

120103-  
1

저가형 고감도 식중독균 현장탐지용 자동화 플랫폼 기술 개발

2021

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( ), 비공개( O )발간등록번호( O )  
농축산물안전유통소비기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003713-01

# 저가형 고감도 식중독균 현장탐지용 자동화 플랫폼 기술 개발

2021. 11. 17.

주관연구기관 / 을지대학교 산학협력단  
협동연구기관 / 비아이티밸류

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “저가형 고감도 식중독균 현장탐지용 자동화 플랫폼 기술 개발”(개발기간 : 2020. 05. 29~2021. 07. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 11. 17.

주관연구기관명 : 을지대학교 산학협력단 (대표자) 김 호 철 (인)  
협동연구기관명 : 비아이티밸류 (대표자) 조 원 창 (인)  
참여기관명 : (대표자) (인)

주관연구책임자 : 조 일 훈

협동연구책임자 : 조 원 창

참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서							보안등급				
							일반 [ ]	보안 [ ]			
중앙행정기관명				사업명	사업명						
전문기관명 (해당 시 작성)				사업명	내역사업명 (해당 시 작성)						
공고번호				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)							
				연구개발과제번호							
기술분류	국가과학기술표준분류	LB16	60%	LA11	20%	LA07	20%				
	농림식품과학기술분류	PA0303	60%	PA0105	20%	CA0101	20%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문									
		영문									
연구개발과제명		국문	저가형 고감도 식중독균 현장탐지용 자동화 플랫폼 기술 개발								
		영문	Development of automated platform technology for low-cost and high-sensitive on-site detection of foodborne bacteria								
주관연구개발기관		기관명	울지대학교 산학협력단		사업자등록번호		305-82-13347				
		주소	(13135)경기도 성남시 수정구 산성대로 533		법인등록번호		165271-0005497				
연구책임자		성명	조일훈		직위		부교수				
		연락처	직장전화			휴대전화					
		전자우편			국가연구자번호						
연구개발기간		전체	2020. 05. 29 - 2021. 07. 31 (1년 2개월)								
		단계 (해당 시 작성)	1단계								
			n단계								
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비	그 외 기관 등의 지원금				합계		연구개발 비의 지원금	
		현금	현금	현물	지방자치단체	기타( )		현금	현물		합계
총계		180,000	60,100					180,000	60,100	240,100	
1단계	1년차										
	n년차										
n단계	1년차										
	n년차										
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고				
공동연구개발기관		비아이티별류	조원창	대표이사			역할: 공동 기관유형: 중소기업				
위탁연구개발기관											
연구개발기관 외 기관											
연구개발담당자 실무담당자		성명	최민지		직위		대학원생				
		연락처	직장전화			휴대전화					
			전자우편			국가연구자번호					

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2021년 11월 17일

연구책임자: 조일훈

주관연구개발기관의 장: 김호철 (직인)

공동연구개발기관의 장: 조원창 (직인)

위탁연구개발기관의 장: (직인)



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)					
내역사업명 (해당 시 작성)		연구개발과제번호					
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB16	60%	LA11	20%	LA07	20%
	농림식품 과학기술분류	PA0303	60%	PA0105	20%	CA0101	20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		저가형 고감도 식중독균 현장탐지용 자동화 플랫폼 기술 개발					
전체 연구개발기간		2020. 5. 29 - 2021. 7. 31					
총 연구개발비		총 240,100 천원 (정부지원연구개발비: 180,000 천원, 기관부담연구개발비 : 60,100 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계		기초[ ] 응용[ ] 개발[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(2단계) 종료시점 목표(5단계)	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	식중독균(살모넬라, 리스테리아, 병원성대장균)을 고감도로 현장에서 검출할 수 있는 자동화 플랫폼 기술 개발					
	전체 내용	<p>1. 시료 농축 및 분리, 검출 통합형 카트리지 개발</p> <p>1) 시료 전처리 및 간이 배양 조건 확립 (1) 과정과 시간을 최소화한 시료 전처리 (2) 소형 배양기를 적용한 3종 균의 간이 배양 조건 최적화</p> <p>2) 항체-자성비드 중합체 제조 기술 개발 (1) <i>S.typhimurium</i>, <i>L.monocytogenes</i>, <i>E.coli</i> O157:H7 3종에 대한 항체 선별 (2) 항체-자성비드 중합체 제조 조건 최적화 및 자성비드 선정</p> <p>3) 시료 농축 및 분리 기술 (1) 자동화 장비와 연동 조건 최적화, 카트리지 제조 조건 및 보관 조건 최적화</p> <p>4) 위해요소별 검출 기술 (1) 3종 균에 대한 각 검출용 시스템 최적화 (최적 항체 선정, 농도, 시간 등) (2) 신호증폭 기술 (SA-poly HRP 제조 최적화) 및 분석 시간 단축 기술 최적화</p> <p>5) 시스템 적용 및 성능평가 6) 실제 시료를 이용한 현장 평가</p> <p>2. 저가형 간이 현장검사 자동화 시스템 개발</p> <p>1) 샘플의 자성체 기반 농축 모듈 개발 (1) 초소형 모터 제어기술, 마이크로 주사기 펌프를 이용한 리퀴드 핸들링 기술 개발 (2) 농축 모듈 최적화</p> <p>2) 농축 샘플의 자성체 기반 검사 모듈 개발 (1) 정밀 액체 핸들링 기술 (흡입, 분주), 초소형 피펫 장착 탈착 기술 개발</p> <p>3) 정밀 염가형 HW 개발 (1) Embedded board 개발 : 광학보드, 메인보드 IO보드, 모</p>					

		터제어보드 등 (2) 고감도 신호처리 기술 (OP amp, ADC potentiometer, 노이즈 처리) 4) 자동화 시스템의 운영 SW 기술, 캘리브레이션 SW
1단계 (해당 시 작성)	목표	
	내용	
n단계 (해당 시 작성)	목표	
	내용	

연구개발성과	1. 정성적 성과			
	성과목표	성과지표	목표치	실적
	검출감도	<i>S. typhimurium</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i> O157:H7	20 cfu/g 이하	- <i>S. typhimurium</i> & <i>E. coli</i> O157:H7 : 2 cfu/mL(g) 이하 - <i>L. monocytogenes</i> : 55 cfu/mL(g)
	시간	시료 전처리 시간	총 4~5시간 이내 검출	시료 전처리 3시간
		검출 시간		검출 1~2시간
장치	시료전처리 포함 현장형 간이-신속 검출시스템	시작품	시작품 제작 완성	
		저가형 (150만원 수준)	100만원 이하 시스템 완성	
카트리지	농축, 분리, 검출 일체형	시작품	각 군별 시작품 제작	
2. 정량적 성과				
성과목표	성과지표	목표치	실적	
사업화 지표	특허 출원	1건	1건	
	기술이전	1건	1건	
	기술료 (백만원)	5	5	
연구기반지표	학술발표	1건	1건	
	인력양성	1명	0명	

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	1. 활용계획		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>본 과제를 통해 개발된 식중독균 자동화 분석 시스템의 객관적인 검증을 위해 식중독균 검사 표준 장비와의 비교/검증 테스트 및 보완 작업을 계획</li> <li>공인인증기관에서의 성능 평가를 통해 제품 허가를 위한 객관적 자료 확보 예정</li> <li>대형 식품회사와의 협조를 통해 개발된 분석 시스템의 실증화 및 마케팅 착수</li> <li>상용화를 위한 식약처 가이드라인에 의거한 허가 프로세스 진행</li> <li>식자재 유통/가공/판매 업체 및 식품 제조업체, 수출입 검역소 등의 수요처를 대상으로 한 양산화 및 상용화 계획</li> <li>분석 검출 대상의 확장을 통한 적용 범위 확대 : 기타 식중독 관련 박테리아 및 바이러스, 독소 등</li> </ul>		
	2. 기대 효과		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>자동화 및 all-in-one 카트리지를 이용한 분석을 근본적으로 가능하게 함으로써, 식품 관련 일선에서 비전문가도 간단한 교육을 통해 효과적인 식중독균 검사 가능</li> <li>저가의 소형 자동화 분석 시스템 보급을 통한 현장 적용성 증대를 기반으로 식중독균 상시 감시체계 구축 가능 (식품 제조, 식품 가공, 급식 및 외식업체 등)</li> </ul>		

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 안전한 먹거리에 대한 사회 구성원의 신뢰감을 확보함으로써 식품 관련 소비 시장의 활성화</li> <li>• 자성체 기반 농축 및 검사 기술 확보로 식품 현장 외 다양한 분야에 활용 가능: 보건의료, 수의분야, 고위험 병원체 신속탐지</li> <li>• 리퀴드핸들링용 피펫 기술 개발로 바이오 자동화 핵심기술 확보</li> </ul>												
연구개발성과의 비공개여부 및 사유													
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종		
								생명 정보	생물 자원		정보	실물	
	N	Y(1)	Y(1)	N	Y(1)	N	N	N	N	N	N	N	
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호				
국문핵심어 (5개 이내)	식중독균		현장탐지		고감도		저가형		자동화				
영문핵심어 (5개 이내)	Foodborne bacteria		On-site detection		High-sensitive		Low cost		Automated				

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	7
가. 연구개발의 필요성 .....	7
나. 연구개발 목표 .....	13
다. 연구개발 범위 .....	15
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 .....	17
- 주관연구기관 : 을지대학교 .....	17
- 협동연구기관 : 비아이티밸류 .....	45
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 .....	65
1) 연구수행 결과 .....	65
2) 목표 달성 수준 .....	71
4. 목표 미달 시 원인분석 .....	72
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 .....	73
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 .....	74

### 별첨 자료

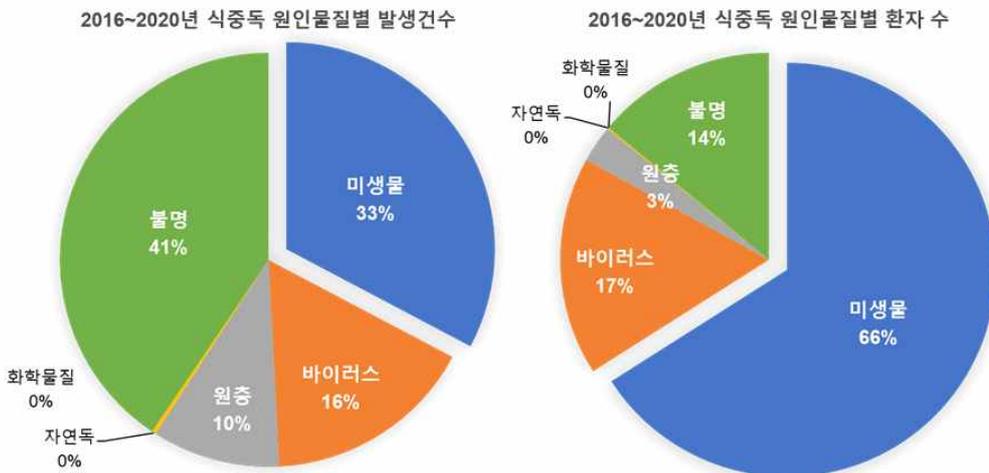
- [별첨1] 자체평가의견서
- [별첨2] 연구성과활용 계획서

※ 각 항목에서 요구하는 정보를 포함하여 연구개발과제의 특성에 따라 항목을 추가하거나 항목의 순서와 구성을 변경하는 등 서식을 수정하여 사용하거나 별도의 첨부자료 활용이 가능합니다.  
 다만, '1.3) 세부 정량적 연구개발성과' 항목은 2021.1.4.부터 2021.12.31.까지 수정 사용 가능합니다.

# 1. 연구개발과제의 개요

## 가. 연구개발의 필요성

- 식품안전정보원에 따르면, 최근 5년간 위해식품정보를 원인요소별로 비교하였을 때 미생물 관련 정보가 가장 많은 것으로 보고되고 있어 식품 안전을 확보하기 위해서는 식품 미생물의 관리가 필수적임.



식중독 원인물질별 발생건수 및 환자 수 [식품의약품안전처]

- 현재 제시되고 있는 식중독 예방 대책으로는 개인위생관리와 음식물 관리 등 기본적인 사항을 강조하는 것뿐이라 실제 여러 환경, 유통, 보관, 조리로 인해 발생할 가능성이 있는 식품 위해성을 사전에 감지하는 데는 큰 어려움을 겪고 있는 상황임.
- 최근 소비자들의 식품 안전에 대한 요구와 국제 유통규정을 준수하기 위해 생산단계에서부터 재배, 포장, 소비에 이르기까지 전 단계에 걸친 유해 미생물을 검출할 수 있는 현장 적용형이 높고, 신속탐지가 가능하며, 사용하기 편리한 검출 방법이 필요함.
- 이를 위해서는 기존 신속검출법의 한계 (단계가 많고 복잡한 시료의 전처리 과정, 사이즈가 큰 고가의 검출 장비 사용으로 인한 현장 적용성 불가, 결과 도출까지 오랜 분석시간 소요 등)를 극복할 수 있는 새로운 검출법이 개발될 필요가 있음.
- 식중독균의 경우 대개 발병한 후 환자의 가검물을 채취하거나 오염 식품으로 의심되는 물질을 식품 공전에 따른 배양, 또는 PCR 분석을 통하여 병원체 대상을 관독하게 되는데 이는 장시간의 분석 및 숙련도가 요구됨.
- 따라서 빠른 환자의 치료 및 오염원의 전파 방지를 위하여 고감도의 검출기기 개발이 매우 필요하고, 신속하고 정확한 대응 방안을 수립하기 위해 비전문가도 현장에서 직접 사용 가능한 소형화된 기기의 개발이 요구되는 실정임.



- 본 연구에서는 상기한 기존 방식의 복잡하고 긴 시간의 전처리, 배양 공정을 개선하고자 하며, 새로운 형태(liquid handling)의 분석방법을 도입하여 간편하면서도 현장에서 적용이 가능한 식중독균 검출 방안을 제시하고자 하였음.

### (1) 연구개발 대상의 기술 현황

- 식중독균의 신속 검출법으로는 직접형광항체법, ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay) 등이 흔히 사용되고 있으며, 또한 DNA hybridization과 PCR을 이용한 유전자 검출 방법이 활발히 응용되고 있음.
- 식중독 원인균 진단기술의 주요한 국내 외 연구동향을 살펴보면 PCR 기법 및 microarray 기법, 면역기법, 생화학적 방법, ATP법 등의 방법에 의해 식품의 식중독균의 탐지가 가능함.
- PCR 방법이나 microarray를 이용한 DNA probe 등은 식품 중 유해 미생물 유전자를 직접 검출하는 방법으로 보통 ELISA 방식보다 특이적이며 믿을만한 검색법으로 알려져 있지만, 식품 중 존재하는 여러 가지 inhibitor에 대한 문제를 해결해야 하며 이러한 유전자 검출 방법은 숙련된 기술과 고가의 장비가 필수적이므로 작업 현장에서 직접 적용하는데는 많은 어려움이 있음.
- 균의 분리 및 동정으로 식중독 균을 탐지하는 기존의 전통적인 방법은 증식배양, 선택배양 및 생화학적 검사에 3~5일의 분석시간이 소요되므로 조기에 세균을 검출하여 식중독을 차단하는 것은 매우 어려운 실정임.

기준	선택 배지법	PCR	면역 기법	Microarray
속도	-	++	+++	+
감도	+	++	+++	++
선택성	-	+++	+	+++
편리성	-	+	+++	+
비용	+++	++	+	++

+++ : 매우 우수, ++ : 우수, + : 보통, - : 미흡 (자료 : 하상도 식중독 검출 기술 동향 분석)

식중독균 검출 방법의 비교

- 위와 같은 사실에 기초하여 고가의 장비나 숙련된 고도의 기술을 요하지 않는 기술인 면역기법을 이용하여 간단한 형태의 칩이나 키트 하나로 식품의 식중독균을 현장에서 바로 측정할 수 있는 기술이 요구되고 있음.
- 식품의 안정성 평가를 위한 안전하고 간단한 동시진단법의 개발이 지속적으로 이루어져야 하나, 외국에 비해 아직도 국내에서의 식품 식중독균을 탐지하는 면역기법에 관한 연구는 실용화 측면에서 보면 매우 부족한 실정임.
- 식중독 관련 RDT(rapid diagnostic test) 기반의 상용화 기술은 대학 및 연구소에서 나노입자를 이용한 방식을 주로 연구하고 있는 실정이나 감도 측면에서는 여전히

기술적 진보가 10여년 전에 비해 크게 발전하지는 못하고 있으며, silver intensification 방식의 증폭법을 적용하고 있으나 이는 재현성 및 배경신호 조절에 문제가 있어 상용화 측면에서는 한계가 있음.

- qPCR을 이용한 식중독 검사는 정확한 검사방식으로 국내의 코젠바이오 등과 해외의 듀폰 등에서 상용시약을 판매중이나, 다양한 종류의 농축산물에 적용하기에 필요한 샘플링 및 전처리를 손쉽게 할 수 있는 실증연구가 부족하고, 유전자 증폭 검사방법 측면에서만 부각이 되어 있어 시장 적용을 확대하는데 장애요인이 되고 있는 상황임.
- 식중독균 검사 장비의 경우 미국 3M사의 MDS, 일본 Simadzu사의 GenField system, 일본 Eiken사의 LA-500 장비 등이 있는데, 모두 등은 증폭 장비 및 시약이 고가이며 현장용으로 적합하지 않고 공공 기관 및 연구용에 적용되고 있음.
- (주)아모라이프사이언스의 기술은 정지 액체상 랩온어칩을 기반으로 포획입자와 표지입자를 사용하여 식중독균을 신속하게 고감도로 검출할 수 있는 시스템이지만, 전처리 과정이 정확하지 않은 등의 문제로 상용화에 어려움을 겪고 있는 것으로 파악됨.
- (주)메텍스의 기술은 분자진단기술과 펩타이드 기술을 통해 식중독 노로바이러스를 검출할 수 있는 프로브를 개발함.  $10^2$  copy 이하의 수준까지 검출이 가능한 기술을 개발한 것으로 알려져 있지만 상용화가 되지 않았고 전처리 과정이 없어 현장에서의 신속한 측정은 불가함.

제조사	제품명	사진	특징	단점 및 한계
 (미국)	VITEK		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 식품, 환경 또는 인체로부터 분리된 미생물을 생화학적인 분석방법을 이용하여 균명을 확인하는 자동화된 미생물 동정장비</li> <li>• 매 15분 마다 화학반응의 변화를 Transmittance / Colorimetry Optics에 의해 측정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 고가의 장비</li> <li>• 균종에 따라 분석시간이 상이함 (약 2-8시간 소요)</li> </ul>
 (미국)	MDS (Molecular Detection system)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 등은증폭 검사방법(Lamp PCR)</li> <li>• 검출시간 (전처리 포함) 20~26시간</li> <li>• 식품공전 사용 가능 판정 받음</li> <li>• 식품 대장균, 살모넬라, 독소 등 검사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 고가의 장비</li> <li>• 가격:2,250만원</li> <li>• 고가의 시약</li> <li>• 78만원/kit</li> <li>• 전처리 별도 필요</li> </ul>
 (일본)	Eiken LA-500 (Lamp PCR)		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 전처리 기능 별도 필요함</li> <li>• 일반적 LAMP PCR 장치</li> <li>• 전처리 제외 2시간 검출</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 고가의장비</li> <li>• 출시제품</li> <li>• 전처리 별도 필요</li> </ul>
 (일본)	GeneFields systeme		<ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA Chromatography detection method</li> <li>• Multiplex detection</li> <li>• 3step 3시간 이내 완료 (식품, 유전자검사 등)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 고가의 시약</li> <li>• 48만원/kit</li> <li>• 범용장비사용은 가능</li> <li>• 전처리 별도 필요</li> </ul>
㈜아모라이프 사이언스 (한국)	랩온어칩기반 식중독 검사장비		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 랩온어칩사용 (포획입자, 표지입자 사용)</li> <li>• 장염비브리오, 대장균, 살모넬라등 검사용</li> <li>• 상용화 사례 없음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 연구과제</li> </ul>
Dupont (미국)	(RT-PCR) Qalicon		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 전처리 기능 별도, (배양 및 유전자 추출과정 필요)</li> <li>• 고가이며 실험실 base 사용장비</li> <li>• 검출시간 24시간 이상 소요</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 고가의 장비</li> <li>• 전처리 별도필요</li> </ul>
PBM	Biosign 신속검출 kit		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colloidal gold가 중합된 면역크로마토그래피 분석 시스템</li> <li>• Salmonella, Listeria, E.coli 검출 가능</li> <li>• 전배양 : 12-48시간 / 탐지 : 15분</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 전배양 별도 필요</li> <li>• 총 분석 시간 1-2일 정도 소요</li> </ul>
Sanigen (한국)	Genelix™ Real-Time PCR Detection kit.		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 식중독 주 원인균 검출 real-time PCR</li> <li>• Template DNA만 있으면 1시간 내 결과 확인 가능</li> <li>• 확인하고자 하는 식중독균만 특이적으로 검출</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 전처리 별도 필요</li> <li>• 검출하고자 하는 원인균에 따라 다르게 사용</li> </ul>

#### 식중독균 검사 상용화 장비 및 제품의 특징과 한계점

- 세계적으로 현존하는 식중독균 현장검사용 시스템은 극소수이며 주로 정성형 진단키트로 양성 또는 음성만을 판단할 수 있어 양성반응과 음성반응의 경계 농도에서 발색신호가 모호한 경우 결과 판정이 어렵기 때문에 병원체나 독소의 정도에 따른 영향력을 확인하기 위해선 정량분석이 필수적임.
- 특히, 현장검사에서의 정밀진단은 극히 미량의 균체나 독소도 검출 가능해야 하므로 기존 분석방법과는 다른 특이적인 항원-항체 반응을 이용한 면역분석을 도입하여야 하며 고감도 탐지 기술을 성취하기 위한 새로운 개념의 검사 시스템을 도입하는 것이 필수적이라 판단됨.

## (2) 사회적 필요성

- 최근 코로나19의 확산으로 인해 손쉽게 조리할 수 있는 ‘밀키트’를 찾는 소비자들이 증가하였는데, 이는 식중독에 취약한 육류나 생선 등을 포함한 경우가 많음.
- 이러한 밀키트를 제조, 유통, 배송하는 단계에서 식중독균에 노출될 가능성은 커지며, 배송 후 방치되는 시간이 길어질수록 그 위험성은 더욱 증가하게 됨.
- 지난 3월 미국 질병통제예방센터(CDC)는 ‘밀키트 식품 안정성 가이드라인’을 발표하였으며, 우리나라에서는 식품의약품안전처에서 ‘식품의 기준 및 규격 개정안’에 밀키트를 지칭하는 ‘간편조리세트’ 유형을 신설, 위생 관련 기준 마련에 나섰음.
- 따라서 식품의 유통 전 가공 및 생산 공정이 이루어지는 현장에서 식중독균 오염을 조기에 신속하게 진단하여 식중독의 발생을 방지하고, 식중독 발생에 따른 사회적 비용을 저감시킬 수 있는 조기 검출 방법에 대한 요구가 증가하고 있음.
- 농식품부에서는 GAP 및 친환경 농산물인증제도 등 안전관리체계를 내실화하고, 인증표시제의 관리강화로 농식품의 소비 신뢰를 제고하고자 노력하고 있고 식품의 경우 HACCP 인증을 통하여 기관 및 업체의 식품 관리기준을 강화하였음.
- 하지만 최근 농축산물 식품에 관련하여 HACCP 관리가 여러 차례 무색하게 하는 식중독 발생기사가 빈번하게 나타나므로 농축산물의 생산, 출하, 저장(유통) 단계에서부터 식중독 관리가 철저히 필요함.
- 특히 냉장이나 냉동 등 저장 단계 (장기간 포함)에서 식중독균 또는 유해바이러스의 발생도 빈번하게 발생하기 때문에, 이를 사전에 차단하여 식재료로의 공급을 막을 수 있는 보호막이 필요한 상황임.
- 식중독 안전관리 향상을 위해서는 전 단계 탐색 조사 과정을 통해서 각 단계의 미생물에 대한 연구 개발이 시급한 상황이나, 발생하는 식중독의 미생물 분석 위주의 관리에 초점이 맞춰져 있으므로 식중독 발생 예방을 위한 현장에서 측정할 수 있는 시스템 도입이 시급함.
- 특히 대표적인 위험 식중독균 (예 : 병원성 비브리오, 이질, 살모넬라, 리스테리아 등)의 경우 확산 방지를 위한 조기 및 신속 탐지가 필요하므로 현장에서 간편한 절차를 통하여 시료를 측정 및 판독할 수 있는 검사 시스템이 필요함.
- 최근 단체 급식 및 식당에서의 식중독 사고 사례가 지속적으로 보고되고 있는데, 대표적으로 올해 여름 김밥집 식중독 사고가 많이 발생하였으며 대부분 살모넬라 또는 병원성 대장균의 오염에 인한 사례들이었음.
- 경기 성남시 분당의 김밥 전문점 2개 지점에서 270여명의 식중독 환자가 발생하였고, 고양시의 한 김밥집 이용객 중에서는 식중독으로 인해 사망에까지 이르는 불상사가 발생함.
- 그 외 부산의 한 밀면집 손님 450명이 식중독 증세를 호소하였고, 이 중 104명이 입원치료를 받는 사건이 있었음.
- 이처럼 단기간에 다수의 환자가 발생하게 되는 현장에서는 신속한 원인 파악과 대처 및 관리의 중요성이 강조됨.

### 계란 만진 손 탓? 20대 숨진 김밥집 식중독 "교차오염 추정"

중앙일보 | 입력 2021.08.27 18:43 | 업데이트 2021.08.27 18:48

이은희 기자



지난 25일 경기 고양시의 한 김밥집을 이용한 고객이 식중독 증상을 보인다 사망하는 사건이 발생했다. 이 식당 고객과 직원 등 총 34명이 식중독 증상을 보인 것으로 확인됐다.

현재 고양시는 정확한 식중독 원인 파악을 위해 환자 기증물, 김밥집 현장에서 채취한 환경검체 등에 대한 검사와 식중독 원인을 위한 역학조사를 진행 중에 있으며 조사결과가 나오는 대로 필요한 조치를 위한 예정이다. 식약처는 "해당 김밥집을 이용하고 장염 증세 후 사망자가 발생한 사례와 관련해서는 현재 부검결과를 기다리고 있다"라고 전했다. 최근 10년간 식중독 관련 사망사고는 6건으로 식중독 원인 물질은 복어독(1), 소라독(1), 비브리오(2) 등이었다. 나머지 2건은 원인이 확인되지 않았다.

지난달 말부터 김밥집 식중독 사고가 잇따르고 있다. 이날 경기 파주시에서도 김밥집 고객 27명이 집단 식중독 증세를 보며 당국이 조사에 들어갔다. 앞서 지난달 말에는 경기 성남시 분당의 김밥전문점 2개 지점에서 살모넬라균에 의한 집단 식중독 사고가 발생해 270여명의 환자가 나왔다.

### [아주 돋보기] 한국은 지금 식중독 '위험' 단계

경제신문 기자 | 입력 : 2021-08-05 16:39

최근 5년간 식중독 발생 환자 중 72% 여름에 나와 한국 식중독 '위험' 단계... 이미 집단 식중독 발생하기도 식자재 관리에 신경쓰고, 증상 보이면 격리하고 병원 가자

여름이 절정에 달하면서 식중독 사례가 급증하고 있다. 보건 당국은 여름에 활성화되는 세균성 식중독 감염을 경고하고 음식 섭취 시 주의를 당부했다.

식중독 발생 환자, 여름에만 72%... 올해도 '위험'



올해 여름에도 전국 식중독 예측 지도는 '위험' 단계를 가리키고 있다. 식약처는 식중독 발생 정보와 기상환경 정보, 의료관계인 서비스(SIS) 빅데이터 등을 통해 지역별 식중독 발생 위험을 지도 형태로 표현한다. 해당 데이터는 식약처와 기상청, 국립환경과학원, 국민건강보험공단 등 4개 기관이 협업해 제공하고 있다.

식중독 예측 지도는 예측 정보 위험 지수에 따라 '관심', '주의', '경고', '위험' 등 4단계로 구분된다. 위험 단계는 식중독 발생 가능성이 매우 높은 상황으로 각별한 경계가 요구된다. 하지만 이미 이번 여름에도 전국 곳곳에서 식중독 집단 감염 사례가 생기고 있다.

지난달 부산에서는 한 밀면집을 방문했던 손님 450명이 식중독 증세를 호소했다. 이 중 104명은 입원 치료를 받았다. 일부 손님은 고열 증세를 보였지만 코로나19로 인해 병원 방문에 어려움을 겪었던 것으로 전해졌다.

뉴스투데인 김유나

### '집단 식중독' 10년 새 최다... "높은 습도가 원인"

한경 2021-09-01 06:43 | 수정 2021-09-01 06:46



뉴스 투데인

직원의 피부에 발진이 수없이 보였습니다.

이 공장에서 집단 식중독 의심 신고가 접수됐습니다.

공장 구내식당에서 식사를 한 직원 20여명이 복통과 두드러기 증상을 보인 겁니다.

[식중독 증상 직관]

"같이 등밀하게 밥을 먹고있고, 특히 고동에서 약간 냄새가 조금 이상하긴 했지만요. 식단에 뭐 조리 과정이나 그런 거 때문인 것 같은데..."

부산의 한 병원 구내식당에서도 점심식사를 한 직원 42명이 설사와 고열, 복통 등을 호소했습니다.

변천으로 나온 닭튀김과 샐러드, 오징어젓갈 등이 식중독을 일으킨 원인으로 추정됩니다.

올들어 전국에서 발생한 식중독 사고는 220건, 3천3백 명이 식중독 진단을 받았습니다.

7월 말 기준으로, 최근 10년 간 가장 많았습니다.

올여름 자칫할 영향을 많이 받는데다 가을철까지 감시면서 습도가 높아지면 원인으로 지목됩니다.

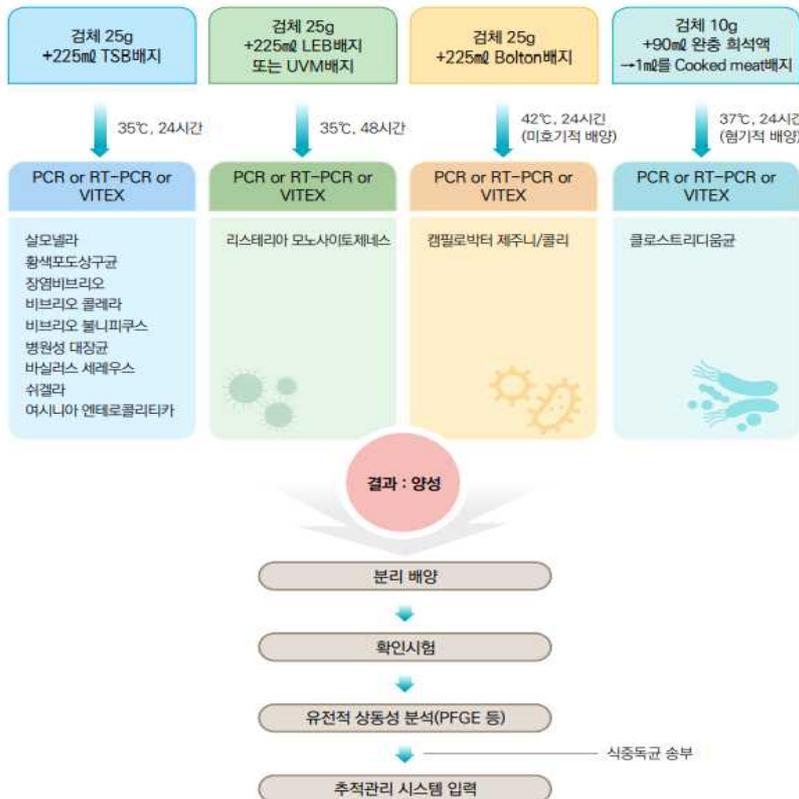
[신원리 역학조사관 인터뷰]

"올여름은 작년보다 특히 온도도 습도가 높고 폭염일수가 늘어나서 날씨의 영향도 있을 것으로 보고 있습니다."

역학조사에 나선 보건 당국은 환자 기증물을 채취해 원인 파악에 나섰습니다.

### 국내 식중독 발병 사례

- 하지만 현재 시행되고 있는 식중독 표준 업무 지침에 따르면, 식중독 발생 후 지자체에서 역학조사 및 검체 채취 후 분석결과가 보건환경연구원으로부터 나오기까지 걸리는 시간이 통상 2~3주정도 소요되며, 그 결과가 식약처 질병관리본부에 전달되어 역학조사 보고서 최종 평가 결과가 나오기까지의 시간이 더 소요되어 한 달 이후에나 식중독의 원인 파악 및 대책 수립 논의가 가능한 실정임.



### 식중독 표준 업무 지침 [식품의약품안전처]

- 이를 보완하기 위해서는 시료를 실험실로 보내지 않고 현장에서 직접 검사할 수 있는 현장 신속검사 (POCT : point of care testing) 시스템의 적용이 필요함.
- 전문 연구원이 아닌 현장 인력 (직원 또는 공무원)이 간단한 조작으로 검사할 수 있는 시스템으로, 2~3시간의 배양 시간을 포함하여 5시간 이내에 식품 공전의 배양법과 동일한 감도 (1~10 cfu/sample)로 식중독균의 존재 유·무를 판단 또는 정량할 수 있어야 함.
- 이를 위하여 본 연구팀은 기존의 면역방법이나 PCR 등 검사를 위한 복잡하고 전문성이 요구되는 한계점을 극복하기 위하여 새로운 방식의 전처리와 배양방법을 제시하고, 간편한 검사방법을 도입하여 총 검사시간이 5시간 내에 가능할 수 있도록 본 연구의 목표로 두고자 함.

### (3) 경제산업적 필요성

- 최근 식품산업 규모가 성장하며 식품사고에 따른 경제적 비용이 증가하고, 수입식품 증가 추세에 수반한 식중독 안전관리 문제가 대두되고 있음.
- 국내에서는 이러한 식품사고의 주요 원인 중 하나인 식중독 발생에 따른 사회적, 경제적 손실 비용이 한해 약 2조8천억으로 추정되며, 식중독 발생률이 10% 감소한다면 약 2천8백억 원의 예산이 절감될 수 있다는 보고가 있음.
- 이러한 손실의 규모는 식품 산업 전반에 타격을 줄 뿐만 아니라 사회 전체의 비효율로 작용하기 때문에 식중독 안전관리에 관한 연구는 더욱 심도 있게 전략적으로 진행되어야 함.
- 우리나라는 1인 가구의 증가 및 가정 내 조리빈도 감소와 더불어 편의점 등에서 더 이상의 조리과정 없이 즉석에서 섭취하는 가정 간편식 시장규모가 증가하면서 즉석 섭취 식품의 안정성 확보에 대한 이해 당사자들의 역할이 매우 중요하게 되었음.
- 이와 같이 식품 시장의 변화는 그에 따른 관리 방안의 마련을 필요로 하고, 동시에 관리 비용이 함께 증가하게 됨.
- 식품 안전 테스트 시장은 전 세계적으로 엄격한 식품 안전 규정 등을 법령으로 정비하고 관리 규정의 증가로 인해 높은 성장을 보이고 있음.
- 세부적으로 식중독 원인균 검출 시장은 식품안전검사 시장의 1/4 수준이며, 국내 시장은 해외 시장의 1/100로 예측되었음 (2018년 약 500억 원)

### (4) 연구개발을 통한 기대효과

- 식중독의 원인을 파악하기 위해 장시간이 요구되었던 기존 분석방법의 기술적 한계를 극복하고 민감도가 향상된 검사 시스템을 구축함으로써 식품 안전 검사 분야에서의 자체적 핵심기술 기반 확립을 성취할 수 있음.
- 간편한 보급형 장비를 활용함으로써 비전문가들도 현장에서 손쉽게 사용할 수 있는 검사시스템을 확보할 수 있음.
- 이를 통해 다양한 현장에서의 신속탐지를 통해 병원체의 확산을 방지할 뿐만 아니라, 국민 보건위생을 국가적 차원에서 관리하는 체계를 구축할 수 있음.
- 제시한 현장탐지용 자동화 플랫폼 기술은 단순히 식품 위생뿐만이 아닌 여러 분야에 적용이 가능한 보편성(universality)을 가지고 있음.
- 검사 대상에 따라 일회성 카트리지만 변경하여 분석을 시행할 수 있기 때문에 그 적용 범위는 광범위하게 확장될 수 있음.



## 나. 연구개발 목표

구분	내용																
최종목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식중독균(살모넬라, 리스테리아, 병원성대장균)을 고감도로 현장에서 검출할 수 있는 자동화 플랫폼 기술 개발</li> <li>* 주요 성과목표 및 지표</li> </ul> <table border="1"> <thead> <tr> <th>성과목표</th> <th>성과지표</th> <th>목표치</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>검출감도</td> <td><i>S. typhimurium</i> / <i>L. monocytogenes</i> / <i>E. coli</i> O157:H7</td> <td>20 cfu/g 이하</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">시간</td> <td>시료 전처리 시간</td> <td rowspan="2">4~5시간 이내 검출</td> </tr> <tr> <td>검출 시간</td> </tr> <tr> <td>장치</td> <td>시료전처리 포함 현장형 간이-신속 검출시스템</td> <td>시작품 저가형 (150만원 수준)</td> </tr> <tr> <td>카트리지</td> <td>농축, 분리, 검출 일체형</td> <td>시작품</td> </tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 최종성과물 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 식중독균 모니터링을 위한 현장형 간이-신속 검사 자동화 검출 시스템 시작품</li> <li>- 살모넬라, 리스테리아, 병원성대장균 3종에 대한 자동화 검출 시스템용 시약 카트리지 시작품</li> </ul> </li> </ul>	성과목표	성과지표	목표치	검출감도	<i>S. typhimurium</i> / <i>L. monocytogenes</i> / <i>E. coli</i> O157:H7	20 cfu/g 이하	시간	시료 전처리 시간	4~5시간 이내 검출	검출 시간	장치	시료전처리 포함 현장형 간이-신속 검출시스템	시작품 저가형 (150만원 수준)	카트리지	농축, 분리, 검출 일체형	시작품
	성과목표	성과지표	목표치														
검출감도	<i>S. typhimurium</i> / <i>L. monocytogenes</i> / <i>E. coli</i> O157:H7	20 cfu/g 이하															
시간	시료 전처리 시간	4~5시간 이내 검출															
	검출 시간																
장치	시료전처리 포함 현장형 간이-신속 검출시스템	시작품 저가형 (150만원 수준)															
카트리지	농축, 분리, 검출 일체형	시작품															
최종목표 설정근거	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 검출감도: 식품공전의 배양법과 유사한 감도</li> <li>- 시료 전처리 시간 및 검출 시간: 사후 조치가 아닌 사전 예방 조치의 결과 활용이므로 4시간 이내 검사완료 목표</li> <li>- 시료전처리 포함 현장형 간이-신속 검출 시스템 개발: 시작품 제작, 연구진이 보유하고 있는 기술을 융합한 개발품으로 개발비 절감을 통해 150만원 수준으로 제작</li> <li>- 식중독균 3종에 대한 1회용 분석 카트리지 시작품 제작</li> </ul>																

## (1) 연구 개발 시스템의 개념도



- **전처리 및 간이 배양** : 식품시료로부터 균을 분리할 수 있는 필터가 포함된 튜브 또는 bag을 통해 전처리 공정과 최소 배양이 이루어질 수 있도록 함. 이때, 시중에 판매중인 간이 배양기를 적용하여 장비를 소형화하여 현장적용성을 높이하고자 함.
- **Liquid handler 및 자동화 시스템** : 배양액을 농축 튜브에 분주 및 반응, 자성 분리, 세척 등 모든 전반적인 공정을 자동으로 수행할 수 있도록 만들어진 장치로, 추후 제작 성공도에 따라 다중 분석이 가능할 수 있도록 디스펜서의 개수를 추가 설계하고자 함. (여러 종의 식중독균을 한 번의 분석 과정을 통해 동시 측정 가능한 효과)
- **시료 농축 및 탐지용 카트리지 (1회용)** : 시료 농축 및 탐지를 전자동화하기 위해 그림과 같이 필요 시약을 각각 튜브 형태로 포함하고 있는 것으로, 검출 대상에 따라 카트리지를 교체함으로써 분석이 가능하도록 함.
- **신호 측정 및 광학 분석부** : 농축이 이루어진 샘플은 반응 튜브로 옮겨져 sandwich 면역분석이 이루어지며, 표지자로 사용되는 효소와 기질의 반응에 의해 발색 또는 발광 신호가 발생됨. 해당 신호는 LED와 고감도 photodiode와 같은 수광 소자에 의해 디지털화되어 데이터 분석이 가능함.

## (2) 검출 대상 식중독균

- 본 연구의 검출 대상으로 사회적으로 발생률 및 위험도가 높은 3개의 균을 선정하였음.
- 다음의 3종 식중독균을 대상으로 하여 해당 연구기간 동안 목표로 한 분석 시스템을 구축하였고, 이를 기반으로 이후 더 많은 식중독균을 대상으로 본 시스템을 적용하고자 계획 중임.



**Escherichia coli O157:H7**

- 병원성 대장균은 최근 5년간 식중독 발생 원인균으로 가장 많이 검출됨
- 장출혈성 대장균은 용혈성 요독 증후군(Hemolytic-uremic syndrome, HUS)을 유발하며, 임상 증상을 보이는 병원성 대장균 중 가장 위해도가 높음.
- 완전히 조리되지 않은 쇠고기, 원유, 마요네즈, 비 살균 과일주스 등이 주요 원인식품임.
- 식수, 식품을 매개로 전파되고, 소량으로도 감염 가능하기 때문에 사람 간의 전파도 중요함. (질병관리청)



**Salmonella typhimurium**

- 살모넬라는 두번째로 식중독 발생 빈도가 높은 균으로, S. Enteritidis와 S.typhimurium이 식중독과 관련성이 가장 높음
- 특히 S. typhimurium은 돼지고기, 가금류 및 소고기와 연관이 크기 때문에 식생활과 밀접하게 관련되어 있음.



**Listeria monocytogenes**

- 살모넬라와 클로스트리디움 보툴리눔보다 높은 치사율을 가진 것으로 알려짐.
- 농, 축, 수산 식품 등 다양한 경로를 통해 식중독을 일으켜 식품산업과 공중위생분야에서 중요도가 높음
- 저온에서도 성장 가능하여 cold chain이 잘 발달되어 있는 선진국에서 많이 발생할뿐만 아니라, 호기성과 혐기성 상태 모두 성장 가능하여 진공포장 또는 질소충전포장 식품에서도 성장함.

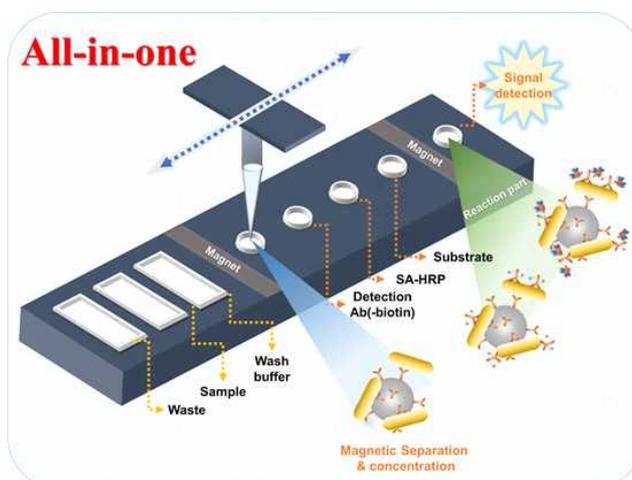
다. 연구개발 범위

주관연구기관 : 을지대학교

(1) 식중독균의 간이 배양

- 3종 균에 대한 배지 선정  
: 각 균에 대해 한 가지 이상의 배지를 적용하여 선별
- 간이 배양 조건 최적화  
: 현장 적용성이 높은 간이 배양 조건 확립 (온도, 시간, 배양 방식 등)

(2) 시료 농축 및 분리, 검출 통합형 카트리지 개발



Easy & fast  
Within 5 hours

High-sensitive  
Below 20 cfu/g

On-site detection  
Briefcase size

- Waste : 반응 잔여 물질 및 wash buffer가 회수되는 부분
- Sample : 검출대상 sample을 준비하는 부분
- Magnet : 자성비드-항체 중합체를 이용한 농축 및 분리 반응 공정에 따라 이동 가능
- 농축부 : 자성비드-항체 중합체가 위치하여 대상 식중독균에 대한 탐지와 자석에 의한 농축 과정이 이루어짐
- 반응부 : 농축이 완료된 sample이 카트리지에 준비된 detection Ab 및 SA-HRP와의 반응이 이루어지는 부분, 마지막 substrate와의 반응에 의한 발광 신호가 감지됨

- 항체-자성비드 중합체 제조 기술  
: *E.coli* O157:H7, *Styphimurium*, *L.monocytogenes* 3종에 대한 항체 선별  
항체-자성비드 중합체 제조 조건 최적화 및 자성비드 선정
- 시료 농축 및 분리 기술  
: 자동화 장비와 연동 조건 최적화  
카트리지 제조 조건 및 보관 조건 최적화
- 식중독균별 검출 기술  
: *E.coli* O157:H7, *Styphimurium*, *L.monocytogenes* 각 검출용 시스템 최적화 (최적 항체 선정, 농도, 시간 등)
- 신호 증폭 기술 (SA-poly HRP 제조 최적화)  
: 분석 시간 단축 및 신호 증폭 기술 최적화

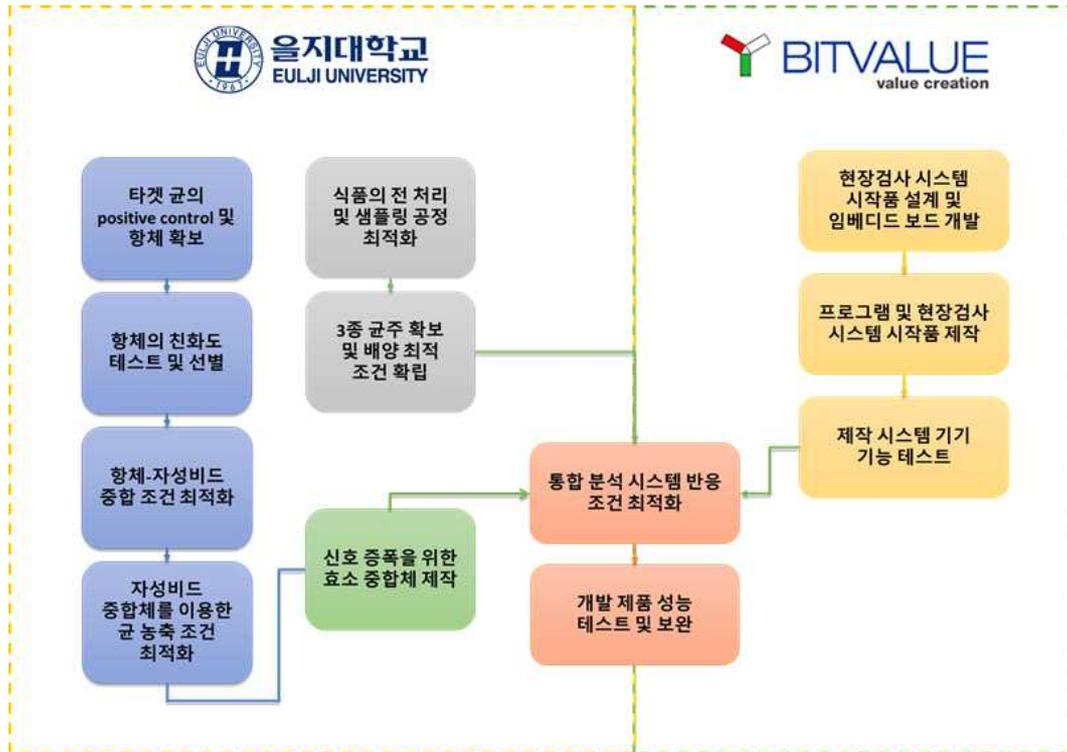
## 협동연구기관 : 비아이티밸류

### (1) 현장형 진단시스템 프로토타입 제작 및 각 모듈 개발

- 식중독균 현장 측정용 진단 시스템 플랫폼 선정
- 선정된 진단 시스템의 Prototype 개발

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

: 주관연구기관인 을지대학교는 대상 시료의 전처리와 식중독균의 간이 배양 조건을 최적화하기 위한 연구를 진행하였음. 또한 농축, 분리, 검출이 이루어지는 카트리지에 적용될 시약들을 제작하였으며, 해당 시약들이 자동화 장비와 통합될 수 있도록 최적화를 수행하였음. 공동연구기관인 비아이티밸류에서는 자동화 시스템을 구현하기 위한 시약품 설계 및 제작 작업을 시행하였음. Liquid handling을 기반으로 자동화 장비를 구축하였으며, 자성반응을 위한 자석과 발광 신호를 얻을 수 있을 수광부 등이 포함되어 있음. 제작된 장비와 시약 및 카트리는 최종적으로 통합 분석 테스트를 진행하여 그 공정을 최적화하고자 하였음.



주관연구기관 : 을지대학교

### 가. 식중독균의 배양 조건 확립

#### (1) 배지 선정

: 식품 시료로부터 대상 균을 분리 및 배양하기 위해 사용하는 배지를 선정하기 위한 실험을 진행하였으며, 식품 공전에서 제시하는 각 균의 1차 증균 배지와 범용적으로 사용되는 LB 배지에서의 증균 효율을 비교하는 방식으로 시행되었음. *L.monocytogene*의 경우 1차 증균 배지로 LE broth (*Listeria enrichment broth*)가 일반적으로 적용되며, 해당 배지에는 영양성분으로 peptone, yeast extract, glucose가 함유되어 있음. 또한 스트레스로부터 손상된 미생물의 회복을 위해 sodium pyruvate가 첨가되어있고, 다른 미생물의 억제를 위해 nalidixic acids, acriflavine HCl, cycloheximide가 들어있음. 식품 공전에서 시료로부터 *S.typhimurium*을 1차 증균시키기 위해서는 BPW (*Buffered peptone water*)를 사용하는데, 이는 균의 손상 복구 및 회복을 촉진시킴. *E.coli*의 1차 증균 비교 배지로는 mTSB broth (*Modified tryptone soya broth*)를 사용하였음. mTSB는 기본 TSB보다 dipotassium hydrogen phosphate의 농도를 높이고 bile salts를 첨가하여 장출혈성 대장균에 대한 선택성을 가짐.

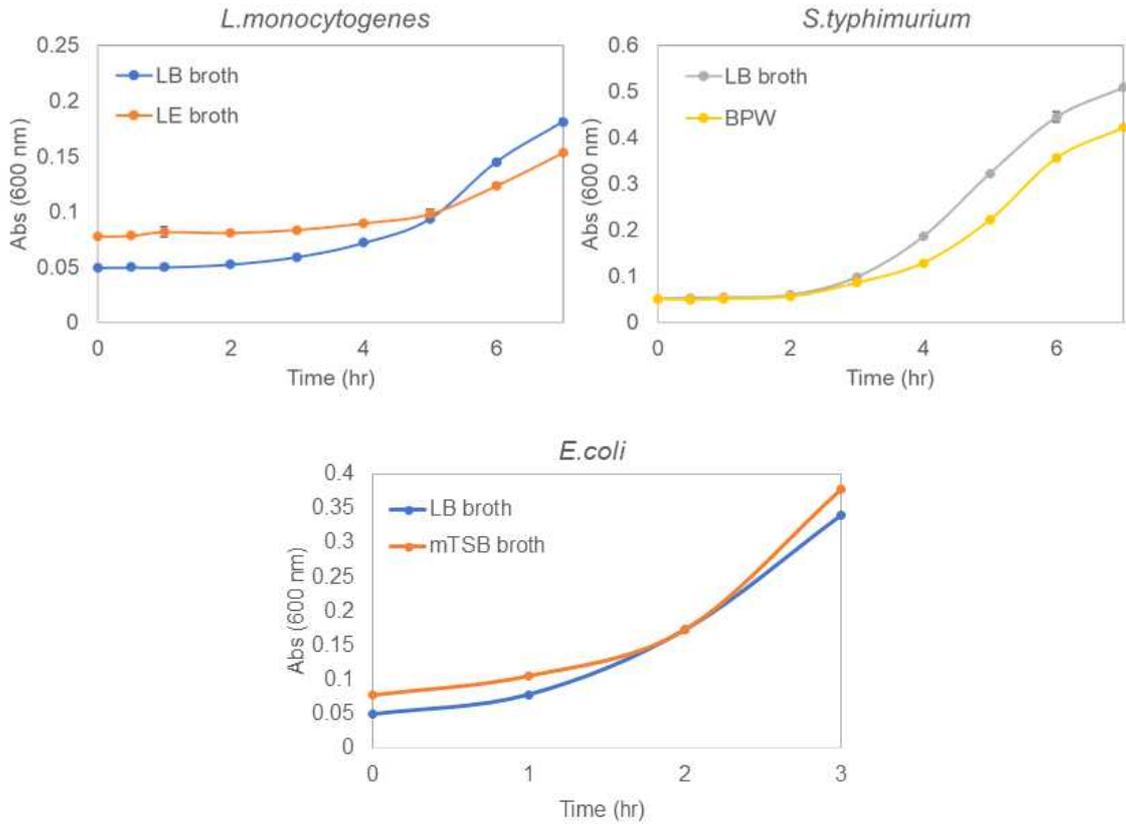


그림 1. 배지 종류에 따른 증균 테스트

본 실험에서 증균된 각 균의 샘플을 시간별로 600 nm에서 흡광도를 측정하였을 때 *Listeria*는 약 6시간, *Salmonella*는 약 4시간 배양 시 현저한 증식이 확인되었으며, *E.coli*는 2시간 만에 초기 배양정도와는 차이가 나는 증균 현상이 확인되었음. 해당 결과는 단순히 균의 증식을 통한 혼탁(turbidity) 정도를 측정하는 것이지만, 배지의 종류에 따른 증식 효율은 충분히 비교가 가능함. 확보한 *Listeria*와 *Salmonella* 균주 모두 비교 배지보다 LB broth에서의 증균 속도가 빠른 것으로 확인되었음. 또한 *E.coli*의 경우 LB broth와 mTSB broth에서의 증균 속도 차이가 미미한 것으로 파악되었음. 비교 배지에 비해 LB broth를 사용하여 증균이 저하되는 현상은 보이지 않았기 때문에 이후 조건테스트는 3 균종을 동일 조건에서 테스트 진행하기 위해 LB broth로 고정하여 진행하였음. 공통 배지를 사용하여 배양된 샘플은 이후 면역분석을 통해 감별될 수 있음.

## (2) 간이 배양 test



그림 2. 선정한 배양기의 규모 비교(좌)와 식품 전처리 및 배양을 위한 멸균백(우)

: 선정된 배지를 이용하여 본 연구에서 목적으로 하는 간이 배양의 가능성을 확인하고자 실험을 시행하였음. 본 연구에서는 간이 배양법을 구축하기 위하여 시판 중인 소형배양기와 박테리아용 멸균백을 사용하였음. 소형배양기의 경우 Labnet사의 Mini incubator(I15110A)를 사용하였으며, 해당 장비는 기존에 실험실에서 사용하던 진탕배양기에 비해 10배 가까이 무게가 가벼워(8.3 kg) 이동성이 좋다는 장점이 있음. 하지만 자체적으로 shaking 기능이 없기 때문에 기존 진탕배양기와 동시에 실험에 적용하여 그 결과를 비교하고자 하였음. 멸균백은 interscience사의 BagFilter Pipet&Roll(111 720) 제품으로, 시료로부터 박테리아를 분리할 수 있도록 필터(<250 μm)가 내부에 위치하고 있음. 해당 멸균백을 사용할 경우 대상 식품을 액체배지에 넣은 상태에서 균질화시킴으로써 균을 분리할 수 있음. 이를 통해 현장에서 얻은 검사 대상 식품을 바로 멸균백에 적용하여 균의 배양과 샘플링을 동시에 시행할 수 있음.

간이 배양 테스트는 각 균주의 preculture를 LB broth 249 mL이 들어있는 멸균백에 1 mL 분주하여 균질화 시켜준 후 배양을 진행하는 방식으로 시행되었음. 각 조건에서의 평균 효율을 비교하기 위해 시간마다 채취한 샘플을 LB agar에 접종 및 배양하여 관찰되는 colony의 counting을 통해 균의 증식 정도를 파악하고자 하였음. 그 결과는 표 1.에 나타내었으며, shaking의 여부와 멸균백의 filter를 통과하기 전후의 샘플로 구분되어있음. 본 연구에서는 최종적으로 간이배양기의 도입이 목적이기 때문에 shaking이 없는 조건에서 filter를 거쳐 얻은 시료가 실제 시스템에 적용하고자하는 샘플이 됨.

<i>Listeria monocytogenes</i>	Shaking O		Shaking X	
	Filter 전	Filter 후	Filter 전	Filter 후
0 hr	8*10 <sup>9</sup>	4*10 <sup>9</sup>	8*10 <sup>9</sup>	5*10 <sup>9</sup>
	14*10 <sup>9</sup>	4*10 <sup>9</sup>	5*10 <sup>9</sup>	4*10 <sup>9</sup>
<b>Average</b>	<b>11*10<sup>9</sup></b>	<b>4*10<sup>9</sup></b>	<b>6.5*10<sup>9</sup></b>	<b>4.5*10<sup>9</sup></b>
3 hr	91*10 <sup>9</sup>	124*10 <sup>9</sup>	105*10 <sup>9</sup>	166*10 <sup>9</sup>
	92*10 <sup>9</sup>	108*10 <sup>9</sup>	91*10 <sup>9</sup>	144*10 <sup>9</sup>
<b>Average</b>	<b>9.15*10<sup>10</sup></b>	<b>17.8*10<sup>10</sup></b>	<b>11.6*10<sup>10</sup></b>	<b>15.5*10<sup>10</sup></b>

<i>Salmonella typhimurium</i>	Shaking O		Shaking X	
	Filter 전	Filter 후	Filter 전	Filter 후
0 hr	7*10 <sup>7</sup>	3*10 <sup>7</sup>	4*10 <sup>7</sup>	6*10 <sup>7</sup>
	12*10 <sup>7</sup>	4*10 <sup>7</sup>	3*10 <sup>7</sup>	3*10 <sup>7</sup>
<b>Average</b>	<b>9.5*10<sup>7</sup></b>	<b>3.5*10<sup>7</sup></b>	<b>3.5*10<sup>7</sup></b>	<b>4.5*10<sup>7</sup></b>
3 hr	54*10 <sup>7</sup>	42*10 <sup>7</sup>	48*10 <sup>7</sup>	42*10 <sup>7</sup>
	52*10 <sup>7</sup>	46*10 <sup>7</sup>	39*10 <sup>7</sup>	49*10 <sup>7</sup>
<b>Average</b>	<b>5.3*10<sup>8</sup></b>	<b>4.4*10<sup>8</sup></b>	<b>4.35*10<sup>8</sup></b>	<b>4.55*10<sup>8</sup></b>

<i>E.coli</i>	Shaking O		Shaking X	
	Filter 전	Filter 후	Filter 전	Filter 후
0 hr	5*10 <sup>6</sup>	3*10 <sup>6</sup>	5*10 <sup>6</sup>	11*10 <sup>6</sup>
	3*10 <sup>6</sup>	4*10 <sup>6</sup>	8*10 <sup>6</sup>	3*10 <sup>6</sup>
<b>Average</b>	<b>4*10<sup>6</sup></b>	<b>3.5*10<sup>6</sup></b>	<b>6.5*10<sup>6</sup></b>	<b>7*10<sup>6</sup></b>
3 hr	5*10 <sup>8</sup>	4*10 <sup>8</sup>	2*10 <sup>8</sup>	6*10 <sup>8</sup>
	9*10 <sup>8</sup>	6*10 <sup>8</sup>	-	4*10 <sup>8</sup>
<b>Average</b>	<b>7*10<sup>8</sup></b>	<b>5*10<sup>8</sup></b>	<b>1*10<sup>8</sup></b>	<b>5*10<sup>8</sup></b>

표 1. 3종균에 대한 간이 배양 테스트 결과

해당 조건에서의 결과를 보았을 때, *Listeria*는 약 30배, *Salmonella*는 약 10배, *E.coli*는 약 70배 정도 증균되는 것을 확인하였음. Shaking이 이루어지지 않을 경우 균의 증식 속도 저하 또는 filtering 효율 감소 등의 우려가 있었으나, 실제 shaking의 여부에 따라 증균 효율을 비교하였을 때 그 차이는 미미하였음. 또한 filter 전후의 샘플을 agar에서 배양 후 counting하였을 때, filter를 통한 균이 이동이 충분히 이루어지는 것을 확인할 수 있었음. 간이 배양을 통해 대상 균을 증균시키는 과정은 본 연구에서 검출 감도를 높이는 1차 요소로 적용됨. 이후 농축 공정을 통해 대상 균에 대한 민감도를 더욱 향상시킬 수 있었음.

## 나. 식중독균의 농축 공정 확립

### (1) Antigen-antibody pair test

- Ag-Ab 친화성 및 교차반응 test

: 본 연구의 면역분석 테스트에 적용하기 위한 3종 식중독균의 positive control(heat-killed bacteria)과 그에 대한 각 항체를 확보하였으며, 그 종류는 다음의 표 2.와 같음.

Antibody list
E.1 : Goat anti- <i>E.coli</i> O157:H7 #5310-0326 (Seracare)
E.2 : Mouse anti- <i>E.coli</i> O157 #A19Z (Invitrogen)
E.3 : Mouse anti- <i>E.coli</i> O157 #D11J (Invitrogen)
E.4 : Mouse anti- <i>E.coli</i> O157 #H55S (Invitrogen)
S.1 : Goat anti- <i>Salmonella</i> CSA-1 #5310-0322 (Seracare)
S.2 : Mouse anti- <i>S.typhimurium</i> #1E6cc (Hyttest)
L.1 : Goat anti- <i>Listeria</i> species High sensitivity #5310-0320 (Seracare)
L.2 : Mouse anti- <i>L.monocytogenes</i> #LZH1 (Hyttest)
L.3 : Mouse anti- <i>L.monocytogenes</i> #LZF7 (Hyttest)
L.4 : Goat anti- <i>Listeria</i> , Genus specific #5310-0319 (Seracare)

표 2. 확보한 3종균에 대한 항체

확보한 항체들의 항원에 대한 친화성 및 교차반응을 확인하기 위하여 항원으로 적용될 positive control을 고정된 microwell에서 모든 항체들을 개별적으로 반응시킨 후 HRP가 표지된 이차항체를 이용하여 신호를 확인하였음.

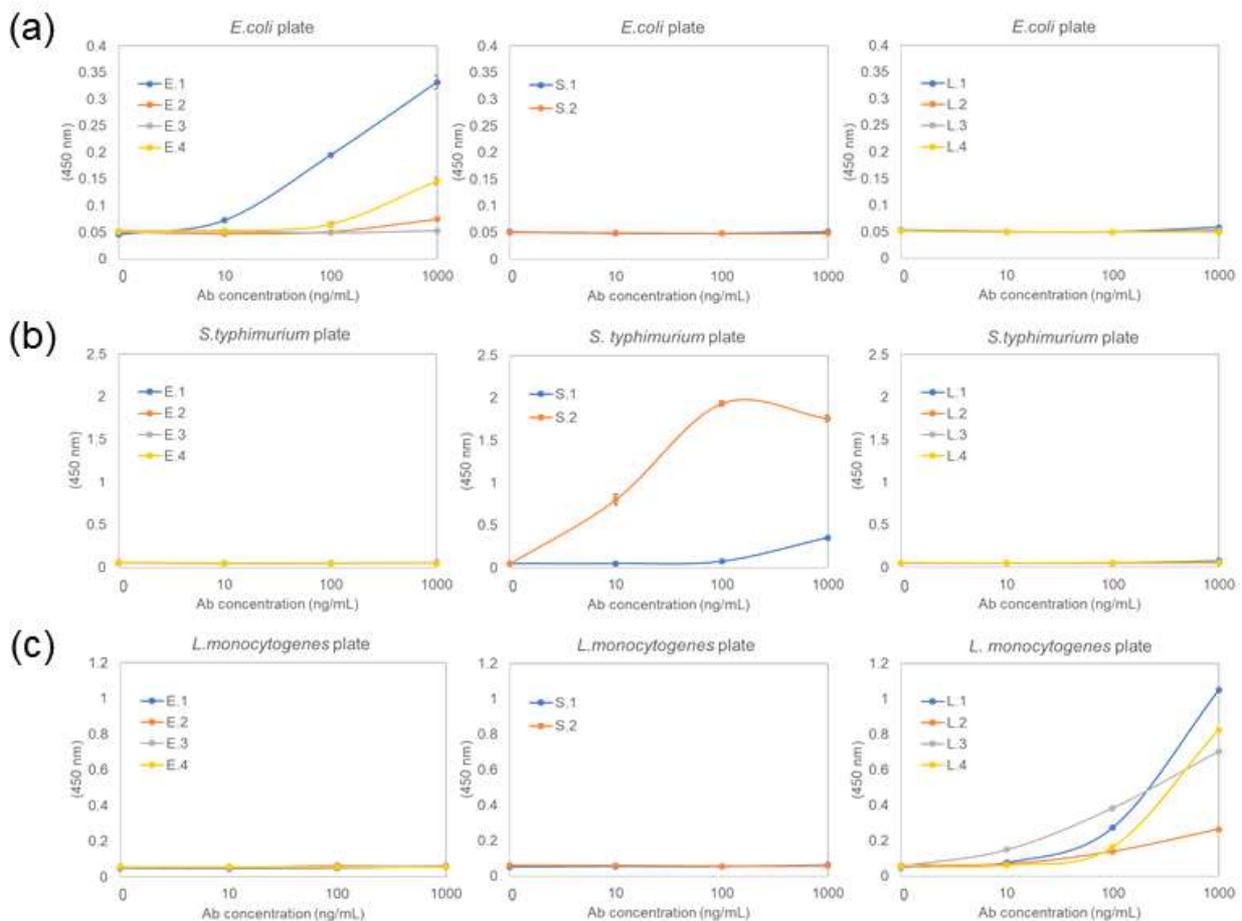


그림 3. 확보한 항체의 교차반응 및 친화성 테스트

그림 3.(a)의 세 그래프는 모두 *E.coli*가 고정된 plate에서 진행한 테스트 결과로, 첫 번째 그래프를 제외한 두 그래프는 각각 *Salmonella* 항체와 *Listeria* 항체를 반응시킨 결과임. 이를 통해 교차로 반응된 조건에서는 모두 반응성이 없는 것을 확인할 수 있으며, 첫 번째 그래프의 결과를 통해서 E.1항체가 *E.coli*와 친화성이 가장 우수한 것을 알 수 있음. 그림 3.(b)는 *Salmonella* plate에서의 결과로 교차 반응이 이루어진 첫 번째, 세 번째 그래프에서는 모두 신호가 관찰되지 않으며 두 번째 그래프를 통해 *Salmonella*는 S.2항체를 사용하였을 때 면역반응이 가장 강한 것을 확인하였음. *Listeria* 항체 테스트가 이루어진 그림 3.(c)의 결과로 보았을 때, 첫 번째와 두 번째 그래프를 통해 교차 반응이 없음을 확인할 수 있으며 마지막 그래프에서 L.3 항체가 *Listeria* 검출 감도가 가장 우수한 것을 알 수 있음. 확보한 모든 항체의 반응성을 확인한 결과, 정도의 차이가 있지만 각 표적 항원에 대한 반응성이 확인되었으며 그 외 항원에 대한 교차반응은 나타나지 않았음.

- Sandwich ELISA (pair test)

: 이후 각 항원에 대해 친화성이 우수한 항체를 선별하여 detection 항체로 적용하고자 두 가지 방식을 이용하여 biotin을 중합하였음. 첫 번째 방식(random)은 항체의 amine에 biotin을 표지하는 방법으로 NHS ester를 갖는 biotin을 사용하였으며, 두 번째 방식(site specific)에서는 DTT와 같은 환원제를 이용하여 항체에 존재하는 disulfide bond를 환원시킴으로써 얻을 수 있는 sulfhydryl group에 maleimide를 작용기로 갖는 biotin을 선택적으로 표지하는 방법임.(그림 4.)

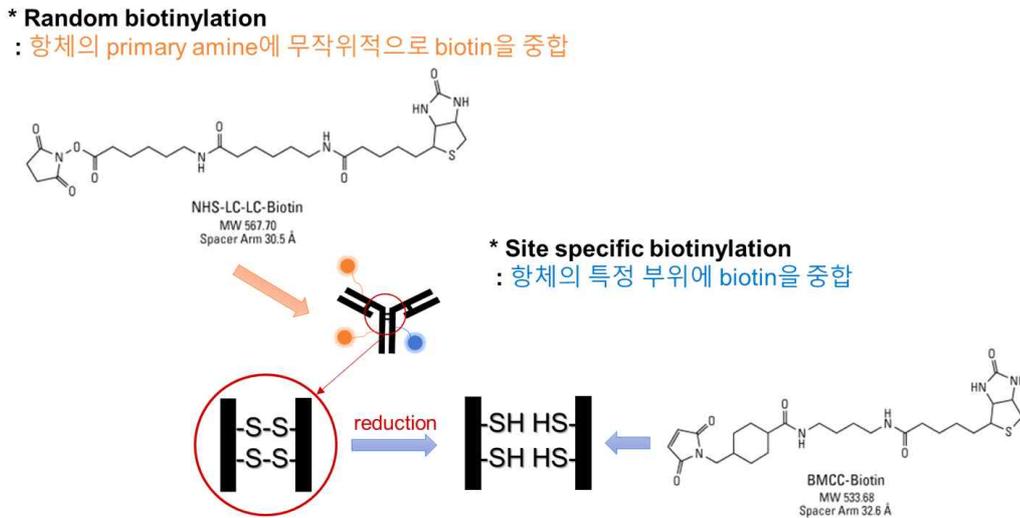


그림 4. Detection 항체에 적용한 두 가지 biotin 중합 방법

두 가지 방식으로 biotin이 표지된 항체들은 sandwich ELISA에서 detection 항체로 적용되었으며, capture 항체로 적용된 다른 항체들과의 pair test가 시행되었음.

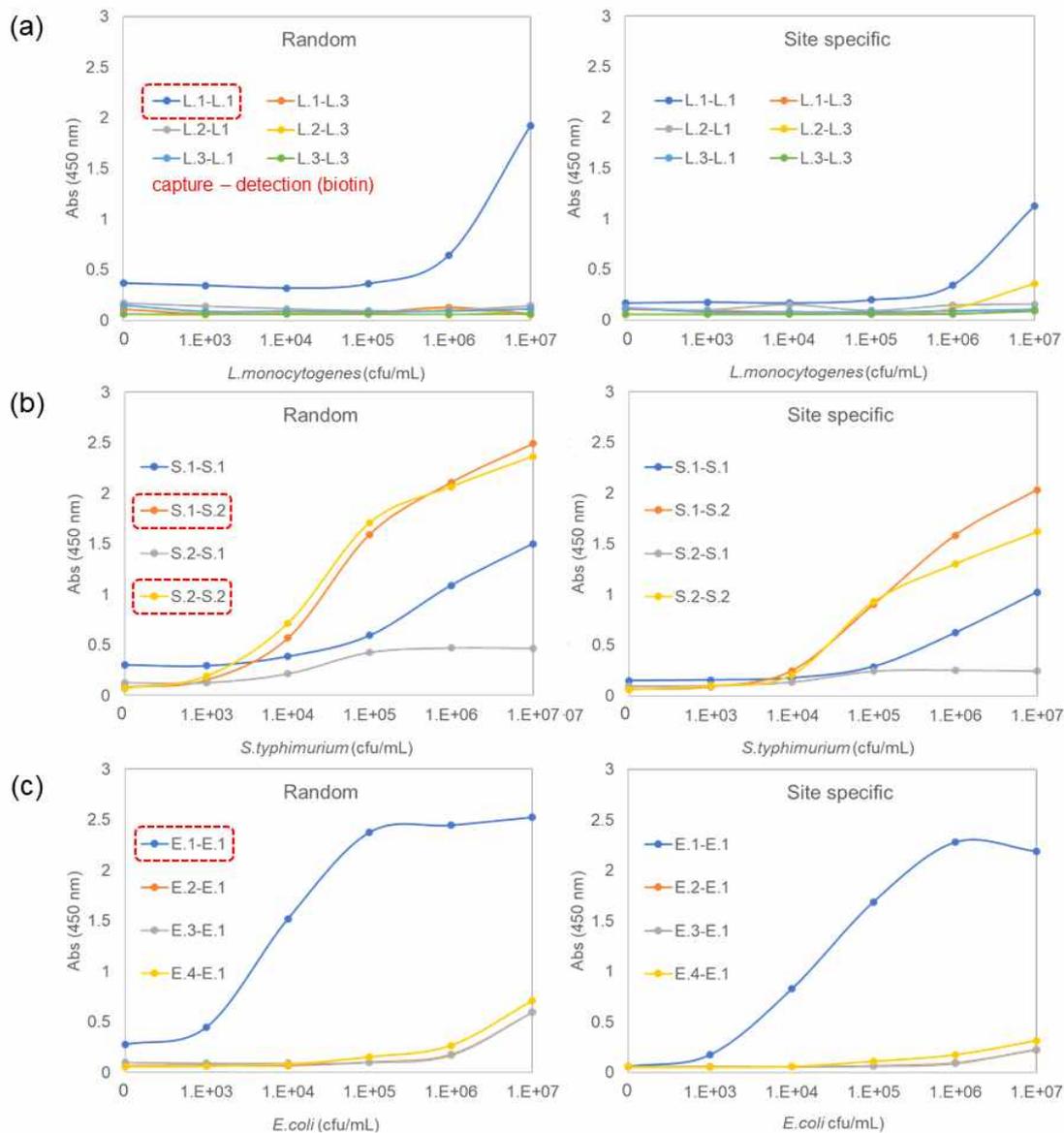


그림 5. 3종균에 대한 항체 pair 테스트

그림 5.(a)의 결과로 보았을 때, *Listeria* 항체의 경우 항체를 L.1-L.1 pair로 적용한 조건 외에는 모두 신호를 관찰할 수 없었음. 이전에 *Listeria* 항체들에 대해 친화성 테스트를 진행한 결과 L.3항체가 가장 우수한 면역 반응을 보였음에도 불구하고 biotin 중합 후 면역 활성이 현저히 저하되는 현상을 보임. 특히 random 방식으로 biotin을 중합한 경우 *Listeria*에 대한 반응성을 전혀 보이지 않음. 이는 biotin이 중합되는 과정에서 항원과 결합하는 항체의 paratope 부위에 영향을 미친 것으로 파악됨.

*Salmonella*(그림 5.(b))와 *E.coli*(그림 5.(c))의 경우에는 이전에 확인한 항체의 친화성과 크게 다르지 않은 경향을 유지하였으며, 전반적으로 random 방식으로 biotin을 표지한 항체를 적용한 경우 신호가 강하게 관찰됨. *Listeria*를 제외한 두 종균은 최적 pair에서 약 1,000~10,000 cfu/mL까지 검출이 가능한 감도를 보이지만, *Listeria*의 경우 1,000,000 cfu/mL 이상의 농도에서 신호가 관찰됨. 이러한 *Listeria*의 저조한 검출 감도를 보완하기 위해 *Listeria*의 pair test를 보다 세부적으로 시행하고자 하였음.

- *L.monocytogenes* 항체 선별  
: *Listeria*의 capture 항체와 detection 항체를 각각 4종류씩 적용하여 감도가 가장 양호한

pair를 선정하기 위해 sandwich ELISA를 시행하였음. L.3의 경우 단독적으로 사용 시 항원에 대한 친화성이 가장 좋으나, random 방식으로 biotin을 표지할 경우 면역 활성에 영향을 미치는 것으로 파악되어 site specific 방식으로 biotin을 표지하거나 HRP를 표지하는 방식을 적용하였음. 또한, *Listeria* 항체를 추가로 한 종류 더 확보하여 (L.4) 친화성을 함께 비교하고자 하였음.

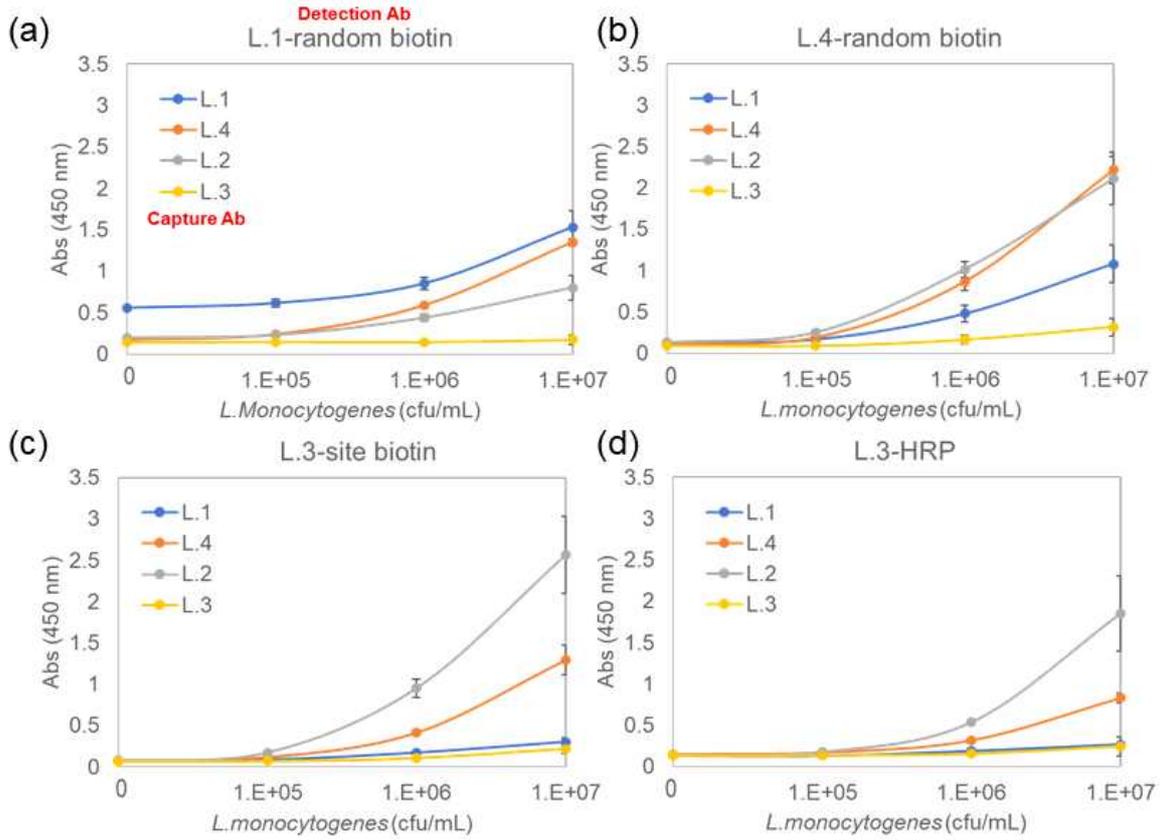
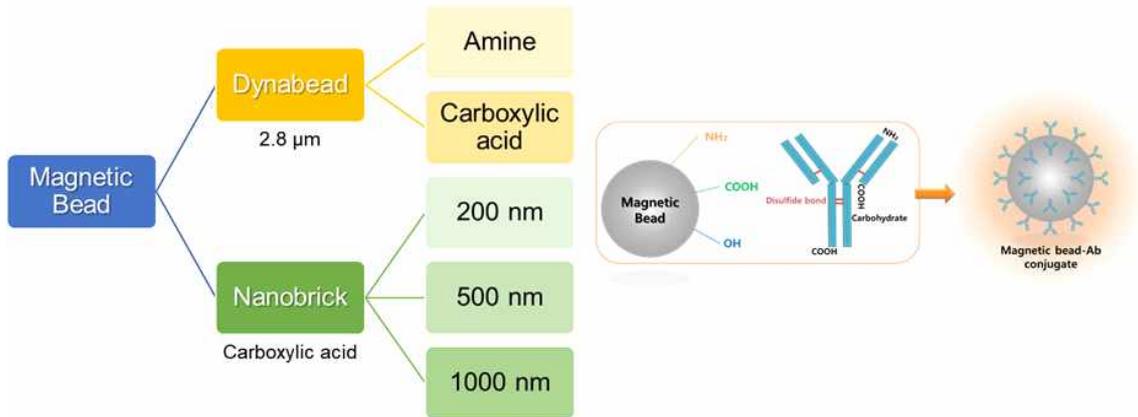


그림 6. *L. monocytogenes*의 검출 감도 증가를 위한 detection 항체 적용 전략 테스트

그림 6.(a)에서는 이전 pair 테스트 시 감도가 가장 좋았던 L.1-L.1(random biotin) pair 외에 추가로 capture 항체를 3종 더 비교한 결과로, 배경 신호를 감안하였을 때 새로 확보한 L.4 항체를 capture 항체로 적용한 조건에서 감도가 가장 좋았음. L.4에 biotin을 random 방식으로 중합하여 detection 항체로 적용한 경우(그림 6.(b))에는 capture 항체로 L.2 또는 L.4 항체를 사용하는 것이 가장 감도가 우수하였음. L.3항체를 detection 항체로 이용한 조건(그림 6.(c),(d))에서는 L.2 항체와 pair로 적용하는 것이 가장 검출 효율이 좋은 것을 확인하였음. L.3에 HRP를 표지하여 신호를 검출하는 방식보다 site specific 방식으로 biotin을 중합하여 SA-HRP와 반응 후 신호를 검출하는 조건에서 감도가 더 향상되는 경향을 볼 수 있음. 이는 항체에 바로 HRP를 표지할 경우 항체와 결합할 수 있는 HRP의 양이 한정되어 있는 반면, 항체에 biotin을 표지한 후 SA-HRP와 반응 시 결합되는 HRP의 양이 상대적으로 많기 때문으로 추정할 수 있음. 특히 후자의 방식에서는 항체에 biotin이 표지된 양이 많을수록 그리고 SA과 결합된 HRP의 양이 많을수록 그 효과가 크며, biotin과 SA의 강한 결합력 또한 신호 증가에 도움을 줌. 종합적인 결과를 도출하였을 때, capture 항체는 L.2 또는 L.4를 적용하고 detection 항체는 random 방식으로 biotin을 중합한 L.4, 또는 site specific 방식을 적용한 L.3-biotin을 적용하는 것이 적합한 pair로 판단되었음. 해당 실험을 통해 선별된 항체 pair는 이후 농축 공정에 적용하여 최종 항체 pair 선정 과정을 수행하였음.

## (2) Magnetic bead-antibody(Ab) 중합체 제작 및 농축 test

: 식중독균 농축 및 면역분석에 적용하기 위한 magnetic bead-Ab 중합체(conjugate) 제작 조건을 확립하기 위한 test를 시행하였으며, 최적 조건을 선정하기 위하여 magnetic bead를 종류별로 적용하여 비교하였음. 본 연구에서 후보군으로 선정한 magnetic bead는 총 5가지로 제조사와 bead의 크기 및 표면의 작용기에 차이가 있음.



- 모델 항체를 이용한 기본 조건 test

: 식중독균 항체와 magnetic bead의 중합을 수행하기에 앞서 기본 조건 테스트를 위해 goat anti-mouse IgG를 모델 항체로 이용하여 연구를 진행하였음. Dynabead의 경우 제조사에서 제시하는 protocol을 적용하여 작용기가 서로 다른 두 가지 bead의 중합 효율을 비교하였을 때, 각각의 최적 조건에서 carboxylic acid를 작용기로 가진 bead의 효율이 더 우수한 것을 확인하였음. Nanobrick의 magnetic bead는 크기가 서로 다른 3가지의 bead에 동일 조건으로 중합을 시도하였을 때, 200 nm와 500 nm에서는 반응 튜브에 흡착되는 현상을 보이며 이로 인해 중합 효율이 저하되는 현상을 보였음. 이를 보완하기 위해 tube의 종류를 변경하여 테스트하였지만, 최종적으로 1000 nm 크기의 bead를 사용하는 것이 가장 안정성이 우수하였음. 이처럼 선행 연구를 통해 Dynabead와 Nanobrick의 후보군 중 각각 한 종류를 선별하였고, 최종적으로 균 농축에 적용한 magnetic bead 및 중합 방식을 선정하기 위한 테스트를 진행하였음. Dynabead의 경우 해당 업체에서 제공하는 protocol을 적용하였고, Nanobrick은 Dynabead의 protocol과 실험실 자체에서 구축한 protocol을 동시에 적용하여 비교하였음. 후자의 방식은 EDC와 NHS를 이용하여 magnetic bead 표면의 carboxylic acid를 activation시켜 항체의 amine과 결합하는 방법을 사용하였으며, 중합의 확인은 magnetic bead-항체 중합체와 HRP가 표지된 mouse anti-goat IgG를 반응시켜 효소-기질 발색반응을 통해 이루어졌음. Protocol은 크게 EDC activation과정에서 항체와 중합 전 사용된 EDC 및 NHS의 제거여부에 따라 구분됨. 잔여 linker의 제거 없이 중합한 경우를 one step, 잔여 linker 제거 후 중합한 방식을 two step으로 그림 7.에 표기하였음.

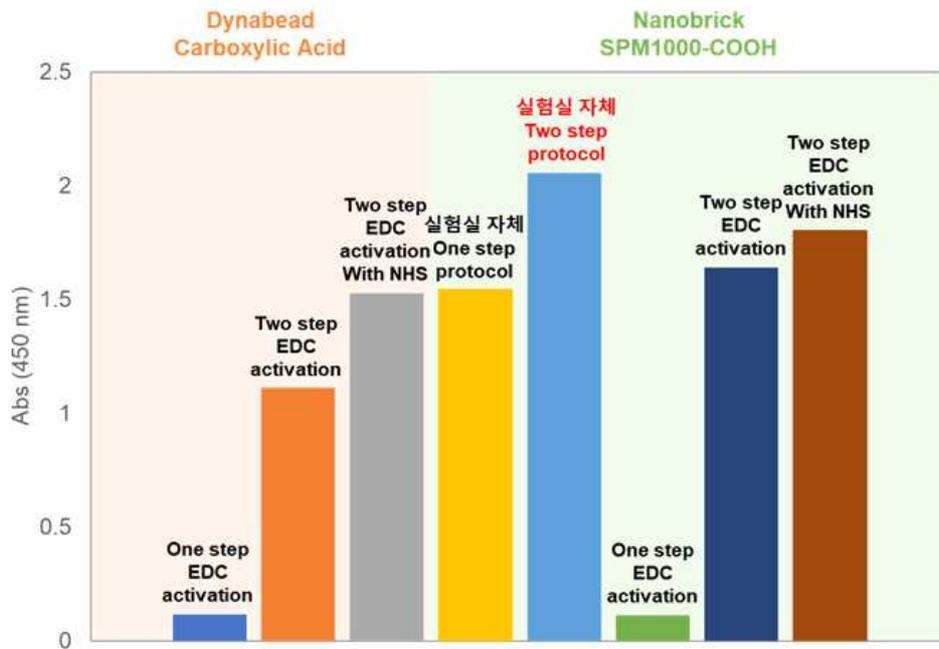


그림 7. Magnetic bead의 종류와 중합 방식에 따른 중합 효율 비교

실험 결과 Nanobrick magnetic bead에 실험실 자체 protocol을 적용하였을 때 Dynabead에서 제시하는 protocol을 적용하는 것과 유사한 수준 또는 그 이상의 중합 효율을 보였음. (그림 7.) 이후 반복 실험을 통해 중합 방식이 간편하고 재현성이 확보된 실험실 자체 protocol을 Nanobrick magnetic bead에 적용하기로 선정하였음.

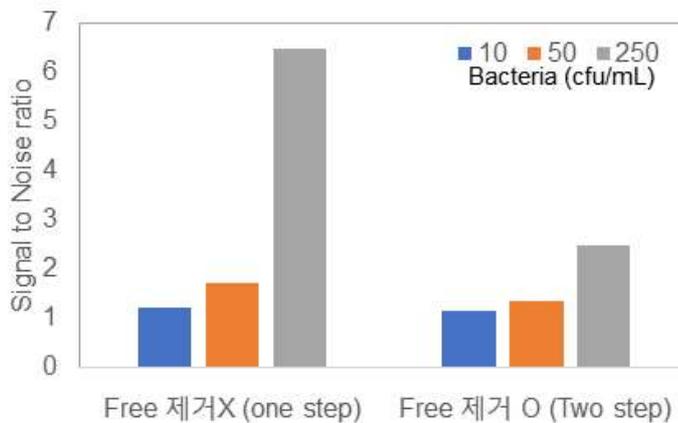


그림 8. Magnetic bead 중합 조건 식중독균 항체 적용

모델 항체를 이용해 선정한 중합 방법을 식중독균 항체에 적용하였을 때, two step protocol에 비해 one step protocol로 제작한 중합체를 사용한 경우에서 감도가 더 우수하였기 때문에 후자의 방식으로 식중독균 중합을 진행하였음.(그림 8.)

- Magnetic bead-Ab 중합체를 이용한 식중독균 농축 test  
 : Magnetic bead-항체 중합체를 이용한 농축 및 분석의 과정은 다음의 모식도와 같이 이루어짐.

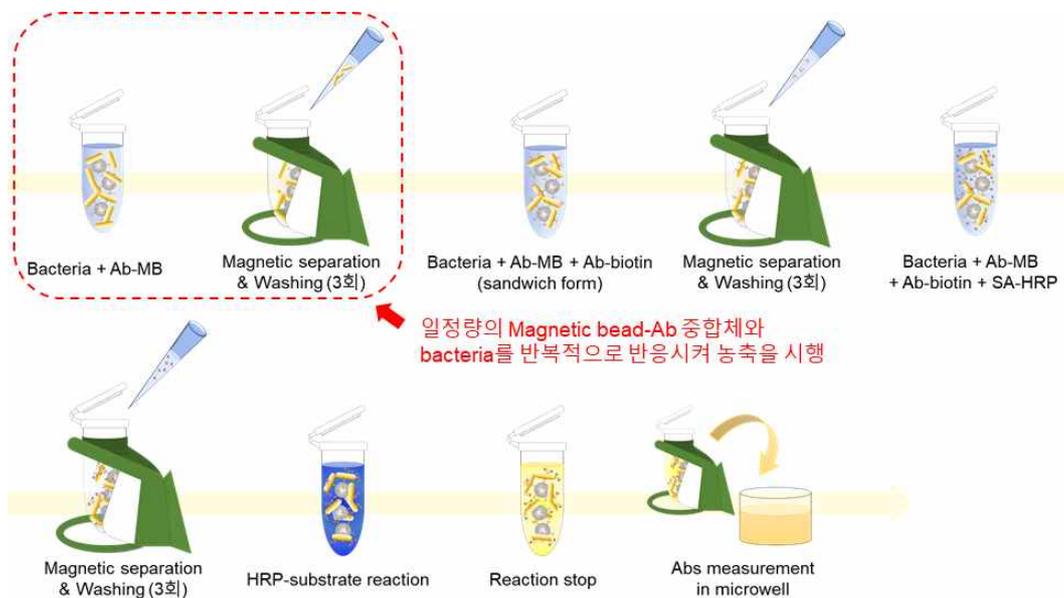


그림 9. Magnetic bead-Ab 중합체를 이용한 균의 농축 및 검출 과정의 모식도

표적 균이 포함되어 있는 샘플 1 mL과 magnetic bead-항체 중합체를 일정 시간 반응시키면 면역반응에 의해 균이 중합체와 결합하게 됨. 이후 자성 분리를 이용하여 반응에 참여하지 않은 잔여물질들과 buffer를 제거한 뒤 buffer로 3회 세척 과정을 수행함. 샘플을 추가하여 해당 과정을 여러 번 반복함으로써 면역 반응 및 자성 분리를 통해 magnetic bead-항체 중합체에 균이 농축됨. 농축된 균은 이후 biotin이 중합된 detection 항체와, 신호체인 SA-HRP와의 순차적인 반응을 수행하고 최종적으로 효소-기질 반응을 통해 발색 또는 발광 신호를 얻을 수 있음. 테스트 과정에서 반응의 최적화를 위해 반응에 참여하는 항체의 양, 중합체의 종류 등을 조절하는 과정이 수행되었음.

- Magnetic bead-Ab 적용 조건 최적화

: Magnetic bead-Ab를 농축 테스트에 적용 시 그 효율을 최적화하기 위해 중합에 사용되는 항체량 테스트를 진행하였음.

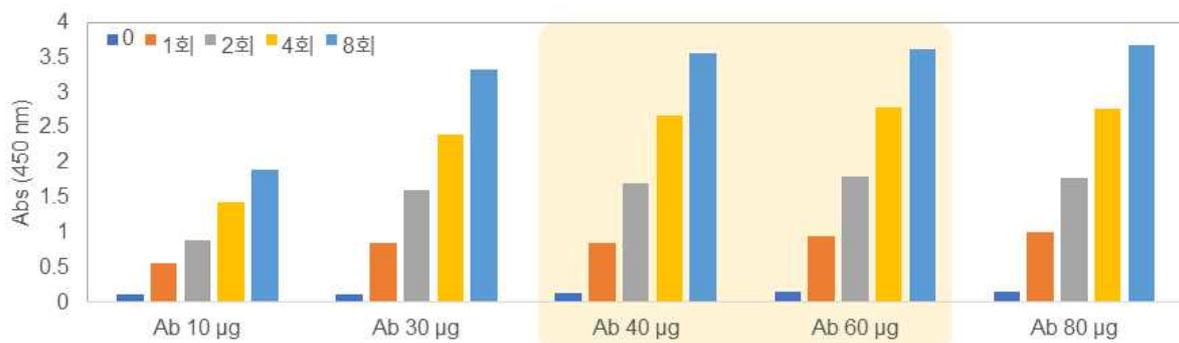


그림 10. 항체 중합량에 따른 magnetic bead-Ab 중합체의 효율 비교

그림 10.의 그래프에 표기된 흡수는 농축 흡수를 의미하며, 항체의 사용량이 많을수록 농축 테스트에서의 감도가 증가하나 그 한계가 존재하는 것으로 파악됨. 약 40~60 µg 정도의 항체가 magnetic bead 100 µL 기준 중합 한계치로 보이며, 이후 추가 실험을 통해 중합에 적용하는 항체량을 50 µg으로 선정하였음.

Magnetic bead와 항체의 중합 조건을 선정한 이후, 이를 농축 테스트에 적용 시 조건을 최적화하기 위한 buffer 비교 테스트를 시행하였음. 농축 시 10 mM PBS, 0.5% casein

PBS, 0.5% BSA PBS를 각각 buffer로 적용하여 결과의 감도 및 재현성을 평가하였음. 그 결과 0.5% BSA PBS를 사용하는 것이 가장 재현성이 우수하였으며, 이후 추가 실험을 통해 0.5% BSA PBS에 0.1% Tween20을 첨가하여 사용하는 것을 최종 buffer 조건으로 선정하였음. (그림 11.)

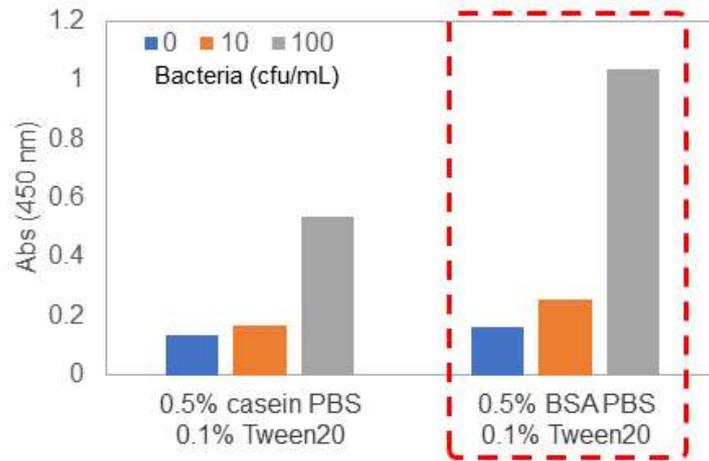


그림 11. 균 농축 및 검출 과정의 buffer 선정 테스트

일반적으로 buffer에 BSA를 첨가할 경우, 총 단백질 농도가 증가하면서 다른 단백질의 분해 현상을 감소시키는 효과가 있기 때문에 생물학적 시약의 안정성을 위하여 보편적으로 사용됨. 또한 BSA는 microwell이나 반응튜브와 같은 플라스틱 표면의 상당 부분을 차단함으로써(blocking) 흡착 현상을 최소화하여 단백질의 손실을 방지할 수 있음. 동일한 이유로 casein을 함께 적용하여 비교해보았을 때, BSA buffer에서 감도가 더 높은 것을 확인하였음. Tween20(polysorbate 20)은 비이온 계면활성제로 buffer에 첨가하여 사용하면 생물학적 분석 시 발생할 수 있는 비특이적 결합을 방지하는 효과가 있음. 비특이적 반응을 최소화함으로써 배경 신호를 감소시킬 수 있고, 이는 신호의 감별성을 향상시킴. 실제로 Tween20의 사용여부에 따라 신호를 비교하였을 때 Tween20을 첨가한 buffer에서 배경 신호가 낮게 나타나는 것을 확인하였음.

- *L.monocytogenes* 농축 조건 최적화

: *Listeria*의 경우 다른 두 종균에 비해 감도가 매우 낮은 문제점이 발생하였기 때문에 별도의 감도 향상을 위한 전략이 필요하였음. 우선, 항체 pair 테스트를 통해 선별된 조건 중 농축 시 가장 효율이 좋은 최적의 pair를 선정하는 과정이 시행되었음.

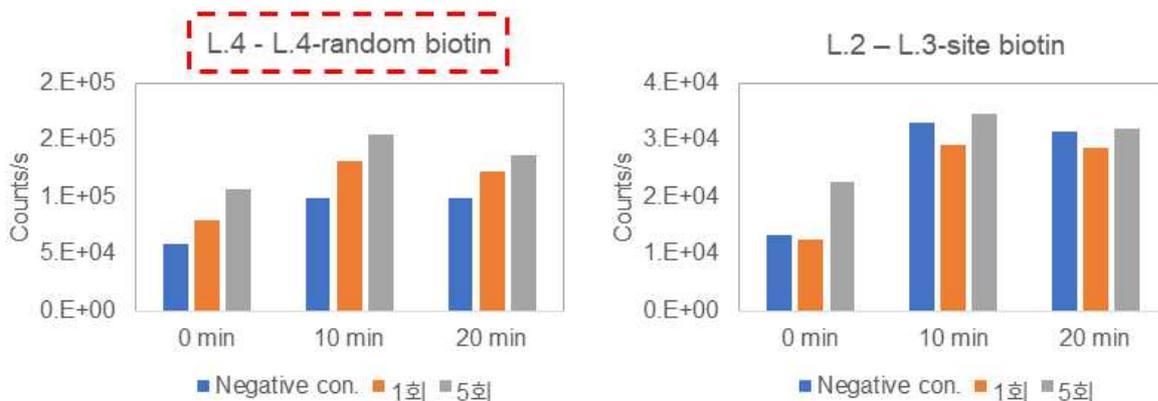


그림 12. *Listeria*의 항체 pair 최종 선정 테스트

선별되었던 두 조건의 항체 pair를 적용하였을 때, L.4가 중합된 magnetic bead를 이용하고 random 방식으로 biotin이 표지된 L.4를 detection 항체로 사용한 경우에서 감도 및 재현성이 가장 양호하였음.(그림 12.) 또한 감도의 향상을 위하여 기존에 발색을 통해 결과를 확인하던 방식에서 발광 신호를 통해 결과를 확인하는 전략을 적용하였음. 효소-기질 반응시 발색 신호를 얻기 위해 TMB를 사용하였던 기존 방식 대신 luminol을 사용함으로써 발광 신호를 측정하였으며, 이를 통해 훨씬 민감한 감도를 얻을 수 있었음.

해당 조건에서 감도를 보다 증가시키기 위하여 detection 항체에 중합하는 biotin의 종류를 추가적으로 테스트하였고, 비교적 biotin linker의 길이가 길게 형성되어 있는 NHS-PEG12-biotin을 사용한 항체를 적용하였을 때 감도가 향상되는 효과를 확인하였음.(그림 13.좌) 해당 항체를 sandwich ELISA에 적용하였을 경우에도 동일 조건에서 배경 신호 증가 없이 감도가 상승하는 것을 확인할 수 있음.(그림 13.우)

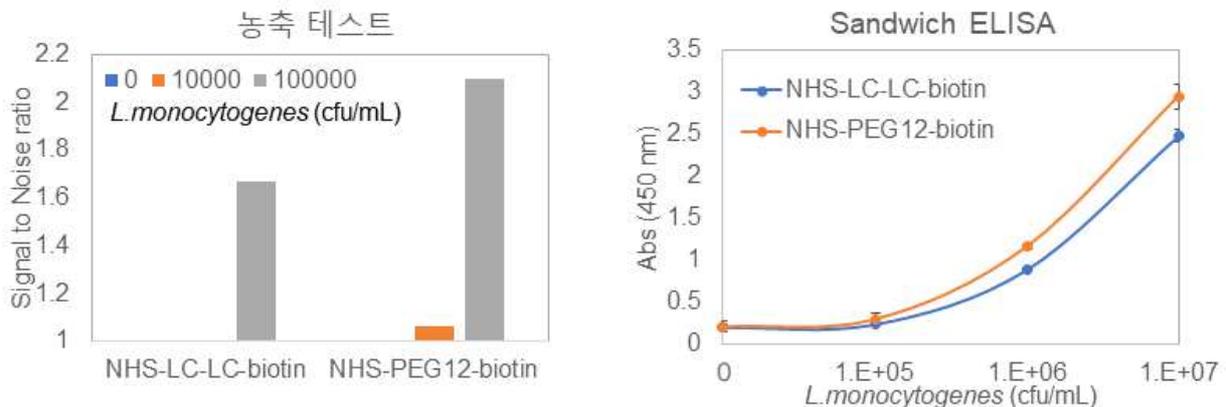


그림 13. Long linker biotin을 이용한 검출 감도 증가 테스트

Long linker biotin을 사용할 경우 항체와 biotin 사이에 일정 범위의 공간이 확보되어 steric hindrance 현상을 감소시킴으로써 이후 SA-HRP와의 반응 효율을 증가시킬 수 있음. 이는 본 농축테스트와 같이 액상에서 이루어질 경우 그 효과가 더욱 현저함. 또한, 해당 전략에서 적용된 NHS-PEG12-biotin의 경우 PEG(polyethylene glycol)에 의해 친수성을 가짐으로써 표지된 항체의 응집 현상을 감소시키는 효과가 있음. 때문에 detection 항체에 표지하는 biotin으로 NHS-PEG12-biotin을 최종 선정하였음. 이후 농축 공정 시행 시 각 균의 검출 감도를 반영하여 magnetic-bead 중합체 및 항체-biotin의 사용량 등 세부적인 조건들을 최적화하였음. 테스트를 통해 구축한 3종 식중독균에 대한 농축 공정은 이후 신호 증폭을 위해 제작한 SA-HRP와 함께 적용하여 본 연구에서 계획한 목표를 달성하고자 하였음.

## 다. 검출 신호 증폭을 위한 신호체 제작

: 본 연구 개발 시스템에서의 검출 감도를 증가시키기 위해 Streptavidin-Horseradish peroxidase(SA-HRP)을 자체 제작하였으며, 이 경우 신호 증폭을 위해 다음의 4가지 전략을 시도하였음.

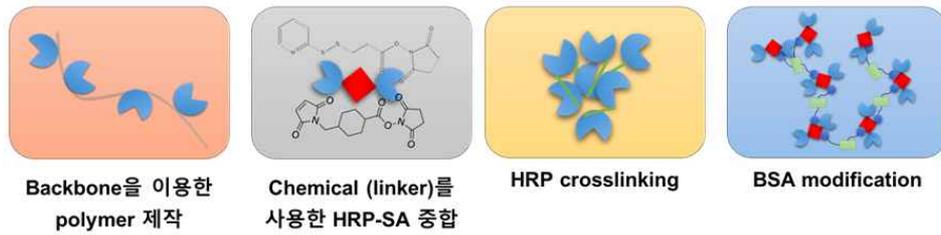
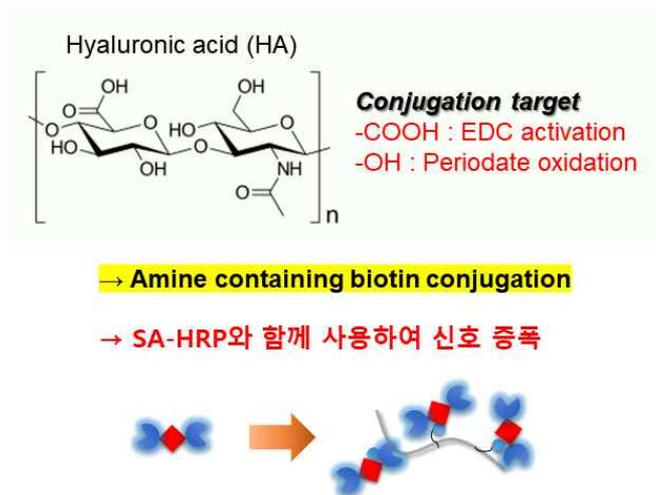


그림 14. 검출 신호 증폭을 위한 SA-HRP 중합 전략

### (1) 고분자 backbone을 이용한 polymer 제작

: 해당 전략에서는 hyaluronic acid(HA)를 backbone으로 활용하여 biotin을 가장 효율적으로 중합할 수 있는 조건을 test 하였음. Biotin이 다량으로 중합된 hyaluronic acid를 SA-HRP와 함께 사용할 경우 SA-HRP 다발체를 형성하여 신호의 증폭 효과를 얻을 수 있을 것으로 예상하였음.



본 연구에서는 HA의 carboxyl group(-COOH)과 hydroxy group(-OH) 두 가지 부위를 중합의 표적으로 선정하였는데, 표적 부위에 따라 biotin의 중합 방법이 다르게 적용되었음. Carboxyl group에 biotin을 중합하는 경우 HA의 EDC activation 과정을 거친 후 작용기로 amine을 가지고 있는 biotin과 결합하는 방식을 적용할 수 있음. HA의 hydroxy group을 이용하는 방식에서는 periodate를 이용한 산화 반응을 통해 aldehyde를 형성하여 amine과 결합할 수 있게 하였음.

- EDC activation

: EDC activation을 이용한 전략의 경우 amine과의 결합 효율을 향상하기 위해 NHS를 추가적으로 사용할 수 있는데, 이의 효과를 확인하기 위해 NHS 사용량과 반응 방식에 따른 biotin의 중합 효율을 비교하고자 하였음. HA에 EDC와 NHS를 동시에 반응시킨 후 biotin을 중합하는 방식과 EDC반응 완료 후 NHS와 biotin을 함께 반응시키는 방식을 비교하였으며, 이때 biotin 중합 전 잔여 EDC 및 NHS의 제거 여부를 변수로 두었음. 중합 방식은 총 4가지이며 아래 그림의 순서로 이루어졌음. 모든 조건에서 EDC와 NHS는 3가지 비율로 사용되었으며, HA과 biotin의 중합은 SA과의 반응성 테스트를 통해 확인되었음.

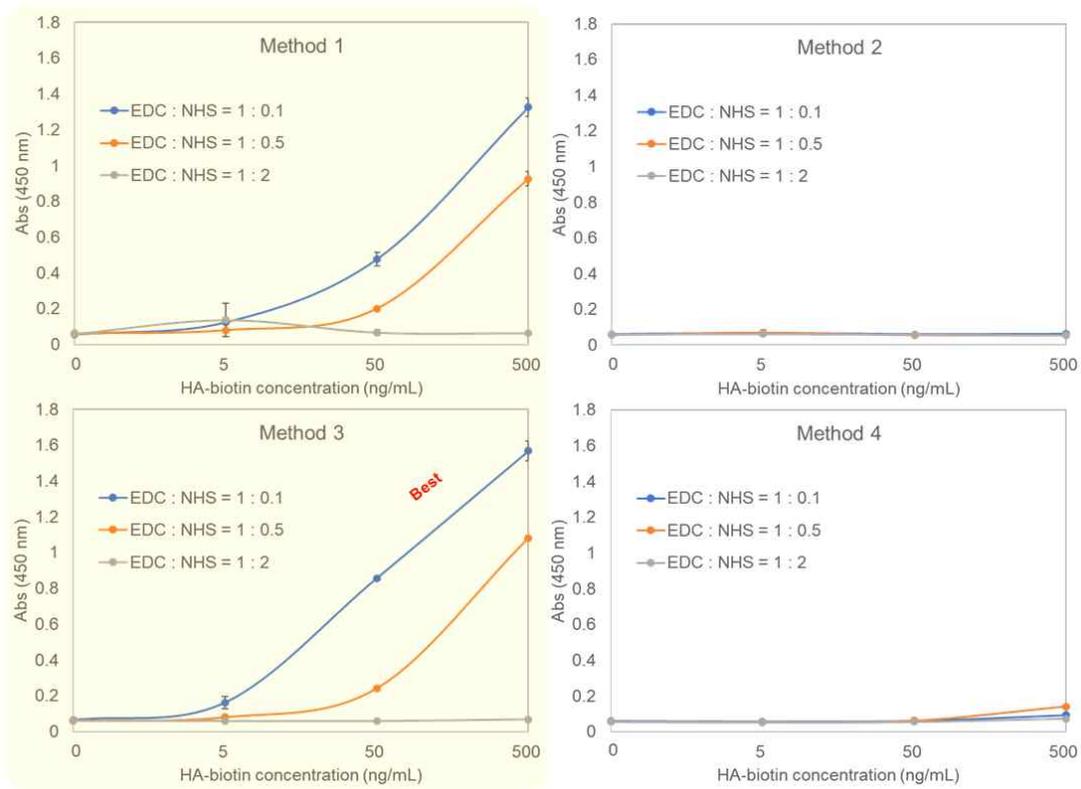
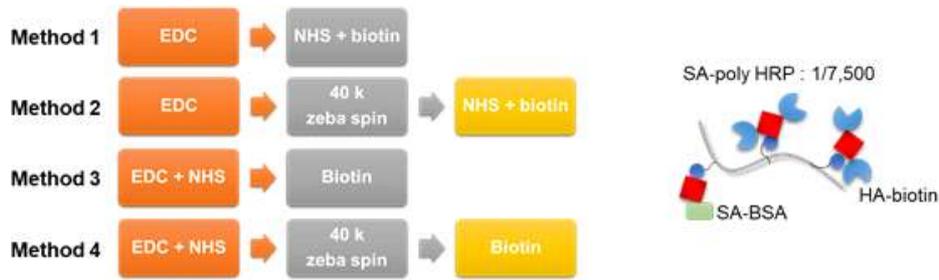


그림 15. EDC activation을 통한 HA-biotin 중합 방식 테스트

중합 방식에 따라 중합체를 비교해보았을 때, 잔여 EDC와 NHS를 제거한 후 biotin을 중합한 method 2,4는 중합이 거의 이루어지지 않은 것으로 확인됨. EDC와 NHS를 동시에 HA에 반응시킨 method 3의 방식이 가장 양호한 결과를 보이며, 그 중 NHS의 사용량이 적을수록 biotin의 중합 효율이 좋은 것을 확인하였음.(그림 15.) 해당 테스트를 통해 EDC activation을 이용한 HA의 biotin 중합 방식은 method 3의 방식으로 선정하였으며, NHS의 사용량에 대해 추가적인 실험을 진행하였음.

앞선 테스트 이후 EDC activation 전략의 중합 조건을 최적화하기 위해 NHS의 사용량과 biotin의 종류에 따른 중합 효율 비교테스트를 시행하였음.

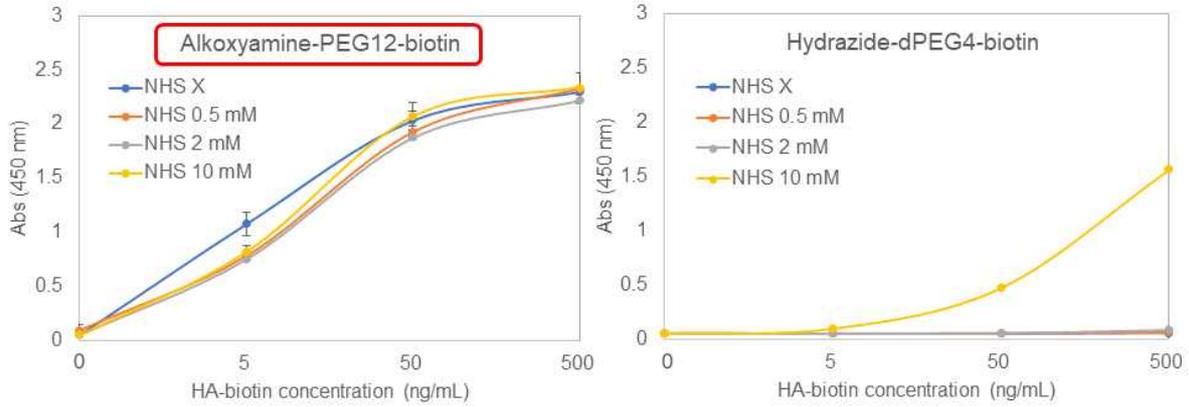


그림 16. NHS 사용량과 biotin 종류에 따른 중합 효율 테스트

Amine을 포함하고 있는 두 가지 biotin 제품을 적용한 결과, alkoxyamine-PEG12-biotin이 hydrazide-dPEG4-biotin에 비해 중합 효율이 확연히 좋은 것을 확인할 수 있었음. 또한 alkoxyamine-PEG12-biotin의 경우 NHS의 사용량에 따른 중합 효율의 차이가 거의 관찰되지 않으며, 오히려 사용하지 않은 경우에서 신호가 가장 강했음.(그림 16.) 이는 고분자인 HA과 biotin이 중합하는 과정에서 상대적으로 linker의 길이가 더 긴 alkoxyamine-PEG12-biotin이 HA 표적부위와의 접근성이 더 유리했을 것으로 판단됨. (Alkoxyamine-PEG12-biotin: 55.4Å / Hydrazide-dPEG4-biotin: 20.6Å) 때문에 EDC activation 전략에서는 alkoxyamine-PEG12-biotin을 NHS 사용 없이 중합하는 조건을 최종 선정하였음.

- Periodate oxidation

: Periodate를 이용하여 hydroxy group(vicinal diol type)을 산화시켜 amine과의 결합을 진행할 경우, 안정적인 결합을 형성하기 위해 sodium cyanoborohydride를 일반적으로 사용함. 본 연구에서는 HA를 산화시키기 위한 sodium *meta*-periodate( $\text{NaIO}_4$ )와 sodium cyanoborohydride( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ )의 사용량을 변수로 biotin 중합 조건을 테스트하였음.

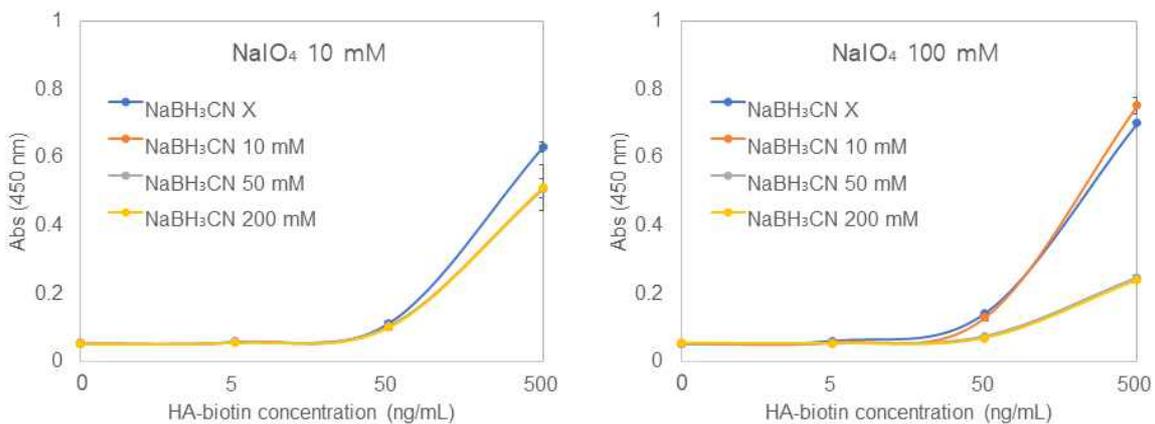


그림 17.  $\text{NaIO}_4$  와  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ 의 사용량에 따른 HA-biotin 중합 효율 테스트

그 결과  $\text{NaIO}_4$  를 100 mM로 적용한 HA가 biotin과의 중합 효율이 상대적으로 좋았으며,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ 을 많이 사용할수록 biotin 중합은 오히려 저하되는 경향을 보임.(그림 17.)  $\text{NaIO}_4$  의 농도가 높을수록 aldehyde의 형성 효율이 향상되어 amine과의 반응성이 높아지는 것으로 파악되며, 이후  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ 의 적용은 HA의 구조에 영향을 미치거나 잔여 물질 제거 과정에서 손실을 유발하는 것으로 추정됨. 때문에 HA을 산화시켜 biotin을 중합 시  $\text{NaIO}_4$  는 100 mM로 사용하고,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ 는 적용하지 않는 조건으로 선정하였음.

- HA-biotin 중합 최적화

: 앞서 EDC activation과 periodate oxidation 두 가지 전략의 중합 조건 테스트 결과를 토대로, 최적화된 두 전략을 함께 적용하여 biotin의 중합 효율을 최대치로 향상시키고자 실험을 진행하였음. EDC activation을 통한 biotin 중합 후 periodate oxidation을 통해 biotin을 추가로 중합하는 방법과, 반대로 periodate oxidation 방식 진행 후 EDC activation을 적용하는 방식을 비교하였음.

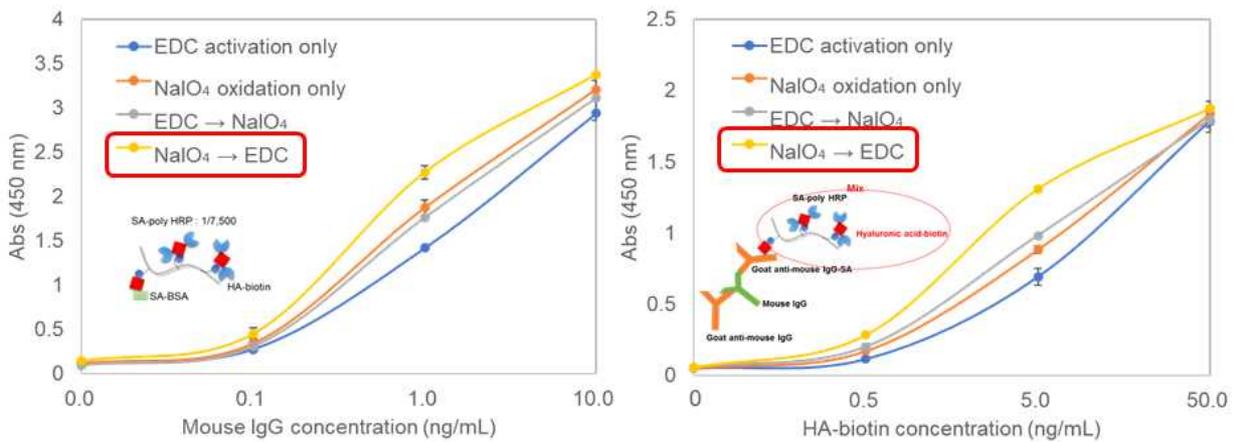


그림 18. HA와 biotin의 중합 효율을 높이기 위한 두 가지 방식의 동시 적용 테스트

두 방식 모두 한 가지 방식만 적용하여 biotin을 중합한 경우보다 biotin의 부착 개수가 증가한 것을 확인하였음. 실제 면역분석에 적용하였을 경우, periodate oxidation이후 EDC activation을 통해 biotin을 추가로 중합한 HA-biotin의 성능이 가장 좋은 것을 확인하였음. (그림 18.) HA에 부착된 biotin의 개수가 많을수록 이후 SA-HRP와의 반응 효율이 좋을 것으로 예상되기 때문에 biotin의 중합량이 가장 많은 해당 조건을 최종 선정하였음.

- HA-biotin의 면역분석 적용 전략

: 중합이 최적화된 HA-biotin을 SA-HRP와 함께 면역분석에 적용하여 SA-HRP를 단독으로 사용한 조건보다 신호가 증폭하는 조건을 찾하고자 실험을 시행하였음. 실험은 sandwich ELISA에서 biotin이 표지된 detection 항체와 SA-HRP 반응 후 HA-biotin과 SA-HRP를 추가로 적용하는 방식으로 진행되었으며, 이 때 SA-HRP와 HA-biotin의 양을 조절하여 신호를 비교하였음.

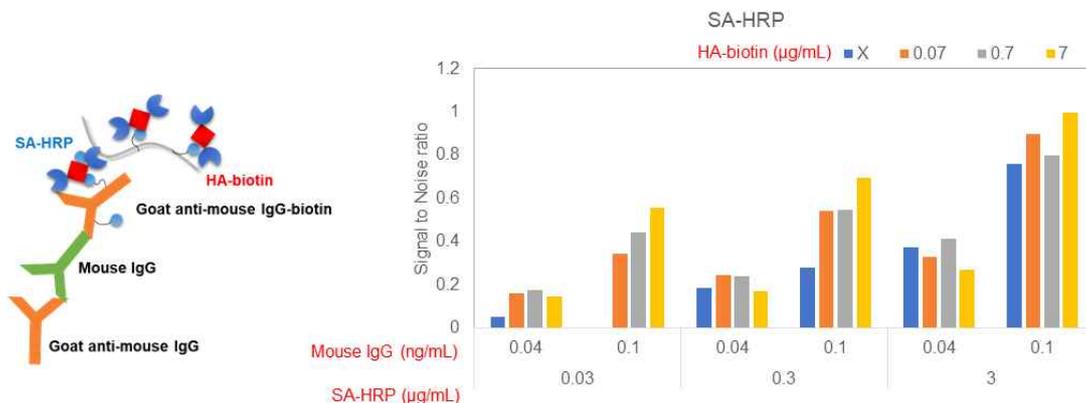


그림 19. HA-biotin의 면역 분석 적용

그림 19의 결과 그래프로 보았을 때, SA-HRP의 사용량이 적은 경우에는 HA-biotin을 적

용함으로써 감도가 증가하는 효과를 보이지만, SA-HRP를 일정량 이상 사용하고 표적 항원의 농도가 낮은 경우에는 오히려 HA-biotin의 사용이 감도를 저하시킬 우려가 있음. 해당 전략을 통해 SA-HRP를 과량으로 사용하지 않는 조건에서 어느 정도의 신호 증폭 효과를 얻을 수 있는 가능성을 얻을 수 있었음.

## (2) Chemical cross-linker를 사용한 SA-HRP 중합

: Heterobifunctional crosslinkers를 이용하여 SA과 HRP를 중합하는 방식을 test 하였으며, 해당 과정에서 SA과 HRP의 중합 비율, linker의 종류 등의 조절을 통해 중합 조건을 최적화하였음.

- SA : HRP의 중합 비율

: Crosslinker를 SA과 HRP에 사용하는 해당 전략에서는 HRP에 LC-SMCC를, SA에 LC-SPDP를 각각 적용하였음. 두 linker 모두 NHS ester를 가지고 있기 때문에 단백질의 amine과 결합력을 가져 SA과 HRP 각각에 중합이 가능함. 또한 LC-SMCC의 경우 maleimide를 작용기로 갖는 linker로 LC-SPDP가 환원된 후 형성하는 sulfhydryl group과 반응성을 가져 결과적으로 각 linker가 부착된 SA과 HRP의 중합이 가능하게 함. 이 때 SA과 HRP를 중합하는 과정에서 각각의 비율을 조절하여 중합체를 최적화하고자 하였음.

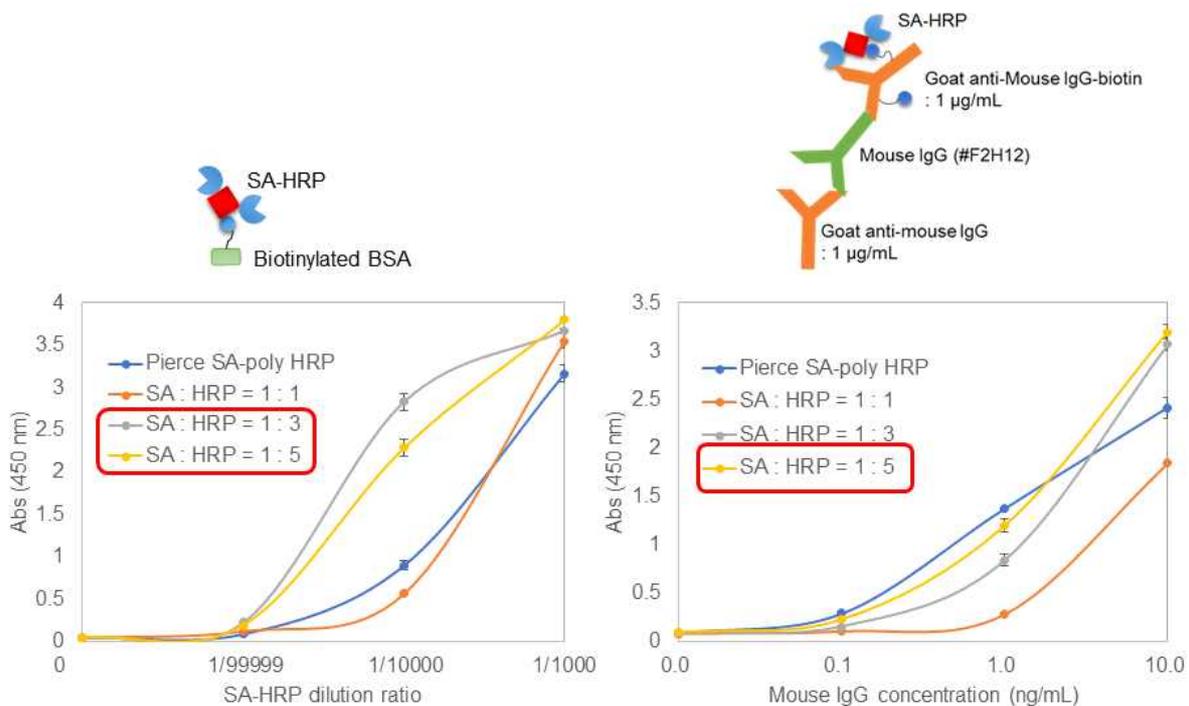


그림 20. SA 및 HRP 중합 비율에 따른 중합체의 성능 비교

제작한 중합체는 BSA-biotin과의 반응성 및 면역분석 적용 시의 효율을 비교함으로써 평가하였음. 그 결과 SA : HRP = 1 : 5의 비율로 제작한 중합체가 가장 성능이 우수하였고, 상용화 제품(pierce SA-poly HRP)와 유사한 수준의 신호를 얻을 수 있었음.(그림 20.) 이는 HRP의 사용량을 증가시킴으로써 하나의 SA에 결합되는 HRP의 양이 증가되는 것을 의미함. 하지만 일정 수준 이상으로 HRP를 사용할 경우, 반응에 참여하지 못하고 남게 되는 HRP의 양이 증가하게 되고 이의 제거가 까다롭기 때문에 과량으로 중합하지 않았음.

- Linker의 종류 및 사용량

: 중합에 사용되는 crosslinker의 길이는 중합체가 분석 과정에 적용되었을 때의 효율에 영향을 미칠 수 있음. 이의 영향을 확인하기 위하여 HRP와 SA에 적용하는 각각의 linker

를 아래의 표 3.과 같이 종류별로 테스트하였음.

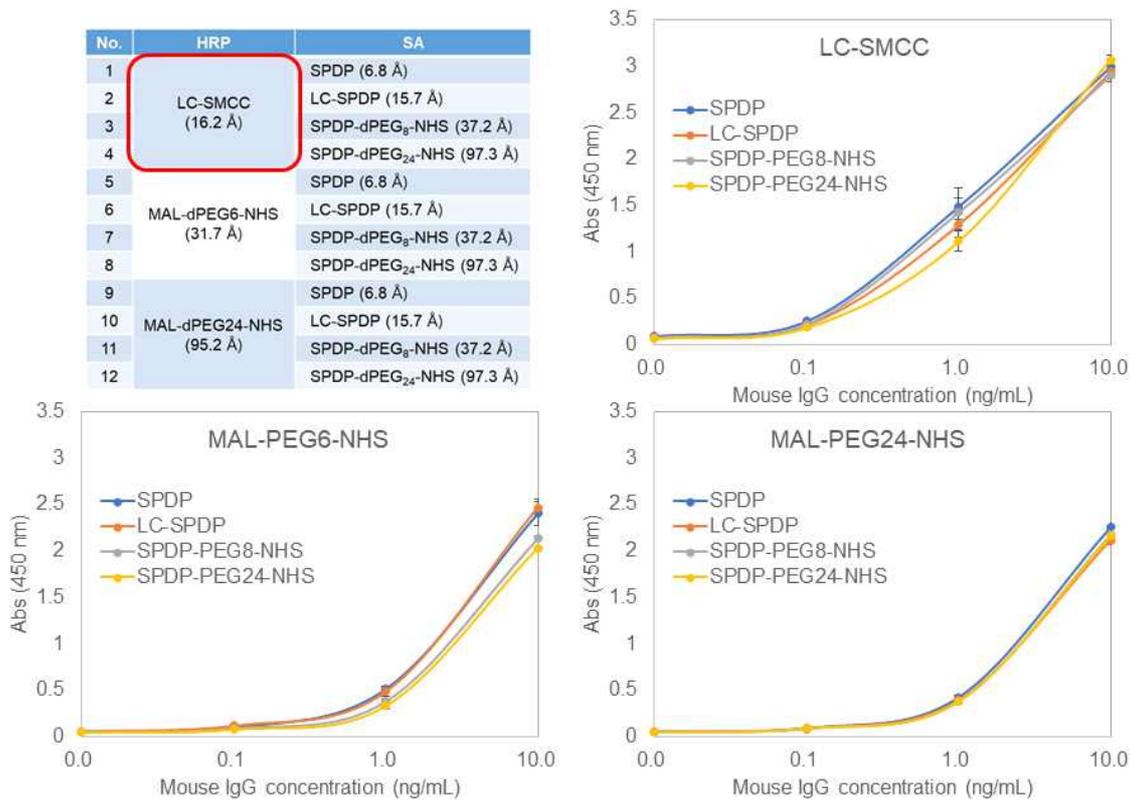


표 3. SA-HRP 중합에 적용된 linker의 종류와 그림 21. 그에 따른 중합체의 성능 비교

HRP 적용된 maleimide modified linker의 경우 LC-SMCC를 사용하는 것이 중합체의 효율이 가장 좋고 SA에 사용되는 SPDP linker의 종류는 결과에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 확인되었음. Linker의 길이가 길수록 중합체 적용 시 steric hindrance와 같은 방해 요소가 최소화되어 효율이 향상될 것으로 기대하였지만, 오히려 긴 linker를 사용할수록 효율이 약간 저하되는 경향을 보임.(그림 21.) 이를 토대로 HRP에 적용하는 linker는 LC-SMCC로 SA에는 SPDP와 LC-SPDP를 각각 적용하여 추가 조건 테스트를 진행하였음.

Linker의 종류를 선정된 후 SA 및 HRP에 각각 적용되는 양을 조절하여 중합 조건을 최적화하고자 하였음. 아래의 표 4.와 같이 LC-SMCC와 LC-SPDP를 각각 대상 단백질의 20x 또는 50x로 중합하였으며, 중합체의 성능은 면역분석에 적용함으로써 확인하였음.

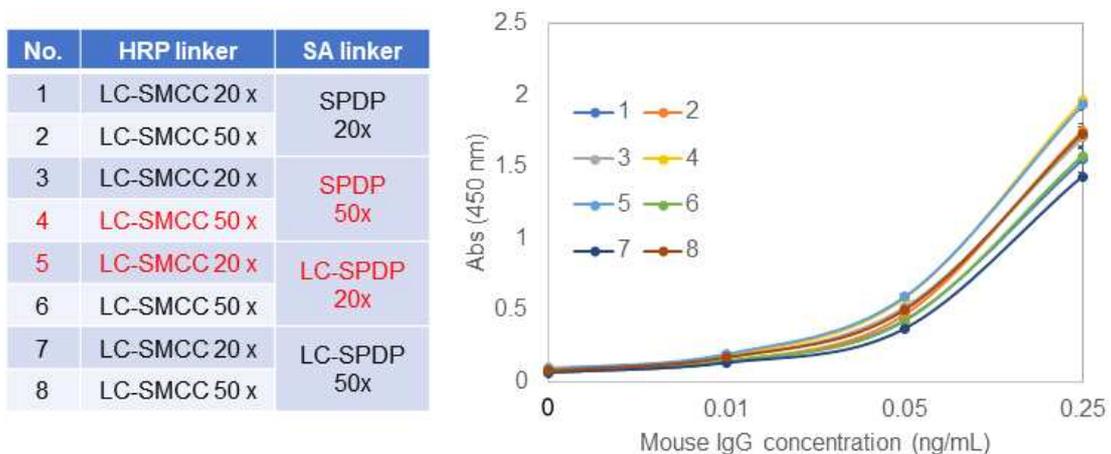


표 4. SA-HRP 중합에 적용된 linker의 사용량과 그림 22. 그에 따른 중합체의 성능 비교

그 결과 제작한 중합체를 동량 적용하였을 때 두 linker 모두 중합 대상 단백질의 20x로 사용하는 것이 가장 적합하였음.(그림 22.) 각 조건에서의 성능 차이가 크지 않기 때문에 사실상 각 linker를 20x로 적용하는 것이 각 단백질량에서 최대치인 것으로 판단됨. 해당 조건을 최종 조건으로 선정하여 SA-HRP를 제작하였고, 이후 실험에 적용하여 사용하였음.

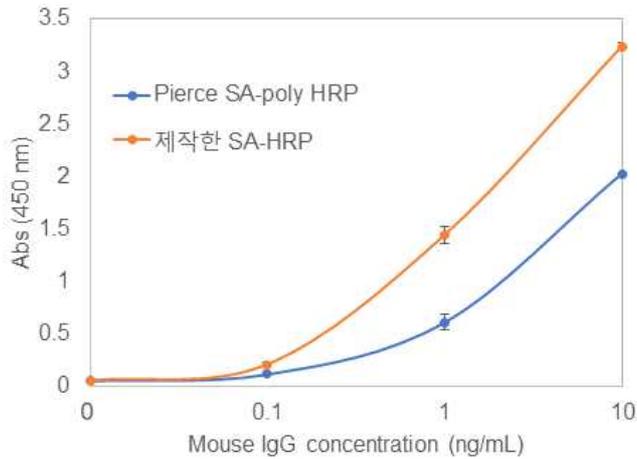


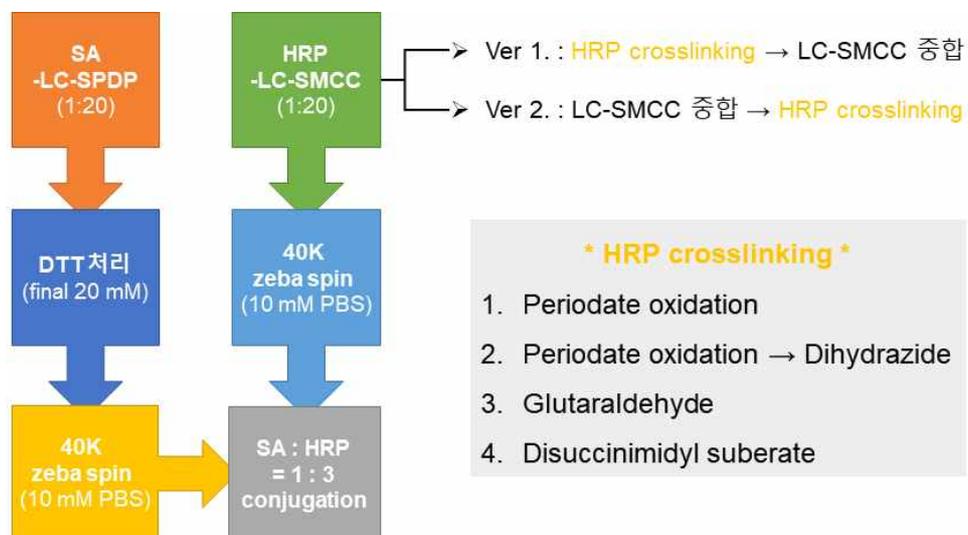
그림 23. 제작한 SA-HRP와 상용화 제품의 면역 분석 적용

최종 선정한 조건으로 제작한 SA-HRP를 상용화 제품인 pierce SA-poly HRP와 동일 조건으로 면역분석에 적용하여 성능을 비교하였을 때, 본 연구를 통해 제작한 SA-HRP를 적용한 조건이 상용화 제품의 경우보다 감도가 향상된 것을 확인하였음.(그림 23.) 이와 같은 방식의 중합체는 중합 방식이 간단하고 반복 실험을 진행하였을 때 다른 전략에 비해 재현성이 우수하다는 장점이 있어 본 연구 뿐만 아니라 다양한 면역분석에도 적용이 가능함.

### (3) HRP crosslinking

: HRP를 crosslinking을 통해 HRP 다발체를 우선 형성한 후 SA-HRP를 제작하여 기존 SA-HRP 대비 신호의 증폭 효과를 얻고자 test를 시행하였음.

- HRP crosslinking test



: HRP crosslinking 전략은 1. HRP의 periodate oxidation을 통한 HRP 사이의 crosslinking, 2. Oxidation된 HRP에 dihydrazide를 적용한 crosslinking, 3. Glutaraldehyde의 이용, 4. Disuccinimidyl suberate(DSS)의 이용 총 4가지 방식으로 테스트 되었음. 1,2번 방식은 HRP가 산화되어 형성된 aldehyde를 amine과 결합시키는 방법을 사용하였고, 3,4번의 경우 amine을 crosslinking 시킬 수 있는 시약을 사용하였음. 4가지의 방식으로 crosslinking된 HRP는 이후 SA과의 중합을 통해 성능을 비교하였으며, 중합은 앞서 linker를 이용한 SA-HRP의 중합 방법과 동일함. 다만, HRP의 crosslinking 시기를 LC-SMCC 중합 전후로 나누어 SA과의 중합을 시행하였음.

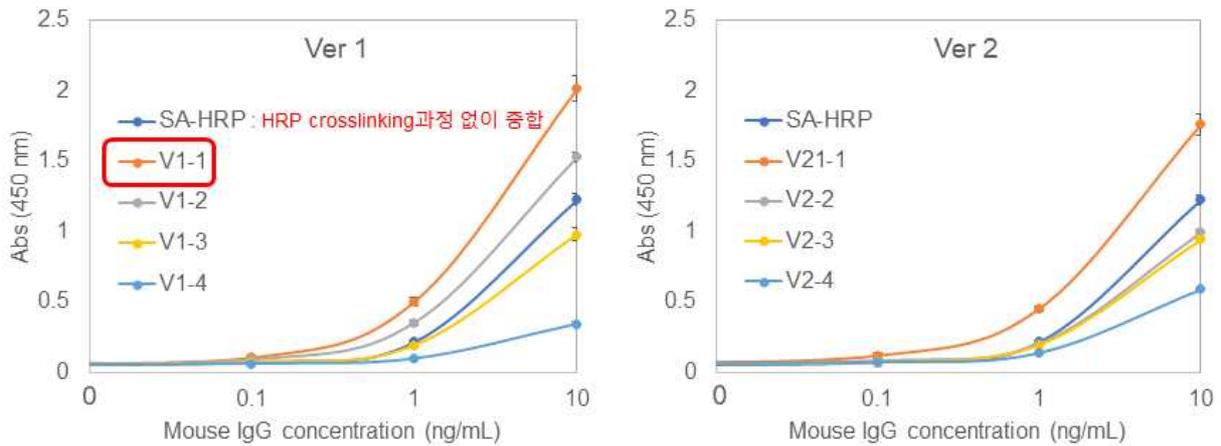


그림 24. HRP crosslinking 전략에 따른 효율 비교

Periodate oxidation 방식으로 crosslinking된 HRP를 적용한 SA-HRP의 경우 crosslinking 없이 제작한 SA-HRP에 비해 감도가 향상됨. 특히, HRP crosslinking을 먼저 시행한 후 LC-SMCC를 중합한 조건(Ver 1)의 중합 효율이 더 양호함. Amine crosslinking 시약을 사용한 3,4 방식의 경우 LC-SMCC와 HRP의 중합 효율에 영향을 미쳐 중합체의 성능이 저조한 것으로 추정됨. HRP의 amine을 표적으로 하여 crosslinking을 시행할 경우 HRP가 가지고 있는 amine이 소모되고 이로 인해 이후 LC-SMCC의 NHS-ester와 반응할 수 있는 기회가 줄어들기 때문으로 사료됨.

- Oxidated HRP 활성화 test

: Periodate oxidation을 적용한 HRP의 crosslinking 효과를 확인하였으나, 이후 테스트를 진행하면서 재현성이 저조하여 HRP의 활성을 확인하는 실험을 시행하였음. Oxidation이 HRP에 미치는 영향을 확인하기 위하여  $\text{NaIO}_4$  를 농도별 / 시간별로 처리하여 native HRP와의 효소 활성을 비교하였음.

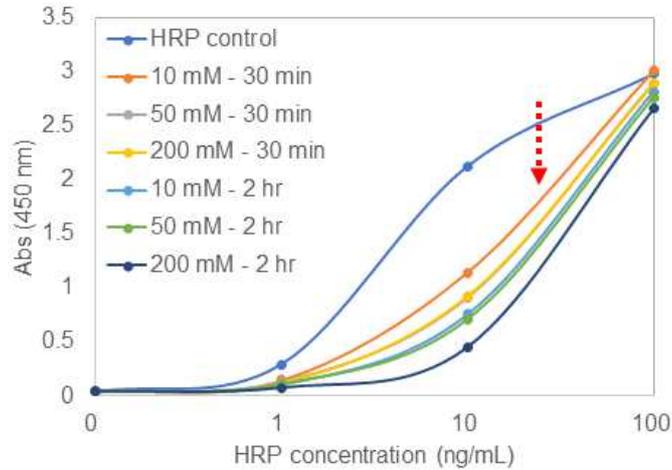


그림 25. HRP oxidation에 따른 활성 변화

그 결과 periodate의 사용량이 많고 반응 시간이 길수록 HRP의 활성이 감소되는 현상을 보였음.(그림 25.) Oxidated HRP를 이용하여 중합 수행 가능하나, HRP의 활성이 유지되지 않는 문제점이 발생하였기 때문에 해당 전략을 이용하기에 어려움이 있다고 판단하여 중단 하였음. 추가 연구를 통해 해당 문제를 보완할 수 있는 방법을 모색한다면, 신호 증폭을 위한 HRP 다발체를 제작할 수 있을 것으로 사료됨.

#### (4) BSA modification

: SA-HRP 다발체를 형성하기 위한 또 다른 전략으로 BSA-biotin을 활용하는 방식을 적용하고자 하였음. 이 때, BSA와 biotin이 최대 효율이 중합할 수 있는 방법을 모색하였음. BSA는 amine을 풍부하게 가지고 있고, 총 35개의 cysteine을 가짐. Cysteine은 기본 아미노산 중 유일하게 thiol기를 포함하고 있어 환원 시 free sulfhydryl group을 얻을 수 있음. BSA가 가지고 있는 35개의 cysteine 중 하나만이 환원된 상태이며, 나머지 34개는 산화되어 있는 상태로 17개의 disulfide bond를 형성하고 있음. 본 연구에서는 BSA의 이러한 특성을 이용해 amine과 cysteine을 모두 활용할 수 있는 방법을 테스트하였음.

- Chaotropic agents에 따른 BSA의 denaturation

: BSA의 cysteine을 환원시키기 전에 BSA의 구조를 denaturation시킴으로써 disulfide bond에 대한 접근성을 높이고자 하였으며, BSA denaturation 시 사용되는 chaotropic agent의 종류와 온도를 변수로 하여 테스트를 진행하였음. 일반적으로 chaotropic agent로 사용되는 SDS는 아미노산에 음전하를 추가시켜 단백질의 2차 및 3차 구조를 파괴함. 본 실험에서 적용한 또 다른 chaotropic agent인 guanidine·HCl는 단백질을 변성시키는 원리가 명확하게 밝혀지지 않았지만, 6M 정도의 guanidine·HCl 존재 하에 단백질은 고유 구조를 상실하고 무작위로 coil을 형성하는 것으로 알려져 있음. 또한 단백질에 일정 온도 이상의 열을 가할 경우 수소 결합 및 비극성 소수성 상호작용을 파괴함으로써 denaturation을 유도할 수 있음. BSA의 denaturation 이후 DTT처리를 통해 cysteine을 환원시키고 maleimide modified biotin인 BMCC-biotin을 중합하였음.

**BSA 1 mg/mL**

No.	Chaotropic agent	Heating
C	-	37°C
1	10 mM SDS	37°C
2	6 M Guanidine	
3	10 mM SDS	45°C
4	6 M Guanidine	
5	10 mM SDS	55°C
6	6 M Guanidine	
7	10 mM SDS	65°C
8	6 M Guanidine	
9	10 mM SDS	75°C
10	6 M Guanidine	
11	10 mM SDS	85°C
12	6 M Guanidine	
13	10 mM SDS	95°C
14	6 M Guanidine	

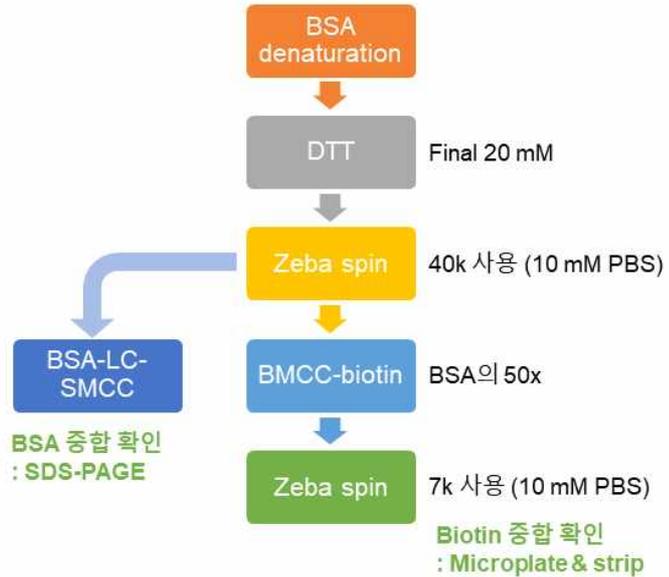


그림 26. BSA의 cysteine를 활용하기 위한 denaturation 및 biotin 중합 전략

BSA와 biotin의 중합을 확인하기 위해서 두 가지 확인 테스트를 진행하였음. 첫 번째는 SA이 고정된 microwell상에서 SA-HRP와의 반응을 통해 신호를 확인하는 방법이고, 두 번째 방법은 제작한 BSA-biotin을 membrane strip 상에 고정하여 SA-gold를 통해 결과를 확인하는 것이었음.

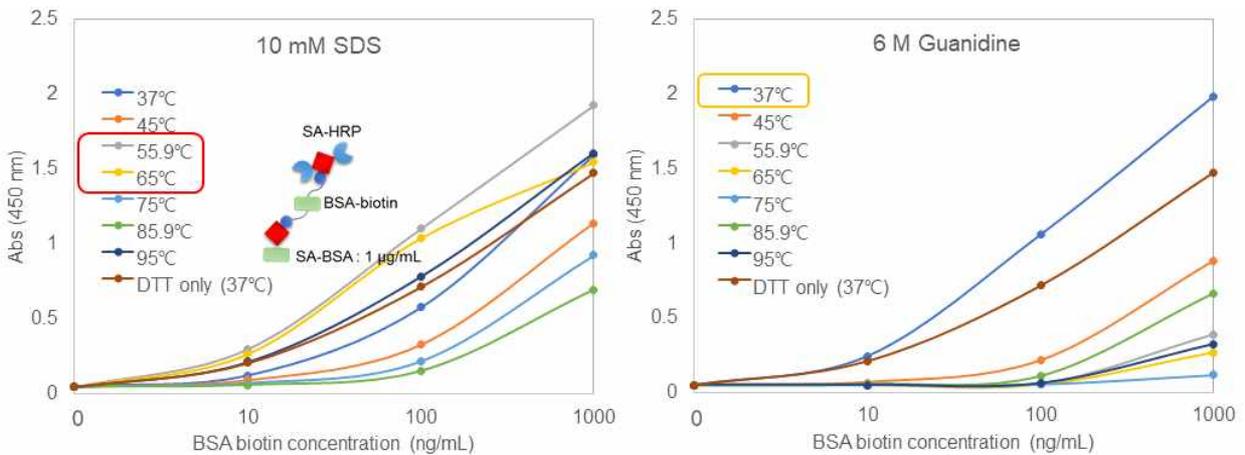


그림 27. Chaotropic agent 및 온도 변화에 따른 BSA-biotin 중합 효율 (microwell test)

Microwell상에서 시행한 실험 결과로 보았을 때, chaotropic agents로 10 mM SDS를 사용한 경우 56~65°C 또는 95°C로 heating하여 denaturation을 시행하는 것이 단순히 DTT만 처리하여 biotin을 중합한 것보다 중합 효율이 좋은 것으로 확인됨.(그림 27.) Guanidine으로 denaturation시에는 37°C보다 높은 온도로 heating시 이후 biotin과의 중합 효율이 저하되는 것을 알 수 있음.

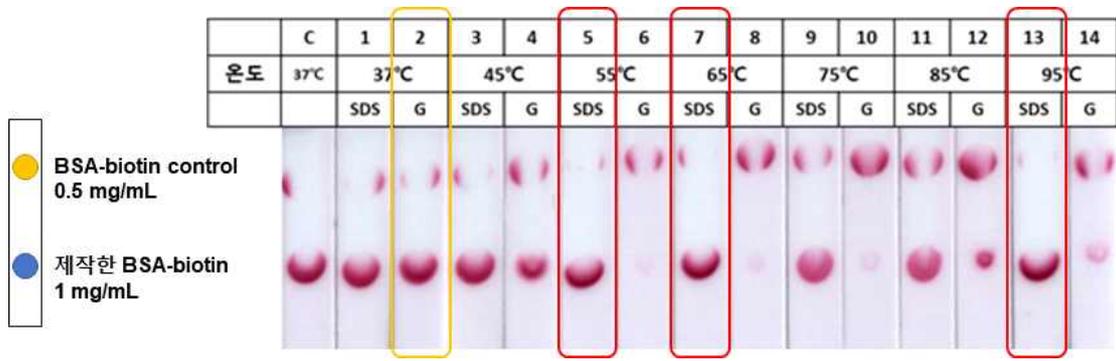


그림 28. Chaotropic agent 및 온도 변화에 따른 BSA-biotin 중합 효율 (Strip test)

Strip상에서도 거의 동일한 경향의 결과를 보이며, 온도의 영향은 guanidine이 적용된 조건에서 더 크게 작용하는 것으로 보임.

추가로 BSA의 denaturation 및 환원 후 maleimide와의 반응 효율을 비교하기 위하여 LC-SMCC가 표지된 BSA와 중합을 시행하였고 그 결과를 SDS-PAGE를 통해 확인하였음. BSA-BSA의 결합체가 많이 형성될수록 SDS-PAGE 상에서 관찰되는 BSA band의 변화가 클 것이기 때문에 이를 통해 각 조건에 따른 BSA의 denaturation 효율을 간접적으로 추정할 수 있음.

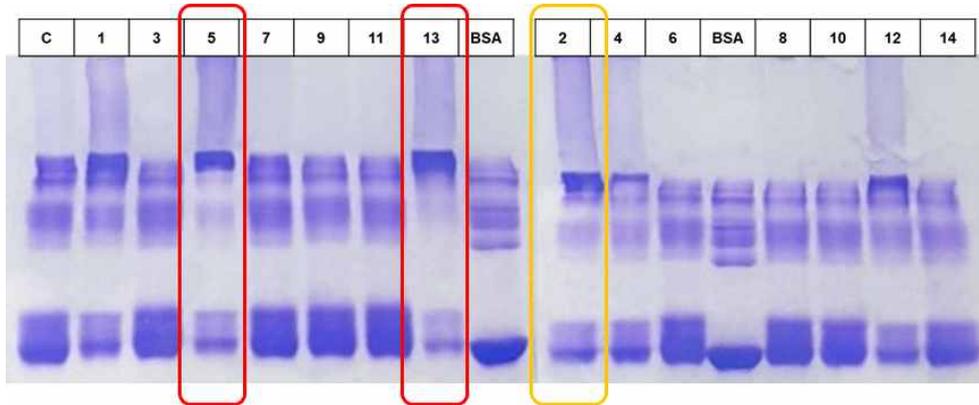


그림 29. Denaturation 된 BSA의 sulfhydryl group 형성 효율 비교

BSA에 BSA를 추가로 중합하여 SDS-PAGE를 시행한 결과, 앞서 BSA-biotin의 중합효율을 확인한 실험결과와 유사하게 chaotropic agents 및 온도의 영향이 확인됨.(그림 29.) SDS가 적용된 BSA는 55.9°C 및 95°C에서, guanidine 조성에서는 37°C에서 denaturation한 것이 이후 LC-SMCC가 부착된 BSA와의 반응성이 큰 것으로 보임. 이어 추가 실험을 통해 재현성이 확보된 SDS를 chaotropic agent로 선정하였고, 온도를 선정하기 위해 세부적인 테스트를 진행하였음.

BSA denaturation를 활용한 biotin의 중합을 최적화하기 위해 SDS를 적용한 조건에서 heating 온도를 조절하였고, cysteine 환원 시 사용되는 DTT의 농도를 선정하기 위해 테스트를 시행하였음. SDS를 통한 denaturation 과정 없이 DTT만을 사용한 조건에서는 온도를 37°C로 고정하였고, SDS 적용 시 60°C, 95°C 두 가지 온도에서 denaturation을 진행하였음. DTT는 5, 20, 60 mM로 사용하여 이후 BMCC-biotin과의 중합 효율을 microwell 상에서의 분석을 통해 비교하였음.

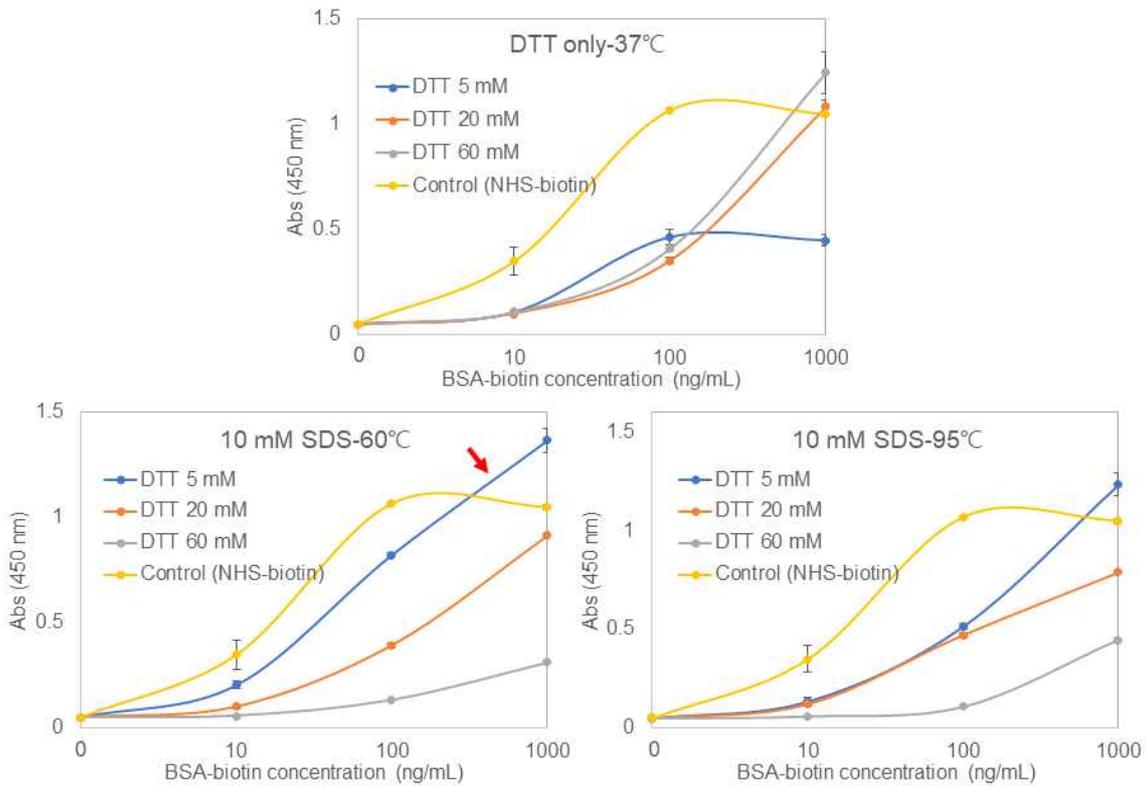


그림 30. BSA denaturation 조건 선정 테스트

BSA의 cysteine을 표적으로 한 biotin 중합 전략의 효율을 평가하기 위해 BSA의 amine부위에 biotin을 부착한 조건(NHS-biotin)과 성능을 비교하였음. 그림 30의 그래프로 보았을 때, 모든 조건에서 NHS-biotin을 사용한 조건에 비해 biotin 중합량이 적은 것을 알 수 있음. 하지만, BSA 자체가 가지고 있는 amine과 cysteine의 양적 차이가 존재하기 때문에 가장 biotin 중합량이 많은 조건을 선정하여 활용하고자 하였음. 즉, BSA의 amine과 cysteine을 각각 최대로 활용하면 개별적으로 biotin을 중합한 경우에 비해 biotin 중합량이 증가할 수 있음. 총 6가지의 변수 중 10 mM SDS 첨가 후 60°C에서 heating한 BSA가 BMCC-biotin과의 중합 효율이 가장 좋은 것으로 확인되었으며,(그림 30의 화살표) 이를 토대로 BSA에 biotin을 최대치로 중합할 수 있는 방법에 대해 추가적으로 테스트가 진행되었음.

- BSA의 cysteine 및 amine 활용

: 앞서 BSA의 cysteine을 표적으로 한 biotin 중합 조건을 최적화하였기 때문에, 이에 추가로 BSA에 많이 존재하는 amine에 biotin을 함께 중합하는 전략을 시도하였음. Biotin 중합은 cysteine을 대상으로 먼저 진행 후 amine에 추가 중합을 시행하는 방법과(그림 31.), 반대로 amine에 biotin 우선 중합 후 cysteine을 활용하는 방법을 비교하였음.(그림 32.)

**BMCC → NHS**

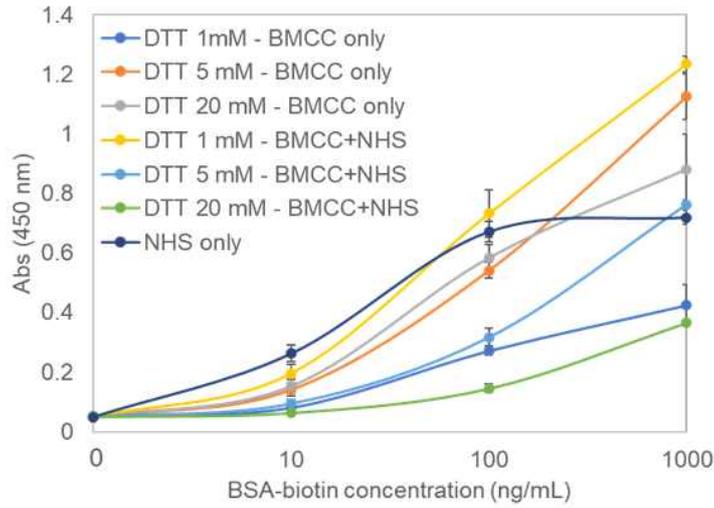
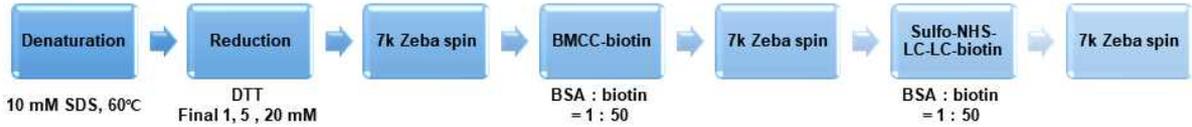


그림 31. BSA biotin 중합 최적화 : Cysteine → Amine

그림 31.의 그래프로 보았을 때, BMCC-biotin을 중합하는 경우에는 DTT의 사용량이 5 mM이상인 경우 중합 효율이 좋으나, 이후 NHS-biotin을 중합한 경우 오히려 성능이 저하되는 현상을 보임. 1 mM DTT를 적용한 BSA는 BMCC-biotin과의 중합 효율은 낮으나, 이후 NHS-biotin의 중합량이 확연히 많은 것을 알 수 있음. BSA에 BMCC-biotin 중합 후 NHS-biotin을 추가적으로 중합하는 과정에서 BSA의 구조에 영향을 미쳐 SA과의 반응 효율에 영향을 미치는 것으로 추정됨.

**NHS → BMCC**

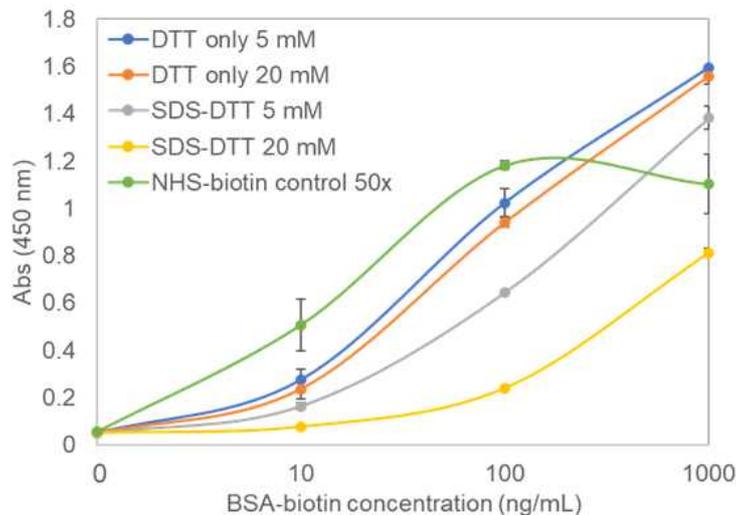
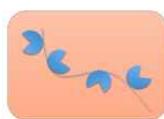


그림 32. BSA biotin 중합 최적화 : Amine → Cysteine

그림 32와 같이 NHS-biotin이 중합된 BSA를 denaturation 및 환원하여 BMCC-biotin의 추가 중합을 시도한 경우, 오히려 DTT 및 SDS의 사용량이 많을수록 SA과의 반응성이 저하되는 현상을 보임. 이 또한 denaturation과 환원 과정에서 발생하는 BSA의 구조 변화에 의한 것으로 판단됨. 또한, 해당 전략과 같이 여러 단계를 거쳐 중합이 진행되는 경우, 잔여 물질을 반복적으로 제거하는 과정에서 단백질의 손실 또한 증가할 우려가 있음.

BSA modification 전략의 경우 native BSA의 amine을 표적으로 하여 NHS-biotin만을 단독으로 중합하는 방식에 비해 biotin 부착 효율이 향상되는 조건을 얻기 어려운 것을 판단되어 해당 전략은 보류하였음.

최종적으로 신호 증폭을 위한 4가지 전략 중 가장 효과적인 방법은 linker를 이용한 SA-HRP 중합체 제작으로, 해당 중합체를 농축 공정에 함께 적용하여 감도를 향상시키고자 하였음.



Backbone을 이용한 polymer 제작

- Hyaluronic acid의 두가지 작용기를 이용하여 biotin을 중합할 경우 biotin을 최대한으로 중합 가능하지만, 이를 적용하여 분석 감도 증가의 효과를 극대화하기는 어려움



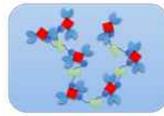
Chemical (linker)를 사용한 HRP-SA 중합

- 중합 방식을 최적화한 자체 제작 SA-HRP를 동일 조건으로 면역분석에 적용하였을 때, 비교 제품에 비해 감도가 증가하는 효과를 얻을 수 있었음



HRP crosslinking

- HRP를 oxidation하여 crosslinking이 가능한 것을 확인하였지만, HRP의 활성에 영향을 미치기 때문에 신호 증폭에 적용하기에 적절하지 않음



BSA modification

- BSA를 reduction / denaturation 시켜 활용 시 cysteine을 활용할 수 있는 효과가 있지만, BSA에 풍부하게 존재하는 amine을 단독으로 활용하는 것에 비해 효과를 얻지 못함

## 라. 분석 시스템의 최종 감도

: 항체-자성비드 기반의 농축 공정 및 최적화된 SA-HRP 중합체를 적용하여 3종균에 대한 검출 테스트를 시행하였고 그 감도를 확인하고자 하였음. 공동연구기관이 구축한 liquid handling system에 적용하여 진행하였으며, 최적화 공정을 통해 최종 성능을 평가하였음.

항체-자성비드 중합체를 이용하여 각 대상균을 농도별로 측정하여 standard curve를 작성하였고, 농축 횟수에 따른 분석민감도 증가 효율을 산출하였음.

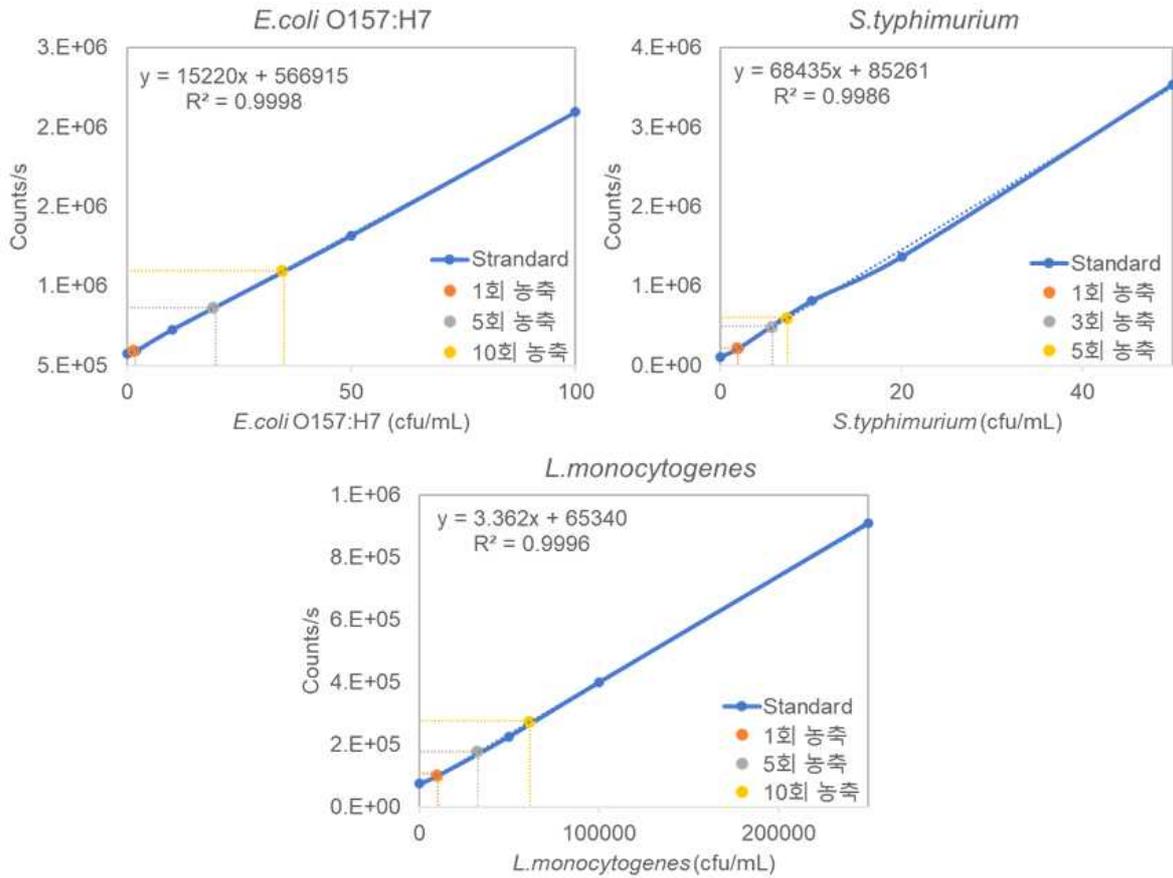


그림 33. 구축한 시스템을 통한 균의 검출 감도와 농축 효율

그 결과 *E.coli*의 경우 10회 농축 시 약 15배, *S.typhimurium*은 5회 농축을 통해 약 3.5배, *L.monocytogenes*는 10회 농축으로 6배 정도 감도가 증가하는 효율을 보였음. 농축 횟수에 비례하여 균 농축이 정량적으로 증가하지는 않았는데 이는 추후 농축과정에서의 liquid handling system의 면밀한 보완이 필요할 것으로 사료됨.

최종적으로 농축 과정 없이 각 magnetic bead 중합체를 이용한 분석 공정에서의 검출 감도는 *E.coli*와 *Salmonella*는 2 cfu/mL, *Listeria*는 10,000 cfu/mL이며, 이는 균의 배양과 농축을 통해 더욱 민감해질 수 있음. 각 균을 3시간 간격으로 배양한 후 농축 공정을 포함하여 시행하였을 때 얻을 수 있는 이론적 최종 감도는 다음의 표 5와 같음.

Bacteria	3시간 배양	농축	최종 감도
<i>E.coli</i> O157:H7	70배	15배 (10회)	약 1,050x
<i>S.typhimurium</i>	10배	3.5배 (5회)	약 13.5x
<i>L.monocytogenes</i>	30배	6배 (10회)	약 180x

표 5. 총 공정을 통한 3종균의 최종 검출 감도

*E.coli*와 *Salmonella*의 경우 구축한 magnetic bead를 이용한 면역분석 조건만으로도 목표치의 감도를 충분히 충족하는 상황이지만, *Listeria*는 배양과 농축 과정을 거처도 LOD가 약 55 cfu/mL 정도임. 이의 원인은 사용한 항체와 항원의 면역 반응성 영향이 가장 크며, 친화성이 높은 항체를 확보하여 적용할 경우 이는 상당 부분 보완될 것으로 예상할 수 있음.

## 마. 실제 식품을 이용한 검출 공정 테스트

: 과제계획서에는 제시하지 않았지만 본 연구를 통해 구축한 시스템을 실제 식품 시료를 대상으로 하여 향후 현장 적용 가능성을 평가하고자 하였음. 테스트 시행에 앞서 3종균의 검출 대상 식품을 선정하기 위해 검출 빈도 및 식중독 발생 빈도가 높은 식품군을 조사하였으며, 최근 식품 사고 관련 기사와 식약처의 통계를 기반으로 각 군에 대한 식품을 선정하였음.



최종 검출 대상으로 *S.typhimurium*-닭고기, *L.monocytogenes*-훈제연어, *E.coli* O157:H7-채소류를 선정하였으며, 농도를 알고 있는 3종의 균을 각각 농도별로 희석하여 식품에 적용하였음. 멸균수에 배지 90 mL, 식품 10 g 그리고 각 균을 일정량 접종한 후 충분히 균질화 시켜주었고, 이후 filter를 통과한 샘플 1 mL을 취하여 구축한 시스템을 통해 균을 검출하는 방식으로 테스트가 진행되었음.



그림 34. 식품 시료를 이용한 샘플 채취

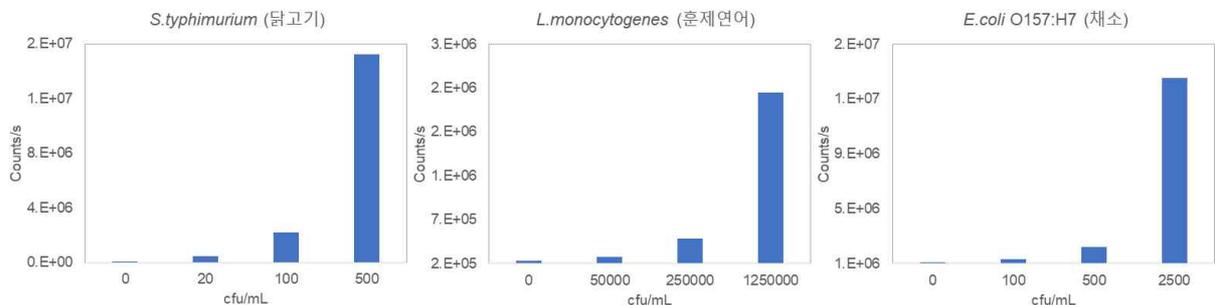


그림 35. 식품 시료를 적용한 검출 결과

실제 식품 시료를 대상으로 하여 검출 테스트를 진행한 결과, 3종균 모두 농도별로 신호를 확인할 수 있었음. *Salmonella* 20 cfu/mL, *Listeria* 50,000 cfu/mL, *E.coli*는 100 cfu/mL 이상부터 신호 감별이 가능했으며, 이는 균의 배양 및 농축의 과정이 적용되지 않은 결과임.(그

림 35.) 즉, 해당 감도는 앞서 연구내용에서 제시하였던 배양과 농축 공정을 통해 더욱 향상될 수 있음. 다만 앞서 최적 조건과 시스템 평가를 위해 사용하였던 LB 배지와 실제 식품 시료 간의 배양 정도의 차이는 있을 수 있지만 표 5.의 결과를 기반으로 본다면 각 균별로 수십배 ~ 수백배의 민감도 증가를 예상할 수 있으며, 이를 통해 구축한 시스템을 활용하여 식품에 저농도로 존재하는 식중독균을 민감하게 검출할 수 있는 가능성이 충분한 것으로 사료됨.

■ 현장 검증

짧은 과제기간으로 인해 충분히 진행하지 못했던 현장 실증을 통한 검증을 위해 현장에서 식품 샘플을 직접 수급 및 테스트 할 수 있는 식품관련 업체에서 필터 테스트를 진행하고자 함. 적용 대상은 본 과제를 위해 고객 니즈 조사를 진행했던 삼성 웰스토리, 롯데칠성음료, 동원 F&B등을 고려하고 있음. 이들 기관은 opinion leader 급으로 2개월 정도 공동으로 테스트하고, 그 결과를 reference로 하여 마케팅 tool로 활용하고자함.

**협동연구기관 : 비아이티밸류**

- 본 과제의 협동 기관인 비아이티밸류는 서두에서 밝힌 연구의 필요성의 기존 검사 시스템 장비의 단점을 보완하고 전처리가 용이하게 될 수 있도록 장비를 고안하여 식중독균 현장 측정용 진단시스템 플랫폼 시스템의 Prototype을 개발하였음.
- 전반적으로 자동화에 초점을 맞추었으며, 선행기술을 일부 보유하고 있던 리퀴드 핸들러 기술을 개선 완성하여 100~300uL의 99%이상의 정확도를 가진 자동 pipette 부를 개발 완료하였음
- 전반적으로 배양 및 전처리 된 시료를 바로 적용, Loading하여 식중독 균의 검출까지 측정, 판별 display 할 수 있는 proto 장비로서 리퀴드 핸들러를 포함하여 5축 전자동 제어로 Full Automation system의 proto type의 개발임.
- 피펫 기술의 개발, 리퀴드핸들링부 설계 및 제작, 광학 검사부 개발, 검사 S/W 및 보정 알고리즘 개발, 히터제어부의 개발, 시스템의 보완 및 Integration 까지 전 과정을 비아이티밸류 독자적으로 개발하여 완성도를 높이는 작업을 완료하였음.
- 구축된 장비의 초기 테스트는 *E.coli*의 실제 균(Inactivated)을 적용하여 장비에 로딩하여 농축도를 구분하여 test set을 을지대와 같이 진행하였음.
- 진단시스템의 Prototype의 개발은 아래의 파트 모듈의 개발로 진행되었음.
  - 리퀴드핸들링부
  - 피펫기술 개발
  - 검사부 개발
  - 검사 SW 및 보정 알고리즘 개발
  - 히터 제어부 개발
  - 시스템 보완 및 Integration 제작

## 가. 기구

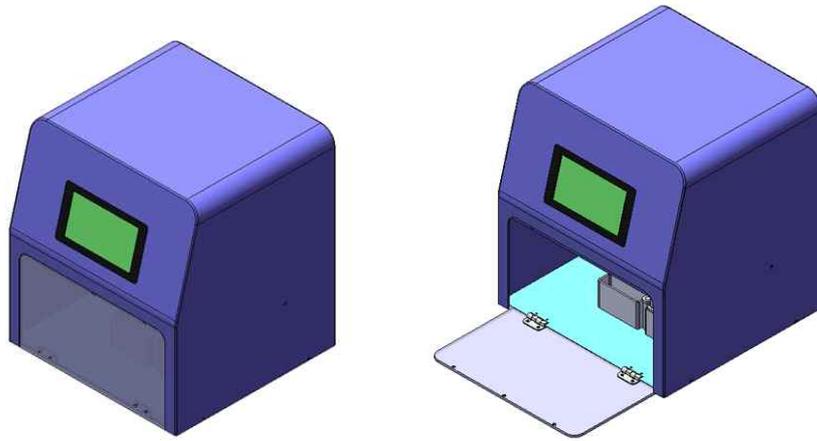


그림 36. 식중독균 현장 측정용 진단 시스템의 외관 모식도

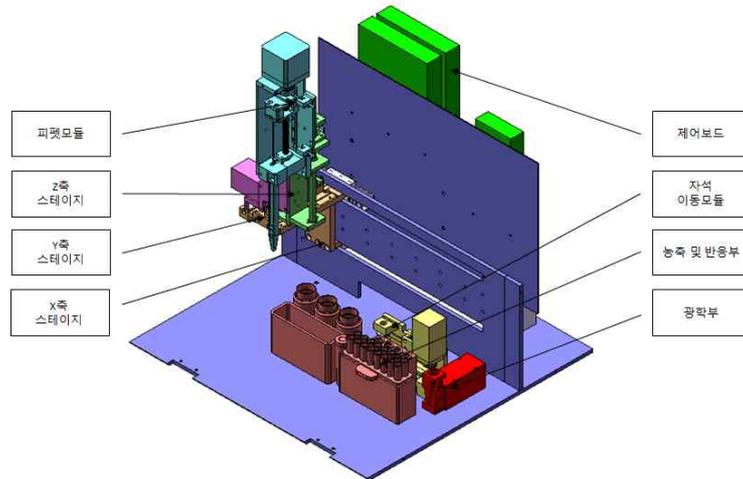


그림 37. 식중독균 현장 측정용 진단 시스템의 내부구조 및 명칭

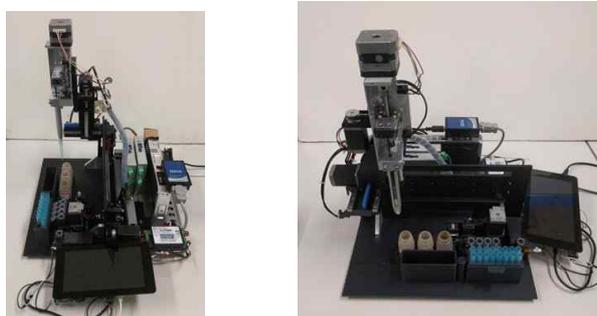


그림 38. 실제 제작된 식중독균 현장 측정용 진단 시스템

- 로봇 모듈은 X축, Y축, Z축의 세축으로 구성되어 있으며 Z축의 브라켓에는 피펫모듈이 조립되어 있음. 로봇 모듈에 조립된 피펫모듈은 X, Y, Z 방향으로 자유롭게 이동 할 수 있으며, 농축 및 반응부의 위쪽에서 이동하며 시약을 흡입, 분주하며 실험을 진행하게 됨.

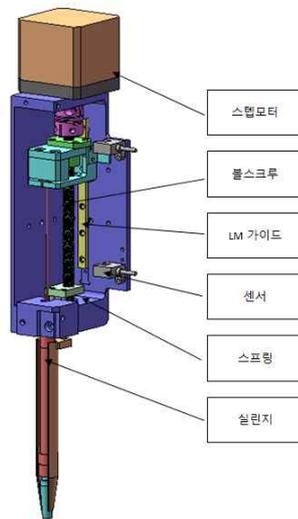


그림 39. 피펫모듈의 구조 및 명칭

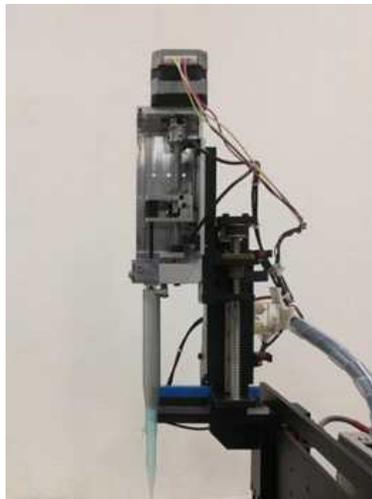


그림 40. 실제 제작된 피펫 모듈

- 피펫 모듈은 볼 스크루에 연결된 스텝모터를 제어하여 시약의 흡입 및 분주를 제어 할 수 있도록 구성되어 있으며 실린지는 피펫 모듈 몸체에 고정되어 있고, 실린지 피스톤은 볼 스크루 너트에 고정되어 있어서 볼 스크루의 이동에 따라 실린지 피스톤이 상하로 이동하게 되어 있음.
- 볼 스크루 측면에는 LM 가이드를 설치하여 볼 스크루가 수직으로 이동할 수 있게 하였으며, 볼 스크루와 스텝모터는 커플링을 이용하여 직결로 연결하였음.
- 피펫모듈의 하부의 피펫팁 고정부에는 스프링을 사용하여 피펫팁이 체결되면 스프링을 밀어서 고정이 되며, 피펫팁 사용 후 볼 스크루 너트로 스프링을 밀어내어 피펫팁을 자동으로 제거 할 수 있도록 하였음.

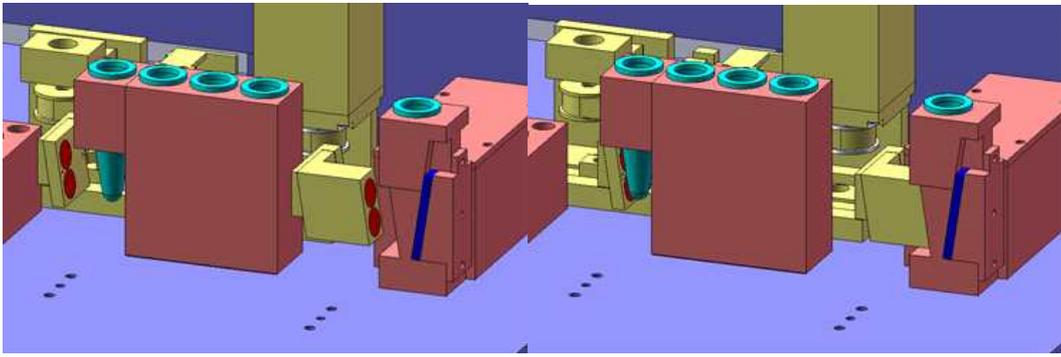


그림 41. 자석이 농축부, 반응부 튜브와의 접촉(좌측 그림) 및 분리(우측 그림)된 모습

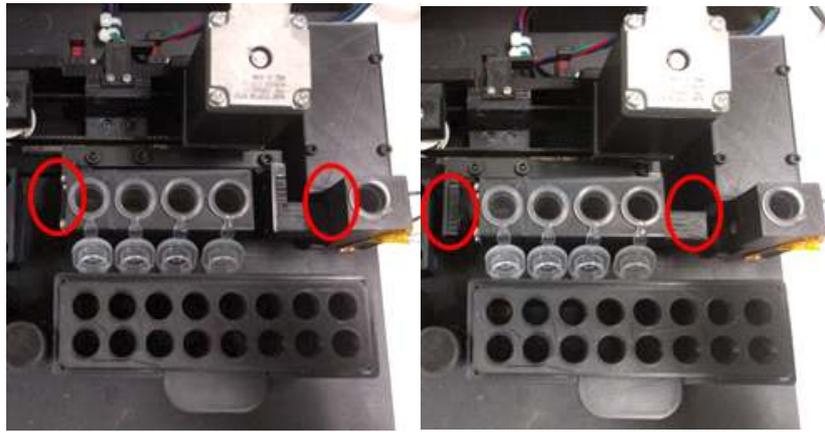


그림 42. 실제 제작된 자석 이동 모듈의 농축부, 반응부 튜브와의 접촉(좌측사진) 및 분리(우측 사진)된 모습

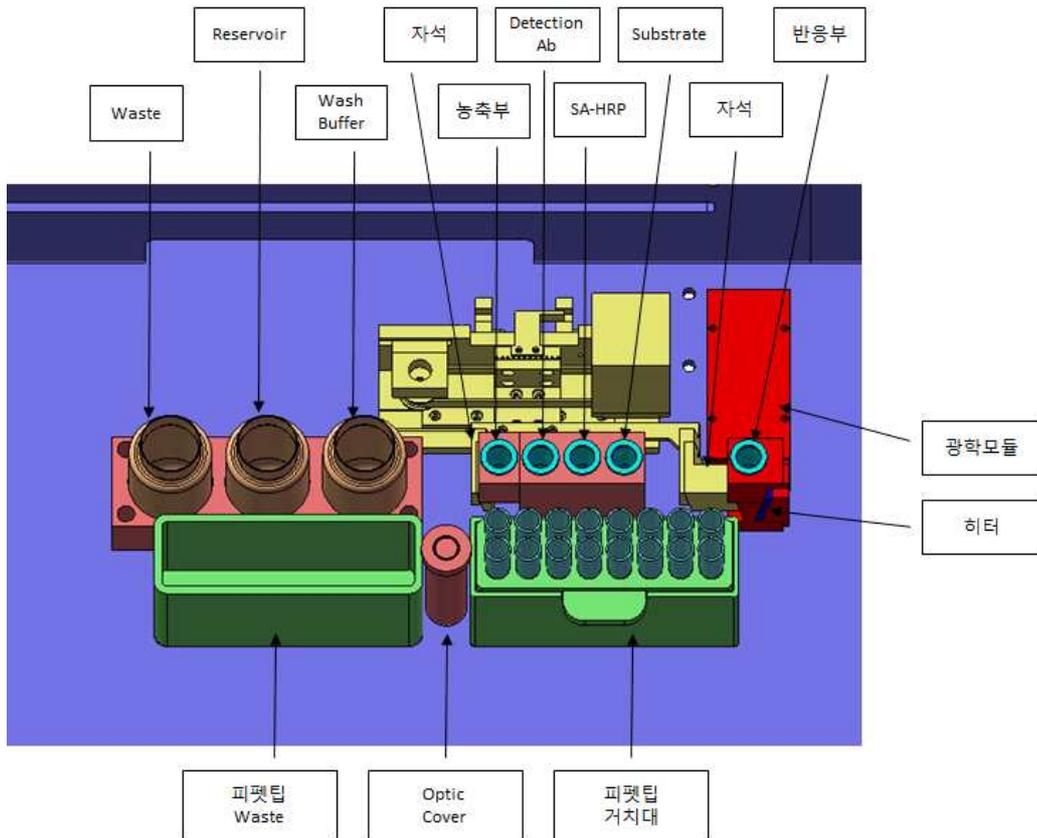


그림 43. 시약부의 구조 및 명칭

- 농축부와 반응부의 측면에는 마그네틱비드와 결합할 수 있는 자석이 위치되어 있음. 스텝 모터에 체결된 자석은 스텝모터의 제어에 따라 농축부, 반응부의 튜브와 접촉과 분리를 하게 됨.
- 자석이 튜브에 접촉하면 마그네틱비드가 튜브 벽면에 고정되며, 자석이 튜브에서 분리되면 마그네틱비드는 튜브내부에서 자유롭게 섞일 수 있게 됨.

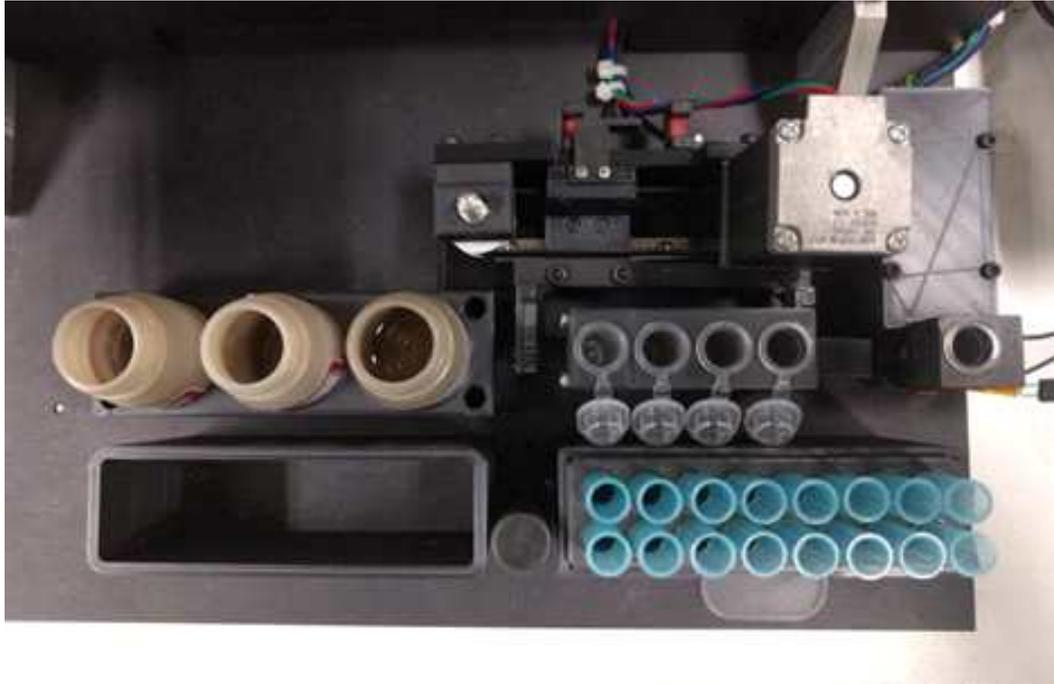
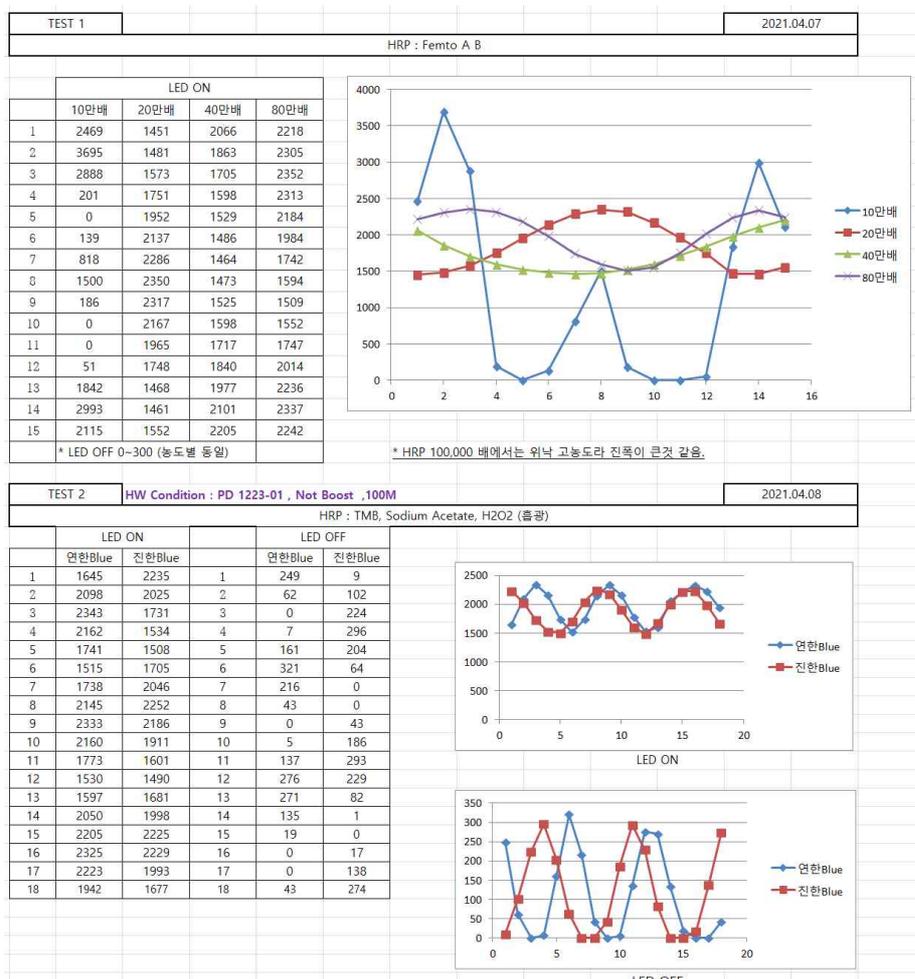


그림 44. 실제 제작된 시약부의 모습

- 농축부와 반응부의 배치는 테스트 프로토콜을 고려하여 최적화 할 수 있도록 구성하였음. 스테이지의 앞쪽에는 피펫팁 waste 와 피펫팁 거치대를 배치하였고, 뒤쪽에는 시약 waste, reservoir, wash buffer 를 배치하였음.
- 광학 측정을 위해 농축부와 반응부를 분리하였고, 시약 주입 순서에 따라 detection Ab, SA-HRP, substrate 를 순차적으로 배치하였음.
- 마그네틱비드 결합용 자석은 농축부와 반응부에 양쪽에 모두 설치하였음.
- 테스트 프로토콜은 샘플을 농축한 후 시약을 순차적으로 주입하여 반응을 시키고 광학부로 측정하는 과정임.
- Reservoir 에 담겨있는 샘플을 피펫모듈을 이용하여 자성비드-항체 중합체가 준비되어 있는 농축부에 분주함.
- 분주된 샘플을 피펫모듈을 이용하여 mix 과정을 진행하여 샘플과 자성비드-항체 중합체와 반응시킴. 반응이 완료되면 자석을 이용하여 반응이 완료된 자성비드만 분리하고 잔여 물질을 피펫모듈을 이용하여 waste 로 이동하여 버리게 됨.
- 이 후 위의 과정을 반복하여 샘플의 농축을 수행하게 됨.
- 농축이 완료되면 농축부에 wash buffer를 분주하고 mix를 한 후 샘플 전체를 취하여 반응부로 이동시킴. 이동 후 반응부에 자석을 접촉하여 자성비드만 분리하고 wash buffer 는 제거하여 waste 에 버리게 됨.
- 이 후 wash buffer를 반응부에 분주하여 mix 하고 자석으로 자성비드 분리하여 wash buffer 를 버리는 과정을 진행하여 wash 과정을 수행하게 됨.
- Wash 과정이 완료되면 detection Ab를 반응부에 분주하고 mix 하여 반응물질과 충분히 반응 할 수 있도록 함.
- 이 후 자석으로 자성비드를 분리하고 나머지를 waste 에 버림.

- Detection Ab 반응과정이 완료되면 wash 과정을 반복함. wash 과정이 완료되면 SA-HRP를 반응부에 분주하고 mix 하여 반응물질과 충분히 반응 할 수 있도록 함.
- 이 후 자석으로 자성비드를 분리하고 나머지를 waste 에 버리고 SA-HRP 반응과정이 완료되면 wash 과정을 반복함.
- Wash 과정 후 substrate를 반응부에 분주하고 mix를 한 후 광학모듈로 측정하여 결과를 얻을 수 있음.
- 최초에 검토했던 PD detection 방식은 충분한 감도가 나오지 않아서 도중에 PMT 광학계를 사용하여 변경하였음. 원가는 약간 증가했으나 충분히 적용 가능한 방식으로 결과 도출에 무리가 없었음.
- 아래의 데이터는 최초 PD Detection 의 데이터로서 HRP 희석 비율에 따른 PD 흡광량 차이를 보았는데 유의할 만한 수준은 아니라고 판단되어 PMT로 검토 제작 완료하였음.
- PMT 방식의 측정 데이터는 후반부 테스트 결과에 나타내었음.

[PD detection 방식 데이터]



## 나. H/W (하드웨어)

- 본 과제를 위해서 H/W 설계를 아래와 같이 진행하였음. 먼저 제어부와 구동부, 그리고 검사부로 나누어져 있으며 디스플레이 7인치 터치 LCD를 사용하였고 RS422 컨트롤러를 통하여 제어부의 컨트롤 보드와 검사부(광학부)의 연계를 나타내는 블록 다이어그램을 아래에 표시하였음.

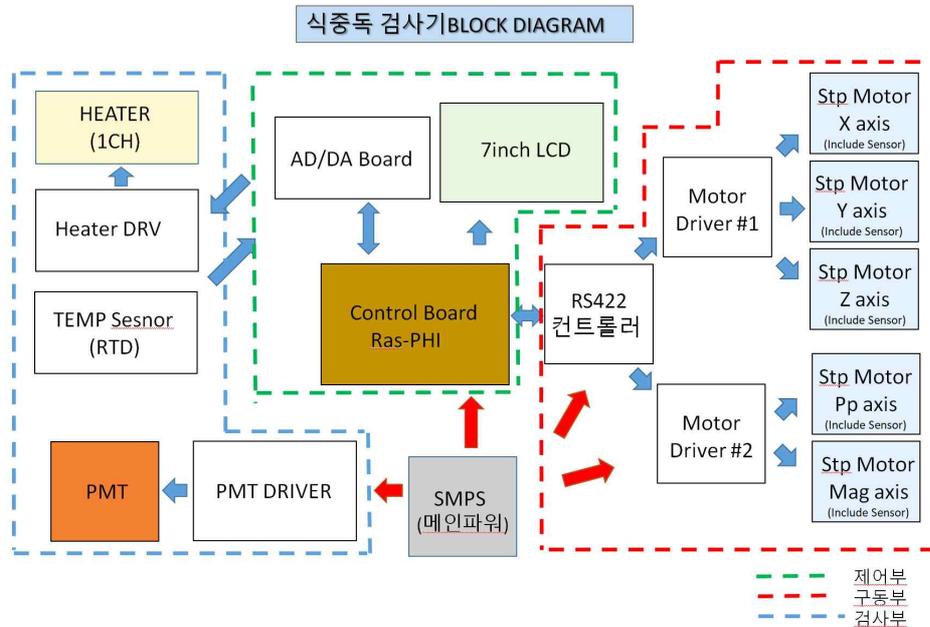


그림 45. 블록다이어그램

- 장비를 전체적으로 operation 시키는 임베디드 중앙 컨트롤 보드와 RS422 컨트롤러가 연동하여 전체를 제어함.
- 위의 색깔로부터 제어부, 구동부, 검사부 등 전반적으로 Display와 광학센서의 최종 결과 값을 7인치 Touch LCD를 통하여 결과가 도출됨.
- 다음은 시스템 장비에 사용된 주요 회로도 임.

주요 회로도

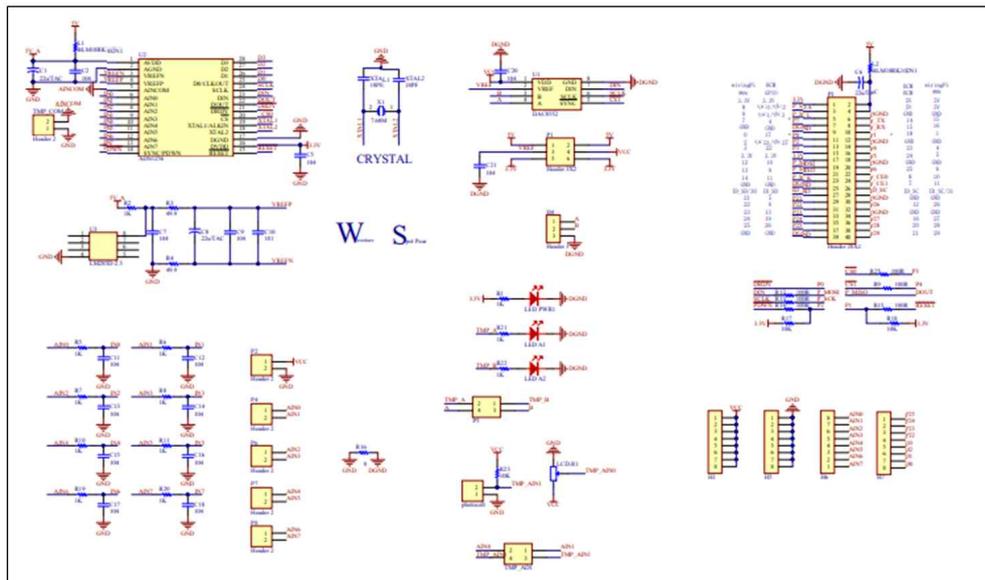


그림 46. 주요 회로도

(1) Hardware 주요 검토내용

- PMT 구동조건을 위한 최적화 및 구동드라이버 설계  
: PMT 자체가 여러 제약조건과 드라이버 조건이 어려운 부분이 있음. 예를 들어, 외부 충격에 약하며, 가시광선에 센싱 창 노출 시, 측정데이터의 문제가 발생할 수도 있고, 주변광량을 0 수준으로 처리한 것에 대한 OFFSET Voltage Range를 0.5~1.1V 를

초과하지 않는 조건 등. 여러 제약 조건에 대해 DC-DC 중 고효율 저노이즈 파워를 공급해서 PMT 동작에 안정화와 정확한 Offset 조정회로를 설계 적용하였음.

- HEATER 구동위한 구동 드라이버 설계 및 최적화

: 히터사양이 약간 rough한 상황에서, 과열 및 오작동으로 인한 문제를 사전에 방지하기 위하여, 역전압방지 및 전류 제한 수치를 최적화 하여, 현재 구동드라이버에 적용하였음.

- AD/DA 설정 통한 정밀 온도센싱 최적화

: Low drift 기준을 갖는 24BIT의 고성능 AD Conversion이 되는 산업용 Chip을 적용하여, 정밀도를 향상시켰으며, 특히 0.4ppm INL 및 2ppm/°C 의 기준 drift , 0.5ppm /°C 의 Gain drift , 그리고 0.05 uV/°C 의 offset drift , 0.7uVrms at 60SPS 노이즈등 여러 면에서 고성능의 조건으로 온도 센싱의 오차를 최소화할 수 있는 CHIP을 적용하였음.

- 모터구동드라이빙 공정 최적화 진행

: Motor Driver 의 공정상 최적화를 위해, 선정된 모터에 맞게 최적의 전류조건과 3축 제어되는 드라이버를 2개 적용하여 , 각 3축 , 2축 모터드라이빙 할 수 있게 422 통신을 적용하여 구축하였고, 공정 시 정지 전류 값, 적절한 분주 비를 motor 사양에 맞게 적용하였음. 또한 센서의 원활한 통신을 위한 전장배선 또한 최적화가 되도록 적용하였음.

## (2) 주요 파트 사진 및 설명

: 다음은 H/W의 주요 파트 설명을 사진과 함께 나타내었음.

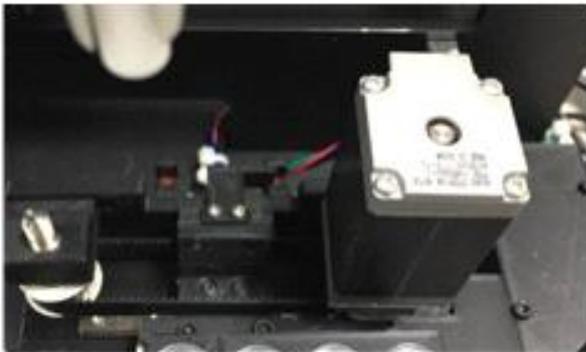


그림 47. Magnet axis(좌)와 PMT,Temp센서,히터(우)

- 좌측 사진은 마그네틱을 움직이는 축을 나타낸 Magnet Axis(축)이고, 우측 사진은 초기에 PD로 감도가 나오지 않아 PMT로(photo diode보다 감도가 10~100배 이상 좋음) 설계 제작하여 적용한 PMT와 온도센서를 나타낸 그림.



그림 48. PMT DRIVER(Offset 포함)(좌)와 SMPS 및 Motor Diver & 422Driver(우)

- 좌측 사진은 PMT 광학계를 제어하기 위한 PMT Driver 의 사진임. 우측 사진은 전체 시스템 전원 공급장치인 SMPS, 측제어를 위한 Motor driver, 와 전체 작동을 위한 422Driver의 사진.
- 다음은 작동 몇 결과 화면의 display를 나타내는 color 7inch Touch LCD의 사진과 용액 등 시약을 컨트롤링하여 분주하는 Pipette Axis 의 모습을 나타낸 리퀴드 핸들러의 사진임.



그림 49. 7인치 Touch LCD(좌)와 Pipette Axis(우)

- 좌측, 7인치 Touch LCD display의 배선 사진, 우측은 리퀴드 핸들러를 컨트롤하는 Pipette Axis 의 사진임.

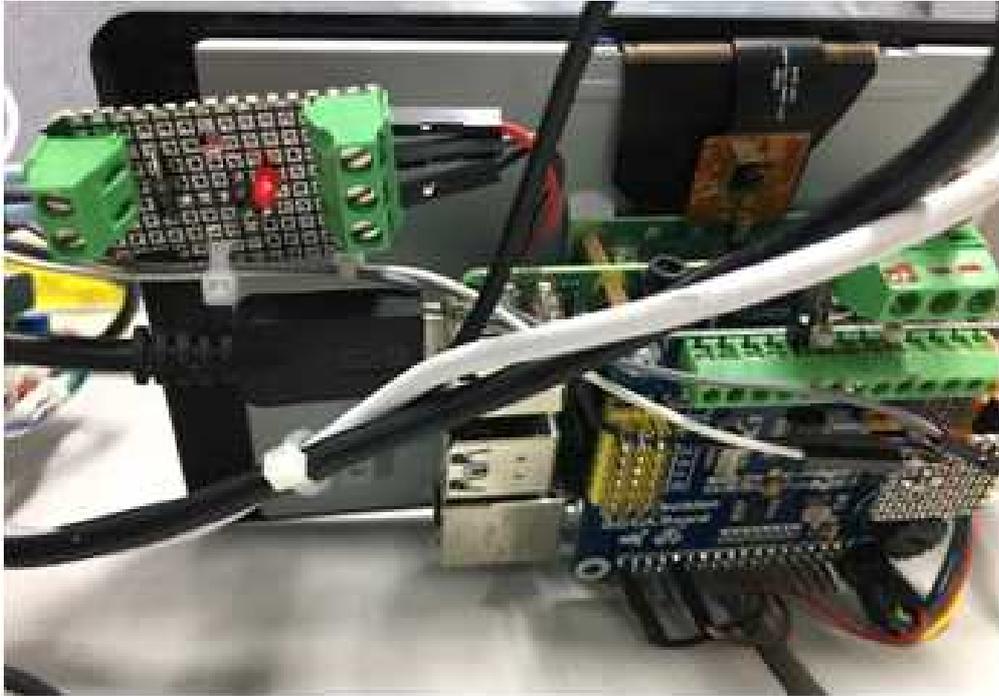


그림 50. 제어부(메인컨트롤,ADC , 히터DRIVER외)

- 위의 사진은 전체 메인컨트롤 제어부의 사진과 ADC(아날로그 신호를 Digital 신호로 바꾸는 장치), 그리고 히터 드라이버의 사진 모습.
- 지금까지 설명한 전체 Hard Ware system Part는 마지막에 설명한 제어부의 메인컨트롤을 통하여 전체적으로 동작명령을 내리는 시스템으로 설계되어 있음.
- 지금까지 전체 시스템의 주요 Hard Ware 부를 설명하였고 다음은 전체 작동을 제어하는 Firm Ware의 개발 내용을 설명할 것 임.

#### 다. F/W (Firm Ware)

: 장비 주요부 설명 및 F/W 명령 Sequence 설명. (작동 시스템 5축 제어 알고리즘, 시스템제어, 작동 시퀀스)

- 다음은 장비의 유효한 구조의 입면도와, 전체 시스템 구성을 나타내는 측면도를 나타냄.

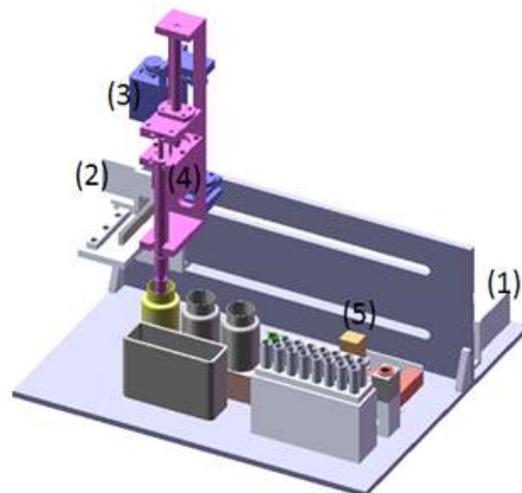
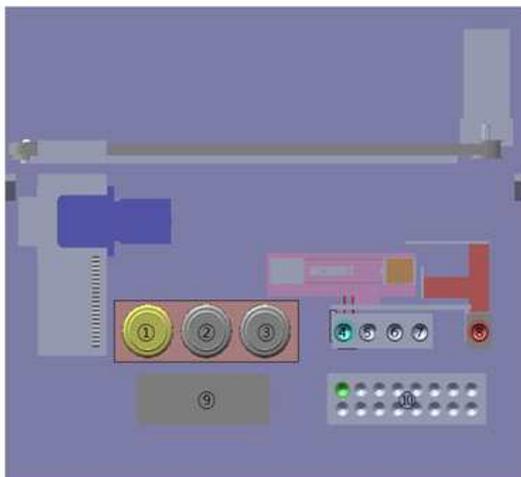


그림 51. 장비의 입면도(좌)와 측면도(우)

- 위의 그림에서 볼 수 있듯이 1번 : Waste, 2번 : Reservoir(샘플저장bottle), 3번 : Wash buffer이며 4~7번이 시약 부로서, Magnetic bead, Ab(항체)-Detection Antibody, SA-HRP 효소, 그리고 Substrate(Femto A/B)가 위치하며, 8번은 반응부로서 37도 온도 히팅을 한 후에 광학 측정이 가능하게 한 PMT 및 히터가 위치하고 있음.
- 9번 그림은 사용되는 Tip이 버려지는 Tip Waste box의 자리이고, 10번은 사용되는 Tip 이 위치하게 되는 Tip box의 모습임.
- 당초 계획서에 언급한 리퀴드핸들러 모듈(dispensing 포함)의 흡입 분주량이 조절이 가능하고 Reagent를 분주 하는 장치모듈은 개발 완료 후 작동 측정 결과 100~300 uL 조절에서 오차가 CV 1% 미만으로 자동장치에 적용 탑재되어 작동이 용이하게 개발됨.
- 이는 분주량이 정확하도록 Standard 시린지로 Core에서 작동하며 전체 식중독 검사를 위한 작동 sequence가 정확히 작동하도록 F/W 로 제어됨.
- 전체 시스템 로봇 모듈은 5축으로 구성되어 있고, 샘플(시료) 흡입부터 분주, 시약흡입 및 분주, 마그네틱 이동 및 시료의 농축과 마그네틱 비드의 분리를 통하여 광학부(측정부)에 최종으로 반응한 샘플을 가져다가 분주하여 PMT 광학계로 읽어서 ADC변환하여 데이터를 측정 Display 함.
- 이에 사용되는 Firm Ware 명령을 통하여 작동이 모두 이루어 지며 아래 표와 같은 전체 시퀀스에 해당하는 부분 명령을 Step별로 Command 가 실행되어 전체 시스템의 장비가 작동하게 됨.
- 아래에 내타낸 표는 전체 작동 Sequence 흐름을 나타낸 표로서 1~57step의 실험과정과 구동부의 위치를 나타낸 표임.

	실험 과정	구동부 이동 위치	구동부 동작	사용 모터	
농 축 부 정	1	Reservoir부에 측정하고자 하는 샘플을 미리 준비 : 약 10 mL	원점		
	2	파이펫에 팁을 장착한 후	원점 -> 10-1	피펫팁 부착	1,2,3
	3	reservoir부로 이동하여 샘플 1 mL를 취함	10-1(반복시1) -> 2	시약 흡입 동작	1,2,3,4
	4	농축부로 이동 후 샘플을 분주 (농축부에는자성비드-항체 중합체가 준비되어있는 상태)	2 -> 4	시약 배출 동작	1,3,4
	5	농축부에서 샘플과 자성비드-항체 사이에 면역반응이 이루어짐 이때 충분한 반응이 이루어질 수 있도록 mix 과정이 필요하며, 반응시간은 10분 내외로 진행		Mix 동작	4
	6	반응 완료 후 자석을 이용하여 반응이 완료된 물질만 분리하고		자석 결합 위치	5
	7	나머지 buffer 및 잔여물질을 파이펫으로 취함		시약 흡입 동작	3,4
	8	파이펫으로 취한 물질들은 waste부로 이동하여 버림	4 -> 1	시약 배출 동작	1,3,4
	9	자석은 원점으로		자석 해제 위치	5
	10	3~9 과정을 총 10회 반복하여 샘플의 농축을 수행함 : 1 mL*10회 = 총 10 mL	3-9 번 과정 10회 반복		
	11	농축 과정이 완료되면 사용 중이던 파이펫 팁을 폐기한 후	1 -> 9	피펫팁 폐기	1,2,3
	12	새로운 팁으로 교체	9 -> 10-2	피펫팁 부착	1,2,3
	13	Wash buffer 15 mL 중 300 µL를 취하여	10-2 -> 3	시약 흡입 동작	1,2,3,4
	14	농축부에 buffer가 없는 상태인 반응물질에 분주하여	3 -> 4	시약 배출 동작	1,3,4
	15	mix (Buffer로 농축된 샘플을 충분히 균질화)		Mix 동작	4
D e t e c t i o n 항 체 반 응	16	샘플 전체를 파이펫으로 취하여 반응부로 이동 및 분주	4 -> 8	시약 흡입 동작 시약 배출 동작	1,3,4
	17	자석이 반응부로 이동하여 반응물질 외 buffer 및 잔류물질을 분리시키고,		자석 결합 위치	5
	18	이를 파이펫으로 취하여		시약 흡입 동작	3,4
	19	waste부로 이동하여 버림 (반응부에는 반응물질만 잔존)	8 -> 1	시약 배출 동작	1,3,4
	20	자석은 원점으로		자석 해제 위치	5
	21	사용 중이던 파이펫 팁을 폐기하고	1 -> 9	피펫팁 폐기	1,2,3,4
	22	새 팁으로 교체한 후	9 -> 10-3(반복시10-5,6,7,9,10,11)	피펫팁 부착	1,2,3
	23	wash buffer 300 µL를 취하여	10-3(반복시10-5,6,7,9,10,11) ->3	시약 흡입 동작	1,2,3,4
	24	반응부에 분주 및	3 -> 8	시약 배출 동작	1,3,4
	25	mix		Mix 동작	4
	26	균질화된 샘플을 다시 자석으로 분리시킨 후		자석 결합 위치	5
	27	buffer 및 잔류물질을 제거함으로써 wash 과정을 수행		시약 흡입 동작	3,4
	28	waste부로 이동하여 버림	8 -> 1	시약 배출 동작	1,3,4
	29	자석은 원점으로		자석 해제 위치	5
	30	사용 중이던 파이펫 팁을 폐기하고	1 -> 9	피펫팁 폐기	1,2,3,4
31	Wash가 완료된 후 새로운 파이펫 팁으로 교체한 후	9 -> 10-4	피펫팁 부착	1,2,3,4	
32	detection antibody 200 µL를 취함 (Detection antibody부에는 총 300 uL 담겨있음)	10-4 -> 5	시약 흡입 동작	1,2,3,4	
33	파이펫이 반응부로 이동하여	5 -> 8		1	
34	detection antibody 200 µL를 분주하고		시약 배출 동작	3,4	
35	mix 과정을 통해 반응물질과 충분히 균질화 및 면역반응이 이루어질 수 있도록 함 10분 내외로 반응 수행		Mix 동작	4	
36	Detection antibody 반응과정이 완료되면 자석으로 반응물질과 그 외 buffer 및 잔류물질을 분리시켜		자석 결합 위치	5	
37	반응물질을 제외한 나머지를 제거		시약 흡입 동작	3,4	
38	waste부로 버림	8 -> 1	시약 배출 동작	1,3,4	
39	자석은 원점으로		자석 해제 위치	5	
40	위의 21-29 과정을 동일하게 수행하여 wash를 진행 - 총 3회 수행	21-29 번 과정 3회 반복			
신 호 제 반 응	41	사용 중이던 파이펫 팁을 폐기하고	1 -> 9	피펫팁 폐기	1,2,3,4
	42	Wash 과정 완료 후 파이펫 팁을 새 것으로 교체하고	9 -> 10-8	피펫팁 부착	1,2,3,4
	43	SA-HRP부로 파이펫을 이동 (SA-HRP부 총 300 uL 담겨있음)	10-8 -> 6		
	44	SA-HRP 200 µL를 파이펫으로 취하여		시약 흡입 동작	3,4
	45	반응부에 모두 분주하고	6 -> 8	시약 배출 동작	1,3,4
	46	물질의 균질화 및 원활한 반응이 이루어질 수 있도록 10분 내외로 mix 반응 수행		Mix 동작	4
	47	자석을 반응부로 이동시켜 반응물질을 분리하고		자석 결합 위치	5
	48	buffer와 그 외 잔여물질을 파이펫으로 취하여		시약 흡입 동작	3,4
	49	waste부에 버림	8->1	시약 배출 동작	1,3,4
	50	위의 21-29과정을 3회 반복하여 wash과정을 수행	21-29 번 과정 3회 반복		
발 광 신 호 측 정	51	사용 중이던 파이펫 팁을 폐기하고	1 -> 9	피펫팁 폐기	1,2,3,4
	52	Wash가 완료된 후 새로운 파이펫 팁으로 교체한 후	9 -> 10-12	피펫팁 부착	1,2,3,4
	53	Substrate 200 µL를 파이펫으로 취하여	10-12 -> 7	시약 흡입 동작	1,2,3,4
	54	반응부에 분주	7 -> 8	시약 배출 동작	1,3,4
	55	및 mix후		Mix 동작	4
	56	사용 중이던 파이펫 팁을 폐기하고	1 -> 9	피펫팁 폐기	1,2,3,4
	57	HRP-substrate 반응에 의한 발광신호를 측정 ***관장 (Substrate부에는 총 300 uL 담겨있음)		광학 신호 측정	

표 6. 작동 전체 Flow Sequence

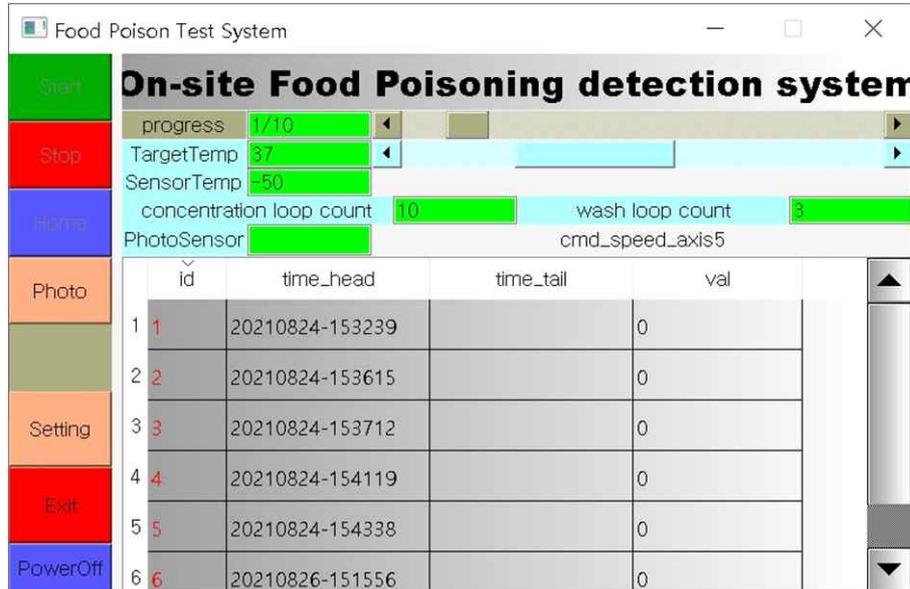
- 위 표에 의하여 전체 시스템의 검사 동작이 작동하게 되며 1~57Step의 작동이 각각의 command로 분리되어 2000 Step의 작동 명령어가 시스템 H/W에 전달하게 되어 구동됨.

## 라. S/W (User Interface)

: 사용화면 캡처 이미지, 기능설명

- 작동을 위한 User Interface 화면 구성은 아래와 같음.

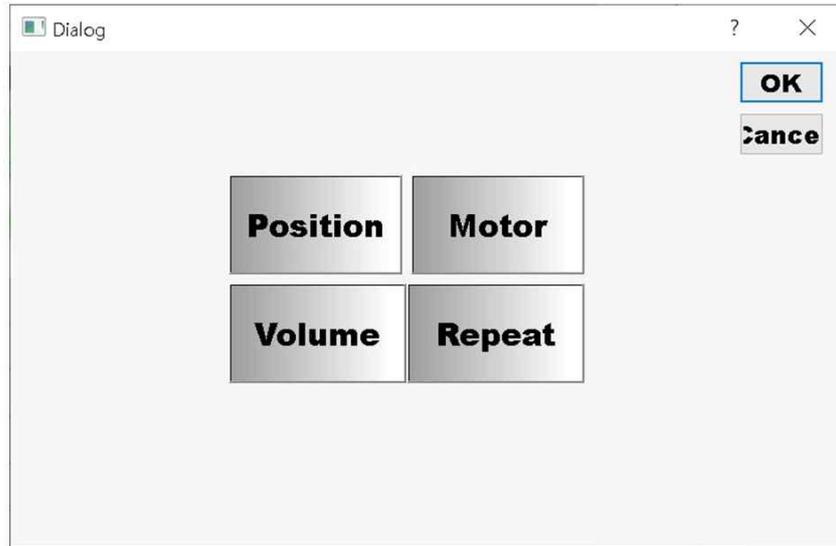
### (1) 메인 화면



- Start 버튼 : 테스트 시작
- Stop 버튼: 테스트 종료
- Home 버튼: 테스트 시작전 모터 수동 Home 이동
- Photo 버튼: 테스트 종료후 결과 수동 검출
- Setting 버튼: 테스트 조건 설정
- Exit 버튼: 프로그램 재시작
- PowerOff 버튼 : 시스템 종료
- progress 표시 : 테스트 진행사항 진행률 표시
- Targettemp : 테스트 온도 설정
- SensorTemp : 테스트 시료의 현재 온도 표시
- concentration loop count : 농축회수 표시
- wash loop count : wash 공정 회수 표시
- PhotoSensor : 측정된 결과 표시
- 작업진행바 : 현재 공정 사항 표시
- 테스트 결과리스트
  - id : 테스트 고유번호
  - time\_head : 테스트 시작시간
  - time\_tail : 테스트 종료시간
  - val : 테스트 결과값
- 메인 화면은 테스트의 시작과 종료를 모두 포함하며 좌측 박스 아이콘에 주요 명령버튼

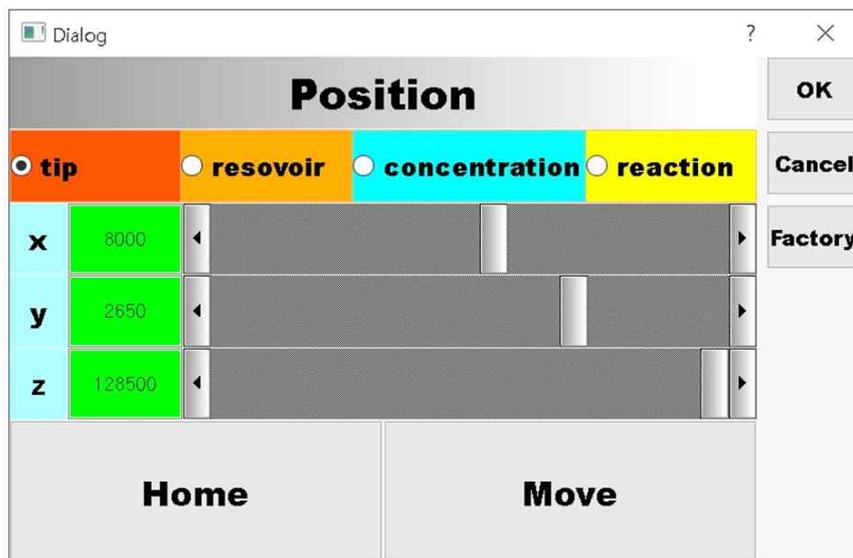
이 위치해있음. 중앙에는 테스트 시간과 테스트 일련번호, 그리고 상단에는 진행상황, 설정온도, PMT 센서 온도, 농축 루프 반복횟수, 그리고 측정 결과 값이 표시됨.

(2) 설정 화면



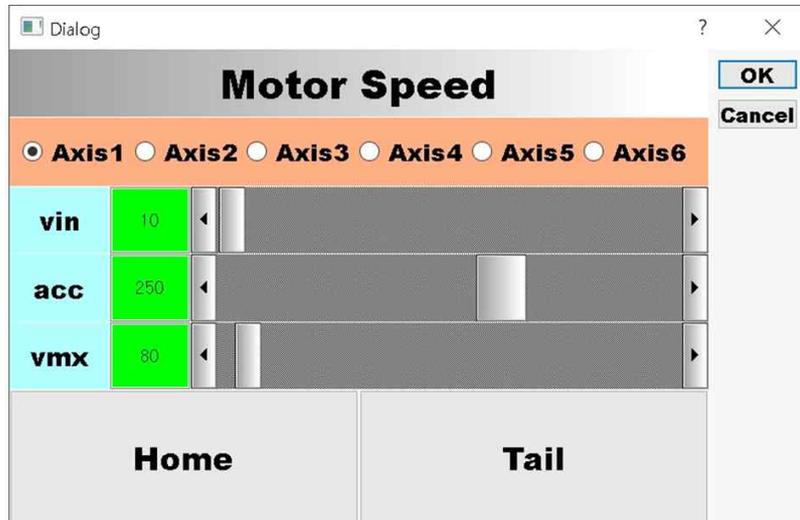
: 위 그림은 설정 화면으로서 장비 모듈의 위치 설정, Motor 위치, 사용 용액의 Volume 그리고 작동 반복 횟수조절 기능의 설정 화면임.

- Position (모터의 수평 수직 높이 값 설정)



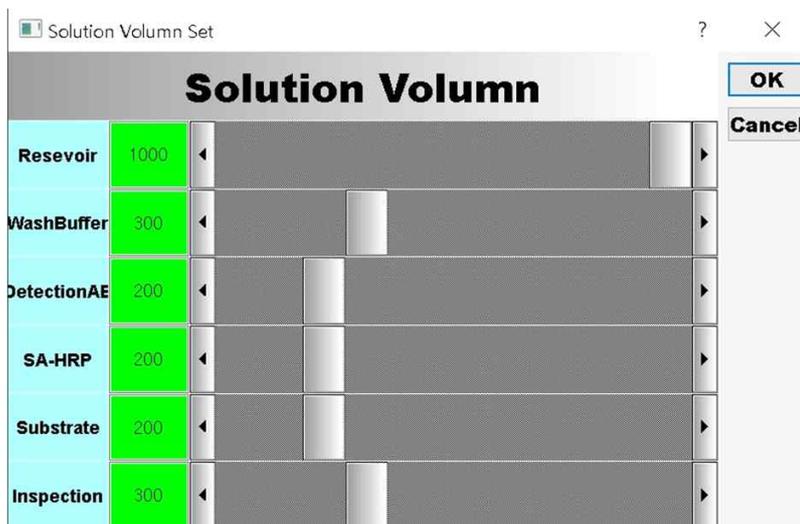
: 위 그림은 모터의 수평, 수직 높이 값을 설정으로 리퀴드핸들러 Pipette 모듈의 위치(Positioning)을 설정하는 화면으로 좌측에 5축 포함의 Axis의 X, Y, Z positioning을 수치로 나타내었고 상단에 탭으로 Pipette 모듈의 Tip에 대한 위치, Reservoir, concentration(농축), Reaction(시약반응)에 대한 설정을 나타냄. 우측에 중앙에 Factory 아이콘은 기본 Default 설정 Setting으로 지정할수 있는 되돌림 버튼이고, 하단에 Home Move를 통하여 각각의 원점이동이 가능하게 함.

- Motor (모터 축(axis)별 이동속도 설정)



: 검사 속도를 조절하기 위해서 Motor Speed를 통하여 각 모듈(주로 Pipette 모듈)의 이동 속도를 조절 할 수 있음 (6축 까지 가능).

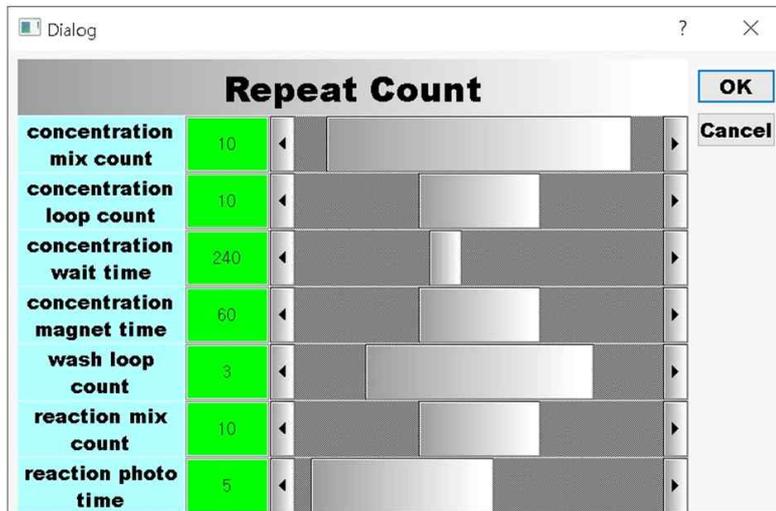
- Volume (공정별 시약의 양 설정)



: 각 부분 공정의 샘플의 볼륨 조절 화면

Reservoir 1000 uL X 10회 설정 가능하고, Wash buffer는 300 uL단위로 X 10 회, Detection Ab는 200 uL X 10회 까지 가능하는 등, 각 단계에 따른 시약의 작동(흡입량 및 분주량)의 반복횟수를 설정하는 화면으로, 예를 들어 Detection 하고자 하는 식중독균의 종류와 조건에 따라서 설정이 가능하게 함.

- 공정 중 시약의 반복횟수 설정



: 각 부분 공정의 작동 반복 횟수 지정 화면

각 단계의 작동에 따른 설정시간과 반복횟수, 그리고 Mixing 횟수 등을 설정 할 수 있는 화면으로 마지막에 Reaction Photo time 설정까지 가능함.

## 마. 테스트 결과



그림 52. 제작된 시스템을 이용한 실제 테스트 화면

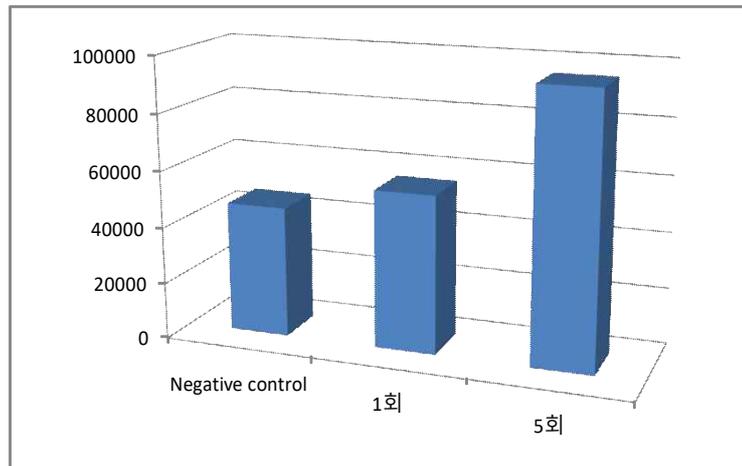
- 위 그림처럼 좌측 상단에 파이펫 모듈이 위치해 있고 1,000 uL Tip이 장착되어있으며, 중앙하단부에 Waste, Reservoir, Washing buffer bottle이 보임.
- 그리고 그 우측에 시약을 넣을 수 있는 1.5 mL tube가 Rack에 꽂혀있고, 그 위에 자석(magnetic)을 시약부에 붙였다가 떼었다가 할 수 있는 구동부가 보임.
- 우측 하단에 Tip Rack이 위치하며 그 옆에 우측으로 광학부가 위치함.
- 중앙 상단에는 리퀴드 핸들러부가 이동할 수 있는 가드가 보임.
- 다음은 제작된 시스템 prototype 장비로 실제 식중독균을 가지고 실험한 결과로, 을지대학교와 협의 하에 샘플을 제공 받아 원 식중독균 시료를 단계 회석하여  $1.0 \times 10^2$  cfu/mL 시료를 300 uL 횟수별로 취하여 시스템에 로딩하여 농축된 반응의 측정값을 나타낸 것임. 마그네틱비드를 이용하여 시료를 농축했으며, 검출 시간은 약

1시간 10분~1시간 50분이 소요되었으며 이는 농축 횟수에 따라 조절이 가능함.

[#1 TEST] 농축 횟수별 data (1회, 5회 농축)

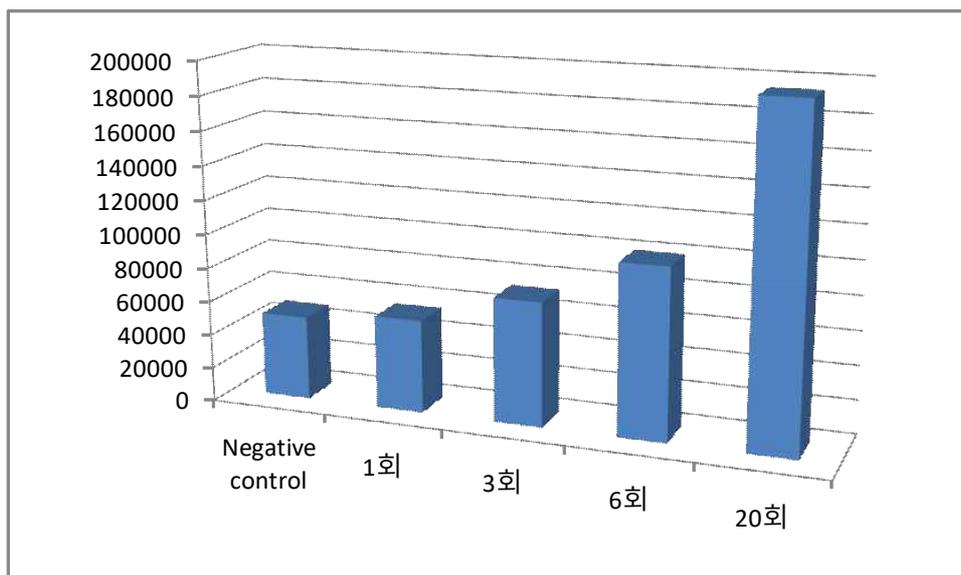
Negative control	1회	5회
46398	55933	95473

- 하단은 ADC Raw data



[#2 TEST] 농축 횟수별 data (1회, 3회, 6회, 20회 농축)

Negative control	1회	3회	6회	20회
49524	55001	73183	100317	194715



- 위 그래프를 보면 반응부의 측정 ADC Raw data 가 유의성 있게 농축 횟수별로 증가하는 것을 볼 수 있음.
- 다음은 실제 장비의 7인치 Touch LCD에 display 된 실제 측정 결과 값의 화면으로서 위에서도 같이  $10^9$  cfu/mL농도의 *E.coli* 원액을 단계 희석하여 실제 적용하여 감도 테스트를 한 결과로서 위의 막대그래프의 결과에 대한 Raw data 값임.



그림 53. Test Raw data 화면



그림 54. 실제 테스트에 사용된 Magnetic Bead(좌)와 희석 buffer와 Ab,HRP, 기질액 등(우)

- 참고 : 제조 원가 검토 (100대 기준)

재료비	보드부품비	MCU, 커넥터, ADC 메모리, 저항등	1	50,000	50,000	100 세트기준
	PCB/SMT	-	1	45,000	45,000	보드제작
	히터	세라믹히터	1	18,000	18,000	
	기계부품	폴리, 베어링, 샤프트, LM	1	80,000	80,000	
	Power Supply	12W	1	40,000	40,000	
	TFT-LCD/Embedded PC	7"	1	48,000	48,000	Touch panel 사용
	스텝모터	42 각	1	45,000	45,000	
	광센서	PMT 및 드라이버	1	320,000	320,000	
	광학부품	렌즈, 필터, LED	1	30,000	30,000	
	유체부품	실린지, 튜브등	1	60,000	60,000	

	고무부품	오링등	1	12,000	12,000	
	센서	센서	1	60,000	60,000	광센서, 근접센서, 온도센서등
	자석류	막대자석	1	20,000	20,000	
	소 계				828,000	
구매 및 외주제작	케이스	사출성형	1	10,000	20,000	100대 기준
	기구가공 1	농축부	1	25,000	32,000	"
	기구가공 2	검출부	1	40,000	40,000	"
	소 계				92,000	
	재료제작비 계				920,000	
인건비	기구/전장조립`	8hr x 2day	2	15,000	40,000	
	시약테스트&튜닝	8hr x 1day	1	15,000	25,000	Calibration 포함
	출하 Test(포장)	8hr x 0.5day	0.5	15,000	12,500	
	인 건 비 계				77,500	
	제조원가 계				<b>997,500</b>	

- 위 표와 같이 식중독 검사 장비의 Prototype 제조 원가는 100대 기준 대당 약 100만원으로 과제에서 제시했던 목표 제품가 150만원 수준에 충분히 맞출 수 있다고 판단됨.
- 원가 절감을 위해서는 정밀도가 필요하지 않는 부분은 3D 프린터를 이용하거나 보다 저렴한 메카트로닉스 부품을 적용하고, 기구부의 금형 개발을 통해 재료비를 절감하여 저가형의 목표를 달성하고자 함.

## 바. 식중독균 현장 검출용 liquid handling system 시작품



■ 제품 보안을 통한 상용화 개발에 추가할 개발내용

- 연속적인 자동 검사과정에 발행할 수 있는 cross contamination 방지를 위해 UV Lamp를 이용한 살균기능을 추가하고, Liquid Handling과정중 발생할 수 있는 오염을 방지하기 위해 side carrier bracket를 피펫팁 하단 쪽에 이동 설치 가능하도록 하여 이동 중 시약과 시료가 카트리지에 낙하하는 것을 방지하는 메커니즘을 추가할 계획임
- 본 자동 장비에서 사용하는 반응용 Tube는 상용판매중인 표준 Tube를 적용했으나 최종 상용화시에는 테스트마다 여러 튜브를 로딩해야 하는 고객의 불편을 방지하고, 소모품 판매를 통한 매출 확대를 위해 Strip형태의 카트리지를 금형으로 제작 계획임. 금형비는 대략 1000만원, 카트리지 금형 사출 원가는 200원 이하로 예상됨.

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

성과목표	성과지표	목표치	실적
검출감도	<i>S. typhimurium</i> / <i>L. monocytogenes</i> / <i>E. coli</i> O157:H7	20 cfu/g 이하	<i>S.typhimurium</i> & <i>E.coli</i> O157:H7 : 2 cfu/mL(g) 이하 <i>L.monocytogenes</i> : 55 cfu/mL(g)
시간	시료 전처리 시간	4~5시간 이내 검출	시료 전처리 3시간 검출 2시간 이내
	검출 시간		
장치	시료전처리 포함 현장형 간이-신속 검출시스템	시작품	시작품 제작
		저가형 (150만원 수준)	100만원
카트리지	농축, 분리, 검출 일체형	시작품	장치내 포함 제작

##### (2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도	연도		계	가중치 (%)
		1단계 (2020~2021)	2단계		
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	특허	목표(단계별)	1	1	45
		실적(누적)	1	1	
	학술발표	목표(단계별)	1	1	20
		실적(누적)	1	1	
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	기술이전(건)	목표(단계별)	1	1	15
		실적(누적)	1	1	
	기술료(천원)	목표(단계별)	5,000	5,000	10
		실적(누적)	5,000	5,000	
	인력양성	목표(단계별)	1	1	10
		실적(누적)	0	0	
계	목표(단계별)				100
	실적(누적)				90

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능 <sup>1)</sup> )	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 <sup>2)</sup> (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치	목표설정 근거
			보유국 /보유기관	성능수준	성능수준		
1 검출감도	cfu/g	-	미국 /AATI	10~10 <sup>6</sup> cfu/mL	국내 상용화 제품 없음	20 cfu/g 이하	식품공전의 배양법과 유사한 감도
2 검사시간	시간	-	프랑스 /BIOMERIEUX	최소 2시간 (균마다 상이함)		4~5시간 이내 검출	사후 조치가 아닌 사전 예방 조치의 결과 활용이므로 5시간 이내 검사 완료 목표
3 장치	-	-	-	-		시작품	
4 카트리지	-	-	-	-		1회용 시작품	

##### (3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021 춘계 국제학술대회 및 기기전시회	최민지	2021. 6. 17	비발디 공원 (온라인 발표)	대한민국

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호
2021	최종보고서		

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	특허 출원	생체 물질 자동 검사 시스템	을지대학 교 산학협력 단 외 1명	2021. 7. 19	10-2021 -009403 6						

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

- \* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자

- \* 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	노하우	자성비드-항체 중합 방법	비아이티밸류	2021.7.23	5,000,000	

- \* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

사업화 투자 실적 (투자계획)

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*
	자동 검사 플랫폼 상용화개발 2.5억	장비양산시설/ 시약 생산 2.0억	인증 투자(식약처) 0.5억	5억	국가정책과제 3억 자체 투자 2억

사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- \* 1) 기술이전 또는 자기실시
- \* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- \* 3) 국내 또는 국외

매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수치 개선 효과

성과		저가형 자동 식중독균 검사 시스템, 관련 식중독균 검사시약 시제품 개발		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2 (상용화 개발 1년, 인증 및 양산준비 1년)		
	소요예산(천원)	500,000 (상용화 개발 300,000, 인증/양산준비 200,000)		
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후
		-	1,000,000	5,000,000
		시장 점유율	단위(%)	현재까지
국내	2			5
국외	0.1			0.2
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	- 면역기반 휴먼(Human) 질병검사 (심장병관련) - 코로나 19 접종후 항체 생성을 검사			
무역 수치 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후
	수출	-	500,000	3,000,000
			300,000	2,000,000

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력		
		생산인력		
	개발 후	연구인력		
		생산인력		

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황																	
			학위별				성별		지역별											
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타							

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

210mm×297mm[(백상지(80g/m<sup>2</sup>) 또는 중질지(80g/m<sup>2</sup>)

(22쪽 중 11쪽)

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

\* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상(부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
기탁	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 식중독균을 20 cfu/g 이하의 감도로 검출할 수 있는 기술 개발	○ <i>S.typhimurium</i> 과 <i>E.coli</i> O157:H7 : 2 cfu/mL(g)이하 ○ <i>L.monocytogenes</i> : 55 cfu/mL(g)	90%
○ 대상 시료의 전처리 시간 및 검출 시간을 모두 포함하여 5시간 이내에 검출 가능한 자동화 플랫폼 기술 개발	○ 시료의 전처리 시간 : 3시간 ○ 검출 시간 : 1시간 ~ 2시간 (농축 횟수에 따름)	100%
○ 현장형 간이-신속 검출시스템의 저가형 시제품 제작	○ 약 100만원 이내의 식중독균 측정용 liquid handling system 시제품 제작	100%
○ 시료의 농축, 분리, 검출 일체형 카트리지 시제품 제작	○ 시료의 농축, 분리, 검출에 필요한 시약 자체 제작 ○ 각 시약을 카트리지에 적용하여 자동화 장비에 적용 (일회성)	100%

성과목표	성과지표	목표치	실적	가중치(%)	달성도(%)
사업화 지표	특허 출원	1	1	45	45
	기술이전	1	1	15	15
	기술료 (백만원)	5	5	10	10
연구기반지표	학술발표	1	1	20	20
	인력양성	1	0	10	0

## 4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

---

- 본 연구의 검출 대상인 3종 식중독균 중 2종에 대해서는 목표 감도 이상의 민감도를 충족하였으나, *L.monocytogenes*의 경우 목표치인 20 cfu/g보다 약 2배가량 낮은 민감도를 달성하였음. 이의 가장 큰 원인은 확보한 항체의 성능 차이로 인한 것으로 판단되며, 대상 균에 대한 면역성이 우수한 항체를 적용할 경우 목표치까지 보완 가능할 것으로 사료됨.
  - 인력양성의 경우 본 연구 기간 내 학위(석사)를 수여할 예정이었던 학생의 불가피한 사정(대학원 징계로 인한 학업 중단)으로 인력양성 항목 달성이 이루어지지 못하였음. 다만 다른 학생인력 대체를 통해 연구를 진행하였으며 과제 마무리하는데 특별한 문제점은 발생하지 아니하였음.
- 

### 2) 자체 보완활동

---

- 확보한 항체 자체의 면역성이 낮은 *L.monocytogenes*의 검출 민감도를 향상시키기 위해 추가로 다른 항체들을 확보하고, 항체들에 대한 여러 가지 종합 전략을 시도하여 초기 조건에 비해 현저한 민감도를 향상시킬 수 있었음.
  - 주관연구개발기관인 을지대학교는 연구 대상 미생물을 이용한 실험 진행을 위한 LMO 시설이 미흡한 상태였지만, 외부 연구 시설(LMO 2등급)을 이용하여 연구 진행에 차질이 없도록 대처하였음.
- 

### 3) 연구개발 과정의 성실성

---

- 주관연구개발기관과 공동연구개발기관의 각 연구 내용이 유기적으로 통합될 수 있도록 연구 기간 동안 활발하게 교류하여 의견 공유 및 문제점 해결에 최선을 다하였음. 특히 공동기관에서 개발한 liquid handling system에 실제 적용이 가능하도록 노력하였음. 리퀴드핸들링용 피펫모듈 개발, 고정밀 PMT 검사기술 확보를 위해 수차례 설계, 제작, 테스트 과정을 반복하여 원하는 수준의 기술을 확보함
  - 해당 연구 과제 기간 동안 국내외로 악화된 코로나 사태로 인해 필요 시약의 납품 지연, 확진자 발생으로 인한 몇 차례 실험실 폐쇄 등의 문제점들이 상대적으로 짧은 과제 기간 내에 목표를 달성하기에 어려움을 초래하였음. 하지만 코로나 확산으로 인한 실험실 내에서의 연구 활동 제한이 발생한 경우 이를 보완하기 위해 대체 실험 모색, 미흡한 부분의 자료 조사 및 논의, 상황 복구 시 수행할 실험 계획 수립 등 연구 활동이 중단되지 않도록 노력하였음.
  - 본 연구 계획 시 설정한 목표치를 100% 완전히 달성하지 못 하였으나, 상당 부분 충족하였으며 달성하지 못한 부분에 대해서도 꾸준히 해결 방안을 모색하고 원인을 파악하고자 하였음.
  - 본 연구 기간 동안 모든 연구 내용은 연구 노트에 상세히 기록 및 보관하여 관련 데이터를 충실히 확보하였음.
-

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

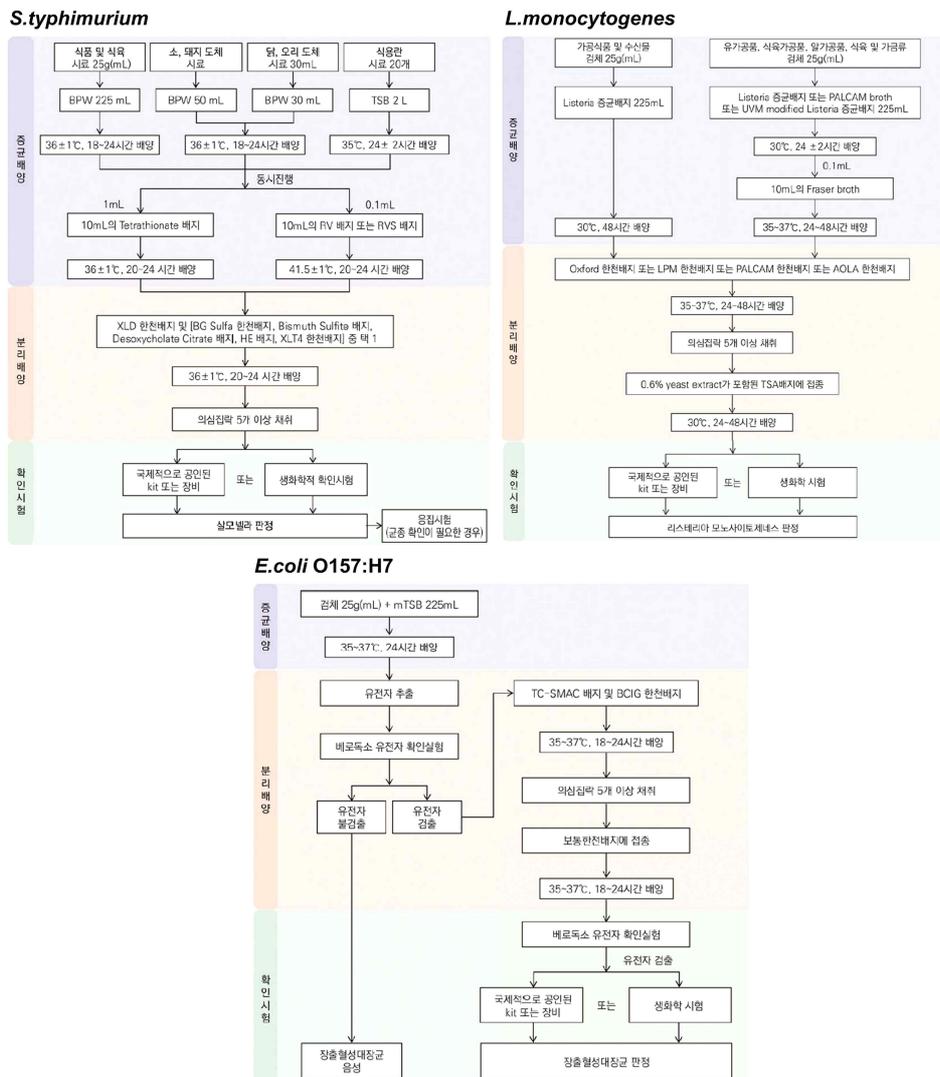
---

- 본 연구를 통해 구축된 시스템은 현장에서 비교적 신속하게 식품 미생물을 검출할 수 있게 하는 동분야 최초의 기술이며, 식품이 사용되는 여러 현장에서 발생할 수 있는 식중독 예방에 활발하게 적용이 될 것으로 기대함.
  - 개발한 시스템은 자동화 장비 및 일회용 카트리지를 통해 분석이 수행되므로, 간단한 교육을 통해 비전문가들도 손쉽게 사용할 수 있다는 장점이 있음.
  - 또한, 장비의 소형화 및 저비용화를 통해 보다 많은 현장에서 활용이 가능하여 사회적으로 식품관리의 안정성을 향상시킬 수 있음.
  - 해당 연구 내용은 카트리지에 적용되는 시약에 따라 검출 대상 범위의 확대가 가능하며, 식품 현장뿐만 아니라 코로나 19의 분자진단 검사, 보건의료, 수의분야 및 고위험 병원체 신속탐지 등 다양한 분야에서의 적용이 가능함.
  - 연구 과정에서 개발한 SA-HRP 중합체는 해당 검출법뿐만 아니라 다른 검사법에도 다양하게 적용이 가능함. 검출하고자 하는 대상을 감지하는 물질에 biotin을 중합한다면, SA-HRP 중합체를 신호체로 사용할 수 있음. 제작한 SA-HRP의 재현성을 확보하고 후속 연구를 통해 신호 증폭의 효과를 더욱 극대화할 수 있다면, 해당 중합체만으로도 기술적 경쟁력을 가질 수 있음.
  - 국내에서 최초로 시도하는 자동화 플랫폼과 식중독 박테리아 검출 키트가 상용화 되면 식약처 등록을 추진하고, 식품 분야의 HACCP 인증업체, 군부대, 대량 식자재 공급업체, 유통업체 등에 판매할 수 있는 시장 조사 결과에 따라 기업 매출 증대에 큰 효과가 있을 것으로 사료됨.
-

## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 개발 시스템과 식중독균 분야 표준 장비와의 비교 분석을 통한 정확도 및 신뢰도 평가
- 공인인증기관에서의 성능평가를 통한 시험성적서 발급 및 국제 표준 준수 여부 검증
- 식품회사의 협조를 구하여 개발 시스템의 객관적 검증을 위한 현장 테스트 및 실증화
- 선정 식중독균 외에도 발생 빈도가 높은 균을 추가적으로 대상 확장
- 자동화 플랫폼은 기술적인 완성도를 높이고, 개발된 시약을 통한 실증과 최적화 과정을 통해 기술적인 보완 개발을 추가로 진행한다. 식품회사의 품질관리용이나 학교, 대기업의 급식용 식자재의 스크리닝으로도 판매할 수 있어, 신기술을 통한 시장 진출 및 식품 안전성검사의 전문기업으로 성장할 수 있을 것으로 판단됨.
- 양산화 및 상용화 계획 : 식자재 유통 · 가공 · 판매 업체, 식품 제조 업체, 수출입 검역소 등의 수요처를 대상
- 전시회 참여 등을 통해 판매 개시를 위한 사전 마케팅 착수
- 상용화를 위한 제품 허가 프로세스 진행
- 자성체 기반 자동 검사기술의 플랫폼 기술 및 특허확보로 응용 분야 확대 및 수출을 위한 IP 확보

개발 시스템의 산업화를 위해서는 검증 및 인증이 필수적임. 이를 위해 기존에 동분야에서 적용되고 있는 검사법들과의 비교 및 공인인증기관에서의 시험 등을 수행할 예정임. 식품 공전에 제시되어 있는 각 식중독균에 대한 시험법은 다음과 같으며, 본 연구를 통해 개발한 시스템의 비교테스트를 진행하고자 함.



기존의 검사법과 비교하여 본 개발 시스템의 성능을 검증하고자 식품 공전 외에도 기존에 개발된 검사법들과 비교를 진행하고자 함. 분자진단 장비나 미생물 생화학 동정 장비 (VITEK) 또는 신속 검출키트와의 성능을 비교할 예정임. 식품공전 및 공식적인 미생물 검출 기술과의 성능 비교는 검출 민감도 및 특이도, 검출 시간, 결과의 재현성, 검사 비용 등을 평가하여 시행할 계획임.



< 기술 개발 이후 사업화 계획 >



< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		종료 1차년도	종료 2차년도	종료 3차년도	종료 4차년도	종료 5차년도
국외논문	SCIE	1				
	비SCIE					
	계	1				
국내논문	SCIE					
	비SCIE					
	계					
특허출원	국내					
	국외					
	계					
특허등록	국내		1			
	국외					
	계		1			
인력양성	학사					
	석사	2				
	박사					
	계	2				
사업화	상품출시			1		
	기술이전					
	공정개발					
제품개발	시제품개발		1			
비임상시험 실시						
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상				
		2상				
		3상				
	의료기기					
진료지침개발						
신의료기술개발						
성과홍보						
포상 및 수상실적						
정성적 성과 주요 내용						

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)

[별첨 1]

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호	120103-01		
사업구분	2020년도 농림축산식품 연구개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농축산물안전유통소비기술개발사업 (농축산물위해성분제어기술개발)			주관	
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	저가형 고감도 식중독균 현장탐지용 자동화 플랫폼 기술 개발			과제유형	개발
연구기관	을지대학교 산학협력단			연구책임자	조일훈
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2020. 5. 29 ~ 2021. 7. 31	180,000	60,100	240,100
	2차연도				
	3차연도				
	4차연도				
	5차연도				
	계	2020. 5. 29 ~ 2021. 7. 31	180,000	60,100	240,100
참여기업	비아이티밸류				
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021. 10. 7

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
을지대학교 산학협력단	부교수	조일훈

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.

확 약	
-----	---

## I. 연구개발실적

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

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

본 연구개발결과는 기존의 식품 식중독균을 검출하는 방식과 일부 중복성이 있을 수 있으나, 균의 농축부터 검출까지의 전 공정을 자동화한 liquid handling 형태의 시스템은 기존에는 보고되지 않은 것으로 동종 분야에서 차별성이 있으며, 시약기술, 용복합기술에서 독창성이 있음. 또한 본 연구에서 개발한 시스템은 소형화 및 저비용화를 통해 현장 적용성이 용이하다는 강점이 있어 추가 연구개발을 통해 완성도를 높인다면 식품분야 뿐만 아니라 다양한 분야에 적용이 가능함.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구를 통해 구축한 시스템은 현장에서의 신속하고 간편한 식중독균의 검출을 목적으로 함. 이는 식품 현장에서 발생할 수 있는 식중독을 예방하여 식중독에 대한 감시체계를 보다 활성화할 수 있는 효과가 있음. 식품업체의 품질관리 현실에서 본 과제와 자동화 시스템이 출시된다면, 시장에서 판매가능성이 높은 것으로 조사됨(삼성웰스토리, 롯데칠성, 동원F&B등 품질부서 의견). 현재는 식중독균 검사 공정별로 분리되어 있어 전문적인 기술이 필요하고, 시간이 많이 걸리나 본 시스템을 적용하면 비전문가들도 손쉽게 사용 가능하게 함으로써 활용도가 높을 것으로 기대되며, 관련시약(항체), 카트리지와 자성체등 소모품 판매를 통한 부가가치가 높은 제품임

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

개발한 시스템은 all-in-one 카트리지를 이용한 자동화 장비로, 비전문가도 손쉽게 사용할 수 있다는 편리성을 가짐. 또한 검사 시행 시 요구되는 규모가 크지 않기 때문에 현장 적용성이 높다는 장점이 있음. 해당 시스템을 이용하여 식품 미생물을 민감하고 정확하게 검출하기 위해 이에 대한 검증 작업이 필요함. 연구 개발 내용의 민감도 및 특이도 그리고 재현성을 확보하기 위한 테스트를 진행할 예정이며, 객관성을 위해 공인인증기관에도 성능 검사를 의뢰하고자 함.

해당 연구개발결과의 시스템은 일회성 카트리지를 기반으로 한 자동화 장비로, 카트리지의 구성에 따라 적용 대상이 다양함. 카트리지에 적용되는 시약, 특히 항체가 표적으로 하는 대상을 다르게 하여 임상 및 보건 산업에도 적용이 가능하며, 수의 분야나 생물 분석 공정에도 활용 가능함. 또한 면역분석뿐이 아닌 분자생물학적 분석도 최적화를 통해 적용이 가능함.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

당초 본 연구의 개발기간은 1년으로 길지 않은 기간이었고 해당 기간 동안 코로나의 확산으로 인해 연구 지속에 어려움을 겪을만한 이슈들이 발생하였음. 하지만 주관 및 공동연구개발기관은 과제의 원활한 진행을 위해 지속적으로 노력하였으며, 상호 간 적극적인 교류를 통해 목표를 달성하기 위한 연구 활동을 유지하였음. 그 결과 계획했던 목표의 상당부분을 달성할 수 있었음. 또한 관련된 연구노트도 성실하게 작성하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

본 연구 내용은 ‘2021 한국바이오칩학회 춘계 국제학술대회 및 기기전시회’에서 포스터 형식으로 발표되었으며, 핵심 개발 기술은 특허출원을 완료하였음. (출원번호10-2021-0094036) 과제 종료 후에는 SCI급 논문 1건을 투고할 예정임.

II . 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
3종균을 각각 20 cfu/g 이하에서 검출 가능한 감도	20	90	Listeria 감도가 목표치에 약간 미치지 못하였으나 다른 2균에 대한 감도는 목표치를 상회하였음
시료 전처리부터 검출까지 4~5시간 이내 처리 가능한 시스템 확립	20	100	3시간 배양과 추가 1~2시간의 농축 및 분석 시간을 통해 5시간 이내 공정을 달성하였음
저가형 및 현장형 간이-신속 검출 시스템 구축	30	100	100만원 이하의 식중독균 검출용 liquid handling system 시작품 제작을 달성하였음
농축, 분리, 검출 일체형 카트리지를 시작품 제작	30	100	식중독균 별 농축, 분리, 검출을 할 수 있는 시작품을 개발하였음
합계	100점	97.5점	

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구를 통해 기존에 개별적으로 분리되어 수행하였던 식중독균의 농축, 분리, 면역분석, 신호탐지 등의 일련의 절차를 한 측정시스템에서 자동화하여 현장 적용성을 높였다는 점에서 그 의의가 크다고 할 수 있음. 통상 현장 적용을 위해서는 사용의 편리성, 신속성, 간편성, 저가형 등의 요건이 충족이 되어야 하는데 본 시스템에서는 위 핵심 사항을 잘 반영하였다고 할 수 있음. 다만 배양 공정이 기기에서 직접 이루어지지 못하는 것이 한계점이지는 하나 향후 사업화를 위해 배양도 기기에서 구현할 수 있는 연구를 공동연구기관과 진행하고자 계획하고 있음. 특히 이러한 면역분석 기반 식중독 검사용 리퀴드 핸들링 자동 검사시스템의 특허 확보는 최근 COVID-19 등으로 그 중요성이 높아진 분자진단 및 혈액 검사 등에도 적용할 수 있는 플랫폼 기술이 될 수 있으므로, 본 연구 과제를 통해 달성한 성과는 비단 식중독균 검사 뿐만 아니라 다양한 산업 분야에서 활용성이 높다는 장점이 있기 때문에 광범위한 현장에서의 사회적 기여도가 높을 것으로 기대할 수 있음.

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

### IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

#### 1. 연구책임자의 의견

“저가형 고감도 식중독균 현장탐지용 자동화 플랫폼 기살 개발“ 과제에 참여한 비아이티밸류가 개발한 시스템은 아직 국내에서 출시된 제품이 없어 신규성이 있고, 출원된 특허도 아직 비공개 상태로 IP 관리 및 제품 출시 전에 비공개 필요성이 있음.

#### 2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 2]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	저가형 고감도 식중독균 현장탐지용 자동화 플랫폼 기술 개발			
주관연구기관	을지대학교 산학협력단		주관연구책임자	조일훈
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	180,000	60,100		240,100
연구개발기간	2020. 5. 29 ~ 2021. 7. 31			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:      )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 3종균을 각각 20 cfu/g 이하에서 검출	2종균에 대한 검출 감도 충족
② 시료 전처리부터 검출까지 4~5시간 이내 처리 가능한 시스템 확립	5시간 이내 검출 가능
③ 저가형 및 현장형 간이-신속 검출 시스템 구축	100만원 이하 저가형 시스템 개발
④ 농축, 분리, 검출 일체형 카트리지 시제품 제작	각 식중독균 별 시제품 개발

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 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)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SCI	비 SCI							
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	45%			15%	10%									20%	10%					
최종목표	1			1	5									1	1					
연구기간내 달성실적	1			1	5									1	0					
달성율(%)	100			100	100									100	0					

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	자성비드-항체 중합체를 이용한 검출 대상의 농축 및 분리
②	효소 중합체를 이용한 검출 신호의 증폭
③	식중독균 농축, 분리, 검출 자동화 liquid handling system

### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해결	정책 자료	기타
①의 기술							v			
②의 기술										
③의 기술	v	v				v				

\* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	타 식중독균에 대한 중합체 제조 및 시스템에 적용
②의 기술	고감도 분석을 위한 면역분석시스템 성능 향상에 활용
③의 기술	기술적 보완 및 시제품 제작 후 식품업체 보급 및 상용화 추진

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구활용등)
	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	45%			15%	10%									20%	10%				
최종목표	1	1		1	5	1	200				1			1	1				
연구기간내 달성실적	1	0		1	5	0	0				0			1	0				
연구종료후 성과창출 계획	0	1		0	0	1	200				1			0	0				

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기 <sup>3)</sup>	
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>			

- 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)

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농축산물안전유통소비기술개발사업 저가형 고감도 식중독균 현장탐지용 자동화 플랫폼 기술 개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 농축산물안전유통소비기술개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안된다.