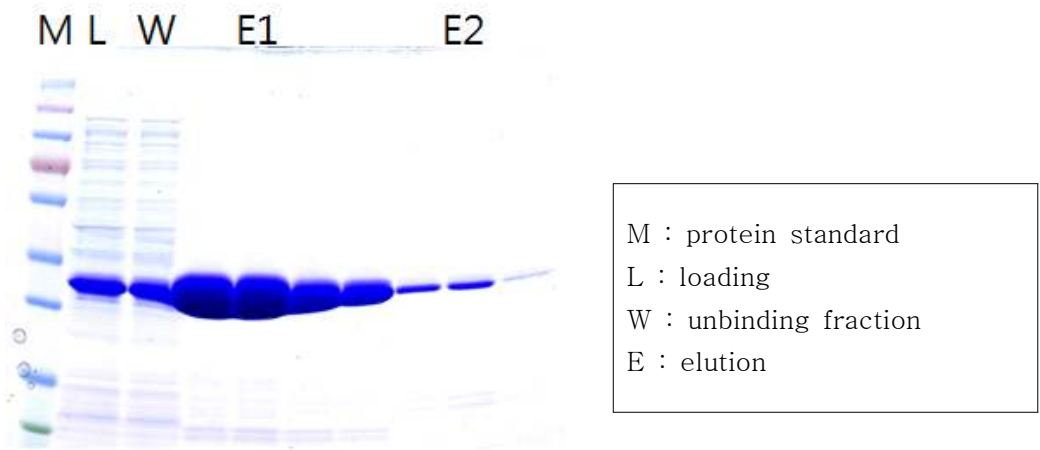
(6) 대량생산 (pilot 100 L 규모)을 위한 정제과정 간소화

○ -70 °C에서 보관중인 균주를 사용하여 3 ml 규모에서 골드 융합 단백질의 발현을 확인함. 배양액을 원심분리한 후, 전 실험과 다른 종류의 binding buffer (20 mM Tris pH 8.0, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole)를 처리하였음. 다음으로 sonication을 통하여 대장균 세포를 파쇄하였으며, 13,000 rpm, 4 °C에서 30분간 원심분리하여 상등액을 획득함. 여기에 0.45 μm 필터링을 실시하여 컬럼에 주입하기 위한 시료를 확보함. binding buffer를 사용하여 컬럼 평형화를 실시한 후, 시료를 주입하였으며, imidazole 농도를 순차적으로 조절하여 단백질을 용출하였음. (그림 27, 28)



Step	용액
Elution1	50 mM imidazole (20 mM Tris pH 8, 0.5 M NaCl)
Elution2	100 mM imidazole (20 mM Tris pH 8, 0.5 M NaCl)

<그림 27> GBP-Protein G 융합 단백질 정제과정의 크로마토그램 및 단계별 용출 용액



<그림 28> 친화 크로마토그래피를 이용한 단백질 정제 후 전기영동 그림

나. 사균체를 이용한 항체 제작

(1) 항원의 제조

(가) 균주배양 및 샘플준비

- 배지: LB broth제조 (1% Bacto Tryptone, 0.5% YE, 1% NaCl)
- 접종: Stock culture로부터 직접 접종하거나 미리 배양해 놓은 배지를 1-2% 접종함.
- 배양: 37 °C에서 12시간 이상 shaking 배양함.
- 균체수집:
 - 10,000 rpm 이상에서 10분 원심분리 후 상층액 제거함.
 - 3차증류수로 수집된 균체를 2회 세척함.
 - 초기배지량의 10%에 해당하는 3차증류수로 수집된 균체를 풀어줌.
 - 균체파쇄 또는 균체사멸전까지 얼음속에서 보관함.

(나) 균체파쇄물 제조

- Sonicator를 이용하여, 5-10분정도 균체를 파쇄하고 얼음속에서 보관함.

(다) 사멸균 제조

○ 풀어준 균체액을 유리튜브에 넣고 autoclave를 수행한 후, 냉장 보관함.

(2) 다클론 항체 생산

(가) 면역반응유도

○ 항원을 토끼(new zealand white)에 주사하기 전에 pre-immune serum을 채취하여 negative control로 사용함.

○ Primary immunization은 항원을 complete freund's adjuvant(sigma)와 혼합하여 피하(SC)주사하고 4주 후 incomplete freund's adjuvant와 혼합한 항원으로 1차 boosting을 진행함.

○ 1주 후 1차 blood 1ml을 채취하여 ELISA test를 진행하고 2주 간격으로 boosting과 bleeding을 진행함. 3차 boosting 1주 후 토끼 심장으로부터 채혈하고 final serum을 분리하여 ELISA test 수행하여 항체역가 측정함.

실험 기간	다클론 항체 제작 과정
0 주	Normal serum bleeding (대조군) Primary injection
4 주차	1 st Boosting
5 주차	1 st bleeding
6 주차	2 nd Boosting
7 주차	2 nd bleeding
8 주차	3 rd Boosting
9 주차	Heart Puncture

<표 4> 토끼를 이용한 다클론 항체 제작 과정

○ Final serum은 Protein A 컬럼을 이용하여 serum 중 항체를 분리, 정제함.

(나) 다클론항체 면역단계별 역가측정

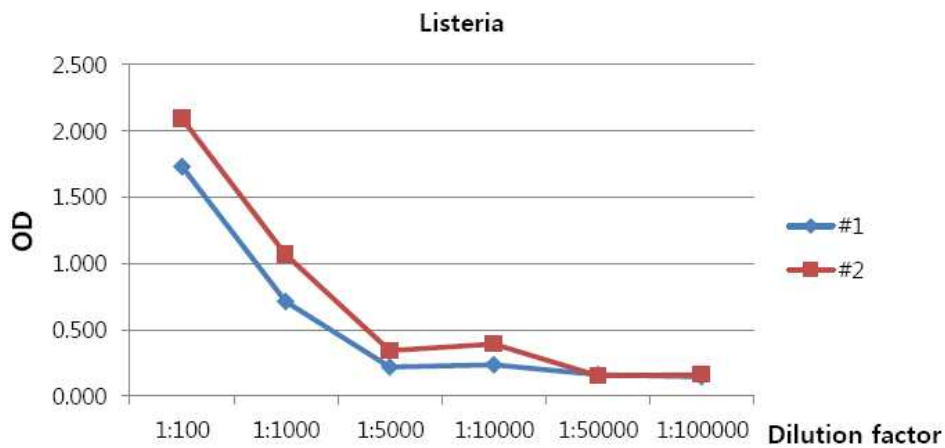
ELISA reader	Perkinelmer Victor X3	Antigen Coating	200 ng/well
Measurement filter	450 nm	2nd Antibody (Rabbit IgG-HRP)	1: 10000 dilution
Measurement Mode	Single Point Photo	Substrate	TMB

<표 5> 다클론항체의 역가측정 조건

○ 1차 면역후 혈청내 항체의 역가 측정을 실행하였으며, antibody titer 가 1:100~1000 정도로 확인됨. (표 5, 그림 29)

Sample	Dilution factor	Listeria	
		#1	#2
pre-Immune	1:100	0.129	0.170
Test serum	1:100	1.730	2.094
	1:1000	0.711	1.067
	1:5000	0.218	0.344
	1:10000	0.235	0.389
	1:50000	0.160	0.151
	1:100000	0.142	0.159

<표 5> 1차면역 후 혈청에서의 다클론 항체 역가 측정 결과

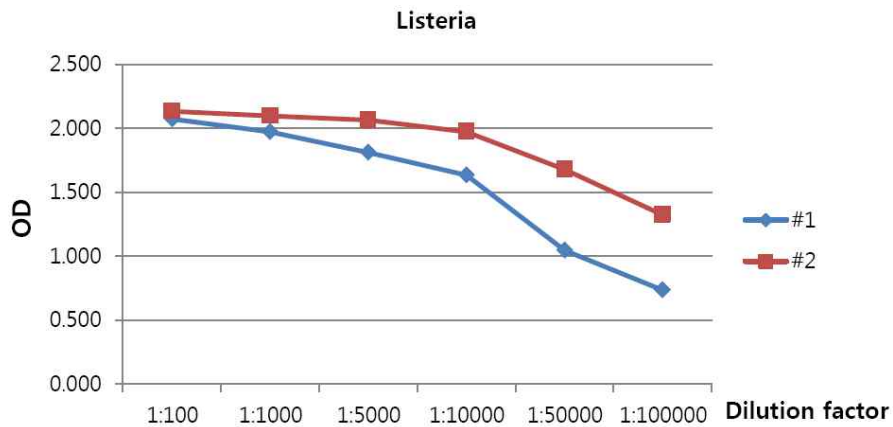


<그림 29> 1차면역 후 혈청에서의 다클론 항체 역가 측정 결과

○ 2차 면역후 혈청내 항체의 역가 측정을 실행하였으며, antibody titer 가 1:50,000~100,000 정도로 확인됨 (표 6, 그림 30)

Sample	Dilution factor	Listeria	
		#1	#2
pre-Immune	1:100	0.122	0.137
Test serum	1:100	2.072	2.133
	1:1000	1.972	2.098
	1:5000	1.810	2.066
	1:10000	1.632	1.972
	1:50000	1.046	1.676
	1:100000	0.735	1.321

<표 6> 2차면역 후 혈청에서의 다클론 항체 역가 측정 결과

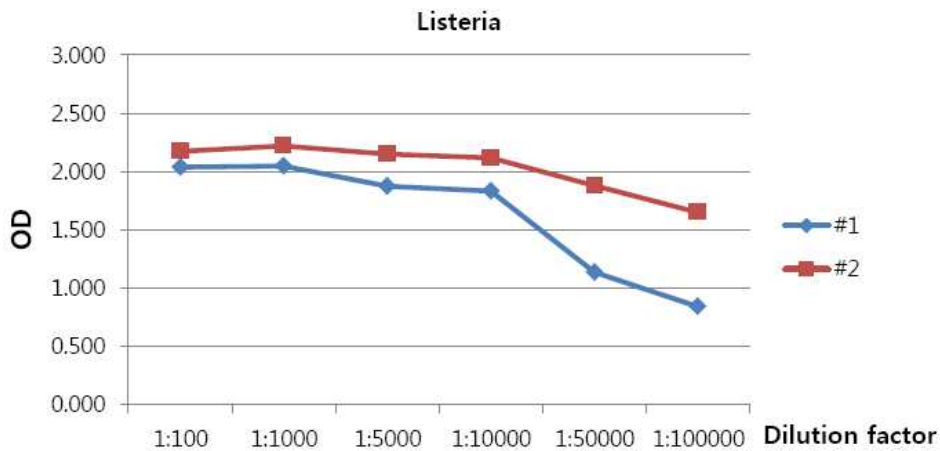


<그림 30> 2차면역 후 혈청에서의 다클론 항체 역가 측정 결과

○ 3차 면역후 혈청내 항체의 역가 측정을 실행하였으며, Final Bleeding ELISA test 결과 antibody titer 가 1:50,000 이상으로 확인됨. (표 7, 그림 31)

Sample	Dilution factor	Listeria	
		#1	#2
pre-Immune	1:100	0.169	0.169
Test serum	1:100	2.038	2.174
	1:1000	2.048	2.221
	1:5000	1.873	2.152
	1:10000	1.830	2.119
	1:50000	1.137	1.881
	1:100000	0.840	1.648

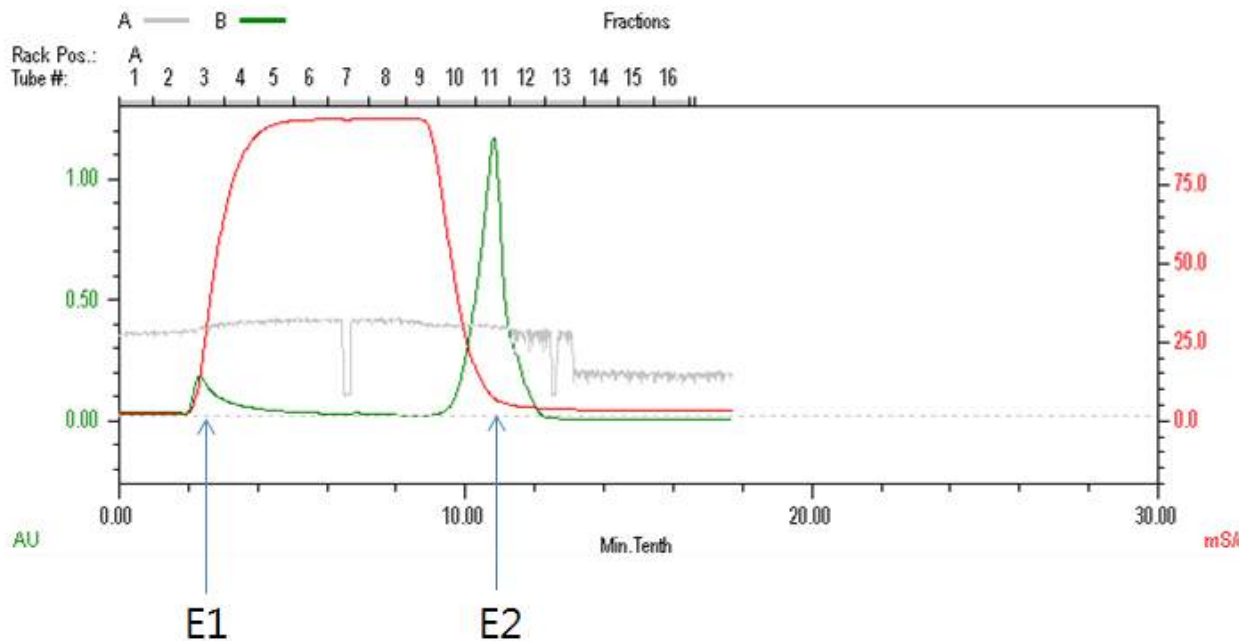
<표 7> 3차면역 후 혈청에서의 다클론 항체 역가 측정 결과



<그림 31> 3차면역 후 혈청에서의 다클론 항체 역가 측정 결과

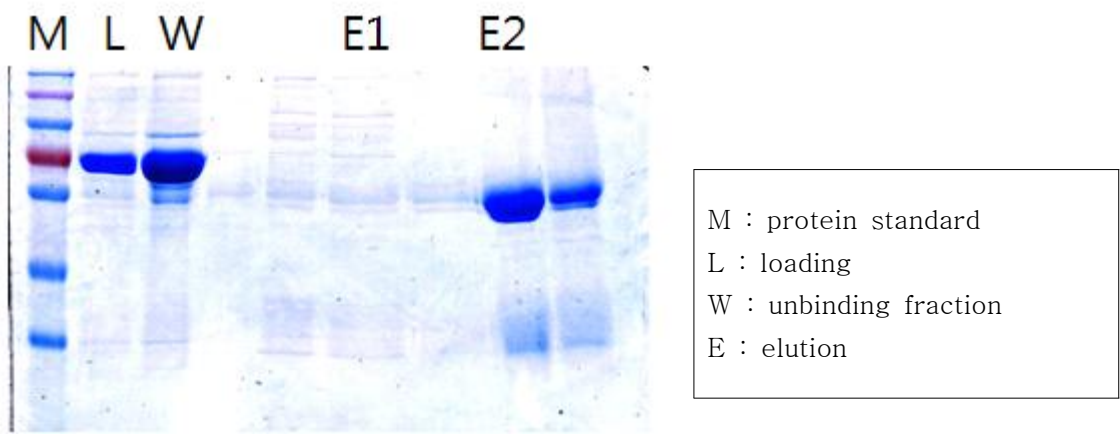
(다) 다클론 항체의 분리 정제

○ 샘플의 컬럼 적용에 앞서 Protein A 컬럼을 20 mM Tris pH 7.5 를 이용하여 평형화 하였으며, 토끼로부터 얻은 혈액은 20 mM Tris pH 7.5 와 1:1 비율로 혼합하여 컬럼에 적용하였음. 1차 용출(20 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl)을 통하여 비특이적으로 붙은 단백질을 제거하였으며, 2차 용출(0.1 M glycine pH 3.0)을 통하여 항체를 분리하였음. 정제과정을 통하여 얻은 항체는 투석과정을 통해 PBS로 버퍼 교환하여 보관하였음.



Step	용액
Elution1	20 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl
Elution2	0.1 M glycine pH 3.0

<그림 32> anti-*Listeria* 다클론 항체 정제 과정의 크로마토그램 및 단계별 용출 용액



<그림 33> Protein A 친화 크로마토그래피를 이용한 항체 정제 후 전기영동 그림

(3) 단클론 항체 제작

(가) 면역반응유도

○ 항원을 생쥐(BALB/c)에 adjuvant(sigma)와 혼합하여 주사하고, 생쥐의 혈액을 채취하여 항체 생성여부를 ELISA법으로 확인하였음.

○ 2회 면역 후 항체의 역가(1: 10,000)가 적정하게 증가하여 면역된 생쥐에서 비장을 떼어 내어 B 림프구를 분리한 다음, 배양한 myeloma 세포(sp2/0)와 융합하였음.

○ 융합 과정 후, hypoxanthin, aminopterin, thymidine이 첨가되어 있는 배지 (HAT medium)에서 배양하여 myeloma와 B 세포가 융합된 세포(hybridoma)만을 선택적으로 선별하여 배양하였음.

○ 선별된 hybridoma 세포 중에서 항원과 반응하는 항체를 생산하는 세포를 ELISA법을 이용하여 확인하였음.

○ ELISA 양성반응인 세포를 한계희석법(limiting dilution method)를 이용하여 양성세포와 음성세포를 분리하는 과정(cloning)을 반복하여, 항원에 반응하는 항체를 생산하는 단일클론세포(hybridoma)만을 배양하였음. 선별된 hybridoma cell을 (5×10^6 cell/ml) 로 액체 질소 탱크에 보관하였음.

실험 기간	단클론 항체 생산 과정	실험 기간	단클론 항체 생산 과정
0 주	Primary Injection	9 주차	Fusion ELISA
2 주차	1 st Boosting	10 주차	Screening
3 주차	1 st Bleeding	13 주차	1 st cloning
4 주차	2 nd Boosting	15 주차	2 nd cloning
5 주차	2 nd Bleeding	17 주차	Freezing
6 주차	3 rd Boosting	18 주차	Final Screening
7 주차	Fusion		

<표 7> 단클론 항체 제작 과정

(나) 단클론항체 면역단계별 역가측정

○ 역가 측정시 항체의 sensitivity를 확인하기 위해 gram-negative 박테리아인 *E. coli* 파쇄 물을 비교 항원으로 측정하였음.

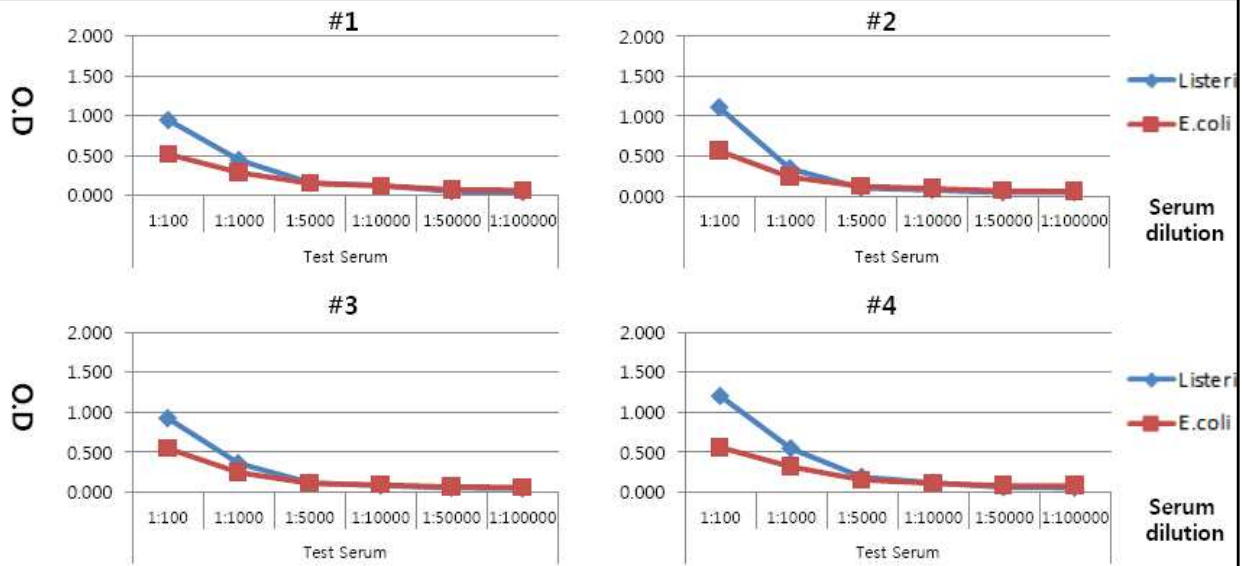
ELISA reader	Perkinelmer Victor X3	Antigen Coating	200 ng/well
Measurement filter	450 nm	2nd Antibody (Mouse IgG-HRP)	1: 20,000 dilution
Measurement Mode	Single Point Photo	Substrate	TMB

<표 8> 단클론항체 역가측정 조건

○ 1차 면역후 혈청내 항체의 역가를 측정하였음. (5×10^8 cell/n)의 항원으로 면역한 mouse에서 채혈하였으며, titer 는 1:100 정도로 관찰됨. (표 9, 그림 34)

Sample	Dilution factor	#1		#2		#3		#4	
		Listeria	E.coli	Listeria	E.coli	Listeria	E.coli	Listeria	E.coli
pre-Immune	1:100	0.051	0.074	0.052	0.075	0.054	0.087	0.055	0.100
Test serum	1:100	0.946	0.512	1.106	0.562	0.922	0.545	1.198	0.557
	1:1000	0.441	0.286	0.339	0.237	0.357	0.244	0.542	0.314
	1:5000	0.154	0.150	0.101	0.121	0.115	0.106	0.183	0.149
	1:10000	0.121	0.120	0.072	0.094	0.080	0.088	0.114	0.110
	1:50000	0.051	0.068	0.046	0.062	0.047	0.063	0.055	0.080
	1:100000	0.046	0.061	0.044	0.060	0.045	0.060	0.050	0.080

<표 9> 1차면역 후 혈청에서의 단클론 항체 역가 측정 결과

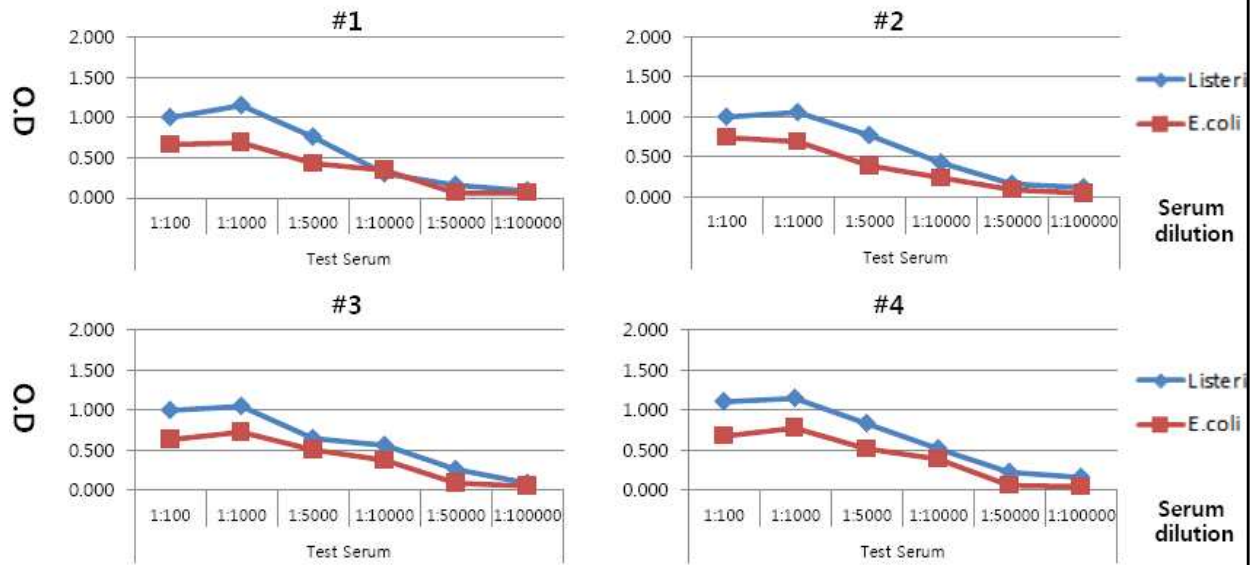


<그림 34> 1차면역 후 혈청에서의 단클론 항체 역가 측정 결과

○ 2차 면역후 혈청내 항체의 역가를 측정하였으며, titer 는 1:1,000 정도로 관찰됨. (표 10, 그림 35)

Sample	Dilution factor	#1		#2		#3		#4	
		Listeria	E.coli	Listeria	E.coli	Listeria	E.coli	Listeria	E.coli
pre-Immune	1:100	0.054	0.041	0.041	0.054	0.042	0.045	0.045	0.052
Test serum	1:100	1.002	0.663	0.994	0.733	0.994	0.630	1.100	0.671
	1:1000	1.148	0.687	1.051	0.685	1.047	0.719	1.141	0.773
	1:5000	0.755	0.430	0.765	0.389	0.646	0.501	0.829	0.516
	1:10000	0.302	0.340	0.419	0.233	0.554	0.375	0.517	0.383
	1:50000	0.158	0.060	0.158	0.089	0.256	0.085	0.219	0.059
	1:100000	0.085	0.057	0.112	0.045	0.083	0.047	0.154	0.043

<표 10> 2차면역 후 혈청에서의 단클론 항체 역가 측정 결과



<그림 35> 2차면역 후 혈청에서의 단클론 항체 역가 측정 결과

○ 1차 fusion시 10개의 96 well plate를 사용하였으며, 2차 fusion 시에는 5개의 96 well plate를 사용하였음. 항원과의 반응은 *Listeria* lysate를 coating 하여 확인하였고, control 단백질로 *E.coli* lysate를 이용하여 확인함. (PL1-PL15 까지 15개의 plate에 대하여 실시함)

PL1

<i>Listeria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.070	0.128	0.070	0.089	0.064	0.091	0.068	0.119	0.063	0.062	0.069	0.063
B	0.068	0.069	0.083	0.063	0.060	0.079	0.062	0.063	0.054	0.058	0.057	0.066
C	0.064	0.089	0.067	0.069	0.060	0.062	0.061	0.055	0.058	0.053	0.611	0.068
D	0.066	0.064	0.070	0.061	0.051	0.064	0.055	0.054	0.048	0.051	0.051	0.059
E	0.061	0.064	0.065	0.071	0.063	0.065	0.055	0.051	0.046	0.052	0.053	0.055
F	0.071	0.064	0.062	0.063	0.075	0.269	0.055	0.060	0.048	0.051	0.053	0.053
G	0.060	0.061	0.081	0.081	0.048	0.055	0.054	0.049	0.045	0.054	0.049	0.052
H	0.063	0.060	0.060	0.054	0.050	0.052	0.051	0.053	0.044	0.061	0.053	1.332

<i>E.Coli</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.066	0.146	0.072	0.066	0.063	0.069	0.090	0.063	0.056	0.056	0.051	0.052
B	0.066	0.072	0.064	0.062	0.060	0.069	0.060	0.066	0.055	0.055	0.053	0.059
C	0.063	0.066	0.065	0.068	0.066	0.063	0.060	0.056	0.053	0.053	0.500	0.056
D	0.060	0.059	0.065	0.064	0.047	0.068	0.058	0.055	0.055	0.053	0.051	0.054
E	0.057	0.061	0.064	0.072	0.058	0.059	0.052	0.054	0.050	0.053	0.049	0.054
F	0.062	0.062	0.064	0.061	0.127	0.055	0.055	0.053	0.048	0.049	0.049	0.052
G	0.056	0.060	0.059	0.058	0.049	0.056	0.053	0.049	0.046	0.051	0.048	0.055
H	0.057	0.055	0.059	0.052	0.049	0.053	0.051	0.052	0.049	0.049	0.052	0.333

<표 11> 세포 융합 후, PL1의 *Listeria* 와 *E.coli* 항원에 대한 반응성 테스트

PL2

<i>Listeria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.069	0.253	0.072	0.078	0.065	0.075	0.071	0.064	0.059	0.066	0.059	0.056
B	0.082	0.066	0.100	0.063	0.057	0.064	0.066	0.062	0.057	0.070	0.055	0.061
C	0.063	0.061	0.065	0.088	0.059	0.060	0.057	0.052	0.052	0.052	0.051	0.058
D	0.065	0.063	0.064	0.061	0.048	0.063	0.051	0.054	0.047	0.048	0.062	0.061
E	0.064	0.068	0.063	0.063	0.080	0.061	0.052	0.053	0.045	0.048	0.055	0.055
F	0.066	0.109	0.062	0.060	0.055	0.056	0.053	0.050	0.046	0.046	0.059	0.054
G	0.066	0.060	0.058	0.057	0.050	0.055	0.056	0.074	0.046	0.049	0.047	0.051
H	0.063	0.056	0.061	0.051	0.067	1.344	0.048	0.051	0.049	0.159	0.054	1.299

<i>E.Coli</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.066	0.245	0.068	0.066	0.061	0.078	0.065	0.069	0.058	0.054	0.057	0.058
B	0.065	0.065	0.072	0.058	0.056	0.068	0.059	0.063	0.053	0.053	0.053	0.059
C	0.061	0.062	0.065	0.063	0.061	0.063	0.059	0.055	0.049	0.052	0.052	0.054
D	0.053	0.053	0.056	0.056	0.049	0.059	0.052	0.050	0.047	0.051	0.050	0.059
E	0.056	0.060	0.061	0.061	0.056	0.074	0.051	0.050	0.047	0.048	0.055	0.052
F	0.063	0.207	0.061	0.060	0.100	0.054	0.051	0.051	0.046	0.045	0.050	0.051
G	0.057	0.056	0.058	0.055	0.047	0.053	0.052	0.048	0.044	0.051	0.045	0.051
H	0.058	0.053	0.057	0.052	0.048	0.052	0.050	0.052	0.049	0.044	0.049	0.401

<표 12> 세포 융합 후, PL2의 *Listeria* 와 *E.coli* 항원에 대한 반응성 테스트

PL3

<i>Listeria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.088	0.078	0.078	0.081	0.074	0.072	0.184	0.073	0.068	0.063	0.060	0.068
B	0.074	0.076	0.069	0.074	0.063	0.073	0.473	0.067	0.060	0.057	0.060	0.063
C	0.066	0.081	0.065	0.068	0.232	0.062	0.055	0.059	0.051	0.054	0.053	0.058
D	0.067	0.065	0.070	0.061	0.051	0.061	0.054	0.058	0.052	0.049	0.061	0.060
E	0.058	0.061	0.068	0.060	0.057	0.060	0.051	0.052	0.048	0.046	0.046	0.091
F	0.066	0.099	0.061	0.059	0.054	0.056	0.051	0.052	0.068	0.043	0.050	0.057
G	0.073	0.081	0.058	0.053	0.047	0.052	0.049	0.046	0.045	0.043	0.050	0.054
H	0.092	0.058	0.060	0.053	0.051	0.053	0.048	0.051	0.053	0.048	0.053	1.275

<i>E.Coli</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.077	0.076	0.075	0.073	0.065	0.071	0.066	0.074	0.061	0.060	0.057	0.067
B	0.063	0.065	0.063	0.060	0.059	0.065	0.058	0.064	0.054	0.053	0.055	0.084
C	0.061	0.077	0.065	0.066	0.059	0.062	0.055	0.055	0.061	0.054	0.051	0.055
D	0.059	0.066	0.060	0.062	0.047	0.062	0.053	0.055	0.047	0.046	0.055	0.058
E	0.056	0.061	0.061	0.059	0.055	0.061	0.048	0.051	0.046	0.047	0.047	0.053
F	0.059	0.116	0.060	0.058	0.053	0.056	0.052	0.053	0.046	0.042	0.046	0.054
G	0.057	0.058	0.055	0.055	0.046	0.060	0.049	0.046	0.052	0.043	0.047	0.052
H	0.115	0.057	0.055	0.051	0.048	0.052	0.046	0.052	0.049	0.046	0.049	0.391

<표 13> 세포 융합 후, PL3의 *Listeria* 와 *E.coli* 항원에 대한 반응성 테스트

PL4

<i>Listeria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.077	0.088	0.078	0.082	0.069	0.073	0.069	0.071	0.064	0.068	0.057	0.064
B	0.070	0.076	0.067	0.076	0.059	0.073	0.060	0.070	0.065	0.063	0.054	0.059
C	0.064	0.475	0.069	0.082	0.065	0.069	0.060	0.067	0.049	0.056	0.051	0.055
D	0.072	0.071	0.066	0.068	0.058	0.066	0.059	0.056	0.053	0.055	0.062	0.053
E	0.062	0.068	0.063	0.066	0.064	0.065	0.069	0.052	0.050	0.056	0.052	0.057
F	0.071	0.063	0.061	0.072	0.055	0.056	0.051	0.051	0.046	0.045	0.048	0.052
G	0.064	0.060	0.062	0.054	0.058	0.059	0.056	0.047	0.048	0.044	0.045	0.050
H	0.058	0.065	0.059	0.053	0.059	0.059	0.047	0.050	0.048	0.073	0.051	1.314

<i>E.Coli</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.074	0.080	0.080	0.080	0.066	0.074	0.064	0.066	0.059	0.056	0.053	0.060
B	0.075	0.071	0.073	0.066	0.062	0.075	0.062	0.066	0.055	0.058	0.060	0.066
C	0.061	0.065	0.066	0.068	0.063	0.062	0.058	0.061	0.051	0.053	0.052	0.053
D	0.061	0.062	0.063	0.063	0.050	0.063	0.055	0.053	0.048	0.047	0.051	0.061
E	0.060	0.062	0.064	0.064	0.058	0.061	0.051	0.051	0.046	0.048	0.046	0.055
F	0.064	0.061	0.062	0.060	0.054	0.054	0.052	0.053	0.045	0.042	0.057	0.054
G	0.061	0.057	0.059	0.055	0.048	0.053	0.050	0.049	0.045	0.043	0.047	0.054
H	0.059	0.056	0.059	0.055	0.051	0.056	0.049	0.051	0.049	0.047	0.053	0.379

<표 14> 세포 융합 후, PL4의 *Listeria* 와 *E.coli* 항원에 대한 반응성 테스트

PL5

<i>Listeria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.066	0.065	0.067	0.065	0.068	0.070	0.067	0.070	0.056	0.056	0.054	0.059
B	0.091	0.062	0.063	0.062	0.059	0.066	0.059	0.063	0.051	0.053	0.343	0.052
C	0.058	0.062	0.066	0.069	0.070	0.063	0.070	0.058	0.054	0.053	0.058	0.054
D	0.061	0.059	0.064	0.183	0.049	0.066	0.056	0.056	0.050	0.056	0.048	0.047
E	0.056	0.087	0.081	0.060	0.063	0.061	0.054	0.052	0.048	0.051	0.067	0.053
F	0.063	0.061	0.060	0.059	0.054	0.055	0.055	0.056	0.044	0.048	0.047	0.050
G	0.054	0.061	0.056	0.056	0.050	0.055	0.055	0.048	0.050	0.045	0.048	0.050
H	0.057	0.272	0.058	0.052	0.051	0.054	0.052	0.052	0.048	0.045	0.056	1.097

<i>E.Coli</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.073	0.072	0.083	0.067	0.061	0.067	0.070	0.066	0.061	0.056	0.062	0.058
B	0.066	0.066	0.066	0.062	0.057	0.066	0.060	0.064	0.056	0.053	0.054	0.059
C	0.063	0.065	0.070	0.070	0.061	0.062	0.063	0.059	0.051	0.053	0.050	0.051
D	0.061	0.062	0.066	0.065	0.072	0.065	0.055	0.053	0.050	0.051	0.052	0.051
E	0.061	0.064	0.064	0.066	0.061	0.063	0.055	0.053	0.053	0.053	0.049	0.052
F	0.061	0.060	0.060	0.059	0.055	0.054	0.052	0.051	0.045	0.046	0.048	0.049
G	0.056	0.058	0.060	0.054	0.047	0.053	0.050	0.047	0.045	0.044	0.045	0.050
H	0.062	0.057	0.058	0.053	0.048	0.051	0.050	0.052	0.052	0.045	0.048	0.383

<표 15> 세포 융합 후, PL5의 *Listeria* 와 *E.coli* 항원에 대한 반응성 테스트

PL6

<i>Listeria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.071	0.065	0.073	0.062	0.060	0.068	0.066	0.067	0.064	0.060	0.067	0.075
B	0.067	0.063	0.064	0.062	0.058	0.067	0.059	0.063	0.055	0.060	0.054	0.070
C	0.069	0.069	0.067	0.067	0.063	0.064	0.056	0.056	0.050	0.053	0.053	0.077
D	0.076	0.056	0.063	0.060	0.048	0.062	0.053	0.055	0.049	0.046	0.048	0.098
E	0.058	0.062	0.065	0.061	0.057	0.061	0.051	0.052	0.046	0.049	0.046	0.057
F	0.056	0.060	0.064	0.059	0.056	0.074	0.054	0.053	0.045	0.048	0.047	0.051
G	0.054	0.058	0.059	0.055	0.047	0.054	0.051	0.047	0.044	0.047	0.057	0.049
H	0.065	0.054	0.057	0.053	0.050	0.050	0.050	0.052	0.048	0.047	0.050	1.331

<i>E.Coli</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.076	0.071	0.068	0.067	0.061	0.072	0.071	0.068	0.069	0.063	0.066	0.065
B	0.065	0.064	0.065	0.061	0.060	0.069	0.059	0.061	0.055	0.054	0.057	0.066
C	0.062	0.065	0.066	0.069	0.065	0.064	0.061	0.057	0.052	0.052	0.051	0.061
D	0.058	0.061	0.068	0.064	0.051	0.067	0.056	0.053	0.049	0.050	0.051	0.055
E	0.057	0.061	0.064	0.061	0.057	0.061	0.125	0.052	0.048	0.052	0.049	0.075
F	0.057	0.060	0.061	0.058	0.054	0.057	0.055	0.051	0.045	0.050	0.049	0.053
G	0.053	0.059	0.060	0.056	0.047	0.053	0.050	0.046	0.044	0.045	0.052	0.053
H	0.057	0.054	0.058	0.059	0.050	0.053	0.048	0.052	0.050	0.046	0.050	0.470

<표 16> 세포 융합 후, PL6의 *Listeria* 와 *E.coli* 항원에 대한 반응성 테스트

PL7

<i>Listeria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.073	0.068	0.067	0.063	0.056	0.064	0.065	0.065	0.056	0.055	0.104	0.057
B	0.072	0.069	0.068	0.062	0.061	0.066	0.058	0.063	0.051	0.051	0.052	0.061
C	0.061	0.064	0.065	0.066	0.062	0.073	0.058	0.063	0.050	0.054	0.063	0.065
D	0.058	0.062	0.065	0.063	0.052	0.068	0.095	0.059	0.049	0.050	0.050	0.053
E	0.071	0.061	0.063	0.061	0.057	0.062	0.051	0.057	0.048	0.049	0.060	0.056
F	0.057	0.062	0.061	0.059	0.054	0.073	0.052	0.053	0.065	0.046	0.050	0.050
G	0.053	0.057	0.058	0.055	0.048	0.053	0.091	0.048	0.222	0.062	0.057	0.049
H	0.055	0.055	0.060	0.054	0.049	0.053	0.090	0.053	0.049	0.058	0.052	1.305

<i>E.Coli</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.064	0.064	0.063	0.057	0.053	0.061	0.059	0.059	0.053	0.054	0.055	0.057
B	0.064	0.069	0.066	0.063	0.061	0.071	0.064	0.063	0.054	0.053	0.061	0.058
C	0.060	0.062	0.065	0.066	0.062	0.061	0.054	0.054	0.050	0.051	0.052	0.056
D	0.057	0.065	0.062	0.060	0.049	0.061	0.054	0.052	0.047	0.046	0.045	0.048
E	0.056	0.062	0.063	0.061	0.056	0.060	0.051	0.051	0.048	0.047	0.050	0.058
F	0.058	0.074	0.061	0.058	0.052	0.054	0.052	0.052	0.045	0.043	0.045	0.051
G	0.058	0.058	0.058	0.054	0.047	0.053	0.050	0.047	0.046	0.043	0.046	0.049
H	0.061	0.055	0.059	0.055	0.053	0.055	0.051	0.052	0.051	0.047	0.050	0.435

<표 17> 세포 융합 후, PL7의 *Listeria* 와 *E.coli* 항원에 대한 반응성 테스트

PL8

<i>Listeria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.085	0.078	0.069	0.064	0.058	0.066	0.062	0.062	0.059	0.058	0.075	0.081
B	0.080	0.067	0.064	0.062	0.059	0.067	0.060	0.061	0.053	0.054	0.056	0.065
C	0.069	0.067	0.065	0.086	0.058	0.060	0.056	0.055	0.051	0.050	0.052	0.060
D	0.065	0.059	0.063	0.060	0.050	0.061	0.053	0.052	0.045	0.047	0.048	0.061
E	0.070	0.065	0.068	0.061	0.058	0.061	0.051	0.069	0.055	0.048	0.046	0.058
F	0.063	0.069	0.060	0.058	0.053	0.054	0.051	0.050	0.045	0.045	0.053	0.051
G	0.064	0.059	0.057	0.055	0.049	0.056	0.050	0.046	0.044	0.043	0.050	0.050
H	0.070	0.061	0.060	0.056	0.051	0.059	0.049	0.053	0.050	0.048	0.055	1.259

<i>E.Coli</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.080	0.069	0.065	0.061	0.054	0.062	0.059	0.058	0.054	0.050	0.052	0.059
B	0.082	0.064	0.063	0.059	0.058	0.063	0.057	0.061	0.053	0.053	0.054	0.059
C	0.069	0.062	0.066	0.066	0.061	0.062	0.060	0.054	0.051	0.050	0.050	0.058
D	0.064	0.059	0.061	0.064	0.050	0.060	0.053	0.049	0.049	0.051	0.049	0.048
E	0.063	0.063	0.062	0.060	0.058	0.061	0.052	0.052	0.046	0.051	0.047	0.052
F	0.058	0.079	0.059	0.058	0.052	0.051	0.051	0.050	0.045	0.045	0.045	0.048
G	0.056	0.057	0.058	0.053	0.046	0.052	0.049	0.046	0.043	0.043	0.045	0.049
H	0.062	0.054	0.056	0.052	0.051	0.050	0.049	0.050	0.047	0.044	0.048	0.462

<표 18> 세포 융합 후, PL8의 *Listeria* 와 *E.coli* 항원에 대한 반응성 테스트

PL9

<i>Listeria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.077	0.067	0.068	0.064	0.064	0.073	0.068	0.065	0.067	0.061	0.067	0.073
B	0.068	0.062	0.063	0.062	0.061	0.066	0.060	0.063	0.052	0.057	0.059	0.065
C	0.070	0.062	0.066	0.067	0.062	0.060	0.059	0.055	0.049	0.052	0.050	0.062
D	0.061	0.058	0.067	0.061	0.049	0.062	0.054	0.053	0.047	0.052	0.049	0.052
E	0.063	0.064	0.064	0.062	0.056	0.060	0.056	0.052	0.046	0.345	0.046	0.058
F	0.060	0.059	0.062	0.059	0.055	0.054	0.053	0.052	0.043	0.045	0.047	0.062
G	0.055	0.062	0.057	0.054	0.047	0.053	0.050	0.046	0.045	0.044	0.047	0.049
H	0.065	0.058	0.059	0.054	0.050	0.053	0.059	0.066	0.054	0.049	0.056	1.323

<i>E.Coli</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.076	0.079	0.073	0.064	0.059	0.066	0.065	0.065	0.059	0.056	0.064	0.063
B	0.070	0.073	0.064	0.062	0.059	0.068	0.062	0.063	0.055	0.056	0.056	0.064
C	0.066	0.065	0.067	0.067	0.063	0.064	0.056	0.056	0.049	0.053	0.052	0.057
D	0.087	0.062	0.065	0.065	0.055	0.066	0.056	0.055	0.047	0.052	0.051	0.053
E	0.065	0.065	0.064	0.064	0.057	0.059	0.051	0.048	0.047	0.049	0.047	0.053
F	0.061	0.061	0.063	0.060	0.055	0.055	0.054	0.053	0.047	0.047	0.049	0.049
G	0.057	0.059	0.059	0.056	0.048	0.053	0.052	0.049	0.045	0.044	0.046	0.053
H	0.062	0.060	0.060	0.053	0.049	0.053	0.051	0.056	0.053	0.048	0.052	0.514

<표 19> 세포 융합 후, PL9의 *Listeria* 와 *E.coli* 항원에 대한 반응성 테스트

PL10

<i>Listeria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.064	0.073	0.170	0.065	0.059	0.068	0.065	0.065	0.404	0.054	0.058	0.058
B	0.068	0.066	0.073	0.068	0.063	0.070	0.064	0.063	0.057	0.059	0.058	0.064
C	0.060	0.064	0.069	0.067	0.065	0.063	0.060	0.056	0.053	0.054	0.053	0.064
D	0.057	0.060	0.064	0.062	0.050	0.063	0.056	0.053	0.052	0.050	0.049	0.054
E	0.059	0.066	0.068	0.063	0.066	0.062	1.151	0.053	0.048	0.052	0.050	0.053
F	0.063	0.066	0.065	0.075	0.066	0.054	0.055	0.053	0.058	0.048	0.049	0.053
G	0.057	0.059	0.060	0.085	0.052	0.054	0.053	0.047	0.043	0.049	0.052	0.050
H	0.064	0.056	0.061	0.058	0.054	0.058	0.065	0.775	0.052	0.108	0.057	1.342

<i>E.Coli</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.072	0.066	0.069	0.064	0.063	0.065	0.060	0.060	0.054	0.054	0.053	0.054
B	0.065	0.064	0.065	0.063	0.059	0.063	0.056	0.061	0.052	0.051	0.052	0.057
C	0.060	0.062	0.066	0.063	0.059	0.061	0.056	0.052	0.050	0.047	0.050	0.052
D	0.059	0.057	0.062	0.059	0.047	0.059	0.054	0.051	0.046	0.048	0.047	0.049
E	0.061	0.063	0.064	0.061	0.057	0.075	0.051	0.050	0.045	0.049	0.047	0.055
F	0.066	0.062	0.063	0.058	0.054	0.179	0.052	0.052	0.044	0.046	0.049	0.050
G	0.057	0.060	0.057	0.055	0.047	0.170	0.049	0.046	0.043	0.043	0.046	0.049
H	0.060	0.056	0.059	0.056	0.050	0.057	0.049	0.056	0.050	0.061	0.055	0.439

<표 20> 세포 융합 후, PL10의 *Listeria* 와 *E.coli* 항원에 대한 반응성 테스트

PL11

<i>Listeria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.127	0.127	0.133	0.141	0.131	0.160	0.171	0.737	0.138	0.110	0.125	0.154
B	0.146	0.126	0.127	0.115	0.152	0.144	0.115	0.129	0.104	0.108	0.117	0.116
C	0.153	0.105	0.092	0.110	0.219	0.124	0.096	0.123	0.079	0.089	0.096	0.106
D	0.117	0.097	0.090	0.103	0.084	0.102	0.081	0.081	0.111	0.081	0.171	0.109
E	0.127	0.111	0.102	0.129	0.094	0.101	0.099	0.087	0.101	0.102	0.074	0.104
F	0.103	0.095	0.085	0.097	0.084	0.086	0.079	0.080	0.068	0.076	0.136	0.132
G	0.101	0.100	0.089	0.173	0.086	0.089	0.105	0.066	0.084	0.079	0.087	0.097
H	0.100	0.100	0.092	0.082	0.084	0.135	2.460	0.097	0.098	0.094	0.127	2.886

<표 21> 세포 융합 후, PL11의 *Listeria* 항원에 대한 반응성 테스트

PL12

<i>Listeria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.117	0.103	0.369	0.133	0.108	0.114	0.098	0.108	0.115	0.133	0.102	0.094
B	0.132	0.128	0.113	0.121	0.108	0.101	0.104	0.115	0.114	0.093	0.270	0.124
C	0.114	0.089	0.102	0.089	0.125	0.088	0.075	0.105	0.099	0.085	0.089	0.176
D	0.085	0.079	0.076	0.089	0.077	0.085	0.076	0.090	0.067	0.086	0.098	0.097
E	0.107	0.087	0.086	0.144	0.078	0.077	0.085	0.108	0.071	0.074	0.076	0.090
F	0.099	0.090	0.082	0.094	0.077	0.095	0.074	0.073	0.070	0.065	0.077	0.098
G	0.104	0.122	0.087	0.083	0.099	0.088	0.081	0.084	0.086	0.082	0.088	0.106
H	0.109	0.100	0.101	0.096	0.143	0.104	0.095	0.099	0.101	0.100	0.124	3.103

<표 22> 세포 융합 후, PL12의 *Listeria* 항원에 대한 반응성 테스트

PL13

<i>Listeria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.103	0.099	0.110	0.191	0.108	0.131	0.112	0.114	0.129	0.144	0.107	0.211
B	0.176	0.157	0.128	0.132	0.140	0.129	0.126	0.114	0.124	0.123	0.100	0.117
C	0.114	0.115	0.109	0.136	0.117	0.098	0.124	0.086	0.111	0.118	0.096	0.125
D	0.120	0.082	0.087	0.099	0.112	0.090	0.078	0.079	0.085	0.089	0.106	0.084
E	0.093	0.088	0.091	0.144	0.094	0.157	0.087	0.080	0.080	0.362	0.079	0.086
F	0.092	0.084	0.083	0.136	0.878	0.085	0.082	0.122	0.076	0.383	0.087	0.086
G	0.095	0.087	0.085	0.118	0.074	0.084	0.086	0.085	0.088	0.141	0.097	0.072
H	0.102	0.089	0.090	0.083	0.085	0.084	0.092	0.090	0.099	0.096	0.083	3.393

<표 23> 세포 융합 후, PL13의 *Listeria* 항원에 대한 반응성 테스트

PL14

<i>Listeria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.171	0.098	0.132	0.106	0.101	0.104	0.098	0.109	0.113	0.101	0.257	0.099
B	0.123	0.124	0.126	0.128	0.136	0.161	0.132	0.138	0.124	0.157	0.137	0.117
C	0.107	0.107	0.102	0.157	0.142	0.121	0.126	0.119	0.083	0.144	0.185	0.101
D	0.095	0.135	0.079	0.091	0.114	0.094	0.092	0.088	0.090	0.084	0.086	0.096
E	0.094	0.110	0.102	0.099	0.098	0.094	0.090	0.099	0.097	0.090	0.099	0.081
F	0.129	0.125	0.086	0.079	0.075	0.090	0.092	0.087	0.074	0.088	0.081	0.085
G	0.090	0.097	0.082	0.098	0.082	0.086	0.095	0.096	0.133	0.116	0.105	0.078
H	0.086	0.088	0.088	0.085	0.091	0.096	0.089	0.104	0.100	0.096	0.079	3.110

<표 24> 세포 융합 후, PL14의 *Listeria* 항원에 대한 반응성 테스트

PL15

<i>Listeria</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.085	0.087	0.094	0.085	0.079	0.087	0.094	0.079	0.077	0.085	0.094	0.104
B	0.108	0.098	1.484	0.097	0.083	0.086	0.081	0.080	0.093	0.089	0.340	0.094
C	0.094	0.127	0.091	0.101	0.125	0.123	0.079	0.092	0.083	0.102	0.088	0.085
D	0.077	0.075	0.088	0.096	0.072	0.105	0.071	0.084	0.094	0.071	0.152	0.085
E	0.074	0.084	0.088	0.084	0.078	0.085	0.095	0.076	0.087	0.076	0.073	0.089
F	0.078	0.079	0.090	0.075	0.071	0.081	0.077	0.364	0.069	0.068	0.078	0.078
G	0.076	3.002	0.088	0.139	0.078	0.084	0.079	0.089	0.083	0.082	2.842	0.089
H	0.099	0.095	0.119	0.094	0.097	0.085	0.089	0.097	0.265	0.088	0.089	2.965

<표 25> 세포 융합 후, PL15의 *Listeria* 항원에 대한 반응성 테스트

○ 1차 fusion 후에는 OD(*Listeria*) - OD(*E.coli*) > 0.2 이상인 12개 clone 을 확인하였으며, 24 well로 옮겨 재확인 하였음. 이를 통하여 *Listeria*와만 반응하는 4개의 positive clone을

확인하였음. 2차 fusion 후에는 항원과 OD > 0.7 이상 반응하는 6개 clone을 확인하였으며, 24 well로 옮겨서 3개의 positive clone을 확인하였음.

Clone NO.	Listeria	<i>E.Coli</i>
1F6	0.051	0.045
2H6	1.360	0.043
3B7	0.199	0.044
3C5	0.055	0.045
4C2	0.174	0.043
5B11	0.061	0.045
5H2	0.079	0.045
7G9	0.434	0.045
9 E10	0.178	0.045
10A9	0.238	0.045
10E7	0.999	0.045
10H8	0.832	0.045

Clone NO.	Listeria	<i>E.Coli</i>
11A8	0.133	0.050
11H7	1.229	0.080
13F5	0.795	0.052
15B3	0.213	0.049
15G2	0.398	0.051
15G11	1.609	0.050

<표 27> 2차 fusion 후 screening 결과

<표 26> 1차 fusion 후 screening 결과

○ fusion 후 확보한 7개의 clone으로부터 1 차 cloning 과정을 수행하였음.

2H6

2.788	2.803	2.664	2.762	0.751	0.475	0.304	0.066	0.478	0.263	0.258	0.327
2.861	2.749	1.067	0.486	0.306	0.129	0.181	0.065	0.127	0.126	0.126	0.198
2.524	2.403	0.961	2.012	0.198	2.189	0.078	0.056	0.076	0.077	0.085	0.141
2.383	2.504	0.405	0.167	0.115	0.067	0.059	0.057	0.055	0.062	0.070	0.103
2.251	1.947	0.389	0.182	0.076	0.068	0.054	0.053	0.051	0.057	0.064	0.105
0.645	0.658	0.109	0.189	0.074	0.058	0.063	0.053	0.052	0.056	0.065	0.115
0.377	1.296	0.125	0.094	0.053	0.060	0.056	0.051	0.053	0.059	0.077	0.124
0.525	0.256	0.132	0.097	0.068	0.069	0.064	0.055	0.126	0.073	0.123	0.155

7G9

1.682	1.749	1.576	0.911	0.776	0.745	0.315	0.303	0.244	0.288	0.288	0.336
1.771	1.764	1.177	0.948	0.263	0.157	0.174	0.140	0.117	0.130	0.164	0.199
1.542	1.483	1.070	0.433	0.454	0.120	0.122	0.071	0.067	0.087	0.111	0.138
1.267	1.167	0.519	0.543	0.092	0.070	0.064	0.056	0.052	0.060	0.076	0.096
0.754	0.717	0.263	0.119	0.147	0.083	0.059	0.053	0.049	0.058	0.068	0.101
0.619	0.298	0.212	0.092	0.054	0.055	0.055	0.055	0.048	0.057	0.071	0.108
0.400	0.638	0.278	0.067	0.052	0.060	0.057	0.057	0.052	0.065	0.093	0.136
0.308	0.265	0.175	0.081	0.070	0.073	0.067	0.075	0.074	0.072	0.112	0.150

10E7

2.414	2.209	0.686	0.489	0.386	0.243	0.206	0.176	0.199	0.194	0.234	0.367
2.143	1.660	0.361	0.449	0.111	0.141	0.107	0.102	0.106	0.102	0.144	0.233
1.458	1.380	0.190	0.116	0.068	0.079	0.069	0.067	0.075	0.079	0.108	0.181
1.082	0.866	0.107	0.067	1.107	0.063	0.056	0.056	0.052	0.060	0.080	0.118
0.339	0.356	0.073	0.070	0.061	0.063	0.056	0.057	0.056	0.058	0.079	0.142
0.301	0.182	0.098	0.069	0.112	0.062	0.111	0.064	0.059	0.062	0.092	0.160
0.374	0.652	0.101	0.098	0.071	0.087	0.080	0.073	0.078	0.075	0.111	0.147
0.381	0.253	0.199	0.209	0.169	0.176	0.195	0.176	0.182	0.141	0.215	0.243

10H8

1.894	1.832	1.838	1.845	1.883	1.916	1.905	1.730	1.643	1.523	1.419	0.424
1.909	1.826	1.803	1.819	1.865	1.840	1.618	1.724	0.435	1.493	1.770	0.688
1.857	1.799	1.749	1.734	1.813	1.386	1.627	0.080	0.086	0.079	0.248	0.192
1.881	1.811	1.904	1.767	1.669	1.473	1.577	0.336	0.062	0.080	0.081	0.143
1.879	1.822	1.766	1.776	1.339	1.680	1.343	0.116	1.052	0.059	0.065	0.130
1.913	1.861	1.799	1.229	0.235	0.317	0.179	0.090	0.051	0.096	0.068	0.129
1.884	1.787	1.769	1.675	1.196	0.111	0.640	0.055	0.050	0.060	0.065	0.126
1.745	1.762	1.595	0.985	0.205	0.116	0.067	0.112	0.073	0.083	0.087	0.145

11H7

2.963	2.923	2.717	2.724	0.137	0.094	0.102	0.090	0.074	0.068	0.066	0.091
2.984	2.898	2.748	2.663	2.659	0.112	0.090	2.681	0.064	0.065	0.069	0.087
2.883	2.782	2.728	0.150	0.105	0.082	0.074	0.066	0.060	0.063	0.061	0.073
2.969	2.808	2.224	1.005	0.068	0.077	0.063	0.062	0.057	0.059	0.053	0.066
2.825	2.628	2.419	0.101	0.079	0.092	0.062	0.072	0.057	0.064	0.057	0.070
1.069	0.159	0.081	0.093	0.068	0.063	0.059	0.065	0.057	0.060	0.061	0.077
0.180	0.118	1.847	0.070	0.056	0.063	0.059	0.059	0.056	0.060	0.058	0.081
0.146	2.516	0.089	0.084	0.080	0.071	0.084	0.081	0.096	0.082	0.083	0.133

13F5

0.255	0.171	0.156	0.171	0.103	0.135	0.142	0.126	0.092	0.095	0.096	0.124
0.163	0.134	0.118	0.109	0.091	0.088	0.083	0.079	0.080	0.075	0.077	0.159
0.137	0.106	0.090	0.084	0.076	0.071	0.068	0.067	0.060	0.063	0.071	0.107
0.139	0.092	0.079	0.078	0.058	0.070	0.063	0.061	0.058	0.059	0.065	0.134
0.111	0.083	0.076	0.077	0.068	0.069	0.061	0.061	0.054	0.060	0.060	0.107
0.101	0.076	0.070	0.072	0.062	0.060	0.061	0.066	0.054	0.056	0.062	0.097
0.089	0.070	0.067	0.070	0.055	0.059	0.059	0.063	0.051	0.054	0.059	0.089
0.110	0.089	0.077	0.078	0.068	0.056	0.065	0.076	0.068	0.068	0.082	0.142

15G11

3.151	3.112	3.074	3.016	2.985	2.894	2.859	2.450	2.386	0.087	0.094	0.109
3.197	3.143	3.086	3.016	2.974	2.881	2.464	2.465	2.078	1.434	0.566	0.100
3.180	3.126	2.999	2.965	2.935	2.796	0.076	2.512	0.057	0.062	0.068	0.092
3.177	3.154	3.029	2.832	2.773	2.027	0.069	2.266	0.053	0.058	0.064	0.090
3.177	3.130	2.957	2.878	2.392	0.654	0.058	0.060	0.049	0.056	0.058	0.078
3.215	3.171	3.050	2.415	1.949	0.065	2.523	0.061	0.053	0.056	0.071	0.095
3.197	3.145	3.011	2.793	0.080	0.068	0.064	0.057	0.055	0.059	0.066	0.081
3.131	3.113	2.728	0.114	0.212	0.092	0.082	0.102	0.090	0.096	0.115	0.099

<표 28> 7개의 clone에 대한 1차 cloning 결과

○ cloning 과정을 반복하여, *Listeria* 항원에 특이적으로 반응하는 clone을 선별하였음. 모든 clone에서 *Listeria*에 대해 OD > 1.0 이상으로 반응하였음.

Clone No.	<i>Listeria</i>	<i>E.Coli</i>
10E7	1.721	0.114
10H8	1.174	0.049
11H7	1.167	0.049
15G11	1.196	0.048

<표 29> 선별된 4개의 clone 에 대하여 항원에 대한 반응성 확인

○ 최종 확인된 4개의 clone에 대하여 Isotyping을 실시하였음. 10E7, 10H8, 15G11 clone에서는 Isotype이 IgG1/kappa로, 11H7 clone에서는 Isotype이 IgG1/lamda로 확인되었음.

	10E7	10H8	11H7	15G11
IgG1	0.709	0.361	0.463	0.409
IgG2a	0.160	0.090	0.150	0.101
IgG2b	0.049	0.043	0.040	0.044
IgG3	0.127	0.103	0.081	0.123
IgA	0.248	0.078	0.168	0.078
IgM	0.071	0.063	0.060	0.064
kappa	0.297	0.351	0.043	0.249
lambda	0.041	0.040	0.245	0.041

<표 30> 최종 확인된 clone의 Isotyping

(다) 단클론 항체의 생산 및 정제

○ Anti-*Listeria* 항체를 생산하는 hybridoma cell은 5 % CO₂를 유지하는 37 °C incubator에서 배양하였음. 냉동 보관된 5×10⁶ cell 을 T75 플라스크에 해동하여, DMEM(10 % FBS) 배지를 사용하여 플라스크가 거의 꽉 찰 때까지 배양함. 배양액을 모아서 원심분리한 후, 상등액을 20 mM Tris pH 7.5 와 1:1 비율로 섞어서 0.22 μm 필터링을 실행함.

○ 단클론 항체의 순수 분리를 위해서 Protein G 친화 크로마토그래피 방법을 사용하였음. 20 mM Tris pH 7.5 용액으로 미리 평형화시킨 Protein G 컬럼에 위에서 준비한 항체 용액을 적용하였음. 여기에 20 mM Tris pH 7.5 용액으로 세척 후, 100 mM Glycine-HCl pH 3.5 용액으로 항체를 용출하였음. 낮은 pH 로 인한 항체의 변성을 최소화하기 위하여, 1 M Tris pH 9.0 을 완충 용액으로 사용하였음. 이 항체를 투석하여 PBS로 버퍼 교환 후, 다른 실험에 적용하였음.

2. 제작된 단클론 항체의 항원 특이성 시험 : SPR (surface plasmon resonance) system 이
용

가. 항원의 준비

○ *Listeria*와 *Salmonella*를 37 °C에서 배양하여 샘플을 준비함. *Salmonella*를 대조군으로 사용하였음.

나. SPR system

○ GLH sensor chip/ProteOn™XPR36 (Bio-rad)을 사용함.

다. 실험과정

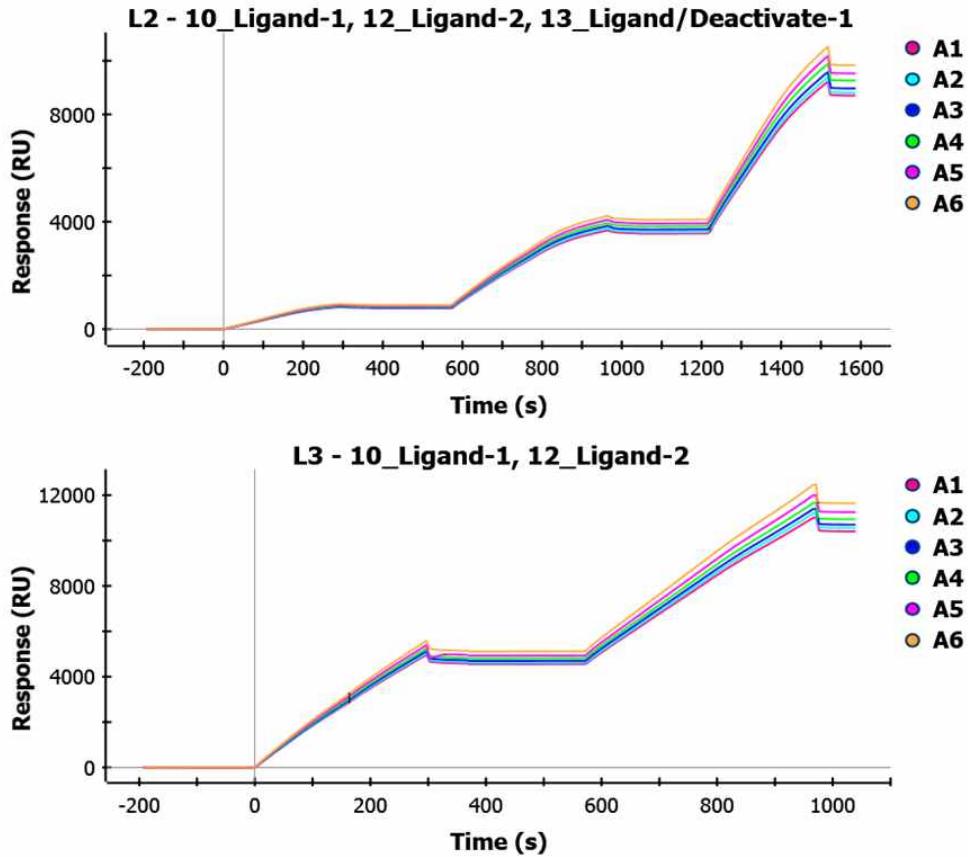
실험순서	flow rate (ul/min)	injection volume (ul)	duration (s)	sample name
washing	30	30	60	0.5 % SDS / 50 mM NaOH / 100 mM HCl 3개의 solution에 대하여 각각 실행
surface activation	3	150	300	EDC/sulfo-NHS
antibody immobilization	30	150	300	antibody
deactivation	30	150	300	ethanolamine HCl
antigen loading	25	100	240	Listeria/Salmonella
antigen detaching	100	30	18	glycine pH 2.5

<표 31> SPR을 이용한 항원-항체 특이성 실험과정

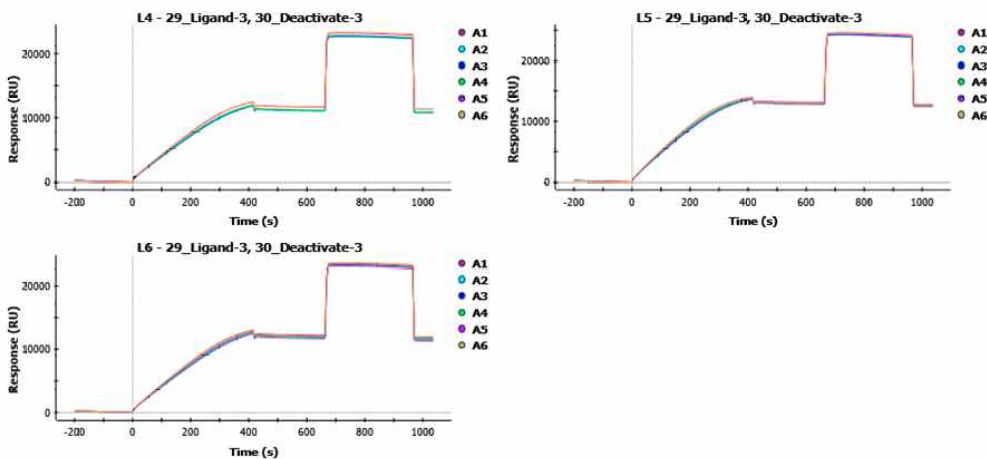
(1) 칩 표면에 항체 부착 (antibody immobilization)

○ 직접 제작한 3개의 단클론 항체의 특이성을 평가하기 위한 대조군으로서 시판되고 있는 항체를 사용함. 다클론 항체 (abcam, ab35132), 단클론 항체 (abcam, ab11439)

○ GLH sensor chip에 항체를 고정하는 실험에서는, 직접 제작한 항체가 control로 사용한 항체보다 쉽게 부착되어짐.



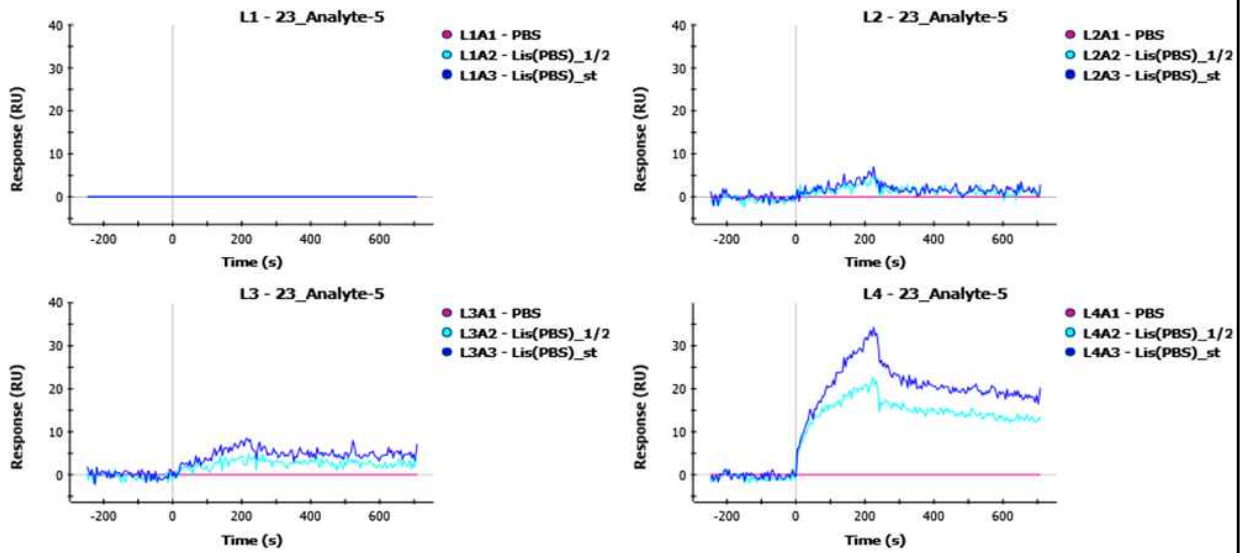
<그림 36> 시판중인 단클론(L2)/다클론(L3) 항체 부착 (control)



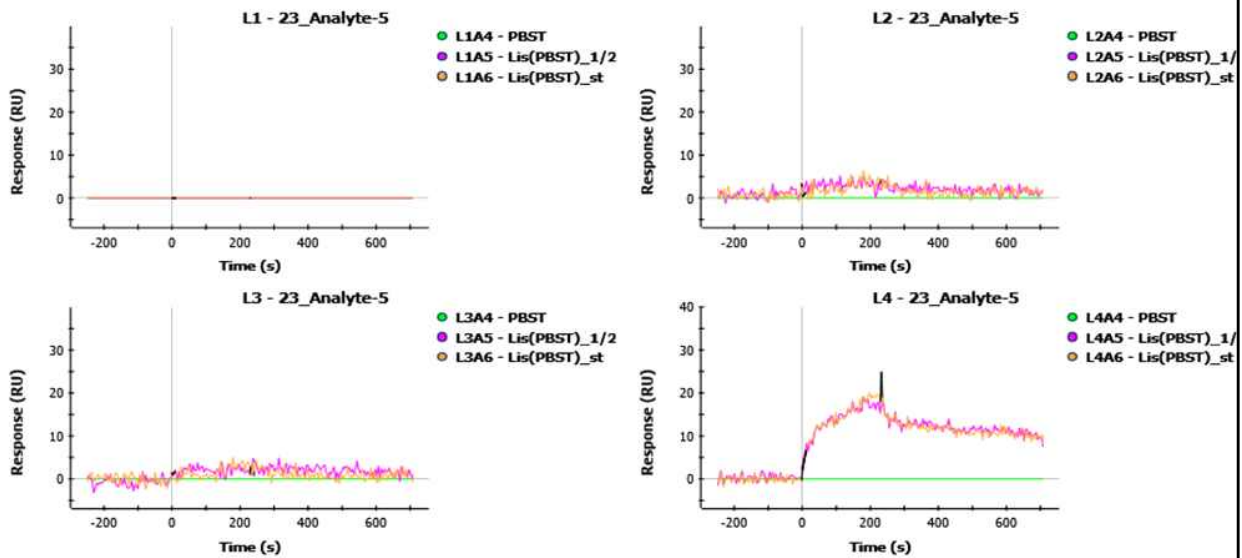
<그림 37> GLH sensor chip에 직접 제작한 3개의 항체를 각각 부착함. 10E9(L4) 10H8(L5), 11H7(L6)

(2) 버퍼 선정을 위한 반응성 시험

○ PBS와 PBST 버퍼에서의 항원-항체 반응을 비교하였음. Positive control로 사용한 항체에서, 항원-항체 반응성이 크지 않음. 두 버퍼에서의 반응성이 큰 차이를 보이지 않으므로, 이 후 실험에서 PBS 버퍼를 사용함. (그림 38, 39)



<그림 38> PBS 버퍼를 사용하여 항원-항체 반응 실험



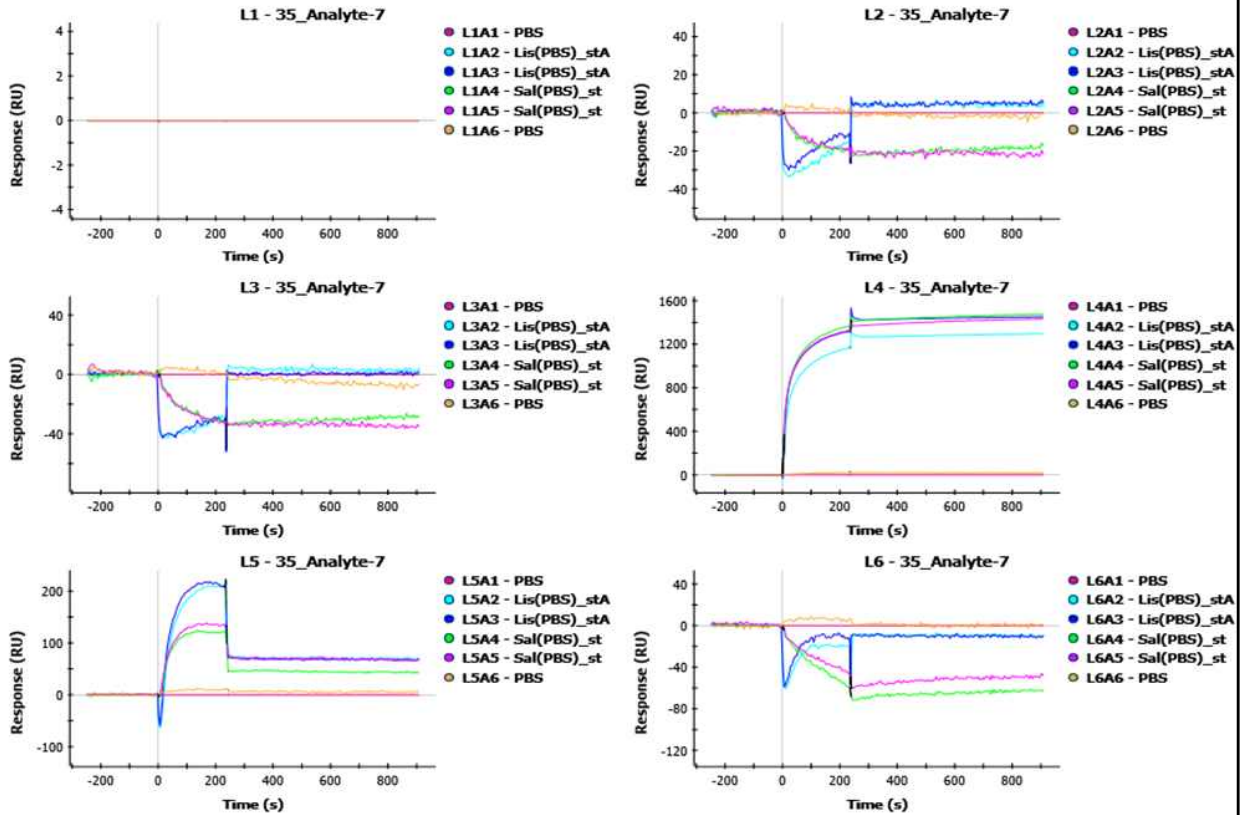
<그림 39> PBST 버퍼를 사용하여 항원-항체 반응 실험

(3) 미생물을 이용한 SPR 측정

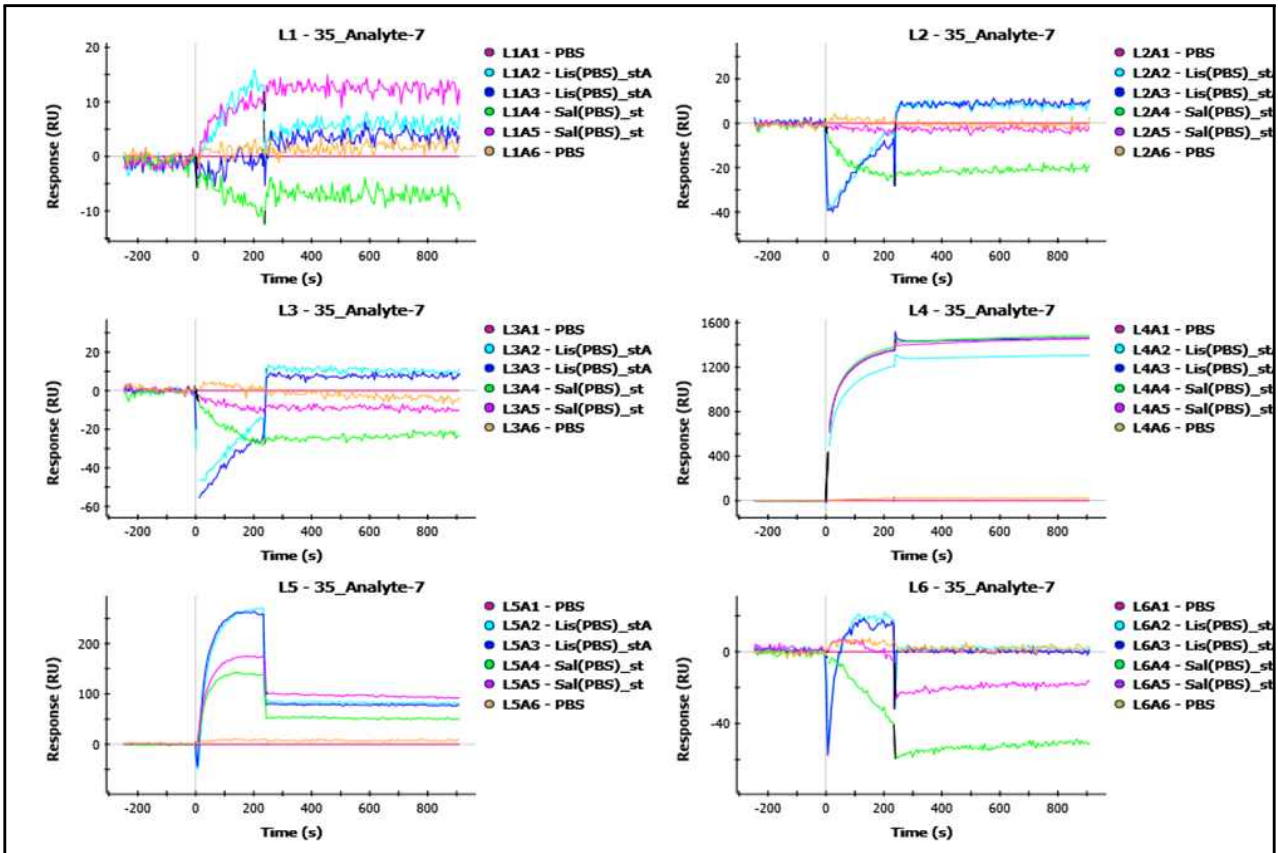
○ Control로 사용한 시판중인 항체는 *Listeria*와의 반응에서 어느 정도의 반응성을 보였으며, *Salmonella*와의 반응에서는 전혀 다른 패턴을 보여주었음. 따라서 두 미생물에 대하여 약간의 선택적인 결합을 보여주었음. (L2: 단클론, L3: 다클론)

○ Clone 10E9(L4)은 현저히 높은 항원-항체 반응성을 보여주었으나, 선별적 특이성면에서 부족함. Clone 10H8(L5)은 control 보다 높은 항원-항체 반응성과 함께, 어느정도의 선별적

특이성도 보여줌. Clone 11H7(L6)은 control가 가장 비슷한 패턴으로 항원-항체 반응이 관찰되었음. (그림 40, 41)



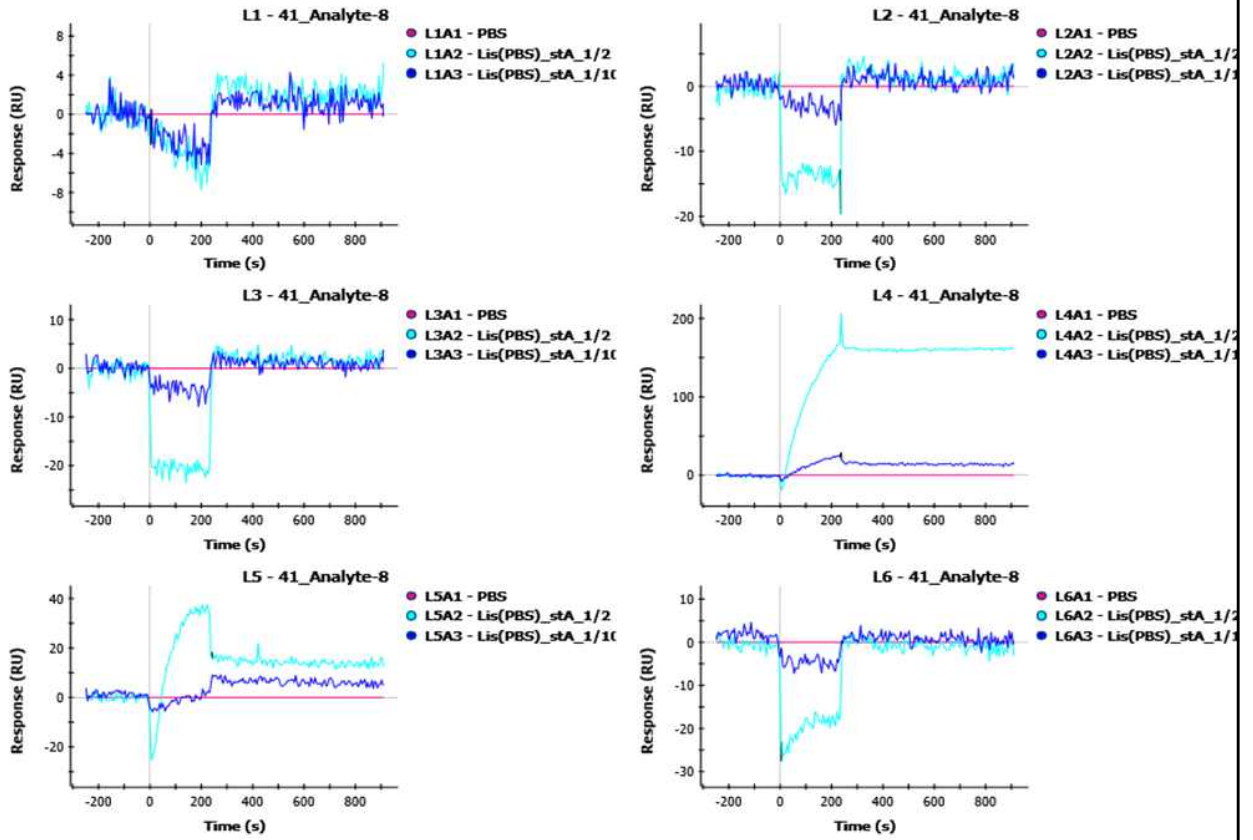
<그림 40> 제작한 항체와 미생물의 반응성 측정. Positive control(L2, L3), 10E9(L4), 10H8(L5), 11H7(L6)



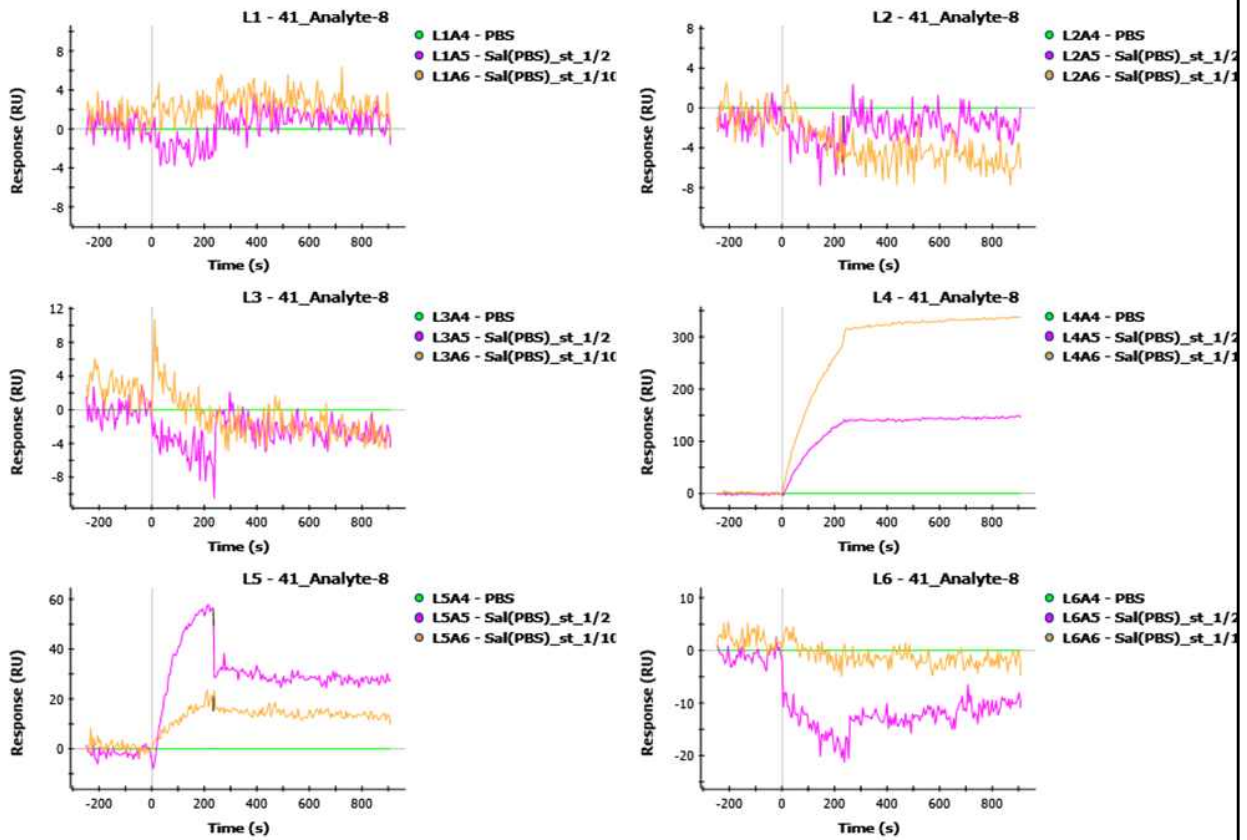
<그림 41> 제작한 항체와 미생물의 반응성 측정. Positive control(L2, L3), 10E9(L4), 10H8(L5), 11H7(L6)

(4) sample의 농도변화에 따른 반응성 측정

○ 항원으로 작용하는 미생물의 양을 줄여서(1/2, 1/10) 항원-항체 반응성을 확인하였음. Clone 10E9과 10H8은 전체적인 반응성이 좋으므로, 항원의 차이에 따른 변화를 보여주었으며, Control과 clone 11H7은 반응성의 차이가 크지 않게, 비슷한 패턴으로 관찰되었음. (그림 42, 43)



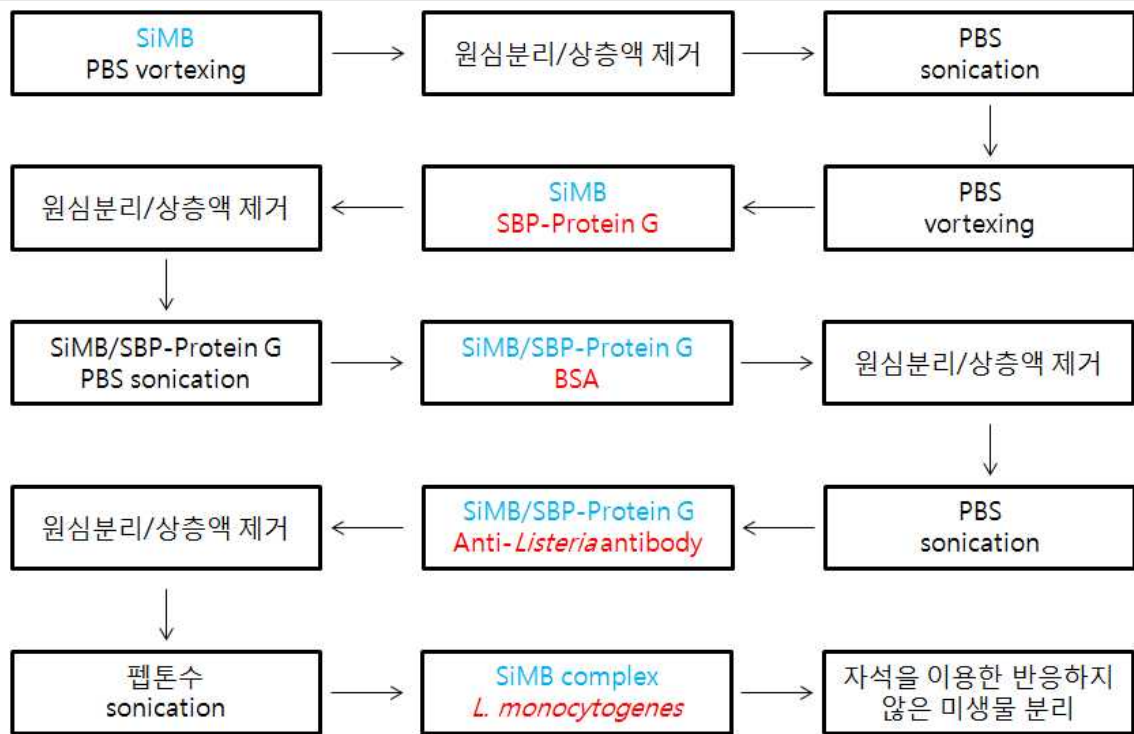
<그림 42> *Listeria*의 농도변화에 따른 반응성 측정. Positive control(L2, L3), 10E9(L4), 10H8(L5), 11H7(L6)



<그림 43> *Salmonella*의 농도변화에 따른 반응성 측정. Positive control(L2, L3), 10E9(L4), 10H8(L5), 11H7(L6)

3. 제작된 항체를 이용한 COC(cyclic olefin copolymer) chip에서의 성능시험

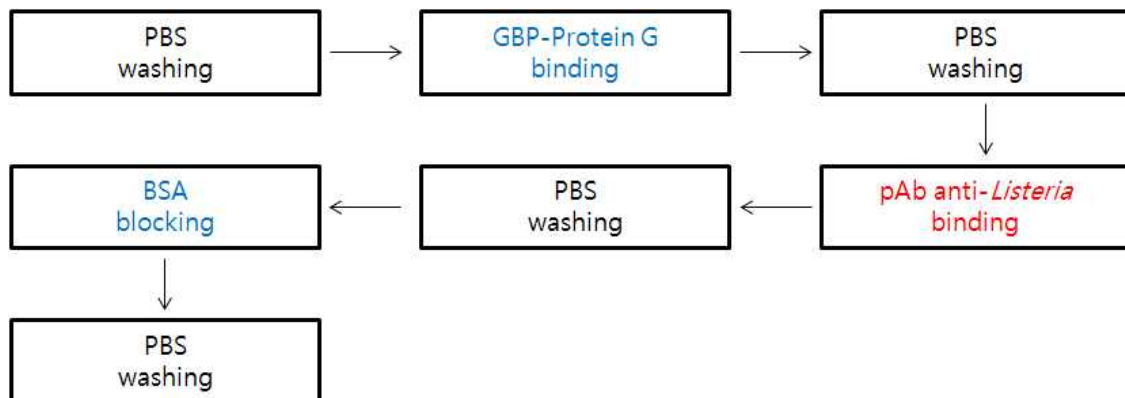
가. SiMB(Silica coated magnetic bead)에 제작한 anti-*Listeria* 항체(단클론/다클론) 고정
 ○ 제1협동에서 제공한 방법을 통하여 SiMB complex를 제조하였음. SiMB(2.03×10^9 beads/mL) 200 μ L, SBP-ProG 융합 단백질(500 μ g/mL) 100 μ L, 1% BSA 100 μ L, anti-*Listeria* antibody (500 μ g/mL) 100 μ L, *L. monocytogenes*(10^6 CFU/mL) 10 μ L를 각각 사용하였음. (그림 44)



<그림 44> SiMB complex 제조 및 미생물 반응과정

나. COC chip 상판 골드 표면에 anti-*Listeria* 다클론 항체 고정

○ 제1협동에서 제공한 방법을 통하여 항체 고정을 실시함. GBP-ProG 융합 단백질 (1mg/mL), pAb *Listeria*(500µg/mL), BSA(1mg/mL)를 5µL/min 속도로 주입하여 칩의 천장부에 고정화 시켰음. (그림 45)



<그림 45> COC chip 에 항체 고정 과정

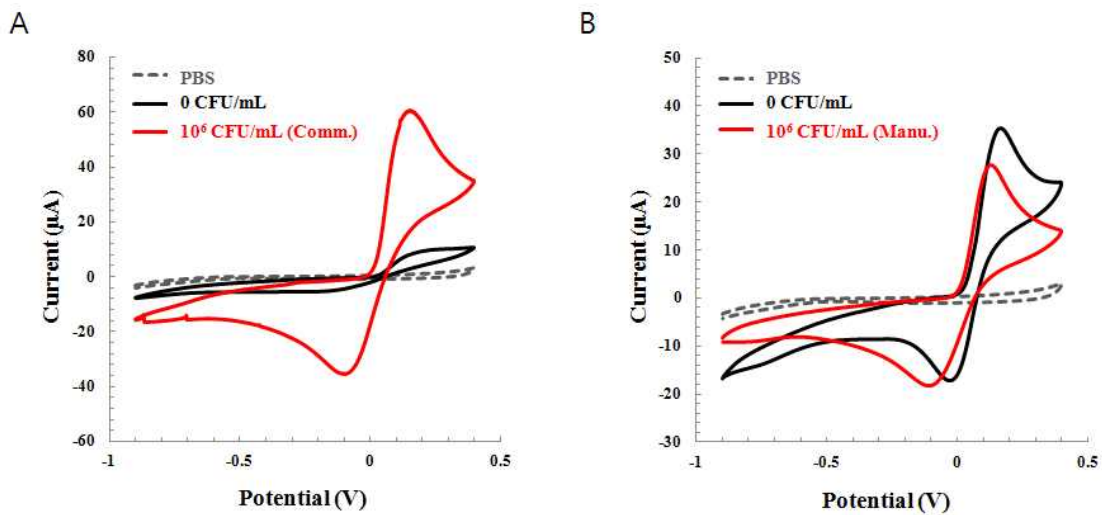
다. COC chip을 통한 *L. monocytogenes* 검출

○ 준비된 SiMB complex/*L. monocytogenes*를 20min간 5µL/min의 속도로 주입하여 천장부의 pAb *Listeria*와 반응할 수 있도록 하였음. PBS 버퍼를 이용하여 반응하지 않은 SiMB

complex/*L. monocytogenes*를 제거후에, PAPP (4mM in Tris-HCL pH 9.0)를 주입하여 SiMB complex/*L. monocytogenes*의 AP와 반응하도록 한 뒤 CV로 산화 환원 피크를 확인하였음.

(1) COC chip 상판 골드 표면에 제작한 anti-*Listeria* 다클론 항체를 사용한 경우

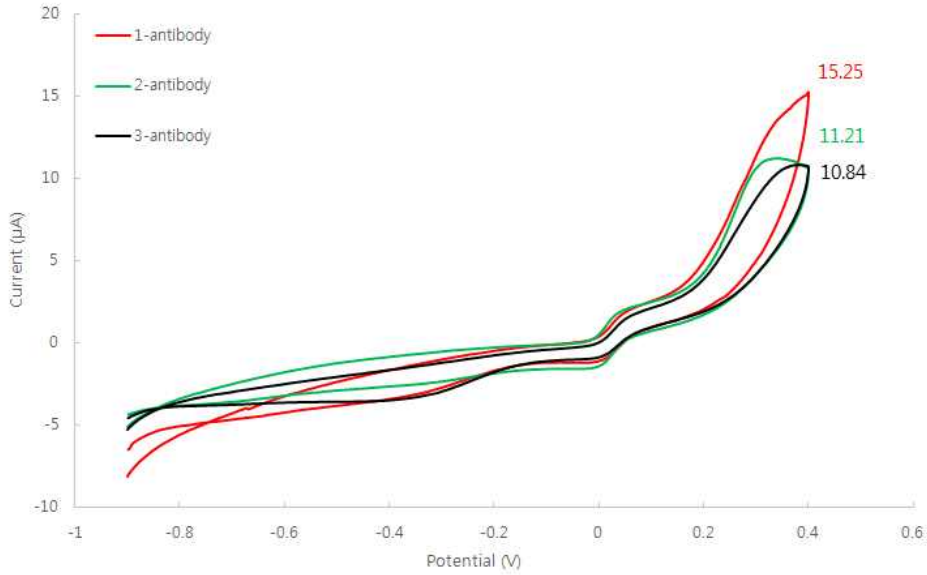
○ 제작된 anti-*Listeria* 다클론 항체를 이용한 실험 결과, 항체에 의한 산화 피크 값이 27.60 μA 로 대조군(0 CFU/mL의 *L. monocytogenes* 접종)의 산화 피크 35.33 μA 보다 낮게 형성되었음. 따라서 다클론 항체의 경우 비특이적 반응이 많이 발생하여, 상판의 골드 표면에 적용되는 포획용 항체로의 사용에 적합하지 않음. (그림 46)



<그림 46> 펩톤수 내에 존재하는 *L. monocytogenes* CFU/mL에 따른 CV 신호 변화. A(시판되고 있는 항체), B(제작한 항체)

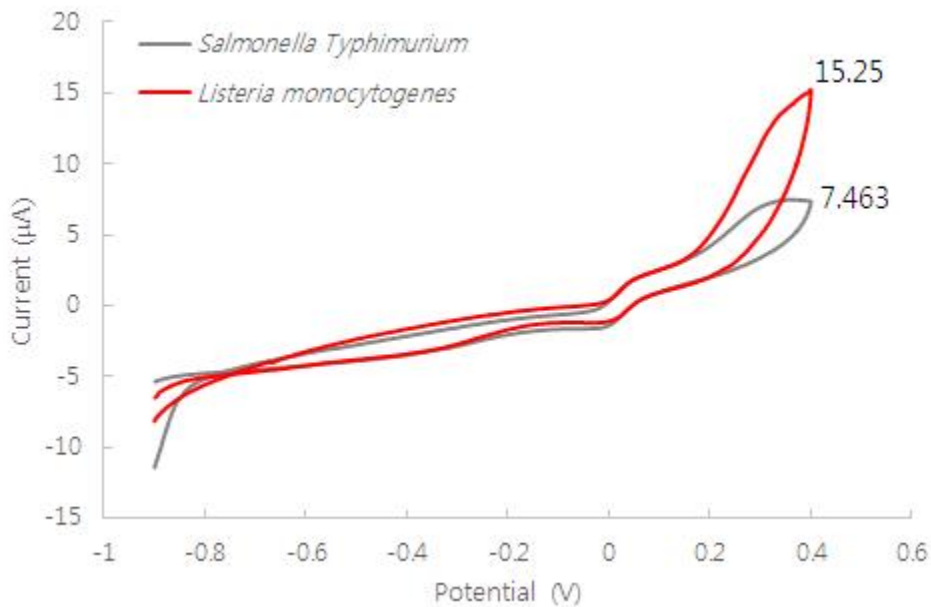
(2) 단클론 항체를 이용하여 SiMB complex를 제조한 경우

○ Clone 10E9(1-antibody)가 가장 높은 산화 피크 15.25 μA 를 보였으며, clone 10H8(2-antibody)은 11.21 μA , clone 11H7(3-antibody)은 10.84 μA 를 나타냄. (그림 47)



<그림 47> 시판중인 단클론 항체와 제작한 단클론 항체의 민감도 비교

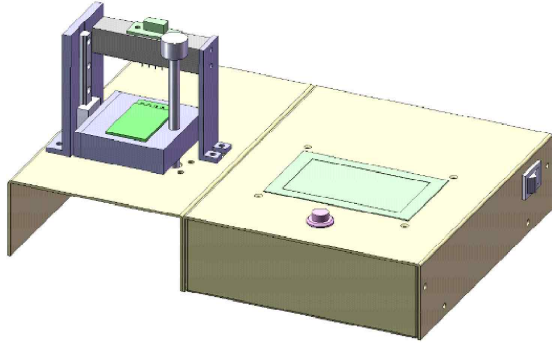
○ 민감도 비교 실험에서 가장 높은 값을 갖는 clone 10E9의 선택도(selectivity)를 평가하고자 살모넬라 10^6 CFU/mL을 처리하여 전기화학 신호를 관찰하였음. Clone 10E9은 동일 CFU/mL의 *Listeria*를 *salmonella*에 비해 2배 높은 전기화학 신호로 검출하였음. 따라서 SiMB complex의 제조에 적용이 가능할 것으로 보임. (그림 48)



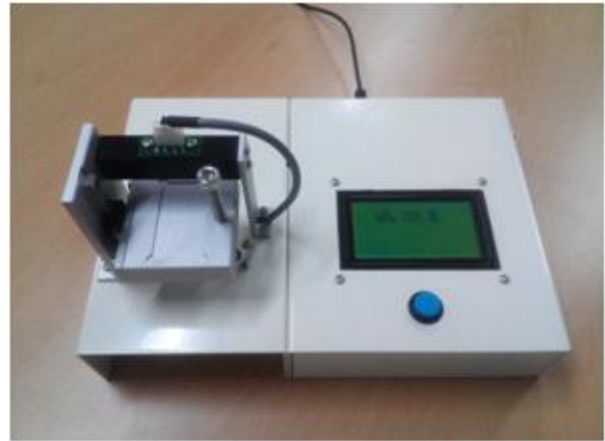
<그림 48> *Listeria*와 *Salmonella*를 이용한 선택성 비교

4. 검출시스템 개발

가. 전기화학분석기 ElBio ED-014 외관 (그림 49, 50)



<그림 49> 전기화학분석기 ElBio ED-014 모식도

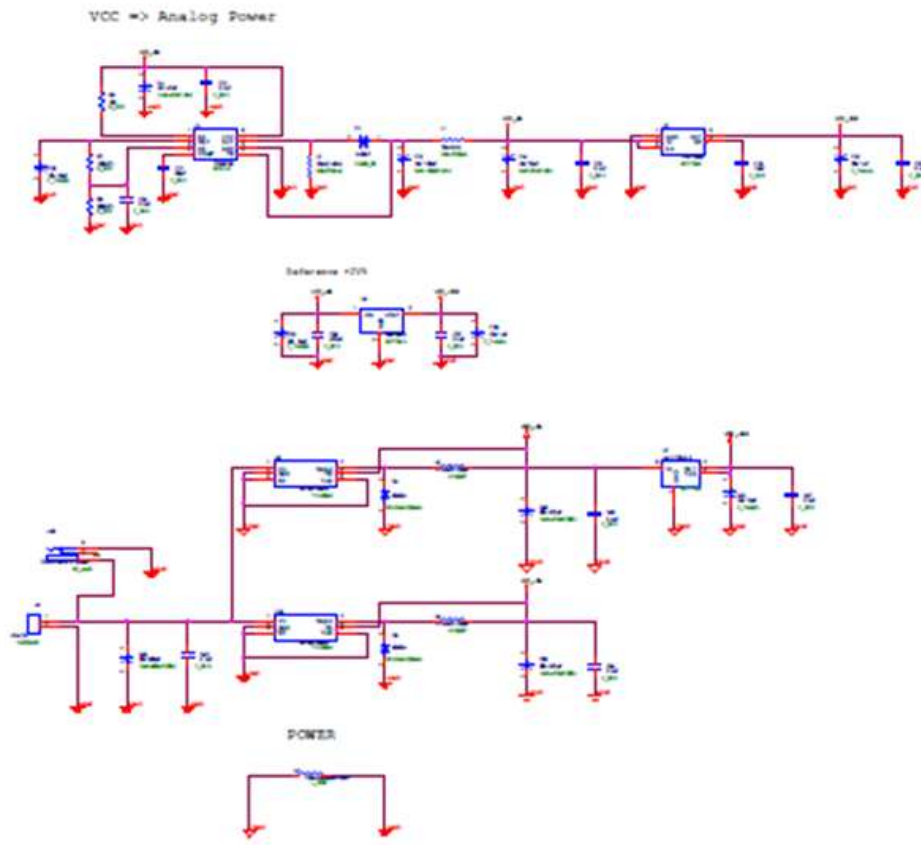


<그림 50> 전기화학분석기 ElBio ED-014 시제품

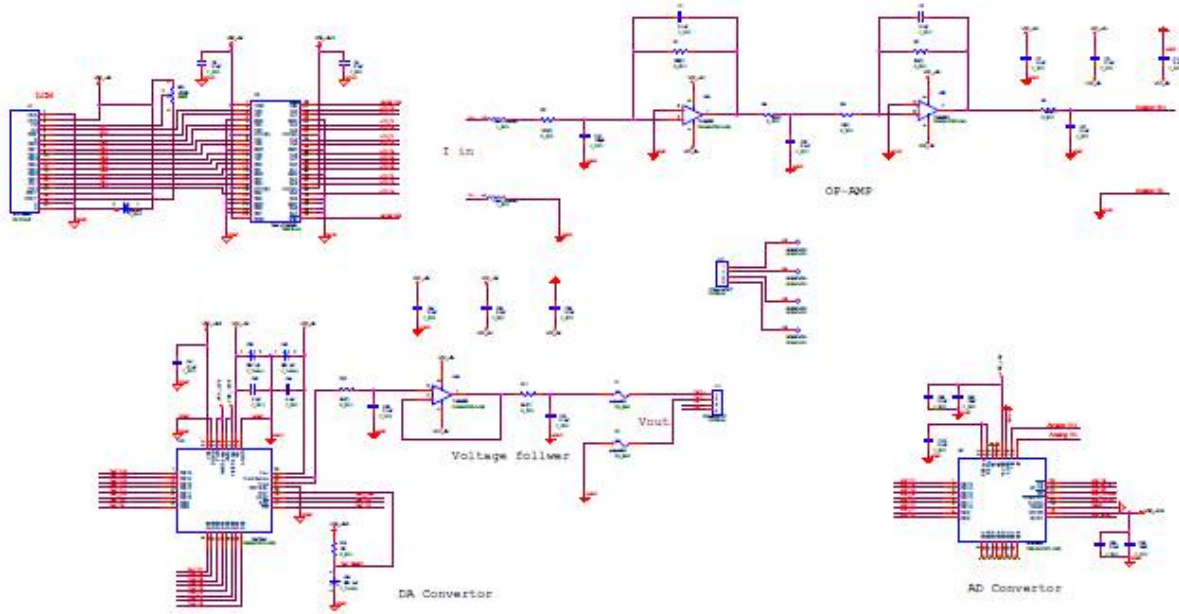
나. 전기화학분석기 ElBio ED-014의 특징

- 반응이 일어날 때 발생하는 칩의 내부 저항 값에 따라 정전압 회로에서 전압 분배를 사용하여 발생한 전압 값을 ADC (analog-to-digital converter)로 읽어내는 원리임.
- 16 bit ADC 로 변환된 값은 CPU에 저장된 자체 분석 프로그램으로 처리하여 uA 값으로 표기됨.
- 측정된 전체 데이터는 자체 SRAM에 저장되어 있으므로, PC 응용 프로그램을 개발한다면 PC와의 연동이 가능함.

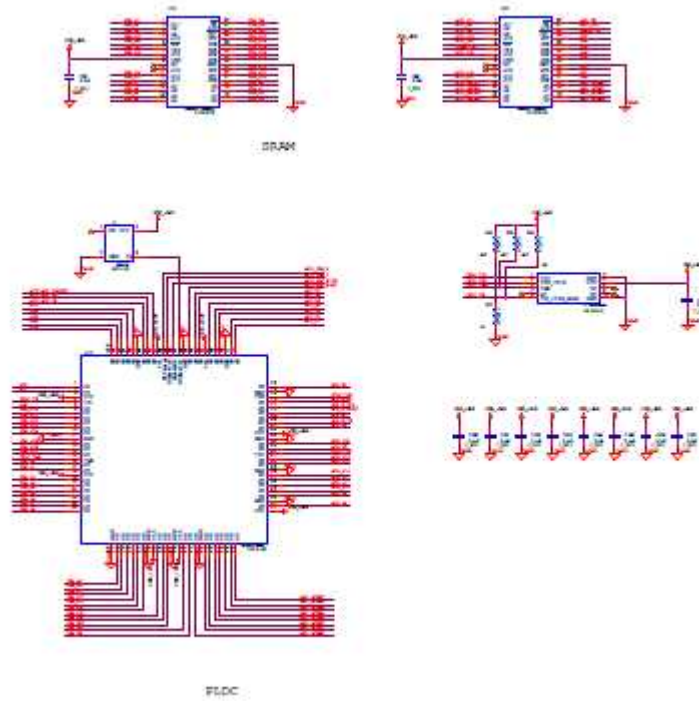
다. ElBio ED-014 회로도



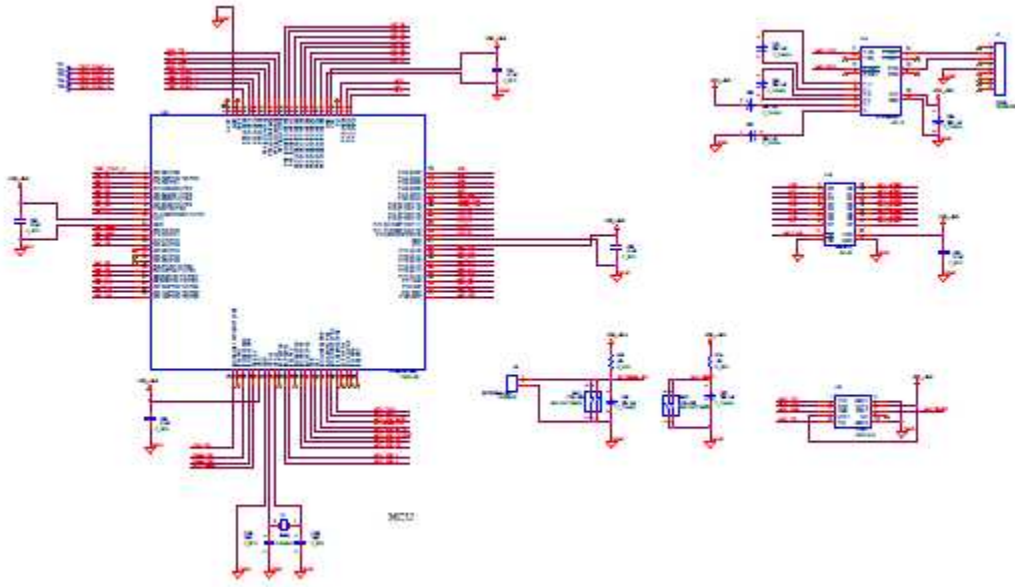
<그림 51> Power 회로도



<그림 52> DA converter 와 AD converter 회로도



<그림 53> SRAM 과 PLDC 회로도



<그림 54> MCU 회로도

라. 현재 시판되고 있는 CHI624C 장비와의 비교

○ 비교 실험에 사용한 COC chip은 control로서 사용한 항체를 이용하여 제작하였음. 제작한 전기화학분석기는 cyclic voltammetry에서 보여주는 그래프 형태가 아닌 가장 높은 값만을 보여줌. 또한 미생물을 직접 사용하기에 앞서 piranha solution을 사용하여 측정을 하였음. 실험결과 현재 시판되고 있는 기기와 비슷한 정도의 전류값을 나타내며, 보다 많은 분석을 통하여 에러율 발생정도에 대한 데이터와 보정 가능성에 대한 연구가 필요할 것으로 보임.

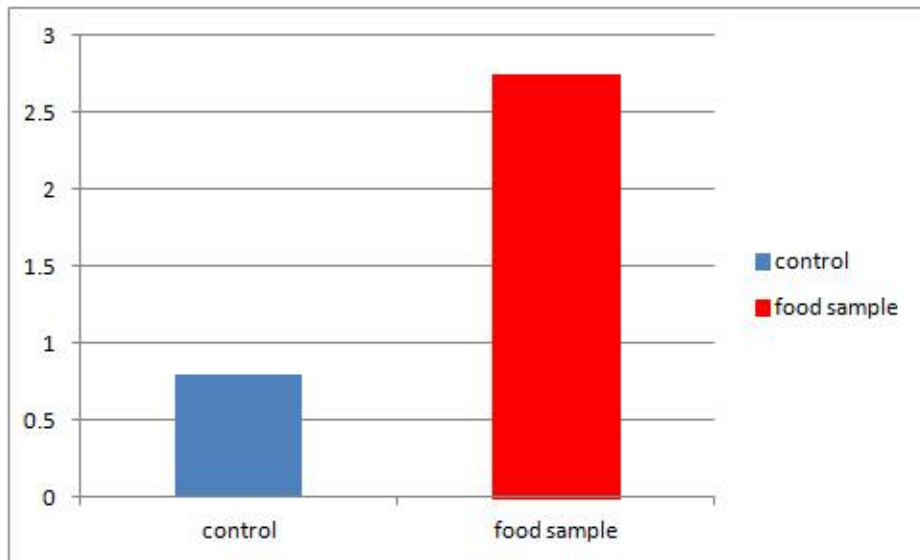
CHI624C 측정시 전류 피크값	테스트	제작한 전기화학분석기		
		ADC값	칩 저항값	전류값
-	1	-	-	-
2.474uA	2	127	684.4K	3.251uA
7.5uA	3	261	283.1K	6.681uA

<표 32> 전기분석장비 데이터 비교

마. 실제 식품샘플에의 적용

○ 일상에서 쉽게 접할 수 있는 양상추를 이용하여, 자체 제작한 전기화학분석기가 실제 식품에서도 적용될 수 있는지를 확인하였음. 펩톤수를 사용한 대조군은 0.8 uA를 나타내었으며, *L. monocytogenes*를 10^6 CFU/mL 처리한 양상추에서 채취한 샘플은 2.75 uA 값을

보여주었음. 따라서 *L. monocytogenes*를 유무를 확인하기 위하여 현장에서의 활용이 가능할 것으로 보임. 또한 정성적 분석 뿐 아니라 정량적 분석을 위하여 전류 값을 미생물의 수와 값이 보여주기 위한 추가 연구가 필요할 것으로 보임. (그림 51)



<그림 55> 양상추에 처리한 *L. monocytogenes* 샘플을 자체 제작한 전기화학분석기에 적용

3-2 절 제1협동과제

1. 실험 방법

가. SiMB/monoclonal anti-*Listeria* complex의 제조

Silica coated magnetic bead(SiMB, 2.03×10^9 beads/mL) 200 μ L를 500 μ L의 PBS가 들어있는 epi-tube에 넣어 1min간 vortexing 하고 5000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10min의 조건으로 원심분리 하여 상층액을 제거함. 다음으로 SiMB가 pellet 상태로 있는 epi-tube에 PBS 버퍼 500 μ L를 넣고 sonication을 30s 처리한 뒤 vortexing하여 SiMB가 단일 입자로 수용액 상에 존재하도록 하였음. 이 후 SiMB의 실리카 표면에 물리·화학적 처리 없이 직접적으로 결합하는 것으로 알려진 silica binding peptide(SBP)와 항체의 Fc 부위에 특이적으로 결합하는 것으로 알려진 Protein G(ProG)를 유전공학적 방법으로 융합시켜 만든 SBP-ProG 융합 단백질(500 μ g/mL)을 100 μ L 처리하여 실온에서 30min간 반응시킴. 반응이 일어나는 동안 SiMB가 단일 입자로 존재할 수 있도록 vortexing함. SiMB 표면으로의 SBP-ProG의 고정화는 monoclonal anti-*Listeria* antibody(mAnti-*Listeria*)가 SiMB의 표면으로 ProG 도메인에 의해 어떠한 표면 처리 없이 직접적으로 결합되어 지도록 함. 이는 물리·화학적 방법을 통한 항체 고정 시 생체 물질의 불안정성이

유발될 수 있는 환경으로부터 보호하고, ProG에 의해 항체의 Fab 부위가 항원 방향으로 위치함으로써 항원-항체 반응의 효율을 높일 수 있게 함. SiMB와 SBP-ProG의 반응이 끝나면 3000rpm, 4°C, 10min 조건으로 원심분리 하여 상층액을 제거함으로써 SiMB와 결합하지 않은 SBP-ProG를 제거함. 이 후 다시 500µL의 PBS 버퍼를 SiMB/SBP-ProG가 있는 epi-tube에 넣어 30s간 초음파 처리(sonication)하여 SiMB/SBP-ProG를 수용액 내에서 분산시킨 뒤 vortexing 하고 1% BSA를 100µL 넣어 실온에서 10분간 반응시킴으로써 SBP-ProG가 결합하지 않은 SiMB의 표면을 blocking 함. 이 후 3000rpm, 4°C, 10min의 조건으로 원심분리 하여 SiMB/SBP-ProG와 결합하지 않은 BSA를 제거하고, 500µL의 PBS 버퍼를 넣어 30s간 sonication하여 mAb *Listeria*와의 결합을 준비함. mAnti-*Listeria*(500µg/mL) 100µL를 SiMB/SBP-ProG와 실온에서 60min간 반응 시킨 뒤, 이를 각각 60 µL씩 epi-tube에 분주하여 3000rpm, 4°C, 10min 조건으로 원심분리 함으로써 반응하지 않은 mAnti-*Listeria*를 제거하고 펩톤수 90µL를 넣어 30초 sonication하여 SiMB complex를 분산시켜 *L. monocytogenes*의 검출을 준비함.

준비된 SiMB complex와 *L. monocytogenes*를 반응시키기에 앞서, 펩톤수와 BSA(1mg/mL)를 9:1로 섞은 용액 내에 *L. monocytogenes*가 10^{1-6} CFU/mL이 되도록 준비하였음. 다음으로 SiMB complex에 *L. monocytogenes*(10^1-10^6 CFU/mL)가 포함 된 샘플 용액을 10 µL 넣어 30min간 실온에서 반응시킴. 이 후 자석이 고정화 되어져 있는 epi-tube용 랙에 SiMB complex와 *L. monocytogenes*가 반응된 epi-tube를 끼워 5min간 반응 시킨 뒤 반응하지 않은 *L. monocytogenes*를 제거하고 PBS 버퍼를 100µL 채워 sonication하여 SiMB complex/*L. monocytogenes*를 분산시켜 줌. 식품샘플 내의 *L. monocytogenes*의 검출 과정은 5배 많은 볼륨으로 실험을 진행함.

나. 식품 샘플(양상추)의 선정 및 *L. monocytogenes* 접종

A



B



<그림 56> 식품 샘플 만들기

A) 80ml Stomacher bag 안의 식품 샘플 (양상추, *L. monocytogenes*, peptone water),

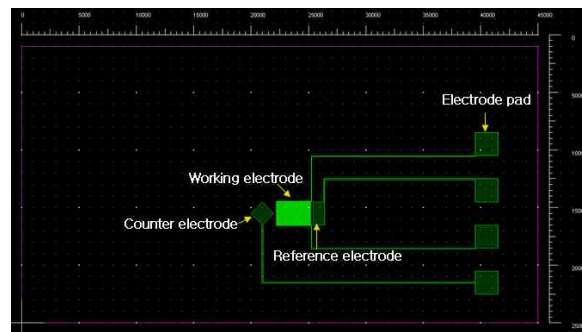
B) 양상추에서 접종된 *L. monocytogenes*를 떼어내는 stomaching과정.

식중독균에 의해 오염된 식품 샘플을 준비하기 위해 식품 샘플로는 양상추 샐러드를 선택하였으며, 식중독 균으로는 *L. monocytogenes*를 선택하였음. 일반적으로 양상추 샐러드는 가열과정 없이 샐러드로 섭취되는 식품으로서 식중독 감염 위험도가 높고, 최근 ready-to-eat 식품으로서 그 소비가 증가하고 있음. *L. monocytogenes*에 의해 오염된 양상추 샐러드 샘플을 만들기에 앞서, 식품 샘플 내에 존재가능성이 있는 미생물과 농약 등을 제거하기 위해 세척 과정을 진행함. 그 과정은 다음과 같음. 세정제 (500mL distilled water(D.W), 7.5mL 야채전용세정제)에 10g의 양상추(2 x 2cm)를 넣어 2 분간 실온에 두고, 이 후 D.W(500mL)로 3회 세척함. 다음으로, 그림 56A와 같이 세척 과정을 거친 양상추 10g은 90mL의 *L. monocytogenes*를 접종한 peptone water가 담겨진 80mL stomach bag에 넣어 밀봉하고, rotator 상에서 (4°C, 2hr) 반응시킴. 4°C의 반응 온도는 유통되는 식품 샘플 보관환경과 유사한 환경을 만들어 주기 위함이며, 이 과정을 통해 양상추 표면에 *L. monocytogenes*가 고르게 접종됨. 다음으로 접종 된 *L. monocytogenes*를 검출하기 위해 식중독균 오염 양상추를 포함하는 stomach bag을 vortexer에서 2분간 가장 강한 세기로 vortexing하여 양상추로부터 *L. monocytogenes*를 탈리하였음(그림 56B). 그 후 stomach bag 내의 5부분에서 soup을 200μL 씩 취해 총 1mL의 샘플을 만듦. 모든 세척과정은 무균작업대에서 진행되었음.

다. COC chip의 제작

1) 금 전극 칩의 제작 및 최적화 조건

아래 그림의 interdigitated array(IDA) 전극 칩 디자인에 나와 있듯이 working electrode, counter electrode, reference electrode로 구성되어졌고 working electrode는 100개의 어레이 쌍으로 이루어졌고 microfinger하나의 넓이 10um, 간격 5um로 설계 되어졌음. 대량 생산에 용이하며 내열성/내약품성 등이 우수한 COC (cyclic olefin copolymer) 플라스틱으로 초미세가공 기술에 의하여 금이 박막된 IDA 전극 칩을 제작하였음.



<그림 57> Working electrode, counter electrode, reference electrode로 구성된 IDA 전극 칩의 설계도

포토리소그래피(photolithography) 과정을 통해 금이 박막된 COC chip 상판과 interdigitated assay(IDA) 전극이 형성된 COC chip 하판을 제작하였음. 플라즈마 처리를 한 COC chip 표면에 e-beam evaporator를 이용하여 크롬과 골드를 박막한 뒤, positive photoresistant(positive PR)인 S1813을 spin coater를 이용하여 코팅함. 다음으로 90℃에서 90s간 baking한 뒤 2s간 UV를 조사하고, PR developer에 90s간 담구어 PR을 제거함. 증류수로 PR developer를 제거한 뒤 기체 질소를 이용하여 COC chip의 표면을 건조시킴. 이 후 COC chip을 금 etchant에 담구어 COC chip의 금 박막 표면이 검회색이 될 때까지 기다린 뒤, 색이 변한 10s 후에 꺼내어 증류수와 기체 질소를 이용하여 세척 및 건조하였음. 다음으로 COC chip의 크롬을 제거할 수 있는 용액을 이용하여 실온에서 90s간 담구어 크롬을 제거하고 증류수와 기체 질소를 이용하여 세척 및 건조함. 다음으로 COC chip의 골드 박막 표면에 남아있는 PR을 제거하기 위해 아세톤을 이용하여 세척한 뒤 증류수로 2차 세척하여 기체 질소를 이용하여 말리고 사용 전까지 밀봉하여 보관함.

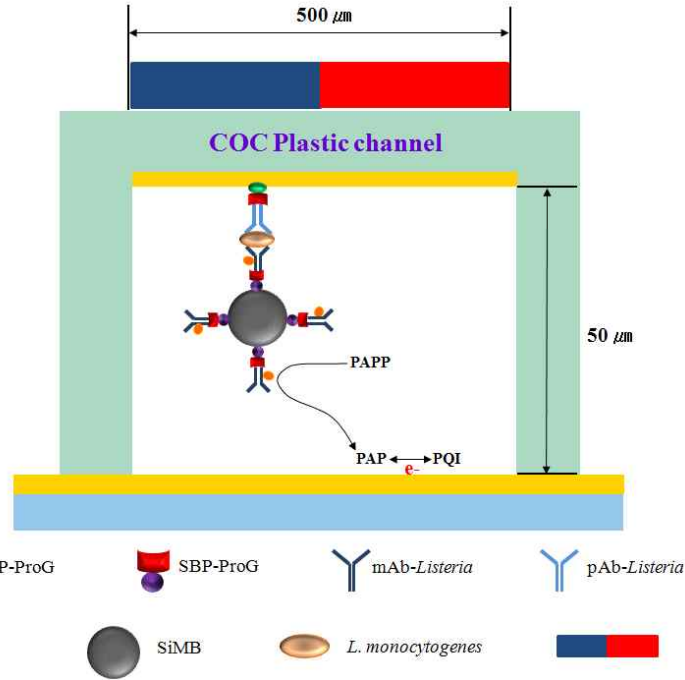
라. COC chip 상판 골드 표면으로의 polyclonal anti-*Listeria* (pAb *Listeria*)고정

COC chip의 상판은 포토리소그래피(photolithography) 과정을 통해 중앙 부위에 골드가 박막될 수 있도록 하였으며, 시료의 주입 및 제거를 위해 inlet과 outlet을 형성하였음. 준비된 COC chip의 상판은 phirana solution을 이용하여 세척하고 실온에서 건조하였음. COC chip의 상판에 GBP-ProG 및 pAb *Listeria*를 고정화하기 위해 양면테이프를 이용하여 채널을 형성하고 금이 박막되지 않은 COC 하판과 부착시켜 주었음. 이 후 syringe pump를 COC chip의 inlet 부위에 연결하여 주었음. 다음으로 syringe pump를 이용하여 PBS를 COC chip의 채널 내부로 1min간 200μ

L/min의 유속으로 주입하여 채널을 세척함. 다음으로 COC chip의 천정 부위에 박막된 금 표면에 항체의 고정화를 용이하게 할 수 있도록 금에 직접적으로 결합하는 Gold binding peptide (GBP)와 항체의 Fc 부위와 특이적으로 결합하는 Protein G를 유전공학적으로 융합한 GBP-ProG 융합 단백질(1mg/mL)을 채널 내부로 30min 동안 5 μ L/min의 속도로 주입하여 천장부에 고정화 시켰음. 이후 PBS 버퍼를 10min간 20 μ L/min의 속도로 흘려 천장의 금 박막 부위와 결합하지 않은 GBP-ProG를 제거하고, pAb *Listeria*(500 μ g/mL)을 채널내로 25min간 5 μ L/min의 속도로 주입하여 천장부에 고정화 시켰음. 반응하지 않은 pAb *Listeria*는 PBS washing을 통해 제거하였으며, 이때 PBS는 5min간 20 μ L/min로 주입하였음. BSA(1mg/mL)를 5min 또는 15min간 5 μ L/min의 속도로 흘려 아무것도 결합하지 않은 금 표면을 blocking 하였음. 금 박막 부위와 반응하지 않은 BSA는 PBS 버퍼를 5min간 20 μ L/min의 속도로 흘려 제거하였음.

마. COC chip을 통한 *L. monocytogenes* 검출

‘라’의 실험을 통해 준비한 COC chip의 상판을 하판으로부터 분리한 뒤, IDA 전극이 형성된 COC chip 하판과 미세유체 채널이 형성된 양면 테이프(높이 50 μ m)를 이용하여 채널을 형성하고 상·하판을 고정 하였음 (그림 58). 다음으로 PBS 버퍼를 5min간 20 μ L/min의 유속으로 주입하여 washing 하고, COC chip의 상부에 자석을 위치시킴(그림 58). 준비된 SiMB complex/*L. monocytogenes*를 20min간 5 μ L/min의 속도로 주입하여 천장부의 pAb *Listeria*와 반응할 수 있도록 하였음. 이 후 반응하지 않은 SiMB complex/*L. monocytogenes* or SiMB complex는 PBS 버퍼 200 μ L를 20 μ L/min의 유속으로 주입하여 제거하였음. 이 후 PAPP (4mM in Tris-HCL pH 9.0)를 5min 동안 5 μ L/min의 유속으로 주입하여 SiMB complex/*L. monocytogenes*의 AP와 반응하도록 한 뒤 CV로 산화 환원 피크를 확인하였음.



<그림 58> 미세유체 채널이 형성된 전기화학 COC chip의 식중독균 검출 모식도

2. 실험 결과

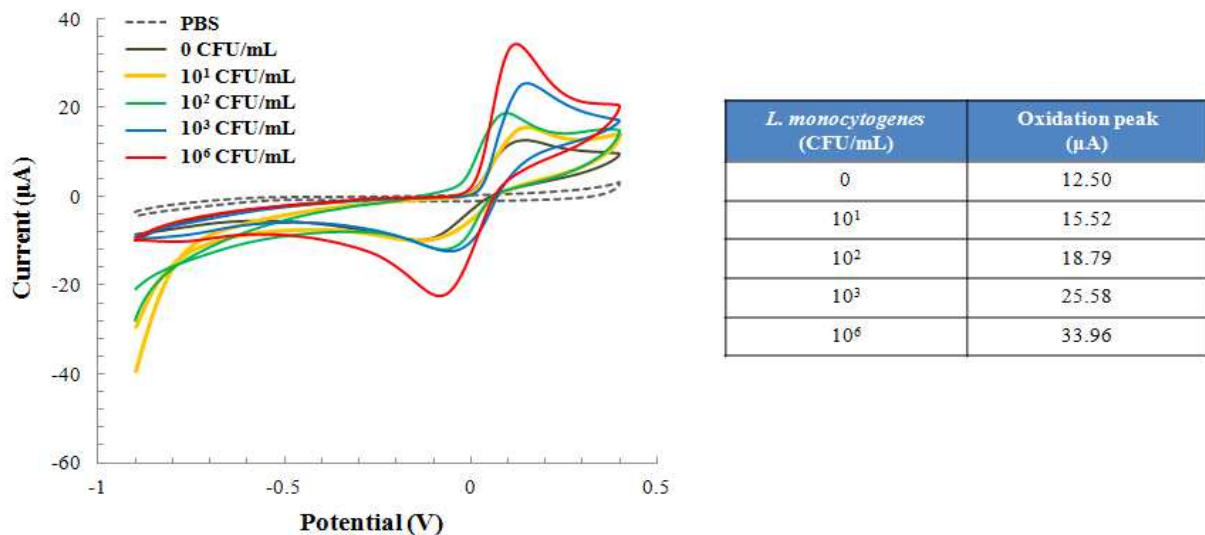
가. BSA가 포함된 샘플 버퍼내의 *L. monocytogenes*의 CFU/mL에 따른 COC chip의 신호 변화측정

<i>L. monocytogenes</i> (CFU/mL)	Oxidation peak (μ A)
0	11.40
10^1	17.05
10^2	29.13
10^3	33.75
10^6	60.55

<표 33> 펩톤수 내에 존재하는 *L. monocytogenes* CFU/mL에 따른 CV 신호 변화

본 연구진은 2차 년도에 본 연구진이 개발한 COC chip에 의해 펩톤수에 존재하는 *L. monocytogenes*를 10^1 CFU/mL의 검출 한도로 정량·정성 평가가 가능함을 확인하였음 (표 33). 본 연구진의 최종 목표는 식품 내에 존재하는 식중독균을 유통단계에서 신속 정확하게 검출하는 것으로, 그 가능성을 평가하고자 *L. monocytogenes*를 BSA(1mg/mL in peptone water)가 포함된 샘

플 버퍼 내에 접종한 뒤 COC chip을 통해 CFU/mL 단위로 정량·정성 평가가 가능한지를 확인하였음. 일반적으로 식품 샘플로부터 식중독균을 검출하기 위해서는 식품과 버퍼의 비율을 1:10으로 하여 stomacher bag에 넣고 stomacher를 이용하여 분쇄한 뒤, 그 용액을 취해 균의 유무를 확인하게 됨. 이 때 용액 내에 존재하는 식품 성분들은 식중독균이 SiMB complex와 반응하는데 있어서 큰 장애물로 작용할 수 있음. BSA는 본 실험에서 이와 같은 장애물로서 사용되어 졌으며, 처리된 BSA의 농도 이상 또는 이하로 식품 matrix 들이 식품 샘플 용액 내에 존재할 수 있음. FDA는 식품 내에 존재하는 *L. monocytogenes*가 10^2 CFU/g 이상일 때를 식중독균이 오염된 식품으로서 폐기 처분 할 것을 명시하고 있음. 따라서 본 실험을 통해 확인될 검출 한도는 10^2 CFU/mL 이하가 되어야 할 것임.



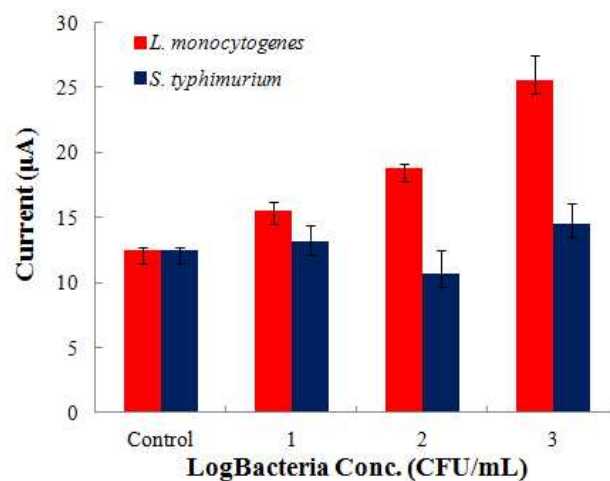
<그림 59> BSA가 포함된 샘플 버퍼내의 *L. monocytogenes*의 CFU/mL에 따른 CV 신호 변화

그림 59은 본 실험의 결과를 cyclic voltammogram 및 표로 나타낸 것임. *L. monocytogenes*의 처리 농도에 의존적으로 산화 피크가 증가되는 것을 확인할 수 있으며, 그 검출 한도가 10^1 CFU/mL로 나타남. 그림 59의 결과는 표 33의 2차 년도 결과(*L. monocytogenes*를 포함하며, BSA는 포함하지 않는 샘플 버퍼에 의한 결과)와 비교하였을 때 전반적으로 cyclic voltammogram의 산화 피크의 세기가 감소하는 것을 볼 수 있으며, 이러한 결과는 BSA가 *L. monocytogenes*와 SiMB complex의 결합 반응 저해 인자로서 작용하였기 때문임. 본 결과에 따라 식품 샘플 내에 존재하는 *L. monocytogenes*의 정량·정성 평가가 가능할 수 있을 것이라 예상해 볼 수 있었음.

나. *Salmonella typhimurium*(*S. Typhimurium*)의 CFU/mL에 따른 COC chip의 신호 변화 측정

실험 결과 ‘가’에 따라 본 연구진에 의해 개발되어질 식중독균 검출 바이오센서의 식품 내에 존

재하는 *L. monocytogenes*의 정량평가가 가능할 수 있을 것이라 예상해 볼 수 있었음. 본 연구진은 정성 평가의 가능성 또한 판단해 보기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였음. 식품 내에는 *L. monocytogenes* 외에도 *Escherichia coli* O157:H7, *S. typhimurium*, *Bacillus cereus* 와 같이 다양한 식중독균이 존재할 수 있음. 따라서 *L. monocytogenes* 외에 다른 균이 존재할 때, *L. monocytogenes* 만을 선택적으로 검출할 수 있는지를 확인하고자 *L. monocytogenes* 대신 *S. typhimurium*을 BSA를 포함하는 펩톤수에 10^{1-3} CFU/mL이 되도록 준비한 뒤, SiMB complex와 반응시켜 COC chip 내에 주입하여 산화 피크를 확인함으로써 결과를 획득하였음.



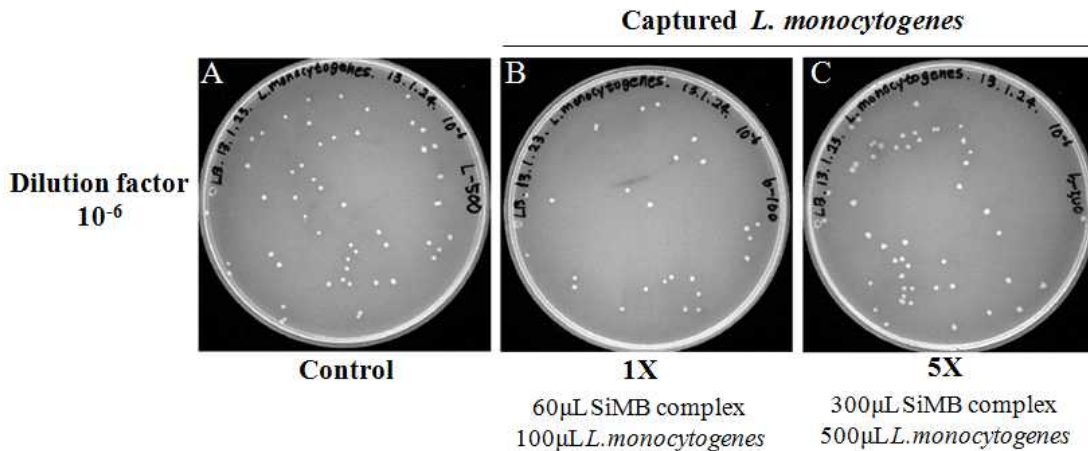
<그림 60> COC chip의 선택도(selectivity) 평가

그림 60에서 볼 수 있듯이 모든 실험군에서 *S. typhimurium*의 산화 피크가 *L. monocytogenes*의 산화피크보다 낮게 나타나는 것을 확인할 수 있었음. 이는 본 연구진의 COC chip의 선택도가 매우 높다는 것을 의미하며, BSA가 포함된 배지로부터 *L. monocytogenes*를 SiMB 복합체가 포획하는데 있어 그 항원-항체 반응에 BSA가 방해 인자로 작용하지 않았을 것이라 예상해 볼 수 있는 결과임. 항원-항체 반응은 매우 특이적이고, 민감한 반응으로서 본 연구진은 위 결과를 통해 COC chip 시스템이 식품 매트릭스에 의한 방해에도 *L. monocytogenes*를 매우 선택적으로 고민감도를 유지하면서 검출 가능할 것이라 예상할 수 있었음.

다. 식품 내에 존재하는 *L. monocytogenes*의 검출 가능성 실험

전기화학식 면역-바이오센서에 있어서 미세입자는 부피당 표면적이 넓어 검출하고자 하는 물질을 특이적으로 인지하는 다량의 항체를 표면에 개질할 수 있을 뿐만 아니라 효소 반응에 의한 전기화학적 신호를 획득함에 있어 미세입자에 의해 더 많은 효소를 개질할 수 있어 전기화학 신호의 민감도를 높일 수 있음. 본 연구진은 1차년도에 COC chip 시스템 확립에 있어 SiMB complex에 의한 전기화학 신호를 확인한바 있으며, SiMB complex를 사용하지 않은 경우 보다 2.7배 높은 전기화학 신호를 나타내는 것을 확인한바 있음. 그러나 BSA를 포함하는 펩톤수 내의 *L.*

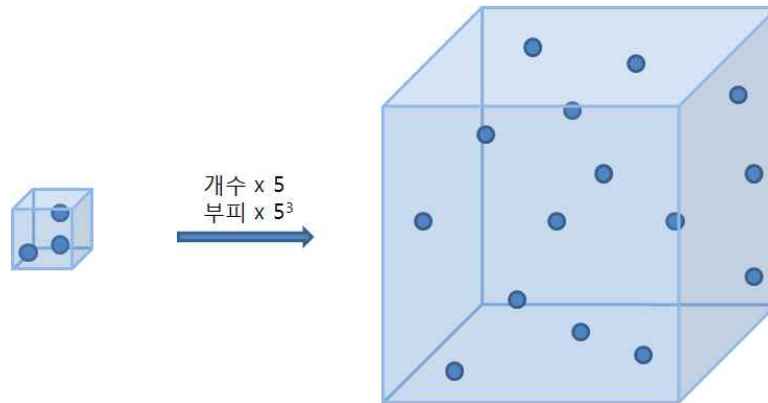
monocytogenes 검출 실험에서 확인하였듯이 SiMB complex에 의한 *L. monocytogenes*의 검출 신호는 BSA가 없을 때의 검출 신호보다 많게는 1.5배 이상의 전기화학 신호의 감소가 나타나는 것을 확인한바 있음. 식품 샘플은 펩톤수 또는 BSA가 포함된 펩톤수에 비해 다양한 식품 성분이 함유되어 있을 뿐 아니라 stomacher 과정에서 식품 잔해물들이 포함되어 있을 수 있음. stomacher 과정에서 만들어진 식품 즙(체액)은 샘플의 점성도를 증가시킬 수 있으며 이는 SiMB complex가 기존의 펩톤 수 샘플에 비해 점액질에 의한 이동 범위가 좁아질 수 있다는 것을 의미함. 따라서 기존 예비 실험과는 달리 포획되어지는 식중독균의 포획률이 감소 또는 증가할 수 있어 이를 확인하고자 기존의 SiMB complex와 샘플 버퍼의 반응 실험과 동일한 조건으로 식품 샘플 내의 *L. monocytogenes* 포획률을 확인하고, 95% 이상의 포획률을 획득하기 위한 실험 또한 진행하였음 (그림 60).



<그림 61> SiMB complex와 식품 샘플의 부피 증대에 따른 포획률의 변화. (Control은 SiMB complex와 반응하지 않은 *L. monocytogenes*가 접종된 식품 샘플)

그림 61의 B는 기존의 방식대로 60µL의 SiMB complex와 100µL의 *L. monocytogenes*가 접종된 식품 샘플을 반응시킨 다음, 반응 용액 100µL를 취해 LB plate에 spreading 하고 37°C 배양기에서 12hr 배양한 결과임. 대조군(그림 61A)의 colony 수와 비교하였을 때 51%의 포획률을 획득하는 것을 확인하였음. 이를 통해 본 연구진은 식품즙(체액)이 SiMB complex와 *L. monocytogenes*의 반응을 저해한다는 것을 예측할 수 있었고, 이를 해결하기 위해 다음과 같은 가설을 세워 보았음. SiMB complex를 포함하는 용액과 샘플버퍼의 부피를 5배 증가시키면 부피당 존재하는 SiMB complex의 개수는 5배 증가하고, 부피는 3배 증가하게 될 것임(그림 62). 이렇게 될 경우 SiMB complex와 *L. monocytogenes*가 반응함에 있어 두 물질간의 거리는 넓어질 수 있으나, 방해물질을 피해 이동할 수 있는 경우의 수를 많이 만들어 줄 수 있다는 장점을 갖게 될 것이며 이를 통해 SiMB complex에 의한 *L. monocytogenes*의 포획률을 높일 수 있을 것으로 예상하였음. 이를 확인하고자 SiMB complex와 *L. monocytogenes*를 접종한 식품 샘플의 양을 5배

늘려 실험을 진행하였으며, 그 결과 96%의 포획률을 획득할 수 있었음(그림 61C). 따라서 이후 진행되는 COC chip 검출 시스템을 이용한 식품 샘플내의 *L. monocytogenes*의 검출 실험에 사용되어지는 SiMB complex와 식품샘플은 5배 증가된 볼륨으로 실험을 수행하였음.



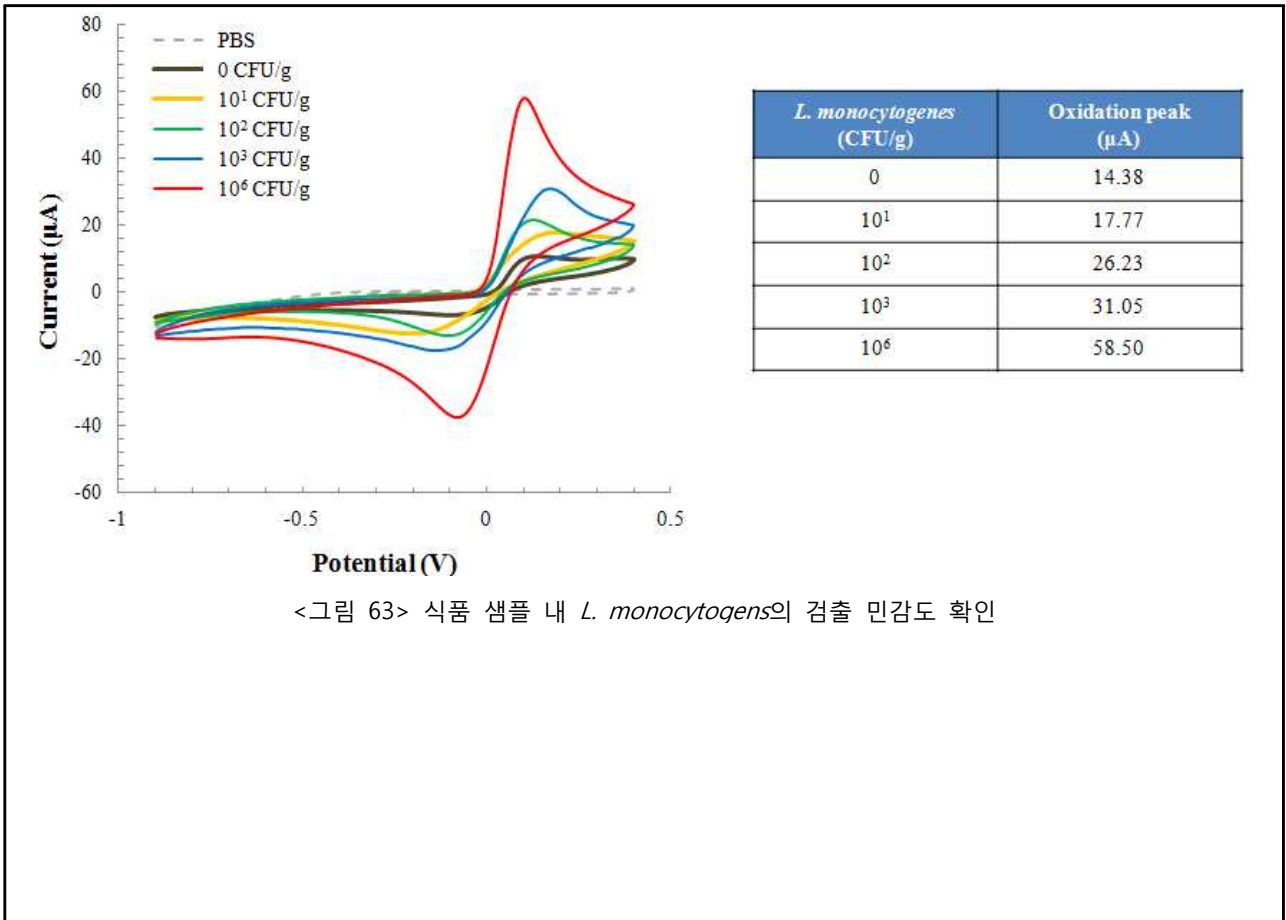
<그림 62> 개수와 부피의 증가에 따른 효율적인 자리배치

라. 식품 샘플 내 *L. monocytogenes*의 CFU/g에 따른 COC chip의 신호 변화 측정

Ready-to-eat 식품은 경제가 발달할수록 그 수요가 점차 늘어가고 있으며, 이에 따른 식중독 발병률의 증가가 나타나고 있음. 특히 전자레인지나 열처리를 통해 섭취하는 ready-to-eat 식품의 경우는 많은 수의 식중독균이 사멸되지만 샐러드와 같은 냉장식품은 구매 후 바로 섭취 가능한 식품으로서 식품 내에 존재하는 균을 제거할 수 있는 어떠한 과정도 포함되지 않게 됨. 따라서 샐러드와 같은 신선식품에 존재하는 식중독균을 손쉽게 유통과정 동안 검출할 수 있도록 하는 것은 국민 생활건강 증진에 큰 기여를 할 수 있을 것임. 본 연구는 이를 가능하게 할 수 있는 COC chip을 개발하기 위한 최종 단계로서 양상추 샐러드에 10^{1-6} CFU/g으로 *L. monocytogenes*가 존재할 수 있도록 준비한 뒤, stomacher를 이용하여 균질화 하고 이를 SiMB complex와 반응시켜 식품 샘플로부터 *L. monocytogenes*를 포획하였음. 다음으로 SiMB complex/*L. monocytogenes*를 COC chip에 주입하여 CFU/g에 따른 전기화학 신호를 획득함.

그림 63에 그 결과를 나타냄. *L. monocytogenes*의 CFU/g의 증가에 따라 전기화학 신호인 산화 피크도 증가함을 확인할 수 있었으며, 그 검출 한도가 10^1 CFU/g으로 나타남에 따라 본 연구진에 의해 만들어진 COC chip 검출 시스템이 식품 샘플 내에서의 식중독균을 높은 민감도로 검출할 수 있음을 확인함. 따라서 본 연구에 의해 개발되어진 COC chip은 식중독균 검출을 위한 센서로서 상용화 될 수 있으며, 국민생활 건강 증진에 큰 기여를 할 수 있을 것으로 판단되어짐.

본 연구에서 개발된 시스템은 *L. monocytogenes*의 뿐만 아니라 다른 다양한 병원성 미생물 검출에도 응용 가능함. 이를 위해 시스템에 다양한 target 병원성 미생물에 대한 특이 항체를 섞어 시스템에 응용하면 다양한 식중독균들을 동시에 검출 할 수 있음.



<그림 63> 식품 샘플 내 *L. monocytogenes*의 검출 민감도 확인

3-3 절 제2협동과제

[1 차년도 연구 결과]

1. RTE내 식중독균의 저해를 위한 천연미생물저해제 선정

- 현재 식품에 사용가능한 천연미생물저해제들은 동물유래의 경우 락토페린(Lactoferrin), 라이소자임(Lysozyme), 키토산(Chitosan) 등이 있고 식물유래의 경우 phenolic compound (고추), sulfur compound류(마늘, 양파), isothiocyanate(겨자) 등이 있으며, 미생물유래로는 박테리오신류(nisin, pediocin, lactocin 등)이 있다.
- 천연저해복합제의 개발을 위한 천연미생물저해제 선정은 여러 가지 조건이 요구되는데, (1) RTE내 주요 식중독균에 대한 우수한 항균력, (2) 인체내 안전성 및 건강기능성 부여, (3) 식품내 사용승인 여부, (4) 식품유통 및 저장 중 우수한 항균력 유지, (5) 식품에 적용시 맛, 향미 및 텍스처에 영향을 주지 않는 것 등과 같은 조건들이 요구된다.
- 이러한 기준을 적용하여 각 천연미생물저해제 후보군의 평가결과는 <표 1>과 같다.
- 평가결과를 통하여 선정기준에 가장 적합한 세가지 천연미생물저해제들(나이신, 키토산, 락토페린)을 선정하고 각 물질들의 최적배합조건을 찾아 항균력을 극대화시키고자 한다.

<표 1>. RTE 식품적용을 위한 천연미생물저해제 후보군의 선정평가

천연미생물저해제	원재료	선정기준 적합도 평가	선정결과
----------	-----	-------------	------

Lactoferrin	초유	<ol style="list-style-type: none"> 1. 우수한 항균력: 다양한 미생물 및 바이러스 등 광범위한 저해력 2. 건강기능성: 면역력증가 및 항산화기능 3. 식품사용승인: 식약청승인으로 조제분유등에 사용 4. 유통/저장시 항균력유지: 냉장저장시 항균력 유지됨 5. 식품적용시 관능변화: 변화없음 6. 대표적 단점: 철분이 많은 육류 등에는 저해 활성이 낮음 	선정
Lysozyme	계란	<ol style="list-style-type: none"> 1. 우수한 항균력: Peptidoglycan의 분해력에 따른 그람양성균으로 제한됨 2. 건강기능성: 염증완화 3. 식품사용승인: 식약청승인으로 천연미생물저해제 소재로 일부 사용 4. 유통/저장시 항균력유지: 자체가 효소이므로 유통저장시 항균력이 낮아짐 5. 식품적용시 관능변화: 변화없음 6. 대표적 단점: 효소제제이므로 고가이고 유통시 항균력저하가 있음 	
수용성 Chitosan	갑각류	<ol style="list-style-type: none"> 1. 우수한 항균력: 다양한 식중독균에 대한 항균력 우수 2. 건강기능성: 면역강화, 항암효과, 콜레스테롤 저하 등 3. 식품사용승인: 식약청승인으로 다양한 기능성 식품소재로 사용 4. 유통/저장시 항균력유지: 냉장저장시 항균력 탁월함 5. 식품적용시 관능변화: 변화없음 6. 대표적 단점: 단독제제로서는 상대적으로 항균력이 약한 편이므로 혼합제제 응용 	선정
Phenolic compound (Capsaicin)	고추	<ol style="list-style-type: none"> 1. 우수한 항균력: 제한된 항균력을 보이며 낮은 역가를 보임 2. 건강기능성: 혈액순환강화 3. 식품사용승인: 전통적인 식품성분임 4. 유통/저장시 항균력유지: 냉장저장시 항균력 유지됨 5. 식품적용시 관능변화: 강한 매운맛으로 인한 관능적 변화가 생김 6. 대표적 단점: 제한된 항균력 및 강한 매운맛에 의한 관능변화로 인하여 천연미생물저해제로서 식품사용이 제한적임 	
Sulfur compound (Allicin)	양파, 마늘	<ol style="list-style-type: none"> 1. 우수한 항균력: 다양한 미생물에 대한 우수한 저해력 2. 건강기능성: 혈액순환개선 및 항산화작용 3. 식품사용승인: 전통적인 식품성분임 4. 유통/저장시 항균력유지: 냉장저장시 항균력 유지됨 5. 식품적용시 관능변화: 변화없음 6. 대표적 단점: 강력한 매운 맛 및 냄새로 인하여 천연미생물저해제로서 직접 식품첨가에 제한적임 	
Isothiocyanate	겨자	<ol style="list-style-type: none"> 1. 우수한 항균력: 다양한 미생물 및 바이러스 등 광범위한 저해력 2. 건강기능성: 면역력증가 및 항산화기능 3. 식품사용승인: 식약청승인으로 조제분유등에 사용 4. 유통/저장시 항균력유지: 냉장저장시 항균력 유지됨 5. 식품적용시 관능변화: 매운 맛 및 냄새 6. 대표적 단점: 강력한 매운 맛 및 냄새로 인하여 천연미생물저해제로서 직접 식품첨가에 제한적임 	
Nisin	<i>Lactococcus</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 우수한 항균력: Peptidoglycan의 분해력에 따른 그램음성균에 대한 항균력이 없으나 그램양성균에 대한 저해능은 뛰어남 	선정

		2. 건강기능성: 아직 알려지지 않음 3. 식품사용승인: 식약청승인으로 인한 일부식품 사용 4. 유통/저장시 항균력유지: 내산성, 내열성 및 단백질분해효소 내성으로 인한 높은 안정성 및 냉장저장시 항균력유지됨 5. 식품적용시 관능변화: 변화없음 6. 대표적 단점: 그램양성균만을 저해	
Pediocin	<i>Pediococcus</i>	1. 우수한 항균력: Peptidoglycan의 분해력에 따른 그램양성균으로 제한됨 2. 건강기능성: 모름 3. 식품사용승인: 식약청에서 아직 승인되지 못함 4. 저장시 항균력유지: 냉장저장시 항균력유지됨 5. 식품적용시 관능변화: 변화없음 6. 대표적 단점: 그램양성균만을 저해하며 대량 생산이 불가하여 상업화되지 못함	
Lactocin	<i>Lactobacillus</i>	1. 우수한 항균력: Peptidoglycan의 분해력에 따른 그램양성균으로 제한됨 2. 건강기능성: 모름 3. 식품사용승인: 식약청에서 아직 승인되지 못함 4. 유통/저장시 항균력유지: 냉장저장시 항균력유지됨 5. 식품적용시 관능변화: 변화없음 6. 대표적 단점: 그램양성균만을 저해하며 대량 생산이 불가하여 상업화되지 못함	

- 선정된 세가지 천연미생물저해제인 나이신, 키토산, 락토페린의 산업적 응용을 위하여 시그마사의 제품과 실제로 대량생산되는 공장 벌크제품을 사용하여 각 식중독 지표균들에 대한 최소저해농도 연구를 통하여 비교하고자 한다. 본 연구의 결과는 최소저해농도 실험결과에 제시하도록 한다. 본 실험에서 사용된 천연미생물저해제의
- 제조사 및 제품번호는 <표 2>와 같다.

<표 2> 선정된 천연미생물저해제의 제조사 및 제품번호

천연미생물저해제	시약 제품		벌크 제품	
	제품명/제품번호	제조사	제품명	제조사
나이신	Nisin from <i>Lactococcus lactis</i> / N5764	Sigma	Sinorey NISIN	Jiangsu China (Mainland)
키토산	Chitosan oligosaccharide lactate / 523682	Sigma	키토올리고당H	(주)키토라이프
락토페린	Lactoferrin from bovine milk / L9507	Sigma	Bovine lactoferrin	Newan Health Products

2. RTE내 주요 식중독 지표균의 선정

- 최근 들어 원인별 식중독 발생건수를 보면 2003년도에는 *Vibrio*, *Salmonella*, *Staphylococcus* 순이었고 2005년도에는 *Salmonella*, *Vibrio*, *Staphylococcus* 순이었다.
- 또한 원인별 식중독 환자수를 보면 2003년도에는 *E. coli*, *Staphylococcus*, *Vibrio* 이었고 2005년도에는 *E. coli*, *Staphylococcus*, *Salmonella* 순이었다.
- 따라서 가장 빈번한 식중독 사고를 일으키는 식중독균으로서는 *E. coli*, *Salmonella*, *Vibrio* 및

Staphylococcus 등이라고 판단된다.

- 최근의 연구에 따르면 김밥, 샐러드, 샌드위치 등의 냉장즉석식품내 식중독 지표균의 분포는 조금 다른데 주로 발견되는 식중독균으로는 *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella*, *B. cereus* 등이며 아래 <표 3>와 같다 (김하규 외 3인. 즉석 섭취 식품에 대한 미생물 오염 분석. 2008. J. Food Hyg. Safety. **23(4)**:285-290)

<표 3> 즉석식품내 식중독 지표균의 분포

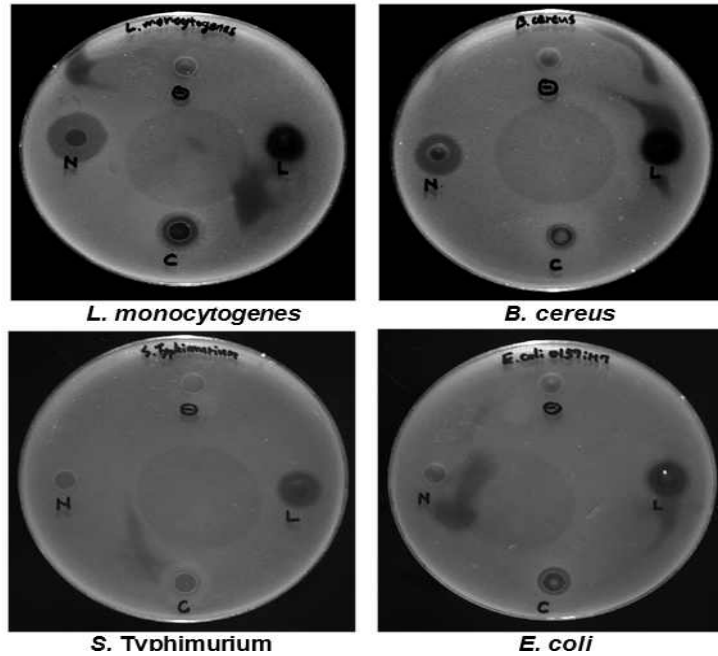
냉장즉석식품	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>
김밥	2/108(1.9%)	5/108(4.6%)	2/108(1.9%)	2/108(1.9%)
샐러드	ND	2/72(2.8%)	4/72(5.5%)	ND
샌드위치	ND	ND	ND	ND
합계	2/360(0.6%)	10/360(2.8%)	9/360(2.5%)	3/360(0.8%)

¹⁾ Not Detected

- 본 연구의 결과를 바탕으로 냉장즉석식품중 주로 발견되는 주요 식중독 지표균으로써 *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*를 선정하였다.
- 이러한 4종류의 식중독균은 각각 두 종류씩 그램음성 (*E. coli* ATCC 43890, *Samonella* Typhimurium SL1344) 및 그램양성 (*Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Bacillus cereus* ATCC 13061) 식중독균을 대표하고 있으므로 적절한 선정이라고 사료된다.

3. 천연미생물저해제에 대한 개별적인 식중독 지표균들의 저해유무 확인

- 선정된 천연미생물저해제 3종류 (나이신, 키토산, 락토페린)에 대한 각 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. Typhimurium*, *E. coli*)의 저해유무를 확인하기 위하여 천연미생물저해제 용액을 제조하고 Standard well diffusion method를 활용하여 측정하였다.
- 천연미생물저해제는 각각 3차증류수에 용해한 후 멸균을 위하여 멸균용 필터(0.22 μm diameter)를 활용하여 filtration해준 후 냉장 또는 냉동 보관한다.
- 각 천연미생물용해제 50 μl를 각각 well에 첨가하고 1시간정도 확산시킨 다음 각각 다른 식중독 지표균을 포함하는 0.5% 한천배지를 표면에 도포하여 12시간정도 37도에서 배양하였다.
- 배양후 저해유무를 확인한 결과는 <그림 1>과 같다.



<그림 1> 천연미생물저해제에 대한 냉장즉석식품내 주요 식중독 지표균의 저해유무
 (⊖, negative control, 3차 증류수; N, 나이신; C, 키토산; L, 락토페린)

- 본 실험결과를 바탕으로 *Listeria monocytogenes*와 *Bacillus cereus*는 세가지 모든 천연미생물저해제에 대해서 효과적으로 저해되었다.
- 그러나 *Salmonella Typhimurium* 및 *E. coli*의 경우에는 키토산과 락토페린에서만 저해되었고 나이신에 대해서는 내성을 보여주었다.
- 이러한 내성은 나이신의 특성에 기인하는데 나이신은 그람양성균만을 우수하게 저해하는 특징을 가지고 있기 때문이다.
- 따라서 선정된 천연미생물저해제가 효과적으로 모두 또는 대부분의 냉장즉석식품내 주요 식중독 지표균들을 효과적으로 저해하는 것으로 나타나 향후 천연복합저해제의 개발에 있어서 좋은 천연소재로서 활용될 것이다.

4. 천연미생물저해제에 대한 민감지표균 및 내성지표균의 확인

- <그림 1>의 결과를 바탕으로 볼 때, *L. monocytogenes*는 나이신 및 락토페린에 대하여 높은 민감도를 보여주었으나 키토산에 대해서는 상대적으로 약한 민감도를 보여주었다.
- *B. cereus*의 경우에는 모든 천연미생물저해제에 대해서 *L. monocytogenes*에 비하여 전반적으로 약한 민감도를 보여주었으나 *L. monocytogenes*와 마찬가지로 모든 천연미생물저해제에 대하여 효과적으로 저해되었다.
- *S. Typhimurium*의 경우에는 락토페린은 여전히 우수한 저해효과를 보여주지만 키토산의 경우는 아주 낮은 민감도를 보여주어서 키토산 자체만으로는 억제하기 어려울 것이라고 판단된다. 또한 나이신에 대해서는 전혀 저해하지 못하는 결과를 보여주었는데 이는 나이신의 저해능이 그람양성균에

한정되는 특성에 기인한다.

- *E. coli*의 경우에는 락토페린은 여전히 우수한 저해효과를 보여주고 또한 *S. Typhimurium*에 비하여 키토산에 대한 민감도가 우수하였다. 마찬가지로 나이신은 여전히 그램음성균인 *E. coli*를 저해하지 못하였는데 이것도 나이신의 특성 때문이다.
- 본 비교분석을 통하여 그램양성균에 대해서는 나이신이, 그리고 그램음성균에 대해서는 락토페린이 가장 저해능이 우수한 것으로 평가되었다.
- 서로의 약점을 보완하기 위하여 혼합 후 최적화과정을 거쳐 시너지효과를 극대화할 경우 적은 양의 천연미생물저해제만으로도 우수한 냉장즉석식품내 식중독균을 저해할 수 있을 것이라고 사료된다.

5. 천연미생물저해제의 Stock solution 농도 결정 및 다양한 농도의 용액제조

- 기존 논문에서 제시된 일반적인 식중독균에 대한 각 천연미생물저해제의 최소저해농도는 시약수준의 정제된 제품을 사용하여 결정되었으므로 본 연구에서 사용하는 벌크제품과는 다른 최소저해농도를 가질 것으로 예측되었다.
- 따라서 벌크제품의 경우 새로운 최소저해농도를 결정하여야 하고 이를 위해서는 기존논문의 최소저해농도보다 높은 stock solution의 농도를 결정한 후 이를 단계희석법을 사용하여 벌크제품들의 새로운 최소저해농도를 결정하고자 한다.
- 또한 기존 실험의 최소저해농도를 기준으로 시약수준의 시그마 제품과 벌크형태의 천연미생물저해제들의 stock solution을 각각 별도로 제조하였다.
- 각 천연미생물저해제에 대한 기존 실험의 최소저해농도를 기준으로 10-100배 범위내에서 용해되어 질 수 있는 농도를 기준으로 stock solution의 농도를 결정하였다. 결정된 stock solution의 농도는 <표 4>와 같다.

<표 4> 각 천연미생물저해제의 stock solution의 농도

천연미생물저해제	기존최소저해농도 ¹⁾	stock solution 농도 ²⁾		참고문헌
		시약제품	벌크제품	
나이신	100 µg/ml	10,000	10,000	Murdock et al. 2007. Lett Appl. Microbiol. 44:255-261
키토산	1,000 µg/ml	100,000	100,000	진성식의 1인, 2004. 한국키토산학회지. 9(2):68-72
락토페린	1,000 µg/ml	250,000	250,000	Hoek et al. 1997. Antimicrob. Agents Chemother. 41(1):54-59

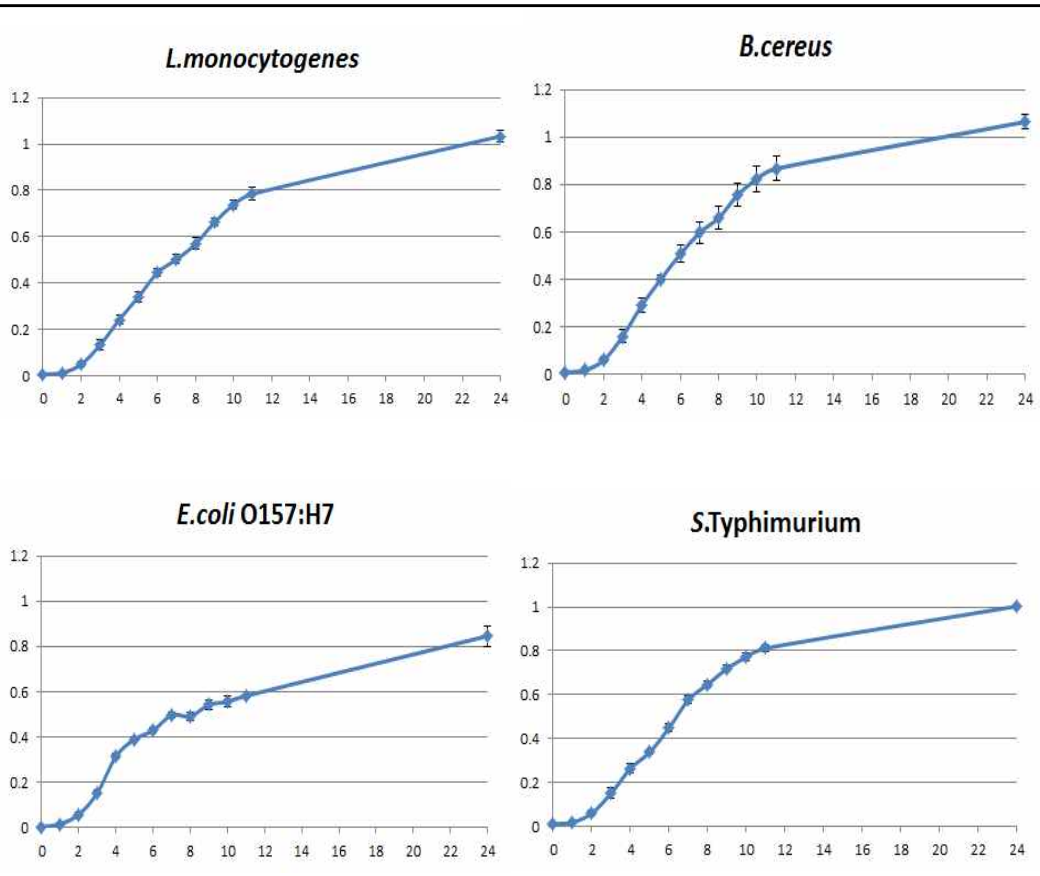
¹⁾나이신 및 키토산은 *L. monocytogenes*, 락토페린은 *E. coli*에 대한 최소저해농도임.

²⁾µg/ml

- 결정된 각 천연미생물저해제의 stock solution 농도를 기준으로 단계희석법을 통해서 단계적으로 20%씩 희석하여 각각의 선정된 식중독 지표균들의 최소저해농도를 실험하였다.

6. Standard diffusion method를 위한 선정된 식중독 지표균들의 초기접종량 결정

- 새로운 액상배지에 각 식중독 지표균을 접종하고 1시간마다 600 nm에서 흡광도 (OD_{600nm})를 측정하여 24시간까지의 흡광도를 얻고 정확도를 높이기 위하여 같은 방법으로 3반복 실험을 수행하여 성장곡선을 완성하였다. 각 식중독균별로 얻어진 성장곡선은 <그림 2>와 같다.



<그림 2> 식중독 지표균들의 성장곡선

- 성장곡선을 바탕으로 하였을 때 OD_{600nm}에서 1.0에 이르는 시간은 대략 배양 후 24시간이었다. 따라서 24시간 배양한 후 단계희석법 (10배씩 희석)을 사용한 생균수를 측정하였다.
- 24시간 배양 후 배양액을 살균한 펩톤수를 가지고 10배씩 희석하였다.
- 희석한 다음, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ 희석된 배지를 각각 새로운 한천배지에 100 μl씩 깔고 24시간 배양하였다.
- 본 실험을 3반복 실험을 진행하여 정확도를 높였다.
- 얻어진 콜로니 숫자를 바탕으로 평균을 내어 얻어진 총 생균수는 <표 5>와 같다.

<표 5> OD_{600nm} = 1.0에서 식중독 지표균들의 생균수

식중독 균주	배양시간	총생균수 (평균값)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114	24시간	6.10 X 10 ⁸ CFU/ml
<i>B. cereus</i> ATCC 13061	24시간	2.88 X 10 ⁹ CFU/ml
<i>S. Typhimurium</i> SL1344	24시간	1.40 X 10 ⁹ CFU/ml
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43890	24시간	4.22 X 10 ⁹ CFU/ml

- 얻어진 총생균수의 평균을 바탕으로 Standard diffusion method 수행시 0.5% 한천배지에 첨가되는 식중독균수로서 10⁸ CFU를 초기접종량으로 결정함

7. 한천배지 및 액상배지에서의 천연미생물저해제 최소저해농도 결정

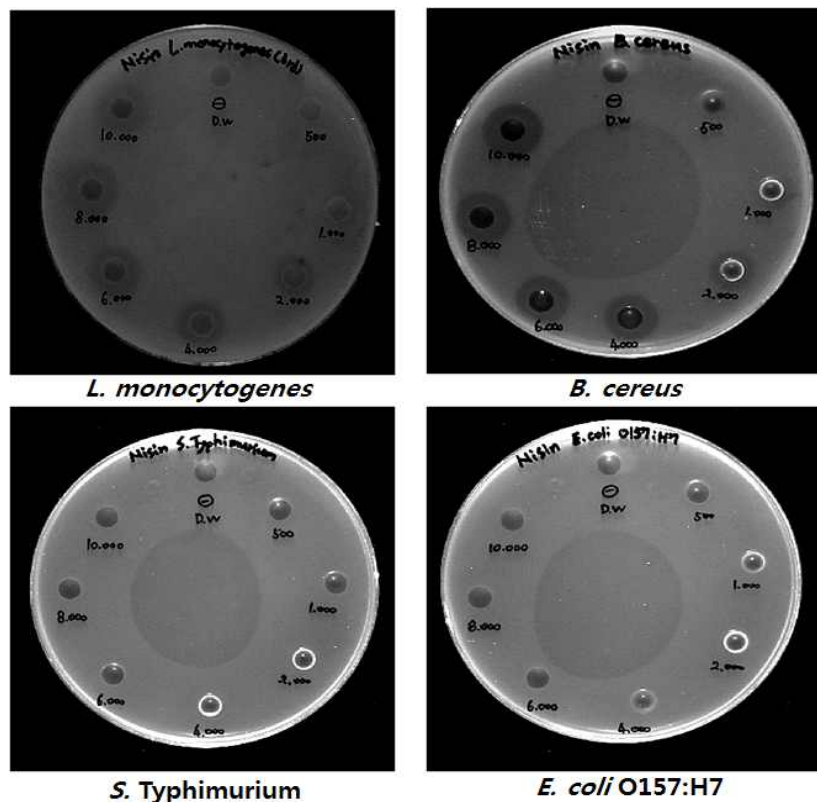
7.1. Standard diffusion method를 활용한 한천배지에서의 천연미생물저해제 최소저해농도 결정

7.1.1. 실험방법 요약

- 한천배지의 경우 Standard diffusion method를 활용하여 다양한 농도의 천연미생물저해제를 한천배지내 만들어진 well에 주입 후 확산시켜서 각 식중독 지표균들을 도포하여 저해능을 평가하는 방법을 사용하였다.
- Stock solution으로부터 단계희석법을 사용하여 20%씩 희석된 다양한 농도의 용액들을 이용하여 저해능을 실험하였다.
- 이러한 방법을 위하여 도포하는 식중독균의 초기접종량을 앞에서 결정한대로 10^8 CFU을 05% 한천배지에 넣어서 도포하였다.
- 12시간 배양후 clear zone의 존재유무를 확인함으로써 저해능을 평가하였다.

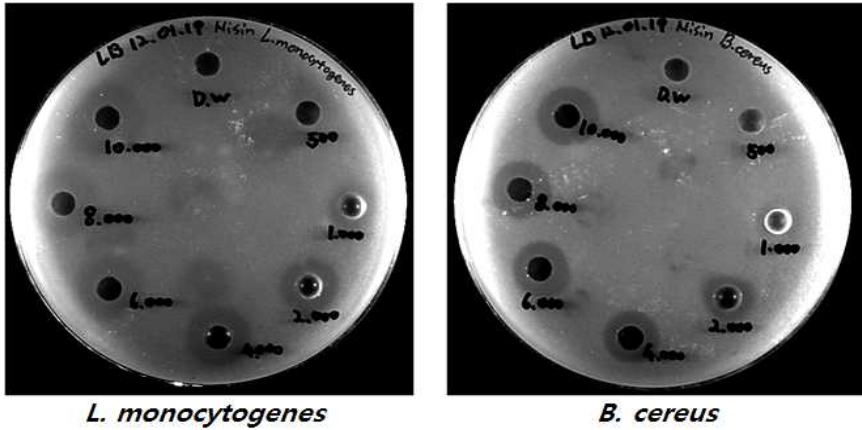
7.1.2. 한천배지에서 나이신의 최소저해농도 결정

- 4가지 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. Typhimurium*, *E. coli*)을 대상으로 벌크제품의 nisin에 대한 최소저해농도를 평가해본 결과, 그람양성균인 리스테리아 및 바실러스에 대해서는 최소저해농도가 1,000 µg/ml이었고 그람음성균인 살모넬라 및 대장균의 경우에는 저해가 일어나지 않았다.
- 이러한 그람음성균에 대한 나이신 저해가 없는 특징은 나이신 자체의 특성 때문인 것으로 생각된다.
- 각 천연미생물저해제 벌크제품의 최소저해농도 결과는 <그림 3>과 같다.



<그림 3> 식중독 지표균에 대한 나이신 벌크제품의 최소저해농도 실험결과

- 또한 나이신 시약제품(Nisin from *Lactococcus lactis*, 시그마알드리치, N5764)의 최소저해농도도 같은 방법으로 평가해본 결과, 그램양성균인 리스테리아 및 바실러스에 대한 최소저해농도는 같은 1000 µg/ml이었고 마찬가지로 그램음성균인 살모넬라 및 대장균에 대해서는 저해를 하지 않았다.
- 따라서 벌크제품이라 하여도 시약제품과의 저해능에 있어서는 별 차이를 보여주지 못하였다.
- 각 천연미생물저해제 시약제품의 최소저해농도 결과는 <그림 4>와 같다. 살모넬라 및 대장균은 저해가 전혀 일어나지 않아서 사진을 보여주지 않았다.

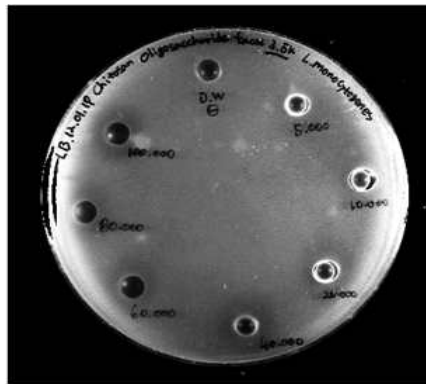


<그림 4> 식중독 지표균에 대한 나이신 시약제품의 최소저해농도 실험결과

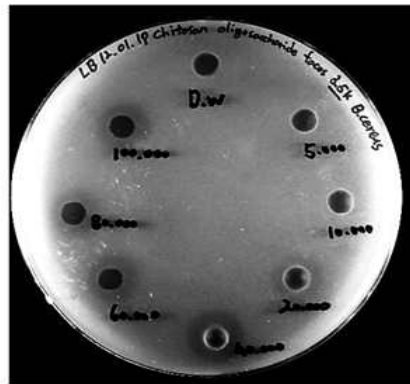
- 이러한 실험의 결과는 시약제품 및 벌크제품에 있어서 식중독 지표균들의 저해능이 크게 다르지 않다는 것을 보여주었다. 따라서 향후 스프레이용 천연복합저해제 제조시 이러한 벌크제품들이 적극 활용되어질 것이다.
- 그러나 알려진 각각의 식중독 지표균에 대한 나이신의 최소저해농도가 높은 편이었다. 이러한 부분은 값싼 나이신의 농도를 약간 높여줌으로써 해결되리라 생각한다.

7.1.3. 한천배지에서 키토산의 최소저해농도 결정

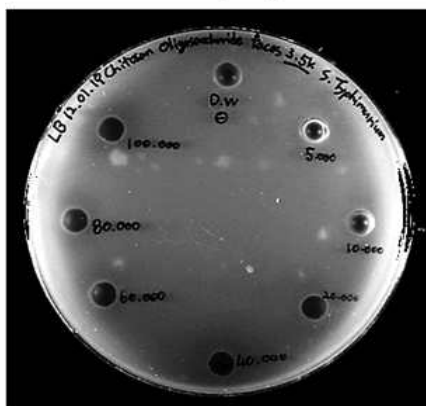
- 4가지 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. Typhimurium*, *E. coli*)을 대상으로 키토산 벌크제품의 최소저해농도를 평가해본 결과, 모든 식중독균의 최소저해농도가 20,000 µg/ml이었다.
- 각 천연미생물저해제 벌크제품의 최소저해농도 결과는 <그림 5>와 같다.
- 키토산 벌크제품은 (주)키토라이프에서 생산되는 키토올리고당H를 샘플로 사용하였다. 이러한 키토올리고당H는 실제로 (주)시그마알드리치에서 판매하고 있는 Chitosan oligosaccharide lactate (제품번호 523682)와 동일한 물질이어서 시약제품에 대한 최소저해농도 평가는 별도로 진행하지 않았다.
- 예상된 것과는 다르게 키토산의 저해능은 사용된 식중독 지표균에 대하여 뚜렷한 저해능을 보이기 보다는 전체적으로 퍼져있는 저해능을 보여주어 식중독 지표균에 대한 나이신 저해능과 차별화 되었다.
- 그러나 알려진 각각의 식중독 지표균에 대한 키토산의 최소저해농도도 나이신과 같이 높은 편이었다. 이러한 부분은 값싼 키토산의 농도를 약간 높여주거나 또는 다른 천연미생물저해제와의 혼합에 따른 시너지효과를 통하여 해결되리라 생각한다.



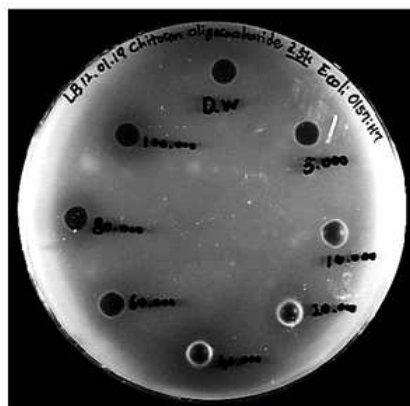
L. monocytogenes



B. cereus



S. Typhimurium

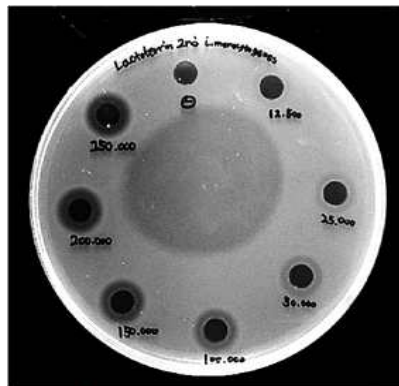


E. coli O157:H7

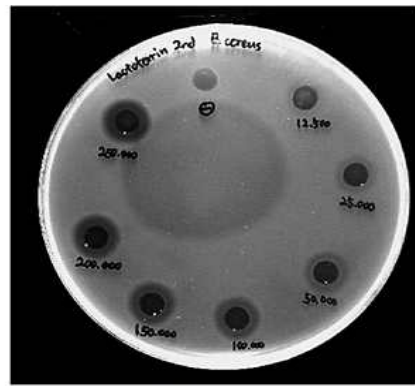
<그림 5> 식중독 지표균에 대한 키토산 벌크제품의 최소저해농도 실험결과

7.1.4. 한천배지에서 락토페린의 최소저해농도 결정

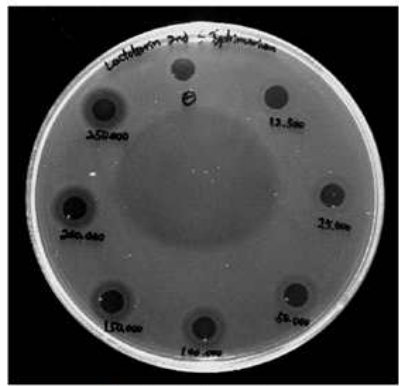
- 4가지 식중독 지표균을 대상으로 락토페린 벌크제품의 최소저해농도를 평가해본 결과, 모든 식중독균의 최소저해농도가 12,500 µg/ml이었다. 각 천연미생물저해제 벌크제품의 최소저해농도 결과는 <그림 6>과 같다.



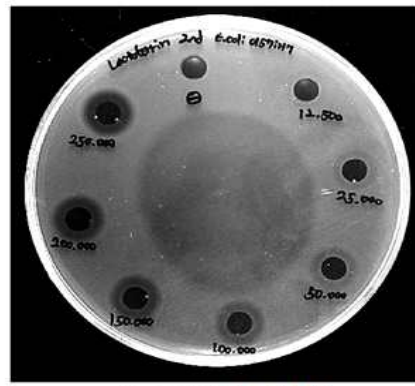
L. monocytogenes



B. cereus



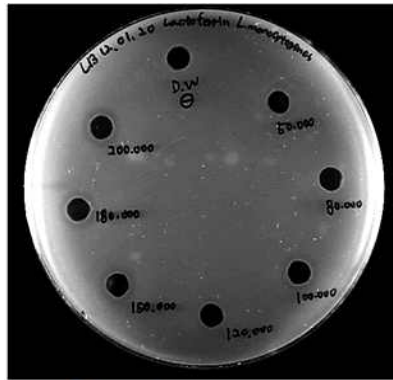
S. Typhimurium



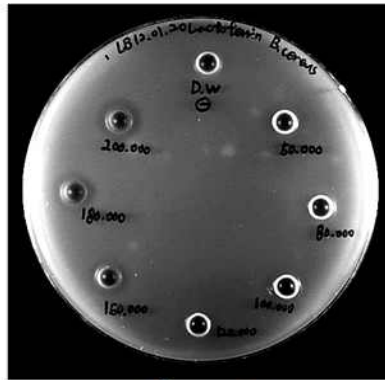
E. coli O157:H7

<그림 6> 식중독 지표균에 대한 락토페린 벌크제품의 최소저해농도 실험결과

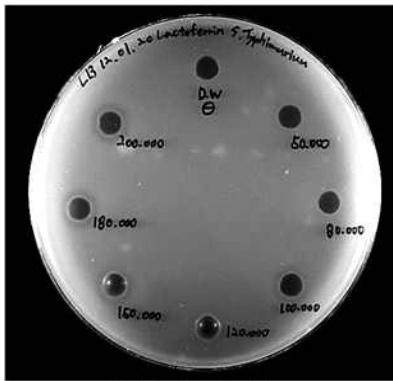
- 또한 락토페린 시약제품(Lactoferrin from bovine milk, 시그마알드리치, L9507)의 최소저해농도도 같은 방법으로 평가해본 결과 모든 식중독 지표균들에 대한 최소저해농도는 100,000 µg/ml이었다.
- 각 천연미생물저해제 시약제품의 최소저해농도 결과는 <그림 7>과 같다.
- 그러나 이러한 농도는 기존 논문에서 발표된 최소저해농도보다도 높을 뿐만 아니라 락토페린 벌크제품에 비해서도 높은 농도이었다.
- 따라서 향후 스프레이식 천연복합저해제 제조시 이러한 저해능이 뛰어난 벌크제품을 사용하여 진행할 것이다.



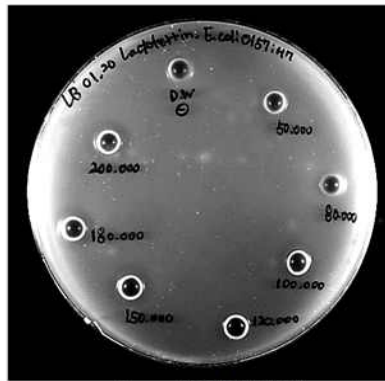
L. monocytogenes



B. cereus



S. Typhimurium



E. coli O157:H7

<그림 7> 식중독 지표균에 대한 락토페린 시약제품의 최소저해농도 실험결과

7.1.5. 한천배지조건에서 천연미생물저해제의 최소저해농도 결과

- 다음의 <표 6>과 같이 이러한 세가지 천연미생물저해제의 최소저해농도 실험을 통하여 얻어진 결과를 바탕으로 각 식중독 지표균에 대한 최소저해농도를 결정하였다.

<표 6> 한천배지조건에서 각 천연미생물저해제의 최소저해농도 실험결과 (단위, µg/ml)

천연미생물저해제	벌크제품	시약제품	최종 최소저해농도
나이신	1,000	1,000	1,000
키토산	20,000	20,000	20,000
락토페린	12,500	100,000	12,500

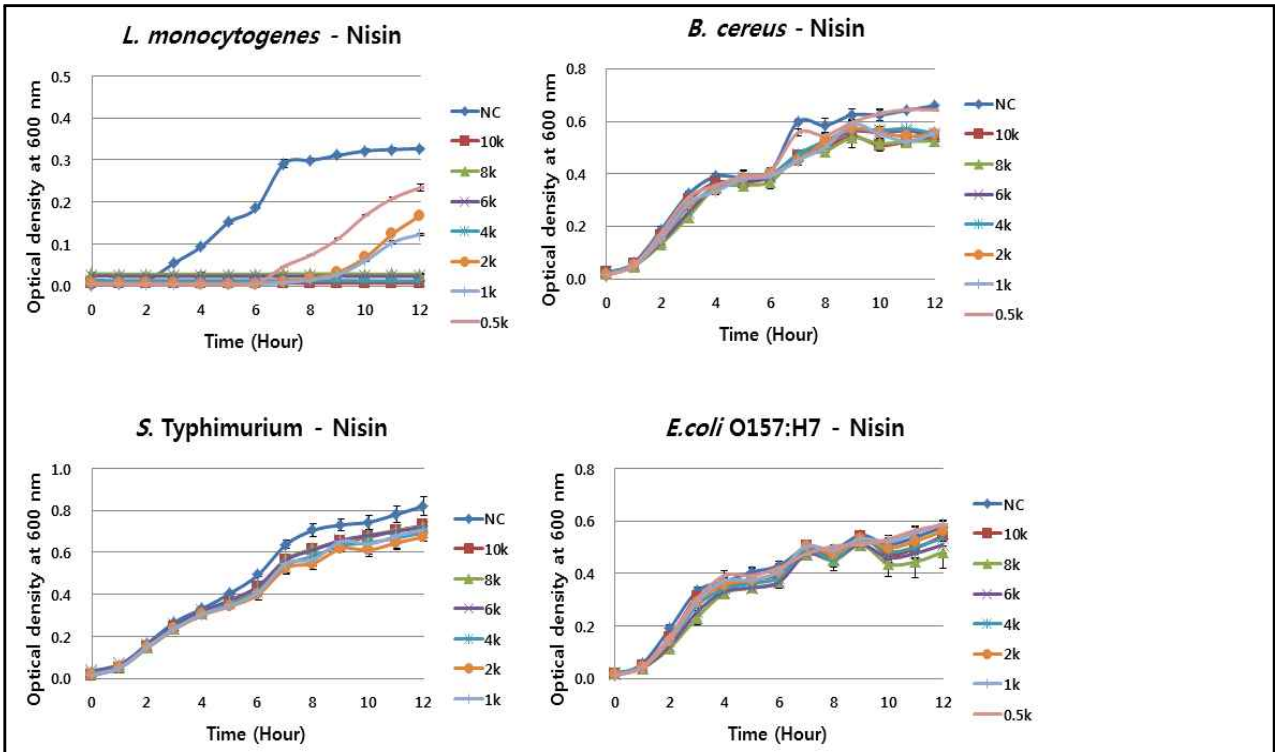
- 결정된 천연미생물저해제의 최소저해농도를 바탕으로 모든 식중독균을 저해할 수 있는 최소첨가농도를 결정할 것이다.

7.2. Standard diffusion method를 활용한 액상배지에서의 천연미생물저해제 최소저해농도 결정

- 액상배지의 경우 단계희석법을 활용하여 다양한 농도의 천연미생물저해제를 96-well에 있는 각각의 well에 액상배지와 잘 혼합한 후 각 식중독 지표균들을 접종하여 저해능을 평가하는 방법을 사용하였다.
- Stock solution으로부터 단계희석법을 사용하여 20%씩 희석된 다양한 농도의 용액들을 이용하여 저해능을 실험하였다.
- 이러한 방법을 위하여 접종하는 식중독균의 초기접종량을 앞에서 결정한대로 10^8 CFU로 조정된 후 액상배지에 접종하였다.
- 접종 직후부터 12시간까지 1시간간격으로 600 nm에서 흡광도를 측정함으로써 저해능을 평가하였다.

7.2.1. 액상배지에서 나이신의 최소저해농도 결정

- 나이신의 stock solution을 단계희석법을 사용하여 10,000 $\mu\text{g/ml}$ 부터 500 $\mu\text{g/ml}$ 까지 다양하게 희석하고 이를 네가지 식중독 지표균이 접종된 배지에 첨가하여 12시간까지 배양하였다.
- 1시간마다 600 nm에서 흡광도를 측정하여 식중독 지표균별로 성장곡선을 그렸다.
- 나이신은 첨가되었으나 식중독 지표균이 접종되지 아니한 배지를 blank로 잡고 흡광도를 측정한 다음 샘플들의 흡광도를 보정하였다.
- Negative control로써는 나이신이 첨가되지 않은 각 식중독균이 접종된 배지의 배양후 흡광도를 측정하여 사용하였다.
- 모든 실험은 3반복 실험을 통하여 정확도를 높였다. 그 결과는 <그림 8>과 같다.

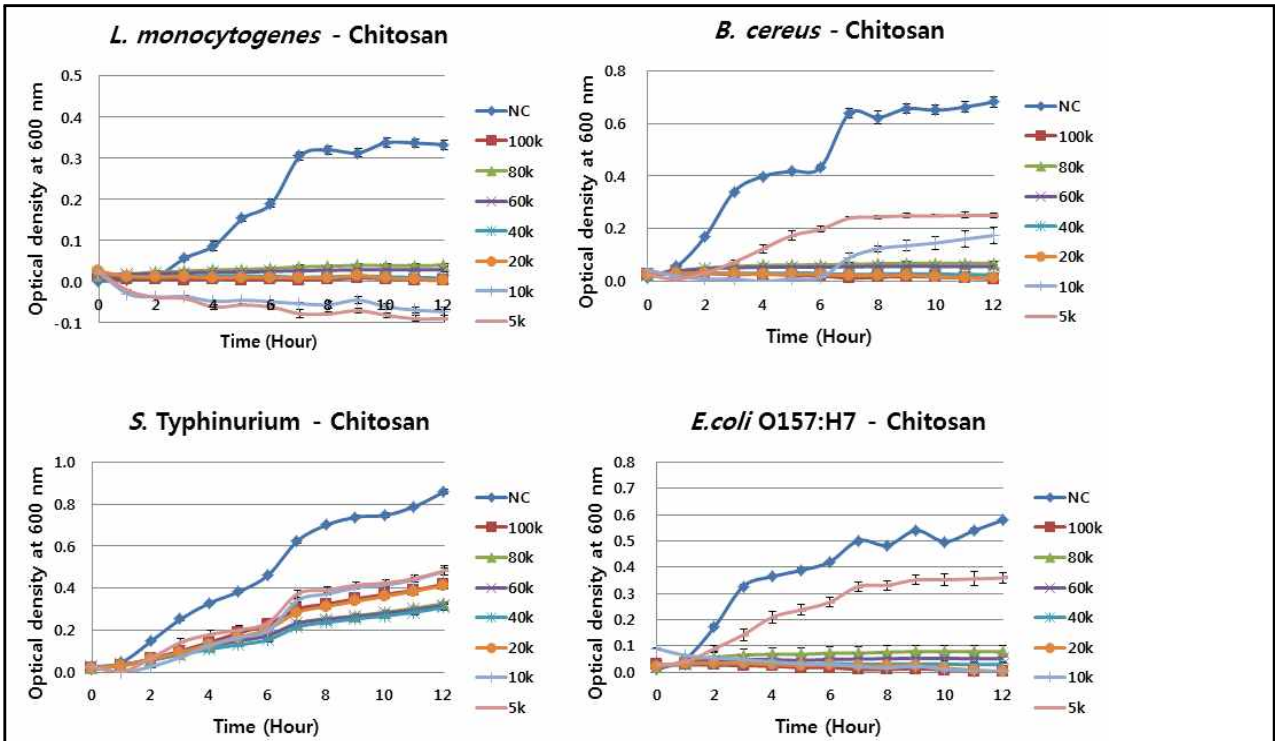


<그림 8> 나이신의 식중독 지표균들에 대한 액상배지에서의 저해능 측정 (NC, negative control; 나이신의 농도단위는 $\mu\text{g/ml}$)

- 나이신은 그람양성균에 대한 저해능이 알려져 있으므로 액상배지조건에서 리스테리아 및 바실러스에 대한 저해가 예상되었다.
- 그러나 실험결과, 리스테리아의 저해능은 탁월하였으나 액상배지조건에서 바실러스는 거의 저해되지 않았다.
- 12시간까지의 흡광도를 기준으로 할 때 저해된 리스테리아의 액상배지조건에서의 최소저해농도는 $4,000 \mu\text{g/ml}$ 로 결정된다. 이러한 액상배지조건에서의 최소저해농도는 한천배지에서의 최소저해농도 ($1,000 \mu\text{g/ml}$)에 비해서 4배 높은 것으로 보여져서, 액상배지조건에서의 나이신에 대하여 식중독 지표균들이 덜 민감하다는 결론을 얻었다.
- 그램음성균인 살모넬라 및 대장균의 경우에는 앞서 예상된대로 액상배지조건에서 전혀 저해가 일어나지 않았다. 이는 한천배지 결과와 상통한다.

7.2.2. 액상배지에서 키토산의 최소저해농도 결정

- 키토산의 stock solution을 단계희석법을 사용하여 $100,000 \mu\text{g/ml}$ 부터 $5,000 \mu\text{g/ml}$ 까지 다양하게 희석하고 이를 네가지 식중독 지표균이 접종된 배지에 첨가하여 12시간까지 배양하였다.
- 1시간마다 600 nm에서 흡광도를 측정하여 식중독 지표균별로 성장곡선을 그렸다.
- 키토산은 첨가되었으나 식중독 지표균이 접종되지 아니한 배지를 blank로 잡고 흡광도를 측정한 다음 샘플들의 흡광도를 보정하였다.
- Negative control로써는 키토산이 첨가되지 않은 각 식중독균이 접종된 배지의 배양후 흡광도를 측정하여 사용하였다.
- 모든 실험은 3반복 실험을 통하여 정확도를 높였다. 그 결과는 <그림 9>와 같다.



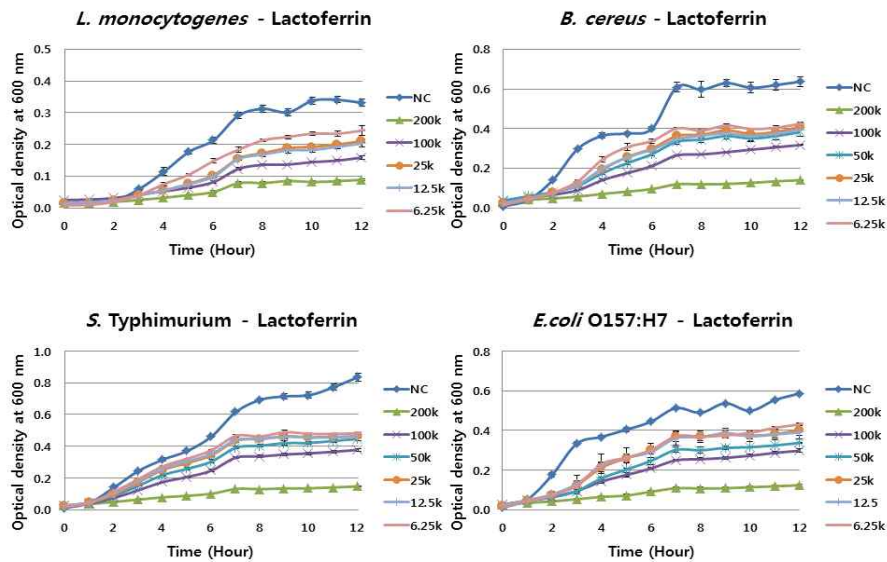
<그림 9> 키토산의 식중독 지표균들에 대한 액상배지에서의 저해능 측정
(NC, negative control; 키토산의 농도단위는 $\mu\text{g/ml}$)

- 키토산은 식중독균의 생육을 저해하는 것으로 알려져 있으며, 특히 바실러스, 대장균, 리스테리아를 잘 저해하는 것으로 알려져 있다. 따라서 액상배지조건에서 이러한 세 식중독 지표균들에 대하여 저해가 예상되었다.
- 실험결과, 액상배지조건에서 키토산은 리스테리아, 바실러스 및 대장균에 대하여 저해가 탁월하였으나 의외로 살모넬라에 대해서는 약한 저해를 보였다.
- 12시간까지의 흡광도를 기준으로 할 때 저해된 리스테리아, 바실러스 및 대장균의 액상배지조건에서의 최소저해농도는 각각 5,000, 20,000 및 10,000 $\mu\text{g/ml}$ 로 결정되어져서 리스테리아가 키토산에 대하여 액상배지조건에서 민감한 것으로 나타났다.
- 이러한 액상배지조건에서의 최소저해농도는 바실러스를 제외한 리스테리아 및 대장균에 있어서 한천배지에서의 최소저해농도(20,000 $\mu\text{g/ml}$)에 비해서 25% 및 50% 수준밖에 안되는 것으로 결론을 얻었다.
- 따라서 리스테리아 및 대장균은 액상배지조건에서 키토산에 의하여 더 잘 저해되는 것으로 결론지었다.

7.2.3. 액상배지에서 락토페린의 최소저해농도 결정

- 락토페린의 stock solution을 단계희석법을 사용하여 200,000 $\mu\text{g/ml}$ 부터 6,250 $\mu\text{g/ml}$ 까지 다양하게 희석하고 이를 네가지 식중독 지표균이 접종된 배지에 첨가하여 12시간까지 배양하였다.
- 1시간마다 600 nm에서 흡광도를 측정하여 식중독 지표균별로 성장곡선을 그렸다.
- 락토페린은 첨가되었으나 식중독 지표균이 접종되지 아니한 배지를 blank로 잡고 흡광도를 측정한 다음 샘플들의 흡광도를 보정하였다.
- Negative control로써는 락토페린이 첨가되지 않은 각 식중독균이 접종된 배지의 배양후 흡광도를 측정하여 사용하였다.

- 모든 실험은 3반복 실험을 통하여 정확도를 높였다. 그 결과는 <그림 10>과 같다.



<그림 10> 락토페린의 식중독 지표균들에 대한 액상배지에서의 저해능 측정 (NC, negative control; 락토페린의 농도단위는 $\mu\text{g/ml}$ 임)

- 락토페린은 식중독균인 대장균, 살모넬라 등의 초기 생육을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있어서 그램음성균에 대한 초기저해가 예상되었다.
- 그러나 실험결과, 모든 4가지 식중독 지표균들 (리스테리아, 바실러스, 살모넬라 및 대장균)에 대한 저해가 약하게 이루어져 있으나 12시간까지 완벽하게 생육을 저해하지는 못하였다.
- 따라서 12시간까지의 흡광도를 기준으로 할 때 저해된 리스테리아의 액상배지조건에서의 최소저해 농도는 결정되지 못하였다. 그러므로 한천배지에서의 최소저해농도 (12,500 $\mu\text{g/ml}$)을 보았을 때 액상배지조건에서의 락토페린에 대하여 식중독 지표균들이 훨씬 덜 민감하다는 결론을 얻었다.

7.2.4. 액상배지에서 천연미생물저해제들의 저해능 측정 결과

- 앞의 액상배지에서 천연미생물저해제들의 식중독 지표균들에 대한 저해능 결과를 바탕으로 각각의 천연미생물저해제가 얼마나 효과적으로 어떤 종류의 식중독 지표균들을 저해할 수 있는지 연구를 하였다.
- 나이신의 경우, 리스테리아만을 완벽하게 저해하였으나 다른 식중독균들은 저해되지 못하였다.
- 키토산의 경우, 리스테리아, 바실러스, 대장균에 대해서는 완벽하게 저해하였으나 살모넬라에 대해서는 약하게 저해되었다.
- 락토페린의 경우 모든 4종류의 식중독 저해균들이 약하게 저해되었다.
- 이러한 결과를 바탕으로 하였을 때, 이 3가지 천연미생물저해제를 복합하였을 경우에는 리스테리아, 바실러스 및 살모넬라를 확실하게 저해할 것이라고 예상된다.
- 또한 살모넬라는 한천배지에서 락토페린에 의해 효과적으로 저해되었으므로 실제적으로 이 3가지 천연미생물저해제를 최적화한 후 복합하였을 경우에는 살모넬라도 저해될 것으로 예상된다.

8. 액상배지 및 한천배지에서의 천연미생물저해제 최소첨가농도 결정

8.1. 한천배지조건에서 각각의 식중독 지표균들에 대한 천연미생물저해제의 최소저해농도 정리 및 최소첨가농도 결정

- 한천배지조건에서 각 식중독 지표균들에 대한 천연미생물저해제의 최소저해농도는 <표 7>과 같다.

<표 7> 한천배지조건에서 각 식중독 지표균들에 대한 천연미생물저해제의 최소저해농도 및 최소첨가농도 (단위는 µg/ml)

식중독균	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	최소첨가농도
나이신	1,000	1,000	ND	ND	>1,000
키토산	20,000	20,000	20,000	20,000	20,000
락토페린	12,500	12,500	12,500	12,500	12,500

*ND, not determined

- 한천배지조건에서 모든 4가지 식중독 지표균들을 동시에 저해하기위한 각 천연미생물저해제(나이신, 키토산, 락토페린)의 최소첨가농도는 각각 1,000이상, 20,000 및 12,500 µg/ml로 결정되었다.

8.2. 액상배지조건에서 각 식중독 지표균들에 대한 천연미생물저해제의 최소저해농도 정리 및 최소첨가농도 결정

- 액상배지조건에서 각 식중독 지표균들에 대한 천연미생물저해제의 최소저해농도는 <표 8>과 같다.

<표 8> 액상배지조건에서 각 식중독 지표균들에 대한 천연미생물저해제의 최소저해농도 및 최소첨가농도 (단위는 µg/ml)

식중독균	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	최소첨가농도
나이신	4,000	ND	ND	ND	>4,000
키토산	5,000	20,000	ND	10,000	>20,000
락토페린	ND	ND	ND	ND	ND

*ND, not determined

- 액상배지조건에서 모든 4가지 식중독 지표균들을 동시에 저해하기위한 각 천연미생물저해제(나이신 및 키토산)의 최소첨가농도는 각각 4,000 및 20,000 µg/ml 이상으로 예상되었다.

- 그러나 락토페린의 경우 모든 4가지 식중독 지표균들에 대하여 약한 저해만을 보여주므로 단일 물질로서 최소첨가농도를 구하기에는 불가능하였다.

- 따라서 단일 물질로서 저해가 어려울 경우 두가지 이상의 천연미생물저해제를 혼합하여 저해되지 않는 식중독균을 저해하도록 최적화가 필요할 것이다.

- 또한 만약 두 물질 이상을 섞었을 때 최소첨가농도보다 더 적은 양으로 저해할 수 있다면 시너지효과가 있다고 생각해 볼 수 있다.

- 최소첨가농도 자료를 바탕으로 향후 각각의 천연미생물저해제들을 혼합 및 최적화하여 이번에 결정된 최소저해농도보다 낮은 농도로도 모든 4가지 식중독 지표균들을 동시에 저해할 수 있는 복합저해제를 개발하고자 한다.

[2 차년도 연구 결과]

-1차 년도 실험 결과를 바탕으로 식중독 지표균에 대한 저해가 가능한 각 천연미생물저해제의 최소첨가농도를 복합천연미생물저해시험의 최고 농도로 결정하였으며 항균제의 **최소첨가농도를 100%**로 지정하여 농도를 단계 희석하여 시너지 효과를 2차년도 과제를 통하여 확인하고자 함.

-결과는 <표 1>과 같다. (단위 mg/ml)

<표 1> 한천배지 및 액상배지 조건에서 각 식중독 균에 대한 천연미생물저해제의 최소첨가농도

천연미생물저해제	한천배지 조건에서 최소첨가농도	액상배지 조건에서 최소첨가농도
나이신	>1	>4
키토산 올리고당	>20	>20
락토페린	>12.5	>200

1. 각 천연미생물저해제 중 두가지 저해제의 다양한 조합을 구성한 후 시너지효과 검증 및 저해능과 최소저해농도(MIC)의 미생물학적 평가

1.1. 각 천연미생물저해제의 최소저해농도를 기준으로 두가지 저해제의 다양한 조합 구성

1.1.1. 각 저해제의 최소저해농도 기준으로 두가지 저해제의 가능한 모든 조합 구성

- <표 1>에 기재된 천연미생물저해제 3종류 (나이신, 키토산 올리고당, 락토페린)의 최소첨가농도를 100% 기준으로 각 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)의 최소저해능을 확인하기 위하여 다양한 농도의 조합을 구성함.
- 100% 최소저해농도를 갖는 각각의 천연미생물저해제를 단계별 희석 후 혼합과정을 통하여 시너지 효과 및 최소저해능이 관찰되는 최소저해농도를 결정하고자 함.
- 각 천연미생물저해제의 최소저해농도(MIC)를 100%로 정했을 때 나이신, 키토산, 락토페린을 <표 2>와 같이 희석하여 희석농도구배를 만들.

<표 2> 각 천연미생물저해제의 희석농도구배 (단위 %)

나이신	80	60	50	40	35	30	25	20	15	10	5	11가지
키토산	80	60	50	40	35	30	25	20	15	10	5	11가지
락토페린	80	60	50	40	35	30	25	20	15	10	5	11가지

(100%의 기준은 각 천연저해제의 최소저해농도(MIC)를 기준으로 함)

- 이를 바탕으로 천연미생물저해제 2가지씩 섞는 다양한 조합을 만들.
- 저해제 2가지씩 섞었을 경우, 나이신+키토산, 나이신+락토페린, 키토산+락토페린의 3가지 기본조합이 가능하며 각 희석농도구배가 11가지씩이므로 두 가지 섞는 경우 조합의 수는 121가지임.
- 따라서 총 3개의 기본조합을 합산했을 때, 총 가능한 조합의 개수는 363가지임.
- 이러한 363가지의 조합에 해당하는 혼합용액을 모두 제조하고 식중독균 3종 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)에 대하여 저해능 평가를 한천배지를 이용한 Standard well diffusion method 및 액상배지를 이용한 흡광도 측정법을 활용하여 미생물학적인 평가를 수행함.

1.2. 최소저해농도(MIC)의 미생물학적 평가에 따른 두가지 복합천연미생물저해제의 시너지효과 검증

1.2.1. Standard well diffusion method를 활용한 한천배지에서의 두가지 복합천연미생물저해제의 저해능 확인

- 한천배지의 경우 Standard well diffusion method를 활용하여 2배 농축된 다양한 농도의 2가지 복합천연미생물저해제를 한천배지 내 well에 주입 후 확산시켜서 각 식중독 지표균들을 도포하여 저해능을 평가하는 방법을 사용함.
- 각 천연미생물 저해제의 최소첨가농도로부터 단계희석법을 사용하여 희석 후 혼합된 다양한 농도의 용액들을 이용하여 저해능을 실험하였다.
- 12시간 배양 후 clear zone의 존재유무를 확인함으로써 저해능을 평가하였다.
- 두가지 복합천연미생물저해제의 평가를 위해서는 아래 두가지의 개념을 정립하였음.

1. 시너지효과의 유무에 대하여, 최소저해농도보다 낮은 농도를 가진 두가지 저해제의 혼합용액이 생성하는 clear zone의 직경이, 최소저해농도일 때 두가지 저해제 각각이 생성하는 clear zone의 직경과 같거나 큰 경우를 기준으로 함.

2. 이러한 시너지효과를 가진 혼합용액 중, 가장 낮은 농도의 저해제 조합을 선발하여 이를 두가지 저해제의 조합 중 최적화된 조합으로 하고 '천연복합저해제의 최소저해농도'로 정의함.

<한천배지에서 나이신과 키토산 올리고당 혼합의 시너지최소농도 및 최소저해농도 결정>

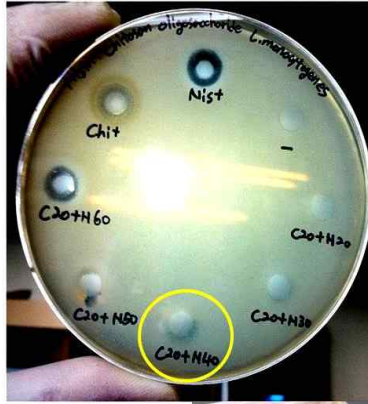
- 3가지 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)을 대상으로 Nisin과 Chitosan oligosaccharide 혼합에 대한 최소저해농도를 평가해본 결과, 각 천연미생물저해제의 최소저해농도 100%를 기준으로 그람양성균인 리스테리아는 나이신 40% (0.4 mg/ml), 키토산 올리고당 20% (4 mg/ml), 바실러스에서는 나이신 20% (0.2 mg/ml), 키토산 올리고당 40% (8 mg/ml)의 결과를 보였으며, 그람음성균인 *E. coli* O157:H7의 경우 나이신 20% (0.2 mg/ml), 키토산 올리고당 50% (10 mg/ml)의 최소저해농도에 대한 결과를 보임.
- 나이신과 키토산 올리고당 혼합물의 최소저해농도 평가실험의 결과는 <표 3>과 같음

<표 3> 나이신 및 키토산 올리고당 혼합용액의 최소저해농도 (MIC) 평가실험 결과

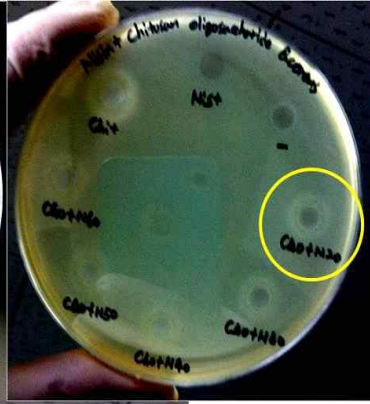
식중독균	나이신 + 키토산 올리고당
	최소저해농도(MIC)
<i>L. monocytogenes</i>	나이신 40% (0.4 mg/ml) 키토산 올리고당 20% (4 mg/ml)
<i>B. cereus</i>	나이신 20% (0.2 mg/ml) 키토산 올리고당 40% (8 mg/ml)
<i>E. coli</i> O157:H7	나이신 20% (0.2 mg/ml) 키토산 올리고당 50% (10 mg/ml)

- 한천배지 조건으로 나이신과 키토산 올리고당에 의한 저해능 결과는 <그림 1>과 같다.

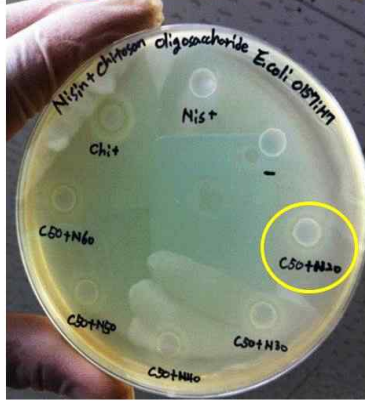
L. monocytogenes
MIC effect
(N 40 + C 20)



B. cereus
MIC effect
(N 20 + C 40)



E. coli O157:H7
MIC effect
(N 20 + C 50)



<그림 1> 한천배지 조건에서 식중독 지표균에 대한 나이신과 키토산 올리고당 복합천연미생물저해제의 최소저해농도 (MIC) 평가 결과

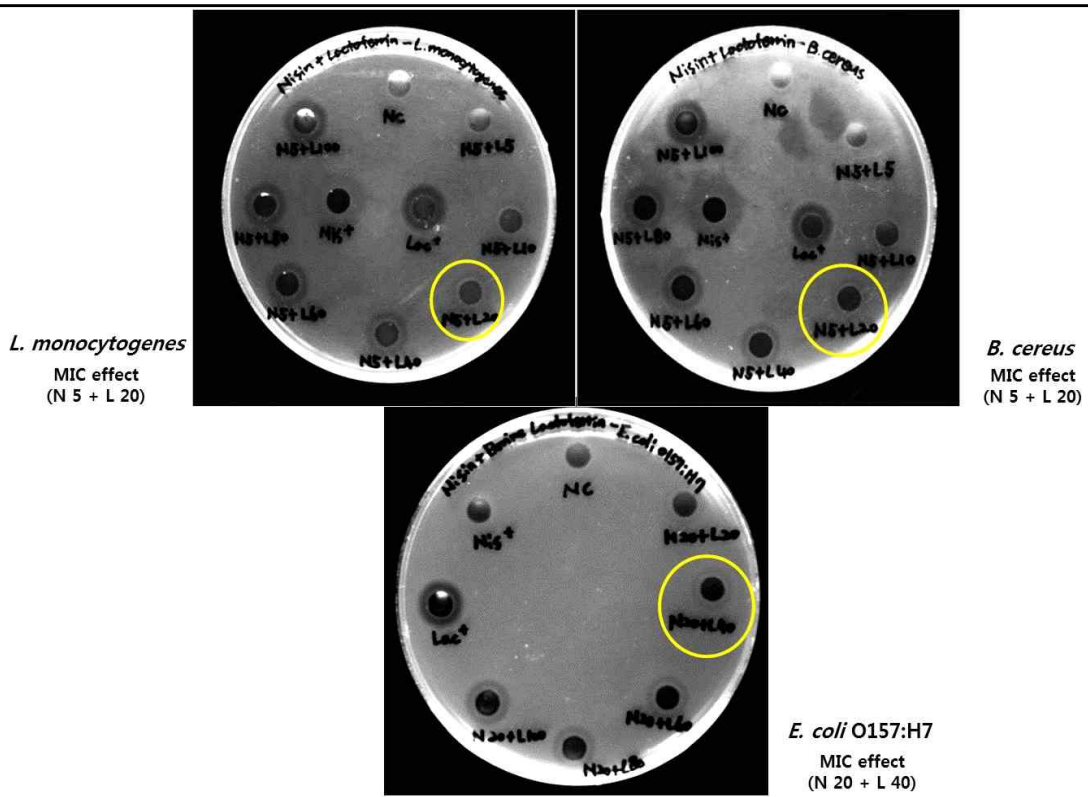
<한천배지에서 나이신과 락토페린 혼합의 시너지농도 및 최소저해농도 결정>

- 3가지 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)을 대상으로 Nisin과 Bovine lactoferrin 혼합에 대한 최소저해농도를 평가해본 결과, 각 천연미생물저해제의 최소저해농도 100%를 기준으로 그램양성균인 리스테리아는 나이신 5% (0.05 mg/ml), 락토페린 20% (2.5 mg/ml), 바실러스에서는 나이신 5% (0.05 mg/ml), 락토페린 20% (2.5 mg/ml)의 결과를 보였으며, 그램음성균인 *E. coli* O157:H7의 경우 나이신 20% (0.2 mg/ml), 락토페린 40% (5 mg/ml)의 최소저해농도에 대한 결과를 보임.
- 나이신과 락토페린 혼합물의 최소저해농도 평가실험의 결과는 <표 4>와 같음.

<표 4> 나이신 및 락토페린 혼합용액의 최소저해농도(MIC) 평가실험 결과

식중독균	나이신 + 락토페린
	최소저해농도(MIC)
<i>L. monocytogenes</i>	나이신 5% (0.05 mg/ml) 락토페린 20% (2.5 mg/ml)
<i>B. cereus</i>	나이신 5% (0.05 mg/ml) 락토페린 20% (2.5 mg/ml)
<i>E. coli</i> O157:H7	나이신 20% (0.2 mg/ml) 락토페린 40% (5 mg/ml)

- 한천배지 조건으로 나이신과 락토페린에 의한 저해능 결과는 <그림 2>와 같다.



<그림 2> 한천배지 조건에서 식중독 지표균에 대한 나이신과 락토페린 복합천연미생물저해제의 최소저해농도 (MIC) 평가 결과

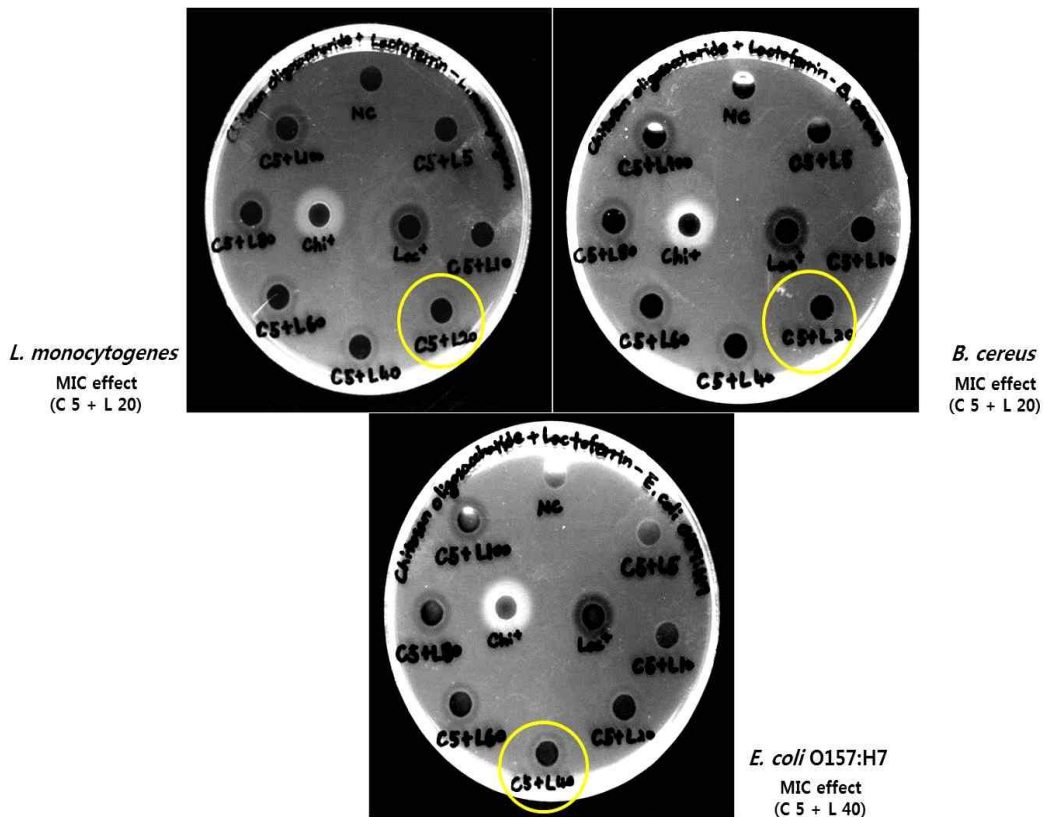
<한천배지에서 키토산 올리고당과 락토페린 혼합의 시너지최소농도 및 최소저해농도 결정>

- 3가지 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)을 대상으로 Chitosan oligosaccharide과 Bovine lactoferrin 혼합에 대한 **최소저해농도**를 평가해본 결과, 각 천연미생물저해제의 최소저해농도 100%를 기준으로 그램양성균인 리스테리아는 **키토산 올리고당 5% (1 mg/ml), 락토페린 20% (2.5 mg/ml)**, 마실러스에서는 **키토산 올리고당 5% (1 mg/ml), 락토페린 20% (2.5 mg/ml)**의 결과를 보였으며, 그램음성균인 *E. coli* O157:H7의 경우 **키토산 올리고당 5% (1 mg/ml), 락토페린 40% (5 mg/ml)**의 최소저해농도에 대한 결과를 보임.
- 키토산 올리고당과 락토페린 혼합물의 최소저해농도 평가실험의 결과는 <표 5>와 같음.

<표 5> 키토산 올리고당 및 락토페린 혼합용액의 최소저해농도(MIC) 평가실험 결과

식중독균	키토산 올리고당 + 락토페린
	최소저해농도(MIC)
<i>L. monocytogenes</i>	키토산 올리고당 5% (1 mg/ml) 락토페린 20% (2.5 mg/ml)
<i>B. cereus</i>	키토산 올리고당 5% (1 mg/ml) 락토페린 20% (2.5 mg/ml)
<i>E. coli</i> O157:H7	키토산 올리고당 5% (1 mg/ml) 락토페린 40% (5 mg/ml)

- 한천배지 조건으로 키토산 올리고당과 락토페린에 의한 저해능 결과는 <그림 3>과 같음.



<그림 3> 한천배지 조건에서 식중독 지표균에 대한 키토산 올리고당과 락토페린 복합천연미생물저해제의 최소저해능 (MIC effect) 평가 결과

<한천배지 조건에서 2 가지 복합 천연미생물저해제의 최소저해농도 최종 결과>

- 3 가지 천연미생물저해제의 최소저해농도 실험을 통하여 얻어진 결과를 바탕으로 각 식중독 지표균에 대한 2가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도를 결정함.
- 2가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도는 <표 6>과 같음.

<표 6> 한천배지 조건에서 각 식중독 지표균에 대한 2가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도 (MIC) 실험결과 (단위, mg/ml)

식중독균	나이신+ 키토산 올리고당	나이신+ 락토페린	키토산 올리고당+ 락토페린
<i>L. monocytogenes</i>	나이신 40% (0.4 mg/ml) 키토산 20% (4 mg/ml)	나이신 5% (0.05 mg/ml) 락토페린 20% (2.5 mg/ml)	키토산 5% (1 mg/ml) 락토페린 20% (2.5 mg/ml)
<i>B. cereus</i>	나이신 20% (0.2 mg/ml) 키토산 40% (8 mg/ml)	나이신 5% (0.05 mg/ml) 락토페린 20% (2.5 mg/ml)	키토산 5% (1 mg/ml) 락토페린 20% (2.5 mg/ml)
<i>E. coli</i> O157:H7	나이신 20% (0.2 mg/ml) 키토산 50% (10 mg/ml)	나이신 20% (0.2 mg/ml) 락토페린 40% (5 mg/ml)	키토산 5% (1 mg/ml) 락토페린 40% (5 mg/ml)

- 최종결과로부터 얻어진 최소저해농도(MIC)로부터 적은 양으로 효과적인 식중독균의 저해를 얻기 위해서는 최소저해농도를 기준으로 3가지 복합천연미생물저해제에 대한 연구를 진행하는 것이 필요함.

- 결정된 2가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도를 바탕으로 3가지의 복합천연미생물저해제에 대하여 모든 식중독 지표균을 저해할 수 있는 최적조합 및 최소농도를 결정할 것임.

1.2.2. 액상배지 흡광도 측정법을 활용한 한천배지에서의 두가지 복합천연미생물저해제의 저해능 확인

- 액상배지의 경우 단계희석법을 활용하여 다양한 농도의 복합천연미생물저해제를 96-well plate 각각의 well에 액상배지와 1:1 비율로 혼합 후 각 식중독 지표균들을 접종하여 저해능을 평가하는 방법을 활용함.
- 각 천연미생물저해제의 최소저해농도(MIC) 100%를 기준으로 단계희석법을 사용하여 희석된 다양한 농도의 혼합된 저해제용액들을 이용하여 저해능을 실험함.
- 접종 직후부터 12시간까지 1-2시간 간격으로 600 nm에서 흡광도를 측정함으로써 저해능을 평가.
- 두가지 복합천연미생물저해제에 대한 액상배지에서의 평가를 위해서 아래 두가지의 개념을 정립.

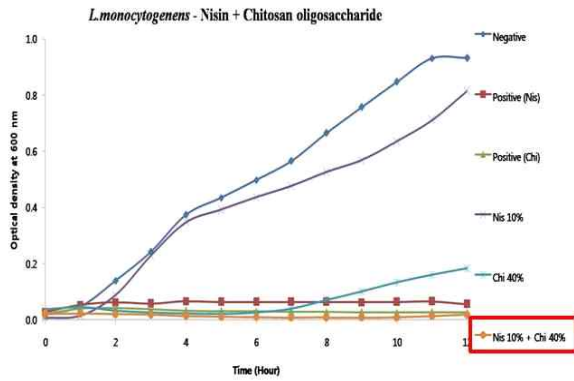
1. 시너지효과의 유무에 대하여, 최소저해농도보다 낮은 농도를 가진 두가지 저해제의 혼합용액이 액상배지조건에서 12시간 배양후까지 흡광도가 완벽하게 저해하는 농도임.

2. 이러한 시너지효과를 가진 혼합용액 중, 가장 낮은 농도의 저해제 조합을 선발하여 이를 두가지 저해제의 조합 중 최적화된 조합으로 하고 ‘천연복합저해제의 최소저해농도’로 정의함.

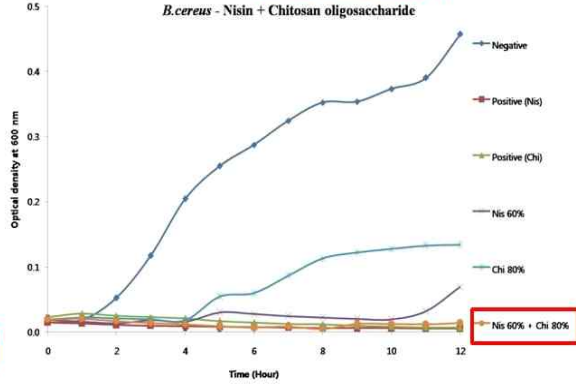
<액상배지 조건에서 나이신과 키토산 올리고당 혼합의 시너지농도 및 최소저해농도 결정>

- 나이신 및 키토산 올리고당의 최소첨가농도로부터 단계희석법을 사용하여 희석 후 혼합된 다양한 농도의 용액들을 혼합하여 저해능을 실험함. 이를 3가지 식중독 지표균이 접종된 배지에 첨가하여 12시간까지 배양함.
 - 1-2시간마다 600 nm에서 TECAN microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정 후 식중독 지표균별로 성장곡선화 함.
 - 나이신과 키토산 올리고당 혼합 천연미생물저해제는 첨가되었으나 식중독 지표균이 접종되지 않은 배지를 blank로 잡고 흡광도를 측정한 후 샘플들의 흡광도를 보정함.
 - Negative control은 나이신과 키토산 올리고당 혼합 천연미생물저해제가 첨가되지 않은 각 식중독균이 접종된 배지의 배양 후 흡광도를 측정하여 사용함.
 - Positive control은 나이신 및 키토산올리고당 각각의 최소저해농도가 포함된 배지에 각 식중독지표균을 접종하고 배양 후 흡광도를 측정하여 사용함.
 - 모든 실험은 3반복 실험 후 평균 및 표준편차를 통하여 정확도를 높임.
- 액상배지 조건으로 나이신과 키토산 올리고당에 의한 저해능 결과는 <그림 4>와 같다.

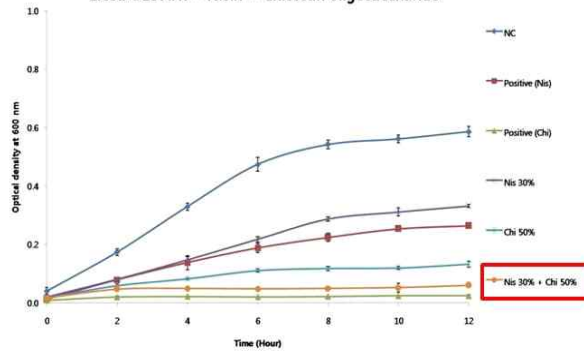
***L. monocytogenes* – Nis 10% + Chi 40%**



***B. cereus* – Nis 60% + Chi80%**



***E.coli* O157:H7 - Nisin + Chitosan oligosaccharide**



***E. coli* O157:H7 – Nis 30% + Chi 50%**

<그림 4> 액상배지 조건에서 식중독 지표균에 대한 나이신과 키토산 올리고당 복합천연미생물저해제의 최소저해농도 (MIC) 평가 결과

- <그림 4>의 결과를 바탕으로 12시간까지의 흡광도를 기준으로 3가지 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)에 대한 Nisin과 Chitosan oligosaccharide가 혼합된 최소저해농도 평가 결과에서, 각 천연미생물저해제의 최소저해농도 100%를 기준으로 그램양성균인 리스테리아는 나이신 10% (0.4 mg/ml), 키토산 올리고당 40% (8 mg/ml), 바실러스에서는 나이신 60% (2.4 mg/ml), 키토산 올리고당 80% (16 mg/ml)의 결과를 보였으며, 그램음성균인 *E. coli* O157:H7의 경우 나이신 30% (1.2 mg/ml), 키토산 올리고당 50% (10 mg/ml)의 최소저해농도에 대한 결과를 보임.
- 나이신과 키토산 올리고당 혼합물의 최소저해농도 평가실험의 결과는 <표 7>과 같음.

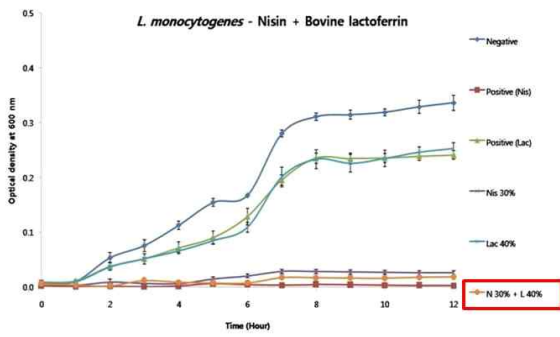
<표 7>액상배지 조건에서 나이신 및 키토산 올리고당 혼합용액의 최소저해농도 (MIC) 평가실험 결과

식중독균	나이신 + 키토산 올리고당
	최소저해농도(MIC)
<i>L. monocytogenes</i>	나이신 10% (0.4 mg/ml) 키토산 올리고당 40% (8 mg/ml)
<i>B. cereus</i>	나이신 60% (2.4 mg/ml) 키토산 올리고당 80% (16 mg/ml)
<i>E. coli</i> O157:H7	나이신 30% (1.2 mg/ml) 키토산 올리고당 50% (10 mg/ml)

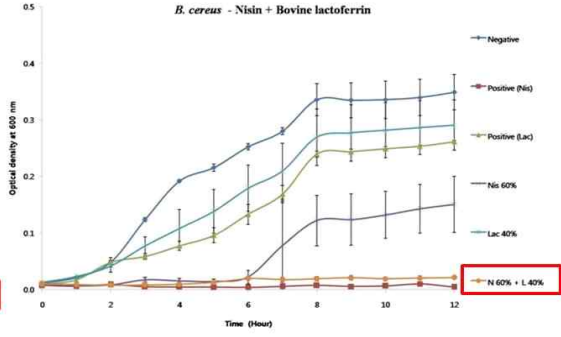
<액상배지 조건에서 나이신과 락토페린 혼합의 시너지농도 및 최소저해농도 결정>

- 나이신 및 락토페린의 최소첨가농도로부터 단계희석법을 사용하여 희석 후 혼합된 다양한 농도의 용액들을 혼합하여 저해능을 실험함. 이를 세 가지 식중독 지표균이 접종된 배지에 첨가하여 12시간까지 배양함.
- 1-2시간마다 600 nm에서 TECAN microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정 후 식중독 지표균별로 성장곡선화 함.
- 나이신과 락토페린 혼합 천연미생물저해제는 첨가되었으나 식중독 지표균이 접종되지 않은 배지를 blank로 잡고 흡광도를 측정한 후 샘플들의 흡광도를 보정함.
- Negative control은 나이신과 락토페린 혼합 천연미생물저해제가 첨가되지 않은 각 식중독균이 접종된 배지의 배양 후 흡광도를 측정하여 사용함.
- Positive control은 나이신 및 락토페린 각각의 최소저해농도가 포함된 배지에 각 식중독 지표균을 접종하고 배양 후 흡광도를 측정하여 사용함.
- 모든 실험은 3반복 실험 후 평균 및 표준편차를 통하여 정확도를 높임.
- 액상배지 조건으로 나이신과 락토페린에 의한 저해능 결과는 <그림 5>와 같다.

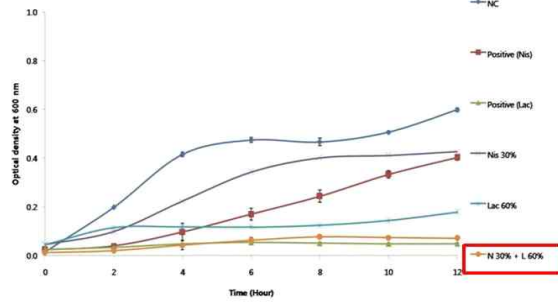
***L. monocytogenes* – Nis 30% + Lac 40%**



***B. cereus* – Nis 60% + Lac 40%**



***E. coli* O157:H7 - Nisin + Bovine lactoferrin**



***E. coli* O157:H7 – Nis 30% + Lac 60%**

- <그림 5> 액상배지 조건에서 식중독 지표균에 대한 나이신과 락토페린 복합천연미생물저해제의 최소저해농도 (MIC) 평가 결과

- <그림 5>의 결과를 바탕으로 12시간까지의 흡광도를 기준으로 3가지 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)에 대한 Nisin과 Bovine lactoferrin이 혼합된 최소저해농도 평가 결과에서, 각 천연미생물저해제의 최소저해농도 100%를 기준으로 그람양성균인 리스테리아는 나이신 30% (1.2 mg/ml), 락토페린 40% (80 mg/ml), 바실러스에서는 나이신 60% (2.4 mg/ml), 락토페린 40% (80 mg/ml)의 결과를 보였으며, 그람음성균인 *E. coli* O157:H7의 경우 나이신 30% (1.2 mg/ml), 락토페린 60% (120 mg/ml)의 최소저해농도에 대한 결과를 보임.
- 나이신과 락토페린 혼합물의 최소저해농도 평가실험의 결과는 <표 8>과 같음.

<표 8> 액상배지 조건에서 나이신 및 락토페린 혼합용액의 최소저해농도 (MIC) 평가실험 결과

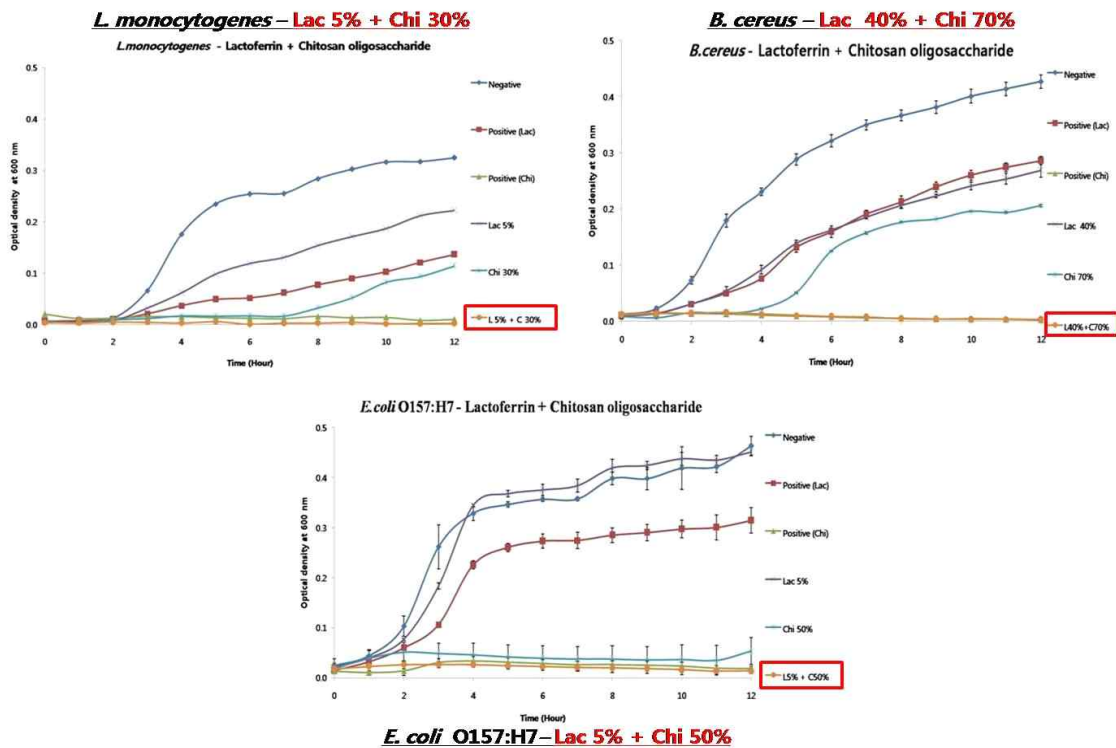
식중독균	나이신 + 락토페린
	최소저해농도(MIC)
<i>L. monocytogenes</i>	나이신30% (1.2 mg/ml) 락토페린 40% (80 mg/ml)
<i>B. cereus</i>	나이신 60% (2.4 mg/ml) 락토페린 40% (80 mg/ml)
<i>E. coli</i> O157:H7	나이신 30% (1.2 mg/ml) 락토페린 60% (120 mg/ml)

<액상배지 조건에서 키토산 올리고당과 락토페린 혼합의 시너지농도 및 최소저해농도 결정>

- 키토산 올리고당 및 락토페린의 최소첨가농도로부터 단계회석법을 사용하여 회석 후 혼합된 다양한 농도의 용액들을 혼합하여 저해능을 실험함. 이를 세 가지 식중독 지표균이 접종된 배지에 첨가하여

12시간까지 배양함.

- 1-2시간마다 600 nm에서 TECAN microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정 후 식중독 지표균별로 성장곡선화 함.
- 키토산 올리고당과 락토페린 혼합 천연미생물저해제는 첨가되었으나 식중독 지표균이 접종되지 않은 배지를 blank로 잡고 흡광도를 측정한 후 샘플들의 흡광도를 보정함.
- Negative control은 키토산 올리고당과 락토페린 혼합 천연미생물저해제가 첨가되지 않은 각 식중독균이 접종된 배지의 배양 후 흡광도를 측정하여 사용함.
- Positive control은 키토산 올리고당 및 락토페린 각각의 최소저해농도가 포함된 배지에 각 식중독 지표균을 접종하고 배양 후 흡광도를 측정하여 사용함.
- 모든 실험은 3반복 실험 후 평균 및 표준편차를 통하여 정확도를 높임.
- 액상배지 조건으로 키토산 올리고당과 락토페린에 의한 저해능 결과는 <그림 6>과 같다.



<그림 6> 액상배지 조건에서 식중독 지표균에 대한 나이신과 락토페린 복합천연미생물저해제의 최소저해농도 (MIC) 평가 결과

- <그림 6>의 결과를 바탕으로 12시간까지의 흡광도를 기준으로 3가지 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)에 대한 Chitosan oligosaccharide와 Bovine lactoferrin이 혼합된 최소저해농도 평가 결과에서, 각 천연미생물저해제의 최소저해농도 100%를 기준으로 그람양성균인 리스테리아는 키토산 올리고당 30% (6 mg/ml), 락토페린 5% (10 mg/ml), 바실러스에서는 키토산 올리고당 70% (14 mg/ml), 락토페린 40% (80 mg/ml)의 결과를 보였으며, 그람음성균인 *E. coli* O157:H7의 경우 키토산 올리고당 5% (1 mg/ml), 락토페린 50% (100 mg/ml)의 최소저해농도에 대한 결과를 보임.
- 키토산 올리고당과 락토페린 혼합물의 최소저해농도 평가실험의 결과는 <표 9>와 같음.

<표 9> 액상배지 조건에서 키토산 올리고당 및 락토페린 혼합용액의 최소저해농도(MIC) 평가실험 결과

식중독균	키토산 올리고당 + 락토페린
	최소저해농도(MIC)
<i>L. monocytogenes</i>	키토산 올리고당 30% (6 mg/ml) 락토페린 5% (10 mg/ml)
<i>B. cereus</i>	키토산 올리고당 70% (14 mg/ml) 락토페린 40% (80 mg/ml)
<i>E. coli</i> O157:H7	키토산 올리고당 5% (1 mg/ml) 락토페린 50% (100 mg/ml)

<액상배지 조건에서 두 가지 복합 천연미생물저해제의 최소저해농도 최종 결과>

- 세 가지 천연미생물저해제의 최소저해농도 실험을 통하여 얻어진 결과를 바탕으로 각 식중독 지표균에 대한 두 가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도의 결정은 <표 10>과 같음.

<표 10> 액상배지 조건에서 각 식중독 지표균에 대한 두 가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도 (MIC) 실험 결과 (단위, mg/ml)

식중독균	나이신+키토산 올리고당	나이신+락토페린	키토산 올리고당+락토페린
<i>L. monocytogenes</i>	나이신 10% (0.4 mg/ml) 키토산 40% (8 mg/ml)	나이신30% (1.2 mg/ml) 락토페린 40% (80 mg/ml)	키토산 30% (6 mg/ml) 락토페린 5% (10 mg/ml)
<i>B. cereus</i>	나이신 60% (2.4 mg/ml) 키토산 80% (16 mg/ml)	나이신 60% (2.4 mg/ml) 락토페린 40% (80 mg/ml)	키토산 70% (14 mg/ml) 락토페린 40% (80 mg/ml)
<i>E. coli</i> O157:H7	나이신 30% (1.2 mg/ml) 키토산 50% (10 mg/ml)	나이신 30% (1.2 mg/ml) 락토페린 60% (120 mg/ml)	키토산 5% (1 mg/ml) 락토페린 50% (100 mg/ml)

- 최종결과로부터 얻어진 최소저해농도(MIC)로부터 적은 양으로 효과적인 식중독균의 저해를 얻기 위해서는 **최소저해농도를 기준으로** 3가지 복합천연미생물저해제에 대한 연구를 진행하는 것이 필요함
- 결정된 2가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도를 바탕으로 3가지의 복합천연미생물저해제에 대하여 모든 식중독 지표균을 저해할 수 있는 최적조합 및 최소농도를 결정할 것임.

3. 두가지 저해제의 최적화 결과를 바탕으로 세가지 저해제의 다양한 조합을 구성한 후 시너지효과 검증 및 저해능과 최소저해농도(MIC)의 미생물학적 평가에 따른 최적조합 결정

3.1. 두가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도를 기준으로 세가지 저해제의 다양한 조합 구성

3.1.1 두가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도를 기준으로 한천배지에서 다양한 세가지 저해제의 조합 구성

- <표 11>에 기재된 천연미생물저해제 3종류 (나이신, 키토산 올리고당, 락토페린) 중, 한천배지 조건에서 두가지 저해제 혼합물의 최소첨가농도(MIC)를 기준으로 3가지 저해제의 기본 조성비율을 정함

고, 각 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)의 최소저해능을 확인하기 위하여 기본 조성비율로부터 다양한 농도의 조합을 구성함.

<표 11> 한천배지 조건에서 2가지 복합천연항균제의 최소저해능도 결과에 따른 3가지 복합천연미생물저해제 혼합 조성을 위한 기본 조성비율 결정 (단위 %)

식중독균	나이신	키토산 올리고당	락토페린
<i>L. monocytogenes</i>	40% (0.4 mg/ml)	20% (4 mg/ml)	
	5% (0.05 mg/ml)		20% (2.5 mg/ml)
		5% (1 mg/ml)	20% (2.5 mg/ml)
<i>B. cereus</i>	20% (0.2 mg/ml)	40% (8 mg/ml)	
	5% (0.05 mg/ml)		20% (2.5 mg/ml)
		5% (1 mg/ml)	20% (2.5 mg/ml)
<i>E. coli</i> O157:H7	20% (0.2 mg/ml)	50% (10 mg/ml)	
	20% (0.2 mg/ml)	40% (8 mg/ml)	
		20% (4 mg/ml)	40% (5 mg/ml)
기본 조성 비율	40% (0.4 mg/ml)	50% (10 mg/ml)	40% (5 mg/ml)

- 3가지 저해제의 기본 조성 비율로부터 각각의 천연미생물저해제를 단계별 희석 후 혼합과정을 통하여 시너지효과 및 최소저해능이 관찰되는 최소저해능도를 결정하고자 함
- 각 천연미생물저해제의 최소저해능도(MIC)를 100%로 정했을 때 나이신, 키토산, 락토페린을 <표 12>와 같이 희석하여 희석농도구배를 만듦.

<표 12> 한천배지조건에서 각 천연미생물저해제의 희석농도구배 (단위 %)

나이신	60	50	40	35	30	25	20	10	5		9가지
키토산	70	60	50	40	35	30	25	20	10	5	10가지
락토페린	60	50	40	35	30	25	20	10	5		9가지

(100%의 기준은 각 천연저해제의 최소저해능도(MIC)를 기준으로 함)

- 이를 바탕으로 천연미생물저해제 3가지씩 모두 섞는 다양한 조합을 만듦.
- 총 3개의 조합을 계산했을 때, 총 가능한 조합의 개수는 810가지임.
- 이러한 810가지의 조합에 해당하는 혼합용액을 모두 제조하고 식중독균 3종 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)에 대하여 저해능 평가를 한천배지를 이용한 Standard well diffusion method를 이용한 미생물학적인 평가를 수행함
- 미생물학적인 평가를 수행하기 위하여 한천배지의 경우 Standard well diffusion method를 활용하여 <표 12>의 희석농도구배의 조합에 따라 다양한 농도의 3가지 복합천연미생물저해제를 한천배지 내 well에 주입 후 확산시켜서 각 식중독 지표균들을 도포하여 저해능을 평가하는 방법을 사용함.
- 각 천연미생물 저해제의 최소첨가농도로부터 단계희석법을 사용하여 희석 후 혼합된 다양한 농도의

용액들을 이용하여 저해능을 실험하였다.

- 12시간 배양 후 clear zone의 존재유무를 확인함으로써 저해능을 평가하였다.

3.1.2. 두가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도를 기준으로 액상배지에서 다양한 세가지 저해제의 조합 구성

- <표 13>에 기재된 천연미생물저해제 3종류 (나이신, 키토산 올리고당, 락토페린) 중, 액상배지조건에서 두가지 저해제 혼합물의 최소첨가농도(MIC)를 기준으로 **3가지 저해제의 기본 조성비율**을 정하고, 각 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)의 최소저해능을 확인하기 위하여 기본 조성비율로부터 다양한 농도의 조합을 구성함.

<표 13> 액상배지 조건에서 2가지 복합천연항균제의 최소저해농도 결과에 따른 3가지 복합천연미생물저해제 혼합 조성을 위한 기본 조성비율 결정 (단위 %)

식중독균	나이신	키토산 올리고당	락토페린
<i>L. monocytogenes</i>	10% (0.4 mg/ml)	40% (8 mg/ml)	
	30% (1.2 mg/ml)		40% (80 mg/ml)
		30% (6 mg/ml)	5% (10 mg/ml)
<i>B. cereus</i>	60% (2.4 mg/ml)	80% (16 mg/ml)	
	60% (2.4 mg/ml)		40% (80 mg/ml)
		70% (14 mg/ml)	40% (80 mg/ml)
<i>E. coli</i> O157:H7	30% (1.2 mg/ml)	50% (10 mg/ml)	
	30% (1.2 mg/ml)		60% (120 mg/ml)
		5% (1 mg/ml)	50% (100 mg/ml)
기본 조성 비율	60% (2.4 mg/ml)	80% (16 mg/ml)	60% (120 mg/ml)

- 3가지 저해제의 기본 조성 비율로부터 각각의 천연미생물저해제를 단계별 희석 후 혼합과정을 통하여 시너지효과 및 최소저해능이 관찰되는 최소저해농도를 결정하고자 함
- 각 천연미생물저해제의 최소저해농도(MIC)를 100%로 정했을 때 나이신, 키토산, 락토페린을 <표 14>과 같이 희석하여 희석농도구배를 만듦

<표 14> 액상배지조건에서 각 천연미생물저해제의 희석농도구배 (단위 %)

나이신	80	60	50	40	35	30	25	20	15	10	5	11가지
키토산	80	60	50	40	35	30	25	20	15	10	5	11가지
락토페린	80	60	50	40	35	30	25	20	15	10	5	11가지

(100%의 기준은 각 천연저해제의 최소저해농도(MIC)를 기준으로 함)

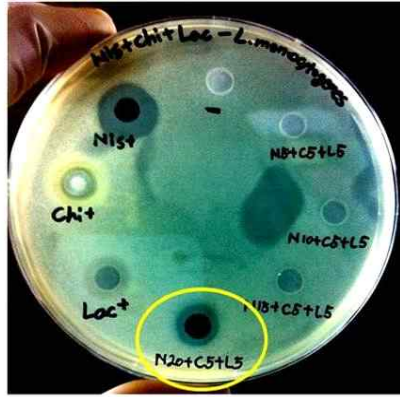
- 이를 바탕으로 천연미생물저해제 3가지씩 모두 섞는 다양한 조합을 만듦.
- 총 3개의 조합을 계산했을 때, 총 가능한 조합의 개수는 1,331가지임.

- 이러한 1,331가지의 조합에 해당하는 혼합용액을 모두 제조하고 식중독균 3종 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)에 대하여 저해능 평가를 액상배지 조건에서 흡광도 측정법을 이용한 미생물학적인 평가를 수행함
- 미생물학적인 평가를 수행하기 위하여 액상배지의 경우 <표 14>의 희석농도구배의 조합에 따라 다양한 농도의 3가지 복합천연미생물저해제를 액상배지에 주입 및 혼합 후 96-well plate 및 TECAN microplate reader를 이용하고 12시간 동안 매 시간마다 각 식중독 지표균들의 흡광도 (600 nm)를 측정하여 저해능을 평가하는 방법을 사용함.

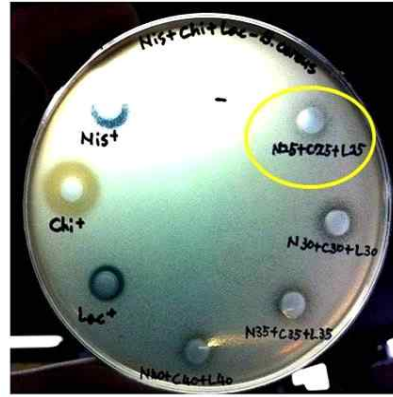
3.2. 최소저해농도(MIC)의 미생물학적 평가에 따른 세가지 복합천연미생물저해제의 시너지효과 검증

3.2.1. 한천배지 방식에서 최소저해농도(MIC)의 미생물학적 평가에 따른 세가지 복합천연미생물저해제의 시너지효과 검증

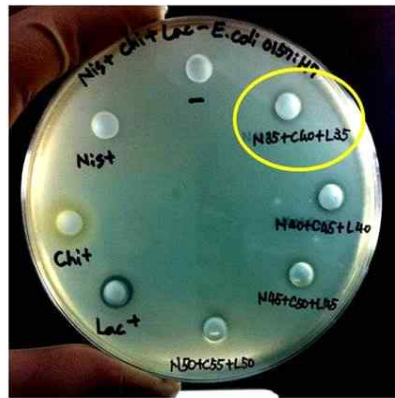
- <표 15>를 이용하여 3가지 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)을 대상으로 한천배지 조건에서 Nisin, Chitosan oligosaccharide 및 Bovine lactoferrin 혼합에 대한 최소저해농도를 평가해본 결과, 각 천연미생물저해제의 최소저해농도 100%를 기준으로 그람양성균인 리스테리아는 나이신 20% (0.2 mg/ml), 키토산 올리고당 5% (1 mg/ml), 락토페린 5% (0.625 mg/ml), 바실러스에서는 나이신 25% (0.25 mg/ml), 키토산 올리고당 25% (5 mg/ml), 락토페린 25% (3.125 mg/ml)의 결과를 보였으며, 그람음성균인 *E. coli* O157:H7의 경우 나이신 35% (0.35 mg/ml), 키토산 올리고당 40% (8 mg/ml), 락토페린 35% (4.375 mg/ml)의 최소저해농도에 대한 결과를 보임.
- 한천배지 조건으로 나이신, 키토산 올리고당 및 락토페린 조합에 의한 저해능 결과는 <그림 7>과 같음



L. monocytogenes
(N 20 + C 5 + L 5)



B. cereus
(N 25 + C 25 + L 25)

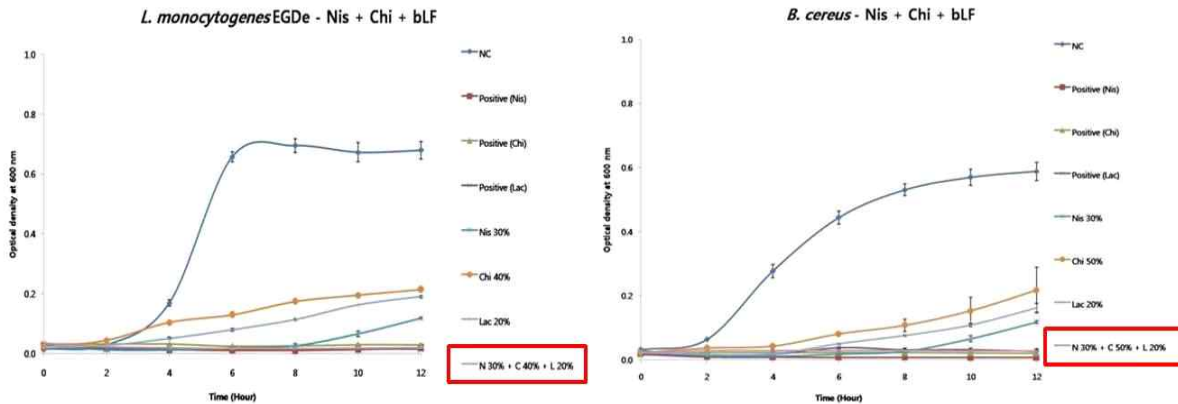


E. coli O157:H7
(N 35+ C 40 + L 35)

<그림 7> 한천배지 조건에서 식중독 지표균에 대한 나이신, 키토산 올리고당 및 락토페린 복합 천연미생물저해제의 최소저해농도(MIC) 결과

3.2.2. 액상배지 방식에서 최소저해농도(MIC)의 미생물학적 평가에 따른 세가지 복합천연미생물저해제의 시너지효과 검증

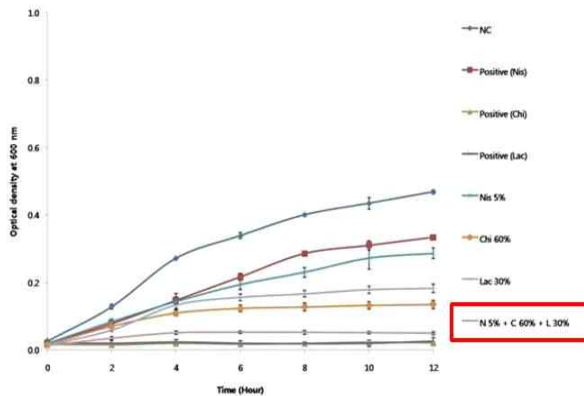
- <표 14>를 이용하여 나이신, 키토산 올리고당 및 락토페린의 최소첨가농도로부터 단계회석법을 사용하여 회석 후 혼합된 다양한 농도의 용액들을 혼합하여 최소저해농도를 실험함. 이를 세 가지 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)이 접종된 배지에 첨가하여 12시간 까지 배양함.
- 1-2시간마다 600 nm에서 TECAN microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정 후 식중독 지표균별로 성장곡선화 함.
- 나이신, 키토산 올리고당 및 락토페린 혼합 천연미생물저해제는 첨가되었으나 식중독 지표균이 접종되지 않은 배지를 blank로 잡고 흡광도를 측정한 후 샘플들의 흡광도를 보정함.
- Negative control은 나이신, 키토산 올리고당 및 락토페린 혼합 천연미생물저해제가 첨가되지 않은 각 식중독균이 접종된 배지의 배양 후 흡광도를 측정하여 사용함.
- Positive control은 나이신, 키토산 올리고당 및 락토페린 각각의 최소저해농도가 포함된 배지에 각 식중독 지표균을 접종하고 배양 후 흡광도를 측정하여 사용함.
- 모든 실험은 3반복 실험 후 평균 및 표준편차를 통하여 정확도를 높임.
- 액상배지 조건으로 나이신, 키토산 올리고당 및 락토페린에 의한 저해능 결과는 <그림 8>과 같음



***L. monocytogenes* – Nis 20 + Chi 40 + Lac 20**

***B. cereus* – Nis20 + Chi 50 + Lac 20**

E. coli O157:H7 - Nis + Chi + bLF



***E. coli* O157:H7 – Nis 5 + Chi 60 + Lac 30**

<그림 8> 액상배지 조건에서 식중독 지표균에 대한 세가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도 (MIC) 평가 결과

- <그림 8>의 결과를 바탕으로 12시간까지의 흡광도를 기준으로 3가지 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)에 대한 Chitosan oligosaccharide와 Bovine lactoferrin이 혼합된 최소저해농도 평가 결과에서, 각 천연미생물저해제의 최소저해농도 100%를 기준으로 그람양성균인 리스테리아는 나이신 20% (0.8 mg/ml), 키토산 올리고당 40% (8 mg/ml), 락토페린 20% (40 mg/ml), 바실러스에서는 나이신 20% (0.8 mg/ml), 키토산 올리고당 50% (10 mg/ml), 락토페린 20% (40 mg/ml)의 결과를 보였으며, 그람음성균인 *E. coli* O157:H7의 경우 나이신 5% (0.2 mg/ml), 키토산 올리고당 60% (12 mg/ml), 락토페린 30% (60 mg/ml)의 최소저해농도에 대한 결과를 보임.

3.3. 3가지 식중독 지표균에 저해능을 보이는 세가지 복합천연미생물저해제의 최적조합비율 결정

3.3.1. 한천배지조건에서 세 가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도 결과

- <그림 7>을 활용하여 2가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도 실험을 통해 얻어진 결과를 바탕으로 각 식중독 지표균에 대한 3가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도를 결정함.
- 각 식중독 지표균에 대한 3가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도의 결과는 <표 15>와 같음.

<표 15> 한천배지 조건에서 각 식중독 지표균에 대한 3가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도 (MIC) 실험결과 (단위, mg/ml)

복합천연미생물저해제	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
나이신 + 키토산 올리고당 + 락토페린	나이신 20% (0.2 mg/ ml) 키토산 5% (1 mg/ ml) 락토페린 5% (0.625 mg/ ml)	나이신 25% (0.25 mg/ ml) 키토산 25% (5 mg/ ml) 락토페린 25% (3.125 mg/ ml)	나이신 30% (0.3 mg/ ml) 키토산 40% (8 mg/ ml) 락토페린 35% (4.375 mg/ ml)

3.3.2. 액상배지 조건에서 세 가지 복합 천연미생물저해제의 최소저해농도 결과

- <그림 8>을 활용하여 2가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도 실험을 통해 얻어진 결과를 바탕으로 각 식중독 지표균에 대한 **3가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도**를 결정함.
- 각 식중독 지표균에 대한 3가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농도의 결과는 <표 16>과 같음.

<표 16> 액상배지 조건에서 각 식중독 지표균에 대한 3가지 복합천연미생물저해제의 최소저해농(MIC) 실험결과 (단위, mg/ml)

복합천연미생물저해제	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
나이신 + 키토산 올리고당 + 락토페린	나이신 20% (0.8 mg/ ml) 키토산 40% (8 mg/ ml) 락토페린 20% (40 mg/ ml)	나이신 20% (0.8 mg/ ml) 키토산 50% (10 mg/ ml) 락토페린 20% (40 mg/ ml)	나이신 50% (0.2 mg/ ml) 키토산 60% (12 mg/ ml) 락토페린 30% (60 mg/ ml)

3.3.3. 최소저해농도의 최적조합을 바탕으로 모든 식중독 지표균을 저해할 수 있는 세가지 복합천연미생물저해제에 사용될 최소첨가농도 결정.

- <표 15> 및 <표 16>을 바탕으로 식중독 지표균에 대한 복합 천연항균제의 저해능 결과를 확인 후 3가지 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)을 저해했던 3가지 천연미생물저해제의 가장 높은 농도를 선발하여 모두 저해할 수 있는 **최소첨가농도**를 선정함.
- 최소첨가농도를 선정결과는 <표 17>와 같음.

<표 17> 선정된 모든 식중독 지표균의 저해 가능한 최소첨가농도.(단위 mg/ml)

복합천연미생물저해제	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
한천배지 조건에서 나이신, 키토산 및 락토페린 복합 최소저해농도	나이신 20% (0.2 mg/ ml) 키토산 5% (1 mg/ ml) 락토페린 5% (0.625 mg/ ml)	나이신 25% (0.25 mg/ ml) 키토산 25% (5 mg/ ml) 락토페린 25% (3.125 mg/ ml)	나이신 30% (0.3 mg/ ml) 키토산 40% (8 mg/ ml) 락토페린 35% (4.375 mg/ ml)
액상배지 조건에서 나이신, 키토산 및 락토페린 복합 최소저해농도	나이신 20% (0.8 mg/ ml) 키토산 40% (8 mg/ ml) 락토페린 20% (40 mg/ ml)	나이신 20% (0.8 mg/ ml) 키토산 50% (10 mg/ ml) 락토페린 20% (40 mg/ ml)	나이신 50% (0.2 mg/ ml) 키토산 60% (12 mg/ ml) 락토페린 30% (60 mg/ ml)
최종 최소첨가농도	나이신 30% (한천배지: 0.3 mg/ml, 액상배지: 1.2 mg/ml) 키토산 올리고당 60% (한천배지: 12 mg/ml, 액상배지: 12 mg/ml) 락토페린 35% (한천배지: 4.375 mg/ ml, 액상배지: 70 mg/ ml)		

4. 결정된 최적조합을 바탕으로 스프레이식 천연복합저해제의 개발 및 최적저해능 평가

4.1. 최종 조합된 복합 천연미생물 저해제의 최소첨가농도를 활용하여 스프레이 형태의 복합천연미생물저해제 개발

4.1.1. 세가지 천연미생물저해제의 최적조합비율 및 최소첨가농도 바탕으로 한 복합천연미생물저해제 개발

- <표 19>와 같이 최종결정된 최적조합비율 및 농도는 **나이신 30% (1.2 mg/ml), 키토산 올리고당 60% (12 mg/ml), 락토페린 35% (70 mg/ ml)**임.
- 이를 바탕으로 3가지 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)을 모두 효과적으로 저해할 수 있도록 식품표면에 분사하여 식품 안전성 목적으로 사용될 스프레이 형태의 복합천연미생물저해제 제조.
- 위에 기술한 바와 같이 최종결정된 최적조합비율 및 농도를 갖도록 세가지 천연미생물저해제를 희석한 후 혼합하고 멸균용 필터(0.22 μm diameter)를 활용하여 filtration처리 후 무균 비닐 팩에 보관한 용기에 담아 4℃ 냉장 보관함.
- 개발된 복합천연미생물저해제는 <그림 9>와 같다.



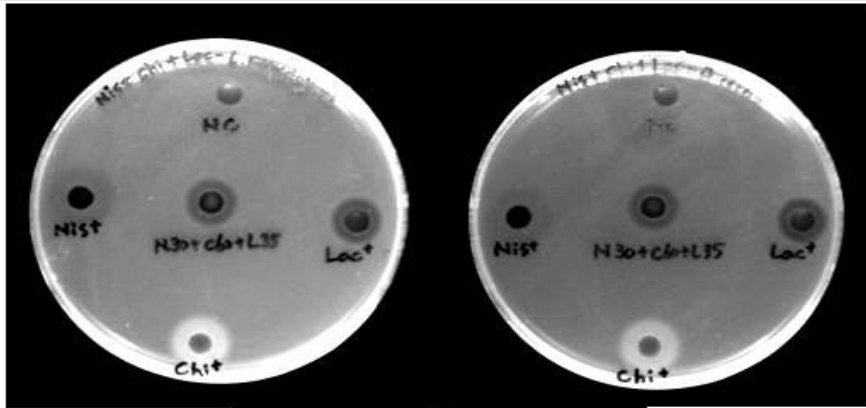
<그림 9> 개발된 복합천연미생물저해제

(최종농도 : 나이신 30% (1.2 mg/ml), 키토산 올리고당 60% (12 mg/ml), 락토펜린 35% (70 mg/ml))

4.2. 개발된 스프레이 형태의 복합천연미생물 저해제를 이용한 3가지 식중독 지표균에 대한 최적 저해능 평가

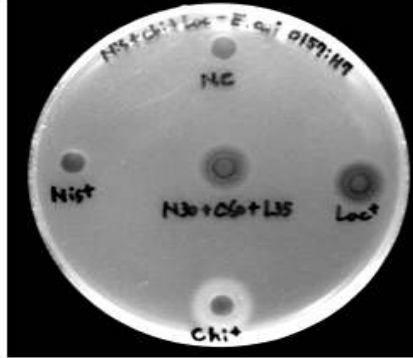
4.2.1. 한천배지 조건에서 모든 식중독 지표균 저해 가능한 최적의 복합천연미생물저해제의 저해능 확인.

- <표 17>을 바탕으로 선정된 최소첨가농도를 적용하여 한천배지 조건에서 Standard well diffusion method를 활용하여 복합천연미생물저해제에 식중독 지표균의 탁월한 저해능 확인.
- 3가지 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)을 대상으로 Nisin, Chitosan oligosaccharide 및 Bovine lactoferrin 혼합에 대한 최소첨가농도를 평가해본 결과 그람 양성균인 리스테리아, 바실러스, 그람 음성균인 *E. coli* O157:H7 모두 한천배지 조건에서 최소첨가농도인 나이신 30% (0.3 mg/ml), 키토산 올리고당 60% (12 mg/ml), 락토펜린 35% (4.375 mg/ml)에서 탁월한 저해 효과를 보임.
- 한천배지 조건으로 나이신, 키토산올리고당 및 락토펜린 복합 천연미생물저해제의 최소첨가농도에 의한 저해능 결과는 <그림 10>과 같음.



L. monocytogenes

B. cereus

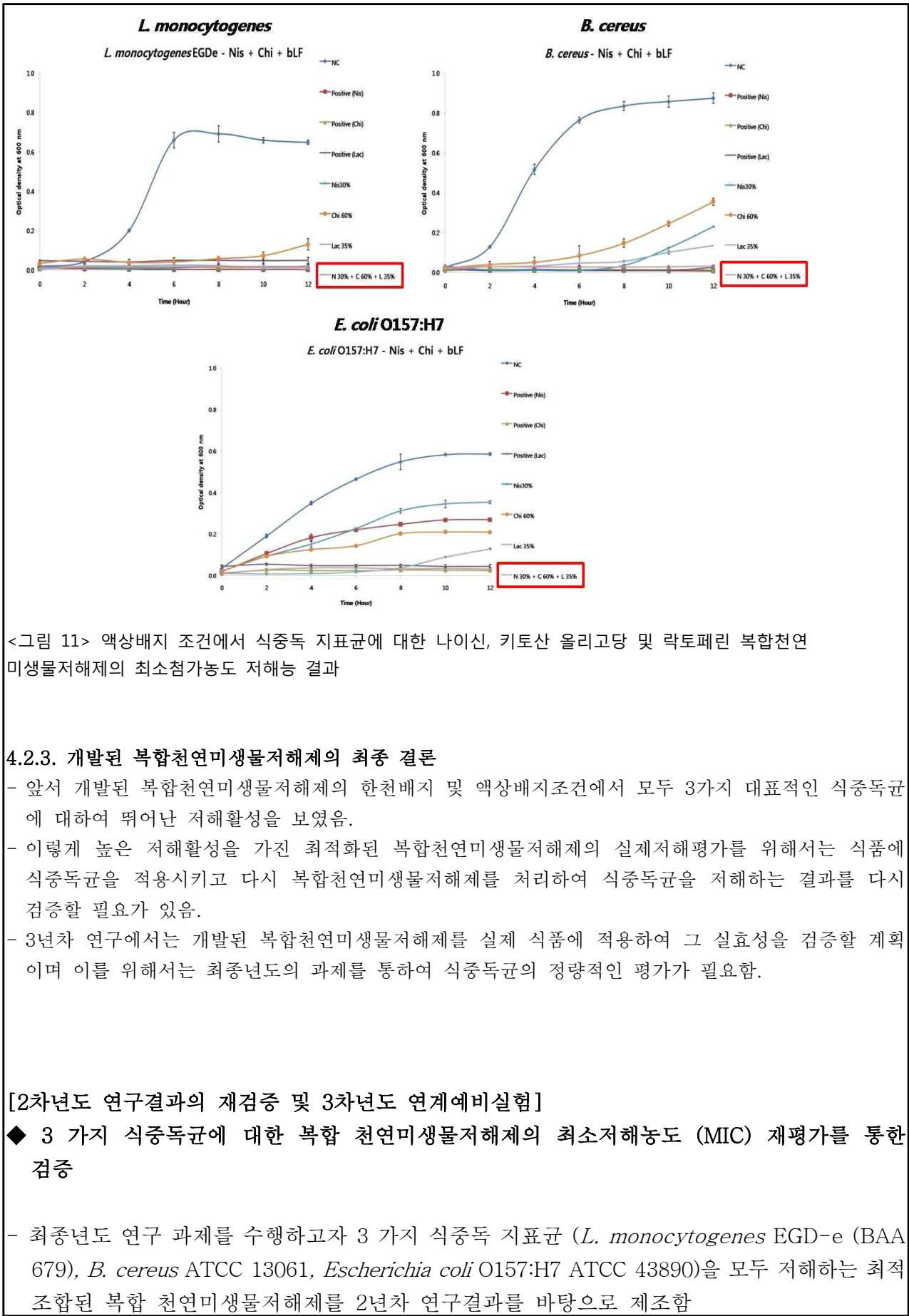


E. coli O157:H7

<그림 10> 한천배지 조건에서 식중독 지표균에 대한 나이신, 키토산 올리고당 및 락토페린 복합천연 미생물저해제의 최소첨가농도 저해능 비교 분석 결과

4.2.2 액상배지 조건에서 모든 식중독 지표균 저해 가능한 복합천연미생물저해제의 저해능 확인.

- <표 17>을 바탕으로 선정된 최소첨가농도를 적용하여 액상배지 조건에서 흡광도 측정법 (600 nm) 을 활용하여 복합천연미생물저해제에 식중독 지표균의 저해능 확인.
- 세 가지 식중독 지표균 (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7)을 대상으로 Nisin, Chitosan oligosaccharide 및 Bovine lactoferrin 혼합에 대한 최소첨가농도를 평가해본 결과 그래프 양성균인 리스테리아, 바실러스, 그램음성균인 *E. coli* O157:H7 모두 액상배지 조건에서 최소첨가 농도인 나이신 30% (1.2 mg/ml), 키토산 올리고당 60% (12 mg/ml), 락토페린 35% (70 mg/ml) 에서 탁월한 저해 효과를 보임.
- 액상배지 조건으로 나이신, 키토산올리고당 및 락토페린 복합천연미생물저해제의 최소첨가농도에 의한 저해능 결과는 <그림 11>과 같음.



<그림 11> 액상배지 조건에서 식중독 지표균에 대한 나이신, 키토산 올리고당 및 락토페린 복합천연 미생물저해제의 최소첨가농도 저해능 결과

4.2.3. 개발된 복합천연미생물저해제의 최종 결론

- 앞서 개발된 복합천연미생물저해제의 한천배지 및 액상배지조건에서 모두 3가지 대표적인 식중독균에 대하여 뛰어난 저해활성을 보였음.
- 이렇게 높은 저해활성을 가진 최적화된 복합천연미생물저해제의 실제저해평가를 위해서는 식품에 식중독균을 적용시키고 다시 복합천연미생물저해제를 처리하여 식중독균을 저해하는 결과를 다시 검증할 필요가 있음.
- 3년차 연구에서는 개발된 복합천연미생물저해제를 실제 식품에 적용하여 그 실효성을 검증할 계획이며 이를 위해서는 최종년도 과제물 통하여 식중독균의 정량적인 평가가 필요함.

[2차년도 연구결과의 재검증 및 3차년도 연계예비실험]

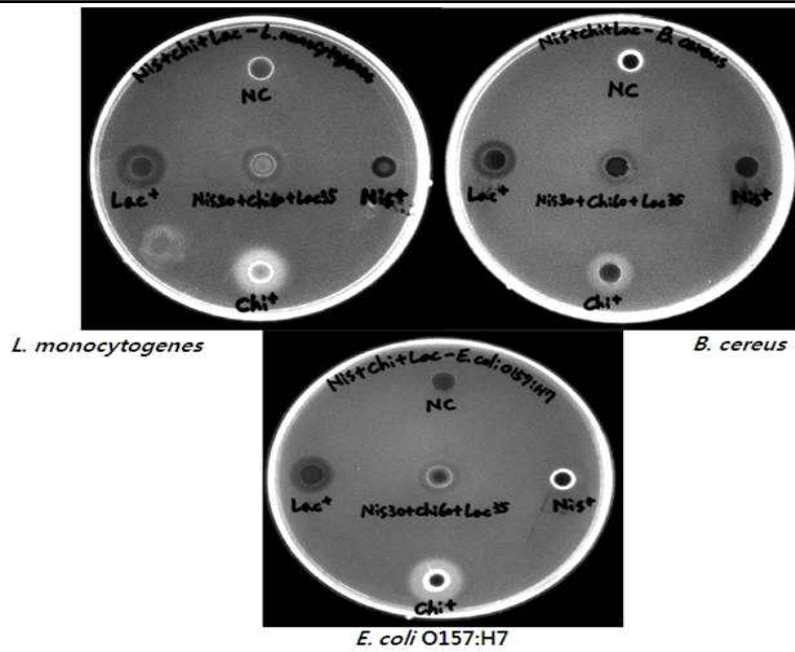
◆ 3 가지 식중독균에 대한 복합 천연미생물저해제의 최소저해농도 (MIC) 재평가를 통한 검증

- 최종년도 연구 과제를 수행하고자 3 가지 식중독 지표균 (*L. monocytogenes* EGD-e (BAA 679), *B. cereus* ATCC 13061, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43890)을 모두 저해하는 최적 조합된 복합 천연미생물저해제를 2년차 연구결과를 바탕으로 제조함

복합천연미생물저해제	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
한천배지 조건에서 나이신, 키토산 및 락토페린 복합 최소저해농도	나이신 20% (0.2 mg/ ml) 키토산 5% (1 mg/ ml) 락토페린 5% (0.625 mg/ ml)	나이신 25% (0.25 mg/ ml) 키토산 25% (5 mg/ ml) 락토페린 25% (3.125 mg/ ml)	나이신 30% (0.30 mg/ ml) 키토산 40% (8 mg/ ml) 락토페린 35% (4.375 mg/ ml)
액상배지 조건에서 나이신, 키토산 및 락토페린 복합 최소저해농도	나이신 20% (0.8 mg/ ml) 키토산 40% (8 mg/ ml) 락토페린 20% (40 mg/ ml)	나이신 20% (0.8 mg/ ml) 키토산 50% (10 mg/ ml) 락토페린 20% (40 mg/ ml)	나이신 5% (0.2 mg/ ml) 키토산 60% (12 mg/ ml) 락토페린 30% (60 mg/ ml)
최종 최소첨가농도	나이신 30% (한천배지: 0.3 mg/ml, 액상배지: 1.2 mg/ml) 키토산 올리고당 60% (한천배지: 12 mg/ml, 액상배지: 12 mg/ ml) 락토페린 35% (한천배지: 4.375 mg/ ml, 액상배지: 70 mg/ ml)		

<표 1> 선정된 모든 식중독 지표균의 저해 가능한 최소첨가농도 (단위 mg/ml)

- <표 1>과 같이 나이신, 키토산 올리고당, 락토페린 최소저해농도(MIC)를 활용하여 2년 차 연구 결과인 최적 조합된 복합 천연 미생물 저해제를 제조 후 Standard agar well diffusion method를 활용한 재검증 평가를 <그림 1>과 같이 실시함



•NC : Negative control
 •Nis⁺ : Nisin MIC (1 mg/ml)
 •Chi⁺ : Chitosan oligosaccharide MIC (20 mg/ml)
 •Lac⁺ : Bovine lactoferrin MIC (12.5 mg/ml)
 •Nis 35 + Chi 60 + Lac 35
 Nis 35 : 35% of nisin MIC (0.35 mg/ml)
 Chi 60 : 60% of chitosan oligosaccharide MIC (12 mg/ml)
 Lac 35 : 35% of bovine lactoferrin MIC (4.375 mg/ml)

<그림 1> 한천배지 조건에서 식중독 지표균에 대한 나이신, 키토산 올리고당 및 락토페린 복합천연미생물저해제의 최소첨가농도 저해능 재검증 분석 결과

- <그림 1>과 같이 최적 조합된 나이신, 키토산 올리고당, 락토페린의 최소저해농도(MIC)의 재평가 분석을 통하여 최종 결정된 최적조합비율 및 농도를 갖도록 3가지 천연미생물저해제를 희석한 후 혼합하고 멸균용 필터(0.22 μm diameter)를 활용하여 filtration처리 후 무균 비닐 팩에 보관한 스프레이 용기에 담아 -20도에 보관함
- 개발된 복합천연미생물저해제는 <그림 2>와 같음



<그림 2> 개발된
복합천연미생물저해제

{최종농도 : 나이신 30% (1.2 mg/ml), 키토산 올리고당 60% (12 mg/ml), 락토페린 35% (70 mg/ ml)}

- 개발된 복합 천연미생물저해제에 대한 평가에 앞서 육안적으로 색상, 맛, 향미, 점도를 평가하여 <표 2>에 정리함

평가항목	
색상	옅은 황색빛
맛	無味
향	無香
점도	약간 끈끈함

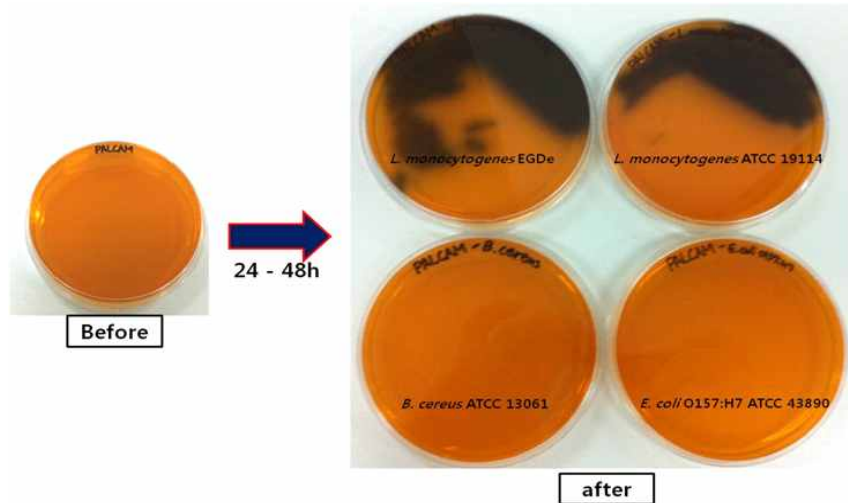
<표 2> 개발된 복합
천연미생물저해제의 일반적 평가표

◆ 각 식중독균에 대하여 선택배지를 활용한 특이적 검출 검증 연구

<PALCAM 선택배지를 이용한 선택적 검출에 대한 검증 실험>

- RTE 식품 내 잔존하는 미생물 검출에 앞서 본 과제를 수행하기 위해 사용되는 식중독균의 집락을 특이적으로 성장시키기 위한 선택배지를 선택 후 검증 연구를 실시함
- *L. monocytogenes*의 경우 특이적으로 검출 가능한 선택배지로 기산 바이오텍 社의 PALCAM agar로 PALCAM agar 및 PALCAM supplement 내 포함된 lithium chloride, polymyxin B sulfate, acriflavine HCl 등의 성분에 의해 *L. monocytogenes*를 제외한 기타 그람 양성균 및 그람 음성균이 억제된 상태에서 Bile esculin 가수분해 및, mannitol 발효 여부에 따라 *L. monocytogenes*를 흑색빛의 띄는 집락으로 선택적 성장이 가능하도록 함

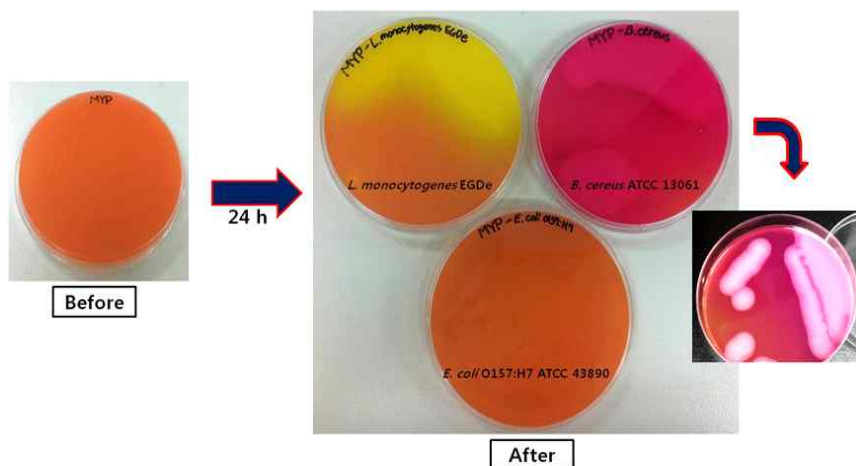
- PALCAM agar에 따른 각 식중독 균주에 대한 특이적 성장에 대한 검증 연구 결과는 <그림 3>과 같음



<그림 3> 각 식중독균에 따른 PALCAM agar의 특이적인 집락 성장 비교

<MYP 선택배지를 이용한 선택적 검출에 대한 검증 실험>

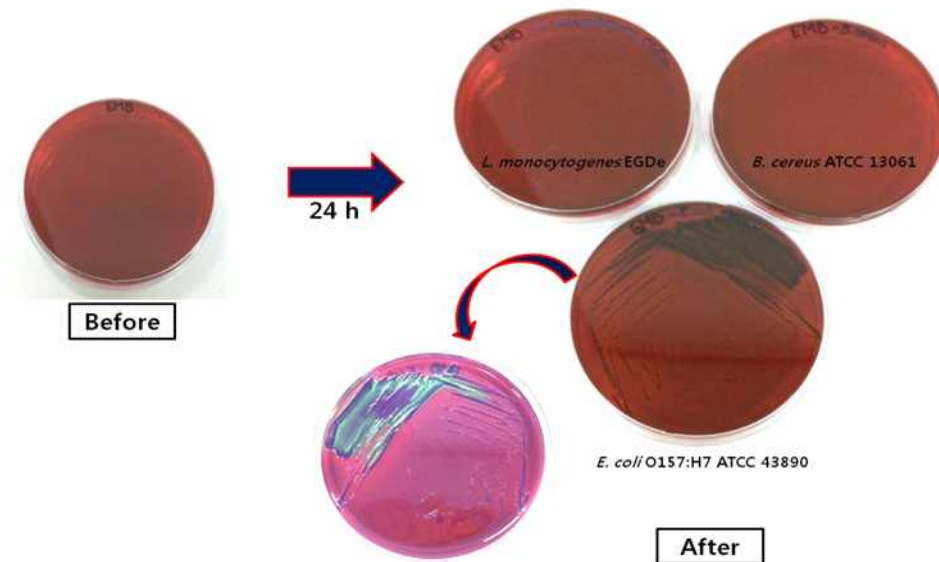
- *B. cereus*의 경우 특이적으로 검출 가능한 선택배지로 기산 바이오텍 社의 MYP (Mannitol-Egg yolk-Polymxin) agar로 MYP agar 및 MYP supplement 내 포함된 polymyxin B 등의 성분에 의해 *B. cereus*를 제외한 기타 그람 음성균들이 억제된 상태에서 lecthin 가수분해 양성 및, mannitol 음성 여부에 따라 *B. cereus*를 핑크색 환 형태의 집락을 선택적으로 성장하도록 함
- MYP agar에 따른 각 식중독 균주에 대한 특이적 성장에 대한 검증 연구 결과는 <그림4>와 같음



<그림 4> 각 식중독균에 따른 MYP agar의 특이적인 집락 성장 비교

<EMB 선택배지를 이용한 선택적 검출에 대한 검증 실험>

- *E. coli* O157:H7의 경우 식품 공전상에 명시된 대장균 검출에 대한 완전 시험법에서 특이적으로 검출 가능한 선택배지로 EMB (Eosin Methylene blue) agar 및 SMAC(Sorbitol Macconkey) agar 를 사용하며 본 과제를 수행하기 위해 기산 바이오텍 社의 EMB agar 및 SMAC agar를 사용하였음
- EMB agar의 경우 조직 및 세포 염색 및 pH 지시반응에 쓰이는 Eosin 및 Methylene blue 를 사용하여 각 균들의 성장에 따른 Lactose의 발효 또는 비발효 유무에 따른 집락의 색상을 통한 감별로 짙은 녹색의 금속성 광택(Metalic sheen)을 띤 집락을 *E. coli*균으로 간주하여 분리함
- EMB agar에 따른 각 식중독 균주에 대한 특이적 성장에 대한 검증 연구 결과는 <그림5>와 같음

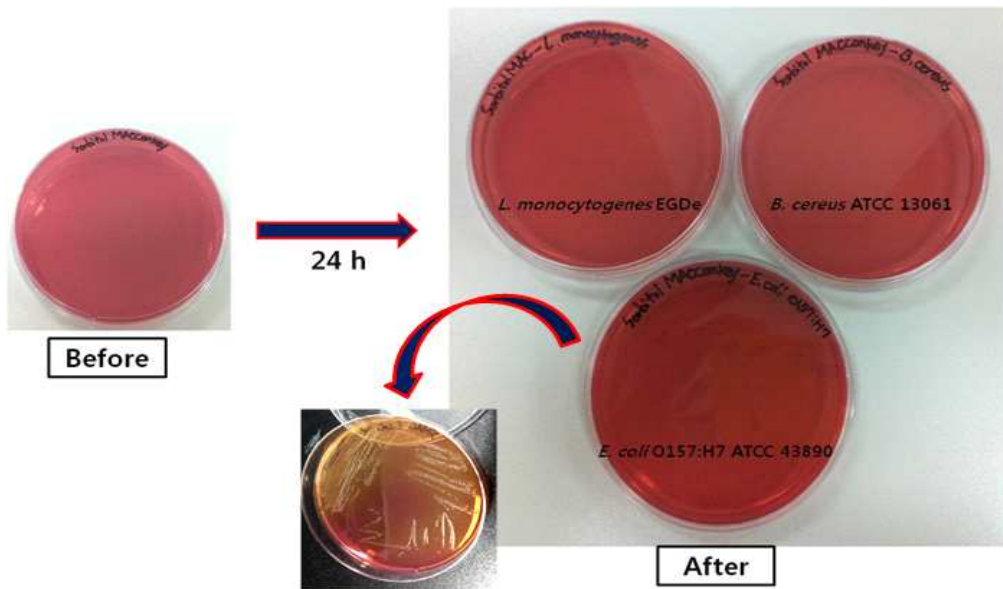


<그림 5> 각 식중독균에 따른 EMB agar의 특이적인 집락 성장 비교

<SMAC 선택배지를 이용한 선택적 검출에 대한 검증 실험>





- SMAC agar의 경우 EMB agar를 통하여 분리된 짙은 녹색의 금속성 광택(Metalic sheen)을 띤 *E. coli*균에 대하여 Sorbitol의 비발효 능력을 구분점으로 핑크색 집락을 띤 일반 대장균과 무색 집락을 띤 장관출혈성 대장균인 *E. coli* O157:H7 을 특이적으로 분리하며 SMAC agar 및 SMAC supplement에 포함되는 bile salt, saltcrystal violet, tellurite 및 cefixime 등에 의해 기타 그람 양성균 및 그람 음성균들의 성장이 저해됨

- SMAC agar에 따른 각 식중독 균주에 대한 특이적 성장에 대한 검증 연구 결과는 <그림 6>과 같음



<그림 6> 각 식중독균에 따른 SMAC agar의 특이적인 집락 성장 비교

- 각 식중독 균주에 대해 특이적인 집락을 보이는 각 선택배지에 대한 내용은 <표 3>에 정리하였음

선택배지명	검출 균주	생화학적 성상 및 결과
 PALCAM agar	<i>L. monocytogenes</i>	<ul style="list-style-type: none"> Lithium chloride, polymyxin B sulfate, acriflavine HCl, ceftazidime 성분에 의한 <i>L. monocytogenes</i> 선택적 성장 Mannitol 발효능 Bile esculin 가수분해에 의해 흑색의 colony를 형성함.
 MYP agar	<i>B. cereus</i>	<ul style="list-style-type: none"> Polymyxin B의 작용으로 그람 음성균 억제 Lecithinase 및 난백 분해능에 따른 투명대 형성 Mannitol 발효능에 따른 색상 변화로: 핑크색의 colony를 형성함.
 EMB agar	<i>E. coli</i> 또는 기타 그람음성균	<ul style="list-style-type: none"> 배지내 염료 성분인 eosin Y 및 mthylene blue 성분이 그람 양성균 억제 Lactose 발효 및 비발효 능력에 따른 배지내 pH의 변화로 인한 색상 변화 <i>E. coli</i>: 짙은 녹색의 금속성 광택 기타 그람 음성균주: 무색 및 호박색
 Sorbitol Macconkey agar	<i>E. coli</i> O157:H7 또는 <i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> 배지내 성분인 Crystal violet에 따른 그람 양성균 저해 배지내 성분인 Sorbitol 분해 및 비분해 능력에 따른 colony의 색상 변화 <i>E. coli</i> O157:H7: 무색 투명한 colony <i>E. coli</i>: 핑크색 colony

<표 3> 각 식중독 균에 대한 선택배지에 대한 내용 요약표

◆ 3 가지 식중독균에 대하여 특이적 프라이머를 활용한 PCR (Polymerase chain reaction) 검증 연구

<각 식중독균에 대한 Species-specific primer를 이용한 PCR 검증 연구>

- DNA에 존재하는 특정 유전자 정보를 활용하여 3 가지 각 식중독균의 특이적 검출을 위해 식중독균 검출 관련 논문 및 질병 관리 본부 등 국가 기관에서 제공하는 국내 식중독균 검출 분석법을 통하여 얻은 프라이머 정보를 이용하여 마크로젠社에 제작 의뢰하였으며 본 연구 과제에 사용될 프라이머 정보에 대한 내용은 <표 4>와 같음

Foodborne pathogens	Sequence	Strand	Oligomer	Tm °C
Amplicon Size = 453 bp (<i>lmo 0733 gene: similar gene to transcription regulator</i>)				
<i>L. monocytogenes</i>	CGCAAGAAGAAATTGCCATC	forward	21	56.4
	TCCGGGTTAGAAAAATTCCA	reverse	20	54.3
참고 문헌	Dongyou Liu, A. Jerald Ainsworth, Frank W. Austin, Mark L. Lawrence, 2004. Use of PCR primers derived from a putative transcriptional regulator gene for species-specific determination of <i>L. monocytogenes</i> . Int. Food Microbiol. 91, 297-304			
Amplicon Size = 328 bp (<i>nhe B gene: Non hemolytic enterotoxin genes</i>)				
<i>B. cereus</i>	GTGCAGCAGCTGTAGGCGGT	forward	20	60.5
	ATGTTTTCCAGCTATCTTCGCAAT	reverse	26	61.6
참고 문헌	Seon Je Seong, Ji Su Lim, Kwang Geun Lee, Seung Ju Lee, and Kwang Won Hong, 2008. Toxin Gene Profiling of <i>Bacillus cereus</i> Food Isolates by PCR. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 51(4), 263-268.			
Amplicon Size = 391 bp (<i>stx 1 gene: Shiga-like toxin gene</i>)				
<i>E. coli</i> O157:H7	CGTCTTACTGATGATTGAT	forward	20	52.3
	GCTGTCACAGTAACAAACCG	reverse	20	58.4
참고 문헌	A. Mark Ibekwe, Pamela M. Watt, Catherine M. Grieve, Vijay K. Sharma, and Steven R. Lyons, 2002. Multiplex Fluorogenic Real-Time PCR for Detection and Quantification of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in Dairy Wastewater Wetlands. J. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4853-4862			

<표 4> 각 식중독균의 primer sequence 정보

- <표 4>에 각 식중독균의 primer sequence 정보를 통하여 마크로젠社에 의뢰하여 제작된 프라이머를 이용하여 각 식중독균에 대해 특정 유전자인지를 검증하기 위해 각 식중독균에서 추출한 DNA를 이용하여 PCR 진행 후 결과를 확인함
- 각 식중독균에 대해 특정 유전자인지를 검증하기 위해 사용되는 식중독균들을 37도에서 12시간 배양 후 1.5 ml 튜브에 1 ml을 취하여 13,000 rpm에서 1 분간 원심분리후 상층액을 버리고 3차 증류수 세척 과정을 두 번 거쳐 여분의 배지성분을 제거함

- 배지성분 제거 후 200 μ l의 3차 증류수와 유리비드를 첨가 후 비드비터로 30 초간 세포를 깬 다음 얼음에 30 분간 방치하여 열을 식힌 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리를 통해 상층에 존재하는 DNA를 200 μ l를 취하여 새로운 1.5 ml 튜브에 담아 -20도에 보관하였으며 보관 전 DNA 농도를 측정한 결과는 <표 5>와 같음

Gram stain	strain	260 / 280 _{nm}	Concentration
Gram-positive bacteria	<i>L. monocytogenes</i> EGD-e	1.89	352.4 μ g/ml
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114	1.81	335.5 μ g/ml
	<i>L. monocytogenes</i> Scott A	1.80	330.6 μ g/ml
	<i>L. innocua</i> ATCC 33090	2.08	429.7 μ g/ml
	<i>B. cereus</i> ATCC 13061	1.84	341 μ g/ml
	<i>B. cereus</i> ATCC 10876	1.87	357.1 μ g/ml
	<i>B. cereus</i> ATCC 14579	1.81	346.8 μ g/ml
	<i>B. cereus</i> ATCC 21772	1.94	396.4 μ g/ml
	<i>B. cereus</i> ATCC 21786	1.83	383.9 μ g/ml
	<i>B. cereus</i> ATCC 27348	1.84	352.5 μ g/ml
	<i>B. licheniformis</i> MZA24	1.95	390.1 μ g/ml
	<i>B. amyloliquefaciens</i> KCTC 1660	1.79	327.3 μ g/ml
	<i>B. subtilis</i> KCTC 3239	2.00	407.3 μ g/ml
Gram-negative bacteria	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43888	1.86	384.7 μ g/ml
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43890	1.91	329.4 μ g/ml
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43894	1.85	327.5 μ g/ml
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	1.87	365.9 μ g/ml
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 35150	2.16	399.3 μ g/ml
	<i>E. coli</i> MG 1655	2.06	383.5 μ g/ml
	<i>E. coli</i> DH5 α	2.13	398.4 μ g/ml

<표 5> 특정 유전자에 대해 PCR 검증을 위한 각 식중독균의 Total DNA 농도 측정

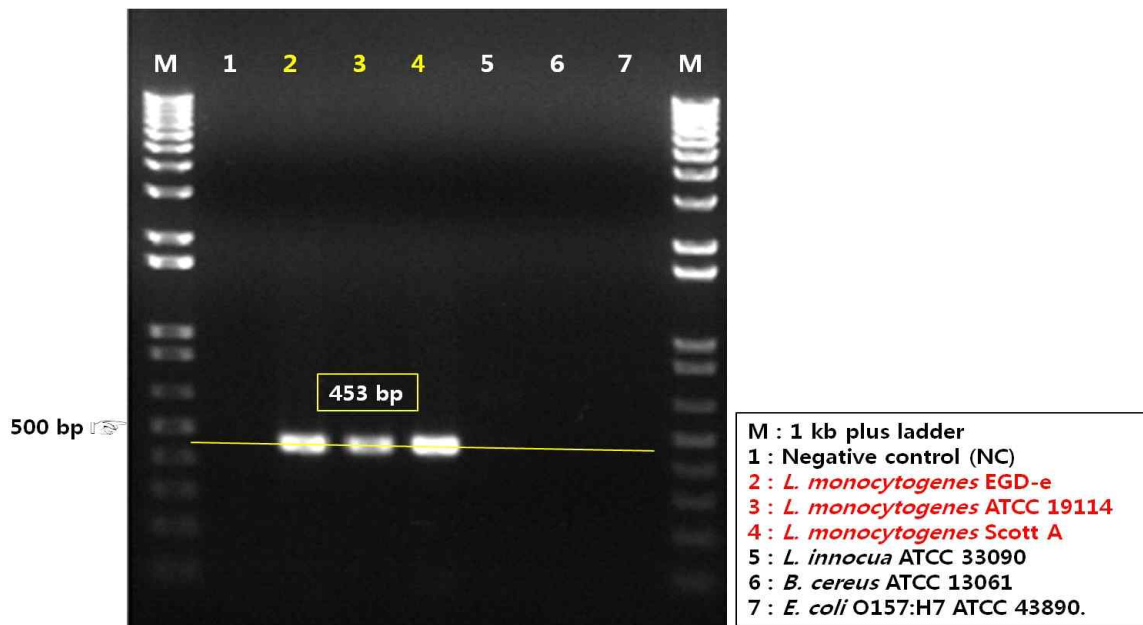
- <표 5>와 같이 DNA 농도를 측정 후 각 식중독균에 대한 PCR 최적 조건을 <표 6>에 정리함

Procedure	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
Pre denaturation	95° C - 3 min	95° C - 3 min	95° C - 3 min
Denaturation	95° C - 30 sec	95° C - 30 sec	95° C - 30 sec
Annealing	52° C - 30 sec	58° C - 30 sec	56° C - 30 sec
Extension	72° C - 1 min	72° C - 1 min	72° C - 1 min
Final extension	72° C - 5 min	72° C - 5 min	72° C - 5 min

<표 6> 각 식중독균의 특정 유전자에 대하여 PCR 증폭을 위한 PCR 조건

< *L. monocytogenes*의 Species specific primer를 이용한 PCR 검증 연구 >

- <표 6>의 조건을 통하여 *L. monocytogenes*의 특정 유전자인 *lmo0733 gene* (453 bp)의 검출을 위해 PCR을 진행한 결과는 <그림 7>과 같음

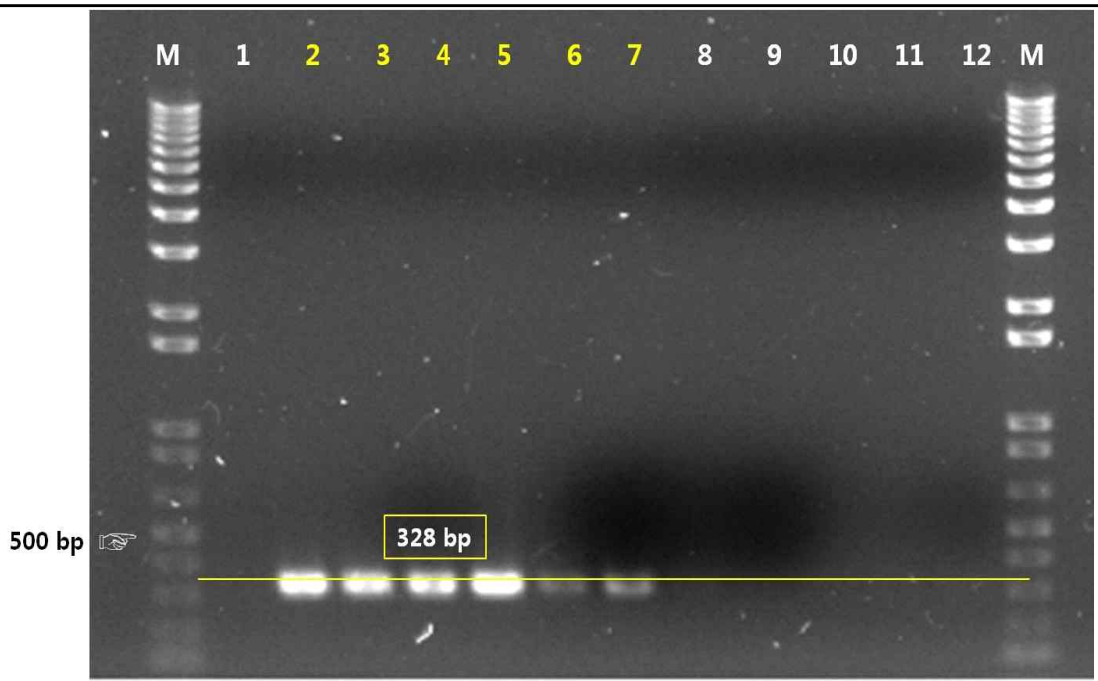


<그림 7> PCR을 통하여 증폭된 *L. monocytogenes*의 *lmo 0733* (453 bp) 특정 유전자의 전기영동 상 결과 확인

- <그림 7>에서 보는 바와 같이 *lmo0733* (453 bp) 특정 유전자를 이용한 프라이머로 PCR 증폭 후 전기영동으로 확인한 결과 *L. monocytogenes* 종이 특이적으로 검출됨

< *B. cereus* 의 Species-specific primer를 이용한 PCR 검증 연구 >

- <표 6>의 조건을 통하여 *B. cereus*의 특정 유전자인 *nheB gene* (328 bp)의 검출을 위해 PCR을 진행한 결과는 <그림 8>과 같음



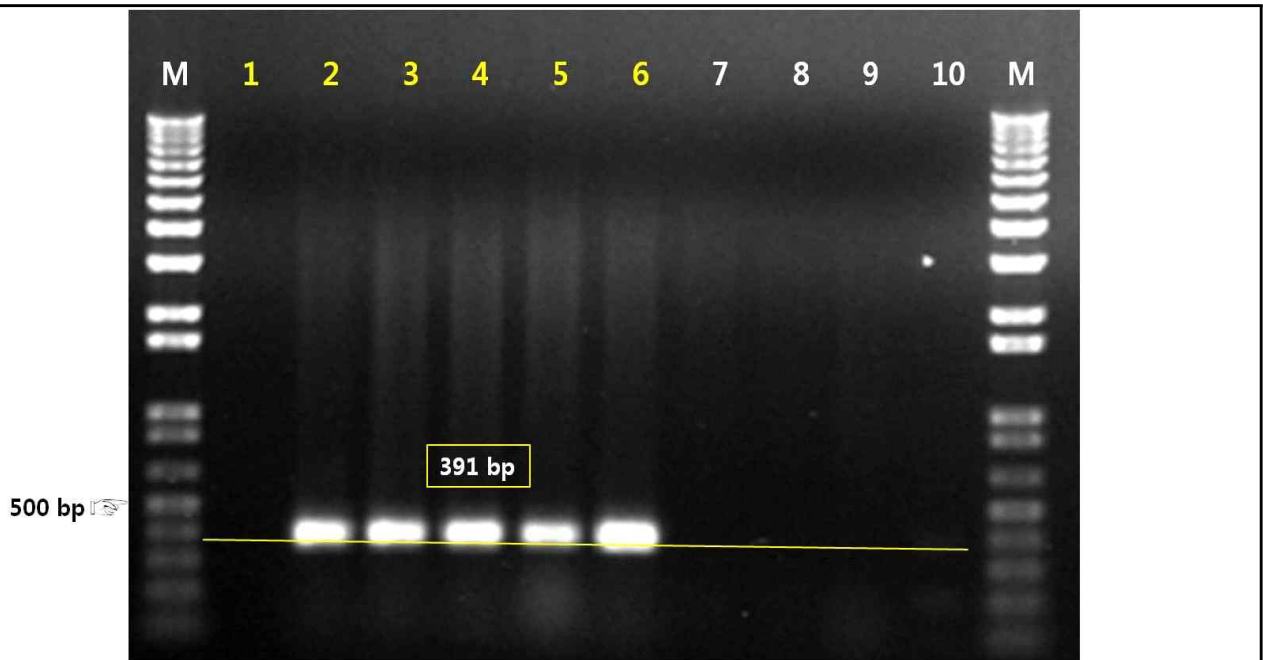
M : 1 kb plus ladder 1 : Negative control (NC). 2 : *B. cereus* ATCC 13061, 3 : *B. cereus* ATCC 10876 , 4 : *B. cereus* ATCC 14579, 5 : *B. cereus* ATCC 21772, 6 : *B. cereus* ATCC 21786, 7 : *B. cereus* ATCC 27348, 8 : *B. licheniformis* MZA24, 9 : *B. amyloliquefaciens* KCTC, 1660, 10 : *B. subtilis* KCTC 3239, 11 : *L. monocytogenes* EGD-e, 12 : *E. coli* O157:H7 ATCC 43890.

<그림 8> PCR을 통하여 증폭된 *B. cereus*의 *nheB gene* (328 bp) 특정 유전자의 전기영동 상 결과 확인

- <그림 8>에서 보는 바와 같이 *nheB gene* (328 bp) 특정 유전자를 이용한 프라이머로 PCR 증폭 후 전기영동으로 확인한 결과 *B. cereus* 종이 특이적으로 검출됨

<*E. coli* O157:H7 의 Species-specific primer를 이용한 PCR 검증 연구 >

- <표 6>의 조건을 통하여 *E. coli* O157:H7의 특정 유전자인 *stx1 gene* (391 bp)의 검출을 위해 PCR을 진행한 결과는 <그림 9>와 같음



M : 1 kb plus ladder 1 : Negative control (NC)
 2 : *E. coli* O157:H7 ATCC 43888, 3 : *E. coli* O157:H7 ATCC 43890, 4 : *E. coli* O157:H7 ATCC 43894,
 5 : *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, 6 : *E. coli* O157:H7 ATCC 35150, 7 : *E. coli* MG 1655, 8 : *E. coli* DH5 α ,
 9 : *L. monocytogenes* EGDe, 10 : *B. cereus* ATCC 13061.

<그림 9> PCR을 통하여 증폭된 *E. coli* O157:H7의 *stx1 gene* (391 bp) 특정 유전자의 전기영동 상 결과 확인

- <그림 9>에서 보는 바와 같이 *stx1 gene* (391 bp) 특정 유전자를 이용한 프라이머로 PCR 증폭 후 전기영동으로 확인한 결과 *E. coli* O157:H7 균주가 특이적으로 검출됨
- 본 실험을 통하여 앞으로 진행될 선택배지 및 PCR 증폭을 위한 특이적 검출 효과를 검증함

[3차년도 연구결과 - 천연복합저해제의 RTE 식품 적용]

1. 선택배지 및 각 식중독균 검출을 위해 제작된 특이적인 프라이머를 이용한 PCR을 통하여 실제 RTE 식품 내 잔존하는 식중독균의 저해 유무 확인

1.1. 선택배지를 이용한 RTE 식품 내 잔존 미생물의 정성적 검출 및 저감화 확인

- 본 과제를 통하여 선정된 3 종류의 즉석식품 (샌드위치, 김밥, 샐러드)를 인근 대형 마트 및, 대학교 내 매점 등에서 직접 구매하여 즉석식품 (RTE : Ready to eat)내에 실제 잔존하는 미생물의 존재 여부와 저감화를 선택배지 및 PCR을 통하여 <그림 10>과 같이 정성적으로 확인하고자 함

❖ Samples preparation

샘플	항균제 분사량					
	0	1	2	3	4	5
샌드위치	0	1	2	3	4	5
김밥	0	1	2	3	4	5
샐러드	0	1	2	3	4	5



즉석식품 내 잔존 미생물의 존재 여부 및 저감화 확인



<그림 10> 선택배지 및 PCR을 이용한 즉석식품 내 잔존 미생물의 정성적 존재 확인 및 저감화 연구 방법 모식도

<샌드위치 샘플 내 잔존 미생물의 정성적 검출 및 저감화 확인>

- <그림 10> 방법을 토대로 대형 마트 및 학교 매점에서 구매한 샌드위치 샘플을 각각 25 g 씩 정량하여 항균제를 0회 분사한 비 처리군 및 5, 10, 15, 20 회 분사한 처리군으로 나누어 분사하고 세척 및 70% 에탄올로 소독된 식품 보관용 용기에 담아 4도씨 냉장 온도에서 12 시간 보관함
- 4도씨 냉장 온도에서 12 시간 보관한 샘플을 탈리용 멸균백에 0.1% 펩톤수 225 ml과 혼합하여 30 초간 탈리 과정을 거친 후 50 ml 멸균 튜브에 옮겨 넣어 1,500 rpm에서 10 분간 원심분리하고 식품 성분을 제거 후 상층액 부분을 다시 8,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 식품 내 잔존하는 세포들을 모은 후 상층액을 제거하고 남은 세포들을 농축하고 1.5 ml 튜브에 분주함
- 농축된 세포를 백금이로 각각의 선택배지에 streaking하여 37도에서 24 ~48 시간 배양 후 각 선택배지에서 특이적으로 성장한 의심 집락을 3 반복 실험을 통하여 확인함
- 선택배지를 이용한 샌드위치 샘플에 대한 잔존 미생물의 분리 기준 및 존재 여부는 <표

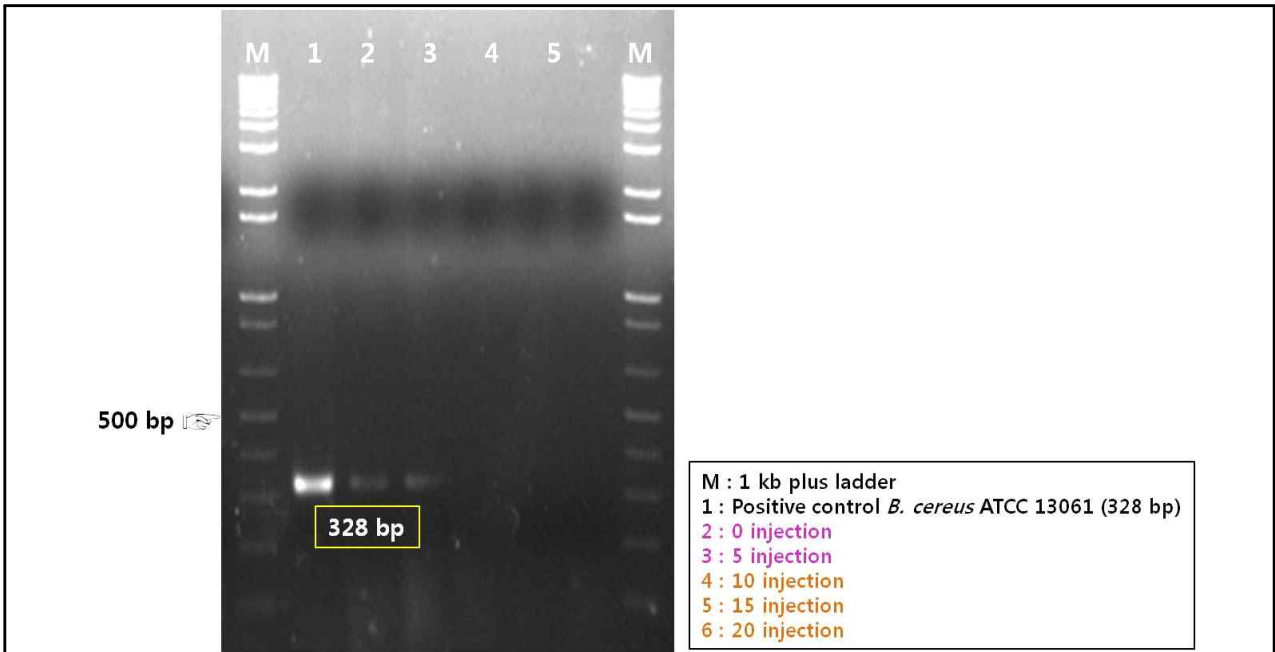
7>과 같음

선택배지	선택적 성장 가능균주 및 집락의 색상
PALCAM agar	<i>L. monocytogenes</i> EGDe
MYP agar	<i>B. cereus</i>
	Unknown
EMB agar	<i>E. coli</i>
Sorbitol MAC agar	<i>E. coli</i> O157:H7

샌드위치 샘플	분사량				
	0	5	10	15	20
12 시간 배양					
<i>L. monocytogenes</i>	불검출				
<i>B. cereus</i>					
<i>E. coli</i> O157:H7			불검출		

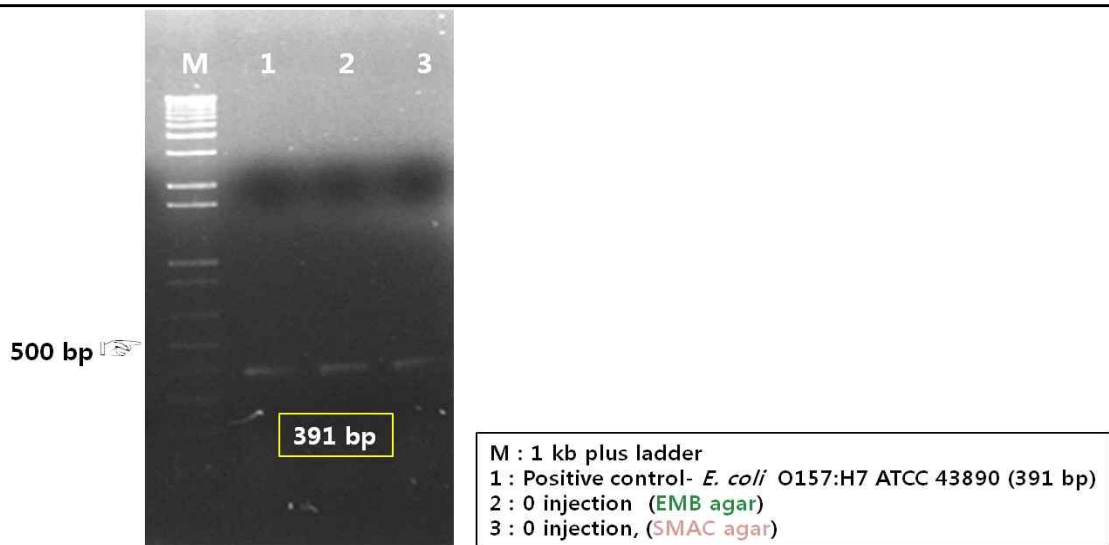
<표 7> 선택배지를 이용한 샌드위치 샘플 내 잔존 미생물의 정성적 존재 여부 확인

- <표 7>에서 보는 바와 같이 선택배지를 활용하여 샌드위치 샘플 내 잔존하는 미생물의 존재 여부를 확인한 결과 *L. monocytogenes*의 경우 검출되지 않았으며 *B. cereus*의 경우 5회 분사량에서는 의심 집락이 검출되었으나 10회 이후부터는 억제되는 양상을 보였고 *E. coli* O157:H7의 경우 분사하지 않은 미 처리군에서만 의심 집락이 검출되었음
- 선택배지에서 특이적으로 검출된 노란색의 기타 다른 세균의 집락과 핑크색의 검출된 *B. cereus* 및 EMB agar와 SMAC agar상에서 검출된 *E. coli* O157:H7 의심 집락을 각각 1.5 ml 튜브에 넣고 1 ml의 3차 증류수로 첨가하여 희석 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 상층액을 버리고 모아진 세포의 세척함
- 세척 과정을 거친 박테리아 세포 농축물을 200 µl의 3차 증류수와 유리비드를 첨가하여 30 초간 비트비터로 세포 파쇄과정을 거치고 30 분 간 얼음에 방치하여 열에 대한 안정화 과정 후 13,000 rpm에서 1 분간 원심분리과정을 거쳐 DNA가 포함되어 있는 상층액을 추출함
- 추출된 DNA를 <표 6>의 PCR 조건에 따라 PCR 증폭과정을 거쳐 1.5% agarose gel을 이용한 전기영동을 통한 검출을 통하여 즉석식품 내 잔존하는 식중독균의 분포 및 각 분사량에 따른 저해양상을 확인함
- 샌드위치 샘플에서 선택배지를 통하여 검출된 *B. cereus* 및 *E. coli* O157:H7 의심 균주에 대한 PCR 결과는 <그림 11>과 같음



<그림 11> PCR을 활용한 샌드위치 샘플 내 *B. cereus* 의심 균주의 정성적 존재 여부 확인

- <그림 11>에서 보는 바와 같이 MYP agar 상에서 명확하게 보였던 0회 및 5회 분사한 샌드위치 샘플에서 검출된 핑크색 *B. cereus* 의심 집락에서 추출한 DNA를 PCR로 증폭한 결과 전기영동 상에서 328 bp 부분에 밴드가 관찰되었으며 10, 15, 및 20회 분사한 샌드위치 샘플에서 검출된 노란색 집락으로부터 추출한 DNA를 PCR로 증폭 후 전기영동 상으로 확인한 결과 검출되지 않았던 것으로 보아 *B. cereus* 이외의 기타 다른 세균으로 간주됨.
- 샌드위치 샘플에서 선택배지를 통하여 검출된 *E. coli* O157:H7 의심 균주는 먼저 EMB agar에 접종 후 자란 집락과 다시 SMAC agar에 접종하여 검출된 집락을 streaking 후 37도에서 12시간 배양하여 선택적으로 검출된 집락으로부터 추출한 DNA를 PCR로 증폭 후 검출 및 저감화를 확인하였으며 이에 대한 PCR 결과는 <그림 12>와 같음



<그림 12> PCR을 활용한 샌드위치 샘플 내 *E. coli* O157:H7 의심 균주의 정성적 존재 여부 확인

- <그림 12>에서 보는 바와 같이 EMB agar 및 SMAC agar 상에서 명확하게 보였던 0회 분사한 항균제 미처리 샌드위치 샘플에서 검출된 짙은 녹색의 금속성 광택 *E. coli* 의심 집락 및 이 런 집락을 다시 SMAC agar에 재접종하여 검출된 무색투명의 *E. coli* O157:7 의심 균주에서 추출한 DNA를 PCR로 증폭한 결과 전기영동 상에서 391 bp 부분에 밴드가 관찰되었으며 5, 10, 15, 및 20회 분사한 샌드위치 샘플에 대해서는 집락이 관찰되지 않았음

<김밥 샘플 내 잔존 미생물의 정성적 검출 및 저감화 확인>

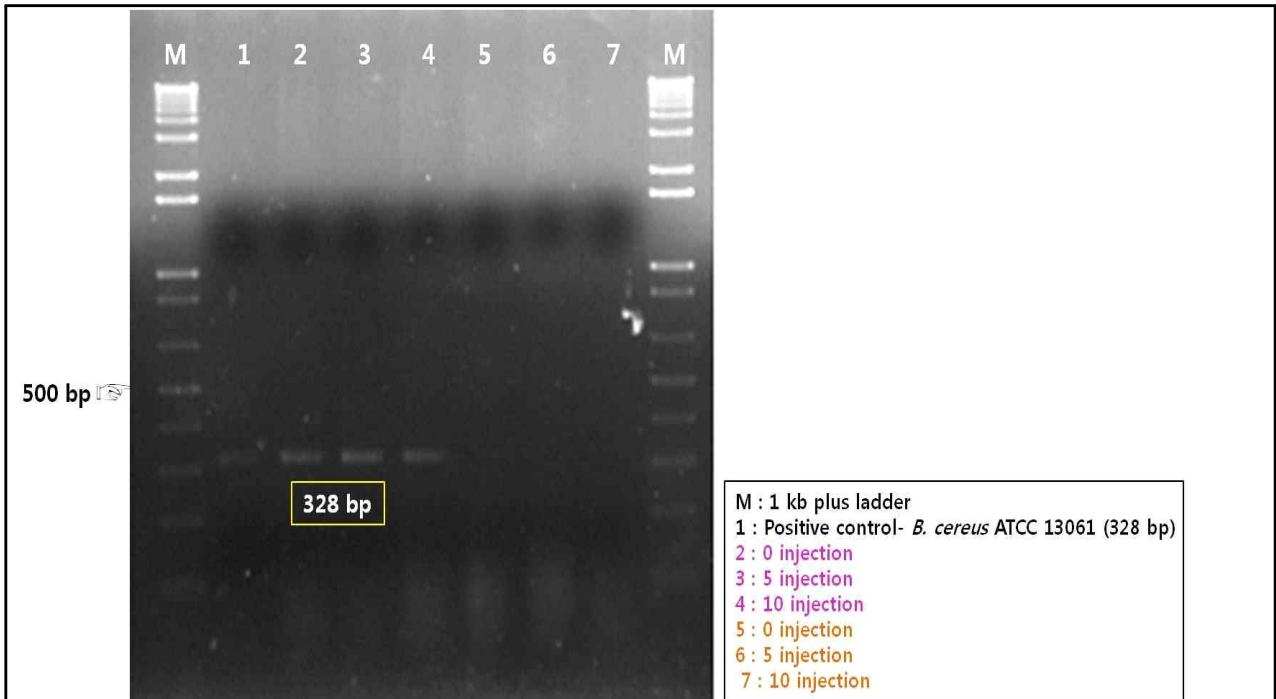
- <그림 10> 방법을 토대로 대형 마트 및 학교 매점에서 구매한 김밥 샘플을 각각 25 g씩 정량하여 항균제를 0회 분사한 비 처리군 및 5, 10, 15, 20 회 분사한 처리군으로 나누어 분사하고 세척 및 70% 에탄올로 소독된 식품 보관용 용기에 담아 4도씨 냉장 온도에서 12 시간 보관함
- 4도씨 냉장 온도에서 12 시간 보관한 샘플을 탈리용 멸균백에 0.1% 펩톤수 225 ml과 혼합하여 30 초간 탈리 과정을 거친 후 50 ml 멸균 튜브에 옮겨 넣어 1,500 rpm에서 10 분간 원심분리하고 식품 성분을 제거하여 상층액 부분을 다시 8,000 rpm에서 10 분간 원심분리 과정을 진행하여 식품 내 잔존하는 세포들을 모은 후 상층액을 제거함
- 상층액 제거 후 남은 세포들을 농축하고 1.5 ml에 분주하여 백금이를 이용하여 각각의 선택배지에 streaking하여 37도에서 24 ~48 시간 배양 후 각 선택배지에서 특이적으로 성장한 집락을 3 반복 실험을 통하여 확인함
- 선택배지를 이용한 샌드위치 샘플에 대한 잔존 미생물의 분리 기준 및 존재 여부는 <표 8>과 같음

선택배지	선택적 성장 가능균주 및 집락의 색상
PALCAM agar	<i>L. monocytogenes</i> EGDe
MYP agar	<i>B. cereus</i>
	<i>B. subtilis</i>
EMB agar	<i>E. coli</i>
Sorbitol MAC agar	<i>E. coli</i> O157:H7

김밥 샘플 12 시간 배양	분사량				
	0	5	10	15	20
<i>L. monocytogenes</i>	불검출				
<i>B. cereus</i>	10%			불검출	
	90%				
<i>E. coli</i> O157:H7	불검출				

<표 8> 선택배지를 이용한 김밥 샘플 내 잔존 미생물의 정성적 존재 여부 확인

- <표 8>에서 보는 바와 같이 선택배지를 활용하여 김밥 샘플 내 잔존하는 미생물의 존재 여부를 확인한 결과 *L. monocytogenes*의 경우 검출되지 않았으며 *B. cereus*의 경우 0, 5 및 10회 분사량에서는 10개의 집락 당 1개 정도의 비율로 의심 집락이 검출되었으며 대부분 기타 다른 세균들이 집락 10개당 9 개의 비율로 대부분을 차지하였으며 15회 이후부터는 억제되는 양상을 보였고 *E. coli* O157:H7의 경우에도 검출되지 않았음
- 선택배지에서 특이적으로 검출된 노란색의 기타 다른 세균의 집락과 핑크색의 *B. cereus* 의심 집락을 각각 1.5 ml 튜브에 넣고 1 ml의 3차 증류수로 첨가하여 희석 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 상층액을 버리고 모아진 세포의 세척함
- 세척한 박테리아 농축 세포에 200 µl의 3차 증류수와 유리비드를 첨가하여 30 초간 비트비터로 세포 파쇄과정을 거치고 30 분 간 얼음에 방치하여 열에 대한 안정화 과정 후 13,000 rpm에서 1 분간 원심분리과정을 거쳐 DNA가 포함되어 있는 상층액을 추출함
- 추출된 DNA를 <표 6>의 PCR 조건에 따라 PCR 증폭과정을 거쳐 1.5% agarose gel을 이용한 전기영동을 통한 검출을 통하여 즉석식품 내 잔존하는 식중독균의 분포 및 각 분사량에 따른 저해양상을 확인함
- 김밥 샘플에서 선택배지를 통하여 검출된 *B. cereus* 의심 균주에 대한 PCR 결과는 <그림 13>과 같음



<그림 13> PCR을 활용한 김밥 샘플 내 *B. cereus* 의심 균주의 정성적 존재 여부 확인

- <그림 13>에서 보는 바와 같이 MYP agar 상 0, 5 및 10회 분사한 샌드위치 샘플에서 검출된 핑크색 *B. cereus* 의심 집락에서 추출한 DNA를 PCR로 증폭한 결과 전기영동 상에서 328 bp 부분에 밴드가 관찰되었으며 0, 5, 및 10회 분사한 샌드위치 샘플에서 검출된 노란색 집락으로부터 추출한 DNA를 PCR로 증폭 후 전기영동 상으로 확인한 결과 검출되지 않았던 것으로 보아 *B. cereus* 이외의 기타 다른 세균으로 간주됨.

<샐러드 샘플 내 잔존 미생물의 정성적 검출 및 저감화 확인>

- <그림 10> 방법을 토대로 대형 마트 및 학교 매점에서 구매한 샐러드 샘플을 각각 25 g씩 정량하여 항균제를 0회 분사한 비 처리군 및 5, 10, 15, 20 회 분사한 처리군으로 나누어 분사하고 세척 및 70% 에탄올로 소독된 식품 보관용 용기에 담아 4도씨 냉장 온도에서 12 시간 보관함
- 4도씨 냉장 온도에서 12 시간 보관한 샘플을 탈리용 멸균백에 0.1% 펩톤수 225 ml과 혼합하여 30 초간 탈리 과정을 거친 후 50 ml 멸균 튜브에 옮겨 넣어 1,500 rpm에서 10 분간 원심분리하여 식품 성분을 제거하고 상층액 부분을 다시 8,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 식품 내 잔존하는 세포들을 모은 후 상층액을 제거여 남은 세포들을 농축함
- 농축된 박테리아 세포를 백금이로 각각의 선택배지에 streaking하여 37도에서 24 ~48 시간 배양 후 각 선택배지에서 특이적으로 성장한 의심 집락을 3 반복 실험을 통하여 확인함

- 선택배지를 이용한 샌드위치 샘플에 대한 잔존 미생물의 분리 기준 및 존재 여부는 <표 9>과 같음

선택배지	선택적 성장 가능균주 및 집락의 색상
PALCAM agar	<i>L. monocytogenes</i> EGDe
MYP agar	<i>B. cereus</i>
	Unknown
EMB agar	<i>E. coli</i>
Sorbitol MAC agar	<i>E. coli</i> O157:H7

샐러드 샘플	분사량				
	0	5	10	15	20
12 시간 배양	불검출				
<i>L. monocytogenes</i>					
<i>B. cereus</i>					
<i>E. coli</i> O157:H7					

<표 9> 선택배지를 이용한 샐러드 샘플 내 잔존 미생물의 정성적 존재 여부 확인

- <표 9>에서 보는 바와 같이 선택배지를 활용하여 김밥 샘플 내 잔존하는 미생물의 존재 여부를 확인한 결과 *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7의심 균주가 검출되지 않았음
- 샐러드 샘플 내에서 본 과제에서 다루는 3 가지 의심 균주가 검출되지 않았던 원인은 샐러드 샘플 내에서 복합 천연미생물저해제의 높은 항균활성 능력, 최적의 위생화된 식품 가공 공정 및 유통, 증균과정이 불가피한 소량의 미생물 수, 세척 후에도 잔류되어 있는 미량의 농약 성분 등이 주요 원인으로 사료됨.
- 선택배지에서 3 가지 식중독 의심 균주에 대하여 불검출 결과를 보였으므로 CR을 통한 검출 실험은 생략함
- 현재 대형 마트 및 대학 내 매점 등에서 시판 중인 샌드위치, 김밥, 샐러드 즉석 식품으로 선택배지 및 PCR을 통한 정성적 방법을 이용하여 각 즉석식품 샘플에 대한 최적의 복합 천연미생물저해제의 분사량을 결정하였으며 그 내용은 <표 10>과 같음

즉석식품 샘플	최적 분사량 (100 μ l/회)
샌드위치	10
김밥	15
샐러드	10

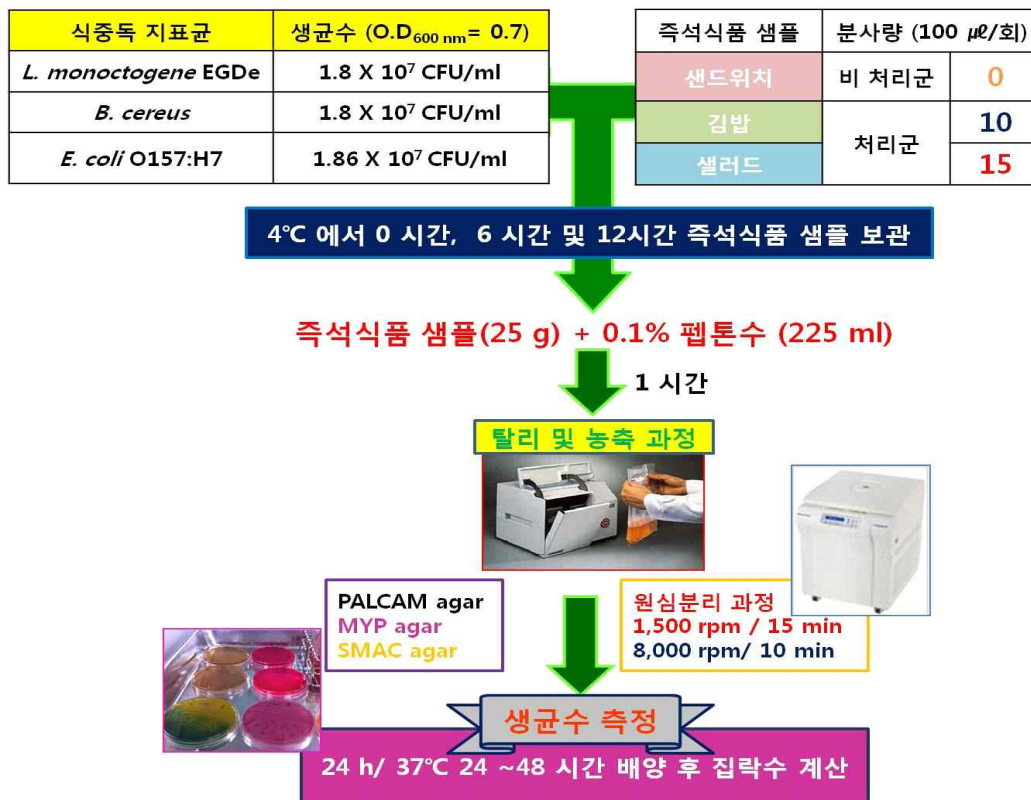
<표 10> 즉석식품내 식중독균 저감화를 위한 최적 분사량

- <표 10>의 내용을 참고하여 다음 단계 실험인 식품, 식품 가공 장소 및 소비 장소에서 복합 천연미생물저해제를 분사 후 정성적 및 정량적 분석을 통한 저감화 실험에 적용하고자 함

2. 개발된 복합 천연미생물저해제의 효과를 확인하기 위한 비교실험 수행

2.1 선택배지를 활용한 생균수측정을 통해 각 식중독균이 접종된 RTE 식품 내 복합천연미생물저해제 처리에 따른 저감화를 위한 정량적 분석

- 본 과제를 통하여 선정된 3 종류의 즉석식품 (샌드위치, 김밥, 샐러드)를 인근 대형 마트 및, 대학교 내 매점 등에서 직접 구매한 즉석식품 (RTE : Ready to eat)에 본 과제에서 다루는 3가지 식중독 균인 *L. monocytogenes* EGD-e, *B. cereus* ATCC 13061 및 *E. coli* O157:H7를 일정 시간 배양 후 직접 주입 후 각 즉석식품 샘플들의 최적 분사량에 따라 분사하고 4도씨 냉장 온도에서 0 시간, 6 시간 및 12 시간 보관 후의 샘플을 식품 공전 상 식중독균 검출법에 따라 각 식중독균의 검출이 가능한 선택배지를 이용하여 <그림 14>와 같이 정량적 검출에 대한 연구를 하고자 함



<그림 14> 선택배지를 이용한 즉석식품 내 식중독균 저감화를 위한 정량분석 방법 모식도

2.1.1 선택배지를 이용하여 복합 천연미생물저해제를 처리한 즉석식품 내 각 식중독균의 저감화 를 정량적으로 분석하기 위한 식중독 균주의 초기 접종량 결정

- <표 11>에서 보는 바와 같이 즉석식품 내 동일한 양의 균주를 주입 후 저감화를 정량적으로 분석하기 위하여 3가지 식중독균을 Spectrophoometer를 이용하여 각 식중독균의 성장 시간에 따른 O.D (O.D600 nm= 0.5 ~ 1.0)값을 측정하여 생균수를 계산함

그람염색	식중독 지표균	측정 시간	O.D600 nm	생균수
Gram-positive bacteria	<i>L. monocytogenes</i> EGDe	1:40	0.518	2.4×10^7 CFU/ ml
		1:50	0.660	1.1×10^7 CFU/ ml
		2:00	0.763	1.2×10^7 CFU/ ml
		2:10	0.890	1.8×10^7 CFU/ ml
		2:30	0.999	1.77×10^7 CFU/ ml
	<i>B. cereus</i> ATCC 13061	2:30	0.508	0.7×10^7 CFU/ ml
		2:40	0.658	1.4×10^7 CFU/ ml
		2:50	0.728	1.8×10^7 CFU/ ml
Gram-negative bacteria	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43890	3:00	0.806	3.7×10^7 CFU/ m
		2:00	0.517	0.29×10^7 CFU/ ml
		2:10	0.611	1.08×10^7 CFU/ ml
		2:20	0.713	1.86×10^7 CFU/ ml
		2:30	0.810	2.16×10^7 CFU/ ml

<표 11> 각 식중독균의 성장 시간에 따른 생균수 측정 결과

- <표 11>의 내용을 기반으로 즉석식품 내 주입 가능한 각 식중독균의 초기 접종량을 <표 12>와 같이 최종 결정함

식중독 지표균	생균수 (O.D _{600 nm} = 0.7)
<i>L. monocytogenes</i> EGDe	1.8×10^7 CFU/ml
<i>B. cereus</i> ATCC 13061	1.8×10^7 CFU/ml
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43890	1.86×10^7 CFU/ml

<표 12> 최종 결정된 각 식중독균의 초기 접종량

<선택배지를 이용하여 복합 천연미생물저해제를 처리한 즉석 식품 내 *L. monocytogenes* EGDe 의 저감화를 위한 정량분석법>

- <그림 14> 방법을 토대로 대형 마트 및 학교 매점에서 구매한 3 가지 즉석식품 샘플을 각각 25 g씩 정량하여 10^7 CFU/ml의 *L. monocytogenes* EGDe 균주를 접종한 후 항균제를 0 회 처리한 비 처리군과 샌드위치, 샐러드 10 회 및 김밥 15 회 처리한 처리군으로 나누어 분사하고 세척 및 70% 에탄올로 소독된 식품 보관용 용기에 담아 4도씨 냉장 온도에서 0 시간, 6 시간 및 12 시간 보관하여 탈리용 멸균백에 0.1% 펩톤수 225 ml과 혼합하여 30 초간 탈리 과정을 거친 후 50 ml 멸균 튜브에 옮겨 넣음

- 옮겨 넣은 튜브를 1,500 rpm에서 10 분간 원심분리하여 식품 성분을 제거하고 상층액 부분

을 다시 8,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 식품 내 잔존하는 세포들을 모은 후 상층액 제거와 남은 세포들을 농축하여 1.5 ml에 분주 후 spreader로 PALCAM agar에 spreading 하여 37도에서 24 ~48 시간 배양함

- 37도에서 24 ~48 시간 배양 후 PALCAM agar에서 특이적으로 성장한 각 식중독 균주의 집락수 계산으로 3 반복 실험을 통하여 정량적 확인함
- PALCAM agar를 이용하여 복합 천연미생물저해제를 처리한 즉석 식품 내 *L. monocytogenes* EGDe 의 저감화를 위한 정량분석법으로 생균수 측정 결과는 <표 13>와 같음

식중독균	선택배지	즉석식품 샘플	보관기한	분사량	생균수 측정	최종 저해능
<i>L. monocytogenes</i> EGDe	PALCAM	샌드위치	0 시간	0	1.06 X 10 ⁷ CFU/ml	3 log ↓
				10	3.21 X 10 ⁶ CFU/ml	
			6 시간	0	4.24 X 10 ⁷ CFU/ml	
				10	4.39 X 10 ⁵ CFU/ml	
			12 시간	0	3.92 X 10 ⁸ CFU/ml	
				10	2.1 X 10 ⁵ CFU/ml	
		김밥	0 시간	0	1.46 X 10 ⁸ CFU/ml	4 log ↓
				15	3.15 X 10 ⁷ CFU/ml	
			6 시간	0	1.05 X 10 ⁹ CFU/ml	
				15	1.66 X 10 ⁵ CFU/ml	
			12 시간	0	1.13 X 10 ⁹ CFU/ml	
				15	4.88 X 10 ⁵ CFU/ml	
		샐러드	0 시간	0	1.71 X 10 ⁶ CFU/ml	3 log ↓
				10	4.45 X 10 ⁶ CFU/ml	
			6 시간	0	1.57 X 10 ⁸ CFU/ml	
10	2.15 X 10 ⁴ CFU/ml					
12 시간	0		1.98 X 10 ⁸ CFU/ml			
	10		1.87 X 10 ⁵ CFU/ml			

<표 13> PALCAM agar에서 생균수 측정을 이용한 식품 내 *L. monocytogenes* EGDe 정량분석법

- <표 13>에서 보는 바와 같이 3 종의 즉석식품 내 *L. monocytogenes* EGDe의 생균수 측정을 통하여 정량 분석을 실시한 결과 3 ~4 log 정도 *L. monocytogenes* EGDe 균주가 저감화 되었으며 본 과제를 통하여 개발된 신규 복합 천연미생물저해제에서 3 가지 식중독 지표균을 모두 저해할 수 있는 혼합 농도가 Gram-positive bacteria인 *L. monocytogenes* EGDe를 저감시키기에는 충분히 높은 농도였기 때문에 사료됨

<선택배지를 이용하여 복합 천연미생물저해제를 처리한 즉석 식품 내 *B. cereus* ATCC 13061 의 저감화를 위한 정량분석법>

- <그림 14> 방법을 토대로 대형 마트 및 학교 매점에서 구매한 3 가지 즉석식품 샘플을 각각 25 g씩 정량하여 10^7 CFU/ml의 *B. cereus* ATCC 13061 균주를 접종한 후 항균제를 0 회 처리한 비 처리군과 샌드위치, 샐러드 10 회 및 김밥 15 회 처리한 처리군으로 나누어 분사하고 세척 및 70% 에탄올로 소독된 식품 보관용 용기에 담아 4도씨 냉장 온도에서 0 시간, 6 시간 및 12 시간 보관하여 탈리용 멸균백에 0.1% 펩톤수 225 ml과 혼합하여 30 초간 탈리 과정을 거친 후 50 ml 멸균 튜브에 옮겨 넣음
- 옮겨 넣은 튜브를 1,500 rpm에서 10 분간 원심분리하여 식품 성분을 제거하고 상층액 부분을 다시 8,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 식품 내 잔존하는 세포들을 모은 후 상층액 제거와 남은 세포들을 농축하여 1.5 ml에 분주 후 spreader로 MYP agar에 spreading하여 37도에서 24 ~48 시간 배양함
- 37도에서 24 ~48 시간 배양 후 MYP agar에서 특이적으로 성장한 각 식중독 균주의 집락 수 계산으로 3 반복 실험을 통하여 정량적 확인함
- MYP agar를 이용하여 복합 천연미생물저해제를 처리한 즉석 식품 내 *B. cereus* ATCC 13061 의 저감화를 위한 정량분석법으로 생균수 측정 결과는 <표 14>와 같음

식중독균	선택배지	즉석식품 샘플	보관기한	분사량	생균수 측정	최종 저해능
<i>B. cereus</i> ATCC 13061	MYP	샌드위치	0 시간	0	1.09×10^7 CFU/ml	3 log↓
				10	1.56×10^5 CFU/ml	
			6 시간	0	1.62×10^8 CFU/ml	
				10	1.26×10^5 CFU/ml	
			12 시간	0	1.39×10^8 CFU/ml	
				10	1.79×10^5 CFU/ml	
		김밥	0 시간	0	3×10^7 CFU/ml	4 log↓
				15	3×10^3 CFU/ml	
			6 시간	0	2.43×10^7 CFU/ml	
				15	3.33×10^3 CFU/ml	
			12 시간	0	4.22×10^7 CFU/ml	
				15	5×10^3 CFU/ml	
		샐러드	0 시간	0	5.19×10^8 CFU/ml	3 log↓
				10	2.62×10^5 CFU/ml	
			6 시간	0	4.71×10^6 CFU/ml	
10	1×10^3 CFU/ml					
12 시간	0		3.6×10^7 CFU/ml			
	10		0.93×10^4 CFU/ml			

<표 14> MYP agar에서 생균수 측정을 이용한 식품 내 *B. cereus* ATCC 13061 정량분석법

- <표 14>에서 보는 바와 같이 3 종의 즉석식품 내 *B. cereus* ATCC 13061의 생균수 측정을 통하여 정량 분석을 실시한 결과 3 ~4 log 정도 *B. cereus* ATCC 13061 균주가 저감화 되었으며 본 과제를 통하여 개발된 신규 복합 천연미생물저해제에서 3 가지 식중독 지표균을 모두 저해할 수 있는 혼합 농도가 Gram-positive bacteria인 *B. cereus* ATCC 13061를 저감시키기에는 충분히 높은 농도였기 때문에 사료됨

<선택배지를 이용하여 복합 천연미생물저해제를 처리한 즉석 식품 내 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890의 저감화를 위한 정량분석법>

- <그림 14> 방법을 토대로 대형 마트 및 학교 매점에서 구매한 3 가지 즉석식품 샘플을 각각 25 g씩 정량하여 10^7 CFU/ml의 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890 균주를 접종한 후 항균제를 0회 처리한 비 처리군과 샌드위치, 샐러드 10 회 및 김밥 15 회 처리한 처리군으로 나누어 분사하고 세척 및 70% 에탄올로 소독된 식품 보관용 용기에 담아 4도씨 냉장 온도에서 0 시간, 6 시간 및 12 시간 보관하여 탈리용 멸균수에 0.1% 펩톤수 225 ml과 혼합하여 30 초간 탈리 과정을 거친 후 50 ml 멸균 튜브에 옮겨 넣음

- 옮겨 넣은 튜브를 1,500 rpm에서 10 분간 원심분리하여 식품 성분을 제거하고 상층액 부분을 다시 8,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 식품 내 잔존하는 세포들을 모은 후 상층액 제거와 남은 세포들을 농축하여 1.5 ml에 분주 후 spreader로 SMAC agar에 spreading하여 37도에서 24 ~48 시간 배양함

- 37도에서 24 ~48 시간 배양 후 SMAC agar에서 특이적으로 성장한 각 식중독 균주의 집락수 계산으로 3 반복 실험을 통하여 정량적 확인함

- SMAC agar를 이용하여 복합 천연미생물저해제를 처리한 즉석 식품 내 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890 의 저감화를 위한 정량분석법으로 생균수 측정 결과는 <표 15>와 같음

식중독균	선택배지	즉석식품 샘플	보관기한	분사량	생균수 측정	최종 저해능
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43890	SMAC	샌드위치	0 시간	0	2.6 X 10 ⁷ CFU/ml	2 log ↓
				10	2.49 X 10 ⁷ CFU/ml	
			6 시간	0	1.18 X 10 ⁸ CFU/ml	
				10	3.44 X 10 ⁶ CFU/ml	
			12 시간	0	1.9 X 10 ⁸ CFU/ml	
				10	3.06 X 10 ⁶ CFU/ml	
		김밥	0 시간	0	2.42 X 10 ⁸ CFU/ml	2 log ↓
				15	3.54 X 10 ⁷ CFU/ml	
			6 시간	0	2.21 X 10 ⁸ CFU/ml	
				15	2.20 X 10 ⁶ CFU/ml	
			12 시간	0	5.08 X 10 ⁸ CFU/ml	
				15	3.46 X 10 ⁶ CFU/ml	
		샐러드	0 시간	0	3.03 X 10 ⁸ CFU/ml	2 log ↓
				10	6.94 X 10 ⁷ CFU/ml	
			6 시간	0	5.19 X 10 ⁸ CFU/ml	
				10	5.45 X 10 ⁶ CFU/ml	
			12 시간	0	1.91 X 10 ⁸ CFU/ml	
				10	4.68 X 10 ⁶ CFU/ml	

<표 15>SMAC agar에서 생균수 측정을 이용한 식품 내 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890 정량분석법

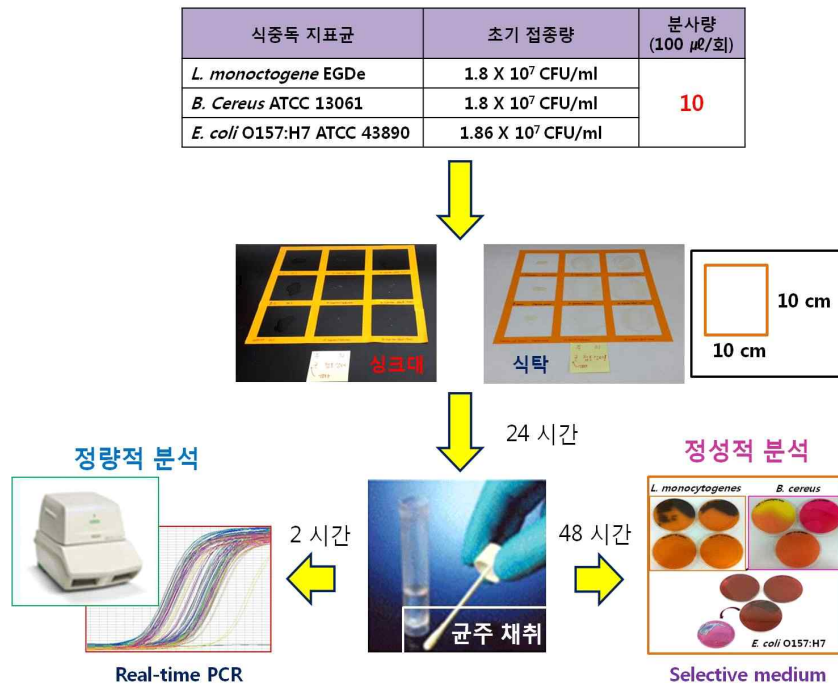
- <표 15>에서 보는 바와 같이 3 종의 즉석식품 내 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890의 생균수 측정을 통하여 정량 분석을 실시한 결과 2 log 정도 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890 균주가 저감화 되었음
- 본 과제를 통하여 개발된 신규 복합 천연미생물저해제가 즉석식품 내에서 Gram-positive bacteria인 *L. monocytogenes* EGDe, *B. cereus* ATCC 13061를 저감시키기는 농도보다 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890에서 비교적 낮은 저해능을 보였던 원인으로는 3 가지 식중독 지표균을 모두 저해할 수 있는 혼합 비율의 농도 중 가장 높은 농도로 저해되는 Gram-negative bacteria인 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890의 최소저해농도(MIC : Minimum inhibitory concentration) 비율로 개발되었기 때문으로 사료됨
- 따라서 추후 *E. coli* O157:H7 저해를 목적으로 보다 강력한 저해능 연구에 사용하기 위해서는 본 과제에서 제시한 복합 천연미생물 저해제의 혼합 비율보다 높은 농도의 혼합 비율을 권장함

[3차년도 연구결과 - 천연복합저해제의 식중독균 예방제 활용]

3. 개발된 복합 천연미생물저해제의 식중독균 예방제로서의 유용성 평가

- 주방 싱크대, 식탁 등 식품 조리 및 소비 장소를 선정하여 가로 10cm X 세로 10cm의 간격으로 구획을 나눈 뒤 본 과제에서 다루는 3가지 식중독 균인 *L. monocytogenes* EGD-e, *B.*

Cereus ATCC 13061 및 *E. coli* O157:H7를 일정 시간 배양하여 직접 주입 후 미 처리균과 10회 분사한 처리균을 24 시간 방치한 후 식품 공전 상 식중독균 검출법에 따라 각 식중독균의 검출이 가능한 선택배지 및 Real-time PCR을 이용하여 <그림 15>와 같이 정성적 및 정량적 검출에 대한 연구를 하고자 함.



<그림 15> 각 식중독균이 접종된 식품 조리 및 소비장소 내 복합 천연미생물저해제처리에 따른 저감화를 위한 정성 및 정량적 분석 연구

3.1 .선택배지를 활용한 각 식중독균이 접종된 식품 조리 및 소비장소 내 복합 천연미생물저해제처리에 따른 저감화를 위한 정성적 연구

- 본 과제를 위해 선정된 주방 싱크대, 식탁 등의 식품 취급 장소에 가로 10cm X 세로 10cm의 간격으로 구획을 나누고 3가지 식중독 균인 *L. monocytogenes* EGD-e, *B. cereus* ATCC 13061 및 *E. coli* O157:H7를 10⁷ CFU/ml 까지 배양하여 주입 후 음성 대조균인 복합 천연미생물저해제 미 처리균과 10회 처리균을 24 시간 방치한 후 3M 社의 P-swab을 이용하여 구획별로 샘플을 모아 P-swab 용기 내 0.85% saline에 접종하여 가볍게 흔들어 <그림 16>과 같이 장소 및 균주별로 샘플을 준비함



싱크대 접종 샘플





식탁 접종 샘플

<그림 16> 장소 및 균주별로 채취된 샘플 준비

- 이후 1 ml을 1.5 ml 튜브에 옮겨 넣고 배금이를 이용하여 각 식중독균의 선택적 검출이 가능한 선택배지를 이용하여 streaking 후 37도에서 24 ~ 48 시간 배양 후 복합 천연미생물 저해제에 의한 저감화를 정성적으로 확인함

<주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *L. monocytogenes* EGDe의 정성적 분석을 통한 저해능>

- <그림 15>와 같은 방법을 통하여 주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *L. monocytogenes* EGDe의 저감화에 대하여 PALCAM agar를 이용하여 정성적으로 분석한 결과는 <그림 17>과 같음




샘플링 장소	선택배지	분사량	<i>L. monocytogenes</i> EGDe의 정성적 분석을 통한 저해능
싱크대	PALCAM	0	
		10	
식탁		0	
		10	

<그림 17> 주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *L. monocytogenes* EGDe의 정성적 분석을 통한 저해능

- <그림 17>에서 보는 바와 같이 주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *L. monocytogenes* EGDe의 정성적 분석을 통한 저해능을 관찰한 결과 복합 천연미생물저해제를 10회 처리만으로도 식품보다 더 강한 *L. monocytogenes* EGDe의 저해능을 보임.
- 따라서 식품 가공 공정, 처리 및 취급 장소에 대하여 신규 개발된 복합 천연 미생물저해제를 사용한다면 *L. monocytogenes* 저해에 대하여 긍정적인 효과가 기대됨.

<주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *B. cereus* ATCC 13061의 정성적 분석을 통한 저해능>

- <그림 15>와 같은 방법을 통하여 주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *B. cereus* ATCC 13061의 저감화에 대하여 MYP agar를 이용하여 정성적으로 분석한 결과는 <그림 18>과 같음



샘플링 장소	선택배지	분사량	<i>B. cereus</i> ATCC 13061의 정성적 분석을 통한 저해능
싱크대	MYP	0	
		10	
0			
10			

<그림 18> 주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *B. cereus* ATCC 13061의 정성적 분석을 통한 저해능

- <그림 18>에서 보는 바와 같이 주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *B. cereus* ATCC 13061의 정성적 분석을 통한 저해능을 관찰한 결과 복합 천연미생물저해제를 10회 처리만으로도 *L. monocytogenes* EGDe와 마찬가지로 식품보다 더 강한 *B. cereus* ATCC 13061의 저해능을 보임
- 따라서 *B. cereus* ATCC 13061 또한 식품 가공 공정, 처리 및 취급 장소에 대하여 신규 개발된 복합 천연 미생물저해제를 사용한다면 *B. cereus* ATCC 13061 저해에 대하여 긍정적인 효과가 기대됨

<주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890의 정성적 분석을 통한 저해능>

- <그림 15>와 같은 방법을 통하여 주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890의 저감화에 대하여 SMAC agar를 이용하여 정성적으로 분석한 결과는 <그림 19>과 같음

샘플링 장소	선택배지	분사량	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43890의 정성적 분석을 통한 저해능
싱크대	SMAC	0	
		10	
식탁		0	
		10	

<그림 19> 주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890의 정성적 분석을 통한 저해능

- <그림 19>에서 보는 바와 같이 주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890의 정성적 분석을 통한 저해능을 관찰한 결과 복합 천연미생물저해제를 10회 처리만으로도 식품에서도 만족할만한 효과를보였던 Gram-positive bacteria인 *L. monocytogenes* EGDe 및 *B. cereus* ATCC 13061과 마찬가지로 강한 저해능을 보임.
- 따라서 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890 또한 식품 가공 공정, 처리 및 취급 장소에 대하여 신규 개발된 복합 천연 미생물저해제를 사용한다면 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890 저해에 대하여 긍정적인 효과가 기대됨.

3.2 선택배지를 활용한 각 식중독균이 접종된 식품 조리 및 소비장소 내 복합 천연미생물저해제처리에 따른 저감화를 위한 정량적 연구

- 본 과제를 위해 선정된 주방 싱크대, 식탁 등의 식품 취급 장소에 가로 10cm X 세로 10cm의 간격으로 구획을 나누고 3가지 식중독 균인 *L. monocytogenes* EGD-e, *B. cereus* ATCC 13061 및 *E. coli* O157:H7를 10^7 CFU/ml 까지 배양하여 주입 후 음성 대조군인 복합 천연미생물저해제 미 처리군과 10회 처리군을 24 시간 방치함
- 3M 社의 P-swab을 이용하여 구획별로 샘플을 모아 P-swab 용기 내 0.85% saline에 접종하여 가볍게 흔들어 <그림 16>과 같이 장소 및 균주별로 샘플을 준비함

- 이후 1 ml을 1.5 ml 튜브에 옮겨 13,000 rpm에서 1분간 3차 증류수를 첨가하고 vortexer를 이용하여 혼합시킨 후 13,000 rpm에서 1 분 동안 원심분리함
- 원심분리 후 상층액을 제거하고 다시 1 ml의 3차 증류수를 첨가하고 vortexer를 이용하여 혼합시킨 후 13,000 rpm에서 1 분 동안 원심분리하여 상층액 제거 후 200 μ l의 3차 증류수를 첨가하여 파이펫으로 희석하고 비드비터로 30 초간 박테리아 세포를 깬 후 얼음에 30분 간 안정화 시키고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 식중독균의 DNA가 존재하는 상층액을 따로 분리하여 -20도에 보관함
- 냉동 온도인 -20도에 보관된 DNA를 실온에 녹인 후 TAKARA 社의 2X premix Ex Taq 12.5 μ l, 10 pmole의 forward, reverse primer 및 TaqMan probe 0.75 μ l, 증폭을 향상시켜주는 ROX dye 0.5 μ l, $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 의 농도로 각각 희석된 Template DNA 2 μ l, 및 D.W로 최종 25 μ l의 볼륨을 맞춘 후 95도에서 30 초간 pre denaturation 과정을 거치고 95도에서 30 초간 denaturation 과 58도에서 30 초간 annealing 과정을 50 사이클 반복하여 DNA 농도에 따른 증폭 양상을 통하여 각 식중독균의 저감화를 정량적으로 확인함

<각 식중독균에 대한 Species specific primer 및 TaqMan probe 제작>

- DNA에 존재하는 특정 유전자 정보를 활용하여 Real-time PCR 증폭 시 3 가지 각 식중독균의 특이적 검출을 위해 식중독균 검출 관련 논문 및 질병 관리 본부 등 국가 기관에서 제공하는 국내 식중독균 검출 분석법을 통하여 얻은 프라이머 시퀀스 정보 및 프로브 시퀀스를 GenScript를 이용하여 제작 후 마크로젠 社에 의뢰하였으며 본 연구 과제에 사용될 프라이머 및 프로브 시퀀스 정보에 대한 내용은 <표 16>과 같음

Foodborne pathogens	Sequence	Strand	Position	Tm °C	Modification
Amplicon Size = 83 bp (<i>lmo 0733 gene</i> : similar gene to transcription regulator)					
<i>L. monocytogenes</i> EGDe	ACTGGTGTTC AAGCACTTC	forward	330	56.4	
	ACAATCTCTAAATGGGAGCA	reverse	393	54.3	
	TCGGAATCAGGAACTGACAGTCC	foward	369	64.8	5'Fam-3'Tamra
참고 문헌	Dongyou Liua, A. Jerald Ainswortha, Frank W. Austinb, Mark L. Lawrenceca, 2004. Use of PCR primers derived from a putative transcriptional regulator gene for species-specific determination of <i>L. monocytogenes</i> . Int. Food Microbiol. 91, 297-304				
Amplicon Size = 79 bp (<i>nhe B gene</i> : Non hemolytic enterotoxin genes)					
<i>B. cereus</i>	TGTGTACCATGGTTTGAATG	forward	38	54.7	
	AACACAAACGGAGTATTTAACAA	reverse	94	55.5	
	TGCAAACGCTGTAATTGCAGTATCAA	foward	63	62.2	5'Fam-3'Tamra
참고 문헌	Seon Je Seong, Ji Su Lim, Kwang Geun Lee, Seung Ju Lee, and Kwang Won Hong, 2008. Toxin Gene Profiling of <i>Bacillus cereus</i> Food Isolates by PCR. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 51(4), 263-268.				
Amplicon Size = 94 bp (<i>stx 1 gene</i> : Shiga-like toxin gene)					
<i>E. coli</i> O157:H7	GCCATTCGTTGACTACTTCT	forward	289	56.4	
	GTAACAAACCGTAACATCGC	reverse	363	56.4	
	CACTGACGCAGTCTGTGGCA	foward	340	64.8	5'Fam-3'Tamra
참고 문헌	A. Mark Ibekwe, Pamela M. Watt, Catherine M. Grieve, Vijay K. Sharma, and Steven R. Lyons, 2002. Multiplex Fluorogenic Real-Time PCR for Detection and Quantification of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in Dairy Wastewater Wetlands. J. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4853-4862				

<표 16> Real-time PCR에 이용되는 Primer 및 probe sequence 정보

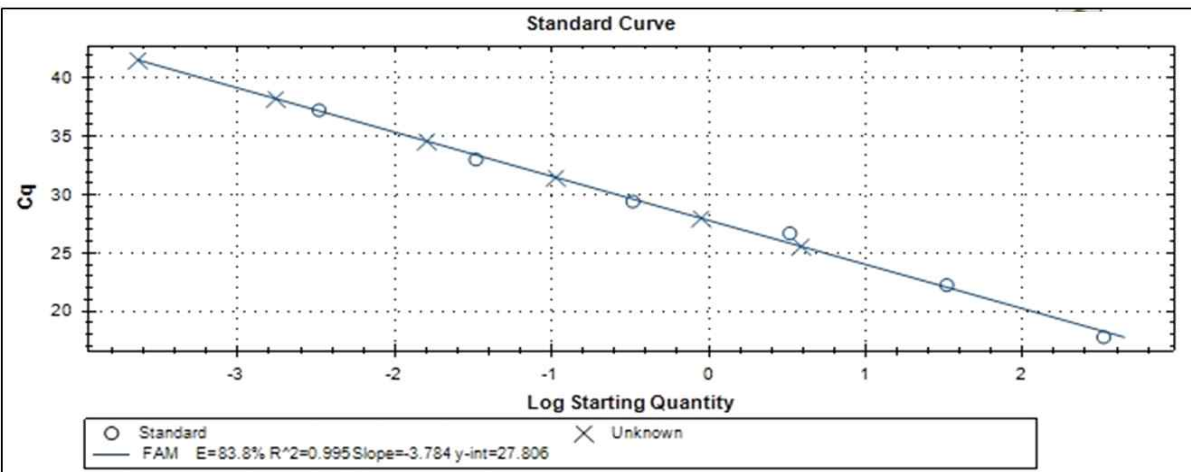
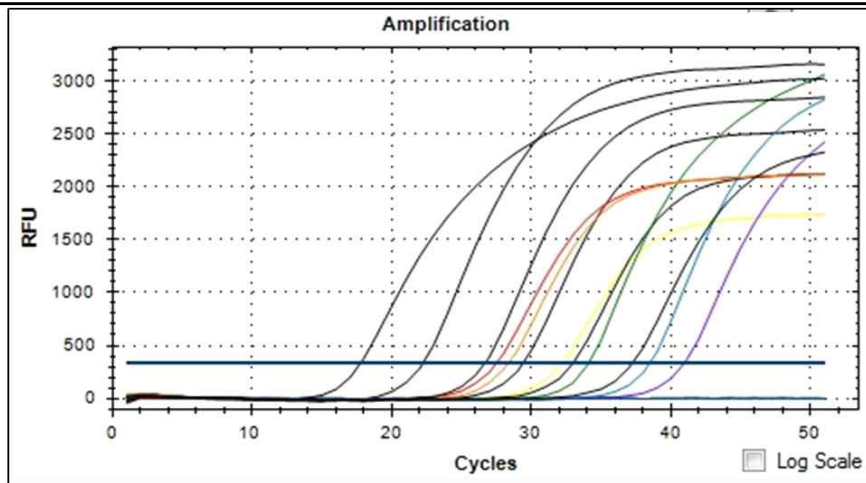
- <표 16>에 명시된 Primer 및 probe sequence 정보를 이용하여 3 가지 식중독 균주에 대한 Real-time PCR을 진행하였으며 실시간 증폭과정을 관찰하기 위한 Real-time PCR 조건은 <표 17>과 같음

Real-time PCR condition	
Pre denaturation	95°C- 30 sec
Denaturation	95°C - 5 sec
Annealing	58°C- 30 sec
50 cycles	

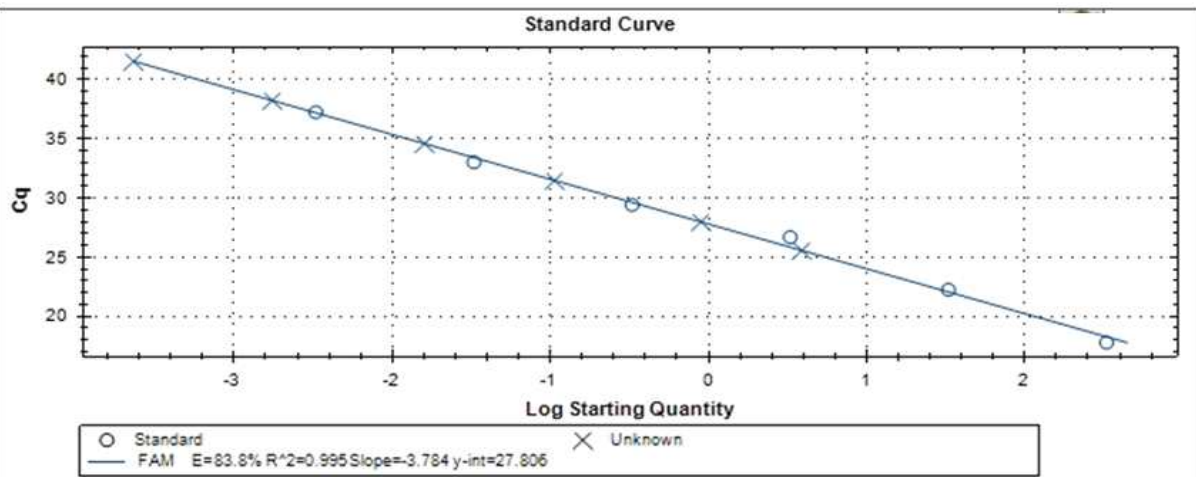
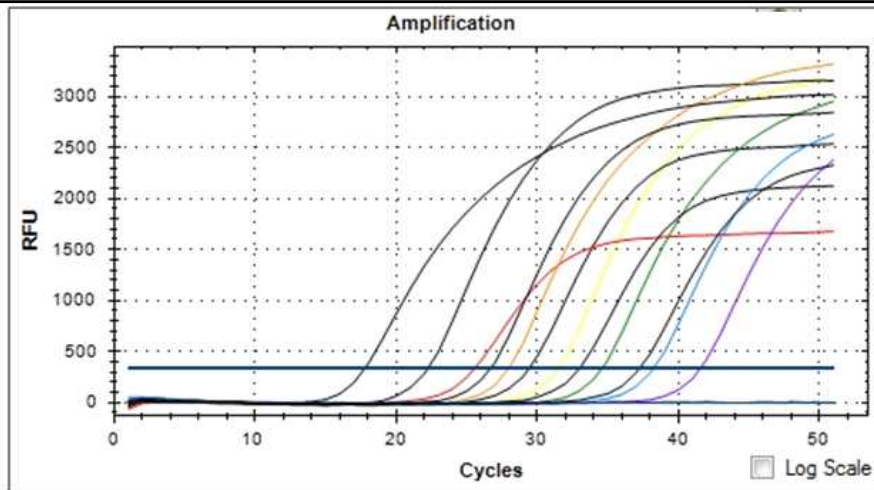
<표 17> 각 식중독균이 접종된 식품 조리 및 소비장소 내
복합 천연미생물저해제처리에 따른 저감화를 위한
Real-time PCR 조건

<주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *L. monocytogenes* EGDe의 정량적 분석을
Real-time PCR을 이용한 저해능 확인>

- <그림 15>와 같은 방법을 통하여 주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *L. monocytogenes* EGDe의 저감화에 대하여 Real-time PCR를 이용하여 정량적으로 분석한 결과는 <그림 20> 및 <그림 21>과 같음



<그림 20> 상크대로부터 채취한 샘플 내 *L. monocytogenes* EGDe의 정량적 분석을 Real-time PCR을 이용한 저해능 확인(검정선 : 0 injection (standard curve), 칼라선 : 10 injection)



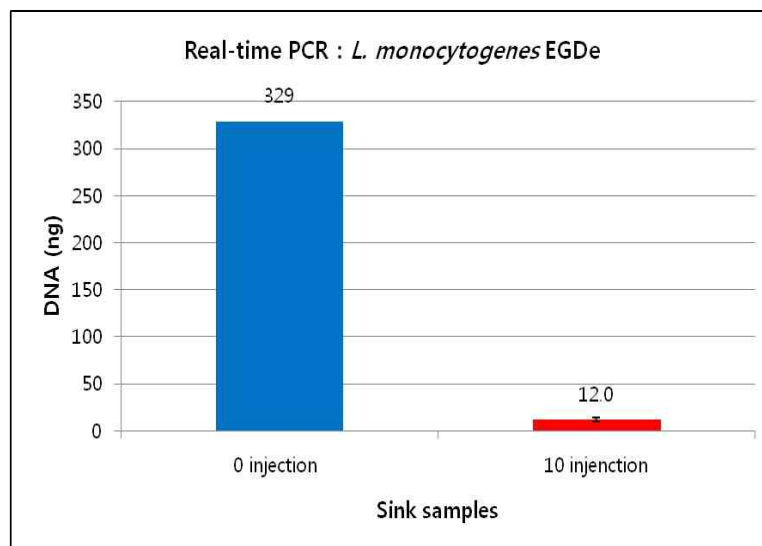
<그림 21> 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *L. monocytogenes* EGDe의 정량적 분석을 Real-time PCR을 이용한 저해능 확인(검정선 : 0 injection (standard curve), 칼라선 : 10 injection)

- <그림 20> 및 <그림 21>의 Real-time PCR 분석 결과를 통하여 실시간으로 저해능이 관찰 되었으며 이를 토대로 복합 천연미생물저해제의 처리 및 미 처리된 *L. monocytogenes* EGDe 균주의 증폭된 DNA 농도를 이용한 저해능을 정량적으로 분석한 결과는 <표 18>과 같음

Samples	DNA (ng)	Adjusted DNA (ng)	Average (ng)	Stdev*	error
<i>L. monocytogenes</i> EGDe (0 injection)	329.00000	329.00000	329.00000	0.00000	0.00000
	32.90000	329.00000			
	3.29000	329.00000			
	0.32900	329.00000			
	0.03290	329.00000			
	0.00329	329.00000			
<i>L. monocytogenes</i> EGDe (Sink-10 injection)	3.85572	3.85572	11.99875	5.60699	2.28905
	0.86825	8.68247			
	0.09962	9.96173			
	0.01456	14.56216			
	0.00153	15.29728			
	0.00020	19.63317			
<i>L. monocytogenes</i> EGDe (Table-10 injection)	1.15026	1.15026	12.39586	9.82812	4.01231
	0.68135	6.81346			
	0.06110	6.10977			
	0.01955	19.54527			
	0.00131	13.05461			
	0.00028	27.70176			

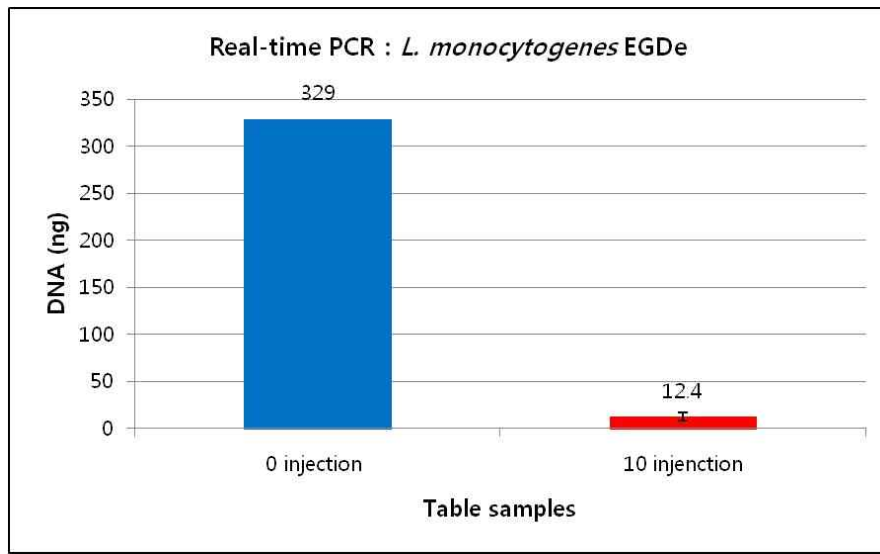
<표 18> 싱크대 및 식탁 샘플에서 채취한 *L. monocytogenes* EGDe의 Real-time PCR을 이용한 정량적 분석 저해능 결과

- Adjusted DNA의 경우 증폭된 DNA를 기준으로 희석배수를 곱하여 보정한 값이며, 이 보정 값을 바탕으로 평균 값, standard deviation 및 standard error를 계산함
- standard error 계산식은 각각의 표준편차를 각실험의 반복횟수 (6) 범위의 제곱근으로 나누어 계산함
- <표 18>을 통하여 Real-time PCR을 이용하여 정량화된 데이터를 바탕으로 주방 싱크대에서 채취한 *L. monocytogenes* EGDe의 저해능을 그래프화한 데이터는 <그림 22>와 같음



<그림 22> Real-time PCR을 바탕으로 싱크대에서 채취한 *L. monocytogenes* EGDe의 저해능비교

- <표 18>, <그림 22>의 결과를 바탕으로 싱크대에서 채취한 *L. monocytogenes* EGDe의 저해능을 정량적으로 분석한 결과 복합 천연미생물저해제 비 처리군에 비해 10회 분사한 처리군에서 약 27.4배 저감된 결과를 보였음
- <표 18>에서 보는바와 같이 Real-time PCR을 이용하여 정량화된 데이터를 바탕으로 식탁에서 채취한 *L. monocytogenes* EGDe의 저해능을 그래프화한 데이터는 <그림 23>와 같음

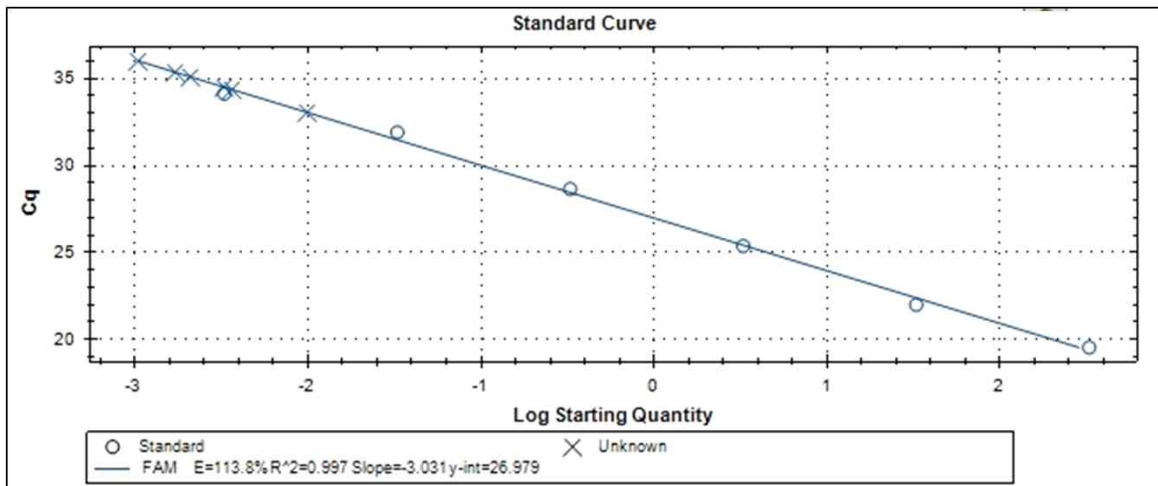
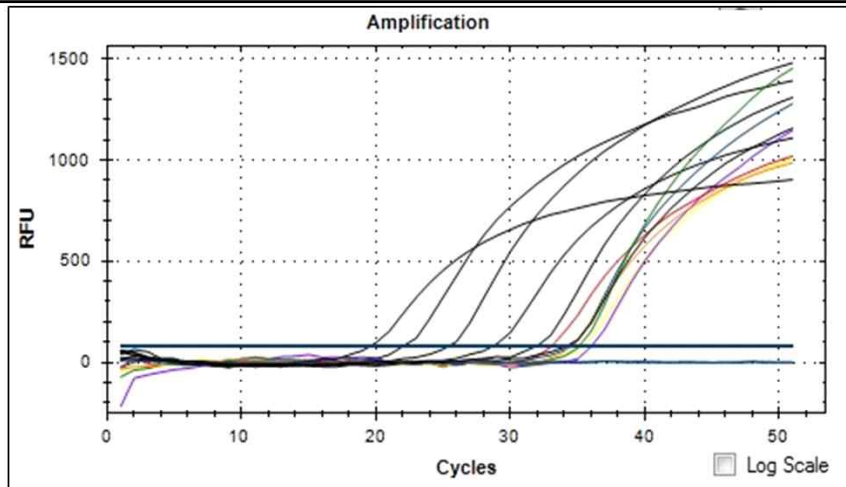


<그림 23> Real-time PCR을 바탕으로 식탁에서 채취한 *L. monocytogenes* EGDe의 저해능비교

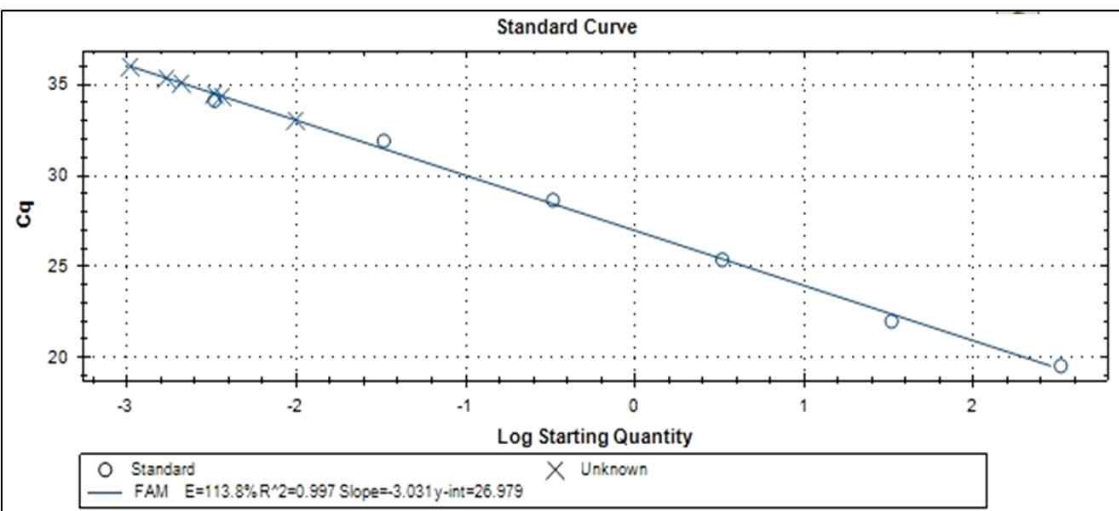
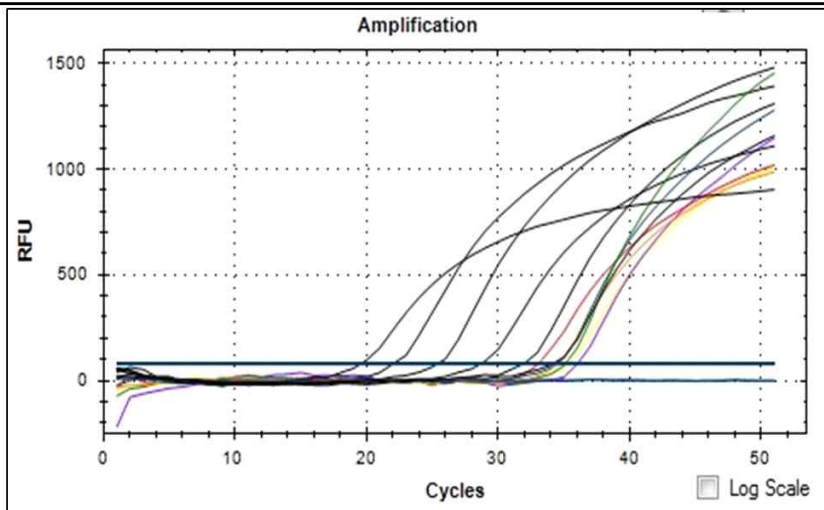
- <표 18>, <그림 23>의 결과를 바탕으로 싱크대에서 채취한 *L. monocytogenes* EGDe의 저해능을 정량적으로 분석한 결과 복합 천연미생물저해제 비 처리군에 비해 10회 분사한 처리군에서 약 26.5배 저감된 결과를 보였음

<주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *B. cereus* ATCC 13061의 정량적 분석을 Real-time PCR을 이용한 저해능 확인>

- <그림 15>와 같은 방법을 통하여 주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *B. cereus* ATCC 13061의 저감화에 대하여 Real-time PCR를 이용하여 정량적으로 분석한 결과는 <그림 24> 및 <그림 25>와 같음



<그림 24>싱크대로부터 채취한 샘플 내 *B. cereus* ATCC 13061의 정량적 분석을 Real-time PCR을 이용한 저해능 확인(검정선 : 0 injection (standard curve), 칼라선 : 10 injection)



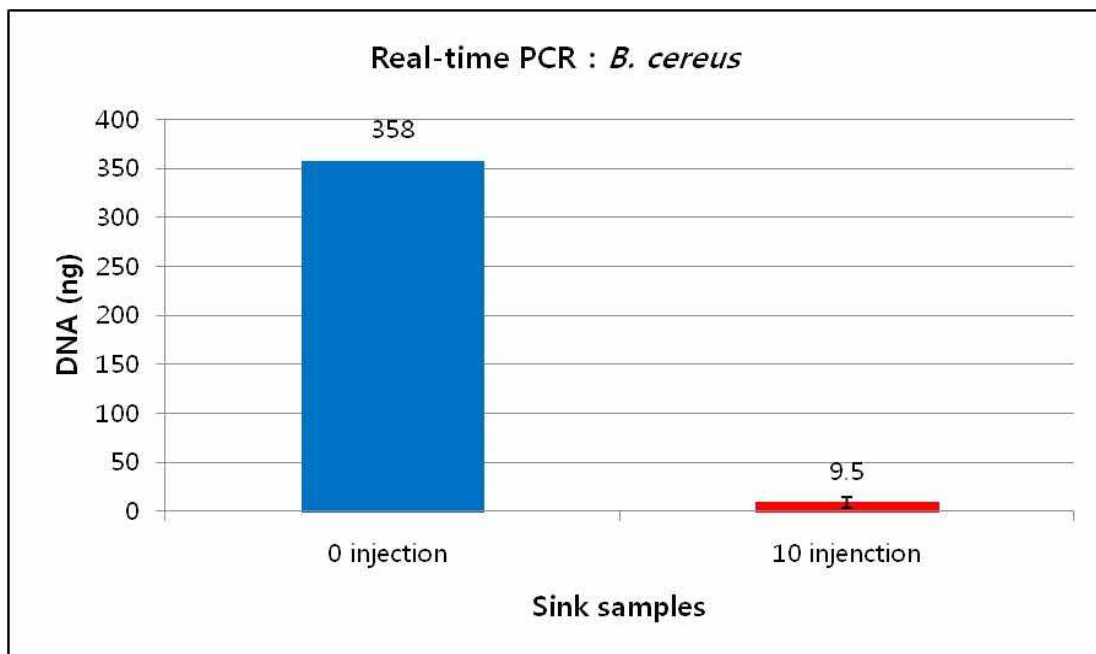
<그림 25> 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *B. cereus* ATCC 13061의 정량적 분석을 Real-time PCR을 이용한 저해능 확인(검정선 : 0 injection (standard curve), 칼라선 : 10 injection)

- <그림 24> 및 <그림 25>의 Real-time PCR 분석 결과를 통하여 실시간으로 저해능이 관찰되었으며 이를 토대로 복합 천연미생물저해제의 처리 및 미 처리된 *B. cereus* ATCC 13061 균주의 증폭된 DNA 농도를 이용한 저해능을 정량적으로 분석한 결과는 <표 19>와 같음

Samples	DNA (ng)	AdjustedDNA (ng)	Average (ng)	Stdev*	error
<i>B. cereus</i> ATCC 13061 (0 injection)	358.00000	358.00000	358.00000	0.00000	0.00000
	35.80000	358.00000			
	3.58000	358.00000			
	0.35800	358.00000			
	0.03580	358.00000			
	0.00358	358.00000			
<i>B. cereus</i> ATCC 13061 (Sink-10 injection)	0.02040	0.00000	9.50000	13.56000	5.50000
	0.00488	0.00000			
	0.00255	0.30000			
	0.00665	6.60000			
	0.00341	34.10000			
	0.00158	15.80000			
<i>B. cereus</i> ATCC 13061 (Table-10 injection)	0.00607	0.00000	12.90000	22.20000	9.10000
	0.00189	0.00000			
	0.00094	0.10000			
	0.00114	1.10000			
	0.00214	21.40000			
	0.00055	54.80000			

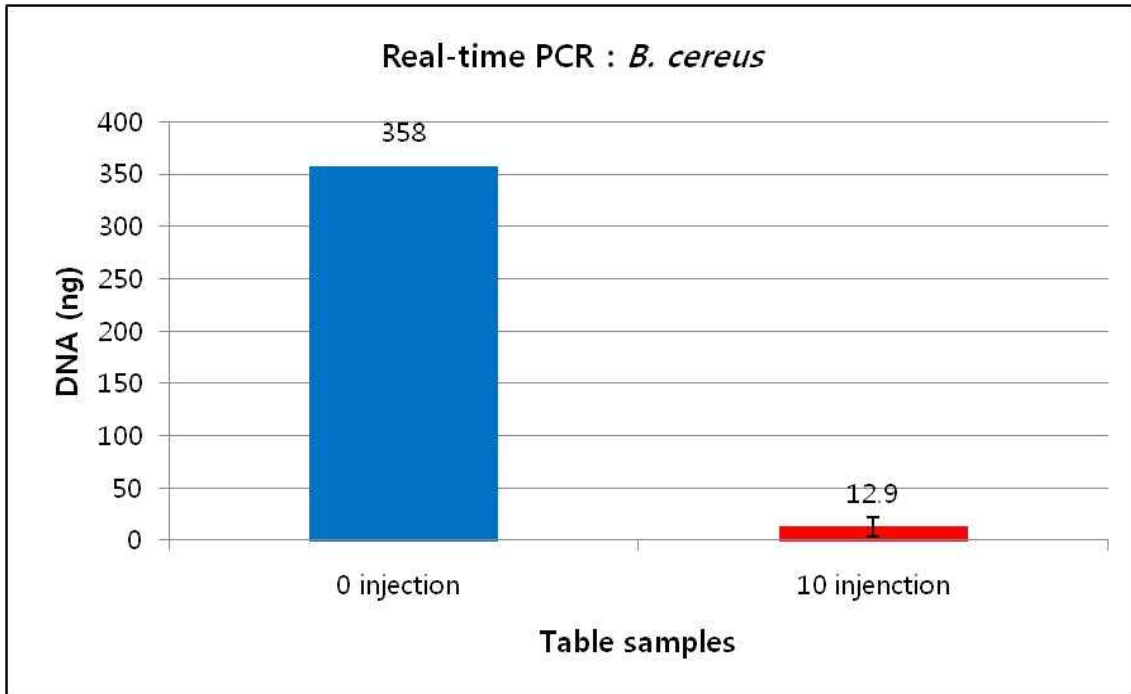
<표 19>싱크대 및 식탁 샘플에서 채취한 *B. cereus* ATCC 13061의 Real-time PCR을 이용한 정량적 분석 저해능 결과

- Adjusted DNA의 경우 증폭된 DNA를 기준으로 희석배수를 곱하여 보정한 값이며, 이 보정 값을 바탕으로 평균 값, standard deviation 및 standard error를 계산함
- standard error 계산식은 각각의 표준편차를 각실험의 반복횟수 (6) 범위의 제곱근으로 나누어 계산함
- <표 19>을 통하여 Real-time PCR을 이용하여 정량화된 데이터를 바탕으로 주방 싱크대에서 채취한 *B. cereus* ATCC 13061의 저해능을 그래프화한 데이터는 <그림 26>과 같음



<그림 26> Real-time PCR을 바탕으로 싱크대에서 채취한 *B. cereus* ATCC 13061의 저해능비교

- <표 19>, <그림 26>의 결과를 바탕으로 싱크대에서 채취한 *B. cereus* ATCC 13061의 저해능을 정량적으로 분석한 결과 복합 천연미생물저해제 비 처리군에 비해 10회 분사한 처리군에서 약 37.7배 저감된 결과를 보였음
- <표 19>에서 보는바와 같이 Real-time PCR을 이용하여 정량화된 데이터를 바탕으로 식탁에서 채취한 *B. cereus* ATCC 13061의 저해능을 그래프화한 데이터는 <그림 27>과 같음

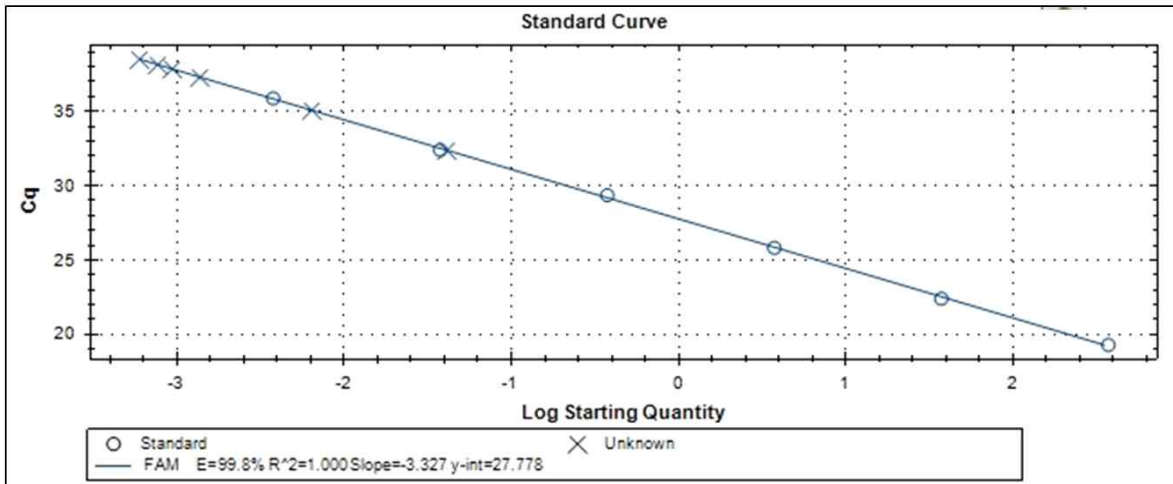
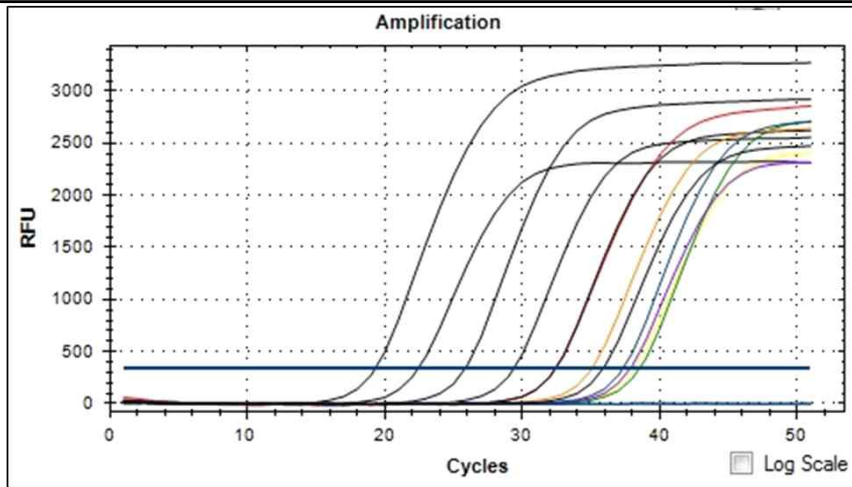


<그림 27> Real-time PCR을 바탕으로 식탁에서 채취한 *B. cereus* ATCC 13061의 저해능비교

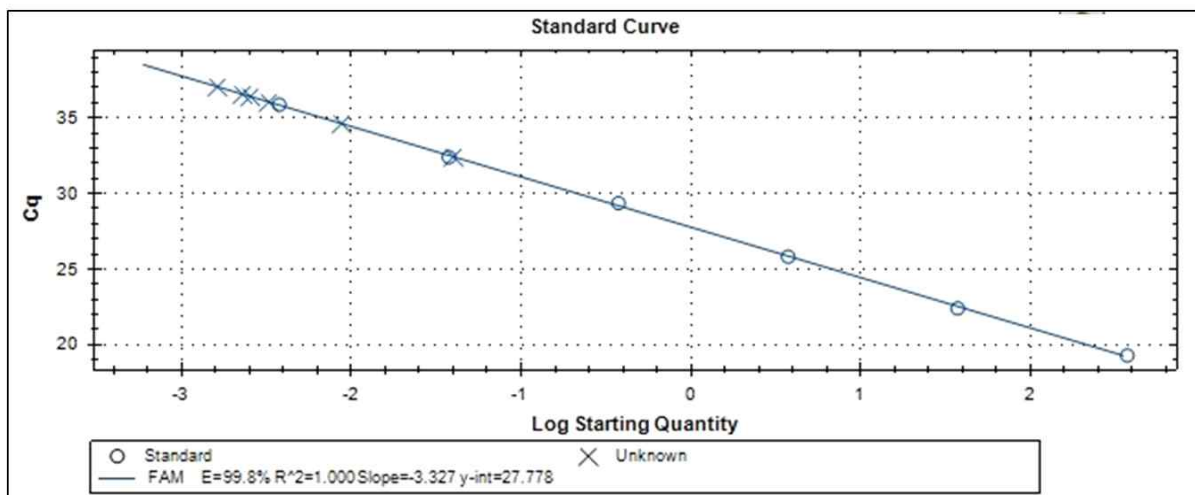
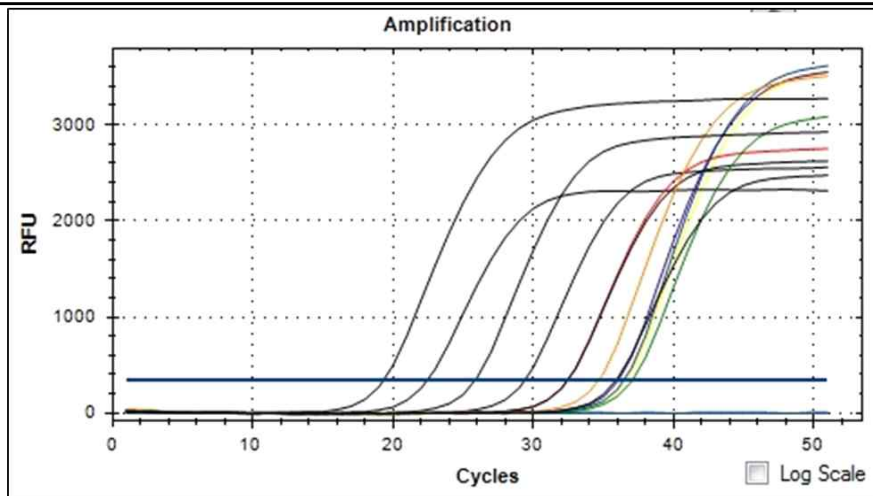
- <표 19>, <그림 27>의 결과를 바탕으로 식탁에서 채취한 *B. cereus* ATCC 13061의 저해능을 정량적으로 분석한 결과 복합 천연미생물저해제 비 처리군에 비해 10회 분사한 처리군에서 약 27.6배 저감된 결과를 보였음

<주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890의 정량적 분석을 Real-time PCR을 이용한 저해능 확인>

- <그림 15>와 같은 방법을 통하여 주방 싱크대 및 식탁으로부터 채취한 샘플 내 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890의 저감화에 대하여 Real-time PCR를 이용하여 정량적으로 분석한 결과는 <그림 28> 및 <그림 29>와 같음



<그림 28> 주방 싱크대로부터 채취한 샘플 내 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890의 정량적 분석을 Real-time PCR을 이용한 저해능 확인(검정선 : 0 injection (standard curve), 칼라선 : 10 injection)



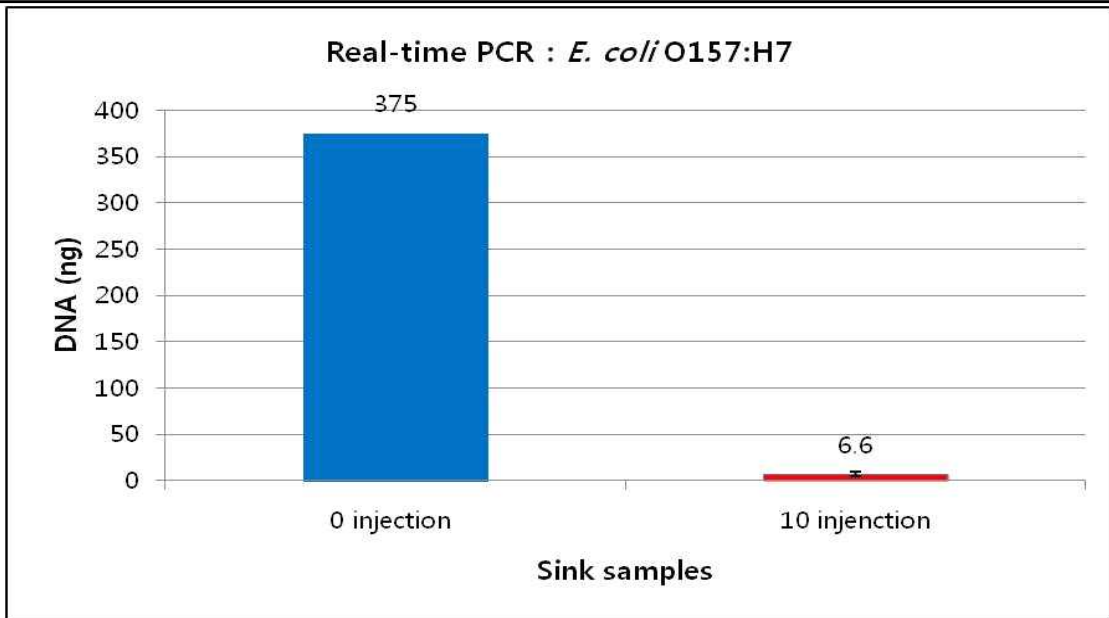
<그림 29>식탁으로부터 채취한 샘플 내 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890의 정량적 분석을 Real-time PCR을 이용한 저해능 확인(검정선 : 0 injection (standard curve), 칼라선 : 10 injection)

- <그림 28> 및 <그림 29>의 Real-time PCR 분석 결과를 통하여 실시간으로 저해능이 관찰되었으며 이를 토대로 복합 천연미생물저해제의 처리 및 미 처리된 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890 균주의 증폭된 DNA 농도를 이용한 저해능을 정량적으로 분석한 결과는 <표 20>과 같음

Samples	DNA (ng)	Adjusted DNA (ng)	Average (ng)	Stdev*	error
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43890 (0 injection)	375.00000	375.00000	358.00000	0.00000	0.00000
	37.50000	375.00000			
	3.75000	375.00000			
	0.37500	375.00000			
	0.03750	375.00000			
	0.00375	375.00000			
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43890 (Sink-10 injection)	0.02306	0.02306	9.48063	13.56046	5.53604
	0.00293	0.02930			
	0.00028	0.02773			
	0.00021	0.20859			
	0.00053	5.27143			
	0.00034	34.27575			
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43890 (Table-10 injection)	0.02234	0.02234	12.91163	22.19281	9.06018
	0.00412	0.04125			
	0.00093	0.09293			
	0.00064	0.63993			
	0.00090	9.04525			
	0.00139	138.58941			

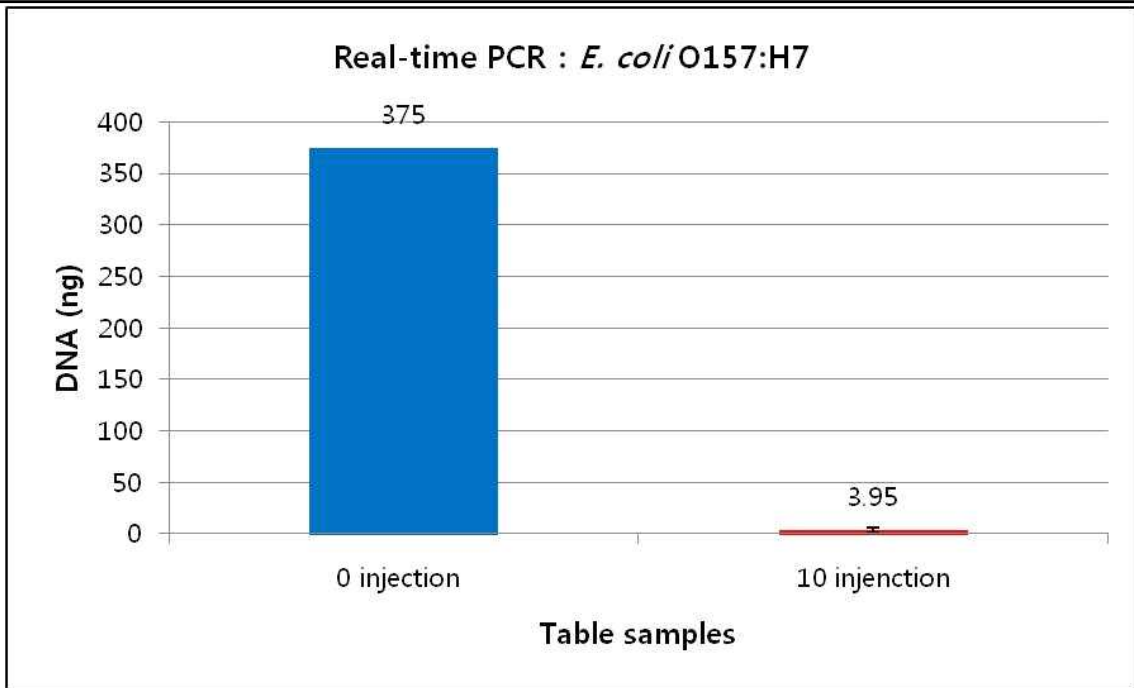
<표 20> 싱크대 및 식탁 샘플에서 채취한 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890의 Real-time PCR을 이용한 정량적 분석
저해능 결과

- Adjusted DNA의 경우 증폭된 DNA를 기준으로 희석배수를 곱하여 보정한 값이며, 이 보정 값을 바탕으로 평균 값, standard deviation 및 standard error을 계산함
- standard error 계산식은 각각의 표준편차를 각실험의 반복횟수 (6) 범위의 제곱근으로 나누어 계산함
- <표 20>을 통하여 Real-time PCR을 이용하여 정량화된 데이터를 바탕으로 주방 싱크대에서 채취한 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890의 저해능을 그래프화한 데이터는 <그림 30>과 같음



<그림 30> Real-time PCR을 바탕으로 싱크대에서 채취한 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890의 저해능비교

- <표 20> 및 <그림 30>의 결과를 바탕으로 싱크대에서 채취한 *B. cereus* ATCC 13061의 저해능을 정량적으로 분석한 결과 복합 천연미생물저해제 비 처리군에 비해 10회 분사한 처리군에서 약 56.8배 저감된 결과를 보였음
- <표 20>에서 보는바와 같이 Real-time PCR을 이용하여 정량화된 데이터를 바탕으로 식탁에서 채취한 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890의 저해능을 그래프화한 데이터는 <그림 31>과 같음



<그림 31> Real-time PCR을 바탕으로 싱크대에서 채취한 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890의 저해능비교

- <표 20> 및 <그림 30>의 결과를 바탕으로 싱크대에서 채취한 *B. cereus* ATCC 13061의 저해능을 정량적으로 분석한 결과 복합 천연미생물저해제 비 처리군에 비해 10회 분사한 처리군에서 약 94.9배 저감된 결과를 보였음
- 최종적 결론으로 싱크대 및 식탁 등의 식품 조리 및 소비시설에 있어서 복합 천연미생물저해제의 표면 분사를 통한 3 가지 식중독균에 대한 저해능을 정량적으로 분석한 결과는 매우 효과적이었으며 향후 식품 가공 공정 및 식품 취급 장소에 있어 천연미생물 소재의 소독제로서 개발 가능성 또한 매우 긍정적일 것으로 판단됨

<스프레이형태로 복합 천연미생물저해제의 식품적용 후 관능 평가>

<RTE 식품 내 복합 천연미생물저해제 처리 및 비 처리 후 단일 맹검 시험법(Single blind test) 실시>

- 대형 마트 및 대학 내 매점 등에서 구매한 RTE 식품 샘플 (샌드위치, 김밥, 샐러드)에 복합 천연미생물저해제를 최적의 양으로 처리 및 비 처리하여 4도 냉장 온도에서 24 시간 보관 후의 외관, 맛, 향미, 식감 및 색감 등을 약 10 명의 패널을 선정하여 단일 맹검 시험법(Single blind test)을 실시함
- 단일 맹검 시험법 (Single blind test)을 수행하기 위한 기준 및 평가 항목은 <표 21>과 같음

샘플	항균제 처리여부	패널 (명)	평가방법	평가 기준 및 항목
샌드위치	A: 비처리군	총 :10 명 남자 : 3 명 여자 : 7 명	단일 맹검 시험법 (Single blind test)	개인의 기호에 따라 선호하는 항목 선택
	B: 처리군			외관상 선호도에 대한 평가
김밥	A: 비처리군			향미에 대한 선호도 평가
	B: 처리군			맛에 대한 선호도 평가
샐러드	A: 비처리군			식감에 대한 선호도 평가
	B: 처리군			기타 의견

<표 21> 단일 맹검 시험법 (Single blind test)을 위한 기준 및 평가 항목

<표 21>과 같이 단일 맹검 시험법 (Single blind test)을 위한 평가 기준 및 항목에 따라 3 가지 즉석 식품에 대하여 10 명의 패널들을 대상으로 단일 맹검 시험법 (Single blind test)을 실시하였으며 복합 천연미생물저해제를 비 처리한 A군을 제외한 복합 천연미생물저해제를 처리한 B군 및 A군과 B군의 차이가 없다는 C군은 실제 식품 적용 후 유통 시 소비자들에 대한 불만을 못느낄 것으로 판단되어 본 단일 맹검 시험법에서는 긍정적인 결과로 판단하였으며 그 결과는 <표 22>와 같음

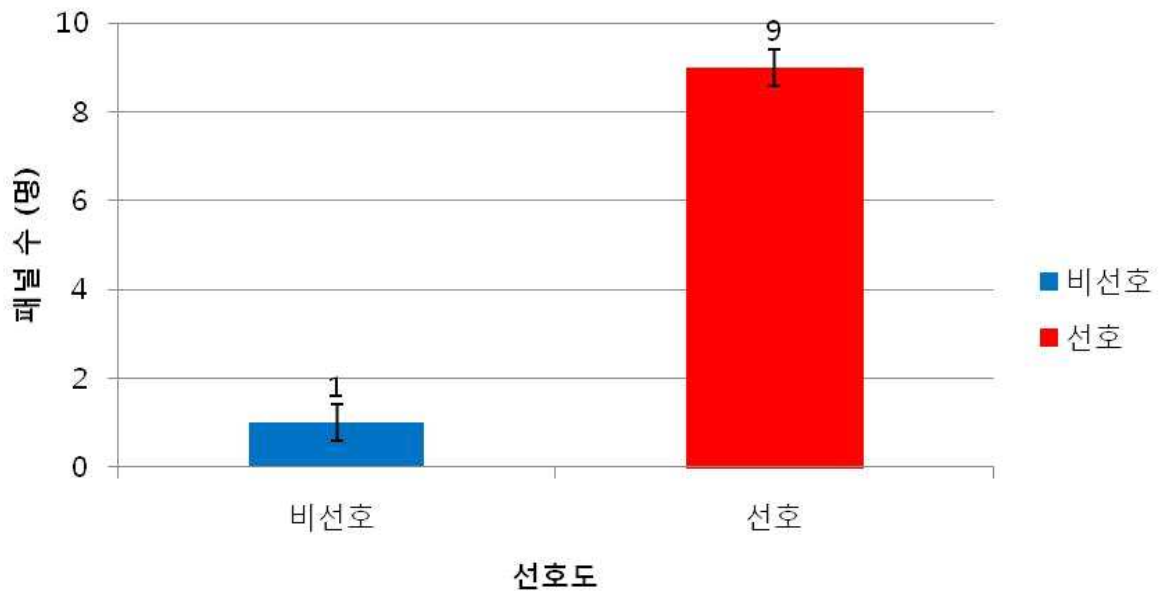
단일 맹검 시험법		선호도		
샘플명	검사항목	비처리군 (A 군)	처리군 (B 군)	A 군과 B 군의 차이가 없다
샌드위치	외관	2	1	7
	향미	0	1	9
	맛	1	1	8
	식감	1	1	8
	기타	•처리군 (B 군)에서 약간 시큼한 맛이 났음. (1 명)		
단일 맹검 시험법		선호도		
샘플명	검사항목	비처리군 (A 군)	처리군 (B 군)	A 군과 B 군의 차이가 없다
김밥	외관	0	2	8
	향미	2	1	7
	맛	4	2	4
	식감	1	1	8
	기타	•비처리군 (A 군)에서 식감이 너무 딱딱함 (1 명) •처리군 (B 군)에서 약간 시큼한 맛이 났음 (1 명)		
단일 맹검 시험법		선호도		
샘플명	검사항목	비처리군 (A 군)	처리군 (B 군)	A 군과 B 군의 차이가 없다
샐러드	외관	1	0	9
	향미	2	0	8
	맛	2	3	5
	식감	2	0	8
	기타	•처리군 (B 군)에서 약간 단맛이 났음		

<표 22>복합 천연미생물저해제 처리 여부에 따른 3 가지 즉석식품에 대한 단일 맹검 시험법 (Single blind test) 결과

- <표 22>와 같이 3 가지 즉석식품에 대한 단일 맹검 시험법의 결과를 통하여 각 샘플에 대한 평균 값 및 표준편차를 계산하였으며 그 결과는 <표 23>, <표 24> 및 <표 25>와 같음

샘플명	측정 값	비선호	선호
샌드위치	평균	1	9
	표준편차	0.82	0.82
	에러율	0.40824829	0.40824829

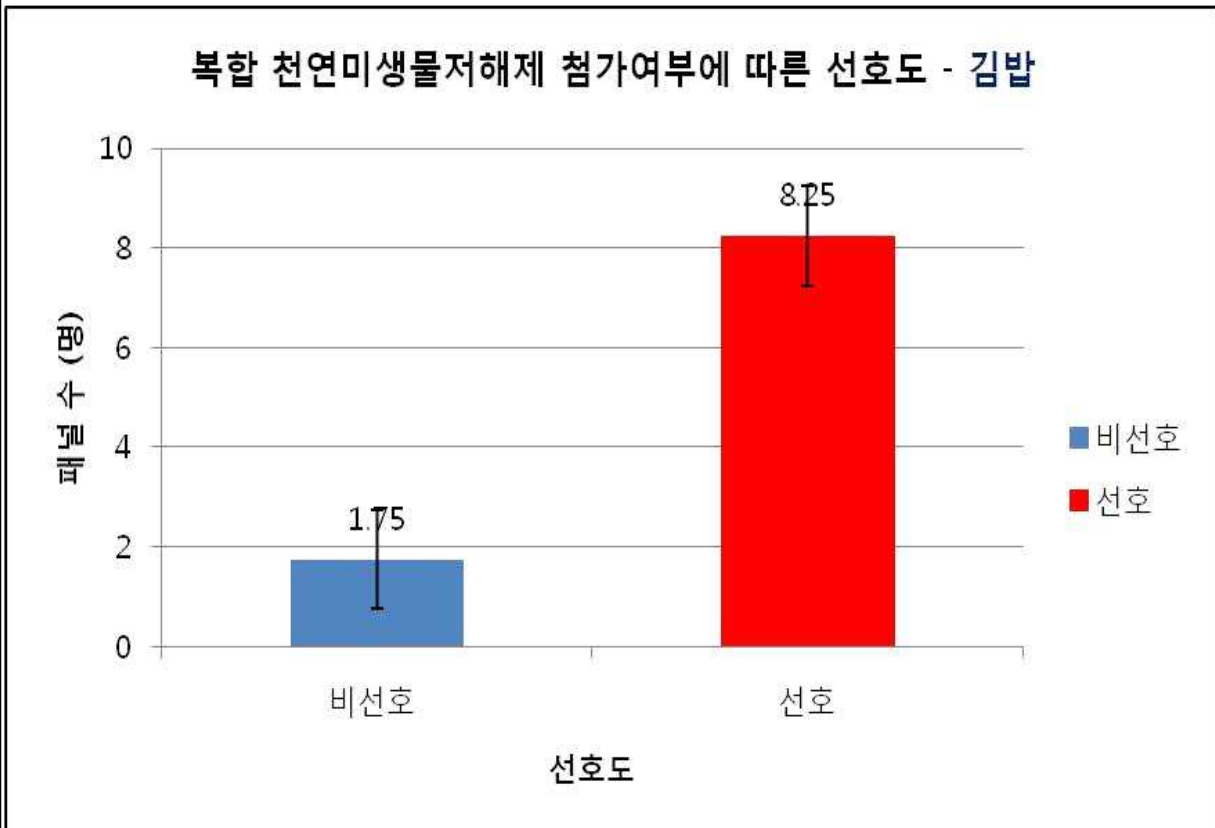
복합 천연미생물저해제 첨가여부에 따른 선호도 - 샌드위치



<표 23> 샌드위치 샘플의 복합 천연미생물저해제 처리 여부에 대한 단일 맹검 시험법 최종 결과

- <표 23>의 결과와 같이 샌드위치 샘플에 복합 천연미생물저해제를 처리한 군의 선호도가 약 9 배 정도 높게 분석된 것으로 보아 향후 샌드위치 제조, 가공 및 유통 전 복합 천연미생물저해제 처리를 통하여 식품보존기간 증대를 위한 식품 첨가물로서 신규 개발된 복합 천연미생물저해제 적용에 대하여 긍정적인 결과를 보일 것으로 기대됨

샘플명	측정값	비선호	선호
김밥	평균	1.75	8.25
	표준편차	1.71	1.71
	에러율	0.85	0.85

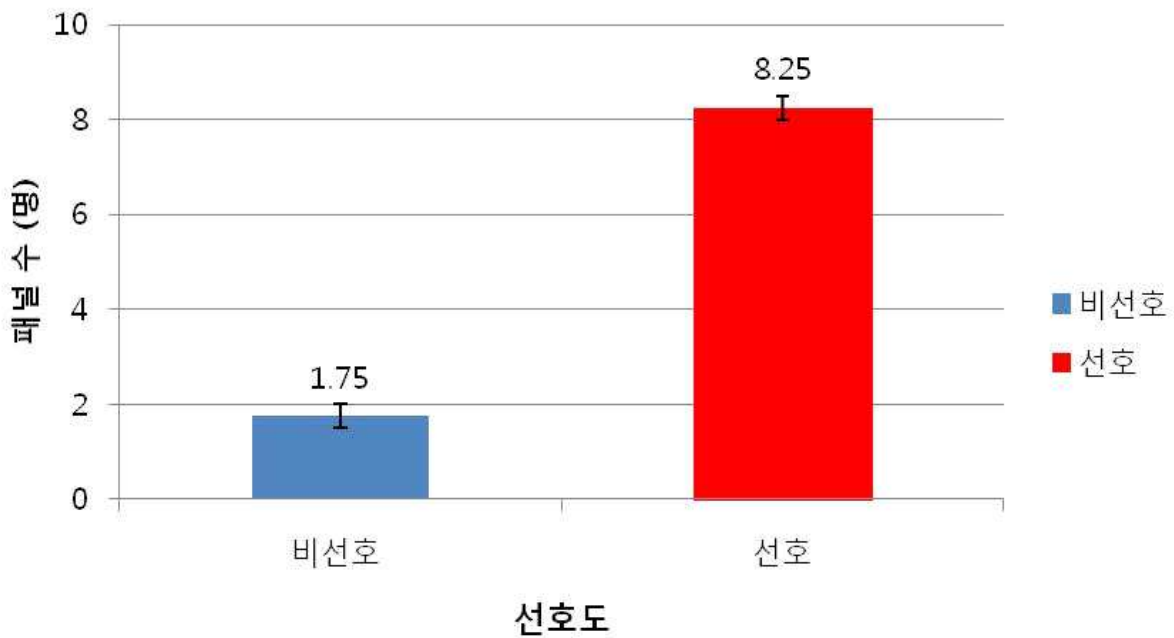


<표 24> 김밥 샘플의 복합 천연미생물저해제 처리 여부에 대한 단일 맹검 시험법 최종 결과

- <표 24>의 결과와 같이 김밥 샘플에 복합 천연미생물저해제를 처리한 군의 선호도가 약 4.73 배 정도 높게 분석된 것으로 보아 향후 김밥 제조, 가공 및 유통 전 복합 천연미생물저해제 처리를 통하여 보존기간 증대를 위한 식품 첨가물로서 신규 개발된 복합 천연미생물저해제 적용에 대하여 긍정적인 결과를 보일 것으로 기대됨

샘플명	측정값	비선호	선호
샐러드	평균	1.75	8.25
	표준편차	0.50	0.50
	에러율	0.25	0.25

복합 천연미생물저해제 첨가여부에 따른 선호도 - 샐러드



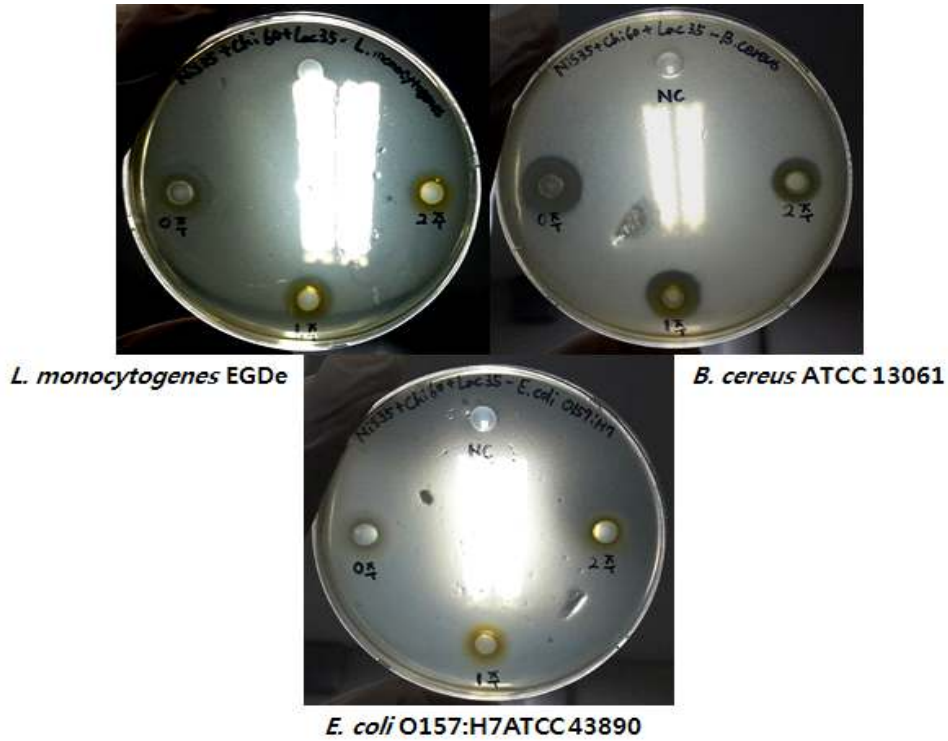
<표 25> 샐러드 샘플의 복합 천연미생물저해제 처리 여부에 대한 단일 맹검 시험법 최종 결과

- <표 25>의 결과와 같이 샐러드 샘플에 복합 천연미생물저해제를 처리한 군의 선호도가 약 4.73 배 정도 높게 분석된 것으로 보아 향후 샐러드 제조, 가공 및 유통 전 복합 천연미생물저해제 처리를 통하여 보존기간 증대를 위한 식품 첨가물로서 신규 개발된 복합 천연미생물저해제 적용에 대하여 긍정적인 결과를 보일 것으로 기대됨

<천연복합저해제의 유통기간 및 처리 후 효과 유지 기간>

- 천연복합저해제의 열에 대한 안정성 연구를 위해 최종 결정된 농도 조합의 항균제를 제조 후 1.5 ml의 EP tube에 분주하여 50°C dry oven에 1 ~2 주 동안 보관 후 10^7 CFU/ml의 식중독균을 접종 후 37°C에서 12시간 배양하여 Standard agar well diffusion method 및 viable Cell counts를 통하여 항균성 유, 무를 평가함.
- 50°C dry oven에 1 ~2 주 동안 보관된 항균제의 항균성 유, 무를 Standard agar well diffusion

method를 통하여 정성적으로 평가한 결과는 <그림 12>와 같음.



<그림 32> 50°C dry oven에 1~ 2주 보관된 천연복합저해제에 정성적 방법으로 Standard agar well diffusion method를 이용한 열에 대한 안정성 연구 결과
(나이신 30% (0.3 mg/ml), 키토산 올리고당 60% (12 mg/ml), 락토펜 35% (4.375 mg/ ml))

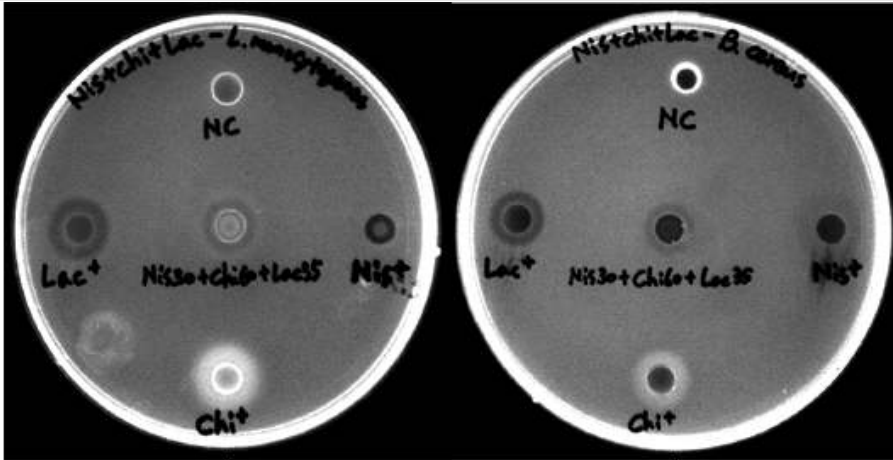
-<그림 32>에서 보는 바와 같이 50°C dry oven에 1 ~2 주 동안 보관된 항균제의 항균성 유,무를 Standard agar well diffusion method를 통하여 정성적으로 평가한 결과 *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7 균주에 대해 모두 항균성을 보였음.

-이 결과를 정성적으로 평가하고자 Viable Cell count를 통하여 저해 유,무를 확인한 결과는 <표 26>과 같음.

<표 26> 50°C dry oven에 1~ 2주 보관된 천연복합저해제에 정량적 방법으로 Viable Cell count를 이용한 열에 대한 안정성 연구 결과

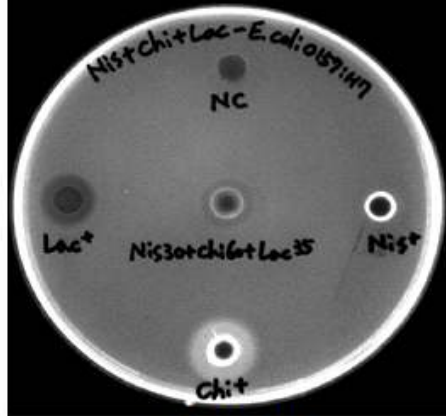
식중독균	천연복합저해제 보관 온도	보관 기간	생균수 측정	최종 시너지 농도
<i>L. monocytogenes</i> EGDe	50°C	저해제 비처리군 (음성 대조군)	2.16 X 10 ⁹ CFU/ml	6 log ↓
		0 주	1.3 X 10 ³ CFU/ml	
		1 주	1.8 X 10 ³ CFU/ml	
		2 주	2 X 10 ³ CFU/ml	
식중독균	천연복합저해제 보관 온도	보관 기간	생균수 측정	최종 시너지 농도
<i>B. cereus</i> ATCC 13061	50°C	저해제 비처리군 (음성 대조군)	1.2 X 10 ⁹ CFU/ml	7 log ↓
		0 주	1.7 X 10 ² CFU/ml	
		1 주	2.2 X 10 ² CFU/ml	
		2 주	3.2 X 10 ² CFU/ml	
식중독균	천연복합저해제 보관 온도	보관 기간	생균수 측정	최종 시너지 농도
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43890	50°C	저해제 비처리군 (음성 대조군)	2.03 X 10 ⁸ CFU/ml	5 log ↓
		0 주	3 X 10 ³ CFU/ml	
		1 주	2.5 X 10 ⁵ CFU/ml	3 log ↓
		2 주	2.96 X 10 ⁵ CFU/ml	

- <표 26>에서 보는 바와 같이 50°C dry oven에 1 ~2 주 동안 보관된 향균제의 향균성 유,무를 Viable Cell count를 통하여 정량적으로 평가한 결과 *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* O157:H7 균주에 대해 약 3 ~7log 정도의 높은 향균 활성을 보였음.
- 본 연구 결과를 바탕으로 최종년도 식품에 응용한 향균 능력 연구에 비해 향균제에 균을 직접 접종하여 높은 향균 활성을 보인 원인은 식품내 존재하는 다양한 식품 물질로 인해 향균 물질이 직접 식중독 균체에 영향을 주는 것에 약간의 방해가 작용된 것으로 사료됨.
- 또한 *L. monocytogenes*, *B. cereus*에 대한 향균 활성에 비해 *E. coli* O157:H7에 대한 향균 활성이 낮았던 원인은 개발된 천연복합저해제의 농도가 *L. monocytogenes*, *B. cereus*를 저해하기 위한 농도 보다는 높은 농도이나 *E. coli* O157:H7를 저해하기 위해서는 최소저해농도 (MIC)에 가까운 농도이기 때문이라 사료됨.
- 마지막 연구로 천연복합저해제의 유통기한에 대한 향균성 유지 연구를 위해 제조 후 실온에 1년간 보관된 향균제를 이용하여 향균성 유,무를 확인하기 위해 Standard agar well diffusion method를 통하여 평가한 결과는 <그림 33>과 같음.



L. monocytogenes

B. cereus



E. coli O157:H7

<그림 33> 실온에서 1년간 보관된 천연복합저해제에 정성적 방법으로 Standard agar well diffusion method를 이용한 열에 대한 안정성 연구 결과
(나이신 30% (0.3 mg/ml), 키토산 올리고당 60% (12 mg/ml), 락토펜 35% (4.375 mg/ml))

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

평가의 착안점 및 기준	달성도 (%)
○ 자성 나노입자 기반 시료 전처리 시스템 제작 여부	100
○ 자성 나노입자 표면의 최적의 항체 고정화 조건 확립(공초점 현미경의 형광 세기로 평가)	100
○ 융합단백질(GBP-ProG)의 항체고정화를 위한 바이오링커로서의 유용성 분석 비교 분석 (Cyclic voltammetry, CV 데이터로 분석)	100
○ 플라스틱 기반 골드 전극 칩 및 미세유체 채널 제작 여부	100
○ 융합단백질 및 항체의 전극 표면에 고정화 균일도, 재현성 분석(균일도 >90%, 재현성 >80%)	100
○ 전극칩과 미세유체 채널이 일체화된 전기화학 바이오센서의 식중독균 검출 여부(CV 데이터 분석)	100
○ 자성입자 도입에 의한 식중독균 검출 성능 평가(민감도 >20%)	100
○ 시료 전처리 디바이스와 바이오센서가 일체화된 시스템에 의한 즉석식품 내 식중독균 검출 성능 테스트 (Listeria 균을 101 cfu/mL의 검출한계)	100
○ 현장적용 가능성 평가(Listeria 균을 101 cfu/mL의 검출한계)	100
○ Ready-to-eat 식품의 경우 기존의 lactate 같은 천연복합저해제들은 식품자체의 맛이나 향미를 변화가 일어나지 않아야 함.	100
○ 기존의 천연복합저해제들은 부가적인 건강기능성이 부족하므로 이러한 인체건강기능성을 부여하면서도 Ready-to-eat 식품내의 식중독균을 저해할 수 있는 복합적인 기능이 바람직함.	100
○ Ready-to-eat 식품들은 냉장 유통되므로 이러한 냉장조건에서 생장이 우수한 리스테리아의 완벽한 제어가 가능해야 함.	100

○ 락토페린, 나이신 및 수용성 키토산의 경우 각기 단일성분으로 사용되었을 경우에는 일반적으로 2-3 log정도 감소를 보임. 세 가지의 성분이 혼용되었을 경우에 상호 시너지효과를 확인.(저해능 5 log를 목표로 함).	100
○ Ready-to-eat 제품의 생산 공정에 바로 사용할 수 있는 스프레이 형태의 천연보존제 제품화 개발	100

제 2 절. 관련분야의 기술발전예의 기여도

○ 효과적 항체 고정화에 의한 전기화학식 면역-바이오센서 제작으로 관련 연구 분야 발전의 가속화가 기대됨
○ 고감도 바이오센서의 개발로 다양한 식품내에 존재하는 극소량의 식중독균 뿐만 아니라 다양한 식품위해물질의 현장 검출이 기대됨
○ 새로운 개념의 고감도 전기화학 나노바이오센서 특허 등록으로 국제 경쟁력을 갖춘 국내 기술력 확보가 기대됨
○ 나노바이오(Nano-Bio)의 분자 연구·개발로서, 바이오콘텐츠 기술개발 가속화 및 바이오칩 원천기술 개발로의 시너지 효과가 기대됨.
○ 연구에서 수행되는 기술력은 식중독사고가 빈번하게 일어나는 가장 큰 이유중 하나인 Ready-to-eat 식품의 안전성 및 보존성을 확보해 나가는 방법에 대하여 천연물질을 활용하여 해결해 나가는 방법을 제시해 줌.
○ 특히 Ready-to-eat 식품내 존재하는 식중독균의 종류 및 생균수를 선택배지 등의 전통적인 미생물 검출방법을 비롯하여 분자생물학적인 연구방법인 16S rRNA PCR and Sequencing을 활용한 식중독균의 빠르고 정확한 동정법개발 및 최신 미생물수 정량방법인 Real-time PCR 방법을 개발 및 적극 활용하여 새롭게 개발되는 천연복합저해제의 유효성 및 활용도를 빨리 평가할 수 있는 기술개발에도 도움이 될 것임.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절. 연구개발 성과

1. 연구개발결과의 성과 및 목표 대비 실적

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타 (제품화)
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표	1								
	달성	1								
2차 년도	목표	1	1					2		1
	달성									
3차 년도	목표	1	1					2		2
	달성							1		
4차 년도	목표		1							
	달성		1					1		
계	목표	3	3					4		3
	달성	1	1					2		0

가. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2012	신규한 단백질 및 이의 용도	차의과학대학교 산학협력단	대한민국	10-2012-0054954	2014	신규한 단백질 및 이의 용도	차의과학대학교 산학협력단	대한민국	9월 중 등록 예정
2013	Novel Protein and Use Thereof	고성호, 정광희, 김아람	미국	PCT/KR2013/004539					

나. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2014	<i>Vibrio vulnificus</i> Bacteriophage SSP002 as a Possible Biocontrol Agent	이현성	이주훈 최상호	최슬애 신학동	Applied and Environmental Microbiology	80(2)	국외	SCI (IF 3.678)
2014	Rapid detection of aflatoxin B1 by a bifunctional protein crosslinker-based surface plasmon resonance biosensor	박재홍 김영필	고성호	김인호	Food Control	36	국외	SCI

2. 연구성과 활용 목표 대비 실적

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2	3		1		
	달성	0	0		0		

제 2 절. 성과활용계획

- 고감도 바이오센서의 개발로 다양한 식품내에 존재하는 *Listeria monocytogenes*의 현장 검출 가능성(시간절약을 통한 유통기간 확보)을 보였으며, 다양한 항체를 이용하여 본 연구의 시스템을 다른 미생물에 적용예정.
- 방향성 있는 항체 고정화 방법과 이를 이용한 전기화학식 면역-바이오센서 개발은 다양한 질병 검사와 병원균 발견에 활용이 가능함.
- 천연복합저해제의 개발로 식품의 보존성을 증대시키고 식중독 예방효과를 기대할 수 있음.
- 현재 사용되고 있는 식품보존제와의 비교를 통한 대체가능성 조사.
- 대량 생산을 통한 경제성 확보와 제품화 검토.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

○ 연구개발 기간동안 특이사항 없음.

제 7 장 참고문헌

1. 강태진. 2006. 식품산업현황과 발전방향. BioWave 8:22
2. 한국보건산업진흥원. 2009. 2009년 식품산업 분석 보고서.
3. 권오석. 2010. 친환경 소재 천연식품 보존제 개발 성공. 안동인터넷뉴스 2월 25일자 기사.
4. 조미희 외 3인. 2008. 천연항균제의 식품산업에의 응용. 식품과학과 산업 6월호 pp. 36-45
5. Mo H, Zhu Y and Chen Z. 2010. Microbial fermented tea - a potential source of natural food preservatives. Trends Food Sci. Technol. (Epub ahead)

주 의

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