

118104-02

농축산물 저장 중 발생하는 위해요소 모니터링 기술 개발현장 실증 연구

보안 과제(), 일반 과제(○) / 공개(○), 비공개()발간등록번호(○)

농축산물안전유통소비기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003365-01

농축산물 저장 중 발생하는 위해요소 모니터링 기술 개발현장 실증 연구

2021. 1. 22.

주관연구기관 / 숙명여자대학교 산학협력단
협동연구기관 / (주)보레다바이오텍

2021

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “농축산물 저장 중 발생하는 위해요소 모니터링 기술 개발현장 실증 연구”(개발기간 : 2018. 12. 03 ~ 2020. 09. 02)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 01. 22.

주관연구기관명 : 숙명여자대학교 산학협력단 (대표자) 이 명 석
협동연구기관명 : (주)보레다바이오텍 (대표자) 최 동 욱



주관연구책임자 : 숙명여자대학교 윤 요 한
협동연구책임자 : (주)보레다바이오텍 최 동 욱

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	118104-02	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.12.03 ~ 2020.09.02 (21개월)	단 계 구 분	(해당단계)/ (총단계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농축산물안전유통소비기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	농축산물 저장 중 발생하는 위해요소 모니터링 기술 개발현장 실증 연구			
	세 부 과 제 명	주관 : 농축산물 저장 중 발생하는 위해요소 모니터링 기술 개발현장 실증 연구 협동 : 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단키트 제품화 및 현장 실증 연구			
연구책임자	운요한	해당단계 참여연구원 수	총: 13 명 내부: 13 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:157,000천원 민간: 53,000천원 계: 210,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 13 명 내부: 13 명 외부: 명	총 연구개발비	정부:157,000천원 민간: 53,000천원 계: 210,000천원
연구기관명 및 소속부서명	숙명여자대학교 산학협력단			참여기업명 (주)보레다바이오텍	
국제공동연구	상대국명:				상대국 연구기관명:
위탁연구	연구기관명:				연구책임자:
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	보안등급 일반 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의 4에 해당하지 않음				

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		10-20 19-01 61841									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 검출을 위한 시료 전처리법과
등온비색 PCR을 이용한 *L. monocytogenes* 진단법 개발 및 진단키트 제품화

보고서 면수
90쪽

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구의 목적 <ul style="list-style-type: none"> - 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 검출을 위한 시료 전처리법과 등온비색 PCR을 이용한 <i>L. monocytogenes</i> 진단법 개발 및 진단키트 제품화 ○ 연구 내용 <ul style="list-style-type: none"> - 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 검출을 위한 시료 전처리법 개발 및 현장 실증 - 등온비색 PCR을 이용한 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단법 개발 및 현장 실증 - 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단키트 제품화 			
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 검출을 위한 시료 전처리법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 증균배지 개선, DNA lysis buffer 개발 - DNA 추출 전 Food matrix를 제어할 수 있는 전처리법 개발 ○ 등온비색 PCR을 이용한 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - <i>L. monocytogenes</i>을 1×10^1 CFU/mL 수준까지 육안으로 검출 가능한 진단법 개발 ○ 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단키트 제품화 <ul style="list-style-type: none"> - 미생물 전처리(증균 및 핵산분리)기술 및 유전자 증폭을 위한 등온비색 PCR로 구성된 진단키트 시제품 개발 완료 ○ 연구결과의 정량적 성과 <ul style="list-style-type: none"> - 국내전문학술지 논문 게재(비SCI 1건) - 국내 학회 발표(2건) - 국내특허 출원(1건) - 기술이전(1건) 및 제품화(1건) - 고용창출(1건) 및 인력양성(4명) 			
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기술적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 축산물 중 <i>L. monocytogenes</i>의 검출 한계를 극복하기 위한 증균배지 및 DNA 추출 등의 전처리 기술 개발로 축산물을 대상으로 한 분자진단기술의 한계점 해결 방안을 제시 - 분자생물학 기반 검출과정의 간소화, 신속하고 낮은 검출 한계의 기술 개발로 신속 검출 기술의 새로운 방법을 제시 - 축산물 및 가공품뿐만 아니라 다른 식품의 위해미생물에 대한 현장진단용 등온비색 PCR 개발에 활용 가능 ○ 경제·산업적 측면 <ul style="list-style-type: none"> - 축산물의 생산 및 유통단계에 신속 검출 시스템을 구축함으로써 축산물 안전성 향상으로 경제적 손실 완화 - 비숙련자의 현장 분석이 가능해짐에 따라 분석비용의 절감 효과 - 현재 수입에 의존하고 있는 진단키트 시장을 국내 키트로 대체하여 국내 진단키트 시장 활성화 			
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>축산식품</p>	<p>리스테리아 모노사이토제네스</p>	<p>등온비색 PCR</p>	<p>진단기술</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Meat products</p>	<p><i>Listeria monocytogenes</i></p>	<p>Colorimetric isothermal amplification</p>	<p>Detection technology</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구수행 내용 및 결과	9
2-1. 연구내용	9
2-1-1. 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 검출을 위한 시료 전처리법 개발	9
2-1-2. 등온비색 PCR을 이용한 냉동육 및 육가공품 내 <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> 진단법 개발	41
2-1-3. 등온비색 PCR을 이용한 냉동육 및 육가공품 내 <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> 진단키트 개발	68
2-2. 연구개발 성과	77
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	79
4. 연구결과의 활용 계획 등	82
붙임. 참고 문헌	87

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 냉동·냉장 저장되는 식육 및 육가공품 중 *L. monocytogenes*의 신속한 검출을 위한 시료 전처리법의 개발
- 전처리법을 적용한 등온비색 PCR 검출 기술의 최적화
- 현장 실증·보완을 통한 제품화

1-2. 연구개발의 필요성

- 식생활의 서구화로 현대인들의 축산식품 소비가 꾸준히 증가하고 있고, 최근 외국산 냉동 축산물의 국내 유입이 급증함에 따라 cold chain과 같은 운반 체계의 온도관리가 철저하게 이루어져야 하며, 국내에서 유통되고 있는 축산물 및 축산 가공품의 미생물학적 안전성에 대한 사회적 관심이 크게 증가하고 있음(Hong et al., 2015).
- 식육을 비롯한 대부분의 축산식품은 우수한 고단백 영양식품이지만 미생물 오염이 매우 쉬워 쉽게 부패 및 변질되는 특징이 있음. 또한 유통되는 동안 직·간접적으로 교차오염되기 쉬우며, 특히 *L. monocytogenes*는 냉장저장 상태에서도 성장하기 때문에 cold chain으로 유통되는 식육 및 육가공품 특성상 식중독 위험성이 높음. 또한 *L. monocytogenes* 감염 환자 수가 증가하고 있음(Kim et al., 2016).
- 식육의 초기 세균이 유통 및 가공과정을 통해 증가할 수 있으므로 초기 유통과정을 포함하여 소비자에게 제공되기까지의 과정에서 축산물 및 가공품 중 적은 양의 식중독세균에 대해서도 검출이 가능한 정밀한 모니터링 기술개발이 절대적으로 필요함.
- 식중독세균 검출을 위해서는 전처리법과 검출법이 필요하며, 현재 전처리법에는 증균배지법이 주로 사용되고 검출법으로는 선택배지, 직접 형광항체법, 유전자 검출법, 간이진단키트, 분자진단법 등이 있음. 그러나 다양한 특성을 가지는 축산물의 식중독세균 모니터링에는 일괄적 적용이 어려우므로 축산물의 특성과 생산 환경을 고려한 전처리법과 신속·정밀한 식중독세균 검출법 개발이 필요함.
- 따라서, 본 연구에서는 냉동육과 육가공품의 미생물학적 안전성 확보에 있어 *L. monocytogenes*의 신속·정밀한 진단을 위해 전처리법과 검출 기술을 개발하여 현장에 적용하고자 함.

가. 축산물 시장의 확대

- 축산물 소비 증가
 - － 식습관의 서구화와 소득 증가 등으로 한국인의 1인당 연간 육류 소비량이 지난 1970년 5.2 kg에서 2015년에는 47.6 kg으로 무려 915.4% 늘었음. ‘2016 농림수산물 주요 통

계'에 따르면 2015년을 기준으로 우리 국민의 1인당 평균 육류 소비량은 47.6 kg으로 집계됨.

- 농식품부에 따르면 한국인의 연간 육류 소비량은 1980년 11.3 kg에 불과했던 1인당 육류 소비량이 1990년 19.9 kg, 2000년 31.9 kg, 2015년 47.6 kg으로 꾸준히 성장하였음(그림 1).



(단위: kg)

그림 1. 한국인의 1인당 육류 소비량 추이 (농림축산식품부, 2016)

○ 축산물 수입 증가

- 육류 소비량이 증가함에 따라 국외로부터 수입되는 축산물의 양도 증가하고 있음. 쇠고기 수입 물량은 2005년부터 연평균 7.4%씩 증가하고 있으며, 돼지고기는 연평균 11.3%, 닭고기는 연평균 15.4%씩 증가하고 있는 것으로 나타났다.
- 축산물 수입 현황을 냉동·냉장육으로 구분하여 살펴보면 쇠고기의 경우 냉동 84%, 냉장 16%로 냉동육의 수입 비율이 높고 돼지고기의 경우 냉동 92%, 냉장 8%로 쇠고기와 마찬가지로 냉동육의 수입 비율이 현저히 높음. 쇠고기 및 돼지고기가 냉동·냉장육으로 구분되어 수입되는 반면에 닭고기는 전량 냉동육으로 수입되고 있음(한국육류유통수출입협회, 2012).
- 수입육의 주요 유통경로는 냉동육의 경우 수입업자를 통해 중간 유통업체(도매상)에서 정육점 또는 음식점으로 유통되어 소비자에게 전달되고, 냉장육의 경우 수입업자를 통해 대형유통업체(90%)나 정육점(10%)에 유통되어 소비자에게 전달되고 있음(한국육류유통수출입협회, 2006).
- 수입육은 대부분 냉동육으로 유통되며, 냉동육의 유통 및 보관 시에 운반 차량과 창고의 온도관리가 철저해야 함. 온도관리 미흡으로 인해 냉동육이 해동되었다가 재냉동 되는 경우 미생물의 증식으로 인한 오염이 발생할 수 있음.
- 따라서, 국내에서 유통되고 있는 냉동육 및 육가공품의 미생물학적 안전성에 대한 지속적인 모니터링 검사가 필요함.

나. 축산물 중 *L. monocytogenes* 오염 증가

○ 축산물 중 *L. monocytogenes* 오염 증가

- *L. monocytogenes*는 자연계에 널리 분포되어 있는 그람양성의 무아포성, 운동성, 세포 내 기생성 간균이며 냉장 온도에서도 증식할 수 있음. 사람과 동물에 리스테리아증을 일으킴(Lee et al., 2008).
- 축산식품에서의 *L. monocytogenes*의 주요 오염원으로는 비가열 식품인 생치즈, 생우유, 식육, 계육 등이 있으며 이러한 식품의 오염원인은 원료 또는 마지막 제조과정 중에 주로 오염되는 것으로 보고되고 있음(Go et al., 2011).
- *L. monocytogenes*는 0°C의 낮은 온도에서 자랄 수 있으므로 냉장 보관 중인 식품에서 천천히 성장할 가능성이 있으며(FSANZ, 2013), 냉동 상태에서도 사멸하지 않고 생존해 있다가 보관온도가 높아지면 다시 성장하여 식품을 오염시킬 수 있음.

○ 축산물 가공품의 미생물 오염도 현황

- Park et al.(2012)는 2010년 2월부터 11월까지 햄 및 소시지 제조과정 중 1차 및 2차 가열을 실시하고 있는 10개의 육가공장에서 햄류 53개 품목과 소시지류 37개 품목을 시료로 선정하여 *L. monocytogenes*의 오염현황을 조사하였음. 그 결과, 시료 1,080개에 대하여 *L. monocytogenes*는 햄류 636개 중 4개(0.6%), 소시지류 444개 중 8개(1.8%)가 검출되었음.
- Cho et al.(2001)은 2000년 3월부터 10월까지 경남지역 창원, 마산, 진주, 김해, 밀양, 함양의 6개 지역에서 유통 판매되는 식육 가공품에서 *L. monocytogenes* 오염 실태를 조사하였음. 조사 결과, 11개의 식육 가공품 모두에서 *L. monocytogenes*는 검출되지 않았음.
- Gomez et al.(2015)은 2012~2013년 동안 스페인 지역의 RTE(ready-to-eat) 식육 가공품 생산 공장에서 87개의 시료와 사라고사 지역에서 판매 중인 42개의 시료를 구입하여 *L. monocytogenes* 검출 현황을 조사하였음. 조사 결과, 가열 식육제품 35개 중 6개(17.1%)와 소시지 57개 중 21개(36.8%), 슬라이스햄 37개 중 9개(24.3%)의 시료에서 *L. monocytogenes*가 검출되어 27.9%의 오염도를 나타냈음(표 1).

표 1. 식육 가공품의 *L. monocytogenes* 검출 현황

국가	종류	시료 수 (개)	양성 시료 수 (개)	오염도 (%)	참고문헌
가열 식육제품					
한국	훈제 식육제품	36	6	16.7	한국소비자원, 2015
	식육 가공품	11	0	0	Cho et al., 2001
유럽연합	열처리된 RTE 식육제품	3,530	74	2.1	EFSA, 2013

벨기에	가열 식육제품	3,405	167	4.9	Uyttendaele et al., 1999
		639	7	1.1	Uyttendaele et al., 2009
스웨덴	가열 식육제품	507	6	1.2	Lambertzetal et al., 2012
영국	슬라이스 가열 식육제품	2,894	61	2.1	Elson et al., 2004
	슬라이스 가열 파테	1,184	22	1.9	Elson et al., 2004
스페인	가열 식육제품	35	6	17.1	Gomez et al., 2015
	소시지	57	21	36.8	Gomez et al., 2015
	슬라이스햄	37	9	24.3	Gomez et al., 2015
	파테	182	10	5.4	Dominguez et al., 2001
	슬라이스 가열 식육제품	68	5	7.3	Perez-Rodriguez et al., 2010
		396	35	8.8	Vitas et al., 2004
	진공포장 식육제품	420	23	5.5	Garrido et al., 2009
진공포장 파테	120	1	0.8	Garrido et al., 2009	
뉴질랜드	사전포장 파테	300	1	0.3	Wong et al., 2005
	포장 가열햄	104	0	0	Wong et al., 2005
	가열햄	301	10	3.3	Cornelius et al., 2008
염지생육제품					
브라질	살라미	81	6	7.4	Borges et al., 1999
	슬라이스 살라미	45	3	6.7	Sakate et al., 2003
스페인		72	22	30.6	Rota et al., 1997
	염지생육 소시지	102	11	10.8	Yanguela et al., 1996
		19	3	15.8	Martin et al., 2011
	절임 식육제품	345	23	6.7	Vitas et al., 2004
	염지생육식육제 품	57	3	5.3	Gomez et al., 2015
이탈리아	발효소시지	237	36	15.2	De cesare et al., 2007
프랑스	건조소시지	30	3	10.0	Thevenot et al., 2005
터키	발효소시지	300	35	11.7	Colak et al., 2007
건조절임식육제품					
스페인	건조절임식육제 품	37	1	2.7	Gomez et al., 2015
이탈리아	건조절임햄	490	20	4.1	Giovannini et al., 2007
	살코기햄	708	14	2.0	Giovannini et al., 2007

- 동결은 음식의 질을 보존하고 식중독세균의 발생을 최소화하는 방법이지만 *L. monocytogenes*는 냉동 온도에서 자라며 냉동 보관 중에도 생존할 수 있으므로 축산물에 대한 *L. monocytogenes*의 철저한 관리가 필요함(Shi et al., 2015).

다. *L. monocytogenes* 환자 증가

- 국내의 경우 식품위생과 공중보건학적 측면에서 *L. monocytogenes* 발생 환자 수가 증가하고 있어 리스테리아증이 더욱 중요시되고 있으므로 이를 예방하기 위해 모니터링을 통해 오염도 측정이 필요함(표 2).

표 2. 연도별 *L. monocytogenes* 환자 수 (건강보험심사평가원, 2020)

년도	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
환자 수	23	15	17	17	25	31	27	29	32	32	32

- 특히, 최근 축산식품에 있어서 대량생산과 냉장 및 냉동기술의 발달로 인하여 식품이 장기간 유통되고, 소비량도 지속적으로 증가하고 있으며, *L. monocytogenes*는 냉장·냉동저장에서도 사멸하지 않기 때문에 cold chain으로 유통되는 식육 및 육가공품 특성상 식중독 위험성이 높음.
- 따라서 축산식품에서의 *L. monocytogenes* 모니터링 기술개발에 대한 필요성이 대두되고 있음.

라. 모니터링 시장규모의 확대

- 세계 분자진단 시장은 연평균 성장률 9.1%로 증가하여 2016년 65억 4,000만 달러에서 2021년까지 101억 2,000만 달러에 이를 것으로 예상됨.
- 분자진단 시장의 주요 기술 분야는 크게 PCR, DNA 시퀀싱 및 NGS, Microarray, 기타기술 분야로 분류될 수 있음. PCR 분야는 2016년 글로벌 분자진단 시장의 39.8%를 차지했음(그림 2).

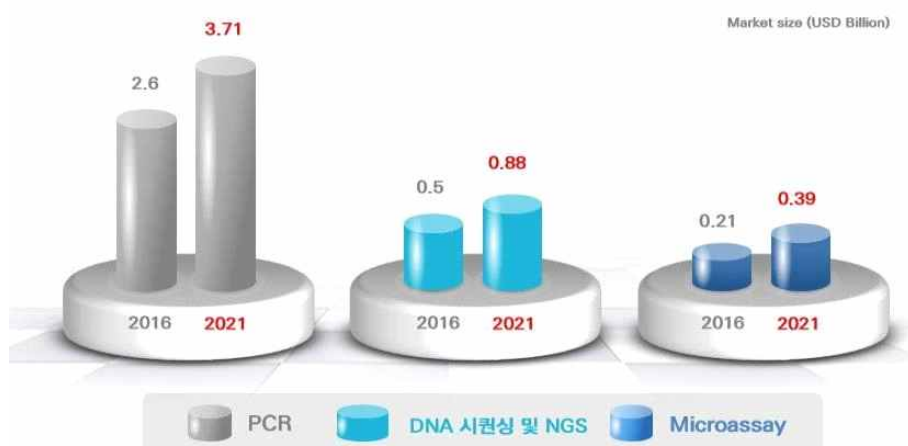


그림 2. 글로벌 분자진단기술 분야에 따른 시장 성장 규모 (연구개발특구진흥재단, 2017)

마. 기 개발된 전처리 방법과 검출법의 한계점

○ 한계점 1: 낮은 민감도

- 현행 우리나라 식품공전 상 등재된 식중독세균 선택배지들은 현재 국제적으로 거의 사용하지 않는 재래식 방법이거나, 분리능이 매우 낮아 현실적으로 사용되지 않는 것이 많다는 문제점이 제기되고 있음. 현재 식품공전이 재개정된 지 수십 년이 되었으나, 배지의 개선은 별로 이루어지지 못했음(Jo et al., 2007).
- 증균배지의 경우 전처리 시간이 오래 걸린다는 한계점을 가지고 있으므로 신속한 검출을 위한 전처리법 개발이 필요함.

○ 한계점 2: 긴 분석 시간

- 증균배지의 경우 전처리 시간이 오래 걸린다는 한계점을 가지고 있으므로 신속한 검출을 위한 전처리법 개발이 필요함.
- 기존 검출법의 경우 식중독세균 검출을 위해 일주일 이상 장시간이 소요되기 때문에 신속 진단기술 개발이 요구됨.

○ 한계점 3: 고비용이 요구됨

- 기존 검출법은 특별한 장비를 사용하므로 전문 인력이 필요하고 고가의 장비를 활용하여 검출하기 때문에 진단 비용이 증가함.

○ 식품 위해 미생물에 대한 검출법을 비교한 것은 다음 표 3과 같음. 면역기법이 신속성, 감도와 편리성 부분에서 가장 우수하였고 PCR법과 Microarray는 선택성 부분에서 가장 우수하였음. 선택배지는 비용적인 부분에서 가장 우수하였지만, 검출법 중 가장 미흡함.

표 3. 식품 위해 미생물 검출법 비교 (Ha, 2007)

	선택배지법	PCR	면역기법	Microarray
속도 (Speed)	-	++	+++	+
감도 (Sensitivity)	+	++	+++	++
선택성 (Selectivity)	-	+++	+	+++
편리성 (Simplicity)	-	+	+++	+
비용 (Cost)	+++	++	+	-

+++ : 매우 우수, ++ : 우수, + : 보통, - : 미흡.

1-3. 연구개발 범위

[1차년도]

- **주관연구기관-숙명여자대학교**: 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 검출을 위한 시료 전처리법 개발
 - 냉동육 및 육가공품 DNA 추출을 위한 전처리 방법 개발
 - 시료(냉동육, 내장, 편육, 소시지, 햄, 훈제오리, 족발 등) 채취 방법
 - *L. monocytogenes* 증균 방법
 - 최적 시료 전처리 및 DNA 추출 방법(방해 물질 제거, DNA 농축, 버퍼 사용)
 - 기존 진단키트를 이용한 전처리 방법 검증
 - 기존 DNA 기반 진단키트에 개발된 전처리 방법을 적용하여 유효성 검증

- **공동연구기관-경상대학교** : 등온비색 PCR을 이용한 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 진단법 개발
 - 등온비색 PCR의 냉동육 및 육가공품에의 적용 가능성 평가
 - 냉동육 및 육가공품에 적용 가능한 등온비색 PCR의 시간 및 온도 설정
 - 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes*에 대한 등온비색 PCR의 특이성 평가
 - 각각의 *Listeria* spp.(*L. ivanovii*, *L. innocua* 등)에 대한 민감도 측정과 동시에 *L. monocytogenes* 특이성 평가
 - *L. monocytogenes* serotype에 따른 검출 효율 차이 확인
 - 다른 식중독균과의 교차반응성 확인
 - 기존 사용하는 RT PCR과의 민감도 확인 및 정확성, 재현성 검증
 - 전처리법을 적용한 냉동육 및 육가공품에서의 *L. monocytogenes* 진단 등온비색 PCR의 최적화

- **협동연구기관-(주)보레다바이오텍** : 등온비색 PCR을 이용한 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 진단키트 개발 계획 수립
 - 등온비색 PCR 적용 진단키트 형태 결정
 - master mix strip 형태, 항원-항체 진단 형태 등 적절한 진단키트 선정
 - 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes*에 대한 등온비색 PCR의 적용 평가
 - 전처리법과 등온비색 PCR을 적용한 냉동육 및 육가공품에서의 *L. monocytogenes* 진단 최적화 가능한 키트 개발

[2차년도]

- **주관연구기관-숙명여자대학교** : 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 검출을 위한 시료 전처리 기술의 현장 실증

- 개발된 시료 전처리법을 활용한 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 진단 현장 실증 및 평가
 - 실제 생산 현장에서의 모니터링 효율 및 현장 적용에의 문제점 분석
 - 기존 방법과의 비교·분석
 - 현장에 적합한 시료 전처리 방법 보완
 - 냉동육 및 육가공업체 섭외를 통한 3자 현장검증 진행

- 공동연구기관-경상대학교 : 등온비색 PCR을 이용한 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 진단기술의 현장 실증
 - 개발된 등온비색 PCR을 활용한 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 진단 현장 실증 및 평가
 - 실제 생산 현장에서의 모니터링 효율 및 현장 적용에의 문제점 분석
 - 기존 방법과의 비교·분석
 - 냉동육 및 육가공업체 섭외를 통한 3자 현장검증 진행
 - 문제점 개선을 통한 등온비색 PCR의 *L. monocytogenes* 진단법 확립

- 협동연구기관-(주)보레다바이오텍 : 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 진단키트 제품화
 - 개발된 전처리 기술과 등온비색 PCR을 기반으로 한 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 진단키트 제품화
 - 향후 제품 사업화 추진 계획 제시

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구내용

2-1-1. 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 검출을 위한 시료 전처리법 개발

[주관연구기관 : 숙명여자대학교 윤요한]

가. 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 검출을 위한 시료 전처리법 개발

(1) 실험 내용

(가) 전처리법에 따른 기술 탐색

- ① 전처리용액의 종류 및 비율(시료:전처리용액)에 따른 *L. monocytogenes* 회수율 비교
 - 전처리용액 및 비율에 따른 회수율을 비교하여 최적 전처리 방법을 도출하였음.
 - 전처리용액 종류: 0.1% Buffered peptone water (BPW), 0.1% Peptone water (PW), 인산염완충희석액(butterfield's phosphate buffered dilution water; BPD), 멸균생리식염수(Sterilized saline solution; SS)
 - 균액준비: *L. monocytogenes* strain ATCC13932, ATCC51774, ATCC BAA-839의 단일 집락을 10 mL의 tryptic soy broth + 0.6% yeast extract (TSBYE)에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 뒤 새로운 10 mL의 TSBYE에 0.1 mL 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였음. 배양액을 혼합(30 mL)하여 원심분리(1,912 ×g, 15분, 4°C)하고, 30 mL의 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 뒤 2차 원심분리 후 30 mL PBS로 현탁시킴. 현탁액을 9 mL의 PBS로 십진 희석하여 5-6 log CFU/g의 균액을 준비하였음.
 - 시료준비 및 접종: 냉동돼지고기(냉동육)와 두루치기(육가공품)를 10 g씩 무균적으로 멸균샘플백에 소분하였음. 시료 표면에 *L. monocytogenes* 균액을 0.1 mL씩 접종(target concentration: 3-4 log CFU/g)하여 30번 강하게 문지른 뒤 15분 동안 상온(25°C)에서 부착시킴.
 - 분석: *L. monocytogenes*가 접종된 시료에 전처리용액을 (시료:전처리용액)의 비율이 1:4, 1:9, 1:19가 되도록 40 mL, 90 mL, 190 mL씩 가하고 120초간 강하게 균질화시킨 후 Palcam agar에 평판도말한 뒤 30°C에서 48시간 동안 배양하였음. 배양 후 집락을 계수하고, 초기 접종 농도 대비 *L. monocytogenes* 회수율을 계산하였음.
- ② DNA 분리 및 정제 기술 탐색
 - 기존의 상용화된 DNA 분리 및 정제 kit보다 간편하고 저렴한 DNA 분리 및 정제 기술을 탐색하였음.
 - Lysis buffer: sodium dodecyl salt (SDS), ethylenediamine-N, N, N', N'-tetraacetic

acid (EDTA), N-lauroylsarcosine sodium salt (NLS sodium salt), NaOH의 단일 또는 혼합

- Washing buffer: 20 mM NaCl + 2 mM Tris-HCl (pH 7.5) + 80% ethanol
- Elution buffer: DNase free water
- Lysis 조건: 99°C -15분, 99°C -30분, 상온(25°C)-30분
- DNA 분리 및 정제 방법
 - ㉠ 균이 포함된 액체를 원심분리(1,912 ×g, 15분, 4°C)하고 상층액을 제거한 뒤 1 mL의 lysis buffer를 가하여 균체를 현탁시킨 후 e-tube에 옮겨 담아 lysis 조건에 따라 lysis 하였음.
 - ㉡ Column(현대마이크로 Cat No. H421GB)에 ㉠의 용액을 넣고 원심분리(8,000 ×g, 1분, 4°C)하고 flow-through를 버렸음.
 - ㉢ Column에 0.6 mL의 washing buffer를 가하여 원심분리(8,000 ×g, 1분, 4°C)하고 flow-through를 버렸음.
 - ㉣ Column에 0.6 mL의 washing buffer를 가하여 원심분리(8,000 ×g, 2분, 4°C)하고 flow-through를 버렸음.
 - ㉤ 새로운 e-tube에 column을 끼워 넣고 0.2 mL의 elution buffer를 가하여 원심분리(8,000 ×g, 2분, 4°C)를 통해 DNA를 추출하였음.
- DNA 순도 및 수율 확인: 기존에 상용화된 DNA 분리 및 정제 kit인 DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen)와 Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)를 이용하여 프로토콜에 따라 DNA를 추출하였음. 본 연구에서 탐색한 DNA 분리 및 정제 방법으로 추출된 DNA와 각 kit를 이용해 추출한 DNA의 순도(A_{260}/A_{280} ratio) 및 수율은 Take3(BioTeck Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 측정하였음.

(나) 증균배지에 따른 기술 탐색

① 식품공전상 증균배지에 따른 증균 효율 비교

- 식품공전에 제시된 *L. monocytogenes* 증균배지: LEB, UVM-modified Listeria broth (UVM-LEB), Palcam broth (PB)
- 균액준비: *L. monocytogenes* strain ATCC13932, ATCC51774, ATCC BAA-839의 단일 집락을 10 mL의 tryptic soy broth + 0.6% yeast extract (TSBYE)에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 뒤 새로운 10 mL의 TSBYE에 0.1 mL 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였음. 배양액을 혼합(30 mL)하여 원심분리(1,912 ×g, 15분, 4°C)하고, 30 mL의 PBS로 세척한 뒤 2차 원심분리 후 30 mL PBS로 현탁시킴. 현탁액을 9 mL의 PBS로 십진 희석하여 3-4 log CFU/mL의 균액을 준비하였음.

- 각 증균배지 10 mL에 *L. monocytogenes*를 0.1 mL 접종(target concentration: 1-2 log CFU/mL)하여 30°C 에 배양하였음.
- 배양액을 0, 6, 8, 10, 12시간마다 TSAYE에 평판도말한 뒤 30°C 에서 24시간 동안 배양하였음. 배양 후 집락을 계수하고, 증균배지에 따른 시간별 증균 속도를 확인하였음.

② 정치배양과 진탕배양의 *L. monocytogenes* 증균력 비교

- 위와 동일한 방법으로 균액을 준비하고 심진희석을 통해 2-3 log CFU/mL로 희석하였음. 14 mL의 round bottom tube에 Listeria enrichment broth (LEB)를 10 mL씩 소분하고 균액을 0.1 mL 접종(target concentration: 1-2 log CFU/mL)하여 정치 또는 진탕(200 rpm)하여 30°C 에서 배양하였음.
- 0, 3, 6, 9, 12시간마다 배양액을 tryptic soy agar + 0.6% yeast extract (TSAYE)에 평판도말하고 30°C 에서 배양한 뒤 집락을 계수하였음.

③ 기존 증균배지의 개선 - Broth 실험

- 증균배지의 증균 효율 비교 실험 결과 및 사용 빈도에 따라 LEB를 성분 개량 배지로 선정하였으며, 이에 탄소원, 질소원, 미량무기질과 그 외의 영양성분을 첨가하여 기존의 배지와 비교하였음.
- 증균배지: 기존 LEB에 영양성분 물질을 농도별로 첨가하여 준비하였음(표 4).

표 4. *L. monocytogenes* 증균배지 첨가 영양성분

종류	물질	농도
탄소원	Pyruvate	0.1%, 0.2%, 0.4%
질소원	Cysteine	0.1%, 0.2%
미량 무기질	Ferric citrate	0.05%, 0.1%
	Iron chloride	0.1%, 0.2%
	Thiamine hydrochloride	0.0005%, 0.001%
Buffer	3-morpholinopropane-1-sulfonic acid (MOPS)	0.5%, 1.0%
항생제	Polymyxin B	100 IU/mL, 1,000 IU/mL

- 균액준비 및 분석: 위와 동일한 방법으로 3-4 log CFU/mL의 균액을 준비하였음. 영양성분을 첨가한 각 증균배지 10 mL에 *L. monocytogenes*를 0.1 mL 접종(target concentration: 1-2 log CFU/mL)하여 30°C 에서 배양하였고, 이를 0, 3, 6, 9, 12시간마다 TSAYE에 평판도말한 뒤 30°C 에서 24시간 동안 배양하였음. 배양 후 집락을 계수하고, 개선한 증균배지에 따른 증균 속도를 비교하였음.

④ 기존 증균배지의 개선 - 식육 적용 실험

- 균액, 시료준비 및 접종: 위와 동일한 방법으로 4-5 log CFU/mL의 *L. monocytogenes* 균액을 준비하였음. 냉동돼지고기를 10 g씩 무균적으로 소분하여 멸균샘플백에 담은 뒤 시료 표면에 *L. monocytogenes* 균액을 0.1 mL씩 접종(target concentration: 1-2 log CFU/g)하여 30번 강하게 문지른 뒤 15분 동안 상온에서 부착시킴.
- 분석: 식육 적용 실험의 증균배지는 broth 실험에서 LEB 대비 증균 효과가 가장 뛰어났던 LEB+0.1% pyruvate+0.1% ferric citrate를 선정하였음. *L. monocytogenes*가 접종된 시료 10 g에 90 mL의 증균배지(LEB[대조군] 또는 LEB+0.1% pyruvate+0.1% ferric citrate[실험군])를 가하여 30회 강하게 흔들어서 30°C에서 배양하였고, 이를 0, 6, 8, 10, 12시간마다 Palcam agar에 평판도말한 뒤 30°C에서 48시간 동안 배양하였음. 배양 후 집락을 계수하고, 12시간 동안 기존 증균배지 대비 개량 증균배지의 증균 효율을 비교하였음.

(다) 전처리법 검증

① 개발된 전처리법 검증

- 개발된 전처리법을 검증하기 위하여 식품(돼지 안심, 소시지, 삼겹살)에 임의로 *L. monocytogenes*를 오염시켜 LAMP PCR 및 RT PCR을 통해 개발된 전처리법을 확인하였음.
- 균액, 시료준비 및 접종: 위와 동일한 방법으로 4-5 log CFU/mL의 균액을 준비하였음. 돼지 안심, 소시지와 삼겹살에 *L. monocytogenes* 농도가 1-2 log CFU/g가 되게 하여 접종한 뒤, 30번 강하게 문지르고 15분 동안 상온에서 부착시킴.
- 분석: 균이 부착된 시료에 시료 무게의 9배 되는 양의 증균배지를 첨가하여 30회 강하게 흔들고 30°C에서 배양하였음. 배양 후 증균배양액 50 mL을 취하여 DNA 추출에 이용하고, 나머지는 Palcam agar에 평판도말한 뒤 30°C에서 48시간 동안 배양 후 집락을 계수하였음.
- DNA 추출은 아래와 같이 진행하였으며, 추출한 DNA를 이용하여 LAMP PCR 및 RT PCR을 수행하였음.
 - ㉠ 균이 포함된 액체를 원심분리(1,912 ×g, 15분, 4°C)하고 상층액을 제거한 뒤 1 mL의 lysis buffer(0.5% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH + 0.5 M EDTA)를 가하여 균체를 현탁시킨 후 e-tube에 옮겨 담아 상온에서 30분 처리하였음.
 - ㉡ Column(현대마이크로 Cat No. H421GB)에 ㉠의 용액을 넣고 원심분리(8,000 ×g, 1분, 4°C)하고 flow-through를 버렸음.
 - ㉢ Column에 0.6 mL의 washing buffer(20 mM NaCl + 2 mM Tris-HCl (pH 7.5) +

80% ethanol)를 가하여 원심분리(8,000 ×g, 1분, 4°C)하고 flow-through를 버렸음.

㉔ Column에 0.6 mL의 washing buffer를 가하여 원심분리(8,000 ×g, 2분, 4°C)하고 flow-through를 버렸음.

㉕ 새로운 e-tube에 column을 끼워 넣고 0.2 mL의 elution buffer를 가하여 원심분리 (8,000 ×g, 2분, 4°C)를 통해 DNA를 추출하였음.

② 기존 진단키트에 개발된 전처리 방법을 적용한 유효성 검증

- 기존의 상용화된 진단키트(K사의 Real-time PCR 키트, N사의 PCR 키트)를 이용하여 DNA 분리 및 정제 방법을 검증하였음.
- 위와 동일한 방법으로 균액을 준비한 후 십진희석하여 로그 수 별 균액을 준비하여 균액민감도 및 식육민감도 실험에 사용하였음.
- 냉동돼지고기를 10 g씩 무균적으로 소분하여 멸균샘플백에 담은 뒤 시료 표면에 준비된 로그 수 별 균액을 0.1 mL씩 접종하여 30번 강하게 문지른 뒤 15분 동안 상온에서 부착시켜 식육 민감도의 균액을 준비하였음.
- 위의 DNA 분리 및 정제 방법 기술을 이용하여 균액민감도 및 식육민감도 DNA를 추출한 후 기존 상용화된 진단키트를 이용하여 검출한계를 확인하였음.
- Real-time polymerase chain reaction(RT PCR) 분석은 Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN)을 이용하였으며, 사용된 primer 정보와 PCR 조건은 아래와 같음 (표 5, 표 6).

표 5. Primer 정보

Primers	Sequence (5' to 3')	Target gene	Size (position) of amplified product*
ILMPRFAF	CAATGGGATCCACAAGAATA	<i>prfA</i>	186
ILMPRFAR	AGCCTGCTCGCTAATGACTT		

*Sizes are in base pairs; positions are in nucleotides.

표 6. Real-time PCR 수행 조건

구분	온도	시간	cycle 수
초기변성	95°C	5분	1
변성	95°C	5초	30
Annealing/신장반응	60°C	10초	
융해곡선	Start : 72°C End : 95°C		1

(2) 연구 결과

(가) 전처리법에 따른 기술 탐색

① 전처리용액의 종류 비율(시료:전처리용액)에 따른 *L. monocytogenes* 회수율 비교

- 초기 접종 농도 대비 *L. monocytogenes* 회수율은 냉동돼지고기와 두루치기 모두에서 0.1% BPW를 1:19의 비율로 처리하였을 때 가장 높은 것으로 확인되었음. 시료와 전처리용액을 1:9 비율로 처리했을 때, 0.1% BPW 다음으로 0.1% PW, BPD, SS 순으로 *L. monocytogenes* 회수율이 높은 것으로 나타났음(표 7).

표 7. 전처리용액의 종류 및 비율에 따른 *L. monocytogenes* 회수율

단위: %

Solution	비율 (시료:전처리용액)					
	냉동돼지고기(냉동육)			두루치기(육가공품)		
	1:4	1:9	1:19	1:4	1:9	1:19
0.1% BPW	117.6±24.8	129.0±29.2	161.9±40.0	133±38.8	135.0±18.0	172.7±25.3
0.1% PW	130.3±33.1	117.9±43.3	131.4±31.2	113.8±26.6	126.8±34.4	117.2±32.2
BPD	101.2±19.3	79.7±20.2	97.5±18.5	125.2±24.3	116.9±25.5	97.4±12.6
SS	93.4±15.3	71.6±13.4	100.4±9.3	79.7±12.5	86.2±14.4	90.1±12.8

Data were presented as mean and standard error.

② DNA 분리 및 정제 기술 탐색

- A_{260}/A_{280} ratio의 값이 1.8-2.0일 때 순도가 좋다고 판단함. Lysis buffer의 조성 및 처리조건에 따라 *L. monocytogenes* DNA를 추출한 결과, 0.5% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH + 0.5 M EDTA를 이용하여 99°C-30분, 상온-30분 처리하였을 때 DNA의 순도가 2.00, 1.89로 나타났으며, 1% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH + 0.5 M EDTA를 상온-30분 처리하였을 때 순도는 1.96으로 확인되었음(표 8).
- DNA 수율은 lysis buffer를 99°C-15분, 상온-30분 처리하였을 때 1 M EDTA의 경우 각 109.21 ng/μL, 160.73 ng/μL로 가장 높았고, 99°C-30분 처리하였을 때 1% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH를 이용한 DNA 수율이 110.17 ng/μL 가장 높았음(표 8).
- 또한 기존의 DNA 추출 방법 대비 실온에서 추출 단계 및 시간을 단축함으로써 원가 절감 및 필요 장비를 간소화하여 편의성을 증대하였음(표 9).
- 최종적으로 DNA의 순도와 현장 적용 가능성, 신규성을 고려하여 lysis buffer와 처리조건을 선별한 결과, 0.5% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH + 0.5 M EDTA 또는 1% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH + 0.5 M EDTA를 이용하여 상온-30분간 처리하는 방법을 선정하였음.

표 8. Lysis buffer의 조성 및 처리조건을 달리해 추출한 DNA 순도와 수율

Lysis buffer	순도(A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ratio)			수율(ng/μL)		
	99°C, 15분	99°C, 30분	상온, 30분	99°C, 15분	99°C, 30분	상온, 30분
0.05 N NaOH	1.60±0.07	1.66±0.02	1.62±0.02	16.21±2.49	23.67±1.69	103.00±8.50
0.1 N NaOH	1.65±0.01	1.64±0.03	1.68±0.08	14.53±1.68	22.21±3.38	97.63±29.39
0.5 N NaOH	1.77±0.05	1.72±0.01	1.57±0.03	18.27±1.30	20.00±1.27	29.78±0.33
0.05 N NaOH + 0.25% SDS	1.60±0.05	0.62±1.43	1.48±0.04	17.21±5.35	6.68±13.65	46.07±14.01
0.1 N NaOH + 0.5% SDS	1.73±0.42	1.75±0.13	1.63±0.01	9.64±2.21	11.28±2.69	32.81±9.41
0.5 N NaOH + 1% SDS + 0.5 M EDTA	1.25±0.36	-1.54±2.32	1.67±0.00	19.24±17.16	0.14±0.29	9.71±3.94
1 M EDTA	2.18±0.10	0.26±0.86	1.74±0.03	109.21±32.17	0.86±1.17	160.73±6.04
0.5% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH	1.76±0.17	1.42±0.06	1.58±0.06	8.37±1.65	17.31±6.61	13.90±2.62
1% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH	1.70±0.52	2.08±0.03	1.45±0.09	5.83±2.73	110.17±3.00	10.23±2.94
0.5% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH + 0.5 M EDTA	2.16±1.05	2.00±0.53	1.89±0.33	10.16±1.02	9.62±8.42	13.90±4.73
1% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH + 0.5 M EDTA	2.90±4.93	1.19±0.07	1.96±0.09	0.77±0.74	6.93±1.77	17.44±2.09
Blood & Tissue kit (Control)	2.02			139.82		

Data were presented as mean and standard deviation.

표 9. 기존 DNA 추출 방법과 개발된 Lysis buffer의 경제성 비교

구분 \ 제조사	Q	P	T	본 연구
가격	4,142원/sample	3,598원/sample	2,715원/sample	812원/sample
단계	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Enzymatic buffer 30분</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Proteinase K 30분</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="text-align: center;">+ 100% ethano</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">AW1 buffer 1분</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">AW2 buffer 1분</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">AE buffer 1분</div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Lytic enzyme with EDTA 30분</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Nuclei lysis solution 5분</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">RNase solution 30분</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Protein precipitation solution 5분</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">DNA rehydration solution 60분</div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Trizol Reagent 5분</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Chloroform 15분</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">100% ethanol 5분</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Sodium citrate/ethanol 30분</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">Sodium citrate/ethanol 30분</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">75% ethanol 20분</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">8mM NaOH 10분</div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">용해 버퍼 30분</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">세정 버퍼 1분</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">세정 버퍼 1분</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;">용출 버퍼 1분</div>
소요시간 (분)	80-90	150-160	140-150	50-60
필요 장비	37°C incubator, 56°C incubator, Microcentrifuge	37°C incubator, 80°C incubator, Microcentrifuge	Microcentrifuge	Microcentrifuge

(나) 증균배지에 따른 기술 탐색

① 식품공전상 증균배지에 따른 증균 효율 비교

- *L. monocytogenes* 증균배지에 따른 증균 효율은 LEB와 UVM-LEB의 증균 효율이 비슷한 것으로 확인되었고, PB는 증균 효율이 매우 낮은 것으로 확인되었음(그림 3).
- 따라서 성분 개량 증균배지로 LEB를 선택하였음.

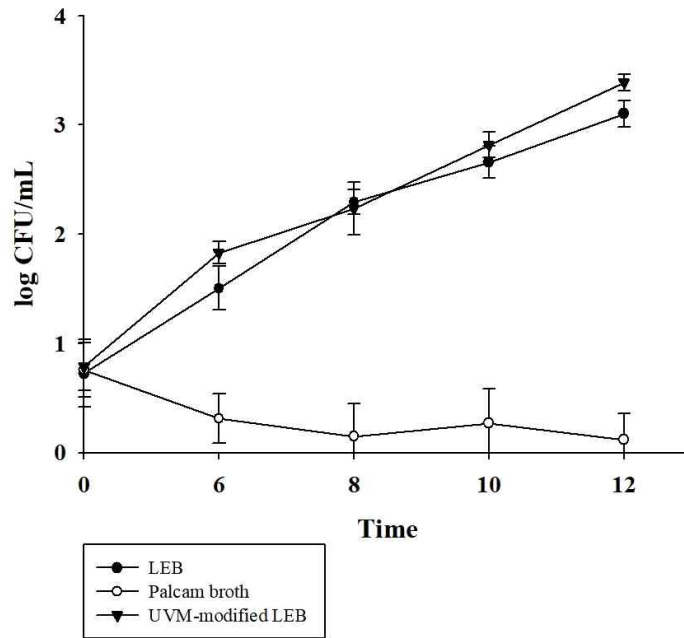


그림 3. 증균배지에 따른 증균 효율 비교

② 정치배양과 진탕배양의 *L. monocytogenes* 증균력 비교

- 동일한 조건에서 *L. monocytogenes*를 정치 또는 진탕배양하여 *L. monocytogenes*의 증균력을 비교했을 때, 두 배양 방법 간의 증균력 차이는 유의적이지 않았음(그림 4).
- 따라서 *L. monocytogenes*의 증균배지 개선 시험에서 정치배양을 택하여 증균력 비교 실험을 진행하였음.

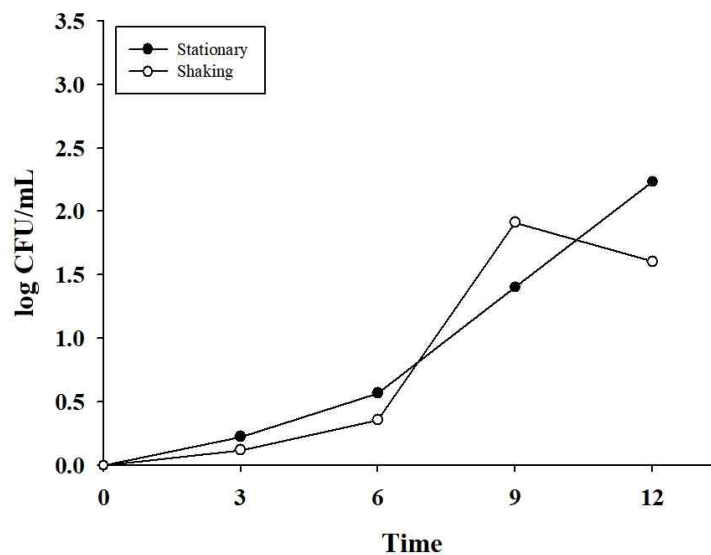


그림 4. 정치배양과 진탕배양의 *L. monocytogenes* 증균력 비교

③ 기존 증균배지의 개선 - Broth 실험

- LEB에 영양성분과 그 농도를 달리하여 첨가한 후 증균 효율을 비교한 결과, LEB+0.1% pyruvate와 LEB+0.1% ferric citrate에서 12시간 증균 후 기존 LEB 대비 각 0.6 log CFU/mL 가량 더 증가하였고 LEB+0.2% pyruvate와 LEB+0.001% thiamine hydrochloride에서는 0.3 log CFU/mL 가량 더 증가하였음(표 10).

표 10. 단일 성분을 추가한 LEB의 증균 효율 비교

단위: log CFU/mL

증균배지	초기 균수	12시간 증균 후 균 수	12시간 동안 증가량	LEB 대비 증가량
LEB (Control)	0.8±0.2	3.1±0.3	2.3±0.1	-
LEB+0.1% Pyruvate	0.4±0.6	3.3±0.3	2.9±0.5	0.6
LEB+0.2% Pyruvate	0.5±0.5	3.1±0.6	2.6±0.3	0.3
LEB+0.4% Pyruvate	0.5±0.6	2.7±1.2	2.2±0.8	-0.1
LEB+0.1% Cysteine	0.8±0.4	2.7±0.4	2.1±0.3	-0.2
LEB+0.2% Cysteine	0.7±0.5	2.6±0.4	2.1±0.4	-0.2
LEB+0.1% Iron chloride	0.5±0.4	3.0±0.4	2.5±0.5	0.2
LEB+0.2% Iron chloride	0.5±0.6	2.9±0.4	2.4±0.7	0.1
LEB+0.05% Ferric citrate	0.9±0.1	3.3±0.2	2.5±0.3	0.2
LEB+0.1% Ferric citrate	0.9±0.0	3.8±0.1	2.9±0.1	0.6
LEB+0.0005% Thiamine hydrochloride	0.9±0.2	2.9±0.4	2.0±0.2	-0.3
LEB+0.001% Thiamine hydrochloride	0.6±0.3	3.2±0.2	2.6±0.0	0.3
LEB+0.5% MOPS	0.9±0.3	2.9±0.1	2.1±0.3	-0.2
LEB+1.0% MOPS	0.7±0.5	2.8±0.2	2.1±0.7	-0.2
LEB+Polymyxin B (100 IU/mL)	0.5±0.4	2.3±0.7	1.8±0.3	-0.5
LEB+Polymyxin B (1,000 IU/mL)	0.4±0.4	0.9±0.9	0.5±0.6	-1.7

Data were presented as mean and standard error.

- LEB에 단일 성분을 첨가하여 비교하였을 때 증균 효율을 증가시켰던 pyruvate, ferric citrate, thiamine hydrochloride를 혼합하여 증균배지를 제조하여 이의 증균 효율을 비교하였음.

- LEB+0.1% pyruvate+0.05% ferric citrate와 LEB+0.1% pyruvate+0.1% ferric citrate에 *L. monocytogenes*를 접종하여 12시간 증균시킨 결과, 기존 LEB와 비교하였을 때, *L. monocytogenes*가 각각 0.6 log CFU/mL, 0.8 log CFU/mL 더 증균된 것으로 확인되었음(표 11).

표 11. 혼합 성분을 추가한 LEB의 증균 효율 비교

단위: log CFU/mL

증균배지	초기 균수	12시간 증균 후 균 수	12시간 동안 증가량	LEB 대비 증가량
LEB (Control)	0.8±0.2	3.1±0.3	2.3±0.1	-
LEB+0.1% Pyruvate +0.05% Ferric citrate	0.7±0.1	3.4±0.1	2.9±0.4	0.6
LEB+0.1% Pyruvate +0.1% Ferric citrate	0.7±0.0	3.7±0.1	3.1±0.1	0.8
LEB+0.1% Pyruvate +0.001% Thiamine hydrochloride	0.7±0.4	3.1±0.2	2.4±0.2	0.1
LEB+0.1% Pyruvate +0.1% Iron chloride	0.3±0.5	2.4±0.8	2.1±0.5	-0.2
LEB+0.1% Pyruvate +0.2% Iron chloride	0.5±0.5	2.4±0.9	1.9±0.4	-0.4

Data were presented as mean and standard error.

④ 기존 증균배지의 개선 - 식육 적용 실험

- LEB에 영양 성분을 혼합하여 첨가하였을 때 *L. monocytogenes*의 증균 효율이 가장 우수했던 LEB+0.1% pyruvate+0.05% ferric citrate와 LEB+0.1% pyruvate+0.1% ferric citrate를 냉동 돼지고기에 적용하여 12시간 동안 *L. monocytogenes*의 증균 효율을 비교한 결과, LEB에 비해 LEB+0.1% pyruvate+0.1% ferric citrate의 배지에서 *L. monocytogenes*가 0.6 log CFU/g 더 증균 된 것으로 나타났음(표 12, 그림 5).

표 12. 식육 적용 개량 LEB의 12시간 평균 효율 비교

단위: log CFU/mL

평균배지	초기 균수	12시간 평균 후 균수	12시간 동안 증가량	LEB 대비 증가량
LEB (Control)	1.3±0.4	3.5±0.2	2.2±0.5	-
LEB+0.1% Pyruvate +0.05% Ferric citrate	1.5±0.2	3.5±0.1	2.0±0.3	-0.2
LEB+0.1% Pyruvate +0.1% Ferric citrate	1.5±0.3	4.2±0.2	2.8±0.4	0.6

Data were presented as mean and standard error.

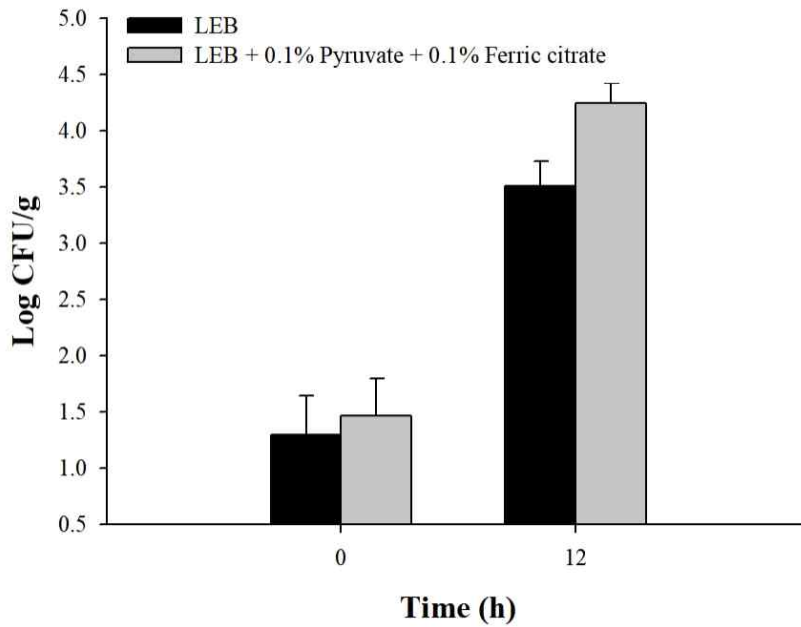


그림 5. 식육 적용 개량 LEB의 12시간 평균 효율.

(다) 전처리법 검증

① 개발된 전처리법 검증

㉔ 식육

- 개발된 전처리법을 검증하기 위하여 식육에 인위적으로 *L. monocytogenes*를 접종하여 증균시간에 따른 기존(LEB) 및 개량배지(LEB+0.1% Pyruvate+0.1% Ferric citrate)의 증균력을 비교하였음.
- 그 결과, 표 13과 같이 기존 배지의 경우 12시간 후 초기 세균수 대비 2.8 log CFU/g이 증가했고 개량 배지는 12시간 후 3.3 log CFU/g 증가하였음.
- RT PCR 분석 결과, 기존 배지는 12시간까지 모든 시간대에서 음성이었으며, 개량 배지는 12시간에서 양성으로 확인되었음.

표 13. 기존 및 개량 배지 증균력 비교

시간	기존 배지 (LEB)		개량 배지 (LEB+0.1% pyruvate+0.1% ferric citrate)	
	Cell counts (log CFU/g)	RT PCR	Cell counts (log CFU/g)	RT PCR
0h	1.0±0.0	-	1.0±0.0	-
3h	1.5±0.1	-	1.7±0.1	-
6h	2.2±0.0	-	2.5±0.2	-
9h	2.9±0.1	-	3.5±0.0	-
12h	3.8±0.1	-	4.3±0.1	+

㉕ 소시지 및 삼겹살

- 육가공품(소시지)에 *L. monocytogenes*의 초기 균수가 2 log CFU/g가 되게 접종하여 개발된 전처리법을 검증한 결과, 9시간 증균 후 3.8±0.1 log CFU/g 가량 증균 되었으며 12시간 후 4.6±0.1 log CFU/g 증균 되었음. 삼겹살의 경우 9시간 증균 후 4.1±0.3 log CFU/g, 12시간 증균 후 5.5±0.1 log CFU/g으로 증균 되었음(표 14).
- 본 증균배양액으로 DNA 추출 후 RT PCR로 분석한 결과, 소시지에서는 9시간 증균했을 때 불검출되었으며, 12시간 증균 후 모두 검출되었음. 삼겹살을 이용한 검증에서는 9시간 및 12시간에서 모두 검출되었음.

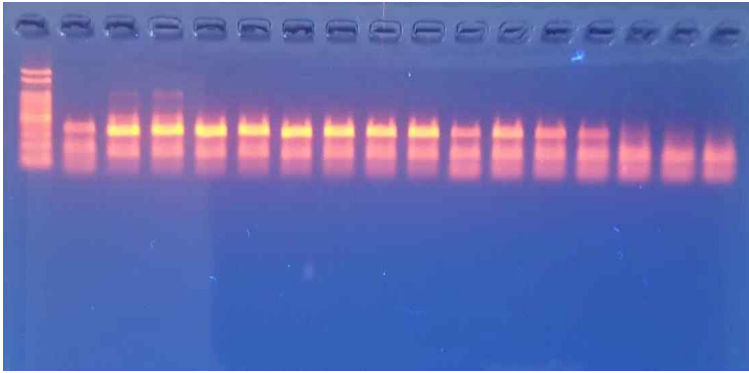
표 14. 개발된 전처리법 검증

시료	중균 시간 (h)	duplicate	Cell counts (log CFU/g)	RT PCR
소시지	9	S-1	3.8±0.1	-
		S-2		-
		S-3		-
		S-4		-
		S-5		-
	12	S-1	4.6±0.1	+
		S-2		+
		S-3		+
		S-4		+
		S-5		+
삼겹살	9	S-1	4.1±0.3	+
		S-2		+
		S-3		+
		S-4		+
		S-5		+
	12	S-1	5.5±0.1	+
		S-2		+
		S-3		+
		S-4		+
		S-5		+

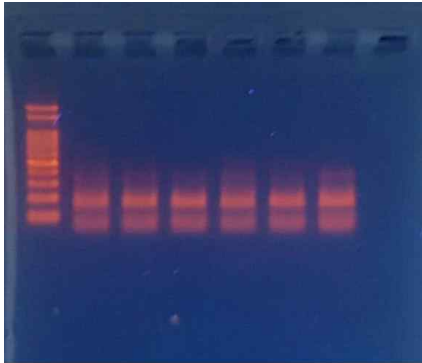
② 기존 진단키트에 개발된 전처리 방법을 적용한 유효성 검증

㉠ 균액 민감도

- 기존 진단키트 K사의 Real-time PCR 키트, N사의 PCR 키트를 이용하여 균액 민감도의 DNA로부터 검출한계를 확인한 후 RT PCR과 비교한 결과, N사의 진단키트는 3.7 log CFU/mL, K사의 진단키트와 RT PCR은 1.7 log CFU/mL까지 검출이 가능하였음(그림 6, 그림 7, 표 15).



Lane 1: 100bp ladder;
 Lane 2: Positive control (366bp);
 Lane 3, 4: 8.7 log CFU/mL;
 Lane 5, 6: 7.8 log CFU/mL;
 Lane 7, 8: 6.9 log CFU/mL;
 Lane 9, 10: 5.8 log CFU/mL;
 Lane 11, 12: 4.7 log CFU/mL;
 Lane 13, 14: 3.7 log CFU/mL;
 Lane 15, 16: 2.7 log CFU/mL;
 Lane 17: 1.7 log CFU/mL



Lane 1: 100bp ladder;
 Lane 2, 3: 1.7 log CFU/mL;
 Lane 4, 5: 0.5 log CFU/mL;
 Lane 6, 7: 0.0 log CFU/mL

그림 6. N사의 진단키트 균액 민감도 실험 결과.

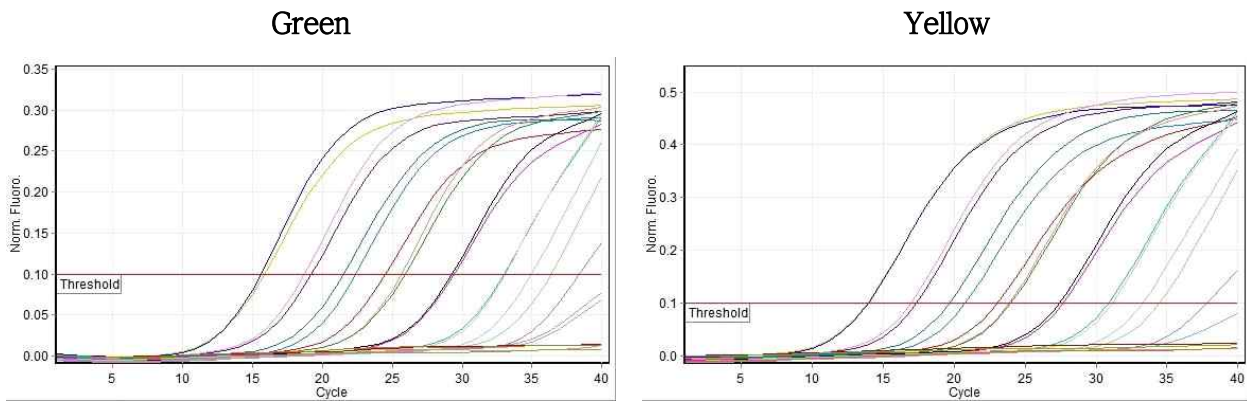


그림 7. K사의 진단키트 균액 민감도 실험 결과.

표 15. 기존 진단 키트를 이용한 균액 민감도 실험 결과

균 수 (log CFU/mL)	RT PCR	K사의 Real-time PCR 키트		N사의 PCR 키트
		Green	Yellow	PCR band 유무
8.7	9.95±1.65	15.76±0.19	13.92±0.04	+*
7.8	13.16±2.43	19.02±0.34	17.16±0.28	+
6.9	15.91±2.42	21.97±0.62	20.24±0.77	+
5.8	19.83±1.87	25.80±0.19	23.97±0.08	+
4.7	22.50±2.63	29.37±0.10	27.54±0.18	+
3.7	26.20±2.91	33.07±0.04	31.05±0.18	+
2.7	27.08±0.00	35.68±0.97	33.91±0.86	-
1.7	28.98±0.00	38.39±0.00	37.78±0.00	-
0.5	-	-	-	-
0.0	-	-	-	-

* +; positive, -; negative

㉞ 식육 민감도

- 식육 민감도의 DNA로부터 기존 진단키트를 이용하여 검출한계를 확인한 결과, N사의 진단키트와 RT PCR은 3.9 log CFU/g, K사의 진단키트는 2.9 log CFU/g까지 검출이 가능하였음(그림 8, 표 16).

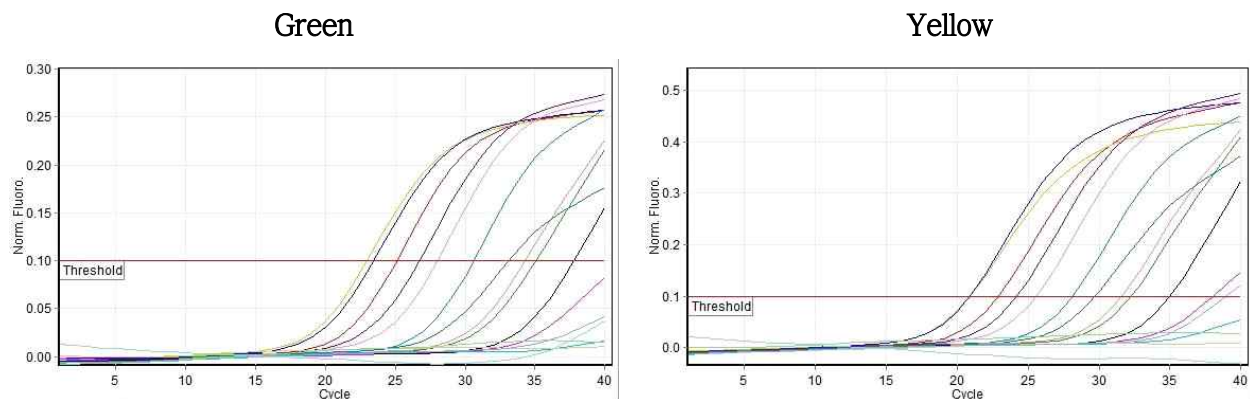


그림 8. K사의 진단키트 식육 민감도 실험 결과

표 16. 기존 진단 키트를 이용한 식육 민감도 실험 결과

균 수 (log CFU/g)	RT PCR	K사의 Real-time PCR 키트		N사의 PCR 키트
		Green	Yellow	PCR band 유무
7.1	17.25±0.06	23.24±0.35	20.90±0.01	+
6.0	21.40±0.85	27.39±0.91	24.91±0.95	+
4.9	24.31±0.05	31.86±1.77	28.93±1.10	+
3.9	28.38±0.66	34.70±0.53	31.95±0.48	+
2.9	-	37.76±0.00	36.53±2.12	-
2.0	-	-	-	-
1.2	-	-	-	-

* +; positive, -; negative

- 상기 결과를 종합하여 분석한 결과, LEB+0.1% Pyruvate+0.1% Ferric citrate 배지로 12시간 배양 후 증균배양액을 0.5% NLS sodium salt+0.5 N NaOH+0.5 M EDTA를 이용하여 상온에서 30분간 용해하는 전처리법이 유효함을 확인하였음.

나. 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 검출을 위한 시료 전처리기술의 현장 실증

(1) 실험 내용

(가) 식육 및 육가공품 모니터링 및 현장 적용에서의 문제점 분석

- 식육 및 육가공품에 대해 식품공전에서 양성으로 확인된 시료에 대해 본 전처리 기술이 유효한지 확인하기 위하여, 식품공전법과 1차년도에 확립한 전처리 방법을 이용하여 진단 결과를 비교하였음.

① 식품공전법

- 시료 준비: clean bench에서 시료를 25 g씩 무균적으로 멸균샘플백에 소분하였음.
- 1·2차 증균: 1차 증균은 시료와 LEB 증균배지가 1:9가 되도록 LEB를 225 mL씩 시료에 가하고 균질화시킨 후 30°C 에서 24시간 동안 배양하였음. 2차 증균은 Fraser broth 9 mL에 1차 증균배양액을 1 mL씩 분주하여 37°C 에서 48시간 동안 배양하였음.
- 분리배양: 2차 증균 후, 멸균된 white loop를 이용하여 증균액을 선택배지인 Palcam agar에 streaking 하여 30°C, 48시간 배양하였음.
- 확인시험 : Palcam agar에서 확인된 의심집락을 LM chrom agar에 streaking 하여 37°C, 24시간 배양하였음. 배양 결과, 파란색에 흰색 환을 가진 의심집락은 16s rRNA 검사를 수행하였음.

② 1차년도 확립 전처리법

- 시료 채취 및 증균 : clean bench에서 시료를 무균적으로 소분하여 멸균샘플백에 담고 시료와 개량 배지(LEB+0.1% pyruvate+0.1% ferric citrate)가 1:9가 되도록 한 후, 30번 흔들어서 30°C 에서 12시간 동안 배양하였음.
- 추출한 DNA는 정상대로 송부하여 LAMP PCR 분석을 실시하였음.

(나) 현장에 적합한 시료 전처리 방법 보완

- 모니터링 결과, 기존 확립한 전처리 방법 중 일부 시료에서만 LAMP PCR 양성이 확인되었음. 본 실험 결과 및 문헌조사를 바탕으로 지방질을 포함한 food matrix를 제어하기 위한 시료 전처리 기술이 필요하다고 판단하였음. 따라서 DNA 추출 전 washing 처리와 여과지 처리 단계를 추가하였음.

① DNA 추출 전 균체 washing 처리

- Washing 용액 종류: Phosphate buffered saline(PBS), 70% ethanol
- 시료 종류: 분쇄육가공품, 삼겹살, 돼지안심, 햄, 소시지
- 균액준비: *L. monocytogenes* strain ATCC13932, ATCC51774, ATCC BAA-839의 단일

집락을 10 mL의 tryptic soy broth+0.6% yeast extract (TSBYE)에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 뒤 새로운 10 mL의 TSBYE에 0.1 mL 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였음. 배양액을 혼합(30 mL)하여 원심분리(1,912 ×g, 15분, 4°C)하고, 30 mL의 PBS로 세척한 뒤 2차 원심분리 후 30 mL PBS로 현탁시킴. 현탁액을 9 mL의 PBS로 십진 희석하여 균액을 준비하였음.

- 시료준비 및 접종: 시료를 무균적으로 멸균샘플백에 소분하였음. 시료 표면에 *L. monocytogenes* 균액을 최종 농도가 2 log CFU/g 수준이 되도록 접종하여 30번 문지른 뒤 15분 동안 상온에서 부착시킴.
- 분석: 시료와 개량 증균배지의 비율이 1:9가 되도록 시료에 가하고, 균질화시킨 후 Palcam agar에 평판도말한 뒤 30°C에서 48시간 동안 배양하였음. 균액 접종 직후 0시간과 12시간 배양에 대한 집락을 계수하고, 초기 접종 농도 대비 *L. monocytogenes* 증균량을 계산하였음.
- DNA washing 처리 및 분리, 정제 방법
 - ㉠ DNA 추출 전 표 17과 같이 처리함.
 - ㉡ 상층액을 제거한 Pellet에 1 mL의 lysis buffer(0.5% N-lauroyl sarcosine sodium salt+0.5N NaOH+0.5M EDTA)를 가하여 균체를 현탁시킨 후 상온에서 30분 처리하여 lysis 함.
 - ㉢ Column(현대마이크로 Cat No. H421GB)에 ㉡의 용액을 넣고 원심분리(8,000 ×g, 1분, 4°C)하여 flow-through를 버림.
 - ㉣ Column에 0.6 mL의 washing buffer(80% ethanol, 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl(pH 7.5))를 가하여 원심분리(8,000 ×g, 1분, 4°C)하고 flow-through를 버림.
 - ㉤ Column에 남은 0.6 mL의 washing buffer(80% ethanol, 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl(pH 7.5))를 가하여 원심분리(8,000 ×g, 1분, 4°C)하고 flow-through를 버림.
 - ㉥ 빈 Column을 원심분리(8,000 ×g, 1분, 4°C)하고 flow-through를 버림.
 - ㉦ 새로운 e-tube에 column을 끼워 넣고 0.05 mL의 멸균 증류수 가하여 원심분리(8,000 ×g, 1분, 4°C)를 통해 DNA를 elution함.
 - ㉧ e-tube에 추출된 DNA를 다시 한번 column에 가하여 원심분리(8,000 ×g, 1분, 4°C)를 통해 최종 DNA를 추출함.
 - ㉨ DNA 정량 및 RT PCR(*prfA* gene)을 수행함.
 - ㉩ 일부 시료는 정상대에 송부하여 LAMP PCR 분석을 실시하였음.

표 17. DNA 추출 전 균체 washing 처리 방법

washing 처리 방법	처리 내용
CON	① 증균배양액 50 mL을 거즈에 걸러 원심분리(1,912 ×g, 4°C, 15분)하고 상층액을 제거함
PBS	① 증균배양액 50 mL을 거즈에 걸러 원심분리하고 상층액을 제거함 ② 2 mL의 PBS로 pellet을 재현탁하고 원심분리(15,000 rpm, 4°C, 5분) 후 상층액을 제거함
70% ethanol	① 증균배양액 50 mL을 거즈에 걸러 원심분리하고 상층액을 제거함 ② 2 mL의 70% ethanol로 pellet을 재현탁하고 원심분리(15,000 rpm, 4°C, 5분) 후 상층액을 제거함
D.W	① 증균배양액 50 mL을 거즈에 걸러 원심분리하고 상층액을 제거함 ② 2 mL의 D.W로 pellet을 재현탁하고 원심분리(15,000 rpm, 4°C, 5분) 후 상층액을 제거함
99% ethanol	① 증균배양액 50 mL을 거즈에 걸러 원심분리하고 상층액을 제거함 ② 2 mL의 99% ethanol로 pellet을 재현탁하고 원심분리(15,000 rpm, 4°C, 5분) 후 상층액을 제거함

② DNA 추출 전 증균배양액 여과지 이용

- 기존에 증균배양액을 여과했던 거즈를 여과지로 대체하여 효과적으로 food matrix를 제거하고자 하였으며, 실험에 사용한 여과지 정보는 표 18과 같음.

표 18. 여과지 사양

품명	평량 (g/m ²)	두께 (mm)	여과속도 (s/100 mL)	보류입자경 (μm)	회분량 (%)	Conversion Whatman
No.10	70	0.17	150	6~10	0.1	NO.1
No.20	85	0.20	160	5~8	0.1	NO.2
No.22	84	0.21	40	12~15	0.1	NO.4

- 시료 종류: 베이컨

- 균액 준비, 시료 준비, 균액 접종 및 분석 단계는 ①에 명시한 방법과 동일하게 하였음.

- DNA 분리 및 정제 방법

㉔ 증균배양액 50 mL을 거즈(대조군) 또는 여과지로 걸러 원심분리(1,912 ×g, 15분, 4°C)하고 상층액을 제거함.

㉕ 상층액을 제거한 Pellet에 1 mL의 lysis buffer를 가하여 균체를 현탁시킨 후 상온

에서 30분 처리하여 lysis 함.

- ㉔ Column(현대마이크로 Cat No. H421GB)에 ㉓의 용액을 넣고 원심분리(8,000 ×g, 1분, 4°C)하여 flow-through를 버림.
- ㉕ 이외의 절차는 상기 명시한 DNA washing 처리 및 분리, 정제 방법 ㉒ 단계 이후와 같음.

(다) 냉동육 및 육가공업체 3자 현장 검증 진행

- 중견기업 규모의 육가공업체를 방문하여 육가공업체 현장의 소형화 장비만으로 유전자 분석이 가능한지에 대한 3자 검증을 진행하였음. 제공된 시료의 증균 배양 후, LAMP PCR kit를 이용하여 DNA 추출 및 LAMP PCR을 수행하였음.
- 시료 : 공장 내 시료
- 분석 : 시료와 개량 증균배지의 비율이 1:9가 되도록 하고 균질화시킨 후 30°C에서 12시간 이상 배양 후 DNA를 추출하여 LAMP PCR을 수행하였음.

(라) 표준 전처리법 확립

- 개발된 시료 전처리법을 활용한 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 진단 현장 실증 및 평가 후 표준 전처리법을 확립하였음.

(2) 연구 결과

(가) 식육 및 육가공품 모니터링 및 현장 적용에서의 문제점 분석

① 식육 및 육가공품 모니터링 결과 및 현장 적용에서의 문제점 분석

- 공전법에 따라 *L. monocytogenes*를 모니터링한 결과, L사의 분쇄육가공제품(비살균 제품)에서 40개 중 15개 시료가 양성으로 확인되었으며, 이를 제외한 다른 시료에서는 모두 음성으로 확인되었음(표 19).

표 19. 식육 및 식육가공품 모니터링 결과

제조사	식품유형	결과 (양성 시료 수/총 시료 수)
A	소시지(살균제품)	0/10
B	소시지(비살균제품)	0/20
C	발효소시지(비살균제품)	0/5
D	베이컨류(비살균제품)	0/5
E	분쇄가공육제품(비살균제품)	0/5
F	생햄(비살균제품)	0/5
G	소시지(비살균제품)	0/5
H	생햄(비살균제품)	0/5
I	베이컨류(비살균제품)	0/5
J	베이컨류(비살균제품)	0/5
K	분쇄가공육제품(비살균제품)	0/5
L	분쇄가공육제품(비살균제품)	15/40
M	프레스햄(살균제품)	0/5
N	프레스햄(살균제품)	0/5
O	프레스햄(살균제품)	0/5
P	프레스햄(살균제품)	0/10
Q	햄(살균제품)	0/5
R	분쇄가공육제품(비살균제품)	0/5
S	프레스햄(살균제품)	0/5

- 공전법 모니터링에서 양성을 보인 분쇄가공육 제품에 대해 1차년도에 확립한 전처리법을 적용하여 DNA를 추출하였음.
- 추출한 DNA로 RT PCR을 수행한 결과, 15개 중 1개의 시료가 양성으로 확인되었음. 12시간 증균 후 균 수가 검출한계 미만이었던 시료(81, 82, 83, 85, 89)를 제외하고 LAMP PCR 분석을 실시한 결과 10개 중 7개의 시료에서 양성으로 확인되어 LAMP PCR의 검출 효율이 RT PCR보다 우수함을 확인하였음(표 20).
- 그러나 일부 시료에서 12시간 증균 후 균 수가 LAMP PCR에서 검출한계 이상임에도 불구하고 음성으로 확인된 점을 문제점으로 인지하여 전처리법 보완점으로 DNA 추출 시 food matrix를 제거하는 방안을 모색하였음.

표 20. *L. monocytogenes* 양성 시료의 1차년도 확립 전처리법 적용 결과

시료번호	12시간 증균 후 균 수 (log CFU/g)	순도 (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	수율 (ng/μL)	RT PCR	LAMP PCR
77	3.8	1.93±0.07	813.12±309.51	- ¹⁾	+ ²⁾
78	3.2	2.00±0.10	1209.13±472.93	-	-
80	3.2	2.04±0.15	883.75±366.37	-	-
81	<1.0 ³⁾	-	-	-	NT ⁴⁾
82	<1.0	-	-	-	NT
83	<1.0	-	-	-	NT
85	<1.0	-	-	-	NT
89	<1.0	-	-	-	NT
92	4.7	1.19±0.12	2869.00±13.30	-	+
93	5.0	2.07±0.51	1567.53±2126.41	-	+
95	5.7	2.13±0.03	1840.53±161.09	-	+
97	2.9	1.70±0.02	2918.18±11.66	-	+
100	2.3	1.83±0.40	2412.54±646.21	-	+
144	<1.0	1.96±0.09	795.00±618.18	-	-
145	1.5	1.95±0.01	338.07±134.16	+	+

¹⁾Negative; ²⁾Positive; ³⁾Detection limit; ⁴⁾Not tested

(나) 현장에 적합한 시료 전처리 방법 보완

① DNA 추출 전 균체 washing 처리

- 시료 중 food matrix를 제어하기 위한 방법으로 전처리 단계에서 washing 과정을 추

가하여 DNA의 순도, 수율 및 C_T value를 확인하였음.

- 식육 및 육가공품은 초기 균 수와 비교해 12시간 후 평균 2.8 log CFU/g 증균되었으며, 햄과 소시지의 순도는 평균 1.60으로 낮았으나 삼겹살, 돼지 안심은 1.8-2.0에 근접한 수치를 나타내었음. DNA의 순도의 경우 A₂₆₀/A₂₈₀이 1.7~2.0일 경우 PCR에 적합한 DNA로 판단하지만, 가공식품의 경우 이러한 순도 적용이 어려운 경우가 있으므로 반드시 적용되는 것은 아님(식품의약품안전처, 2016). 따라서 RT PCR 분석을 통해 PCR에 사용될 수 있는 유효한 DNA인지 판단하였음.
- RT PCR 분석 결과 햄, 소시지의 경우 70% ethanol로 washing을 한 것이 가장 검출 효율이 높았음(표 21).
- 식육 시료(삼겹살, 돼지안심)에 대해서는 전반적으로 육가공품보다 검출 효율이 낮았으며, 검출률로 비교해본다면 대조군보다 washing 처리 균의 양성 시료 수가 더 많았음. 식육 시료의 경우, 12시간 증균 후 증균배양액에 food matrix의 성분이 많은 용출됨을 육안으로 확인할 수 있었으므로 이를 제거하기 위한 다른 방법을 함께 모색하였음.

표 21. DNA 추출 전 washing 처리에 따른 순도, 수율 및 C_T value

시료	Washing 처리 방법	초기 균 수 (log CFU/g)	12시간 증균 후 균 수 (log CFU/g)	순도 (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	수율 (ng/μL)	C _T value	RT PCR (양성 시료 수/총 시료 수)
햄	CON			1.55±0.05	89.68±20.56	21.84±1.33	5/6
	PBS	2.4	5.4	1.60±0.08	49.06±13.26	23.81±1.55	4/6
	70% ethanol			1.65±0.13	28.51±10.29	21.89±1.28	6/6
소시지	CON			1.56±0.04	85.85±31.03	21.30±0.66	6/6
	PBS	2.3	6.0	1.63±0.09	67.07±21.99	21.93±0.53	6/6
	70% ethanol			1.82±0.31	14.76±7.55	21.49±0.86	6/6
삼겹살	CON			1.99±0.09	904.49±555.43	27.57	1/6
	PBS	2.8	5.5	2.05±0.02	769.57±221.49	20.45±1.02	2/6
	70% ethanol			2.03±0.02	771.65±398.30	23.98±0.95	2/6
돼지 안심	CON			1.96±0.17	835.39±899.84	19.65±0.28	2/6
	PBS	3.3	5.4	1.96±0.21	556.24±755.16	23.97±1.29	4/6
	70% ethanol			1.94±0.16	406.71±534.96	25.59±2.84	4/6

Data were presented as mean and standard error.

- 시료 중 가장 지방이 많았던 분쇄가공육의 경우, 2 mL의 PBS로 washing을 한 것이 가장 DNA 순도가 좋았으며, 검출 효율이 높았음. 반면 70% ethanol로 세척한 샘플은 세척하지 않은 시료와 검출률에서 차이가 없었음(표 22).

표 22. DNA 추출 전 washing 처리에 따른 순도, 수율 및 C_T value

시료	Washing 처리 방법	12시간 증균 후 균 수 (log CFU/g)	순도 (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	수율 (ng/μL)	C _T value	RT PCR (양성 시료 수/ 총 시료 수)
	CON		1.80±0.13	367.24±278.74	27.78±1.70	4/8
분쇄 가공육	PBS	4.3±0.4	1.86±0.17	228.60±194.02	26.92±1.27	5/8
	70% ethanol		1.82±0.26	200.16±143.45	26.38±1.09	4/8

Data were presented as mean and standard error.

- 분쇄가공육 증균배양액에 지방 성분을 녹일 수 있는 에탄올의 농도를 높여 세척 용액으로 사용하였음.
- DNA의 순도는 PBS, Control, 99% ethanol, 70% ethanol, D.W 순으로 우수하였으며, 수율은 Control, PBS, D.W, 70% ethanol, 99% ethanol 순으로 높았음(표 23).
- 그러나 RT PCR 분석 결과 모든 처리 군에서 위음성으로 확인되어 LAMP PCR 분석을 수행하였음. 그 결과 PBS, D.W, 70% ethanol로 washing을 한 DNA에서 모두 양성으로 검출되어 RT PCR보다 LAMP PCR의 검출 효율이 뛰어난을 확인할 수 있었음(표 23).

표 23. DNA 추출 전 washing 처리에 따른 순도, 수율 및 C_T value

시료	Washing 처리 방법	12시간 증균 후 균 수 (log CFU/g)	순도 (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	수율 (ng/μL)	RT PCR (양성 시료 수/ 총 시료 수)	LAMP PCR
	CON		1.91±0.17	1729.59±675.08	0/4	0/4
	PBS		1.97±0.10	627.20±377.46	0/4	4/4
분쇄 가공육	D.W	4.7±0.5	1.83±0.09	585.51±155.78	0/4	4/4
	70% ethanol		2.05±0.04	508.09±103.65	0/4	4/4
	99% ethanol		2.02±0.09	384.94±244.59	0/4	0/4

Data were presented as mean and standard error.

② DNA 추출 전 증균배양액 여과지 이용

- 시료 중 food matrix, 특히 지방질을 제어하기 위한 방법으로 전처리 단계에서 여과지를 이용하였으며, 여과지의 pore size는 미생물이 여과될 수 있는 크기로 선정하였음.
- 여과지 처리 결과, 육안으로 pellet과 결합한 food matrix가 적은 것을 확인할 수 있었음.
- 베이컨에서는 초기 균 수에 비해 12시간 후 평균 3.1 log CFU/g 증균되었으며, 순도와 수율은 거즈를 사용했을 때 가장 높게 확인되었음.
- 그러나 RT PCR 분석 결과, 여과지를 사용한 모든 처리 군에서 양성으로 확인되었으며 No.22 여과지를 사용하였을 때 가장 낮은 C_T value가 확인되었음.
- 따라서 거즈보다 여과지를 사용했을 때 검출 효율이 더 높았음(표 24).

표 24. DNA 추출 전 여과지 이용에 따른 순도, 수율 및 C_T value

시료	여과지 종류	초기 균 수 (log CFU/g)	12시간 증균 후 균 수 (log CFU/g)	순도 (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	수율 (ng/μL)	C _T value	RT PCR (양성 시료 수/총 시료 수)
베이컨	거즈			1.67±0.05	123.93±60.08	22.27±1.87	5/6
	No.10	2.2	5.3	1.59±0.10	62.08±44.84	23.77±3.05	6/6
	No.20			1.63±0.06	63.23±48.51	22.25±1.63	6/6
	No.22			1.63±0.09	79.22±36.34	22.20±1.04	6/6

Data were presented as mean and standard error.

③ 개발된 전처리 방법 보완 결과

- 시료 채취 및 증균 배양 단계에서 개발된 전처리법 보완 전에는 시료에 개발한 증균배지(LEB + 0.1% pyruvate + 0.1% ferric citrate)를 1:9 비율로 첨가하고 food matrix의 용출을 최소화하기 위해 30회 shaking하여 30°C 에서 12시간 증균 한다고 명시하였음. 사용자의 이해를 돕고자 기기를 이용한 균질화를 방지하기 위하여 스토마커를 하지 않는다는 문구를 포함하여 보완함.
- DNA 추출 단계에서는 증균배양액 내의 food matrix를 더 효율적으로 제어하기 위해 증균배양액 여과 시 거즈 대신 여과지 사용 및 지방함량이 많은 시료의 경우 균체를 washing하는 단계를 추가하여 보완함.

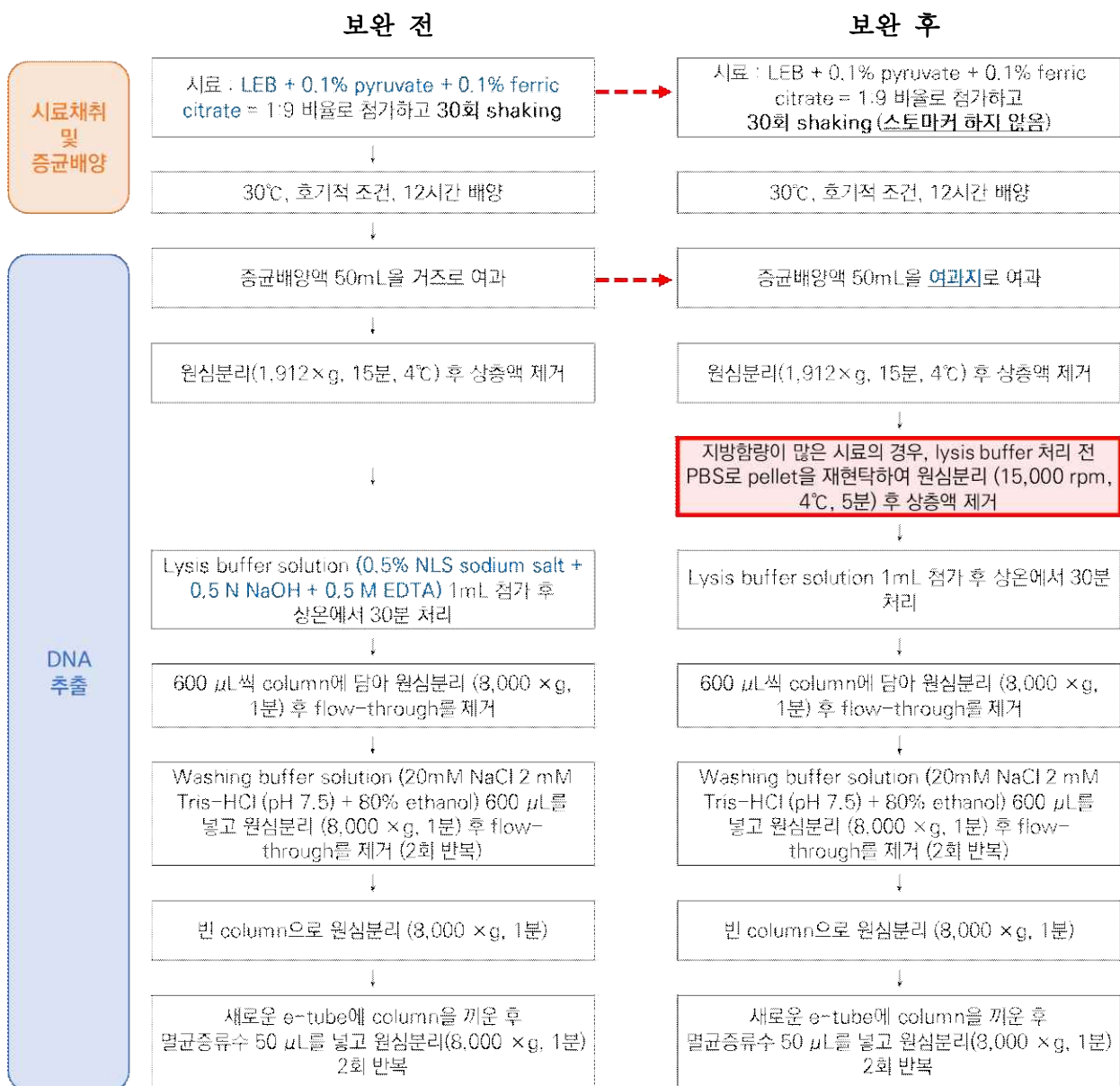


그림 9. 개발된 전처리법 보완 사항

(다) 냉동육 및 육가공업체 3자 현장 검증 진행

- 3자 검증을 통해 장소에 구애받지 않고 신속, 정확하게 유전자를 분석할 수 있는 현장 용이성을 확인하였음.
- 안전실험실에는 이화학실험 및 미생물 실험을 할 수 있는 기자재가 구비되어있었으며, 미생물 실험을 위해 클린벤치, 오토클레이브, 저울, 인큐베이터, 냉장고, 소형 원심분리기, PCR 기기, DNA prep 기기, 마이크로피펫, 팁 등이 구비되어있어 3자 검증을 진행하는데 무리가 없다고 판단되었음(그림 10, 그림 11).



육가공업체 실험실 전경



인큐베이터



PCR 기기, DNA prep 기기

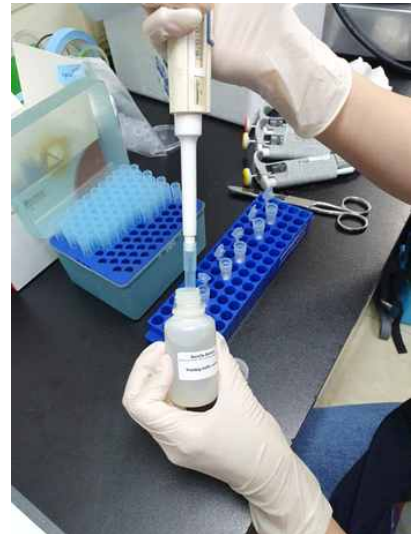


클린벤치

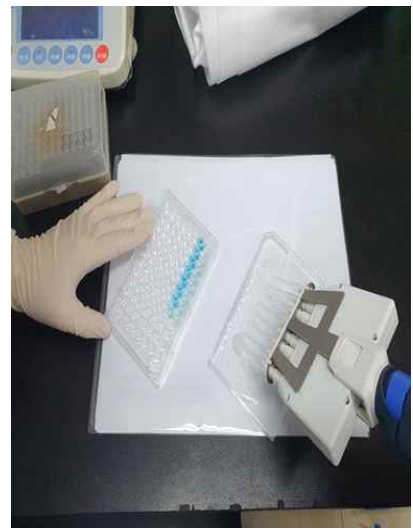
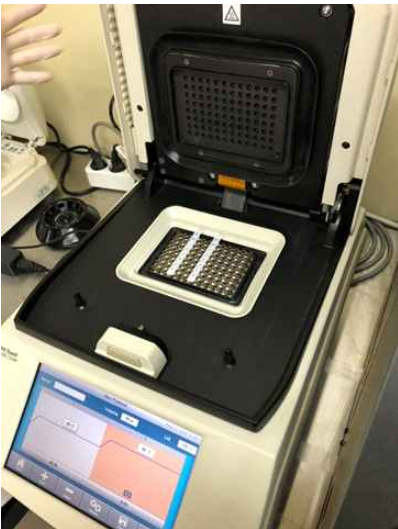
그림 10. 육가공업체 실험실 시설 설비



시료 전처리



DNA 추출



LAMP PCR

그림 11. 육가공업체 안전실험실 3자 검증

- 현장에 원심분리기가 갖춰지지 않아 증균배양액 1 mL로 DNA 추출 진행하였으며, 흡광도 측정 기기가 갖춰지지 않은 관계로 LAMP-PCR 비색반응을 육안으로 확인하였음.
- LAMP PCR 결과, 시료 3에서 *L. monocytogenes* 양성 반응을 확인하였음(그림 12).
- 이후 주관기관의 실험실에서 DNA의 순도 및 수율을 확인하였고, RT PCR 분석을 통해 교차검증을 시행하였음.
- 그 결과, DNA의 순도와 수율이 PCR을 하기에 적당한 수준으로 확인되었으며, RT PCR 결과 현장에서 수행한 LAMP PCR 비색결과와 유사한 경향을 나타내었음. 따라서 본 연구를 통해 확립된 검출 방법이 유효함을 확인하였음(그림 13, 표 25).

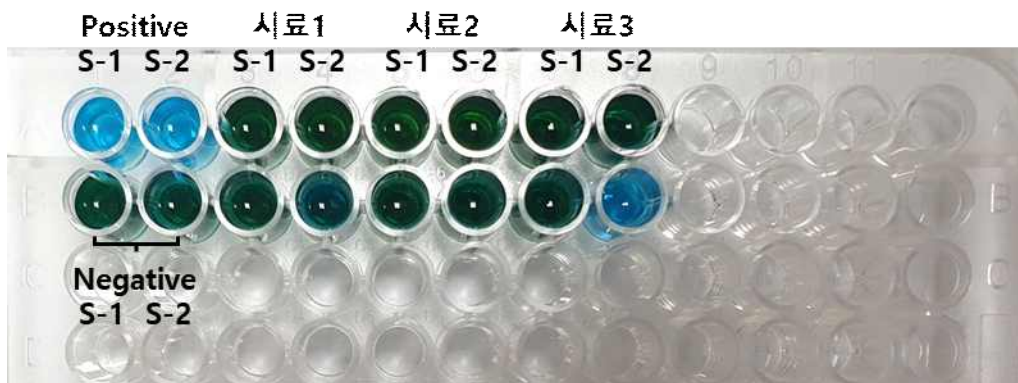
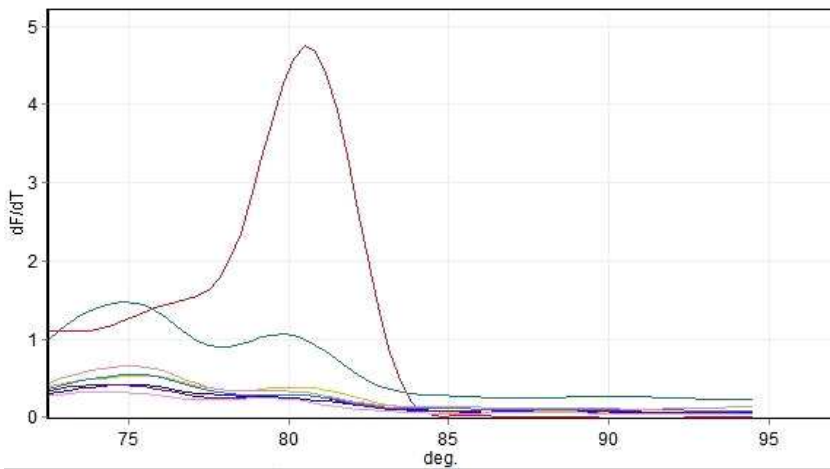
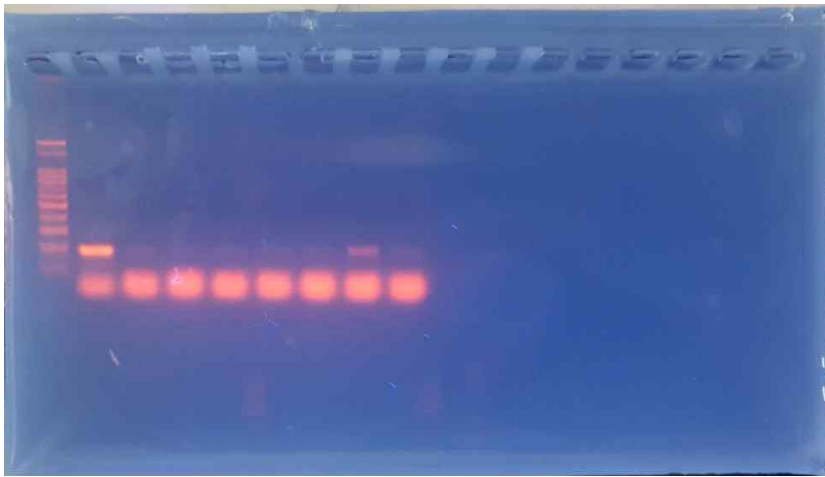


그림 12. 3자 검증 LAMP PCR 비색결과



No.	Color	Name
1	Red	Positive control
2	Yellow	Negative control
3	Blue	시료 1 S-1
4	Purple	시료 1 S-2
5	Pink	시료 2 S-1
6	Light Blue	시료 2 S-2
7	Teal	시료 3 S-1
8	Light Red	시료 3 S-2



Lane 1: 100bp ladder;
 Lane 2: Positive control (186bp);
 Lane 3, 4: 시료 1;
 Lane 5, 6: 시료 2;
 Lane 7, 8: 시료 3;

그림 13. 3자 검증 RT PCR 결과

표 25. 3자 검증 진행 결과

시료	순도 (A_{260}/A_{280})	수율 (ng/ μ L)	RT PCR	LAMP PCR
시료 1	1.967 ± 0.012	46.22 ± 0.61	-	-
시료 2	1.984 ± 0.004	59.90 ± 1.69	-	-
시료 3	2.059 ± 0.015	45.27 ± 0.80	+	+

Data were presented as mean and standard error.

(라) 표준 전처리법 확립

- 위의 실험 결과를 종합하여 실용화 단계에서 활용될 수 있도록 아래와 같이 표준 전처리법을 확립하였음(그림 14).

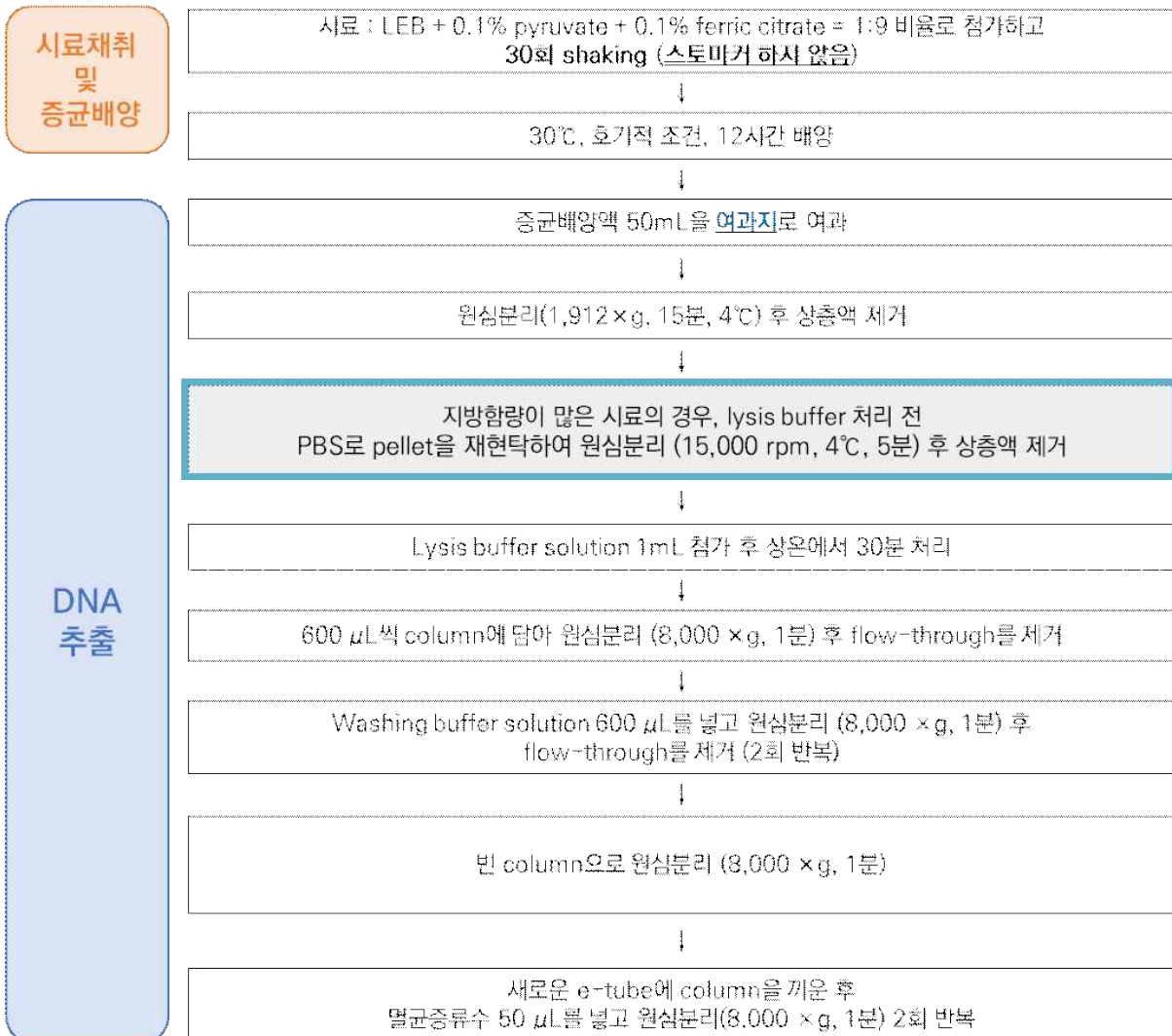


그림 14. 시료에 따른 표준 전처리법

2-1-2. 등온비색 PCR을 이용한 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 진단법 개발

[공동연구기관 : 경상대학교 심원보]

가. 냉동육 및 육가공품에서 *L. monocytogenes* 검출을 위한 시료 전처리법 및 등온비색 PCR 검출 기술개발

(1) 실험 내용

(가) 등온비색 PCR의 냉동육 및 육가공품에의 적용 가능성 평가

- 전처리법을 적용한 냉동육 및 육가공품에서의 *L. monocytogenes* 진단 등온비색 PCR의 최적화
 - ① Primer 및 molecular beacon 디자인
 - ② 반응온도: 최적 반응온도를 확립하기 위하여 65, 63, 59.7, 55, 49.4, 44.7, 41.7, 40°C 에서 *Bst* DNA polymerase 제조사(New England Biolabs)가 제시한 매뉴얼대로 30분 동안 등온비색 PCR을 수행하였음.
 - ③ 반응 시간: 중합효소인 *Bst* DNA polymerase를 첨가하여 60°C 에서 10, 20, 30, 40, 50, 60분 반응시킨 뒤 결과를 확인·분석하였음.
 - ④ 시약 농도: primer, DNA 중합효소(*Bst* DNA polymerase), 분자비콘(molecular beacon)의 조건을 시험하였음(표 26).

표 26. 등온비색 PCR에 사용되는 시약 농도의 최적화 조건

시약	최적화 조건
Primer	<ul style="list-style-type: none"> - 타 연구를 통해 보고된 바에 따르면 primer의 농도가 1:4(outer primer:inner primer) 일 때 가장 높은 효율을 보이는 것으로 확인됨(Notomi et al., 2000). - 본 연구에서는 primer 농도의 최적화를 위해 그 농도를 80/20, 40/10, 20/5, 10/2.5, 5/1.25, 2.5/0.675 μM (inner primer/outer primer)로 설정하여 실험을 실시하였음.
<i>Bst</i> DNA polymerase	<ul style="list-style-type: none"> - 중합효소 농도의 최적화를 위하여 4,000, 8,000, 16,000, 32,000 unit 농도의 중합효소를 이용해 실험을 실시하였음.
Molecular beacon	<ul style="list-style-type: none"> - LAMP 기반 등온비색 PCR의 결과를 확인하기 위하여 HRPzyme이 포함되어 있으며 증폭산물에 특이적인 결합능을 가지는 분자비콘의 최적 농도 설정은 매우 중요함. - 본 연구에서는 1, 2, 4, 8 μM 농도의 분자비콘을 사용하여 background signal이 낮으면서 양성 시료와 음성 시료의 발색 차이가 높게 나타나는 분자비콘의 최적 농도를 확인하고자 하였음.

(나) 전처리법을 적용한 냉동육 및 육가공품에서의 *L. monocytogenes* 진단 등온비색 PCR 최적화

- ① 전처리법과 증균 조건을 적용한 후 냉동육 및 육가공품에서의 등온비색 PCR법 평가
 - 전처리법과 증균 조건에 사용되는 물질로 인하여 등온비색 PCR법의 특이성과 민감도가 저해되는지 여부 판단하기 위해 주관연구팀에서 DNA를 받아 분석에 이용하였음.
 - ㉓ 균액 민감도 확인: 0~8.7 log CFU/mL
 - ㉔ 식육 중 민감도 확인: 1.0~7.1 log CFU/g
 - ㉕ 교차반응성 확인: *Listeria* spp. 3종(*L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*), 기타 미생물 5종(*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, Yeast)

- ② 임의로 오염시킨 냉동육 및 육가공품에서 *L. monocytogenes* 검출 확인
 - 유통과정 중의 냉동육 및 육가공품 표면에 임의로 *L. monocytogenes*를 오염시킨 후 주관연구팀에서 개발한 전처리법과 증균 조건을 적용 후 평가하여 전처리법 보완을 위한 피드백을 전달하였음.

(2) 실험 결과

(가) 등온비색 PCR의 냉동육 및 육가공품에의 적용 가능성 평가

① Primer 및 molecular beacon 디자인

- *L. monocytogenes* 검출용 등온비색 PCR의 개발을 위해 *L. monocytogenes* 특이유전자인 *hlyA* gene을 활용해, primer 및 molecular beacon을 디자인하였음.
- 디자인한 molecular beacon 및 실험에 사용한 primer의 염기서열은 아래와 같음.

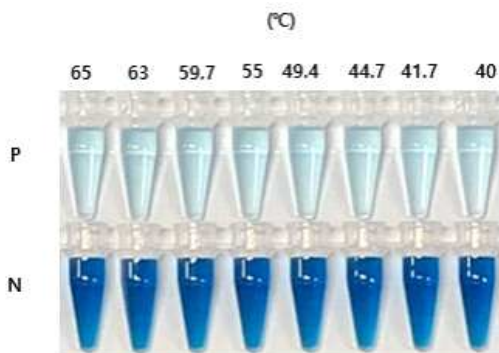
>CP045969.1 *Listeria monocytogenes* strain AUSMDU00007774 chromosome, complete genome
TCTACCAAT**TTGCGCAACA**AACTGAAGCAAAGGATGCATCTGCATTCAATAAAGAAAATTCAAT**TTTCATCCA**
TGGCACCACCAGCATCTCCGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCAATCGAAAAGAAACACG**CGGATGAAATCGAT**
AAGTATATACAAGGATTGGATTACAATAAAAAACAATGTATTAGTATACCACGGAGATGCAGTGACAAATG
TGCCGCCAAGAAAAGGTTACAAAGATGGAAATGAATATATCGTTGTGGAGAAAAGAAGAAATCCATCAA
TCAAATAATGCAGACATTCAAGTTGTGAATGCAATTTGAGCCTAACCTAT**CCAGGTGCTCTCGTAAAA**
GCGAATTCG

F3: TTG CGC AAC AAA CTG AAG C
B3: GCT TTT ACG AGA GCA CCT GG (CCA GGT GCT CTC GTA AAA GC)
FIP: CGT GTT TCT TTT CGA TTG GCG TCT TTT TTT CAT CCA TGG CAC CAC C
BIP: CCA CGG AGA TGC AGT GAC AAA TGT TTT GGA TTT CTT CTT TTT CTC CAC AAC
LF: TAG GAC TTG CAG GCG GAG ATG
LB: GCC AAG AAA AGG TTA CAA AGA TGG
Molecular beacon (15mer): **AAATCGATAAGTATA**GGGTAGGGCGGGTTGGGT**ATAAAAAACAATGTAT**

② 반응온도

- 실험 결과 40-65°C의 범위에서 양성 시료와 음성 시료 사이에 발색 차이가 나타나는 것을 확인할 수 있었으나, 가장 높은 발색 차이를 보인 55°C를 반응온도로 결정하였음.

A. 비색 이미지



B. 흡광도

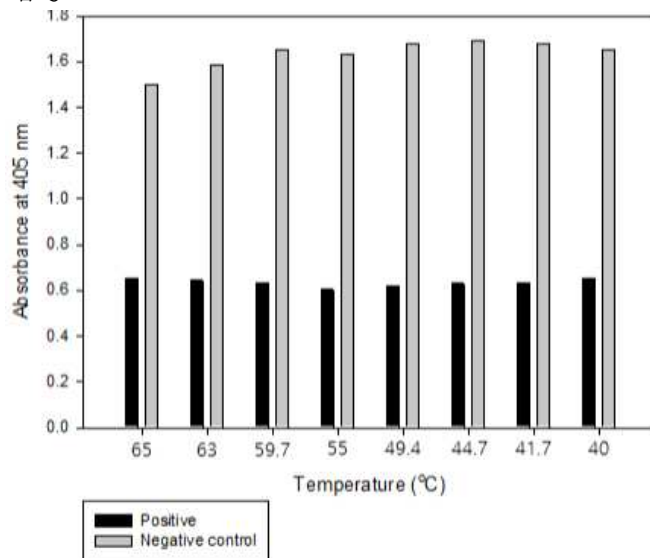
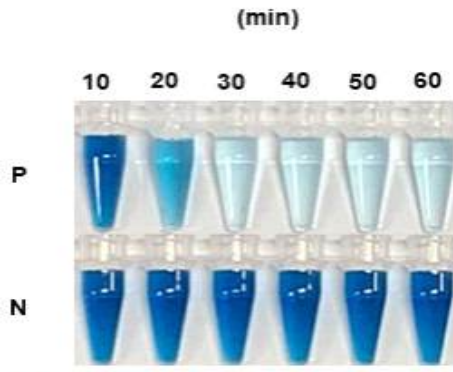


그림 15. 개발한 등온비색 PCR법의 최적 반응온도 확인 비색 이미지(A)와 흡광도(B).

③ 반응 시간

- 20분 이후부터 증폭산물이 형성되는 것을 확인할 수 있었으나, 30분을 반응시킨 조건에서 가장 높은 발색 차이가 확인되었기 때문에 보다 확실한 결과를 도출하기 위해 최적 반응 시간을 30분으로 결정하였음.

A. 비색 이미지



B. 흡광도

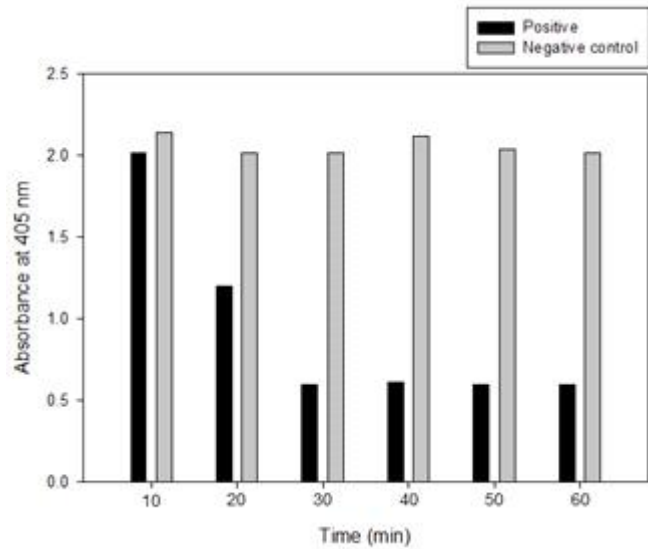
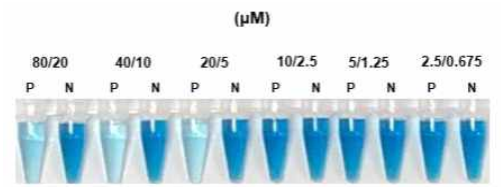


그림 16. 개발한 등온비색 PCR법의 최적 반응 시간 확인 비색 이미지(A)와 흡광도(B).

④ 시약 농도

- Primer의 경우, 실험 결과 outer primer(F3, B3)와 inner primer(FIP, BIP)의 농도가 10/40, 20/80 μM 일 때 발색 차이가 가장 높게 나타났으나 추후 경제적 평가를 대비하기 위하여 primer의 최적 농도를 10/40 μM (outer/inner primer)로 결정하였음.

A. 비색 이미지



B. 흡광도

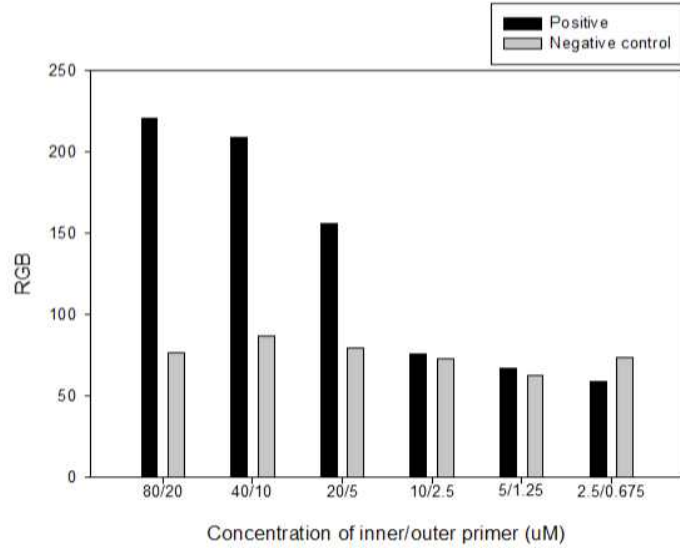
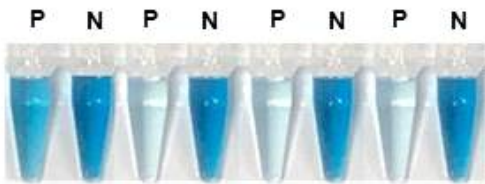


그림 17. 개발한 등온비색 PCR법의 최적 primer 농도 확인 비색 이미지(A)와 흡광도(B).

- *Bst* DNA polymerase의 경우, 발색반응 결과에서 확인할 수 있듯이 8,000, 16,000, 32,000 unit 농도의 중합효소를 사용한 결과에서 유의적으로 높은 발색 차이가 나타났으나 추후 경제적 평가를 대비하기 위하여 8,000 unit을 최적 농도로 결정하였음.

A. 비색 이미지



B. 흡광도

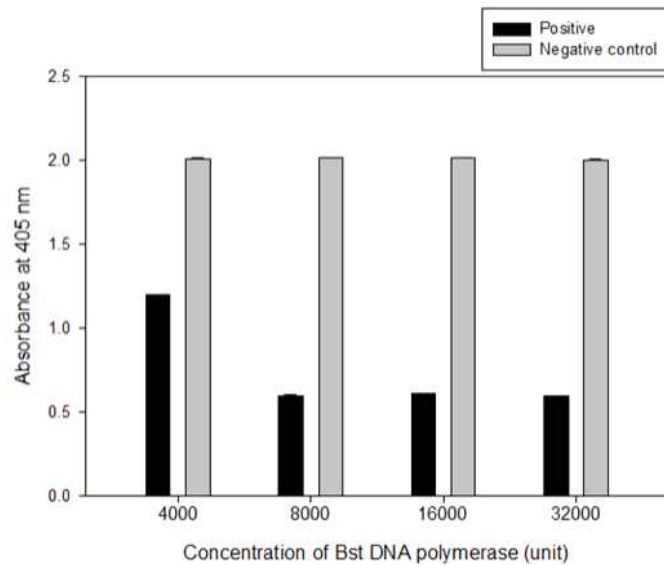
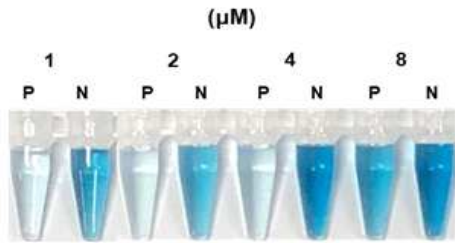


그림 18. 개발한 등온비색 PCR법의 최적 *Bst* DNA polymerase 농도 확인 비색 이미지(A)와 흡광도(B).

- 분자비콘의 경우, 4 μ M 농도의 분자비콘을 이용하였을 때 background signal이 낮으며 발색의 차이가 가장 크게 나타나는 것을 확인할 수 있었음.

A. 비색 이미지



B. 흡광도

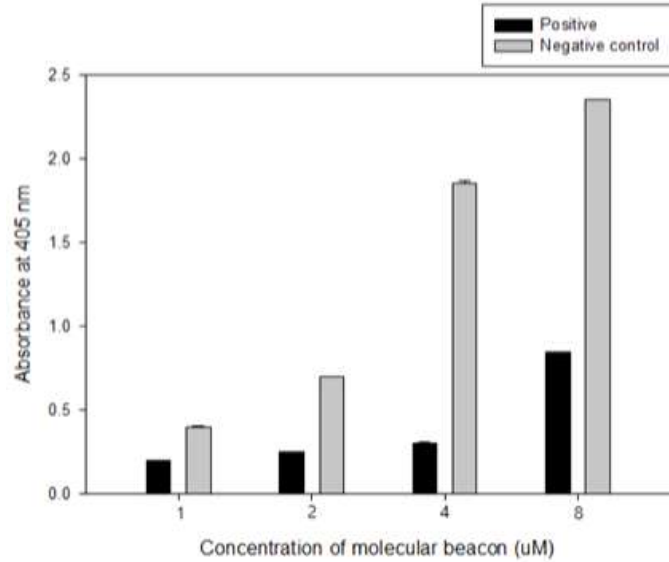


그림 19. 개발한 등온비색 PCR법의 최적 molecular beacon 확인 비색 이미지(A)와 흡광도(B).

(나) 전처리법을 적용한 냉동육 및 육가공품에서의 *L. monocytogenes* 진단 등온비색 PCR 최적화

① 전처리법과 증균 조건을 적용한 후 냉동육 및 육가공품에서의 등온비색 PCR법 평가

㉠ 균액 민감도 확인: 0~8.7 log CFU/mL

- 0~8.7 log CFU/mL 수준의 *L. monocytogenes* 균으로부터 추출한 DNA를 본 연구에서 개발한 등온비색 PCR을 이용해 분석하였음.

- 그 결과, 0.5 log CFU/mL 수준까지는 검출 가능함을 확인할 수 있었음(표 27, 그림 20).

표 27. 등온비색 PCR을 이용한 균액 민감도 분석

DNA		Duplicate	Sample number	cLAMP Results
균 농도별	8.7 log CFU/mL	S-1	2-1	+
		S-2	2-2	+
	7.8 log CFU/mL	S-1	2-3	+
		S-2	2-4	+
	6.9 log CFU/mL	S-1	2-5	+
		S-2	2-6	+
	5.8 log CFU/mL	S-1	2-7	+
		S-2	2-8	+
	4.7 log CFU/mL	S-1	2-9	+
		S-2	2-10	+
	3.7 log CFU/mL	S-1	2-11	+
		S-2	2-12	+
	2.7 log CFU/mL	S-1	2-13	+
		S-2	2-14	+
	1.7 log CFU/mL	S-1	2-15	+
		S-2	2-16	+
0.5 log CFU/mL	S-1	2-17	+	

		S-2	2-18	+
	0 log CFU/mL	S-1	2-19	-
		S-2	2-20	-

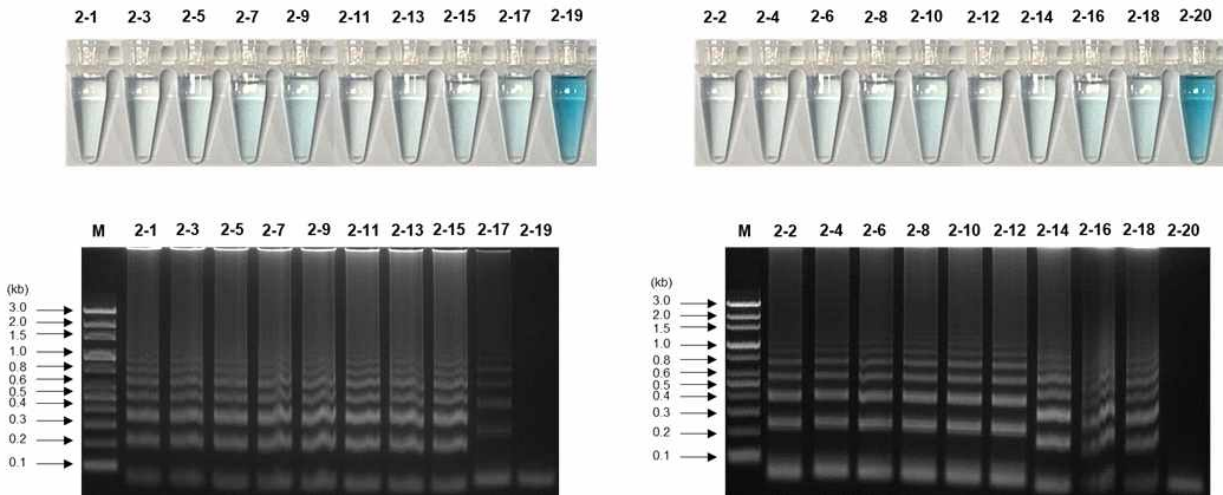


그림 20. 등온비색 PCR을 이용한 균액 민감도 분석

㉔ 식육 중 민감도 확인: 1.0~7.1 log CFU/g

- 식육에 1.0~7.1 log CFU/g 농도의 *L. monocytogenes* 균을 임의로 오염시킨 후, 해당 시료로부터 추출한 DNA를 본 연구에서 개발한 등온비색 PCR로 분석하였음.
- 그 결과, 축육시료에 *L. monocytogenes*가 3.0 log CFU/g 이상의 농도로 오염되었을 때, 본 연구에서 개발한 등온비색 PCR로 검출 가능함을 확인할 수 있었음(표 28, 그림 21).

표 28. 등온비색 PCR을 이용한 식육 중 민감도 확인

Sample	DNA	Sample number	cLAMP Results
식육 민감도	7.1 log CFU/g	5-1	+
	7.1 log CFU/g	5-2	+
	6.0 log CFU/g	5-3	+
	6.0 log CFU/g	5-4	+
	4.9 log CFU/g	5-5	+
	5.0 log CFU/g	5-6	+
	4.0 log CFU/g	5-7	+
	3.9 log CFU/g	5-8	+
	2.9 log CFU/g	5-9	+
	3.0 log CFU/g	5-10	+
2.0 log CFU/g	5-11	-	

	1.9 log CFU/g	5-12	-
	1.0 log CFU/g	5-13	-
	1.3 log CFU/g	5-14	-

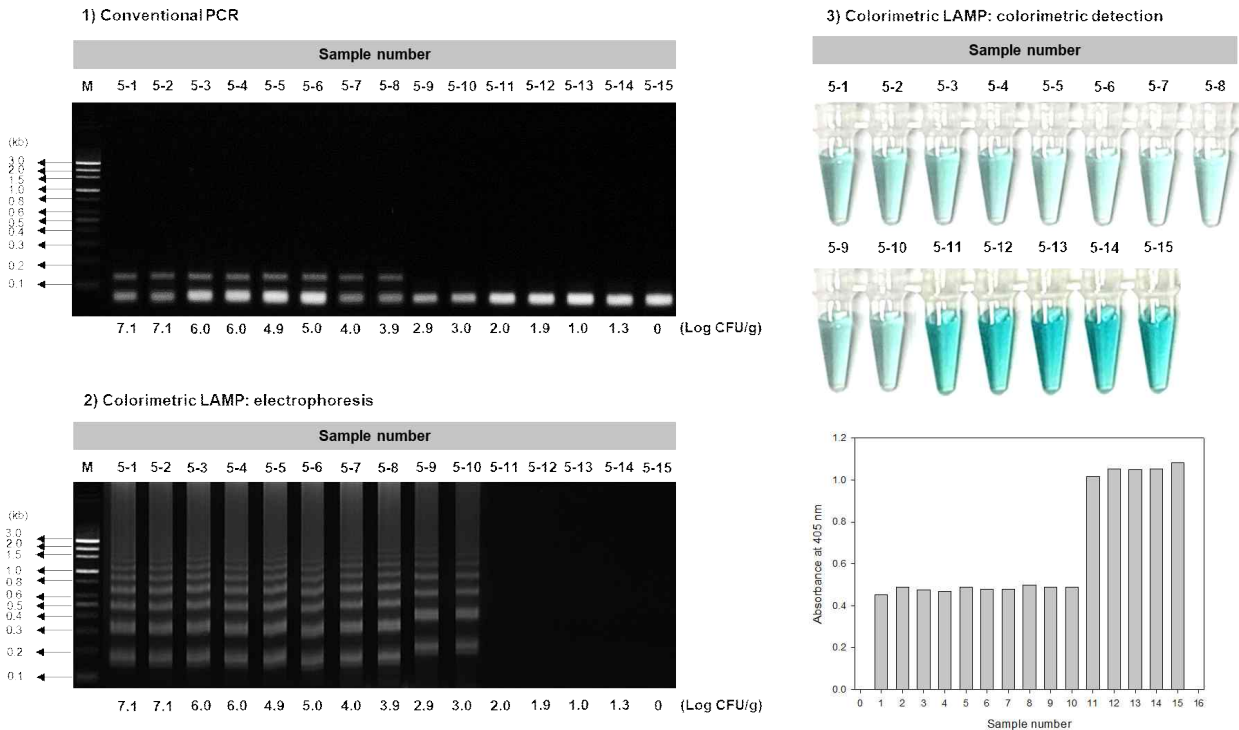


그림 21. 등온비색 PCR을 이용한 식육 중 민감도 확인

㉔ 교차반응성 확인: *Listeria* spp. 3종(*L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*), 기타 미생물 5종(*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, Yeast)

- *L. monocytogenes* 균을 포함한 총 4종의 *Listeria* spp. 속(*L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*)과 기타 미생물로부터 추출한 DNA를 이용해 개발한 분석기술의 특이성을 확인하였으며, 5종의 미생물(*E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Sal. Typhimurium*, Yeast)에는 반응하지 않는 것을 확인할 수 있었음(표 29).

- 그 결과, 본 연구에서 개발한 등온비색 PCR의 경우 *L. monocytogenes* 균만 특이적으로 검출 가능함을 확인할 수 있었음(그림 22).

표 29. 등온비색 PCR을 이용한 교차반응성 확인

DNA		Duplicate	Sample number	cLAMP Results
Bacteria	<i>Listeria innocua</i>	S-1	3-1	-
		S-2	3-2	-
	<i>Listeria welshimeri</i>	S-1	3-3	-
		S-2	3-4	-
	<i>Listeria ivanovii</i>	S-1	3-5	-
		S-2	3-6	-
	<i>Escherichia coli</i>	S-1	4-1	-
		S-2	4-2	-
	<i>Bacillus cereus</i>	S-1	4-3	-
		S-2	4-4	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	S-1	4-5	-
		S-2	4-6	-
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	S-1	4-7	-
		S-2	4-8	-
	Yeast	S-1	4-9	-
		S-2	4-10	-

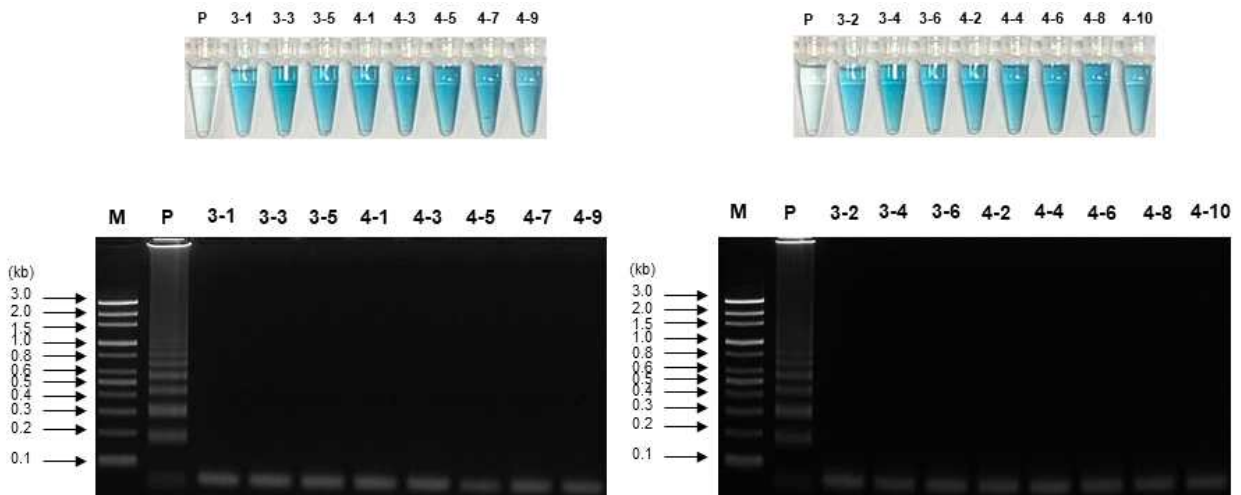


그림 22. 등온비색 PCR을 이용한 교차반응성 확인

② 임의로 오염시킨 냉동육 및 육가공품에서 *L. monocytogenes* 검출 확인

㉠ 기존 배지 및 개량 배지를 이용한 증균능 비교

- 공전 상의 시험법을 기반으로 제조한 증균배지와 개량 배지를 이용해 *L. monocytogenes*를 증균 한 뒤, 증균능을 비교하였음.
- 그 결과, 개량 배지를 이용할 경우 약 9시간, 기존 배지를 이용할 경우 약 12시간의 증균 시간이 필요한 것으로 확인되었음(표 30).

표 30. 기존 및 개량 배지를 이용한 증균능 확인

DNA			Duplicate	Sample number	Cell counts (log CFU/mL)	cLAMP Results	RT PCR
증균시간별	0h	기존 배지	S-1	1-1	1.0±0.0	-	-
			S-2	1-2		-	-
		개량 배지	S-1	1-3	1.0±0.0	-	-
			S-2	1-4		-	-
	3h	기존 배지	S-1	1-5	1.5±0.1	-	-
			S-2	1-6		-	-
		개량 배지	S-1	1-7	1.7±0.1	-	-
			S-2	1-8		-	-
	6h	기존 배지	S-1	1-9	2.2±0.0	-	-
			S-2	1-10		-	-
		개량 배지	S-1	1-11	2.5±0.2	-	-
			S-2	1-12		-	-
	9h	기존 배지	S-1	1-13	2.9±0.1	-	-
			S-2	1-14		-	-
		개량 배지	S-1	1-15	3.5±0.0	+	-
			S-2	1-16		+	-
	12h	기존 배지	S-1	1-17	3.8±0.1	+	-
			S-2	1-18		+	-
		개량 배지	S-1	1-19	4.3±0.1	+	+
			S-2	1-20		+	+

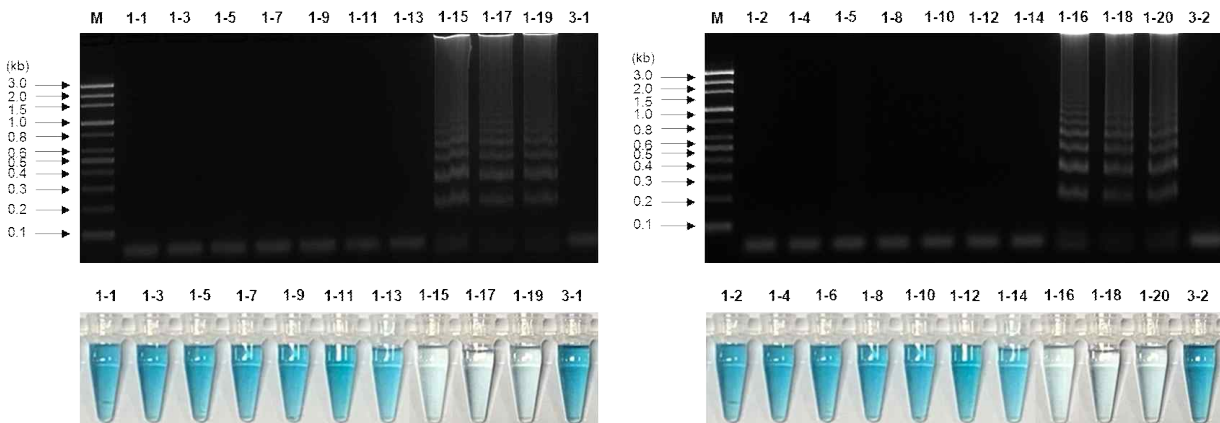


그림 23. 기존 및 개량 배지를 이용한 증균능 확인 비색결과

나. 개발된 시료 전처리법 및 등온비색 PCR 검출 기술을 활용한 냉동육 및 육가공품에서 *L. monocytogenes* 검출 현장 실증

(1) 실험 내용

(가) 개발된 등온비색 PCR을 활용한 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 진단 현장 실증 및 평가

① 냉동육 및 육가공품 유통단계 모니터링 및 현장 적용에의 문제점 분석

- 주관기관에서 제공한 DNA 시료를 개발한 등온비색 PCR을 이용해 분석한 뒤, RT-PCR 결과와 비교하였음.

㉠ *L. monocytogenes* 양성 시료 분석을 통한 현장 적용 문제점 분석

㉡ 증균배양액 세척 효율 비교

- 식육(삼겹살), 육가공품(소시지, 분쇄가공육)의 증균 시간 및 균 세척 용액에 따른 검출 효율을 확인하였음.

㉢ *L. monocytogenes* 양성 시료 세척 효율 비교

(나) 문제점 개선을 통한 등온비색 PCR의 *L. monocytogenes* 진단법 확립

① 등온비색 PCR의 절차개선

- 개발한 등온비색 PCR을 검출 현장에서 비전문가가 쉽게 사용할 수 있도록 개선하였음(등온비색 PCR: two tube assay → one tube assay).

- 기존에 확립한 등온비색 PCR의 경우 아래 그림 24와 같이 LAMP 반응 후 molecular beacon을 첨가하고, hybridization을 실시한 뒤 LAMP-molecular beacon 반응산물 5 μL와 hemin 5 μL를 다른 tube에 들어있는 기질 용액에 첨가하는 방식으로 실험을 진행하였음.

- 기존에 확립한 등온비색 PCR은 반응시키는 용액이 극소량이고, 두 개 이상의 tube를 사용해야 하므로 시료 간의 오차가 발생하여 비전문가가 현장 등의 장소에서 사용하기에 어려움이 있을 것으로 판단하였음.

- 그러므로 아래 그림 24와 같이 실험 단계를 간소화시키고 one-tube 내에서 증폭과 발색을 확인할 수 있도록 등온비색 PCR 과정을 개선하였음.

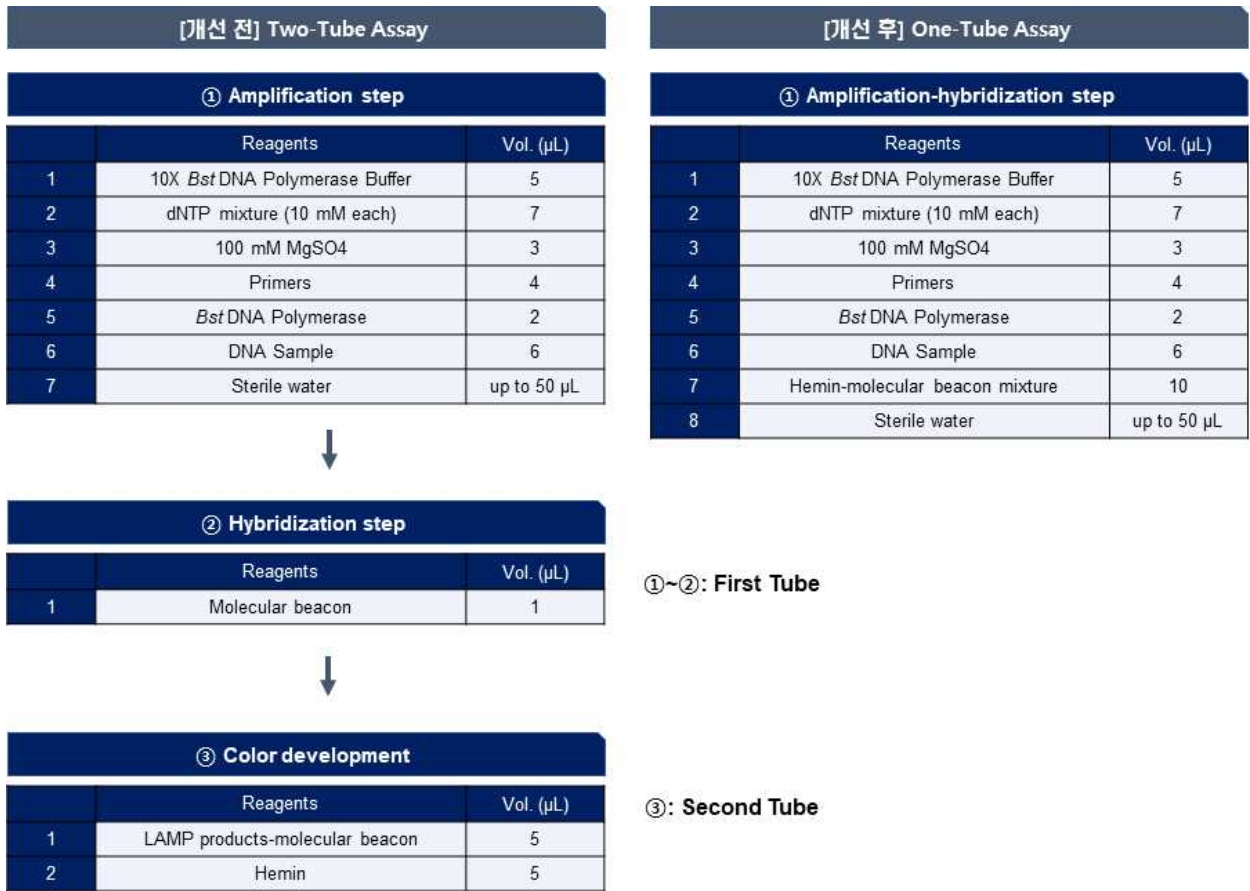


그림 24. 기존 및 개선된 등온비색 PCR의 과정도

- 먼저 molecular beacon과 hemin을 mixture 형태로 혼합하여 준비함으로써 LAMP 증폭 단계 이후 두 단계에 나누어 시약을 첨가하지 않고, 한 번에 시약을 첨가할 수 있도록 실험 단계를 간소화하였음.
- 또한 기존에 확립한 등온비색 PCR의 경우 소량의 LAMP-molecular beacon 반응산물과 hemin을 따로 반응시키는 등 최소 2개 이상의 tube를 사용하여 실험 결과를 확인하였음.
- 하지만 개선된 등온비색 PCR의 경우 소량의 시약을 취하지 않고 one-tube 내에서 반응할 수 있도록 분석법을 개선함으로써 tube를 옮기고 다시 섞는 등의 복잡한 과정을 생략하도록 하여 비전문가도 쉽게 사용 가능한 분석 방법을 개선하였음.

(2) 실험 결과

(가) 개발된 등온비색 PCR을 활용한 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 진단 현장 실증 및 평가

① 냉동육 및 육가공품 유통단계 모니터링 및 현장 적용에의 문제점 분석

- 주관기관에서 제공받은 DNA 시료를 본 연구에서 개발한 등온비색 PCR을 이용해 분석하였으며, 실험 결과는 전기영동과 비색반응 두 가지로 확인하였음.
- 또한 주관연구팀에서 제공한 RT PCR 결과와 비교하여 문제점을 분석하였음.
- 특히, LAMP 기법의 경우 위양성 결과가 발생할 수 있으므로 발색 결과를 통해 DNA 시료의 분석 결과를 판단하였음.

② *L. monocytogenes* 양성 시료 분석을 통한 현장 적용 문제점 분석

- 분쇄가공육 시료 77번, 78번, 80번 시료를 분석한 결과, 분쇄가공육 77번 시료에서만 검출 가능한 것으로 확인되었음.
- 분쇄가공육 시료 92번, 93번, 95번, 97번, 100번, 144번, 145번 시료를 분석한 결과, 분쇄가공육 144번 이외의 시료들에서 검출 가능함을 알 수 있었음.
- 144번 시료는 증균 후 균수가 검출한계 미만으로 확인되어 검출되지 않은 것으로 판단됨.

표 31. *Listeria monocytogenes* 양성 시료 전처리 시료 분석

Sample	Duplicate	Sample number	Cell counts (log CFU/g)	cLAMP Results	RT PCR	
분쇄 가공육	77	S-1	10-1	3.8	+	-
		S-2	10-2		+	-
		S-3	10-3	4.0	+	-
		S-4	10-4		+	-
	78	S-1	10-5	3.2	-	-
		S-2	10-6		-	-
		S-3	10-7	<1.0	-	-
		S-4	10-8		-	-
	80	S-1	10-9	3.2	-	-
		S-2	10-10		-	-
		S-3	10-11	<1.0	-	-
		S-4	10-12		-	-
	92	S-1	12-1	4.7	+	-
		S-2	12-2		+	-
	93	S-1	12-9	5.7	+	-
		S-2	12-10		±	-
95	S-1	12-17	5.7	±	-	
	S-2	12-18		+	-	
97	S-1	12-19	2.9	+	-	

		S-2	12-20		+	-
100		S-1	12-27	2.3	+	-
		S-2	12-28		+	-
		S-1	12-35		<1.0	-
144	S-2	12-36	-	-		
145		S-1	12-41	1.5	+	+
		S-2	12-42		+	+

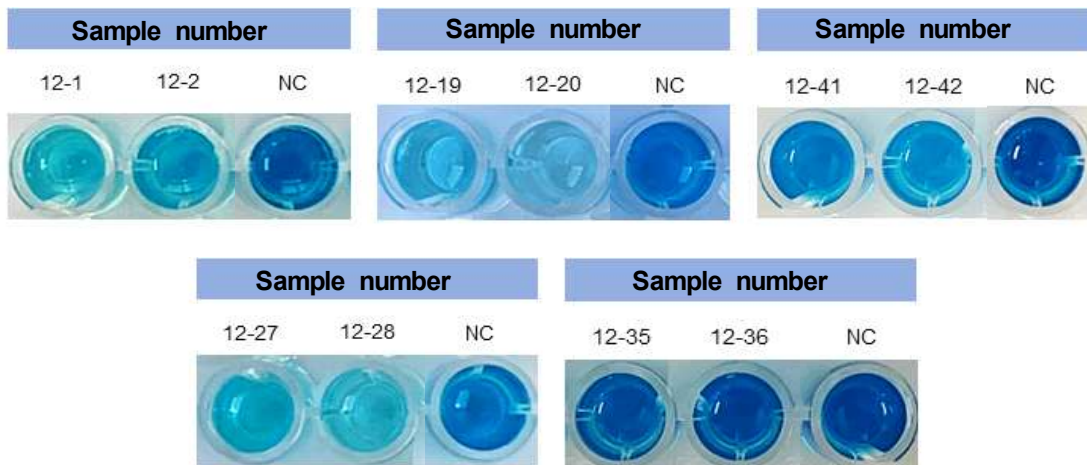
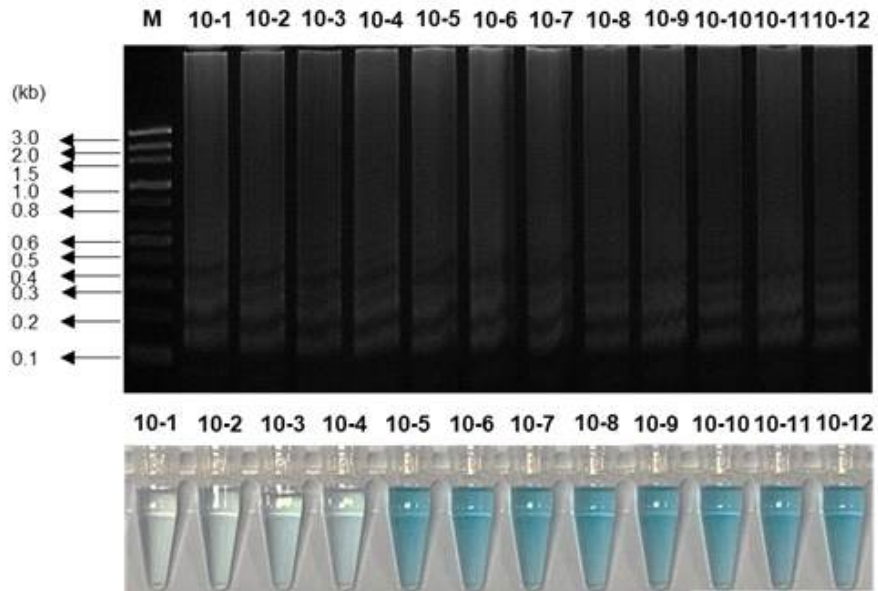


그림 25. *Listeria monocytogenes* 양성 시료 전처리 시료 분석

㉔ 증균배양액 세척 효율 비교

- *L. monocytogenes* 균을 임의로 오염시킨 육가공품(소시지)과 식육(삼겹살) 시료를 각각 9시간과 12시간 배양한 뒤, 2 mL의 70% ethanol로 세척한 균과 미세척한 균으로부터 추출된 DNA를 분석한 결과 해당 시료 모두 검출 가능함을 확인할 수 있었음.

표 32. 증균 시간 및 균 세척 용액에 따른 검출 효율 확인 (소시지)

Sample	Time (h)	Washing	Duplicate	Sample number	Cell counts (log CFU/g)	cLAMP Results	RT PCR
소시지	9	-	S-1	6-1	3.8±0.1	+	-
			S-2	6-2		+	-
			S-3	6-3		+	-
			S-4	6-4		+	-
			S-5	6-5		+	-
		70% Ethanol	S-1	6-6		+	-
			S-2	6-7		+	-
			S-3	6-8		+	-
			S-4	6-9		+	-
			S-5	6-10		+	-
	12	-	S-1	6-11	4.6±0.1	+	+
			S-2	6-12		+	+
			S-3	6-13		+	+
			S-4	6-14		+	+
			S-5	6-15		+	+
		70% Ethanol	S-1	6-16		+	+
			S-2	6-17		+	+
			S-3	6-18		+	+
			S-4	6-19		+	+
			S-5	6-20		+	+

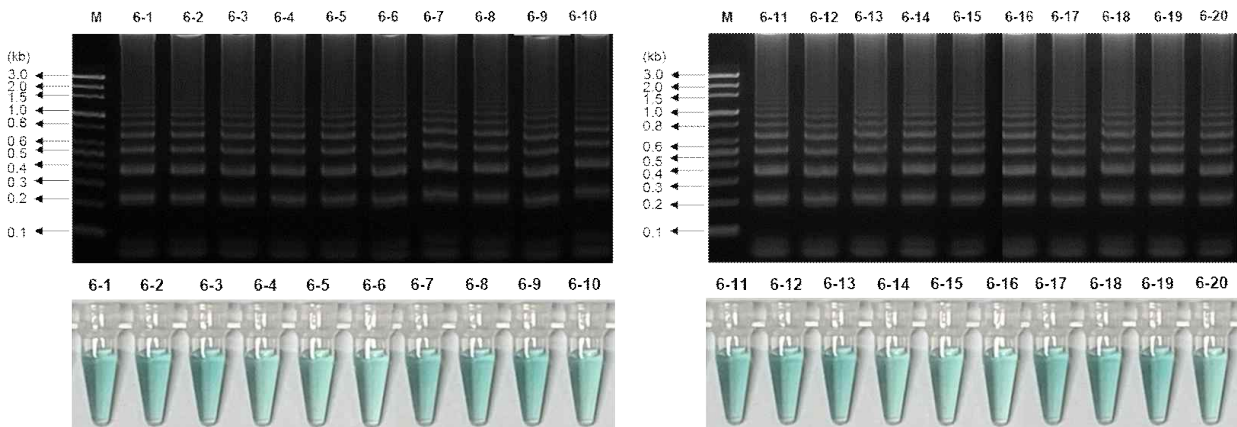


그림 26. 증균 시간 및 균 세척 용액에 따른 검출 효율 확인 (소시지)

표 33. 평균 시간 및 균 세척 용액에 따른 검출 효율 확인 (삼겹살)

Sample	Time (h)	Washing	Duplicate	Sample number	Cell counts (log CFU/g)	cLAMP Results	RT PCR
삼겹살	9	-	S-1	7-1	4.1±0.3	+	+
			S-2	7-2		+	+
			S-3	7-3		+	+
			S-4	7-4		+	+
			S-5	7-5		+	+
		70% Ethanol	S-1	7-6		+	+
			S-2	7-7		+	+
			S-3	7-8		+	+
			S-4	7-9		+	+
			S-5	7-10		+	+
	12	-	S-1	7-11	5.5±0.1	+	+
			S-2	7-12		+	+
			S-3	7-13		+	+
			S-4	7-14		+	+
			S-5	7-15		+	+
		70% Ethanol	S-1	7-16		+	+
			S-2	7-17		+	+
			S-3	7-18		+	+
			S-4	7-19		+	+
			S-5	7-20		+	+

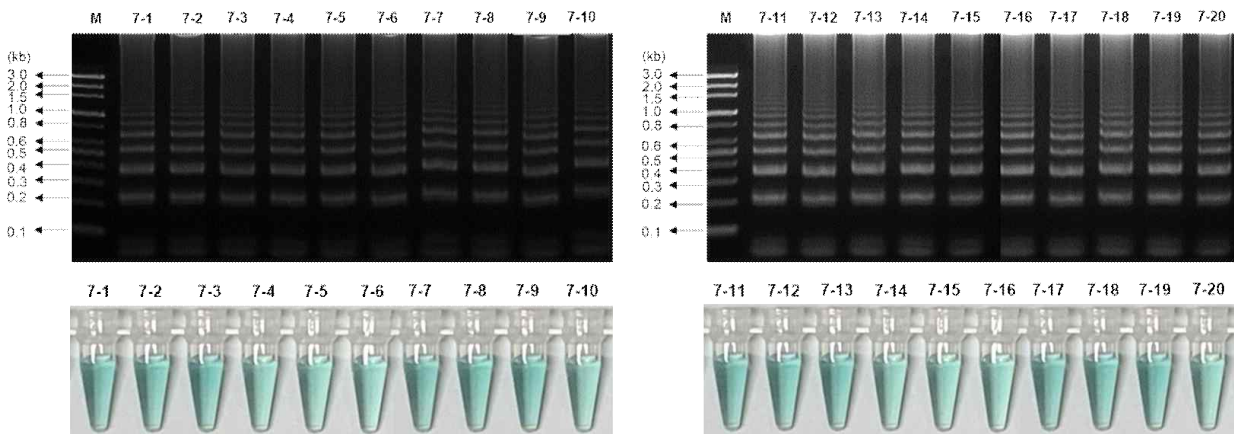


그림 27. 평균 시간 및 균 세척 용액에 따른 검출 효율 확인 (삼겹살)

- *L. monocytogenes* 균이 임의로 오염된 분쇄가공육 시료를 증균 한 뒤 미세척한 균과 PBS와 70% ethanol로 각각 세척한 균으로부터 추출한 DNA를 분석하였음.
- 그 결과 미세척한 균에서 추출한 DNA를 사용하였을 때 검출이 어려운 것으로 확인되었음.
- 또한 PBS와 70% ethanol로 세척한 균으로부터 추출한 DNA의 경우 일부 시료에서만 검출 가능한 것으로 확인되었음.

표 34. 분쇄가공육을 이용한 균 세척 용액 (PBS, 70% ethanol)의 효율 비교

Sample	Time (h)	Washing	Duplicate	Sample number	Cell counts (log CFU/g)	cLAMP Results	RT PCR
분쇄 가공육	12	-	S-1	9-1	4.6	-	+
			S-2	9-2		-	-
			S-3	9-3	3.7	-	+
			S-4	9-4		-	-
		PBS	S-1	9-5	4.6	-	-
			S-2	9-6		-	+
			S-3	9-7	3.7	+	+
			S-4	9-8		+	-
		70% ethanol	S-1	9-9	4.6	-	+
			S-2	9-10		-	-
			S-3	9-11	3.7	+	+
			S-4	9-12		+	+

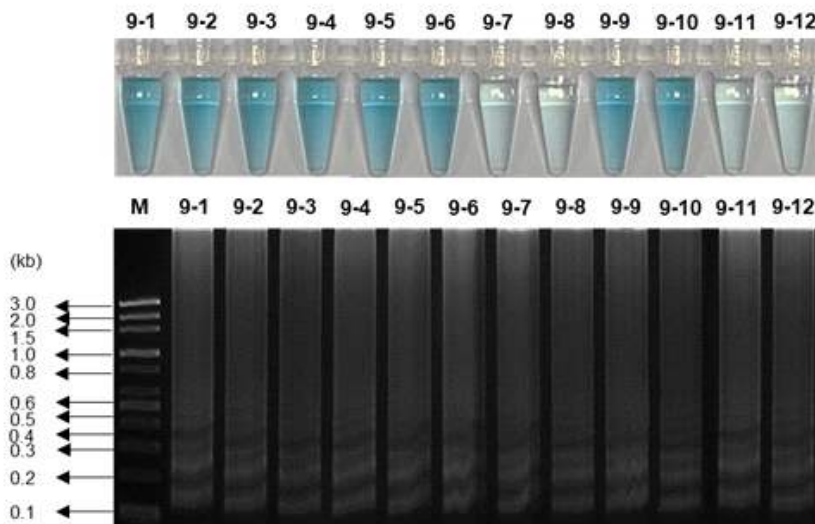


그림 28. 분쇄가공육을 이용한 균 세척 용액 (PBS, 70% ethanol)의 효율 비교

- 균 세척 용액의 효율을 비교하기 위해 *L. monocytogenes*가 오염된 분쇄가공육 시료를 증균 한 뒤 미세척한 균과 PBS, D.W, 70% ethanol 및 99% ethanol를 이용해 세척한 균으로부터 추출한 DNA를 분석하였음.
- 그 결과, 아래 그림과 같이 PBS와 D.W 그리고 70% ethanol를 사용하여 균을 세척한 시료에서만 검출 가능성을 확인할 수 있었음.

표 35. 분쇄가공육을 이용한 균 세척 용액 (PBS, D.W, 70% ethanol, 99% ethanol)의 효율 비교

Sample	Time (h)	Washing	Duplicate	Sample number	Cell counts (log CFU/g)	cLAMP Results	RT PCR
분쇄 가공육	12	-	S-1	11-1	4.4	-	-
			S-2	11-2		-	-
			S-3	11-3	5.0	-	-
			S-4	11-4		-	-
		PBS	S-1	11-5	4.4	+	-
			S-2	11-6		+	-
			S-3	11-7	5.0	+	-
			S-4	11-8		+	-
		D.W	S-1	11-9	4.4	+	-
			S-2	11-10		+	-
			S-3	11-11	5.0	+	-
			S-4	11-12		+	-
		70% ethanol	S-1	11-13	4.4	+	-
			S-2	11-14		+	-
			S-3	11-15	5.0	+	-
			S-4	11-16		+	-
		99% ethanol	S-1	11-17	4.4	-	-
			S-2	11-18		-	-
			S-3	11-19	5.0	-	-
			S-4	11-20		-	-

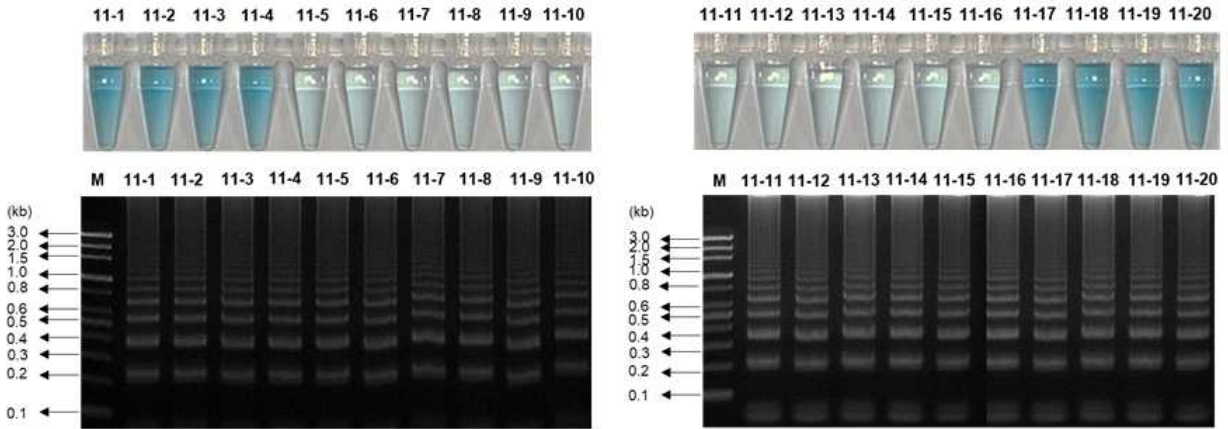


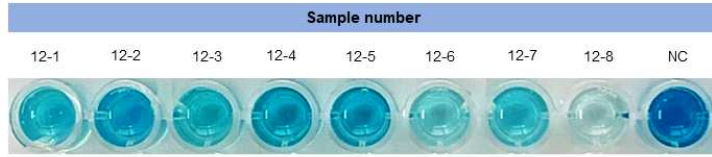
그림 29. 분쇄가공육을 이용한 균 세척용액 (PBS, D.W, 70% ethanol, 99% ethanol)의 효율 비교

㉔ *L. monocytogenes* 양성 시료 세척 효율 비교

- 앞서 실험한 바와 같이 7가지 분쇄가공육 시료를 증균시킨 뒤 PBS, 70% ethanol 및 99% ethanol를 이용해 균을 세척함으로써 균 세척용액의 효율을 비교·평가하였음.
- 그 결과 아래 그림과 같이 전반적으로 미세척한 균으로부터 DNA를 추출한 시료보다 세척한 균으로부터 DNA를 추출하였을 때 반응성이 높은 것으로 확인되었음.

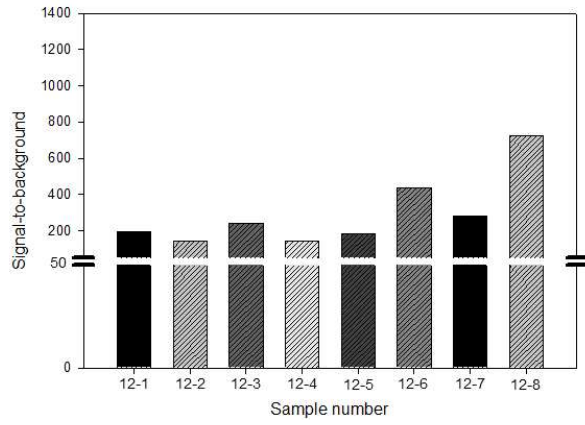
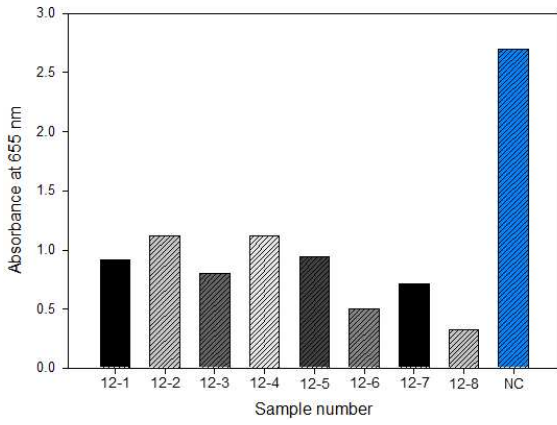
표 36. 분쇄가공육 *Listeria monocytogenes* 양성 시료 세척 효율 비교

Sample	Treatment	Duplicate	Sample number	Cell counts (log CFU/g)	cLAMP Results	RT PCR
92	CON	S-1	12-1	4.7	+	-
		S-2	12-2		+	-
	PBS	S-1	12-3		+	-
		S-2	12-4		+	-
	70% ethanol	S-1	12-5		+	-
		S-2	12-6		+	-
	99% ethanol	S-1	12-7		+	-
		S-2	12-8		+	-
93	CON	S-1	12-9	5.7	+	-
		S-2	12-10		±	-
	PBS	S-1	12-11		+	+
		S-2	12-12		±	-
	70% ethanol	S-1	12-13		+	+
		S-2	12-14		+	-
	99% ethanol	S-1	12-15		+	-
		S-2	12-16		+	-
97	CON	S-1	12-19	2.9	+	-
		S-2	12-20		+	-
	PBS	S-1	12-21		+	-
		S-2	12-22		+	-
	70% ethanol	S-1	12-23		+	-
		S-2	12-24		+	-
	99% ethanol	S-1	12-25		+	-
		S-2	12-26		+	-
100	CON	S-1	12-27	2.3	+	-
		S-2	12-28		+	-
	PBS	S-1	12-29		+	-
		S-2	12-30		+	-
	70% ethanol	S-1	12-31		+	-
		S-2	12-32		+	-
	99% ethanol	S-1	12-33		+	-
		S-2	12-34		+	-
144	CON	S-1	12-35	<1.0	-	-
		S-2	12-36		-	-
	PBS	S-1	12-37		-	-
		S-2	12-38		-	-
	70% ethanol	S-1	12-39		-	+
		S-2	12-40		-	-
145	CON	S-1	12-41	1.5	+	+
		S-2	12-42		+	-
	PBS	S-1	12-43		+	+
		S-2	12-44		+	-
	70% ethanol	S-1	12-45		+	-
		S-2	12-46		+	-



Sample No. 92

Sample No. 92



Sample No. 93

Sample No. 93

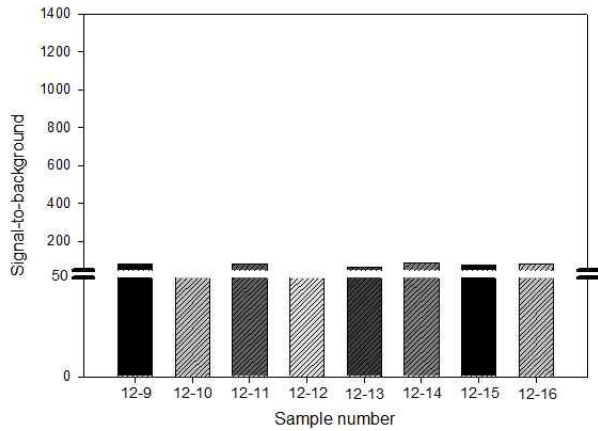
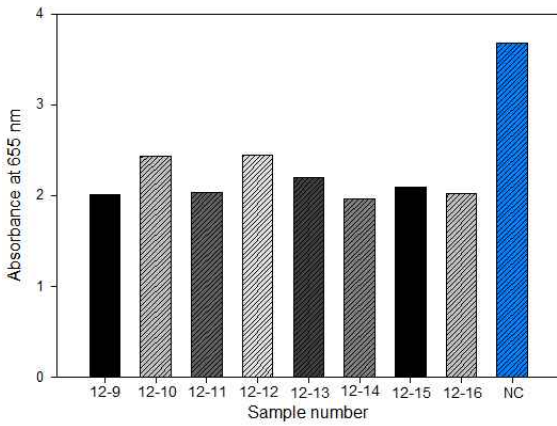
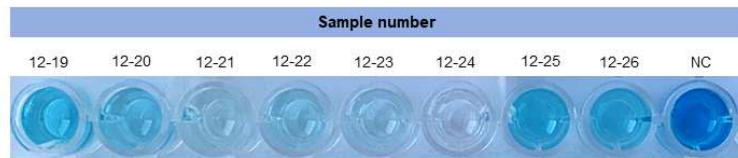


그림 30. 분쇄가공육 *Listeria monocytogenes* 양성 시료 세척 효율 비교 1



Sample No. 97

Sample No. 97

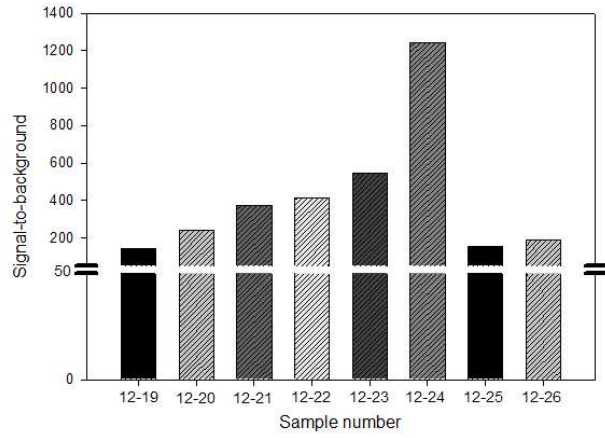
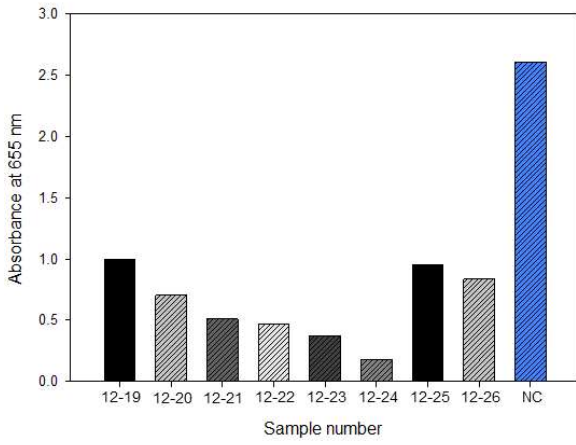
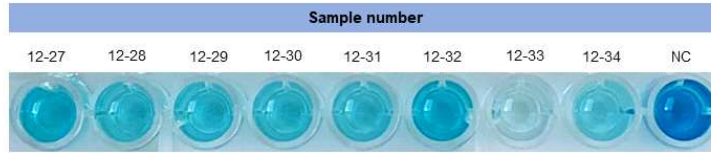
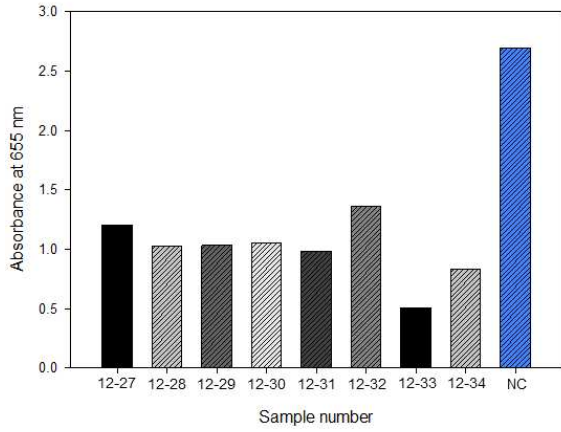


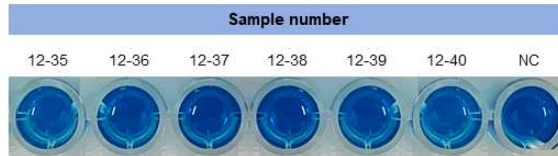
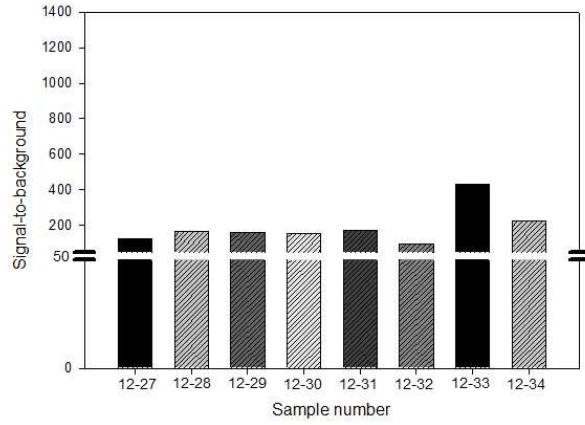
그림 31. 분쇄가공육 *Listeria monocytogenes* 양성 시료 세척 효율 비교 2



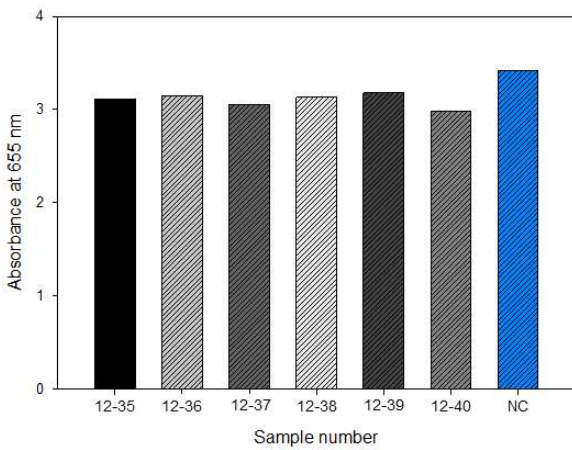
Sample No. 100



Sample No. 100



Sample No. 144



Sample No. 144

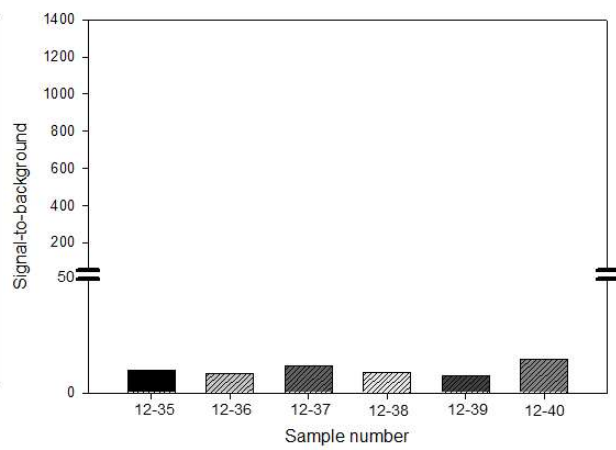
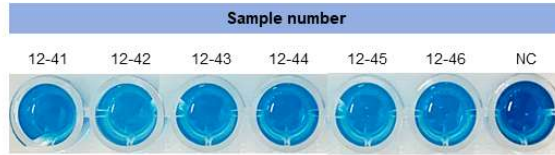
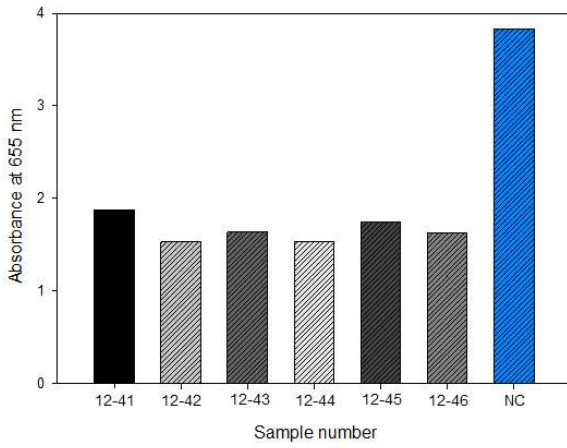


그림 32. 분쇄가공육 *Listeria monocytogenes* 양성 시료 세척 효율 비교 3



Sample No. 145



Sample No. 145

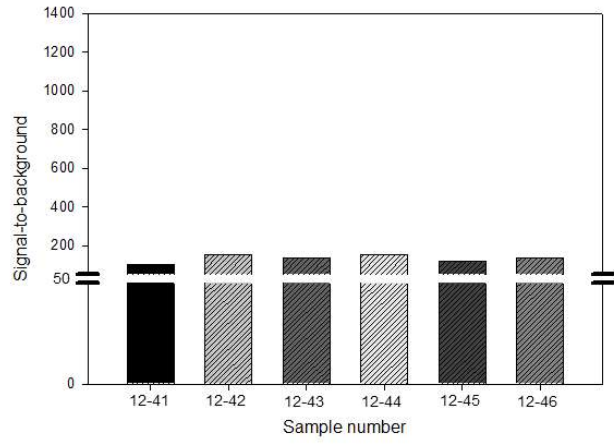


그림 33. 분쇄가공육 *Listeria monocytogenes* 양성 시료 세척 효율 비교 4

(나) 문제점 개선을 통한 등온비색 PCR의 *L. monocytogenes* 진단법 확립

① 등온비색 PCR의 절차개선

- 앞서 언급한 바와 같이 one-tube assay로 개선한 등온비색 PCR을 이용하여 아래 그림 34, 그림 35와 같이 반응 시간, 민감도 및 특이성을 확인하였으며, 실험 결과 기존 방법과 마찬가지로 30분 이상 반응할 경우 특이적으로 *L. monocytogenes* 균을 검출할 수 있음을 확인하였음.

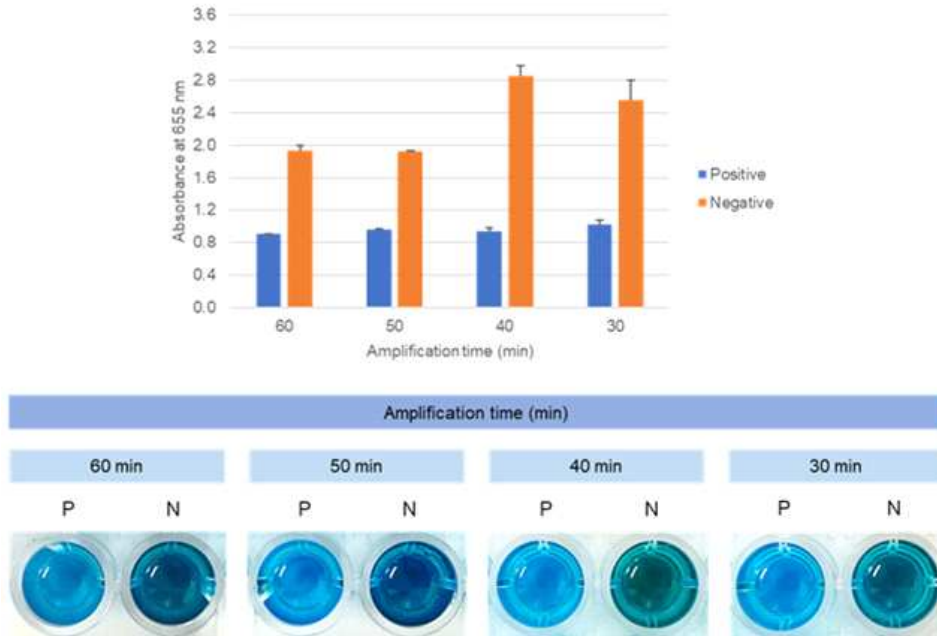


그림 34. 개선된 등온비색 PCR을 이용한 최적 반응 시간 확립

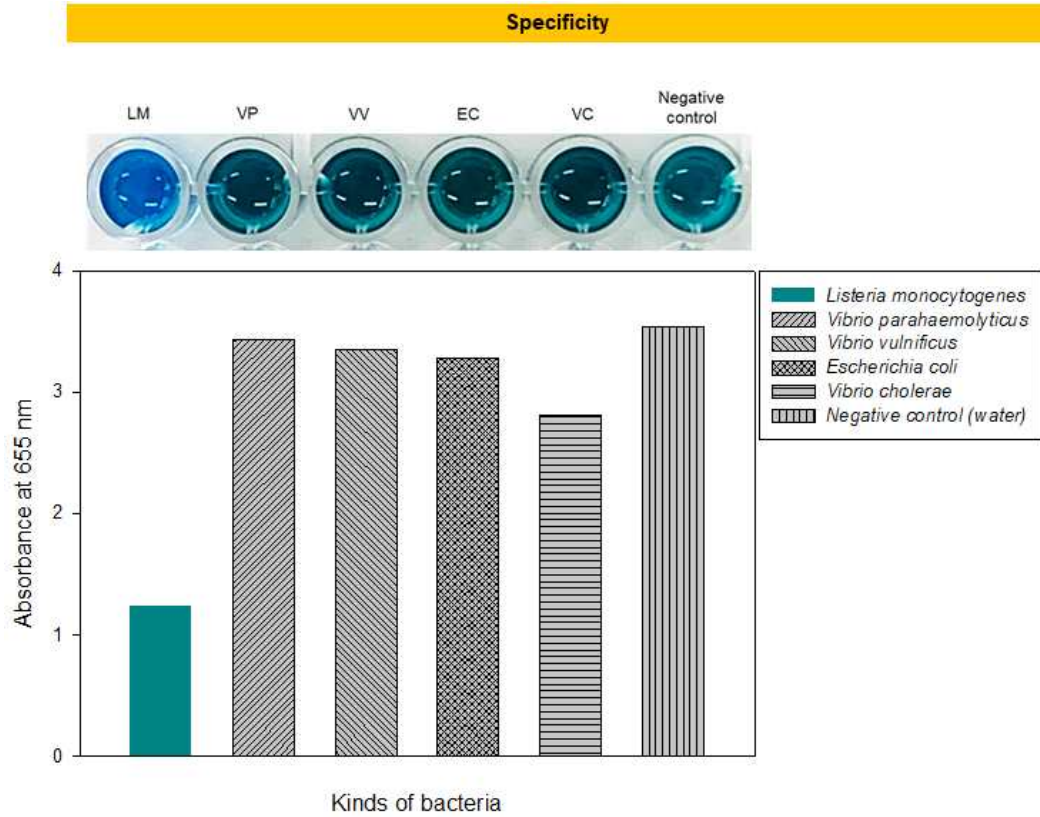


그림 35. 개선된 등온비색 PCR을 이용한 분석기술의 교차반응성 확인

- 더불어, 기존의 등온비색 PCR과 마찬가지로 개선된 *L. monocytogenes* 검출용 등온 비색 PCR의 경우에도 해당 균을 1×10^1 CFU/mL 수준까지 육안으로 검출 가능함을 확인할 수 있었음(그림 36).

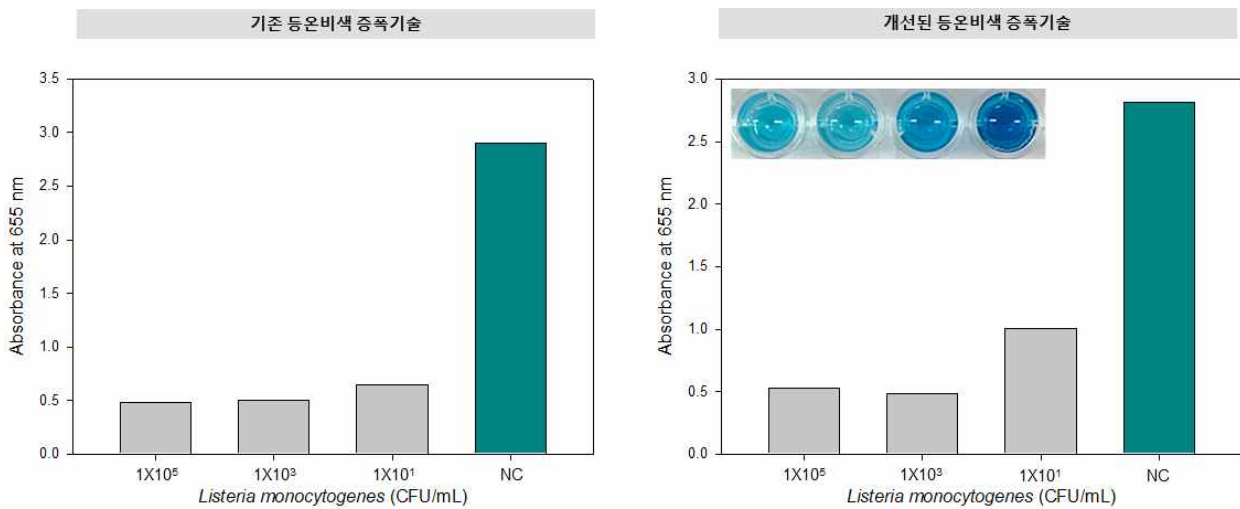


그림 36. 개선된 등온비색 PCR을 이용한 분석기술의 민감도 확인

② 등온비색 PCR 분석 매뉴얼

- 개발 및 one-tube assay로 개선된 등온비색 PCR을 아래와 같이 매뉴얼을 마련하였
음.

① 아래 조성과 같이 LAMP mixture를 제조한 뒤, 60 °C에서 40분간 반응시킨다.

	Reagents	Vol. (μL)
1	10X <i>Bst</i> DNA Polymerase Buffer	5
2	dNTP mixture (10 mM each)	7
3	100 mM MgSO ₄	3
4	Primers	4
5	<i>Bst</i> DNA Polymerase	2
6	DNA Sample	6
7	Hemin-molecular beacon mixture	10
8	Sterile water	up to 50 μL

② 10% 과산화수소와 TMB 기질용액을 1대 1로 혼합한 뒤, LAMP 반응산물에 200 μL를 첨가한다.

③ 655 nm에서 흡광도를 측정한다.

그림 37. 등온비색 PCR의 매뉴얼

2-1-3. 등온비색 PCR을 이용한 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 진단키트 개발

[협동연구기관 : (주)보레다바이오텍 최동욱]

가. 등온비색 PCR을 이용한 냉동육 및 육가공품 내 *L. monocytogenes* 진단키트 개발 계획 수립 및 제품화

(1) 실험 내용

(가) 등온비색 PCR 적용 진단키트 형태 결정

① 시판 중인 진단키트의 제품 형태 조사

- 등온비색 PCR 키트 제품화를 위한 자료 검색을 통해 시판 중인 분자 진단 형태의 *L. monocytogenes* 검출 키트의 구성 품목 및 보관 조건을 확인하였음.
- 시판 중인 *L. monocytogenes* 검출 키트 제품명 및 제조사의 조사: 제조사별 제품명, 키트 주요 구성 품목, 보관 조건을 알아보기 위한 목적으로 조사를 착수하였음. 제품의 구성 방식 중 *L. monocytogenes*의 DNA를 추출하고 증균 할 수 있는 구성 품목, 원재료의 가공 방식 등을 제조사별 구성 품목을 조사하여 확인하였고, 보관 조건 등을 비교 분석하여 시제품 개발에 필요 보관 조건을 정리하였음.

(나) 전처리법과 등온비색 PCR을 적용한 냉동육 및 육가공품에서의 *L. monocytogenes* 진단 최적화 가능한 키트 개발

① 타사 제품과의 호환성 평가

- 시판 중인 DNA 추출 및 정제 시료를 사용하여 추출한 DNA와 타사 LAMP 키트의 구성품 10X isothermal amplification buffer 5 μ L, MgSO₄ 3 μ L, dNTP mix 7 μ L, DNA polymerase 2 μ L와 3차 멸균 증류수 23 μ L 그리고 진단 타겟 박테리아의 genomic DNA 6 μ L를 섞은 50 μ L의 용액의 DNA 증폭을 진행하였음. 이후 증폭된 DNA를 Beacon과 Hemin을 1:6으로 섞은 혼합물 10 μ L와 섞은 후 다시 thermal cycler를 통하여 95°C에서 2.5분 및 65°C에서 12.5분 동안 hybridization을 진행하였고, 이 수용액을 H₂O₂와 TMB 1:1 혼합물 200 μ L와 반응시켜 의도한 등온비색 PCR 결과가 나오는지 확인하였음.

② 숙명여자대학교에서 제공받은 조성의 유효성 및 재현성 평가

- 숙명여자대학교 측에서 제공한 기의 *L. monocytogenes* 증균배지와 DNA 추출 및 정제 시료 제작 방법에 따라 제작을 실시하였음. 상기의 증균배지를 사용하여 *L. monocytogenes*를 37°C에서 18시간 배양하고 당해 배양균과 DNA 추출 및 정제 시료를 사용하여 *L. monocytogenes*의 genomic DNA를 얻고, 이 genomic DNA의 PCR을 진행하고 그 결과물을 전기영동하여 실험 결과가 유효한지 평가하였음.

- *L. monocytogenes* 증균배지의 조성: 배지 1L 당 pancreatic digest of casein 17g, soytone 3g, dextrose 2.5g, sodium chloride 5g, dipotassium phosphate 2.5g, yeast extract 6g, cycloheximide 0.05g, acriflavine HCl 0.015g, nalidixic acid 0.04g, pyruvate 1g, ferric citrate 1g.
- DNA 추출 및 정제 시료 조성-1 (Washing Buffer): Buffer 100 mL 당 0.5% N-lauroyl sarcosine sodium salt 0.5g, 0.5N NaOH 10 mL, 0.5M EDTA 50 mL 첨가 후 3차 멸균 증류수를 사용하여 최종 부피를 100 mL로 맞춤.
- DNA 추출 및 정제 시료 조성-2 (Lysis Buffer): Buffer 100 mL 당 1M NaCl 2 mL, 1M Tris-HCl (pH 7.5) 2 mL, Ethanol 80 mL 혼합 후 3차 멸균 증류수를 사용하여 최종 부피를 100 mL로 맞춤.
- DNA 추출 및 정제 시료 조성-3 (Elution Buffer): 멸균 3차 멸균 증류수를 사용
- 전기영동 조건: Mupid-exU (TaKaRa Biomedical, 대한민국), 2% Agarose gel, 0.5X TAE buffer.

③ 시제품 구성물질의 저장 형태의 호환 가능성 조사

- (가)-①의 조사한 자료와 (나)-②의 실험 자료를 바탕으로 구성 품목을 가공한 진단 키트의 시제품을 제작하였음. 구성 품목의 각개 포장 및 보관 형태의 1차 시제품 등 온비색 PCR 실험 결과를 3회 이상 반복 획득하여 실험 결과에 재현성이 있는지 확인하였음. 이후 시제품 중 등온비색 PCR 구성 품목 중 일부를 여타 시제품과 같이 혼합물로 가공 및 포장된 형태의 2차 시제품 진단키트를 제작하고 결과를 3회 이상 반복 획득하여 결과에 재현성이 있는지 확인하였음. 2차 시제품의 혼합물을 동결건조하여 최종 형태의 3차 시제품을 만들고 이를 활용하여 결과의 재현성을 확인하였음.
- 1차 시제품 품목들의 보관 형태 및 조건 (개별포장): 구성 품목을 개별로 냉동 보관 (-20℃)하고 검사 전 실험자가 섞는 형태. 실험자가 PCR primer, 10X isothermal amplification buffer*, MgSO₄, dNTP mix*, DNA polymerase를 개별로 합친 후 추출 및 정제한 *L. monocytogenes*의 DNA를 첨가하여 등온비색 PCR을 진행함.
- 2차 시제품 품목들의 보관 형태 및 조건 (혼합액): PCR primer, 10X isothermal amplification buffer*, MgSO₄, dNTP mix* 를 각각 섞어 'Master Mix' 형태로 제작 후 냉동 보관(-20℃)한 형태. 등온비색 PCR을 진행하기 전 3차 멸균 증류수와 추출한 *L. monocytogenes*의 DNA를 첨가하여 등온비색 PCR을 진행하였음.
- 3차 시제품 품목들의 보관 형태 및 조건 (동결건조): 거의 혼합물에 3차 멸균 증류수를 첨가하고 이를 각각의 strip에 소분 후 동결건조 한 키트를 제작하였음. 동결건조 이후 당해 키트에 3차 멸균 증류수를 섞어 실험 결과가 2차 시제품 결과와 비슷한지 확인하는 실험을 진행하였음.

(2) 연구 결과

(가) 등온비색 PCR 적용 진단키트 형태 결정

① 시판 중인 진단키트의 제품 형태 조사

- 시판 중인 분자진단 형태의 *L. monocytogenes* 검출 키트의 구성 품목 및 보관 조건을 확인한 결과는 아래 표 37과 같음.

표 37. 시판 중인 *L. monocytogenes* 진단키트 예시

제조사명	진단키트 구성 품목명	보관 조건	작용 원리
Eiken Chemical Co.,Ltd.	Extraction Solution, 1 M Tris-HCl (pH7.0), Reaction Mix, <i>Bst</i> DNA Polymerase, Positive Control	-20° C	LAMP
Canvax	Master Mix, lysis buffer, Positive Control, Negative Control	-20° C	qPCR
Bio-Rad	Lysis reagent, Fluorescent probes, Amplification mix, Negative Control, Positive Control, Lysis beads	2~8° C	qPCR
BioVision	Negative Control, Master Mix, Positive Control, Lysis buffer	-20° C	qPCR

- 시판 중인 분자진단 기반의 *L. monocytogenes* 검출 키트 조사를 통하여 이들의 공통적인 제품의 구성 방식은 크게 *L. monocytogenes*의 DNA를 추출할 수 있는 품목과 추출한 DNA를 사용하여 PCR을 진행할 수 있는 품목들로 나뉘는 것을 확인할 수 있었음.
- PCR을 진행할 수 있는 품목들, 예를 들어 2가 양이온 (Mg^{2+}), dNTP, primer, DNA polymerase 등은 하나의 형태로 합친 형태의 이른바 ‘Master Mix, Pre-Mix’ 등의 명칭의 혼합물 형태로 제공한다는 것을 확인할 수 있었음.
- 작용 원리 및 제조사에 상관하지 않고 *L. monocytogenes* 검출 키트에서 혼합물 (Master Mix) 형태로 제공되는 PCR 원재료들 대부분의 보관 조건이 -20°C 인 것에 근거하여 자사에서 실험의 진행을 위해 각 시약들을 보관할 때도 여타 시제품들과 마찬가지로 -20°C 에 보관이 가능한 물질들을 사용하여 시제품 개발에 착수하였음.

(나) 전처리법과 등온비색 PCR을 적용한 냉동육 및 육가공품에서의 *L. monocytogenes* 진단 최적화 가능한 키트 개발

- *L. monocytogenes* 진단을 위한 키트(DNA 추출과 등온비색 PCR)의 구성품은 조사 결과에 따라 표 38과 같이 구성하였음.

표 38. *L. monocytogenes* 진단키트의 구성 시안

분류	상세 품목
DNA 추출	Lysis buffer, Washing buffer, Elution buffer, column*
등온비색 PCR	PCR primer, 10X isothermal amplification buffer*, MgSO ₄ *, dNTP mix*, 검출 strip, DNA polymerase*

*타사 제품 사용 예정

① 타사 제품과의 호환성 평가

- 기에 명시된 시판 중인 DNA 추출 키트를 사용하여 *L. monocytogenes*의 genomic DNA를 추출하고 해당 DNA와 타사에서 시판 중인 등온증폭 키트의 구성품 중 MgSO₄, 10X isothermal amplification buffer, dNTP mix, DNA polymerase를 사용하여 등온비색 PCR을 진행하였음. 그리고 해당 결과가 의도한바 같이 음성 및 양성 결과가 뚜렷하게 차이가 있는지 확인하였음.

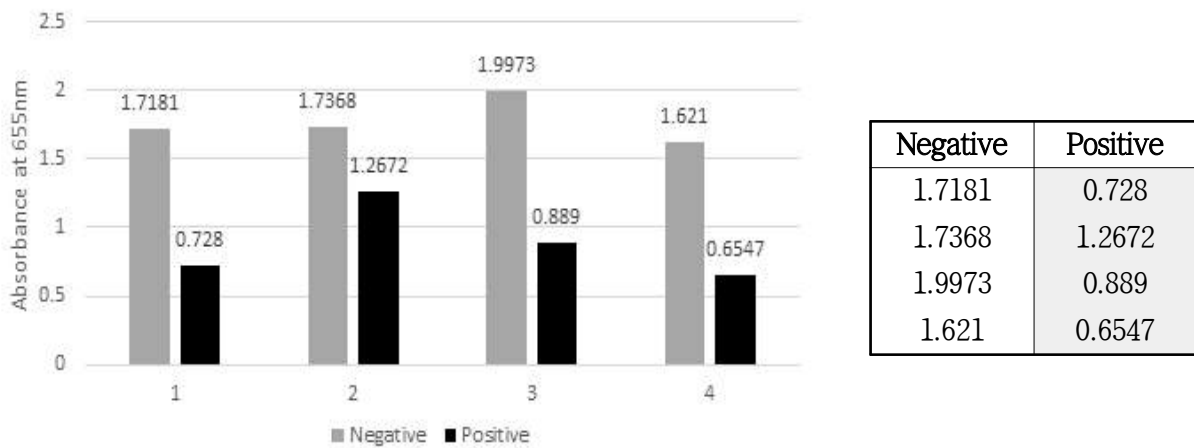


그림 38. 타사 제품과 등온비색 PCR 프로토콜의 호환성 평가 결과

- 실험 결과 음성 시료에서 높은 흡광도 결과가 나오는 반면 양성 샘플에서 낮은 흡광도가 나타내는 것을 확인할 수 있었음. 따라서 타사에서 제공하는 등온증폭 키트 시료 중 MgSO₄, 10X isothermal amplification buffer, dNTP mix, DNA polymerase를 사용하였을 때 유효한 실험 결과가 반복적으로 나오는 것을 확인할 수 있었음. 그러나 실험 결과에서 시험자마다, 실험 환경마다 실험 음성 및 양성 샘플에서 결과값의 variation이 발생하는 것을 확인할 수 있었기에 해결 방안을 마련하기로 하였음.

② 숙명여자대학교에서 제공받은 조성의 유효성 및 재현성 평가

- 기에 명시한 기준에 따라 *L. monocytogenes* 증균배지와 DNA 추출 및 정제 시료를 제조 후 DNA 추출 및 정제 시료의 유효성을 검증하였음. 시제품을 사용하여 추출한 DNA와 제작한 시료를 사용하여 얻은 후, 해당 DNA를 등온비색 PCR을 진행하고 이를 전기영동하여 같은 DNA ladder 영역에서 밴드가 등장하는지 확인하였음.

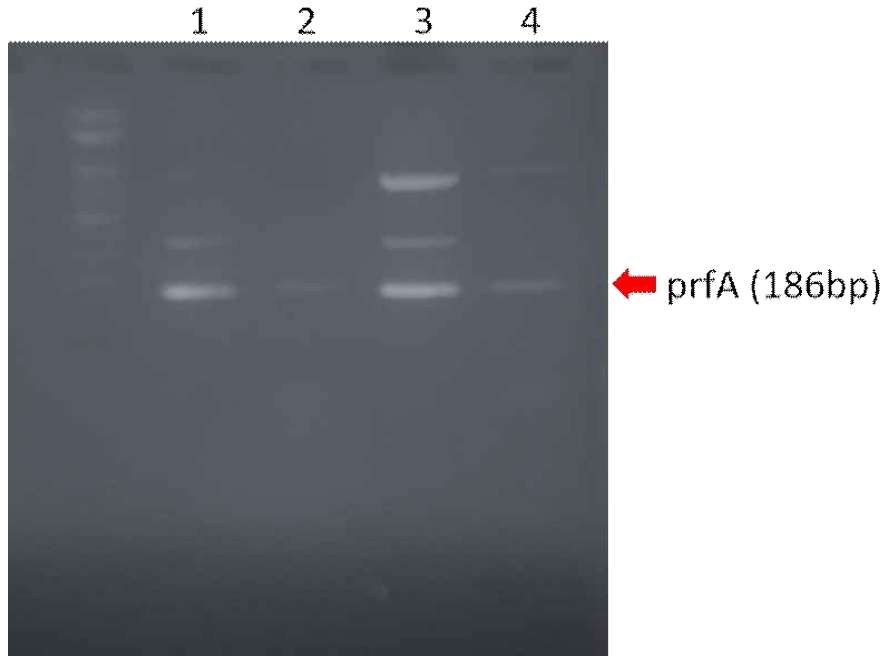


그림 39. DNA 추출 및 정제 시료의 유효성 평가 결과

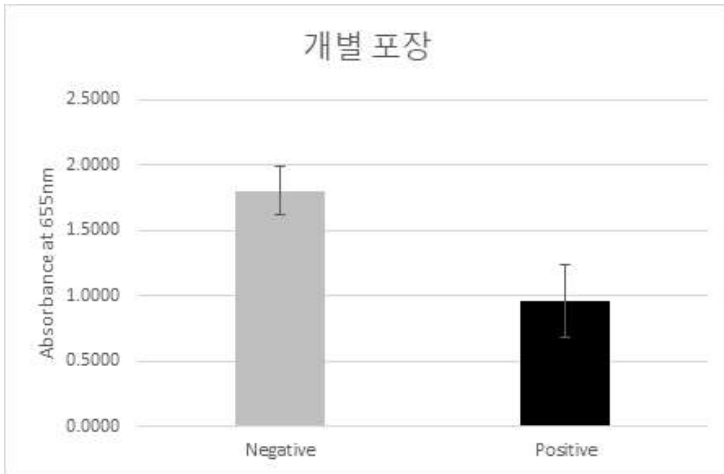
- 위의 그림 39에서 lane 1, 3은 각각 시판 중인 genomic DNA 추출 키트를 사용한 실험 결과고 lane 2, 4는 제작하여 만든 시료를 사용한 실험 결과로 각각의 시료를 사용하여 얻은 전기영동 결과에 대한 그림임. 두 결과를 비교하였을 때, 다른 시료를 사용하였음에도 동일한 위치에서 타겟 밴드(*prfA*; 186bps)가 유효하게 등장하는 것을 확인할 수 있었음. 이를 통해 숙명여자대학교에서 제공받은 과정으로 제작한 시료의 *L. monocytogenes*의 DNA 추출 및 정제의 유효성은 시판 중인 DNA 추출 및 정제 키트와 비슷하다는 것을 확인할 수 있었음.

③ 시제품 구성물질의 저장 형태의 호환 가능성 조사

㉠ 1차 시제품 저장 형태에 따른 실험 결과 - 개별포장 방식

- 시제품의 구성 품목 중 등온비색 PCR 물품에서 검출 strip을 제외한 수용액 상태의 물질들을 개별적으로 냉동 보관하여 매번 실험마다 PCR Primer, 10X isothermal amplification buffer, MgSO₄, dNTP mix, DNA polymerase를 각각 4 μL, 5 μL, 3 μL, 7 μL, 2 μL를 첨가하였고 정제 및 추출한 *L. monocytogenes*의 genomic DNA 6 μL

와 3차 멸균 증류수를 이용하여 최종 부피를 50 μL 로 하였음. 이것을 이용하여 등온 비색 PCR을 진행한 결과는 아래 그림 40과 같음.



개별포장	Negative	Positive
Means	1.8034	0.9614
STD	0.1882	0.2768

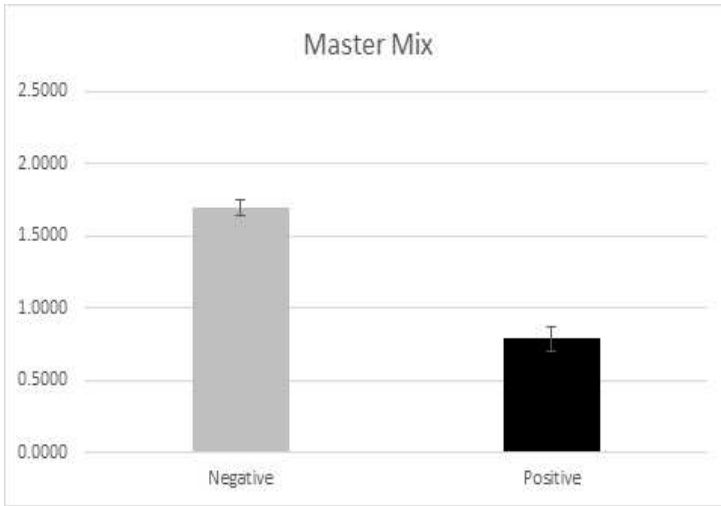
그림 40. 개별포장 및 보관 시료를 사용한 실험 결과

- 그래프 제작에 사용한 양성 및 음성 실험 결과는 서로 다른 날 얻은 등온비색 PCR 흡광도 결과 세 번에 대한 평균임. 상기의 결과를 보았을 때 각각 실험군의 오차가 10%를 넘어가는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 시험자, 실험 진행 환경마다 결과가 유효하게 달라질 수 있다는 것을 확인할 수 있었음. 해당 문제에 영향을 주는 주된 요인이 개별 포장된 등온비색 PCR용 시료들을 매 실험마다 새로 섞으면서 실험 진행마다 발생할 수 있는 실험적 오차일 것이라 가정하였고 이를 해결하기 위해 등온비색 PCR 시료 중 PCR Primer, 10X isothermal amplification buffer, MgSO_4 , dNTP mix를 섞어 다른 시제품들과 같이 ‘Master Mix’ 또는 ‘Pre-Mix’ 형태로 제작하기로 결정하였음.

㉔ 2차 시제품 저장 형태에 따른 실험 결과 - 혼합액

- 시제품의 구성 품목 중 등온비색 PCR 물품에서 검출 strip과 DNA polymerase를 제외한 수용액 상태의 PCR Primer, 10X isothermal amplification buffer, MgSO_4 , dNTP mix를 각각 4 μL , 5 μL , 3 μL , 7 μL 그리고 3차 멸균 증류수 23 μL 를 합쳐 최종 42 μL 의 혼합액 (이하 Master Mix)를 스케일업 형태로 제작하여 보관하였음. 이를 사용하여 등온비색 PCR을 진행하기 위해서 Master Mix 42 μL 와 2 μL 의 DNA polymerase, 6 μL 의 *L. monocytogenes*의 genomic DNA를 함께 섞어서 실험을 진행하였음. 이때 3회의 실험을 반복하여 ㉔의 개별포장 형태와 비슷한 유효한 결과가

나타나면서 다른 실험 사이의 오차가 감소하는지 확인하였음. 해당 시제품을 이용하여 등온비색 PCR을 진행한 결과는 아래의 그림 41과 같음.



Master Mix	Negative	Positive
Means	1.6927	0.7877
STD	0.0564	0.0819

그림 41. Master Mix 시료를 사용한 실험 결과

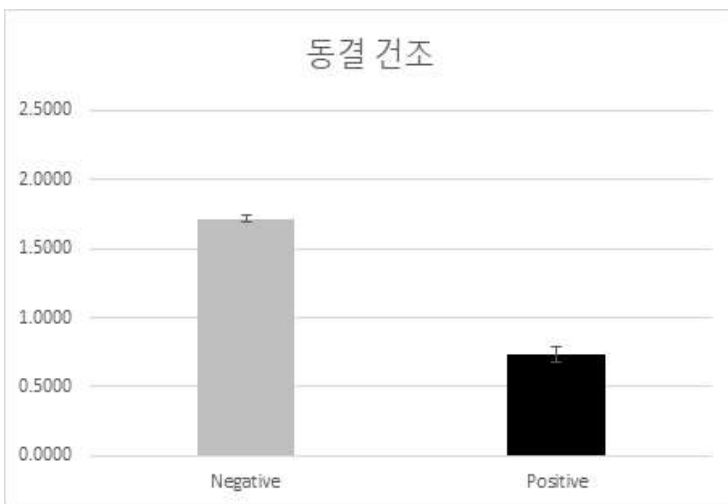
- 그래프 제작에 사용한 양성 및 음성 실험 결과는 서로 다른 날 얻은 등온비색 PCR 흡광도 결과 세 번에 대한 평균임. 이를 통해 실험 사이의 오차가 PCR 구성 품목들의 개별포장 형태보다 줄어든 것을 확인할 수 있었고, 결과에 유효하게 영향을 끼칠 수 있는 요인이 Master Mix 형태로 제작 시 통제가 되는 것을 확인할 수 있었음. 그러나 자사에서 제품화하는 당해 진단키트의 사용 목적을 고려하였을 때 현장에서 냉동 보관 형태는 유효한 형태의 보관 조건이 아니라고 판단하였고, 이를 해결하기 위해 Master Mix와 23 μ L의 3차 멸균 증류수를 섞고 동결건조하는 형태를 선택하여 보관의 편의성을 높일 수 있도록 시도하였음.

㉠ 3차 시제품 저장 형태에 따른 실험 결과 - 동결건조

- 시제품을 냉장 보관 형태로 제작하여 출하하는 것은 현재 제품 개발 목적인 ‘검사 현장으로 상시 휴대할 수 있는 진단키트’와 부합하지 않다고 판단하였음. 따라서 이에 부합하는 형태의 제품을 만들기 위하여 ㉠의 Master Mix에 3차 멸균 증류수를 첨가하여 PCR Primer, 10X isothermal amplification buffer, MgSO₄, dNTP mix 그리고 3차 멸균 증류수를 각각 4 μ L, 5 μ L, 3 μ L, 7 μ L 그리고 23 μ L 비율로 배합하여 50회 분량으로 제작하였음. 이를 개당 8세트의 멸균된 검출 strip 6개에 소분하여 48개 분량의 실험을 진행할 수 있도록 최종 포장 후 소분된 strip의 동결건조를 진행하였음.



그림 42. Master Mix를 소분하여 strip에 넣어 동결 건조한 형태



동결건조	Negative	Positive
Means	1.7161	0.7335
STD	0.0272	0.0543

그림 43. 동결건조 샘플 사용 실험과 Master Mix 사용 실험 결과 비교

- 동결건조한 제품에 42 μL 의 3차 멸균 증류수와 DNA polymerase 2 μL , 검출 타겟의 genomic DNA 6 μL 를 첨가하여 실험을 진행한 결과는 상기 그래프에 묘사되어 있음. 해당 그래프와 Master Mix를 사용하여 얻은 결과를 비교하였을 때, 소분 후 동

결건조한 Master Mix를 다시 3차 멸균 증류수에 분산하여 실험한 결과와 Master Mix 형태로 보관한 시료를 사용한 결과 사이 차이가 유의미하지 않다는 것을 확인할 수 있었음. 이를 통해 Master Mix가 동결건조 되어도 PCR 결과에는 큰 영향이 없으며, 상용화에 있어 보관 조건을 용이하게 하는데 동결건조를 사용하여도 결과에 영향을 크게 끼치지 않는다는 것을 확인할 수 있었음.

- 위의 시제품 조사 및 실험 결과들을 토대로 진단키트 시제품의 형태는 위의 사진과 같음. 시제품의 구성은 크게 DNA 추출 품목과 등온비색 PCR 품목으로 나뉨. DNA 추출 품목의 구성은 상세히는 washing buffer (1회 1 mL 사용), lysis buffer (1회 600 μ L 사용), elution buffer (1회 50 μ L 사용)을 기준으로 준비하였으며 column의 경우 외부업체에서 주문 제작하여 포장한 형태임. 또한 최종적인 등온비색 PCR 품목은 PCR primer, 10X isothermal amplification buffer, MgSO₄, dNTP mix, 검출 strip, DNA polymerase, Positive Control, Negative Control, Molecular Beacon, Hemin 으로 구성하였음. 이들 중 동결건조를 진행하여 검출 strip에 소분된 Master Mix는 PCR primer, 10X isothermal amplification buffer, MgSO₄, dNTP mix 혼합물이고. DNA polymerase, Molecular beacon, Hemin, H₂O₂, TMB는 개별 포장하여 아래의 시제품 사진과 같은 형태로 제공할 계획 중에 있음.



그림 44. Master Mix를 소분하여 동결 건조한 최종 시제품 형태

2-2. 연구개발 성과

가. 논문게재 및 학술대회 발표

(1) 논문게재

번호	논문명	주저자명	학술지명	Vol. (No.)	게재일	국명/SCI여부
1	증균배지 및 DNA 추출법 개량을 통한 <i>Listeria monocytogenes</i> 의 검출기법 개선 연구	이○연	Journal of Food Hygiene and Safety	35(4): 334-340	2020. 08.31	한국/비SCI

(2) 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	발표제목	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	Development of a colorimetric loop-mediated isothermal amplification(LAMP) assay using molecular beacon HRP-mimicking for the rapid detection of <i>Listeria</i> spp. in mushroom	2019 한국식품위생안전성학회 정기학술대회	이○은	2019.11.08	경주 화백컨벤션센터	한국
2	Improved Method with Modified Enrichment Broth and DNA Extraction Buffer for Detection of <i>Listeria monocytogenes</i>	2020 한국미생물·생명공학회 정기학술대회	서○은	2020.09.23	온라인	한국

(3) 포상 및 수상 실적

- 해당없음

나. 특허 출원

번호	특허명	출원번호	출원일
1	식품 내 식중독 세균의 검출을 위한 증균 및 핵산의 추출 방법	10-2019-0161841	2019.12.06

다. 기술실시

번호	기술명	실시기관	기술실시일
1	식품 내 식중독 세균의 검출을 위한 증균 및 핵산의 추출방법	(주)보레다바이오텍	2020.03.11

	특허권 양도계약		
--	----------	--	--

라. 사업화

번호	사업화명	제품명	업체명	비고
1	시료 전처리 및 LAMP PCR 키트 제품화	DNA추출 및 LAMP PCR 키트	(주)보레다바이오텍	시제품 완료

마. 기타 실적

(1) 홍보실적

- 해당없음

(2) 고용창출

번호	고용창출명	고용창출년도	고용창출내용
1	이○희	2020	신규인력 채용

(3) 인력양성

번호	인력양성명	인력양성년도	인력양성내용
1	김○리	2019	석사 학위 취득
2	박○은	2020	석사 학위 취득
3	성○선	2020	석사 학위 취득
4	오○민	2020	박사 학위 취득

(4) 생명자원(생명정보)

- 해당없음

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표 및 목표 달성여부

구분	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도	[주관] 농축산물 저장 중 발생하는 위해요소 모니터링 기술 개발현장 실증 연구	냉동육 및 육가공품 DNA 추출을 위한 전처리 방법 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 전처리용액의 종류 및 비율에 따른 균액 회수율을 비교하였으며, 전처리 용액은 0.1% BPW, 비율은 시료:용액 =1:19일 때 균액 회수율이 가장 높은 것으로 확인되었음. - DNA 분리 및 정제 기술 탐색 결과 0.5% NLS sodium salt+0.5 N NaOH+0.5 M EDTA를 이용하여 상온에서 30분 처리하였을 때, 순도와 수율이 가장 좋았음. - LEB에 영양성분 물질을 첨가하여 증균 효율 비교한 결과, LEB에 0.1% pyruvate와 0.1% ferric citrate를 첨가하였을 때 기존 LEB 대비 증가량이 가장 높았음.
		기존 진단키트를 이용한 전처리 방법 검증	100	- 기존 PCR 기반 진단키트를 이용하여 균액 민감도, 식육 민감도 분석을 통해 전처리 방법을 검증하였음.
	[공동] 농축산물 저장 중 발생하는 위해요소 모니터링 기술 개발현장 실증 연구	등온비색 PCR의 냉동육 및 육가공품에의 적용 가능성 평가	100	- 주관기관에서 냉동육 및 육가공품에 대한 시료 전처리법을 확립한 후 본 연구기관에서 개발한 <i>L. monocytogenes</i> 검출용 등온비색 PCR 법을 적용하였음.
		전처리법을 적용한 냉동육 및 육가공품에서의 <i>L. monocytogenes</i> 진단 등온 비색 PCR의 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> - 등온비색 PCR 수행을 위한 반응온도, 반응 시간, 시약(primer, DNA polymerase, 분자비콘)농도를 최적화 하였음. - 반응온도는 55°C로 결정되었음. - 반응 시간은 30분으로 결정되었음. - 시약 농도는 primer의 경우 10/40 μM (outer/inner primer), <i>Bst</i> DNA polymerase의 경우 8,000 unit, 분자비콘의 경우 4 μM 농도로 결정되었음.
[협동] 냉동육 및 육가공품 내 <i>L.</i>	등온비색 PCR 적용 진단키트 형태 결정	100	- 현재 시판 중의 <i>L. monocytogenes</i> 진단키트의 구성 품목 및 IFU (Instruction For Users)를 조사하여 진	

<i>monocytogenes</i> 진단키트 제품화 및 현장실증 연구			단키트의 구성을 확인함. - PCR에 사용하는 물질들이 어떤 구성으로 혼합물 형태로 시판되는지 PCR에 대한 사전 자료 조사와 시판 제품의 PCR 시약들의 구성 정보를 통해 대조함. - 조사 결과를 제품화할 진단키트의 시약 조성 및 포장 방식에 적용함.
	전처리법과 등온비색 PCR을 적용한 냉동육 및 육가공품에서의 <i>L. monocytogenes</i> 진단 최적화 가능한 키트 개발	100	- 타사 제품과 자체적으로 보유하고 있는 등온비색 PCR 품목을 함께 사용하여도 유효한 실험 결과가 나오는지 1차적으로 확인함. - 숙명여자대학교에서 제공받은 DNA 추출 및 정제 시약 제조와 증균배지의 유효성을 전기영동 및 PCR을 통해 확인함.

구분	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도	[주관] 농축산물 저장 중 발생하는 위해요소 모니터링 기술 개발현장 실증 연구	개발된 시료 전처리법을 활용한 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단 현장실증 및 평가	100	- 개발된 시료 전처리법에 대한 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단 현장실증 및 평가를 통해 문제점을 분석하고 보완함. - 문제점 분석 결과, PCR의 inhibitor로 작용하는 시료의 food matrix를 제거하는 방안을 모색함.
	[공동] 농축산물 저장 중 발생하는 위해요소 모니터링 기술 개발현장 실증 연구	개발된 등온비색 PCR을 활용한 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단 현장 실증 및 평가	100	- 1차년도에 확립했던 DNA 추출과정 전 단계에서 여과지를 사용하여 증균 배양액을 여과하거나 washing 단계를 추가한 결과, 기존 방법보다 검출률이 높아짐을 확인함. - 3차 검증 진행 결과 본 전처리 기술과 진단기술이 유효함을 확인함.
		문제점 개선을 통한 등온비색 PCR의 <i>L. monocytogenes</i> 진단법 확립	100	- 등온비색 PCR의 절차개선 (two tube assay → one tube assay) - one-tube assay로 개선한 후 등온비색 PCR 결과 <i>L. monocytogenes</i> 을 1×10^1 CFU/mL 수준까지 육안으로 검출함.
	[협동] 냉동육 및 육가공품 내 <i>L.</i>	개발된 전처리 기술과 등온비색 PCR을 기반으로 한 냉동육 및	100	- 시제품의 포장 형태를 결정하기 위해 실험을 진행한 결과, 등온비색 PCR 구성 품목의 Master Mix를 동결건조

<i>monocytogenes</i> 진단키트 제품화 및 현장실증 연구	육가공품 내 <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> 진단키트 제품화	하는 것이 제품의 성능에 큰 영향이 없이 휴대성을 높일 수 있는 것으로 확인함.
--	--	--

3-2. 관련분야 기여도

○ 미생물학적 위해요소 신속 검출 시스템 구축을 통한 식품 안전성 향상

- 축산물에서 발생할 수 있는 미생물학적 위해요소의 신속 검출 기술을 통해 축산물의 생산 및 유통단계의 신속 검출 시스템을 구축함으로써 식품 안전성을 향상 시킬 수 있음.

○ 저비용 고효율의 검출 기술 적용으로 비용 절감 효과

- 축산물 중 *L. monocytogenes*의 검출한계를 극복하기 위한 증균배지 및 DNA 추출 등의 전처리 기술 개발로 축산물을 대상으로 한 분자진단기술의 한계점 해결 방안을 제시하였음.
- 기존 분자생물학적 기술의 과정이 간소화됨과 동시에 검출 시간이 빠르고 정확한 검출한계를 보여주는 기술을 개발함으로써 신속 검출 기술의 새로운 방법을 제시할 수 있을 것으로 기대됨.
- 손쉬운 작동 및 저가의 장비로 인한 비숙련자의 현장 분석이 가능해지므로 전문 인력 육성 비용 절감 효과를 기대할 수 있음.
- 본 연구의 방법은 LAMP 산물의 확인을 위해 전기영동과 같은 별도의 장비가 필요하지 않으며 온도 구배가 없으므로 증폭 장비의 소형화가 유리하여 휴대성이 높은 시스템의 구축이 가능하므로 연구실뿐만 아니라 현장 등의 장소에 구애받지 않고 적용될 수 있는 장점이 있음.
- 해당 기술의 경우 증폭 산물의 핵산탐지 속도와 민감도 및 특이성을 향상할 수 있는 진단 방법으로, 스마트폰을 이용한 바이오센서 도구를 활용하여 흡광도를 측정한다면 짧은 시간 내에 보다 정확하게 분석 결과를 확인할 수 있는 기술이 될 수 있을 것으로 사료됨.

○ 분자진단 분야의 국내 경쟁력 확보

- 축산물 및 가공품뿐만 아니라 다른 식품의 위해 미생물에 대한 현장 진단용 등온비색 LAMP PCR 개발의 기초연구 결과로 활용이 가능할 것으로 사료됨.
- 현재 수입에 의존하고 있는 진단키트를 국내 키트로 대체를 통한 국내 분자진단 분야의 경쟁력 강화가 기대됨.
- 나아가 중소기업의 보유 기술 발굴로 인한 과학기술 발전 가능성이 있음.

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 연구성과의 활용분야 및 활용방안

- 기존 진단기법보다 빠르고 간편하게 식중독세균을 검출할 수 있는 등온 비색 PCR 진단키트의 개발을 통해 비용 절감과 동시에 시간과 장소에 구애받지 않고 비전문가도 쉽게 사용 가능하며 냉동육 및 육가공품에서 *L. monocytogenes* 오염 확인 가능하며 검출 비용 및 인력 절감
- 축산물의 생산 및 유통단계의 신속 검출 시스템 구축 및 현장형 축산물 위해요소 검출 가능
- 본 연구를 통하여 개발된 신속 정밀한 *L. monocytogenes* 진단기술을 활용하여 소비자가 안심하고 소비할 수 있는 축산물의 안전관리 가능
- 현재 축산물의 생산 및 유통단계 등 실험 시설이 제대로 갖추어지지 않거나 전원 공급이 어려운 현장에서는 등온비색 PCR을 이용한 분석이 어려운 한계점이 있으나, 대용량 보조 배터리를 이용한 휴대형 heating block을 활용한다면 전원 공급이 없는 현장에서 보다 신속하게 시료 중 *L. monocytogenes*의 검출 여부를 확인할 수 있을 것으로 판단됨

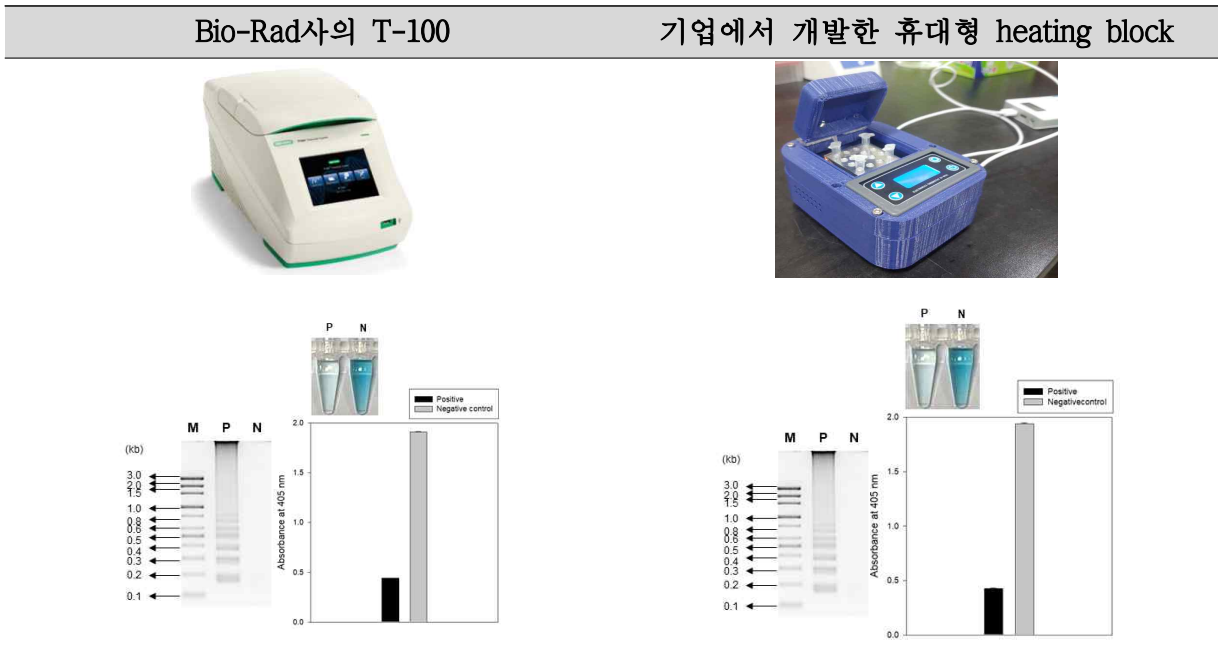


그림 45. 기존 PCR 장비와 국내 기업에서 개발한 휴대형 heating block을 이용한 비교·평가

- 특히, 위의 그림과 같이 Bio-Rad 사에서 판매되는 PCR 장비와 휴대형 heating block을 이용하여 등온비색 PCR을 실시한 결과, 두 장비를 이용한 시료가 모두 유의적인 결과값을

나타내는 것으로 확인됨.

- 등온비색 PCR법의 보다 정확한 결과 분석을 위해 개발 과정 중에는 흡광도 측정 장비를 사용하여 결과값을 수치화하였으나, 아래 그림과 같은 휴대형 비색 측정장치 및 어플리케이션을 활용한다면 현장에서 보다 간편하고 정확하게 결과 분석이 가능할 것으로 판단됨.
- TECAN사에서 판매되는 SPARK 10M 흡광도 장비와 국내 기업에서 개발된 휴대형 비색 측정기 및 어플리케이션을 활용하여 동일한 시료를 분석한 결과에서도 동일한 경향의 결과가 나타나는 것으로 확인됨.

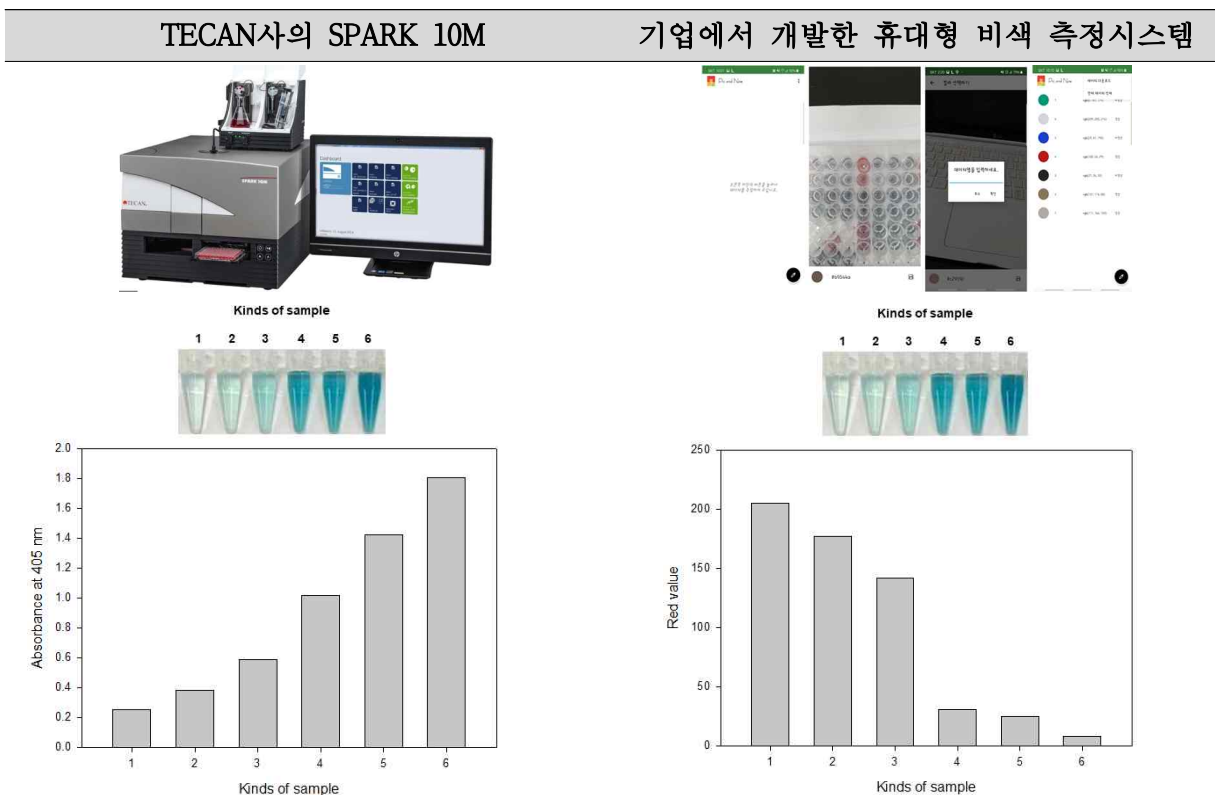


그림 46. 기존 흡광도 측정 장비와 국내 기업에서 개발한 휴대형 비색 측정시스템 이용한 측정 감도 비교·평가

4-2. 기술이전을 통한 사업화 실시 및 추가 연구의 필요성

- 본 연구과제의 수행 결과를 통해서 협동연구기관인 (주)보레다바이오텍에서 기술이전 자체 사업화를 위하여 기술실시 계약을 체결하였음.
- 현재 *L. monocytogenes*의 Culture Media, genomic DNA (gDNA) Extraction Kit 및 LAMP-PCR의 시제품 제작을 완료하였으며, 농식품연구성과후속지원사업을 통해 등온비색 PCR 상품화를 위한 키트의 최적화 및 현장 실증을 진행하여 최적화된 키트를 완성할 계획임.

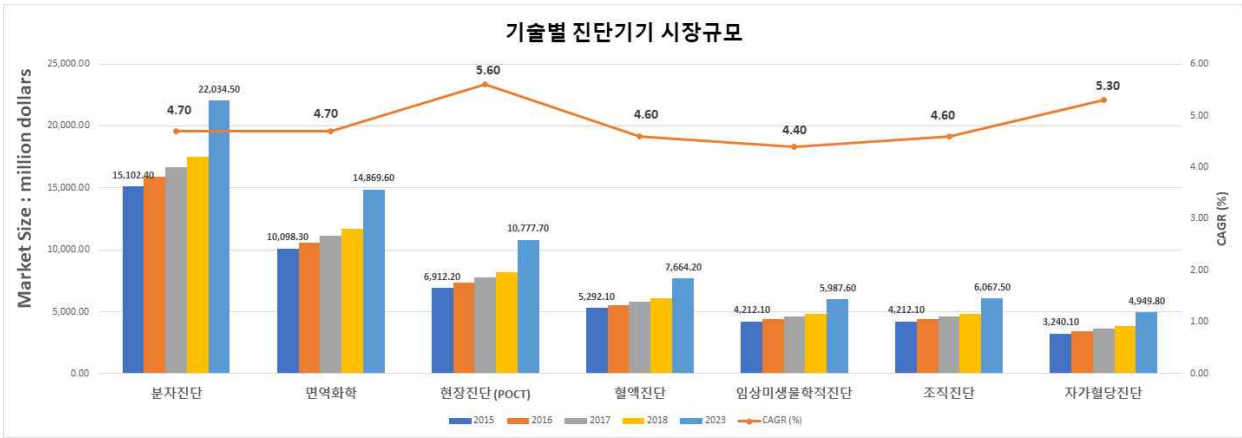


그림 47. 기술별 진단기기 시장규모
(Mordor intelligence, global *in vitro* Diagnostics Market(2018-2023))

- 현재 분자진단 시장의 경우 2012년 시장규모는 50억 달러 규모로 전체 진단 시장의 11%를 점유하고 있고 2017년 90.7억 달러로 연평균 12.6%의 성장을 보일 것으로 전망되며, 감염병 진단에 가장 많이 활용되고 있으며 분자진단 시장은 가장 빠르게 제품의 변화를 보이는 시장임.
- 구체적인 시장규모는 2017년 약 90억 달러 규모로 추산되며, 2018년 73억 5,570만 달러에서 연평균 성장률 8.7%로 증가하였음. 연평균 12.7%씩 성장하여 2023년에는 약 186억 달러 규모의 시장을 형성할 것으로 전망됨. 국내 분자진단 시장은 2017년 약 1,516억 원 규모로 추산되며, 연평균 12.7%씩 성장하여 2023년에는 3,345억 원 규모의 시장을 형성할 것으로 전망되고 있음.

글로벌 진단 시장의 용도별 시장 규모 및 전망

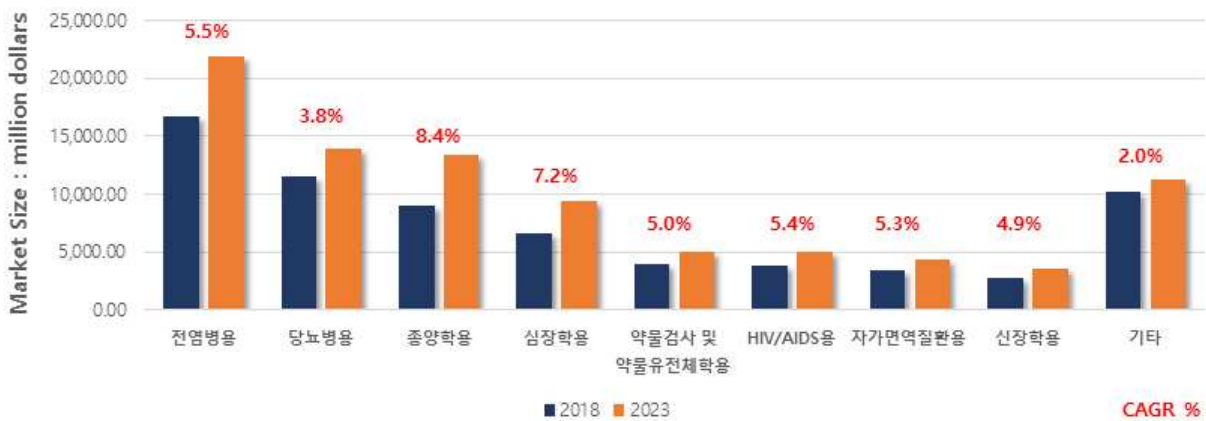


그림 48. 글로벌 진단 시장의 용도별 시장규모 및 전망
(Markets and markets, *In vitro* Diagnostics/IVD Market, 2018)

- 전 세계 체외진단(IVD) 시장은 제품&서비스에 따라 시약&키트, 기구, 서비스, 데이터 관리 소프트웨어로 분류됨. 시약&키트는 2018년 553억 3,220만 달러에서 연평균 성장률 5.8%로 증가하여, 2023년에는 732억 4,940만 달러에 이를 것으로 전망됨. 기구는 2018년 88억 9,440만 달러에서 연평균 성장률 2.2%로 증가하여, 2023년에는 99억 3,660만 달러에 이를 것으로 전망됨.

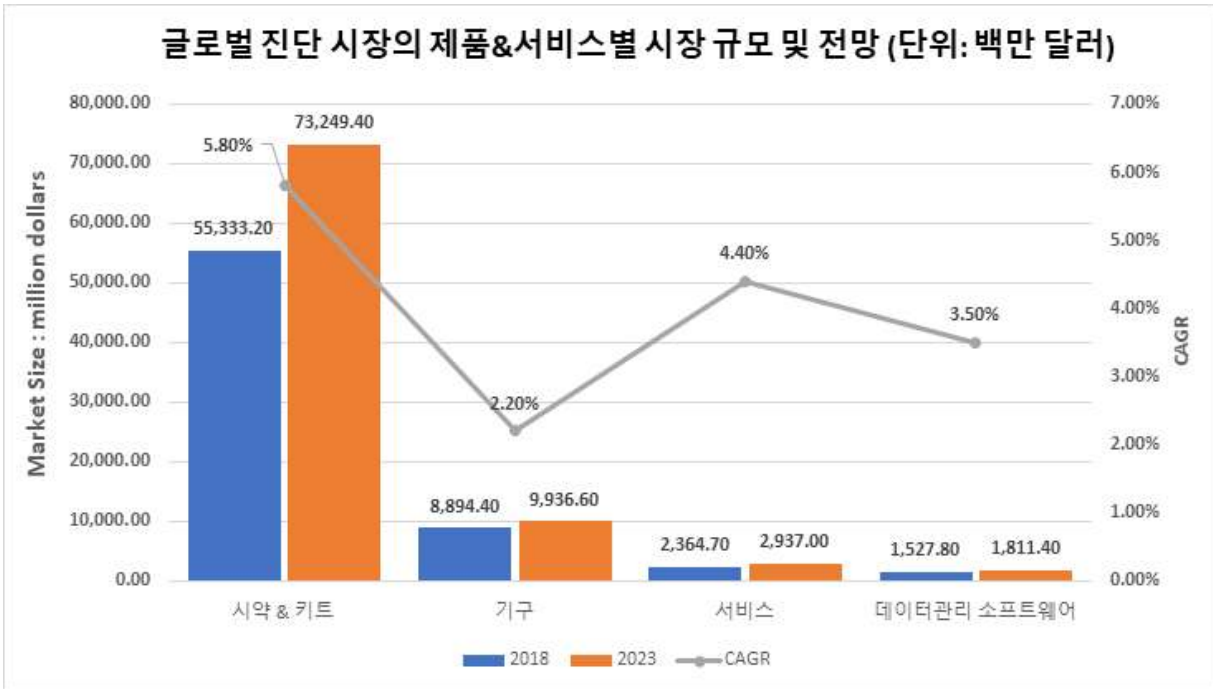


그림 49. 글로벌 진단 시장의 제품&서비스별 시장규모 및 전망
(Markets and markets, *In vitro* Diagnostics/IVD Market, 2018)

- 이러한 분자생물학적 진단키트의 수요가 큰 폭으로 증가하는 추세에 있는 환경에서 본사의 *L. monocytogenes* 진단키트의 개발은 선제적인 모니터링의 수행을 통한 선별적인 위해 요인을 차단할 수 있으며 초기대응 및 확산 방지를 빠르게 막을 수 있을 것으로 사료됨. 또한 기관에서 행하여지는 식중독으로 인한 현장에서의 탐지조사를 보다 손쉽고 결과판독이 안정적이고 용이한 시스템으로 만들 수 있는 방법의 하나가 될 수 있음.
- 게다가 *L. monocytogenes*뿐만 아니라 다양한 식중독 원인균의 적용을 통해 그 범용성을 넓은 부분으로 확대 가능하여 이러한 제품은 많은 수요를 통한 안정적인 시장 창출을 이룰 수 있을 것으로 사료됨. 이렇게 용도에 따른 적용 범위가 표적 특이적이며 전문화되면서 그 사용량 및 범위가 증가할 것으로 예상되며 본 산업적인 제품화로 인한 매출의 발생은 안정적인 제품의 마케팅 방안의 설정을 통해 구체화 될 예정임.
- 현재의 시제품 생산을 통한 실험 결과 기준에 제공되기로 했던 *L. monocytogenes*의 검출용 키트의 사용 시 많은 구성품의 사용을 통한 실험의 경우 실험에 따른 환경적 요인에 의한 결과값의 variation이 나타나는 것을 확인할 수 있었으며 이를 통한 제품의 보완을 통해

‘Master Mix’ 또는 ‘Pre-Mix’의 형태로 제작의 변경이 이루어졌으며 그 결과 variation이 적은 유효성 있는 결과의 도출이 이루어지는 것을 확인할 수 있었음. 현재는 양성과 음성 값에 있어 보다 확연한 차이를 보일 수 있도록 제품의 개선을 위한 노력을 실시하고 있음.

4-3. 시제품의 제품화를 위한 방향성과 판로 및 마케팅 전략

- 제품에 대한 유통기한은 시제품 출고 이후 안정성 시험을 통해 validation 예정이며, 특히 kit의 주요 품목 중 하나가 동결건조 상태로 제공되기에 제품의 보관 조건 중 습도에 관련한 테스트를 지속적으로 진행하여 유통기한에 반영 예정임.
- 매출 증대 및 기술력 강화를 위해 보레다바이오텍이 기존에 형성한 시장 네트워크를 통해 *L. monocytogenes* 검출에 대한 실험이 가능한 사용자들에게 자사의 시제품을 샘플로 제공하고, 이에 대한 피드백을 통해 기술의 검증 및 해당 제품이 필수적인 고객들에 대한 네트워크를 완제품 출시 전 형성할 예정임.
- 상세히는, *L. monocytogenes* 균의 검출이 중요한 업체(낙농업체, 육류 및 유제품 가공생산 업체, 전문 식품 수출입 업체 등) 및 당해 균에 대한 검사 실시 및 보고 관리하는 관공서 부서 등의 실사용자들에게 시제품의 샘플이 보급될 수 있도록 하여 완제품이 되기까지의 피드백을 제공받고, 이러한 피드백을 반영, 실질적인 판매시장에 개선된 제품을 선보일 예정임.

4-4. 후속과제 및 이를 통해 보완하려 하는 점

- LAMP 시행에 있어 가장 중요한 *Bst* DNA polymerase가 단가 형성에 가장 중요한 영향을 끼침. 현재 가장 널리 사용되는 *Bst* DNA polymerase중 하나인 NEB사의 당해 효소는 구매 lot별(100회 실험 기준) 가격이 120,750원임. *Bst* DNA polymerase를 국산화하지 않으면 96 test 기준 1 tube당 *Bst* DNA polymerase 가격만 1,258원으로, 이것에 대한 단가를 낮추는 것이 원가 절감으로의 핵심 과제임.
- 또한 현재 *L. monocytogenes*의 검출을 위한 Detection kit의 경우 Biovison, Qiagen, Thermofisher 등의 업체들이 있으나 대부분 검출원리는 PCR 또는 real-time PCR assay를 기반으로 한 Kit가 대부분임. 이에 LAMP PCR을 기반으로 한 *L. monocytogenes* Detection kit의 제품 출시와 보레다바이오텍의 대량정제 기술 등을 활용하여 최대한 높은 수율과 낮은 단가로 합성 가능한 자체 개발 *Bst* DNA polymerase를 합성하여 현재 외산 제품에 의존적인 제품들의 국산화 및 즉각적인 수익 창출을 목표로 함.

붙임. 참고문헌

- Borges, M. D. F., Siqueira, R. S. D., Bittencourt, A. M., Vanetti, M. C. D., & Gomide, L. A. M. (1999). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. *Revista de Microbiologia*, 30(4), 362-364.
- Cho, S. H., & Kim, Y. R. (2001). Antimicrobial effects of *Scutellariae radix* extract against *Listeria monocytogenes*. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 30(5), 959-963.
- Colak, H., Hampikyan, H., Ulusoy, B., & Bingol, E. B. (2007). Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish style fermented sausage (sucuk). *Food Control*, 18(1), 30-32.
- Cornelius, A. J., Hudson, J. A., & Wong, T. L. (2008). Enumeration and growth of naturally occurring *Listeria* spp. in unpackaged ham. *Food microbiology*, 25(2), 407-412.
- De Cesare, A., Mioni, R., & Manfreda, G. (2007). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in fresh and fermented Italian sausages and ribotyping of contaminating strains. *International journal of food microbiology*, 120(1-2), 124-130.
- Dominguez, C., Gomez, I., & Zumalacarregui, J. (2001). Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in smoked fish and pâté sold in Spain. *Journal of food protection*, 64(12), 2075-2077.
- Elson, R., Burgess, F., Little, C. L., Mitchell, R. T., & Local Authorities Co-ordinators of Regulatory Services and the Health Protection Agency. (2004). Microbiological examination of ready-to-eat cold sliced meats and pâté from catering and retail premises in the UK. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3), 499-509.
- European Food Safety Authority. (2013). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. *EFSA Journal*, 11(6), 3241.
- Food Standards Australia New Zealand(FSANZ). (2013). "Agents of foodborne illness. Retrieved from <http://www.foodstandards.gov.au>.
- Garrido, V., Vitas, A. I., & García-Jalón, I. (2009). Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. *Food Control*, 20(11), 986-991.
- Giovannini, A., Migliorati, G., Prencipe, V., Calderone, D., Zuccolo, C., & Cozzolino, P. (2007). Risk assessment for listeriosis in consumers of Parma and San Daniele hams. *Food*

- Go, E. K., Park, H. J., Wee, S. H., Heo, E. J., Kim, Y. J., & Moon, J. S. (2011). Prevalence of *Listeria monocytogenes* isolated from Livestock processed products in Korea. *Korean Journal of Veterinary Public Health*, 35(4), 214-219.
- Gómez, D., Iguácel, L. P., Rota, M., Carramiñana, J. J., Ariño, A., & Yangüela, J. (2015). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products and meat processing plants in Spain. *Foods*, 4(3), 271-282.
- Hong, S. H., Park, N. Y., Jo, H. J., Ro, E. Y., Ko, Y. M., Na, Y. J., ... & Moon, J. S. (2015). Risk ranking determination of combination of foodborne pathogens and livestock or livestock products. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 30(1), 1-12.
- Jo, S. H., Ha, J. H., Kim, K. S., Shim, Y. H., Kwon, K. S., Han, J. A., ... & Oh, D. H. (2007). Evaluation of selective media for isolation of foodborne bacteria. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 22(4), 388-394.
- Klein, P. G., & Juneja, V. K. (1997). Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4441-4448.
- Kim, J. H., Kim, H. W., Ham, J. S., Kim, B. M., & Oh, M. H. (2016). Analysis of the Recovery Rate of Food-borne Pathogens according to Sample Preparation Methods in Animal Origin Foods. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 31(6), 406-413.
- Lambertz, S. T., Nilsson, C., Brådenmark, A., Sylvén, S., Johansson, A., Jansson, L. M., & Lindblad, M. (2012). Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010. *International Journal of Food Microbiology*, 160(1), 24-31.
- Martin, B., Garriga, M., & Aymerich, T. (2011). Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* at small-scale Spanish factories producing traditional fermented sausages. *Journal of food protection*, 74(5), 812-815.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), e63-e63.
- Park, H. J., Go, E. K., Wee, S. H., Yoon, H. C., Heo, E. J., Kim, Y. J., ... & Moon, J. S. (2012). Analysis of foodborne pathogenic contamination of cooked hams and sausages in Korean processing facilities. *Food Science of Animal Resources*, 32(1), 103-111.
- Pérez-Rodríguez, F., Castro, R., Posada-Izquierdo, G. D., Valero, A., Carrasco, E., García-Gimeno, R. M., & Zurera, G. (2010). Evaluation of hygiene practices and

microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. *Meat Science*, 86(2), 479-485.

- Rota, C., Yanguela, J., Blanco, D., Carramiñana, J. J., & Herrera, A. (1997). Presencia de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* sp. en longanizas frescas y curadas. Utilización de distintas condiciones de tiempo y temperatura de incubación. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 44(1-10), 617-624
- Sakate, R. I., Aragon, L. C., Raghianti, F., Landgraf, M., Franco, B. D., & Destro, M. T. (2003). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in pre-sliced vacuum-packaged. *Archivos latinoamericanos de nutricion*, 53(2), 184-187.
- Thevenot, D., Delignette-Muller, M. L., Christieans, S., & Vernozy-Rozand, C. (2005). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *International journal of food microbiology*, 102(1), 85-94.
- Uyttendaele, M., Busschaert, P., Valero, A., Geeraerd, A. H., Vermeulen, A., Jacxsens, L., ... & Devlieghere, F. (2009). Prevalence and challenge tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. *International Journal of Food Microbiology*, 133(1-2), 94-104.
- Uyttendaele, M., De Troy, P., & Debevere, J. (1999). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. *International Journal of Food Microbiology*, 52(1), 75-80.
- Vitas, A. I. (2004). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 90(3), 349-356.
- Wong, T. L., Carey-Smith, G. V., Hollis, L., & Hudson, J. A. (2005). Microbiological survey of prepackaged pate and ham in New Zealand. *Letters in Applied Microbiology*, 41(2), 106-111
- Wu, S., Wu, Q., Zhang, J., Chen, M., & Hu, H. (2015). *Listeria monocytogenes* prevalence and characteristics in retail raw foods in China. *PLoS One*, 10(8), e0136682.
- Yanguela, Y., Blanco, D., Carralninana, J. J., Rota, C., Roncales, P., & Herrera, A. (1996). Microbial ecology and safety of Longaniza de Aragon, a typical pork sausage. *Microbiologie Aliments Nutrition*, 14(2), 133-146.
- Yi, C. H., Song, H. H., Kim, M. R., Kang, H. J., & Son, W. G. (2008). Exploration of Virulence Markers and Genes of *Listeria monocytogenes* Isolated from Animal Products. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 23(3), 248-256.

- 농림축산식품부(MAFRA) [웹사이트]. (2017). Retrived from <http://lib.mafra.go.kr/k>.
- 보건의료빅데이터개방시스템 [웹사이트]. (2014). Retrived from <https://opendata.hira.or.kr/home.do>.
- 식품의약품안전처(MFDS), 2018, 식중독 표준업무 지침, 90-92.
- 식품의약품안전처, 2016, 식품 중 사용원료 진위 판별을 위한 유전자 분석 방법.
- 식품의약품안전처, 2017, 식중독 안전관리 분석 및 평가 보고서.
- 한국소비자원, 2015, 혼제식품 안전실태조사 결과보고서, 4-7.
- 한국육류유통수출입협회(KMTA) [웹사이트]. (2012). Retrived from <http://www.kmta.or.kr/kr/main/main.php>.
- 한국육류유통수출입협회(KMTA), 2006, 가축 유통실태 조사 및 개선 방안, 170-171

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 농축산물 저장 중 발생하는 위해요소 모니터링 기술 개발현장 실증 연구				
	(영문) Development of technic for monitoring risk factors in agricultural and animal products during distribution				
주관연구기관	숙명여자대학교 산학협력단		주 관 연 구	(소속) 숙명여자대학교 산학협력단	
참 여 기 업	(주)보레다바이오텍		책 임 자	(성명) 윤요한	
총연구개발비 (210,000천원)	계	210,000	총 연구 기간	2018. 12. 03 ~ 2020. 09. 02 (1년 9개월)	
	정부출연 연구개발비	157,000	총 참 여 원 수	총 인원	13
	기업부담금	53,000		내부인원	13
	연구기관부담금			외부인원	
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> • 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 검출을 위한 시료 전처리법과 등온비색 PCR을 이용한 <i>L. monocytogenes</i> 진단법 개발 및 진단키트 제품화 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> • 전처리용액에 따른 균 회수율은 시료와 0.1% BPW를 1:19의 비율로 처리하였을 때 가장 높은 것으로 확인되었고, DNA 순도와 수율은 0.5% NLS sodium salt + 0.5 N NaOH + 0.5 M EDTA의 Lysis buffer를 이용하여 상온 30분간 처리하였을 때 가장 우수하였으며, 평균효율은 기존 증균배지에 0.1% Pyruvate, 0.1% Ferric citrate를 첨가하였을 때 가장 우수한 것으로 확인되었음. 위의 전처리법을 식육과 기존 진단키트에 적용하여 유효성을 검증하였음. • 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 검출을 위해 0.1% Pyruvate, 0.1% Ferric citrate를 첨가한 LEB를 이용하여 증균한 뒤, 증균배양액에서 DNA 추출 전 여과지 이용 및 washing을 진행한 결과 검출 효율이 향상되었음. • 등온비색 PCR을 위한 primer, molecular beacon을 디자인하고, 가장 높은 발색 차이를 보인 55℃, 30분을 반응조건으로 선정하였음. 시약 농도는 발색 차이와 경제적 평가를 고려하여 10/40 μM (outer/inner primer), 8000 unit(Bst DNA polymerase), 4 μM(분자비콘)로 최적 농도로 결정하였음. • 비전문가의 사용과 시료 간의 오차를 줄이기 위해 실험 단계를 간소화시키고 one-tube 내에서 증폭과 발색 확인 가능하도록 등온비색 PCR을 개선하였음. 등온비색 PCR 결과 <i>L. monocytogenes</i>을 1×10¹ CFU/mL 수준까지 비색을 육안으로 관찰하여 검출함. • 시판 제품 조사 및 실험 결과를 토대로 DNA 추출 품목(washing buffer, lysis buffer, elutino buffer, column), 등온비색 PCR 품목(동결건조 후 strip에 소분된 Master mix, DNA polymerase Molecular Beacon, Hemin, H₂O₂, TMB)으로 구성된 진단키트를 제품화하였음. <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> • 본 연구를 활용하여 비SCI 논문 1편, 학술발표 2건, 특허출원 1건, 기술실시 1건, 고용창출 1건, 인력양성 4건을 달성하였음. • 축산물의 생산 및 유통단계의 신속검출 시스템 구축을 통해 냉동육 및 육가공품에서 <i>L. monocytogenes</i> 검출 비용, 시간과 인력 절감 및 현장형 축산물 위해요소 검출 정성 분석이 가능해지며 소비자가 안심하고 소비할 수 있는 축산물의 안전관리 효과를 기대할 수 있음. • 축산물 및 가공품 뿐만 아니라 다른 식품의 위해 미생물에 대한 현장진단용 등온비색 PCR 개발의 기초연구결과로 활용이 가능하며, 현재 수입에 의존하고 있는 진단키트 시장을 국내 키트로 대체할 수 있을 것으로 예상됨. 					

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	118104-02		
사업구분	농축산물안전유통소비기술개발사업				
연구분야	축산물 위생·안전		과제구분	단위	
사업명	농축산물안전유통소비기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	농축산물 저장 중 발생하는 위해요소 모니터링 기술 개발현장 실증 연구		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	숙명여자대학교 산학협력단		연구책임자	윤요한	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2018.12.03.~ 2019.09.02.	90,000	30,000	120,000
	2차연도	2019.09.03.~ 2020.09.02.	67,000	23,000	90,000
	3차연도				
	4차연도				
	5차연도				
	계		157,000	53,000	210,000
참여기업	(주)보레다바이오텍				
상대국		상대국연구기관			

2. 평가일 : 2020. 10. 17

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
숙명여자대학교 산학협력단	교수	윤요한

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약 

1. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 아주우수

본 연구개발결과, 축산물 중 *L. monocytogenes*의 검출한계를 극복하기 위한 증균배지 및 DNA 추출 등의 전처리기술 개발을 통해 축산물을 대상으로 한 분자진단기술의 한계점을 해결하였음. 또한 기존 분자생물학적 기술 과정보다 간소화된 신속진단기술 개발을 통해 신속검출 기술의 새로운 방법을 제시하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 아주우수

축산물에서 발생할 수 있는 미생물학적 위해요소의 신속검출 기술개발을 통해 축산물의 생산 및 유통 단계에서의 신속검출 시스템을 구축함으로써 식품의 안전성 향상 및 유통 및 수출입 과정에서 일어날 수 있는 경제적 손실을 완화할 수 있을 것으로 기대됨. 또한, 손쉬운 작동 및 저가의 장비를 이용하여 비숙련자도 현장 분석이 가능해지므로 전문 인력 육성 비용 절감 효과를 기대할 수 있음.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 아주우수

식육 및 식육가공품에서 *Listeria monocytogenes*를 신속정확하게 검출할 수 있음. 또한 다른 식품의 위해미생물에 대한 현장진단용 등온비색 PCR 개발의 기초연구결과로 활용이 가능함.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 아주우수

본 연구의 연구진은 전처리법·정밀진단 기술 전문가 및 진단제품 개발 기업으로 구성되어 관련 전공지식과 인프라를 토대로 냉동·냉장 저장되는 식육 및 식육가공품 중 *L. monocytogenes*의 신속한 검출을 위한 등온비색 PCR법의 개발과 검출속도, 민감도 개선을 위한 전처리법의 개발 및 현장 실증과 개발 기술의 제품화의 목표를 달성하기 위해 21개월간 연구개발을 성실하고 면밀하게 수행하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 아주우수

본 연구개발의 계획된 성과(특허출원 1건, 기술실시 1건, 제품화 1건, 비SCI 논문 1건, 학술발표 2건, 인력양성 2건)는 모두 달성하였으며, 고용창출 및 인력양성 성과의 경우 초과달성하였음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 검출을 위한 시료 전처리법 개발	25	100	- 전처리용액의 종류 및 비율에 따른 균액 회수율을 비교하였으며, DNA 분리 및 정제 기술 탐색, 증균배지 개량을 통해 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 검출을 위한 시료 전처리법을 개발하여 세부 연구 목표를 100% 달성하였음.
등온비색 PCR을 이용한 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단법 개발	25	100	- 등온비색 PCR 수행을 위한 반응온도, 반응시간, 시약(primer, DNA polymerase, 분자비콘)농도를 최적화하였음. - 주관연구팀에서 냉동육 및 육가공품에 대한 시료 전처리법을 확립한 후 본 연구기관에서 개발한 <i>L. monocytogenes</i> 검출용 등온비색 PCR법을 적용하여 세부 연구목표를 100% 달성하였음.
냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 검출을 위한 시료 전처리기술의 현장실증	15	100	- 문제점 분석 결과, PCR의 inhibitor로 작용하는 시료의 food matrix를 제거하는 방안을 모색함. - 1차년도에 확립했던 DNA 추출과정 전단계에서 여과지를 사용하여 증균배양액을 여과하거나 washing 단계를 추가한 결과, 기존 방법보다 검출률이 높아짐을 확인함. - 현장에서 제3자가 검증을 진행한 결과 본 전처리기술이 유효함을 확인하여 세부 연구목표를 100% 달성하였음.
등온비색 PCR을 이용한 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단기술 현장실증	15	100	- 등온비색 PCR의 절차 개선 (two tube assay → one tube assay) 후 등온비색 PCR 결과 <i>L. monocytogenes</i> 을 1×10^1 CFU/mL 수준까지 육안으로 비색을 확인하여 검출함. - 현장에서 제3자가 검증을 진행한 결과 본 진단기술이 유효함을 확인하여 세부 연구목표를 100% 달성하였음.
냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단키트 제품화, 사업화와 이를 통한 이익창출 및 신규인력 채용	20	100	- 참여기업은 주관연구팀에서 제공받은 전처리기술과 진단기술의 유효성을 확인하고 진단키트를 제품화하였으며, 진단키트의 사용편의성을 향상시키기 위해 등온비색 PCR 구성 품목의 Master Mix를 동결건조하여 제품의 성능에 영향을 주지 않고 휴대성을 높일 수 있게 하였음.
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구개발의 최종목표인 ‘냉동·냉장 저장되는 식육 및 식육가공품 중 *L. monocytogenes*의 신속한 검출을 위한 등온비색 PCR법의 개발과 검출속도, 민감도 개선을 위한 전처리법의 개발 및 현장 실증’ 달성을 위해 21개월간의 연구기간 동안 충실하고 성실하게 수행하였음. 본 연구를 통해 개발된 축산물 중 *L. monocytogenes*의 신속진단기술은 축산물에서 발생할 수 있는 미생물학적 위해요소의 신속검출 기술개발을 통해 축산물의 생산 및 유통단계의 신속검출 시스템을 구축함으로써 식품의 안전성 향상과 유통과정에서 발생할 수 있는 경제적 손실을 감소시킬 수 있을 것으로 기대됨. 또한, 저가의 장비 및 손쉬운 작동으로 비숙련자의 현장 분석이 가능해지므로 현장 안전관리의 효율이 증대 될 것임.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구를 통해 도출된 결과는 현장검증을 통해 우수한 성능이 검증되었고 참여기업에게 기술이전이 완료되었음. 참여기업은 이를 바탕으로 제품화를 완료하였음.

본 연구개발성과 중 학술발표 1건의 경우, 전세계적인 COVID-19 사태로 인해 8월 개최로 예정된 국내외 학술대회가 연기되어 연구기간 외(9월 23일 발표)에 달성하게 되었음.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

○ 연구결과의 활용방안

본 연구결과를 통해 확보한 개발된 미생물 전처리(중균 및 핵산분리)기술 및 유전자 증폭을 위한 등온 비색 PCR 기술활용 및 응용을 위해 후속연구(농식품연구성과후속지원사업)가 도출되었음.

등온비색 PCR에 사용되는 주원료인 DNA Polymerase의 경우 전량 수입에 의존하여 원가상승의 원인이 되었음. *L. monocytogenes* 등온비색 PCR의 제품화에 주원료의 안정적 공급과 원가 절감의 필요성으로 인하여 재조합 단백질 제조 기술을 이용하여 등온비색 PCR에 최적화된 DNA Polymerase 개발을 통한 주원료의 자사화가 필수적임. 따라서 주원료인 DNA polymerase(bst polymerase) 자체 생산 기술개발을 통해 가격경쟁력을 확보할 계획에 있음. 본 연구 및 후속연구를 통해 향후 현재 수입에 의존하고 있는 진단키트 시장을 국내 키트로 대체할 수 있으며, 나아가 중소기업의 보유 기술 발굴 및 수익창출로 인한 관련 산업의 발전을 이룰 수 있을 것으로 사료됨.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	농축수산물안전 (LB1602)	
연구과제명	농축산물 저장 중 발생하는 위해요소 모니터링 기술 개발현장 실증 연구			
주관연구기관	숙명여자대학교 산학협력단		주관연구책임자	윤요한
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	157,000,000	53,000,000		210,000,000
연구개발기간	2018. 12. 03 - 2020. 09. 02 (21 개월)			
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 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 검출을 위한 시료 전처리법 개발	- 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 검출을 위한 시료 전처리법 개발 완료 - 해당 연구결과로 도출된 내용을 바탕으로 ‘식품 내 식중독 세균의 검출을 위한 증균 및 핵산의 추출 방법’ 특허 출원 완료
② 등온비색 PCR을 이용한 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단법 개발	- 등온비색 PCR을 이용한 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단법 개발 완료
③ 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단키트 제품화	- 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단키트 제품화 완료

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과			교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활
	특 허 출	특 허 등	품 종 등	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창	투 자 유		논문		학 술 발			정 책 활	홍 보 전	
												SC I	비 SC						

	원	록	록					출	치			I	균	표		용	시	용
단위	건	건	건	건	백만 원	건	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	명	건	건	
가중치	30			30		20			-					10	10			
최종목표	1			1		1			1				1	2	2			
연구기간내 달성실적	1			1		1							1	2	4			
달성율(%)	100			100		100			0				100	100	200			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	식품 내 식중독 세균의 검출을 위한 증균 및 핵산의 추출 방법
②	등온비색 PCR을 이용한 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복	외국기술 제	외국기술 소화흡수	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해	정책 자료	기타
①의 기술					V	V	V	V		
②의 기술					V	V	V	V		

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과 활용계획 및 기대효과
①의 기술	본 연구개발결과, 축산물 중 <i>L. monocytogenes</i> 의 검출한계를 극복하기 위한 증균 배지 및 DNA 추출 등의 전처리기술 개발을 통해 축산물을 대상으로 한 분자진단기술의 한계점을 해결하였음. 또한, 간소화된 핵산추출방법 개발을 통해 신속검출 기술의 새로운 방법을 제시하였음
②의 기술	기존 분자진단기술의 과정이 간소화됨과 동시에 검출시간이 빠르고 특이도와 민감도가 높은 기술이 개발됨으로써, 신속 검출 기술의 새로운 방법을 제시할 수 있을 것으로 예상됨

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명					
가중치	30			30		20		-					10	10					
최종목표	1	1		1		1	300		1		1	1		2	2				
연구기간내 달성실적	1			1		1						1		2	2				
연구종료후 성과창출 계획		1					300		1		1								

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	식품 내 식중독 세균의 검출을 위한 증균 및 핵산의 추출 방법		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	10,000천원
이전방식 ²⁾	<input checked="" type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1개월	실용화예상시기 ³⁾	2021.05
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	기술지도		

- 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 농축산물안전유통소비기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농축산물안전유통소비기술 개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.