117064-03

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

고부가가치식품기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호
11-1543000-003055-01

식중독 균 바이오필름 생성 인자의 분자생물학적 규명을 통한 현장 적용 가능한 제어 시스템 개발 최종보고서

2020.03.26.

주관연구기관 / (주)세니젠

협동연구기관 1/ 서울대학교

협동연구기관 2/ 서울대학교

농 림 축 산 식 품 부

농림식품기술기획평가원

식중독 균 바이오필름 생성인자의 분자생물학적 규명을 통한 현장 적용 가능한 제어시스템 개발 최종보고서

2020

농 림 축 산 식 품 부

농림식품기술기획평가원

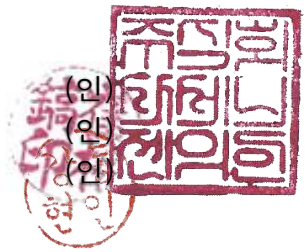
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

‘식중독 균 바이오필름 생성인자의 분자생물학적 규명을 통한 현장 적용 가능한 제어시스템 개발’(연구개발 기간 : 2017.06.15. ~ 2019.12.31.) 과제의 최종보고서 9부를 제출합니다.

2020.03.26.

주관연구기관명 : ㈜세니젠 박정웅 (인)
협동연구기관명 : 서울대학교 최상호 (인)
서울대학교 강동현 (인)



주관연구기관책임자: 박 정 웅
협동연구기관책임자: 최 상 호
강 동 현

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>117064-03</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td>3차년도</td><td>단 계 구 분</td><td>3단계/
총 3단계</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>단 위 사 업</td><td colspan="4">농식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td>사 업 명</td><td colspan="4">고부가가치식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4">식중독 균 바이오필름 생성인자의 분자생물학적
규명을 통한 현장 적용 가능한 제어시스템 개발</td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">식중독 균 바이오필름 생성인자의 분자생물학적
규명을 통한 현장 적용 가능한 제어시스템 개발</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">박 정 웅</td><td>해당단계
참여연구원 수</td><td>총: 42명
내부: 10명
외부: 32명</td><td>해당단계
연구개발비</td><td>정부:385,000천원
민간:128,340천원
계:513,340천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참여연구원 수</td><td>총: 119명
내부: 32명
외부: 87명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부:990,000천원
민간:330,020천원
계:1,320,020천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="3">㈜세니젠</td><td colspan="2">참여기업명
㈜세니젠</td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="3">상대국명:</td><td colspan="2">상대국 연구기관명:</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="3">연구기관명:</td><td colspan="2">연구책임자:</td></tr>
</table>

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

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

○ 바이오필름 생성인자의 발현 조절특성을 규명하여 식중독 균 바이오필름 생성단계에서 억제하는 제어기반을 구축함. ○ 박테리오파지 유래의 유용 엔돌라이신을 선별 및 초고온 과열 증기 장치의 바이오필름 제어 최적조건 확립함. ○ 엔돌라이신 및 초고온 과열 증기 장치의 병합처리를 통하여 식중독 균 바이오 필름 제어 효과를 극대화 함. ○ 식품제조 및 가공업체 작업환경 내 바이오필름 현황 모니터링 및 최적조건 에서의 현장 적용 평가를 통해 바이오필름 제어 효과를 검증함. ○ 특허출원 2 건, 특허 등록 1 건, SCI국제 학술지 논문 19 편, 국제 학술대회 발표 9 건, 국내 학술대회 발표 20 건, 전문인력 양성 15 명 건의 연구개발 성과를 달성함.	보고서 면수 161

〈 국 문 요 약 문 〉

연구의 목적 및 내용	○ 식중독 균 바이오필름 생성인자의 동정 및 분자생물학적 특성 규명을 통한 제어기반 구축 및 생물학적·물리적 제어 기술 연구를 통해 현재 사용되고 있는 식중독 균 바이오필름 제어 기술의 단점을 보완하고 식품제조 및 가공업체에서 폭넓게 활용 가능한 첨단 제어 시스템을 개발하고자 함.				
연구개발성과	○ 식품 생산 공정 별 바이오필름 제어기준 마련 ○ RNA-seq을 통한 식중독 균 바이오필름 생성인자 5 종 이상 선정 ○ 바이오필름 생성인자가 결여된 isogenic knock-out mutant 2 종 이상 개발 및 특성 분석 ○ 바이오필름 생성인자 2 종 이상 순수분리 및 발현 조절특성 규명 ○ 바이오필름 생성 저해 제어조건 확립 및 제어기반 구축 ○ 다양한 식중독 균 타겟 박테리오파지 10 건 이상 분리 ○ 박테리오파지 3 건 이상 sequencing 분석 및 3 종 이상의 새로운 엔돌라이신 확보 ○ 현장형 초고온 과열 증기 바이오필름 제어 장비 시작품 개발 ○ 3 종 이상의 식품접촉표면에서 99.99 % 식중독 균 바이오필름 제거 효과 확인 ○ 관련 연구 논문 (SCI 급) 19 편 게재 ○ 특허 출원 2 건, 등록 1 건 ○ 학술 발표 29 건 ○ 인력양성 15 명 ○ 산업체로의 기술이전 1 건				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	○ 바이오필름 생성인자의 발현 조절특성을 규명하여 식중독 균 바이오필름을 생성단계에서 억제하는 제어기술 개발에 활용 ○ 바이오필름 생성인자 제어기술을 통해 식중독 균 바이오필름에 의한 식품접촉 표면 오염을 사전에 차단함으로써 식품안전성을 확보 ○ 다양한 종류의 박테리오파지 엔돌라이신 확보 기반 식중독 균 제어법 개발 및 실용화를 통해 농수축산 식품 및 의학 분야에서 항생제 대체제로의 활용 ○ 소량으로 강력한 균 사멸 능을 나타내는 박테리오파지 및 엔돌라이신과 같은 저비용, 고효율 생물적 방제 제품 개발의 원천 기술 확보를 통한 부가가치 창출 ○ 현장형 초고온 과열 증기 발생 장비 개발을 통한 식품제조 및 가공업체 내 식품접촉표면에 형성된 식중독 균 바이오필름 제어에 활용 ○ 실제 식품 현장에서 활용 가능한 식중독 균 바이오필름 제어 기술의 개발을 통한 식중독 사고의 예방 및 경제적 손실 절감, 관련 식품에 대한 소비자의 신뢰 증진				
국문핵심어 (5개 이내)	식중독 균	바이오필름	생성인자규명	엔돌라이신	초고온 과열수증기

〈 목 차 〉

제1장 연구개발의 개요 ····· 6
제1절 연구개발 목적 ····· 6
제2절 연구개발의 필요성 ····· 7
제3절 연구개발 범위 ····· 15

제2장 연구수행 내용 및 결과 ····· 21
제1절 연구개발 추진전략 ····· 21
제2절 1차년도 연구개발 내용 및 성과 ····· 25
제3절 2차년도 연구개발 내용 및 성과 ····· 61
제4절 3차년도 연구개발 내용 및 성과 ····· 95
제5절 초고온 과열 증기 장치 연구개발 내용 및 성과 ····· 136
제6절 연구개발성과 ····· 144

제3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ····· 151
제1절 목표 및 달성여부 ····· 151

제4장 연구결과의 활용 계획 및 기대효과 ····· 153
제1절 연구개발 결과의 활용방안 ····· 153
제2절 기대성과 및 파급효과 ····· 154

제5장 사업화계획 ····· 155
제1절 생산 및 매출 계획 ····· 155
제2절 사업화 전략 ····· 155
제3절 사업화를 위한 비즈니스 모델 ····· 156
제4절 미래 고부가가치 시장 활용 방안 ····· 157

제6장 참고문헌 ····· 159

제1장 연구개발의 개요

제1절 연구개발 목적

1. 연구개발목표

○ 본 연구에서는 식중독 균 바이오필름 생성인자의 동정 및 분자생물학적 특성 규명을 통한 제어기반을 구축하고 생물학적·물리적 제어기술 개발을 통해 현재 사용되고 있는 식중독 균 바이오필름 제어 기술의 단점을 보완하고 식품제조 및 가공업체에서 폭넓게 활용 가능한 첨단 제어 시스템을 개발하고자 함.

2. 주요연구 내용

○ 식품제조 및 가공업체 작업환경 내 식중독 균 바이오필름 생성 현황 모니터링
- 식품제조 및 가공업체 내 생산 공정별 미생물 오염도, 바이오필름 생성 정도 비교
- 조사 내용 분석을 통한 주요 control point 및 제어 기준 설정

○ 식중독 균 바이오필름 생성인자의 동정, 분자생물학적 특성규명을 통한 제어기반 구축
- RNA-seq과 bioinformatics를 기반으로 한 genome-wide level에서의 바이오필름 생성인자들의 포괄적 동정
- 바이오필름 생성인자들의 결여 isogenic mutant의 개발 및 기능특성 규명
- 바이오필름 생성인자들의 발현 조절특성 규명 및 바이오필름 제어조건 확립

○ 식중독 균 바이오필름의 생물학적 제어 기술 개발
- 식중독균을 효과적으로 제어하는 박테리오파지 선정 후 유전체 분석 및 생화학적 특성 분석
- 박테리오파지 유래의 유용 엔돌라이신 선별 및 순수 분리 후 바이오필름 제어 가능성 연구
- 다양한 식품접촉 표면의 식중독균 바이오필름 제어 효과 확인 및 현장 적용평가

○ 식중독 균 바이오필름의 물리적 제어 기술 개발
- 초고온 과열 증기 가열 기술을 활용한 식중독 균 바이오필름 제어 효과 검증 및 식품접촉 표면 특성에 따른 제어 효과 규명
- Kinetics modeling을 활용한 바이오필름 제어 효과의 정량적 평가
- 식중독 균 바이오필름 제어효과 극대화를 위한 생물학적·물리적 제어기술 병행처리 연구
- 식품제조/가공 기기 및 기구 내 식중독 균 바이오필름 제어를 위한 현장형 초고온 과열 증기 발생 장비 시작품 제작, 현장적용평가 및 매뉴얼 제작

제2절 연구개발의 필요성

1. 식중독 사고의 증가

○ 농식품 또는 원료식품의 세계 교역량은 2,700 억 달러에 이르며, 식품산업이 한 국가의 경제 규모에서 차지하는 비중은 선진국의 경우 GNP의 20 %를 차지함 (USDA, 2006). 국내의 경우에도 식품산업의 규모가 커지고 있으며, 식품산업에서 창출되는 부가가치는 국내총생산 (GDP)의 3.8 % 수준으로, 정체되고 있는 농업과는 달리 국가경제의 주요 산업 부문이 되고 있음.

○ 하지만 이러한 식품산업의 발전과 더불어 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 매년 다수의 식중독 사고가 발생되고 있음. 우리나라의 경우, 2007년 510 건의 식중독 발생 이후 2008년도부터 감소된 추세를 보이고 있으나 연간 200 건 이상의 식중독 사고가 꾸준히 발생하고 있으며, 2014년 이후 해마다 300 건 이상의 식중독 사고가 발생하여 다시 증가 추세를 보이고 있음. 이러한 식중독 사고는 인간의 건강을 해칠 뿐 아니라 관련 의료비로 인해 막대한 경제적 손실을 야기하고 있음.

표 1. 연도별 식중독 발생현황 (식품의약품안전처-식중독 통계시스템)

구분	'08	'09	'10	'11	'12	'13	'14	'15	'16	계
발생 건수 (건)	354	228	271	249	266	235	349	330	400	2,682
발생 환자수 (명)	7,487	5,999	7,218	7,105	6,058	4,958	7,466	5,981	7,192	59,464

○ 특별히 학교 및 기업 등 단체를 대상으로 하는 급식 시설이 증가함에 따라 집단 식중독 발생의 위험성 역시 증가하였음. 일례로 2012년 한 업체에서 생산한 김치에 의해 인천지역 7 개 학교에서 1000 여명의 학생 및 교사가 집단 식중독 증상을 나타냈으며 2014년 또 다른 업체에서 납품한 김치로 인해 인천지역 10 개 학교에서 1000 여명의 학생과 교사가 식중독에 걸리는 사고가 있었음. 이와 같이 단체급식의 증가에 따라 대형 식중독 사고가 우려되기 때문에 식재료 선택부터 유통단계에 이르는 전 과정에 걸친 품질관리의 중요성이 대두되고 있음 (이현성 외, 2015).

○ 병원성 미생물 (식중독 균)은 주요한 식중독의 원인물질임. 실제로 2012년부터 2016년까지 발생한 식중독의 원인물질을 분석한 결과 원인 불명을 제외하면 대부분 병원성 미생물에 의한 것임을 알 수 있음. 따라서 병원성 미생물을 제어하는 것이 식중독을 예방하기 위해 반드시 필요하다고 할 수 있음.

표 2. 원인물질별 '12~'16년도 식중독 발생현황 (식품의약품안전처-식중독 통계시스템)

원인 물질	바실러스 세레우스	병원성 대장균	살모 넬라	장염 비브리오	캠필로 박터 제주니	클로스트 리디움 퍼프리젠스	황색포도 상구균	원인불명	계
발생 건수 (건)	34	198	80	50	69	97	37	693	1,258
발생 환자수 (명)	320	9,616	2,809	589	2,996	3,345	488	4765	24,928

2. 식중독 균 바이오필름의 위험성

○ 바이오필름은 미생물이 영양상태가 낮은 환경에서 살아남기 위해 비가역적으로 표면에 부착하여 존재하는 고착 상태의 미생물 커뮤니티로 최근 병원성 미생물이 다른 미생물들과 함께 식품 또는 식품공정표면에 붙어 군집을 형성함으로써 오랜 기간 살아남을 수 있음이 밝혀졌음. 이러한 바이오필름은 항생제나 항균제뿐만 아니라 pH, 영양성분 및 산소와 같은 환경 조건의 변화에 대한 더 큰 저항성을 나타내며 세척 또는 살균과정을 거쳐도 제거되지 않고 생존할 가능성이 높음. 살아남은 병원성 미생물은 식품, 기기 및 조리 도구 등에 부착하여 교차오염을 통해 식재료 및 조리된 식품에 잔존하게 되어 식중독을 유발할 수 있음. 또한 식중독 균에 의한 교차오염뿐만 아니라 부패균에 의한 오염으로 식품의 품질 및 유통기한에 심각한 영향을 줄 수 있음 (이현성 외, 2015).

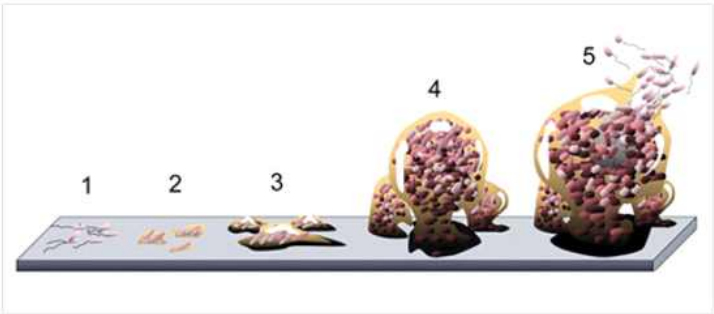


그림 1. 바이오필름 형성 5 단계. (1, 초기부착단계; 2, 비가역적 부착단계; 3, 미세군락 형성단계; 4, 바이오필름 성숙단계; 5, 바이오필름으로부터 세포의 분리 및 분산) (Monroe, 2007)

그림 2. 바이오필름 형성 모습

○ 실제 경기지역 375 개 학교를 대상으로 한 조사 결과 단체급식소 내 교차오염관리가 가장 취약한 것으로 드러났음 (2014년 학교급식 식중독 예방진단 컨설팅 보고서). 따라서 식품 내에 존재하는 식중독 균을 제어하기 위한 노력 외에 식품공정표면 내 형성된 식중독균 바이오필름 제어를 통해 교차오염의 위험성을 줄일 수 있는 방안 마련이 필요함.

○ 국외의 경우 식중독 균 바이오필름에 의한 식중독 발병 사례가 많이 보고되고 있음. 2011년에는 장관 출혈성 대장균 O104:H4로 인해 독일 3,800 여명 포함 유럽 전역에 4천여 명의 발병자와 50 여명의 사망자가 발생하였으며, 이 사고는 22 % 이상의 용혈성 요독 증후군(Haemolyticuraemic syndrome, HUS) 환자를 발생시킴 (Richter et al., 2014). 미국의 2008년 살모넬라 아고나 (Salmonella Agona) 관련 식중독 사고의 경우 한 시리얼 생산 공장에서 비롯되었으며, 이 공장은 1998년 사고 후 해당 구역을 살균 소독 처리하고 지역을 봉쇄하기 위해 에폭시 마감재를 이용하여 벽을 막았으나 살모넬라균이 살아남아 공장 환경을 오염시키면서 식품에 전이되어 감염을 일으킨 것으로 보고됨 (Russo et al., 2013). 또한 2000년 델리카트 칠면조 고기를 섭취한 사람들 중 30 여명이 리스테리아균에 감염되었고 4 명이 사망한 사례가 있으며, 이는 1988년 발생한 칠면조 소시지 관련 식중독 균과 동일한 것으로 확인되어 무려 12년이 지난 후에도 살아남은 리스테리아균의 위험성을 나타냄 (Orsi et al., 2008).

3. 현행 바이오필름 제거/제어 방법 및 한계점

○ 바이오필름 내 병원성 미생물을 효과적으로 제거하기 위해서는 바이오필름을 형성하는 주요 물질인 EPS를 제거하는 것이 일차적으로 이루어져야하며 이러한 EPS는 살균제만으로는 제거하기가 어렵기 때문에 세척 단계가 반드시 필요함. 세척 단계는 바이오필름의 EPS등 오염물질을 제거함으로써 살균 단계에서 미생물이 살균제에 직접 접촉이 가능하게 하며 미생물의 살균제에 대한 민감도를 증가시켜 살균제의 효율성을 높여줌. 이를 위해 물리적인 제거작업이 함께 이루어져야 하며 대표적으로 고압 세척, 초음파 등이 사용되고 있음 (Ban et al., 2012). 하지만 이러한 물리적인 방법의 경우 살균 효과는 기대할 수 없으며 초음파의 경우에는 기구 내 바이오필름 세척에는 활용될 수 있지만 기기 표면 내 바이오필름 세척에는 사용될 수 없다는 한계가 있음.

○ 세척 단계 후, 살균 단계를 통해 바이오필름 내 미생물 제어를 하게 되며 기존 식품 가공환경에서는 염소계 살균소독제가 가장 많이 이용되고 있고 이외에 알코올계 및 과산화수소 등 다양한 화학적 살균소독제가 사용되고 있음. 염소계와 알코올계 살균소독제의 경우 저렴하고 사용이 간편하다는 장점이 있지만 제한된 살균효과를 나타내며 특히 식품과 같은 유기물이 존재할 때, 그 활성이 떨어지는 단점이 있음. 또한 이러한 화학적 살균소독제의 경우 처리 후 기기 및 기구 표면에 잔존하여 식품으로의 전이 문제가 생길 수 있음. 과산화물계 살균소독제는 잔여물이 남지 않아 친환경적인 살균소독제로써 식품 산업계에서 널리 사용되고 있으나 식품에 직접 접촉할 경우 식품이 산화 또는 탈색되는 등 식품 품질 변화 문제가 있어 식품 제조 설비나 기구에만 적용한 뒤 반드시 세척 후 설비나 기구를 사용하도록 요구하고 있음. 또한 바이오필름의 경우 접촉이 어려워 주기적인 세척이 힘든 부분에 주로 형성되기 때문에 살균소독제 처리의 경우 이러한 부분에 대한 적용이 어렵다는 단점이 있음.

○ 이처럼 현재 사용되고 있는 바이오필름 세척 및 살균 방법에는 많은 제약이 따르고 있으며 이에 따라 현장적용 가능한 새로운 바이오필름 제어 기술이 요구되고 있음. 또한 현재까지 이루어진 바이오필름 형성 미생물에 대한 연구는 단순한 제어 효과에 초점을 두고 있으며 바이오필름 형성 및 제어기전에 대한 분자수준에서의 연구는 미미한 실정임.

4. 바이오필름 생성인자 동정 및 특성 규명을 통한 생물학적·물리적 제어기술 개발의 필요성

○ 바이오필름 생성인자 동정 및 분자생물학적 특성 연구의 필요성

- 현재의 바이오필름 제어기술들은 세척을 통한 물리적 제거나 소독을 통한 화학적 살균에 그 기본을 두고 있음. 하지만 앞서 언급하였듯이 세균이 바이오필름을 생성하여 EPS가 축적되면 이러한 물리·화학적 살균공정에 대하여 높은 내성을 갖게 되므로 기존의 바이오필름 제어기술에는 많은 제약이 따름. 이러한 제약을 극복하기 위해 바이오필름의 EPS 매트릭스을 구성하는 인자들이 무엇인지 동정하고 그 인자들의 발현을 제어하는 기술 개발이 요구됨.
- 국내의 경우 식중독 균 바이오필름 생성인자에 대한 연구가 거의 이루어지지 않고 있음. 국외의 경우 다양한 식중독 균을 대상으로 연구가 진행되고 있으나 국내 대표적인 식중독 균 패혈증비브리오균의 바이오필름 생성에 대한 이해는 매우 부족한 실정임.
- 바이오필름 생성인자의 발현을 조절하는 기술은 이미 생성된 바이오필름을 제거 또는 제어하는 기존 기술과 달리 바이오필름을 생성단계에서 억제하며, 이를 통해 식중독 균에 의한 표면 오염을 사전에 차단하여 식품 안전 확보에 기여할 수 있음.

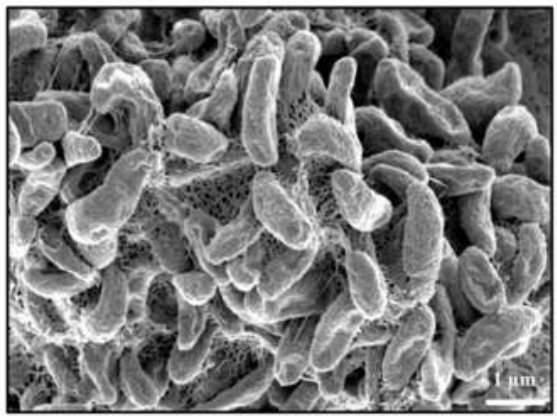


그림 3. 패혈증비브리오균이 생성한 바이오필름 매트릭스 (Park et al., 2015)

- 바이오필름 형성에 필요한 생성인자의 합성이나 기능을 저해함으로써 바이오필름 제어 기작의 효율을 증대시킬 수 있음.
- 본 연구의 내용은 이미 형성된 바이오필름의 제어뿐만 아니라 식품접촉표면 내 바이오필름 형성 방지를 위한 연구에도 확장 적용될 수 있음.

○ 생물학적 바이오필름 제어 기술 개발의 필요성

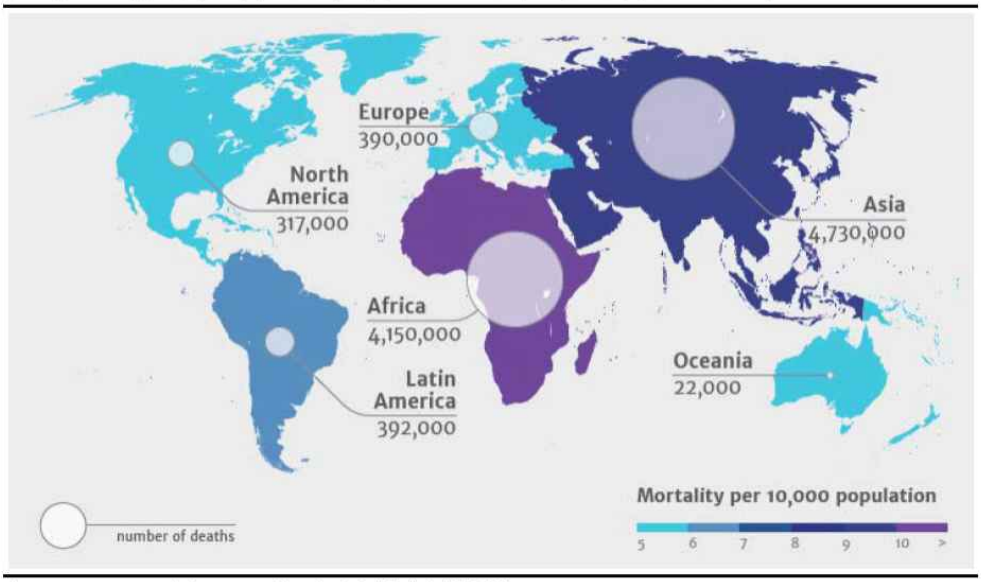
- 항생제 내성 문제의 심각성 및 현황.

• 전 세계적으로 항생제의 오남용과 사용량의 증가로 항생제 내성 문제가 갈수록 심각해지고 있으며, 항생제 내성 관리가 적절하게 이루어지지 않을 경우 2050년 무렵에는 항생제내성으로 전 세계에서 연간 1 천만 명의 사망자가 나올 것으로 전망됨.

• 신세대 항생제가 개발되지 않는다면 항생제 내성이 암보다 더 치명적인 위험이 될 것이며, 향후 35년간 세계 GDP의 3.5 %에 해당하는 100 조 달러의 경제적 손실이 초래될 것임.

• 전 세계적으로 항생제의 내성 문제가 심각해져 국내에서도 항생제 사용을 줄이는 분위기가 형성되어 국내 항생제 시장은 2015년 기준으로 약 1 조 3 천억 원 규모의 시장을 형성한 것으로 추정됨.

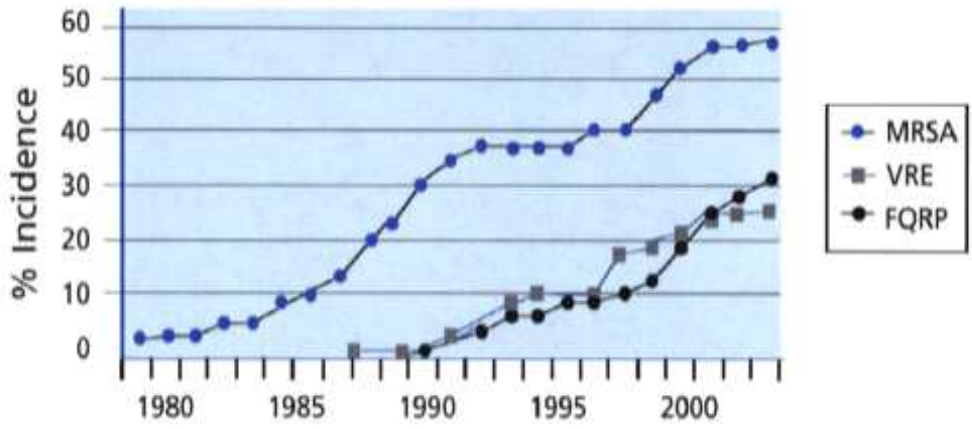
• 2012년 국회 국정감사에서 나온 자료에 따르면 우리나라의 항생제 내성률이 OECD 국가 중 최고 수준인 것으로 드러났고, 국내 슈퍼박테리아 감염 건수도 매년 증가하고 있는 추세임.



자료: Review on Antimicrobial Resistance (영국 정부의 항생제 내성 대책위원회)

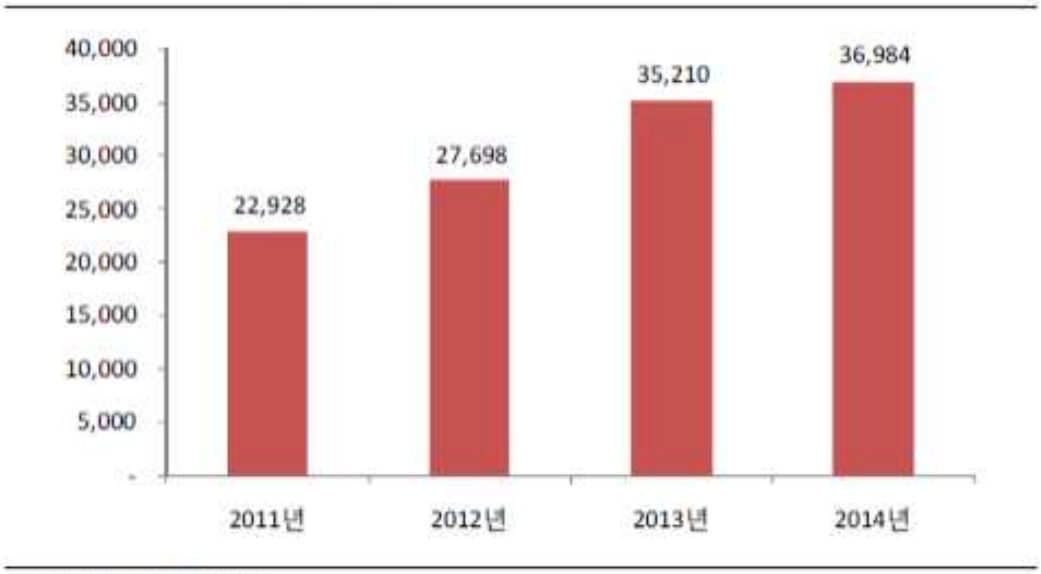
그림 4. 항생제내성에 따른 지역별 연간 사망자 수 전망
(2050년 예상 기준, 전 세계 연간 1천만 명 사망 전망)

• 현재까지 개발된 항생제 가운데 가장 강력한 항생제는 반코마이신 (Vancomycin)이었지만, 1996년 이 항생제에도 강한 내성을 보이는 VRSA (Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*)가 발견되었고, VRSA는 면역력이 약해진 인체에 들어 올 경우 온갖 감염을 심화시키며, 어떤 항생제도 듣지 않아 결국 생명을 위협하는 초강력 세균임.



자료 : CDC
주: MRSA-methicillin resistant staphylococcus aureus
VRE-vancomycin-resistant enterococci infection
FQRP-Fluoroquinolone-Resistant Pseudomonas Aeruginosa

그림 5. 빠르게 커지고 있는 슈퍼박테리아 감염률



자료 : 질병관리본부, SK 증권

그림 6. 연도별 국내 슈퍼박테리아 감염 건 수

- 박테리오파지와 엔돌라이신을 이용한 식중독균 바이오필름 제어
  - 박테리오파지는 세균을 숙주로 하는 지구상에서 가장 많이 존재하는 (1031~1032 마리) 'self-replicating unit' 으로, 세균이 존재하는 곳이면 어디든지 존재할 것으로 추정되며, 특정한 receptor를 갖는 세균만 인식해서 감염시키는 특이성을 가짐.
  - 박테리오파지는 항생제에 비해 높은 특이성을 가지며, 자연계에서 발견이 용이하고, 교차내성이 적으며, 다른 어떤 항생제도 가지지 못하는 증식성을 보유함. 또한 항생제에 대해 저항성을 갖는 병원균과는 달리 박테리오파지에 저항성을 보이는 병원균은 종종 그 병원성 자체도 감소한다고 알려짐. 이는 저항성과 관련된 심각성이 항생제에 비해 상대적으로 낮음을 의미함.

특성	Antibiotics	Bacteriophages	Phage Endolysin
특이성(Specificity)	Low	High to extremely high	High to extremely high
부작용(Side Effects)	High	Very low (if any)	Very low (if any)
새 product 개발 소요시간	Time-consuming	Relatively fast	Relatively fast
증식성(Multiplicity)	No	Yes	No
교차내성(Cross-resistance)	Yes	No ~ (Yes)	No ~ (Yes)
병원성과의 관계 (Relation to pathogenicity)	Not associated with virulence	Often confer LESS virulent phenotype	Might be associated with viability, and thus LESS virulent

그림 7. 박테리오파지, 박테리오파지 엔돌라이신 그리고 항생제의 특성 비교

- 최근 next generation sequencing 등 유전체 기술의 발달로 박테리오파지의 genome 분석이 용이하게 되어 박테리오파지 자체뿐만 아니라 박테리오파지가 지니고 있는 단백질에 대한 연구 결과가 증가하고 있음.

· 엔돌라이신은 박테리오파지가 숙주를 뚫고 나올 때 용출을 위해 필요한 단백질로서, 최근 연구에 의하면 그람 양성 세균을 감염시키는 박테리오파지 엔돌라이신의 경우 용균 활성을 나타내는Enzymatic active domain (EAD)과 peptidoglycan 내 특정 부위를 인식하고 결합하는 Cel wall-binding domain (CBD)이 짧은 linker로 연결된 구조를 가진다고 알려짐 (Hermoso et al., 2007).

· 최근 항생제 내성균의 폭발적인 증가로 인한 대안 마련의 한 방법으로 박테리오파지와 엔돌라이신 활용에 대한 관심이 고조되어 이에 관한 연구가 증가하는 추세임.

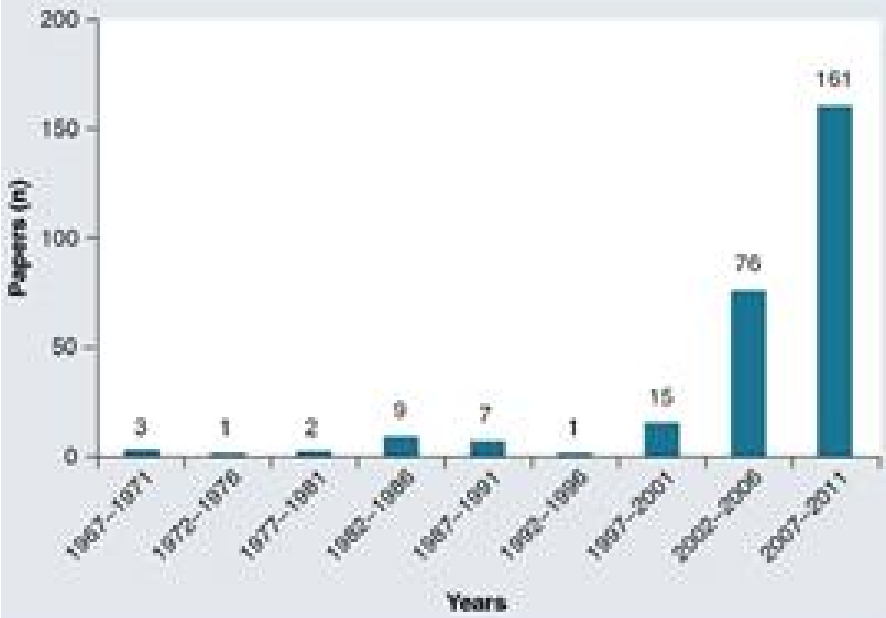


그림 8. 박테리오파지 therapy 에 관한 연구의 증가 추세

· 식중독 균 바이오필름 제거의 방안으로 직접 처리해도 어떠한 물리적 및 화학적 변화를 야기 하지 않는 박테리오파지나 엔돌라이신이 대두되고 있으나, 아직까지 관련 연구가 미진하여 보편화 되지 못하는 실정임.

○ 물리적 바이오필름 제어 기술 개발의 필요성

- 현재 바이오필름 제어를 위해 사용되고 있는 기술들의 경우 바이오필름 제거효과는 있으나 살균 효과가 없거나 현장적용성이 떨어진다는 단점이 있음. 따라서 이러한 단점을 극복할 수 있는 새로운 물리적 바이오필름 제어 기술의 발굴이 필요함.
- 초고온 과열 증기는 포화 증기를 정압 하에서 가열해 포화 온도보다 온도를 상승시킨 증기로 이용할 수 있는 잠열이 크므로 식품표면에 닿으면 응축 시 열을 빠르게 방출하여 병원균들을 빠르게 사멸시킨다는 장점이 있음.
- 아래 그림에서 A 점은 온도 90 ℃, 압력 0.1 MPa, 엔탈피 375 kJ/kg의 물을 나타냄. 이 물에 열을 가하면 온도는 saturated liquid 곡선의 점 B인 100 ℃까지 오르게 되고 엔탈피는 420 kJ/kg이 됨. 여기에 열에너지를 더 가하게 되면 상태변화가 일어나게 되고 liquid인 물에서 증기 상태로 변화하게 됨. 점 C에서 물은 모두 100 ℃의 포화 증기가 되고 엔탈피는 2675 kJ/kg이 됨. 이 상태에서 추가적인 열에너지를 가하게 되면 점 D의 고온의 과열 증기로 변하고, 온도 200 ℃, 엔탈피 2850 kJ/kg이 됨. 즉, 초고온의 과열 증기가 포화 증기보다 엔탈피가 175 kJ/kg 이 높다는 특성을 확인함.

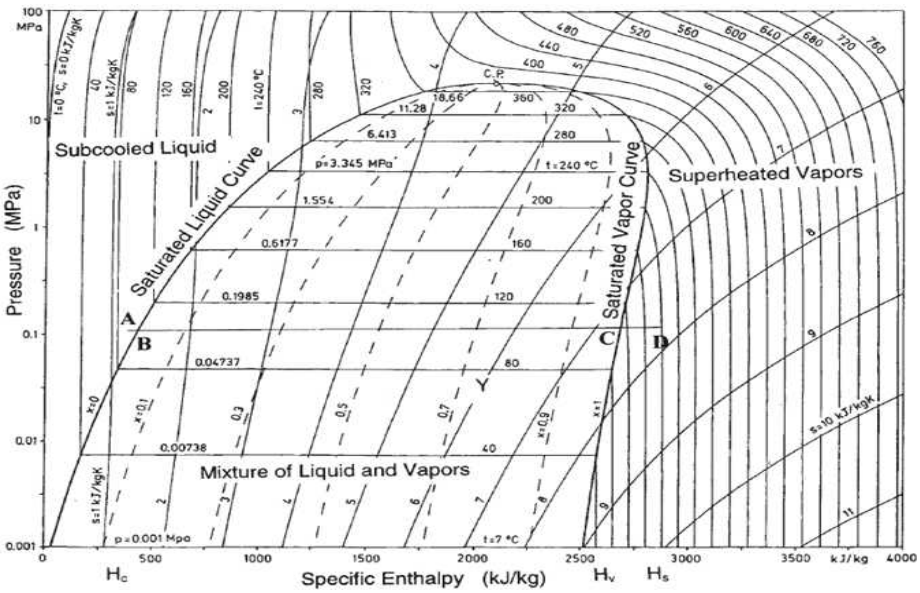


그림 9. Pressure-enthalpy diagram for steam-water and vapor (Straub and Scheibner, 1984)

- 초고온 과열 증기의 경우 이러한 높은 열에 의한 바이오필름 내 식중독 균 제어 효과와 더불어 발생 압력 조절을 통해 추가적인 바이오필름 제거 효과를 나타낼 수 있음. 즉 위에서 살펴본 바이오필름 세척 및 살균 효과를 동시에 얻을 수 있다는 큰 장점이 있음. 또한 특별한 화학적 물질의 사용이 없기 때문에 실제 식품현장 적용 시 잔류물에 의한 부작용 역시 없다는 장점이 있음.
- 국내의 경우 포화증기는 식품 산업에서 가공과 관련되어 많이 활용되고 있으나 초고온 과열 증기를 이용한 기술은 개념 정립 단계 정도임. 국외의 과열 증기 발생기구와 이를 이용한 건조기 등의 설비 기술 연구를 진행하고 있음. 미국, 유럽 등에서는 조리용 증기 오븐에 유사한 기술을 적용하고 있으나 뚜렷한 연구개발 성과가 없는 상태임. 특별히 식중독 균 바이오필름을 제어하기 위한 목적의 초고온 과열 증기의 적용 사례는 전무함.
- 초고온 과열 증기를 활용한 식품 건조 연구 논문은 활발히 게재 되었으나 식품 살균에 관한 논문은 매우 적으며 특별히 초고온 과열 증기를 활용한 식품접촉표면 내 식중독 균 바이오필름 제어와 관련된 연구 논문은 보고된 바 없음. 보고된 초고온 과열 증기를 이용한 식품 살균 관련 논문을 살펴보면 초고온 과열 증기가 포화증기에 비해 월등히 높은 식중독 균 제어 효과를 나타내기에 이를 활용한 식중독 균 바이오필름 제어 연구의 수행이 필요함.

제3절 연구개발 범위

1. 연구개발의 최종목표

구분	내용
최종목표	○ 식품제조 및 가공업체 작업환경 내 식중독 균 바이오필름 생성 현황 모니터링 ○ 식중독 균 바이오필름 생성인자의 동정, 분자생물학적 특성 규명을 통한 제어기반 구축 - 패혈증비브리오균 바이오필름 생성인자의 동정, 특성규명 및 제어기반 구축 • RNA-seq을 통하여 패혈증비브리오균 바이오필름 생성인자 5 종 이상 선정 • 바이오필름 생성인자가 결여된 isogenic knock-out mutant 2 종 이상 개발 및 특성 분석 • 바이오필름 생성인자 2 종 이상 순수분리 및 특성 규명 • 바이오필름 생성인자의 발현특성 및 조절특성 규명 • 바이오필름 생성을 저해하는 제어조건 확립 및 제어기반 구축 • 관련 연구 논문 (SCI급) 2 편 게재 ○ 식중독 균 바이오필름의 생물학적 제어 기술 개발 - 박테리오파지 유래 엔돌라이신을 통한 식중독 균 바이오필름 제어 기술 개발 및 현장적용평가 • 다양한 식중독 균을 타겟으로 하는 박테리오파지 10 건 이상 분리 • 박테리오파지 선정 후 3 건 이상 sequencing 분석 • 3종 이상의 새로운 엔돌라이신 확보 • 식품 접촉 표면 3 가지 이상에서 99.99 % 바이오필름 제거 효과 확인 • 관련 기술 논문 2 편 게재. 특허 출원 1 건 ○ 식중독 균 바이오필름의 물리적 제어 기술 개발 - 초고온 과열 증기 가열을 이용한 식중독 균 바이오필름 제어효과 검증, 현장형 바이오필름 제어 장치 개발 및 현장적용평가 • 초고온 과열 증기 기술을 활용한 식중독 균 제어 연구 논문 (SCI 급) 6 편 게재 • 현장형 초고온 과열 증기 바이오필름 제어 장비 시작품 개발 • 초고온 과열 증기 바이오필름 제어 장비 관련 특허 출원 및 등록 1 건 • 관련 기술의 산업체로의 기술이전 1 건

구분	내용
세부목표	○ 식품제조 및 가공업체 작업환경 내 식중독 균 바이오필름 생성 현황 모니터링 - 식품제조 및 가공업체 내 생산 공정별 미생물 오염도, 바이오필름 생성 정도 비교 - 조사 내용 분석을 통한 주요 control point 및 제어 기준 설정 ※ 적용범위 - 개발될 식중독 균 바이오필름 제어 기술의 현장 적용에 있어 적용 범위를 설정하고 기술의 제어 효율성을 검증하는데 활용함. ○ 패혈증비브리오균 바이오필름 생성인자의 동정, 특성규명 및 제어기반 구축 - RNA-seq과 bioinformatics를 기반으로 한 genome-wide level에서의 바이오필름 생성인자들의 포괄적 동정 - 바이오필름 생성인자들의 결여 isogenic mutant의 개발 및 기능특성 규명 - 바이오필름 생성인자들의 발현 조절특성 규명 및 바이오필름 제어조건 확립 ※ 핵심기술 - RNA-seq을 통한 패혈증비브리오균 바이오필름 생성인자의 포괄적 동정 • Bioinfomatics를 기반으로 예측된 바이오필름 생성인자 5 종 이상 선정 - 바이오필름 생성인자가 결여된 isogenic mutant의 개발 및 특성 분석 • 2 종 이상의 isogenic mutant를 개발하고 식품의 제조 가공 유통 저장 조건에서 바이오필름 생성능력에 대한 분석 수행 - 바이오필름 생성인자 순수분리 및 생화학적 특성 분석 • 바이오필름 생성인자 2 종 이상에 대해 cloning, 순수분리 및 생화학적 특성 분석 수행 - 바이오필름 생성인자의 발현 조절특성 분석 • 바이오필름 생성인자 1 종 이상의 cis-regulatory element 동정 해당 생성인자의 발현을 조절하는 trans-regulatory element 1 종 이상 동정 및 특성 규명 - 바이오필름 생성을 저해하는 제어조건 확립 및 제어기반 구축 • 바이오필름 제어타겟에 대한 제어조건 탐색 및 제어효과 확인 ※ 적용범위 - 식품 제조 및 가공 공정 중 접촉이 어려운 기기 표면 내 식중독 균 바이오필름의 제어효율 증대에 적용 가능함. - 식중독 균 바이오필름의 생성을 저해함으로써 가공 공정 내 오염되기 쉬운 표면의 식품위생을 사전 확보하기 위한 목적으로 활용될 수 있음.

구분	내용
세부목표	○ 식중독 균 바이오필름의 생물학적 제어 기술 개발 - 식중독균을 효과적으로 제어하는 박테리오파지 선정 후 유전체 분석 및 생화학적 특성 분석 - 박테리오파지 유래의 유용 엔돌라이신 선별 및 순수 분리 후 바이오필름 제어 가능성 연구 - 다양한 식품접촉 표면의 식중독 균 바이오필름 제어 효과 확인 및 현장 적용평가 ※ 핵심기술 - 식품 내 식중독 균을 감염하는 박테리오파지 분리 · 식중독 균 2 종 이상 선정, 식중독균 별 5 종 이상의 박테리오파지 분리 - 박테리오파지 특성 분석 및 NGS를 활용한 전체염기서열 분석 및 생물정보학적 분석기법을 활용한 전체 유전자 예측 및 기능성 분석 · 식중독 균 당 1 종 이상 박테리오파지의 특성 분석을 수행하고, 유전체 분석을 실시함 - 분석된 유전자의 기능성을 바탕으로 엔돌라이신 유전자의 존재 유무 확인 및 엔돌라이신 염기서열 확보 · 유전체 분석 결과에 따라 엔돌라이신 유전자 3 종 이상 확보 - 엔돌라이신 유전자를 대장균 발현 정제 시스템을 통해 얻고, 특성 분석 수행 · 엔돌라이신 2 종 이상 분리 및 특성 분석 수행 · 초고온 과열 증기와의 병행 처리하여 균 사멸에 대한 시너지 효과 확인 - 실제 다양한 식품 접촉 표면의 식중독균 바이오필름 제거 효과를 검증 · 3 가지 이상의 식품 접촉 표면 (유리, stainless steel, PVC 등)에서 99.99 % 바이오필름 제거 확인 ※ 적용범위 - 박테리오파지나 엔돌라이신은 액상으로 제품화 되었을 경우 식품 제조 및 가공 공정 시 기기 살균 세척에 적용 가능함. - 식품제조 및 가공업체에서의 도마, 칼 등의 기구표면, 나아가 작업대, 선반 등에 박테리오파지나 엔돌라이신 처리를 통해 식품위생상 안전성 보장 가능함. ○ 식중독 균 바이오필름의 물리적 제어 기술 개발 - 초고온 과열 증기 가열 기술을 활용한 식중독 균 바이오필름 제어 효과 검증 및 식품접촉표면 특성에 따른 제어 효과 규명 - Kinetics modeling을 활용한 바이오필름 제어 효과의 정량적 평가 - 식중독 균 바이오필름 제어효과 극대화를 위한 초고온 과열 증기 및 박테리오파지 유래 엔돌라이신 병행처리 연구 - 식품제조/가공 기기 및 기구 내 식중독 균 바이오필름 제어를 위한 현장형 초고온 과열 증기 발생 장비 시작품 제작, 현장적용평가 및 매뉴얼 제작

<table>
<tr><th>구분</th><th>내용</th></tr>
<tr><td>세부목표</td><td>
※ 핵심기술
- 개발될 현장형 초고온 과열 증기 바이오필름 제어 장비의 주요 사양은 아래와 같음. 특별히 상용전압인 220 V를 사용하여 장비의 실제 현장 적용성을 향상시킬 것임.

<table>
<tr><td>초고온 과열 증기 온도범위</td><td>100~250 ℃</td></tr>
<tr><td>증기 압력</td><td>0.1 ~0.3 MPa</td></tr>
<tr><td>증기 생성량</td><td>5 kg/h</td></tr>
<tr><td>사용전력</td><td>3 kW</td></tr>
<tr><td>사용전압</td><td>220 V</td></tr>
<tr><td>장비 무게</td><td>약 20 kg</td></tr>
</table>

- 식중독 균 바이오필름 제어 목표치는 아래와 같음.
<table>
<tr><th></th><th>150 ℃ 초고온 과열 증기 처리</th><th>200 ℃ 초고온 과열 증기 처리</th></tr>
<tr><td>식중독 균 바이오필름제어 효과</td><td>40 초 내 99.999 % 제어</td><td>30 초 내 99.999 % 제어</td></tr>
</table>

- 자체 발열 기능이 있는 처리 호스를 사용하여 기존 초고온 과열 증기 발생 장비의 문제점인 처리 호스 말단에서의 온도 급감 문제를 해결
<table>
<tr><th></th><th>Lab scale 초고온 과열 증기 발생 장비</th><th>현장형 초고온 과열 증기 발생 장비</th></tr>
<tr><td>처리 부 온도 감소율</td><td>20~25 %</td><td>10 % 이내</td></tr>
</table>

※ 적용 범위
- 식품제조 및 가공업체에서 기기 표면 내 식중독 균 바이오필름을 제어하는데 활용될 수 있으며 특별히 평상시 세척이 어려운 기기 틈새나 롤러 등의 살균 세척에 적용 가능함.
- 도마, 칼 등의 기구표면 내 바이오필름 제어에도 활용될 수 있으며 작업대, 선반 등의 전반적인 식품제조 및 가공업체 환경에서 폭넓게 활용될 수 있음.
</td></tr>
</table>

2. 연구개발의 개별목표 및 내용

가. 1차년도

(1) 개발목표

○ 주관연구기관 (세니젠)
- 식품제조 및 가공업체 작업환경 내 바이오필름 생성 현황 모니터링

○ 협동연구기관 1 (서울대학교 최상호)
- 패혈증비브리오균 genome-wide level에서 바이오필름 생성인자의 포괄적 동정

○ 협동연구기관 2 (서울대학교 강동현)
- 다양한 샘플에서 식중독 균을 제어하는 새로운 박테리오파지 분리 및 특성 규명
- 초고온 과열 증기 가열 기술의 식중독 균 바이오필름 제어 효과 검증

(2) 개발 내용 및 범위

○ 주관연구기관 (세니젠)
- 실제 식품제조 및 가공업체를 선정 후 우선적용 대상 확인
- 생산 공정별 미생물 오염도와 바이오필름 생성 정도 비교
- 조사 내용 분석을 통한 주요 control point 및 제어 기준 설정

○ 협동연구기관 1 (서울대 최상호)
- 바이오필름과 planktonic 패혈증비브리오균의 RNA-seq 비교 분석
- 바이오필름에서 특이적으로 발현하는 유전자들의 profile 분석
- Bioinfomatics 기반 바이오필름 생성인자들의 genome-wide level에서 포괄적 동정

○ 협동연구기관 2 (서울대학교 강동현)
- 다양한 샘플에서 식중독 균을 제어하는 박테리오파지 분리
- 박테리오파지 선정을 위한 Bacterial challenge assay, host range test, TEM 등 특성 분석
- 박테리오파지 선정 및 박테리오파지 시퀀싱
- 초고온 과열 증기 처리 온도 및 시간에 따른 주요 식중독 균 바이오필름 제어 효과 규명
- 식품접촉표면 특성에 따른 제어 효과 규명
- Kinetics modeling을 통한 제어 효과의 정량적 평가 및 최적 처리 조건 확립

나. 2차년도

(1) 개발 목표

○ 주관연구기관 (세니젠)
- 개발 기술의 현장적용 기반 구축

○ 협동연구기관 1 (서울대학교 최상호)
- 패혈증비브리오균 바이오필름 생성인자들의 기능특성 규명

○ 협동연구기관 2 (서울대학교 강동현)
- 박테리오파지 유전체 분석 및 엔돌라이신 특성 규명
- 초고온 과열 증기 가열을 활용한 병행처리 연구/현장형 초고온 과열 증기 발생 장비 설계

(2) 개발 내용 및 범위

○ 주관연구기관 (세니젠)
- 박테리오파지 엔돌라이신 대량 생산 기반 마련
- 현장형 초고온 과열 증기 발생 장비 설계 및 제작

○ 협동연구기관 1 (서울대학교 최상호)
- 바이오필름 생성인자들이 결여된 isogenic knock-out mutant 개발
- 식품의 제조 가공 유통 저장 조건에서 wild type과 isogenic mutant들의 바이오필름 생성능력 비교.
- 바이오필름 생성인자들의 cloning, 순수분리 및 생화학적 특성 규명

○ 협동연구기관 2 (서울대학교 강동현)
- 시퀀싱된 박테리오파지의 유전체 분석 및 엔돌라이신 유전자 확인
- 엔돌라이신 유전자 클로닝 후 분리, 정제 및 특성 분석
- 초고온 과열 증기 및 박테리오파지 유래 엔돌라이신 병행처리 연구 및 최적 처리 조건 확립
- 현장적용을 위한 초고온 과열 증기 발생 장비 시작품 설계

다. 3차년도

(1) 개발 목표

○ 주관연구기관 (세니젠)
- 개발 기술의 현장 적용 평가

○ 협동연구기관 1 (서울대학교 최상호)
- 패혈증비브리오균 바이오필름 생성인자들의 발현 조절특성 규명 및 제어기반 구축

○ 협동연구기관 2 (서울대학교 강동현)
- 다양한 식품 접촉 표면에서 식중독 균 바이오필름 제거 기술 개발 및 현장적용검증
- 현장형 초고온 과열 증기 발생 장비 시작품 제작 및 현장적용평가

(2) 개발 내용 및 범위

○ 주관연구기관 (세니젠)
- 박테리오파지 엔돌라이신 칵테일을 활용한 현장적용평가
- 현장형 초고온 과열 증기 발생 장비 시작품 제작 및 현장적용평가

○ 협동연구기관 1 (서울대학교 최상호)
- 패혈증비브리오균 생장조건에 따른 바이오필름 생성인자들의 발현특성 규명
- 바이오필름 생성인자들의 promoter mapping 및 cis-regulatory elements의 동정
- 바이오필름 생성인자들의 trans-regulatory elements의 동정 및 특성 규명
- 바이오필름 생성을 저해하는 제어타겟 발굴 및 제어조건 확립

○ 협동연구기관 2 (서울대학교 강동현)
- 다양한 식품접촉표면에서 식중독 균 바이오필름 형성
- 박테리오파지 및 엔돌라이신의 바이오필름 제거 최적 조건 확립
- 다양한 식품접촉표면에서 박테리오파지 및 엔돌라이신 처리에 의한 바이오필름 제거 효과 확인
- 현장 적용성을 높이기 위해 220V 상용전압을 사용하고 자체발열 단열호스를 사용하여 열전달 효율을 높인 현장형 바이오필름 제어 장비 시작품 제작
- 실제 식품제조 및 가공업체에 설치한 후 현장적용평가 수행 및 현장형 사용 매뉴얼 제작

제2장 연구수행 내용 및 결과

제1절 연구개발 추진전략

1. 연구개발 추진전략・방법

○ 서울대학교 최상호 교수 연구팀은 지난 20여 년간 국내 대표적인 식중독 균 패혈증비브리오균의 독성발현을 분자수준에서 이해하는 연구를 진행하였고, 패혈증비브리오균 주요조절인자에 대한 지식 및 단백질의 분리 동정과 기능특성 분석 노하우를 가지고 있음.

○ 특히 최근 5년간 패혈증비브리오균 바이오필름 생성에 대한 분자수준 연구를 진행하여 바이오필름 생성인자 CabA를 동정하고 그 기능특성을 규명하였으며 PLoS pathogen을 비롯한 SCI급 논문에 결과를 게재하였음 (Park et al., 2015, 2016).

○ 본 연구에서 RNA-seq을 통해 바이오필름 생성인자를 동정하여 기능특성을 규명하고, 동정한 바이오필름 생성인자의 발현 조절특성을 이용하여 바이오필름을 생성단계에서 제어할 수 있는 기반을 구축하고자 함.

○ 서울대학교 강동현 교수 연구팀은 지난 10년간 다양한 종류의 병원성 균 (*Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *B. cereus*, *S. aureus*)을 제어 할 수 있는 수십 종의 박테리오파지를 분리, 정제 그리고 식품 적용에 관한 노하우를 가지고 있음.

○ 이를 바탕으로 식품 제조 및 가공 공정상에 문제를 일으키는 식중독 균을 제어하는 새로운 박테리오파지를 확보하고, 이의 활용성을 높이는 기술을 개발하고, 실제 식품 접촉 표면에 처리하여 식중독 바이오필름 제거를 통해 식중독사고를 예방하고자 함.

○ 보다 정확한 박테리오파지 genome sequencing data를 얻기 위해 비교적 긴 read length를 갖는 454 GS-FLX plus system (Roche)과, 높은 해상도의 (약 200 Gb) illumina HiSeq system (Illimina)을 동시에 진행하는 hybrid sequencing을 진행하고자 함.

○ 본 연구팀은 박테리오파지 genome sequencing data 분석을 위한 서버급 유닉스 컴퓨터를 보유하고 있으며, 다양한 소프트웨어를 활용한 바이오인포메틱스 기술력을 갖고 있음.

○ 본 연구팀은 박테리오파지의 연구에서 세계 유수의 선발 주자들 (미국 NIH, 스위스 Loessner group등) 과 지속적인 정보교환 등의 친밀한 직, 간접적 유대 관계를 가지고 있음. 본 연구를 수행하는 동안에도 지속적인 교류 및 정기 세미나 개최 등을 통해 최신의 기술정보를 수집하여 보다 성공적인 연구 수행을 위해 노력할 것임.

○ 또한 서울대학교 강동현 교수 연구팀은 식중독 균 제어를 위한 가열 (초고온 과열 증기, 마이크로웨이브, radio frequency, 적외선, 옴 가열) 및 비가열 (UV, LED-UV, 이산화염소 가스, modified atmosphere packaging) 기술 연구를 지속적으로 수행해 왔음. 이러한 연구를 통해 각 제어 기술의 특성을 정확히 파악하고 있으며 적용하고자 하는 분야에 맞는 제어 기술을 최적의 조건으로 처리할 수 있는 노하우를 보유하고 있음. 이러한 연구를 통해 SCI 급 연구 논문을 100편 이상 게재하였으며 다양한 제어 기술 관련 특허를 보유하고 있음.

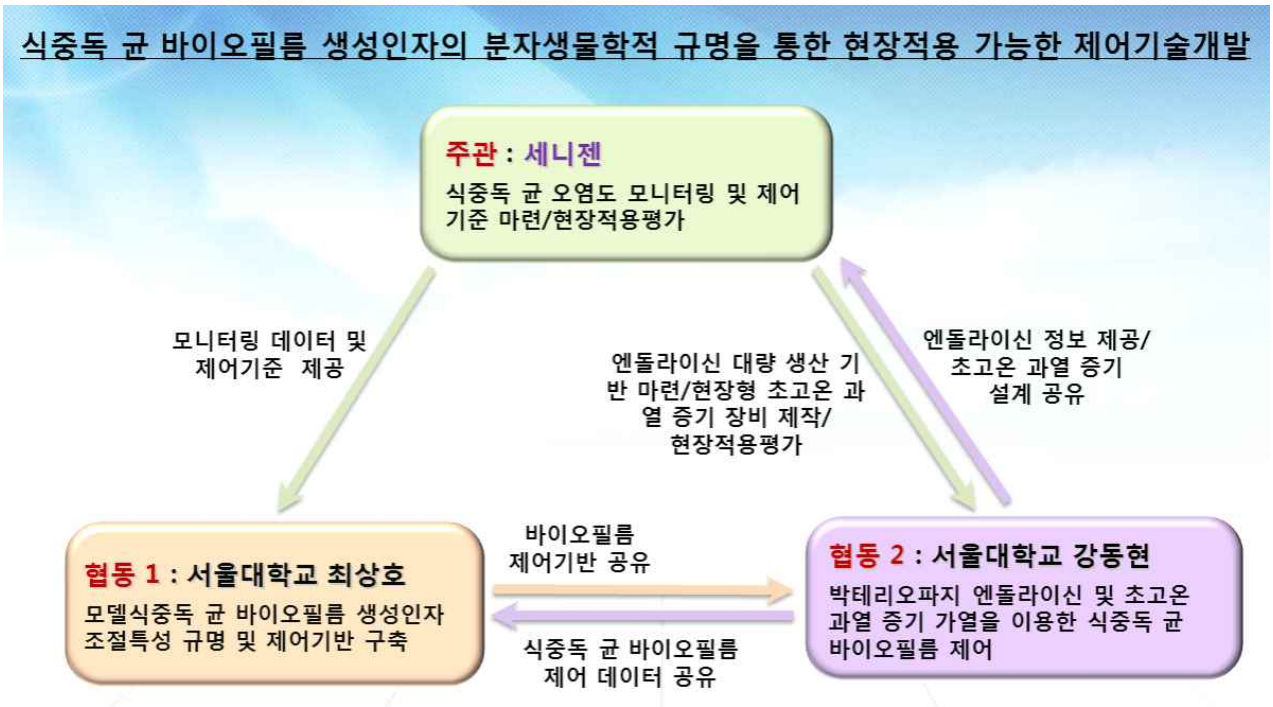
○ 본 연구팀은 다양한 식품관련 업체와의 산학 연구를 지속적으로 수행해 왔으며 이러한 경험을 통해 연구실에서 이루어지는 연구와 실제 현장에서 필요로 되는 기술 사이의 격차를 줄일 수 있는 노하우를 보유하고 있음. 이러한 경험은 본 연구 과제의 목표인 현장 적용 가능한 식중독 균 바이오필름 제어 기술 개발 연구에 있어서 큰 도움이 될 것임.

○ 본 연구팀은 식품 업체와의 협력 연구를 통해 다양한 기술이전 성과를 달성하였으며 이러한 경험을 바탕으로 본 연구에서 이루어질 연구 결과의 적극적인 산업화 방안을 모색할 것임.

○ 본 연구과제의 주관연구기관인 (주)세니젠은 다양한 부처 연구사업 수행을 통해 지하수 오염 실태조사, 제빙기 전용 살균소독제 개발, 복합정수처리 장치 개발, 위생관리 프로그램 개발, 천연보존제 개발 연구 등을 수행해 왔으며 이를 통해 국내외 특허출원 및 제품개발, 기술 이전 등의 다양한 실적을 보유하고 있음.

○ 또한 이러한 연구과제 수행을 통해 제빙기 살균소독제인 세니아이, 4단계 다중방어 시스템을 적용한 복합정수 처리시스템, 트리클로산 및 파라벤 무첨가 손세정제인 세니버블, 노로바이러스 제어를 위한 LPHO UV 소독장치 등의 사업화 실적을 달성하였음.

○ 이러한 주관연구기관의 식품 관련 기술의 다양한 산업화 및 사업화 경험은 본 연구 과제에서 이루고자 하는 식중독 균 바이오필름 제어 시스템 개발에 있어 큰 도움이 될 것이며 협동연구기관인 서울대학교와의 유기적인 연계를 통해 현장에서 직접 활용될 수 있는 시스템이 개발되는데 활용될 것임.



2. 연구개발 추진체계

연구개발과제		총 참 여 연 구 원
과제명	식중독 균 바이오필름 생성인자의 분자생물학적 규명을 통한 현장적용 가능한 제어시스템 개발	주관연구책임자 박정웅 외 총 36 명

기 관 별 참 여 현 황		
구 분	연구기관수	참여연구원수
대 기 업		
중견기업		
중소기업	1	10
대 학	1	27
국공립(연)		
출 연 (연)		
기 타		

주관연구기관명 (세니젠)	협동연구기관명 (서울대학교)	협동연구기관명 (서울대학교)
과 제 명 식품제조/가공업체 내 식중독 균 바이오필름 모니터링 및 제어 기술 현장적용기반 마련	과 제 명 식중독 균 바이오필름 생성인자의 동정, 분자생물학적 특성규명을 통한 제어기반 구축	과 제 명 식중독 균 바이오필름의 생물학적/물리적 제어 기술 개발
연구책임자명 박정웅 외 9 명	연구책임자명 최상호 외 9 명	연구책임자명 강동현 외 16 명
담당기술개발내용	담당기술개발내용	담당기술개발내용
- 식품제조 및 가공업체 작업환경 내 바이오필름 생성 현황 모니터링 - 박테리오파지 엔돌라이신 대량생산 기반 마련 및 현장적용평가 - 현장형 초고온 과열 증기 발생장비 시작품 제작 및 현장적용평가	- RNA-seq과 bioinformatics를 기반으로 한 genome-wide level에서의 바이오필름 생성인자들의 포괄적 동정 - 바이오필름 생성인자들의 결여 isogenic mutant의 개발 및 기능특성 규명 - 바이오필름 생성인자들의 발현 조절특성 규명 및 바이오필름 제어조건 확립	- 식중독균을 효과적으로 제어하는 박테리오파지 선정 후 유전체 분석 및 생화학적 특성 분석 - 박테리오파지 유래의 유용 엔돌라이신 선별 및 순수 분리 후 바이오필름 제어 가능성 연구 - 초고온 과열 증기 가열 기술을 활용한 식중독 균 바이오필름 제어 효과 검증 - 현장형 초고온 과열 증기 발생장비 시작품 제작, 현장적용평가 및 매뉴얼 제작 - 식중독 균 바이오필름 제어효과 극대화를 위한 생물학적·물리적 제어기술 병행처리 연구

3. 연구개발 추진일정

일련번호	연구내용	월별 추진 일정												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1차년도															
1	식품제조 및 가공업체 작업환경 내 식중독 균 오염도 조사						■	■	■	■	■	■	■	155,750	박정웅 (세니젠)
2	Biofilm 과 planktonic 패혈증비브리오균의 RNA-seq 비교 분석						■	■	■						최상호 (서울대)
3	Biofilm에서 특이적으로 발현하는 유전자들의 profile 분석									■	■			66,750	최상호 (서울대)
4	Bioinfomatics 기반 biofilm 생성인자들의 genome-wide level에서 포괄적 동정											■	■		최상호 (서울대)
5	샘플링 및 박테리오파지 분리						■	■	■						강동현 (서울대)
6	박테리오파지 특성 분석							■	■	■					강동현 (서울대)
7	박테리오파지 선정 및 유전체 sequencing									■	■	■	■	133,500	강동현 (서울대)
8	초고온 과열 증기 기술의 식중독 균 바이오필름 제어 효과 검증						■	■	■						강동현 (서울대)
9	표면 종류에 따른 초고온 과열 증기의 식중독 균 바이오필름 제어 효과 검증									■	■	■	■		강동현 (서울대)
2차년도															
1	박테리오파지 엔돌라이신 대량 생산 기반 마련	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	234,000	박정웅 (세니젠)
2	현장형 초고온 과열 증기 발생 장비 제작						■	■	■	■	■	■	■		박정웅 (세니젠)
3	Biofilm 생성인자들이 결여된 isogenic knock-out mutant 개발	■	■	■										100,000	최상호 (서울대)
4	Wild type과 isogenic mutant들의 biofilm 생성능력 비교				■	■	■	■							최상호 (서울대)
5	Biofilm 생성인자들의 cloning, 순수분리 및 생화학적 특성 규명								■	■	■	■	■		최상호 (서울대)
6	박테리오파지 유전체 분석	■	■	■	■									200,000	강동현 (서울대)
7	엔돌라이신 분리 정제 및 특성 분석			■	■	■	■	■	■						강동현 (서울대)
8	박테리오파지 및 엔돌라이신과 초고온 과열 증기 병행 처리 연구							■	■	■	■	■	■		강동현 (서울대)
9	초고온 과열 증기 및 박테리오파지 엔돌라이신 병행처리 연구	■	■	■	■	■	■	■	■						강동현 (서울대)
10	현장형 초고온 과열 증기 장비 설계								■	■	■	■	■		강동현 (서울대)
3차년도															
1	박테리오파지 엔돌라이신 및 초고온 과열 증기 기술의 현장적용평가	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	234,000	박정웅 (세니젠)
2	패혈증비브리오균 생장조건에 따른 biofilm 생성인자들의 발현특성 규명	■	■	■										100,000	최상호 (서울대)
3	Biofilm 생성인자들의 promoter mapping 및 *cis*-regulatory elements들의 동정				■	■	■								최상호 (서울대)
4	Biofilm 생성인자들의 *trans*-regulatory elements의 동정 및 특성 규명							■	■	■					최상호 (서울대)
5	Biofilm 생성을 저해하는 제어타겟 발굴 및 제어조건 확립										■	■	■		최상호 (서울대)
6	식품 접촉 표면에 바이오필름 형성	■	■	■	■									200,000	강동현 (서울대)
7	박테리오파지 및 엔돌라이신의 바이오필름 제거 최적 조건 확립			■	■	■	■	■	■						강동현 (서울대)
8	식품 접촉 표면에서 박테리오파지 및 엔돌라이신의 바이오필름 제거능 확인					■	■	■	■	■	■	■	■		강동현 (서울대)
9	현장형 초고온 과열 증기 발생 장비 시작품 제작	■	■	■	■										강동현 (서울대)
10	개발된 장비의 현장적용 평가 및 매뉴얼 제작				■	■	■	■	■	■	■	■	■		강동현 (서울대)

제2절 1차년도 연구개발 내용 및 성과

1. 패혈증비브리오균 genome-wide level에서 바이오필름 생성인자의 포괄적 동정 (1차년도, 협동 1)

가. 바이오필름과 planktonic 패혈증비브리오균의 RNA-seq 비교 분석

○ 패혈증비브리오균 (*Vibrio vulnificus*) strain을 LBS 배지 (2.0% (wt/vol) NaCl이 첨가된 Luria-Bertani (LB) 배지)에서 30℃로 배양한 후, OD_{600} 0.8인 배양액을 VFMG (*Vibrio Fischeri* minimal medium containing 32.6 mM glycerol)에 OD_{600} 0.05로 희석하고 6-well culture plate 상에서 30℃로 배양하여 바이오필름을 생성하였음.

○ 배양 시간에 따른 바이오필름 생성 단계를 결정하기 위해 2시간 간격으로 crystal violet 염색을 통해 바이오필름을 정량함. 6-well culture plate 상에 생성된 바이오필름에서 planktonic cell을 제거하고 PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4)로 세척한 후 1% (wt/vol) crystal violet 용액으로 상온에서 15분간 염색하였음. 이를 에탄올로 용출한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하여 바이오필름을 정량하였음.

○ 상기 실험을 통해 결정된 바이오필름의 각 생성 단계를 대표하는 3가지 time point (배양 시작 시간으로부터 1.5 시간, 6시간, 10시간)에서 바이오필름 상태와 planktonic 상태의 bacterial cell을 회수하였음. 각 time point에서 회수한 바이오필름 상태와 planktonic 상태의 샘플을 B1, B2. B3와 P1, P2, P3라 명명하였고, 각 샘플은 통계적 유의성을 확보하기 위해 biological duplicate로 확보하였음.

○ RNA-seq을 진행하기 위해 miRNeasy kit (Qiagen)를 사용하여 회수한 bacterial cell로부터 total RNA를 순수분리하고, Ribo-Zero rRNA Removal kit (Epicentre)를 사용해 섞여있는 ribosomal RNA를 제거한 후, TruSeq Standard mRNA Sample Prep Kit (Illumina)를 사용해 cDNA library를 제작하였음. 이를 Hiseq platform (Illumina)을 이용한 NGS (next-generation sequencing) 기법으로 sequencing하고, sequence read를 CLC Genomics Workbench 7.6.1 software (CLC Bio)를 이용하여 패혈증비브리오균 genome에 mapping하였음.

○ RNA-seq 결과로부터 바이오필름 상태와 planktonic 상태에서 각각 발현되는 유전자들의 상대적인 전사량을 백만개의 read가 mapping될 때 각 유전자의 kilobase 당 mapping되는 read 수를 나타내는 digital number인 RPKM (reads per kilobase per million mapped reads) 값으로 표현하였음. Normalization을 거친 후 각 샘플에서의 RPKM을 비교하여 fold change와 significance (*P* value)를 할당하였음.

○ RNA-seq의 결과는 Genomics Workbench 7.5.1 (CLC Bio)를 통해 처리하고 PCA (principal component analysis) plot과 volcano plot으로 시각화하여 바이오필름과 planktonic 상태에서의 transcriptome 간 유의미한 통계적 차이를 확인하였음.

○ 6-well culture plate 상에 패혈증비브리오균 바이오필름을 생성하고 2시간 간격으로 정량한 결과, 바이오필름의 양은 배양 시작으로부터 6시간째에 가장 높고 이후에는 급격히 감소하는 양상을 보임. 이를 토대로 바이오필름 각 생성 단계의 특징을 대표할 수 있는 1.5 시간, 6시간, 10시간의 3가지 time point를 결정하였고, 이 3가지 time point에서 바이오필름과 planktonic cell의 회수를 진행하였음.

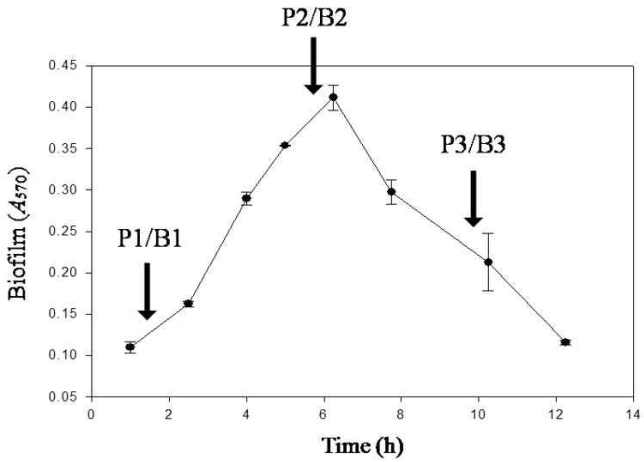


그림 10. 패혈증비브리오균 바이오필름의 생성 단계

(화살표는 bacterial cell 회수를 진행한 3가지 time point를 나타냄.)

○ 각 샘플에 대해 duplicate 샘플 간 transcriptome의 유사성과 서로 다른 샘플 간 transcriptome의 차이를 확인하기 위하여 PCA analysis를 진행하고 그 결과를 PCA plot으로 시각화하였음. 각 샘플 내의 duplicate는 서로 연관성을 가지고 clustering되는 반면 각 time point에서 회수한 바이오필름 샘플과 planktonic 샘플은 cluster가 명확히 분리되었고, 바이오필름 생성 단계별 비교에서는 따로 clustering 되는 B1과 달리 B2와 B3의 cluster가 매우 근접하여 형성되었음.

○ 이로부터 각 time point에서 바이오필름 cell과 planktonic cell의 transcriptome이 유의적인 차이를 보이며, 바이오필름 생성 초기 단계에서의 transcriptome은 바이오필름 생성 중기나 후기에서의 transcriptome과는 다른 양상을 나타냄을 확인하였음.

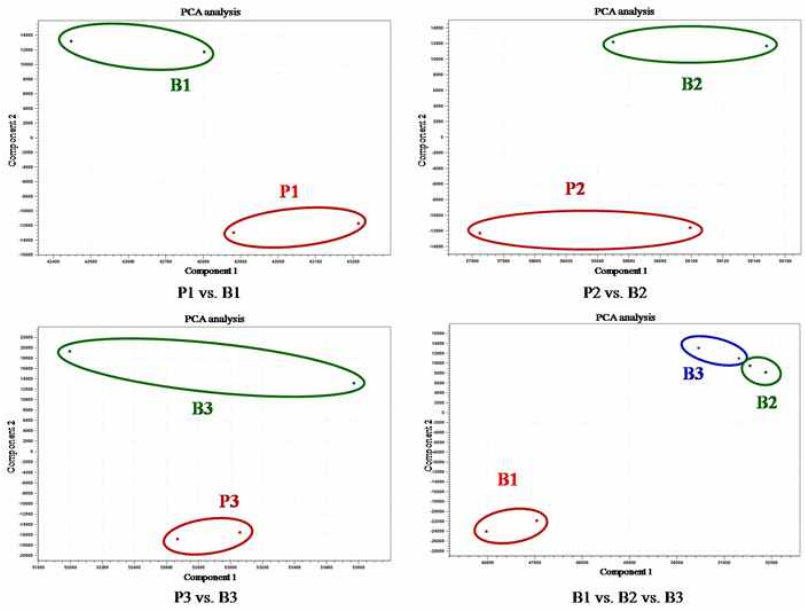


그림 11. Principal component analysis (PCA) plot을 통한 각 샘플들의 transcriptome 비교

○ 각 샘플 간 특이적으로 발현이 변화한 유전자들을 fold change와 *P* value를 기준으로 하여 volcano plot으로 시각화하였음. B2와 B3의 transcriptome을 비교한 경우는 다른 경우에 비해 상대적으로 유전자들의 fold change가 작은 것으로 나타났으며 이는 PCA analysis의 결과에서 두 샘플의 transcriptome이 유사한 것으로 나타난 것과 일치함. 이 경우를 제외하고 바이오필름 샘플과 planktonic 샘플을 비교했을 때 혹은 바이오필름 초기 단계의 샘플을 중기 단계의 샘플과 비교했을 때에는 많은 유전자들의 발현양이 특이적으로 변화하였으며, 이로부터 각 샘플의 transcriptome 간에 유의미한 통계적 차이가 존재함을 확인하였음.

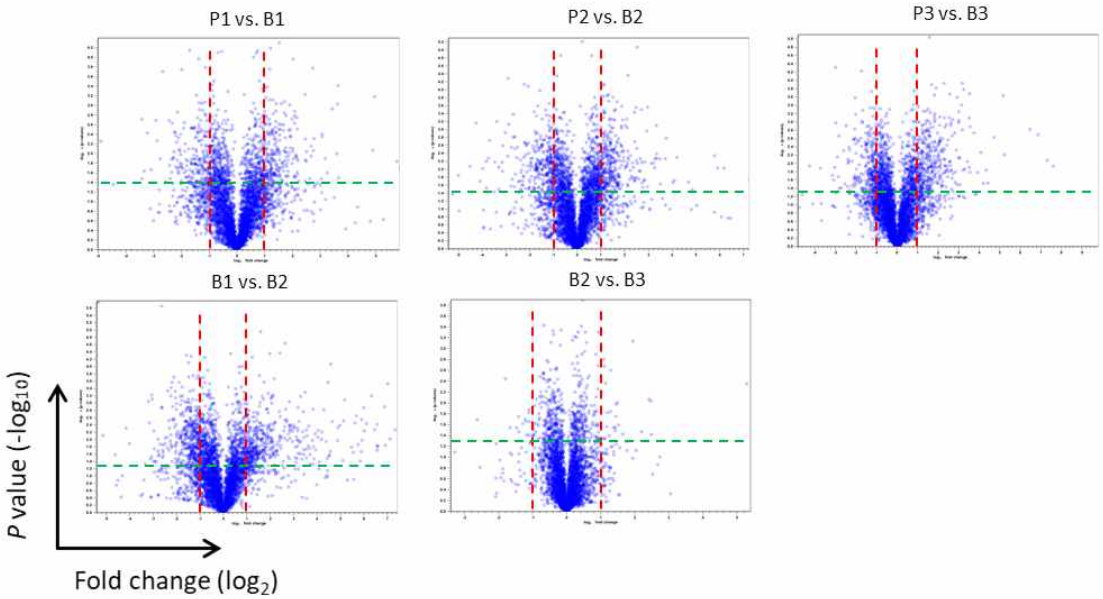


그림 12. Volcano plot을 통한 각 샘플들의 transcriptome 비교

(적색 점선과 녹색 점선은 각각 2-fold change와 P value 0.05의 경계를 나타냄.)

나. 바이오필름에서 특이적으로 발현하는 유전자들의 profile 분석

○ RNA-seq을 통해 얻은 각 샘플에서의 RPKM 값들을 통계적으로 분석하여 바이오필름에서 특이적으로 발현이 변화하는 유전자들인 DEGs (differentially expressed genes)의 profile을 확인함. 바이오필름에서 특이적으로 발현이 변화하는 유전자는 (1) 동일한 time point에서 planktonic 샘플에 비해 바이오필름 샘플에서 특이적으로 발현이 변화한 유전자와 (2) 서로 다른 time point의 바이오필름 샘플에서 특이적으로 발현이 변화한 유전자의 두 가지 기준을 적용하여 다양한 측면에서 분석하였음. 각 샘플에서 유전자들의 RPKM 값을 비교할 때 fold change가 2배 이상이고 동시에 *P* value 가 0.05 미만인 유전자만을 DEG에 포함하였음.

○ 바이오필름에서 특이적으로 발현이 변화한 DEG들의 기능 분류 (functional category)를 결정하기 위해 패혈증비브리오균의 genome date를 Clusters of Orthologous Groups (COG) database (http://weizhong-lab.ucsd.edu/metagenomic-analysis/server/cog/)를 이용해 분석하고, 이를 바탕으로 바이오필름에서 특이적으로 발현이 변화한 DEG의 profile을 각 기능 분류별로 확인하였음.

○ 연구 방법에 기재한 기준을 적용하여, 각 샘플 간의 transcriptome 비교를 통해 바이오필름에서 특이적으로 발현이 변화한 DEG를 결정하였음.

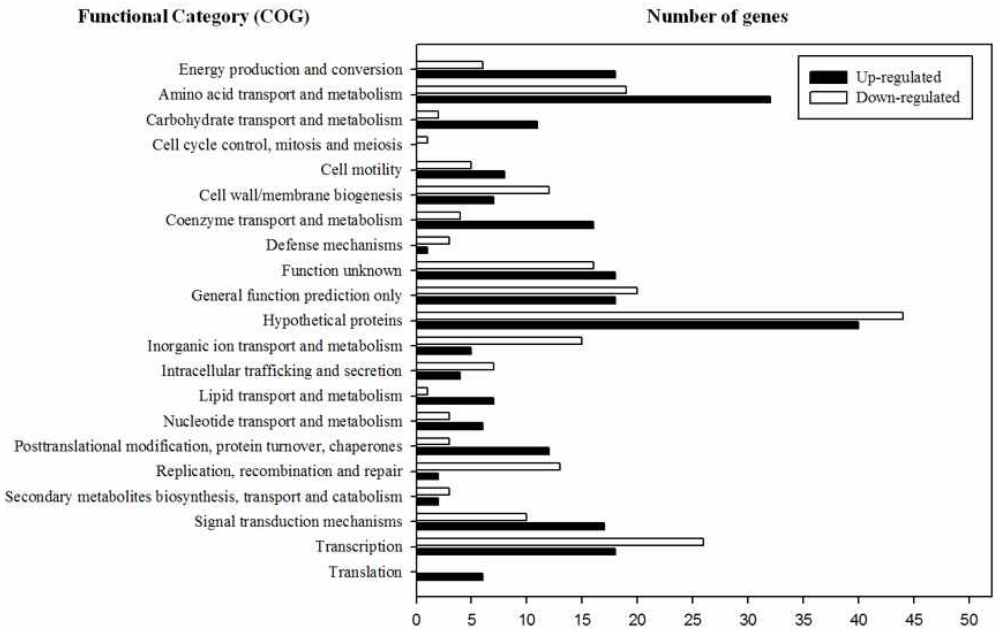
표 3. 각 샘플 간의 transcriptome 비교를 통해 결정된 DEG의 수

Group	Regulation	Number of genes	Total
Biofilm cells vs. Planktonic cells			
B1/P1	Up	248	461
	Down	213	
B2/P2	Up	325	609
	Down	284	
B3/P3	Up	327	553
	Down	226	
Biofilm cells at the different development stages			
B2/B1	Up	395	758
	Down	363	
B3/B2	Up	23	36
	Down	13	

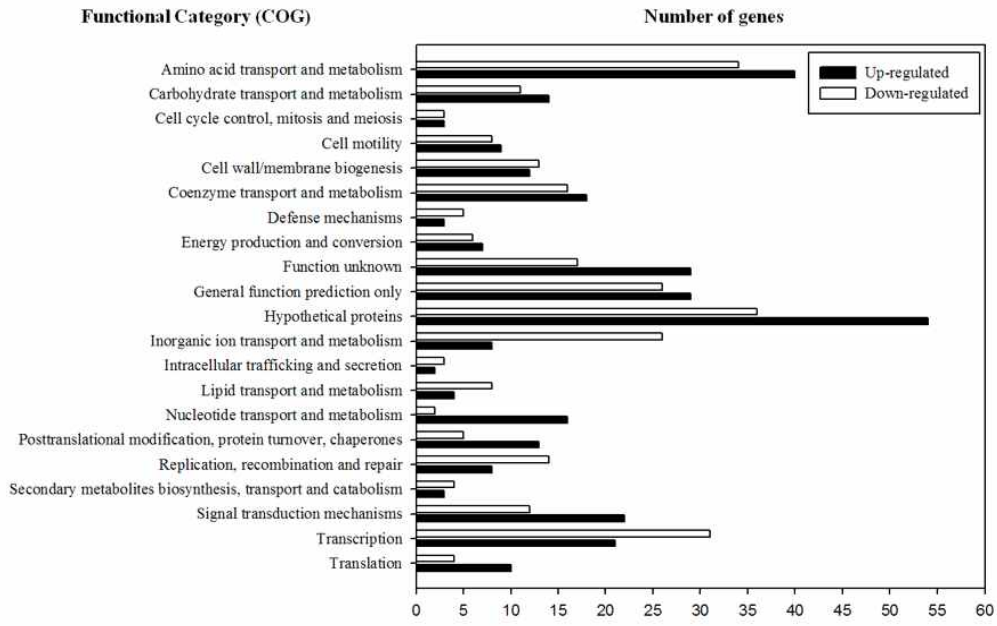
○ 바이오필름 상태의 cell은 바이오필름 생성 단계에 상관없이 planktonic cell에 비해 460개 이상 유전자가 발현양에 차이를 보임. 이는 패혈증비브리오균 전체 ORF 수인 약 4600개의 10%에 달하는 수치로, 패혈증비브리오균이 바이오필름을 생성하기 위해서는 매우 많은 수의 유전자들에 대한 발현 profile 변화가 수반되어야함을 의미함.

○ 바이오필름 생성 단계별로 비교하였을 때 바이오필름 생성 중기에서는 초기에 비해 (B2/B1) 758개에 달하는 많은 수의 유전자가 발현에 차이를 보인 반면, 후기와 중기를 비교한 경우에는 (B3/B2) 단 36개의 유전자만이 유의적인 발현 변화를 나타내었음. 이는 앞서 PCA plot과 volcano plot으로부터 얻은 결과와 일치하며, 바이오필름 생성 초기에 비해 중기와 후기에서의 바이오필름 cell은 상당히 비슷한 transcriptome을 가지고 있음을 의미함. 따라서 패혈증비브리오균은 바이오필름 생성 단계 중 초기와 중·후기를 거쳐 적어도 두 번의 큰 transcriptome profile 변화가 바이오필름 생성에 수반됨을 알 수 있음.

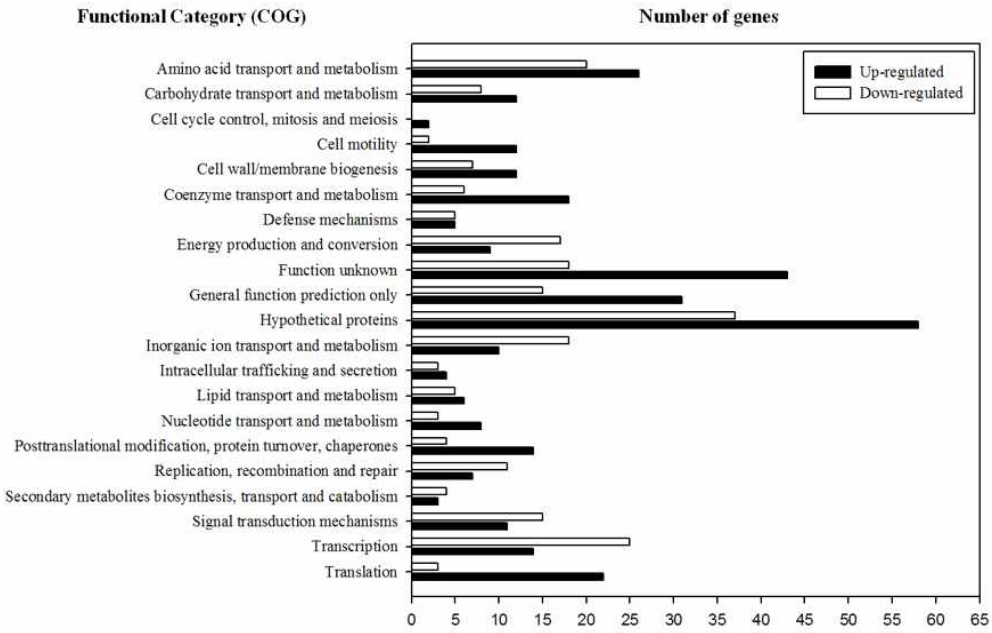
○ COG database를 바탕으로 각 샘플 간의 비교에서 결정된 DEG들이 어떤 기능적 분류에 속하는지를 확인하였음.


Functional Category (COG)
Number of genes
Up-regulated
Down-regulated
Energy production and conversion
Amino acid transport and metabolism
Carbohydrate transport and metabolism
Cell cycle control, mitosis and meiosis
Cell motility
Cell wall/membrane biogenesis
Coenzyme transport and metabolism
Defense mechanisms
Function unknown
General function prediction only
Hypothetical proteins
Inorganic ion transport and metabolism
Intracellular trafficking and secretion
Lipid transport and metabolism
Nucleotide transport and metabolism
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
Replication, recombination and repair
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
Signal transduction mechanisms
Transcription
Translation
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50

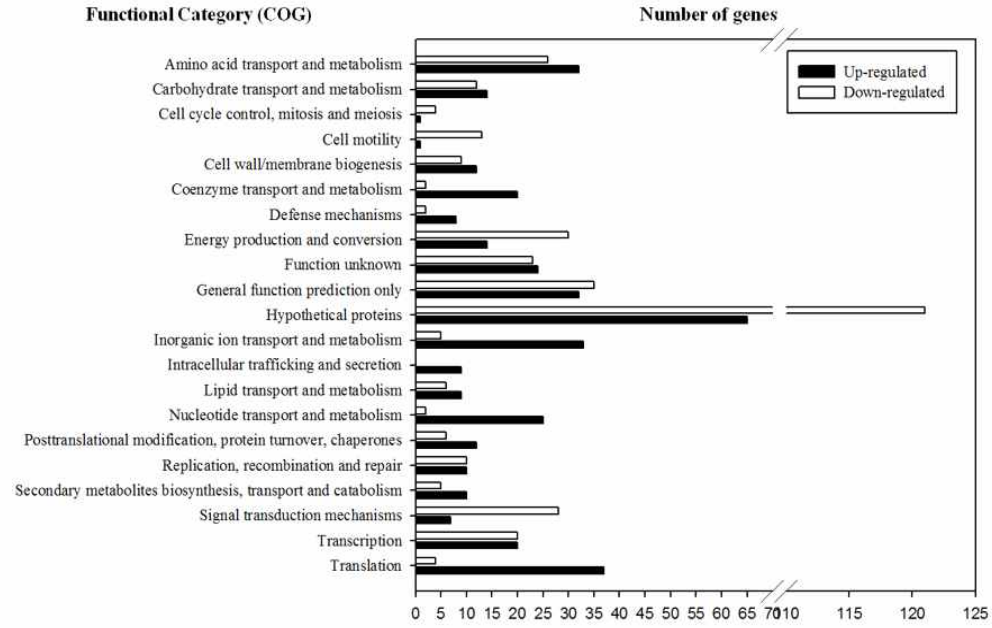
(A) B1/P1


Functional Category (COG)
Number of genes
Up-regulated
Down-regulated
Amino acid transport and metabolism
Carbohydrate transport and metabolism
Cell cycle control, mitosis and meiosis
Cell motility
Cell wall/membrane biogenesis
Coenzyme transport and metabolism
Defense mechanisms
Energy production and conversion
Function unknown
General function prediction only
Hypothetical proteins
Inorganic ion transport and metabolism
Intracellular trafficking and secretion
Lipid transport and metabolism
Nucleotide transport and metabolism
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
Replication, recombination and repair
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
Signal transduction mechanisms
Transcription
Translation
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60

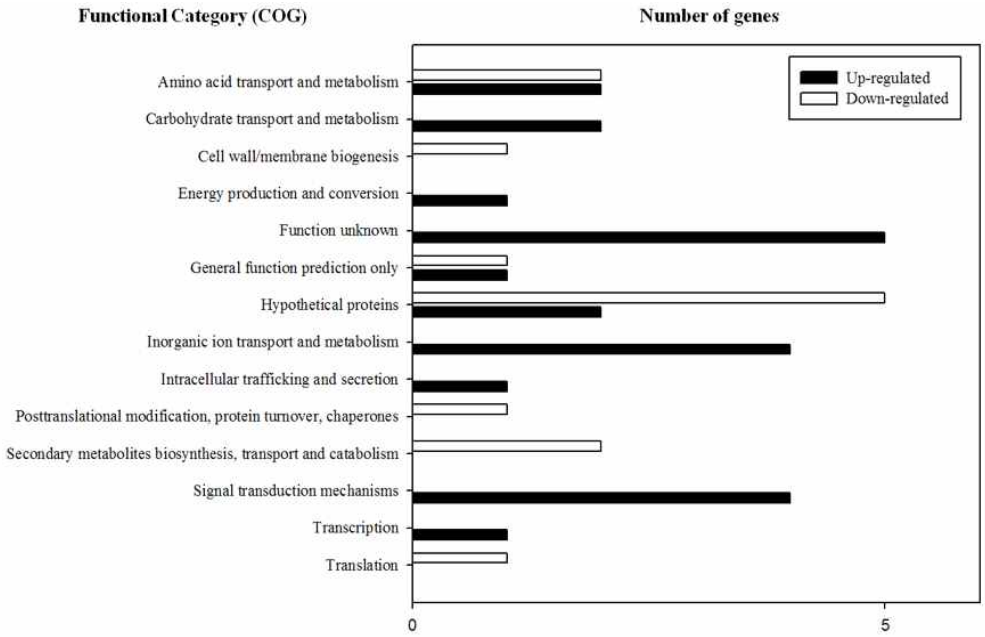
(B) B2/P2


Functional Category (COG)
Number of genes
Amino acid transport and metabolism
Carbohydrate transport and metabolism
Cell cycle control, mitosis and meiosis
Cell motility
Cell wall/membrane biogenesis
Coenzyme transport and metabolism
Defense mechanisms
Energy production and conversion
Function unknown
General function prediction only
Hypothetical proteins
Inorganic ion transport and metabolism
Intracellular trafficking and secretion
Lipid transport and metabolism
Nucleotide transport and metabolism
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
Replication, recombination and repair
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
Signal transduction mechanisms
Transcription
Translation
Up-regulated
Down-regulated
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65

(C) B3/P3


Functional Category (COG)
Number of genes
Amino acid transport and metabolism
Carbohydrate transport and metabolism
Cell cycle control, mitosis and meiosis
Cell motility
Cell wall/membrane biogenesis
Coenzyme transport and metabolism
Defense mechanisms
Energy production and conversion
Function unknown
General function prediction only
Hypothetical proteins
Inorganic ion transport and metabolism
Intracellular trafficking and secretion
Lipid transport and metabolism
Nucleotide transport and metabolism
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
Replication, recombination and repair
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
Signal transduction mechanisms
Transcription
Translation
Up-regulated
Down-regulated
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 110 115 120 125

(D) B2/B1



(E) B3/B2

그림 13. 각 샘플 간의 transcriptome 비교를 통해 결정된 DEG의 기능 분류

○ DEG들의 기능 분류를 결정한 결과 바이오필름에서 특이적으로 발현이 변화한 유전자들은 그 수가 많을 뿐 아니라 유전자의 기능 또한 다양한 분류에 속해있음을 확인함. 이는 패혈증 비브리오균이 바이오필름을 생성하기 위해서 다양한 cellular process의 조절이 필요함을 의미함. 이 중에는 바이오필름 생성에 간접적으로 영향을 미치는 유전자도 있으며 반대로 직접적으로 바이오필름 생성에 관여하는 바이오필름 생성인자의 유전자 또한 포함되어 있음. 따라서 각각의 유전자 및 해당 유전자가 encoding하는 protein에 대한 정보를 Bioinformatics 기반의 방법으로 분석 및 예측함으로써 바이오필름 생성인자 후보를 선정할 수 있음.

다. bioinformatics 기반 바이오필름 생성인자들의 genome-wide level에서 포괄적 동정

○ 바이오필름 상태와 planktonic 상태를 나타내는 샘플들의 RPKM 값들로부터 계산된 fold change를 바탕으로, planktonic 상태에 비해 바이오필름 상태에서 발현이 up-regulated 되거나 바이오필름 생성 단계별로 발현에 특이적인 차이를 보이는 유전자들을 포괄적으로 동정함.

○ Conserved protein domain database를 바탕으로 한 InterProScan (http://www.ebi.ac.uk/interpro/)을 사용하여 각 유전자들이 encoding하는 protein들의 domain 분석 및 예측을 진행하였으며, Clustal Omega (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)를 사용하여 서로 다른 아미노산 서열 간의 sequence alignment를 진행하였음. 이를 통해 각 유전자가 encoding하는 protein의 기능을 예측하고 기존 연구 결과로 밝혀진 바이오필름 생성인자와의 sequence 및 domain homology를 확인하여 바이오필름 생성인자 후보를 선정하였음.

○ Planktonic 상태에 비해 바이오필름 상태에서 발현이 up-regulated 되거나 바이오필름 생성 단계별로 발현에 차이를 보인 유전자 중 gene annotation 정보와 protein domain 예측을 바탕으로 바이오필름 생성인자 후보 5종을 선정함.

표 4. 선정된 바이오필름 생성인자 후보 목록

Locus	Predicted function	Fold change	Note
VV2_1571	calcium binding protein	4.6 (B3/P3)	Identified as *cabABC* operon previously (Park *et al.*, 2015)
VV2_1572	ABC-type protease/lipase transport system, ATPase and permease component	3.2 (B3/P3)	
VV2_1573	membrane-fusion protein	3.2 (B3/P3)	
VV1_3061	RTX toxin and related calcium-binding protein	3.0 (B3/P3)	
VV2_1307	hypothetical protein	7.6 (B3/P3)	
VV2_1308	membrane fusion component of tripartite multidrug resistance system	6.6 (B3/P3)	
VV2_1309	permease of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily	3.1 (B3/P3)	
VV2_0196	opacity protein and related surface antigen	20.2 (B3/P3)	
VV1_2716	agglutination protein	1.6 (B1/B2)	
VV1_2715	RTX toxin and related calcium-binding protein	1.4 (B1/B2)	

○ VV2_1571-1573의 경우 planktonic 상태에 비해 바이오필름 상태에서 각각 4.6배, 3.2배, 3.2배 발현이 증가하였으며 (B3/P3), 바이오필름 생성 단계별로도 초기에 비해 중기에서 각각 7.2배, 6.8배, 4.2배 발현이 증가하였음 (B2/B1). 해당 유전자들은 본 연구진의 기존 연구에서 패혈증비브리오균 바이오필름 생성에 필수적인 matrix protein CabA와 이를 세포 밖으로 분비하기 위해 필요한 type I secretion system의 구성요소 CabBC를 각각 encoding하는 *cabABC* operon으로 동정된 바 있음 (Park et al., 2015). 이는 바이오필름 생성인자를 encoding하는 해당 유전자들이 바이오필름에서 특이적으로 발현이 증가함으로써 패혈증비브리오균의 바이오필름 생성에 기여함을 나타내며, RNA-seq 결과를 바탕으로 바이오필름에서 특이적으로 발현이 증가하는 유전자를 바이오필름 생성인자 후보로 선정하는 것이 타당함을 보여줌.

○ VV1_3061은 planktonic 상태에 비해 바이오필름 상태에서 발현이 3.0배 증가하였고 (B3/P3), gene annotation 상에서 RTX toxins and related calcium-binding proteins에 속하는 protein을 encoding 하는 것으로 나타남. 특히 protein domain 분석에서 기존에 동정된 바이오필름 생성인자인 CabA와 동일한 5개의 hemolycin-type calcium-binding repeats를 갖는 것이 확인되었으며 CabA와 37%의 아미노산 서열 상동성을 나타내었음. 본 연구진의 기존 연구 결과에서 패혈증비브리오균의 바이오필름 생성에 calcium이 필요하며 CabA가 calcium-binding protein으로써 바이오필름 구조 형성에 기여한다는 것이 밝혀진 바 있으므로, VV1_3061이 encoding 하는 protein 또한 calcium과 결합할 수 있는 바이오필름 생성인자일 가능성이 있음.

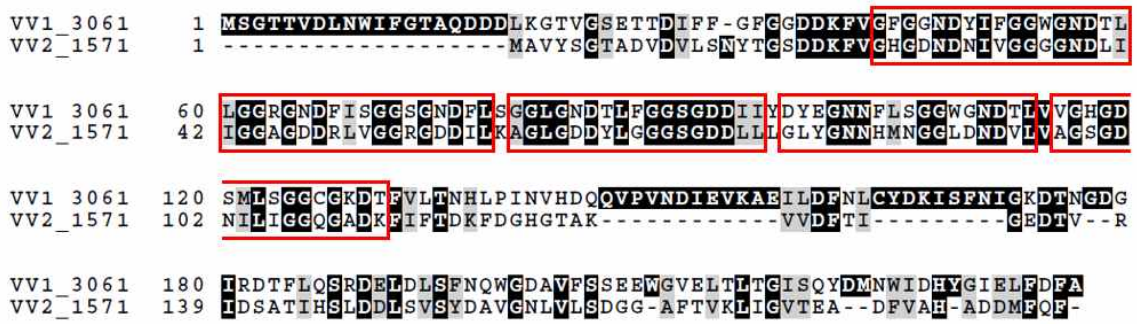


그림 14. VV1_3061와 VV2_1571 (CabA)의 amino acid sequence alignment.

(표시된 곳은 상동성을 갖는 calcium-binding repeats를 나타냄.)

○ VV2_1307-1309는 planktonic 상태에 비해 바이오필름 상태에서 각각 7.6배, 6.6배, 3.1배 발현이 증가하였음 (B3/P3). VV2_1307은 gene annotation 상에서 기능이 예측되지 않는 hypothetical protein을 encoding하는 것으로 명시된 반면 VV2_1308과 VV2_1309는 각각 membrane fusion component of tripartite multidrug resistance system과 permease of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily에 속하는 protein을 encoding 하는 것으로 예측되었음. 바이오필름에서 발현이 증가한 이 3개의 유전자는 genome 상에서 같은 방향으로 연이어 위치하며 본 연구진에서 바이오필름 생성인자로 동정된 *cabABC* operon과 매우 유사한 형태를 나타냄. 또한 VV2_1308과 VV2_1309가 encoding하는 protein들의 예측된 기능이 바이오필름 생성인자 CabA에 대한 secretion system을 구성하는 CabBC와 유사하다는 점에서, VV2_1307은 다른 두 유전자가 encoding 하는 secretion machinery를 통해 세포 밖으로 분비되는 바이오필름 생성인자를 encoding할 가능성이 있음.

그림 15. VV2_1307-1309와 VV2_1571-1573 (*cabABC* operon)의 genome 상 배열 비교

○ VV2_0196은 planktonic 상태에 비해 바이오필름 상태에서 발현이 20.2배 증가하였고 (B3/P3), gene annotation 상에서 opacity protein and related surface antigen을 encoding하는 것으로 예측되었음. Protein domain 분석에서는 outer membrane protein bate-barrel domain을 갖는 것으로 예측되었는데, 이는 주로 outer membrane protein에서 발견되는 membrane-bound beta-barrel fold로써 해당 protein이 세포 밖 surface에 위치할 것이라는 gene annotation 상의 예측과 부합하는 결과임. Colony opacity는 bacteria의 바이오필름 생성 능력을 판단하는 중요한 지표 중 하나이며 protein의 위치 또한 바이오필름 생성에 직접적인 영향을 미칠 수 있는 세포의 outer membrane surface로 예측되므로 VV2_0196은 바이오필름 생성인자를 encoding할 가능성이 있음.

○ VV1_2716은 바이오필름 중기에 비해 초기에서 발현이 1.6배 증가하였고 (B1/B2), gene annotation 상에서 agglutination protein을 encoding하는 것으로 예측됨. Protein domain 분석에서는 특정한 domain이 발견되지는 않았으나 outer membrane efflux protein의 특징을 공유하는 것으로 나타남. 아미노산 서열의 유사성을 바탕으로 했을 때 VV1_2716이 encoding하는 protein은 *Shewanella oneidensis*의 agglutination protein으로 동정된 AggA와 42%의 상동성을 갖는 것으로 나타났는데, AggA는 baterial cell과 외부 표면 사이의 부착에 관여하며 바이오필름의 일종인 pellicle 생성에 필수적인 기능을 하는 것으로 밝혀진 바 있음 (Liang et al., 2010), 따라서 VV1_2716 또한 AggA와 유사한 바이오필름 생성인자를 encoding 하거나 혹은 생성인자를 세포 밖으로 분비하는 secretion machinery의 구성요소를 encoding할 가능성이 있음.

○ VV1_2715는 바이오필름 중기에 비해 초기에서 발현이 1.4배 증가하였고 (B1/B2), gene annotation 상에서 RTX toxins and related calcium-binding proteins에 속하는 protein을 encoding 하는 것으로 예측되었음. 특히 protein domain 분석에서 바이오필름 생성인자 CabA와 동일한 type의 calcium-binding repeats와 type 1 secretion system에 의한 secretion과 관련된 type I secretion C-terminal target domain을 C-terminal에 가지는 것으로 예측됨. 따라서 VV1_2715이 encoding하는 protein은 CabA와 유사하게 세포 밖으로 분비되어 calcium-binding을 통해 바이오필름 생성에 관여하는 바이오필름 생성인자일 가능성이 존재함.

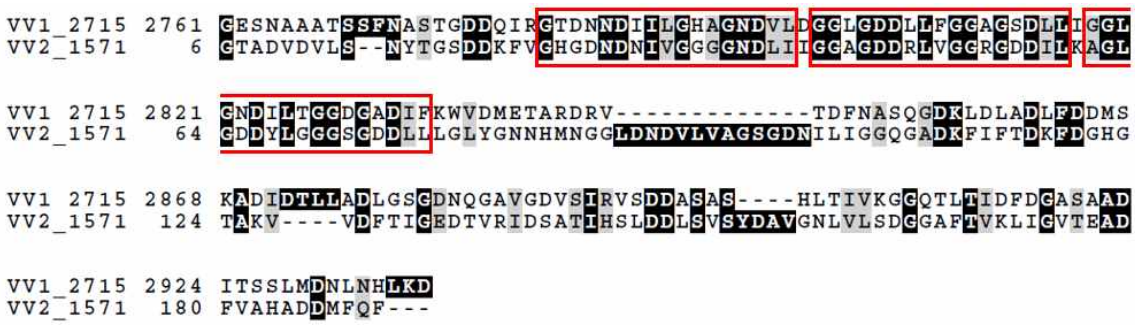


그림 16. VV1_2715와 VV2_1571 (CabA)의 amino acid sequence alignment.
(상동성을 갖는 부분만 나타내었으며, 표시된 곳은 calcium-binding repeats를 나타냄.)

2. 식중독 균 바이오필름의 생물학적/물리적 제어 기술 개발 (1차년도, 협동 2)

가. 황색포도상구균 (*S. aureus*) 저해 신규 박테리오파지 분리

○ *S. aureus* 균을 특이적으로 제어하는 박테리오파지를 분리하기 위해 흙이나 분변과 같은 환경 샘플을 채취한 후, bag mixer를 이용해서 BPD 완충용액과 섞어 잘게 부순 후, tryptic soy broth에서 1차 증식시켰음.

○ 1차 증식시킨 sample을 원심분리 (15,000 x g, 10 min)하여 상층액을 2차로 LB broth에서 목표 병원균인 *S. aureus* 와 함께 증식시켰음. 그 후 2차 증식한 sample을 다시 원심분리 (15,000 x g, 10 min) 하여 상층액을 filtration (0.2-μm in pore size) 한 후, double layer plate에 dotting assay로 plaque가 형성됨을 확인함으로써 박테리오파지의 존재를 파악하였음.

○ Single plaque purification을 3~4회 이상 진행하여 박테리오파지를 순수하게 분리하였음. 이와 같은 실험 과정을 통해 4종의 박테리오파지를 분리하였으며, 이는 host 균주에 대해 투명한 plaque를 형성하였음.

○ TEM analysis를 위해 1010 PFU/mL 농도의 박테리오파지 stock을 carbon-coated grid에 aqueous uranyl acetate로 negative staining하여 준비하였음. 전자현미경은 Jeol model JEM1010을 사용하였고, 80 kV의 조건에서 분석하여 50,000x~200,000x 배율로 전자현미경 사진을 얻었음.

○ 총 10종의 박테리오파지의 형태학적 결과를 바탕으로 International Committee of Taxonomy of Viruses에서 제시한 기준에 따라 박테리오파지 head의 크기, tail의 길이, 외피의 유무 등을 확인하여 박테리오파지를 분류한 결과, HSA84, HSA85와 HSA86은 비수축성, 유연한 꼬리를 가진 *Siphivoridae* family, 그리고 HSA30은 수축성 꼬리를 가진 Myoviridae family에 속하는 것을 알 수 있었음.

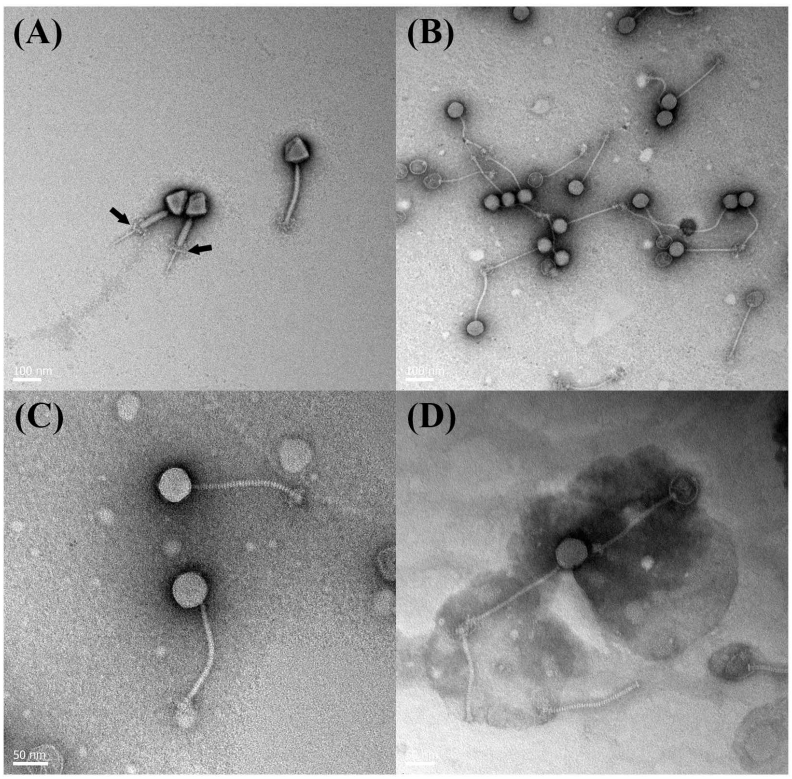


그림 17. 신규 박테리오파지의 전자현미경 이미지 a) HSA30, b) HSA84, c) HSA85, d) HSA86

표 5. 신규 *S. aureus* 박테리오파지의 형태학적 분석

Phage	Family	Tail length (nm)	Capsid diameter (nm)
HSA30	Myoviridae	198 ± 10	76.1 ± 3.8
HSA84	Siphoviridae	195 ± 38	52.2 ± 3.4
HSA85		181 ± 17	55.2 ± 2.5
HSA86		170 ± 11	54.6 ± 3.1

나. 박테리오파지 host range 분석

○ 분리된 박테리오파지의 host range를 확인하기 위해 각각의 박테리오파지를 총 24종의 균주 (17종의 *Staphylococcus*, 3종의 다른 그람 양성 균주, 4종의 그람 음성 균주)에 대해서 spotting assay를 수행하였음.

○ 그 결과, 분리된 모든 박테리오파지는 *Staphylococcus*의 genus 레벨의 높은 특이성을 가지고 있는 것을 확인하였음. 특히, HSA30의 경우 2종의 Metichillin-resistant *S. aureus* 를 포함하여 대부분의 *S. aureus*에 대해서 균 사멸 효과를 보였음.

○ HSA84, HSA85와 HSA86의 경우, 비슷한 숙주 감염 범위를 나타내었으나, 그 중 HSA84는 투명한 plaque를 다른 두 박테리오파지에 비해 clear plaque를 많이 형성한 것을 확인하였음.

표 6. 신규 *S. aureus* 박테리오파지의 host range

Bacterial host	Plaque formation			
	HSA30	HSA84	HAS85	HAS86
S. aureus RN4220	T	C	C	C
S. aureus Newman	C	-	-	-
S. aureus ATCC 13301	T	-	-	-
S. aureus ATCC 23235	T	-	-	-
S. aureus ATCC 33586	T	-	-	-
S. aureus ATCC 33593	-	T	T	T
S. aureus KTCC 1916	T	C	T	T
S. aureus ATCC 6538	T	C	C	C
S. aureus ATCC 29213	T	C	T	T
S. aureus ATCC 12600	T	C	T	T
MRSA CCARM 3793	C	-	-	-
MRSA CCARM 3090	T	-	T	T
MRSA CCARM 3089	I	C	C	C
S. haemolyticus ATCC 29970	I	T	-	-
S. epidermidis ATCC 35983	-	T	T	T
S. hominis ATCC 37844	T	-	-	-
S. warneri ATCC 10209	C	-	-	-
Other Gram-positive bacteria				
Enterococcus faecalis ATCC 29212	-	-	-	-
Bacillus cereus ATCC 14579	-	-	-	-
Bacillus subtilis ATCC 23857	I	-	-	-
Other Gram-negative bacteria				
Salmonella Typhimurium SL1344	-	-	-	-
Escherichia coli MG1655 ATCC 47076	-	-	-	-
Cronobacter sakazakii ATCC 29544	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	-	-	-	-

C: clear plaque; T: turbid plaque; -: no plaque; I: inhibition zone

다. Bacterial growth challenge assay

○ 분리된 박테리오파지의 숙주균 용해능을 비교하는 실험을 진행하였으며, 방법은 다음과 같았음. 1) Tryptic Soy Broth (이하 TSB)에 각 숙주균을 접종한 후, 37°C의 교반 조건에서 early-exponential growth phase까지 배양하였음. 2) 각각의 박테리오파지를 숙주균에 Multiplicity of infection (이하 MOI) 1으로 접종하고 OD값의 감소를 모니터링 함으로써 숙주균 사멸 효과를 확인하였음. 그 결과, 모든 박테리오파지가 infection 후 1시간 이내 균 생장 저해능을 보였으며, 그 활성이 HSA30은 약 19시간, 그리고 나머지 3개의 박테리오파지는 약 10시간 동안 지속되는 것을 알 수 있었음.

○ 위의 실험 결과를 비롯하여 HSA84, HSA85, HSA86은 숙주 감염 범위와 형태학적 분류 또한 유사함으로 분자생물학적으로 유사한 박테리오파지일 가능성이 높아 보였음. 따라서 분리된 박테리오파지 중 가장 넓은 숙주 감염 범위를 가지고 *Myoviridae* family에 속하는 HSA30과 *Siphoviridae* 박테리오파지 중 숙주 용해능이 가장 우수한 HSA84에 대한 추가적인 특성 분석을 진행하였음.

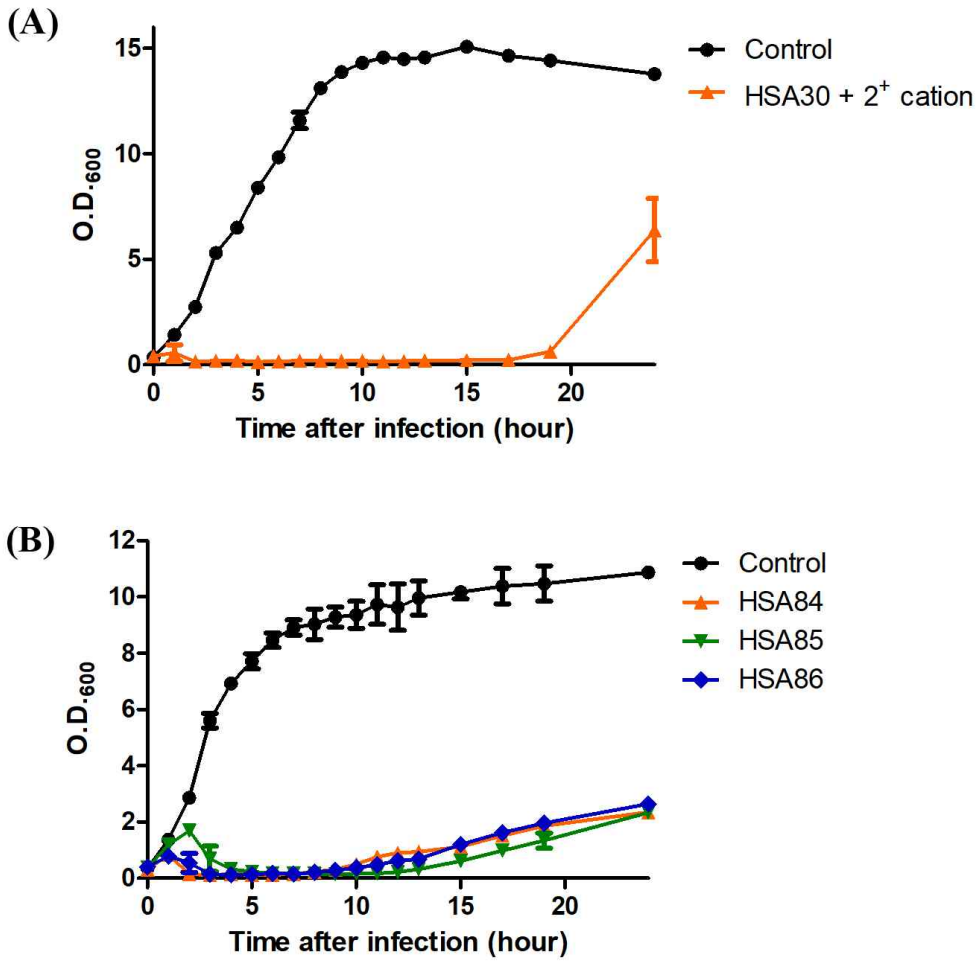


그림 18. 신규 *S. aureus* 저해 박테리오파지의 숙주 용해능 분석

(a) *S. aureus* #130, b) *S. aureus* RN 4220 (10^8 PFU/mL), MOI of 1)

라. Adsorption assay

○ 박테리오파지의 숙주 부착능을 확인하기 위한 adsorption assay은 다음과 같은 방법으로 진행하였음. 1) TSB에 각 숙주균을 접종시킨 후 37°C 교반조건에서 exponential growth phase (OD_{600}=1.0~1.5)까지 배양하였음. 2) 각 박테리오파지를 MOI 0.01로 접종 후 37°C에서 정치배양을 한 후, 5분 간격으로 sampling 하였음. 3) 얻은 샘플을 원심분리한 후, 상등액에 잔류하는 박테리오파지의 양을 측정하였음.

○ 이를 통해 숙주균에 흡착하지 않은 박테리오파지의 양을 예측함으로써 각 박테리오파지의 adsorption efficiency를 확인할 수 있었음. HSA30와 HSA84는 숙주균에 60분동안 감염시켰을 때 각각 80%, 90%의 박테리오파지가 부착되는 것을 확인하였음.

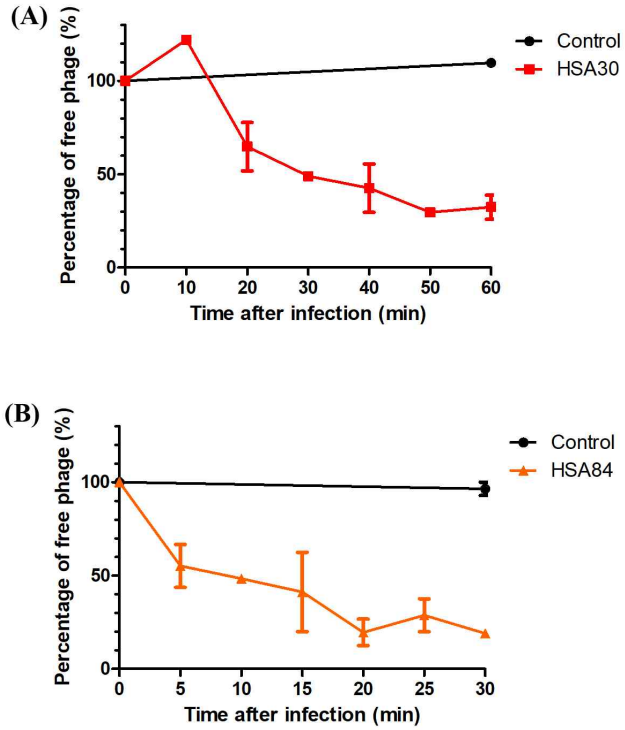


그림 19. Adsorption assay 결과 a) HSA30, b) HSA84.

마. One-step growth curve

○ HSA30과 HSA84의 one-step growth pattern을 파악하기 위하여 다음과 같이 실험을 수행하였음. 우선, TSB에 접종된 숙주균을 early-exponential phase까지 배양시킨 후, 각 박테리오파지를 MOI 0.001로 5분 동안 감염시켰음. 이후, 원심분리를 통해 획득한 pellet을 획득하였고 새로운 TSB에 균일하게 풀어준 후 37°C 교반조건에서 배양하였고, 5분 간격으로 60분 동안 두 세트의 샘플을 획득하였음. 이 때, 한 샘플에는 chloroform을 처리하여 세포 내에 잔류하는 박테리오파지의 양을 측정하였음.

○ 그 결과, HSA30은 숙주균 감염 후 약 25 분 후부터 숙주균을 용해하고 빠져나오는 것으로 관찰되었음. 또한 하나의 virion이 숙주에 감염된 후, 한 번에 80 마리 정도의 virion이 증폭되어 빠져나오는 것으로 확인되었음. 반면, HSA84의 경우, 숙주균 감염 후 30분 후부터 숙주균을 용해하고 빠져나왔으며, 한 번에 30 마리 정도의 virion이 증폭되어 나오는 것으로 관찰되었음.

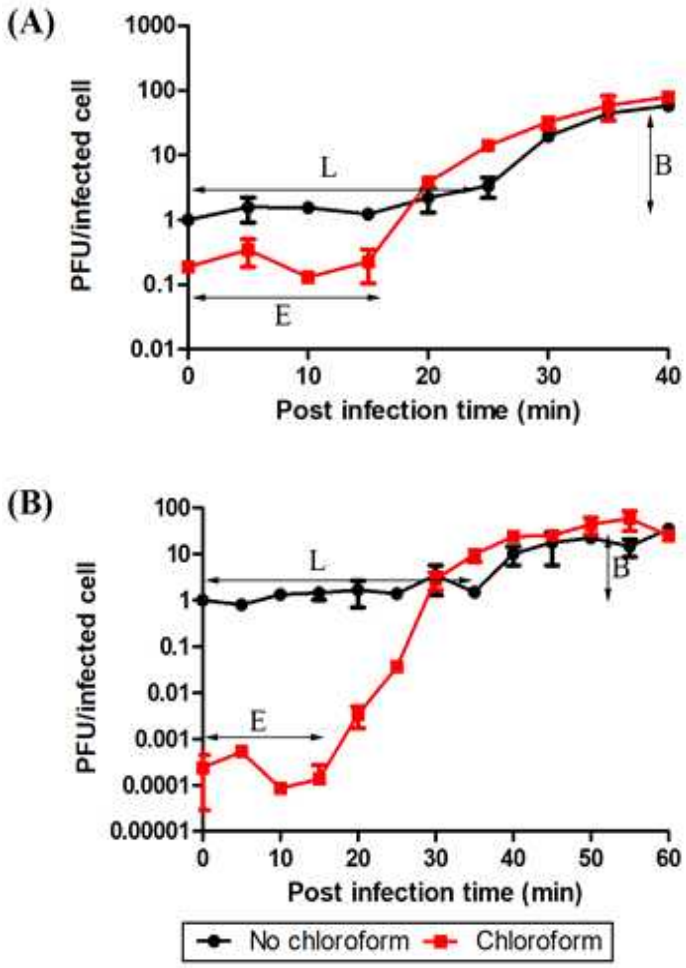


그림 20. *S. aureus* 저해 박테리오파지의 one-step growth curve, a) HSA30, b) HSA84.

바. 박테리오파지 유전체 분석

○ HSA30과 HSA84 유전체 분석을 통해 각 박테리오파지의 분자생물학적 특성을 확인하였음.

○ 우선, phenol/chloroform을 이용해 박테리오파지의 유전자를 추출하였고, 에탄올 침전법을 통해 추출된 DNA를 농축 및 정제하였음. 정제된 DNA의 시퀀싱은 Illumina Miseq (Illumina, San Diego, CA, USA)을 통해 이뤄졌고, CLC Genomics Workbench (Qiagen, Venolo, Netherlands)를 통해 조립되었음. 이후, 조립된 유전체는 RAST와 BLAST를 비롯한 다양한 소프트웨어를 통해 annotation 되었음.

○ HSA30의 유전체를 분석한 결과, 약 140 kb, 이중나선의 고리모양 DNA로 확인되었음. 본 유전체는 30.2%의 G+C함량을 가지며, 224개의 open reading frame (ORF)를 비롯하여 3개의 tRNA가 예측되었음. HSA30은 *Myoviridae* family 박테리오파지에 특이적인 tail sheath protein 형성에 관하는 유전자가 예측되었음. 또한, 응용이 가능한 숙주 용해 단백질인 엔돌라이신과 putative 테일 라이신이 발견되었고, 독성인자 및 항생제 내성 유전자가 존재하지 않음을 확인하였음. 하지만, 용원 형성에 관여하는 단백질인 recombinase와 resolvase 관련 유전자가 확인되었음.

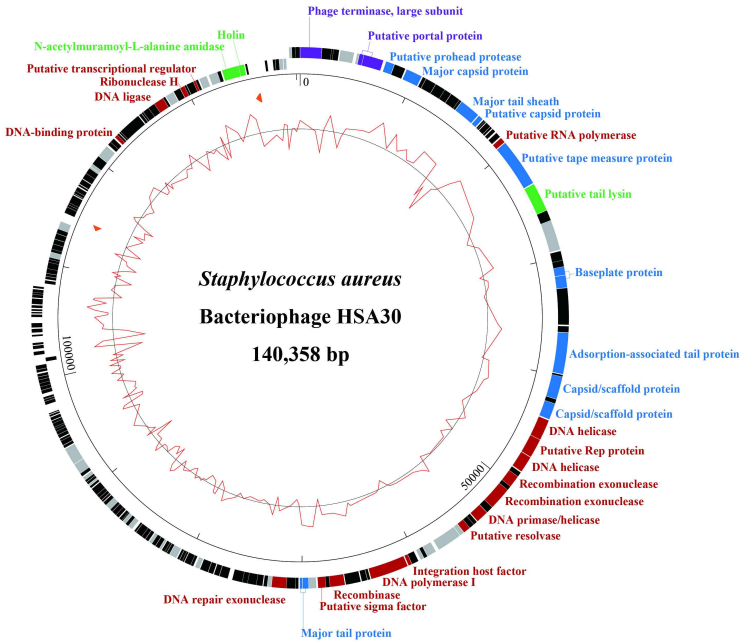


그림 21. 박테리오파지 HSA30 의 유전체 지도

○ HSA84의 유전체는 약 43 kb 크기의 이중나선 DNA로 이루어져 있었으며, 60개의 ORF가 예측되었음. HSA84의 유전체 또한 엔돌라이신과 putative 테일 라이신이 예측되었고, 위험요소 (독성인자 및 항생제 내성 유전자)가 발견되지 않았음. 특이적으로, 유전체에 용균/용원 결정 유전자가 존재하는 것을 보아 HSA84는 용원성 박테리오파지임을 알 수 있었음.

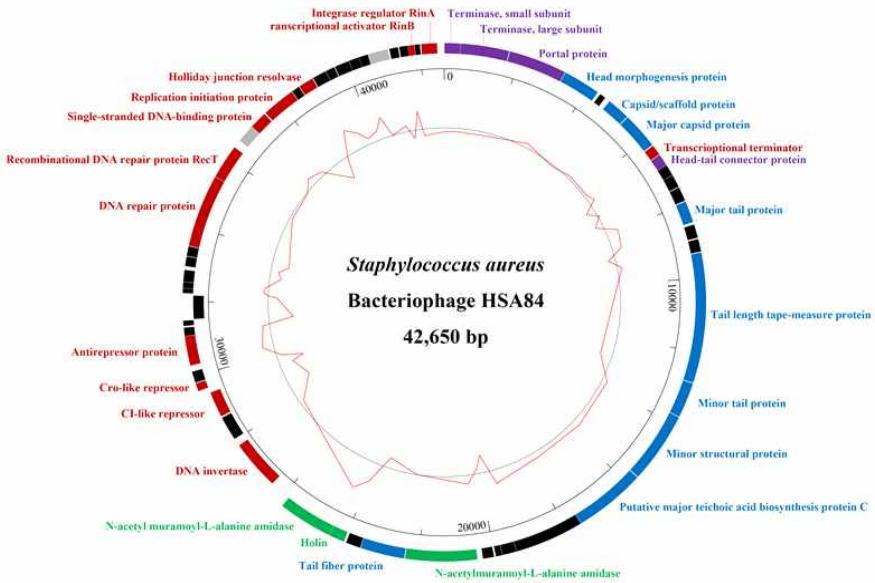


그림 22. 박테리오파지 HSA84 의 유전체 지도

사. 신규 *S. aureus* 저해 박테리오파지 추가 분리

○ 앞서 분리한 박테리오파지의 특성 분석 결과, 용원성 생활사를 보이는 *Sipoviridae* family에 속하는 박테리오파지가 다수 분리되었고, *Myoviridae*에 속하는 박테리오파지가 1종 분리 되었으나, 숙주 균 사멸을 위해 양이온이 필요하다는 점과 유전체 분석 결과 용원 형성에 관련된 유전자가 존재하는 것으로 확인되어, 추가적인 박테리오파지 분리 과정을 진행하기로 하였음.

○ *S. aureus* 균을 특이적으로 제어하는 박테리오파지를 분리하기 위해 흙이나 분변과 같은 환경 샘플을 채취한 후, bag mixer를 이용해서 SM 완충용액과 섞어 잘게 부순 후, tryptic soy broth에서 1차로 증식시켰음.

○ 1차로 증식시킨 sample을 원심분리 (15,000 x g, 10 min)하여 상층액을 2차로 tryptic soy broth에서 목표 병원균인 *S. aureus* 와 함께 증식하였음.

○ 그 후 2차 증식한 sample을 다시 원심분리 (15,000 x g, 10 min) 하여 상층액을 filtration (0.2-μm in pore size) 한 후, double layer plate에 dotting assay로 plaque가 형성됨을 확인함으로써 박테리오파지의 존재를 파악하였고, single plaque purification을 3~4회 이상 진행하여 박테리오파지를 순수하게 분리하였음.

○ 이와 같은 실험 과정을 통해 7 종의 박테리오파지를 분리하였으며, 이는 host 균주에 대해 투명한 plaque를 형성하였음.

표 7. *S. aureus* 저해 박테리오파지 2차 분리

Phage designation	Source	Host strain
CSA5	유입수	*S. aureus* Livestock isolate 131
CSA13	닭	*S. aureus* Clinical isolate FMB_1
CSA24	오리	*S. aureus* CCARM 3793
CSA6	오리	*S. aureus* RN 4220
CSA7	오리	*S. aureus* RN 4220
CSA9	닭	*S. aureus* RN 4220
CSA10	닭	*S. aureus* RN 4220

아. 신규 박테리오파지 7종에 대한 전자현미경 분석

○ TEM analysis를 위해 1010 PFU/mL 농도의 박테리오파지 stock을 carbon-coated grid에 aqueous uranyl acetate로 negative staining하여 준비하였음.

○ 전자현미경은 Jeol model JEM1010을 사용하였고, 80 kV의 조건에서 분석하여 50,000x~200,000x 배율로 전자현미경 사진을 얻었음.

○ 7종의 박테리오파지의 형태학적 결과를 바탕으로 International Committee of Taxonomy of Viruses에서 제시한 기준에 따라 박테리오파지 head의 크기, tail의 길이, 외피의 유무 등을 확인하여 박테리오파지를 분류한 결과, CSA5는 77nm의 icosahedral head와 153 nm의 수축성 꼬리를 지니는 *Myoviridae* family에 속하였음.

○ CSA13는 40 nm, CSA24는 36 nm의 icosahedral head가 확인되었으며, 두 박테리오파지 모두 공통적으로 짧은 비수축성 꼬리를 지니는 *Podoviridae* family에 속하는 박테리오파지로 확인되었음.

○ CSA6, CSA7, CSA9, 그리고 CSA10는 공통적으로 약 40 nm 크기의 icosahedral head와 유연한 비수축성 꼬리를 갖는 *Siphoviridae* family에 속하였음.

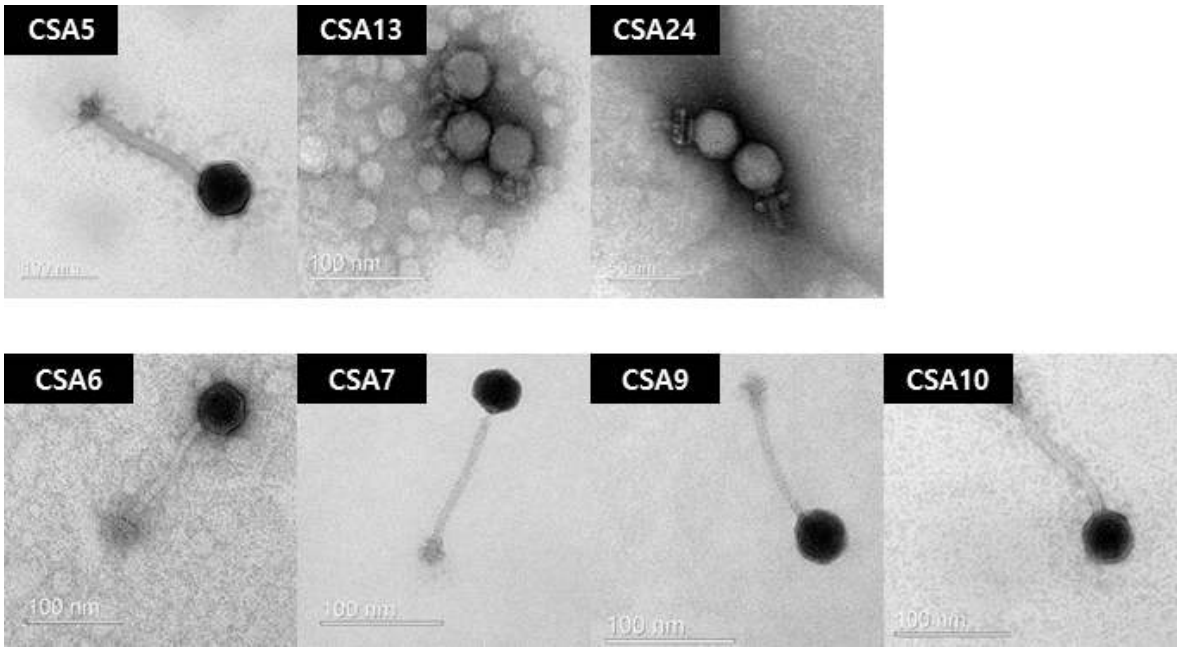


그림 23. 2차 분리된 박테리오파지의 전자현미경 이미지

자. 2차 분리 박테리오파지의 숙주 저해능 분석

○ *S. aureus*를 특이적으로 용해하는 박테리오파지의 용해능을 확인하기 위해 CSA5에 대해서는 *S. aureus* clinical isolate 131, CSA13에 대해서는 *S. aureus* clinical isolate FMB-1, 그리고 CSA24에 대해서는 *S. aureus* CCARM3793, 그 외의 박테리오파지에 대해서는 *S. aureus* RN4220을 숙주로 사용하여 inhibition test를 수행하였음.

○ TSB에 균 접종 후, 37°C의 교반 조건에서 배양하였으며, MOI값은 1로 하여 박테리오파지를 host에 처리했을 때 host culture의 OD_{600} 값 감소를 monitoring함으로써 박테리오파지의 용해능을 측정하였음.

○ 이 때, CSA6, CSA7, CSA9, 그리고 CSA10의 경우 숙주에 감염되기 위해 양이온을 필요로 하므로, 10 mM의 $MgCl_2$와 $CaCl_2$를 첨가하였음.

○ 그 결과, CSA5, CSA13, 그리고 CSA24 모두 1시간 이내에 균 생장 저해능을 보였으며, CSA5는 14시간, CSA24는 10시간, 그리고 CSA13은 23시간 동안 그 활성이 지속됨을 확인하였음. CSA6, CSA10의 경우 초기에는 host culture의 OD_{600} 값이 점차 증가하는 경향을 보였으나, 약 2시간 이내에 균 성장 저해능을 보였으며, 그 활성은 2시간 정도 지속됨을 확인하였음.

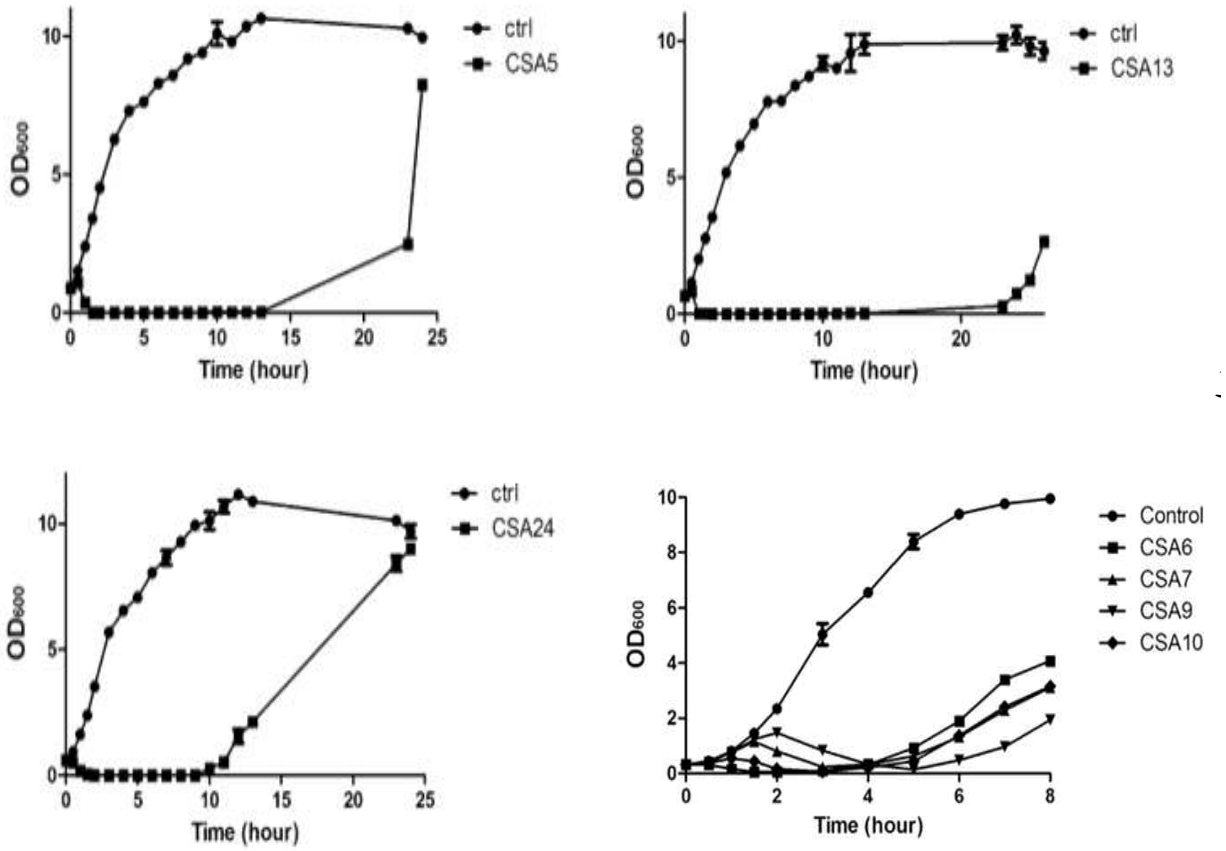


그림 24. 2차 분리된 박테리오파지의 숙주 저해능 분석

차. Host range 측정

○ 분리된 박테리오파지들의 host range를 알아보기 위해서 다수의 *S. aureus* 표준 균주와 기타 속의 staphylococcal 균주들에 대해 spotting assay를 수행하였음.

○ 그 결과, CSA13 박테리오파지의 경우 시험한 2종의 MRSA를 포함한 14종의 *S. aurueus* 균주와 2종의 staphylococcal 균주에 감염하여 투명한 plaque를 형성하였고, 가장 넓은 균주 용균 범위를 가짐을 확인할 수 있었음.

○ CSA24는 7종의 *S. aureus* 균주와 1종의 staphylococcal 균주에 감염하여 투명한 plaque를 형성하였음. CSA5는 5종의 *S. aureus* 균주와 1종의 staphylococcal 균주에 감염하여 투명한 plaque를 형성하였음. 반면, CSA6, CSA7, CSA9, 그리고 CSA10의 경우 공통적으로 *S. aureus* RN4220에 대해서만 투명한 plaque을 형성하였으며, 이외의 staphylococcal strain에 대해서는 균 사멸 효과가 매우 낮거나 없는 것을 나타내었음.

표 8. *S. aureus* 및 기타 균주에 대한 host range

Bacterial host / Staphylococcal strain	CSA5	CSA13	CSA24	CSA6	CSA7	CSA8	CSA9
S. aureus RN4220	T	T	-	++	++	++	++
S. aureus Newman	++	I	I	I	I	I	I
S. aureus ATCC 13301	T	++	I	-	-	I	-
S. aureus ATCC 23235	++	T	++	I	I	I	I
S. aureus ATCC 33586	++	T	-	I	I	T	-
S. aureus ATCC 33593	I	++	++	I	I	T	-
S. aureus ATCC 1916	T	++	++	I	I	I	T
S. aureus ATCC 6538	T	++	++	T	I	I	I
S. aureus ATCC 29213	++	++	++	T	T	I	I
S. aureus ATCC 12600	I	T	++	I	I	T	I
MRSA CCARM 3793	++	++	++	I	T	I	T
MRSA CCARM 3089	T	++	-	-	-	I	-
MRSA CCARM 3090	T	I	I	-	-	I	-
S. haemolyticus ATCC 29970	T	I	I	T	I	T	I
S. epidermidis ATCC 35983	I	++	T	-	I	I	I
S. hominis ATCC 37844	++	++	++	I	T	T	T
S. warneri ATCC 10209	T	T	-	-	-	-	-
Other Gram positive bacteria							
Enterococcus faecalis ATCC 29212	_	_	_	_	_	_	_
Bacillus cereus ATCC 14579	_	_	_	_	_	_	_
Bacillus subtilis ATCC 23857	_	_	_	_	_	_	_
Listeria monocytogenes ATCC 19114	_	_	_	_	_	_	_
Other Gram negative bacteria							
Sarmonella enterica serovar Typhimurium SL 1344	_	_	_	_	_	_	_
Escherichia coli MG1655 ATCC 47076	_	_	_	_	_	_	_
Cronobacter sakazakii ATCC 29544	_	_	_	_	_	_	_
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	_	_	_	_	_	_	_

++, clear plaque; T, turbid plaque; -, non-specific; I, inhibition zone

표 9. 임상 분리 *S. aureus* 균주에 대한 host range

Bacterial host Staphylococcal strain	Sources	CSA5	CSA9	CSA13	CSA24
129	축산물 isolate	T	T	++	-
130	축산물 isolate	T	I	T	-
131	축산물 isolate	++	-	T	I
134	축산물 isolate	++	++	++	T
clinical isolate 0055	경상대학교 의대 병원	++	T	++	T
clinical isolate 0136	경상대학교 의대 병원	-	-	++	-
clinical isolate 0154	경상대학교 의대 병원	T	I	T	-
clinical isolate 0212	경상대학교 의대 병원	T	I	T	T
clinical isolate 0600	경상대학교 의대 병원	++	I	++	T
clinical isolate-FMB_1	병원솜에서 분리	T	I	++	-
clinical isolate-FMB_2	성모병원 환자 , 욕창환자	I	-	I	-
clinical isolate-FMB_3	성모병원 환자 엉덩이피부	I	-	I	-
cow milk isolate-FMB_4	유방염에 걸린 소 젖	++	I	I	-
77	사람 isolate	T	T	T	-
79	사람 isolate	T	I	T	-
80	사람 isolate	T	I	++	-
81	사람 isolate	I	I	T	-
82	사람 isolate	T	I	T	-

++, clear plaque; T, turbid plaque; -, non-specific; I, inhibition zone

카. 박테리오파지 CSA5 and CSA13의 host receptor 확인

○ Peptidoglycan 층의 wall teichoic acid coding gene인 *tagO* gene을 mutation시킨 돌연변이 균주를 활용하여 *S. aureus* 박테리오파지 CSA5와 CSA13의 박테리오파지 receptor를 탐색하였음.

○ Mutant에 spotting assay로 확인한 결과, 두 박테리오파지 모두 wall teichoic acid를 receptor로 갖는다는 결과를 얻었음.

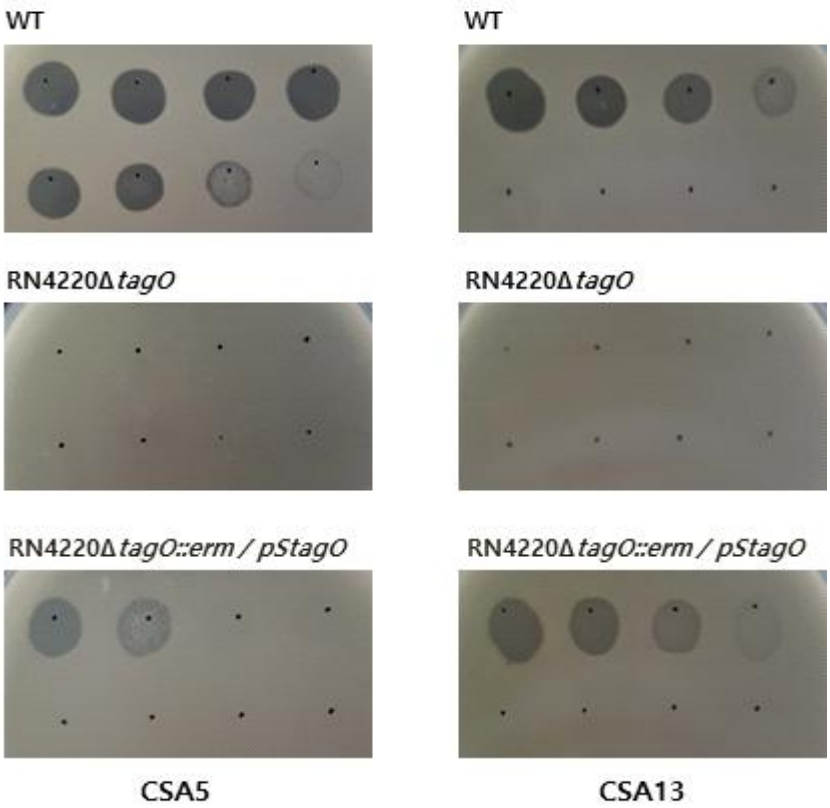


그림 25. 박테리오파지 CSA5 and CSA13의 wall teichoic acid receptor 확인

타. 2차 분리 박테리오파지 유전체 분석

○ Host range가 넓고, 균 사멸 효과가 우수하며, 용균성 생활사를 갖는다고 알려진 *Myoviridae*와 *Podoviridae*에 속하는 박테리오파지 CSA24, CSA5, CSA13이 추후 연구를 위해 선정되었고, 각 박테리오파지의 분자생물학적 특성을 확인하기 위해 시퀀싱을 완료하였음.

○ Phenol/chloroform을 이용해 박테리오파지의 유전자를 추출하였고, 에탄올 침전법을 통해 추출된 DNA를 농축 및 정제하였음. 정제된 DNA의 시퀀싱은 Illumina Miseq (Illumina, San Diego, CA, USA)을 통해 이뤄졌고, CLC Genomics Workbench (Qiagen, Venolo, Netherlands)를 통해 유전체 분석을 진행 중에 있음.

파. 초고온 과열 증기 기술의 식중독 균 바이오필름 제어 효과 검증

○ 첫 번째 식품접촉표면은 stainless steel No.4를 사용하였으며 coupon (5*2 cm) 형태로 절단하여 사용하였고 실험에 사용하기 전 autoclave를 통해 표면에 존재하는 다른 미생물을 멸균하였음.

○ 바이오필름 형성을 위해 황색포도상구균을 tryptic soy broth (TSB)에서 24시간 동안 배양한 후 원심분리를 통해 균체를 모았으며 PBS buffer에 다시 희석하여 10^{8}~10^{9}CFU/mL 농도로 50 mL conical tube에 30 mL씩 분주하였음.

○ 준비된 균액에 stainless steel No.4 coupon을 담가 4℃에서 24시간동안 균을 부착시킴.

○ 그 이후 coupon을 PBS buffer로부터 꺼내어 멸균증류수를 이용하여 washing해 줌으로써 부착되지 않은 균을 제거한 후 30mL의 TSB 용액이 담긴 conical tube에 옮겨 25℃에서 5일간 배양하며 황색포도상구균 바이오필름을 형성시킴.

○ 5일 후 바이오필름이 형성된 coupon을 사용하여 100℃ 포화 증기 및 125℃, 150℃ 초고온 과열 증기를 최대 20초간 처리한 후 황색포도상구균 바이오필름의 저감화 정도를 확인함.

그림 26. 본 실험에 사용된 lab scale 초고온 과열 증기 발생 장비

○ 1차년도 실험에는 상기 그림과 같은 lab scale 포화 증기 및 초고온 과열 증기 발생 장비를 이용하여 실험을 수행함.

○ 검출 배지로는 황색포도상구균의 선택분별배지인 Baird Parker agar를 사용함.

○ 100℃ 포화 증기 및 125℃, 150℃ 초고온 과열 증기 처리에 따른 stainless steel No.4 표면 내 황색포도상구균 바이오필름 저감화 결과는 아래 그림과 같음. 100℃ 포화 증기 처리 시 7초까지는 125℃ 및 150℃ 초고온 과열 증기 처리와 유사한 저감화 정도를 나타내며 4 log 정도의 저감화가 일어났으나 그 후 저감화 속도가 감소하는 경향이 나타났으며 20초 처리를 통해 검출한계 이하 (1.48 log CFU/coupon)로 저감화 되는 것을 확인하였음.

○ 초고온 과열 증기 처리는 100℃ 포화 증기에 비해 황색포도상구균 바이오필름 제어에 더 좋은 효과를 나타내는 것을 확인하였음. 125℃ 초고온 과열 증기를 처리하였을 때 15초 처리 후 황색포도상구균 바이오필름이 검출한계 이하로 저감화 되었으며 150℃ 초고온 과열 증기를 처리하였을 때는 10초 처리 후 황색포도상구균 바이오필름이 검출한계 이하로 저감화 되었음.

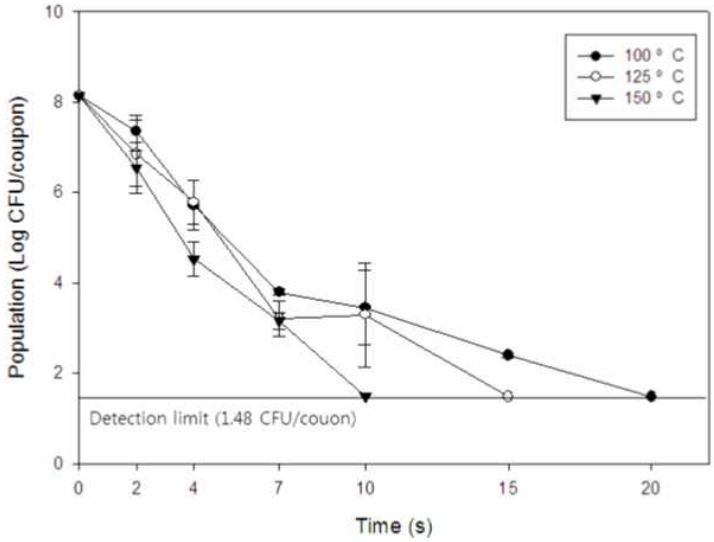


그림 27. 100℃ 포화 증기 및 125℃, 150℃ 초고온 과열 증기 처리에 따른 stainless steel No.4 표면 내 황색포도상구균 바이오필름 저감화

하. 표면 종류에 따른 초고온 과열 증기의 식중독 균 바이오필름 제어 효과 검증

○ 추가적인 식품접촉표면 샘플 선정에 있어서는 식품산업 현장에서 폭넓게 사용되는 동시에 표면의 hydrophobicity, roughness, 열전도도 등의 특성이 다른 것을 선정함.

○ 샘플표면의 hydrophobicity 및 roughness는 각각 water contact angle 측정 및 white light scanning interferometry 측정기를 이용하여 확인함.

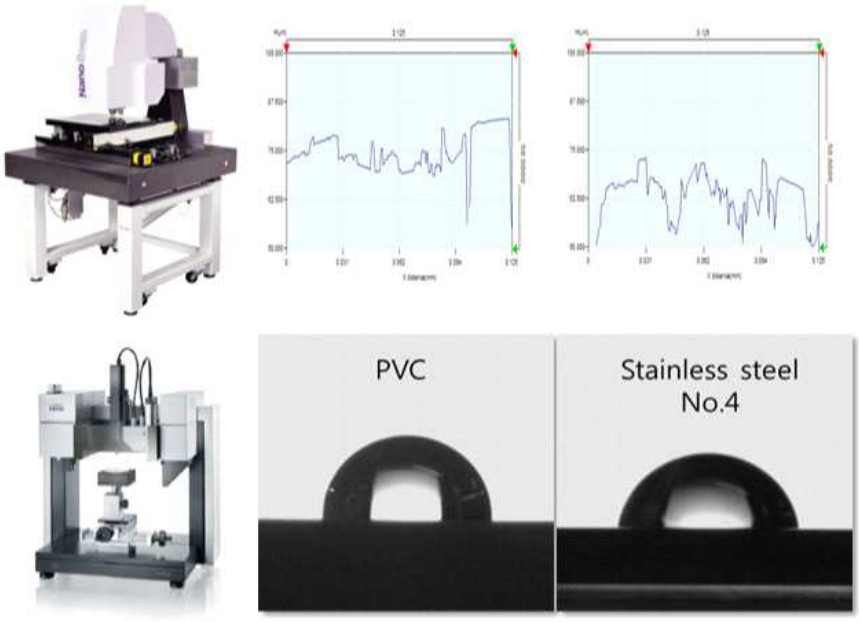


그림 28. 샘플표면의 특성 측정에 사용된 water contact angle 측정 장비 및 white light scanning interferometry 측정 장비

○ 이러한 과정을 통해 stainless steel 2B, HDPE, PP 재질을 선정하였으며 상기와 동일한 방식으로 coupon 형태로 제작하여 황색포도상구균의 바이오필름을 형성시킴.

○ 형성된 황색포도상구균 바이오필름에 포화 증기 및 초고온 과열 증기를 처리하는 과정은 상기 방법과 동일함.

○ 식품접촉표면 4종에 대한 water contact angle 수치는 아래 표와 같음. 일반적으로 water contact angle이 65° 이상일 경우 hydrophobic하다고 판단하므로 본 실험의 사용된 4종의 샘플 표면은 모두 hydrophobic한 특성을 나타내었음. 그 중 stainless steel 2B 및 HDPE가 stainless steel No.4 및 PP에 비해 hydrophobicity가 유의적으로 높은 것을 알 수 있었으며 stainless steel 2B 및 HDPE, stainless steel No.4 및 PP 재질의 hydrophobicity는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났음.

표 10. 식품접촉표면의 water contact angle 값

샘플	Water contact angle (°)
Stainless steel No.4	85.6±1.5B
Stainless steel 2B	96.8±1.8A
HDPE	96.6±2.8A
PP	86.9±1.7B

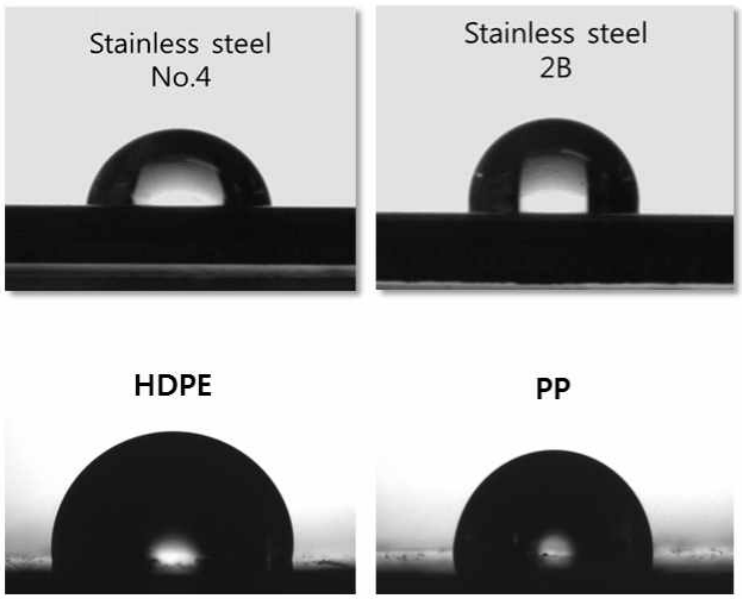


그림 29. 식품접촉표면의 water contact angle 측정 모습

○ 식품접촉표면 4종에 대한 roughness 수치는 아래 표와 같음. Ra 값은 산술평균거칠기를 나타내며 Rq 값은 제곱평균 거칠기를 나타내는 것으로 표면의 거칠기를 판단하는 가장 기본적인 수치로 활용됨. 4종의 식품접촉표면 재질의 Ra 값 및 Rq 값은 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 전반적으로 모두 고른 표면 특성을 나타내는 것을 알 수 있었음.

표 11. 식품접촉표면의 roughness 값

샘플	Ra (μm)	Rq (μm)
Stainless steel No.4	0.14±0.04A	0.22±0.04A
Stainless steel 2B	0.16±0.03A	0.24±0.05A
HDPE	0.15±0.06A	0.23±0.09A
PP	0.15±0.01A	0.28±0.05A

○ Stainless steel 2B 재질의 경우 stainless steel No.4 재질과 유사한 결과를 보였으며 100℃ 포화 증기를 처리하였을 때 20초 처리 후 황색포도상구균 바이오필름이 검출한계 이하로 저감화되는 것을 확인하였고 125℃ 및 150℃ 초고온 과열 증기를 처리하였을 때 각각 15초 및 10초 처리 후 황색포도상구균 바이오필름이 검출한계 이하로 저감화되는 것을 확인하였음.

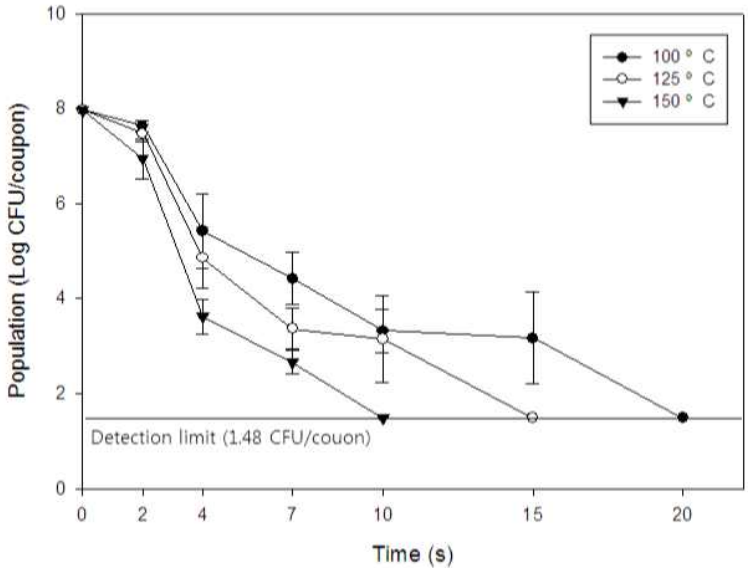


그림 30. 100℃ 포화 증기 및 125℃, 150℃ 초고온 과열 증기 처리에 따른 stainless steel 2B 표면 내 황색포도상구균 바이오필름 저감화

○ HDPE 및 PP 재질의 경우 전반적으로 stainless steel 재질에 비해 낮은 저감화가 관찰되었음. HDPE 재질의 경우 100℃ 포화 증기를 7초간 처리하였을 때 4 log 정도의 저감화가 나타났으나 그 이후 tailing 현상이 나타나 추가적으로 유의적인 저감화는 20초 처리까지 나타나지 않았음.

○ 이에 비해 125℃ 및 150℃ 초고온 과열 증기를 처리하였을 때는 tailing 현상이 나타나지 않았으며 15초 처리를 통해 황색포도상구균 바이오필름이 검출한계 이하로 저감화 되는 것을 확인하였음.

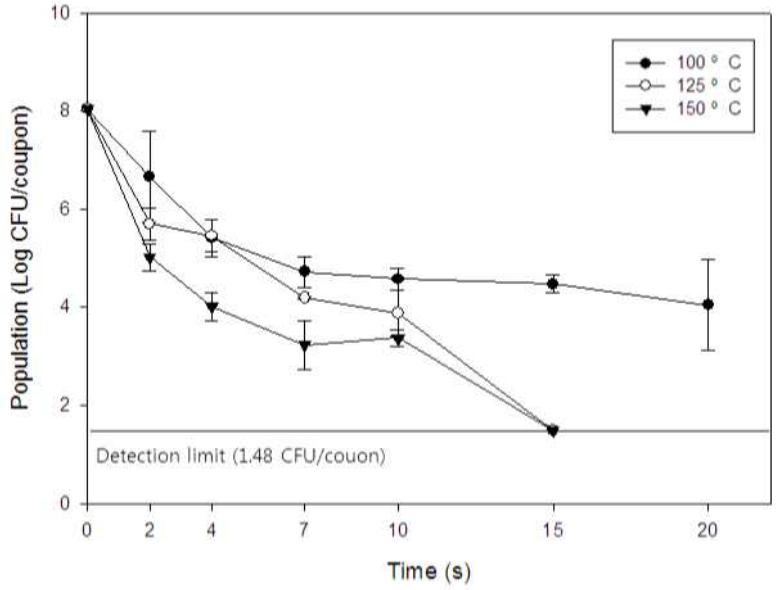


그림 31. 100℃ 포화 증기 및 125℃, 150℃ 초고온 과열 증기 처리에 따른 HDPE 표면 내 황색포도상구균 바이오필름 저감화

○ PP 재질의 경우 100℃ 포화 증기를 20초간 처리하였을 때 5 log 정도의 저감화가 일어났으며 125℃ 및 150℃ 초고온 과열 증기를 각각 20초 및 15초간 처리하였을 때 황색포도상구균 바이오필름이 검출한계 이하로 저감화되는 것을 확인하였음.

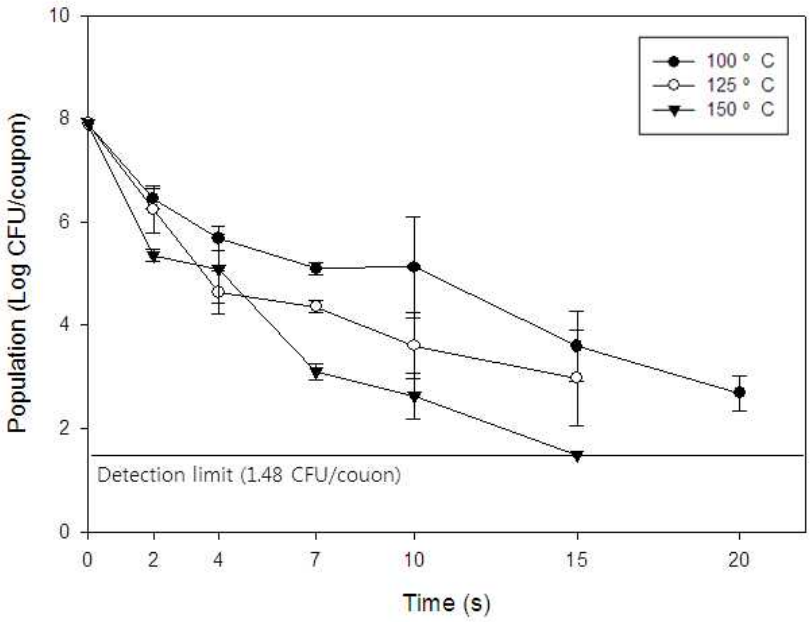


그림 32. 100℃ 포화 증기 및 125℃, 150℃ 초고온 과열 증기 처리에 따른 PP 표면 내 황색포도상구균 바이오필름 저감화

거. 모델링을 통한 초고온 과열 증기의 황색포도상구균 바이오필름 제어 효과 정량적 분석

○ 초고온 과열 증기 처리에 따른 황색포도상구균 바이오필름의 제어 효과를 정량적으로 분석하기 위해 log-linear 모델 (first order kinetics) 및 weibull 모델을 이용하여 kinetics 모델링을 진행함. Kinetics 모델링은 저감화 정도를 정량적으로 분석함으로써 원하는 저감화 정도를 달성하기 위해 어느 정도의 처리가 필요한지를 알 수 있게 해 주기에 중요하다고 할 수 있음.

$$\log\frac{N_t}{N_0} = -\frac{t}{D} \qquad \log\frac{N}{N_0} = -\left(\frac{1}{2.303}\right)\left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\beta}$$

그림 33. Kinetics 모델링에 사용된 log-linear 모델 및 weibull 모델식

○ Log-linear 모델 및 weibull 모델식을 이용하여 저감화 정도를 모델링 해 보았을 때 R^2 값을 통해 일차 kinetic 모델인 log-linear 모델보다 weibull 모델이 정량적 분석에 있어 더 적합한 모델인 것을 알 수 있었음.

표 12. Kinetics 모델링에 따른 R^2 값

Kinetics model	Temperature (℃)	R^2			
		Stainless steel No. 4	Stainless steel 2B	HDPE	PP
Log-linear	100	0.90	0.90	0.71	0.93
	125	0.93	0.90	0.93	0.89
	150	0.98	0.91	0.81	0.89
Weibull	100	0.96	0.95	0.95	0.97
	125	0.96	0.94	0.97	0.98
	150	0.99	0.94	0.98	0.98

○ Weibull 모델 분석을 통해 얻은 parameters를 이용하여 5 log 저감화가 일어나는데 필요한 시간인 T_5d 값을 계산한 결과는 아래 표와 같음.

표 13. Weibull 모델 parameter를 이용한 T_5d 값

Temperature (℃)	T_5d (s)			
	Stainless steel No. 4	Stainless steel 2B	HDPE	PP
100	11.17	12.77	40.51	21.02
125	9.68	9.59	11.14	13.42
150	6.81	6.38	13.40	9.36

○ 각각의 재질에 있어 처리 온도가 증가함에 따라 T_5d 값이 감소하는 것을 알 수 있었음. Stainless steel No.4 재질의 경우 100℃ 포화 증기 처리 시 황색포도상구균 바이오필름의 5 log 저감화를 위해 11.17초 처리가 필요한 것에 비해 125℃ 및 150℃ 초고온 과열 증기 처리 시 각각 9.68초 및 6.81초 처리를 통해 5 log 저감화를 달성할 수 있음. 다른 재질에 있어서도 동일한 경향성을 확인할 수 있었으며 재질별로는 stainless steel 두 종류가 비슷한 경향으로 빠른 저감화가 일어나는 것을 알 수 있었고 그 다음 PP, HDPE 순으로 T_5d 값이 증가하는 경향을 나타냄.

3. 식품제조 및 가공업체 작업환경 내 바이오필름 생성 현황 모니터링 (1차년도, 세부 1)

가. 식품제조 및 가공업체 작업환경 내 미생물 및 바이오필름 오염도 조사

○ 국내 식품제조 및 가공업체 중 식품 이동방식 (파이프, 컨베이어 벨트 등), 제조원료 (농산물, 축산물 등), 제조 가공 시 작업자 필요유무 등을 고려하여 농산물 가공식품공장 1 곳, 가공식품공장 2 곳, 육가공식품 공장 1 곳의 공장 설비 표면 미생물 오염도 조사를 수행함.

○ 실제 산업현장은 HACCP 또는 CIP를 적용하여 살균, 소독을 진행하고 있기 때문에 심각한 바이오필름은 없을 것으로 판단함. 따라서 심각해 보이는 부분은 바로 바이오필름이 형성되었는지 시험해볼 수 있는 biofilm detection kit를 이용하여 측정하고, 바이오필름이 형성되지 않은 제조 공정은 swab을 활용하여 bacteria을 샘플링하고 바이오필름 형성능을 보이는 균들을 동정하는 방식으로 실험을 진행함.

○ 샘플링 구획의 경우 ㈜세니젠에서 개발한 10 X 10 cm의 면적을 비접촉식으로 구획할 수 있는 Beamtemplete를 이용하여 샘플링 할 위치의 면적을 구획함.

○ 구획한 면적에 3M의 E-swab을 이용하여 사각형 내에 가로, 세로, 대각선 방향으로 1 회 stoke 하여 샘플링을 진행함.

○ 진행한 swab은 9 mL의 버퍼에 담금 후 곧바로 아이스박스에 보관하여 12 시간 이내에 검사를 진행함.

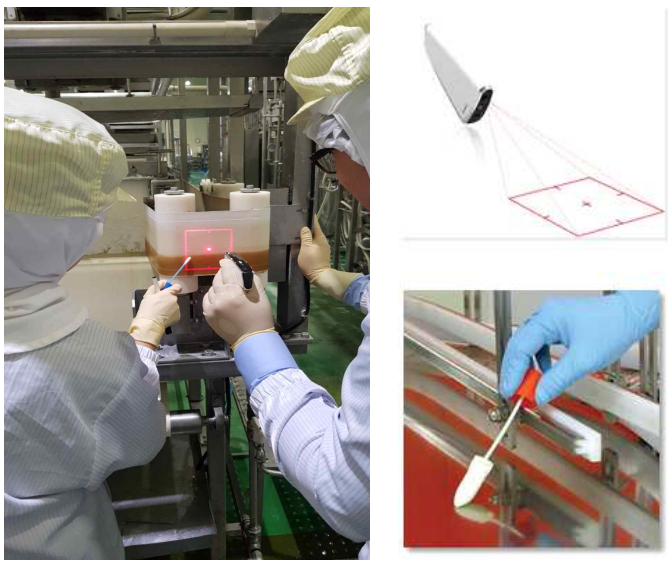


그림 34. 현장 샘플링 도구 및 방법

○ 병원성 미생물 (*Bacillus cereus, Listeria monocytogenes, Salmonella Typhimurium, Escherichia coli* O157:H7, *Stphylococcus aureuss, Clostridium perfringens*)의 오염여부 및 오염 수준을 조사함.

○ 각각의 병원성 미생물은 오염여부를 파악하기 위하여 액체 증균 배지를 활용하여 배양기에서 증균한 후 각각의 선택배지에 도말하였으며, 의심이 되는 집락에 대하여는 확인 시험을 실시함.

○ 오염여부가 확인되는 병원성 미생물들은 다시 각각의 선택배지를 이용하여 정량검사를 실시함.

표 14. 병원성 미생물의 조사에 이용되는 선택배지와 확인 법 및 배양 법

세균의 종류	선택증균배지 (Selective broth)	선택고체배지 (Selective agar)	확인법 (Conformation)	배양조건
Eshcerichia coli O157:H7	mEC media	MacConkey sorbitol agar	Latex agglutination test kit, API test, Real Time PCR	37 ℃, 24 h
Salmonella Typhimurium	Rappapot-Vassiliadis medium	Xylose Lysine Desoxycholate agar	Biochemical test, Coagulation test, API test, Real Time PCR	37 ℃, 24 h
Listeria monocytogenes	UVM-modified Listeria Enrichment broth	Oxford agar base with Listeria oxford supplement	hemolysis, motility, catalase, CAMP test, API test, Real Time PCR	37 ℃, 24 h
Staphylococcus aureus	Mannitol salt agar with egg yolk	Baird-Parker agar	Coagluase test, API test, Real Time PCR	37 ℃, 24 h
Bacillus cereus	Robertson's cooked meat medium	Bacillus cereus selective agar	Biochemical test, API test, Real Time PCR	37 ℃, 24 h
Clostridium perfringens	Pepton-Glucose yeast extract broth	Trytpse-sulphite-cyclose rine agar	TSC supplemented with egg yolk	37 ℃, 24 h, 혐기적 배양

○ 총균수 (Total aerobic bacteria)측정은 희석액에 담겨진 swab을 3000 rpm으로 3 분간 vortexing하여 균을 모두 탈리시킨 후 serial dilution을 통해 10배씩 희석하여 tryptic soy agar에 분주하여 도말함. 도말한 배지는 37 ℃에서 48 시간 동안 배양 후 균수를 측정함.

○ *E. coli*/대장균 군 (Coliform) 측정은 *E. coli*/coliform용 Petri-film (3M)을 활용하여 분석을 진행하였으며, 빨간색에 가스를 포함한 대장균 군과 파란색에 가스를 포함한 대장균 (E. coli) 균수를 따로 측정함.

○ 바이오필름 형성능을 측정은 tryptic soy agar에 자란 균들을 백금이를 이용하여 분리 배양한 다음, 현미경으로 균의 형태를 관찰하고, 그람 염색법을 통해 균들을 분류함. 분류한 균 중 가장 많은 숫자를 보인 균을 우점종으로 선정함.

○ 각각의 분리 배양한 균들은 백금이를 활용하여 희석액 (peptone water) 15 mL에 vortexing 하여 resuspension 이후, SYLM BART에 넣어 상온에서 7 일간 보관함.

○ SYLM BART 측정 결과 증가하거나 띠를 형성한 균은 바이오필름 형성능이 있다고 판단하여 동정과정을 진행함.

그림 35. SYLM BART 형성 예시

(띠 형태의 바이오필름 (2번, 3번), 탁한 형태의 바이오필름(1번, 4번))

○ VITEK 2를 이용한 균 동정의 경우 SYLM BART를 통해 바이오필름 형성능을 보인 균들을 백금이로 취하여 3 mL의 0.45 % NaCl solution에 푼 후 각각의 그람염색의 결과에 맞게 VITEK GN card, VITEK GP card, VITEK BCL card를 넣어 균을 동정함.

나. 국내 농산물 가공식품 공장 1곳 모니터링 결과

○ 샘플링 지점 4번 공정과정 이후 대장균 군이 검출되어 현행식품기준 및 규격상의 기준인 1 log CFU/cm^2 이상인 공정도 2군데 존재하는 것으로 확인함.

○ 샘플링 지점 4번 공정 이후 공정에서 더 많은 균이 검출되었으며, 이는 4 공정 이후 더 높은 습도로 인해 균이 잘 자랄 수 있는 환경이기 때문임.

○ 전반적으로 공정 내 상단 부분보다는 하단 부분에서 더 많은 균이 검출되었음.

○ Biofilm detection kit 사용결과 바이오필름 형성된 부분은 발견되지 않음.

표 15. 국내 농산물 가공식품공장 제조공정 표면스왑 정량평가 결과

(단위: log CFU/cm^2)

샘플링지역 번호	총 균수	대장균	대장균군	균 종류
1	4.04	0	0	4
2	6.80	0	0	2
3	4.43	0	0	4
4	2.39	0	0.7	3
5	1.98	0	0	2
6	6.94	0	3.2	3
7	6.61	0.7	1.1	2
8	1.96	0	0.4	2
9	7.22	0	1	2
10	2.67	0	0.8	1
11	2.31	0	0.9	2
12	5.43	0	0.9	3
13	6.83	0	1	2
14	2.56	0	0.7	3
15	7.06	0	1	2

○ Swab을 통해 샘플링을 진행한 균 중 우점종 및 SYLM BART를 활용하여 biofilm 형성 가능성이 있는 균 확인 결과 띠 형태의 바이오필름을 형성한 균은 모두 Gram-positive 였으며, 탁한 형태의 바이오필름을 형성한 균은 모두 그람 음성균으로 나타남.

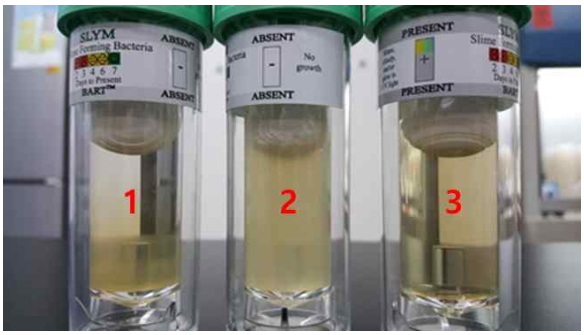


그림 36. SYLM BART를 활용한 biofilm 형성 가능 균주 확인

(띠 형태의 Biofilm (1), 탁한 형태의 Biofilm (2), Biofilm을 형성하지 않음(3))

표 16. 미생물 동정 실험 결과 (VITEK 2 사용)

발견위치	우점종 여부	그람염색결과	균 동정결과
1	X	양성	*Staphylococcus Vitulinus*
1	X	양성	*Bacillus cereus*
2	O	양성	*Streptococcus sanguinis*
3	X	양성	*Bacillus mycoides*
6	O	음성	*Klebsiella pneumoniae*
7	X	음성	*Klebsiella pneumoniae*
8	X	음성	*Enterobactoer cloacae*
13	O	음성	*Raoultella planticola*

표 17. 농산물 가공식품공장에서 검출된 균의 특성

검출된 균 명	검출된 균 특성
Staphylococcus vitulinus	주로 식품과 동물에서 유래되며 fructose, trehalose, mannitol & sucrose를 분해하여 산을 생성할 수 있는 특징을 가지고 있음. 병원성에 대해서는 알려진 바가 없음.
Bacillus cereus	포자를 형성할 수 있으며, 식중독을 일으킴. 식품에 5 log CFU 이상 함유되어 있어야 식중독을 일으킴.
Streptococcus sangunis	주로 건강한 사람의 입 속에서 서식하며 충치를 유발하는 균으로 알려져 있음. 혈관안으로 직접 들어가게 될 경우 위험하며 치료도 어려운 균임.
Bacillus mycoides	토양에 주로 분포하며 배지상에서 자랐을 경우 크기가 약 3 um 보다 큰 곰팡이와 같은 형태를 보임. 유해한 균이나 곰팡이를 제어하는 특징이 있으며 인체나 환경에는 해로운 영향은 없다고 알려짐. 하지만 단백질이나 아미노산 같은 물질에서 암모니아로 바꿀 수 있는 질소 고정능력이 있음.
Enterobacter cloacae	장내에 만이 서식하며 병을 일으키지 않는 균임. 물, 토양 등에 널리 분포함.
Raoultella planticola	*Klebsiella pneumoniae*와 거의 유사한 균이며 10℃ 의 환경에서도 자랄 수 있다는 점이 차이점임. 물과 토양에 많이 분포하며 인체에 감염되어 병을 일으킨 사례는 거의 없음.

다. 국내 가공식품 공장 2곳 모니터링 결과

○ 가공식품 공장 1의 경우, 일반세균 실험결과, 파이프라인에서 최대 2.310 log CFU/cm^2이 검출되었음.

○ 살균공정 5에서 6을 지나면 일반 세균수가 10 CFU/cm^2 아래로 살균되기 때문에 살균 공정 부분 관리가 중요한 부분으로 판단됨.

○ Biofilm detection kit 사용결과 두 공장에서 모두 바이오필름 형성은 발견되지 않음.

표 18. 국내 가공 식품공장1 제조공정 표면스왑 결과

(단위:Log CFU/cm^2)

샘플링 지역번호	총 균수	대장균	대장균군	균종류
1	0.69	O	O	1
2	2.04	O	O	2
3	2.31	O	O	2
4	2.17	O	O	2
5	2.09	O	O	2
6	0.30	O	O	1

표 19. 국내 가공 식품공장2 제조공정 표면스왑 결과

(단위:Log CFU/cm^2)

샘플링 지역번호	총 균수	대장균	대장균군	균종류
1	2.61	O	0.4	4
2	1.65	O	O	2
3	3.04	O	O	2
4	3.13	O	O	2
5	0	O	O	0
6	0.47	O	O	1

○ Swab을 통해 샘플링을 진행한 균 중 우점종 및 SYLM BART를 활용하여 biofilm 형성 가능성이 있는 균 확인 결과 두 공장에서 모두 띠형태 및 탁한 형태의 바이오필름 형성 가능성 있는 균이 검출됨.

그림 37. SYLM BART를 활용한 biofilm 형성 가능 균주 확인

(띠 형태의 Biofilm(2번, 3번) 탁한형태의 Biofilm(1번, 4번))

표 20. 국내 가공식품공장1 균 동정 결과 (VITEK2 사용)

발견위치	우점종 여부	그람염색결과	균 동정결과
1	O	양성	*Erysipelothrix rhusiopathiae*
2	O	양성	*Erysipelothrix rhusiopathiae*
3	O	양성	*Granulicatella elegans*
4	O	양성	*Geobacillus thermoglucosidasius*
4	X	양성	*Granulicatella elegans*
5	O	양성	*Streptococcus mitis*
5	X	양성	*Brevibacillus choshinensis*
6	X	양성	*Streptococcus ovis*

표 21. 국내 가공식품공장 2 균 동정 결과 (VITEK2 사용)

발견위치	우점종 여부	그람염색결과	균 동정결과
1	O	음성	*Acinetobactoer lwoffii*
1	X	음성	*Acinetobacter haemolyticus*
1	X	양성	*Streptoccus mitis*
2	O	양성	*Granulicatella elegans*
3	O	양성	*Streptococcus mitis*
4	O	음성	*Acinetobacter haemolticus*

표 22. 가공식품공장 2곳에서 검출된 균의 특성

검출된 균 명	검출된 균 특성
Erysipelothrix rhusiopathiae	이 균은 포자를 형성할 수 없으며 이동성이 없는 균이다. 동물에 의해 오염된 토양이나 음식물에서 주로 검출되며, 토양에 오랜기간 살아남을 수 있으며, 주로 닭이나 돼지에서 단독 (erysipelas)을 일으키는 균이며 사람도 이 병이 일어날 수 있음. 주로 이러한 병에 걸린 돼지의 분변에서 많이 검출됨.
Granulicatella elegans	이 균은 포자를 형성할 수 없으며 이동성이 없는 균이다. 주로 동물이나 인체의 구강과 상기도, 요생식관, 위장관 등에 상재균으로 존재하며 주로 심내막염을 유발하는 균임
Geobacillus thermoglucosidasius	주로 생장온도가 60℃인 높은 온도에서 생장하나 37-68℃사이에서는 생장할 수 있다고 알려져 있다. 다양한 극한환경 (2000 m 이하, 73℃ 이상 등)에서 살아남을 수 있으며, 다양한 탄소원을 이용할 수 있는 균이라고 알려져있음.
Streptococcus mitis	주로 동물이나 인체의 구강에서 존재하며, 인체에는 구강이나 호흡계관련 병원균이라고 알려져 있음.
Brevibacillus choshinensis	주로 토양이나 물, 오염된 유기물에서 발견되며, 포자를 형성할 수 있음. 인체에는 영향이 없음.
Streptococcus ovis	포자를 형성하지 않으며, 주로 동물 및 토양에서 발견됨. 인체에는 영향을 주지 않음.
Acinetobacter lwoffii	이 균은 주로 토양과 물에 주로 분포하며 건조환경이나 낮은 pH, 넓은 범위의 온도조건에서 살아남을 수 있으며 식품의 경우 동결한 식품에서도 발견됨. UV 조사나 살균제 등에 저항성이 높음.
Acinetobacter haemolyticus	이 균은 *Acinetobacter lwoffii*와 같이 토양과 물에 주로 분포하며 다른 특징은 없음.
Granulicatella elegans	이 균은 포자를 형성할 수 없으며 이동성이 없는 균임. 주로 동물이나 인체의 구강과 상기도, 요생식관, 위장관 등에 상재균으로 존재하나, 주로 심내막염을 유발하는 균임.

라. 국내 육가공식품 공장 1곳 모니터링 결과

○ 정량평가 결과 주된 오염균은 *E. coli*이지만 인체에 유해한 종은 없는 것으로 나타남.

○ 1~3 번 공정에서 호흡계에 병을 일으킬 수 있는 균이 검출됨. 따라서 작업자가 들어갈 때에는 마스크 및 호흡과 관련된 장비를 갖추고 들어가는 것을 권장함.

○ 마지막 6 번 공정에서 작업자들의 접촉으로 인해 균수 가 증가됨. 따라서 도마, 칼 등 작업도구 및 작업자의 철저한 위생관리가 필요할 것으로 판단됨.

○ 바이오필름 형성능 실험 결과 총 9개 균주가 바이오필름을 형성하였으며, 2 개는 띠를 형성하는 바이오필름. 7 개의 균주는 탁한 형태의 바이오필름을 형성함. 띠를 형성하는 바이오필름은 그람 양성균, 탁한 형태의 바이오필름을 형성하는 균은 그람 음성균으로 나타남.

○ Biofilm detection kit 사용결과 두 공장에서 모두 바이오필름 형성은 발견되지 않음.

표 23. 국내 육가공식품공장 1곳 표면스왑 결과

단위:Log CFU/cm^2

샘플링 지역번호	총 균수	대장균	대장균군	균종류
1	2.95	1.77	1.34	4
2	2.93	1.75	0.47	3
3	4.50	1.22	1.60	3
4	2.18	0.90	0	2
5	1.96	0.69	0	2
6	5.17	0.69	0	4
7	0	0	0	0

표 24. 국내 육가공식품공장 균 동정 결과 (VITEK 2 사용)

발견위치	우점종 여부	Gram염색결과 (G^+/G^-)	균 동정결과
1	O	G^-	*Escherichia coli*
1	X	G^-	*Serratia fonticola*
2	X	G^-	*Escherichia coli*
3	O	G^-	*Citrobacter freundii*
3	X	G^+	*Kocuria rosea*
3	X	G^+	*Lactococcus garvieae*
4	X	G^-	*Escherichia coli*
5	O	G^-	*Escherichia coli*
6	O	G^+	*Staphylococcus hominis*

표 25. 육가공업체공장 1곳에서 검출된 균의 특성

검출된 균 명	검출된 균 특성
Escherichia coli	이 균은 온혈동물의 창자에서 많이 볼 수 있는 박테리아이다. 대부분의 대장균의 변종은 해롭지 않지만 항원형 O157 등은 사람의 식중독을 일으키며 가끔 대규모의 식품리콜의 원인이 된다. 해롭지 않은 변종은 대장의 공생 동물이며 비타민 K2 등을 생산하여 이로움을 주기도하며, 창자에서 병의 원인이 되는 박테리아의 번식을 막기도 한다.
Serratia fonticola	이 균은 다양한 환경에 분포하며 인체에 다친 피부나 호흡계통을 통해 감염되었을 경우 병을 일으킬 수 있다. 주로 노약자나 환자들과 같은 면역력이 약한 사람들에게 위험한 균이다.
Citrobacter freundii	이 균은 주로 토양에 분포하며 물이나 하수, 식품 동물의 창자에 많이 분포한다. 건강한 사람의 장내에 주로 분포하며 인체에 유익한 균이다.
Kocuria rosea	이 균은 토양과 물에 많이 분포하며 면역력이 약한 사람들에게 때때로 병을 일으키는 균이다.
Lactococcus garvieae	이 균은 주로 물고기에 감염되어 병을 일으키는 균으로 유방내 이상이 있는 소, 가금류 등에서 보인다. 인체에는 현재까지 약 14개의 감염 케이스만 보고되어 있으며, 인체에 들어오더라도 낮은 발병확률을 보인다.
Staphylococcus hominis	이 균은 주로 인체의 피부에 존재하며 바이오필름을 형성하기 쉬운 균이다. 인체에 무해한 균으로 알려져 있다.

마. 종합 결과

○ 대부분의 산업현장을 샘플링 한 결과 주로 *Staphylococcus* species 및 *Eshcerichia* species가 주요 오염균으로 밝혀짐.

○ Biofilm detection kit를 활용하여 샘플링 부분을 확인한 결과 바이오필름의 형성 부위는 발견되지 않음.

○ 현장 내 제대로 관리하지 않을 경우 바이오필름 형성능을 가진 균들이 많아 추후 교차오염의 위험 등의 손해를 유발할 가능성이 큼.

제3절 2차년도 연구개발 내용 및 성과

1. 패혈증 비브리오균 바이오필름 생성인자들의 기능특성 규명 (2차년도, 협동 1)

가. 바이오필름 생성인자들이 결여된 isogenic knock-out mutant 개발

○ 1차년도 연구 결과로 선정된 패혈증비브리오균 바이오필름 생성인자 후보 목록 중 VV1_3061, VV2_1307, VV2_1308의 3 가지 유전자를 isogenic knock-out mutant 구축 대상 유전자로 결정함.

○ VV1_3061이 encoding 하는 단백질은 패혈증비브리오균의 바이오필름 구조 형성에 기여하는 calcium-binding protein CabA와 동일한 5 개의 hemolycin-type calcium-binding repeats를 가지며 37 %의 아미노산 서열 상동성을 나타내는 점에서 바이오필름 생성인자로 기능할 것으로 예측되어 knock-out 대상 유전자로 선정함.

○ VV2_1307-1309는 genome 상에서 같은 방향으로 연이어 위치하며 CabA를 포함하는 *cabABC* operon과 매우 유사한 형태를 나타냄. VV2_1308과 VV2_1309가 encoding하는 protein들의 예측된 기능이 바이오필름 생성인자 CabA에 대한 secretion system을 구성하는 CabBC와 유사하다는 점에서 VV2_1307은 다른 두 유전자가 encoding 하는 secretion machinery를 통해 세포 밖으로 분비되는 바이오필름 생성인자를 encoding할 가능성이 있고 이 중 VV2_1307과 VV2_1308을 knock-out 대상 유전자로 선정함.

○ 패혈증비브리오균의 genomic DNA를 추출하고 이로부터 각 유전자 ORF의 약 2/3이 deletion된 fragment를 PCR로 증폭하였음. 얻어진 fragment를 suicide vector인 pDM4에 cloning하고 conjugational donor인 *E. coli* S17-1 λpir strain으로 transformation을 진행함

○ 이후 conjugation을 통해 패혈증비브리오균의 parent strain 내로 suicide vector를 전달하고 homologous recombination에 의해 chromosome 상에 deletion된 ORF를 갖는 knock-out mutant를 PCR screening을 통해 선별함.

○ 선별된 knock-out mutant들은 genomic DNA를 추출하고 해당 유전자의 ORF를 PCR로 증폭 후 젤 전기영동을 통해 parent strain과 비교하여 chromosome 상에 deletion된 ORF를 가지고 있음을 검증함.

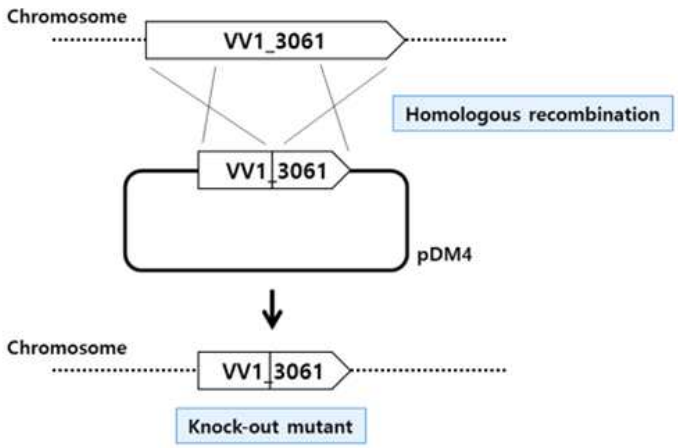


그림 38. Homologous recombination을 통한 isogenic knock-out mutant의 개발.

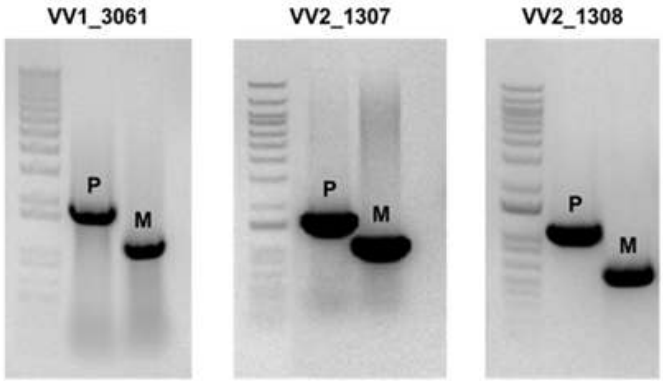


그림 39. 각 isogenic knock-out mutant의 ORF band size 검증.
(P, parent strain. M, knock-out mutant.)

○ 3종의 유전자 각각에 대한 knock-out이 패혈증비브리오균의 바이오필름 생성 능력에 영향을 미치는지 확인하기 위해 96 well culture plate 상에서 parent strain과 각 isogenic knock-out mutant의 바이오필름 생성 능력을 비교함.

○ 패혈증비브리오균 parent strain과 isogenic knock-out mutant strain을 LBS 배지에서 30 ℃로 배양한 후, OD_{600} 0.8인 배양액을 VFMG에 OD_{600} 0.05로 희석하고 96 well culture plate 상에서 30 ℃로 배양하여 바이오필름을 생성하였음.

○ 24 시간 동안 생성시킨 바이오필름에서 planktonic cell이 존재하는 상등액은 따내어 제거하고 culture plate 표면에 부착된 바이오필름을 PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4)로 2 번 세척한 후 1% (wt/vol) crystal violet 용액으로 상온에서 15분간 염색하였음.

○ 다시 crystal violet 용액을 제거하고 증류수로 세척한 후 5 분 간 상온에 drying하였음.

○ 바이오필름에 염색된 crystal violet을 에탄올로 용출하고 microplate reader를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하여 바이오필름을 정량하였음.

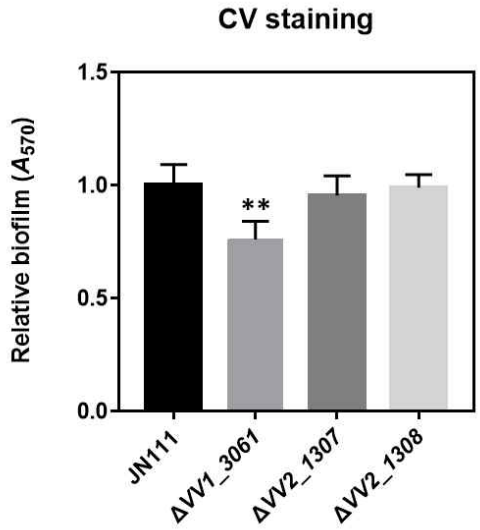


그림 40. Parent strain과 바이오필름 생성인자가 결여된 isogenic knock-out mutant 3종의 바이오필름 생성능력 비교. (JN111, parent strain. **, $P < 0.05$ relative to parent strain.)

○ 실험 결과에서 VV1_3061의 knock-out mutant는 parent strain에 비해 바이오필름 생성 능력이 감소한 반면 VV2_1307과 VV2_1308의 knock-out mutant는 parent strain과 비슷한 양의 바이오필름을 생성하는 것을 확인하였음.

○ 이는 3 종의 유전자 중 VV1_3061의 product가 해당 실험 조건에서 패혈증비브리오균의 바이오필름 생성에 유의미하게 기여함을 의미하며, 이를 토대로 VV1_3061을 추가 분석의 대상이 될 바이오필름 생성인자로 결정하였음.

○ VV1_3061은 본 연구진에서 패혈증비브리오균의 바이오필름 생성인자로 기존 동정된 CabA와 아미노산 서열의 유사성을 가지고 있으며, CabA와 마찬가지로 세균의 바이오필름 생성을 촉진하는 bacterial second messenger c-di-GMP의 세포 내부 농도가 높을 때 유전자의 발현량이 증가하는 것으로 확인됨. 이는 두 생성인자가 유사한 조절 특성을 가짐으로써 바이오필름 상에서 동시에 존재하여 바이오필름을 강화하는 역할을 할 수 있다는 것을 시사함.

○ 따라서 두 바이오필름 생성인자 VV1_3061과 CabA의 특성을 비교분석하기 위하여 VV1_3061과 CabA가 모두 결여된 double knock-out mutant 1종을 추가 구축하고 SH174라 명명함.

○ 구축한 double knock-out mutant SH174에 대해서도 genomic DNA를 추출하고 VV1_3061과 *cabA* 두 가지 유전자의 ORF를 각각 PCR로 증폭하였음.

○ 젤 전기영동을 통해 각 ORF band의 size를 parent strain과 비교하여 두 유전자 모두 deletion된 ORF를 가지고 있음을 검증함.

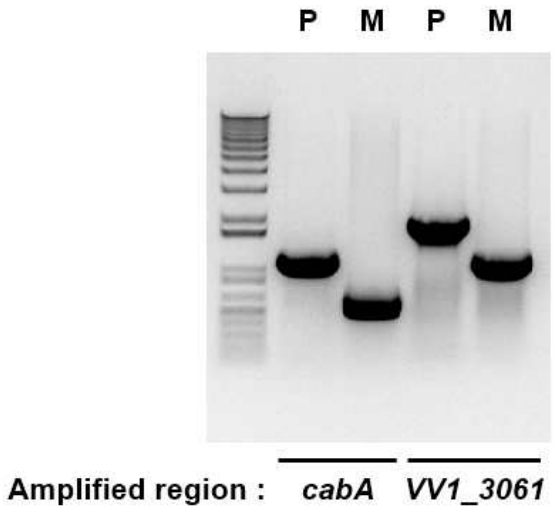


그림 41. VV1_3061과 *cabA*의 double knock-out mutant의 ORF band size 검증.

(P, parent strain. M, double knock-out mutant.)

나. Parent strain과 isogenic mutant들의 바이오필름 생성능력 비교

○ VV1_3061과 CabA 각각의 knock-out mutant 및 double knock-out mutant가 parent strain과 비교하여 바이오필름 생성 능력 및 생성된 바이오필름의 특성에서 나타내는 차이를 확인하기 위한 분석을 진행함.

○ 먼저 crystal violet staining을 통해 각 strain이 생성하는 바이오필름의 양 차이를 비교하였음.

○ (1)에서와 마찬가지로 parent strain과 각 isogenic knock-out mutant strain을 LBS 배지에서 30 ℃로 배양 후 OD_{600} 0.8인 배양액을 VFMG에 OD_{600} 0.05로 희석하고 96 well culture plate 상에서 30 ℃로 배양하여 바이오필름을 생성하였음. 24 시간 동안 바이오필름을 생성시킨 후 (1)에서와 동일한 방법으로 crystal violet 염색 및 정량을 진행하였음.

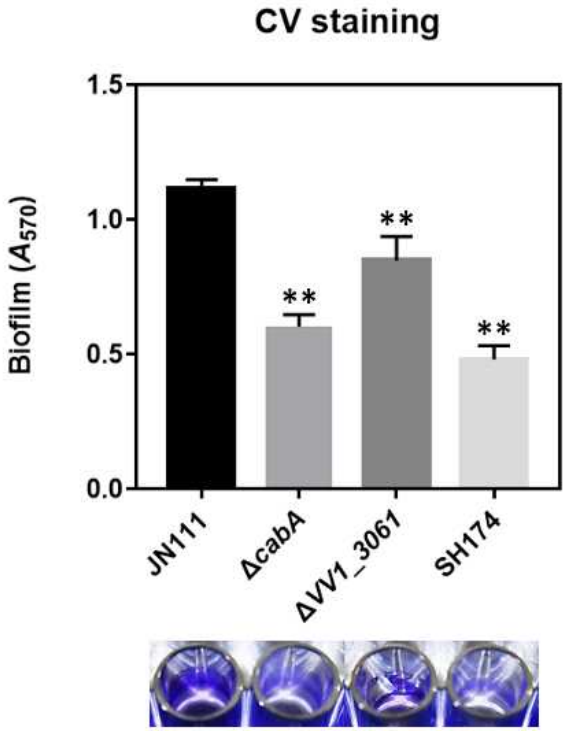


그림 42. Parent strain과 VV1_3061 및 CabA가 결여된 isogenic knock-out mutants의 바이오필름 생성능력 비교. (JN111, parent strain. SH174, *VV1_3061 cabA* double knock-out mutant, **, $P < 0.05$ relative to parent strain.)

○ 실험 결과에서 VV1_3061과 CabA가 각각 결여된 knock-out mutant는 parent strain에 비해 바이오필름 생성량이 감소하는 것을 확인하였음.

○ 또한 VV1_3061과 CabA가 모두 결여된 double knock-out mutant는 각각의 single knock-out mutant 보다 적은 양의 바이오필름을 생성하는 것을 확인하였음.

○ 이는 패혈증비브리오균의 온전한 바이오필름 생성에 VV1_3061과 CabA가 모두 바이오필름 생성인자로서 필요하며, 둘 중 하나라도 결여될 경우 불완전한 바이오필름이 생성됨을 의미함. 또한 두 가지의 바이오필름 생성인자를 동시에 제어할 경우 바이오필름 생성에 대해 가장 큰 제어 효과를 얻을 수 있음을 확인하였음.

○ 패혈증비브리오균이 생성하는 바이오필름은 해당 균이 형성하는 macrocolony의 형상 변화에도 영향을 주며 colony 표면에 주름을 생성하게 됨. 이러한 colony의 rugosity (주름진 정도)와 바이오필름 생성능력은 양의 상관관계를 가지며 CabA가 이러한 주름진 colony 형성에 필요하다는 것이 본 연구진에 의해 확인된 바 있음 [Park *et al.*, 2015].

○ 새롭게 발굴한 바이오필름 생성인자 VV1_3061의 knock-out mutant 및 VV1_3061과 CabA의 double knock-out mutant에서 colony rugosity의 변화를 확인하고자 colony morphology assay를 진행하였음.

○ Parent strain과 각 isogenic knock-out mutant strain을 LBS 배지에서 30 ℃로 배양하여 OD_{600} 0.8인 배양액을 microcentrifuge로 cell down 후 동량의 VFMG에 resuspend 하였음. 각 균의 배양액을 VFMG agar plate 상에 2 μl 씩 spotting한 후 30 ℃에서 정치로 3 일 동안 배양하여 macrocolony가 형성되도록 하였음. 형성된 colony의 morphology는 Zeiss 사의 Stemi DV4 실체현미경을 이용해 8배율로 관찰 및 imaging 하였음.

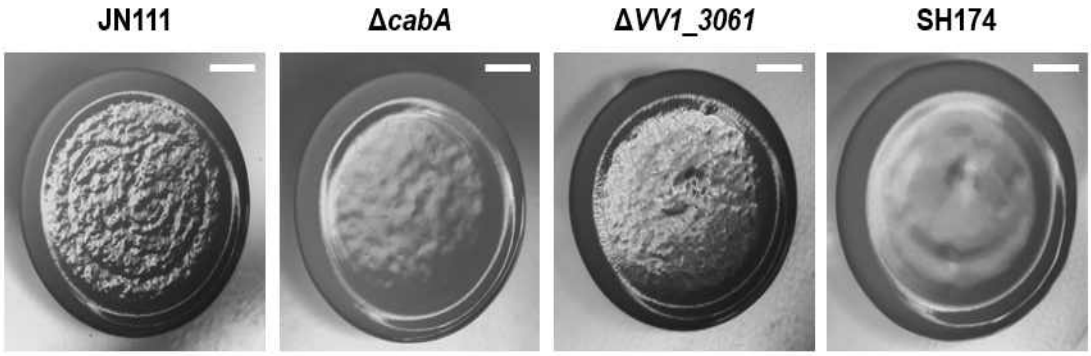


그림 43. Parent strain과 VV1_3061 및 CabA가 결여된 isogenic knock-out mutants의 colony morpholology 비교 (Scale bar는 1 mm를 나타냄.
JN111, parent strain. SH174, *VV1_3061 cabA* double knock-out mutant.)

○ 실험 결과에서 VV1_3061 및 CabA가 각각 결여된 knock-out mutant에서 parent strain에 비해 rugosity가 감소된 것을 확인할 수 있으며, 이러한 경향은 VV1_3061과 CabA가 모두 결여된 double knock-out mutant에서 가장 뚜렷하게 나타남.

○ Colony rugosity와 바이오필름 생성능력 사이의 양의 상관관계를 고려할 때, VV1_3061과 CabA 각각이 바이오필름 생성인자로서 바이오필름 생성에 요구되는 기능을 수행하며 두 생성인자가 모두 결여되면 하나만 결여된 경우에 비해 바이오필름 생성능력이 더욱 저하된다는 것을 colony rugosity의 감소를 통해 확인하였고 이는 앞선 바이오필름 생성량 비교 실험과도 일치하는 양상을 나타냄.

○ Pellicle은 박테리아가 고체 표면에 생성하는 일반적인 바이오필름과는 달리 배양액과 공기사이에 형성되는 막 형태의 바이오필름이며, 생성된 pellicle의 양과 형상 또한 바이오필름 생성능력을 판단하는 중요한 지표임. 따라서 VV1_3061 및 CabA가 결여된 knock-out mutant에서 pellicle 생성에 어떠한 차이가 나타나는지 분석하였음.

○ Parent strain과 각 isogenic knock-out mutant strain을 LBS 배지에서 30 ℃로 배양하여 OD_{600} 0.8까지 키운 후, pellicle 생성을 촉진하기 위해 10 mM $CaCl_2$를 첨가하고 test tube에 2 mL 씩 분주하여 30 ℃에서 정치 배양하였음. 24 시간 동안 배양하여 배양액 표면에 생성된 pellicle은 카메라로 imaging하여 비교 분석하였음.

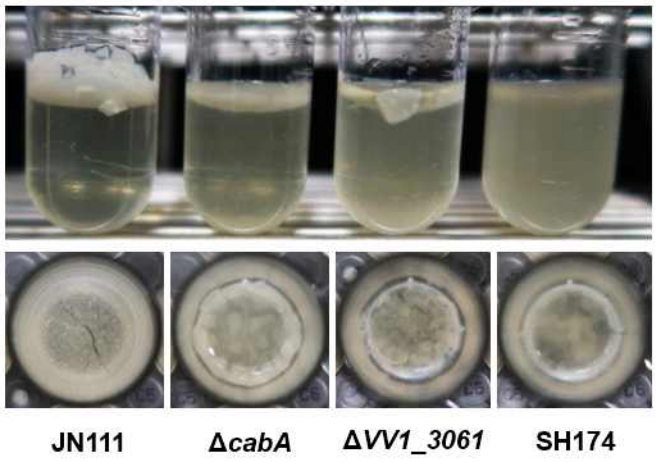


그림 44. Parent strain과 VV1_3061 및 CabA가 결여된 isogenic knock-out mutants의 pellicle 생성 비교. (JN111, parent strain. SH174, *VV1_3061 cabA* double knock-out mutant.)

○ 실험 결과 parent strain에서는 배양액 표면에 두껍고, 주름지고, 견고한 많은 양의 pellicle이 생성된 것에 비해 VV1_3061 또는 CabA가 결여된 knock-out mutant에서는 pellicle의 양이 감소하고 구조가 엉성해진 것을 확인하였으며, 특히 VV1_3061의 knock-out mutant가 생성한 pellicle은 작은 충격에도 쉽게 부서지고 배양액 표면으로부터 분리되어 가라앉는 것을 확인하였음. VV1_3061과 CabA가 모두 결여된 double knock-out mutant의 경우 pellicle이 거의 생성되지 않았는데, pellicle이 적게 생성된 mutant일수록 배양액 자체의 색은 더 탁한 것을 확인할 수 있었음.

○ 이는 parent strain에서는 bacterial cell을 포함한 대부분의 biomass가 바이오필름의 일종인 pellicle 형태로 존재하는 반면 바이오필름 생성인자가 결여된 mutant들에서는 pellicle을 형성하기 위한 지지대 기능을 하는 생성인자들이 부족하여 온전한 pellicle이 생성되지 못하고, 그 결과 더 많은 양의 bacterial cell과 biomass가 배양액 상에 부유하는 형태로 존재하기 때문으로 추정됨.

○ 이러한 현상을 적용하여 바이오필름 생성인자 제어를 통해 바이오필름 생성을 억제하고 오염부위로 부터 세균을 쉽게 제거할 수 있을 것으로 예상됨. 바이오필름 생성인자인 VV1_3061 및 CabA의 결여로 인해 발생하는 바이오필름 생성능력의 감소와 특성 변화가 식품접촉표면 상에서의 바이오필름 생성 및 바이오필름의 물리적 저항성 형성에는 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위한 실험을 진행하였음.

○ Parent strain과 각 isogenic knock-out mutant strain을 LBS 배지에서 30 ℃로 배양 후 OD_{600} 0.8인 배양액을 VFMG에 OD_{600} 0.05로 희석하고 PS (polystyrene) 재질의 test tube에 분주하여 30 ℃로 배양하였음.

○ 24시간 동안 배양하여 바이오필름을 생성시킨 후 planktonic cell이 존재하는 상등액은 따내어 제거하고 test tube 표면에 부착된 바이오필름을 PBS로 세척하였음. 이후 micro mixer (Confido S-20, FINEPCR)를 이용해 1200 rpm으로 바이오필름에 vibration stress를 가해주었음.

○ Vibration을 가하지 않은 sample과 10, 20, 30 초 동안 처리한 sample에서 각각 PBS를 제거한 후 test tube 표면에 남은 바이오필름을 1% (wt/vol) crystal violet 용액으로 상온에서 15 분간 염색하였음.

○ 다시 crystal violet 용액을 제거하고 증류수로 세척한 후 5 분 간 상온에 drying하였음. 염색된 바이오필름은 카메라로 imaging하고, 바이오필름에 염색된 crystal violet을 에탄올로 700 rpm에서 5 분간 용출 후 microplate reader를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하여 바이오필름을 정량하였음.

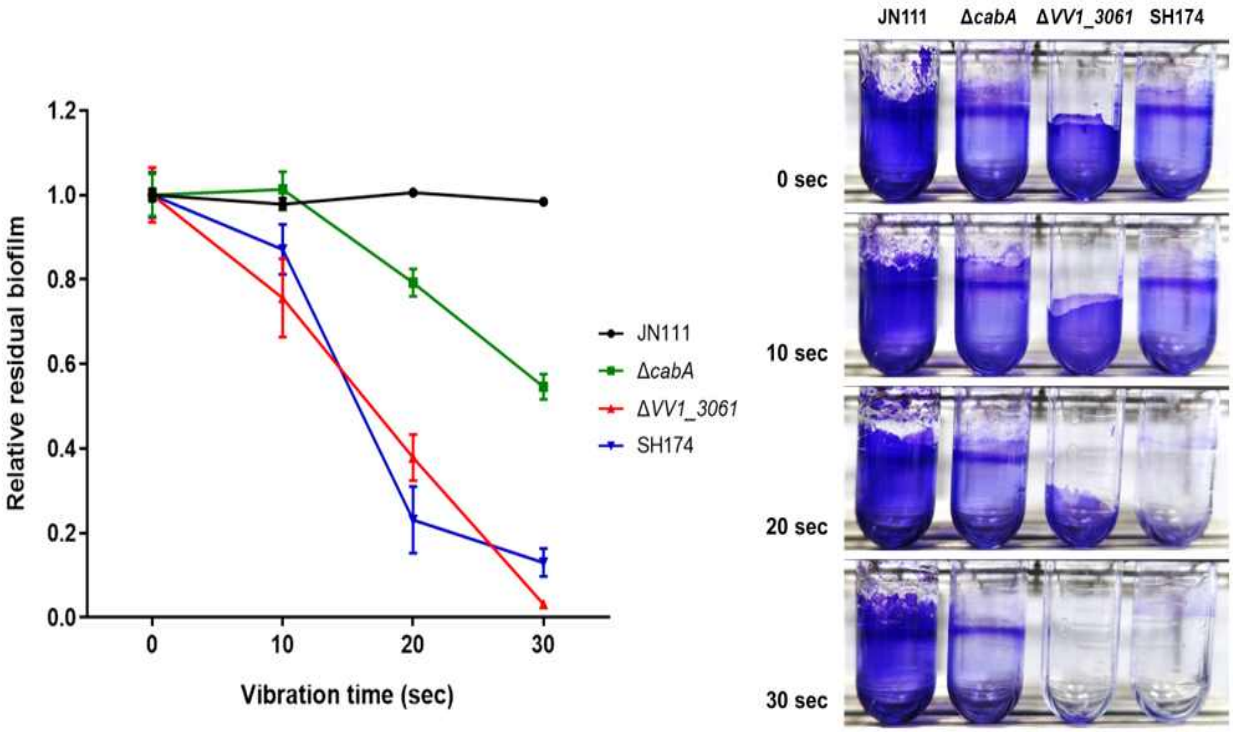


그림 45. PS test tube 표면에 생성된 바이오필름의 물리적 저항성 비교.

(JN111, parent strain. SH174, *VV1_3061 cabA* double knock-out mutant.)

○ 실험 결과에서 VV1_3061 또는 CabA가 결여된 경우 parent strain에 비해 물리적 stress에 대한 저항성이 감소한 것을 확인하였음. 이러한 현상은 CabA가 결여된 경우보다 VV1_3061이 결여된 경우 (Δ*VV1_3061*과 SH174)에 더욱 뚜렷하게 나타났는데, VV1_3061이 결여된 바이오필름은 test tube 표면으로부터 쉽게 박리되고 제거되는 것으로 나타남.

○ 실험 결과들을 종합해보면 VV1_3061은 바이오필름이 생성되는 접촉표면과 바이오필름 간의 interaction에 중요한 생성인자로서 바이오필름의 물리적 저항성 형성에 주로 관여하며, CabA는 바이오필름 매트릭스 내부의 구조 형성에 중요한 생성인자로서 바이오필름의 양 증가에 주로 관여하는 것으로 확인됨. 두 바이오필름 생성인자는 패혈증비브리오균의 바이오필름에 함께 존재하며 서로 중복되지 않는 고유의 기능을 통해 각각 바이오필름을 강화하는 것으로 추정되고, 따라서 두 생성인자를 동시에 조절하는 것이 패혈증비브리오균의 바이오필름을 약화하고 바이오필름 생성을 억제하는 효과적인 제어전략일 것으로 판단됨.

다. 바이오필름 생성인자의 cloning 및 생화학적 특성 규명

○ 바이오필름 생성인자 VV1_3061의 생화학적 특성을 확인하기 위해 VV1_3061의 cloning을 진행하고 단백질 정제를 시도하였음.

○ 재조합 플라스미드의 backbone vector로는 pHis-parallel을 사용하였음. 해당 vector는 발현되는 단백질의 N-terminus에 6XHis affinity tag를 추가할 수 있어 정제에 용이하며 T7 promoter를 사용하므로 원하는 시점에 강력한 발현을 유도할 수 있는 장점을 가짐.

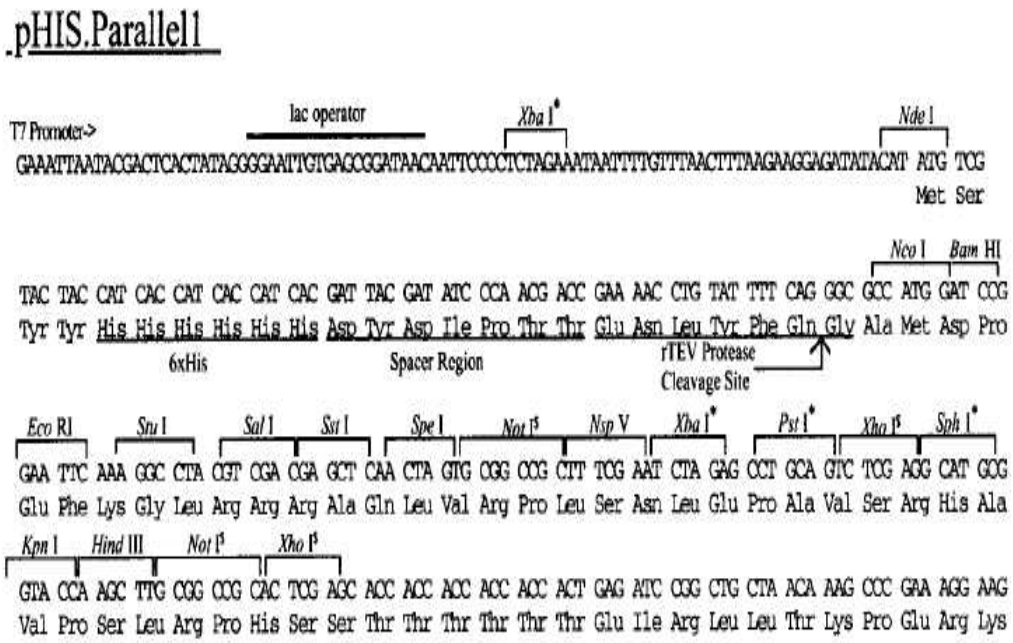


그림 46. pHis-parallel backbone vector의 polylinker region DNA sequence

○ 패혈증비브리오균의 genomic DNA로부터 VV1_3061 ORF의 시작코돈에서 시작하여 종결코돈까지 포함하는 부분을 PCR을 통해 증폭하고, 얻어진 insert fragment를 enzyme cut한 pHis-parellel과 reading frame을 맞추어 ligation하였음. 구축한 재조합 플라스미드는 단백질 정제에 최적화된 *E. coli* BL21 (DE3) strain에 transformation 하여 cloning하고 시퀀싱을 통해 insert의 DNA 서열에 error가 발생하지 않았음을 검증하였음.

○ 단백질 정제에 앞서 구축한 플라스미드에서 VV1_3061 단백질이 발현되는지를 확인하기 위해 small scale에서 induction test를 진행하였음.

○ 재조합 플라스미드를 보유한 BL21 (DE3) strain을 100 μg/mL ampicillin이 첨가된 LB 배지에서 37 ℃로 OD_{600} 0.5까지 배양한 후, 단백질 induction을 위해 1 mM IPTG를 첨가하고 30 ℃로 온도를 낮추어 배양하며 1 시간 간격으로 샘플링하였음. 비교를 위해 IPTG를 첨가하지 않은 배양액을 control로 같이 배양하며 동일한 시간 간격으로 샘플링 하였음.

○ 샘플링한 배양액은 microcentrifuge로 cell down하여 상등액은 버리고 pellet만 -20 ℃에서 냉동보관하였음. 단백질 발현 induction 후 4 시간까지 샘플링을 진행하고 모인 샘플은 lysis 후 SDS-PAGE를 통해 VV1_3061 단백질의 발현 여부를 확인하였음.

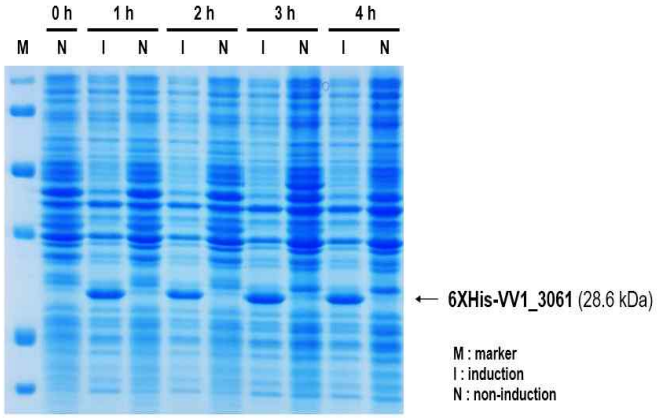


그림 47. 재조합 플라스미드로부터 VV1_3061의 small scale induction test

○ SDS-PAGE 결과 IPTG 첨가를 통해 induction한 샘플에서 VV1_3061 단백질의 band가 확실히 나타나는 것을 확인하였음. 따라서 해당 재조합 플라스미드를 이용하여 large scale에서의 induction 및 VV1_3061 단백질 정제를 진행하기로 하였음.

○ 동일한 재조합 플라스미드를 보유한 BL21 (DE3) strain을 100 μg/mL ampicillin이 첨가된 LB 배지 2 L에서 37 ℃로 OD_{600} 0.5까지 배양한 후 1 mM IPTG를 첨가하고 18℃로 온도를 낮추어 17 시간 동안 배양하였음. 낮은 온도는 균 자체의 생장에 소모되는 에너지를 줄이고 발현되는 단백질의 안정성을 증가시키기 위함임.

○ 배양액은 원심분리기를 이용해 저온에서 cell down한 뒤 상등액은 버리고, 남은 pellet을 차가운 PBS로 wash하여 다시 cell down함. Wash 과정을 세 번 반복한 뒤 lysis buffer (20 mM Tris-Cl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 10 % glycerol)로 resuspend하여 cell lysis를 준비하였음.

○ Bacterial cell을 sonication을 이용해 lysis한 후 microcentrifuge하여 supernatant와 pellet을 분리하였음. 이 중 supernatant만 Ni-NTA agarose bead와 혼합하여 His-tag affinity chromatography를 진행하였음.

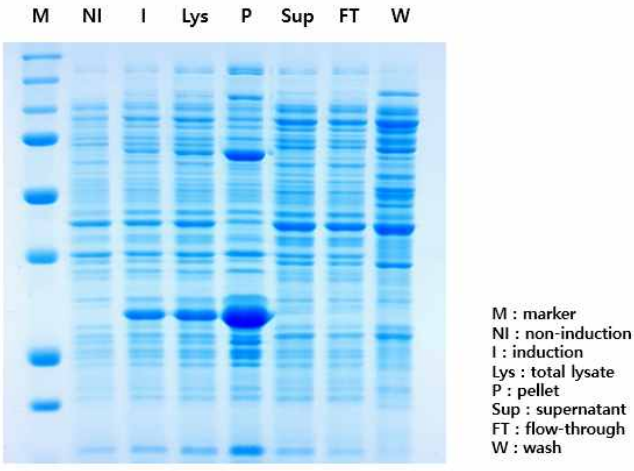


그림 48. 재조합 플라스미드로부터 VV1_3061의 large scale induction 및 정제

○ SDS-PAGE 결과 large scale에서도 충분한 양의 VV1_3061 단백질이 induction되어 약 28.6 kDa의 두꺼운 band를 형성하는 것이 관찰되었음. 그러나 대부분이 supernatant가 아닌 pellet에 존재하는 것으로 확인되었으며 이는 발현된 단백질의 solubility가 매우 낮기 때문으로 추정됨.

○ 따라서 VV1_3061 단백질의 정제를 통한 특성 분석은 어렵다고 판단되었고, 이후 expression plasmid의 cloning과 이를 이용한 패혈증비브리오균 내에서의 complementation을 통해 VV1_3061의 기능 특성 분석을 진행하였음.

○ 재조합 expression plasmid 구축을 위한 backbone vector로는 패혈증비브리오균 내에서 replication이 가능하고 PBAD promoter를 통해 유전자의 arabinose-dependent expression이 가능한 pJK1113을 사용하였음 [Lim *et al.*, 2014].

○ 패혈증비브리오균의 genomic DNA로부터 VV1_3061 ORF를 PCR로 증폭하고 enzyme cut한 pJK1113과 ligation한 후 *E. coli* S17-1 λpir strain에 transformation하였음. Cloning한 재조합 플라스미드는 시퀀싱을 통해 DNA sequence 내 오류 여부를 검증한 후 pSH1711이라 명명하였음.

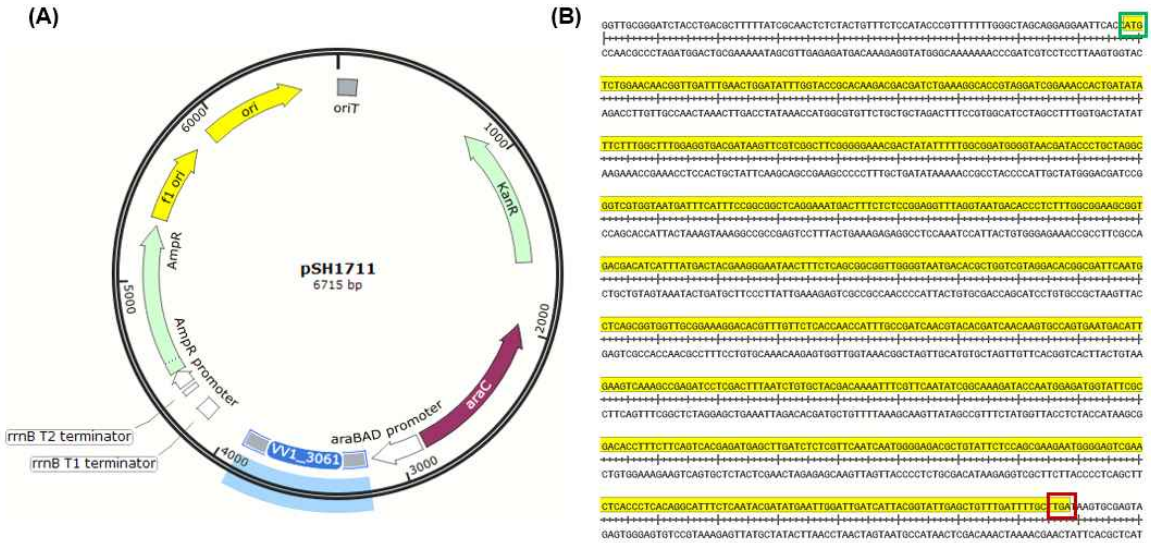


그림 49. (A) 재조합 플라스미드 pSH1711의 vector map
(B) 시퀀싱을 통해 확인한 pSH1711 내의 VV1_3061 ORF DNA sequence

○ Cloning한 재조합 플라스미드 pSH1711을 통해 VV1_3061을 패혈증비브리오균 내에서 complementation하였을 때 PS 재질의 접촉표면 상에서 생성된 바이오필름의 물리적 저항성 형성에 어떠한 차이가 발생하는지 확인하기 위한 실험을 진행하였음.

○ Complementation 실험에는 control로 empty vector를 보유한 JN111+pJK1113, Δ*VV1_3061*+pJK1113 strain과 VV1_3061의 expression vector를 보유한 Δ*VV1_3061*+pSH1711 strain을 사용하였고 vector 유지를 위해 배지에 kanamycin 항생제를 첨가하였음.

○ 먼저 pSH1711을 통해 VV1_3061의 발현을 유지하면서 바이오필름이 생성될 수 있는 kanamycin과 arabinose의 적정 농도를 결정하기 위한 예비 실험을 진행함.

○ 상기 3 가지 strain을 100 μg/mL kanamycin이 첨가된 LBS 배지에서 30 ℃로 OD_{600} 0.8까지 배양 후 배양액을 다양한 농도의 kanamycin과 arabinose (kanamycin은 100, 150, 200 μg/mL, araninose는 0.01, 0.02 %의 농도)가 첨가된 VFMG에 OD_{600} 0.05로 희석하고 PS 재질의 test tube에 분주하여 30℃로 배양하였음.

○ 24 시간 동안 배양하여 바이오필름을 생성시킨 후 상등액은 따내어 제거하고 test tube 표면에 부착된 바이오필름을 PBS로 세척 후 micro mixer로 1200 rpm, 20 초 동안 vibration stress를 가해주었음.

○ 이후 (2)에서와 동일한 과정을 통해 crystal violet staining 및 정량을 진행하여 표면에 남은 바이오필름의 양을 비교하였음.

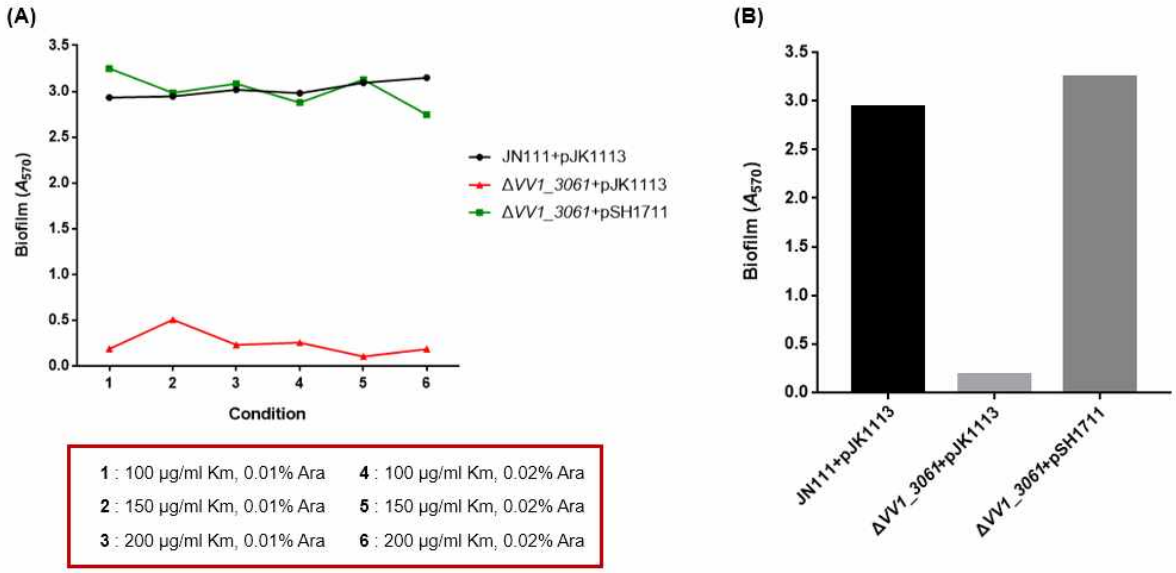


그림 50. (A) 다양한 kanamycin과 arabinose 농도 조건에서 바이오필름 생성 비교
(B) 조건 1에서 각 strain의 바이오필름 생성 비교

○ 예비 실험 결과 VV1_3061의 complementation strain은 parent strain과 비슷한 정도로 바이오필름의 물리적 저항성이 회복됨을 확인하였으며, 이는 VV1_3061의 knock-out mutant에서 expression vector를 통한 VV1_3061의 complementation이 이루어졌음을 의미함.

○ 또한 바이오필름 생성 양상은 6 가지의 농도 조건 간에 유의미한 차이를 보이지 않았으므로 kanamycin과 arabinose의 농도가 가장 낮은 '조건 1'로 추가 실험을 진행하였음.

○ 동일한 3 가지의 strain을 100 μg/mL kanamycin이 첨가된 LBS 배지에서 30 ℃로 OD_{600} 0.8까지 배양 후 배양액을 조건 1에 맞추어 100 μg/mL kanamycin과 0.01 % arabinose가 첨가된 VFMG에 OD_{600} 0.05로 희석하고 PS 재질의 test tube에 분주하여 30 ℃로 배양하였음.

○ 24시간 동안 배양하여 바이오필름을 생성시킨 후 상등액은 따내어 제거하고 test tube 표면에 부착된 바이오필름을 PBS로 세척 후 micro mixer를 이용해 1200 rpm으로 0, 10, 20, 30 초 동안 vibration stress를 가해주었음. 이후 (2)에서와 동일한 과정을 통해 crystal violet staining 및 정량을 진행하였음.

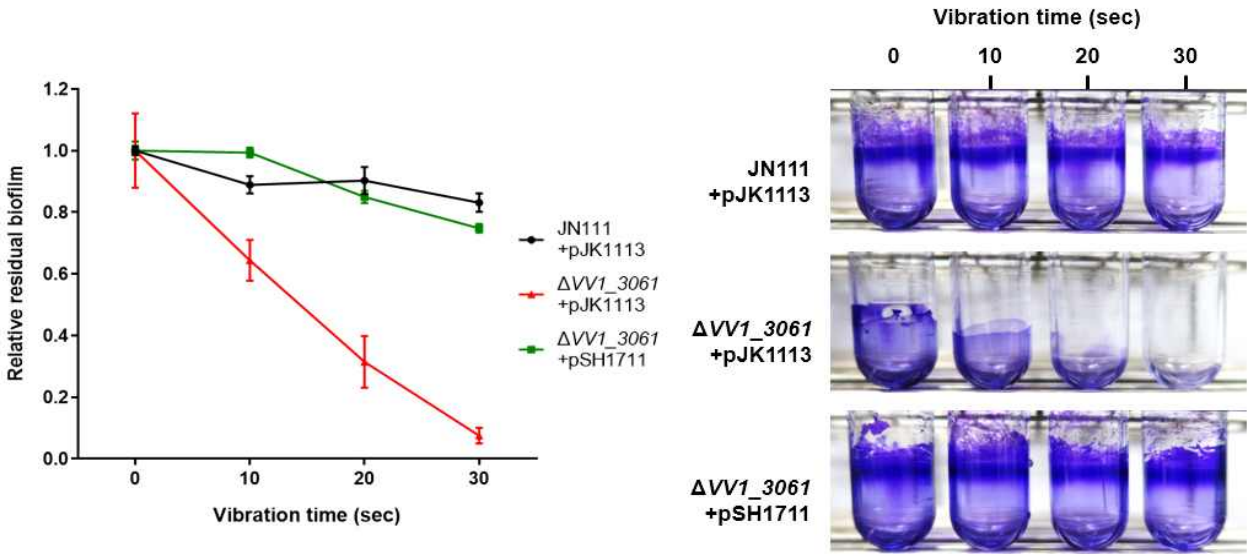


그림 51. VV1_3061의 complementation이 바이오필름의 물리적 저항성 형성에 미치는 영향

○ 실험 결과 expression vector를 통해 VV1_3061을 complementation한 strain은 empty vector를 갖는 VV1_3061 knock-out mutant와 같이 바이오필름이 접촉표면으로부터 쉽게 박리되어 파괴되는 현상을 나타내지 않았으며 바이오필름의 물리적 저항성이 parent strain의 수준으로 회복된 것을 확인하였음.

○ 이러한 결과는 VV1_3061 자체가 bacterial cell 외부로 분비되어 바이오필름의 matrix 상에서 기능하는 단백질이며, 특히 바이오필름과 바이오필름이 생성되는 접촉 표면 사이에서 상호 작용과 부착력을 강화하여 외부 stress에 대한 바이오필름의 저항성을 향상시킴을 의미함.

2. 시퀀싱된 황색포도상구균 박테리오파지의 유전체 분석 및 엔돌라이신 유전자 확인 (2차년도, 협동 2)

가. 박테리오파지 DNA 추출

○ 순수하게 농축시킨 박테리오파지 lysate은 박테리아 DNA와 RNA를 제거하기 위하여 DNase와 RNase를 각각 처리하여 37 °C에서 1 시간 동안 반응시킴.

○ 박테리오파지 lysate은 1 %의 sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5 mol/L의 EDTA와 10 mg/mL의 proteinase K를 처리한 후 56° C에서 2 시간 반응시킴.

○ 박테리오파지 DNA는 페놀과 클로로포름을 이용한 추출법으로 획득하였으며, 앞선 과정으로 불순물이 제거된 박테리오파지 lysate에 동량의 페놀을 각각 가한 후 1.5 mL tube를 위 아래로 부드럽게 흔들어 섞은 후 상온, 5000 rpm에서 5분 동안 원심분리 함.

○ 상등액만 분리하여 클로로포름으로 동일한 과정을 반복하여 상등액을 깨끗한 1.5 mL tube에 옮겨 담고, 100 % 에탄올을 이용해 DNA를 농축하여 침전시켰는데, 우선 샘플의 두 배 부피의 100 % 에탄올을 1.5 mL tube에 담고 30 분 이상 -80 °C의 냉동고에 넣은 후, 원심분리 (15,000 g, 4 °C, 10 min)하여 DNA를 침전시킨 후 70 % 에탄올로 동일한 과정을 반복함.

○ 1.5 mL tube에 pellet만 남으면 15 분 이상 상온에서 건조시켜 에탄올을 모두 증발시키고 50 µL 이상의 DW로 pellet을 풀어서 박테리오파지 DNA를 얻음.

나. CSA5 파지의 full-genome sequencing 및 ORF 예측

○ 박테리오파지의 DNA를 추출하여 준비한 뒤 Illumina Miseq (Illumina, San Diego, CA, USA)로 sequence를 분석하고, GS de novo assembler software (Roche)로 assmeble 함.

○ CLC genomics Workbench (Qiagen, Venolo, Netherlands)를 통해 CSA5 박테리오파지 sequence를 분석한 결과, 박테리오파지의 길이는 총 139,813 bp이고, 217 개의 ORF로 구성되어 있었음.

○ BLASTP 와 InterProScan 프로그램을 통해 homology searching을 하여 ORF annotation을 수행한 결과, CSA5 박테리오파지는 총 217 개의 ORF로 구성돼 있으며, 4 개의 tRNA를 포함하고 있음을 확인함.

○ CSA5 박테리오파지는 구조 형성, regulation, replication, 세포 용해 및 기타 기능을 하는 ORF 들로 구성되어 있었으며, 독성인자 및 항생제 내성 유전자가 존재하지 않음을 확인함.

○ ORF 기능 분석 후, GeneScene program을 활용하여 CSA5 박테리오파지의 유전자 지도를 완성함.

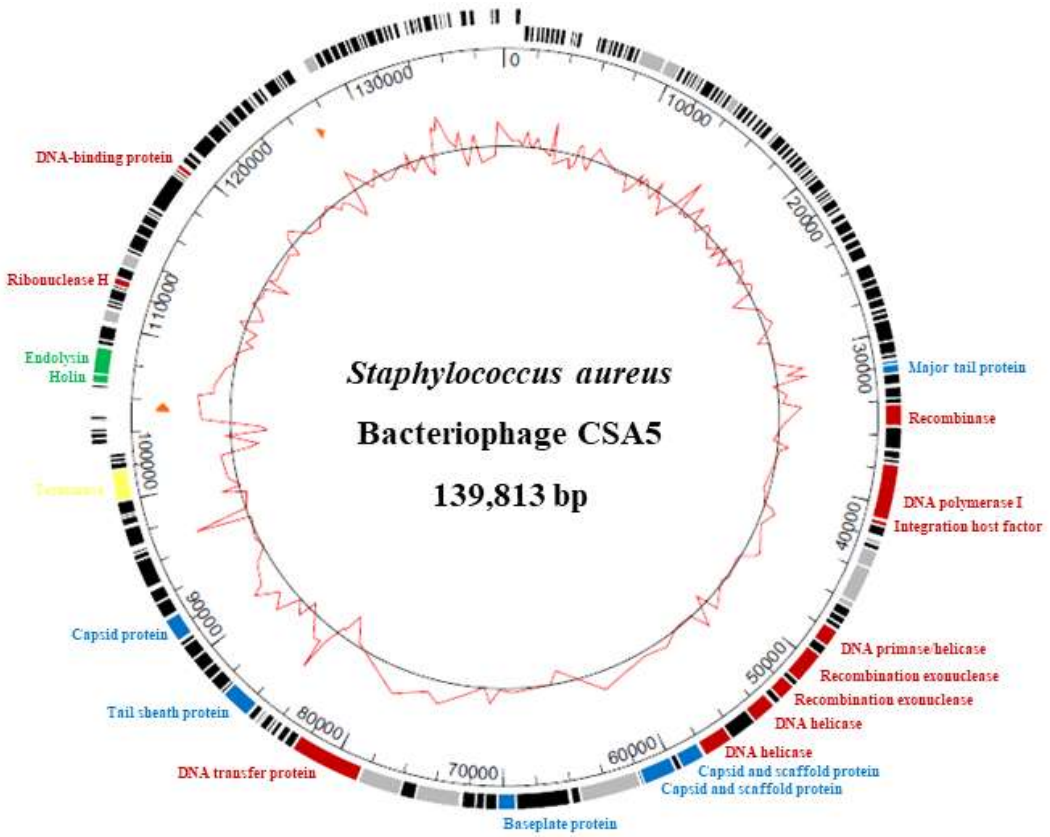


그림 52. 박테리오파지 CSA5의 유전체 지도

다. CSA13 파지의 full-genome sequencing 및 ORF 예측

○ 박테리오파지의 DNA를 추출하여 준비한 뒤 Illumina Miseq (Illumina, San Diego, CA, USA)로 sequence를 분석하고, GS de novo assembler software (Roche)로 assmeble 함.

○ CLC genomics Workbench (Qiagen, Venolo, Netherlands)를 통해 CSA13 박테리오파지의 sequence를 분석한 결과, 박테리오파지의 길이는 총 17,034 bp이고, 18 개의 ORF로 구성되어 있었음.

○ BLASTP 와 InterProScan 프로그램을 통해 homology searching을 하여 ORF annotation을 수행한 결과, CSA13 박테리오파지는 총 18 개의 ORF로 구성되어 있으며, tRNA를 포함하고 있지 않음을 확인함.

○ CSA13 박테리오파지는 구조 형성, regulation, replication, 세포 용해 및 기타 기능을 하는 ORF들로 구성되어 있었으며, 독성인자 및 항생제 내성 유전자가 존재하지 않음을 확인함

○ ORF 기능 분석 후, GeneScene program을 활용하여 CSA13 박테리오파지의 유전자 지도를 완성함.

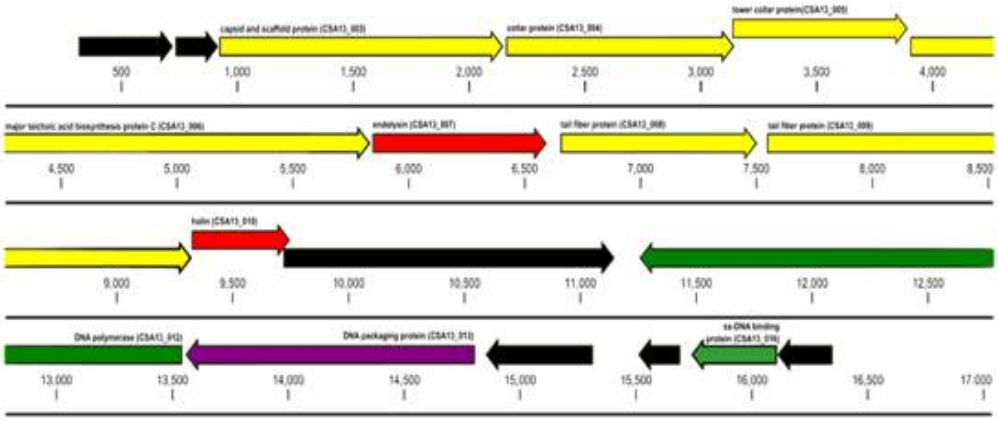


그림 53. CSA13 박테리오파지의 유전체 지도

라. CSA24 파지의 full-genome sequencing 및 ORF 예측

○ 박테리오파지의 DNA를 추출하여 준비한 뒤 Illumina Miseq (Illumina, San Diego, CA, USA)로 sequence를 분석하고, GS de novo assembler software (Roche)로 assmeble 함.

○ CSA24 박테리오파지의 sequence를 분석한 결과, 박테리오파지의 길이는 총 16,911 bp이고, 19 개의 ORF로 구성되어 있었음.

○ BLASTP 와 InterProScan 프로그램을 통해 homology searching을 하여 ORF annotation을 수행한 결과, CSA24 박테리오파지는 총 19 개의 ORF로 구성돼 있으며, tRNA를 포함하고 있지 않음을 확인함.

○ CSA24 박테리오파지는 구조 형성, regulation, replication, 세포 용해 및 기타 기능을 하는 ORF들로 구성되어 있었으며, 독성인자 및 항생제 내성 유전자가 존재하지 않음을 확인함.

○ ORF 기능 분석 후, GeneScene program을 활용하여 CSA24 박테리오파지의 유전자 지도를 완성함.

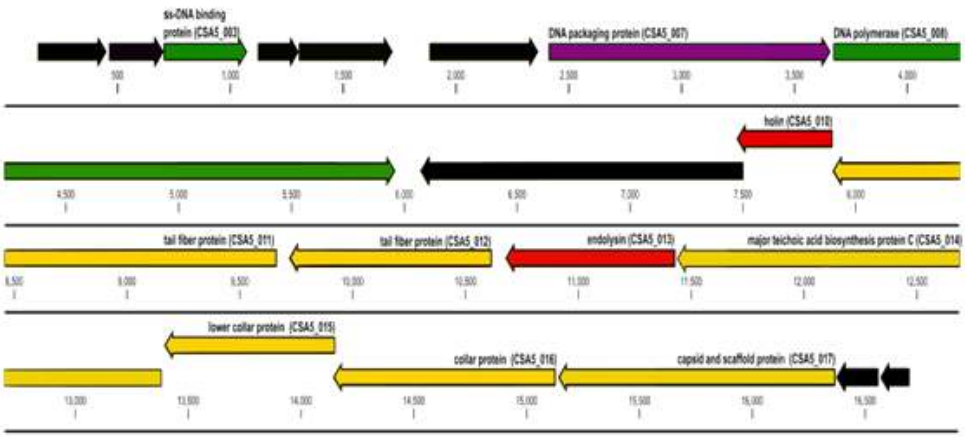


그림 54. CSA24 박테리오파지의 유전체 지도

마. HSA30 박테리오파지의 엔돌라이신 확인

○ Bacteriophage HSA30의 분석된 224 개 ORF 중, BLASTP analysis를 통하여 기존에 보고된 endolysin과 similarity를 보이는 ORF (ORF 214)를 선정함.

○ 기존의 protein domain database와 비교하기 위하여 InterProScan program을 사용하여 domain anlaysis를 진행한 결과, LysHSA30의 N-terminal에 amidase 활성을 가진 것으로 알려진 CHAP domain이 있었으며, 중간에 amidase 활성을 갖는다고 알려진 amidase_2 domain이 위치함. 또한, C-terminal region에 cell wall binding domain으로 알려진 SH3_5 domain이 자리하고 있음을 확인함.

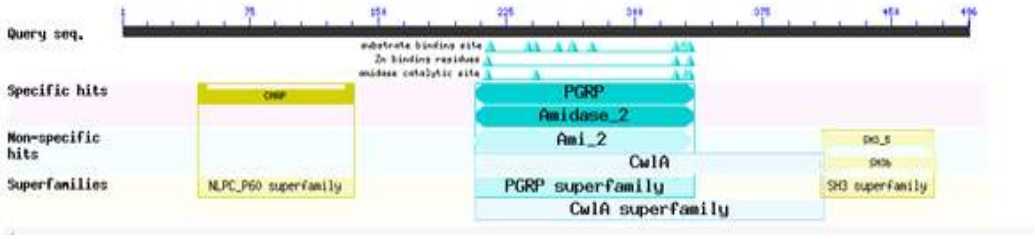


그림 55. HSA30의 모식도

바. HSA84 박테리오파지의 엔돌라이신 확인

○ Bacteriophage HSA84의 분석된 60 개 ORF 중, BLASTP analysis를 통하여 기존에 보고된 endolysin과 similarity를 보이는 ORF (ORF 24)를 선정함.

○ 기존의 protein domain database와 비교하기 위하여 InterProScan program을 사용하여 domain anlaysis를 진행한 결과, LysHSA84의 N-terminal에 amidase 활성을 가진 것으로 알려진 CHAP domain이 있었으며, 중간에 amidase 활성을 갖는다고 알려진 amidase_2 domain이 위치하고 있었음. 또한, C-terminal region에 cell wall binding domain으로 알려진 SH3_5 domain이 자리하고 있음을 확인함.

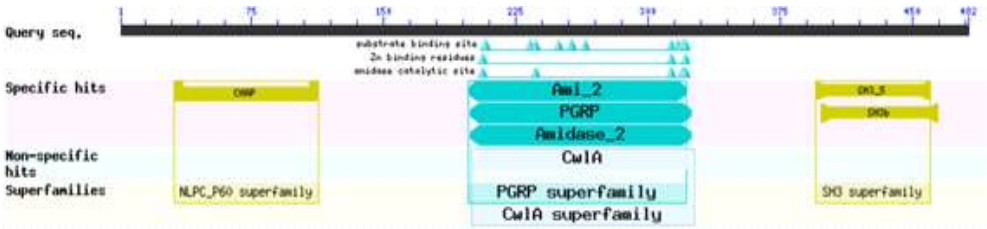


그림 56. HSA84의 모식도

사. CSA5 박테리오파지의 엔돌라이신 확인

○ Bacteriophage CSA5의 분석된 217 개 ORF 중, BLASTP analysis를 통하여 기존에 보고된 endolysin과 similarity를 보이는 ORF (ORF 154)를 선정함.

○ 기존의 protein domain database와 비교하기 위하여 InterProScan program을 사용하여 domain anlaysis를 진행한 결과, LysCSA5의 N-terminal에 amidase 활성을 가진 것으로 알려진 CHAP domain이 있었으며, 중간에 amidase 활성을 갖는다고 알려진 amidase_2 domain이 위치하고 있었음. 또한, C-terminal region에 cell wall binding domain으로 알려진 SH3_5 domain이 자리하고 있음을 확인함.

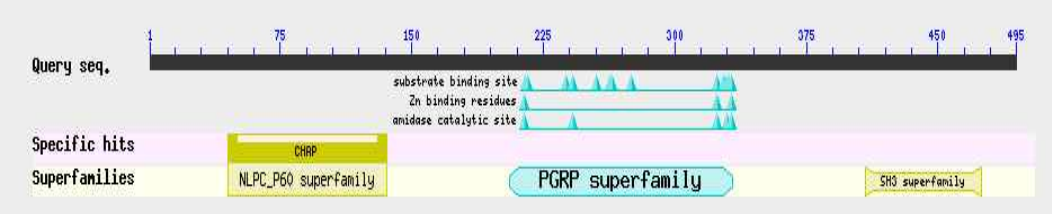


그림 57. CSA5의 모식도

아. CSA24 박테리오파지의 엔돌라이신 확인

○ Bacteriophage CSA24의 경우, 분석된 19 개 ORF 중, BLASTP analysis를 통하여 기존에 보고된 endolysin과 similarity를 보이는 ORF (ORF 13)를 선정함.

○ 기존의 protein domain database와 비교하기 위하여 InterProScan program을 사용하여 domain anlaysis를 진행한 결과, LysCSA24의 N-terminal에 amidase 활성을 가진 것으로 알려진 CHAP domain이 있었으며, C-terminal region에 cell wall binding domain으로 알려진 SH3_5 domain이 자리하고 있음을 확인함.

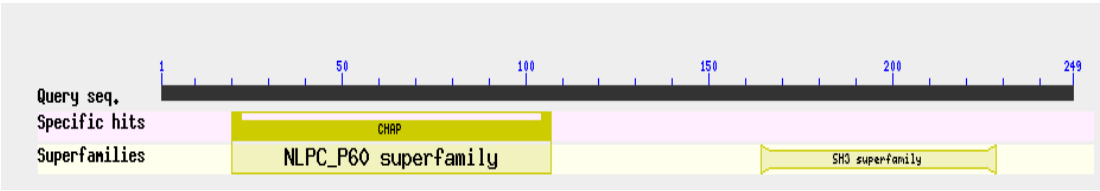


그림 58. CSA24의 모식도

자. CSA13 박테리오파지의 엔돌라이신 확인

○ Bacteriophage CSA13의 경우, 분석된 18 개 ORF 중, BLASTP analysis를 통하여 기존에 보고된 endolysin과 similarity를 보이는 ORF (ORF 13)를 선정함.

○ 기존의 protein domain database와 비교하기 위하여 InterProScan program을 사용하여 domain anlaysis를 진행한 결과, LysCSA13의 N-terminal에 amidase 활성을 가진 것으로 알려진 CHAP domain이 있었으며, C-terminal region에 cell wall binding domain으로 알려진 SH3_5 domain이 자리하고 있음을 확인함.

○ Bacteriophage CSA13의 높은 균 제어 활성을 고려할 때, LysCSA13이 후속 연구에 좋은 후보임을 알 수 있음.

○ 분리한 박테리오파지 HSA30, HSA84, CSA5, 그리고 CSA24의 유사성 검사 결과, 기존의 엔돌라이신과 유사도가 비교적 낮았으며, *podoviridae*과 phage에서 유래된 endolysin의 특성분석이 이루어진 예가 거의 없으므로, 이 엔돌라이신의 특성분석을 수행하는 것은 매우 의미 있는 연구가 될 것으로 사료되어 후속 연구를 진행함.

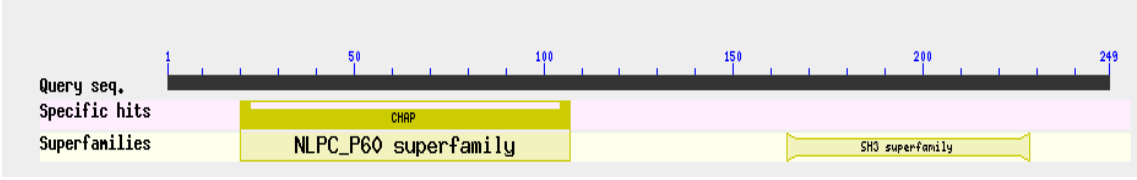


그림 59. LysCSA13의 모식도

3. 엔돌라이신 유전자 클로닝 후 분리, 정제 및 특성 분석 (2차년도, 협동 2)

가. 선별된 엔돌라이신 candidate의 cloning, purification and checking lytic activities

○ *S. aureus*-targeting 박테리오파지 CSA13의 전체 sequence 분석 결과, 엔돌라이신 유전자가 확인되었고, 박테리오파지로부터 이 부분을 얻어낼 수 있도록 양 끝에 두 가지 primer를 design하여 PCR을 하여 엔돌라이신 product를 얻음.

○ 그 후 pET28a 벡터에 클로닝 하여, *E. coli* BL21에 형질전환하여 재조합 균주를 완성함.

○ 완성된 벡터는 IPTG의 첨가에 의해 발현이 유도되며, 그 후, 균주의 세포벽을 제거하고 원심분리를 한 뒤 상등액을 Ni-NTA Superflow 컬럼에 통과시켜 순수한 엔돌라이신 LysCSA13을 얻음.

○ SDS-PAGE를 통해 LysCSA13이 순수하게 분리되었으며, 예측된 크기를 갖는 것으로 확인됨.

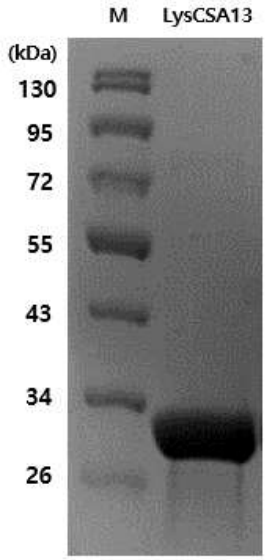


그림 60. SDS-PAGE를 통해 LysCSA13의 순수 정제 확인

나. LysCSA13의 균사멸 효과 분석

○ 엔돌라이신의 용균 활성을 확인하기 위해 exponential stage의 *S. aureus* RN 4220 배양액에 분리한 엔돌라이신 LysCSA13을 처리함.

○ 이때 엔돌라이신을 첨가한 실험구가 buffer만 첨가한 대조군에 비해 흡광도가 어느 정도 감소하는지 OD_{600} 값의 변화를 통해 파악하였고, 이를 통해 분리된 엔돌라이신 처리량과 host cell의 사멸 능력을 판단함.

○ LysCSA13은 농도 의존적인 균 사멸 효과를 나타냈으며, 300 nM을 처리한 경우, 10 분 이내의 짧은 시간에 OD_{600} 값이 0.7 이상 감소함을 확인함.

○ 기존에 보고된 여러 엔돌라이신에 비해 적은 양의 엔돌라이신으로 짧은 시간 안에 큰 효과를 보였기에, 이는 우수한 균 및 바이오필름 사멸제재로 활용될 수 있다고 판단됨.

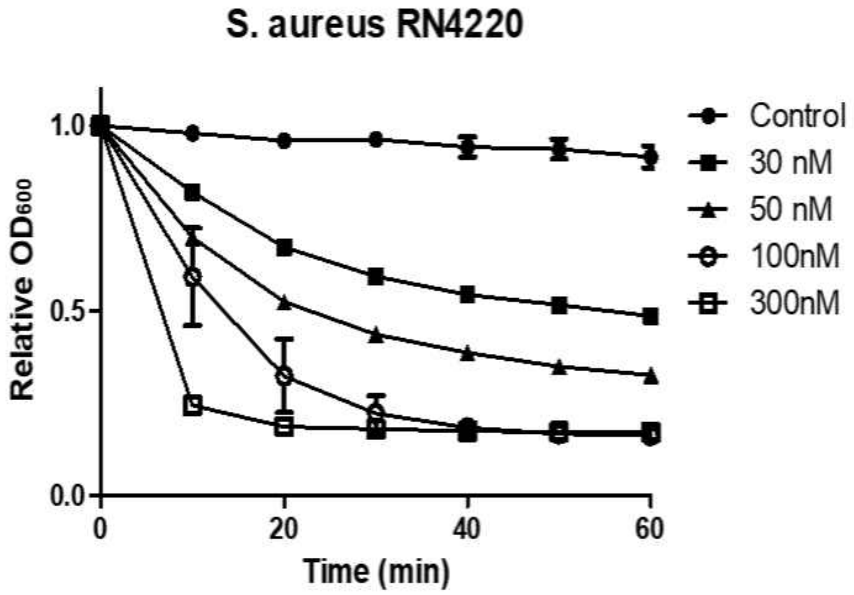


그림 61. LysCSA13의 균사멸 효과 분석

다. LysCSA13의 항균 활성 범위

○ 분리한 엔돌라이신에 sensitive한 용균 활성 범위를 확인하는 실험을 수행하는데, 그람 음성균과 그람 양성균 모두를 대상으로 하여 시험함.

○ 그람 양성균으로는 *B. cereus, B. subtilis, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Streptococcus thermophilus*와 *Lactococcus lactis* 등의 균주를 숙주로 하여 엔돌라이신이 항균 활성을 나타내는지를 600 nm에서의 optical density 값으로 확인함.

○ 그람 음성균으로는 *E. coli, Pseudomonas aeroginosa, Cronobacter sakazakii, Salmonella* Typhimurium, *Shigella flexineri*와 *E. coli* O157:H7 등의 균주를 숙주로 하여 항균 활성을 확인함.

○ 그람 음성균의 경우, 0.1 M의 EDTA로 세포를 washing하여 세포벽의 permeability를 높인 후 실험을 수행함.

○ 실험 결과는 table 에 제시하였으며, CSA13 박테리오파지의 숙주 용해능 범위 시험 시와 동일한 균주로 실험하였기에 그 결과가 비교 가능함.

○ LysCSA13 엔돌라이신의 항균 활성 범위가 넓어졌음을 확인함.

○ LysCSA1는 CSA13 박테리오파지 처리 시와 마찬가지로 시험한 모든 *S. aureus* 균주들에, *S. aureus* 이외의 staphylococcal 균주들에 있어서는 *S. epidermidis, S. warneri*와 *S. intermedius* 균주를 추가적으로 사멸할 수 있음을 확인함.

○ 또한 LysCSA13은 기존에 알려진 기타 엔돌라이신과 비교하였을 때, 넓은 항균 범위를 갖고 있음을 확인함.

표 26. LysCSA13의 용균 활성 범위

Bacterial host	Lytic activity (%)
Staphylococcal strain	
S. aureus RN4220	+++
S. aureus Newman	++
S. aureus ATCC 13301	+++
S. aureus ATCC 23235	++
S. aureus ATCC 33586	+++
S. aureus ATCC 33593	+++
S. aureus ATCC 6538	++
S. aureus ATCC 29213	++
S. aureus ATCC 12600	+++
MRSA CCARM 3793	++
MRSA CCARM 3089	+++
MRSA CCARM 3090	+++
S. haemolyticus ATCC 29970	+++
S. hominis ATCC 37844	+++
S. warneri ATCC 10209	++
Other Gram-positive bacteria	
Enterococcus faecalis ATCC 29212	-
Bacillus cereus ATCC 14579	-
Bacillus subtilis ATCC 23857	-
Listeria monocytogenes ATCC 19114	-
Other Gram-negative bacteria	
Salmonella enterica serovar Typhimurium SL 1344	-
Escherichia coli MG1655 ATCC 47076	-
Cronobacter sakazakii ATCC 29544	-
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	-

라. LysCSA13 용균 활성에 대한 온도 및 pH, NaCl, 양이온의 효과

○ 분리한 엔돌라이신의 pH, 염, 온도 및 2가 이온에 따른 항균활성을 비교하는 실험을 수행함.

○ exponential phase까지 배양한 숙주 균주 배양액에 엔돌라이신을 처리함.

○ 다양한 pH의 buffer 조건에서 실험을 수행하는데, pH 2.0 (0.1% Trifluoroacetic acid), pH 7.0 (50 mM Bis-Tris), pH 8.0-8.5 (50 mM Tris-HCl), pH 9.0-9.5 (50 mM glycine), pH 10.0-10.5 (50 mM N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid)의 조건에서 용해능을 비교함.

○ 또한, 온도에 따른 항균 활성을 비교하기 위하여 25-72 °C의 다양한 조건에서 엔돌라이신을 처리한 후 용해능을 비교함.

○ 0-100 mM의 다양한 염 조건에서의 엔돌라이신 활성 변화를 측정함.

○ 해당 엔돌라이신의 효과적인 항균활성에 도움을 주는 2가 이온들을 선별해내어 이들의 효과를 확인함.

○ pH 8.0의 buffer 조건에서 최대한의 항균활성을 보였고, 25 °C에서 가장 우수한 활성을 나타냄.

○ NaCl 농도가 0 mM일 때 최대한의 활성을 보였으며, 25 mM 이상의 조건에서는 활성이 절반 이하로 떨어지는 현상을 보임.

○ 5.0 mM의 EDTA를 lysCSA13 protein에 처리하여 금속이온 활성을 제거한 결과, activity가 현격히 떨어지는 것을 보아 LysCSA13의 완전한 활성을 위하여 금속이온이 필요하다는 결과를 얻음.

○ 이후 칼슘이온, 마그네슘이온, 망간이온, 구리이온과 아연이온 등을 EDTA를 처리한 LysCSA13에 처리한 결과 칼슘이온과 망간이온을 1 mM로 처리하였을 때 활성이 완전히 회복됨.

○ 반면, 다른 금속이온을 처리하여 시험해 본 모든 실험구에서 LysCSA13의 활성이 거의 회복되지 않음.

○ 다음 결과를 바탕으로 하였을 때, LysCSA13의 활성을 위하여 금속이온이 필요하며, 특히 칼슘이온과 망간이온이 LysCSA13의 효소 활성이 최대가 되는데 필요하다는 결과 얻음.

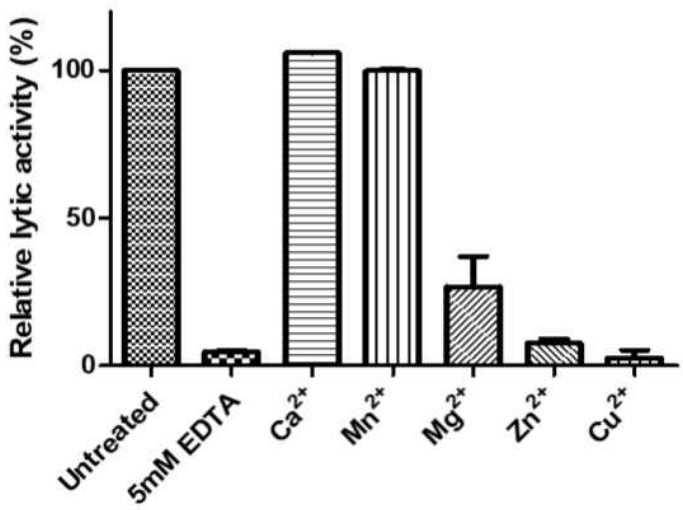
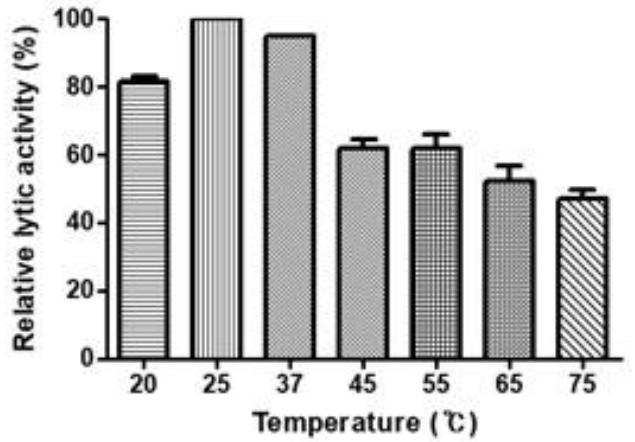
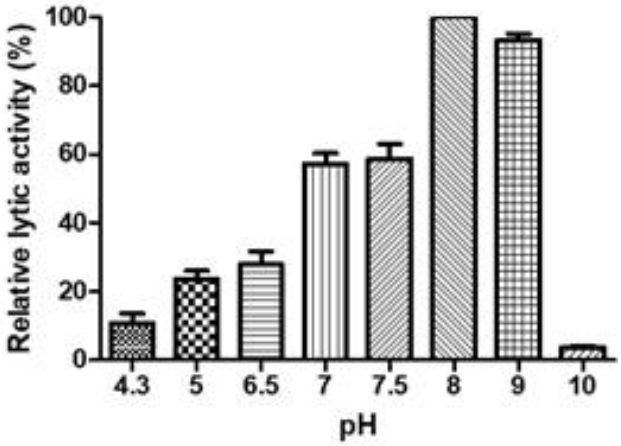


그림 62. LysCSA13 용균 활성에 대한 양이온의 효과





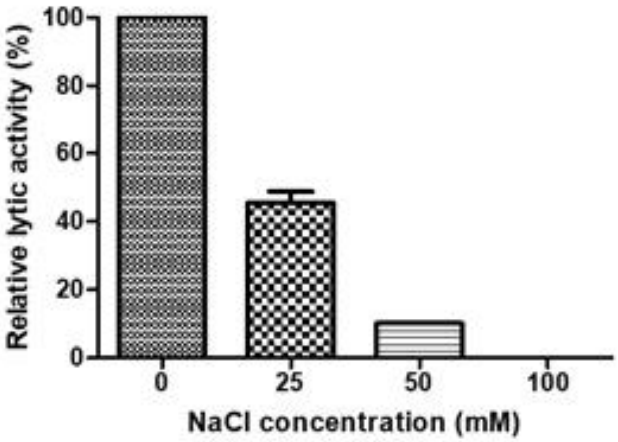


그림 63. LysCSA13 용균 활성에 대한 온도 및 pH, NaCl의 효과

4. 초고온 과열 증기 및 박테리오파지 엔돌라이신 병행처리 연구 (2차년도, 협동 2)

가. 황색포도상구균 및 살모넬라 바이오필름 형성

○ 식품접촉표면으로는 1차년도 연구를 통해 초고온 과열 증기의 황색포도상구균 바이오필름 제어 효과를 검증한 바 있는 stainless steel (SS) No.4를 사용하였음. SS No.4 재질을 coupon (2*2 cm) 형태로 절단하여 사용하였고 실험에 사용하기 전 95 % ethanol에 담근 후 autoclave를 통해 표면에 존재하는 다른 미생물을 멸균하였음.

그림 64. 실험에 사용된 SS No.4 coupon (2*2 cm)

○ 바이오필름 형성을 위해 황색포도상구균 및 살모넬라 균주를 tryptic soy broth (TSB)에서 24 시간 동안 배양한 후 원심분리를 통해 균체를 모았으며 PBS buffer에 다시 희석하여 10^8~10^9CFU/mL 농도로 50 mL conical tube에 30 mL씩 분주하였음. 실험에는 황색포도상구균 ATCC 25923, ATCC 27213, ATCC 29213 균주 및 살모넬라 타이피무리움 ATCC 19585, ATCC 43971, DT 104 균주를 사용하였음.

○ 준비된 PBS 균액에 SS coupon을 넣고 4 ℃에서 24 시간 동안 배양하며 균을 SS coupon 표면에 부착시킴.

○ 그 후 SS coupon을 PBS buffer로부터 꺼내어 멸균증류수를 이용하여 washing해 줌으로써 부착되지 않은 균을 제거하고 30 mL의 TSB 용액이 담긴 conical tube에 옮겨 25 ℃에서 5 일간 배양하며 황색포도상구균 및 살모넬라 바이오필름을 형성시킴

○ 5 일 후 바이오필름이 형성된 coupon을 사용하여 초고온 과열 증기 및 박테리오파지 엔돌라이신 병행처리 연구를 수행함.

나. 병행처리 조건 설정

○ 1차년도에는 5*2 cm 크기의 SS No.4 coupon을 사용하였으나 2차년도 병행처리 연구에 있어서는 처리의 편의성을 위해 2*2 cm 크기의 coupon을 사용하였음. 따라서 병행처리 시간 설정을 위해 상기의 방법으로 SS No.4 coupon에 형성된 황색포도상구균 바이오필름에 포화 증기 및 초고온 과열 증기를 처리하고 저감화 정도를 확인하였음. 포화 증기 및 초고온 과열 증기 처리된 coupon을 glass beads가 포함된 30 mL의 PBS가 담긴 conical tube에 넣고 2 분간 균질화 한 후 10배 단계적으로 희석하여 각각의 선택배지에 도말함. 선택배지로는 황색포도상구균의 경우 Baird Parker agar를 사용하였으며 살모넬라의 경우 Xylose lysine desoxycholate agar를 사용하였음. 실험에는 1차년도에 사용한 lab scale 포화 증기 및 초고온 과열 증기 발생 장비를 동일하게 사용하였음.

○ 또한 박테리오파지 엔돌라이신 단독처리에 따른 SS No.4 coupon 내 황색포도상구균 및 살모넬라 바이오필름 제어 효과를 확인하였음. 상기의 방법으로 SS No.4 coupon에 형성된 황색포도상구균 및 살모넬라 바이오필름에 정제된 황색포도상구균 엔돌라이신 LysCSA1 (300 및 500 nM) 및 살모넬라 엔돌라이신 BSP16Lys (150 및 300 nM)을 30 분간 처리한 후 저감화 정도를 확인함. 엔돌라이신 처리를 위해서 아래와 같은 챔버를 제작하여 사용하였으며 엔돌라이신 처리 후 상기와 같은 방법을 통해 선택배지에 도말하고 배양한 후 균을 계수하였음.

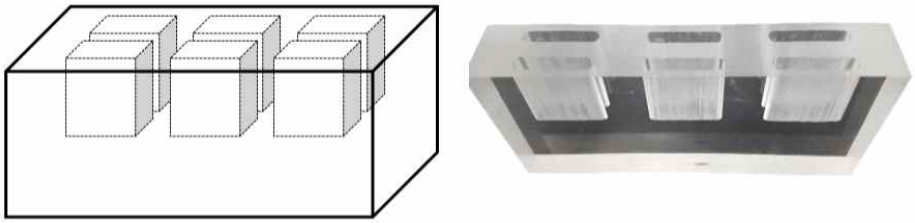


그림 65. 실험에 사용된 엔돌라이신 처리용 챔버

○ 100 ℃ 포화 증기 및 150 ℃ 초고온 과열 증기 처리에 따른 stainless steel No.4 표면 내 황색포도상구균 바이오필름 저감화 결과는 아래 그림과 같음.

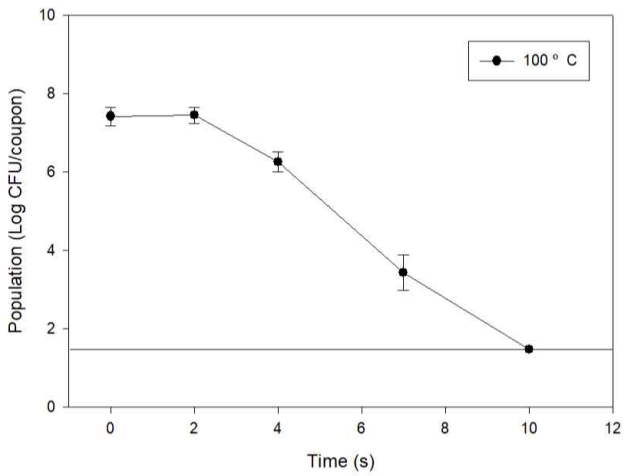


그림 66. 100 ℃ 포화 증기 처리에 따른 SS No.4 coupon (2*2 cm) 내 황색포도상구균 바이오필름 제어 효과

○ 100 ℃ 포화 증기 처리 시 10 초 처리 후 모든 균이 검출한계 이하 (1.48 log CFU/coupon)로 저감화 되는 것을 확인하였음. 1차년도의 연구에서는 100 ℃ 포화 증기 처리 시 20 초 처리를 통해 검출한계 이하로 균이 저감화 된 것에 비해 더 좋은 저감화 효과가 나타난 것은 coupon의 크기가 작아 진 것에 따른 면적 대비 포화 증기 처리량의 증가에 따른 것으로 생각됨.

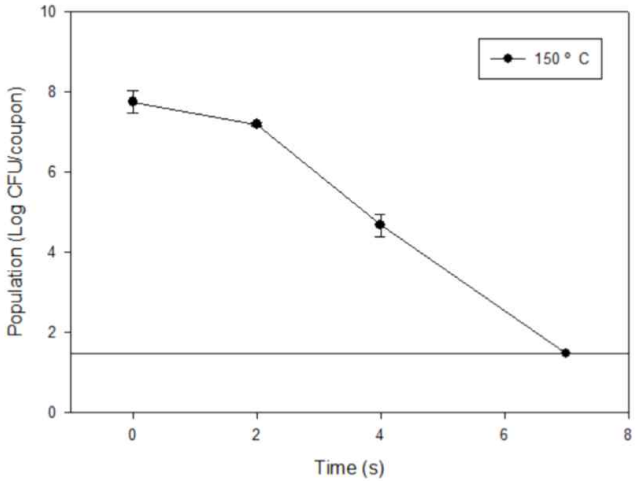


그림 67. 150 ℃ 포화 증기 처리에 따른 SS No.4 coupon (2*2 cm) 내 황색포도상구균 바이오필름 제어 효과

○ 150 ℃ 초고온 과열 증기 처리 시 7 초 처리 후 모든 균이 검출한계 이하 (1.48 log CFU/coupon)로 저감화 되는 것을 확인하였음. 1차년도의 연구에서는 150 ℃ 포화 증기 처리 시 10 초 처리를 통해 검출한계 이하로 균이 저감화 된 것에 비해 더 좋은 저감화 효과가 나타난 것은 상기와 동일한 이유인 것으로 생각됨.

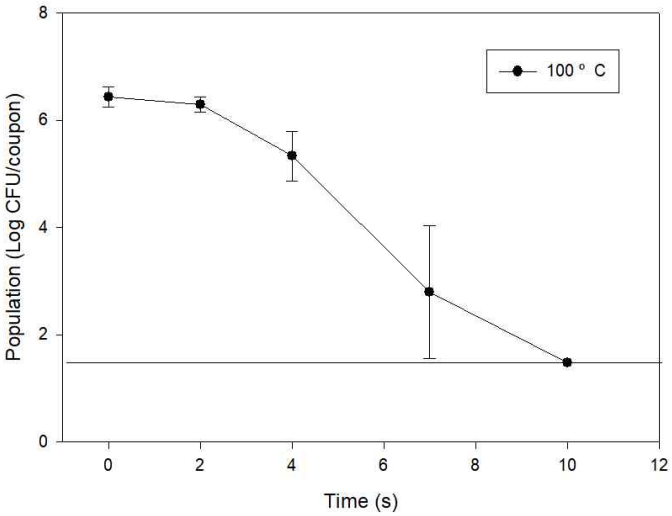


그림 68. 100 ℃ 포화 증기 처리에 따른 SS No.4 coupon (2*2 cm) 내 살모넬라 바이오필름 제어 효과

○ 살모넬라 바이오필름의 경우 100 ℃ 포화 증기 처리 시 황색포도상구균 바이오필름과 동일하게 10 초 처리 후 모든 균이 검출한계 이하 (1.48 log CFU/coupon)로 저감화 되는 것을 확인하였음. 살모넬라 바이오필름의 경우 150 ℃ 포화 증기 처리 시 3 초 처리 시 모든 균이 검출한계 이하 (1.48 log CFU/coupon)로 저감화 되어 엔돌라이신 병행처리 조건 설정에 어려움이 있었으며 따라서 살모넬라의 경우 100 ℃ 포화 증기와 엔돌라이신의 병행처리 연구만 진행하였음.

○ 황색포도상구균 박테리오파지 엔돌라이신 LysCSA1 단독처리의 경우 300 nM을 30 분간 처리 시 0.50 log, 500 nM을 30 분간 처리 시 0.29 log 저감화가 나타나는 것을 확인하였음.

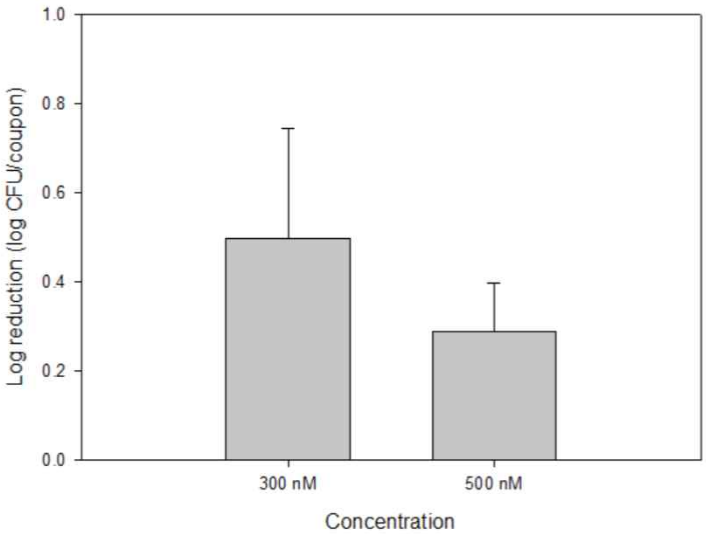


그림 69. 박테리오파지 엔돌라이신 단독처리에 따른 SS No.4 coupon (2*2 cm) 내 황색포도상구균 바이오필름 제어 효과

○ 살모넬라 박테리오파지 엔돌라이신 BSP16Lys 단독처리의 경우 150 nM을 30 분간 처리 시 0.81 log, 300 nM을 30 분간 처리 시 1.26 log 저감화가 나타나는 것을 확인하였음.

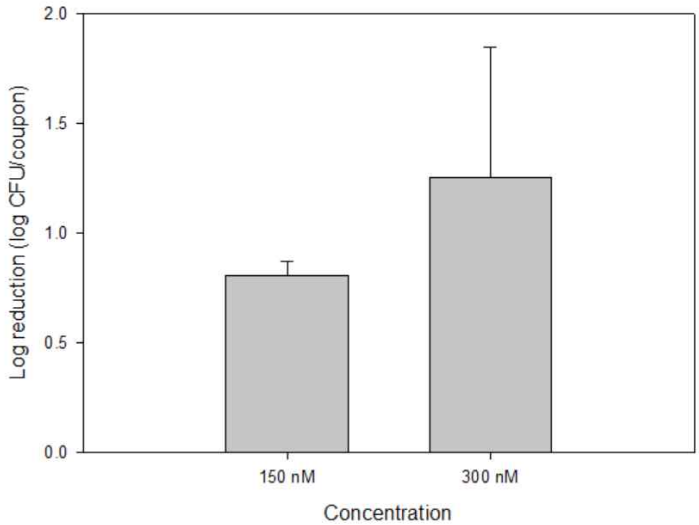


그림 70. 박테리오파지 엔돌라이신 단독처리에 따른 SS No.4 coupon (2*2 cm) 내 살모넬라 바이오필름 제어 효과

○ 병행처리 시간은 포화 증기 및 초고온 과열의 경우 4 초, 엔돌라이신 처리의 경우 30 분으로 설정함.

다. 초고온 과열 증기/박테리오파지 엔돌라이신 병행처리에 따른 바이오필름 제어효과 검증

○ 상기에서 설정된 포화 증기 및 초고온 과열증기, 엔돌라이신의 처리 시간을 토대로 하여 병행처리를 수행한 후 황색포도상구균 및 살모넬라 바이오필름의 저감화 효과를 확인함. 포화 증기 및 초고온 과열 증기의 경우 처리 공정상 엔돌라이신과의 동시 처리가 어렵기 때문에 순차적 처리로 진행하였으며 우선적으로 포화 증기 및 초고온 과열 증기를 4초간 처리한 후 황색포도상구균의 경우 박테리오파지 엔돌라이신 LysCSA1 300 nM 및 500 nM, 살모넬라의 경우 박테리오파지 엔돌라이신 BSP16Lys 150 nM 및 300 nM로 각각 30 분간 처리한 후 저감화 정도를 확인함.

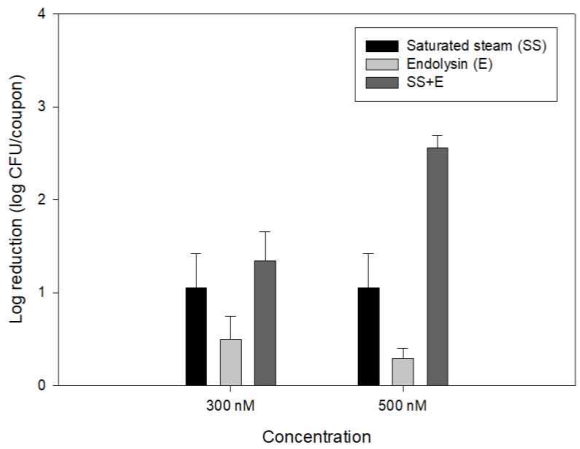


그림 71. 100 ℃ 포화 증기 처리 및 엔돌라이신 병행처리에 따른 SS No.4 coupon 내 황색포도상구균 바이오필름 제어 효과

○ 황색포도상구균 바이오필름의 경우 100 ℃의 포화 증기 4초 처리 시 1.06 log, 300 nM 및 500 nM 엔돌라이신 LysCSA1 30 분 처리 시 0.50 및 0.29 log 저감화가 나타났음. 이에 비해 포화 증기 및 300 nM의 엔돌라이신 LysCSA1 병행처리 시 1.34 log 저감화가 나타남으로써 additional effect를 확인하였으며 500 nM의 엔돌라이신 LysCSA1 병행처리 시 2.56 log 저감화가 나타남으로써 synergistic effect를 확인하였음.

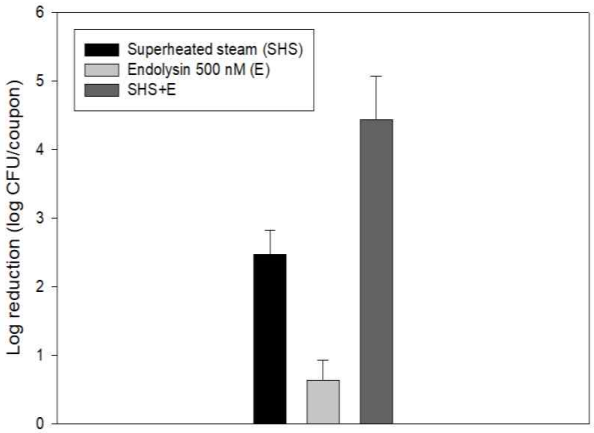


그림 72. 150 ℃ 포화 증기 처리 및 엔돌라이신 병행처리에 따른 SS No.4 coupon 내 황색포도상구균 바이오필름 제어 효과

○ 150 ℃의 초고온 과열 증기의 경우 4 초 처리 시 2.47 log, 500 nM 엔돌라이신 LysCSA1 30 분 처리 시 0.64 저감화가 나타난 것에 비해 150 ℃의 초고온 과열 증기 및 500 nM의 엔돌라이신 LysCSA1 병행처리 시 4.44 log 저감화가 나타남으로써 synergistic effect를 확인하였음.

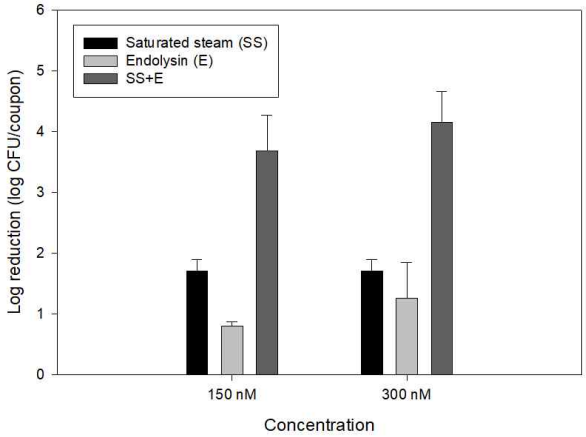


그림 73. 100 ℃ 포화 증기 처리 및 엔돌라이신 병행처리에 따른 SS No.4 coupon 내 살모넬라 바이오필름 제어 효과

○ 살모넬라 바이오필름의 경우 100 ℃의 포화 증기 4초 처리 시 1.70 log, 150 nM 및 300 nM 엔돌라이신 BSP16Lys 30 분 처리 시 0.81 및 1.26 log 저감화가 나타났음. 이에 비해 포화 증기 및 150 nM의 엔돌라이신 BSP16Lys 병행처리 시 3.68 log 저감화가 나타남으로써 synergistic effect를 확인하였으며 300 nM의 엔돌라이신 LysCSA1 병행처리 시 4.16 log 저감화가 나타남으로써 마찬가지로 synergistic effect를 확인하였음.

라. 초고온 과열 증기/박테리오파지 엔돌라이신 병행처리 적용 순서에 따른 바이오필름 제어효과 검증

○ 황색포도상구균 바이오필름을 대상으로 포화 증기/초고온 과열 증기 및 엔돌라이신의 병행처리 순서가 제어효과에 미치는 영향을 확인하였음. 제어 기술 순차적 처리의 경우 처리 순서에 따라 저감화 효과가 다르게 나타날 수 있기 때문에 이를 확인하는 것은 실제적인 공정적용에 있어 매우 중요하다고 할 수 있음.

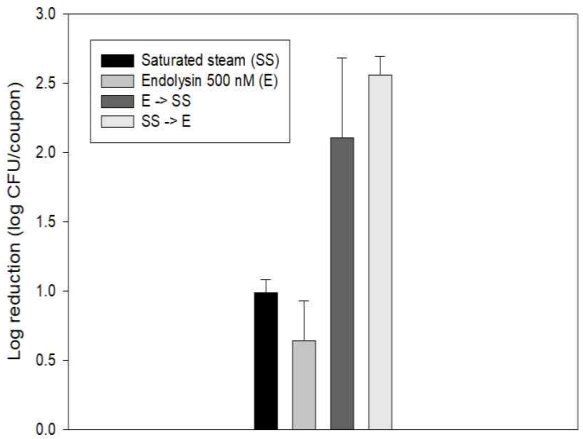


그림 74. 100 ℃ 포화 증기 처리 및 엔돌라이신 병행처리 순서에 따른 SS No.4 coupon 내 황색포도상구균 바이오필름 제어 효과

○ 100 ℃의 포화 증기 4초 처리 시 0.99 log, 500 nM 엔돌라이신 LysCSA1 30 분 처리 시 0.64 log 저감화가 나타났음. 병행처리에 있어 100 ℃의 포화 증기 처리 후 엔돌라이신을 처리하였을 경우 2.56 log 저감화가 나타난 것에 비해 엔돌라이신 처리 후 및 100 ℃의 포화 증기를 처리하였을 때 2.11 log의 저감화가 나타났으나 유의적인 차이는 나타나지 않음. 따라서 포화 증기 및 엔돌라이신 병행처리에 있어서는 각 기술의 처리 순서가 바이오필름 제어에 있는 영향을 미치는 않는 것으로 사료됨.

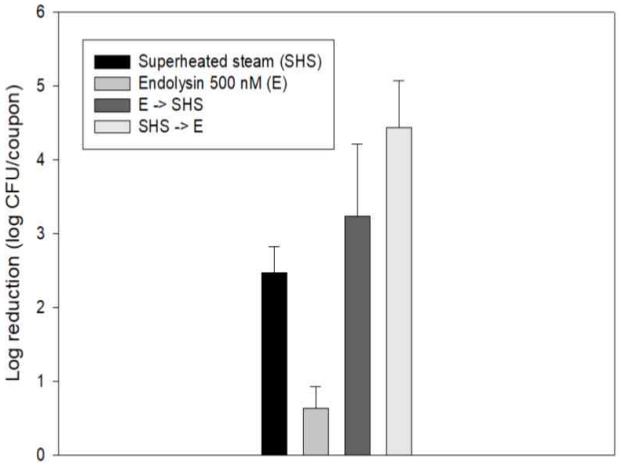


그림 75. 150 ℃ 초고온 과열 증기 처리 및 엔돌라이신 병행처리 순서에 따른 SS No.4 coupon 내 황색포도상구균 바이오필름 제어 효과

○ 150 ℃의 초고온 과열 증기 4초 처리 시 2.47 log, 500 nM 엔돌라이신 LysCSA1 30 분 처리 시 0.64 log 저감화가 나타났음. 병행처리에 있어 150℃의 초고온 과열 증기 처리 후 엔돌라이신을 처리하였을 경우 4.44 log 저감화가 나타난 것에 비해 엔돌라이신 처리 후 및 150 ℃의 초고온 과열 증기를 처리하였을 때 3.23 log의 저감화가 나타남으로써 유의적인 차이를 확인하였음. 즉, 초고온 과열 증기와 엔돌라이신 병행처리에 있어서는 초고온 과열 증기를 우선적으로 적용하고 엔돌라이신을 적용하는 것이 황색포도상구균 바이오필름 제어에 있어 더 좋은 효과를 나타내는 것으로 확인됨.

마. 초고온 과열 증기/박테리오파지 엔돌라이신 병행처리에 따른 injured cell 발생 확인

○ 식중독 미생물의 injured cell의 경우 식품접촉표면 내 잔존하고 있다가 이후 적합한 환경조건이 되면 회복되어 식중독을 유발할 수 있기 때문에 제어 기술 적용 시 injured cell 발생여부를 확인하는 것이 중요함. 따라서 포화 증기/초고온 과열 증기 및 엔돌라이신 병행처리에 따른 황색포도상구균의 injured cell 발생 여부를 확인하였음. Injured cell의 계수는 처리 된 황색포도상구균 바이오필름 cell을 우선적으로 일반 영양배지인 tryptic soy agar (TSA)에 37 ℃에서 2 시간 동안 배양한 후 선택배지인 baird parker agar를 overlay 하고 22 시간동안 추가 배양하는 방법을 통하여 진행하였음.

○ 상기 병행처리 적용 순서에 따른 바이오필름 제어효과 검증 실험과 동일한 조건으로 실험을 수행한 후 황색포도상구균 바이오필름 cell의 injured cell 발생 정도를 확인해 보았을 때, 100 ℃의 포화 증기 및 엔돌라이신 병행처리, 150 ℃의 초고온 과열 증기 및 엔돌라이신 병행 처리 모두 처리 순서와 상관없이 유의적인 수준의 injured cell을 발생시키지 않는 것을 확인하였음. 따라서 포화 증기/초고온 과열 증기 및 엔돌라이신 병행처리가 효과적으로 황색포도상구균 바이오필름을 제어하는 것을 확인함.

표 27. 100℃ 포화 증기 처리 및 엔돌라이신 병행처리에 따른 injured cell 발생 확인

Culture media	Log reduction (Log CFU/coupon)			
	Superated steam (SS)	Endolysin (500 nM) (E)	E → SS	SS →E
BPA	0.99 ± 0.09 A	0.64 ± 0.28 A	2.11 ± 0.58 A	2.56 ± 0.13 A
OV-BPA	1.00 ± 0.19 A	0.48 ± 0.22 A	2.11 ± 0.54 A	2.38 ± 0.25 A

Means ± standard deviations from three replications. Within the same treatment, means with the same uppercase letters within a row are not significantly different ($p > 0.05$).

표 28. 150℃ 포화 증기 처리 및 엔돌라이신 병행처리에 따른 injured cell 발생 확인

Culture media	Log reduction (Log CFU/coupon)			
	Superated steam (SS)	Endolysin (500 nM) (E)	E → SS	SS →E
BPA	2.47 ± 0.36 A	0.64 ± 0.28 A	3.24 ± 0.98 A	4.44 ± 0.64 A
OV-BPA	1.83 ± 0.82 A	0.48 ± 0.22 A	3.25 ± 1.07 A	4.57 ± 0.32 A

Means ± standard deviations from three replications. Within the same treatment, means with the same uppercase letters within a row are not significantly different ($p > 0.05$).

5. 박테리오파지 엔돌라이신 대량 생산 기반 마련 (2차년도, 세부 1)

가. 엔돌라이신 선정

○ 2협동과제 서울대학교 유상열 교수 연구실에서 분리된 박테리오파지 중 CSA5, CSA9, CSA13 및 CSA24 등 네 종류의 박테리오파지 유래 엔돌라이신을 후보로 전달받았음.

○ 각각의 엔돌라이신을 LysCSA5, LysCSA9, LysCSA13, LysCSA24로 명명하였음.

○ 이 중 특히 LysCSA13의 경우 서울대 유상열 교수 연구실에서 진행한 small-scale purification 결과를 참고하였을 때 높은 solubility를 갖고 있는 것으로 예측되었음.

○ 이에 따라 LysCSA13을 우선적으로 대량 정제 진행한 후, 필요에 따라 다른 엔돌라이신을 순차적으로 대량정제하기로 결정하였음.

나. 재조합 벡터 제작

○ Backbone vector로는 단백질 발현에 특화된 pET-28a plasmid를 사용하였음.

○ pET-28a plasmid는 단백질 발현 유전자 삽입 부위 양 말단에 histidine tag (His-tag)을 갖고 있어 원하는 방식으로 His-tag을 융합하는데 유리함.

○ T7 promoter를 갖고 있어 T7 polymerase를 이용한 강력한 단백질 발현이 가능함.

○ T7 promoter 이외에 lac operon의 regulation system이 삽입되어있어 IPTG 등을 이용해 실험자가 원하는 시점부터 발현이 가능함.

○ 재조합은 일반적인 cloning 기법을 이용하였으며, 엔돌라이신 암호화 유전자는 pET-28a vector의 BamHI, HindIII site에 삽입하였음.

○ 일반적으로 엔돌라이신은 C-말단 부분에 tag이 있을 경우 CBD의 활성이 방해받아 효소 전체의 활성이 떨어진다고 알려져 있으므로, His-tag은 N-말단 부분에 융합하였음.

○ 재조합 vector는 보관 용도를 위해 *E. coli* DH5α strain에 먼저 도입하였음. 재조합 단백질의 발현을 위해 재조합 vector가 도입된 *E. coli* DH5α로부터 다시 재조합 vector를 정제하고 이를 *E. coli* BL21 (DE3) strain에 도입하였음.

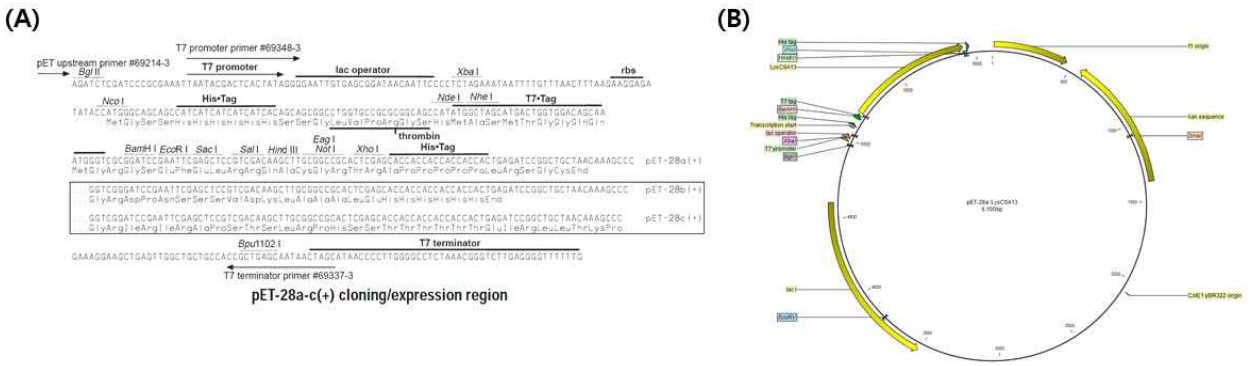


그림 76. (A) pET-28a vector map (B) 엔돌라이신 LysCSA13 재조합 pET-28a vector

다. LysCSA13 1차 대량 정제

○ 1차 정제 조건은 서울대학교 유상열 교수 연구실에서 최적화한 small-scale 정제 조건을 참고하여 정하였음.

○ 재조합 vector를 보유한 *E. coli* BL21 (DE3) strain을 kanamycin 첨가 LB 배지 1L에 접종하고 이를 37 ℃, 220 rpm에서 배양하여 OD_{600} = 0.5~0.6이 될 때까지 배양하였음.

○ 배양 종료 후 IPTG 500 μM를 처리하여 단백질의 발현을 induction하였음.

○ IPTG를 이용한 induction 이후에는 18 ℃로 배양 온도를 낮추고, 약 20 시간 동안 단백질 발현을 유도하였음.

○ 단백질 발현 종료 후 원심분리를 통해 cell을 모두 가라앉히고 상층액은 모두 버렸음. 이후 남아있는 pellet을 resuspension buffer (50 mM sodium phosphate (pH 8.0), 300 mM NaCl, 30 % glycerol) 60 mL에 풀어주었음.

○ 풀어준 cell에 초음파를 가하여 모두 분쇄한 후, 원심분리 (max. rpm, 30 min, 4 ℃)를 하여 불용성의 물질들을 모두 가라앉히고 상층액을 ÄKTA Pure FPLC system (GE healthcare, USA)에서 정제하였음. 정제 방식은 일반적인 His-tag affinity chromatography 기법을 이용하였음.

○ Column은 HisTrap FF를 이용하였으며, 상층액 60 mL을 모두 injection 하였음. binding rate는 2 mL/min 이었으며, washing은 5 mL/min의 속도로 행하였음. Elution은 imidazole에 gradient를 주어 수행하였고, 마찬가지로 5 mL/min의 속도로 행하였음.

○ Detector 검출 결과 imidazole 주입 시 단백질이 용해되는 것으로 보아 target protein이 존재하는 것으로 여겨짐. 그러나 peak의 높이가 매우 낮아 농도가 높지 않을 것으로 예상되었음.

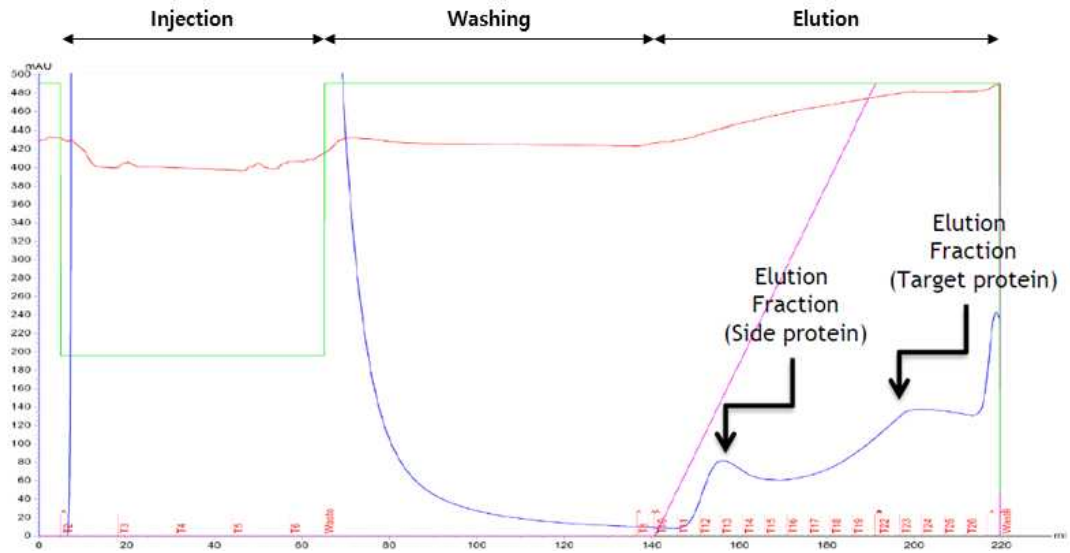


그림 77. LysCSA13 1차 대량정제 detection 검출 결과

○ SDS-PAGE 분석 결과 total protein에서 target protein인 LysCSA13으로 추정되는 두꺼운 band가 관찰되었으나, soluble fraction이 아닌 pellet에 더 많이 존재하는 것으로 보아 solubility가 크게 떨어지는 것으로 예측됨.

○ 또한 elution 결과 아주 높은 imidazole 농도에서 LysCSA13이 검출되었으나, 그 band 두께가 매우 얇아 농도가 매우 낮을 것으로 예측됨.

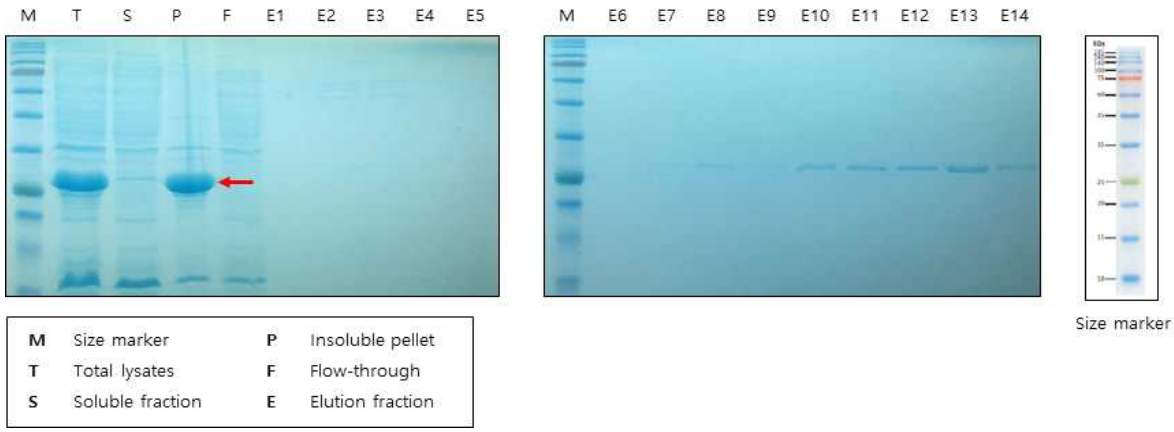


그림78. LysCSA13 1차 대량정제 SDS-PAGE 결과 (붉은색 화살표 : LysCSA13)

○ 농도 측정 결과 약 0.001~0.015 mg/mL의 매우 낮은 값이 예측됨. LysCSA13의 1차 정제 시도는 실패로 판정됨.

라. LysCSA13 2차 정제 시도

○ 1차 정제에서 사용한 것과 다른 종류의 *E. coli* strain을 사용하여 추가 정제를 시도함.

○ *E. coli* BL21 (DE3) 외에 BL21 (DE3) pLysS, BL21 (DE3) codon-plus RIL, Rosetta (DE3) strain을 test 하여봄.

○ BL21 (DE3) pLysS strain은 target protein이 독성을 갖고 있을 경우에 대비하여 선정하였고, BL21 (DE3) codon-plus RIL, Rosetta (DE3) strain은 codon bias에 대비하여 선정하였음.

○ 또한 resuspension buffer를 두 종류로 test 하여 최적 조건의 buffer를 찾고자 하였음.

○ Buffer A의 조성은 20 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM NaCl 이었음.

○ Buffer B의 조성은 50 mM sodium phosphate (pH 8.0), 300 mM NaCl 이었음.

○ 각 조합에 따라 8 가지의 test를 수행하였음. 각 조합에서 수행한 단백질의 발현 및 정제 과정은 1차 정제 시와 같았으나, 전체 volume을 50 mL 정도로 축소시켜 small-scale에서의 최적화를 먼저 진행하였음.

○ 발현 및 solubility test 결과 발현도는 37 ℃ 배양 시 더 발현이 잘 되었으며, BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS보다 codon-plus RIL, Rosetta (DE3) strain에서 발현이 더 잘 되었음.

○ 그러나 모든 발현 조건에서 protein의 solubility가 크게 떨어지는 것을 확인하였음.

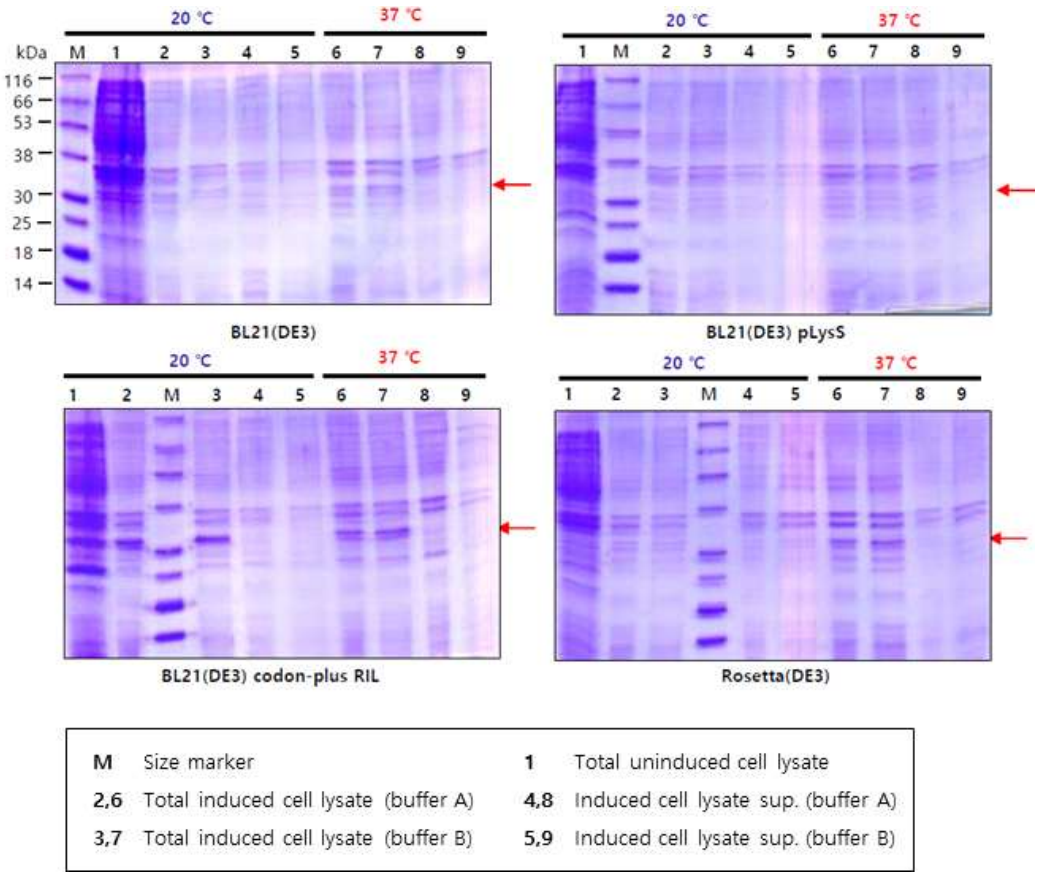


그림 79. LysCSA13 2차 정제 최적화 - 발현도 및 solubility test

○ 이상의 결과로 미루어보아 LysCSA13의 대량 정제 성공 가능성은 매우 낮은 것으로 판단하고 이를 제외한 다른 엔돌라이신에 대하여 정제를 진행하기로 하였음.

마. LysCSA5, LysCSA9, LysCSA24의 대량 정제 pre-test

○ LysCSA13을 제외한 다른 세 종류의 엔돌라이신 (LysCSA5, LysCSA9, LysCSA24)에 대하여 small-scale 정제 최적화를 먼저 수행하였음.

○ 발현 조건은 18 ℃에서 16 시간, 26 ℃에서 6 시간, 37 ℃에서 4 시간 배양하였고, induction 조건은 IPTG 0.2 mM, 1 mM이었음.

○ 정제 volume은 cell culture 50 mL이었음. 이외의 조건은 1차 정제와 같았음.

○ SDS-PAGE 분석 결과 모든 조건에서 단백질의 발현은 잘 일어난 것을 확인하였음.

○ LysCSA5와 LysCSA9은 모든 조건에서 insoluble한 것을 확인할 수 있었음.

○ 반면 LysCSA24는 18 ℃에서 16 시간 배양한 후 IPTG 0.2 mM 또는 1 mM로 induction 하였을 때 소량이지만 soluble한 protein이 존재함을 확인하였음.

○ 이에 따라 LysCSA24를 18 ℃에서 16 시간 배양, IPTG 0.2 mM induction 조건에서 large-scale 정제를 수행하기로 결정함.

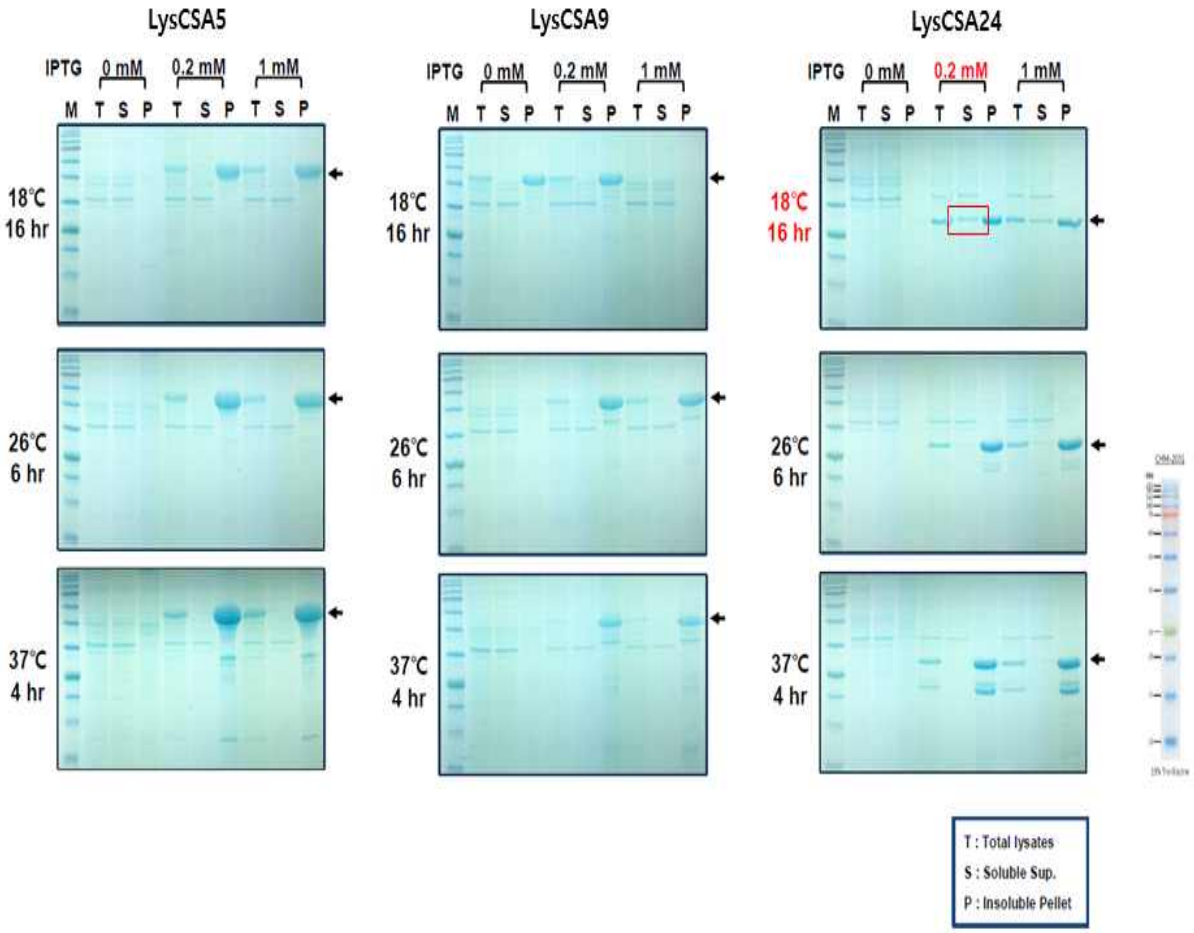


그림 80. LysCSA5, LysCSA9, LysCSA13 정제 pre-test

바. LysCSA24 대량 정제

○ 발현 조건 이외의 정제 방식은 LysCSA13의 1차 정제 시도와 동일하였으며, 정제 volume은 2 L였음.

○ 정제 결과 elution 단계에서 이전보다 높은 peak가 검출되었음.

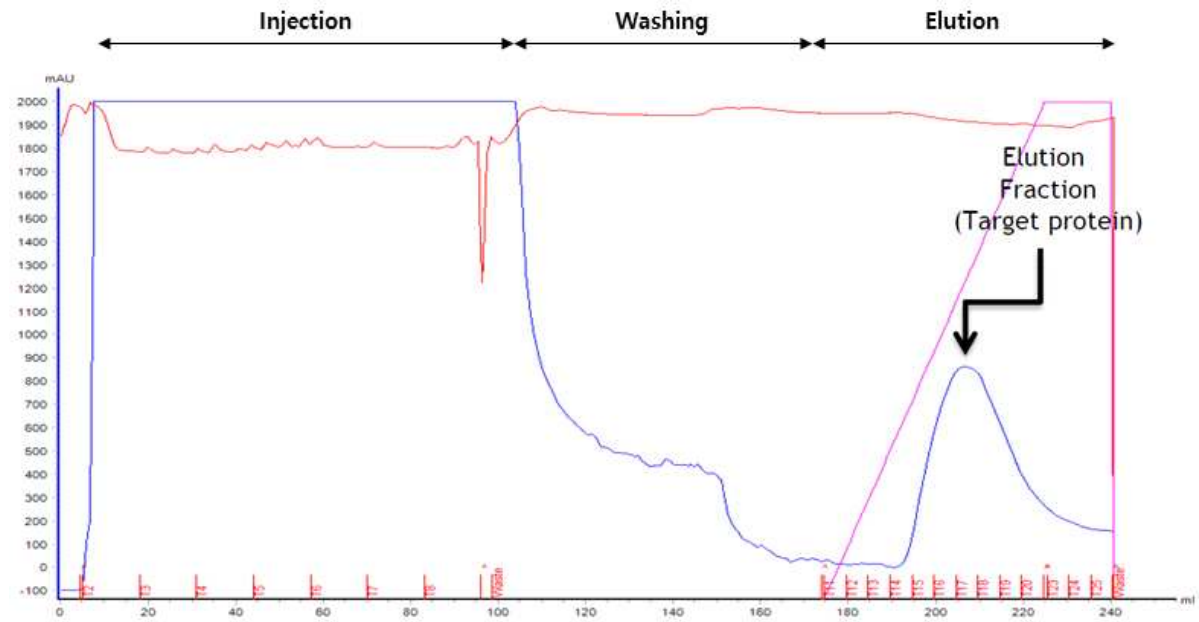


그림 81. LysCSA24 1차 대량정제 detection 검출 결과

○ SDS-PAGE 분석 결과 단백질의 발현이 정상적으로 이루어졌으며, solubility도 높은 것으로 예측되었음. 또한 elution step에서 다량의 LysCSA24가 정제된 것을 확인하였음.

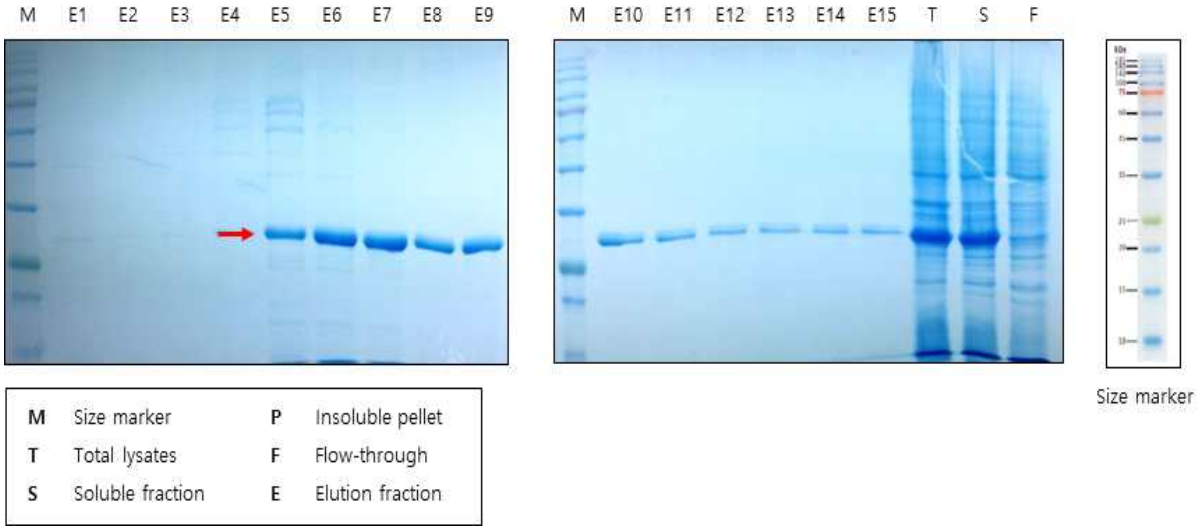


그림 82. LysCSA24 대량정제 SDS-PAGE 결과 (붉은색 화살표 : LysCSA13)

○ 정제된 단백질을 취합하여 모으고, imidazole 성분을 제거하기 위해 storage buffer (50 mM sodium phosphate (pH 8.0), 300 mM NaCl, 30 % glycerol)로 dialysis 해주었음.

○ 정제 완료된 LysCSA24의 농도 측정 결과 약 1.1 ~ 1.3 mg/mL의 비교적 높은 농도로 정제가 성공하였음을 알 수 있었음.

○ 2 L cell culture 기준 총 부피 5 mL, 총량 6.4 mg의 단백질을 정제하였음. 이를 통해 엔돌라이신의 대량 정제에 필요한 시약, 장비, 소모품 및 정제 방법 등에 대한 전체적인 protocol을 구축하는데 성공하였음.

제4절 3차년도 연구개발 내용 및 성과

1. 패혈증비브리오균 바이오필름 생성인자들의 발현 조절특성 규명 및 제어기반 구축 (3차년도, 협동 1)

가. 패혈증비브리오균 생장조건에 따른 바이오필름 생성인자들의 발현특성 규명

○ 2차년도 연구 결과로 패혈증비브리오균의 새로운 바이오필름 생성인자 VV1_3061을 발굴하였으며, 이 생성인자의 결여가 식품접촉표면 상에서 바이오필름 생성 능력 및 바이오필름의 물리적 저항성을 감소시킴을 확인함. VV1_3061은 본 연구진에서 패혈증비브리오균의 바이오필름 생성인자로 기존 동정된 CabA와 아미노산 서열의 유사성을 가지고 있으며, CabA와 마찬가지로 세균의 바이오필름 생성을 촉진하는 bacterial second messenger c-di-GMP의 세포 내부 농도가 높을 때 유전자의 발현량이 증가하는 것으로 확인됨. 이는 두 생성인자가 유사한 발현 조절 특성을 가짐으로써 바이오필름 상에서 동시에 존재하여 바이오필름을 강화하는 역할을 할 수 있다는 것을 시사함.

○ VV1_3061은 CabA와 동시에 바이오필름 상에 존재하며 서로 중복되지 않는 메커니즘을 통해 협력적으로 바이오필름을 강화한다는 것을 확인하였으므로, 이를 바탕으로 이 두 가지 바이오필름 생성인자를 동시에 조절하여 바이오필름의 생성을 저해하는 조절인자를 탐색하고자 함.

○ 패혈증비브리오균은 세포 내 c-di-GMP의 농도가 높을 때에 바이오필름의 생성이 촉진되며, 여기에는 BrpR과 BrpT라는 두 가지의 전사 조절자 단백질이 관여하는 것으로 알려져 있음.

○ 두 조절인자 BrpR과 BrpT의 발현이 바이오필름 생성인자의 발현과 상관관계를 갖는지 확인하기 위해 세포 내 c-di-GMP 농도 조건에 따른 조절인자와 생성인자의 발현특성을 확인하였음.

○ 패혈증비브리오균의 세포 내 c-di-GMP 농도를 조절하기 위하여, 배양액에 첨가한 arabinose 농도 의존적으로 세포 내 c-di-GMP 농도가 조절되는 JN111 균주를 실험의 parent strain으로 사용함 [Park et al., 2015].

○ Parent strain을 arabinose를 첨가하지 않은 LB 배지와 0.01% arabinose가 첨가된 LB배지 각각에서 30℃로 배양 후 OD_{600} 2.0에 도달하였을 때 배양액으로부터 bacterial cell을 회수함. 회수한 cell pellet으로부터 miRNeasy kit를 사용하여 total mRNA를 추출하고 이로부터 cDNA를 합성하여 바이오필름 조절인자와 생성인자 유전자의 발현량을 qRT-PCR을 이용해 정량함.

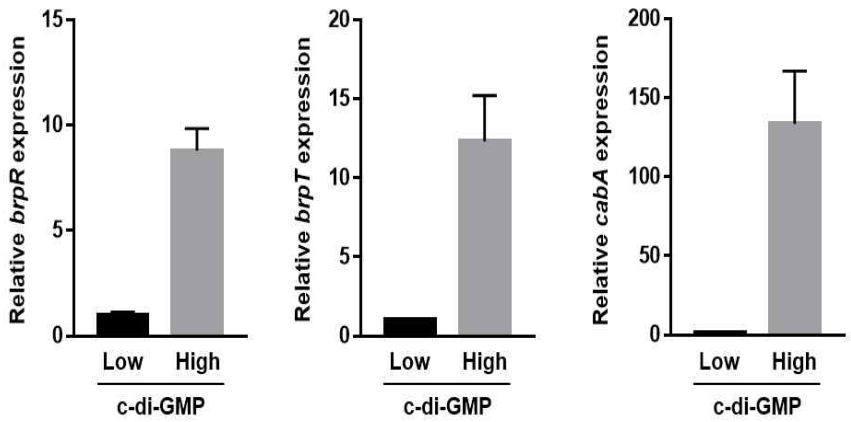


그림 83. 세포 내 c-di-GMP 농도 조건에 따른 바이오필름 조절인자와 생성인자의 발현특성

○ 실험 결과에서 바이오필름 조절인자 BrpR과 BrpT 및 바이오필름 생성인자 CabA 모두의 발현량이 세포 내 c-di-GMP 농도가 높아짐에 따라 크게 증가하는 것이 확인됨.

○ 이는 패혈증비브리오균의 세포 내 c-di-GMP 농도가 증가하여 바이오필름이 형성될 때 조절인자와 생성인자 모두 발현이 증가하여 바이오필름 형성에 관여함을 의미하며, 따라서 조절인자 BrpR과 BrpT가 생성인자 CabA 및 VV1_3061의 발현 조절에도 관여할 수 있다는 가능성을 확인함.

○ 조절인자 BrpR과 BrpT가 생성인자 CabA와 VV1_3061의 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 parent strain으로부터 *brpR* 유전자와 *brpT* 유전자 중 하나, 또는 두 유전자가 모두 결여된 isogenic knock-out mutant들을 구축함.

○ Isogenic mutant의 구축은 2차년도의 연구방법과 동일하게 진행함. 패혈증비브리오균의 genomic DNA로부터 각 유전자 ORF의 약 2/3이 deletion된 fragment를 PCR로 증폭하고 얻어진 fragment를 suicide vector인 pDM4에 cloning하였으며, conjugation을 통해 parent strain 내로 suicide vector를 전달하고 homologous recombination에 의해 chromosome 상에 deletion된 ORF를 갖는 knock-out mutant를 PCR screening을 통해 선별함.

○ Parent strain과 mutant strain들을 LBS 배지에서 30℃로 배양하고 OD_{600} 0.8에 도달하였을 때 배양액을 VFMG에 OD_{600} 0.05로 희석하여 96 well culture plate 상에서 30℃로 배양하여 바이오필름을 생성함.

○ 24시간 동안 배양한 바이오필름 상태의 bacterial cell을 회수하고 miRNeasy kit로 total mRNA를 추출 및 이로부터 cDNA를 합성하여 바이오필름 생성인자의 발현량을 qRT-PCR로 확인함.

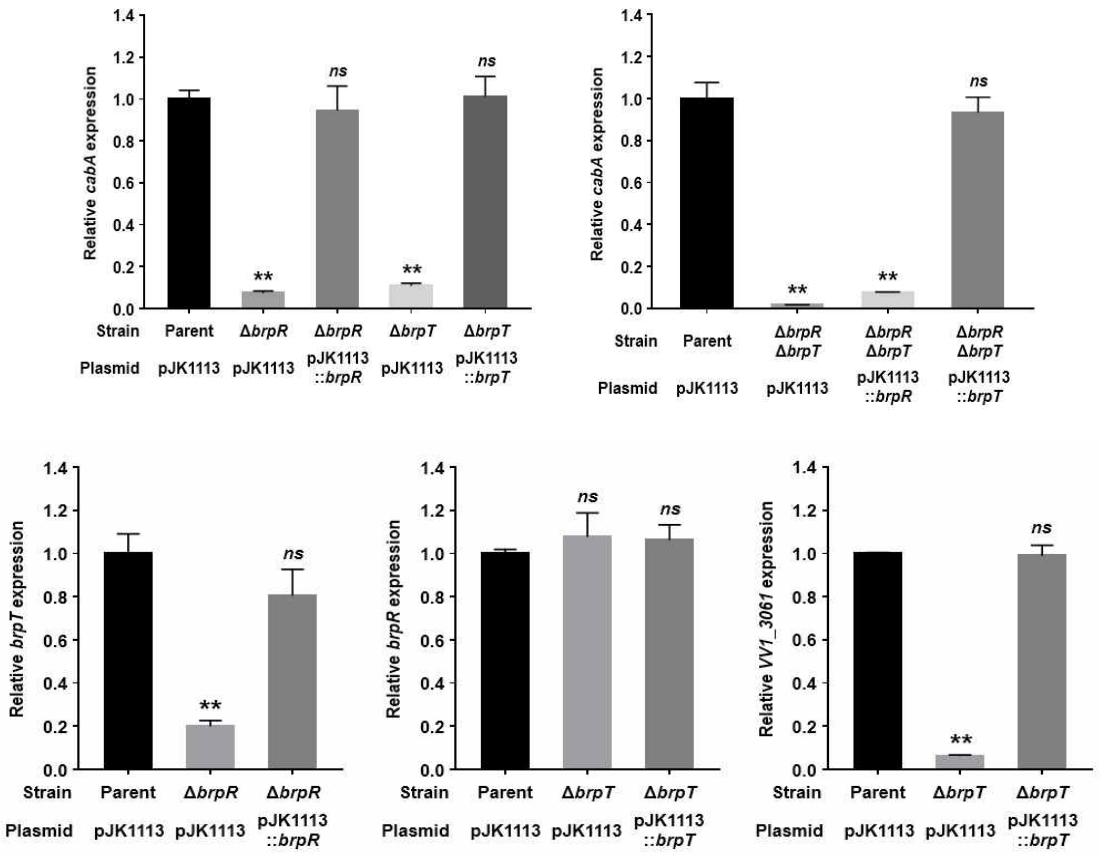


그림 84. 조절인자의 knock-out mutant에서 바이오필름 조절인자 및 생성인자 유전자의 발현량 확인

($P < 0.05$ relative to parent strain. ns, not significant.)

○ 실험 결과 조절인자 BrpR 또는 BrpT가 결여된 isogenic mutant 모두에서 parent strain에 비해 바이오필름 생성인자 CabA의 발현량이 크게 감소하였으며, 결여된 조절인자의 complementation을 통해 CabA의 발현량이 다시 회복됨을 확인함. 이로부터 BrpR과 BrpT는 모두 CabA의 발현 증가에 중요한 조절인자임을 확인함.

○ BrpR과 BrpT 두 조절인자간의 상하관계를 파악하고 어느 조절인자가 CabA의 발현 조절에 직접적으로 작용하는지를 확인하기 위해, 두 조절인자가 모두 결여된 double mutant에서의 CabA의 발현량을 parent strain과 비교함.

○ BrpR과 BrpT가 모두 결여된 double mutant 역시 parent strain에 비해 CabA의 발현량이 크게 감소함. 해당 double mutant에 BrpT만 complementation하였을 경우 CabA의 발현량이 parent strain의 수준으로 회복되었으나 BrpR만 complementaion하였을 경우에는 CabA의 발현량이 회복되지 않음을 확인함.

○ 이는 BrpT가 없는 경우 BrpR이 CabA의 발현을 증가시키지 못함을 의미함. 따라서 CabA의 발현을 직접적으로 증가시키는 조절인자는 BrpT이며 BrpR은 BrpT를 통해 CabA의 발현을 증가시킬 것이라 가정하였음.

○ 위 가정을 확인하기 위해 BrpR 또는 BrpT가 결여된 isogenic mutant에서 BrpT와 BrpR의 발현량을 각각 확인함.

○ BrpR이 결여된 mutant에서는 parent strain에 비해 BrpT의 발현량이 크게 감소한 반면 BrpT가 결여된 mutant에서는 BrpR의 발현량이 변화하지 않았고, 이는 위 가정대로 BrpR이 BrpT의 발현 증가를 통하여 CabA의 발현을 증가시킴을 의미함.

○ VV1_3061의 발현량 또한 BrpT 결여 mutant에서 크게 감소하였고 이는 CabA와 마찬가지로 VV1_3061의 발현량이 BrpT에 의해 조절되어 증가함을 의미함.

○ 따라서 바이오필름 생성인자 CabA와 VV1_3061 모두 BrpR-BrpT로 이어지는 동일한 조절 체계에 의해 발현이 크게 증가하는 발현특성을 나타냄을 규명함.

나. 바이오필름 생성인자들의 promoter mapping 및 cis-regulatory elements의 동정

○ 바이오필름 생성인자 CabA와 VV1_3061의 발현 조절 특성 및 조절 메커니즘을 분자생물학적으로 분석하기 위해 *cabA* 유전자를 모델로 하여 promoter 분석을 진행함.

○ 먼저 primer extension을 이용해 *cabA* 유전자의 전사가 개시되는 transcription start site (TSS)를 확인하고자 함.

○ Parent strain에서 추출한 total RNA를 template로 하여 *cabA* coding region에 상보적인 primer를 이용해 역방향으로 extention을 진행함.

○ 합성된 cDNA를 sequencing ladder와 함께 sequencing gel에 전기영동하여 TSS를 나타내는 밴드가 위치한 부근의 서열을 확인하고 TSS의 위치를 결정함. 그림에는 TSS의 upstream에 위치한 RNA polymerase의 sigma factor가 결합하는 putative -10, -35 서열 및 이후 실험에서 결정된 두 조절인자 BrpT와 BrpS의 결합 부위를 함께 표기함.

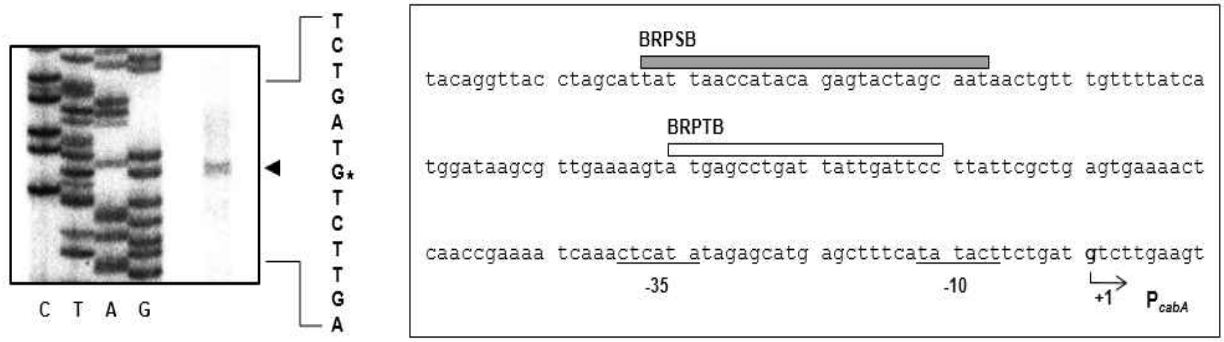


그림 85. *cabA* 유전자의 transcription start site (TSS)와 조절 부위 확인

(BRPSB, 조절인자 BrpS 결합 부위. BRPTB. 조절인자 BrpT 결합 부위)

○ 위 실험에서 결정된 *cabA* 유전자 TSS의 upstream에 위치한 regulatory region에서 조절인자가 결합하는 부위를 확인하고 해당 부위가 *cabA* 유전자의 전사에 미치는 효과를 파악하기 위하여 promoter deletion assay를 수행함.

○ *cabA* 유전자 upstream 부위를 다양한 길이로 deletion하여 *luxCDABE* 유전자들을 갖는 reporter plasmid에 재조합하고 만들어진 reporter plasmid들을 parent strain 및 조절인자가 결여된 isogenic mutant들에 conjugation을 통하여 전달함.

○ Reporter plasmid를 갖는 strain들은 *cabA* promoter의 활성을 증대시키기 위해 0.01% arabinose가 첨가된 LB배지에서 30℃로 배양하고, OD_{600} 2.0에 도달하였을 때의 cellular luminescence를 흡광도로 나누어 relateive light unit (RLU) 값으로 표현함.

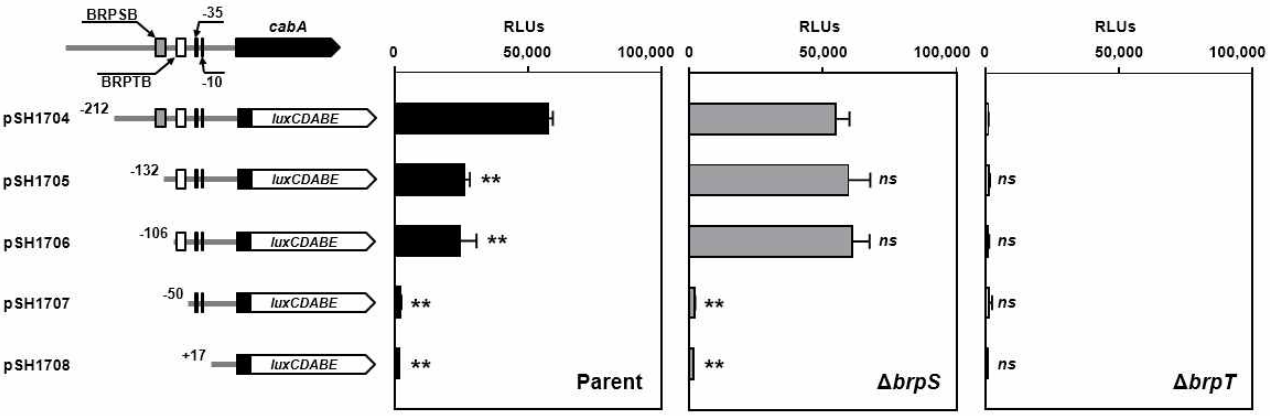


그림 86. *cabA* 유전자의 promoter deletion assay를 통한 cis-regulatory elements 확인

(**, $P < 0.05$ relative to parent strain. ns, not significant.)

○ 실험 결과 reporter plasmid를 갖는 parent strain의 RLU 값은 *cabA* upstream region을 TSS 기준 -50 bp 까지 삭제하였을 때 기저 수준으로 감소하였으며, BrpT가 결여된 isogenic mutant의 경우 모든 reporter plasmid에 대해 기저 수준의 RLU 값을 나타냄.

○ 이는 *cabA* promoter의 전사가 활성화되기 위해 조절인자 BrpT가 필수적이며, BrpT와 상호작용하는 cis-regulatory element가 -50 bp를 포함하는 부위에 위치함을 의미함.

○ Parent strain에서 전체 길이의 *cabA* upstream region (-212 bp)을 갖는 reporter plasmid에 의해 나타나는 RLU 값에 비해 -132 bp까지 삭제된 upstream region을 갖는 reporter plasmid가 나타내는 RLU 값은 절반 정도로 감소하였음. 이는 해당부위에 추가적인 cis-regulatory elements가 존재함을 암시함.

○ 패혈증비브리오균의 genome 상에서 조절인자 BrpT를 encoding하는 유전자 옆에 BrpT의 homolog인 다른 조절인자 BrpS를 encoding하는 유전자가 위치하고 있음. 해당 조절인자가 결여된 isogenic mutant에서 promoter deletion assay를 수행한 결과, parent strain과 달리 *cabA* upstream region이 -132 bp와 -106 bp까지 삭제되었을 때에도 RLU의 감소가 나타나지 않음을 확인함.

○ 이는 -132 bp를 포함하는 부위가 BrpS와 상호작용하는 cis-regulatory element이며, 이 또한 *cabA* promoter의 전사 활성화에 기여함을 나타냄.

○ 위 결과들로부터 바이오필름 생성인자를 encoding하는 유전자 *cabA*의 전사 활성화에 필수적인 두 가지 cis-regulatory elements를 확인하였으며, 각각 BrpT, BrpS와 상호작용하는 것으로 확인됨.

다. 바이오필름 생성인자들의 trans-regulatory elements의 동정 및 특성 규명

○ 조절인자 BrpS가 다른 두 가지 조절인자인 BrpR 및 BrpT과 갖는 상관관계를 파악하기 위해 BrpS가 결여된 isogenic mutant에서 qRT-PCR을 통해 해당 유전자들의 발현량을 parent strain과 비교함.

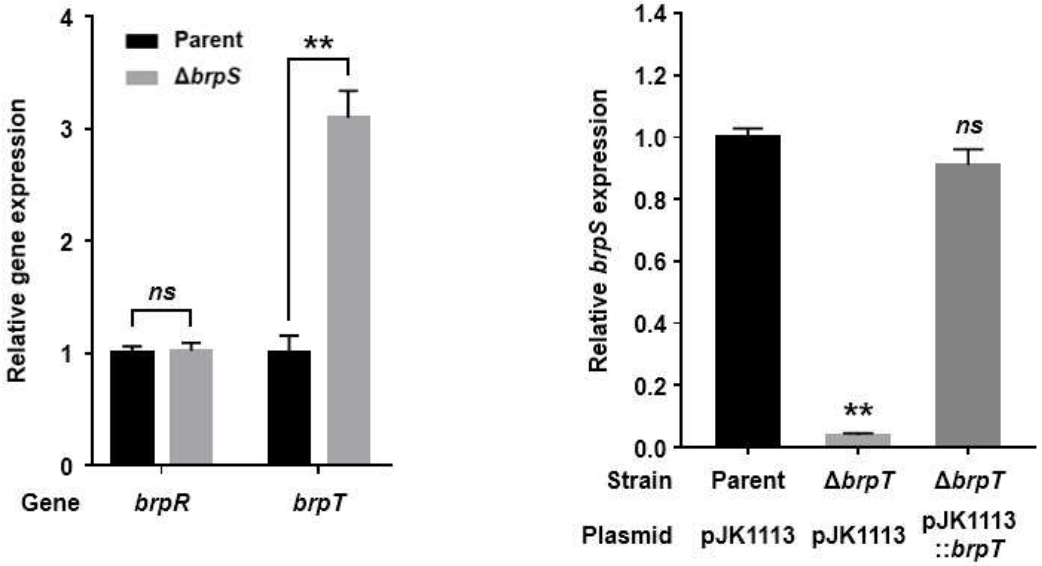


그림 87. 조절인자 BrpT와 BrpS 간의 조절특성.

(**, $P < 0.05$ relative to parent strain. ns, not significant.)

○ 조절인자 BrpS가 결여된 isogenic mutant에서 BrpR의 발현량은 변화가 없는 반면 BrpT의 발현량은 약 3배 증가함. 이는 BrpS가 BrpT의 전사를 억제하여 발현량을 감소시킴을 의미함.

○ 반면 BrpT가 결여된 isogenic mutant에서는 BrpS의 발현량이 크게 감소하였고 BrpT의 complementation을 통해 다시 회복되었음. 이는 BrpS의 전사가 BrpT에 크게 의존적이며 BrpT가 BrpS의 발현을 증가시킴을 의미함.

○ 두 조절인자 BrpT와 BrpS가 서로의 전사를 직접적으로 조절하는지 확인하기 위하여 electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 추가적으로 수행함.

○ 두 조절인자 BrpT와 BrpS 단백질을 정제하고 서로의 유전자 upstream region을 probe로 함께 반응하여 해당 probe에 특이적으로 결합하는지를 확인하였음.

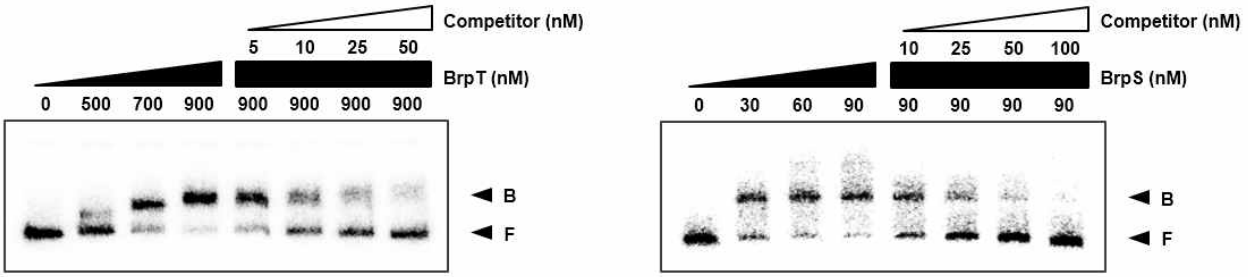


그림 88. 서로의 유전자 upstream region에 대한 두 조절인자 BrpT와 BrpS의 특이적 결합 확인

○ 실험 결과 BrpT는 BrpS를 encoding하는 유전자의 upstream region에, 그리고 BrpS는 BrpT를 encoding하는 유전자의 upstream region에 각각 특이적으로 결합함을 확인함. 이는 두 조절인자가 유전자 upstream에 직접적으로 결합함으로써 서로에 대한 발현 조절 효과를 나타냄을 의미함.

○ 위 결과들을 종합하여 패혈증비브리오균 내에서 두 조절인자 BrpT와 BrpS는 서로의 전사를 직접적으로 조절하며, BrpT가 BrpS의 발현을 증가시키고 반대로 BrpS가 BrpT의 발현을 감소시키는 negative feedbak loop를 형성하여 BrpT의 발현을 안정화시키는 조절특성을 나타냄을 확인함.

○ *cabA* promoter의 조절 부위에서 확인한 두 가지 cis-regualtory elements에 대응하는 trans-regulatory elements가 각각 두 조절인자 BrpT와 BrpS인지 규명하기 위하여 EMSA와 DNase I protection assay를 수행함.

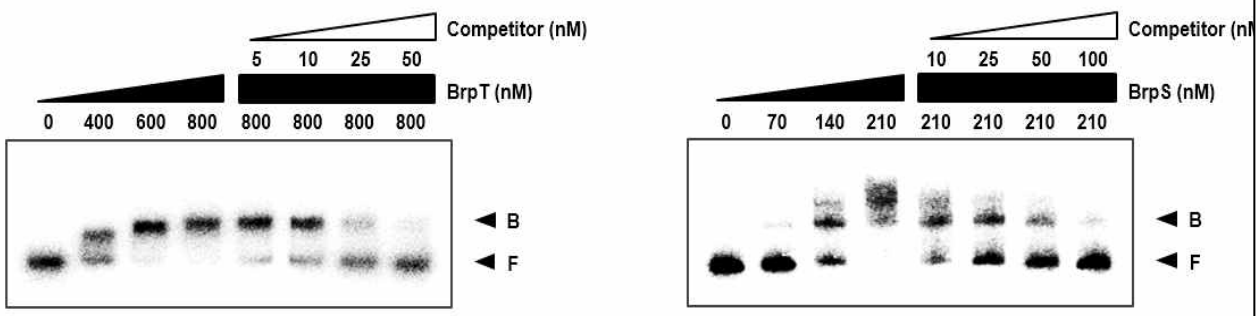


그림 89. *cabA* promoter의 조절 부위에 대한 두 조절인자 BrpT와 BrpS의 특이적 결합 확인

○ EMSA 수행 결과 BrpT와 BrpS 모두 *cabA* promoter의 조절부위에 특이적으로 결합함을 확인함. 이는 두 조절인자가 *cabA* promoter의 조절부위에 직접 결합함으로써 *cabA*의 전사 활성을 조절함을 의미함.

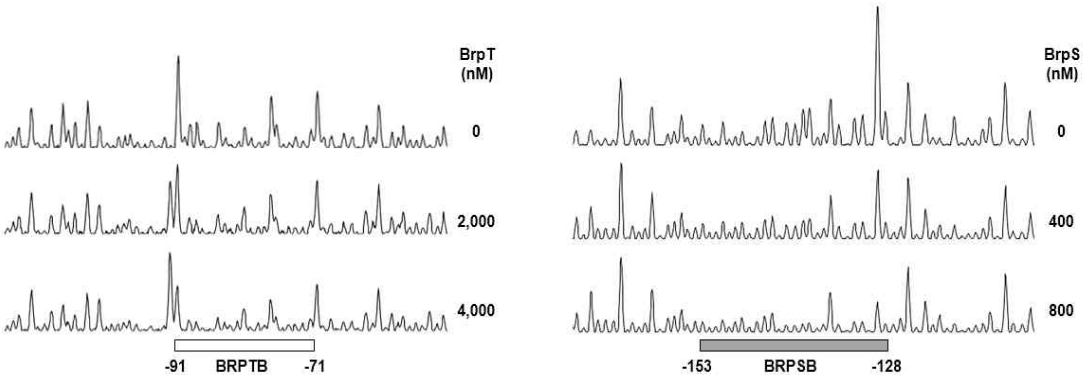


그림 90. 두 조절인자 BrpT와 BrpS의 특이적 결합 부위 및 서열 확인

(BRPSB, 조절인자 BrpS 결합 부위. BRPTB. 조절인자 BrpT 결합 부위)

○ DNase I protection assay 수행 결과 *cabA* promoter의 조절 부위 중 BrpT가 결합하는 부위는 -91 bp에서 -71 bp까지 포함하며, BrpS가 결합하는 부위는 -153 bp에서 -128 bp까지 포함함을 확인함.

○ 해당 부위는 *cabA*의 promoter deletion assay에서 결정된 두 가지 cis-regulatory elements의 위치와 동일함. 따라서 *cabA* promoter 조절 부위의 두 cis-regulatory elements에 대응하는 trans-regulatory elements가 각각 BrpT와 BrpS임을 규명함.

라. 바이오필름 생성을 저해하는 제어타겟 발굴 및 제어조건 확립

○ 바이오필름 생성인자 CabA의 발현을 조절하는 cis-regulatory elements와 trans-regulatory elements의 규명을 통해 두 조절인자 BrpT와 BrpS가 CabA의 발현 증가에 직접적으로 관여함을 확인함.

○ 이 중 BrpT는 CabA의 발현뿐만 아니라 또 다른 바이오필름 생성인자인 VV1_3061의 발현이 활성화되는 데에 필수적임을 확인함.

○ 한편 BrpR은 BrpT의 발현 증가를 통해 바이오필름 생성인자들의 발현을 조절하는 조절인자임을 확인함.

○ 따라서 조절인자 BrpR과 BrpT는 바이오필름 생성인자 CabA와 VV1_3061의 발현을 동시에 억제시킬 수 있는 제어 타겟으로 활용 가능함.

○ 조절인자 BrpR과 BrpT의 제어에 따른 패혈증비브리오균의 바이오필름 생성 제어효과를 확인하기 위해 BrpR와 BrpT 중 하나 또는 둘 모두가 결여된 isogenic mutant에서 나타나는 바이오필름 표현형을 parent strain과 비교함.

○ 패혈증비브리오균 각 균주를 LBS 배지에서 30 ℃로 배양한 후, OD_{600} 0.8인 배양액을 VFMG에 OD_{600} 0.05로 희석하고 96 well culture plate 상에서 30 ℃로 배양하여 바이오필름을 생성하였음.

○ 24 시간 동안 생성시킨 바이오필름에서 planktonic cell이 존재하는 상등액은 따내어 제거하고 culture plate 표면에 부착된 바이오필름을 PBS로 2 번 세척한 후 1% crystal violet 용액으로 상온에서 15 분간 염색하였음.

○ 다시 crystal violet 용액을 제거하고 증류수로 세척한 후 5 분 간 상온에 drying하였음.

○ 바이오필름에 염색된 crystal violet을 에탄올로 용출하고 microplate reader를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하여 바이오필름을 정량하였음.

○ 추가로 14 mL round bottom tube에도 바이오필름을 생성하여 같은 방법으로 염색한 후 관찰하였음.

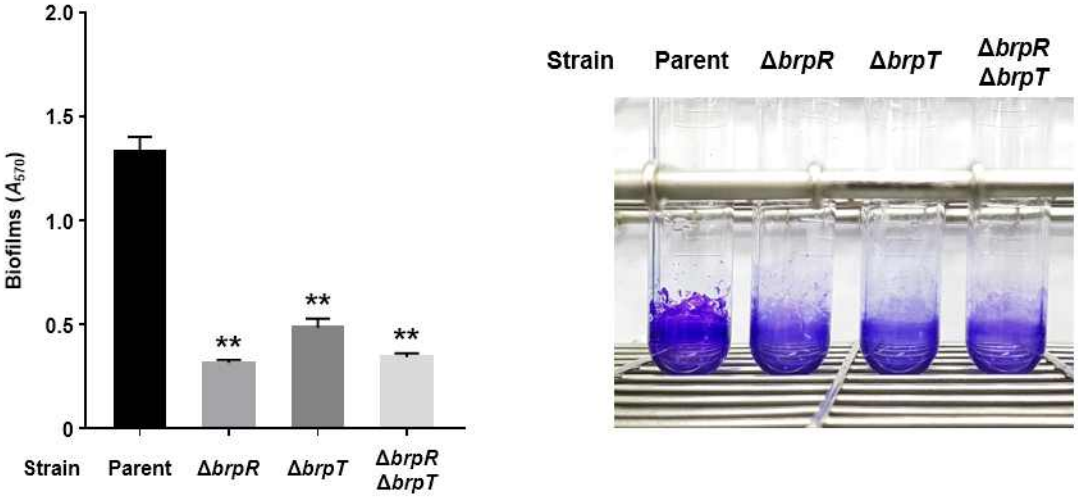


그림 91. 조절인자 BrpR과 BrpT가 결여된 균주의 바이오필름 생성량 비교.

(**, $P < 0.05$ relative to parent strain. ns, not significant.)

○ 실험 결과 BrpR 또는 BrpT가 결여된 isogenic mutant 모두 parent strain에 비해 바이오필름 생성량이 크게 감소함을 확인함. Round bottom tube에 생성된 바이오필름 역시 BrpR 또는 BrpT가 결여된 isogenic mutant에서 염색되는 바이오필름의 양이 현저하게 적은 것을 관찰하였음.

○ 이는 두 조절인자의 제어를 통해 바이오필름 생성인자의 발현을 억제시킴으로써 패혈증비브리오균의 바이오필름 생성 자체를 저해할 수 있음을 의미함.

○ 바이오필름 생성인자들은 패혈증비브리오균이 특이적으로 나타내는 주름진 colony의 형성에 기여한다는 것을 2차년도 연구결과로 확인한 바 있음. 따라서 조절인자 BrpR 또는 BrpT의 결여가 바이오필름 생성과 더불어 주름진 colony의 형성에 영향을 미치는지 확인함.

○ 패혈증비브리오균 각 균주를 LBS 배지에서 30 ℃로 배양하여 OD_{600} 0.8인 배양액을 microcentrifuge로 cell down 후 동량의 VFMG에 resuspend 하였음. 각 균의 배양액을 VFMG agar plate 상에 2 μl 씩 spotting한 후 30 ℃에서 정치로 3 일 동안 배양하여 macrocolony가 형성되도록 하였음. 형성된 colony의 morphology는 Zeiss 사의 Stemi DV4 실체현미경을 이용해 8 배율로 관찰 및 imaging 하였음.

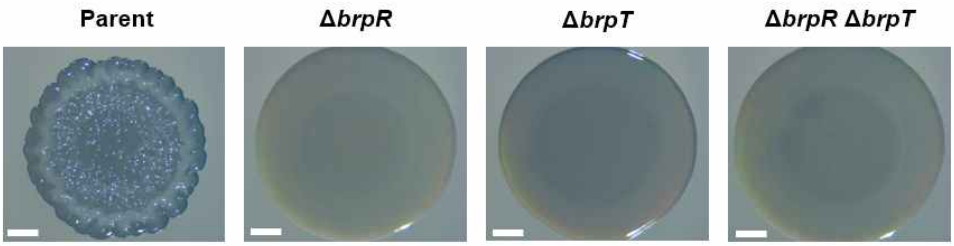


그림 92. 조절인자 BrpR과 BrpT가 결여된 균주의 colony morphology 비교. (Scale bars, 1 mm.)

○ 실험 결과 parent strain은 특이적인 주름진 colony를 형성한 반면 BrpR 또는 BrpT가 결여된 isogenic mutant는 주름이 전혀 존재하지 않는 평평한 colony를 형성함.

○ 이는 주름진 colony morphology 형성에 중요한 바이오필름 생성인자 CabA의 발현이 두 조절인자 BrpR과 BrpT 결여를 통해 억제되어 주름 형성이 저해되었음을 의미함.

○ 두 조절인자 BrpT과 BrpT의 제어가 실제 환경과 유사하게 지속적으로 액체가 흐르는 hydrodynamic한 조건에서 생성되는 바이오필름에도 영향을 미치는지 확인하기 위해 flowcell 실험을 수행함.

○ 패혈증비브리오균 각 균주를 LBS 배지에서 30 ℃로 배양한 후, OD_{600} 0.8인 배양액을 VFMG에 OD_{600} 0.05로 희석하여 준비함.

○ 1 × 4 × 40 mm 크기의 plycarbonate 재질 flowcell에 준비한 배양액을 접종하고 VFMG 배지를 8 mL/h의 유속으로 지속적으로 흐르게 하여 3 일동안 바이오필름을 생성함.

○ 생성된 바이오필름을 LIVE/DEAD *Bac*Light bacterial viability kit (Invitrogen)으로 염색하고 confocal laser scanning microscope (CLSM)를 이용해 바이오필름의 구조를 관찰하였음.

○ 또한 고정, 탈수 후 백금 코팅하여 scanning electron microscope (SEM)를 이용해 바이오필름 내 세포수준의 구조를 분석하였음.

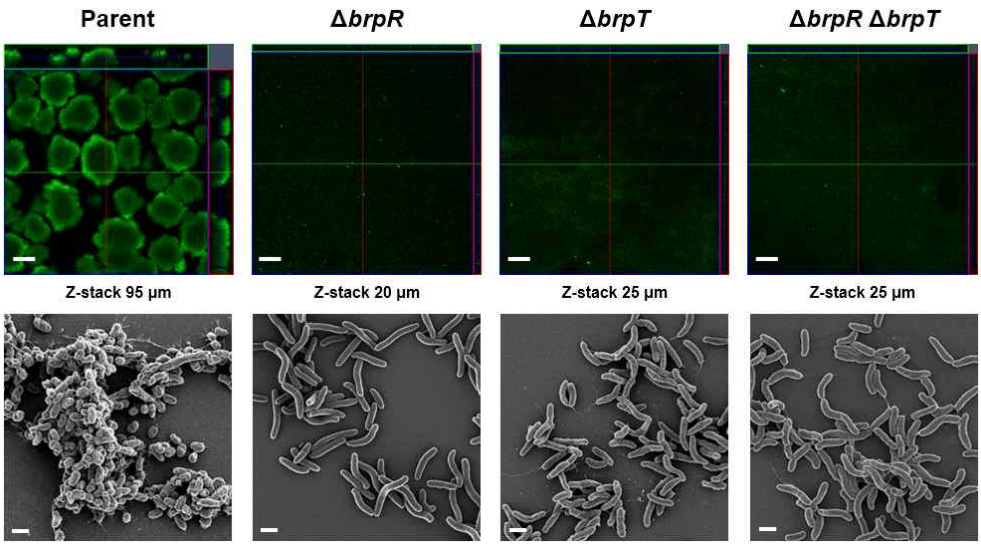


그림 93. 조절인자 BrpR과 BrpT가 결여된 균주의 flowcell에서의 바이오필름 구조 비교. (Scale bars, 100 μm (CLSM) 또는 1 μm (SEM))

○ 실험 결과 지속적으로 배지가 흐르는 flowcell 내부에서 parent strain은 견고하고, 넓고, 균일한 버섯모양의 입체적인 바이오필름 구조 생성한 반면, 조절인자 BrpR 또는 BrpT가 결여된 isogenic mutant는 밀도가 매우 낮고 흩어진 형태를 띄며 구조가 갖춰지지 않은 바이오필름만을 생성함.

○ 이는 조절인자가 결여된 isogenic mutant가 생성하는 바이오필름이 flowcell 내부의 유속을 버틸 수 있을만큼 견고한 구조를 형성하지 못함을 나타냄.

○ 패혈증비브리오균 각 균주가 flowcell 내부에서 생성한 바이오필름 내부의 구조를 전자현미경을 이용해 세포수준에서 더 자세히 관찰 및 분석하였음.

○ Parent strain은 촘촘하고 두꺼운 바이오필름 내부에 세포들이 extracellular matrix에 둘러쌓여 함께 연결되어 있는 모습을 나타냄.

○ 조절인자 BrpR이나 BrpT가 결여된 isogenic mutant는 세포 주변에 extracellular matrix가 전혀 존재하지 않았으며 단지 몇몇의 세포가 무리의 형태로 표면에 모여있는 모습을 나타냄.

○ 결과들로부터 조절인자가 결여된 패혈증비브리오균은 바이오필름 생성인자의 발현이 억제되어 유속이 있는 환경에서 세포를 둘러싸는 extracellular matrix를 생성하지 못하며 이로인해 견고한 바이오필름 구조의 형성 자체가 저해됨을 확인함.

○ 따라서 바이오필름 생성 저해효과가 있는 두 조절인자 중 상위에 위치하며 BrpT를 조절하는 BrpR을 더 효과적인 제어타겟으로 발굴함.

○ 제어타겟 BrpR 자체의 발현이 조절되는 제어조건을 확립하기 위해 패혈증비브리오균의 다양한 배양 조건에 따른 BrpR의 발현량을 비교함.

○ 먼저 세포 내 c-di-GMP 농도 및 growth phase에 따른 BrpR의 발현을 확인하기 위해 parent strain을 LB 배지와 arabinose를 첨가한 LB 배지에서 각각 배양하여 exponential phase인 OD_{600} 0.8과 stationary phase인 OD_{600} 2.0에서 회수한 cell에서 분리한 total RNA에 대해 qRT-PCR을 통해 BrpR을 발현량을 비교함.

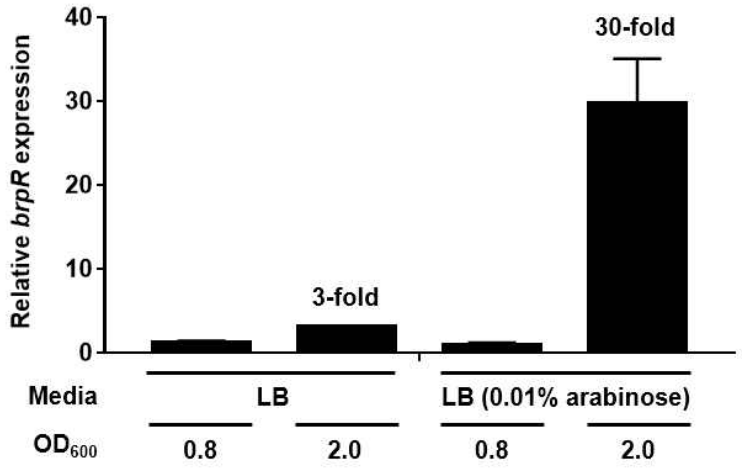


그림 94. 세포 내 c-di-GMP 농도와 growth phase에 따른 제어타겟의 발현량 비교

○ 실험 결과 exponential phase에서는 세포 내 c-di-GMP 농도와 무관하게 BrpR의 발현량이 일정한 것으로 나타남.

○ Stionary phase 상태에서는 exponential phase 상태에 비해 BrpR의 발현량이 증가하며, 세포 내 c-di-GMP 농도가 낮은 때는 약 3 배, 세포 내 c-di-GMP 농도가 높을 때에는 최대 30 배까지 크게 증가하는 것을 확인함.

○ 이는 BrpR 발현이 stationary phase에서 증가하며 세포 내 c-di-GMP 농도가 높을 경우 그 증가폭이 더욱 커짐을 의미함.

○ 패혈증비브리오균이 노출된 환경의 염도 조건에 따른 제어타겟 BrpR의 발현을 비교하기 위해 2.0 % NaCl을 첨가한 LBS 배지와 0.5 % NaCl을 첨가한 LB 배지에서 각각 패혈증비브리오균을 배양하고 마찬가지로 exponential phase와 stationary phase에서 회수한 cell에서 분리한 total RNA에 대해 qRT-PCR을 통해 BrpR의 발현량을 비교함.

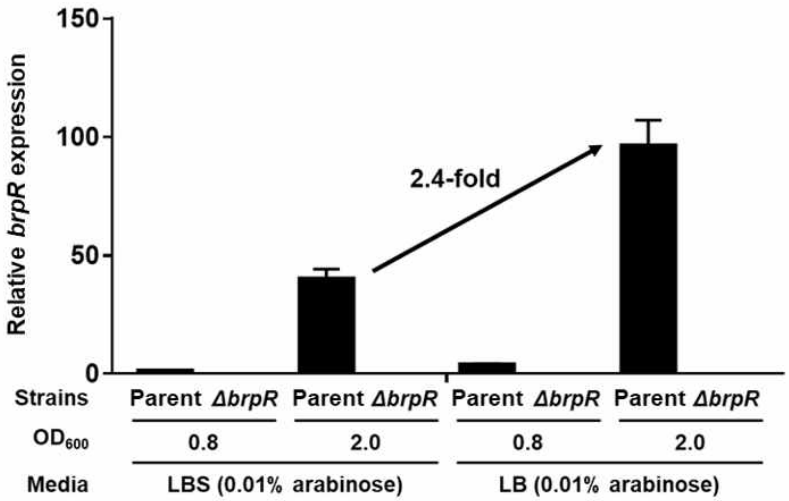


그림 95. 염도 조건과 growth phase에 따른 제어타겟의 발현량 비교

○ 실험 결과 이전 실험과 마찬가지로 BrpR의 발현량은 exponential phase에서보다 stationary phase에서 크게 증가하는 것으로 나타남.

○ Exponential phase의 경우 NaCl 2 % (LBS)에 비해 NaCl 0.5% (LB)에서 BrpR 발현량이 약간 증가하는 것으로 나타났으나 그 차이는 크지 않았음.

○ Stationary phase의 경우 두 염도 조건 모두에서 exponential phase에 비해 BrpR 발현량이 큰 폭으로 증가하였으며, NaCl 0.5 % (LB)에서의 발현량은 NaCl 2% (LBS)에서의 발현량보다 2.4 배 더 높게 나타남.

○ 이는 패혈증비브리오균이 낮은 염도 조건에 노출될 경우 BrpR의 발현이 증대됨을 의미함.

○ 여러 가지 온도 조건에 노출되었을 때 패혈증비브리오균의 BrpR 발현을 확인하기 위하여 30 ℃, 37 ℃, 42 ℃의 세 가지 온도 조건에서 parent strain을 배양함.

○ 이 중 42 ℃에서는 균의 유의미한 생장이 나타나지 않아 이를 제외한 30 ℃와 37 ℃ 두 가지 조건에서 stationary phase 상태의 cell을 회수하고 total RNA를 추출하여 qRT-PCR을 통해 BrpR의 발현량을 비교함.

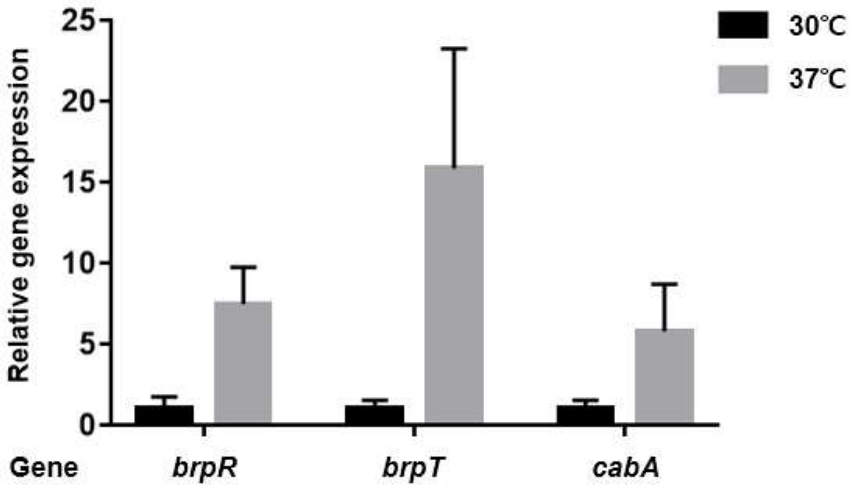


그림 96. 온도 조건에 따른 제어타겟 및 하위 조절인자와 생성인자 유전자 발현량 비교

○ 실험 결과 30 ℃ 온도 조건보다 37 ℃의 온도 조건에 노출되었을 때 stationary phase에서 BrpR의 발현량이 7 배 이상 증가하는 것을 확인함.

○ 37 ℃ 온도 조건에서 증가한 BrpR의 발현은 하위 조절인자인 BrpT 및 바이오필름 생성인자인 CabA의 발현 또한 증가시키는 것으로 나타남.

○ 위 결과들을 종합하여 패혈증비브리오균의 바이오필름 생성 제어타겟 BrpR은 세포 내 c-di-GMP의 감소를 유발하고 외부 환경에서 exponential phase를 유지하며 높은 염도, 낮은 온도 조건을 유지함으로써 발현을 제어할 수 있음을 확인함.

○ 3차년도 연구결과로 제어타겟인 BrpR의 발현 조절을 통해 바이오필름 생성인자의 발현 및 이로인한 환경 내 패혈증비브리오균의 바이오필름 생성 자체를 저해할 수 있음을 확인하였으며 BrpR의 발현을 억제시키기 위한 제어 조건들을 확립함.

2. 식품 접촉 표면에 바이오필름 형성 (3차년도, 제2협동)

가. 온도 및 형성일자별 바이오필름 내 황색포도상구균의 수 차이 비교

○ 바이오필름 형성을 위해 사용한 식품접촉표면은 1차년도에 사용했던 2 x 5 (cm)의 Stainless steel No.4 coupon을 사용하였음. 바이오필름 형성 온도는 실제 산업 조건과 선행연구를 통해 바이오필름 형성이 가능한 조건을 모두 따져 15 °C, 25 °C, 37 °C의 온도로 선정하였으며 1, 2차년도 연구 결과를 바탕으로 바이오필름 형성일자는 최대 5 일로 하여 1 일차부터 5 일차 까지의 전체 균의 수를 확인하였음. 바이오필름 형성방법은 1차년도와 같은 방법으로 진행하였음. 요약하자면 overnight으로 키운 황색포도상구균을 PBS에 풀고 coupon을 균액에 4 °C에서 24 시간 침지 시킨 다음 이를 꺼냈을 때를 Day0로 하여 TSB에 선정한 온도 (15 °C, 25 °C, 37 °C)에 5 일 동안 담그면서 BPA (Baird-Parker Agar)에 plate counting하여 균의 수를 정량하였음.

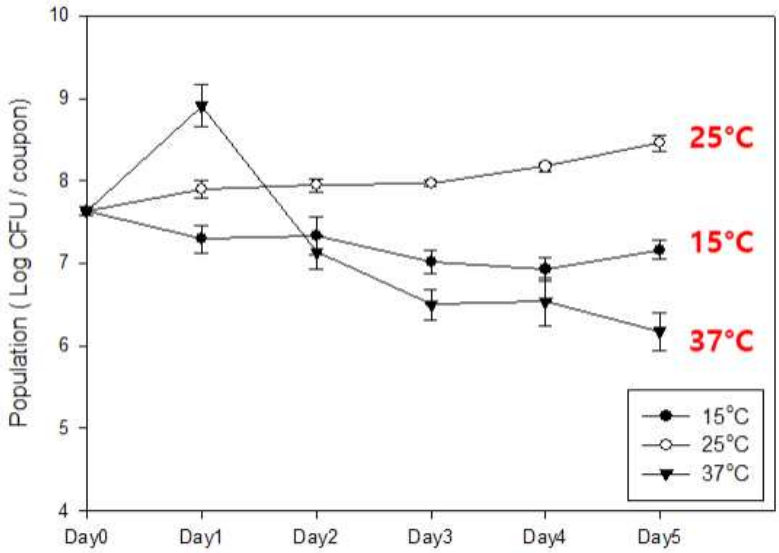


그림 97. 5 일 동안 15 °C, 25 °C, 37 °C에서 황색포도상구균 바이오필름을 형성하였을 때, 균의 수 변화

○ 황색포도상구균을 4 °C에 24 시간 침지시킨 후 (Day0), STS coupon 표면의 균의 수는 7.64 log CFU/coupon 부착되어있음을 확인할 수 있었음. 15 °C에서는 5 일 동안 약간 감소하여 7.16 log CFU/coupon이 바이오필름을 형성하였지만 통계적으로는 유의미한 차이가 없었음 ($p > 0.05$). 25 °C에서 황색포도상구균 바이오필름을 형성시켰을 때, 5일 동안 꾸준히 증가하여 Day5에 표면에 8.46 log CFU/coupon만큼 있었음($p < 0.05$). 37 °C에는 1 일 동안 균이 1 log 이상 증가하여 균이 8.91 log CFU/coupon있었지만 2일 차부터 감소하여 Day5에는 다른 온도에 비해 가장 적은 6.17 log CFU/coupon 남아있었음. ($p < 0.05$)

○ Day0에서 Day5까지 바이오필름 내 황색포도상구균의 수가 가장 많이 증가한 것은 바이오필름을 25 °C에서 형성시켰을 때 였지만 가장 많은 균의 수가 관찰된 것은 37 °C에서 하루 동안 두었을 때 였음. 다만 37 °C는 황색포도상구균이 생장하기 최적의 온도이므로 실제로 바이오필름을 많이 형성하였는지 아니면 생장을 활발히 하여 단순히 많은 균이 부착되어있는 것인지 EPS 정량 및 저항성 증가 등 다른 바이오필름의 요소들을 같이 확인하여 판단할 필요가 있음.

나. 온도 및 형성일자별 바이오필름 내 EPS 정량 비교

○ 5 일 동안 황색포도상구균 바이오 필름을 1 일 형성시켰을 때와 5 일 동안 형성시켰을 때의 EPS (Extracellular Polymeric Substances)의 양을 정량 및 비교하였음. 선행연구를 통해 EPS의 구성성분을 크게 다당류와 단백질로 구분하고 이에 대한 정량분석은 각각 Calcofluor white staining과 FITC staining으로 진행하였음.

○ 정량분석을 하기 위해 1 x 1 (cm)의 STS No.4 coupon을 사용하였으며, 바이오필름 형성 방법은 앞선 균의 수 정량 실험과 동일함. 바이오필름이 형성된 coupon은 증류수 1 L에 washing한 후, 각각 염색시약에 반응 30 분 암반응 시키고 다시 증류수에 washing을 한 다음에 Calcofluor white는 95 % 에탄올 0.8 mL에, FITC는 증류수 0.8 mL에 15 분 동안 염색약을 재추출하여 96 well plate로 옮겨 형광 측정하였음. Calcofluor white staining는 excitation 360 nm / emission 460 nm에서 형광을 측정하고, FITC staining은 excitation 485 nm / emission 528 nm에서 형광을 측정하였고 결과는 아래와 같음.

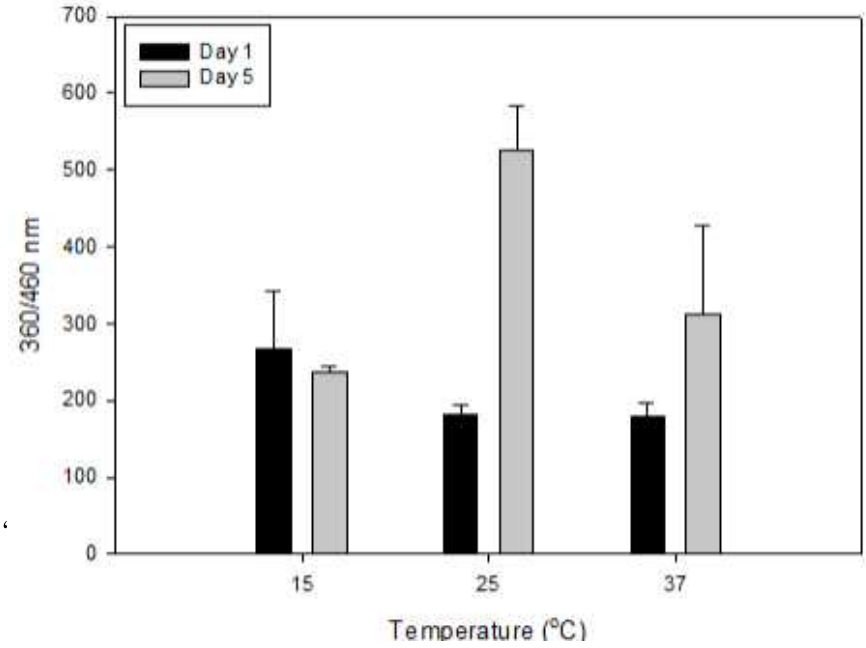


그림 98. 황색포도상구균 바이오필름 형성 시 1 일 차와 5 일 차에서의 다당류의 양 변화 (Calcofluor white staining)

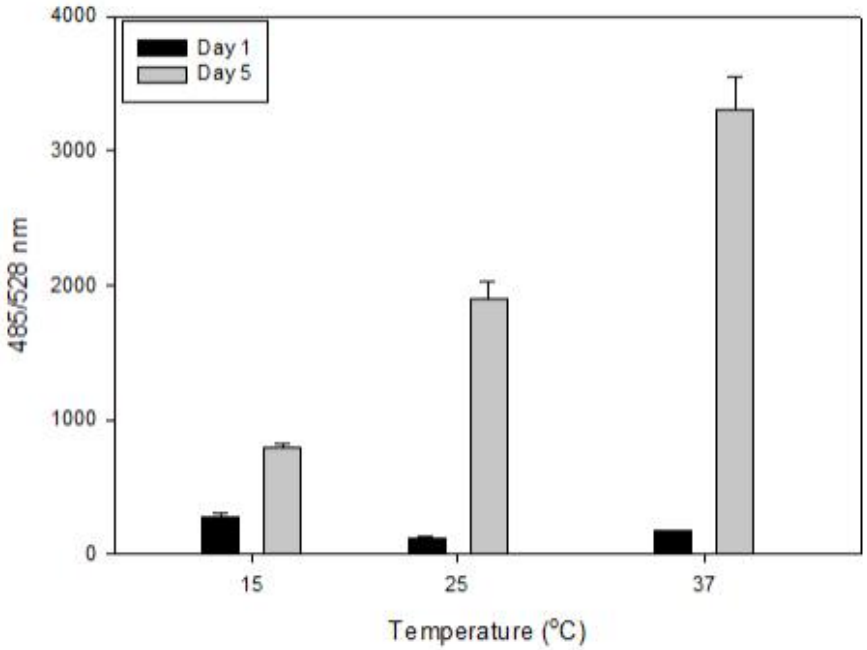


그림 99. 황색포도상구균 바이오필름 형성 시 1 일 차와 5 일 차에서의 단백질의 양 변화 (FITC)

○ 황색포도상구균 바이오필름을 15 °C에서 형성시켰을 때, 1 일과 5 일에서 다당류의 양은 유의미한 차이가 없었고 25 °C와 37 °C는 다당류의 양이 증가하였지만 25 °C에서 더 많은 양이 생긴 것을 확인할 수 있음. 단백질의 양은 모든 온도에서 증가하였고 37 °C, 25 °C, 15 °C 순으로 단백질의 양이 많이 증가한 것을 확인하였음. 이에 대한 해석은 아래의 그림과 같음.

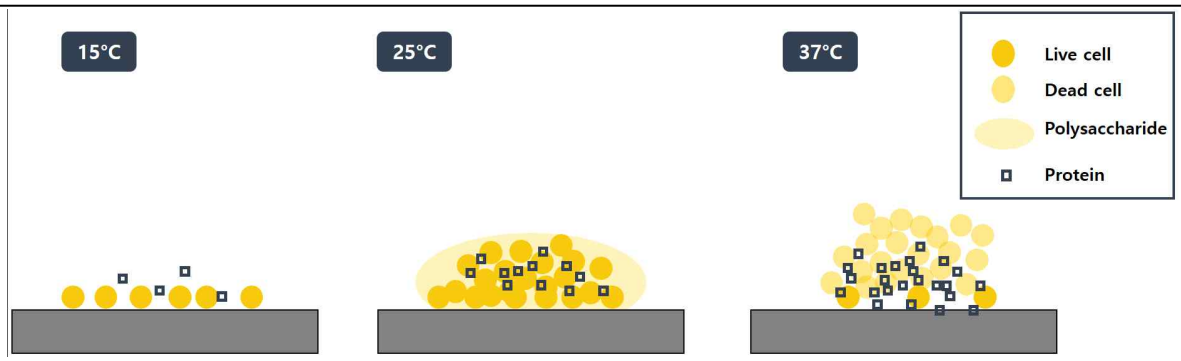


그림 100. 온도별 (15 °C, 25 °C, 37 °C)에서 균의 수,

○ 15 °C에서는 균의 수나 EPS 측면에서는 큰 변화가 없이 정적인 상태로 보이고 37 °C에서는 균이 1일 차에 많이 증가하다가 급격히 수가 줄어들고 단백질의 양이 많아지는 것을 볼 수 있음. 37 °C는 균의 생장하기 최적 온도이기 때문에 표면에 붙은 균이 바이오필름을 형성할 때 대사 물질인 단백질의 발현이 주로 일어나는 것으로 보이며 1 일차에서 바이오필름이 가장 잘 형성되어있는 것으로 보임. 한 편, 25 °C에서는 5 일에 걸쳐 균의 수 뿐만 아니라 다당류와 단백질이 모두 증가한 것을 볼 수 있었음. 따라서 바이오필름 형성 조건은 25 °C에서 5 일이 가장 좋으며 가속화 실험이 필요할 경우엔 37 °C 1 일 바이오필름을 형성시켜서 진행해야함.

다. 온도 및 형성일자별 증기를 활용한 제어효과 확립

○ 앞서 선정한 온도에서 Day1, Day2, Day5별로 증기로 바이오필름 내 황색포도상구균을 저감하는 실험을 통해 다른 조건에서 형성된 바이오필름들을 제어하는 연구를 진행함 증기는 100 °C의 포화증기를 사용하였으며 바이오필름이 형성된 2 x 5 (cm)의 STS No.4 coupon의 양면을 총 7 초 및 10 초 처리하고 중간 지점에서 뒤집어서 처리하였음.

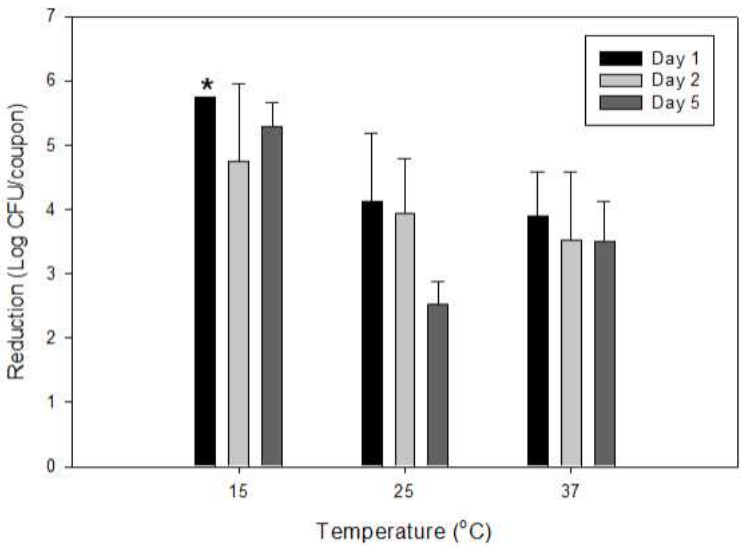


그림 101. 포화 증기 (100 °C)로 황색포도상구균 바이오필름이 형성된 STS No.4 표면에 7 초 처리하였을 때 균 저감 효과 (검출한계 이하)

○ 황색포도상구균 바이오필름을 하루 형성했을 때에는 포화 증기로 처리하였을 때, 15 ℃에서는 검출한계 이하로, 25 ℃에서는 4.13 log, 37 ℃에서는 3.90 log 저감되었음 이에 비해 5 일차에서는 15 ℃에서는 5.70 log 저감으로 1 일차와 큰 차이는 없었으나 25 ℃에서는 2.52 log밖에 저감이 안 되며 보다 높은 열 저항성을 보였음 37 ℃는 1 일차와 5 일차에서 저감효과 차이가 많지는 않았으나 3.49 log 저감되어 15 ℃ 보다는 열 저항성이 높아진 것을 확인할 수 있었음.

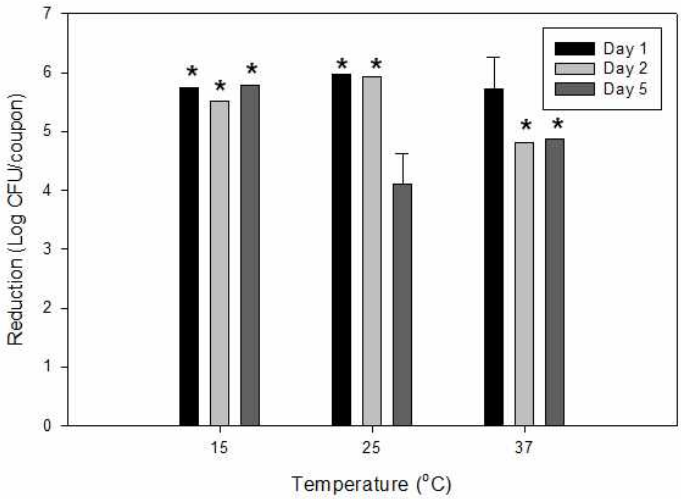


그림 102. 포화 증기 (100 ℃)로 황색포도상구균 바이오필름이 형성된 STS No.4 표면에 10 초 처리하였을 때 균 저감 효과 (검출한계 이하)

○ 황색포도상구균 바이오필름에 포화증기를 7 초 처리하였을 때, 25 ℃에서 5 일 형성한 바이오필름과 37 ℃에서 1 일 형성한 바이오필름을 제외하고 모든 조건에서 황색포도상구균이 검출한계 이하로 떨어진 것을 확인할 수 있었음.

○ 앞선 균의 수, 다당류 그리고 단백질의 양을 미루어보았을 때 25 ℃에서 5 일 형성한 것이 가장 바이오필름의 형태를 잘 갖추었을 것이라 예상하였는데 열 저항성에서도 가장 높은 것을 확인할 수 있었음. 37 ℃에서 1 일 형성한 것 역시 열 저항성이 다른 조건에서 보다 높은 것으로 보아 가속화 실험을 위한 바이오필름 형성에는 적합한 것으로 사료됨.

3. 박테리오파지 및 엔돌라이신의 바이오필름 제거 최적 조건 확립 (3차년도, 제2협동)

가. 분리한 박테리오파지의 바이오필름 제거 최적 조건 확립

○ 박테리오파지 CSA5, CSA13, CSA24의 바이오필름 제거 조건을 확인하기 위해 먼저 *S. aureus* Newman과 *S. aureus* CCARM 3793 을 TSBg (TSB + 0.25 % glucose) 에 키웠음.

○ 앞서 키운 seed culture 1 μL와 2X TSBg 100 uL, 박테리오파지 lysate 200 μL를 각각 섞어 96-well plate에 접종한 후 37 ℃에서 24 시간 키웠음.

○ 0.1% crystal violet을 이용하여 5 분간 염색하고 PBS로 세 번 washing 후 33 % acetic acid를 사용하여 형성된 바이오필름을 녹임.

○ 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 바이오필름 양을 비교함.

○ 10^8 PFU/mL 의 낮은 titer에서도 분리한 박테리오파지가 바이오필름을 제거하는 것을 확인함.

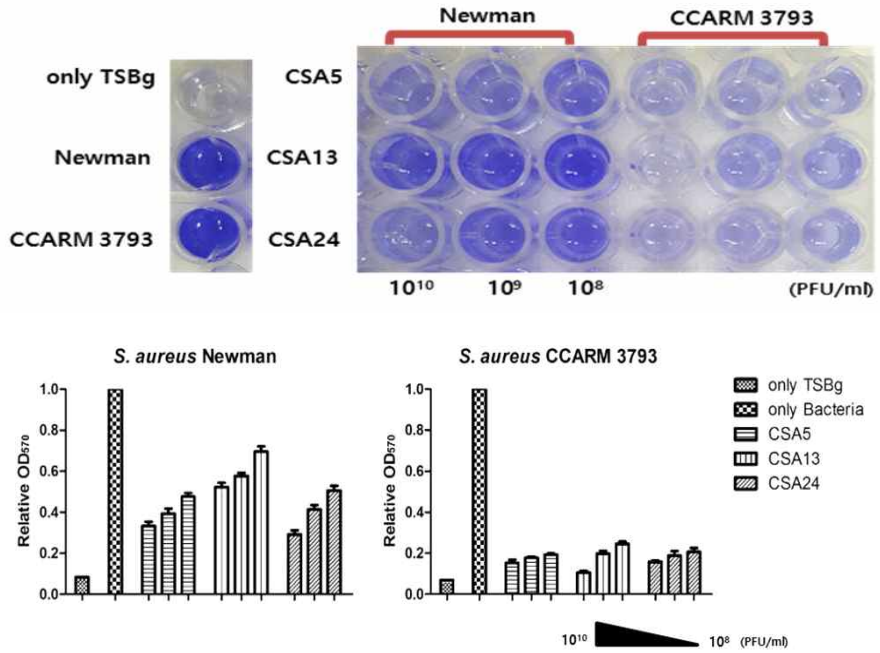


그림 103. 박테리오파지 CSA5, CSA13, CSA24의 바이오필름 제거 효과

나. 엔돌라이신의 바이오필름 제거 최적 조건 확립

○ 2차년도에서 특성분석한 엔돌라이신 LysCSA13을 바이오필름 제거에 활용함.

○ *S. aureus* RN4220, *S. aureus* CCARM 3090 균주를 앞서 확립한 조건을 바탕으로 바이오필름을 형성한 후 실험을 진행함.

○ Reaction buffer (20 mM Tris-Cl, pH 8.0) 를 넣어준 후 100, 300, 1000 nM의 LysCSA13을 각각 2 시간 동안 처리하여 바이오필름 제거 효과를 비교해봄.

○ 그 결과 *S. aureus* RN4220 균주가 형성한 바이오필름은 LysCSA13 300 nM 농도에서 가장 많이 줄어든 것을 확인할 수 있었음.

○ *S. aureus* CCARM 3090 균주가 형성한 바이오필름은 LysCSA13 50 nM의 낮은 농도에서도 바이오필름의 80 %가 감소한 것을 확인할 수 있었음.

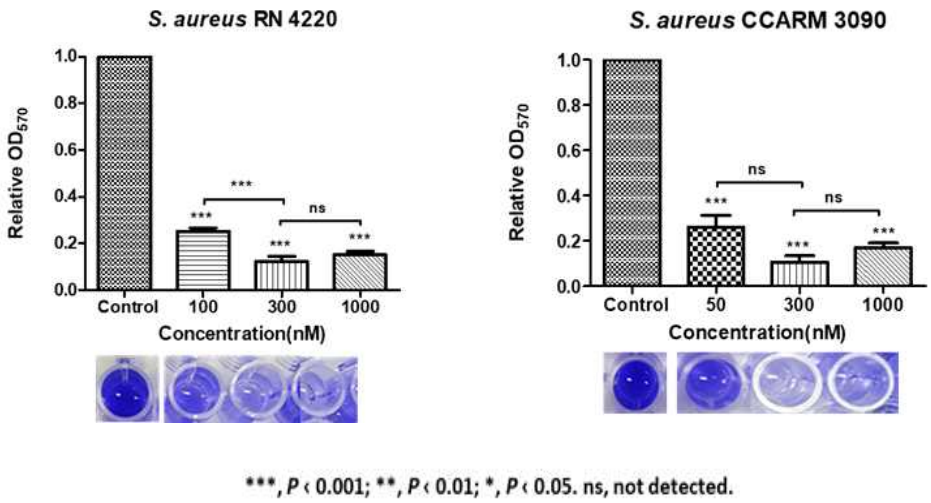


그림 104. 엔돌라이신 LysCSA13의 바이오필름 제거 효과

4. 식품 접촉 표면에서 박테리오파지 및 엔돌라이신의 바이오필름 제거능 확인 (3차년도, 제2협동)

가. 스테인리스에서 *S. aureus* 바이오필름 형성 조건 확립

○ 스테인리스 (2 x 2 ㎠, type: No. 4) 절편을 70 % ethanol에 dipping 하여 1차 살균 후 121 ℃에서 15 분 간 autocalve하여 완전 멸균함.

○ 6-well plate에 TSBg 3 mL을 분주한 후 멸균한 스테인리스를 넣음.

○ *S. aureus* RN4220, *S. aureus* CCARM 3090를 각 well에 접종 후 37 ℃에서 24 시간 키워 바이오필름을 형성함.

나. 유리에서 *S. aureus* 바이오필름 형성 조건 확립

○ 유리 (2 x 2 ㎠) 절편을 70 % ethanol에 dipping 하여 1차 살균 후 121 ℃에서 15 분 간 autocalve하여 완전 멸균함.

○ 6-well plate에 TSBg 3 mL을 분주한 후 멸균한 유리를 넣음.

○ *S. aureus* RN4220, *S. aureus* CCARM 3090를 각 well에 접종 후 37 ℃에서 24 시간 키워 바이오필름을 형성함.

다. 스테인리스에서 엔돌라이신 LysCSA13의 바이오필름 제거 효과 확인

○ 앞서 확립한 조건을 바탕으로 *S. aureus* RN4220, *S. aureus* CCARM 3090 균주의 바이오필름을 6-well plate에 형성한 후 reaction buffer (20 mM Tris-Cl, pH 8.0)를 넣음.

○ 엔돌라이신 LysCSA13을 각각 100, 300, 1000 nM 농도로 각 well에 1 시간 처리함.

○ *S. aureus* RN4220 균주가 형성한 바이오필름은 100 nM의 낮은 농도에서도 LysCSA13이 80 %의 바이오필름 제거 효과를 보임.

○ *S. aureus* CCARM 3090 균주가 형성한 바이오필름은 300 nM의 농도에서 LysCSA13이 가장 높은 바이오필름 제거 효과를 보임.

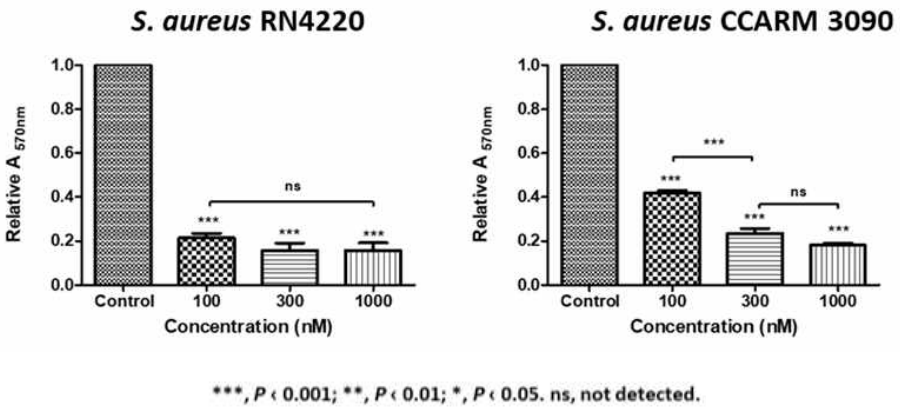


그림 105. 스테인리스에서 엔돌라이신 LysCSA13의 바이오필름 제거 효과

○ 앞선 결과를 바탕으로 형성된 *S. aureus*의 바이오필름을 엔돌라이신 LysCSA13 300 nM 처리하여 시간대 별로 바이오필름 제거 효과를 비교함.

○ 스테인리스에서 *S. aureus* RN4220 균주가 형성한 바이오필름의 경우 처리 후 10 분부터 바이오필름이 제거되기 시작함. 30 분부터 80 % 이상의 바이오필름이 제거된 것을 확인함.
○ 스테인리스에서 *S. aureus* CCARM 3090 균주가 형성한 바이오필름의 경우 30 분부터 바이오필름이 제거되기 시작함. 60 분부터 80 % 이상의 바이오필름이 제거된 것을 확인함.

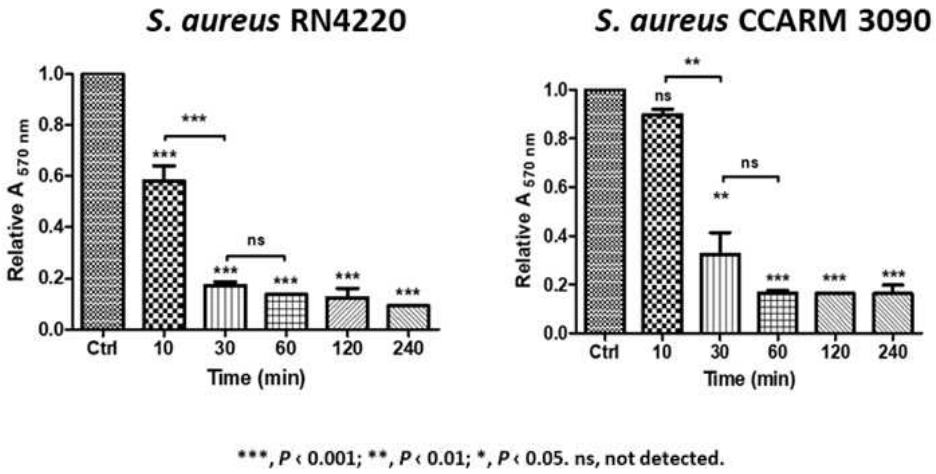


그림 106. 스테인리스에서 시간대 별 엔돌라이신 LysCSA13의 바이오필름 제거 효과

○ Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM)을 활용하여 LysCSA13의 스테인리스 바이오필름 제거 효과를 확인하고자 함.
○ 스테인리스에 *S. aureus* 바이오필름을 형성한 후 LysCSA13을 300 nM 농도로 1 시간 처리하여 FESEM으로 바이오필름 제거 효과를 확인함.
○ LysCSA13 처리 군에서 바이오필름이 확연히 줄어든 것을 확인함.

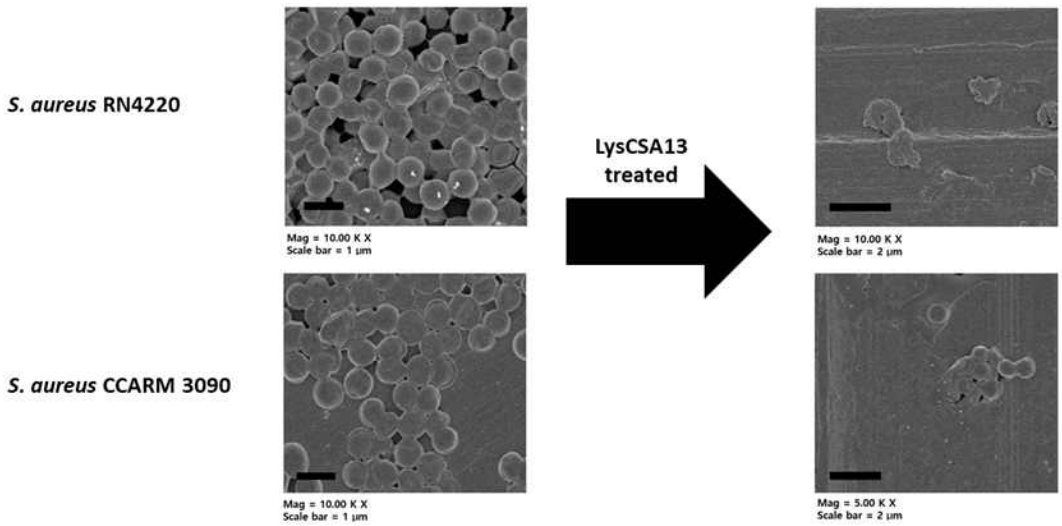


그림 107. FESEM을 활용한 엔돌라이신 LysCSA13의 스테인리스 바이오필름 제거 효과

○ 스테인리스에서 *S. aureus* 바이오필름을 형성한 후 LysCSA13을 처리하여 *S. aureus* 균 사멸능을 확인해보고자 함.

○ LysCSA13을 300 nM 농도로 1 시간 처리한 결과 2 log 감소 효과를 확인할 수 있었음. 이는 LysCSA13이 스테인리스의 바이오필름을 제거할 뿐 아니라 높은 균 사멸 효과를 가지고 있음을 의미함.

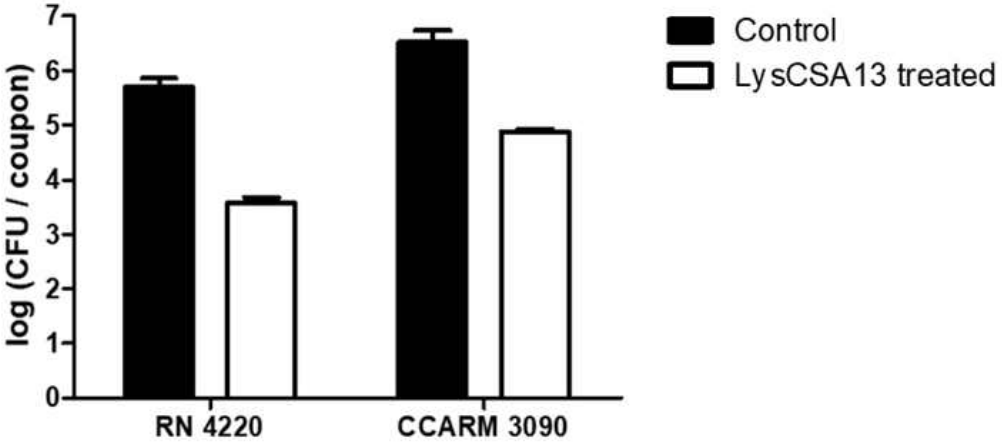


그림 108. 스테인리스에 바이오필름을 형성한 후 엔돌라이신 LysCSA13의 균 사멸 효과

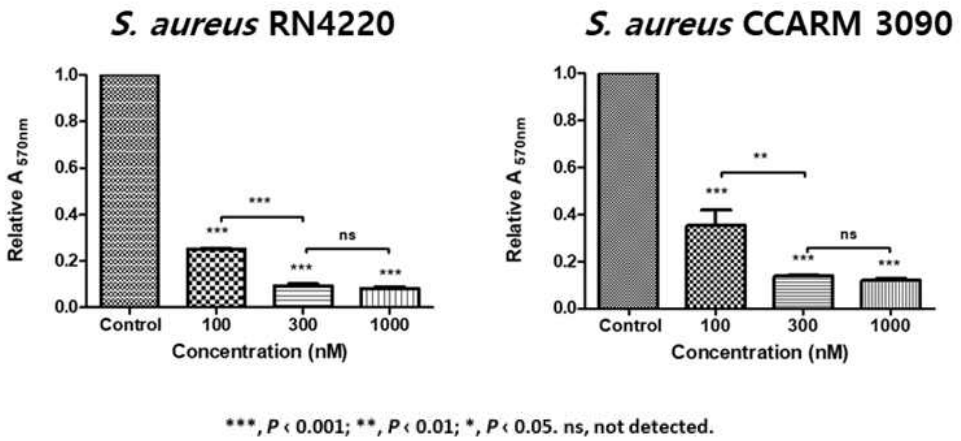
라. 유리에서 엔돌라이신 LysCSA13의 바이오필름 제거 효과 확인

○ 앞서 확립한 조건을 바탕으로 *S. aureus* RN4220, *S. aureus* CCARM 3090 균주의 바이오필름을 6-well plate에 형성한 후 reaction buffer (20 mM Tris-Cl, pH 8.0) 를 넣음.

○ 엔돌라이신 LysCSA13을 각각 100, 300, 1000 nM 농도로 각 well에 1 시간 처리함.

○ *S. aureus* RN4220 균주가 형성한 바이오필름은 100 nM의 낮은 농도에서도 LysCSA13이 80%의 바이오필름 제거 효과를 보임.

○ 두 균주가 형성한 바이오필름은 300 nM의 농도에서 LysCSA13이 가장 높은 바이오필름 제거 효과를 보임.



***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$. ns, not detected.

그림 109. 유리에서 엔돌라이신 LysCSA13의 바이오필름 제거 효과

○ 앞선 결과를 바탕으로 형성된 *S. aureus*의 바이오필름을 엔돌라이신 LysCSA13 300 nM 처리하여 시간대 별로 바이오필름 제거 효과를 비교함.

○ 스테인리스의 결과와 마찬가지로 유리에서 *S. aureus* RN4220 균주가 형성한 바이오필름의 경우 처리 후 10 분부터 바이오필름이 제거되기 시작함. 30 분부터 80 % 이상의 바이오필름이 제거된 것을 확인함.

○ 유리에서 *S. aureus* CCARM 3090 균주가 형성한 바이오필름의 경우 10 분부터 바이오필름이 제거되기 시작함. 60 분부터 80 % 이상의 바이오필름이 제거된 것을 확인함.

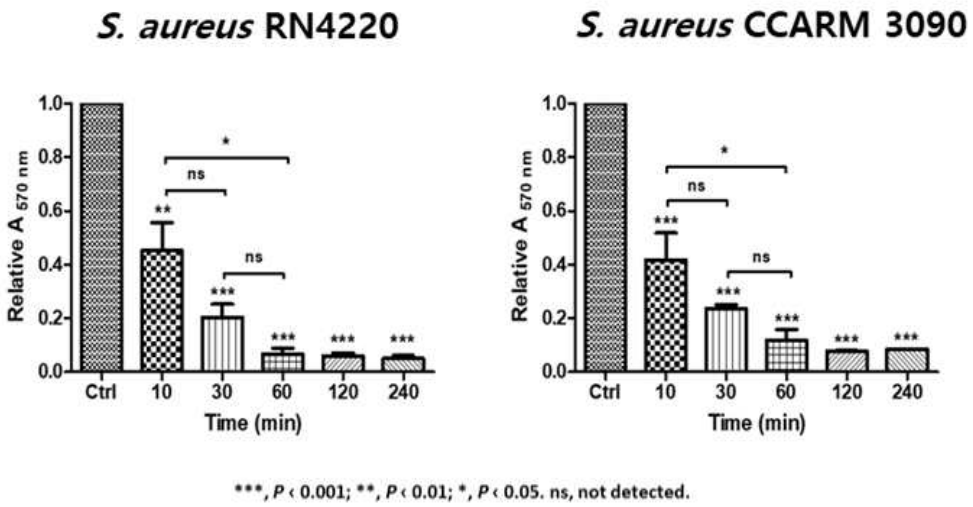


그림 110. 유리에서 시간대 별 엔돌라이신 LysCSA13의 바이오필름 제거 효과

○ 유리에서 *S. aureus* 바이오필름을 형성한 후 LysCSA13을 처리하여 *S. aureus* 균 사멸능을 확인해보고자 함.

○ LysCSA13을 300 nM 농도로 1 시간 처리한 결과 3 log 감소 효과를 확인할 수 있었음. 이는 LysCSA13이 스테인리스와 마찬가지로 유리의 바이오필름을 제거할 뿐 아니라 높은 균 사멸 효과를 가지고 있음을 의미함.

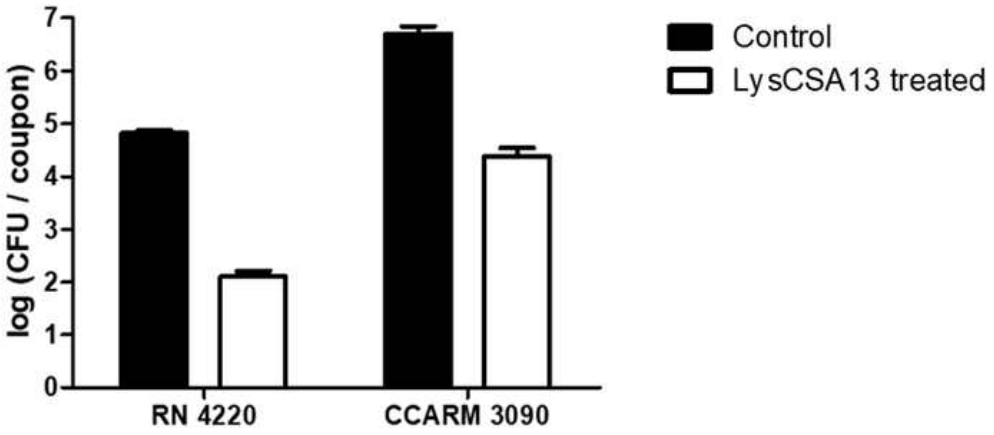
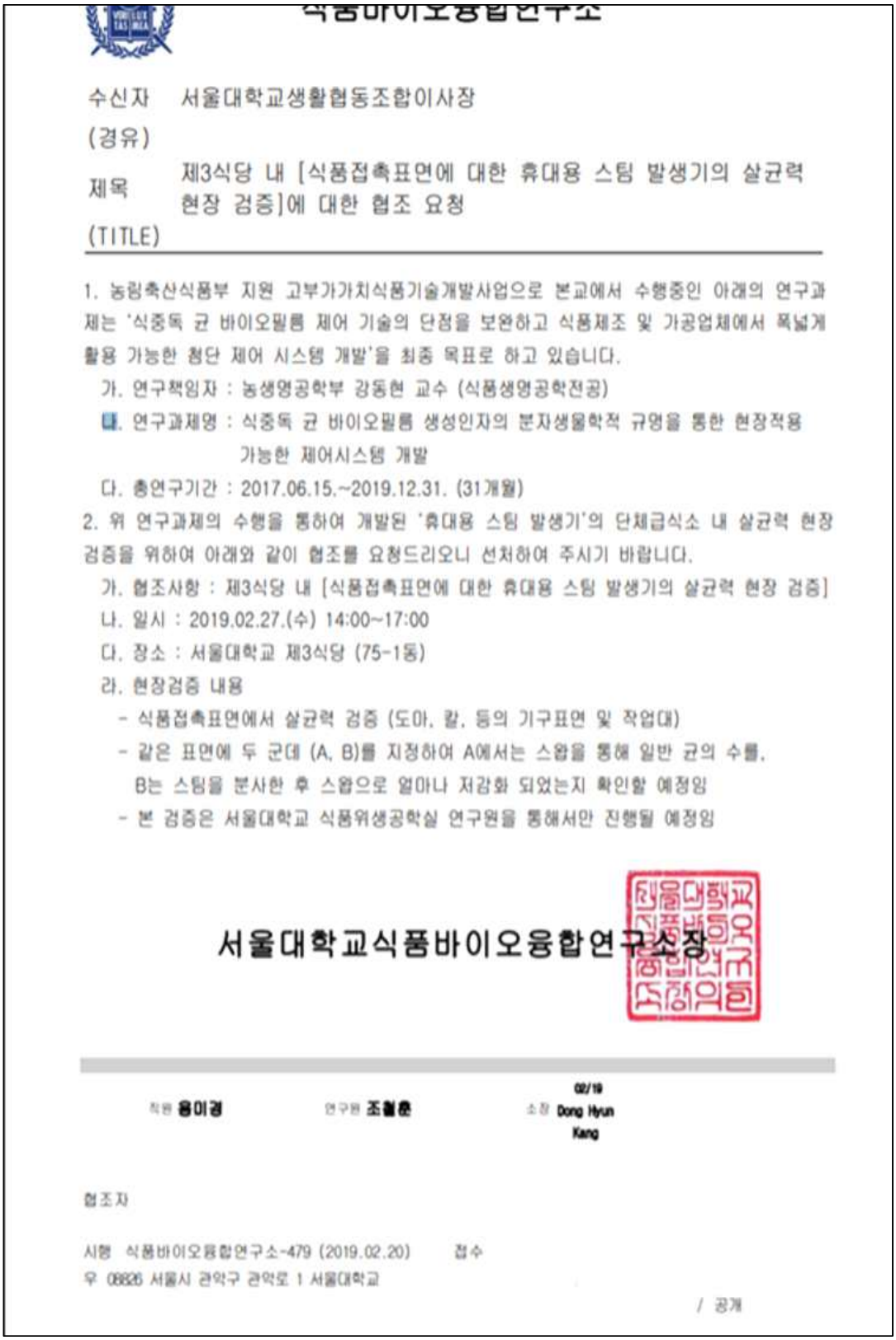


그림 111. 유리에 바이오필름을 형성한 후 엔돌라이신 LysCSA13의 균 사멸 효과

5. 개발된 장비의 현장적용 평가 및 매뉴얼 제작 (3차년도, 제2협동)

가. 급식소 현장적용 평가



식품바이오융합연구소

수신자 서울대학교생활협동조합이사장

(경유)

제목 제3식당 내 [식품접촉표면에 대한 휴대용 스팀 발생기의 살균력 현장 검증]에 대한 협조 요청

(TITLE)

1. 농림축산식품부 지원 고부가가치식품기술개발사업으로 본교에서 수행중인 아래의 연구과제는 '식중독 균 바이오필름 제어 기술의 단점을 보완하고 식품제조 및 가공업체에서 폭넓게 활용 가능한 청단 제어 시스템 개발'을 최종 목표로 하고 있습니다.

가. 연구책임자 : 농생명공학부 강동현 교수 (식품생명공학전공)

나. 연구과제명 : 식중독 균 바이오필름 생성인자의 분자생물학적 규명을 통한 현장적용 가능한 제어시스템 개발

다. 총연구기간 : 2017.06.15.~2019.12.31. (31개월)

2. 위 연구과제의 수행을 통하여 개발된 '휴대용 스팀 발생기'의 단체급식소 내 살균력 현장 검증을 위하여 아래와 같이 협조를 요청드리오니 선처하여 주시기 바랍니다.

가. 협조사항 : 제3식당 내 [식품접촉표면에 대한 휴대용 스팀 발생기의 살균력 현장 검증]

나. 일시 : 2019.02.27.(수) 14:00~17:00

다. 장소 : 서울대학교 제3식당 (75-1동)

라. 현장검증 내용

- 식품접촉표면에서 살균력 검증 (도마, 칼, 등의 기구표면 및 작업대)
- 같은 표면에 두 군데 (A, B)를 지정하여 A에서는 스왑을 통해 일반 균의 수를, B는 스팀을 분사한 후 스왑으로 얼마나 저감화 되었는지 확인할 예정임
- 본 검증은 서울대학교 식품위생공학실 연구원을 통해서만 진행될 예정임

서울대학교식품바이오융합연구소장

02/19

작원 용미경 연구원 조철훈 소장 Dong Hyun Kang

협조자

시행 식품바이오융합연구소-479 (2019.02.20) 접수

우 08826 서울시 관악구 관악로 1 서울대학교

/ 공개

그림 112. 서울대학교 제3식당에 현장 평가 요청한 공문

○ 서울대학교 식품바이오 융합연구소를 통해 서울대학교 제 3식당에 현장 검증 공문을 요청하였음.

칼, 도마, 작업대 등 식품 접촉 표면 및 주변 환경에서 스왑

초고온 과열 증기로 처리 후 살균력 검증

그림 113. 서울대학교 제 3식당 현장평가

○ 현장 검증을 위해 사용된 과열 증기 장비는 제2협동에서 제작한 과열 증기 장비를 바탕으로 세니젠과 같이 만든 휴대용 과열 증기 장비를 이용하였음.

○ 식품이 접촉될 수 있는 표면 및 주변 환경을 위주로 선정하여 10 x 10 cm 정사각형 부분을 임의로 스왑한 후, 그 위에 초고온 과열 증기 125 ℃로 처리하고 다시 스왑해서 그 차이를 이용해 살균력을 확인하였음.

표 29. 급식소 내부 초고온 과열 증기로 살균한 결과

(단위:Log CFU/cm^2)

위치	Log reduction
칼	ND (1.54>)
도마	ND (2.12>)
작업대	ND (3.08>)
싱크대	ND (1.95>)
바닥1	ND (4.53>)
바닥2	ND (3.02>)

○ 과열 증기로 10 초 처리하였을 때, 검출한계 (100 CFU/cm^2)이하로 떨어지며, 현장에서 존재하는 균을 제어하는데 효과적인 것을 입증하였음.

나. 현장형 초고온 과열 증기 매뉴얼 제작

○ 제작한 초고온 과열 증기를 실제 적용에 도움을 주기 위한 매뉴얼을 제작하였음.

○ 해당 매뉴얼은 1. 식품 산업에서 바이오 필름으로 인한 식중독 사건 및 살균의 필요성 2. 식품 산업 현장 살균을 위한 초고온 과열 증기 및 엔돌라이신 소개, 3. 현장형 초고온 과열 증기 및 엔돌라이신 적용 방법, 4. 유의 사항 등으로 구성되어 있음.

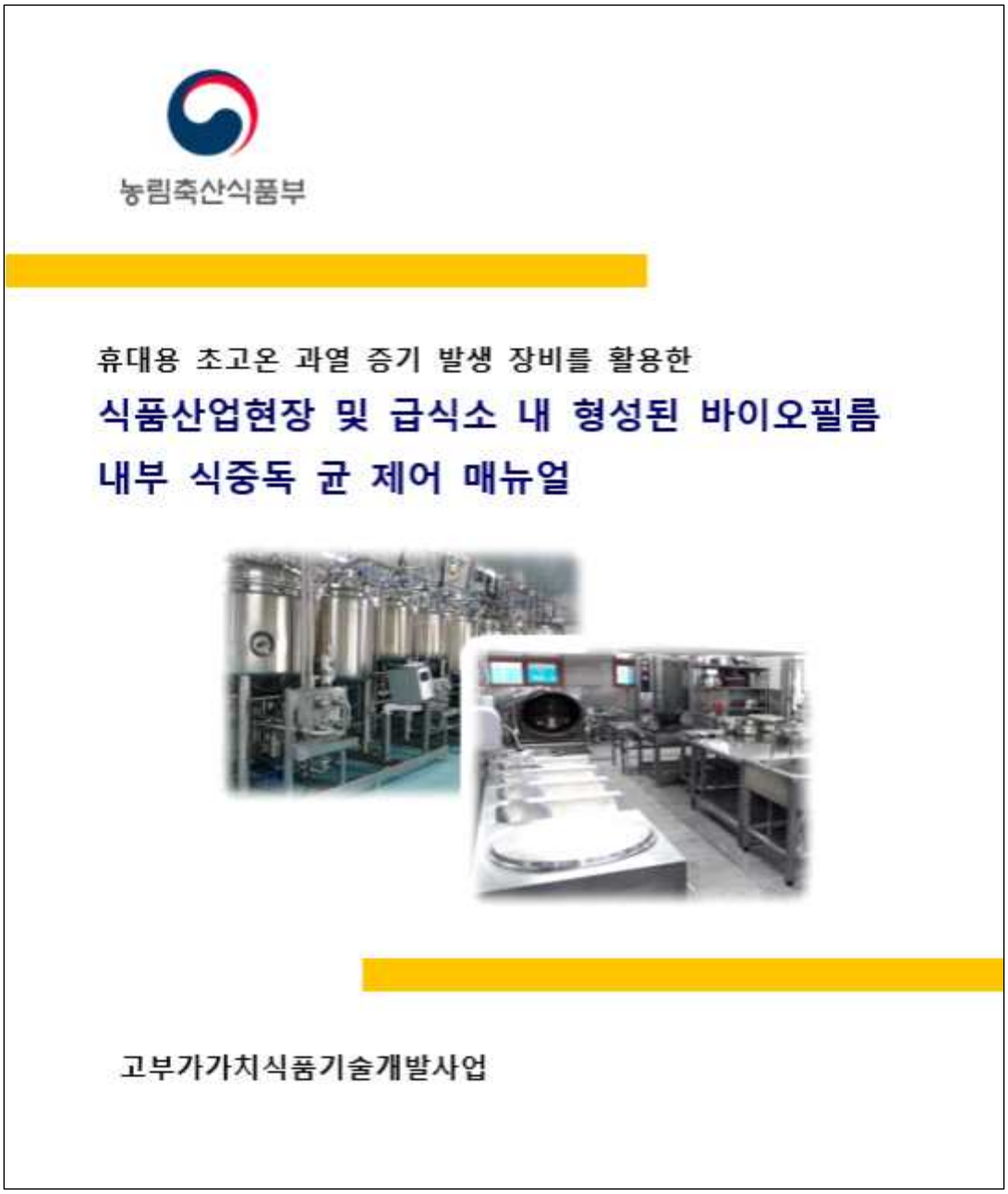


그림 113. 서울대학교 제3식당 현장평가

6. 현장형 초고온 과열 증기 발생 시작품 제작 및 성능 평가 (3차년도, 세니젠)

가. 현장형 초고온 과열 증기 발생 장비 온도 평가

○ 초고온 과열 증기 발생 장비의 분사 거리별 온도를 특정하기 위해 Multi-Channel Temperature meter (Applent AT4508) 장비를 활용함.

○ 거리별 온도 측정은 2 cm 간격으로 분사거리 20 cm 까지 측정을 진행함.

○ 30 초 동안 분사 시, 거리별 평균온도는 최대 199.4 ℃ ~ 64.4 ℃까지 다양한 온도 범위를 나타냄.

그림 115. Multi-Channel Temperature meter 장치

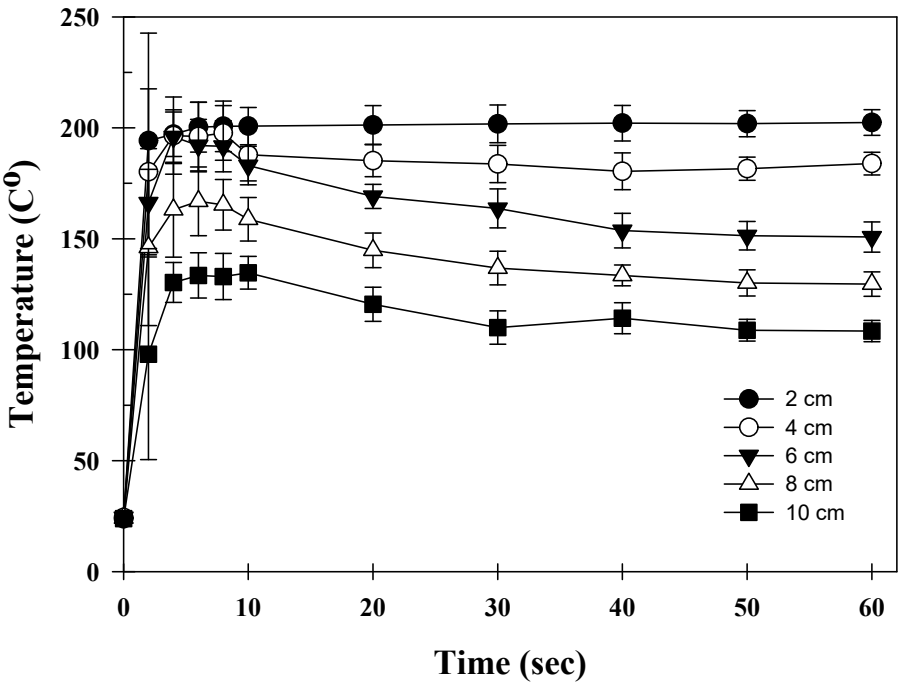


그림 117. 2 cm ~ 10 cm 거리에서의 초고온 과열 장치 시간별 온도

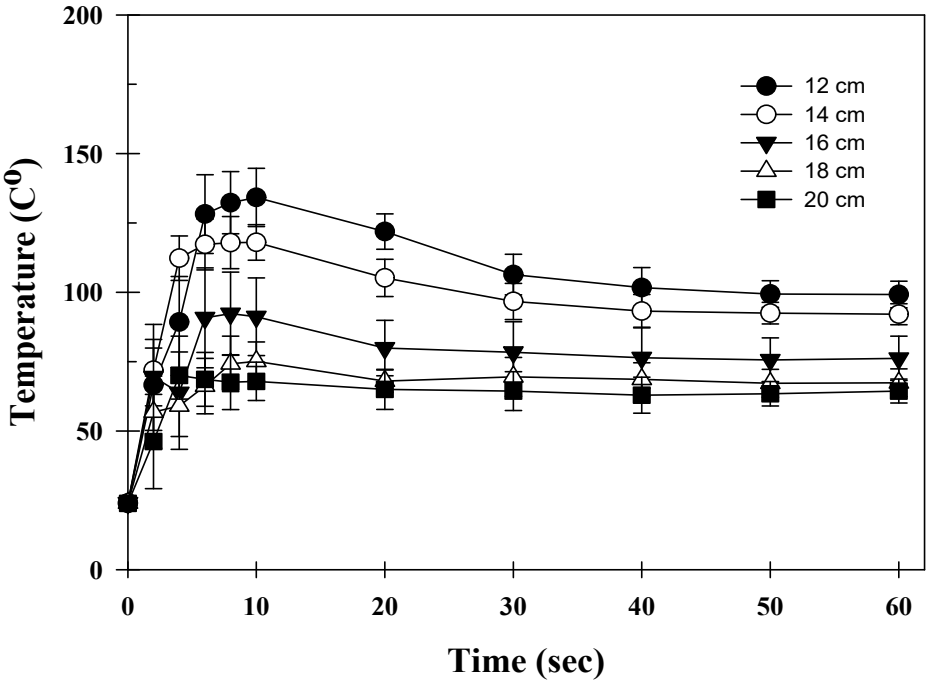


그림 117. 12 cm ~ 20 cm 거리에서의 초고온 과열 장치 시간별 온도

표 30. 거리별 시간에 따른 초고온 가열 장치의 평균 steam 온도

분사 시간	초고온 가열 장치 분사 거리별 평균온도 (℃)									
	2cm	4cm	6cm	8cm	10cm	12cm	14cm	16cm	18cm	20cm
10초	198.8±8.4	191.6±9.8	185.8±8.6	157.2±9.8	125.9±7.4	110.0±9.5	107.4±6.4	91.2±14.0	75.1±7.0	67.9±6.9
30초	199.3±8.5	187.3±8.4	175.8±8.8	149.2±7.6	121.6±7.5	115.9±7.3	105.1±6.5	78.4±11.0	69.5±7.0	64.4±7.0

○ 100 ℃ 까지는 포화증기 상태이며, 100 ℃ 이상의 온도를 초고온 과열 증기라 칭함.
○ 초고온 과열 증기 장치 활용 시, 초고온 과열 증기가 분사되기 사작하는 거리는 14 cm ~ 16 cm 사이 거리로 나타났으며, 이를 좀 더 정확하게 확인하기 위해 15 cm 거리에서 온도를 측정함.

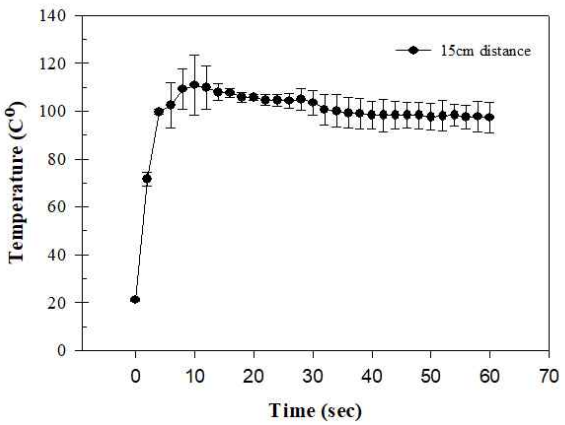


그림 118. 15 cm 거리에서의 초고온 가열 장치 시간별 온도

○ 15 cm 거리에서 처리한 결과 10 초 동안 평균온도는 101 ℃, 30 초 동안 평균온도는 103 ℃를 나타내었으며, 처리 대상으로부터 15 cm 이내의 거리에서 초고온 가열 증기가 발생되는 것을 확인하였음.

나. Spotting한 표면에서의 초고온 과열 증기 발생 장비의 처리 효율

○ 초고온 과열 증기 장치의 사용 가이드라인을 설정하기 위해 식품 공정에서 주로 활용하고 있는 재질 Stainless steel (SUS), Polyvinyl chloride (PVC), Silicon 3 가지를 선정하여 2 cm X 5 cm 크기의 쿠폰을 제작하여 활용하였음.

○ 처리 균의 경우 Gram-negative인 *Escherichia coli* ATCC 43895 및 Gram-positive인 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538을 활용하여 실험을 진행함.

○ 실험 균주의 stock 제조는 *Escherichia coli* ATCC 43895 및 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538을 Tryptic soy broth에 각각 접종하여 37 ℃에서 18 시간 동안 배양함.

○ 배양된 bloth는 centrifuge (3500 rpm, 4 ℃)를 활용하여 cell down 한 후 pH 7.01 PBS buffer로 3 회 washing 처리하여 제조함.

○ 건조 필름 실험의 경우 각각의 재질에 10^8 CFU/mL 농도의 균을 10 uL씩 10 개의 지점에 spotting 하여 40 분 동안 건조 시킨 뒤, 초고온 과열 증기 발생 장비를 활용하여 시간별 처리 효과를 관찰함.

○ 초고온 과열 증기 장치의 처리는 0 초, 2 초, 4 초, 6 초, 8 초, 10 초로 각각 분사하였으며, 분사 거리는 10 cm에서 진행함.

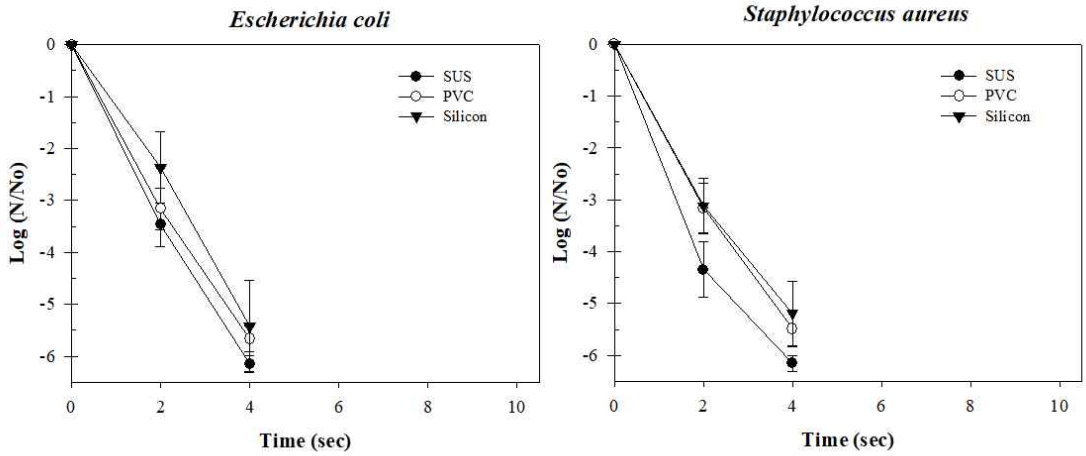


그림 119. 초고온 과열 수증기 장치 10 cm 거리에서 건조 표면 처리 결과

○ Spotting한 건조 표면을 10 초 동안 10 cm 거리 (평균온도 125.9 ±7.4 ℃)에서 처리한 결과 *Escherichia coli*의 경우 SUS, PVC, Silicon 재질에서 각각 처리시간 4 초 만에 - 6.1 ± 0.1 log, -5.6 ± 0.2 log, -5.4 ± 0.8 log의 저감화 효과를 나타냄.

○ *Staphylococcus aureus*의 경우 SUS, PVC, Silicon 재질에서 각각 4 초 만에 - 6.1 ± 0.1 log, -5.4 ± 0.3 log, -5.1 ± 0.6 log의 저감화 효과를 나타냄.

○ 실험의 표준편차를 줄이고 초고온 과열 수증기가 발생되는 시점 (최대 제어 거리)에서의 미생물 제어 효율을 파악하기 위해 15 cm 거리에서 추가로 실험을 진행함.

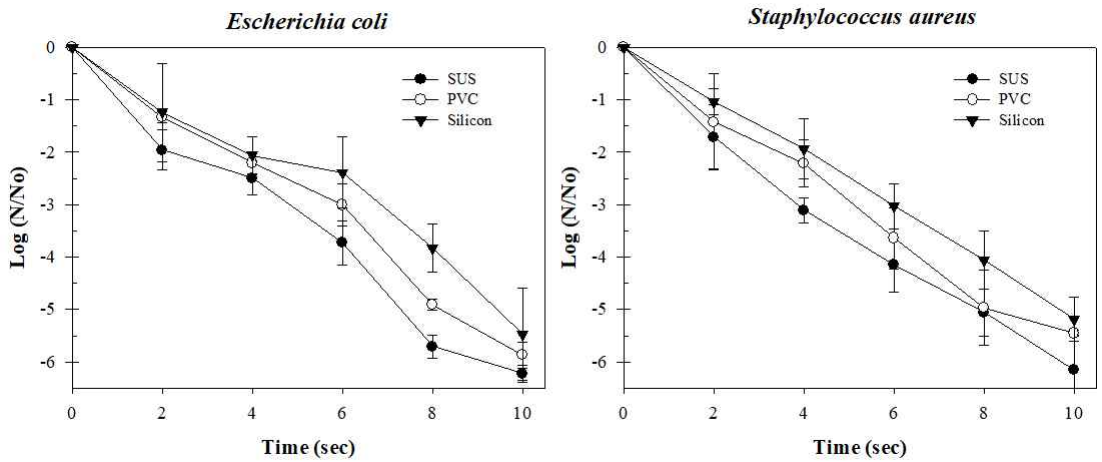


그림 120. 초고온 과열 수증기 장치 15 cm 거리에서 건조 표면 처리 결과

○ Spotting한 건조 표면을 10 초 동안 초고온 과열 증기 장치로 처리한 결과 *E.coli*의 경우 SUS, PVC, Silicon 재질에서 각각 -6.2 ± 0.1 log, -5.8 ± 0.2 log, -5.4 ± 0.8 log의 저감화 효과를 나타냄. *S.aureus*의 경우도 마찬가지로 -6.1 ± 0.6 log, -5.4 ± 0.1 log, -5.1 ± 0.4 log의 저감화 효과를 나타내었음.

○ 열전도도는 각각 SUS (12~45 W/mK), PVC (0.13~0.3 W/mK), Silicon (0.2 W/mK)으로 열전도도가 높은 재질일수록 미생물 저감화 효과가 높게 나타남.

다. 형광현미경 및 Biofilm detection kit를 활용한 Biofilm 형성 확인

○ 3 가지 재질의 쿠폰을 121 ℃, 15 분 동안 Autoclave 한 후, 70 % ethanol로 한 번 더 닦음.

○ *Escherichia coli* stock을 10^9 CFU/mL로 PBS buffer 활용하여 희석한 후 50 mL conical tube에 30 mL씩 분주함.

○ 균액이 분주된 conical tube에 쿠폰을 넣어 4 ℃에서 1일간 부착시킴.

○ 균이 부착된 쿠폰을 Tryptic soy broth (25 ℃, 6 일)에 배양시켜 각각의 쿠폰에 biofilm을 형성시킴.

○ Biofilm형광현미경의 경우 Fluorescence microscopy (ZEISS Scope. A1) 기기를 활용하여 biofilm 형성을 확인함.

○ Dye는 Live/Dead® BacLightTM Bacteral Viability Kit (InvitrogenTM)를 활용하여 염색을 하였으며, dye stock의 제조는 3차 증류수 1 mL과 Kit에 들어있는 3.3 mM SYTO® 9 nucleic acid staining 3 uL와 20 mM propidium iodide 3 uL 용해시켜 만듬.

○ 염색은 바이오필름이 형성된 쿠폰에 dye stock을 100 uL 분주하여 암실에서 30 분간 염색한 뒤 3차 증류수로 2 회 담금 처리 한 후 형광현미경을 활용하여 관찰함.

○ SYTO® 9 nucleic acid staining에 의해 염색된 Live cell 및 propidium iodide에 의해 염색된 Dead cell을 통해 biofilm이 형성된 것을 확인하였음.

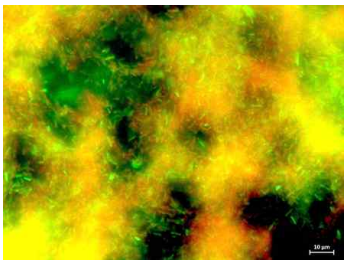


그림 121. *Escherichia coli* ATCC 43895의 Biofilm 형성 사진

○ Biofilm detection kit의 경우 Realco사 제품을 활용하여 biofilm 형성 유무를 확인하였음.
○ Reactive 1 용액을 분사 후 5 분간 반응 후 물로 씻어낸 후 1차 판독을 실시함.
○ 1차 판독결과 파랗게 착색되었다면, 같은 표면에 Reactive 2 용액을 충분히 분사한 후 물을 씻어냄.

표 31. Biofilm 형성 결과 판독표 1 (Realco사, Reactive 1 solution)

결과	판독 방법
Negative (파란 착색 없음)	No contamination
Positive (파랗게 착색)	오염 원인은 아래중 하나 :Biofilm/고착된 유기오염/스케일

표 32. Biofilm 형성 결과 판독표 2 (Realco사, Reactive 2 solution)

결과	판독 방법
Negative (파란 착색 없음)	고착된 유기오염
Positive (파란색→회색)	라임스케일
Positive (파랗게 착색)	Biofilm

○ Biofilm detection kit를 통해 확인 결과 silicon coupon에 biofilm이 형성된 것을 확인할 수 있었음.

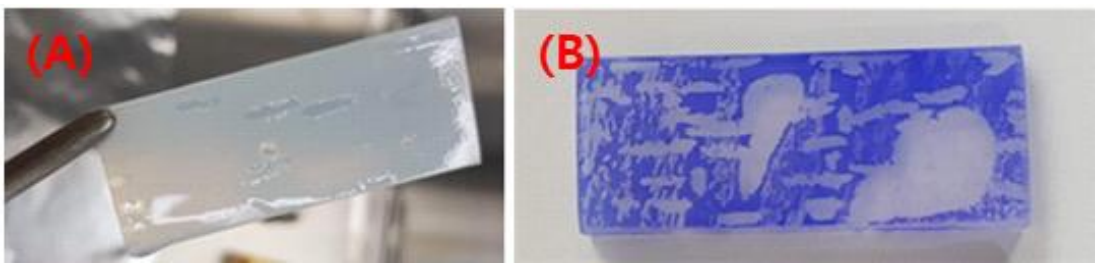


그림 122. Realco사 kit를 활용한 biofilm 형성 확인 염색 전 (A), 염색 후 (B)

라. Biofilm이 형성된 표면에서의 초고온 과열 증기 발생 장비의 처리 효율

○ 초고온 과열 수증기 장치를 활용하여 Biofilm이 형성된 표면을 처리하기 위해 15cm 거리 (30 초 동안 평균온도: 103 ℃)에서 처리 시간에 따른 저감화 효과를 평가함.
○ 처리 시간은 0 초, 10 초, 20 초, 30 초 동안 각각 분사하였으며 Biofilm이 형성된 쿠폰의 초기 균수는 *E.coli*의 경우 10^8 CFU/mL에서 10^9 CFU/mL, S.aureus의 경우 10^7 CFU/mL에서 10^8 CFU/mL을 나타냄.

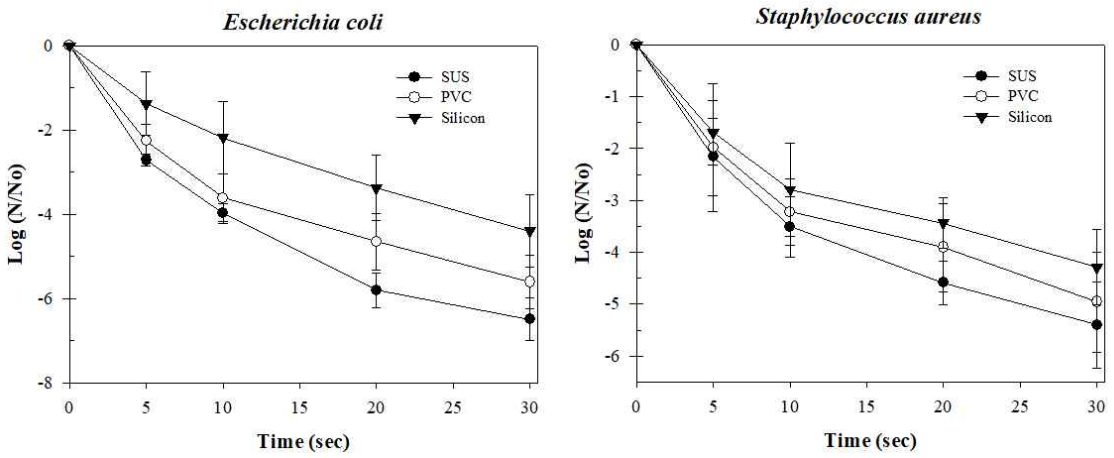


그림 123. 초고온 과열 수증기 장치 15 cm 거리에서 bilfilm 형성 쿠폰 처리 결과

○ Biofilm이 형성된 표면을 30 초 동안 초고온 과열 증기 장치로 처리한 결과 *E.coli*의 경우 SUS, PVC, Silicon 재질에서 각각 -6.4 ± 0.5 log, -5.6 ± 0.6 log, -4.3 ± 0.8 log의 불활성 효율을 나타냄. *S.aureus*의 경우도 마찬가지로 -5.3 ± 0.8 log, -4.9 ± 0.9 log, -4.2 ± 0.7 log의 불활성 효율을 나타내었음.

○ Biofilm이 형성된 표면도 spotting 한 표면과 마찬가지로 열전도도가 높은 재질일수록 미생물의 불활성화 효율이 높게 나타남.

○ Spotting 된 표면 및 Biofilm이 형성된 표면 처리 결과 15 cm 거리에서 30초 동안 분사시, 미생물 처리 효율이 모두 -4 log 이상 나타나는 것으로 확인함.

7. 현장형 초고온 과열 증기 발생 장비 현장 적용 평가 (3차년도, 세니젠)

가. 식품제조 및 가공업체 작업환경 내 미생물 및 바이오필름 오염도 조사

○ 다양한 식품 공정에 초고온 과열 증기 발생 장비를 평가하기 위해 육가공업체 1 곳, 가공식품제조 1 곳, 단체 급식 업소 1 곳 방문하여 오염도가 높을 곳으로 판단되는 공정을 중심으로 현장 평가를 진행함.

○ 오염도가 심각해 보이는 부분의 경우 Realco사의 biofilm detection kit를 활용하여 biofilm 형성 유무를 확인하였음.

○ 각 식품 공장 내 주요 공정부분은 ㈜세니젠에서 개발한 Sani-MacroSwab을 활용하여 샘플링하였으며 가로, 세로, 대각선 방향으로 각 1 회씩 스왑하여 샘플링을 진행함.

○ Swab의 경우 ㈜세니젠에서 개발한 10 X 10 cm의 면적을 비접촉식으로 구획할 수 있는 Beamtemplete를 이용하여 샘플링 할 위치의 면적을 구획함.

○ 각 공정별 오염도를 파악하기 위해 sampling한 시료를 Trypic soy agar에 도말하여 총 균수를 측정함.

○ 각 공정별 Trypic soy agar에서 많이 자란 우점종들을 대상으로 16s rRNA sequencing을 진행하여 biofilm 형성 가능성이 있는 균들을 파악함.

나. 육가공업체 현장 적용 평가 결과

○ 각 공정별 미생물 오염도를 평가한 결과 육가공업체에서는 작업 장비의 칼날 및 컨베이어벨트 부분의 오염도가 높게 나타남.

○ 육가공 업체의 장비 및 작업도구 소독 방식은 칼날 부분은 식기 세척용 주정을 활용하여 세척하였으며, 작업대의 경우 알코올을 분무하여 세척하였음.

○ 세제 및 알코올을 사용하였음에도 불구하고 일반 세균 수가 평균 1.4 ~ 3.8 Log CFU/mL 나타남. 이는 칼날 부분의 경우 처리하기 어려운 좁은 틈새 또는 손이 잘 닿지 못하는 부분이 발생 하므로 세척이 완전히 이루어지지 않고 있으며, 작업대의 작업도구의 경우도 알코올 분무만으로는 미생물을 모두 제어하기는 어려운 것으로 나타남.

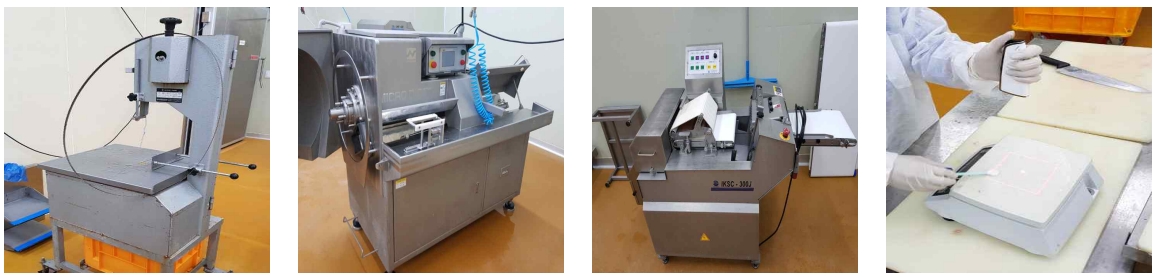
○ 이에 비해 초고온 가열 증기 발생 장치로 초고온 과열 수증기 장치 최대 제어 가능거리인 15 cm (평균온도: 101 ℃) 거리에서 10 초 동안 각 물질을 처리한 결과 일반 세균수는 평균 1 Log CFU/mL 이하로 현저히 낮게 나타남.

○ Biofilm detection kit를 사용한 결과 biofilm 형성 부위는 확인하지 못함.

표 33. 육가공 업체 세부 항목별 미생물 오염도 측정

업체	항목	세부 항목	일반 세균 수 (Log CFU/mL)		
			세척 전	세척 후	SHS 장치 처리 후
육가공 업체	골절기	받침대	5.6 ± 0.2	3.8 ± 0.6	0.7 ± 0.1
		칼날	5.4 ± 0.3	3.2 ± 0.7	0.8 ± 0.1
	마이크로 다이서	푸쉬판	5.0 ± 0.4	2.4 ± 0.3	0.1 ± 0.1
	미니 다이서	컨베이어 벨트	6.6 ± 0.1	2.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1
	작업대	도마	3.3 ± 0.2	2.3 ± 0.2	1 ± 0.2
		망치	3.4 ± 0.2	1.4 ± 0.5	0
		칼	3.8 ± 0.4	3.4 ± 0.4	0
		저울	3.8 ± 0.3	1.4 ± 0.2	0

그림 124. Realco사 Biofilm detection kit 사용 장면



골절기 마이크로 다이서 미니다이서 작업대

그림 125. 육가공 업체 현장 장비 사진

그림 126. 육가공 업체 현장 샘플링 및 초고온 가열 증기 발생 장치 처리

다. 가공식품제조업체 현장 적용 평가 결과

○ 각 공정별 미생물 오염도를 평가한 결과 가공식품제조업체에서는 연육기 칼날, 도마, 장비의 표면 및 손잡이 부분에서 오염도가 높게 나타남.

○ 각각의 작업 도구 및 장비의 초기 일반 세균수를 분석한 결과 대부분 4 ~ 6 Log CFU/mL의 일반세균수가 나타났으며, 물로 세척한 후에도 3 Log CFU/mL 이상의 일반세균수가 관찰되는 부분이 많이 관찰됨.

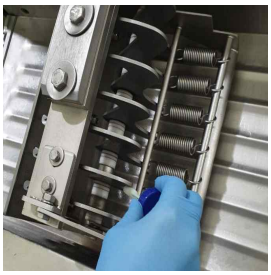
○ 대부분 장비의 경우 크기가 크기 때문에 작업자가 직접 손으로 닦기 힘들며 물로 세척하는 경우가 많음. 이에 비해 초고온 가열 증기 발생 장비의 경우 건 타입으로 만들었기 때문에 기존 개발된 초고온 과열 수증기 장치에 비해 미생물을 제어하는 데 있어 훨씬 편리할 것으로 판단됨.

○ 초고온 가열 증기 발생 장치로 각각의 장비 및 도구를 15 cm 거리 (평균온도: 101℃)에서 10 초 동안 처리한 결과 일반세균 수가 1.8 Log CFU/mL 이하로 매우 낮게 나타남.

○ Biofilm detection kit를 사용한 결과 biofilm 형성 부위는 확인하지 못함.

표 34. 식품 가공 업체의 세부 항목별 미생물 오염도 측정

업체	항목	세부 항목	일반 세균 수 (Log CFU/mL)		
			세척 전	세척 후	SHS 장치 처리 후
가공식품 제조업체	금속검출기	컨베이어 벨트	4.7 ± 0.2	3.6 ± 0.2	0.8 ± 0.2
	연육기	칼날	5.7 ± 0.4	2.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
	작업대	작업용 칼	2.0 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0
		도마	5.6 ± 0.5	2.4 ± 0.5	1.3 ± 0.2
		저울	3.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0
	웨건	표면	4.3 ± 0.3	3.7 ± 0.2	0.9 ± 0.1
	진공텀블러	뚜껑	5.9 ± 0.2	3.3 ± 0.4	1.3 ± 0.2
	피클믹서	표면	5.2 ± 0.4	4.0 ± 0.1	1.8 ± 0.3
	건조대	고무장갑 걸이	5.6 ± 0.3	3.2 ± 0.3	1.0 ± 0.2
	자외선 건조기	손잡이	6.8 ± 0.1	3.6 ± 0.3	0.3 ± 0.1
	선반	포장육 선반	6.2 ± 0.1	3.8 ± 0.2	1.0 ± 0.2


칼날

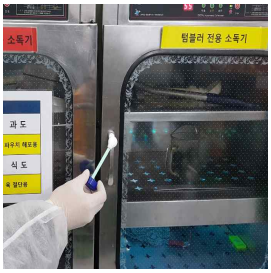
저울

진공텀블러

피클믹서

웨건

고무장갑걸이



자외선소독기

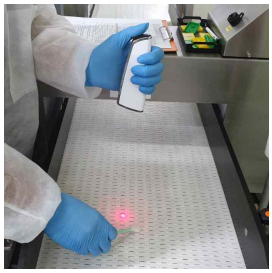

금속검출기

그림 127. 가공식품제조업체 현장 샘플링 사진

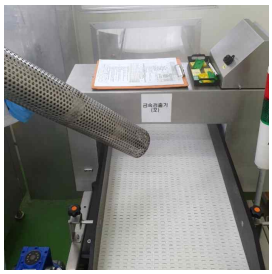


그림 128. 가공식품제조업체 초고온 가열 증기 발생 장치 처리

라. 단체급식 업소 현장 적용 평가 결과

○ 세척이 완료된 후에도 기기 내부 표면, 컨베이어, 도마 등에서 오염도가 높게 나타남.

○ 기기 내부 및 컨베이어 틈새, 도마 칼집 난 부분 등 일반적으로 작업자가 청소하기 어려운 부분에서 오염도가 높게 나타남.

○ 초고온 가열 증기 발생 장치로 처리 시, 일반처리보다 청소하기 어려운 부분들을 훨씬 더 효과적으로 미생물을 제어할 수 있음.

○ 단체급식업소의 경우 초고온 가열 증기 발생 장치로 15 cm 거리에서 10 초 동안 처리 시, 일반 미생물의 수가 육가공 업체 또는 가공식품업체와 마찬가지로 현저히 저감된 것을 확인 할 수 있었음.

○ Biofilm detection kit를 사용한 결과 biofilm 형성 부위는 확인하지 못함.

표 35. 구내 식당의 세부 항목별 미생물 오염도 측정

업체	항목	세부 항목	일반 세균 수 (Log CFU/mL)	
			세척 후	SHS 장치 처리 후
단체급식 업소	냉장고	내부표면	1.3 ± 0.1	0
		내부받침대	4.7 ± 0.2	0
		손잡이	0.7 ± 0.1	0
	온장고	내부표면	4.3 ± 0.2	0.7 ± 0.1
		손잡이	2.8 ± 0.3	0
	식기세척기	컨베이어	2.4 ± 0.4	0
		분사구	3.2 ± 0.2	0
		가림막	2.4 ± 0.3	0
	퇴식구	컨베이어	4.1 ± 0.5	1.0 ± 0.1
	밥솥	통 내부	1.3 ± 0.2	0
		오븐내부	1.6 ± 0.1	0
		오븐 손잡이	2.6 ± 0.1	0
	냉장고	내부표면	1.3 ± 0.2	0
		받침대	4.7 ± 0.2	0
		손잡이	1.7 ± 0.3	0
	온장고	내부표면	4.3 ± 0.3	0.7 ± 0.2
		손잡이	2.8 ± 0.5	0
	식기세척기	컨베이어	2.4 ± 0.6	0
		분사구	3.2 ± 0.2	0
		가림막	2.4 ± 0.3	0
	퇴식구	컨베이어	4.1 ± 0.3	1.0 ± 0.2
	밥솥	통 내부	1.3 ± 0.1	0
		오븐내부	1.6 ± 0.2	0
		오븐 손잡이	2.6 ± 0.3	0
	살균보관함	내부 표면	1.0 ± 0.2	0
		외부 손잡이	2.5 ± 0.2	0
	국통	내부 표면	0.9 ± 0.1	0
		뚜껑	2.0 ± 0.2	0
		손잡이	4.7 ± 0.2	1.0 ± 0.3
	주방용품	국자	1.6 ± 0.1	0
		집게	2.6 ± 0.3	0
		밥주걱	3.0 ± 0.2	0
		도마	4.6 ± 0.3	0.8 ± 0.2
	싱크대	잔반통	5.4 ± 0.2	1.8 ± 0.3

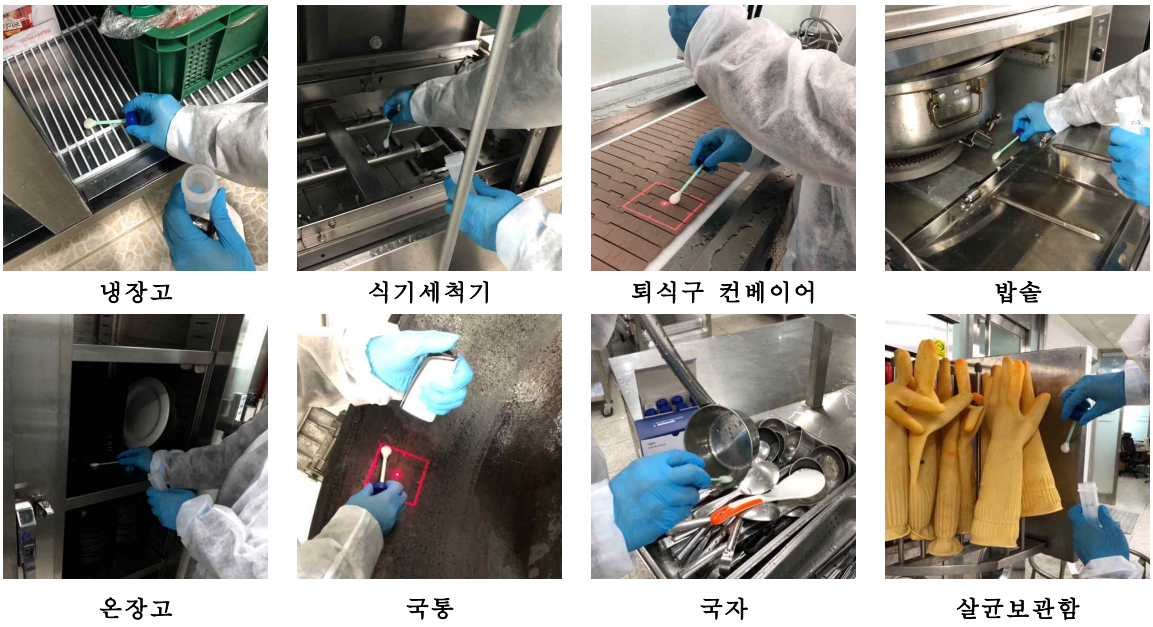


그림 129. 단체급식업소 현장 샘플링 사진

그림 130. 단체급식업소 초고온 가열 증기 발생 장치 처리

마. 16S rDNA sequencing을 통한 현장 내 biofilm 형성 가능성 미생물 종 확인

○ 각 업체별 swab을 통해 채취된 미생물 샘플을 speading 한 결과 우점종을 나타낸 총 108개의 균을 분리 배양하여 16S rDNA sequencing을 진행함.

○ biofilm 형성 가능성이 높은 균의 수는 27 개로 전체 분석 균 중 25 %를 차지함.

○ 가장 많이 나타난 균종의 경우 *Pseudomonas* 종과 *Acinetobacter* 종이 가장 많이 나타났으며, 다음으로는 *Staphylococcus* 종이 많이 나타남. 이외에도 *Bacillus* 종, *Stenotrophomonas* 종, *Serratia* 종, *Enterobacter* 종, *Micrococcus* 종 등 biofilm 형성 가능성이 있는 종들이 관찰됨.

○ *Pseudomonas* 종은 주로 육가공 업체에서 발견이 되었으며 *Acinetobacter* 종은 주로 단체급식업소에서 많이 발견됨. *Staphylococcus* 종의 경우 식품가공 업체에서 많이 발견된 것을 확인할 수 있었음.

표 36. 16S rDNA sequencing 분석 결과 biofilm 형성 가능성이 있는 미생물 종류

업체	Biofilm 형성 가능한 미생물명	발견 위치
육가공 업체	*Pseudomonas lundensis*	골절기 (받침대)
		작업대 (도마)
	Pseudomonas fragi	마이크로 다이서 (푸쉬판)
	Psychrobacter arcticus	작업대 (망치)
	Serratia fonticola	작업대 (저울)
가공식품 제조업체	*Staphylococcus equorum*	진공 텀블러 (뚜껑)
		피클 믹서 (표면)
	Staphylococcus epidermidis	건조대 (고무장갑 걸이)
	Psychrobacter faecalis	피클 믹서 (표면)
		피클 믹서 (표면)
	Pseudomonas fluorescens	작업대 (도마)
	Psychrobacter arcticus	웨건 (표면)
단체급식 업소	*Acinetobacter baylyi*	냉장고 (받침대)
		밥솥 (오븐 내부)
		살균 보관함 (외부 손잡이)
		주방 용품 (국자)
		주방 용품 (밥주걱)
	Acinetobacter pittii	밥솥 (통 내부)
	Stenotrophomonas maltophilia	식기 세척기 (물 분사구)
		밥솥 (오븐 손잡이)
	Micrococcus luteus	식기 세척기 (컨베이어)
		주방용품 (집게)
	Staphylococcus hominis	냉장고 (내부 표면)
	Pseudomonas fragi	냉장고 (받침대)
	Bacillus subtilis	냉장고 (손잡이)
	Ralstonia pickettii	국통 (손잡이)
	Enterobacter aerogenes	주방용품 (집게)

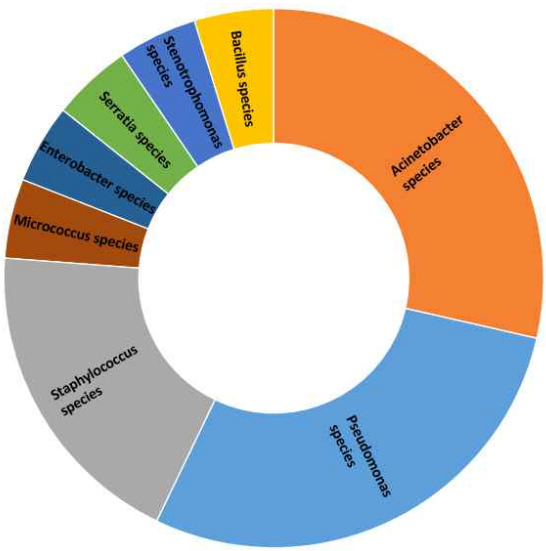


그림 131. Biofilm 형성 가능성이 있는 균 종 분포

표 37. 16S rDNA sequencing 결과 기회감염을 일으킬 수 있는 균주

주의 미생물명	발견 위치	설명
Serratia fonticola	작업대 (저울)	일반적으로 샤워실 및 젖은 타일 주변에서 주로 발견되며, 건강한 사람에게는 해를 끼치지 않으나 상처 및 연조직에 감염을 일으킬 가능성이 있는 기회 감염 균주임.
Acinetobacter baumannii	웨건 (손잡이)	환경의 토양 또는 물 샘플에서 드물게 발견되며, 평상시 병원성은 낮기만 면역력이 저하된 사람에게 감염 시 폐렴, 혈류 감염 등을 일으키는 기회 감염 균주임.

표 38. 16S rDNA sequencing 결과 식품의 품질 저하를 일으키는 균주

주의 미생물명	발견 위치	설명
Pseudomonas lundensis	골절기 (받침대) 작업대 (도마)	유제품, 생선 및 고기 등의 부패를 유발하는 균주
Pseudomonas fragi	마이크로 다이서 (푸쉬판)	유제품의 부패를 일으키는 균주
Brochothrix thermosphacta	웨건 (표면) 피클믹서 (표면)	육가공품의 악취가 발생하는 원인이 되며, 육류의 품질을 저하시키는 원인이 되는 균주

바. 초고온 과열 증기 발생 장비 및 엔돌라이신 병합 처리 1

○ Realco사의 biofilm detection kit를 활용하여 현장에 biofilm 형성 가능성이 높은 곳들을 확인해 보았으나, biofilm 형성 부분을 발견하지 못함.

○ 가동 중인 현장에서 직접적으로 미생물을 배양하여 biofilm을 형성시키는 것은 어려움이 있어 현장 샘플링 결과에서 오염도가 높았던 물질 및 장비를 구매하여 대체 실험을 진행함.

○ 육가공 업체 및 식품 가공업체에서 오염도가 높았던 칼날 부분을 고려하여 sus 재질의 민서기와 연육기의 칼날을 선정하였으며, 가공식품제조업체와 단체급식업소에서 오염도가 높았던 plastic 재질의 컨베이어와 silicon 재질의 도마를 선정하였음.

민서기 연육기 도마 컨베이어

그림 132. 병합처리 선정 물질

○ Biofilm을 형성시키기 위한 stock 제조는 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 27218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213을 각각 tryptic soy broth에 25 ℃, 18 시간 동안 배양시킨 후 pH 7.01 phosphate buffered solution를 활용하여 3 회 washing함.

○ Phosphate buffered solution을 활용하여 10^8 CFU/mL의 농도로 희석한 *Staphylococcus aureus* 3 종을 cocktail한 용액에 각각의 기구를 담가 4 ℃에서 24 시간 동안 균을 부착시킴.

○ 균이 부착된 물품은 tryptic soy broth에 25 ℃에 5 일 동안 배양시켜 biofilm을 형성시킴.

○ Endolysin의 경우 Lys CSA24를 50 mM phosphate buffered solution (pH 8.0), NaCl 300 mM 용액에 희석하여 500 nM 농도가 되도록 하였으며, 30 분 동안 처리함.

○ 단일 처리 및 순차 처리 시 초고온 과열 수증기 장치의 경우 15 cm 거리 (평균온도: 103 ℃)에서 30 초 동안 처리함.

○ 초고온 과열 증기 처리 및 엔돌라이신 처리는 동시 처리가 어렵기 때문에 순차적 처리로 진행하였음.

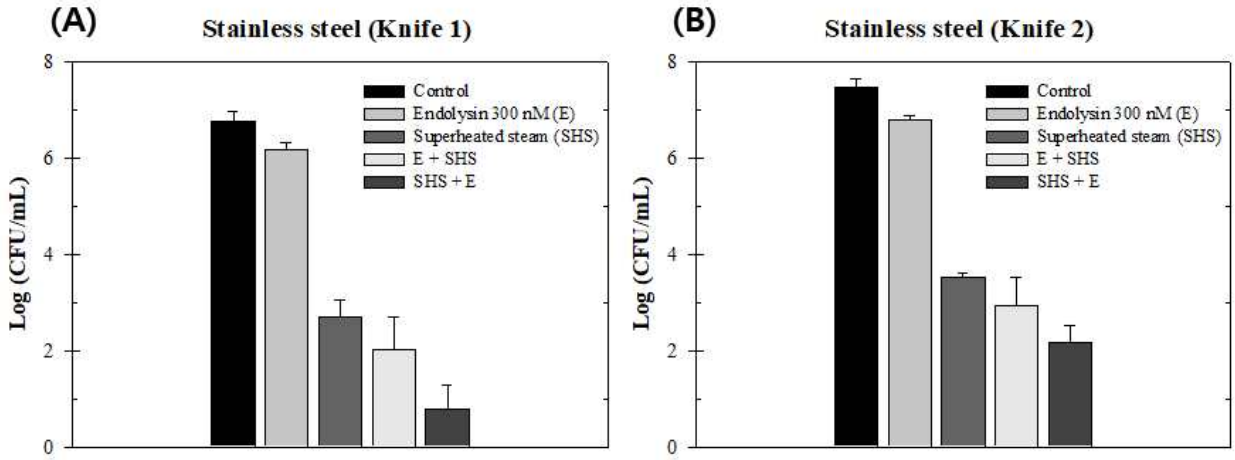


그림 133. 초고온 과열 증기 장치 및 엔돌라이신 병합처리

((A): 민서기 칼날, (B): 연육기 칼날)

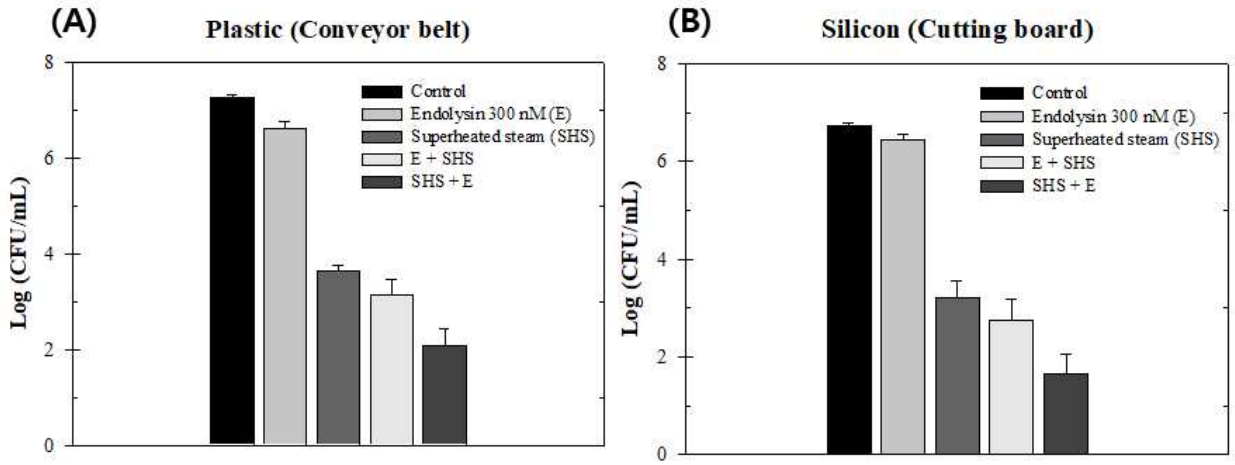
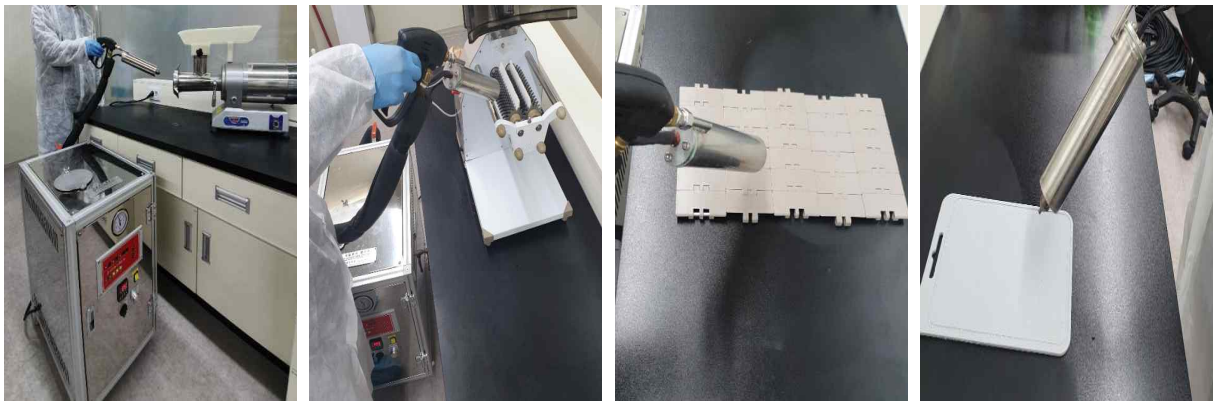


그림 134. 초고온 과열 증기 장치 및 엔돌라이신 병합처리

((A): 컨베이어벨트, (B): 도마)



민서기 연육기 컨베이어 도마

그림 137. 초고온 가열 증기 장치 처리

○ 각각의 기구를 재질별로 처리한 결과 Superated steam 처리 후 Endolysin 처리한 조건이 Endolysin 처리 후 Superated steam을 처리한 조건보다 저감화 효과가 더 뛰어난 것으로 나타남.

○ 각각의 물질을 15 cm 거리(평균온도: 103 ℃)에서 30초 동안 처리 한 후 엔돌라이신 500 nM, 30 분 처리한 조건이 가장 제어가 잘 되는 것으로 나타났으며 병합처리 시 모두 5 log 이상의 제어 효과가 나타남.

○ Superated steam 처리 후 Endolysin 순차 처리한 조건의 경우 단일 처리 시 저감화 효과보다 더 높은 eynergy effect를 나타내었으며 민서기 (Knife 1), 연육기 (Knife 2), 컨베이어벨트, 도마에서 각각 1.4 log, 0.8 log, 0.9 log, 1.3 log의 eynergy effect를 나타냄.

○ SUS, Plastic, Silicon 재질을 각각 처리 한 결과 SUS가 가장 높은 저감화 효과가 나타났으며 그 다음 Plastic, Silicon 순으로 나타남.

표 39. 초고온 과열 증기 및 엔돌라이신 병합처리에 따른 재질별 저감화 효과

Material	Log reduction (Log CFU/mL)			
	Superated steam (SS)	Endolysin (500 nM) (E)	E → SS	SS →E
Stainless steel 1 (Knife 1)	4.0 ± 0.4	0.5 ± 0.2	4.7 ± 0.5	5.9 ± 0.3
Stainless steel 2 (Knife 2)	3.9 ± 0.2	0.6 ± 0.2	4.5 ± 0.7	5.3 ± 0.3
Plastic (Conveyor belt)	3.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	4.1 ± 0.3	5.1 ± 0.3
Silicon (Cutting borard)	3.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1	3.9 ± 0.3	5.0 ± 0.3

Means ± standard deviations from three replications. Within the same treatment, means with the same uppercase letters within a row are not significantly different ($p > 0.05$).

사. 초고온 과열 증기 발생 장비 및 엔돌라이신 병합 처리 2

○ 기구별 바이오필름 형성 및 바이오필름 제어 정도를 확인하기 위해 형광현미경을 활용하여 제어 정도를 확인함.

○ Live/Dead® BacLightTM Bacteral Viability Kit (InvitrogenTM)를 활용하여 염색 하였으며, dye stock의 제조는 3차 증류수 1 mL과 Kit에 들어있는 3.3 mM SYTO® 9 nucleic acid staining 3 uL와 20 mM propidium iodide 3 uL 용해시켜 만듬.

○ 바이오필름이 형성된 각각의 기구에 dye stock을 dropping하여 암실에서 30 분간 염색한 뒤 3차 증류수로 2 회 담금 처리 후 형광현미경을 활용하여 관찰함.

○ SYTO® 9 nucleic acid staining에 의해 염색된 Live cell (녹색) 및 propidium iodide에 의해 염색된 Dead cell (빨간색)을 통해 biofilm 제어 정도를 확인함.

○ 형광현미경을 통해 확인 결과 초고온 과열 증기 장치 및 Endolysin 처리 전 Control의 경우 각각의 기구별로 biofilm이 형성된 것을 확인할 수 있었음.

○ 초고온 과열 증기 장치 처리 후 대부분 dead cell만 남아있는 것으로 나타남.

○ 초고온 과열 증기 장치 처리 후 Endolysin 순차 처리 시, 미생물의 DNA 손상까지 일으켜 dead cell의 수가 현저히 감소하는 것을 확인함.

○ 현광현미경을 통해 확인 결과 초고온 과열 증기 발생 장비 및 엔돌라이신 병합처리는 biofilm을 제어하는데 효과적인 것을 확인함.

표 40. 초고온 과열 증기 발생 장비 및 엔돌라이신 병합처리 시 현광현미경 촬영 1

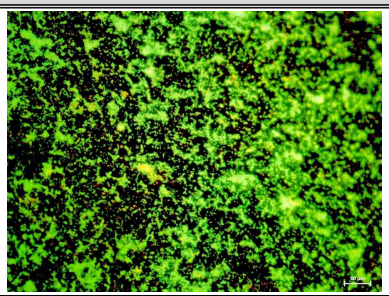
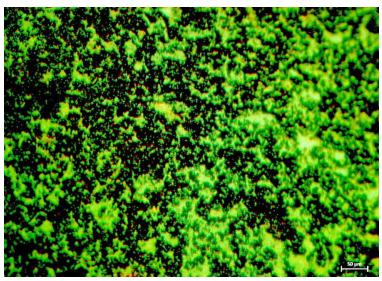
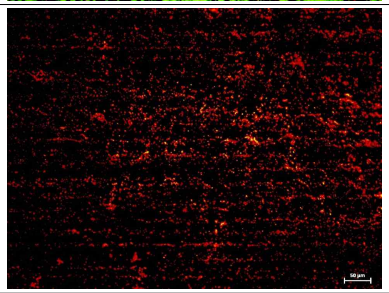
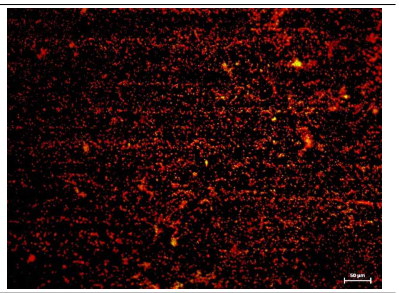
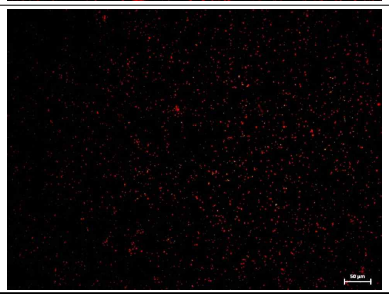
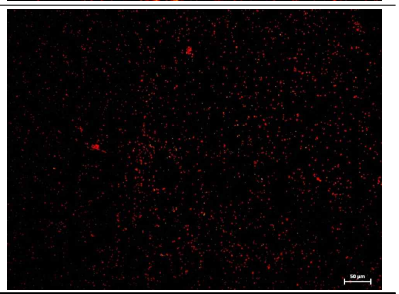
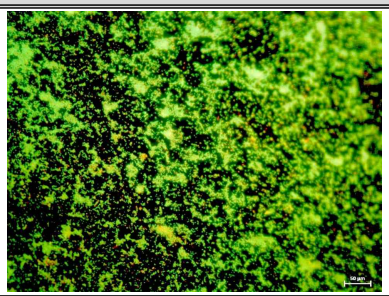
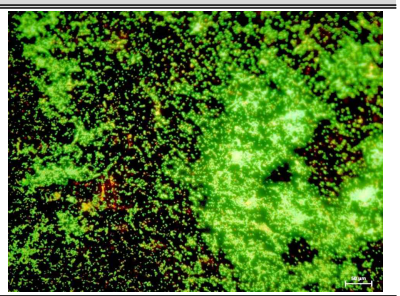
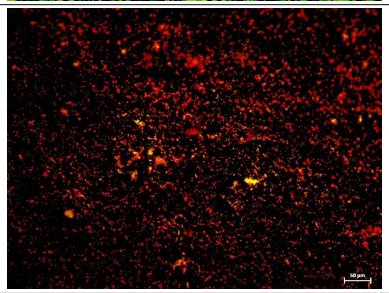
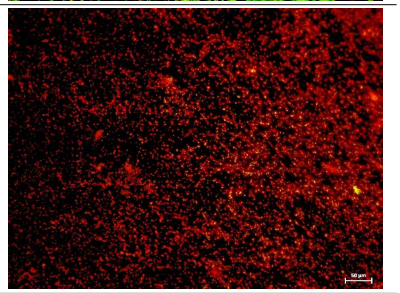
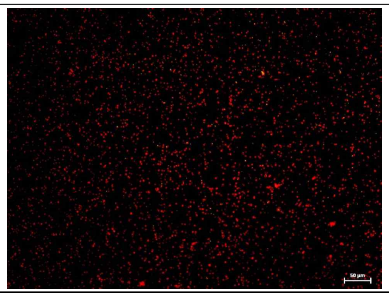
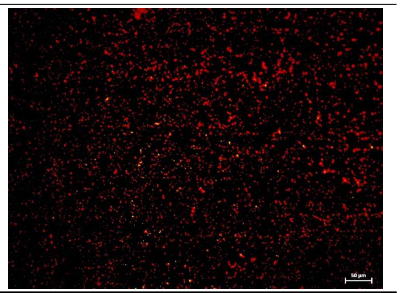
처리 조건	처리 물질	
	민서기 (SUS1)	연육기 (SUS2)
Control		
SHS 처리 (101℃, 5초)		
SHS 처리 (101℃, 5초) ↓ Endolysin 처리 (500 nM, 30분)		

표 41. 초고온 과열 증기 발생 장비 및 엔돌라이신 병합처리 시 현광현미경 촬영 2

처리 조건	처리 물질	
	컨베이어벨트 (Plastic)	도마 (Silicon)
Control		
SHS 처리 (101℃, 5초)		
SHS 처리 (101℃, 5초) ↓ Endolysin 처리 (500 nM, 30분)		

제5절 초고온 과열 증기 장치 연구개발 내용 및 성과

1. 1차 현장형 초고온 과열 증기 발생장치의 개발

○ 1차 히터 및 2차 히터를 모두 장치 내 본체 안에 넣었으며 호스를 통해 분사되는 초고온 과열 증기의 열 손실을 방지하기 위해 발열 호스를 장착함.

○ 2차 히터온도 및 실제 초고온 과열 증기의 토출 부위에 온도센서를 두어 열 손실률 등을 측정하였음.

○ 시제품을 제작하여 시운전 해본 결과, 기존 장비의 열 손실률 (20~25 %)보다 낮은 열 손실률 (12~13 %)을 보였으나 목표하고자하는 열 손실률 (10 %)보다는 높은 것으로 확인하였음.

그림 138. 1차 현장형 초고온 과열 증기 발생 장비 시작품 및 발열 호스

2. 2차 현장형 초고온 과열 증기 발생장치의 개발

○ 기존 1차 현장형 초고온 과열 증기 발생장치의 경우 물을 포화증기로 만드는 1차 히터와 포화증기를 과열증기로 만드는 2차 히터로 구성되어 있는데, 1차 히터의 가열 방식, 2차 히터의 열 손실 및 온도의 변동 폭이 컸으며 이를 제어하기 위한 자동화 시스템이 제대로 구축되어있지 않았음. 따라서 이러한 문제점들을 해결하는 새로운 현장형 초고온 과열 증기 발생 장비 시작품을 제작하고 이는 세니젠에서 최적화된 과열 증기 장치를 제작하기 위한 기초자료로 활용됨.

가. 히터 제작 방식 선정

○ 1차 히터의 경우, 가열 방식에 따라 Water tube boiler 및 Fire tube boiler로 나뉘어 두 가지 방식으로 제작하여 시운전을 진행하였음.

○ Water tube boiler의 경우, 과열 증기가 가열체에 직접 접촉하지 않아 수명이 길다는 장점이 있으나 과열 증기의 온도유지시간이 짧다는 단점이 있음을 확인하였음.

○ Fire tube boiler의 경우, 가열체에 과열 증기가 직접적으로 접촉하여 일정한 온도 유지가 가능하며 더 적은 전력소비로 더 높은 온도의 과열 증기를 생산할 수 있어 2차년도 현장형 초고온 과열 증기 발생 장치의 경우 Fire tube boiler 방식으로 제작하였음.

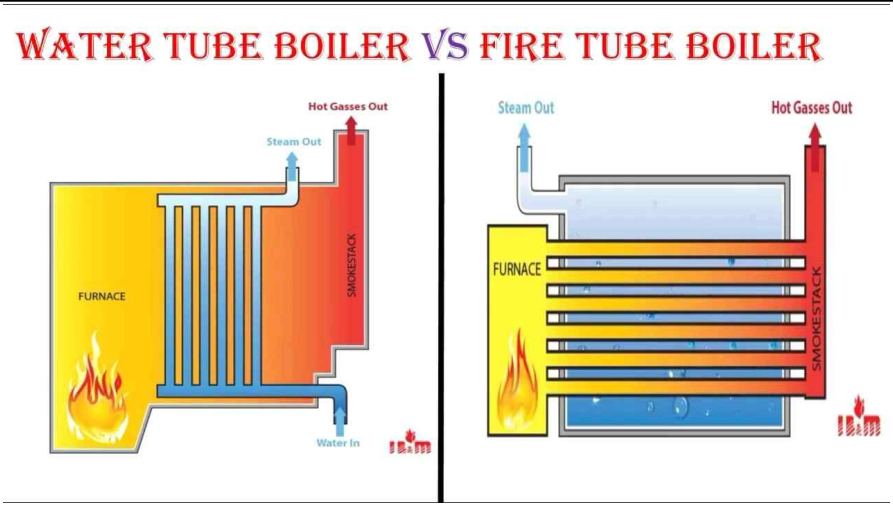


그림 139. 2차 히터 제작방식 모식도

나. 1차 히터의 사양 및 내구 구성

○ 1차 히터의 구조는 개의 히터봉이 수조에 들어가 가열하는 방식 (Fire-tube boiler)으로 증기를 2차 히터로 안정하게 공급할 수 있도록 하였음.

○ 1차 히터는 3.5 kW의 전력 소비량에 6 kg/hr의 증기를 생성하며, 열효율은 98 % 이상을 나타냄.

○ 히터의 재질은 내부식성 재질로 식품산업에서 가장 많이 쓰이는 STS Type 304를 활용하여 부식을 방지함.

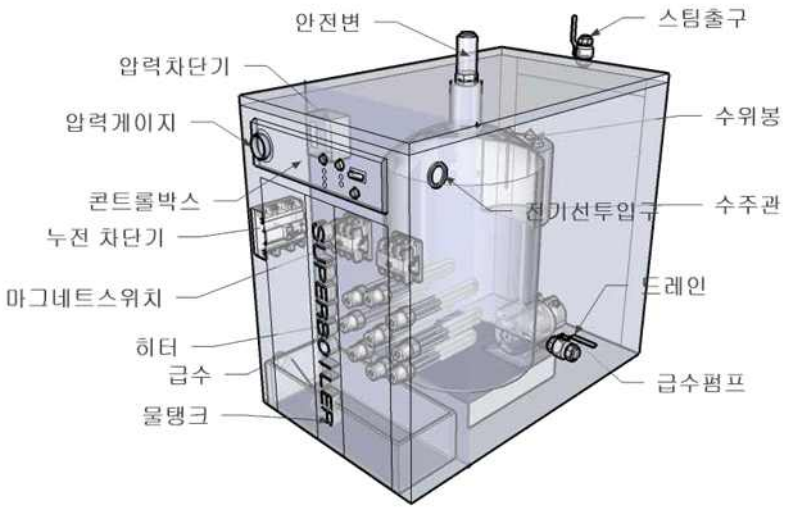


그림 140. 현장형 초고온 과열 증기 발생 장치의 1차 히터 개략도

다. 2차 히터의 사양 및 내구 구성

○ 발열호스의 열 손실 측면 개선하기 위해 2차 히터의 경우 기존 박스 타입에서 건 타입으로 변경하여 설계하였음.

○ 1차 히터로부터 가열된 포화 증기는 1.5 kW의 2차 히터 내부의 원형 코일에 의해 가열되어 초고온 과열 증기가 생성되도록 함.

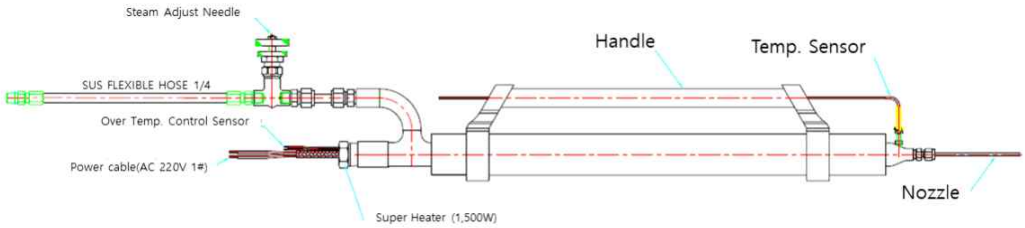


그림 141. 현장형 초고온 과열 증기 발생 장치의 2차 히터 설계도면

○ 시작품의 총 소비전력은 5 kW이며 220 V로 단상으로 제작하여 실제 현장에서 적용하기 편리하게 제작하였으며, 최대 과열 증기 설정 온도는 250 ℃로 함.

○ 최대 과열 증기 설정 온도의 경우 제 2협동 과제 식중독균 바이오필름 온도별 저감화 그래프 데이터를 참조하여 실제 현장 적용 시 온도에 대한 안전성 및 분사 거리에 따른 편리성을 고려하여 설정하였음.

라. 열손실 효율 개선

○ 2차 히터 및 증기가 이동하는 모든 호스라인을 세라크울 소재로 단열하였음.

○ 세라크울의 경우 최대 1,100 ℃까지 사용가능하며, 열전도율이 매우 낮아 열손실을 방지력이 뛰어남. 또한 두께가 얇고 유연하여 시공성이 뛰어나며 가벼움.

○ 2차 히터를 통해 생성된 초고온 과열 증기가 좁은 노즐을 통해 분사될 경우 단열팽창을 하고 이로 인해 분출부에서의 온도가 급감하는 현상이 발생하여 분출부의 노즐을 제거하였음.

○ 2차 히터의 건 방식으로의 변경, 분출부의 노즐제거 및 호스라인 세라크울 소재로 내부 소재를 개선한 후 시운전해 본 결과 열 손실율은 8 %로 나타남.

표 42. 세라크울의 온도별 열전도율

평균온도 (℉)	평균온도 (℃)	열전도율 (W/mK)
200	93.3	0.038
400	204.4	0.058
800	426.7	0.110
1200	648.9	0.183
1600	871.1	0.284

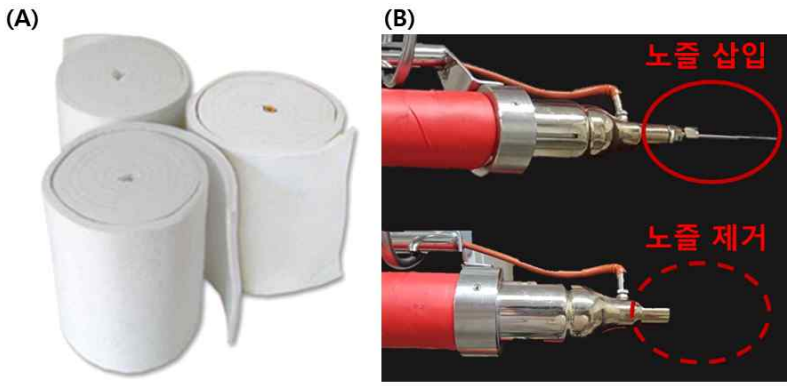


그림 142. 단열재 세라크울 사진 (A), 2차 히터에서 노즐을 제거한 후 분사 장면 (B)

라. 자동 온도 제어 장치 (PID 컨트롤)

○ 기존의 스팀장치는 P제어 on/off방식의 온도 제어로 생성되는 초고온 과열 증기의 초기 온도 변동 폭이 200 °C를 설정하였을 때, 60 °C로 매우 컸으며 안정화되는데 시간이 20 분 이상 걸려 현장에 적용하기 어려운 점이 있었음.

○ 스팀장치 내 PID control (Proportional-Integral-Derivative control)를 장착하여 장치 내 온도를 제어 할 수 있도록 함.

○ PID control를 설치함에 따라 경우 초고온 과열 증기가 고온에 도달한 후에 온도 변동 폭이 10 ℃ 이하로 크게 감소되었으며, 안정적으로 20 분 이상 분사되는 것을 확인할 수 있었음.

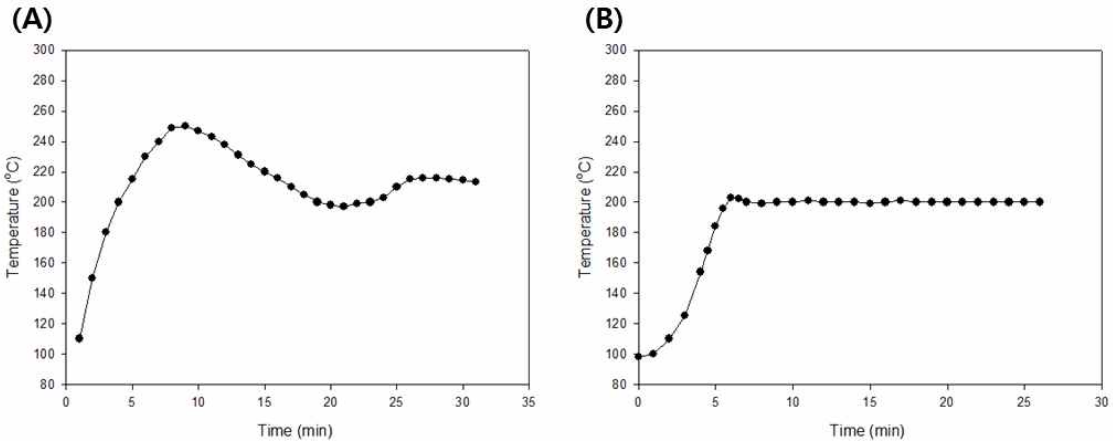


그림. 그림 143. PID 컨트롤 설치 전 온도변화 (A), 설치 후 온도변화 (B)

그림 144. 2차 현장형 초고온 과열 증기 발생 장치 사진

마. 제품의 소형화 및 특허출원

○ 2차 현장형 초고온 과열 증기 발생 장치의 경우 장치 계기판 및 물통의 경우 장비 본체와 따로 분리되어 있어 장비의 크기가 크고 이동하기 불편한 점이 있음.

○ 제품 소형화를 위해 물통의 경우 장치 내부에 배치하였으며, 계기판을 간소화를 통해 장비의 크기를 소형화시킴.

○ 시운전 결과, 250 ℃의 초고온 과열 증기를 3분여간 지속적으로 발생하면서 유지할 수 있음을 확인하였으며 본 장치에 대한 특허를 1건 출원하였음 (출원번호 10-2018-0105994).

그림 145. 2차 현장형 초고온 과열 증기 발생 장치 소형화

3. 3차 현장형 초고온 과열 증기 발생장치의 개발

가. 1차 및 2차 히터 소비전력 절감 및 장치 온도의 최적화

○ 2차년도 현장형 초고온 과열 증기 발생 장치의 경우 1차 히터 (3.5 kW) 및 2차 히터 (1.5 kW)의 히터의 총 소비전력은 5 kW로 일반 220 V 콘센트에 연결이 불가능 하여 배전반을 통해 직접 연결해야 함.

○ 장치 사용의 편의성을 증진시키기 위해 1차 히터의 경우 (2.0 kW) 및 2차 히터의 경우 (0.7 kW)로 장치를 제작하여 히터의 총 소비전력을 2.7 kW로 절감함.

○ 장치 내 세부 작동 사항에 따른 최대 전력 사용량 측정 시, 최대 유효 전력이 발생되는 조건은 초고온 과열 수증기를 분사할 때 2.81 kW를 나타냄.

○ 해당 장비의 소요전력의 90 % 이상은 1차 히터 및 2차 히터를 통해 발생되며, 나머지 10 % 이하의 전력은 장치의 전원, 물 공급 펌프, 장치 내 센서 등에 의해 소요되는 것으로 나타남.

○ 2차 현장형 히터의 경우 최대 분사온도는 250 ℃를 나타내었지만, 사용자의 안전 및 200 ℃ 이하의 초고온 과열 증기로도 20 초 이내에 5 log 이상 biofilm을 충분히 제어 가능하다는 연구 결과를 바탕으로 최대온도를 200 ℃로 세팅함.

표 43. 초고온 과열 증기장치 작동 사항에 따른 전력 소비량

조건	1차히터 작동여부	2차히터 작동여부	온도측정 시간 (min)	최대 사용 전력량 (kW)	세부 작동 내용	장치 상태
1	O	X	17	2.2	장치전원 /1차 히터	0.0~0.2 MPa 압력의 1차 히터 가열 시
2	O	△	13	2.7	장치전원 /1차히터 /2차히터	0.2~0.5 MPa 압력의 1차 히터 및 2차 히터 가열 시
3	△	△	10	2.7	장치전원 /1차히터 /2차히터	0.5 Mpa 압력의 스팀 가열이 끝난 상태
4	O	△	10	2.81	장치전원 /1차히터 /2차히터 /물 공급 펌프	0.05~0.5MPa 압력의 스팀 분사 상태
5	O	△	10	2.7	장치전원 /1차히터 /2차히터	0.05~0.5MPa 압력의 스팀 분사 후 스팀 재가열 상태
6	X	X	5	0.3	장치 전원	장치 전원만 켜놓은 상태

O: 작동 상태, △: 장치 내부 온도센서에 의해 자동으로 ON/OFF가 조절되는 상태, X: 작동 하지 않는 상태

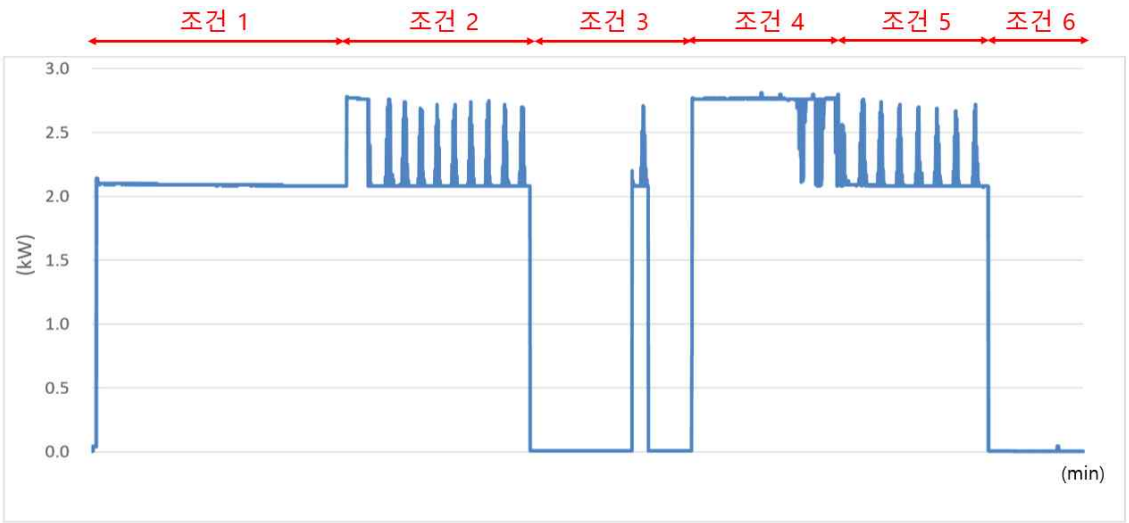


그림 146. 장치 내부 세부 작동별 유효전력 변동 곡선

나. 3차 현장형 초고온 과열 증기 발생장비의 최종 성능

○ 초고온 과열 증기 온도 범위의 경우 사용자의 안전성 및 바이오필름 제어하는데 있어 적합한 온도 (100 ~ 200 ℃)를 고려하여 설정함.

○ 장치의 증기 압력의 경우 최대 0.45 Mpa에서 최소 0.1 Mpa을 나타냄.

○ 장치의 증기 생성량은 2.7 kg/hr로 100 ℃ 이상 초고압 과열 증기로 5분 이상 처리가 가능함.

○ 장비의 사용 전력은 2.81 kW로 일반 220 V에 연결하여 사용할 수 있음.

○ 150 ℃ 초고온 과열 증기를 분사하여 20 초 이내에 biofilm을 5 log 이상 저감화가 가능함.

○ 2차 히터의 건 방식으로의 변경, 분출부의 노즐제거 및 호스라인 세라크울 소재로 내부 소재 개선을 통해 열 손실률은 8 %로 나타남.

3차 현장형 초고온 과열 증기 발생 장비 전경

초고온 과열 증기 발생 장비 내부 전경

초고온 과열 증기 발생 장비의 2차 히터 및 분사부

다. 제작된 초고온 과열 증기 장치의 차별성 및 우수성

○ 초고온 과열 증기를 만들기 위해서는 물을 포화 증기로 만드는 1차 히터와 포화 증기를 가열 하여 과열 증기로 만드는 2차 히터가 필요하며, 이에 요구되는 전기용량이 매우 커 기존의 과열 증기 장치는 상용전압에서 사용하기 힘들다는 단점이 있어 산업체에서 이동하면서 사용하기에 어려움이 있었으나 이를 소형화하여 히터에 사용되는 전기용량을 크게 줄여 220V 단상에서도 사용할 수 있도록 제작하였음.

○ 건 타입의 2차 히터 방식은 분사 직전에 가열이 되기 때문에 기존의 증기 발생 장치보다 열손실이 적고 보다 높은 (초고온)상태의 과열 증기를 만들 수 있음. 또한 손으로 들거나 거치대에 두고 타겟에 분사하기 용이하여 실용적인 측면이 두드러짐.

○ 기존의 바이오필름 제어 방법인 초음파, 전기장, 초고압 등은 실용화하기 어렵다라는 공통적인 단점이 있으며 넓은 구역에 처리하기 어렵고 재 오염의 위험성이 있는 등의 문제가 있었음. 하지만, 초고온 과열 증기는 본 과제를 통해 개발한 장치를 이용하면 실용화는 물론 넓은 구역에 분사할 수 있고 높은 열에너지로 균을 사멸하기 때문에 재 요염의 위험성 역시 적음.

표 44. 기존 바이오필름 제어 방법과 한계

방법	한계	Reference
초음파	- 좁은 구역에만 처리 가능 - 실용화하기 어려움	Mott et al., 1998
전기장	- 좁은 구역에만 처리 가능 - 실용화하기 어려움	Blenkinsopp et al., 1992
초고압	- 처리 후 주변을 균이 퍼져 재오염 가능성 有 - 실용화하기 어려움	Gibson et al., 1999

라. 3차 현장형 초고온 과열 증기 발생장비의 추가 개선 예정사항

○ 2차 히터 건 부분에 보호캡을 설치하여 작업자의 사용 안전성을 높임.

○ 정확한 표적 표면 처리와 초고온 과열 증기 발생 장비의 분사 시 안전성을 높이기 위해 2차 히터 건 부분 측면에 손잡이를 추가로 설치하여 작업자가 더 편리하게 처리할 수 있도록 함.

○ 제품 사용 시 1차 히터 본체 상단에 2차 히터 건을 거치할 수 있는 거치대를 만들어 사용자의 편의성 및 장치 이동 시 안전성을 높임.

○ 2차 히터 겉 부분에 단열재를 추가로 감싸 사용자의 안전성 및 건 부분의 열손실 효율을 개선.

○ 사업화를 위한 해외 수출을 고려함에 따라 장치 내 변압기를 설치하여 110 V에서도 활용이 사용이 가능한 제품을 개발 예정에 있음.

제6절 연구개발 성과

1. 특허 출원

특허 출원				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2018년	병원성 미생물 살균을 위한 과열수증기 발생장치	㈜세니젠	대한민국	1020180105994
2019년	황색포도상구균 유래 바이오필름 제거에 효과적인 박테리오파지 CSA13 및 그 유래의 엔도라이신 LysCSA13	서울대학교산학협력단	대한민국	1020190038569

2. 특허 등록

특허 등록				
출원연도	특허명	출원인	출원국	특허번호
2019년	병원성 미생물 살균을 위한 과열수증기 발생장치	㈜세니젠	대한민국	1019582170000

3. 논문성과

논문 (국내외 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	저자			학술지 게재일	SCI 구분
			주 저자	교신 저자	공동 저자		
1	Comparison of the effect of saturated and superheated steam on the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* on cantaloupe and watermelon surfaces	Food microbiology	권수아	강동현	송원재	2017-10-27	SCI
2	QStatin, a Selective Inhibitor of Quorum Sensing in Vibrio Species	mBio	김병식	최상호 김명희	장송희 방예지 황정원 구영원 장경구 임동렬	2018-01-30	SCI
3	Application of continuous-type pulsed ohmic heating system for inactivation of foodborne pathogens in buffered peptone water and tomato juice	LWT- Food science and technology	김상순	강동현	박상현	2018-03-14	SCI
4	Effect of temperature on chlorine dioxide inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on spinach, tomatoes, stainless steel, and glass surfaces	International journal of food microbiology	박상현	강동현		2018-03-22	SCI

논문 (국내외 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	저자			학술지 게재일	SCI 구분
			주 저자	교신 저자	공동 저자		
5	Effect of relative humidity on inactivation of foodborne pathogens using chlorine dioxide gas and its residues on tomatoes	Letters in applied microbiology	박상현	강동현	김원주	2018-03-27	SCI
6	Inactivation dynamics of 222 nm krypton-chlorine excilamp irradiation on Gram-positive and Gram-negative foodborne pathogenic bacteria	Food research international	강준원	강동현	김상순	2018-04-13	SCI
7	Inactivation of foodborne pathogens influenced by dielectric properties, relevant to sugar contents, in chili sauce by 915 MHz microwaves	LWT- Food science and technology	김원주	강동현	박상현	2018-04-30	SCI
8	Inactivation of foodborne pathogens on fresh produce by combined treatment with UV-C radiation and chlorine dioxide gas, and mechanisms of synergistic inactivation	Food control	박상현	강동현	강준원	2018-05-02	SCI
9	The Auxiliary Role of the Amidase Domain in Cell Wall Binding and Exolytic Activity of Staphylococcal Phage Endolysins	Viruses	손보경	유상열	공민석	2018-05-25	SCI
10	Elevated Inactivation Efficacy of a Pulsed UVC Light-Emitting Diode System for Foodborne Pathogens on Selective Media and Food Surfaces	Applied and environmental microbiology	김도균	강동현	-	2018-08-02	SCI
11	Characterization and Genome Analysis of *Staphylococcus aureus* Podovirus CSA13 and Its Anti-Biofilm Capacity	Viruses	차여연 전지환	유상열	손보경	2019-01-12	SCI
12	Salt content dependent dielectric properties of pistachios relevant to radio-frequency pasteurization	Scientific reports	정슬기	강동현	유상열	2019-02-20	SCI
13	Synergistic effect of ohmic heating and UV-C irradiation for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in buffered peptone water and tomato juice	Food control	김상순	강동현	박상헌 김수환	2019-03-11	SCI
14	Combination effect of saturated or superheated steam and lactic acid on the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* on cantaloupe surfaces	Food microbiology	권선아	강동현	송원재	2019-03-11	SCI
15	Resistance of *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150 to ohmic heating as influenced by growth temperature and sodium chloride concentration in salsa	Food control	김상순 이재익	강동현	-	2019-04-01	SCI
16	Decontamination Effect of the Spindle and 222-Nanometer Krypton-Chlorine Excimer Lamp Combination against Pathogens on Apples (Malus domestica Borkh.) and Bell Peppers (Capsicum annuum L.)	Applied and environmental microbiology	강준원	강동현	-	2019-05-30	SCI

논문 (국내외 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	저자			학술지 게재일	SCI 구분
			주 저자	교신 저자	공동 저자		
17	Effective removal of staphylococcal biofilms on various food contact surfaces by *Staphylococcus aureus* phage endolysin LysCSA13	Food microbiology	차여연 손보경	유상열	-	2019-06-18	SCI
18	Inactivation of *Staphylococcus aureus* Biofilms on Food Contact Surfaces by Superheated Steam Treatment	Journal of food protection	김수환	강동현	박상현	2019-08-14	SCI
19	Effect of surface characteristics on the bactericidal efficacy of UVC LEDs	Food control	김도균	강동현	-	2019-09-05	SCI

4. 국내 및 국제 학술회의 발표

국내 및 국제 학술회의 발표				
번호	발표자	발표제목	발표일시	장소, 국명 출원등록일
1	황승호, 김덕윤, 최상호	Regulatory Characteristics of the cabA Gene Encoding a Calcium-Binding Protein Essential for Biofilm Development in Vibrio vulnificus	2017-06-28	부산 벡스코
2	하은수, 전지환, 유상열	identification of Receptor of Bacteriophage CPS1 infecting Clostridium Perfrigens	2017-06-28	부산 벡스코
3	황승호, 최상호	Regulatory characterisitcs of the cabA Gene Encoding a Calcium-binding protein essential for biofilm development in vibrio vulnificus	2018-06-09	Atlanta, 미국
4	황승호, 박진환, 나은정, 최상호	Regulatory characteristics of the cabA gene encoding a calcium-binding protein essential for biofilm development in vibrio vulnificus	2018-06-27	여수 엑스포 컨벤션 센터, 대한민국
5	이혜연, 강동현	Combined effects of hot water and citric acid for inactivation of foodborne	2018-06-28	부산 벡스코
6	박성은, 강동현	Application of UVC-LED on humidifier water tank disinfection	2018-06-28	부산 벡스코
7	김두현, 강동현	Aerosolized microorganism inactivation by UVC-LEDs in a chamber type air disinfection system	2018-06-28	부산 벡스코
8	김수환, 강동현	Effect of saturated steam and superheated steam on *Staphylococcus aureus* biofilm in plastic and steel type coupons	2018-06-28	부산 벡스코
9	손보경, 유상열	A novel chimeric endolysin with enhanced lytic activity against *Staphylococcus aureus* and other staphylococcal species	2018-06-27	부산 벡스코

국내 및 국제 학술회의 발표				
번호	발표자	발표제목	발표일시	장소, 국명 출원등록일
10	손보경, 유상열	Development of novel chimeric endolysin with enhanced lytic activity against *Staphylococcus aureus*	2018-07-13	Wroclw, poland
11	황승호, 박진환, 최상호	Regulatory Characteristics of the cabA Gene Encoding an Essential Component of the Vibrio vulnificus Biofilm Development	2019-04-19	제주국제컨벤션센터
12	김무성, 김민식, 유상열	Receptor Identification of Bacteriophage CSP1 Simultaneously infecting both *Escherichia coli* and *Cronobacter sakazakii*	2019-06-24	제주국제컨벤션센터
13	김진실, 허정인, 유상열, 전병화	Transcriptomics and Proteomics Analysis of Aerosensitive and Hyper-Aerotolerant Strains of *Campylobacter jejuni* under Aerobic Stress Conditions	2019-06-24	제주국제컨벤션센터
14	이유나, 손보경, 유상열	Characterization of *Staphylococcus aureus*-Specific Bacteriophage PALS2 and its Endolysins	2019-06-24	제주국제컨벤션센터
15	김진우, 유상열, 김민식	Suppression of *Salmonella Typhimurium* Virulence by Engineered Bacteriophage Lysogenization	2019-06-24	제주국제컨벤션센터
16	하은수, 신다은, 최예원, 유상열	Deciphering Spore Binding Domain of Endolysin LysCPD7 from *Clostridium perfringens* Virulent Bacteriophage CPD7	2019-06-24	제주국제컨벤션센터
17	김형순, 김민식, 조도형, 유상열	Effect of *Pectobacterium carotovorum*-Specific Bacteriophage Cocktail to Control Soft Rot Disease in Three crop Models	2019-06-24	제주국제컨벤션센터
18	박해준, 유상열	New Strategy of Food Preservation Combining Heat Treatment and Thermostable Phages	2019-06-24	제주국제컨벤션센터
19	전지환, 유상열	Yeast Surface Display as a Promising Platform for Endolysin Expression and Application	2019-06-24	제주국제컨벤션센터
20	유상열	Endolysin Engineering to improves Its Functionality and Specificity	2019-06-24	제주국제컨벤션센터
21	김수환, 김상순, 박상현	Inactivation of *Bacillus cereus* endospore on stainless steel using superheated steam and UV-C combination treatment	2019-06-27	송도 컨벤시아
22	김진실, 유상열, 전병화	Transcriptomics and proteomics changes in aerosensitive and hyper-aerotolerant *Campylobacter jejuni* isolates after exposure to aerobic stress	2019-06-27	송도 컨벤시아
23	김무성, 김민식, 유상열	Receptor identification of bacteriophage CSP1 concurrently infecting both *Escherichia coli* and *Cronobacter sakazakii*	2019-06-27	송도컨벤시아
24	박해준, 김진우, 박예린, 유상열	Efficient screening of thermostable bacteriophage for new hurdle strategy in food protection	2019-06-27	송도 컨벤시아
25	김무성, 김민식, 유상열	Receptor analysis of Bacteriophage CSP1 infecting Simultaneously both *Escherichia coli* and *Cronobacter sakazakii*	2019-08-05	The Evergreen State College, Olympia, WA

국내 및 국제 학술회의 발표				
번호	발표자	발표제목	발표일시	장소, 국명 출원등록일
26	김형순, 김민식, 유상열	Development of Phage Cocktail and Virulence Assessment of *Pectobacterium carotovorum* mutant strains resistant to bacteriophages	2019-08-05	The Evergreen State College, Olympia, WA
27	김진우, 유상열	A novel phage protein can induce bacterial cell death by disturbing cell division	2019-08-05	The Evergreen State College, Olympia, WA
28	전지환, 유상열	Application of Endolysin Facilitated by Yeast Surface Display Expression System	2019-08-06	The Evergreen State College, Olympia, WA
29	유상열, 손보경, 공민식, 배재우, 나홍준	Application of Bacteriophage and its Lytic Enzyme to Control Foodbrone pathogenic Bacteria	2019-08-05	The Evergreen State College, Olympia, WA

5. 기술실시

기술실시					
번호	기술명	실시구분	실시유형	기술실시일	기술료
1	포화 증기 및 초고온 과열증기와 엔돌라이신 병행처리로 스틸 표면에 형성된 바이오 필름내 황색포도상구균 제어 방법	타기관실시	노하우	2019-10-25	10,000,000 원
2	병원성 미생물 살균을 위한 과열수증기 발생장치	직접실시	특허등록	2020-03-08	3,465,000 원

6. 사업화

사업화				
번호	사업화명	제품명	업체명	사업화 형태
1	병원성 미생물 살균을 위한 과열수증기 발생장치	SANI-Sterilizer	(주)세니젠	기술보유자의 직접사업화_ 기존업체-상품화

7. 논문, 특허 성과의 연관성

논문 (국내외 전문학술지) 게재			
번호	논문명	보고서 연관 내용	기여도
1	Comparison of the effect of saturated and superheated steam on the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* on cantaloupe and watermelon surfaces	초고온 과열증기를 이용해 표면 특성에 따른 식중독균제어 효과를 확인하고 분석한 내용	50%
2	QStatin, a Selective Inhibitor of Quorum Sensing in Vibrio Species	식중독균의 독성 발현에 중요한 정족수 인식 전사 조절자를 제어하여 독성 저해 효과를 확인한 연구 성과로, 식중독균의 분자생물학적 분석을 통해 제어타겟 전사 조절자를 발굴하고 이를 이용해 식중독균의 바이오필름 생성을 제어한 내용	25%
3	Application of continuous-type pulsed ohmic heating system for inactivation of foodborne pathogens in buffered peptone water and tomato juice	열처리로 식중독균을 제어한 연구 내용	50%
4	Effect of temperature on chlorine dioxide inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on spinach, tomatoes, stainless steel, and glass surfaces	표면에 형성된 병원성 미생물을 제어한 내용	50%
5	Effect of relative humidity on inactivation of foodborne pathogens using chlorine dioxide gas and its residues on tomatoes	식품 표면에 형성된 균을 제어한 연구 내용	50%
6	Inactivation dynamics of 222 nm krypton-chlorine excilamp irradiation on Gram-positive and Gram-negative foodborne pathogenic bacteria	엑실램프로 식중독균을 제어한 연구로 직접적인 연관성은 없으나 균의 특성에 따른 제어 방법에 대한 기초 연구를 하여 과제 수행에 도움을 줌	50%
7	Inactivation of foodborne pathogens influenced by dielectric properties, relevant to sugar contents, in chili sauce by 915 MHz microwaves	열처리로 식중독균을 제어한 연구 내용	50%
8	Inactivation of foodborne pathogens on fresh produce by combined treatment with UV-C radiation and chlorine dioxide gas, and mechanisms of synergistic inactivation	융합 살균에 대한 연구 내용	50%
9	The Auxiliary Role of the Amidase Domain in Cell Wall Binding and Exolytic Activity of Staphylococcal Phage Endolysins	황색포도상구균을 저감화 할 수 엔돌라이신의 특성 분석에 관한 연구 내용	50%
10	Elevated Inactivation Efficacy of a Pulsed UVC Light-Emitting Diode System for Foodborne Pathogens on Selective Media and Food Surfaces	표면 살균에 대한 연구 내용	50%
11	Characterization and Genome Analysis of *Staphylococcus aureus* Podovirus CSA13 and Its Anti-Biofilm Capacity	황색포도상구균을 감염할 수 있는 박테리오파지 및 이의 유전체 분석에 관한 연구 내용	50%

논문 (국내외 전문학술지) 게재			
번호	논문명	보고서 연관 내용	기여도
12	Salt content dependent dielectric properties of pistachios relevant to radio-frequency pasteurization	열처리로 식중독균을 제어한 연구 내용	50%
13	Synergistic effect of ohmic heating and UV-C irradiation for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in buffered peptone water and tomato juice	열처리와 융합 살균으로 식중독균을 제어한 연구 내용	50%
14	Combination effect of saturated or superheated steam and lactic acid on the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* on cantaloupe surfaces	초고온 과열증기와 융합 살균으로 표면에 있는 식중독균을 제어한 연구 내용	50%
15	Resistance of *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150 to ohmic heating as influenced by growth temperature and sodium chloride concentration in salsa	열처리로 식중독균을 제어할 때 미치는 영향에 대한 연구 내용	50%
16	Decontamination Effect of the Spindle and 222-Nanometer Krypton-Chlorine Excimer Lamp Combination against Pathogens on Apples (Malus domestica Borkh.) and Bell Peppers (Capsicum annuum L.)	엑실램프를 이용해 식중독균을 제어한 연구내용으로 직접적인 연관성은 없으나 표면 특성에 대한 기초 연구를 하여 과제 수행에 도움을 줌	50%
17	Effective removal of staphylococcal biofilms on various food contact surfaces by *Staphylococcus aureus* phage endolysin LysCSA13	황색포도상구균이 형성한 biofilm을 제거 할 수 있는 엔도라이신의 특성 분석 및 이의 활성에 관한 연구 내용	33.3%
18	Inactivation of *Staphylococcus aureus* Biofilms on Food Contact Surfaces by Superheated Steam Treatment	초고온 과열증기로 표면에 형성된 황색포도상구균을 제어한 연구 내용	100%
19	Effect of surface characteristics on the bactericidal efficacy of UVC LEDs	표면 특성에 따라 균을 제어한 연구 내용	50%

특허 출원			
번호	특허명	보고서 연관 내용	기여도
1	황색포도상구균 유래 바이오필름 제거에 효과적인 박테리오파지 CSA13 및 그 유래의 엔돌라이신 LysCSA13	박테리오파지 및 엔돌라이신을 활용하여 바이오필름을 저감화한 연구에 관련된 내용	100%
2.	병원성 미생물 살균을 위한 과열수증기 발생장치	초고온 과열 증기 장치의 2차 히터를 건 타입으로 개발하여 전력소비량을 낮춤으로써 장비의 편의성 개선함	100%

제3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제1절 목표 및 달성여부

1. 1차년도 연구개발 목표 달성도

1차년도			
일련번호	연구개발 수행 목표	달성도(%)	연구 개발 수행 내용
1	식품제조 및 가공업체 작업환경 내 식중독 균 오염도 조사	100	식품제조 및 가공업체에 방문하여 각 공정별 미생물 오염도 모니터링을 완료
2	Biofilm과 planktonic 패혈증비브리오균의 RNA-seq 비교 분석	100	Biofilm과 planktonic 상태에서의 유전자발현 profile 간 유의미한 통계적 차이를 확인
3	Biofilm에서 특이적으로 발현하는 유전자들의 profile 분석		COGs database 분석을 통해 biofilm에 특이적으로 발현하는 유전자들의 기능이 다양한 functional category에 속해 있음을 확인
4	Bioinfomatics 기반 biofilm 생성인자들의 genome-wide level에서 포괄적 동정		Gene annotation 정보를 바탕으로 바이오필름 생성에 관련될 수 있는 유전자 5종을 선정하였고 이 유전자들로부터 생성되는 protein들의 기능을 확인
5	샘플링 및 박테리오파지 분리	100	가금류 및 하수 등에서 황색포도상구균을 효과적으로 제어하는 새로운 박테리오파지 11 종을 분리
6	박테리오파지 특성 분석		Host range test, TEM analysis, 시간에 따른 OD 값 변화를 통해 박테리오파지 특성 분석 완료
7	박테리오파지 선정 및 유전체 sequencing		Myoviridae family와 Podoviridae family의 형태를 가진 5 종의 박테리오파지를 선정하여 sequencing 함
8	초고온 과열 증기 기술의 식중독 균 바이오필름 제어 효과 검증		Stainless steel 재질에서 초고온 과열 증기의 온도에 따른 황색포도상구균의 저감화 효과를 확인
9	표면 종류에 따른 초고온 과열 증기의 식중독 균 바이오필름 제어 효과 검증		HDPE 및 PP 재질을 대상으로 황색포도상구균의 바이오필름 저감화 효과를 검증

2. 2차년도 연구개발 목표 달성도

2차년도			
일련번호	연구개발 수행내용	달성도(%)	연구 개발 수행 내용
1	박테리오파지 엔돌라이신 대량 생산 기반 마련	100	엔돌라이신 대량정제 기반을 protocol을 구축
2	현장형 초고온 과열 증기 발생 장비 제작		현장형 초고온 과열 증기 발생 장비의 사용성 및 편의성을 개선하여 제작
3	Biofilm 생성인자들이 결여된 isogenic knock-out mutant 개발	100	Biofilm 생성인자 후보에 대한 isogenic knock-out mutant를 구축 및 검증
4	Wild type과 isogenic mutant들의 biofilm 생성능력 비교		Biofilm 생성인자 결여가 biofilm, colony rugosity, pellicle 생성 등에 관한 영향 확인
5	Biofilm 생성인자들의 cloning, 순수분리 및 생화학적 특성 규명		Cloning 및 complementation을 통해 biofilm 생성인자의 기능 특성 규명
6	박테리오파지 유전체 분석	100	박테리오파지 5종의 유전체 분석 완료및 엔돌라이신 유전자 확인
7	엔돌라이신 분리 정제 및 특성 분석		엔돌라이신의 균 사멸 효과 및 용균 활성 범위를 확인
8	박테리오파지 및 엔돌라이신과 초고온 과열 증기 병행 처리 연구		초고온 과열 증기 및 엔돌라이신 병행처리 연구를 통해 synergistic effect를 확인
9	초고온 과열 증기 및 박테리오파지 엔돌라이신 병행처리 연구		초고온 과열 증기 및 엔돌라이신 병행처리에 있어 처리 순서가 biofilm 저감화에 미치는 영향 확인
10	현장형 초고온 과열 증기 장비 설계		히터 가열 방식 선정 및 열 손실 효율 개선, PID 컨트롤 설치를 통한 제품 설계

3. 3차년도 연구개발 목표 달성도

3차년도			
일련번호	연구개발 수행내용	달성도(%)	연구 개발 수행 내용
1	박테리오파지 엔돌라이신 및 초고온 과열 증기 기술의 현장적용평가	100	육가공업체, 가공식품 제조업체, 단체급식업소를 대상으로 현장적용평가를 진행
2	패혈증비브리오균 생장조건에 따른 biofilm 생성인자들의 발현특성 규명		Biofilm 생성인자들의 발현을 공통적으로 조절하는 조절인자를 확인하고 발현특성을 규명
3	Biofilm 생성인자들의 promoter mapping 및 cis-regulatory elements들의 동정	100	Biofilm 생성인자의 발현을 조절하는 promoter와 그 조절부위의 위치를 확인
4	Biofilm 생성인자들의 trans-regulatory elements의 동정 및 특성 규명		Biofilm 생성인자의 발현을 조절하는 조절인자의 DNA 결합을 확인하고 조절 메커니즘을 규명
5	Biofilm 생성을 저해하는 제어타겟 발굴 및 제어조건 확립		Biofilm 생성인자의 발현 조절인자를 제어타겟으로 발굴하여 제어에 따른 효과 확인 및 제어조건 확립
6	식품 접촉 표면에 바이오필름 형성	100	온도 및 형성일자에 따른 biofilm 형성 확인
7	박테리오파지 및 엔돌라이신의 바이오필름 제거 최적 조건 확립		박테리오파지 및 엔돌라이신 병합처리의 최적 조건 확립
8	식품 접촉 표면에서 박테리오파지 및 엔돌라이신의 바이오필름 제거능 확인		Stainless steel 및 유리 coupon에서의 바이오필름 제어능 확인
9	현장형 초고온 과열 증기 발생 장비 시작품 제작		사용 전력 개선하여 현장형 초고온 과열 증기 발생 장비의 시작품을 제작
10	개발된 장비의 현장적용 평가 및 매뉴얼 제작		급식소 현장 적용 평가 및 초고온 과열 수증기 장치에 대한 매뉴얼을 제작

제4장 연구결과의 활용 계획 및 기대효과

제1절 연구개발 결과의 활용방안

○ 식중독 균의 바이오필름 생성인자 발현 조절을 통한 제어는 통상적인 항생제 처리와 달리 세균의 내성을 유발하지 않으면서 물리적/생물학적 제어기술에 대한 저항성을 낮추어 식중독 균을 식품접촉표면으로부터 제거할 수 있는 제어기술임.

○ Genome-wide level에서 동정한 패혈증비브리오균의 바이오필름 생성인자들은 새로운 바이오필름 제어기술 개발을 위한 후속 연구의 제어타겟으로 이용 가능함. 또한 본 연구개발에서 진행된 바이오필름 생성인자에 대한 연구는 bioinformatics를 기반으로 한 상동성 분석을 통해 다른 식중독 균의 바이오필름 생성인자 연구에도 확장 적용될 수 있음.

○ 식중독 균 바이오필름을 생성단계에서 억제하기 때문에 식품접촉표면에서 발생할 수 있는 바이오필름에 의한 오염을 사전에 차단하여 식품 안전을 확보하는 예방적 조치로 활용할 수 있음.

○ 지속적인 박테리오파지 연구를 통해 국내에만 존재 할 수 있는 다양한 종류의 박테리오파지를 확보 할 수 있으며, 이와 더불어 다양한 종류의 엔돌라이신을 얻어 낼 수 있어서 바이오필름 내 발생하는 항생제 내성균 문제의 최소화를 실현할 수 있을 것임.

○ 기존보다 뛰어난 특성을 가지는 박테리오파지나 엔돌라이신이 식중독균 및 병원균 제어에 이용된다면 향후 식품산업 뿐만 아니라 의약 산업에도 크게 활용될 가능성이 무궁무진함.

○ 박테리오파지를 이용한 병원성 세균 제어법 (Phage therapy; Phage biocontrol) 개발은 박테리오파지의 높은 host-specificity에서 기인하는 안전성을 기반으로 실용화가 되었을 때 그 기술 수요는 의학, 농수축산 식품 분야에서 항생제 대체제로서 이용될 수 있음.

○ 다양한 식품 접촉 표면에서 식중독 균 바이오필름 제어 효과는 실제 식품 제조 및 가공 공정에서 발생하는 식중독 사고를 사전에 예방할 수 있는 기반을 마련할 수 있음.

○ 본 연구를 통해 개발될 현장형 초고온 과열 증기 발생 장비는 현장 적용을 위해 초고온 과열 증기는 효과적으로 발생시키면서 220V 상용 전압을 이용할 수 있도록 제작될 것임. 기존 lab scale 장비의 경우 10 kW의 전력이 필요해 추가적인 전기 설비가 필요하였지만 새롭게 개발될 현장형 장비의 경우 상용 전압에서 사용이 가능하여 이동성 및 현장 적용성을 크게 높여 실제 식품제조 및 가공업체에서 식중독 균 바이오필름 제어를 위해 폭넓게 활용 가능함.

제2절 기대성과 및 파급효과

가. 기술적 측면

○ 식중독 균 패혈증비브리오균의 바이오필름 생성인자를 genome-wide level에서 포괄적으로 동정하여 바이오필름 생성 조절을 위한 잠재적인 제어타겟을 확보할 수 있고 이는 새로운 바이오필름 제어기술 개발을 위한 후속연구에 이용될 수 있음.

○ 국내에서는 연구가 미진한 식중독 균 바이오필름 형성의 분자적 이해를 통해 식중독 균의 내성을 유발하지 않는 효율적인 바이오필름 제어기술을 개발할 수 있고 이는 다른 식중독 균의 바이오필름에 대한 연구로도 확장되어 전반적인 식중독 균 제어기술의 발전에 기여할 수 있음.

○ 연구 결과에 따른 지속적인 박테리오파지 연구를 통해 국내에만 존재 할 수 있는 다양한 종류의 박테리오파지를 확보 할 수 있으며 이와 더불어 새로운 박테리오파지들로부터 다양한 종류의 엔돌라이신 획득 가능.

○ 국내에서 처음으로 다양한 식품 접촉 표면에 박테리오파지와 엔돌라이신을 처리하는 연구를 통해 실제 식품 제조 및 가공 공정에서 자주 발생하는 항생제 내성균의 제어와 그에 따른 식중독균의 바이오필름 형성 문제의 최소화를 실현할 수 있으며, 이는 식품 안전 산업 전반에 핵심 기술로 이어질 수 있음.

○ 현재까지 초고온 과열 증기 가열기술을 활용하여 다양한 식품접촉표면의 특성에 따른 식중독 균 바이오필름 제어 효과를 검증한 연구는 없었기에 본 연구는 식중독 균 바이오필름 제어에 있어 새로운 가능성을 제시할 것으로 사료됨.

○ 본 연구를 통해 이루어질 kinetics modeling 적용을 통한 초고온 과열 증기의 식중독 균 바이오필름 제어 효과의 정량적 평가는 해당 기술의 실제적인 현장 적용에 있어 토대가 되는 자료로 사용될 수 있을 것으로 사료됨.

나. 경제적 · 산업적 측면

○ 식중독 균의 바이오필름을 생성단계에서 억제하기 때문에 이미 물리·화학적 저항성을 획득한 바이오필름을 제거하는 것에 비해 경제적이며, 식품가공공정 내 식품접촉표면에 생성된 바이오필름에 의해 발생할 수 있는 식품오염사고를 사전에 방지하여 식품 안전을 확보할 수 있음.

○ 세계화 추세에 따라 엔돌라이신을 천연항생제로 개발하여 활용할 경우 2019년 천연항생제 시장 예상 규모 약 4,216억 원임을 감안할 때, 식품 안전에 대한 관심이 높아지면서 그 규모는 더 커질 것으로 예상됨. (농업기술실용화재단, 2011)

○ 소량으로 강력한 균 사멸능을 나타내는 박테리오파지와 엔돌라이신과 같은 저비용, 고효율의 생물적 방제 제품 개발은 통해 식품 및 의약 산업 전반에 효과적으로 적용이 가능함.

○ 항생제 대체 박테리오파지는 국내 시장에서 약 1,000억원 수준으로 추정되며, 박테리오파지와 엔돌라이신 연구를 통해 생물적 방제 제품 개발의 원천기술 확보 및 부가 가치 창출이 기대됨. (인트론바이오, 2013)

○ 개발될 현장형 초고온 과열 증기 발생 장비의 경우 현재 식중독 균 바이오필름 제어를 위해 사용되어지고 있는 제한된 기술들을 대체할 수 있는 새로운 대안을 제시할 것임.

○ 실제 식품 현장에서 활용가능한 식중독 균 바이오필름 제어 기술의 개발로 식중독 사고를 예방하고 이로 인한 경제적 손실의 절감과 관련 식품에 대한 소비자의 안전성에 대한 신뢰를 증가시킬 수 있음.

제5장 사업화 계획

제1절 생산 및 매출 계획

1. 현장용 바이오필름 제어 장비 시스템

구분		(2020 년) 개발 종료 후 1년	(2021 년) 개발 종료 후 2년	(2022 년) 개발 종료 후 3년
국내	시장점유율 (%)	0.25	1	7.5
	판매량 (단위:세트)	5	20	50
	판매단가 (원)	5,000,000	10,000,000	10,000,000
	국내매출액 (백만원)	50	200	500
해외	시장점유율 (%)	-	0.1	1.0
	판매량 (단위:세트)	-	10	100
	판매단가 ($)	-	6,000	6,000
	해외매출액 (백만원)	-	68	680
당사 생산능력1)		5	50	200

제2절 사업화 전략

1. 참여기업 : ㈜세니젠

구분	구체적인 내용
형태/규모	○ 상용화 형태 : 양산 ○ 수요처 : 식품제조 및 가공업소 등 (자체 영업에 의해 수요 가능) ○ 예상 단가 : 10 백만원/시스템 1세트 ○ 개발 투입인력 및 기간 - 투입인력 (년간): 10 명 - 기간: 3 년
상용화 능력 및 자원보유	o 본사에서 핵심 기술 설계 및 엔지니어링, 품질 관리, A/S o 외주 업체에서 제작 및 설치 (본사 엔지니어가 총괄) o 복합정수처리시스템 / LPHO UV 소독장치시스템 개발 및 제조·판매 중 o 제빙기용 살균소독제 / 항균 손세정제 개발 및 제조·판매중 o 2016년 기준 회사매출액 123억 수준으로 상용화 자원 보유중
상용화 계획 및 일정	o 시제품 개발 완료 및 현장 적용 : 2019년 o 상품화 작업 완료 : 2020년 o 판매 개시 : 2020년

제3절 사업화를 위한 비즈니스 모델

1. BM 수립 배경

○ 식품산업의 발전과 더불어 우리나라 뿐 아니라 전 세계적으로 매년 다수의 식중독 사고가 발생되고 있으며 이러한 식중독 사고는 인간의 건강을 해칠 뿐 아니라 관련 의료비로 인한 막대한 경제적 손실까지 이어질 수 있음.

○ 실제 경기지역 학교 내 단체 급식소를 대상으로 조사한 결과 교차오염관리가 가장 취약한 것으로 나타났으며 국외의 경우 식중독균으로부터 발생 된 바이오필름으로 인한 식중독 발병 사례는 끊임없이 나타나고 있는 실정임.

○ 현재 바이오필름을 제거 및 제어하기 위해 사용되는 방법들은 많은 제약이 있기 때문에 현장 적용이 가능한 바이오필름 제어 장비 및 시스템이 필요한 상황임.

○ 따라서 식품 품질 저하를 최소화하고 바이오필름을 효과적으로 제거 및 제어하기 위한 현장적용 가능한 제어 시스템을 개발하여 식품제조 및 가공업소에 폭넓게 활용 가능하도록 하기위해 마케팅 전략을 수립하고자 함.

2. BM 목표 및 핵심경쟁요인

가. BM 목표

○ 식품제조 및 가공업소 현장별 작업장 내 바이오필름 생성현황 및 오염정도 확인에 따른 제어 기준 설정.

○ 생물학적·물리적 제어 기술을 활용한 바이오필름 제어 시스템 구축.

- 생물학적 제어 기술 : 박테리오파지 엔돌라이신을 이용한 바이오필름 제어.
- 물리적 제어 기술 : 현장형 초고온 과열 증기 발생 장비를 이용한 바이오필름 제어.

나. 핵심경쟁요인

○ 생산 시설 및 전문기술인력이 확보되어 있고, 외부 전문가 그룹이 지속적으로 자문하여 제품품질 향상 및 변화되는 시장에 빠른 대응 가능.

○ 식품 관련 기업 및 협회 등에 지속적으로 실험 관련 기기와 소모품 등을 공급하고 있어 넓은 네트워크로 빠르게 시장에 진입이 가능.

○ 식품 위생 및 안전에 대한 지속적인 컨설팅으로 소비자 니즈에 맞는 제품 생산 가능.

3. 목표 시장 구조

가. 경쟁기업 현황

○ 경쟁기업 현황

- TOKUDEN CO. (일본), Cellkraft (스웨덴), Clayton (미국)

나. 경쟁구조

○ 최근 식품 위생 및 안전에 대한 관리 강화로 식중독균 뿐 아니라 눈에 보이지 않는 바이오 필름 제거 및 제어에 필요성이 커지고 있으며, 경쟁기업에서 개발한 제품들의 경우 제품화된 것이 아직 없음.

○ 당 과제를 통해 개발되는 현장형 초고온 과열 증기 발생 장비의 경우 건 타입 2차 히터를 설계하여 초고온 과열 증기를 형성할 때 발생 될 수 있는 온도손실을 최소화 할 수 있도록 고안되었으므로 같은 증기의 양이라도 더 높은 효율을 낼 수 있기 때문에 경쟁구조에서 우위를 점할 수 있을 것이라고 판단함.

다. 시장진입 장벽

○ 현재 해외 시장은 국내 시장에 비해 그 규모가 약 10배 이상 크다고 볼 수 있으나 해외 시장 공략을 위한 해외 파트너 사 섭외가 미흡한 실정임.

○ 주관기관으로 연구에 참여하는 당사는 현재 제품 개발 및 유전체 연구 외에 해외 파트너 사 (3M, Merck, Mettler toledo)와 협업을 통해 식품 안전 위생 제품을 판매하고 있기 때문에 파트너쉽 유지를 통해 해외 시장 진출로 확보가 용이 할 것으로 판단됨.

4. 수익 확보 전략

가. 주요 고객 군

○ 식품 제조 및 가공업소 중 식중독균 발생 위험도가 높은 육가공 제조업소, 신선농산물 생산업소, 가공식품 생산업소를 주요 고객 군으로 선정.

나. BM의 수익창출 방안

○ 수익유형: 식중독균 바이오필름 제어에 어려움을 겪고 있는 식품 제조 및 가공업소 등에 직접 영업 통해 수익 발생.

○ 수요 고객층 확보 계획: 식품 관련 협회 및 연구원 등과 형성된 네트워크를 활용하여 어려움을 겪고 있는 업체 접촉이 용이하여 빠른 고객 확보 가능.

○ 주요 고객 군과 연결된 네트워크를 통해 빠른 고객 니즈 파악과 니즈에 맞는 시스템 구축과 전문가 그룹을 통한 장치 품질 향상을 통해 다양한 식품 분야의 수요 고객층 확보가 가능하여 안정적인 수익창출 가능.

○ 인터넷 블로그를 활용하여 수요고객 가능성이 있는 고객에게 제품의 노출을 향상시키며, 해당 기술에 대한 자료를 제공함.

○ 각종 학회・전시회에 출시하여 타 기술 대비 우수성 및 실질적 현장 활용 간접 체험을 통한 제품의 우수성을 홍보하고자 함.

다. 기술사업화 역량강화 및 사업성공을 위한 교육 프로그램

○ 사업화 확장을 위한 초고온 과열 증기 장치의 교육용 자료를 제작하여 영업부 중심으로 관련 자료를 배포함.

○ 초고온 과열 증기 장치의 기본 이론 및 장비 활용 방법, 타 기술 대비 우수성에 대한 교육을 진행하여 수요 고객층에게 정보 전달 및 제품 홍보를 할 수 있도록 기본 지식을 함양함.

○ 기존에 공급된 유사 공정 시스템의 현장 적용 사례를 바탕으로 해당 기술의 접목 가능 공정에 대한 기본 교육을 진행함.

제4절 미래 고부가가치 시장 활용 방안

1. 엔돌라이신을 활용한 고부가가치 시장 (의료분야) 진입 배경

○ 항생제내성 문제는 세계보건기구(WHO)에서 매년 최우선 과제로 다루는 만큼 세계적으로 심각한 위협임. 특히 국내 항생제 내성 출현률이 OECD 국가 중 상위에 속하며 연간 8 만 건 이상의 감염 사례가 발생할 만큼 심각함. 2014년 WHO 보고서에 따르면, 국내 항생제 저항성 황색포도상구균 출현률은 67.7%로 영국 13.6%에 비하여 약 5배 높음.

○ 합성 항생제는 지속적으로 개발되고 있으나, 세균은 이에 대응하여 빠르게 저항성을 나타냄. 따라서 저항성 문제가 없는 (resistance-free) 신약 개발이 필요한 실정임.
○ 합성 항생제를 대체하기 위한 많은 소재들(유산균, 박테리오신, 합성 펩타이드)이 지속적으로 개발되고 있으나, 이 역시 저항성 문제에서 자유롭지 못하고 병원균의 저해 효과가 항생제와 비교하여 미미하기 때문에 실제 환자 치료용으로 이용되기 어려움.
○ 당 과제를 통하여 개발된 엔돌라이신은 세계적으로 문제가 되는 다재내성균을 제어할 수 있는 원천 기술이기 때문에, 이를 미래 산업에 적용할 수 있는 방안 수립이 필요함.

2. 고부가가치 시장(의료시장)에서 엔돌라이신의 핵심 경쟁력요인 및 개선사항

가. 핵심경쟁요인

○ 박테리오파지 유래 항균 단백질인 엔돌라이신은 기존 합성항생제와는 다른 기작으로 세균을 저해하기 때문에, 현재 보고된 항생제 다재내성균을 효과적으로 제어할 수 있음.
○ 엔도라이신은 세균 세포벽 성분인 peptidoglycan을 기질로 인식하고 분해하기에, 이에 대한 저항성이 나타는 세균이 출현할 확률이 매우 낮음. 현재까지 엔도라이신 저항성 세균 출현 보고된 바가 없음.
○ 엔돌라이신은 기존 항생제에 비해 높은 균 특이성을 가져, 인체 유익균에 영향을 주지 않고 병원성 세균만 저해할 수 있는 새로운 미래고부가 천연 항생제 소재임.

나. 검토 및 개선사항

○ 당 과제를 통하여 엔돌라이신 대량생산 원천 기술을 확보하였으나, 본 소재를 의료분야에 적용하기 위해서는 정제 과정에서 endotoxin이 없는 순수 정제 방법을 검토해야함.
○ 엔돌라이신의 인체 무해성은 지속적으로 보고되고 있으나, 당 과제를 통해서 분리된 엔돌라이신을 의료 목적으로 이용하기 위해서는 추가 임상 실험이 필요할 것으로 사료됨.
○ 엔돌라이신은 치료제 이외에도, 항생제 내성균을 제어 및 예방할 수 있는 의료소독제로도 이용 가능하기 때문에, 사업화 전반의 검토 필요성이 있다고 판단됨.

제6장 참고문헌

1) Hyunsung Lee, Eun Seob Lim, Ok Kyung Koo (2015), Risk of Biofilm Formation and Inhibition Strategies for a Safe Food Service Environment. Safe Food, Vol10, No.1

2) Don monroe (2007), Looking for chinks in the Armor of bacterial biofilms, Plos biology, volume 5, lssue 11, e307

3) AM Richter, TL Povolotsky, LH Wieler (2014), Cyclic di GMP signalling and biofilm related properties of the Shiga toxin producing 2011 German outbreak *Escherichia coli* O104: H4. EMBO Molecular Medicine, Volume 6, lssue 12

4) Renato H Orsi, Mark L Borowsky, Peter Laue (2008), Short-term genome evolution of Listeria monocytogenes in a non-controlled environment. Springer, 9, Article number: 539

5) Jong Gyu Lim, Ye-Ji Bang, Sang Ho Choi. (2014), Characterization of the *Vibrio vulnificus* 1-Cys peroxiredoxin Prx3 and regulation of its expression by the Fe-S cluster regulator IscR in response to oxidative stress and iron starvation. Journal of Biological Chemistry, 289(52), 36263-36274.

6) Jin Hwan Park, Youmi Jo, Song Yee Jang, Haenaem Kwon, Yasuhiko Irie, Matthew R. Parsek, Myung Hee Kim, Sang Ho Choi. (2015), The *cabABC* Operon Essential for Biofilm and Rugose Colony Development in *Vibrio vulnificus*. PLoS Pathogens, 11(9), e1005192.

7) Han-Suk Kim, Mi-Ae Lee, Se-Jin Chun, Soon-Jung Park, Kyu-Ho Lee. (2007) Role of NtrC in biofilm formation via controlling expression of the gene encoding an ADP-glycero-manno-heptose-6-epimerase in the pathogenic bacterium, *Vibrio vulnificus*. Molecular Microbiology, 63(2), 559-574.

8) Han-Suk Kim, Soon-Jung Park, Kyu-Ho Lee. (2009) Role of NtrC-regulated exopolysaccharides in the biofilm formation and pathogenic interaction of *Vibrio vulnificus*. Molecular Microbiology, 74(2), 436-453.

9) Kyung-Jo Lee, Mi-Ae Lee, Won Hwang, Hana Park, Kyu-Ho Lee. (2016) Deacylated lipopolysaccharides inhibit biofilm formation by Gram-negative bacteria. Biofouling, 32(7), 711-723.

10) M. Corcoran, D. Morris, N. De Lappe, J. O'Connor, P. Lalor, P. Dockery, M. Cormican. (2014) Commonly Used Disinfectants Fail To Eradicate *Salmonella enterica* Biofilms from Food Contact Surface Materials. Applied and Environmental Microbiology, 80(4), 1507-1514.

11) Robert W. Crawford, Deanna L. Gibson, William W. Kay, John S. Gunn. (2008) Identification of a Bile-Induced Exopolysaccharide Required for *Salmonella* Biofilm Formation on Gallstone Surfaces. Infection and Immunity, 76(11), 5341-5349.

12) Jee-Hoon Ryu, Larry R. Beuchat. (2005) Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on Stainless Steel: Effect of Exopolysaccharide and Curli Production on Its Resistance to Chlorine. Applied and Environmental Microbiology, 71(1), 247-254.

13) Brett Froelich, James D. Oliver. (2013) The Interactions of *Vibrio vulnificus* and the Oyster *Crassostrea virginica*. Microbial Ecology, 65(4), 807-816.

14) Rohinee N. Paranjpye, Asta B. Johnson, Anne E. Baxter, Mark S. Strom. (2007) Role of Type IV Pilins in Persistence of *Vibrio vulnificus* in *Crassostrea virginica* Oysters. Applied and Environmental Microbiology, 73(15), 5041-5044.

15) Jin Hwan Park, Byungho Lee, Youmi Jo, Sang Ho Choi. (2016) Role of extracellular matrix protein CabA in resistance of *Vibrio vulnificus* biofilms to decontamination strategies. International Journal of Food Microbiology, 236, 123-129.

16) Ban, G. H., & Kang, D. H. (2016). Effect of sanitizer combined with steam heating on the inactivation of foodborne pathogens in a biofilm on stainless steel. Food microbiology, 55, 47-54.

17) Kristina Jonas, Henrik Tomenius, Abdul Kader, Staffan Normark, Ute Römling, Lyubov M Belova, Öjar Melefors. (2007) Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. BMC Microbiology, 7, 70.

18) Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. D. (2013). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. Food control, 31(2), 572-585.

19) Ban, G. H., Yoon, H., & Kang, D. H. (2014). A comparison of saturated steam and superheated steam for inactivation of Escherichia coli O157: H7, Salmonella *Typhimurium*, and Listeria monocytogenes biofilms on polyvinyl chloride and stainless steel. Food Control, 40, 344-350.

20) Bai, J., Kim, Y. T., Ryu, S., & Lee, J. H. (2016). Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins. Frontiers in Microbiology, 7(APR), 1 - 15.

21) Borysowski, J., Weber-Dąbrowska, B., & Górski, A. (2006). Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. Experimental Biology and Medicine, 231(4), 366 - 377.

22) Chan, B. K., Abedon, S. T., & Loc-Carrillo, C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. Future Microbiology, 8(6), 769 - 783.

23) Khakhum, N., Yordpratum, U., Boonmee, A., Tattawasart, U., Rodrigues, J. L. M., & Sermswan, R. W. (2016). Cloning, expression, and characterization of a peptidoglycan hydrolase from the Burkholderia pseudomallei phage ST79. AMB Express, 6(1), 77.

24) Lehman, S. M., Mearns, G., Rankin, D., Cole, R. A., Smrekar, F., Branston, S. D., & Morales, S. (2019). Design and preclinical development of a phage product for the treatment of antibiotic-resistant staphylococcus aureus infections. Viruses, 11(1).

25) Wright, A., Hawkins, C. H., Änggård, E. E., & Harper, D. R. (2009). A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa; A preliminary report of efficacy. Clinical Otolaryngology, 34(4), 349 - 357.

26) Park, S. H., & Kang, D. H. (2014). Inactivation of biofilm cells of foodborne pathogens by steam pasteurization. European Food Research and Technology, 238(3), 471-476.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.