

발간등록번호

11-1543000-002771-01

캠필로박터 및 바실러스 검출용 고성능, 고 편의성의 소포장 kit 개발 및 시제품 제작 최종보고서

2019 . 06 . 14 .

주관연구기관 / (주)진성유니텍

협동연구기관 / (주)센서젠

고부가가치식품기술개발사업

R&D Report

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “고부가가치기술개발사업”(개발기간 : 2017.12.21. ~ 2018.12.20)과제의 최종
보고서로 제출합니다.

2019 . 02 . 07 .

주관연구기관명 : (주)진성유니텍 (대표자)

협동연구기관명 : (주)센서젠 (대표자)



주관연구책임자 : 전 성 빈

협동연구책임자 : 서 건 호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117105-01	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.12.21.-20 18.12.20 (12개월)	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	[고부가가치식품기술개발사업]			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	캠필로박터 및 바실러스 검출용 고성능, 고 편의성의 소포장 kit 개발			
연구책임자	전 성 빈	해당단계 참여연구원 수	총: 7 명 내부: 7 명 외부: 0 명	해당단계 연구개발비	정부: 160,000 천원 민간: 55,000 천원 계: 215,000 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 7 명 내부: 7 명 외부: 0 명	총 연구개발 비	정부: 160,000 천원 민간: 55,000 천원 계: 215,000 천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	(주)진성유니텍 연구개발부, 진단평가부			참여기업명 (주)센서젠 연구개발부	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위 탁 연 구	연구기관명:			연구책임자:	
연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 과제				

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	✓	✓									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수

본 연구를 통하여 *B. cereus* 및 *Campylobacter* 검출을 위한 고성능 개선된 선택배지를 개발함
개발한 개선배지는 cefuroxime이라는 항생물질을 첨가한 개선된 m-MYPA 선택배지와 TiO₂, 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, Bile salt, tazobactam 등의 발색물질, 항생제를 첨가한 개선 C-mCCDA 선택배지로 시판되고 있는 기존배지 제품에 비하여 다양한 생시료 내에서 목적균 (*Campylobacter* 또는 *Bacillus cereus*) 이외의 경쟁세균을 제어하고 선택성, 양성 검출률, 회복력, 과오염 개선 등 다양한 지표에서 *Campylobacter* 및 *Bacillus cereus*의 우수한 검출 능력이 확인됨 또한 신규 개발된 선택배지를 kit 제품화 하고자 최적의 포장재를 적용한 검출용 소포장 배지 kit를 개발하였으며, 소포장 Kit 개발로 인하여 사용자의 계량시간을 단축하고 파우더 흡입 등의 불편함으로부터 해소됨을 확인함
이 소포장 Kit는 사용자의 편의성을 높이고 정확한 검출 결과를 도출할 수 있도록 제작됨

78

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 캠�필로박터균 및 바실러스 세레우스균 신속 정확 검출용 저비용-고편의성 kit 개발 ◆ 검체식품에서 목적균 (캠틀로박터균, 바실러스 세레우스균) 이외의 경쟁세균 제어 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 기존배지에 나타나는 목적균 이외의 경쟁세균을 동정하고 그 특성을 분석하여 제어 물질 탐색 및 선정을 위한 기초자료 확보 ◆ 경쟁세균 억제물질 발굴 및 선택배지 개선/개발 <ul style="list-style-type: none"> - 발굴된 후보물질들을 농도별로 첨가한 선택배지들을 대상으로 경쟁세균과 목적균에 대한 최소억제농도(MIC, Minimum inhibitory concentration)를 산출함 - 최종적으로 첨가될 억제물질의 농도를 결정하고 고성능 선택배지 개발 ◆ 기존배지와 개발배지의 성능 비교검증 <ul style="list-style-type: none"> - 실제 식품시료를 대상으로 기존배지와 개선배지의 성능을 비교함 - 성능의 비교는 1)목적균 검출률 2)경쟁세균의 검출률 3)경쟁세균의 성장정도를 통해 평가함 - 최종적으로 개선배지의 성능을 실험실간 교차검증함 ◆ 개선배지가 포함된 캠틀로박터 또는 바실러스 세레우스 검출용 소포장 kit 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 성능이 검증된 개선배지가 포함된 유통/편의성이 높은 소포장 kit 제작 - 소포장 kit의 저장기간별 품질검증 및 보완 - 최종 kit 시제품 제작 및 베타사이트 테스트 후 상용화 준비 완료 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 현행법상 사용되고 있는 캠틀로박터/바실러스 선택배지 대비 비용 및 검출도가 향상된 배지 개발 ◆ 소포장을 통한 유통 및 사용자-편의성을 개선한 진단 kit 시제품 제작 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 캠틀로박터/바실러스 세레우스 검출용 국제 경쟁력 있는 국산 제품 출시 ◆ 캠틀로박터/바실러스 세레우스 검출 kit 상용화로 매출 증대 ◆ 캠틀로박터/바실러스 세레우스 검출 kit 검증결과를 토대로 공전법 등재 ◆ 식중독세균 신속검출 제품 수출 활로 개척 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>캠틀로박터</p>	<p>바실러스 세레우스</p>	<p>사용자 편의성</p>	<p>저비용</p>	<p>검출 키트</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p><i>Campylobacter</i></p>	<p><i>Bacillus cereus</i></p>	<p>User-friendly</p>	<p>Cost effective</p>	<p>Detection kit</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<영문 요약문>

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Development of high-performance, user-friendly prototype detection kit for detection of <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i> ◆ Investigation of inhibitor candidates suppressing competing flora in <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i> selective agar <ul style="list-style-type: none"> ✓ Isolation and characterization of competing flora from samples ✓ Investigation of inhibitor candidates capable of inhibiting competing flora ◆ Development of inhibitor-supplemented improved agar for detection of <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i> selective agar <ul style="list-style-type: none"> ✓ Establishing appropriate amount of inhibitor to inhibit competing flora ✓ Supplementation of inhibitor to selective agar (improved agar) ◆ Comparison of performance between normal and improved agar in actual food sample <ul style="list-style-type: none"> ✓ Comparison list: 1)Detection rate of <i>Campylobacter</i> or <i>Bacillus cereus</i> 2) Growth rate of competing flora 3) Growth index of competing flora ✓ Cross-validation of performance of improved agar ◆ Development of prototype kit product <ul style="list-style-type: none"> ✓ Development of user-friendly simplified prototype detection kit for <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i> ✓ Establishing of self life of product ✓ Beta site test 				
Results	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Development of detection kit exhibiting high performance for <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i> ◆ Simplified user friendly prototype product 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Production of an internationally competitive domestic detection kit for <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i> ◆ Uplift in sales by commercializing detection kits for <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i> ◆ Improvement of official detection method for <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i> ◆ Exportation of a domestic detection kit product for <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i> 				
Keywords	<i>Campylobacter</i>	<i>Bacillus cereus</i>	Cost effective	User-friendly	Detection kit

<Summary>

<p>Purpose & Contents</p>	<p>Development of high-performance, user-friendly prototype detection kit for detection of <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ◆ Investigation of inhibitor candidates suppressing competing flora in <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i> selective agar <ul style="list-style-type: none"> ✓ Isolation and characterization of competing flora from samples ✓ Investigation of inhibitor candidates capable of inhibiting competing flora ◆ Development of inhibitor-supplemented improved agar for detection of <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i> selective agar <ul style="list-style-type: none"> ✓ Establishing appropriate amount of inhibitor to inhibit competing flora ✓ Supplementation of inhibitor to selective agar (improved agar) ◆ Comparison of performance between normal and improved agar in actual food sample <ul style="list-style-type: none"> ✓ Comparison list: 1)Detection rate of <i>Campylobacter</i> or <i>Bacillus cereus</i> 2) Growth rate of competing flora 3) Growth index of competing flora ✓ Cross-validation of performance of improved agar ◆ Development of prototype kit product <ul style="list-style-type: none"> ✓ Development of user-friendly simplified prototype detection kit for <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i> ✓ Establishing of self life of product ✓ Beta site test 				
<p>Development results</p>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Development of detection kit exhibiting high performance for <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i> ◆ Simplified user friendly prototype product 				
<p>Expected Contribution</p>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Production of an internationally competitive domestic detection kit for <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i> ◆ Uplift in sales by commercializing detection kits for <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i> ◆ Improvement of official detection method for <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i> ◆ Exportation of a domestic detection kit product for <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i> 				
<p>Keywords</p>	<p><i>Campylobacter</i></p>	<p><i>Bacillus cereus</i></p>	<p>Cost effective</p>	<p>User-friendly</p>	<p>Detection kit</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< **Contents** >

Chapter 1. Overview of the research and development project 8

1. Objectives of the research and development 8

2. Necessity of the research and development 8

3. Scope of the research and development 12

Chapter 2. The research performance content and results 14

Section 1. Research Methods and Results 14

1-1. Overview for development of *Bacillus cereus selctive media* 14

1-2. Research Methods 14

1-3. Research Results 17

2-1. Overview for development of *Campylobacter selctive media* 24

2-2. Research Methods 24

2-3. Research Results 29

3-1. Overview for development of the small packaging Kit 33

3-2. Research Methods 33

3-3. Research Results 40

Section 2. Implementation schedules and performances of research 54

Section 3. Achievements of the research and development 55

1. Academic achievement 55

2. Policy Utilization and Promotional Performance 57

3. Performance of intellectual property rights 57

4. Technology transfer commercialization achievements 58

5. Commercialization achievements 59

Chapter 3. Goal achievements and contribution to related fields 62

1. Goal 62

2. Attainment of the goal 63

3. Causes and follow-up measures for non-fulfillment 65

Chapter 4. Plan for utilizing study results 66

Attached. References 67

<Attached> Self-Assessment of the Subjective Research Institute

<본문목차>

< 목 차 >

제 1장. 연구개발과제의 개요	8
1. 연구개발 목적	8
2. 연구개발의 필요성	8
3. 연구개발 범위	12
제 2장. 연구수행 내용 및 결과	14
제 1절. 연구방법 및 결과	14
1-1. <i>Bacillus cereus</i> 배지개발 개요	14
1-2. 실험방법	14
1-3. 실험결과	17
2-1. <i>Campylobacter</i> 배지개발 개요	24
2-2. 실험방법	24
2-3. 실험결과	29
3-1. 소포장 Kit 개발 개요	33
3-2. 실험방법	33
3-3. 실험결과	40
제 2절. 연구의 추진일정 및 성과수행도	54
제 3절. 연구개발 성과	55
1. 학술 성과	55
2. 정책 활용·홍보 성과	57
3. 지식재산권 성과	57
4. 기술실시(이전) 성과	58
5. 사업화 성과	59
제 3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	62
1. 목표	62
2. 목표 달성여부	63
3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 사후대책	65
제 4장. 연구결과의 활용 계획	66
붙임. 참고 문헌	67

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제 1장. 연구개발과제의 개요

1. 연구개발 목적

구분	내용
최종목표	▶ 본 연구의 최종목표는 효과적인 <i>Campylobacter jejuni / coli</i> 및 <i>Bacillus cereus</i> 의 검출을 위한 고성능 선택배지를 개발하고 최적의 포장재의 선택 및 포장방법을 개발하여 저비용으로 실험자의 사용의 편의성을 높이고 정확한 결과를 도출할 수 있게 하는 kit를 개발하는 것에 있음
세부목표	▶ 식품에서의 목적균(<i>Campylobacter / Bacillus</i>)이외의 경쟁세균 특성분석 및 균주 확보 ▶ 경쟁세균을 억제할 수 있는 억제물질 후보균 선정 ▶ 억제물질의 적정 첨가농도 및 균주별 최소억제농도 data 확보 ▶ 억제물질이 첨가된 개선배지 제작 ▶ 개선배지를 포함한 소포장 kit 제작 ▶ 소포장 kit의 품질유지기간 설정 및 최종 시제품 제작

2. 연구개발의 필요성

<현행 식품 및 축산물 공전법에 사용되는 *Campylobacter jejuni / coli* 및 *Bacillus cereus* 선택배지 개선의 필요성>

- ◆ *Campylobacter jejuni / coli* 는 닭을 포함한 가금류에 주로 오염되는 위험성이 높은 식중독 세균임
- ◆ 유럽 EFSA (European Food Safety Authority)의 통계조사에 따르면, 식품유래 인수공통전염질병 중, 발병사례기준 70% 이상이 *Campylobacter*로 보고된 만큼, 그 위험성이 심각함 (그림 1)

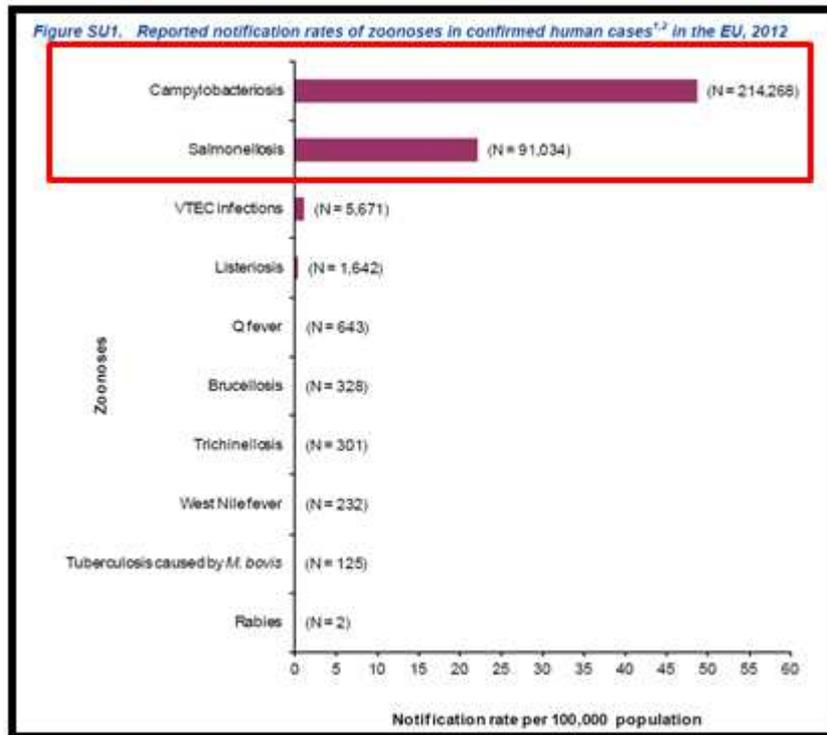


그림 1. European Food Safety Authority 인수공통전염병 통계조사 자료 (2016)

- ◆ 이러한 *Campylobacter*균이 주로 검출되는 식품은 가금육으로 가금육에서의 정확한 진단과 검출은 매우 중요함
- ◆ 현재 국내의 ‘식품공전’ 및 ‘축산물의 가공기준 및 성분규격’의 *Campylobacter* 검출을 위한 미생물 시험법에 사용되는 분리배양용 배지 (mCCDA, modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar)는 선택성이 낮아 정확한 *Campylobacter* 검출이 어려운 것으로 보고되고 있음 (Chon et al., 2013)
- ◆ mCCDA의 선택성을 높이기 위해 첨가되는 주요 물질은 3 세대 cephalosporin 계열 항생제인데, 닭/오리 도체에 존재하는 주요 경쟁균들이 이들 항생제를 분해하는 효소 (ESBL, extended spectrum beta-lactamase)를 생산함으로써 지속적 저항성을 획득하고 있는 실정임
- ◆ 이들 경쟁균들이 현행 공전시험법 선택배지(mCCDA)에서 효과적으로 제어되지 않고 과도하게 성장함으로 인하여 검출 목적균인 *Campylobacter*의 집락형성이 저해되고 뒤덮여 버림으로써, 가금류 도체에서의 정확한 *Campylobacter*의 검출이 불가능한 경우가 많음 (Kim et al., 2016) (그림 2)

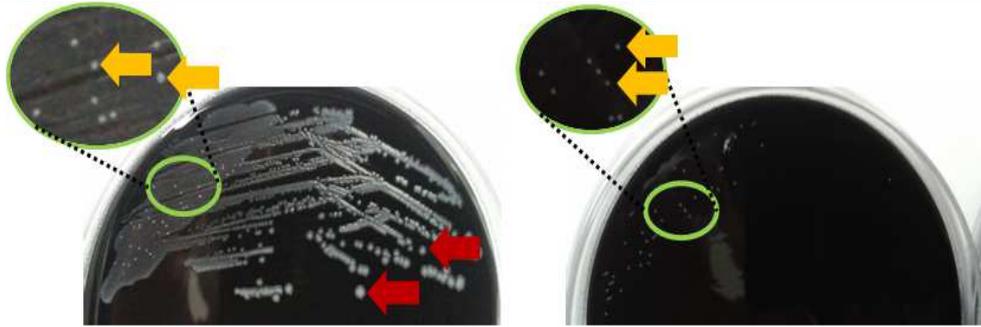


그림 2. *Campylobacter* 검출용 일반배지(좌); 개선배지(우), 경쟁세균(붉은색 화살표); *Campylobacter* (주황색 화살표)

- ◆ *Bacillus cereus*의 경우 대부분의 식품에서 정량기준으로 관리하고 국내에서 발견되는 식중독균 중 매우 흔하게 분리되는 균이기 때문에 이를 분석하기 위한 기존의 MYP 배지는 *Bacillus cereus* 외에 다른 그람 양성균이 polymyxin B(MYP에 기본적으로 첨가되는 선택제제)에 의해 억제되지 못하고 MYP 배지 상에서 우점하여 목적균의 성장 및 균수 산정에 큰 어려움을 주는 현상이 지속적으로 보고되고 있음(Chon et al., 2012)
- ◆ 따라서, 위 사진과 같이 경쟁세균을 억제할 수 있는 물질을 첨가한 개선배지들이 꾸준히 개발되고 있으나, 신종/변종 경쟁세균의 등장으로 인하여 새로운 선택배지의 개발이 절실함

<개별 소포장 배지 개발의 필요성>

- ◆ 현재의 시판 중인 미생물 검출용 배지는 100 g, 250 g, 500 g, 1 kg, 5 kg 단위의 대용량 분말 배지로 판매되고 있어 실험자의 필요량에 따라 배지를 저울로 계량하여 사용함
- ◆ 현재 통상적으로 시판되고 있는 포장단위가 100 g 또는 500 g 단위의 분말배지는 실험량이 많지 않은 고객에게는 불필요하게 많은 양의 단위로 유효기간까지 전부 소진하지 못하는 경우가 많으며 일부 사용자는 유효기간이 경과한 배지를 사용하여 부정확한 결과를 초래하기도 함. 소포장 배지를 사용하는 경우 실험에 필요한 양만 구입이 가능하므로 매 실험 때마다 최적의 결과를 얻을 수 있음
- ◆ 분말 배지의 특성상 배지 계량 시 미세한 파우더 입자의 분산으로 인하여 호흡기로 쉽게 흡입되어 불쾌한 이물감을 호소하는 실험자가 많으며 일부 배지 내 성분은 인체에 유해하여 개량 시 상당히 주의를 요하지만 대부분의 실험자들이 이 유해성을 간과하고 실험에 임하고 있음
- ◆ 또한 저울로 계량 시 시간 및 노동력 소모가 크고 실험자에 따라 계량 값의 오차로 인하여 부정확한 결과를 초래할 수 있는 위험성이 있음



〈분말형태 배지의 예시〉

- ◆ 기존에 유통되고 있는 배지는 제품 개봉 후 산소와 습기가 유입되어 유통기한 경과 전이어도 배지가 굳거나 변색되어 제조된 배지의 색깔과 성능이 떨어지는 단점이 존재함



〈현재 시중에 유통되고 있는 소포장 배지의 형태〉

좌: 플라스틱 소포장 배지 우: 캡슐형태의 소포장 배지

〈표〉 국내의 주요시장 경쟁사

경쟁사명	제품명	포장타입 (배지만으로 구성)	판매가격(원) (개당/250 ml 기준)
HiMedia	HiEncap	캡슐형	\ 4,000~6,000
Neogen	Reveal Medium	용기형 또는 파우치형	\ 6,000~13,000

- ◆ 이로 인해 개개의 실험자에 따라 결과의 영향을 받지 않고 별도의 개량 없이 정해진 용량으로 배지가 1회분씩 포장되고 있어 배지 제조 시간과 노동력을 줄이고 유통 및 사용과정에서도 품질이 일정하게 유지되는 제품이 필요한 실정임
- ◆ 기존 배지 제조회사에서 판매하고 있는 소포장 미생물 배양배지는 플라스틱 용기 또는 캡슐, 알루미늄 비닐 파우치 등으로 포장되어 판매되고 있으나, 캡슐형 배지는 비선택 배지 일부 제품을 대상으로 한정적이며, 가격이 저렴하지 않고 캡슐이 찬물에 잘 녹지 않는다는 단점이 존재함

- ◆ 또한, 플라스틱 용기의 일회용 배지는 항공 운송 시 뚜껑 내부 실링이 파손되어 배지가 굳거나 변색되어 반품 처리 등 사용자 불만을 지속적으로 초래하고 있으며 이러한 단점들을 개선할 수 있는 소포장 기술과 저비용-사용자편의성이 향상된 진단 고성능 식중독세균 검출 kit 개발이 필요함

<연구 개발 대상 및 기술.제품의 개요>

- ◆ *Campylobacter jejuni / coli* 검출용 개선된 선택배지를 제조하기 위한 분말배지와 2종의 추가 첨가제로 이루어진 kit 구성
- ◆ *Bacillus cereus* 검출용 개선된 선택배지를 제조하기 위한 분말배지와 3종의 첨가제로 이루어진 kit 구성
- ◆ 추가적인 계량 없이 배지 제조가 가능하도록 1회 제조 분량만큼 배지를 소포장하고, 1회 제조 분량에 맞도록 추가 첨가제를 구성하여 kit를 제작
- ◆ 배지의 성능과 품질저하 없이 유효기간을 증가시키는 포장 용기 및 포장재를 선택하여 1회 제조용 소포장 배지를 제작



<소량 포장된 배지 powder 및 supplement가 포함된 소포장 배지 kit의 구성예시>

3. 연구개발 범위

- ◆ 주관연구기관((주)진성유니텍 기업부설연구소) :
 - 경쟁세균의 특성분석
 - 각종 검색엔진 및 문헌을 활용한 경쟁세균 억제물질 후보군 발굴
 - 개선된 선택배지의 성능 교차검증
 - 배지 소포장을 위한 최적의 포장재 선택 및 포장방법 디자인
 - 소포장 배지의 최적의 유효기간 설정
 - 시중에 유통 중인 다양한 종류의 포장재 및 포장용기를 사용하여 배지를 소포장한 후 배지

- 의 성상 및 성능 변화 비교, 밀봉 상태 및 재형 변화 여부를 조사하고 사용의 편리성을 확인
- 분말배지를 500 ml 제조량에 맞게 소포장하고 첨가제 2 종을 별도의 용기에 포장하여 구성
- QC 전략 확보 및 유통기한 설정
- 상용화를 위한 허가 및 법리 검토 완료

◆ 협동연구기관((주)센서젠) :

- 경쟁세균을 억제할 수 있는 다양한 억제물질 후보군의 적정 첨가농도 설정
- 적정 첨가농도의 경쟁세균 억제물질이 첨가된 선택배지 제작
- 실제 가금육을 대상으로 한 기존배지와 개선배지의 성능 검증 / 실험실간 교차검증
- 소포장된 배지를 이용하여 배지를 제조할 경우와 기존 벌크병을 이용할 배지를 제조할 경우의 배지 제조시간 및 작업자의 편리성을 비교 확인
- 소포장된 배지를 일정기간 동안 냉장보관하여 개발 제품의 성상변화와 품질변화를 확인
- 최종 시제품을 활용한 실제 검체에서 2차 검증하여 상용화 준비 완료

제 2장. 연구수행 내용 및 결과

<협동 연구 기관: (주) 센서젠>

제 1절. 연구방법 및 결과

1-1. *Bacillus cereus* 배지개발 개요

- ◆ *Bacillus cereus*는 상재균으로 쌀을 비롯한 곡류, 야채, 육류 등에 다양한 식품에 널리 분포하고 있으며 *B. cereus*의 감염량은 환자의 면역상태에 따라 다르나 타 식중독 균 대비 매우 높기 때문에 정성보다는 정량이 우선시 되어 세계 각국은 *B. cereus*에 대한 정량 기준을 가지고 있음
- ◆ 국내에서의 *B. cereus*의 정량기준으로 분유, 유아용식품 등에서는 100 CFU/g이하, 무순, 샐러드 등에서는 1,000 CFU/g 이하, 된장, 고춧가루 등의 조미식품에서는 10,000 CFU/g 이하의 검출 기준을 가지고 있으며 이러한 *B. cereus*의 정량 검출을 기반으로 선택배지를 사용한 표준화된 방법이 널리 사용됨
- ◆ 현재 주로 사용되고 있는 *B. cereus* 검출용 선택배지로는 MYPA (Mannitol - Yolk - PolymyxinB Agar)이며 기타 PEMBA(polymixin B - pyruvate - egg yolk - mannitol - bromothymol blue agar), KG agar 등이 대표적임
- ◆ *B. cereus*는 egg yolk에 함유된 lecithinase반응을 통하여 불투명한 환을 형성하며, Mannitol을 분해하지 못하는 것이 특징으로 Mannitol 분해 여부에 따른 pH의 변화로 배지의 색상 변화를 통하여 *B. cereus* 검출 여부 확인이 가능하여 국내 공인검출법인 식품공전에서는 식품 내 *B. cereus*의 검출을 위한 MYPA 배지의 사용을 제시함
- ◆ MYPA에 첨가되는 항생제 성분인 polymyxin B는 주로 Gram negative bacteria를 표적으로 저해시키므로 기타 Gram positive bacteria의 경쟁 집락에 대한 적합한 항생제의 추가를 통하여 *B. cereus* 검출에 대한 선택성을 증가시킬 필요가 있음
- ◆ 본 사에서는 다양한 항생제를 이용하여 screening test를 진행하였으며 선행연구 결과 cefuroxime이 기존 *B. cereus*를 저해하지 않으면서도 경쟁 집락의 억제에 큰 효과가 있음을 확인함
- ◆ 따라서 본 실험에서는 기존 MYPA에 cefuroxime이라는 항생물질을 첨가하여 신규 선택배지를 개발하였으며 실제 식품시료에서 적용 후 신규 개발된 선택배지가 기존의 MYPA 배지 대비 매우 우수한 *B. cereus* 선택성 및 검출효과가 확인됨

1-2. 실험방법

1) 사용균주

- ◆ 본 연구 과제를 수행하고자 <표1>의 내용과 같이 총 28 종의 *Bacillus cereus* 균주를 사용하였으며 모든 균주는 -80°C deep freezer에 보관되었던 stock cell로부터 blood agar

(bioMérieux, Marcy l' Etoile, France)에 도달한 후 35°C에서 24시간 배양하여 사용함

표1. 신규 개발된 mMYP 배지의 성능 검증 평가에 사용된 균주

균주 정보	
균주명	사용균주수
<i>B. cereus</i> KCTC 1013	1
<i>B. cereus</i> KCTC 1014	1
<i>B. cereus</i> KCTC 1661	1
<i>B. cereus</i> KCTC 1092	1
<i>B. cereus</i> KCTC 3624	1
<i>B. cereus</i> F4810/72(구토형)	1
<i>B. cereus</i> (Wild type: Clinical isolation)	4
<i>B. cereus</i> (Wild type: Food isolation)	18
총 사용균주	28

2) 경쟁세균 특성 분석 및 경쟁세균 억제물질 후보균 발굴

◆ *B. cereus* 검출을 위한 선택배지인 MYPA에 첨가되는 항생물질인 polymyxin B는 주로 Gram negative bacteria를 표적으로 저해하여 *B. cereus*가 속하는 Gram-positive bacteria에 대하여 1차적으로 선택성을 높이는 기능이 있으므로 *B. cereus*의 선택적 검출률 증가 및 경쟁세균을 효과적으로 저해하고자 다양한 논문 검색을 통하여 추가로 첨가될 항생제 후보 물질을 선정 후 실제 적용 후 평가를 통하여 신규 개선된 선택배지를 개발하고자 함

3) Minimum inhibitory concentration(MIC) test

◆ 본 연구 과제를 통하여 개발되는 선택배지 내에 신규 첨가되는 항생물질은 기존의 *B. cereus*의 증식 억제를 방지하고자 *B. cereus*가 해당 항생제 후보균에 대하여 어느 정도의 내성이 있는지 테스트하였으며 <표2>와 같이 MYPA는 식약처 식품공전에서 제시된 방법으로 멸균 증류수에 용해하여 고압 증기멸균 과정을 거친 후 20 ml의 용량으로 균일하게 분주하여 제조함

표2. MYPA 배지 제조 formula

제품명	역할	성분명	사용량
MYPA Mannitol-Yolk-Polymyxin B Agar (Oxoid, UK)	베이스 파우더	Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar	43 g
	항생물질	Polymyxin B	100,000 IU

- ◆ MYPA 배지에 4-64 $\mu\text{g/mL}$ 수준까지 cefuroxime을 첨가하여 배지를 제조 후 28개의 *B. cereus* 균주를 1×10^4 cells 수준으로 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양 후 균주의 성장여부를 통하여 양성으로 판단함

4) Cefuroxime 농도 결정- 순수배양액에서의 회복력(Recoverability) 실험

- ◆ MYPA에 첨가되는 최적의 cefuroxime 농도를 평가하고자 4-32 mg/L 수준으로 단계별 희석된 cefuroxime 항생물질을 첨가한 modified MYPA를 제조하였으며 각 단계별 희석된 농도의 cefuroxime이 첨가된 MYPA 배지위에 일정한 수준의 균을 접종한 후 균수를 측정하여 cefuroxime에 대한 *B. cereus* 회복력을 평가함
- ◆ 회복력 평가 실험에 사용된 균주는 *Bacillus cereus* KCTC 1013, *Bacillus cereus* KCTC 1092, *Bacillus cereus* F4810/72, *Bacillus cereus* KMS_2, *Bacillus cereus* KMS_tofu의 총 5개 균주를 본 실험에 사용하였으며 앞선 논문에서 제시한 방법(Ahmed et al, 2012)을 인용하여 약 15-150개의 회복집락이 검출된 배지를 대상으로 아래의 공식에 대입 후 산출하는 방식으로 회복력을 평가함

$$\text{Recoverability (회복력 \%)} = (\text{mean count on each medium} / \text{mean count on blood agar}) \times 100\%$$

5) 실제 식품에서의 배지 성능 실험

- ◆ 식품공전 내 *B. cereus*에 대한 정량기준이 고시된 총 60여개의 식품을 대상으로 선정하여 기존 배지와 개선된 배지를 이용한 *B. cereus*의 검출 여부를 평가하였으며 <표3>의 모든 시료는 서울시 광진구에 위치한 대형마트에서 구매 후 배지 성능 평가 실험을 진행함

표3. 배지 성능 평가를 위하여 선정된 식품 시료 리스트

실제 식품 샘플에서의 배지 성능 평가		
표적 균주	샘플명	샘플 수(개)
<i>B. cereus</i>	고추가루	10
	된장	10
	생식	10
	선식	10
	과일쥬스	10
	야채샐러드	10
총 샘플 수량(개)		60

- ◆ 실제 식품 내 *B. cereus* 검출 여부를 확인하고자 식품공전에 제시된 방법을 이용하여 배지 성능 평가를 진행함
- ◆ 우선 25 g의 각 식품 시료를 225 mL의 Butterfield's phosphate buffer (Difco)와 혼합하여 약 2분 가량 혼합 후 1 ml을 취하여 5장의 MYPA 배지에 각각 0.2 ml을 분주하여 평판도말을 진행하였으며 동일한 방법으로 5장의 modified MYPA 배지에 각각 0.2 ml을 분주하여 평판도말 후 30°C 에서 24시간 배양을 통하여 분홍색의 환을 보이는 약 15-150개 가량의 전형적인 *B. cereus* 집락을 대상으로 최대 5개까지 선별하여 식품공전에 제시된 생화학적 시험법 및 Colony PCR법을 이용하여 확인동정을 실시함

1-3. 실험결과

1) 경쟁세균 특성 분석 및 경쟁세균 억제물질 후보군 발굴

- ◆ 본 연구 과제를 통하여 신규 개발된 *B. cereus* 검출용 mMYPA 선택배지에 추가로 첨가할 항생물질 후보군으로 cephalosporin 계열의 항생제에서 높은 내성을 보유함에 대한 학술 논문(JW Chon et al, 2012)을 바탕으로 <표4>와 같이 1~3세대의 cephalosporin 계열 항생제 8종의 후보군을 선정함

표4. 신규 *Bacillus cereus* 검출용 선택 배지 개발을 위하여 선정된 Cephalosporin 항생제 후보군

항 생 물 질 후 보 군		
계 열	항 생 제 명	세대(generation)
Cephalosporin	Cephalothin	1
	Cefazolin	1
	Cefoxitin	2
	Cefamandole	2
	cefuroxime	2
	ceftazidime	3
	Cefotaxime	3
	cefoperazone	3

- ◆ 선정된 8종의 Cephalosporin 계열 항생제 후보군을 이용하여 *B. cereus*에 대한 최소저해농도 (MIC)를 평가하여하여 신규 *B. cereus* 검출용 mMYPA 선택배지 개발 시 추가로 첨가되는 최적의 항생제를 최종 선정하였으며 그 결과는 <표5>와 같음

표5. 신규 *B. cereus* 검출용 선택배지에 첨가되는 경쟁세균 억제물질 선정을 위한 최소저해농도(MIC) 결과

Cephalosporin: Minimum Inhibitory Concentration(MIC)									
균주	균주 번호	Cefuroxime (mg/L)	Ceftazidime (mg/L)	Cefoperazone (mg/L)	Cefoxitin (mg/L)	Cefotaxime (mg/L)	Cefamandole (mg/L)	Cephalothin (mg/L)	Cefoxitin (mg/L)
<i>B. cereus</i>	1	64	64	4>	32	32	32	16	32
	2	128<	128<	4>	128<	32	64	64	64
	3	128<	128<	4>	32	32	32	64	32
	4	128<	128<	4>	64	128<	64	64	64
	5	128<	128<	4>	32	128<	64	64	64
	6	128<	128<	4>	32	32	32	64	64
	7	128<	128<	4>	128<	128<	64	64	64
	8	128<	64	4>	16	32	16	32	32
	9	128<	128<	4>	32	64	32	32	32
	10	128<	128<	4>	32	32	32	32	32
	11	128<	128<	4>	32	64	32	64	64
	12	128<	128<	4>	64	128<	64	64	128<
	13	128<	128<	4>	16	32	8	16	64
	14	128<	128<	4>	32	32	8	16	16
	15	128<	128<	4>	32	32	32	64	128<
	16	128<	128<	4>	32	64	64	64	64
	17	128<	128<	4>	32	32	8	16	16
	18	128<	128<	4>	32	32	8	16	16
	19	128<	64	4>	32	16	32	32	32
	20	128<	128<	4>	32	64	64	64	64
	21	128<	128<	4>	128<	64	64	64	64
	22	128<	128<	4>	32	32	32	32	64
	23	64	128<	4>	8	16	8	16	16
	24	128<	128<	4>	32	32	32	32	64
	25	128<	128<	4>	32	64	32	64	64
	26	128<	128<	4>	64	64	32	64	128<
	27	128<	128<	4>	16	64	32	32	64
	28	128<	128<	4>	32	64	32	64	128<
	29	128<	128<	4>	32	64	32	32	64
	30	128<	128<	4>	64	64	64	64	64
	31	128<	32	4>	32	16	4	8	8

2) 28개 균주에 대한 cefuroxime 항생물질의 minimum inhibitory concentration (MIC) test

◆ 경쟁세균 억제물질로 최종 선정된 cefuroxime 제제를 신규 개발된 *B. cereus* 검출용 선택배지에 첨가 시 *B. cereus*의 성장에 문제가 없음을 검증하고자 28개의 *Bacillus cereus* 균주에 대한 cefuroxime에 대한 최소저해농도(MIC)를 측정한 결과 <표6>과 같이 64 mg/L(1번, 23번 *B. cereus* 균주) ~ 128 mg/L 이상의 고농도에서의 MIC 값이 확인되었으며, cefuroxime 항생물질은 *B. cereus*의 성장에 큰 영향을 미치지 않으므로 선택배지 내 신규 첨가 항생물질로 적합한 것으로 확인됨

표6. *Bacillus cereus* 균주의 cefuroxime에 대한 최소저해농도(MIC) 결과

Minimum Inhibitory Concentration(MIC)		
균 주	균 주 번 호	Cefuroxime(mg/L)
<i>B. cereus</i>	1	64
	2	128<
	3	128<
	4	128<
	5	128<
	6	128<
	7	128<
	8	128<
	9	128<
	10	128<
	11	128<
	12	128<
	13	128<
	14	128<
	15	128<
	16	128<
	17	128<
	18	128<
	19	128<
	20	128<
	21	128<
	22	128<
	23	64
	24	128<
	25	128<
	26	128<
	27	128<
	28	128<

3) Cefuroxime 농도 결정- 순수배양액에서의 회복력(Recoverability) 실험

◆ 순수배양액에서의 정량적 회복력 실험을 통하여 최적의 cefuroxime 농도를 배지에 첨가되는 것이 적합한지에 대한 평가로 0 ~ 32 mg/L의 다양한 농도의 cefuroxime 항생물질이 첨가된 배지 내에서 *B. cereus* 균주의 정량적 검출능력을 확인하여 회복력을 평가한 결과 <표7>과 같이 8 mg/L농도의 cefuroxime 항생물질이 첨가된 배지에서 가장 높은 *B. cereus*의 회복률을 보였으며(80.0 ± 3.4), cefuroxime이 전혀 함유되지 않은 MYPA 배지의 회복률(80.1 ± 2.1%)과 비슷한 수준에서 *B. cereus* 균주의 회복률을 보임

표.7. 다양한 농도의 cefuroxime이 함유된 MYPA에서의 *B. cereus* 회복률 평가 결과

균주이름	cefuroxime 함유 MYPA에서의 회복률 (%)				
	0 mg/L	4 mg/L	8 mg/L	16 mg/L	32 mg/L
KCTC 1013	84.06	82.61	92.75	55.07	20.29
KCTC 1092	82.69	80.77	75.00	80.77	75.00
F4810/72	83.87	67.74	80.65	74.19	70.97
KMS_2	76.15	78.90	73.39	64.22	89.91
KMS_tofu	73.91	76.09	78.26	89.13	63.04
Mean ± SE	80.1 ± 2.1	77.2 ± 2.6	80.0 ± 3.4	72.7 ± 6.0	63.8 ± 11.7

4) 실제 식품에서의 배지 성능 실험

◆ 시중에서 판매되는 실제 식품 시료에서 기존의 MYPA배지와 신규 개발된 modified MYPA배지를 사용하여 *B. cereus*의 검출여부를 평가한 결과 <표8>과 같이 기존 MYPA 배지에 비하여 신규 개발된 modified MYPA배지에서 매우 우수한 정량적 검출 능력을 확인함

표.8. 60개 식품 샘플에서의 *B. cereus*의 검출 확인을 통한 배지 성능 비교 결과

시료	균수 (CFU/g)			
	기존 MYPA		개선된 MYPA (Cefu-MYPA)	
	Mean ± SE	Range	Mean ± SE	Range
고춧가루	82.0 ± 38.7	0-400	182.0 ± 51.1	20-460

된장	906.0 ± 221.8	200-2,090	999.0 ± 250.9	300-2,340
생식	581.0 ± 320.7	0-3,300	880.0 ± 520.7	10-5,370
선식	566.0 ± 177.6	0-1490	652.0 ± 200.4	0-1,750
과일쥬스	2.0 ± 1.3	0-10	9.0 ± 5.9	0-60
야채샐러드	44.0 ± 23.5	0-240	50.0 ± 23.9	0-240
Mean ± SE	363.5 ± 81.7	0-3,300	462.0 ± 110.9	0-5,370

◆ 추가 비교검증 시험으로 *B. cereus*의 경우 식품 공전법 상 1,000 CFU/g이 적합 또는 부적합 기준이므로, 실제 1,000 CFU/g이상의 부적합 시료를 배지에 배양 시 어떤 배지에서 더 높은 검출률을 보이는지 비교 검증한 결과 <표9>의 결과와 같이 cefuroxime이 함유된 modified MYPA(17%)가 기존 MYPA(12%)에 비하여 약 5% 가량 더 높은 검출률을 보였으며 이 결과로는 개선된 *B. cereus* 검출용 modified MYPA배지에서 *B. cereus*오염 시료에 대한 높은 정확성과 검출능력이 있음을 검증함

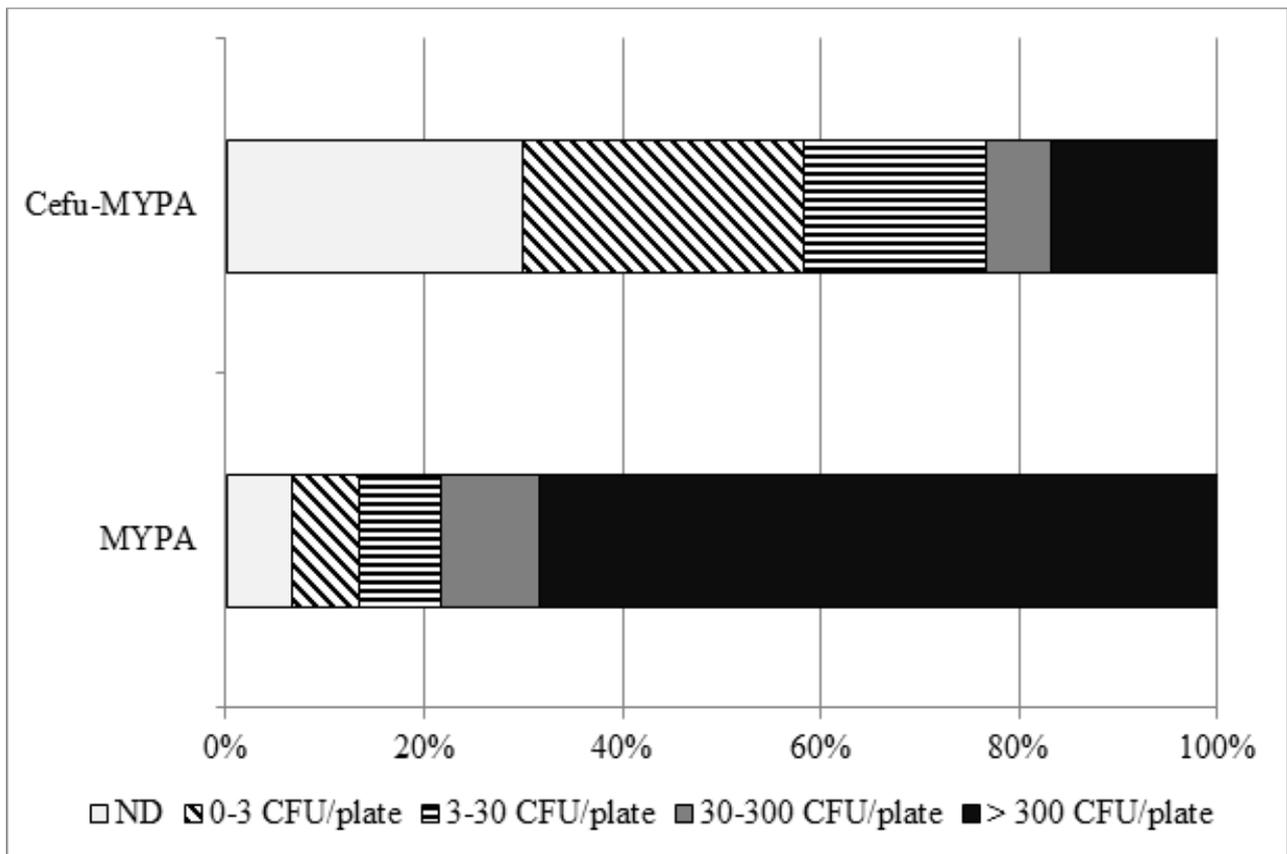
표9. 기존 MYPA배지와 개선된 modified MYPA 배지에서 오염된 *B. cereus*샘플의 검출능력 비교 결과

시료	시료수 (%)							
	MYPA, CFU/g				Cefu-MYPA, CFU/g			
	ND	10-100	100-1000	> 1000	ND	10-100	100-1000	> 1000
고춧가루	2 (3)	6 (10)	2 (3)	0 (0)	0 (0)	4 (7)	6 (10)	0 (0)
된장	0 (0)	0 (0)	7 (12)	3 (5)	0 (0)	0 (0)	7 (12)	3 (5)
생식	1 (2)	4 (7)	4 (7)	1 (2)	0 (0)	4 (7)	3 (5)	3 (5)
선식	1 (2)	3 (5)	3 (5)	3 (5)	2 (3)	1 (2)	3 (5)	4 (7)
과일쥬스	8 (13)	2 (3)	0 (0)	0 (0)	6 (10)	4 (7)	0 (0)	0 (0)
야채샐러드	4 (7)	5 (8)	1 (2)	0 (0)	4 (7)	4 (7)	2 (3)	0 (0)
Total	16 (27)	20 (33)	17 (28)	7 (12)	12 (20)	17 (28)	21 (35)	10 (17)

5) 기존 배지와 개발 배지간의 선택성 검출 비교

◆ 기존 MYPA 배지는 *B. cereus* 이외에 다수의 경쟁 집락 증식이 문제이므로, 개선된 mMYPA 배지에서 경쟁 집락이 제어되는 것이 필수적으로 60개 식품시료에 대하여 비교 실험을 진행한 결과 <그림1>과 같이 기존 MYPA배지에서는 93% 가량의 배지에서 경쟁 집락이 검출되었으며 개선된 mMYPA배지에서는 약 23% 감소된 70%의 배지에서만 경쟁집락이 검출된 결과를 보여 개선된 mMYPA배지의 선택성이 훨씬 우수한 것을 확인하였으며 추가적으로 배지당 300 CFU/plate 이상의 경쟁집락이 검출된 과오염 배지(highly contaminated media; 표의 검은색 부분)의 경우, 개선된 mMYPA배지에서는 20% 이하의 배지에서 과오염 검출 결과를 보였으나, 기존 MYPA배지에서는 약 50% 증가된 70%에 해당되는 배지에서 과오염 검출 결과가 확인되어 신규 개발된 mMYPA배지의 우수한 선택성을 검증함

그림1. 기존 MYPA배지 및 신규 개발된 mMYPA 배지의 Non-*Bacillus cereus* 오염수준 비교 결과



◆ <그림2>의 결과와 같이 불투명한 환으로 둘러싸인 분홍색의 전형적인 집락이 *B. cereus* 균 주로 본 과제를 통하여 신규 개발된 mMYPA배지의 경우 별도의 경쟁 집락의 증식은 없었 으며 순수 *B. cereus*의 전형적인 집락만 검출되는 결과를 보였으며 기존 MYPA배지의 경우 경쟁집락의 과 증식으로 인하여 전형적인 *B. cereus*의 집락의 확인이 불명확한 결과를 보임

- ◆ 특히 된장, 생식, 선식 샘플의 경우 경쟁 집락의 과 증식으로 인한 pH변화로 MYPA 배지 내 첨가되어 있는 Phenol red 지시약 성분의 색상 변화로 노란색 집락이 검출된 결과를 보여 분홍색의 전형적인 *B. cereus* 집락의 확인이 불명확한 결과를 보임
- ◆ 결론적으로 신규 개발된 mMYPA 선택배지는 기존 MYPA 배지와 비교 시 비슷한 *B. cereus* 검출능력이 관찰되었으나 검출 선택성에서는 기존 MYPA배지 대비 매우 우수함을 확인함

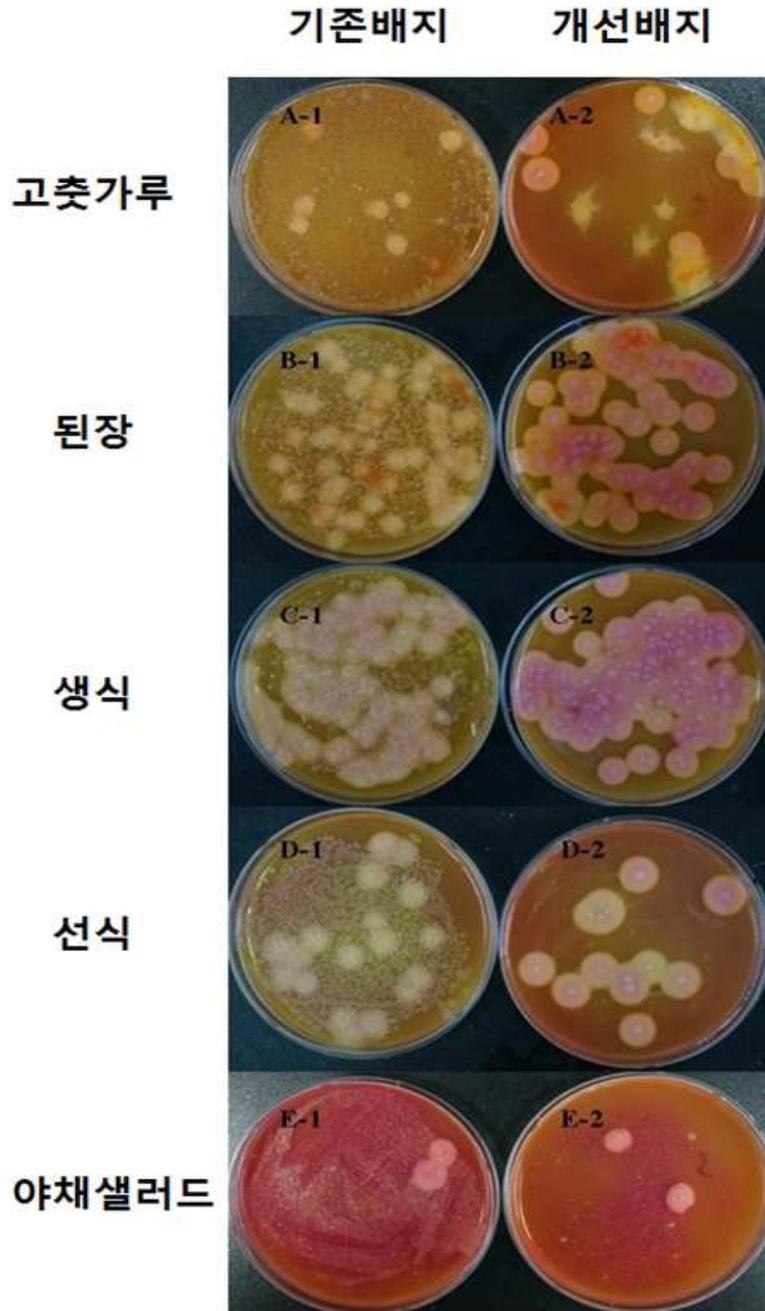


그림2. 기존 MYPA배지 및 신규 개발된 mMYPA 배지의 non-*B. cereus* 오염수준 비교 결과

2-1. *Campylobacter* 배지개발 개요

- ◆ *Campylobacter* 로 인한 식중독 사고는 북미와 유럽 등 전 세계적으로 선진국에서는 *Salmonella* 와 더불어 가장 문제시되고 있으며 식품(주로 계육) 내 *Campylobacter* 오염 시, 국내외 공인 검출법에서는 *Campylobacter* 오염 식품을 미 호기조건으로 증균배양 후, 선택배양을 통해 검출을 실시하여 모니터링하고 있음
- ◆ *Campylobacter* 검출을 위하여 주로 사용되는 선택배지로는 mCCDA 배지(modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar)라는 혈액이 비 함유된 선택배지로서, charcoal, sodium pyruvate, cefoperazone 등이 포함되어 있으며 해당 선택배지는 FDA, ISO 등과 같은 국제적 검출기준에서 사용되고 있음
- ◆ 최근에는 프랑스 비오메리으 社의 크롬배지(CampyFood), 영국 옥소이드 社의 크롬배지(CampyCount) 등 *Campylobacter* 의 집락 검출 시 특이적으로 발색하는 chromogenic 배지에 대한 개발도 이루어지고 있으나 chromogenic 배지는 ESBL 생성 대장균 등의 경쟁 집락에 대한 억제효율 저하 및 고가의 가격대를 형성하고 있는 단점이 있음
- ◆ 본 연구에서는 기존 배지에 비해 선택성이 강화되고, 자주색의 집락 형성도 더 뚜렷할 수 있도록 배지의 배경을 불투명하게 만든 새로운 종류의 chromogenic 배지를 개발하였으며 본 연구과제를 통하여 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 선택배지를 이용하여 *Campylobacter* 의 오염 시 가장 문제가 되는 계육(雞肉) 시료에서의 민감도 및 특이도에 대한 성능을 검증함

2-2. 실험방법

1) 실험에 사용된 균주

- ◆ 본 과제를 통하여 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 선택배지에 대한 민감도 및 특이도에 대한 성능검증을 위하여 <표10>과 같이 표준균주 및 wild type 균주를 포함한 총 32개의 *Campylobacter* 균주 및 30개의 non-*Campylobacter* 균주를 사용하였으며, -80℃의 deep freezer에 보관된 *Campylobacter* 균주를 혈액배지에서 37~42℃ 조건으로 약 48시간 배양하여 회복시켰으며, non-*Campylobacter*의 경우 37℃ 조건에서 12~24시간 배양하여 회복시킴

표10. 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 선택배지의 성능 검증 평가에 사용된 균주

균주 정보				
분류	그람염색성	균주명	균주유형(유래)	사용균주수
<i>Campylobacter</i>	Gram negative	<i>Campylobacter jejuni</i>	표준형/ 야생형	15
		<i>Campylobacter coli</i>	표준형/ 야생형	17
Non <i>Campylobacter</i>	Gram positive	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 1021	표준형	1
		<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	표준형	1
		<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	표준형	1
		<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 51776	표준형	1
		<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 3881	표준형	1
		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51229	표준형	1
	Gram negative	<i>Acinetobacter baumannii</i> PS1	표준형	1
		<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	표준형	1
		<i>Cronobacter sakazakii</i> KCTC 2949	표준형	1
		<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	표준형	1
		<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 7002	표준형	1
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1636	표준형	1
		<i>Salmonella</i> Enteritidis 106	표준형	1
		<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12026	표준형	1
		<i>E. coli</i> ATCC 11175	표준형	1
		<i>E. coli</i> KCTC 1682	표준형	1
		ESBL producing <i>E. coli</i>	닭고기	11
		ESBL producing <i>E. coli</i>	고양이	2
		ESBL producing <i>E. coli</i>	개	1
		총 사용균주		

2) 경쟁세균 억제물질 후보균 발굴 개선된 배지 제작

◆ <표11>과 같이 본 연구과제를 수행하고자 예비 실험 및 선행문헌 연구를 통하여 non-*Campylobacter*의 효과적인 저해 및 *Campylobacter*의 검출률 향상을 위한 억제물질 후보균 5종을 선정하였으며 특히 tazobactam 항생물질에서 경쟁세균의 효과적인 저해가 검증된 연구 문헌을 활용하여 tazobactam을 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 선택배지에 추가되는 항생물질로 최종 선정함

표11. 신규 *Campylobacter* 검출용 선택 배지 개발을 위하여 선정된 항생제 후보균

항생물질 후보균		
항생제명	경쟁 집락 억제율	참고 문헌
Clavulanic acid	63%	Chon et al, 2013
Polymyxin	62%	Chon et al, 2012
Cefotetan	71%	Chon et al, 2016
Cefoxitin	70%	Chon et al, 2016
Tazobactam	99%	Chon et al, 2016

- ◆ 최종 선정된 tazobactam이 추가된 신규 *Campylobacter* 검출용 선택배지의 개발을 위하여 <표12>와 같은 formula를 제작함
- ◆ 본 연구과제 수행을 통하여 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 선택배지에서의 *Campylobacter* 균의 검출원리로 TiO₂는 배지를 탁하게 만들어주는 효과가 있어 명확한 집락의 구분이 가능하고 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride는 chromogenic 배지에 첨가되는 발색물질로서 적색의 집락을 형성하여 *Campylobacter*에 대한 선택성을 부여하며 Bile salt의 Non *Campylobacter* 중 그람양성균을 효과적으로 저해하는 역할과 cefoperazone 및 amphotericin B 외에 tazobactam의 ESBL 생성하는 대장균만을 선택적으로 억제하는 원리를 기반으로 신규 개발된 선택배지로 타사에서 생산되고 있는 *Campylobacter* 검출용 chromogenic 배지의 성능에 대하여 비교 검증을 진행함

표12. 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 선택 배지의 성분표(formula)

제품명	성분명	역할	용량(1 L 제조기준)
<i>Campylobacter</i> 검출용 소포장선택배지(C-mCCDA)	Campy-Cefex agar	베이스 파우더	44.4 g/L
	Titanium(IV) oxide	첨가물질	1.5 g/L
	2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride	발색물질	200 mg/L
	Bile salt	항생물질	0.5 g/l
	CCDA Selective Supplement (Cefoperazone + Amphotericin B)		Cefoperazone: 32 mg/L
			Amphotericin: 10 mg/L
Tazobactam	4 mg/L		

- ◆ <표12>을 토대로 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 chromogenic 배지에서의 *Campylobacter* 집락은 <그림3>과 같이 진한 적색의 전형적인 집락 형태로 *Campylobacter*의 선택적인 구분이 가능하며 배지의 불투명한 배경으로 인하여 집락의 색을 더욱 돋보이게 함



그림3. 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 배지에서 특이적으로 검출된 *Campylobacter*의 집락 형태

3) Inclusivity/exclusivity 테스트- 타 배지와 비교검증

- ◆ 본 연구과제 수행을 통하여 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 선택배지가 *Campylobacter* 이외의 다른 균주의 성장을 저해한다는 것을 확인하고자 <표10>에서 언급한 균주를 사용하여 inclusivity/exclusivity를 검증함
- ◆ <그림4>와 같이 타사에서 생산되고 있는 일반 *Campylobacter* 배지와 Chromogenic 배지 등과 비교검증 되었다[mCCDA 배지(Oxoid, 영국), Campy-Cefex 배지(Oxoid, 영국), CampyFood chromogenic 배지(BioMérieux, 프랑스), CampyCount chromogenic 배지(Oxoid, 영국)를 대상으로 <그림4>에서 언급한 *Campylobacter* 및 non-*Campylobacter* 균주를 10^8 CFU/loop 수준으로 조정 한 후 각각의 배지에 접종하였으며 미호기 조건으로 42°C 에서 48시간 동안 배양한 후 성장여부를 관찰하여 전형적인 *Campylobacter* 집락 검출될 경우 양성으로 판정함

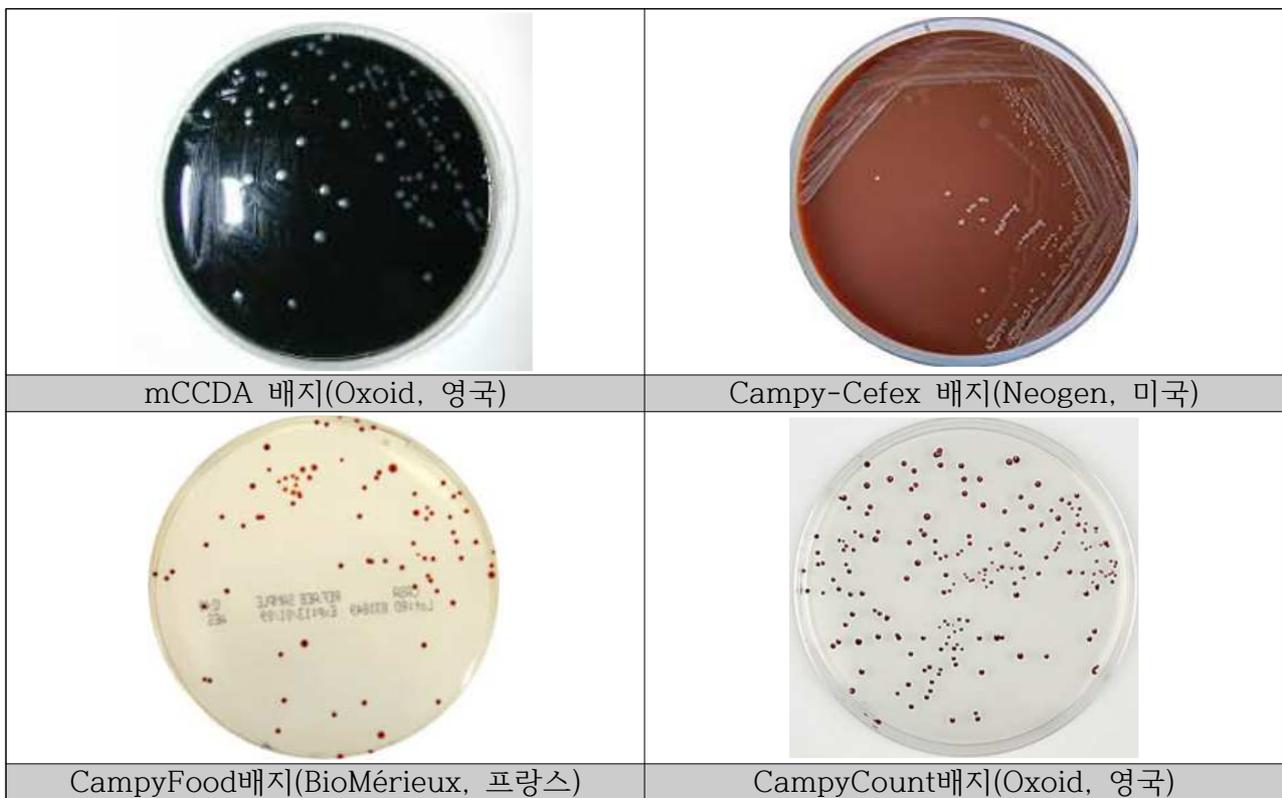


그림4. 배지 검출 성능 비교 검증 평가에 사용된 타 사 생산 배지

4) 계육(雞肉) 시료에서의 개발 배지의 검증실험- 타 배지와 비교검증

- ◆ 본 연구 과제를 통하여 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 chromogenic배지를 이용하여 실제 계육 샘플에서의 검출감도를 확인함
- ◆ *Campylobacter*가 오염 시 문제가 되는 식품은 닭, 칠면조 등의 가금육으로 본 실험에서는 시중에 유통되는 계육(雞肉) 100마리를 구매 후 신규 개발된 C-mCCDA배지와 기존 타사에서 시판중인 mCCDA 배지(Oxoid, 영국), Campy-Cefex 배지(Neogen, 미국), CampyFood chromogenic 배지(BioMérieux, 프랑스), CampyCount chromogenic 배지(Oxoid, 영국)에 대한 배지 성능 비교 실험을 진행함

- ◆ 계육(雞肉)의 린스(rinse) 및 증균 방법은 <그림5>와 같이 미국 농림부의 식품안전기관인 USDA FSIS의 프로토콜을 바탕으로 하였으며 계육(전육) 샘플을 400 ml의 Buffered peptone water에 혼합하여 1분간 shaking 진행 후 rinse액 25 ml을 2X Bolton broth 25 ml과 혼합하여 미호기 조건으로 42°C에서 48시간 배양함
- ◆ 배양 후, 한 백금이를 이용하여 5개 배지에 희석 도달 후 미호기 조건으로 42°C에서 48시간 배양하여 둥글고 편평한 반투명의 집락을 선택하여 생화학적 성상확인 및 colony PCR을 통한 *Campylobacter*의 확인동정을 진행함

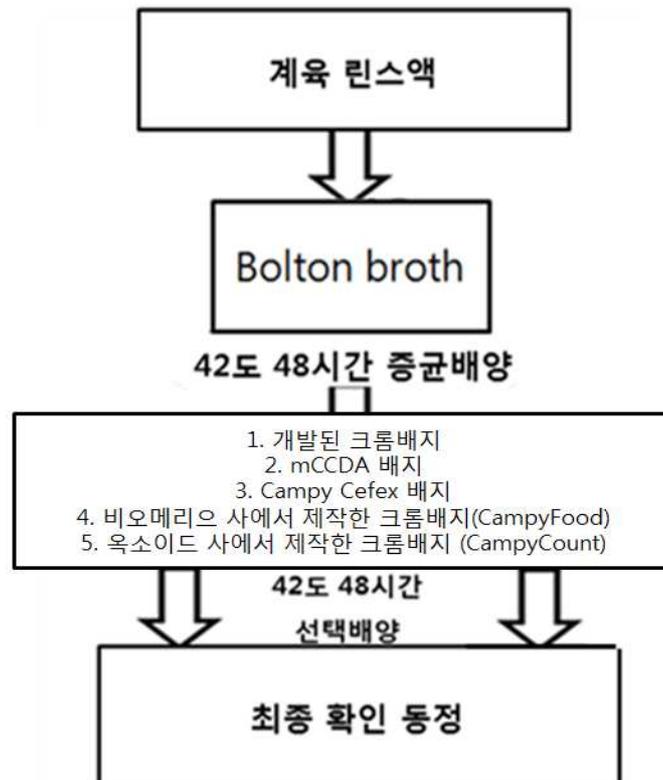


그림5. 계육(雞肉) 시료에서의 개발 배지의 검증 실험 과정

- ◆ Colony PCR의 경우 분자생물학적으로 *Campylobacter*의 확인동정을 실시하는 방법으로 계대된 *Campylobacter*의 집락을 0.2 ml의 멸균 증류수에 희석하여 약 10분간 끓인 후 원심 분리하고 상층액을 분리하여 template DNA로 사용함
- ◆ *Campylobacter*로부터 추출된 template DNA를 16S rDNA gene의 염기서열을 이용하여 합성된 Forward/Reverse primer 및 PCR mix kit인 Maxime™PCR PreMix (iNtRON biotechnology, Sungnam, Korea)와 혼합 후 PCR을 진행하여 대량 증폭된 template DNA의 밴드사이즈를 통하여 *Campylobacter* 양성으로 최종 검증함
- ◆ PCR 진행 시 반응조건, primer 농도, primer 염기서열 정보 등은 문헌(Denis et al., 1999)을 참고하였으며 <표13>과 같음

표13. *Campylobacter* 확인 검출을 위한 PCR 조건

PCR reaction mixture		Volume
DNA Sample		1~2 μL
16s rDNA Forward primer(10pmole)		1 μL
16s rDNA Reverse primer(10pmole)		1 μL
Maxime™ PCR PreMix w i-Star Taq (2 X concentration)		12 μL
Distilled water(HPLC grade)		Up to 10 μL
Total volume		25 μL

PCR condition for specific detection of <i>Campylobacter</i>		
Procedure	Temperature & Time	Amplification cycles number
Pre denaturation	95°C - 10 min	1 cycle
Denaturation	95°C - 30 sec	35 cycles
Annealing	59°C - 1 min 30 sec	
Extension	72°C - 1 min	
Final extension	72°C - 10 min	1 cycle

5) 비교 및 통계처리

- ◆ 계육(雞肉) 샘플에서 배지검증 실험의 경우, Chon et al. (2011)의 참고 문헌에 제시된 방법을 이용하여 *Campylobacter*의 양성 검출 수를 비교 후 민감도를 평가하였으며 non-*Campylobacter*의 경우 경쟁세균(competing flora)이 검출된 배지의 수를 비교하여 선택성을 평가함
- ◆ 배지 내에서 경쟁세균의 증식 여부는 불필요한 균을 배제하는 능력이 뛰어난 것을 의미하므로 경쟁세균이 검출된 배지의 수가 적을수록 선택성이 높음을 의미함
- ◆ 총 100개의 계육(雞肉) 샘플 중 경쟁세균(competing flora)이 검출된 배지의 수를 측정 후 GraphPad InStat software (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA)를 이용한 Fisher's exact test를 진행하여 각 배지의 민감도와 선택성을 비교 평가하였으며 p-value의 경우 측정값이 0.05보다 적으면 유의차가 있는 것으로 판단함

2-3. 실험결과

1) Inclusivity/exclusivity 테스트- 타 배지와 비교검증

- ◆ 본 연구 과제를 통하여 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 chromogenic배지와 타사에서 시판중인 *Campylobacter* 검출용 선택배지의 검출 성능에 대한 비교 검증 실험을 진행한 결과 <표14>에서 보는 바와 같이 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 chromogenic배지에서 *Campylobacter*의 검출률이 우수한 것으로 확인되었으며 non-*Campylobacter*의 경우 기존 배지 제품들의 검출률과 큰 차이를 보이지 않았으나 ESBL 생성 대장균의 경우 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 chromogenic 배지에서 우수한 저해능이 관찰되었으며 기존배지에서는 ESBL 생성 대장균을 효과적으로 저해하지 못하는 것으로 확인됨

- ◆ ESBL 생성 대장균의 경우 최근 *Campylobacter* 오염 시료로부터의 *Campylobacter* 검출에 있어 가장 문제가 되는 경쟁 집락으로 인식되고 있으며, 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 chromogenic 배지는 우수한 선택성을 바탕으로 이를 효과적으로 개선하는 것으로 확인됨

표14. 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 선택배지와 기존 배지의 inclusivity/exclusivity 테스트 결과

균 주		양성집락 개수/총 균주 갯수				
		Campy Cefex	mCCDA	개발 배지	Campy Count	Campy Food
캠필로박터	<i>Campylobacter jejuni</i>	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15
	<i>Campylobacter coli</i>	17/17	17/17	17/17	17/17	17/17
비캠필로박터 (그람양성)	<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1021	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	<i>Enterococcus faecalis</i> 51299	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 51776	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 3881	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
비캠필로박터 (그람음성)	<i>Acinetobacter baumannii</i> _PS1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	<i>Cronobacter sakazakii</i> KCTC 2949	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	<i>E. coli</i> ATCC 11175	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	<i>E. coli</i> KCTC 1682	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 7002	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1636	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	<i>Salmonella Enteritidis</i> _106	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12026	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	ESBL producing <i>E. coli</i> 닭 유래	11/11	11/11	0/11	11/11	4/11
	ESBL producing <i>E. coli</i> 고양이 유래	2/2	2/2	0/2	2/2	2/2
	ESBL producing <i>E. coli</i> 개 유래	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1

2) 실제 식품에서의 검출률 비교- 타 배지와 비교검증

- ◆ 본 연구 과제를 통하여 실제 식품 시료를 이용하여 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 chromogenic 배지와 타사에서 시판중인 *Campylobacter* 검출용 선택배지의 검출 성능에 대한 비교 검증 실험을 진행한 결과 <표15>와 같이 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 chromogenic 배지가 타사의 *Campylobacter* 검출용 선택배지 제품에 대비 유의적으로 우수한 검출률을 확인함
- ◆ 총 4 종류의 타사 *Campylobacter* 검출용 선택배지의 경우 각 100개 중 14-23개의 검출률을 보였으며 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 chromogenic 배지의 경우 용이한 집락 구분에 의한 우수한 선택성으로 인하여 약 39개의 유의적으로 우수한 검출률이 확인됨

표15. *Campylobacter* 검출용 선택배지 5종에 대한 양성 검출률 비교 결과

실험회차	<i>Campylobacter</i> 양성수 / 전체 시료수 (%) (총 5회, 회당 20마리씩 총 100마리 기준)				
	Campy-cefex	mCCDA	개발배지	CampyCount	CampyFood
1회	1/20 (5)	0/20 (0)	4/20 (20)	0/20 (0)	0/20 (0)
2회	0/20 (0)	1/20 (5)	9/20 (45)	1/20 (5)	2/20 (0)
3회	14/20 (70)	17/20 (85)	19/20 (95)	11/20 (55)	14/20 (70)
4회	3/20 (15)	1/20 (5)	3/20 (15)	1/20 (5)	3/20 (15)
5회	0/20 (0)	2/20 (10)	4/20 (20)	1/20 (5)	4/20 (20)
계*	18/100 (18) ^b	21/100 (21) ^b	39/100 (39) ^a	14/100 (14) ^b	23/100 (23) ^b

* 동일열에 있는 다른 알파벳(a, b)은 통계학적 유의차($p < 0.05$)를 의미함

3) 실제 식품에서의 선택성 비교- 타 배지와 비교검증

- ◆ 경쟁 집락의 양성 검출률 비교를 통하여 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 chromogenic 배지의 선택성을 검증하였음
- ◆ 그 결과 <표16>과 같이 타사의 *Campylobacter* 검출용 선택배지의 경우 대다수의 배지(79-95%)에서 경쟁 집락의 증식이 관찰되었으며 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 chromogenic 배지의 경우 경쟁 집락이 불검출 결과를 보임으로 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 chromogenic 배지가 기존 타사의 *Campylobacter* 검출용 선택배지 대비 압도적으로 우수한 선택성이 있음을 확인함

표16. *Campylobacter* 검출용 선택배지 5종에 대한 경쟁세균 대비 선택적 증식능력 비교 결과

실험회차	<i>Campylobacter</i> 경쟁세균 양성수 / 전체 시료수 (%) (총 5회, 회당 20마리씩 총 100마리 기준)				
	Campy-cefex	mCCDA	개발배지	CampyCount	CampyFood
1회	20/20 (100)	20/20 (100)	0/20 (0)	18/20 (90)	20/20 (100)
2회	18/20 (90)	17/20 (85)	0/20 (0)	16/20 (80)	15/20 (75)
3회	20/20 (100)	11/20 (55)	0/20 (0)	10/20 (50)	12/20 (60)
4회	19/20 (95)	18/20 (90)	0/20 (0)	16/20 (80)	16/20 (80)
5회	20/20 (100)	19/20 (95)	0/20 (0)	19/20 (95)	20/20 (100)
계*	97/100 (97) ^b	85/100 (85) ^b	0/100 (0) ^a	79/100 (79) ^b	83/100 (83) ^b

* 동일열에 있는 다른 알파벳(a, b)은 통계학적 유의차($p < 0.05$)를 의미함

<주관 연구 기관: (주) 진성유니텍>

3-1. 소포장 Kit 개발 개요

- ◆ 현재 통상적으로 시판되고 있는 배지파우더 제품의 포장단위는 100 g, 250 g, 500 g, 1 kg, 5 kg 등 단위의 분말 배지로 구성되어 있으며 실험량이 많지 않은 고객에게는 불필요하게 많은 양의 단위로 유효기간까지 전부 소진하지 못하는 사례가 빈번하며 제품의 유효기간이 경과한 배지를 사용하게 되거나 유효기간이 경과하지 않은 제품이어도 열악한 실험 환경 조건 등으로 인하여 산소와 습기가 유입되어 배지의 경화 또는 변색되는 경우가 발생하여 배지를 이용한 미생물 검출 시 부정확한 결과를 초래하기도 함
- ◆ 분말 배지의 특성상 배지성분 계량 시 미세한 배지 파우더 입자의 비산(飛散)으로 인하여 호흡기로 쉽게 흡입되어 불쾌한 이물감에 대하여 고객들이 불편함을 호소하고 있으며 특정 배지 내 일부 성분은 인체에 유해하여 계량 시 상당히 주의를 요하지만 대부분의 실험자들이 이 유해성을 간과하고 실험에 임하고 있음
- ◆ 또한 저울로 계량 시 시간 및 노동력 소모가 크고 실험자에 따라 계량 값의 오차로 인하여 부정확한 결과를 초래할 수 있는 위험성이 있음
- ◆ 이로 인하여 결과에 영향을 받지 않고 별도의 계량 없이 정해진 용량으로 배지를 1회분씩 포장하여 배지 제조 시간과 노동력을 줄이고 유통 및 사용 과정에서도 품질이 일정하게 유지되는 제품이 필요한 실정임
- ◆ 기존 배지 제조회사에서 판매하고 있는 소포장 미생물 배양배지는 플라스틱 용기, 캡슐, 알루미늄 비닐 파우치 등으로 포장되어 판매되고 있으나, 배지 종류가 한정적이고 고가의 가격이며 용해가 어렵다는 단점들이 존재함
- ◆ 본 연구에서는 매 실험 시 마다 추가적인 계량 없이 최적의 결과를 얻을 수 있도록 1회 제조 분량만큼의 배지를 소포장하고 제조 분량에 맞도록 추가 첨가제를 구성하여 kit를 제작함
- ◆ 특히 분말 배지와 항생제의 품질을 오래 유지할 수 있는 포장 용기 및 포장재를 선정하여 포장재를 제작하였으며 상품화를 위하여 디자인 제작과 다양한 제품 구성 방법을 연구함
- ◆ 추가적으로 선정된 포장재와 용기에서 장기간 품질을 오래 유지할 수 있는지에 대한 유효기간 테스트를 진행하여 배지 성능을 검증함

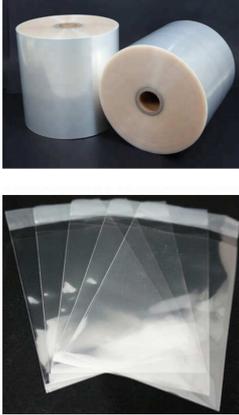
3-2. 실험방법

1) 소포장 배지용 포장재 조사

- ◆ 본 연구에서는 <표1>과 같이 다양한 포장재의 재형 및 특성들을 조사한 후 선발된 포장재들에 대한 전문가의 자문을 통하여 소포장 배지 포장에 적합한 필름을 선정하였으며 소포장 배지의 제품 특성에 맞는 포장용 특수 기능성 필름을 제작하여 분말 배지의 포장에 적용함

표1. 포장재의 종류 및 특징

종류	사진	특징
<p>PE (Polyethylene)</p>		<p>부드럽고 강한 폴리에틸렌(PE) 필름을 이용하여 개봉한 내용물의 공기를 차단하고 재 보관 목적으로 사용되는 포장재로 주로 식품포장재에 응용하여 사용됨</p> <p>무지투명을 기본으로 원하는 색상 및 로고인쇄 등 주문 제작이 가능하여 식품 포장, 화학 원료, 분말 가루, 약포지, 약세사리 및 각종 샘플 보관용 등 다양한 용도로 사용됨</p>
<p>LDPE (Low Density Polyethylene)</p>		<p>저밀도 폴리에틸렌(LDPE) 필름은 가공성 및 광학성이 우수하고 가격이 저렴하며 무독 무미하여 식품 위생적으로 안전한 필름 소재로 부드러운 재질과 충격에 대한 내강성이 탁월하며 열 접착성이 우수하여 다른 필름과의 접합용으로 사용이 가능함</p> <p>고밀도 폴리에틸렌(HDPE) 필름에 비하여 인열 강도가 강하여 찢어짐 현상이 적고 늘어나는 현상이 강하여 종이컵 코팅제, 전선피복, 섬유, 냉동식품 포장재, 쇼핑백 등 각종 포장재의 원료로 사용됨</p>
<p>HDPE (High density polyethylene)</p>		<p>고밀도 폴리에틸렌(HDPE) 필름은 유백색의 딱딱하고 불투명한 재질의 비닐재질로 인장 강도, 경화 및 탄성이 우수하여 쇼핑백, 호스, 맥주 상자, 우유 용기 등의 포장재 원료로 사용됨</p>
<p>LLDPE (Linear low-density polyethylene)</p>		<p>선형 저밀도 폴리에틸렌(LLDPE) 필름은 광학성 및 환경 적응력이 우수한 무독성의 포장재로 강도와 가공성이 탁월하여 식품포장지의 내면에 주로 사용됨</p>
<p>PP (polypropylene)</p>		<p>폴리프로필렌(PP) 필름은 투명성 및 표면 광택이 우수하며 무미, 무취, 무독성의 포장재이나 타 포장재에 비하여 열 접착성이 떨어져 가벼운 제품의 포장에 제한적으로 사용됨</p> <p>PE(Polyethylene) 또는 CPP(Casting polypropylene)와의 코팅 처리를 통한 장점을 강화하여 가공식품, 잡곡, 건어물, 야채, 빵, 문구, 사무용품(헤다가공) 등의 다양한 품목의 포장재로 사용됨</p>

<p>OPP (Oriented polypropylene)</p>		<p>연신 폴리프로필렌(OPP) 필름은 폴리프로필렌(PP) 필름을 일축 또는 이축으로 연신하여 제조한 필름으로 무연신 필름재질인 폴리프로필렌(PP) 필름에 비하여 인장강도, 충격강도 등 기계적 강도가 우수하며 투명성 및 표면광택이 양호하고 방습성이 우수한 포장재임</p> <p>무취, 무독성이며 위생적으로 각종 스낵류, 빵류, 라면류 등의 포장이나 인쇄용 등으로 사용되는 반면 가스 차단성과 내열성이 약하여 열에 의한 열 수축 문제가 발생할 수 있으므로 인쇄 또는 후 가공 시 주의가 필요함</p>
<p>CPP (Casting polypropylene)</p>		<p>무 연신 폴리프로필렌(CPP) 필름은 연신 폴리프로필렌(OPP) 필름에 비하여 광택, 투명성은 떨어지나 저온에서의 충격강도 및 열접착성이 우수함</p> <p>단독으로는 거의 사용하지 않으며 90%이상 타 용도의 필름(OPP, PET 등)재질과 합지하여 사용되며 열접착성이 뛰어나 라면, 제과, 스낵류 등의 내부 재질로 많이 사용됨</p>
<p>NY (Nylon)</p>		<p>나일론(Nylon) 필름은 특수 재질로서 표면에 발생할 수 있는 미세한 작은 구멍이 발생하지 않을 수 있는 성질인 내핀홀성이 높아 장기간 식품을 보관하거나 진공을 요하는 포장지에 주로 사용됨</p> <p>저렴한 가격과 낮은 가스투과율로 OPP 필름 등 가스 투과율이 높은 필름과 나일론 필름 등을 합지 또는 코팅하여 품질을 향상시킴</p>
<p>PVC (Polyvinylchloride)</p>		<p>폴리비닐클로라이드(PVC) 필름은 상온에서 경질상태의 무색투명한 포장재질로 가공 처리에 따라 다양한 용도로 사용한 재질이나 수지자체에 염소가 포함되어 있어 연소 시에는 염소화물이 발생할 우려가 있으며 단단한 성질을 연화시키기 위하여 사용 되는 가소제, 열안정제 등이 인체에 유해할 수도 있으므로 주의를 요하는 수지임</p> <ul style="list-style-type: none"> • 경질 PVC: 파이프, 빗물 흡통, 경질 필름 등으로 사용됨 • 연질 PVC: 농업용 및 포장용 필름, 전선피복 등으로 사용됨
<p>Aluminum metallized film</p>		<p>알루미늄 증착(aluminum metallized film) 필름은 알루미늄 호일의 우수한 물리적 성질을 대체하는 저렴한 가격대의 포장재질로 증착필름으로 많이 사용되며 고 진공 상태에서 알루미늄을 증착하여 광택성, 차광성, 자외선, 가스, 수분 등에 대한 차단성이 우수하여 저장성을 높이기 위한 목적으로 사용됨</p> <p>알루미늄(AL)과 마찬가지로 폴리에스테르(PET), 폴리에틸렌(PE) 등과 합지하여 제과, 스낵류, 꽃, 선물포장</p>

		<p>등으로 사용됨</p> <p>기타 증착필름의 종류로는 OPP증착필름, CPP증착필름, PET증착필름 등이 있으며 수분 및 산소 차단성은 우수하나 알루미늄 재질에 비하여 차광성은 떨어짐</p>
<p>AL (Aluminum)</p>		<p>알루미늄(AL)은 기계적 강도와 가스 차단성이 우수하며 수증기와 산소의 투과율이 적고, 빛에 대한 차단성이 우수하며 내열성, 내한성, 내구성이 강한 포장재임</p> <p>포장재 내 피막 형성을 목적으로 나일론(NY), 폴리에스테르(PET), 폴리에틸렌(PE) 등의 여러 가지 필름 소재에 알루미늄을 합지하여 사용됨</p> <p>장기간 보존성이 요구되는 식품류의 진공포장, 액체포장, 냉동식품 및 높은 방습성이 요구되는 전자부품, 의약품 등의 포장 재료로 널리 사용됨</p>
<p>PET (Polyethylene terephthalate)</p>		<p>폴리에스테르라는 명칭으로 불리는 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET) 필름은 광택성, 내후성, 내약품성 등이 우수하고 스크래치에 강한 포장용 필름 재질로 비교적 가격이 저렴하여 가스차단이 요구되지 않은 일반적 비닐 재질의 포장 시 나일론(NY) 대용으로 PET 필름이 사용됨</p> <p>셀로판의 3배, 폴리에틸렌의 약 10배 정도의 강한 인장강도를 보이며 온도에 따른 변화와 수분 및 기체의 투과성도 적음</p> <p>투명성, 내강성 등이 우수하여 사진필름, 복사용 필름, 자기테이프, 비디오테이프, 절연테이프, 식품포장용 필름, 트레이싱 페이퍼 등 다양한 분야의 포장재로 사용됨</p>

2) 포장용기

- ◆ 본 연구 과제를 통하여 신규 개발된 소포장 개선배지 kit에 첨가하는 신규 supplement의 포장을 위한 다양한 포장용기를 선택하고자 신규 supplement를 구성하는 각 성분들의 조성 및 함량을 확인한 후 각각의 용기에 소분하여 포장함
- ◆ 포장된 신규 supplement의 성분들을 용해시킬 수 있는 일정량의 멸균 증류수를 첨가한 후 용해 정도, 빛과 온도에 의한 시약의 안정성 및 사용 편의성 등을 고려한 가장 적합한 용량의 용기들을 선정하여 최적의 포장용기와 포장방법을 선택하였으며 신규 supplement 포장용기 선정을 위한 vial 정보는 <표2>와 같음

표2. 신규 supplement 포장 용기 정보

용기형태	용량(ml)	규격(mm)	입구내경(mm)	용기사진
Clean vial	2 ml	15*33	7	
Amber vial	2 ml	15*33	7	
Clean vial	3 ml	16.4*38	7	
Amber vial	3 ml	16.4*38	7	
Clean vial	5 ml	22*40	12	
Amber vial	5 ml	22*40	12	

- ◆ 선택배지에 첨가되는 항생제 성분의 경우 대부분 빛 또는 온도 등에 불안정하여 취급상 주의가 요구되므로 소포장 개선배지 내 supplement로 첨가되는 각각의 항생제 성분들에 대한 물질안전보건자료(MSDS)를 참고하였으며 습도, 산소 차단 여부 및 빛에 대한 안정성 여부 등을 고려하여 <그림1>과 같이 밀폐용 마개 및 캡을 선정함



그림1. 신규 supplement 포장 용기의 마개 및 캡 정보

3) 포장 방법 연구 및 디자인

- ◆ 소포장 Kit를 제작하는 근로자의 노동 강도 및 작업 시간을 단축하며 추가적인 계량 없이 소포장 배지의 대량 생산이 가능한 자동포장기를 구매하고자 다양한 자동포장기 생산 업체를 대상으로 상담 진행 및 기타 작업 환경 개선을 위한 부가 장비에 대한 조사를 진행함
- ◆ 국내 업체로부터 생산되어 판매되고 있는 다양한 자동포장기를 대상으로 본 연구 과제를 통하여 신규 개발된 소포장 배지 kit 제품의 자동화 생산과의 적합성 여부를 조사한 결과 국내 시판되고 있는 대부분의 포장기는 부피를 측량하여 플라스틱 재질의 포장재에 일정량을 충전 후 자동 포장하는 방식임
- ◆ 그러나 본 팀에서 요구되는 소포장 배지의 포장방식은 분말 형태의 배지를 정밀저울을 이용한 무게를 정량 측량하여 충전 후 자동 포장하는 방식으로 분말 배지의 특성상 온도와 습도의 영향에 의한 점성화 현상 또는 정전기 발생 등의 요인으로 무게를 측정하는 스테인리스, 플라스틱, 티타늄 재질 등의 용기에 지속적으로 점착되어 무게 측정에 다소 제약이 따르므로 본 과제 수행을 위한 적합한 자동포장기 선정에 다소 한계가 있음
- ◆ 추가적으로 6포장/분 정도로 대량 생산하는 경우에는 다량의 분진(粉塵)이 비산(飛散)되어 작업자의 호흡기로 쉽게 흡입되고 이물감과 불쾌감을 느끼는 등 유해한 결과를 초래할 수 있으나, 3포장/분 정도의 소량 생산하는 경우 집진장치에 의한 분진을 제거 capacity가 충족되어 원활한 제조가 가능하였음
- ◆ 그러나 3포장/분 정도의 속도로 포장하는 경우 작업자의 계량으로도 충분히 제조가 가능한 속도로 본 연구에서는 별도의 자동 포장기 사용 없이 더욱 효율적이고 시간을 단축시키며 제작할 수 있는 환경을 연구함
- ◆ 본 연구 과제를 통하여 개발된 소포장 Kit의 상품화를 위하여 포장재 및 포장 용기에 적합한 디자인을 구상하고, 제품의 품질을 유지한 상태로 운반시킬 수 있는 최적의 Kit 구성에 대하여 연구함

4) 완성된 시제품의 실제 시료에서의 검사

① 실제 시료에서 *B. cereus* 검출 성능평가

- ◆ *Bacillus cereus*의 경우 실제 식품샘플을 대상으로 개선된 소포장 MYP 배지 시제품에 적용 후 배지 내 *B. cereus*에 대한 검출능력 평가 및 검증을 통하여 제품 상용화를 준비함

- ◆ 김밥, 샌드위치 식품샘플을 식품공전에 제시된 방법으로 기존 배지 및 개선된 배지를 사용하여 *B. cereus*에 대한 각 배지의 선택적 검출능력 및 경쟁세균의 증식 여부를 평가함
- ◆ 김밥, 샌드위치 샘플에 대한 각각의 시료를 25 g 분량으로 정밀저울을 이용하여 계량한 후 225 mL의 Butterfield's phosphate buffer(Difco, 미국)와 혼합하여 Bag mixer(Interscience, 프랑스) 장비로 약 1분간 균질화 과정을 진행함
- ◆ 균질화 과정 종료 후 적절하게 혼합된 식품 샘플을 2개의 1.5 ml tube에 각각 1 ml씩 옮긴 후 일반 MYPA 배지(Oxoid, 영국) 및 cefuroxime이 추가된 개선 m-MYPA 배지에 각각 200 μ l를 분주하여 Spread plate technique 기법을 이용한 평판 도말을 진행한 후 30°C에서 24시간 배양을 통하여 식품 내 *B. cereus*의 성장 여부를 통한 배지의 선택적 검출능력 및 경쟁세균의 증식 여부를 평가함

② 실제 시료에서 *Campylobacter* 검출 성능평가

- ◆ *Campylobacter*의 경우 실제 식품샘플을 대상으로 개선된 소포장 C-mCCDA배지 시제품에 적용 후 배지 내 *Campylobacter*에 대한 검출능력 평가 및 검증을 통하여 제품 상용화를 준비함
- ◆ 계육(雞肉), 돈육(豚肉) 식품샘플을 식품공전에 제시된 방법으로 기존 배지 및 개선된 배지를 사용하여 *Campylobacter*에 대한 각 배지의 선택적 검출능력 및 경쟁세균의 증식 여부를 평가함
- ◆ 계육(雞肉), 돈육(豚肉) 샘플에 대한 각각의 시료를 25g 분량으로 정밀저울을 이용하여 계량한 후 225 mL의 2X Bolton broth(Himedia, 인도)와 혼합하여 Bag mixer(Interscience, 프랑스) 장비로 약 1분간 균질화 과정을 진행함
- ◆ 균질화 과정 종료 후 적절하게 혼합된 식품 샘플 미호기 조건으로 42°C에서 48시간 동안 증균 배양 후 일반 mCCDA 배지(Himedia, 인도)와 TiO₂, TTC, Bile salt, tazobactam 등이 추가된 개선 C-mCCDA 배지(Acumedia, 미국)에 각각 100 μ l를 분주하고 Spread plate technique 기법을 이용한 평판 도말을 진행하여 미호기 조건으로 42°C에서 48시간 배양 후 균주의 성장 여부를 통한 배지의 선택적 검출능력 및 경쟁세균의 증식 여부를 평가함

5) 완성된 시제품의 유효기간 테스트

① *B. cereus* 검출용 개선된 m-MYP 배지 시제품의 품질 유효성 평가

- ◆ 본 연구 과제를 통하여 신규 개발된 *B. cereus* 균주 검출용 소포장 m-MYPA 배지 kit 제품에 대한 제품 안정성을 확인하고자 최적의 배지 보관 조건을 확립하고 시제품 첫 생산일로부터 6개월간 매월 배지 제품 및 supplement의 품질 유효성 실험을 진행하여 안정성을 평가함
- ◆ 품질 유효성 실험을 위하여 *B. cereus* ATCC 14579 균주를 사용하였으며 해당 균주는 -80°C의 deep freezer에 보관된 stock cell로부터 brain heart infusion broth(Meark, 독일)에 접

중하여 37°C에서 12시간 동안 2회 계대 배양 후 증식된 *B. cereus* ATCC 14579 균주를 유효성 평가에 사용함

- ◆ 초기 균수 결정을 위하여 brain heart infusion broth(Meark,독일)에 접종하여 37°C에서 12시간 배양된 *B. cereus* ATCC 14579균주는 McFarland standard kit(Bimériux, 프랑스)의 4표준 탁도(O.D₆₀₀ nm=1.0)를 기준으로 희석한 후 10⁸ CFU/ml의 균수를 이용하여 0.1% peptone water(Himedia, 인도)에 *B. cereus* ATCC 14579 균주를 10² ~ 10⁸까지 단계별 희석하였으며 신규 개발된 MYPA 배지에 Spread plate technique 기법을 이용한 평판 도말을 3반복 진행 후 37°C에서 12시간 배양하여 증식된 생균수의 측정으로 최초 배지 포장일로부터 6개월 간 배지 제품 및 supplement의 품질 유효성을 평가함

② *Campylobacter* 검출용 개선된 C-mCCDA 배지 시제품의 품질 유효성 평가

- ◆ 본 연구 과제를 통하여 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 소포장 C-mCCDA 배지 kit의 제품 안정성을 확인하고자 최적의 배지 보관 조건을 확립하고 시제품 첫 생산일로부터 6개월 간 매월 배지 제품 및 supplement의 품질 유효성 실험을 통하여 진행하여 안정성을 평가함
- ◆ 품질 유효성 실험을 위하여 *C. coli* ATCC 33559 균주를 사용하였으며 해당 균주는 -80°C의 deep freezer에 보관된 stock cell로부터 Bolton broth(Himedia, 인도)에 접종하여 미호기 조건으로 42°C에서 48시간 동안 2회 계대 배양을 통하여 증식된 *C. coli* ATCC 33559 균주를 유효성 평가에 이용함
- ◆ 초기 균수 결정을 위하여 Bolton broth(Himedia, 인도)에 접종하여 미호기 조건으로 42°C에서 48시간 배양된 *C. coli* ATCC 33559 균주는 McFarland standard kit (Bimériux, 프랑스)의 4표준 탁도(O.D₆₀₀ nm=1.0)를 기준으로 희석한 후 10⁸ CFU/ml의 균수를 이용하여 Phosphate buffered saline buffer(Sigma aldrich, 미국)에 *C. coli* ATCC 33559균주를 10² ~10⁸까지 단계별 희석하였으며 신규 개발된 소포장 C-mCCDA 배지에 Spread plate technique 기법을 이용한 평판 도말을 3반복 진행 후 미 호기 조건으로 42°C에서 48시간 배양하여 증식된 생균수의 측정으로 최초 배지 포장일로부터 6개월 간 배지 제품 및 supplement의 품질 유효성을 평가함

3-3. 실험결과

1) 개선된 소포장 배지 제품 포장재 결정

- ◆ 다양한 포장재 후보군의 특징을 취합하여 소포장 분말 배지 시제품의 포장에 적합한 포장재를 최종 선택함
- ◆ 포장재 선택의 필수 요소로 빛, 수분, 산소 차단성을 통한 제품 물성 변화의 최소화를 중점적으로 고려하였으며 포장용 필름 업체 전문가의 자문을 통하여 <표3>과 같이 제품 특성을 고려하여 LLDPE, AL, PET 재질의 소포장 배지 포장용 포장재를 최종 결정함

표3. 최종 선발된 소포장 배지 제품의 포장재

종류	장점
<p>LLDPE (Linear low-density polyethylene)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 선형 저밀도 폴리에틸렌(LLDPE) 필름은 광학성 및 환경 적응력이 우수한 무독성의 포장재로 강도와 가공성이 탁월하여 식품포장지의 내면에 주로 사용됨
<p>AL (Aluminum)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 알루미늄(AL)은 기계적 강도와 가스 차단성이 우수하며 수증기와 산소의 투과율이 적고, 빛에 대한 차단성이 우수하며 내열성, 내한성, 내구성이 강한 포장재임 • 포장재 내 피막 형성을 목적으로 나일론(NY), 폴리에스테르(PET), 폴리에틸렌(PE) 등의 여러 가지 필름 소재에 알루미늄을 합지하여 사용됨 • 장기간 보존성이 요구되는 식품류의 진공포장, 액체포장, 냉동식품 및 높은 방습성이 요구되는 전자부품, 의약품 등의 포장 재료로 널리 사용됨
<p>PET (Polyethylene terephthalate)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 폴리에스테르라는 명칭으로 불리는 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET) 필름은 광택성, 내후성, 내약품성 등이 우수하고 스크래치에 강한 포장용 필름 재질로 비교적 가격이 저렴하여 가스차단이 요구되지 않은 일반적 비닐 재질의 포장 시 나일론(NY) 대용으로 PET 필름이 사용됨 • 셀로판의 3배, 폴리에틸렌의 약 10배 정도의 강한 인장강도를 보이며 온도에 따른 변화와 수분 및 기체의 투과성도 적음 • 투명성, 내강성 등이 우수하여 사진필름, 복사용 필름, 자기테이프, 비디오테이프, 절연테이프, 식품포장용 필름, 트레이싱 페이퍼 등 다양한 분야의 포장재로 사용됨

- ◆ <표3>에서와 같이 최종 결정된 포장재의 경우 각 포장재질의 특성에 따른 장단점이 존재하므로 소포장 배지 제품 포장용도에 가장 적합한 기능성 복합 필름을 제작하였으며 본 소포장 배지 포장용 필름은 “PET + AL + LLD”의 포장재를 삼중지로 합지하여 제작된 기능성 필름으로 포장재 외부는 온도에 의한 변성 및 수분과 기체의 투과율이 적은 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET) 필름을 적용하였으며 중간부는 가스 차단성이 우수하며 수분 및 산소 투과성이 적고, 빛에 대한 차단성, 내열성, 내한성, 내구성 등이 우수한 알루미늄(AL)을 적용하였으며 포장재 내부는 열접착성이 우수하고 무독성으로 식품의 내부 포장재로 주로 사용되는 선형 저밀도 폴리에틸렌(LLDPE) 필름을 적용하여 제작함
- ◆ 특히 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET)와 알루미늄(AL) 재질의 합지를 통하여 자외선, 수분, 및 가스 차단성을 높이고 삼중지의 이용으로 더욱 견고하고 포장제품 개봉 시 제품 내 잔여배지 분말 성분 제거에 편리하도록 제작함

2) 포장용기

- ◆ 본 과제를 통하여 신규 개발된 소포장 배지 제품의 최적화된 포장용기를 선정하기 위하여 <표4>와 같이 각 선택배지별 구성 성분을 확인한 후 각 물질에 대한 취급 방법 및 취급 시 주의사항을 조사함
- ◆ 개발된 신규 소포장 배지 제품화를 위하여 supplement를 혼합 시 빛, 온도, 습도 등의 영향에 의한 항생제 성분의 화학적 마찰이 발생하지 않도록 각 성분을 보완할 수 있는 용기를 선택함

표4. 신규 개발된 *Bacillus* 및 *Campylobacter* 검출용 소포장 개선배지 구성 성분

제품명	구성	성분명	역할	용량(500 ml 기준)
<i>B. cereus</i> 검출용 소포장 선택배지(m-MYPA)	BASE	Mannitol-yolk-polymyxin B agar powder	베이스 파우더	21.5 g/450 ml
	SUPPLEMENT	Polymyxin B	항생물질	50,000 IU
		cefuroxime sodium salt		4 mg
		Egg Yolk Emulsion		50 ml
<i>Campylobacter</i> 검출용 소포장 선택배지(C-mCCDA)	BASE	Campy-Cefex agar	베이스 파우더	22.2 g/500 ml
		Titanium(IV) oxide	첨가물질	0.75 g
		2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride	발색물질	100 mg
		Bile salt	항생물질	0.5 g/l
	SUPPLEMENT	CCDA Selective Supplement (Cefoperazone + Amphotericin B)		Cefoperazone: 16 mg
				Amphotericin: 5 mg
		Tazobactam	2 mg	

- ◆ <표4>의 내용을 기반으로 *Bacillus* 검출용 소포장 개선배지 내 첨가되는 Supplement의 구성 성분인 Polymyxin B 항생제와, *Campylobacter* 검출용 소포장 개선배지 내 첨가되는 Supplement의 구성 성분인 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, CCDA selective (cefoperazone + amphotericin B) 성분은 <그림2>의 물질안전보건자료(MSDS)에서 제시한 바와 같이 빛 또는 열에 취약하여 보관이나 취급 시 주의를 요하므로 빛에 의한 영향을 최소화 하고자 Amber vial을 최종 선정함

Material Safety Data Sheet



(Division of Titan Biotech Ltd)
 Corp. Office: A 2/3, 303-305, 1 usa Tower, Azadpur, Delhi - 110033, India
 Customer Care: customercare@titanbiotechltd.com

CCDA SELECTIVE SUPPLEMENT

Section 1: Product Identification

Product Name: CCDA SELECTIVE SUPPLEMENT
Product Code: TS 101
CAS#: NA
CI#: NA

Section 10: Stability and Reactivity Data

Stability: Product is stable if stored as per the conditions specified under storage of Section No. 7. Product loses its potency/performance above 45°C.
Conditions to avoid: Heat and light.
 Hazardous polymerization will not occur.

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

SAFETY DATA SHEET

according to Regulation (EC) No. 1907/2006
 Version 6.0 Revision Date 30.03.2016
 Print Date 18.01.2019
 GENERIC EU MSDS - NO COUNTRY SPECIFIC DATA - NO DEL DATA

SECTION 1: Identification of the substance/mixture and of the company/undertaking

1.1 Product Identifiers
 Product name : **2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride**
 Product Number : T8877
 Brand : Sigma
 REACH No. : A registration number is not available for this substance as the substance or its uses are exempted from registration, the annual tonnage does not require a registration or the registration is envisaged for a later registration deadline.
 CAS-No. : 298-96-4

1.2 Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against
 Identified uses : Laboratory chemicals, Manufacture of substances.

1.3 Details of the supplier of the safety data sheet
 Company : Sigma-Aldrich Korea
 698-84 Maeng-ni, Wonsam-myun
 CHEON-GU, YONGIN CITY 17166
 SOUTH KOREA
 Telephone : +82 31 329-9000
 Fax : +82 31 329-9090

1.4 Emergency telephone number
 Emergency Phone # : +82-31-329-9050

SECTION 7: Handling and storage

7.1 Precautions for safe handling
 Avoid contact with skin and eyes. Avoid formation of dust and aerosols. Provide appropriate exhaust ventilation at places where dust is formed. For precautions see section 2.2.

7.2 Conditions for safe storage, including any incompatibilities
Protect against light. Store in cool place. Keep container tightly closed in a dry and well-ventilated place.
 Recommended storage temperature 2 - 8 °C
 Storage class (TRGS 510): Combustible Solids

7.3 Specific end use(s)
 Apart from the uses mentioned in section 1.2 no other specific uses are stipulated



POLYMYXIN B SELECTIVE SUPPLEMENT

USE

Polymyxin B Selective Supplement is used with Mossel's medium (base) for the detection and enumeration of *Bacillus cereus*. The selective supplement is composed of polymyxin B. Supplied as a freeze-dried preparation, it inhibits almost all contaminating microflora in order to favor the growth of *Bacillus cereus*. More information can be found by consulting the sheets for *Bacillus cereus* agar (Mossel).

STORAGE / SHELF LIFE

- Store between 2 and 8°C, shielded from light.
- The expiration date is indicated on the vial.
- Once reconstituted, the product can be stored for a maximum duration of 30 days at 2-8°C, shielded from light.

그림2. Supplement 구성 성분에 대한 물질안전보건자료(MSDS)

- ◆ 신규 개발된 소포장 배지 kit제품 내 포함된 supplement를 구성하는 항생제 성분들을 각각 소분하여 용해 후 사용 편의성을 고려하여 supplement 포장용기를 최종 결정함
- ◆ 2 ml과 3 ml 용량의 각 바이알에는 정량의 항생제 소분은 가능하였으나 멸균 증류수 2 ml을 첨가하여 용해시킨 결과 용해성이 저하됨을 확인함
- ◆ 특히 *Campylobacter* 검출용 소포장 배지에 첨가되는 supplement의 구성 성분 중 Titanium

dioxide(TiO₂)는 멸균 증류수에 용해되기 어려운 상태로 수월한 용해를 위하여 멸균 증류수가 3 ml 이상 추가가 요구되므로 용해 시 supplement의 취급 용이성을 고려하여 적절한 크기인 5 ml 용량의 vial을 선택함

- ◆ 또한 모든 항생제 성분들은 밀폐 된 용기를 사용하며 건조하고 통풍이 잘 되는 냉온 암소 환경에 보관하는 것이 필수적이므로 일반 고무마개 대신 진공 고무마개를 사용하여 진공포장 후 냉장보관 함
- ◆ 용기의 밀폐용 캡은 <그림3>과 같이 일반 마개 대신 부상의 염려가 적으며 저렴하고 편리하게 개봉 할 수 있는 고리형 탭(Ring tab)이 부착된 절개방식의 밀폐용 캡으로 결정함

<i>Bacillus</i> supplement(mMYP)	<i>Campylobacter</i> supplement(C-mCCDA)
	
Amber vial(좌: 5 ml, 우: 2 ml)	Amber vial(좌 → 우): 5 ml, 3 ml, 2 ml

그림3. Supplement 포장을 위하여 최종 선발된 용기 및 밀폐용 캡

3) 포장 방법 디자인

- ◆ 본 연구에서는 별도의 자동포장기의 이용 없이 더욱 효율적이고 시간을 단축시키며 제작할 수 있는 밀폐된 공간 환경을 제작함
- ◆ Clean bench 사용 시 밀폐환경 조성에 다소 제한이 따르므로 밀폐된 공간 내에서 제조생산 작업을 진행하고자 safety box를 설치 후 외부환경으로부터 밀폐된 공간을 확보하였으며 수동으로 분말 배지의 일정한 양을 계량하여 충전 한 후 <그림4>와 같이 band sealer로 sealing하는 방식을 통하여 소포장 배지를 상품화하였으며 safety box 내 집진 장치를 추가 설치하여 작업 공간 내의 분진에 의한 비산(飛散)을 최소화하여 작업 환경을 더욱 개선하도록 함

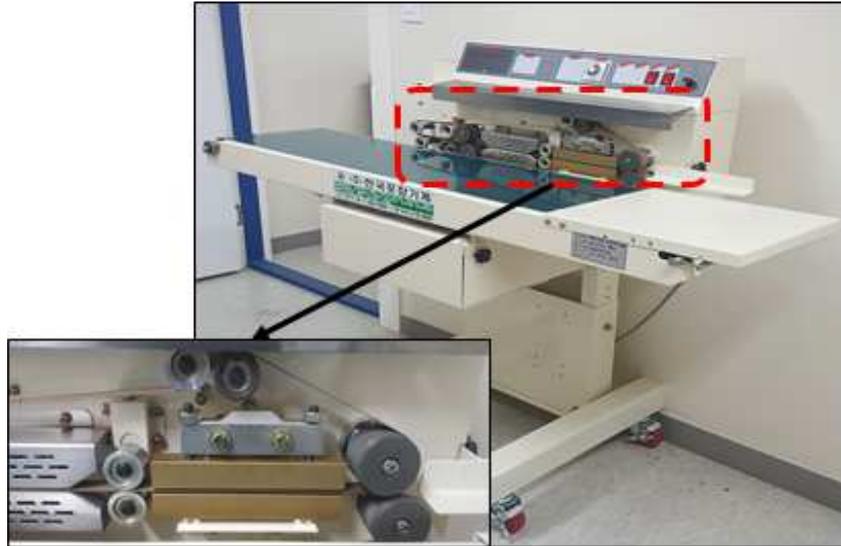


그림4. band sealer방식의 sealing 장비

- ◆ <그림5>의 safety box는 외부와의 공기와 차단된 공간으로 안쪽으로 이어지는 sleeve가 존재하여 작업자가 손만 넣어서 편리하게 작업이 가능하며 safety box 내부에는 정밀저울을 비치하여 배지의 정밀 계량이 가능한 환경을 제공하여 개선된 작업공간에서 작업한 근로자는 파우더의 흡입에 대한 불편함이 전혀 없는 쾌적한 환경에서의 제작이 가능함



그림5. Safety box와 집진기

- ◆ 추가적으로 작업자의 배지 계량 시간을 단축하고자 <그림6>과 같이 다양한 용량의 계량스푼을 제작하여 단 시간 내 계량이 가능하도록 하였으며 다양한 용량의 계량스푼을 사용하여 소분한 결과 각 배지 성분별 1-3분 정도 소요되던 배지 계량 시간을 약 10초 이내로 단축하는 효과를 확인함



그림6. 다양한 크기의 배지 파우더 계량스푼

- ◆ 그러나 배지 내 첨가되는 supplement를 구성하는 항생제의 경우 아주 미세한 양을 소분해야하므로 정밀저울의 사용이 필수적이며 계량 시 비교적 장시간이 소요되므로 현재 고상으로 소분하여 판매 중인 supplement 내 항생제 성분들을 벌크 형태로 액상화 후 각 소포장 단위의 제공량에 맞도록 충전하여 제조하는 방안도 추진 중이며 현재 진행하고 있는 액상형의 항생제를 이용한 소포장 배지 시제품의 유효기간 평가 결과를 통하여 소포장 배지 제품 품질에 대한 안정된 결과가 확인될 경우 액상상태의 항생제로 판매할 예정임
- ◆ 본 과제를 통하여 신규 개발된 소포장 배지 kit는 소분된 분말 배지용 포장재, supplement 용 포장용기와 이를 포장할 소포장 배지 kit 구성 박스 및 항생제 성분을 보냉 처리 후 유통하기 위한 보냉용 박스로 구성됨
- ◆ 추가적으로 배지와 항생제에는 모두 라벨을 붙여 구분이 가능하도록 하였으며 포장재 및 kit 박스 외부는 디자인 전문 제작 업체에 의뢰하여 다양한 도안을 받아 가장 전문적이고 세련된 디자인으로 선정하여 제작함
- ◆ 항생제를 냉장 상태로 유통시킬 수 있는 최적 사이즈의 보냉 박스 크기는 외경 185 × 153 × 190 mm, 내경 155 × 125 × 160 mm의 규격으로 아이스 팩과 항생제가 모두 들어갈 수 있는 크기로 제작하였으며 보냉 박스를 주문 제작할 경우 제작 단가 상승을 고려하여 시중에 판매되는 보냉 박스의 크기와 단가를 조사하여 개당 약 15원 정도의 적당한 가격대를 형성하는 보냉 박스를 선정함
- ◆ 소포장 배지 및 supplement 구성의 kit 박스는 보냉 박스 내에 아이스 팩과 동봉하여 포장 가능하도록 알맞은 크기로 제작하였으며 항생제가 포함되지 않은 배지만 개별 판매할 경우 별도의 보냉 박스 포장 없이 날개 포장상태로 판매하고자 함
- ◆ 추가적으로 항생제가 포함되지 않은 소포장 배지 kit에 대한 소비자의 대량 구매요청이 있을 경우에는 별도 제작한 박스에 25~30개까지 일괄 포장하여 유통하는 방식으로 다양하게 구성하여 판매하고자 함
- ◆ 또한 소포장 kit 제품을 구매하는 소비자에게 제품의 사용 편의성을 제공하고자 제품 제조 시 <그림7>과 같은 제품 매뉴얼을 별도 제작하여 제품에 동봉 후 포장하여 제공하고자 함

 간편한 소포장 배지(Bacillus)		 간편한 소포장 배지(Campylobacter)																	
COMPOSITION The product is composed of a powder base(B) and 2 supplement(S).		COMPOSITION The product is composed of a powder base(B) and 2 supplement(S).																	
STORAGE Base : 15/30°C Supplement : 2/8°C		STORAGE Base : 15/30°C Supplement : 2/8°C																	
DIRECTIONS <ul style="list-style-type: none"> Suspend 1 pack of the medium in 450 ml of purified water and bring gently to the boil to dissolve. Sterilise by autoclaving at 121°C for 15 minutes. Cool to approximately 45-50°C and aseptically add 50ml Egg Yolk Emulsion and 1 vial of m-MYP Supplement, reconstituted as directed. Mix well and pour into sterile petri dishes. 		DIRECTIONS <ul style="list-style-type: none"> Dissolve 1 pack of the medium in 500ml of purified water and aseptically add supplement 1. Heat with frequent agitation and boil for one minute to dissolve the medium. Autoclave at 121°C for 15 minutes. Cool medium to 50°C and aseptically add supplement 2. Mix well and pour into sterile petri dishes. 																	
INOCULATION <ul style="list-style-type: none"> If the agar plate has been refrigerated, allow to warm to room temperature before inoculation. Streak sample onto plate Incubate at 30°C for 18-40 hours. 		INOCULATION <ul style="list-style-type: none"> If the agar plate has been refrigerated, allow to warm to room temperature before inoculation. Streak sample onto plate Inoculated plates at 42°C in a micro-aerophilic atmosphere composed of 5 - 6% oxygen, 3 - 10% carbon dioxide and 84 - 85% nitrogen for 48 hours. 																	
QUALITY CONTROL <table border="1"> <thead> <tr> <th>Positive control:</th> <th>Expected results:</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Bacillus cereus</i> KCTC[®] 1513*</td> <td>Good growth; bright pink colonies; zone of egg yolk precipitation</td> </tr> <tr> <th>Negative control:</th> <th>Expected results:</th> </tr> <tr> <td><i>Escherichia coli</i> ATCC[®] 25922*</td> <td>No growth</td> </tr> </tbody> </table>		Positive control:	Expected results:	<i>Bacillus cereus</i> KCTC [®] 1513*	Good growth; bright pink colonies; zone of egg yolk precipitation	Negative control:	Expected results:	<i>Escherichia coli</i> ATCC [®] 25922*	No growth	QUALITY CONTROL <table border="1"> <thead> <tr> <th>Positive control:</th> <th>Expected results:</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Campylobacter jejuni</i> ATCC[®] 29428*</td> <td>Good growth</td> </tr> <tr> <th>Negative control:</th> <th>Expected results:</th> </tr> <tr> <td><i>Escherichia coli</i> ATCC[®] 25922*</td> <td>No growth</td> </tr> </tbody> </table>		Positive control:	Expected results:	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC [®] 29428*	Good growth	Negative control:	Expected results:	<i>Escherichia coli</i> ATCC [®] 25922*	No growth
Positive control:	Expected results:																		
<i>Bacillus cereus</i> KCTC [®] 1513*	Good growth; bright pink colonies; zone of egg yolk precipitation																		
Negative control:	Expected results:																		
<i>Escherichia coli</i> ATCC [®] 25922*	No growth																		
Positive control:	Expected results:																		
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC [®] 29428*	Good growth																		
Negative control:	Expected results:																		
<i>Escherichia coli</i> ATCC [®] 25922*	No growth																		
<small>진성유니텍 경기도 고양시 덕양구 통일로 140 상송테크노밸리 A동 443호 TEL 02-2219-5157 FAX 02-2219-5158</small>		<small>진성유니텍 경기도 고양시 덕양구 통일로 140 상송테크노밸리 A동 443호 TEL 02-2219-5157 FAX 02-2219-5158</small>																	

그림7. 간편한 소포장 배지 manual

- ◆ 본 과제를 통하여 신규 개발된 소포장 배지 kit의 원활한 제품 생산을 진행하고자 고용창출을 통하여 제조 근로자 1인을 고용하였으며 해당 근로자는 소포장 배지 kit의 전문적인 제조생산 및 포장작업이 주요 업무로 소포장 배지 kit의 생산 과정은 <그림8>과 같음



그림8. 소포장 배지 제조생산 과정

- ◆ <그림8>과 같은 제조생산 과정을 통하여 본 과제에서 진행된 최종 개발된 소포장 배지 kit 제품으로는 *Bacillus* 검출용 개선배지인 mMYPA와 *Campylobacter* 검출용 개선배지인 C-mCCDA로 <그림9>와 같이 총 2종의 소포장 배지 kit를 신규 개발함

4) 최종 상품화 준비 및 가격 결정 비교



그림9. 신규 개발된 소포장 선택배지 kit

[좌): *Campylobacter* 검출용 소포장 배지 kit, (우): *B. cereus* 검출용 소포장 배지 kit]

- ◆ 본 과제를 통하여 신규 개발된 *Bacillus* 및 *Campylobacter* 검출용 선택배지 외에도 기타 다양한 식중독 균의 검출을 위하여 식품공전에서 제시한 여러 종류의 배지들을 대상으로 소포장 배지 kit를 제품화하여 판매하는 부분을 현재 일부 적용하여 진행 중이며 일반적으로 액체배지의 경우 1 L 제조 용량을 기준으로, 고체배지의 경우 약 20개의 평판배지 제조 분량인 500 ml 용량을 기준으로 판매하고 있으나 추후 지속적 판매를 통한 고객의 반응 및 의견을 수렴하여 주문 고객의 요청사항에 따라 다양한 용량의 맞춤형 제작도 가능할 것으로 사료됨
- ◆ 500 ml 용량을 기준으로 생산된 소포장 배지 kit의 가격은 <표5>와 같이 배지원료 및 항생제 외에 포장 재료비, 제조 인건비, 포장비용 등이 모두 포함된 상태로 마진률 40%를 적용하여 산출하였으며 *Bacillus* 검출용 소포장 선택배지인 m-MYPA 제품의 경우 15,413원, *Campylobacter* 검출용 소포장 선택배지인 C-mCCDA 제품의 경우 60,563원으로 최종 결정함

표5. 현재 판매되고 있는 개선배지 소포장 Kit 가격 산출표

No	배지명	배지가격	g/500mL	소포장 봉투 수 /500ml 당	소포장배지 가격	항생제 (500ml 제조기준)	봉투 당 배지원가 (KRW)	포장재 가격	항생제 vial 가격	제조공임	포장비 :비닐+아이스박스	총생산원가	마진 계산 한 총 가격	소비자가	업자가	마진 %	
1	간편한 소포장 배지 (<i>Bacillus</i>)	M636	38,027	23.02	21	1,810.81	6,336.39	8148	25	374	200	501	9,248	15,413	₩ 15,500	₩ 13,950	40%
2	간편한 소포장 배지 (<i>Campylobacter</i>)	A7718	128,234	22.20	22	5,828.82	29,304.28	34864	25	748	200	501	36,338	60,563	₩ 60,600	₩ 54,540	40%

- ◆ 초기 과제 진행 계획에 비하여 가격이 다소 상승하였으나 기존 시판중인 chromogenic 배지제품(CHROMagar, 프랑스) 가격 대비 매우 저렴한 수준이며 <표6>의 내용과 같이 실제로 CHROMagar *Bacillus* 배지제품과 *Campylobacter*배지제품에 대하여 500 ml 단위의

소분된 금액으로 산출하여 비교한 결과 CHROMagar *Bacillus* 배지제품은 약 89,210원, CHROMagar *Campylobacter* 배지제품은 약 119,457원으로 본 연구를 통하여 신규 개발된 *Bacillus* 및 *Campylobacter* 검출용 각 선택배지 kit 가격대비 약 73,797원, 58,893원 가량 증가된 가격으로 산출됨을 확인함

표6. 현재 판매되고 있는 개선배지와 CHROMagar 배지의 500 ml 기준 가격 산출표

No	Cat.No	배지명	배지가격	소포장배지 가격	항생제 1 (500 ml 제조 기준)	항생제 2 (500 ml 제조 기준)	항생제 3 (500 ml 제조 기준)	항생제 4 (500 ml 제조 기준)	항생제 5 (500 ml 제조 기준)	봉투 당 배 지원가 (KRW)	포장재 가격	항생제 vial 가격	제조공임	포장비 :비닐+아이 스박스	총생산원가	마진 계산한 총 가격	소비자가	업자가	마진 %
1	JS-m-MYP	간편한 소포장 배지 (<i>Bacillus</i>)	₩ 38,027	₩ 1,811	3,645	2,262	430	-	-	8148	₩ 25	₩ 374	₩ 200	₩ 501	₩ 9,248	₩ 15,413	₩ 15,500	₩ 13,950	40%
2	JS-C-mCCDA	간편한 소포장 배지 (<i>Campylobacter</i>)	₩ 128,234	₩ 5,829	119	602	480	833	27,000	34864	₩ 25	₩ 748	₩ 200	₩ 501	₩ 36,338	₩ 60,563	₩ 60,600	₩ 54,540	40%
3	BC732	CHROMagar <i>Bacillus</i>	₩ 264,000	₩ 52,800						52800	₩ 25		₩ 200	₩ 501	₩ 53,526	₩ 89,210	₩ 89,300	₩ 80,370	40%
4	CP572	CHROMagar <i>Campylobacter</i>	₩ 351,000	₩ 70,200						70200	₩ 25	₩ 748	₩ 200	₩ 501	₩ 71,674	₩ 119,457	₩ 119,500	₩ 107,550	40%

◆ 기존 mCCDA, MYP 배지를 소포장화 한 경우와 개발 C-mCCDA, mMYP 배지를 소포장화 한 가격의 비교 산출한 경우 <표7>의 내용과 같이 기존배지의 경우 15,500원, 60,600원으로 이에 비하여 본 연구를 통하여 신규 개발된 배지의 경우 22,900원, 76,400원으로 훨씬 저렴한 가격에 선택성 높은 우수한 배지를 사용할 수 있음을 확인함

표7. 현재 판매되고 있는 개선배지와 기존배지의 500 ml 기준 가격 산출표

No	Cat.No	배지명	배지가격	소포장배지 가격	항생제 1 (500 ml 제조 기준)	항생제 2 (500 ml 제조 기준)	항생제 3 (500 ml 제조 기준)	항생제 4 (500 ml 제조 기준)	항생제 5 (500 ml 제조 기준)	봉투 당 배 지원가 (KRW)	포장재 가격	항생제 vial 가격	제조공임	포장비 :비닐+아이 스박스	총생산원가	마진 계산한 총 가격	소비자가	업자가	마진 %
1	JS-m-MYP	간편한 소포장 배지 (<i>Bacillus</i>)	₩ 38,027	₩ 1,811	3,645	2,262	430	-	-	8148	₩ 25	₩ 374	₩ 200	₩ 501	₩ 9,248	₩ 15,413	₩ 15,500	₩ 13,950	40%
2	JS-C-mCCDA	간편한 소포장 배지 (<i>Campylobacter</i>)	₩ 128,234	₩ 5,829	119	602	480	833	27,000	34864	₩ 25	₩ 748	₩ 200	₩ 501	₩ 36,338	₩ 60,563	₩ 60,600	₩ 54,540	40%
3	JS-H-M636F	간편한 소포장 배지 (MYP)	₩ 38,027	₩ 6,336	3,645	2,262				12244	₩ 26	₩ 748	₩ 200	₩ 501	₩ 13,719	₩ 22,865	₩ 22,900	₩ 20,610	40%
4	JS-H-A7718	간편한 소포장 배지 (mCCDA)	₩ 128,234	₩ 29,304	3	15,000				44308	₩ 27	₩ 748	₩ 200	₩ 501	₩ 45,784	₩ 76,307	₩ 76,400	₩ 68,760	40%

◆ 추가적으로 본 과제를 통하여 개발된 *B. cereus* 검출용 선택배지에 비하여 *Campylobacter* 검출용 선택배지에 첨가되는 항생제의 단가가 비교적 높으므로 해당 항생제를 대량 구매 또는 동일 효율을 갖는 비교적 저렴한 타 사 브랜드의 항생제의 대체 사용 등을 통한 비용 절감 방안을 마련하여 현재 가격보다 약 10,000원 가량 저렴한 가격대의 제품을 고객에게 제공할 수 있도록 계획 중임

5) 완성된 시제품의 실제시료에서의 검사

① 실제 식품에서의 *B. cereus* 검출용 m-MYP 선택배지 성능 실험

◆ 시중에서 판매되는 김밥 및 샌드위치의 식품 시료에서 일반 배지와 개발된 배지를 사용하여 *B. cereus*를 검출여부를 평가한 결과 <그림10>과 같이 개선된 m-MYP 배지 대비 기존 일반 선택배지인 MYP 배지에서 *B. cereus* 외에 경쟁 집락이 다수 검출되는 결과를 보여 개선된 m-MYP배지에서 *B. cereus*검출에 대한 우수한 선택성을 확인함

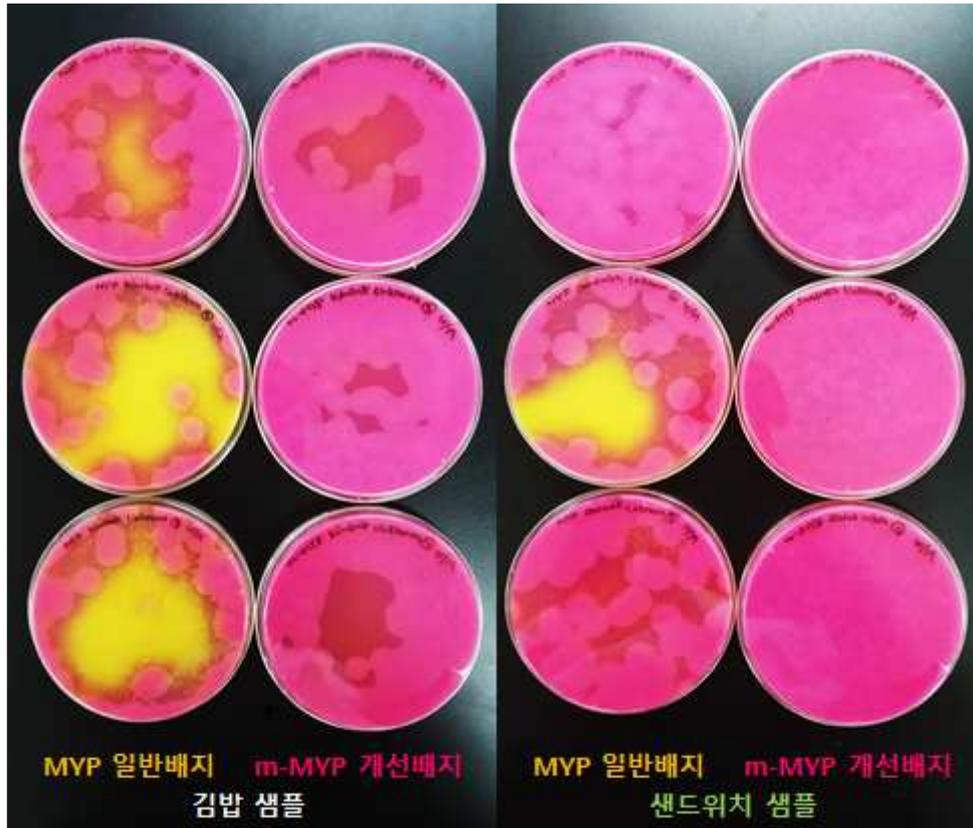


그림10. 신규 개발된 *B. cereus* 검출용 선택배지(m-MYPA)의 식품 내 검출 성능 비교 실험

② 실제 식품에서의 *C. coli* 검출용 C-mCCDA 선택배지 성능 실험

◆ 시중에서 판매되는 계육(雞肉) 및 돈육(豚肉) 식품 시료에서 일반 배지와 개발된 배지를 사용하여 *C. coli*의 검출여부를 평가한 결과 <그림11>과 같이 기존 일반 선택배지인 mCCDA 배지 대비 개선된 C-mCCDA 배지에서 *C. coli*의 검출능력이 우수함을 확인함

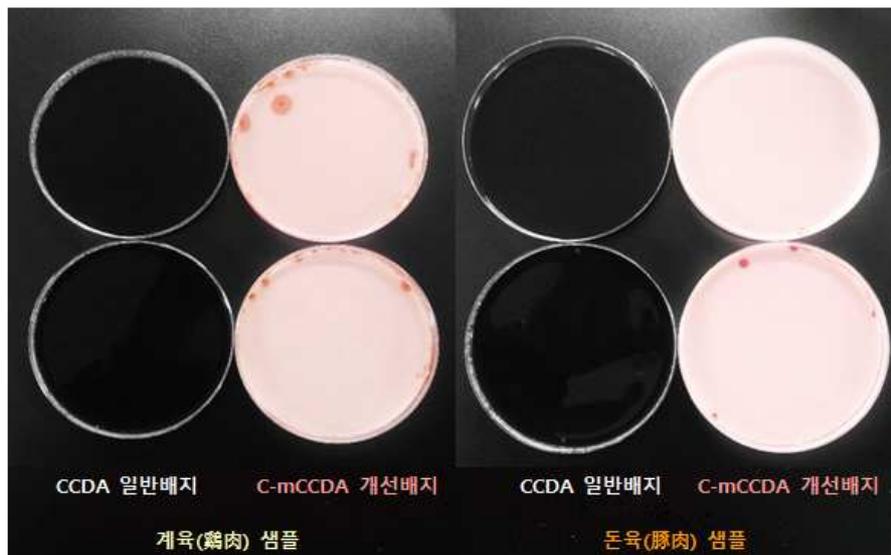


그림11. 신규 개발된 *C. coli* 검출용 선택배지(C-mCCDA)의 식품 내 검출 성능 비교 실험

6) 완성된 시제품의 유효기간 테스트

① 신규 개발된 *B. cereus* 검출용 m-MYP 선택배지 시제품의 품질 유효성 평가 결과

- ◆ 본 연구 과제를 통하여 신규 개발된 *B. cereus* 검출용 소포장 m-MYPA 배지 kit의 제품 안정성을 확인하고자 4°C의 최적 배지 보관 조건을 확립하였으며 시제품 첫 생산일로부터 6개월간 매월 배지 제품 및 supplement에 대한 품질 유효성 실험을 진행하여 제품 안정성을 평가함
- ◆ <표8>과 같이 품질 유효성 실험을 진행하고자 *B. cereus* ATCC 14579 균주를 사용하여 2.17×10^8 CFU/ml로 초기 균수를 결정하였으며 첫 시제품 포장일을 기점으로 6개월간 매월 생균수 측정을 통하여 배지 제품 및 supplement의 유효기간에 대한 안정성 평가를 실시한 결과 $2\sim 3 \times 10^8$ CFU/ml 범위로 일정하게 유지됨을 확인하여 6개월 간 제품에 대한 품질이 비교적 안정적임을 확인함

B. cereus에 대한 소포장 m-MYP 개선 배지의 유효성 평가					
사용균주	사용배지	사용목적	평가기간	생균수측정결과	비고
B. cereus ATCC 14579	MYP agar	초기 균수 결정	2018. 06. 13(수)	2.17×10^8 CFU/ml	소포장 배지 시제품 생산 전으로 MYP agar 벌크 제품을 사용함.
	m-MYP agar (소 포장 개선배지)	시제품 안정성 평가 (유효기간 테스트)	2018. 06. 28(목)	2.35×10^8 CFU/ml	개선된 B. cereus 검출용 소포장 배지를 사용함.
			2018. 07. 25(수)	2.93×10^8 CFU/ml	
			2018. 08. 28(화)	3.17×10^8 CFU/ml	
			2018. 09. 20(목)	2.20×10^8 CFU/ml	
			2018. 10. 30(화)	3.14×10^8 CFU/ml	
			2018. 11. 27(화)	3.25×10^8 CFU/ml	
			2018. 12. 27(목)	3.42×10^8 CFU/ml	

표8. 본 연구 과제를 통하여 개발된 신규 m-MYPA 개선배지 제품에 대한 유효성 평가 결과

- ◆ 일반적으로 제공되는 분말배지 및 배지 내 항생물질의 유통기한이 약 2년 이상임을 감안하였을 경우 본 연구 과제를 통하여 신규 개발된 *B. cereus* 검출용 소포장 선택배지 kit 시제품의 안정성이 충분히 유지되므로 해당 제품의 판매가 가능할 것으로 사료됨
- ◆ 본 연구 과제에서는 포장재, 용기 선정 및 선택 배지 성능 평가 등의 검증과정을 거친 후 첫 소포장 배지 시제품 포장을 개시하였으며, 시제품 생산 시점으로부터 약 6개월 정도의 비교적 단기간 동안 유효기간에 대한 안정성이 평가되었으나 배지와 항생제의 유효기한을 고려하여 추후 연구에서도 지속적으로 제품 안정성 평가를 진행할 필요가 있음

② *C. coli* 검출용 개선된 C-mCCDA 배지 시제품의 품질 유효성 평가

- ◆ 본 연구 과제를 통하여 신규 개발된 *C. coli* 검출용 소포장 C-mCCDA 배지 kit의 제품 안정성을 확인하고자 4°C의 최적 배지 보관 조건을 확립하였으며 시제품 첫 생산일로부터 6개월간 매월 배지 제품 및 supplement에 대한 품질 유효성 실험을 통하여 진행하여 안정성을 평가함

- ◆ <표9>과 같이 품질 유효성 실험을 진행하고자 *Campylobacter coli* ATCC 33559 균주를 사용하여 2.54×10^8 CFU/ml로 초기 균수를 결정하였으며 첫 시제품 포장일을 기점으로 6개월 간 매월 생균수 측정을 통하여 배지 제품 및 supplement의 유효기간에 대한 안정성 평가를 실시한 결과 약 $3\sim 4 \times 10^8$ CFU/ml 범위로 일정하게 유지됨을 확인하여 6개월 간 제품에 대한 품질이 비교적 안정적임을 확인함

표9. 본 연구 과제를 통하여 개발된 신규 C-mCCDA 개선배지 제품에 대한 유효성 평가 결과

C. coli 에 대한 소포장 C-mCCDA 개선 배지의 유효성 평가					
사용균주	사용배지	사용목적	평가기간	생균수 측정결과	비고
C. coli ATCC 33559	mCCDA agar	초기 균수 결정	2018. 06. 13(수)	2.54×10^8 CFU/ml	소 포장 배지 시제품 생산 전으로 mCCDA 벌크 제품을 사용함
	C-mCCDA agar (소 포장 개선배지)	시제품 안정성 평가 (유효기간 테스트)	2018. 06. 28(목)	3.3×10^8 CFU/ml	개선된 <i>Campylobacter</i> 검출용 소 포장 배지를 사용함
			2018. 07. 25(수)	4.09×10^8 CFU/ml	
			2018. 08. 28(화)	4.23×10^8 CFU/ml	
			2018. 09. 20(목)	3.38×10^8 CFU/ml	
			2018. 10. 30(화)	2.01×10^8 CFU/ml	
			2018. 11. 27(화)	4.05×10^8 CFU/ml	
			2018. 12. 27(목)	3.17×10^8 CFU/ml	

- ◆ 일반적으로 제공되는 분말배지 및 배지 내 항생물질의 유통기한이 약 2년 이상임을 감안하였을 경우 본 연구 과제를 통하여 신규 개발된 *Campylobacter* 검출용 소포장 선택배지 kit 시제품의 안정성이 충분히 유지되므로 해당 제품의 판매가 가능할 것으로 사료됨
- ◆ 본 연구 과제에서는 포장재, 용기 선정 및 선택 배지 성능 평가 등의 검증과정을 거친 후 첫 소포장 배지 시제품 포장을 개시하였으며, 시제품 생산 시점으로부터 약 6개월 정도의 비교적 단기간 동안 유효기간에 대한 안정성이 평가되었으나 배지와 항생제의 유효기한을 고려하여 추후 연구에서도 지속적으로 제품 안정성 평가를 진행할 필요가 있음

7) 상용화를 위한 허가 및 법리 검토

- ◆ 배지의 종류는 사용 목적에 따라 증균배지 및 선택배지로 크게 분류되며 다양한 화학적 조성과 함께 균주의 선택적 증식을 위한 항생제 등이 첨가된 supplement가 필요 여부에 따라 첨가될 수 있으므로 실험실용 시약으로 분류됨
- ◆ 실험실용 시약의 예로 식품회사의 실험실에서 일반적으로 사용되는 시약의 경우 별도의 규제나 허가 없이 자유롭게 생산, 유통이 가능하지만 병원 및 국, 공립 의료기관 등 특수 분야에서 실험용 시약을 취급할 경우 사용 목적 및 분류 대상에 따라서 의료기기 관련 신고 또는 허가를 받아야 함
- ◆ 병원에서 인·축 (사람, 동물)의 가검물(주로 혈액 또는 배설물)을 시료로 하여 실험실용 시약을 사용하는 경우 의료기기 품목의 체외 진단 시약으로 분류됨
- ◆ 의료기기 품목은 허가 또는 신고 대상이며 체외 진단 시약은 의료 기기 1등급 품목(1~4 등

급이 있음)에 해당되어 제조, 유통의 신고 대상임

- ◆ 즉, <표10>에서와 같이 본 연구 과제를 통하여 신규 개발된 *Bacillus Campylobaceter* 검출용 소포장 배지 kit의 경우 식품업계를 대상으로 병원성 식중독균의 검출을 위한 판매 목적으로 개발된 제품으로 허가 대상은 아니지만 추후 병원 등의 의료기관에서 사용되는 경우 제조일자, 유통경로 등에 대한 신고를 필하며 중간 유통 업체를 통하여 유통해야할 경우 최종 사용처에 대한 정보를 문의하여야 함

표10. 소포장 배지 kit의 사용처에 따른 허가 및 벌리 검토

사용처	허가 및 벌리 검토
식품회사, 관공서, 대학 등	아무런 규제, 허가 요건 없음
병원	의료기기 1등급으로 제외 진단 시약에 해당, 식약처 농림축산검역본부에 신고해야함

따라서 소포장 배지 kit에 대한 주문 시 반드시 하기 내용에 대한 사항을 파악 후 반드시 지시에 따라야 함

1. 사용처에 대한 의료기관 또는 병, 의원 여부 파악
2. 사용처가 의료기관 또는 병, 의원인 경우 유통 대장에 기록
3. 제품 유통 상 중간 업체일 경우 최종 사용처를 문의하여 의료기관 또는 병, 의원인 경우 유통 대장에 기록해야함

제 2절. 연구의 추진일정 및 성과수행도

- ◆ 본 연구는 *Bacillus*와 *Campylobacter* 검출용 선택배지의 개발 및 소포장 kit의 제작을 우수하게 수행하였음

개발내용	구분	연구 개발 기간												진도 (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
개발 선택배지 내 경쟁 집락 특성 분석		■	■	■										100
		→	→	→										
개발 배지 경쟁 집락 억제 후보물질 선정			■	■	■									100
			→	→	→									
첨가농도 및 최소 억제농도 확립 및 개선배지 제작				■	■	■	■	■						100
				→	→	→	→	→						
기존배지의 성능평가: 식품시료									■	■	■	■	■	100
									→	→	→	→	→	
배지 구성 확정 및 포장재조사		■	■	■	■	■								100
		→	→	→	→	→								
개선배지를 포함한 소포장 kit 제작						■	■	■	■	■	■	■	■	100
						→	→	→	→	→	→	→	→	
소포장 kit의 유효기간 및 품질유지기간 설정 테스트							■	■	■	■	■	■	■	100
							→	→	→	→	→	→	→	
총 진도율														100
* → 로 진도표기														

제 3절. 연구개발 성과

1. 학술 성과

1) 학술발표

◆ 2018.10월 전남 여수에서 개최된 식품 안전성 학회의 학술 포스터 발표

학술회의명	발표일	제목	개최장소
한국식품위생 안전성학회	2018-10-11	Supplementation of modified mannitol-yolk-polymyxin B agar with cefuroxime for quantitative detection of <i>Bacillus cereus</i> in food	여수 디오션리조트

Supplementation of modified mannitol-yolk-polymyxin B agar with cefuroxime for quantitative detection of *Bacillus cereus* in food

Kwang-Young Song^{1,2*}, Sungbin Jun³, Kun-Ho Seo^{1,2}

¹Konkuk University, Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul, Republic of Korea

²Sensorgen, Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul, Republic of Korea

³Jinjueng Unitech, Dukyang, Goyang, Ilan, Republic of Korea

ABSTRACT

The presence of unwanted competing flora has been the most common confounding factor in the enumeration of *Bacillus cereus* (B. cereus) using selective media such as mannitol-yolk-polymyxin B agar (MYPA). The objective of this study was to improve MYPA selectivity for B. cereus by supplementation with a second-generation cephalosporin, cefuroxime. The performance of cefuroxime-supplemented MYPA (cef-MYPA) was evaluated by comparison with original MYPA in 60 food products with established microbiological standards for B. cereus contamination. Cef-MYPA demonstrated superior recoverability and selectivity for B. cereus compared with original MYPA in most tested foods. B. cereus numbers on MYPA and cef-MYPA were 162.5 CFU/g and 621.2 CFU/g, respectively. Competing flora on cef-MYPA was detected in significantly less samples (70%) compared to original MYPA (92%). In addition, the detection and isolation of suspected colonies were significantly improved in cef-MYPA because of the reduction or elimination of competing flora in all tested foods except fruit juice, indicating superior selectivity of the modified medium. Our findings suggest that cefuroxime supplementation of MYPA would markedly improve the detection rate of B. cereus, particularly in foods with high levels of indigenous flora.

INTRODUCTION

Mannitol-yolk-polymyxin B agar (MYPA) is one of the most commonly used plating media for the enumeration of *B. cereus* in foods according to microbiological standards. However, previous studies have reported that the selectivity of this medium is insufficient, especially in foods with high background microflora. MYPA contains polymyxin B as an antimicrobial agent to inhibit background microflora; however, this antibiotic mainly suppresses gram-negative bacteria. It has been reported that *B. cereus* strains produce beta-lactamase and are, therefore, naturally resistant to beta-lactam antibiotics. In our previous studies, we have isolated various wild-type *B. cereus* strains from food samples and human stool, and found that all of them were highly resistant to various beta-lactam antibiotics such as ampicillin, penicillin, and cephalexin. Compared to other beta-lactam antibiotic cephalosporins have broader antibacterial spectrum; thus, supplementation with cephalosporins could be a promising approach to increase MYPA selectivity for *B. cereus*, particularly in foods with high concentration of indigenous flora. In this study, we applied a second-generation cephalosporin, cefuroxime, as an additional antibiotic to supplement MYPA. The selected antibiotic was used to modify MYPA which was then evaluated the bacteria recoverability and selectivity using various food products naturally contaminated with *B. cereus*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

We used 24 *B. cereus* strains (Korean Collection for Type Culture (KCTC) 1012, 1014, 1061, 1092, and 2402, F011072, four clinical isolates, and 18 food isolates). All strains were stored in glycerol at -80°C and were revived by inoculation on sheep blood agar (Oxoid/Labtech, Midway, Korea), France) or mannitol agar (Difco, Daejeon, Korea, USA) and incubated at 37°C for 24 h.

The minimum inhibitory concentration (MIC) of *B. cereus* against cefuroxime

The resistance of *B. cereus* strains on cefuroxime-supplemented MYPA was determined by the MIC test as follows. MYPA was prepared with 1% egg yolk emulsion and 100,000 CFU polymyxin B (all ingredients from Oxoid, Haverhill, UK) according to the manufacturer's recommendations, and then supplemented with cefuroxime (Sigma, St. Louis, MO, USA). The antibiotic was dissolved in sterilized distilled water to the concentration of 1,280 µg/mL, and then two-fold serially diluted in PBS (pH 7.4) (Sigma) up to 80 µg/mL. 1 mL of each dilution was mixed with 1% of MYPA to obtain concentrations from 0 to 80 µg/mL. To evaluate the MIC of tested antibiotic in MYPA, approximately 1 × 10⁶ cells of *B. cereus* were suspended in lialison-lysine (LALR) broth (Oxoid) and spread on MYPA-containing cefuroxime (0-80 µg/mL). The plates were then incubated at 37°C for 24 h.

MATERIALS AND METHODS

Recoverability of pure culture cells on cefuroxime-supplemented MYPA

To determine the optimal cefuroxime concentration which does not affect the growth of tested *B. cereus* strains, the recovery rate of pure cultures on MYPA supplemented with different concentrations of cefuroxime (cef-MYPA) was determined as previously described (Ahmed, Lado-Munoz, & Odehoun, 2012). A single colony from five *B. cereus* strains (KCTC 1012 and 1092, F011072 (manic strain), KML2_1 (food isolate from Kimbap), and KML2_10 (food isolate from noodle)) was inoculated into LALR broth and grown at 37°C for 1-2 h. Then, 1 mL of each culture adjusted to 0.5 McFarland turbidity was 10-fold serially diluted in PBS and 0.1 mL of each dilution in duplicate was inoculated onto blood agar, MYPA, and MYPA supplemented with 0-20 mg/L cefuroxime (cef-MYPA). The plates were incubated at 30 °C for 24 h and colonies were counted; plates containing 15 to 150 colonies were selected. The recovery rate was calculated as follows: recovery rate (%) = (plate count on each medium / mean count on blood agar) × 100% (Ahmed, Lado-Munoz, & Odehoun, 2012).

Enumeration of *B. cereus* in food using two selective media

A total of 60 food samples, including two types of Korean traditional snacks (soy bean paste and red pepper powder), one type of ready-to-eat food (Sarangae and Samik), powdered mixtures of raw and roasted, respectively, grains and vegetables, fruit juice and vegetable salad (10 specimens per food type) were used. All food samples were purchased from local retail markets in Seoul, Korea. *Bacillus cereus* was enumerated according to the method described in the Korean Food Code (Korea Food and Drug Administration, 2016). Briefly, each sample (25 g) was mixed with 225 mL of Bacteroides phosphate buffer (Difco) and homogenized for 2 min in a stomacher. Then, 2 mL of the homogenate was serially diluted in PBS and each dilution was spread on five MYPA and five cef-MYPA plates (0.2 mL per plate). Following by incubation at 37°C for 24 h, food-stained pink, lactoferrin-positive colonies were considered as positive. Plates containing 15-150 suspicious colonies were selected and five typical colonies from each sample were finally confirmed by colony PCR and a strain of biotechnical team (Korea Food and Drug Administration, KFDA, 2016).

Data analysis

The SPSS software version 19.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. The recoverability of cells from pure cultures and food samples on MYPA and cef-MYPA was compared by the t-test. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Table 1. Recoverability of five *Bacillus cereus* pure cultures on MYPA containing various concentrations of cefuroxime.

Strain No.	Recovery rate (%) on cefuroxime-containing MYPA				
	0 mg/L	4 mg/L	8 mg/L	16 mg/L	20 mg/L
KCTC 1012	84.08	82.81	82.75	85.07	80.29
KCTC 1092	81.69	80.77	78.00	80.77	78.00
KML2_1	76.18	78.90	78.29	84.22	89.91
KML2_10	73.91	76.09	78.28	89.12	82.06
Mean ± SE	80.1±2.1	77.2±2.6	80.0±2.6	82.7±2.0	84.1±1.7

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by High Value-added Food Technology Development Program, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.

Table 2. Table 2. The mean number of *Bacillus cereus* cells recovered from 60 food products

Sample	MYPA		cef-MYPA	
	Mean ± SE	Range	Mean ± SE	Range
Red pepper	82.0 ± 15.7	0-200	182.0 ± 51.1	20-250
Soybean paste	208.0 ± 221.8	200-2090	999.0 ± 250.9	200-2100
Sarangae	281.0 ± 230.7	0-2300	880.0 ± 250.7	10-4370
Samik	266.0 ± 177.6	0-1090	645.0 ± 200.4	0-1750
Fruit juice	2.0 ± 1.2	0-12	7.0 ± 3.9	0-20
Vegetable salad	44.0 ± 22.9	0-260	90.0 ± 22.9	0-260
Mean ± SE	245.5 ± 81.7*	0-2300	665.9 ± 110.4*	0-2370

Table 3. Levels of *Bacillus cereus* in 60 food samples determined on two selective media

Sample	Number of samples (%)									
	ND	10-100	100-1000	1000-10000	>10000	ND	10-100	100-1000	1000-10000	>10000
Red pepper	1 (2)	6 (10)	2 (3)	0 (0)	0 (0)	4 (7)	6 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Soybean paste	0 (0)	0 (0)	7 (12)	3 (5)	0 (0)	0 (0)	7 (12)	2 (3)	0 (0)	0 (0)
Sarangae	1 (2)	4 (7)	4 (7)	1 (2)	0 (0)	4 (7)	3 (5)	2 (3)	0 (0)	0 (0)
Samik	1 (2)	3 (5)	2 (3)	2 (3)	2 (3)	1 (2)	3 (5)	4 (7)	0 (0)	0 (0)
Fruit juice	8 (13)	2 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (10)	6 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Vegetable salad	4 (7)	5 (8)	1 (2)	0 (0)	4 (7)	4 (7)	2 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	16 (27)	20 (33)	17 (28)	7 (12)	11 (20)	17 (28)	21 (35)	10 (17)	0 (0)	0 (0)

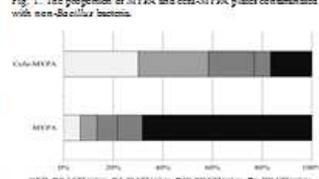


Fig. 1. The proportion of MYPA and cef-MYPA plates contaminated with non-*Bacillus cereus*.



2) 논문(SCI)

- ◆ 본 과제를 통하여 개발된 *B. cereus*의 검출을 위한 개선배지 개발기술을 미국 SCI(E)급 학술지인 “Journal of Food Science(JFS)”에 “Supplementation of Modified Mannitol -Yolk - Polymyxin B agar with Cefuroxime for Quantitative Detection of *B. cereus* in food” 명으로 게재함

게재연도	논문명	저자명	등록번호
2019-01-11	Supplementation of Modified Mannitol-Yolk-Polymyxin B Agar with Cefuroxime for Quantitative Detection of <i>Bacillus cereus</i> in Food	천정환, 김영지, 김동현, 송광영, 김현숙, 서건호	0022-1147
Vol.(No.)	학술지명	SCI 구분	국내외 구분
84(1)	Journal of food science : an official publication of the Institute of Food Technologists	SCI	국외

Supplementation of Modified Mannitol-Yolk-Polymyxin B Agar with Cefuroxime for Quantitative Detection of *Bacillus cereus* in Food

Jung-Whan Chon¹, Young-Ji Kim,^{*} Dong-Hyeon Kim, Kwang-Young Song, Hyunsook Kim, and Kun-Ho Seo

Abstract: The presence of unwanted competing flora has been the most common confounding factor in the enumeration of *Bacillus cereus* (*B. cereus*) using selective media such as mannitol-yolk-polymyxin B agar (MYPA). The objective of this study was to improve MYPA selectivity for *B. cereus* by supplementation with a second-generation cephalosporin, cefuroxime. The performance of cefuroxime-supplemented MYPA (cefu-MYPA) was evaluated by comparison with original MYPA in 60 food products with established microbiological standards for *B. cereus* contamination. Cefu-MYPA demonstrated superior recoverability and selectivity for *B. cereus* compared with original MYPA in most tested foods. *B. cereus* numbers on MYPA and cefu-MYPA were 363.5 and 462.0 CFU/g, respectively. Competing flora on cefu-MYPA was detected in significantly less samples (70%) compared to original MYPA (93%). In addition, the detection and isolation of suspected colonies were significantly improved in cefu-MYPA because of the reduction or elimination of competing flora in all tested foods except fruit juice, indicating superior selectivity of the modified medium. Our findings suggest that cefuroxime supplementation of MYPA would markedly improve the detection rate of *B. cereus*, particularly in foods with high levels of indigenous flora.

Keywords: *B. cereus*, cefuroxime, competing flora, food, MYPA

Introduction

Bacillus cereus in high concentration can produce sufficient amount of emetic and diarrheal toxins to cause food poisoning (Phelps, & McKillip, 2002; van Netten, & Kramer, 1992). Therefore, most food authorities have established acceptable microbiological standards for this pathogen in various food types such as ready-to-eat and fermented foods, fruit juices, spices, and baby weaning foods (Chon et al., 2012; Lee, Woo, Park, Lee, & Oh, 2004). A standard quantitative method of *B. cereus* detection in food samples recommended by food safety authorities is direct plating on selective agars (van Netten, & Kramer, 1992).

Mannitol-yolk-polymyxin B agar (MYPA) is one of the most commonly used plating media for the enumeration of *B. cereus* in foods according to microbiological standards (Fricker, Reissbrodt, & Ehling-Schulz, 2008; Peng et al., 2001; Schulten et al., 2000; Shinagawa, 1990). However, previous studies have reported that the selectivity of this medium is insufficient, especially in foods with high background microflora (Chon et al., 2012; Fricker et al., 2008; Kim et al., 2013; Kim, Chon, Kim, Hwang, and Seo, 2014; Tallent, Kotewicz, Strain, & Bennett, 2012). MYPA contains polymyxin B as an antibacterial supplement to inhibit

background microflora; however, this antibiotic mainly suppresses gram-negative bacteria (Chon et al., 2012; Corry, Post, Colin, and Laisney, 1995; Fricker et al., 2008).

It has been reported that *B. cereus* strains produce beta-lactamase and are, therefore, naturally resistant to beta-lactam antibiotics (Andrews, & Wise, 2002; Godic-Torkar, and Seme, 2009; Park et al., 2009). In our previous studies, we have isolated various wild-type *B. cereus* strains from food samples and human stool, and found that all of them were highly resistant to various beta-lactam antibiotics such as ampicillin, penicillin, and cephalosporins (Chon, Kim, Lee, Hyeon, & Seo, 2012). Compared to other beta-lactam antibiotics, cephalosporins have broader antibacterial spectrum; thus, supplementation with cephalosporins could be a promising approach to increase MYPA selectivity for *B. cereus*, particularly in foods with high concentration of indigenous flora. In this study, we applied a second-generation cephalosporin, cefuroxime, as an additional antibiotic to supplement MYPA. The selected antibiotic was used to modify MYPA which was then evaluated for bacteria recoverability and selectivity using various food products naturally contaminated with *B. cereus*.

JFDS-2018-1172 Submitted 9/18/2018, Accepted 10/19/2018. Authors Chon, YJ Kim, DH Kim, Song and Seo are with the Konkuk Univ., Hwang-dong, Gwangjin-gu, Seoul, The Republic of Korea. Author H Kim is with Dept. of Food & Nutrition, College of Human Ecology, Hanyang Univ., 222 Wangsimni-ro, Seongdong-gu, Seoul, Republic of Korea. Direct inquiries to author Seo (E-mail: hwanu3@konkuk.ac.kr).

^{*}Current address: Division of Antimicrobial Resistance, Centers for Infectious Disease Research, Korea National Institute of Health, Cheongju, Republic of Korea.

© 2018 Institute of Food Technologists®
doi: 10.1111/1750-3841.14393
Further reproduction without permission is prohibited.

Materials and Methods

Bacterial strains

We used 28 *B. cereus* strains [Korean Collection for Type Cultures (KCTC) 1013, 1014, 1661, 1092, and 3624, F4810/72, four clinical isolates, and 18 food isolates]. All strains were stored in glycerol at -80 °C and were revived by inoculation on sheep blood agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) or nutrient agar (Difco, Sparks, MD, USA) and incubation at 35 °C for 24 hr.

Journal of Food Science
A Publication of the Institute of Food Technologists

Vol. 84, Iss. 1, 2019 • Journal of Food Science 133

2. 정책 활용 · 홍보 성과

1) 홍보전시

- ◆ 한국식품위생안전성학회, 한국식품영양과학회, 한국유산균프로바이오틱스 학회에서 상품화한 제품에 대하여 홍보 전시함

행사명칭	개최일	주관기관	장소
한국식품위생안전성학회 정기학술대회 사람중심의 미래식품산업과 안전	2018-10-11~ 2018-10-12	사단법인 한국식품위생안전성학회	여수 디오션리조트
한국식품영양과학회 정기학술대회	2018-10-31~ 2018-11-02	사단법인 한국식품영양과학회	부산 BEXCO
2018년 한국유산균프로바이오틱스학회 추계 국제 학술대회	2018-11-30	한국유산균프로바이오틱스학회	세종대학교 컨벤션센터

3. 지식재산권 성과

1) 특허출원

- ◆ 개발된 기술을 기반으로 2건의 특허를 출원함

출원연도	특허명	출원인	출원국	등록기탁번호
2018-09-03	항생제를 포함하는 개선된 바실러스 세레우스 검출을 위한 선택배지 및 그 검출방법	(주)센서젠	대한 민국	10-2018-010 4564
2018-09-03	개선된 바실러스 세레우스 검출을 위한 선택배 지 및 그 검출방법	(주)센서젠	대한 민국	10-2018-010 4563

출원번호 : 5-5-2018-064037810

출원사실증명원
CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name (주)센서젠 Sensorgen Inc.	주민번호 Residence No	110411-4*****
	주소	전화번호 Telephone No	02-430-4111
발명자 Inventor	성명 Name 송영평 Seong Young Pyung	주민번호 Residence No	700028-1*****
	주소	전화번호 Telephone No	
대리인 Agent	성명 Name 대리인번호	대리인번호 Residence No	010-9000-00000-0
	주소	대리인번호 Telephone No	
출원번호 Application Number	특허-2018-0104564 PATENT-2018-0104564	출원일자 Filing Date	2018년 09월 03일 SEP 03, 2018
발명(고안)의 명칭, 디자인을 표현할 일련, 상표(서비스표)의 구분	항생제를 포함하는 개선된 바실러스 세레우스 검출을 위한 선택배지 및 그 검출방법 An improved selective medium for detecting B. cereus comprising antibiotics and a detection method using the same		
Title of Invention, Product(s) Embodied in Design, or Classification of Mark			
용도 Class	재출원 Priority	IPC 분류 IPC Class	C12Q 1/04
최종처분상태 Final Status		최종처리일자 Final Date	

위 사실을 증명함.
This is to certify that the above applicant has filed as stated in this certificate at the Korea Intellectual Property Office

2018년 12월 21일

특허청
COMMISSIONER

출원번호 : 5-5-2018-064037810

출원사실증명원
CERTIFICATE OF APPLICATION

출원인 Applicant	성명 Name (주)센서젠 Sensorgen Inc.	주민번호 Residence No	110411-4*****
	주소	전화번호 Telephone No	02-430-4111
발명자 Inventor	성명 Name 송영평 Seong Young Pyung	주민번호 Residence No	700028-1*****
	주소	전화번호 Telephone No	
대리인 Agent	성명 Name 대리인번호	대리인번호 Residence No	010-9000-00000-0
	주소	대리인번호 Telephone No	
출원번호 Application Number	특허-2018-0104563 PATENT-2018-0104563	출원일자 Filing Date	2018년 09월 03일 SEP 03, 2018
발명(고안)의 명칭, 디자인을 표현할 일련, 상표(서비스표)의 구분	개선된 바실러스 세레우스 검출을 위한 선택배지 및 그 검출방법 An improved selective medium for detecting B. cereus and a detection method using the same		
Title of Invention, Product(s) Embodied in Design, or Classification of Mark			
용도 Class	재출원 Priority	IPC 분류 IPC Class	C12Q 1/04
최종처분상태 Final Status		최종처리일자 Final Date	

위 사실을 증명함.
This is to certify that the above applicant has filed as stated in this certificate at the Korea Intellectual Property Office

2018년 12월 21일

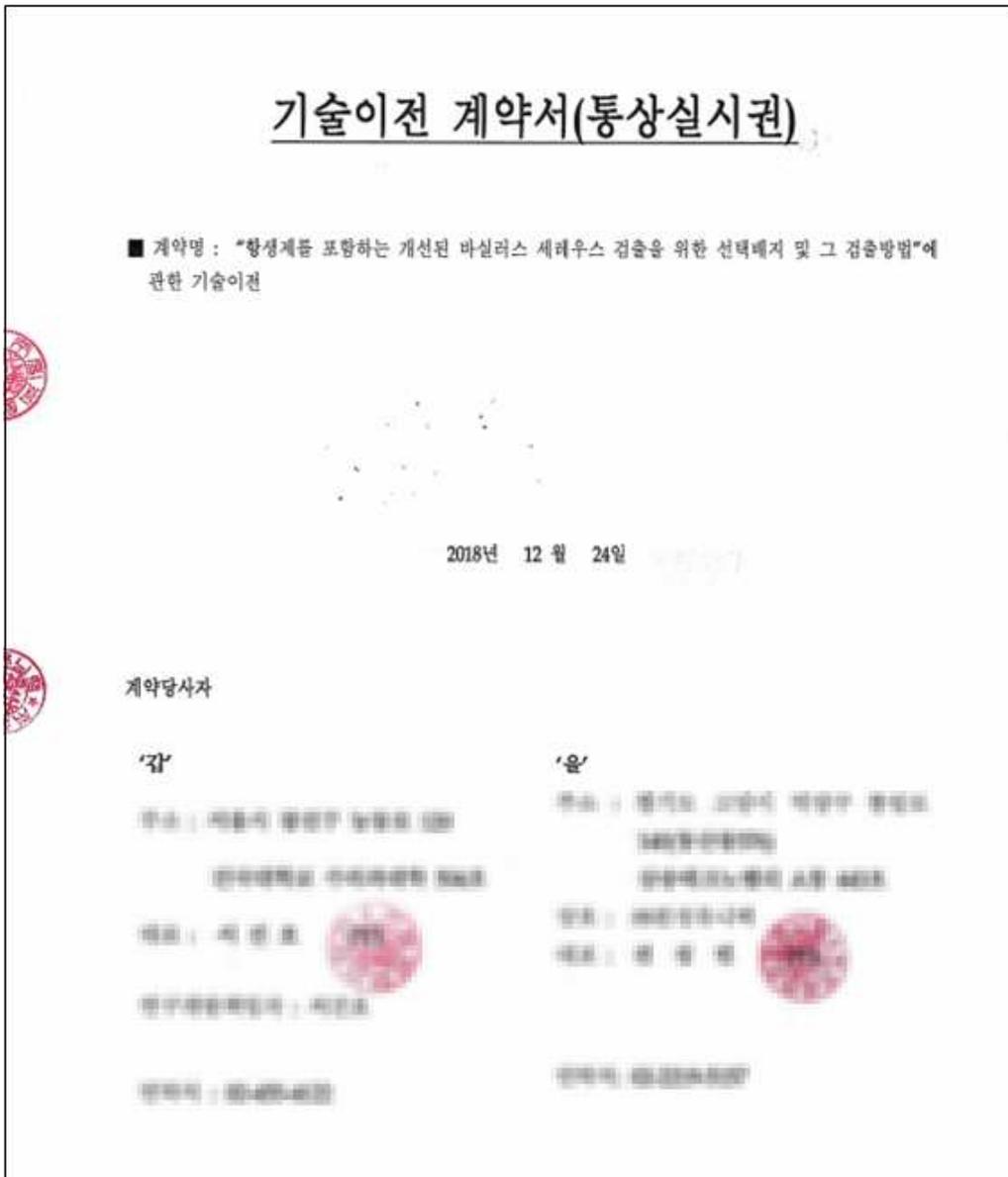
특허청
COMMISSIONER

4. 기술실시(이전) 성과

1) 기술이전

- ◆ (주)센서젠에서 개발한 기술을 기술료 1,400,000원에 (주)진성유니텍에 이전하여 기술실시를 진행함

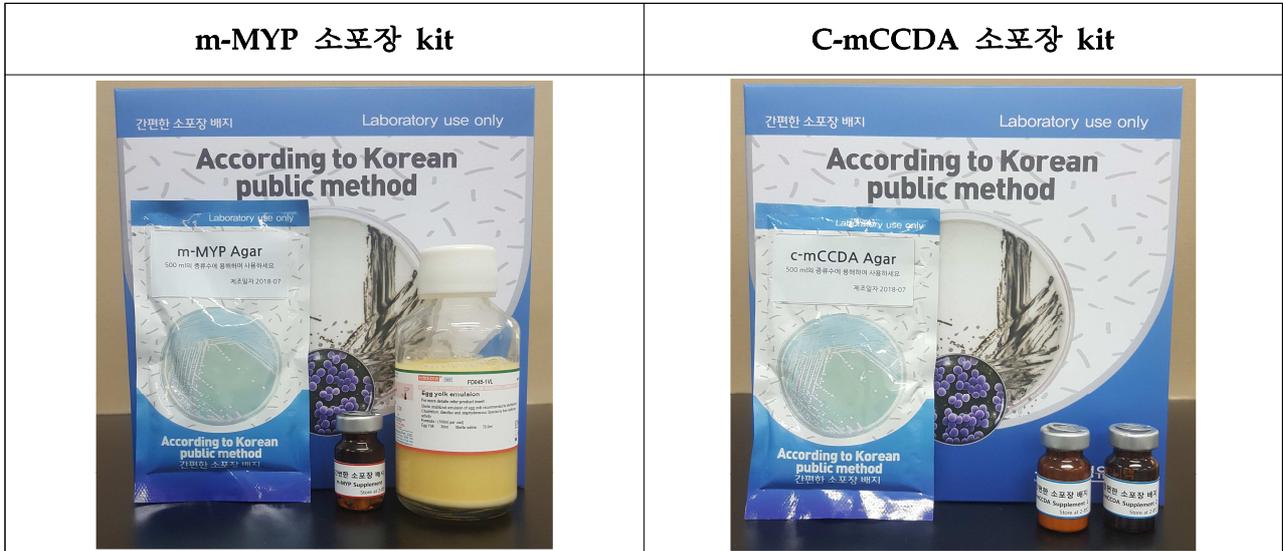
기술이전명	기술실시권 유형	기술 실시 대상기관명
“항생제를 포함하는 개선된 바실러스 세레우스 검출을 위한 선택배지 및 그 검출방법”에 관한 기술이전	통상 실시권	(주)진성유니텍



5. 사업화 성과

1) 제품화 및 매출성과

- ◆ m-MYP, C-mCCDA 소포장 Kit 2건에 대하여 제품화를 진행함



- ◆ 2019년 1월까지 제품화 한 간편한 소포장 배지(*Bacillus*) m-MYP와 간편한 소포장 배지(*Campylobacter*) C-mCCDA 2건과 추가로 그 외 기타 소포장 배지까지 총 23.5 백만원에 대하여 매출 성과를 달성함

품명	총 판매 수량	총 판매액(원)	11월 판매액(원)	12월 판매액(원)	1월 판매액(원)
간편한 소포장 배지 (<i>Campylobacter</i>)	310	18,298,214	1,559,844	8,027,580	8,710,790
간편한 소포장 배지 (<i>Bacillus</i>)	283	4,081,512	171,556	1,370,501	2,539,455
간편한 소포장 배지(기타)	53	1,282,380	-	153,560	1,128,820
총	646	23,662,106	1,731,400	9,551,641	12,379,065

- ◆ 또한 2019년 매 월 일천만 원 이상의 매출 실적을 내고 있으므로 1년 동안 기존에 목표하였던 1억 이상의 매출 목표를 채울 수 있을 것이라고 사료됨

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.22 억원	
			향후 3년간 매출	2 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0.01 억원	
			향후 3년간 매출	2 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 1 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 10 % 국외 : 0 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0.01 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 5 % 국외 : 0 %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			5 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			4 위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		0.75년		
	소요예산(백만원)		1.4백만원		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			0.23	4	6
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	1%	10%	15%
		국외	-	-	-
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		다양한 액체배지, 선택배지 중심의 간편한 소포장 배지 Kit 개발 예정 및 판매 진행 중			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)		0.23	4	6
	수 출		-	-	-

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

과제명	캠필로박터 및 바실러스 균을용 고성능, 고 편의성의 소포장 kit 개발							
주관연구기관	㈜진성유니텍		참여기관	㈜진성세제				
책임자	전성빈		연구기간	2017년 12월 ~ 2018년 12월(총 1년)				
정부출연금	160,000,000	기업부담금	55,000,000	총계	215,000,000			
기술이전명	항생제를 포함하는 개선된 바실러스 세레우스 균을용 위한 소포장 및 그 제조방법		기술실시대장기관	㈜진성유니텍				
기술료	1,400,000		기술실시일	2018.12.24				
구분	기술실시 단계 결산액 (간접 배분액) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성		핵심기술을 통한 사업화 실적					
실적	자산 총계	719	재원인수	2				
	자본 총계	665		기술개발사업비용 총계액				
	부채 총계	58	(주유출액 + 해외출액)					
	대입액 총계	2065				11.29		
제품별 실적								
구분	제품명	제품사진	제품출시일	매출액 (백만원)	핵심기술의 매출액 기여율 (%)	원산지	품질 인증 여부	
1	간편한 소포장 배지(Bacillus)		2018.09	국내	1,542	0.08	미국	Y
				해외				
2	간편한 소포장 배지(Campylobacter)		2018.09	국내	9,587	0.47	미국	Y
				해외				
3	간편한 소포장 배지(기타)		2018.12	국내			미국	Y
				해외				

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

과제명	캠필로박터 및 바실러스 균을용 고성능, 고 편의성의 소포장 kit 개발							
주관연구기관	㈜진성유니텍		참여기관	㈜진성세제				
책임자	전성빈		연구기간	2017년 12월 ~ 2018년 12월(총 1년)				
정부출연금	160,000,000	기업부담금	55,000,000	총계	215,000,000			
기술이전명	항생제를 포함하는 개선된 바실러스 세레우스 균을용 위한 선택배지 및 그 제조방법		기술실시대장기관	㈜진성유니텍				
기술료	1,400,000		기술실시일	2018.12.24				
구분	기술실시 단계 결산액 (간접 배분액) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성		핵심기술을 통한 사업화 실적					
실적	자산 총계	719	재원인수	3				
	자본 총계	665		기술개발사업비용 총계액				
	부채 총계	58	(주유출액 + 해외출액)					
	대입액 총계	2065				12.97 (2019년 1월)		
제품별 실적								
구분	제품명	제품사진	제품출시일	매출액 (백만원)	핵심기술의 매출액 기여율 (%)	원산지	품질 인증 여부	
1	간편한 소포장 배지(Bacillus)		2018.09	국내	2,539	0.12	미국	Y
				해외				
2	간편한 소포장 배지(Campylobacter)		2018.09	국내	8,710	0.42	미국	Y
				해외				
3	간편한 소포장 배지(기타)		2018.12	국내	1,128	0.05	미국	Y
				해외				

2) 고용창출

- ◆ (주)진성유니텍에서 소포장 kit의 제조생산을 위하여 계약직 근로자 1명 창출 완료함
본격적인 상품화 개시 후 소포장 kit의 제조생산 및 포장작업을 주요 업무로 진행하고 있음

출력일시 : 2018.12.21. 09:42

4대 사회보험 사업장 가입자 열부

발급번호	20181221744517	발급일자	2018-12-21 09:42	사업장 관리번호	20201030166	
구분	국민연금	건강보험	산재보험	고용보험		
사업장 번호	202-81-02616	202-81-02616	202-81-02616	202-81-02616		
사업장 명칭	주식회사진성유니텍	주식회사진성유니텍	주식회사진성유니텍	주식회사진성유니텍		
■ 가입 내역(발급일자 현재기준)						
연번	주요(직종명)	성별	국민연금	건강보험	산재보험	고용보험
11	제조업-기계조립	남	2018.05.08	2018.05.08	2018.05.08	2018.05.08

* 이 사업장 소속 직원 중 유급휴가 중인 근로자 제외, 국민연금 가입은 국민연금법 제 11조 제 1항에 따라 2018.05.08일 부터 4대 사회보험(국민연금, 건강보험, 산재보험, 고용보험)을 병행하여 적용하고 있음

제 3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1. 목표

1) 연구과제 목표

구분	내용
최종목표	◆ 본 연구의 최종목표는 효과적인 캄필로박터 제주니/콜리 및 바실러스 세레우스의 검출을 위한 고성능 선택배지를 개발하고 최적의 포장재의 선택 및 포장방법을 개발하여 저비용으로 실험자의 사용의 편의성을 높이고 정확한 결과를 도출할 수 있게 하는 kit를 개발하는 것에 있음
세부목표	▶ 식품에서의 목적균 (캄필로박터/바실러스) 이외의 경쟁세균 특성분석 및 균주 확보
	▶ 경쟁세균을 억제할 수 있는 억제물질 후보균 선정
	▶ 억제물질의 적정 첨가농도 및 균주별 최소억제농도 data 확보
	▶ 억제물질이 첨가된 개선배지 제작
	▶ 개선배지를 포함한 소포장 kit 제작
	▶ 소포장 kit 의 품질유지기간 설정 및 최종 시제품 제작

2) 성과목표

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	연구기반지표																			
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육지도	인력 양성	정책 활용홍보		기타 (타 연구활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	정책 활용			홍보전시		
												SCI	비SCI						논문평균 IF	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	10		10		30	20		10				5					5		
최종목표	2			1	10	1	100		1				1					1		
1차년도	2			1	10	1	100		1				1					1		
소계	2			1	10	1	100		1				1					1		

* 단계별 연구성과 목표는 향후 중간/최종/추적평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

** 연구성과는 연구개발계획에 맞춰 도출하고 예시와 같이 작성

*** 가중치 총합 100을 기준으로 성과목표지표별 중요도, 난이도에 따라 배분하되 가중치 총합이 100이 되도록 배분(사업화지표에 60 이상 배분)

2. 목표 달성여부

1) 연구과제 목표 달성도

구분	내용	목표달성 여부 및 세부목표 달성도
최종목표	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 본 연구의 최종목표는 효과적인 캄필로박터 제주니/콜리 및 바실러스 세레우스의 검출을 위한 고성능 선택배지를 개발하고 최적의 포장재의 선택 및 포장방법을 개발하여 저비용으로 실험자의 사용의 편의성을 높이고 정확한 결과를 도출할 수 있게 하는 kit를 개발하는 것에 있음 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 본 과제를 통해 <i>Campylobacter</i> 및 <i>Bacillus cereus</i> 검출 고성능 개선 배지를 개발함 ◆ 해당 개발 배지는 기존 배지에 비해 우수한 균 검출률과 선택성을 보임 ◆ 또한 최적의 포장재를 사용하여 소포장된 키트를 개발하였으며, 이를 통해 사용자의 편의성을 높이고 정확한 결과를 도출할 수 있도록 함
세부목표	▶ 식품에서의 목적균 (캄필로박터/바실러스) 이외의 경쟁세균 특성분석 및 균주 확보	100%
	▶ 경쟁세균을 억제할 수 있는 억제물질 후보균 선정	100%
	▶ 억제물질의 적정 첨가농도 및 균주별 최소억제농도 data 확보	100%
	▶ 억제물질이 첨가된 개선배지 제작	100%
	▶ 개선배지를 포함한 소포장 kit 제작	100%
	▶ 소포장 kit 의 품질유지기간 설정 및 최종 시제품 제작	100%

2) 성과 목표 달성도

성과지표명	세부항목	최종목표	달성성과	세부항목
지식재산권	특허출원	2건	2건	달성
학술성과	국내외 학술발표	1건	1건	달성
학술성과	논문 SCI	-	1건	추가 달성
기술실시(이전)	기술이전	2건	2건	추가 달성
사업화	제품화	1건	2건	초과 달성
사업화	고용창출	1명	1건	달성
정책활용홍보	홍보전시	1건	3건	초과 달성

3) 기술발전 기여도

- ◆ 본 연구 과제를 통하여 신규 개발된 선택배지 제품은 표적 균주에 대한 선택성, 양성 검출률, 회복력, 과 오염 개선 등 다양한 지표에서 기존 배지에 비해 우수한 검출능력 및 선택성이 확인됨

(1) *Bacillus* 검출용 선택배지의 개선

개선사항	기존 배지 (식품공전 공인배지)	개발배지	개선율
정량검출률	363.5 CFU/g	462.0 CFU/g	27%
부적합 시료 검출률	12%	17%	5%
과 오염 시료	68%	17%	51%
선택성	7%	30%	23%

(2) *Campylobacter* 검출용 선택배지의 개선

개선사항	기존 배지 (식품공전 공인배지 및 타사 개발배지 3종)	개발배지	개선율
집락구분	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 흰색 또는 회색으로 경쟁 집락의 명확한 구분이 어려움 ◆ 빨간 집락의 경우 투명한 배지의 특성으로 인하여 명확한 집락 구분이 어려움 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 백색 바탕에 빨간색 집락 형성으로 <i>Campylobacter</i> 균주에 대한 명확한 집락의 구분이 가능함 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 측정불가
민감도 (캠필로박터 검출률)	14-23%	39%	16-25%
선택성 (비캠필로박터 배제율)	3-21%	100%	79-97%

3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책

- ◆ 성과 목표 중 제품화-매출액 부분이 다소 미흡한 부분이 있음
- ◆ 본 과제의 수행내용 중 시제품의 성능 및 유효기간 평가 부분은 장기적 관점에서 수행되어야 하므로 상품화 진행에 있어 기간이 소요로 인한 제품화 및 판매의 지연이 원인으로 사료됨
- ◆ 현재 약 6개월간의 유효기간 Test가 완료된 상태로 품질 유지기한을 6개월로 판매하고 있으며 추후에도 지속적인 유효기간 평가를 통하여 제품의 품질 유지기한을 증가시킬 예정임
- ◆ 본 과제 수행 중 진행된 다양한 홍보 효과로 인하여 2018년 11월부터 매출이 시작되었으며 12월 이후 매월 약 일천만 원 가량의 매출성과를 얻고 있어 기존 정량적 성과 목표인 1년간 100백만 원의 목표를 충분히 달성할 수 있을 것이라고 사료됨

제 4장. 연구결과의 활용 계획

- ◆ **제품 판매 및 매출 증대 계획:** 현행법상 사용되고 있는 *Campylobacter* 및 *B. cereus* 검출용 배지는 선택성 저하로 목적균의 검출에 다소 한계가 있음이 문제점으로 보고되고 있으나 본 과제를 통하여 신규 개발된 선택배지 kit 제품은 표적 균주들을 대상으로 선택성 증가를 통한 우수한 검출률로 시장에서 높은 매출을 기대할 수 있을 것으로 사료되며 특히 미생물 학회, 식품안전성 학회 등 국내에서 개최되는 국제 학술대회에 참가하여 본 제품의 우수성을 널리 홍보하고 시제품 샘플 등을 배포하여 많은 검사기관 수요를 창출할 계획임
- ◆ **제품 개선 및 후속 제품 개발 계획:** 개발 기술을 바탕으로 소비자의 의견 및 반응에 따른 다양한 용량의 제품을 출시할 예정이며, 제품의 미흡한 부분을 지속적으로 개선하여 타 제품과 비교되는 고 선택성과 고 민감도의 제품으로 보완할 계획임
- ◆ **지식재산권 활용계획:** 출원된 지식재산권을 추후 특허로 등록하여 본 제품에 대한 독점적 판매지위를 확립할 예정임
- ◆ **학술적 활용 계획:** SCI(E)급 학술지의 논문 투고 및 게재를 통하여 개발된 제품에 대한 우수한 성능을 알리고 이를 판매 및 마케팅에 적극 활용할 예정임

붙임. 참고문헌

- ◆ Chon JW et al. Comparison of three selective media and validation of the VIDAS *Campylobacter* assay for the detection of *C. jejuni* in ground beef and fresh-cut vegetables. *Journal of Food Protection* (2011) 74:456- 460.
- ◆ Chon JW et al. “Improvement of mannitol-yolk-polymyxin B agar by supplementing with trimethoprim for quantitative detection of *Bacillus cereus* in foods.” *Journal of food protection* 75.7 (2012): 1342-1345.
- ◆ Chon JW et al. “Improvement of modified charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar by addition of potassium clavulanate for detecting *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse.” *International journal of food microbiology* 165.1 (2013): 7-10.
- ◆ Denis, M. et al. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *C. jejuni* and *C. coli*. *Letters in Applied Microbiology* (1999) 29:406-410.
- ◆ Kim, YJ et al. “Improvement of Karmali Agar by Supplementation with Tazobactam for Detecting *Campylobacter* in Raw Poultry.” *Journal of food protection* 79.11 (2016): 1982-1985.
- ◆ Korea Food and Drug Administration. 2018. Food code. Accessed Jul. 2018.
<https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/safefoodlife/food/foodRvlv/foodRvlv.do>
- ◆ United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service (US FSIS). Laboratory Guidebook., 2013a. Isolation and Identification of *C. jejuni/coli/lari* from Poultry Rinse, Sponge and Raw Product Samples. Available at
<http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/0273bc3d-2363-45b3-befb-1190c25f3c8b/MLG-41.pdf?MOD=AJPERES>

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 캄필로박터 및 바실러스 검출용 고성능, 고 편의성의 소포장 kit 개발				
	(영문) Development of high-performance user-friendly detection kit for detection of <i>Campylobacter</i> and <i>Bacillus cereus</i>				
주관연구기관	(주)진성유니텍		주 관 연 구 자	(소속) (주)진성유니텍	
참 여 기 업	(주)센서젠		책 임 자	(성명) 전 성 빈	
총연구개발비	계	215,000	총 연구 기간	2017.12.21.~ 2018.12.20 (1년)	
(215,000 천원)	정부출연 연구개발비	160,000	총 참 여 연구 원 수	총 인 원	7
	기업부담금	55,000		내부인원	7
	연구기관부담금			외부인원	0

○ 연구개발 목표 및 성과

[연구개발목표]

- *Campylobacter* 또는 *Bacillus cereus* 신속정확 검출용 저비용-고편의성 kit 개발
- 검체식품에서 목적균 (*Campylobacter* 또는 *Bacillus cereus*) 이외의 경쟁세균 제어 기술 개발
- 경쟁세균 억제물질 발굴 및 선택배지 개선/개발
- 기존배지와 개발배지의 성능 비교검증
- 개선배지가 포함된 *Campylobacter* 또는 *Bacillus cereus* 검출용 소포장 kit 제작

[연구개발성과]

- 현행법상 사용되고 있는 *Campylobacter* 및 *Bacillus cereus* 선택배지 대비 비용 및 검출도가 향상된 배지 개발
- 소포장을 통한 유통 및 사용자-편의성을 개선한 진단 kit 시제품 제작

○ 연구내용 및 결과

[연구내용]

- 기존배지에 나타나는 목적균 이외의 경쟁세균을 동정하고 그 특성을 분석하여 제어 물질 탐색 및 선정을 위한 기초자료 확보
- 발굴된 후보물질들을 농도별로 첨가한 선택배지들을 대상으로 경쟁세균과 목적균에 대한 최소 억제농도(MIC, Minimal inhibitory concentration) 산출
- 고성능 선택배지 개발 및 기존배지와 개선배지의 성능 비교
- 실제 식품에서의 배지 성능 실험
- 사용 및 유통이 편리한 소포장 Kit 상품화 방법 연구
- 상품화를 위한 최적의 포장재 및 포장방법 디자인
- QC 전략 확보 및 유통기한 설정 소포장 Kit의 저장기간별 품질 검증

[연구결과]

- 개발된 제품의 선택성, 양성 검출률, 회복력, 과오염 개선 등 다양한 지표에서 *Campylobacter* 및 *Bacillus cereus* 의 우수한 검출 능력 확인
- 개발한 소포장 Kit로 인하여 작업자의 계량시간을 단축하고 파우더 흡입 등의 불편함 개선

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- *Campylobacter* 및 *Bacillus cereus* 검출 kit 상용화로 매출 증대
- 다양한 학회에서 본 제품의 우수성을 널리 홍보하고 샘플을 배포하여 많은 검사기관 수요 창출
- 개발 제품에 대한 SCI(E)급 학술논문을 작성 및 출간하여 우수한 성능을 홍보
- 개발 기술을 바탕으로 다양한 종류와 용량으로 구성된 제품 출시
- 제품의 미비한 부분을 개선하여 선택성과 민감도를 위한 지속적 보완 예정
- 출원된 지식재산권을 추후 특허로 등록하여 본 제품에 대한 독점적 판매지위를 확립
- 신규 개발된 소포장 선택배지 kit 제품의 검증결과를 토대로 식품 공전법 신규 등재 기대
- 병원성 식중독 균 신속검출 KIT 제품에 대한 수출 활로 개척 예정

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	117105-01		
사업구분	고부가가치기술개발사업				
연구분야	식품품질관리[식품(농식품, 축산물) 위생, 안전]			과제구분	단위
사업명	고부가가치기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	캠필로박터 및 바실러스 검출용 고성능, 고풀의성의 소포장 kit 개발		과제유형	(기초, 응용, 개발)	
연구기관	(주)진성유니텍		연구책임자	전 성 빈	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2017.12.21.-2018.12.20	160,000	55,000	215,000
	2차년도	-	-	-	-
	3차년도	-	-	-	-
	4차년도	-	-	-	-
	5차년도	-	-	-	-
	계	2017.12.21.-2018.12.20	160,000	55,000	215,000
참여기업	(주)센서젠				
상대국			상대국연구기관		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2019. 02. 01

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)진성유니텍	연구소장(대표)	전 성 빈

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
-----------	---

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구개발 목표:

효과적인 *Campylobacter* 및 *B. cereus* 의 검출을 위한 고성능 선택배지 개발, 편의성을 높이고 정확한 결과를 도출할 수 있게 하는 kit 개발

연구개발 결과:

고성능의 *Campylobacter* 및 *B. cereus* 선택배지 개발 완료 및 간편한 소포장 배지 kit 개발 완료

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 사업을 통하여 신규 개발된 개선된 성능의 *Campylobacter* 및 *B. cereus* 검출용 선택배지는 기존 *Campylobacter* 및 *B. cereus* 검출용 선택배지 대비 해당 목적균에 대한 검출률을 우수하여 시장 경쟁력이 있을 것으로 판단됨

이 외에도 다양한 증균배지 및 선택배지의 간편한 소포장 배지 Kit의 제조를 위하여 배지파우더 계량 시 분진으로 인한 작업자의 불쾌감, 이물감과 인체에 유해할 수 있는 부분을 방지하고 사용의 편리성이 증대될 것으로 기대됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

Campylobacter 및 *B. cereus* 검출 kit의 검증결과를 토대로 식품 공전법 신규 등재 가능성이 기대됨

Campylobacter 및 *B. cereus* 검출 Kit 상용화를 통한 매출 증대에 기대됨

저비용, 고품의성의 소포장 배지 Kit 개발을 통하여 평소 사용량이 많지 않은 실험실에서 배지의 유효기간 경과로 사용하지 못하고 폐기되는 배지량을 줄일 수 있으므로 매우 경제적인 효과가 있을 것으로 기대됨

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제에 연구기간 내 연구개발 수행 내용에 대한 정성적 연구개발 실적을 100% 이상 초과 달성하였으며, 이를 통하여 정량적 실적 또한 100%에 근접한 목표를 달성하여 본 연구 과제 수행기관의 연구개발 수행노력에 대한 성실도는 “아주우수” 등급으로 판단됨

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구개발성과 목표: 학술발표 1건, 특허출원 2건, 홍보전시 1건
 연구개발성과 실적: 학술발표 1건, 특허출원 2건, 홍보전시 3건, 논문 게재 1건[SCI(E)]
 목표보다 초과된 실적 달성으로 공개 발표된 연구개발성과는 아주우수 등급으로 판단됨

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
식품에서의 목적균 (캠필로박터/바실러스) 이외의 경쟁세균 특성분석 및 균주 확보	10	100	경쟁집락을 형성하여 목적균의 생장을 방해하는 주요 경쟁세균을 분리 동정하고 특성을 파악함
경쟁세균을 억제할 수 있는 억제물질 후보균 list 확보	10	100	경쟁세균을 억제할 수 있는 물질을 선정하고 선택배지에 첨가될 수 있는 적정농도를 선정함
억제물질의 적정 첨가농도 및 균주별 최소억제농도 data 확보	20	100	선택배지에 첨가될 수 있는 적정농도를 선정하여 농도별 억제력을 확인하고 최소억제농도를 산출함
억제물질이 첨가된 개선배지 제작	20	100	억제물질이 첨가된 개선배지를 제작하였고 기존 선택배지에 비하여 검출률이 우수하고 높은 선택성을 확인함
개선배지를 포함한 소포장 kit 제작	20	100	품질을 유지할 수 있는 포장재와 포장용기를 이용하여 개선배지를 포함한 다양한 소포장 kit를 제작함
소포장 kit 의 품질유지기간 설정 및 최종 시제품 제작	20	100	소포장 Kit의 우수한 성능이 유지될 수 있는 품질유지기간을 설정하였고 최종 시제품 제작을 완료하였음
합계	100점	100	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

연구개발 결과의 정량적, 정성적 목표에 대하여 매출 부분을 제외하고는 모두 100% 이상의 목표를 달성하여 종합적인 과제 수행부분에서 약 90% 이상의 목표달성으로 전체적인 연구개발결과가 아주 우수하다고 판단됨

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

참여기관의 연구비 카드 발급지연으로 연구비 사용에 미진한 부분이 있었음
 또한 시제품의 성능 및 유효기간 평가는 장기적 관점에서 수행되어야 하므로 제품화를 진행하기까지 기간이 오래 소요되었으며 연구 기간 내 매출 실적을 달성하기 위하여 1년 이상의 유효기간 평가를 진행하지 못한 상태로 제품화를 실시함
 이로 인하여 추후 유효기간 테스트의 지속적인 진행이 요구되어 정량 목표 중 매출 달성이 다소 미흡한 부분은 평가 시 참작을 요청드립니다
 본 연구과제 수행기간 중 진행된 지속적인 제품 홍보로 인하여 2018년 12월 이후 매월 1천만원 정도의 매출 성과를 창출하고 있으며 본격적인 제품화를 실시한 시기를 기점으로 약 1년간의 기간 내에 기존 정량 목표를 달성할 수 있을 것이라고 판단됨

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구팀은 고부가가치기술개발사업을 통하여 신규 개발된 개선된 성능의 *Campylobacter* 및 *B. cereus* 검출용 선택배지는 기존 *Campylobacter* 및 *B. cereus* 검출용 선택배지 대비 해당 목적균들의 검출률을 증가시켜 시장 경쟁력이 있다고 판단되며 현재 병원성 식중독균의 검출을 위한 시장규모가 해마다 증가하고 있는 실정이므로 본 사업을 통해 개발한 개선된 선택배지 사업화를 통하여 시장점유율과 경쟁력을 높일 예정임

뿐만 아니라 본 연구팀은 식품공전 상의 기존 *Campylobacter* 및 *B. cereus* 검출 선택배지에서 개선된 성능의 *Campylobacter* 및 *B. cereus* 검출 선택배지를 식품 공전법에 신규 등재하고자 함

본 사업을 통해 개발된 간편한 소포장 Kit는 추후 안정성 평가를 지속적으로 진행하여 우수한 품질을 장기간 유지할 수 있는지에 대한 연구가 요구되며 신규 개발한 소포장 선택배지 Kit에 대한 사용고객들의 다양한 의견을 수렴하여 고객 맞춤형 배지 용량 조절 및 액상 형식의 항생제 등 더욱 간편한 Kit로 개선할 예정임

이러한 연구과제의 진행은 상품화를 통하여 보다 안정되고 우수한 품질의 제품을 고객에게 제공하고자 장기적 관점에서 수행되어야 하므로 지속적으로 자체 진행하고 있으며 후속 국책 과제 또는 국내 기업과의 공동연구를 통하여 진행할 계획임

이 외에도 다양한 증균배지 및 선택배지의 간편한 소포장 배지 Kit 제조생산을 위하여 배지 파우더 계량 시 분진으로 인한 작업자의 불쾌감, 이물감과 인체에 유해할 수 있는 성분 등으로 부터의 위험성을 사전에 방지하고 사용 편의성 증대로 본 제품을 사용하는 고객들의 만족도를 높이하고자 함

향후 모든 식중독균(*Campylobacter*, *B. cereus* 포함)의 선택배양 시 사용되는 항생제의 효율을 제고하고 새로운 항생제를 발굴하여 본 과제와 같은 과정을 거쳐서 모든 식중독 (또는 인수공통전염병)의 새로운 Supplement를 개발한다면 국내 뿐 아니라 세계시장에 수출 할 수 있을 것이라고 사료됨

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

-

2. 연구기관 자체의 검토결과

-

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	식품품질관리[식품(농식품, 축산물) 위생, 안전]	
연구과제명	캠필로박터 및 바실러스 검출용 고성능, 고 편의성의 소포장 kit 개발				
주관연구기관	(주)진성유니텍		주관연구책임자	전 성 빈	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비	
	160,000,000	21,500,000	33,500,000	215,000,000	
연구개발기간	2017.12.21.-2018.12.20 (12개월)				
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(제품 개발 및 상품화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)				

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 식품에서의 목적균 (캠필로박터/바실러스) 이외의 경쟁세균 특성분석 및 균주 확보	기존배지에 나타나는 목적균 이외의 경쟁세균을 동정하고 그 특성을 분석하여 제어 물질 탐색 및 선정을 위한 기초자료 확보
② 경쟁세균을 억제할 수 있는 억제물질 후보균 선정	ESBL 생성 대장균을 억제하는 억제물질과 목적균을 저해하지 않으면서도 기타 양성균을 억제시키는 억제물질을 선정
③ 억제물질의 적정 첨가농도 및 균주별 최소억제농도 data 확보	발굴된 후보물질들을 농도별로 첨가한 선택배지들을 대상으로 경쟁세균과 목적균에 대한 최소억제농도(MIC, Minimum inhibitory concentration)를 산출
④ 억제물질이 첨가된 개선배지 제작	cefuroxime이라는 항생물질을 첨가한 개선 MYPA 제작 TiO ₂ , 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, Bile salt, tazobactam 등의 발색물질, 항생제를 첨가한 C-mCCDA 제작
⑤ 개선배지를 포함한 소포장 kit 제작	개선배지를 간편하게 제조할 수 있는 소포장 배지 kit 제품의 상품화를 위한 최적의 포장재 및 포장방법 디자인 완료
⑥ 소포장 kit 의 품질유지기간 설정 및 최종 시제품 제작	유효기간 test를 통하여 상품의 품질유지기한을 6개월로 설정하였으며 지속적인 테스트를 진행하여 고 품질 제품을 유지하기 위한 기한을 추가 재설정할 예정임
⑦ 본 연구의 최종목표는 효과적인 캠필로박터 제주니/콜리 및 바실러스 세레우스의 검출을 위한 고성능 선택배지를 개발하고 최적의 포장재의 선택 및 포장방법을 개발하여 저비용으로 실험자의 사용의 편의성을 높이고 정확한 결과를 도출할 수 있게 하는 kit를 개발하는 것에 있음	<p>본 과제를 통하여 <i>Campylobacter</i> 및 <i>B. cereus</i> 검출을 위한 고성능 개선된 선택배지를 개발하였음</p> <p>해당 개발 배지 kit는 기존 배지에 비해 우수한 균 검출률과 선택성을 보임</p> <p>또한 최적의 포장재를 사용하여 소포장된 소포장 배지 kit를 개발하였으며, 이를 통하여 사용자의 편의성을 높이고 정확한 결과를 도출할 수 있도록 함</p>

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품 종 등 록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I						
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	10	10		10		30	20		10				5				5		
최종목표	2			1	10	1	10 0		1				1				1		
연구기간내 달성실적	2			2	16	2	23. 5		1		1		1				3		
달성율(%)	10 0			20 0	16 0	20 0	23 5		10 0		10 0		10 0				30 0		

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	바실러스 세레우스 검출용 고성능 선택배지 개발
②	캠필로박터 제주니/콜리 검출용 크로모제닉배지 개발
③	간편한 소포장 Kit 제조 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술	✓	✓			✓	✓	✓	✓		
②의 기술	✓	✓			✓	✓	✓	✓		
③의 기술								✓		

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	목적균의 검출률을 높임으로써 검사기관 수요 창출
②의 기술	목적균의 선택성과 민감도를 높임으로써 시장에서의 높은 이익 창출
③의 기술	분진으로 인한 작업자의 불쾌감, 이물감과 인체에 유해할 수 있는 성분 등으로 부터의 위험성을 사전에 방지하고 사용 편의성 증대로 본 제품을 사용하는 고객들의 만족도를 높임

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치	10	10		10		30	20		10				5					5	
최종목표	2			1	10	1	100		1				1					1	
연구기간내 달성실적	2			2	16	2	23.5		1			1		1				3	
연구종료후 성과창출 계획		1					100		1									3	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	항생제를 포함하는 개선된 바실러스 세레우스 검출을 위한 선택배지 및 그 검출방법		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	1,400 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	7일	실용화예상시기 ³⁾	2018년 9월
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	항생제 formula 제공 및 manual 지도		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

<뒷면지>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.