

보안 과제(), 일반 과제(✓) / 공개(✓), 비공개()발간등록번호(11-1543000-002583-01)
농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 시범사업 제2차 연도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002583-01

실제시료에 적용 가능한 병원성 대장균 O157:H7 신속 검출용 현장형 엡타센서 개발 최종보고서

2019. 03. 26.

주관연구기관 / 건국대학교
협동연구기관 / (주)센서젠

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “실제시료에 적용 가능한 병원성 대장균 O157:H7 신속 검출용 현장형 엡타 센서 개발”(개발기간 : 2016. 12. ~ 2018. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 1. 18.

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자)
참여기관명 : (주)센서젠 (대표자)

송창선 (인)
서건호 (인)



주관연구책임자 : 서 건 호
참여기관책임자 : 서 건 호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116140-02	해 당 단 계 연구 기 간	2016. 12. 05 - 2018. 12. 04 (24 개월)	단 계 구 분	2차년도/ 2차년도
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농식품 창업 벤처지원 R&D 바우처 시범사업			
연구 과 제 명	대 과 제 명	실제시료에 적용 가능한 병원성 대장균 O157:H7 신속 검출용 현장형 엠타센서 개발			
	세부 과제명	실제시료에 적용 가능한 병원성 대장균 O157:H7 신속 검출용 현장형 엠타센서 개발			
연구 책임자	서 건 호	당해년도 참여연구원 수	총: 3 명 내부: 3 명 외부: 0 명	당해년도 연구개발비	정부:30000천원 민간:10000천원 계:40000천원
		연구기간 참여연구원 수	총: 3 명 내부: 3 명 외부: 0 명	총 연구개발비	정부:60000천원 민간:20000천원 계:80000천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	건국대학교 산학협력단			참여기업명: (주)센서젠	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위 탁 연 구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반
----------------------	----

9대 성과 등록 킷번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정 보	생물자 원	정보	실물
등록 킷 번호	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설 장비 현황

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

요약

- 개선된 SELEX 방법을 이용한 금나노-센서 최적 대장균 O157:H7 특이 앵타머 개발
- 타 기관에서 개발한 3종의 *E. coli* O157:H7 특이 앵타머의 inclusivity/exclusivity 평가 후 특허 획득과 실제 시료에서 금나노 앵타 센서 플랫폼 개발 연구의 기반 확보
- 조성비 및 신물질 첨가에 따른 성장곡선 분석을 통한 대장균 O157:H7 신속증균배지 개발 및 관련 특허 출원
- 개발기술을 토대로 당일 타겟 스크리닝이 가능한 센서 플랫폼 제시하여 신청기업의 제품화에 기여
- 기존 MYP 배지에 cefsulodin이라는 항생물질을 넣어 그람양성의 경쟁집락을 효과적으로 배제시킬 수 있는 새로운 배지를 개발함

보고서 면수

35

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 실제 시료에 적용이 가능한 현장형 금나노입자 기반 비표지 앵타센싱 기술 개발 ▪ 개발된 기술을 적용한 병원성 대장균 O157:H7 키트 시제품 개발 <ol style="list-style-type: none"> 1. 금나노-센서 최적 대장균 O157:H7 특이 앵타머 선별 및 융합조건 최적화 <ul style="list-style-type: none"> • 금나노-센서 적용에 최적화된 앵타머 선별 • 센서 버퍼의 최적화 2. 대장균 O157:H7 신속증균배지 개발 <ul style="list-style-type: none"> • 후보 배지 성분 선정을 위한 자료 조사 • 신속증균을 위한 배지 조성 최적화 및 신물질 선별 및 적용 3. 센서 플랫폼 구축 <ul style="list-style-type: none"> • 순수배양액에서의 검증을 통한 1차개발: • 실제 시료에서의 검증: 4. one-step kit 시제품 제작 및 AOAC 검증방법에 기반한 시제품 성능 검증 <ul style="list-style-type: none"> • User-friendly one-step kit 시제품 제작 • AOAC 검증방법을 차용한 주요 위해식품에서의 테스트 및 검증 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 개선된 SELEX 방법을 이용한 금나노-센서 최적 대장균 O157:H7 특이 앵타머 개발 및 관련 특허 출원 ▪ 조성비 및 신물질 첨가에 따른 성장곡선 분석을 통한 대장균 O157:H7 신속증균배지 개발 및 관련 특허 출원 ▪ 개발기술을 토대로 당일 타겟 스크리닝이 가능한 센서 플랫폼 제시하여 신청기업의 제품화에 기여 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 연구결과에 따른 기존 현장형 키트(항체면역키트) 대비 고감도의 앵타센서의 독자적인 기술을 바탕으로 한 상품화로, 최종적으로 국내 및 세계의 식중독세균 및 인수공통전염병 원인체를 타겟으로 하는 현장형 키트 시장에서 경쟁력 확보 전망 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>앵타머</p>	<p>금나노입자</p>	<p>현장 검출</p>	<p>실제시료</p>	<p>대장균 O157:H7</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>aptamer</p>	<p>gold nanoparticle</p>	<p>on-site detection</p>	<p>real sample</p>	<p><i>Escherchia coli</i> O157:H7</p>

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구수행 내용 및 결과	14
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	30
4. 연구결과의 활용 계획 등	32
5. 사업화 방안	33
붙임. 참고 문헌	35

<별첨 1> 연구개발보고서 초록

<별첨 2> 자체평가의견서

<별첨 3> 연구성과 활용계획서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

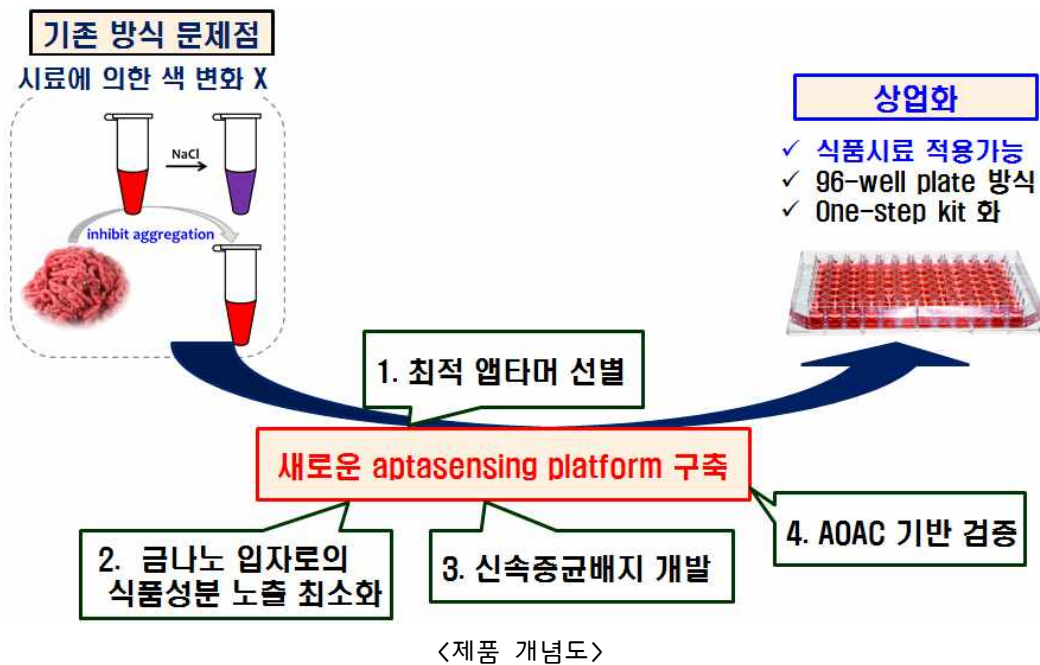
- 실제 시료에 적용이 가능한 현장형 금나노입자 기반 비표지 앵타센싱 기술 개발

1-2. 연구개발의 필요성

<연구개발 대상 및 기술 제품의 개요>

- 연구개발 개요 :

- 비색 금나노입자 기반 비표지 앵타센싱 기술은 민감도가 뛰어나면서도 결과를 육안으로 확인 가능함
- 하지만 실제 시료 내 성분들에 의해 금나노입자의 응집이 저해되어, 현장 적용에 한계가 있음
- 본 팀이 보유한 기술을 활용하여, 실제 시료에 적용이 가능한 바이오센싱 플랫폼을 개발하고자 함



○ 핵심기술

- 고성능 앵타머 개발 기술
 - ✓ random library 증폭시 발생하는 byproduct 억제(emulsion PCR), Cell에 비특이적으로 결합하는 sequence 제거용 향상(Graphene 활용) 등 나노기술을 활용한 기존 앵타머 개발시 발생하는 한계점 개선

- 시료 전처리 기술
 - ✓ 금나노입자의 응집에 관여하는 시료 내 다양한 inhibitor들의 노출을 최소화하기 위해 본 팀에서 보유하고 있는 자기구슬(magnetic bead), 필터법 등을 활용한 시료 전처리법 적용

- 신속증균배지 개발 기술
 - ✓ 균의 성장곡선 분석을 통한 균의 lag phase를 단축시켜 보다 신속한 증균이 가능한 배지 조성 도출

- 검출법 검증 노하우
 - ✓ 개발된 기술들의 국제공인검증방법인 AOAC validation 절차에 기반한 객관적인 검증데이터 제시, 본 연구팀은 다양한 검출법을 해당 절차에 기반하여 검증해왔으며 시료별 backdata 보유

1-3. 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- ◆ 국내 체외진단 분야는 90%이상이 의료용 바이오센서로 주로 암표지자, 면역반응, 대사물질 측정을 통한 간기능검사, 조직검사 등에 국한되어 있고 병원성대장균 검출 관련 진단 제품개발은 미비한 상태
- ◆ 국내 제품이 대개 의료용에 집중되어 있어 식품, 환경 내 병원성대장균을 위한 제품이 부족해 국외 제품에 의존하는 실정

○ 시장현황

- ◆ 2004년 국내 신속진단 kit 시장은 매출 상위 10개 업체를 기준으로 품목수로는 약 200여 개, 생산액은 약 3,300억원으로 추정되며, 생산업체는 녹십자, 영동제약, 동아제약이 있음
- ◆ 최근에는 에스디가 매출액 기준 400억원(2008년 기준)으로 비약적으로 발전한 반면, 기존 업체들의 매출은 저조하여 시장구도가 변화하고 있음
- ◆ (주)씨젠이 2009년도 기준으로 150억원의 매출액을 예상하고 있는 등 신생 바이오업체들에 의한 국내 진단kit 생산액은 증가할 것으로 예상됨
- ◆ 국내 시장의 규모는 전 세계 시장에 비해 작은 편이나 기술개발 수준은 시장규모에 비해 높은 편임
- ◆ 하지만 이는 어디까지나 시장규모에 비교한 것으로 미국, 프랑스 등 바이오 진단 선진국에 비해 제품 기술성이 부족한 실정임
- ◆ 또한 현재 기술수준의 대부분이 임상시료의 체외진단을 위한 기술로 이루어져 있고 검사 대상 또한 고병원성 인플루엔자, 간염 A바이러스, 암 지표 물질, 장기 건강 지표 생리대사 물질에 국한되어 있어 식품시료에서 병원성 대장균을 포함한 식중독균 검사에 관한 기술과 관련 제품은 세계시장 경쟁력이 매우 부족한 상태
- ◆ 국내 기술을 통한 제품개발 및 국제 기준 및 시험법 등재, 세계시장 시장개척이 매우 필요한 상황

○ 경쟁기관현황

- ◆ (주)코젠 및 (주)바이오니어에서 병원성대장균 신속 진단 kit를 개발하였으나 (2011), RT-PCR 기반의 검출법으로 현장 적용이 어려움
- ◆ 고려대학교 바이오센서 및 생분자공학 연구실 및 한국과학기술연구원에서 앵타머-금나노입자를 이용한 현장적용형 키트를 개발하였으나 그 대상이 식중독세균이 아닌 대부분이 환경시료 또는 화학물질 (항생제, 중금속 등)을 대상으로 한 시제품으로 조사됨

○ 지식재산권현황

- ◆ 국내 지식재산권 검색 결과 100건 이상이 검색되며 대부분이 현장적용성이 어려운 PCR 기반의 kit에 대한 특허가 대부분임
- ◆ 면역항체법 기반 검출 kit의 경우 순수배양액 단계까지만 적용된 경우가 대부분으로 실제 식품에까지 적용된 경우는 없음
- ◆ 비표지-앵타센서 기반의 검출법 또한 실제 식품단계까지 적용된 경우는 없어 본 연구팀이 개발목적으로 하는 검출법의 경우 특허활용에 어려움이 없을 것으로 판단됨

○ 표준화현황

- ◆ 현재까지 국내 제품중 표준화단계까지 진행된 검출법은 없으나, PCR법 또는 면역항체법 기반(latex agglutination) 검출법이 국내외 공인법에 스크리닝용 또는 확인동정용으로 사용되고 있는 만큼, 본 팀에서 개발예정인 앵타머-금나노입자 기반의 kit 역시 표준화 될 수 있는 가능성이 있음

회 사	제 품 명	특 징
Thermo Fisher Scientific	◆ MicroSEQ E. coli O157:H7 Detection kit	◆ RT-PCR기반의 kit ◆ FDA-BAM에 등재
BIOTECON Diagnostics	◆ foodproof E. coli O157 Detection Kit	◆ RT-PCR기반의 kit ◆ AOAC 검증 제품
ssidiagnostica	◆ diarrhoeagenic e. coli pcr kit	◆ RT-PCR기반의 kit
POSTBIO	◆ Pathogenic E.coli Detection Kits	◆ RT-PCR기반의 kit
Applied Biosystems	◆ TaqMan E.coli O157:H7 Detection Kit	◆ RT-PCR기반의 kit
Bioo Scientific	◆ MaxSignal E. coli O157:H7 ELISA Test Kit	◆ ELISA기반의 kit
Abraxis	◆ E. coli O157:H7 Latex Test kit	◆ ELISA기반의 kit ◆ USDA-FSIS의 검출법에 적용 가능

○ 지식재산권현황

- ◆ 병원성 대장균 신속검출관련 지식재산권의 경우 4,000건 이상 검색되었으며 대부분이 RT-PCR법을 기반으로 한 지식재산권이 대부분이었음
- ◆ FDA-BAM 또는 USDA-FSIS에서 주로 RT-PCR법을 등재하고 있어, 기업들이 중점적으로 투자 개발하고 있는 것으로 판단됨
- ◆ 본 연구팀이 개발에 사용하려고 하는 앵타머-금나노입자 센서의 경우 대부분이 화학물질 (중금속, 항생제 등) 또는 암세포 특이 항원을 대상으로 한 지식재산권이 대부분이며, 식중독 세균에 대한 센서의 경우 국내의 경우와 마찬가지로 실제 식품단계까지 적용한 경우는 검색되지 않았음
- ◆ 따라서 지식재산권 확보에 어려움이 없을 것으로 판단됨

○ 표준화현황

- ◆ 일부 PCR kit, ELISA kit 제품들의 경우 FDA BAM 또는 USDA-FSIS에 등재되어 식품에서 각각 신속하게 병원성 대장균의 존재유무를 알 수 있는 스크리닝 용도 또는 단일집락을 대상으로 한 스크리닝 검사에 활용되고 있음

1-4. 연구개발 범위

가. 1차년도

① 개발 목표

- 금나노-센서 최적 대장균 O157:H7 특이 앵타머 선별 및 융합조건 최적화
- 대장균 O157:H7 신속증균배지 개발

② 개발 내용 및 범위

- 금나노-센서 최적 대장균 O157:H7 특이 앵타머 선별 및 융합조건 최적화
 - 금나노-센서 적용에 최적화된 앵타머 선별
 - ✓ 기개발된 대장균 O157:H7 특이 앵타머 분석 및 적용가능성 타진
 - ✓ 차별화된 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment; 앵타머 선별과정)방법을 통한 선별기간 단축 및 고성능 앵타머 개발
 - 센서 버퍼의 최적화
 - ✓ 앵타머의 금나노입자와의 결합 및 타겟 접종시 금나노입자로부터의 분리에 영향을 미치는 다양한 factor들을 고려
- 대장균 O157:H7 신속증균배지 개발
 - 후보 배지 성분 선정을 위한 자료 조사
 - ✓ 기존 공인법 등재 및 상업화된 배지 내용성분 분석 등을 통한 기술정보를 수집
 - 신속증균을 위한 배지조성 최적화 및 신물질 선별 및 적용
 - ✓ 대장균 O157:H7 균주의 성장곡선 변화양상에 따라 신속증균에 효과적인 배합비 결정
 - ✓ 쇠고기 등 주요 위해시료에서의 공인증균배지 대비 신속증균력 확인

나. 2차년도

① 개발 목표

- 센서 플랫폼 구축 및 one-step kit 시제품 제작
- AOAC 검증방법에 기반한 시제품 성능 검증

② 개발 내용 및 범위

- 센서 플랫폼 구축
 - 순수배양액에서의 검증을 통한 1차개발:
 - ✓ 다양한 유래의 대장균 O157:H7균주 및 기타 다른 세균 균주들을 활용한 inclusivity/exclusivity 검사 수행
 - ✓ 대장균 O157:H7 균주 농도별 센서 감도를 평가하여 검출한계 도출
 - 실제 시료에서의 검증:
 - ✓ 쇠고기 등 주요 위해시료들에서의 센서의 검출한계를 확인
 - ✓ 필터 등 전처리를 통한 시료 증균액 내 inhibitor에 의한 센서 반응 저해 개선
- one-step kit 시제품 제작 및 AOAC 검증방법에 기반한 시제품 성능 검증
 - User-friendly one-step kit 시제품 제작
 - ✓ 개발 아이템들의 시제품화를 위한 상세 개발 프로토콜 제시
 - ✓ 연구기관 기업간 상호협조를 통한 시제품 제작
 - AOAC 검증방법을 차용한 주요 위해식품에서의 테스트 및 검증
 - ✓ 인위접종 부분양성/음성 시료를 이용하여 기존 검출방법 대비 우수성 입증

2. 연구수행 내용 및 결과

[1년차 연구개발목표 및 내용]

가. 개발목표

- 고성능 앵타머 발굴기법 확립
- 앵타머-급나머입자 융합조건 최적화

나. 개발내용 및 범위

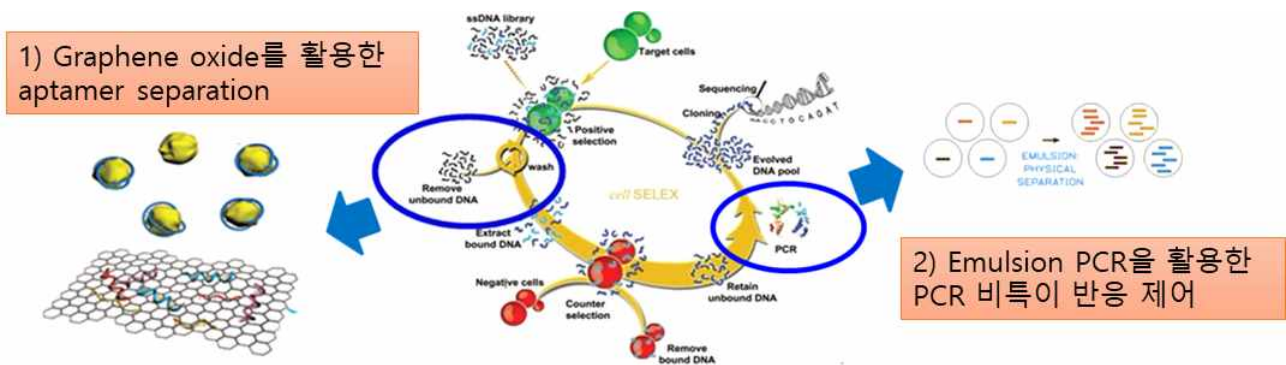
(1) Graphene oxide와 Emulsion PCR을 활용한 앵타머발굴기법 (SELEX, Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment) 개선/확립

① 기존 SELEX기법의 한계점

- 기존 SELEX 기법의 경우, 타겟 (본 연구개발의 경우 대장균 O157:H7)과 결합하지 않은 앵타머를 원심분리 후 상층액 (타겟과 결합하지 않은 앵타머를 포함하고 있음) 제거의 방법을 사용함
- 그러나, 해당방법은 선택성이 높고/낮은 앵타머를 부정확하게 separation 할 가능성이 높으며, 실험자의 숙련도에 따라 실험결과가 크게 달라질 수 있음
- 또한, SELEX후 앵타머 후보군을 증폭함에 있어 Conventional PCR을 활용할 경우 비특이 band들이 높은 비율로 증폭되어 타겟에 결합하는 정확한 앵타머 수급이 매우 어려움

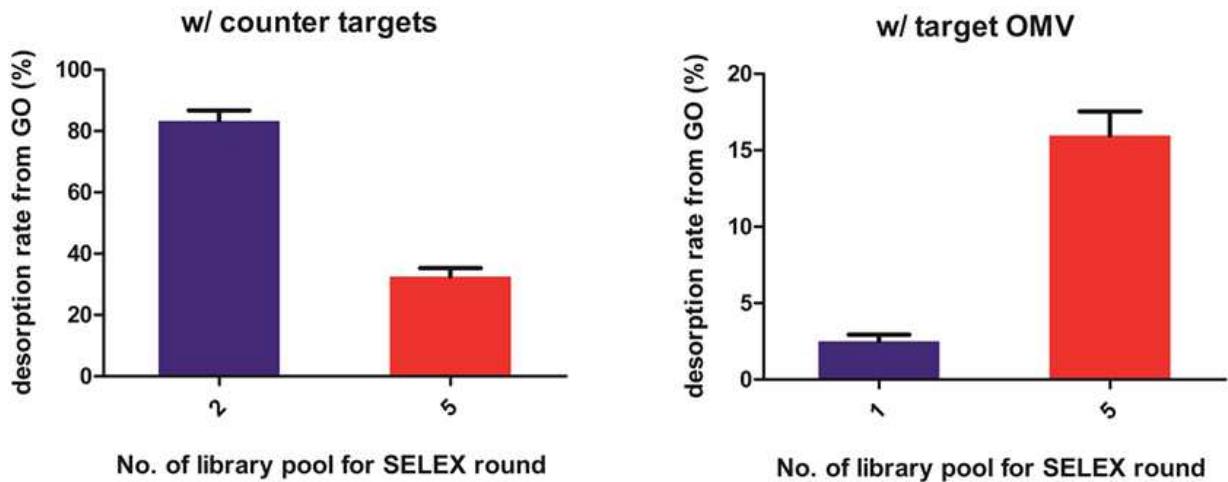
② 본 팀 개발 SELEX 기법

- Graphene oxide를 사용한 separation을 통하여, 정확하고 선택성이 높은 타겟 결합 앵타머를 수급함
- Emulsion PCR을 통하여 PCR 반응 시 발생하는 비특이 반응을 제어함
-



<본 팀 개발 SELEX 기법 모식도>

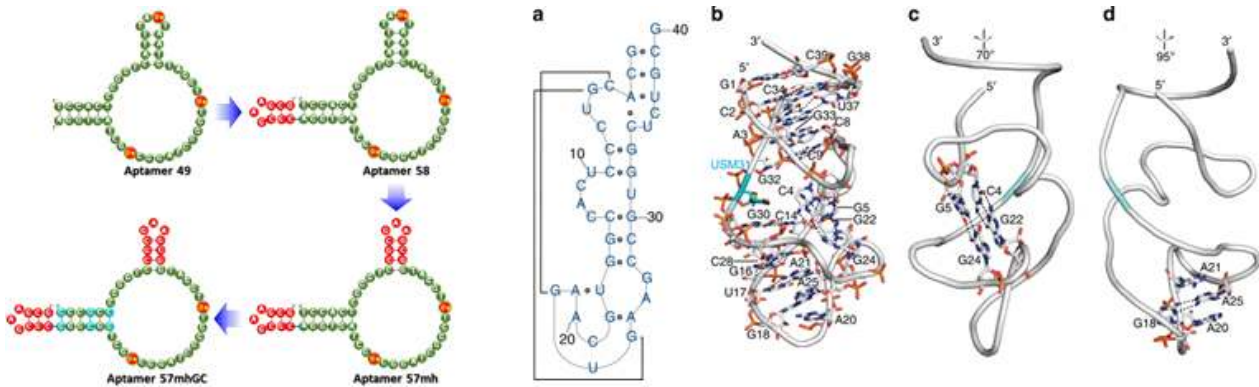
- Counter target (음성 대조군)에 2, 5라운드의 앵타머를 반응시켰을 때, 2라운드 앵타머는 80% 이상이 결합하였으며, 5라운드의 앵타머는 30% 정도만 결합하였음
- Target (양성 대조군)에 1, 2라운드의 앵타머를 반응시켰을 때, 1라운드의 앵타머는 2% 정도가 결합하였고, 5라운드의 앵타머는 15% 이상 결합하였음
- 결론적으로 해당기술을 적용하여 초기 라운드 (1,2 라운드) 의 앵타머 후보군과 5라운드 앵타머 후보군의 선택성을 비교해본 결과, 후기 라운드의 앵타머가 높은 선택성을 나타내었음



[본 팀 개발 앵타머 발굴기술을 적용한 발굴초기 (1,2라운드) 발굴후기 (5라운드) 앵타머 후보군의 선택성 비교

(나) 금나노입자와의 결합 최적화

○ 구조예측, 염기비율 분석, pH 조절 등을 통해 최적의 금나노입자 흡착률을 위해 필요한 조건 확립함



[염기비율 및 구조 분석 예시]

○ 금나노입자의 농축을 통하여, 센서 플랫폼의 color spectrum을 대폭 상승 시킴 (기존 0.88 > 개선 1.47)



[염기비율 및 구조 분석 예시(좌, 기존; 우, 개선)]

(다) 병원성 대장균 검출용 선택배지 개선 연구: Modified MacConKey agar

○ MacConkey agar는 Eosin Methylene Blue agar와 함께 미국 식품의약국의 세균학적 분석 설명서 (FDA BAM; Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual) 기준으로 병원성 대장균 O157:H7을 제외한 나머지 병원성 대장균의 정성검출에 적용되는 배지임. 해당 두 배지의 선택성은 대장균의 배지 내 lactose의 분해능에 의한 pH 변화에 따른 색깔변화에 기인함

○ 하지만, 일부 *Citrobacter*나 *Enterobacter*도 대장균양의 전형집락을 보일 수 있다고 보고된 바 있으며, 본 팀의 선행연구에서도 야채 같은 특정시료에서 대장균과 동일한 형태의 집락을 형성하는 *Citrobacter braakii* 균주 기보유함. 해당시료에서 이 *C. braakii* 균주는 대장균 대비 오염도가 월등히 높아, 선택배지상에서 선별되지 않을 경우 높은 대장균

위양성률로 인해 확인동정에 많은 시간과 비용이 소모될 여지가 있어 개선이 필요

- 본 연구에서는 해당 균주들이 모두 H₂S가스를 생성능이 있다는 사실에 착안하여, 살모넬라 선택배지인 Xylose-Lysine-Desoxycholate agar에서 H₂S가스 생성의 지시제인 Ferric ammonium citrate와 sodium thiosulphate를 동일한 농도로 첨가하고, 가스생성의 확인을 어렵게하는 lactose 농도를 최소화함으로써, 대장균과 *C. braakii*의 구분이 가능한 modified-MacConkey agar를 개발하고, 그 성능을 보유하고 있는 20종의 병원성 대장균을 포함한 대장균과 야채시료에서 분리된 15종의 *C. braakii* 균주들을 이용하여 그 성능을 평가하였음

표 1. MacConkey agar 조성 및 m-MacConkey agar 최종 조성

Supplement	MacConkey agar	m-MacConkey agar
Peptone	17.0 g	10.0 g
Proteose Peptone	3.0 g	5.0 g
Bile Salts No.3	1.5 g	3.6 g *
NaCl	5.0 g	1.5 g
Agar	13.5 g	5.0 g
Neutral Red	0.03 g	10 g
Crystal Violet	0.001 g	6.0 g
Lactose	10.0 g	2.5 g
Sodium thiosulphate	-	6.8 g
Ferric ammonium citrate	-	0.8 g
Distilled water	1000 ml	
pH to 7.1 (+- 0.2)		

표 2. 20종 대장균에 대한 MacConkey agar 및 modified-MacConkey agar에서의 배양시간에 따른 대장균 전형집락을 나타내는 플레이트 수 비교

배양시간(h)	Presumptive positive plates/tested plates (%)	
	MacConkey agar	Modified-MacConkey agar
12	0/20	0/20
24	20/20	20/20
36	20/20	20/20
48	20/20	20/20

결과고찰: 12시간째에서는 집락의 크기가 너무 작아 전형집락 여부를 판단할 수 없었으나, 24시간째부터는 두 선택배지 모두에서 전형적인 대장균 집락형태를 확인할 수 있었음. 따라서, modified-MacConkey agar는 기존 배지와 다른 조성에도 불구하고 대장균에 대한 충분한 민감도를 보인다는 것을 확인함

표 3. 15종 *Citrobacter braakii*에 대한 MacConkey agar 및 modified-MacConkey agar에서의 배양시간에 따른 대장균 전형집락을 나타내는 플레이트 수 비교

배양시간(h)	Presumptive positive plates/tested plates (%)	
	MacConkey agar	Modified- MacConkey agar
12	0/20	0/20
24	20/20	3/20
36	20/20	0/20
48	20/20	0/20

결과고찰: 대장균 결과와 마찬가지로, 12시간째에서는 집락의 크기가 너무 작아 전형집락 여부를 판단할 수 없었으나, 24시간째부터는 MacConkey agar의 경우 모든 샘플에서 대장균과 동일한 형태의 집락을 나타내는 것을 볼 수 있었으나, modified-MacConkey agar의 경우 대부분의 샘플에서 H₂S가스 형성으로 인해 집락의 가운데가 회색을 띄거나 검은색 점을 형성하는 것을 관찰할 수 있었음. 36시간부터는 모든 샘플에서 이러한 경향을 확인할 수 있었으며, 일부 플레이트에서는 집락이 아예 검은색으로 변하는 것이 확인됨 따라서, 개발된 modified-MacConkey agar는 기존의 배지에서 구분이 불가능했던 *Citrobacter braakii* 균주를 효과적으로 배제할 수 있다고 판단되며, 해당 세균의 오염도가 높은 야채류 등의 시료에서 병원성 대장균을 포함한 대장균을 효과적으로 검출하는 데 활용될 수 있을 것으로 사료됨

[2년차 연구개발목표 및 내용]

(가) Cefsulodin이 첨가된 개선된 Mannitol-Yolk-PolymyxinB 배지의 개발

1. 개요

- 바실러스 세레우스는 상재균으로서 쌀을 비롯한 곡류, 야채, 육류 등에 다양한 식품에 널리 분포한다. 바실러스의 감염량은 환자의 면역상태에 따라 다르나 다른 식중독균에 비해 매우 높기 때문에 정정보다는 정량이 우선시 되어 세계 각국은 바실러스에 대한 정량 기준을 가지고 있다.
- 한국에서도 바실러스의 정량기준이 있어서 분유나 유아용식품 등에서는 100 CFU/g이하, 무순이나 샐러드 등에서는 1000 CFU/g 이하, 된장, 고춧가루 등의 조미식품에서는 10000 CFU/g 이하의 바실러스 세레우스 기준을 가지고 있다. 이러한 바실러스 세레우스의 정량 검출은 배지를 사용한 표준화된 방법이 널리 사용되고 있다.
- 바실러스 세레우스 선택배지는 MYP (Mannitol-Yolk-PolymyxinB Agar)와 PEMBA (polymixinB-pyruvate-egg yolk-mannitol bromothymol blue agar), KG agar 등이 있다. 바실러스 세레우스는 lecithinase반응을 통해 egg yolk와 반응하여 불투명한 환을 형성하며, 만니톨을 분해하지 못하는 것이 특징이다. 한편 기존의 MYP는 한가지 항생제 (polymyxinB)만 첨가되는데, 이것은 주로 그람음성균만 저해시키므로 기타 그람 양성균의 경쟁집락에 대하여 적합한 항생제를 추가해 줄 필요가 있다.
- 본 실험에서는 기존 MYP 배지에 **cefsulodin**이라는 항생물질을 넣어 새로운 배지를 개발하였다. 개발된 배지를 기존 MYPA 배지와 비교하여 실제 식품시료에서 바실러스 검출용으로 사용하였으며 우수한 효과를 보였다.

2. 실험방법

(1) 배지의 제조

- 아래와 같은 방법으로 새로운 배지를 개발하였다. 성분배합은 아래와 같다.

표 1. 배지의 성분배합 (1L 당 용량)

	기존 배지(MYPA)	개선배지(Cefsu-MYPA)
아가베이스	Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar 43 g (Oxoid)	Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar 43 g (Oxoid)
난황(Egg yolk)	100 ml (Oxoid)	100 ml (Oxoid)
항생물질	PolymyxinB (Oxoid): 100,000 IU	PolymyxinB (Oxoid): 100,000 IU cefsulodin (Sigma): 1-64 mg

(2) 개발된 배지를 활용한 다양한 식품 내 바실러스 세레우스 검출

- 식품공전 내 바실러스 세레우스의 검출기준이 존재하는 식품을 중심으로 배지를 평가하였다. 3-4 log CFU/g 수준의 바실러스 세레우스 균을 접종하고 식품공전에 나온 검출 기법을 바탕으로 두 가지 배지를 이용하여 바실러스 세레우스의 정량 검출율을 비교하였다.

3. 실험결과:

1> 검출율 비교

: 검출률 면에서 두가지 배지는 유의적인 차이를 보이지 않았다

표2. 식품 대상, 두 가지 배지에서 바실러스 세레우스 검출율 비교

시료	바실러스 세레우스 균수(Mean ±SD, Log CFU/g)		
	접종량	기존 배지(MYPA)	개선배지 (Cefsu-MYPA)
고추가루	4.32 ±0.07 A	3.55 ±0.03 B	3.74 ±0.11 B
된장	4.32 ±0.07 A	3.63 ±0.06 B	3.70 ±0.06 B
야채샐러드	3.32 ±0.07 A	2.93 ±0.14 B	3.03 ±0.09 B
생식	3.32 ±0.07 A	3.23 ±0.12 A	3.37 ±0.19 A

* 서로 같은 알파벳은 통계적인 유의차가 없음을 의미함

실험결과 분석: 표2에 나타나 있듯이 두 가지 선택배지의 검출율에서 기존배지와 개선배지 간의 검출율은 차이를 보이지 않아, 개선된 배지가 기존 배지를 대체하여 사용 가능성이 확인되었다.

2> 선택성 비교

: 개선된 배지는 기존 배지에 비해 훨씬 우수한 선택성을 보였다

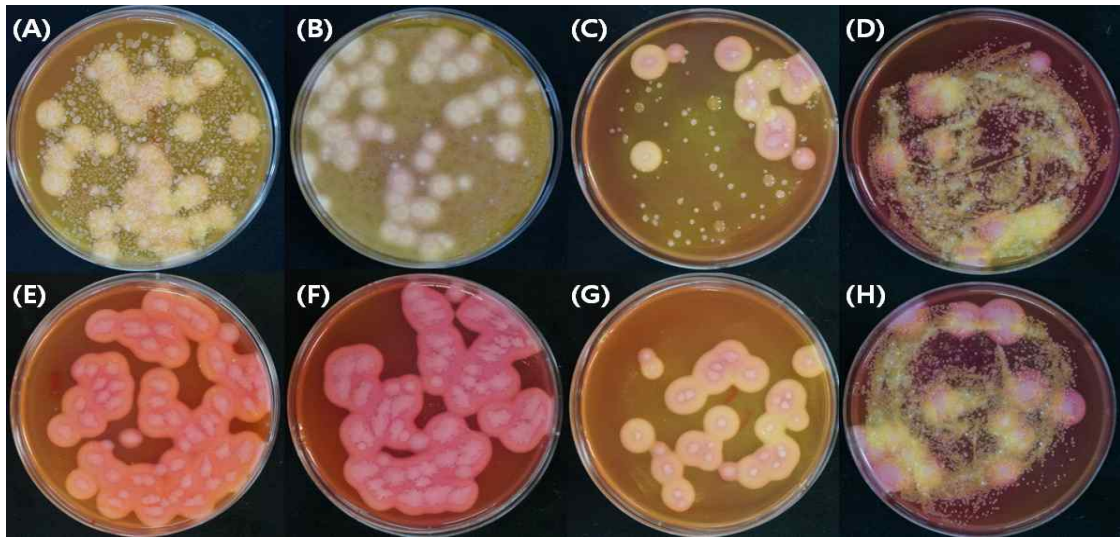


그림1. 각각의 배지에서 분리된 *B. cereus* 집락:

A- 기존배지, 고춧가루; B- 기존배지, 된장; C-기존배지, 생식; D- 기존배지, 야채샐러드
E- 개선배지, 고춧가루; F- 개선배지, 된장; G-개선배지, 생식; H- 개선배지, 야채샐러드

결과분석: 그림1을 보면 불투명한 환으로 둘러싸인 분홍색 집락이 바실러스 세레우스 집락인데, 개발된 배지는 경쟁집락이 없이 바실러스 세레우스만 있는 반면 기존 배지는 경쟁집락에 덮여서 바실러스 세레우스를 찾기가 훨씬 어려운 것을 확인할 수 있다. 특히 고춧가루와 된장은 기존배지의 경우 경쟁집락에 심하게 덮여있었으니 개선된 배지에서는 이 부분이 해소되었다. 특히 고춧가루와 된장의 경우 기존배지는 경쟁집락이 과도로 산화하여 분홍색집락이 전혀 없이 노란색 집락만 보이기도 한다. 결론적으로 새로 개발된 배지는 바실러스 세레우스 검출력에서는 기존 배지와 비슷하면서도 선택성에서는 기존 배지에 비해 우수한 것을 확인하였다.

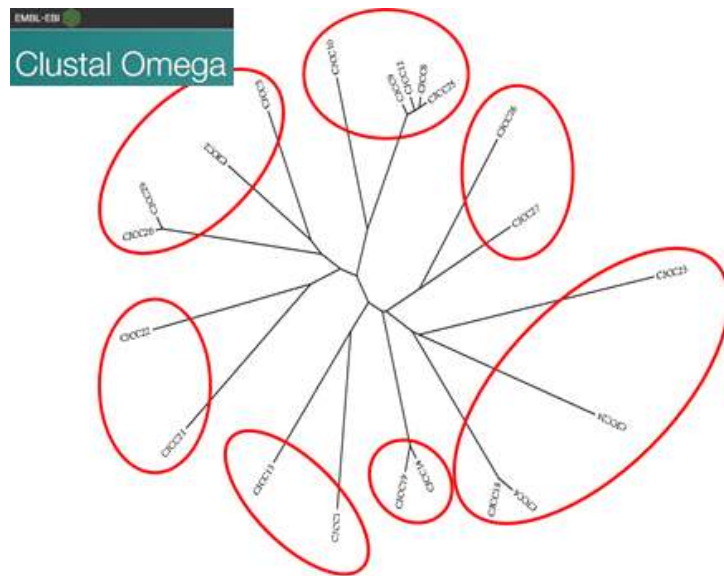
(나) *E. coli* O157 선별 및 구축 플랫폼으로의 적용

① 앵타머 선별 및 결합조건 최적화

㉓ 앵타머 후보군 탐색

○ 본 팀에서 직접 개발한 *E. coli* O157에 대한 앵타머와 타 연구팀에 의해 기개발된 앵타머 모두를 조사함

○ 구조 예측 소프트웨어를 활용하여 조사된 앵타머들을 구조별로 그룹화 함



[구조예측 소프트웨어(clustal omega)를 활용한 앵타머 후보군 그룹화]

㉔ 그룹별 대표 앵타머 선정 및 금나노입자와의 결합가능성 평가

○ 앵타머 그룹별로 대표 앵타머를 선정하여 앵타머별로 염기서열들을 분석/정리하여 금나노입자와의 결합가능성을 평가함

[그룹별 대표 애플타머의 염기서열 분석을 통한 금나노입자와의 결합가능성 평가]

후 보 군	A, C (%)	T (%)	출 처	비 고
O157-1	35%	27%	본 연구팀	T의 비율이 높아 결합가능성 낮음
O157-2	34%	24%		
O157-9	32%	27%		
DNS17	45%	20%	Amraee et al. 2017	ONS23의 경우 결합가능성 유리
DNS18	62.5%	7.5%	Yu et al. 2018	
DNS16	40%	20%	Marfon et al. 2016	

㉔ 애플타머 선별 및 결합조건 최적화

- 금나노입자와의 결합가능성이 높은 애플타머 후보군 몇 개를 선별하여 애플타머-금나노 입자와의 결합시도 결과 본 연구팀에서 개발한 애플타머의 경우 A, C의 비율(높을수록 결합에 유리함)이 낮고 T의 비율(높을수록 결합에 불리함)이 높아 예비실험 결과 금나노입자와의 결합이 용이하지 않았으며 (data not shown), 현재 개선 시도중에 있음
- 따라서, 타 연구팀에서 개발한 애플타머를 이용하여 금나노입자와의 결합조건을 최적화 후 플랫폼을 구축하고 해당 플랫폼의 선택성과 민감도를 평가하였음
- 결합조건 최적화 과정은 아래와 같음

- ☞ 금나노입자 50 ul를 다양한 농도(0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 M)의 MgCl₂가 함유된 DPBS와 섞어 색깔변화를 관찰하고 분광광도계(spectrophotometer)를 통해 파장변화를 동시에 측정하여 MgCl₂의 농도를 결정하였음 (data not shown)
- ☞ 금나노입자 50 ul와 다양한 농도 (0, 0.07, 0.14, 0.21, 0.28, 0.35, 0.42, 0.49, 0.56, 0.63 and 0.7 μ M)의 애플타머가 포함된 DPBS(MgCl₂ 농도는 2M) 10 ul를 섞어주고 색깔변화와 파장변화를 측정함
- ☞ 실험결과 최적화된 MgCl₂ 농도는 2M, 애플타머의 농도는 0.42 μ M로 결정됨

② 선택성 평가

- 소고기 분쇄육 유래 *Escherichia coli* O157:H7 균주를 포함한 20종의 병원성 대장균과 13종의 타 세균들을 이용하여 구축된 플랫폼의 선택성을 평가하고자함

대장균 20종	분류	균주 (유래)
	EHEC	<i>Escherichia coli</i> O26:H11 (human)
		<i>Escherichia coli</i> O91
		<i>Escherichia coli</i> O103:H2 (human)
		<i>Escherichia coli</i> O103:H6 (human)
		<i>Escherichia coli</i> O103:H11 (human)
		<i>Escherichia coli</i> O111:H8 (human)
	EPEC	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (ground beef)
		<i>Escherichia coli</i> O45:H2 (dog)
		<i>Escherichia coli</i> O88
		<i>Escherichia coli</i> O177
	ETEC	<i>Escherichia coli</i> O25
		<i>Escherichia coli</i> O121:H9 (human)
		<i>Escherichia coli</i> O130
	EAEC	<i>Escherichia coli</i> O145:NM (human)
		<i>Escherichia coli</i> O104:H2 (human)
		<i>Escherichia coli</i> O104:H4 (human)
		<i>Escherichia coli</i> O104:H7 (animal carcass)
	EIEC	<i>Escherichia coli</i> O104:H12 (human)
		<i>Escherichia coli</i> O176
<i>Escherichia coli</i> O96		

세 균	유 래	비 고
<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	임상시료/소 분변	표준균주
<i>C. jejuni</i> 9	닭 도체	본 연구팀에서 분리
<i>C. jejuni</i> 10	닭 도체	
<i>C. jejuni</i> 11	닭 도체	
<i>C. coli</i> ATCC 33559	임상시료/돼지 분변	표준균주
<i>C. coli</i> 1	닭 도체	본 연구팀에서 분리
<i>C. coli</i> 2	닭 도체	
<i>C. coli</i> 3	닭 도체	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	닭 도체	
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	임상시료	표준균주
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	임상시료	표준균주
<i>E. cloacae</i>	닭 도체	본 연구팀에서 분리
ESBL - <i>E. coli</i>	닭 도체	

○ 선택성 평가 과정은 아래와 같음

1. *E. coli* O157
 - 1) 실험실 내 stock을 사용
 - 2) TSA에 계대

 2. Aptamer
 - 1) Bionics에서 주문
 - 2) 95°C (water bath) 10분, 얼음에서 15분, 상온에 30분 이상 두어 aptamer의 3차 구조를 안정화시켜 준비함

 3. AuNP
 - 1) 4°C에서 보관하며, 실험 전 최소 30분 이상 상온에 둠

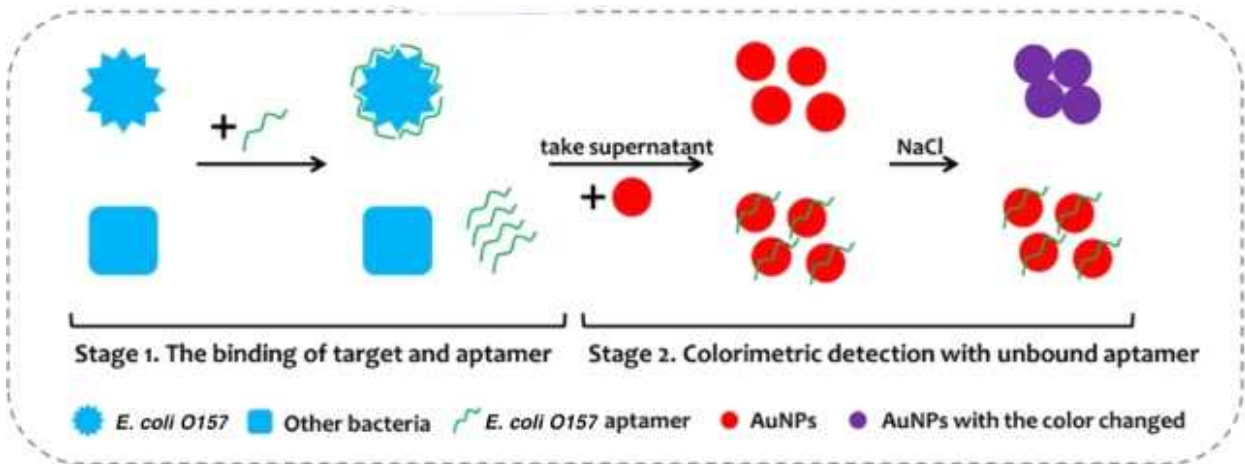
 4. NaCl 농도 확인
 - 1) 10 μ l의 2M NaCl을 90 μ l의 AuNP와 반응시켰을 때 AuNP가 응집하여 색깔이 변하는 것을 확인

 5. *E. coli* O157 CFU별 검출 확인
 - 1) *E. coli* O157 균액을 CFU 별로 준비 (10⁸ CFU/ml, 10⁷ CFU/ml, 10⁶ CFU/ml, 10⁵ CFU/ml, 10⁴ CFU/ml, 10³ CFU/ml, 10² CFU/ml, 10¹ CFU/ml, 0 CFU/ml)
 - 2) 균액 2 μ l와 aptamer 18 μ l를 반응
 - 3) 원심분리 후 상층액 10 μ l와 90 μ l의 AuNP를 반응
 - 4) 10 μ l의 2M NaCl을 첨가하였을 때 색깔 변화가 나타나지 않았음

 6. Aptamer 최적 농도 결정
 - 1) Aptamer를 각각 농도별로 준비 (1.8 μ M, 3.6 μ M, 5.4 μ M, 7.2 μ M, 9.0 μ M, 10.8 μ M, 12.6 μ M)
 - 2) 10 μ l의 aptamer를 90 μ l의 AuNP와 반응
 - 3) 10 μ l의 2M NaCl을 첨가하였을 때 색깔 변화가 나타나지 않았음
- ☞ 원심분리를 통해 상층액은 제거하고 pellet만 남겨둔 후, 앵타머와 반응시킴 (20분)
- ☞ 다시 원심분리를 통해 상층액(세균과 결합하지 않은 앵타머가 존재)만을 금나노입자와 반응시켜 3분뒤, 색깔변화를 관찰하고 분광광도계(spectrophotometer)를 통해 파장변화를 동시에 측정함

<향후 계획>

- 선택성 평가 결과 애타센서가 *E. coli* O157와 반응할 경우 금나노 입자의 색이 파란색-보라색으로 나타났으며 (응집됨), 기타 세균들과 반응할 경우에는 빨간색으로 색이 유지되었음(응집되지 않음)
- 본팀 선행연구에서 캄필로박터 특이 금나노-애타센서 개발에서 구축된 기술을 적용하여 개선된 *E. coli* O157 애타 센서를 개발하고자함.



3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

성과 지표	특허출원	특허등록	품종등록	기술이전 (건)	기술료 (백만원)	제품화 (건)	매출액 (백만원)	수출액 (백만원)	고용 창출 (명)	투자유치 (백만원)	기술인증	논문 (SCI)	논문 (비SCI)	논문 평균 IF	학술발표	교육지도	인력양성	정책활용	홍보전시	기타	계	
계획 (A)	2					1									1							4

3-2. 목표 달성여부

성과 지표	특허출원	특허등록	품종등록	기술이전 (건)	기술료 (백만원)	제품화 (건)	매출액 (백만원)	수출액 (백만원)	고용 창출 (명)	투자유치 (백만원)	기술인증	논문 (SCI)	논문 (비SCI)	논문 평균 IF	학술발표	교육지도	인력양성	정책활용	홍보전시	기타	계	
계획 (A)	2					1									1							4
실적 (B)	2					1									2							5
유효성 여부	○	X	X	X	X	○	X	X	X	X	X	X	X	X	○	X	X	X	X	X	X	3
목표 달성률 (C: B/A)	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	
지표	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	

달성률 (C' = C)																					
가중치	0.33	-	-	-	-	0.33	-	-	-	-	-	-	-	-	0.33	-	-	-	-	-	1
점수 (D)	33.3	-	-	-	-	33.3	-	-	-	-	-	-	-	-	33.3	-	-	-	-	-	100

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

○ 최종 성과목표 및 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
특허출원 (2건)	33.3	100	정량목표 달성
시제품 (1건)	33.3	100	정량목표 달성
학회발표 (1건)	33.3	100	정량목표 달성
합계	100	100	정량목표 달성

○ 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등): 해당사항 없음

4. 연구결과의 활용 계획 등

- 타 기관에서 개발한 3종의 *E. coli* O157:H7 특이 앵타머의 inclusivity/exclusivity 평가 후 특허 획득과 실제 시료에서 금나노 앵타 센서 플랫폼 개발 연구 지속
- 본 발명의 대장균 배양 및 검출용 배지 조성물을 이용 시, 종래 배지에서 검출이 불가능했던 대장균과 *C. braakii* 균주를 육안으로도 효과적으로 구별할 수 있고, 대장균과 상이한 균락 형태를 나타내어 *C. braakii* 균주를 효과적으로 배제할 수 있었음. 또한, 본 발명의 배지는 대장균만을 선택적으로 성장시키고 *C. braakii*의 성장을 저해하여, 효과적으로 대장균을 배양할 수 있어, 관련 산업에 유용하게 이용될 수 있음
- 따라서, 기존 페트리필름법을 개선한 대장균 선택배지의 현장평가 완료 후 특허 등록 획득 및 시제품 개발과 상용화
- 본 연구와 병행하여 개발한 바실러스 세레우스 검출 배지를 기존 MYP 배지와 비교하여 실제 식품시료에서 바실러스 검출용으로 사용하였으며 의심 집락 선별에 우수한 효과를 보임을 확인함
- 이 결과를 활용하여 바실러스 세레우스 검출 배지의 추가 성능평가 완료 후 특허 등록 획득 및 시제품 개발과 상용화

5. 사업화 방안

5-1. 연구에서 개발한 키트가 기존대비 가격 등에 대한 정량적인 비교

키트	원리	검출 시간		검출비용(원/ 샘플)	검출 역치
		중균	검출		
Aptasensor (본연구개발 시제품)	금나노 애타센서의 색 변화 육안 현장 확인	8시간	10분	2,000	1CFU/25g
Neogen Reveal	면역기법과 측면 흐름 크로마토그래 피를 합한 lateral flow device	8시간	20분	8,000	1CFU/25g
SDI RapidChek	이중항체 샌드위치 면역기법을 사용한 측면흐름 스트립	8시간	10분	8,000	1CFU/25g
Dupont BAX	Q-PCR-SYBR Green	8시간	3시간	10,000	<5CFU/65g
BioControl GDS	Probe-based Q-PCR	8시간	75분	10,000	1CFU/25g
FDLB Pathatrix	recirculation , follow-up plating이나 PCR을 통한 항체코팅된	5시간	3시간 qPCR and/or 24시간 배양	15,000	<5CFU/65g

	비드를 캡처				
--	--------	--	--	--	--

5-2. 실용화하기 위한 호환성 검증 및 신뢰성 확보와 재현성 검증 방안

① 개발 목표: AOAC 검증방법에 기반한 시제품 성능 검증

② 개발 내용 및 범위

- 센서 플랫폼 구축

- 순수배양액에서의 검증을 통한 1차개발:

- ✓ 다양한 유래의 대장균 O157:H7균주 및 기타 다른 세균 균주들을 활용한 inclusivity/exclusivity 검사 수행
- ✓ 대장균 O157:H7 균주 농도별 센서 감도를 평가하여 검출한계 도출

- 실제 시료에서의 검증:

- ✓ 쇠고기 등 주요 위해시료들에서의 센서의 검출한계를 확인
- ✓ 필터 등 전처리를 통한 시료 증균액 내 inhibitor에 의한 센서 반응 저해 개선

- one-step kit 시제품 제작 및 AOAC 검증방법에 기반한 시제품 성능 검증

- User-friendly one-step kit 시제품 제작

- ✓ 개발 아이템들의 시제품화를 위한 상세 개발 프로토콜 제시
- ✓ 연구기관 기업간 상호협조를 통한 시제품 제작

- AOAC 검증방법을 차용한 주요 위해식품에서의 테스트 및 검증

- ✓ 인위접종 부분양성/음성 시료를 이용하여 기존 검출방법 대비 우수성 입증

붙임. 참고문헌

- Amraee, Masoum, et al. DNA Aptamer Identification and Characterization for E. Coli O157 Detection Using Cell Based SELEX Method." *Analytical Biochemistry*, vol. 536, 2017, pp. 36-44.
- Kim, Hong-Seok, et al. Two-Stage Label-Free Aptasensing Platform for Rapid Detection of Cronobacter Sakazakii in Powdered Infant Formula." *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 239, 2017, pp. 94-99.
- Wu, Wen-He, et al. Aptasensors for Rapid Detection of Escherichia Coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium." *Nanoscale Research Letters*, vol. 7, no. 1, 2012, p. 658.
- Yu, Xiaofan, et al. Whole-Bacterium SELEX of DNA Aptamers for Rapid Detection of E.coli O157:H7 Using a QCM Sensor." *Journal of Biotechnology*, vol. 266, 2018, pp. 39-49.
- H.P. Dwivedi, R.D. Smiley, L.A. Jaykus, Selection and characterization of DNA aptamers with binding selectivity to Campylobacter jejuni using whole-cell SELEX, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87 (2010) 2323e2334.
- F. Chen, J. Zhou, F. Luo, A.B. Mohammed, X.L. Zhang, Aptamer from wholebacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent Mycobacterium tuberculosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357 (2007) 743e748.
- Y.S. Kim, M.Y. Song, J. Jurng, B.C. Kim, Isolation and characterization of DNA aptamers against Escherichia coli using a bacterial cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment approach, *Anal. Biochem.* 436 (2013) 22e28.
- K. Ninomiya, K. Kaneda, S. Kawashima, Y. Miyachi, C. Ogino, N. Shimizu, Cell-SELEX based selection and characterization of DNA aptamer recognizing human hepatocarcinoma, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 1797e1802.
- H. Li, X.H. Ding, Z.H. Peng, L. Deng, D. Wang, H. Chen, Q.Z. He, Aptamer selection for the detection of Escherichia coli K88, *Can. J. Microbiol.* 57 (2011) 453e459.

- Savory, N., Nzakizwanayo, J., Abe, K., Yoshida, W., Ferri, S., Dedi, C., Jones, B.V., Ikebukuro, K., 2014. Selection of DNA aptamers against uropathogenic *Escherichia coli* NSM59 by quantitative PCR controlled Cell-SELEX. *J. Microbiol. Methods* 104, 94–100.
- Shen, Z.Q., Wang, J.F., Qiu, Z.G., Jin, M., Wang, X.W., Chen, Z.L., Li, J.W., Cao, F.H., 2011. QCM immunosensor detection of *Escherichia coli* O157: H7 based on beacon immunomagnetic nanoparticles and catalytic growth of colloidal gold. *Biosens. Bioelectron.* 26 (7), 3376–3381.
- Dwivedi, H.P., Smiley, R.D., Jaykus, L.A., 2013. Selection of DNA aptamers for capture and detection of *Salmonella Typhimurium* using a whole-cell SELEX approach in conjunction with cell sorting. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (8), 3677–3686.
- Ferreira IM, de Souza Lacerda CM, de Faria LS, Correa CR, de Andrade AS. Selection of peptidoglycan-specific aptamers for bacterial cells identification. *Applied biochemistry and biotechnology.* 2014 Dec; 174(7):2548–56.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품 창업 벤처지원 R&D 바우처 시범사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품 창업 벤처지원 R&D 바우처 시범사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.