

710012
-03

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
농식품기술융합창의인재양성사업 2020년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003310-01

안전식품 소재와 기술의
최적화 및 식품산업 활용

2020

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

안전식품 소재와 기술의 최적화 및 식품산업 활용

2020.12.07.

주관연구기관 / 서울대학교 산학협력단
협동연구기관 / 동국대학교 산학협력단

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “안전식품 소재와 기술의 최적화 및 식품산업 활용”

(개발기간 : 2017. 09. 01. ~ 2020. 08. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 12. 07.

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 (대표자) 김용찬 (인)

협동연구기관명 : 동국대학교 산학협력단 (대표자) 김관규 (인)

참여기관명 : 농업회사법인(주)우리두 (대표자) 조재영 (인)

주세니젠 (대표자) 박정웅 (인)

주인트론바이오테크놀로지 (대표자) 윤성준 (인)

주관연구책임자 : 최상호(서울대)

세부연구책임자 : 김도만(서울대), 유상열(서울대)

협동연구책임자 : 이광근(동국대)

참여기관책임자 : 조재영(농업회사법인(주)우리두),

박정웅(주세니젠),

손지수(주인트론바이오테크놀로지)

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제 고유 번호	710012-03	해당 단계 연구 기간	2017.09.01. ~2020.08.31	단계구분	(해당단계)3단계 / (총단계)3단계
연구사업명	사업명	농식품기술융합창의인재양성사업			
	세부사업명	-			
연구과제명	대과제명	식품안전성및독성연구센터			
	세부과제명	-안전식품 소재와 기술의 최적화 및 식품산업 활용			
연구책임자	최상호	해당단계 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 2,925,000천원 민간: 283,400천원 계: 3,208,400천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
연구기관명 및 소속 부서명	서울대 학교			참여기업명 (주)우리두, (주)세니젠, (주)인트론바이오테크놀로지	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내·외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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 등록된 연구시설·장비 현황

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

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

4. 요약문

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>□ 총괄과제연구목표: 농수산식품의 안전성을 저해하는 다양한 위해인자들을 포괄적으로 동정하여 그 특성을 분자수준에서 규명하고 각 위해인자들을 제어할 수 있는 새로운 기술을 개발함. □ 미생물학적 위해인자들의 포괄적 동정, 특성 규명 및 제어기술 개발 □ 내성균을 유발하지 않는 새로운 패러다임의 식중독 미생물 제어기술 개발 □ 화학적 위해인자와 독성인자의 위해기전 규명 및 저감화 연구 □ 위해인자의 분자 특성에 기반한 효과적 제어 및 안전식품 신기술 □ 개발 안전식품 소재 및 신기술을 개발하고 식품산업 적용을 위한 기반 확립</p> <p>제 1 핵심과제: 식중독미생물 독성인자 특성 규명 및 제어기술 개발 (식품 안전 소재 개발) 제 2 핵심과제: 식품위해물질 대사제어 및 위해평가를 바탕으로 한 맞춤형 생체지표 산업화 연구 (식품 안전 기술 개발) 제 3 핵심과제: 안전식품 소재 및 신기술 개발 (박테리오파지 기반 연구)</p>				
<p>성과</p>	<p>연구개발 성과</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 식중독 미생물 독성인자를 제어하여 내성이 나타나지 않는 식품 안전 소재 개발함. 2. 생물전환기술을 이용하여 천연물 유래 기능성 식품 안전 소재를 개발하고 다수 상품화함. 3. 식품 위해인자의 발생 기작을 규명하고 이를 바탕으로 맞춤형 생체 지표를 개발함. 4. PCR을 기반으로 고민감 식중독균 검출 키트를 개발함. 5. 새로운 식품 살균 기술을 개발하고 이를 제품화함. 6. 박테리오파지와 이로부터 파생된 단백질을 기반으로 항생제 대체 새로운 식품살균제를 제품화함. 			
	<p>인력양성 성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 세균 면역학 관련 분야의 전문적인 인력 양성 가능 ● 세균 제어 기술을 수직상세포를 이용한 세포 치료 분야로의 연결을 통해 향후, 차세대 연구에서의 우수 인력 확보 가능 ● PCR 기반으로 고민감성 병원균 검출 키트를 개발할 수 있는 인력을 양성함. 			
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>□ 새로운 첨단 식품안전 신기술의 창출 및 국제적 기준의 과학적인 식품위해 평가 및 검증기술 개발 □ 식품안전 신기술의 식품산업으로의 이전 및 농수산물의 부가가치 및 생산 성 향상 □ 식품산업 및 농수산업 전반의 발전 및 안전식품생산에 의한 식중독의 예방 및 국산 농산물의 소비증대 □ 첨단 융합학문으로서 새로운 식품안전성학 발전 및 관련 분야 국제적 최우 수 연구 논문 발표로 농업식품분야의 학문적 위상 제고 □ 식품안전 고급 인력양성 및 기술이전 Hub 구축 및 국제적인 식품안전연구 Network 구축</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>식중독균</p>	<p>항생제 대체</p>	<p>식품 위해인자</p>	<p>고민감성 검출 키트</p>	<p>박테리오파지</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>food borne pathogens</p>	<p>antibiotics substitutes</p>	<p>food risk factors</p>	<p>high sensitivity assay kits</p>	<p>bacteriophage</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

5. 본문목차

< 목 차 >

1. 센터의 개요	1
2. 국내외 기술개발 동향	7
3. 연구개발내용 및 인력양성 프로그램 운영	22
4. 센터 운영 성과(1·2·3단계)	27
4-1. 핵심기술개발 성과 및 활용성과	28
4-2. 인력양성 및 활용성과	489
5. 목표달성도 및 관련 분야 기여도	493
6. 연구성과의 활용계획	498
7. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	502
8. 연구개발결과의 보안등급	502
9. 연구개발과제의 대표적 연구실적	502
10. 기타사항	502
11. 참고문헌	503

<별첨 1> 연구개발보고서 초록

<별첨 2> 연구성과 활용계획서

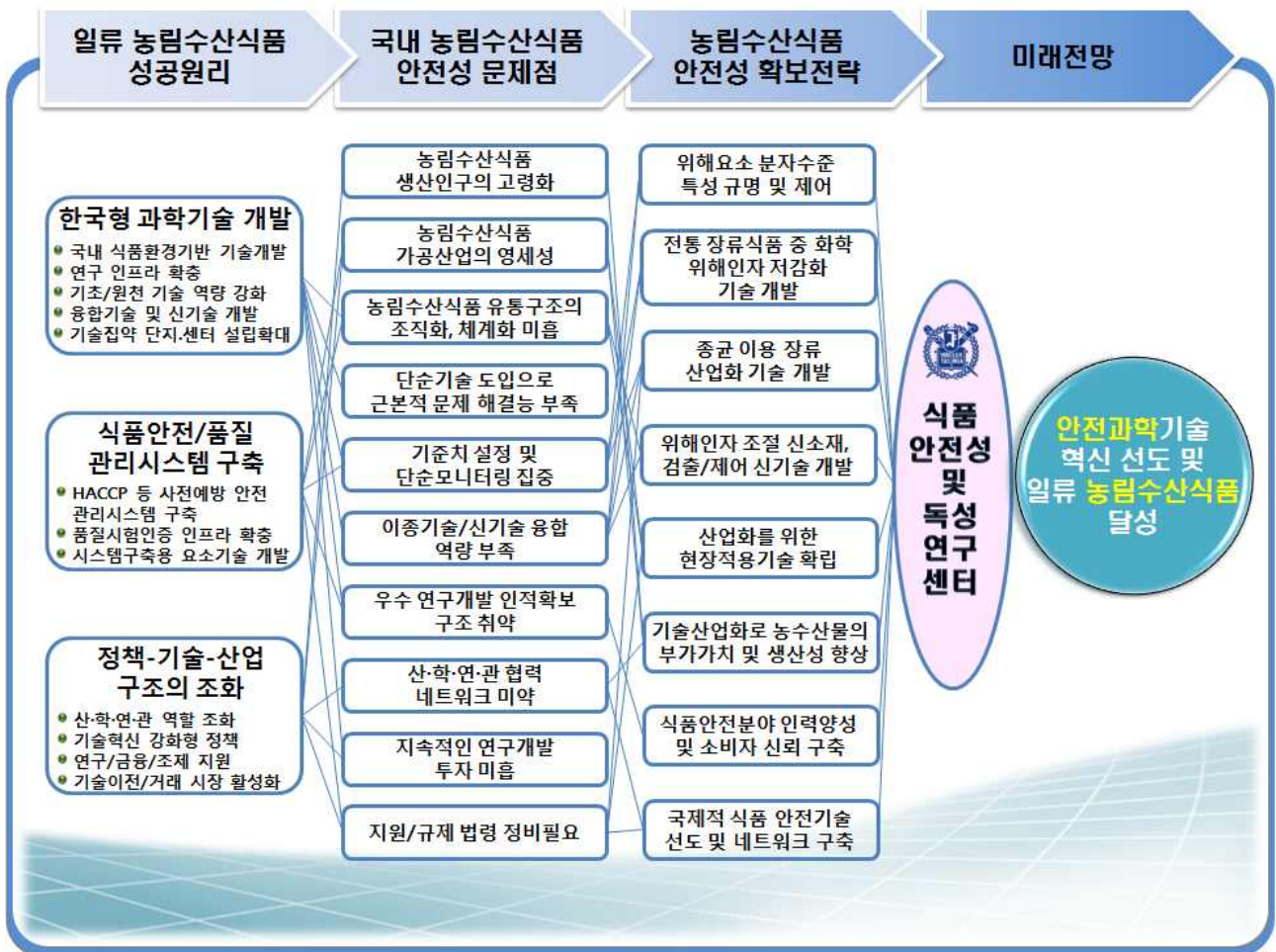
<별첨 3> 자체평가의견서

1. 연구개발과제의(센터의) 개요

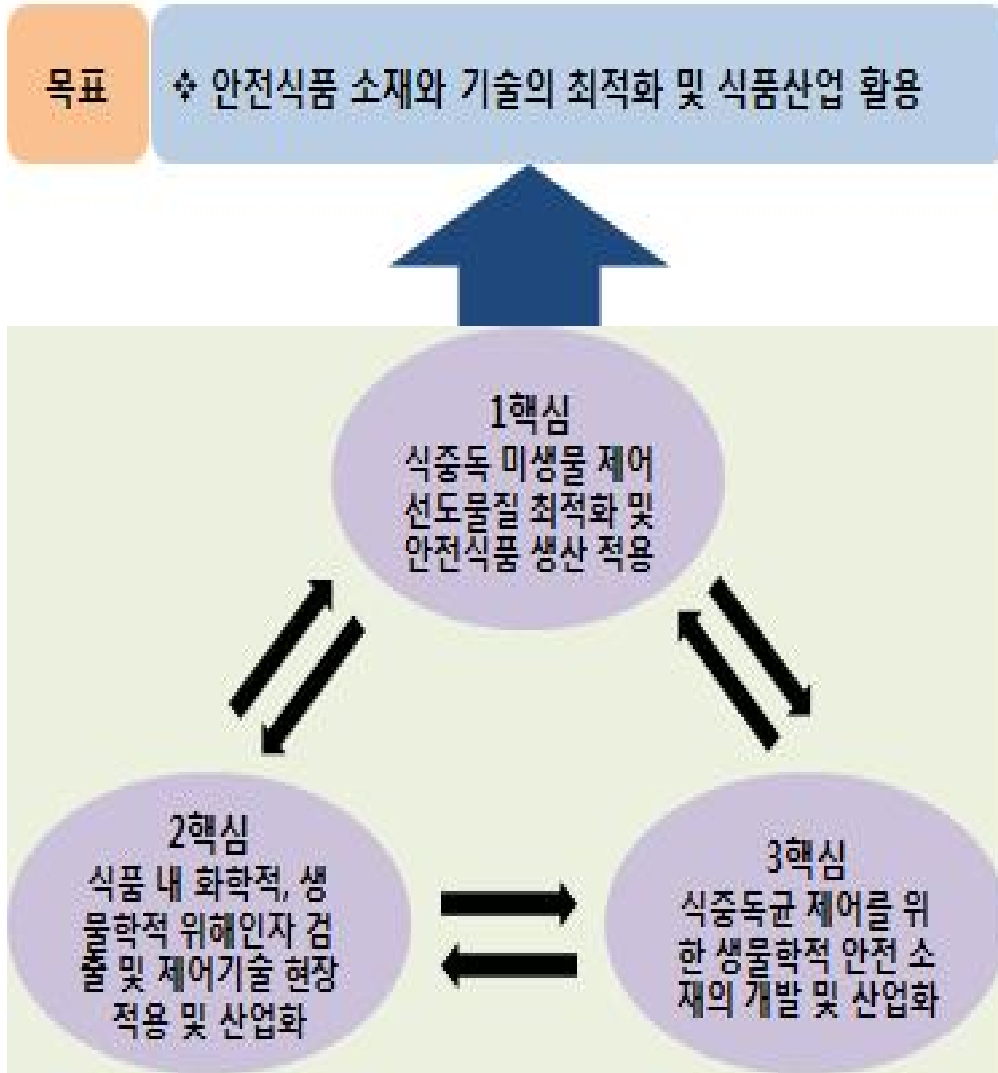
1-1. 연구개발 목적

○ 목표 설정의 배경

- 본 센터는 식품안전성 및 독성 관련 연구 및 기술이전을 통하여 국제적 수준의 연구 센터로의 발전을 목표로 하고 있다. 이를 위해 기초/원천 기술의 역량을 강화하고 식품공학, 구조생물학, 약학 등이 연계된 새로운 연구 분야를 개척하고자 한다. 현재 여러 학문 간의 융합 연구에 대한 중요성이 부각되고 있으며 이러한 융합 연구는 향후 새로운 연구 분야를 개척하고 발전시키는데 매우 중요할 것이다. 또한 산·학·연·관의 연계성에 대한 중요성은 지속적으로 대두되어 왔다. 본 연구 센터는 식품 안전성 및 독성 관련된 교육을 학계 및 기업에 실시하는데 중심적인 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다. 이를 통해 국내외적으로 식품 안전성 및 독성 분야의 학계와 기업체를 아우르는 견고한 네트워크를 구축할 수 있을 것이다.



○ 최종 목표



1-2. 연구개발의 필요성

○ 농림축산업의 성장동력인 식품산업의 중요성

- 세계 식품산업 규모는 연간 5.7조 달러이며 해마다 약 10%씩 꾸준히 성장하고 있음. 이는 자동차 (1.7조 달러), IT (2.9조 달러), 철강 (1조 달러) 보다 각각 3.4, 2.0, 5.7배 높을 정도로 그 경제적 가치는 매우 높음
- 국내 식품산업 매출액 규모는 164조원 (2014년 기준), 국내 농식품 수출액은 61억 달러이며 (2014년 기준) 매해 증가 추세에 있음.
- 5대 고부가가치 산업으로 선정됨 (전자, 자동차, 화학, 기계, 식품)
- 정부는 식품산업의 중요성을 인식하고 2013년 식품산업 발전계획을 수립하고, 농업 농촌 및

식품산업기본법을 개정함. 2014년엔 식품산업 안전 국민 건강을 포함하는 신 식품정책을 수립함.

- 식품산업은 농림축산물의 가장 큰 수요자로서 식품산업의 발전은 농림축산업에 대한 생산 유발 효과가 매우 큼.
- 식품산업은 한계에 도달한 농업 성장의 촉매역할을 수행함.

○ 농식품 안전성 확보의 중요성

- 식품산업 성장의 걸림돌은 바로 식중독균 오염사고임.
- 전 세계적으로 식중독균의 오염으로 인한 대규모 리콜 사태가 매해 있으며 이로 인하여 식품산업의 성장이 저해됨.
- 미국의 경우 식중독에 의한 사회·경제적 손실이 한해 55.5 billion 달러에 이룸(2015년 기준).
- 안전하지 않는 식품을 섭취하여 매년 수백만명이 식품매개 질병으로 사망하고 있음.
- 세계화로 인하여 우리는 다른 나라에서 생산한 식품을 섭취하고, 우리나라 식품도 다른 나라로 수출하고 있음. 이러한 식품산업의 세계화로 인하여 식품안전이 더욱 복잡하고 중요해짐.
- 최근 유기농 및 신선 식품에 대한 선호도가 증가하여 불완전한 살균 등으로 식중독 사고의 위험성은 더욱 증가됨.
- 식품안전을 개선하기 위해서는 다양한 과학기술이 접목이 되어야 함.
- 따라서 고부가가치 농식품을 확보하기 위해서는 신선도 등 식품의 품질을 떨어뜨리지 않지만 병원성 세균의 오염을 효과적으로 막는 새로운 식품 안전소재 또는 기술이 필요함.

○ Globalization과 새로운 감염질환의 출현-막대한 사회적인 손실 (경제·산업적 측면)

- 최근 세계 각국에서 출현하고 있는 신종 그리고 변종 병원균의 출현에 따른 사회경제적인 손실은 해당 국가의 경제에만 영향을 끼치는 것 뿐 아니라 전 세계적으로 막대한 사회경제적인 손실을 야기함.
- 한 예로 2003년 동남아시아와 중국에 출현 하였던 사스는 인명 피해 외에도 관광, 문화, 무역 등 사회전반에 막대한 영향을 끼쳐 수백억 달러의 사회경제적인 손실을 유발함.
- 국내의 경우도 한 예로 2001년도 식품유래 감염균들의 식중독 발생에 의한 사회경제적인 손실을 국가 예산의 0.16%에 달하는 1조 3000억원으로 추정하고 있음 (2001, 박경진, 식품의약품 안전청).

○ 감염 질환의 중요성-leading causes of death worldwide (WHO. 2000) (사회·문화적 측면)

- 전 세계적으로 질병에 의한 연간 사망자 5700만 명 중 약 25%인 1500만 명 이상이 감염질환의 직접적인 결과에 의하여 사망하고 있음. 이러한 수치는 cardiovascular 질환에 의한 사망자 1700만 명 다음으로 높은 수치임.
- 특히 5세 미만 (0세에서 4세까지)의 유아들의 경우 감염질환에 의한 사망률은 특히 높아 연간 전체 사망유아의 65%에 달하고 있음.

○ 축산업에 항생제 내성균의 출현

- 가축에 사용하는 항생제의 증가로 인하여 가축의 항생제 내성균의 오염이 우려되는 실정임.

- 1940년대 이후 항생제의 사용으로 가축의 건강과 생산성이 비약적으로 증가되었지만, 항생제에 대한 내성 증가로 인하여 오히려 치료비용 증가 및 실패 등이 문제로 대두되고 있음.
- 특히 축산업에서 사용되는 항생제 때문에 발생할 수 있는 식품 원재료의 항생제 내성균의 오염은 사회적으로 큰 문제를 야기시킬 수 있음.
- 항생제 내성이 있는 유전자를 갖는 세균은 그 유전자를 다른 세균에게 전파할 수 있으며, 축산업에서 발생한 항생제 내성균의 내성유전자도 인간에게 감염하는 세균에게도 전파할 수 있음.
- 다제내성균의 출현은 가축뿐만 아니라 인류의 생존에 큰 위협이 될 수 있음.
- 따라서 내성 발생이 적은 새로운 개념의 항균제 개발이 중요함.

1-3. 연구개발 범위

○ 제 1핵심 : 식중독 미생물 제어 선도물질 최적화 및 안전식품 생산 적용

- 1-1세부 (서울대 최상호, 하남출)

연차	연구개발 범위	연구자
최종	독성인자 발현제어 선도물질 유래 신개념 식품안전소재 도출	최상호
후속1차	독성인자 조절자 제어 선도물질의 효능 유전체기반 검증 <ul style="list-style-type: none"> • 패혈증 비브리오균의 독성인자 조절자 HlyU 제어 선도물질 CM2660의 효능 검증 • CM2660의 HlyU regulon 발현에 주는 영향 분석 • CM2660에 의하여 발현이 억제되는 marker 독성 유전자 또는 operon 발굴 • Marker 독성 유전자들의 발현 및 기능적인 특성 규명 	최상호
후속2차	독성인자 조절자 제어 선도물질 유도체들의 구조-활성 상관관계 분석 <ul style="list-style-type: none"> • HlyU marker 독성 유전자-<i>lux</i> Reporter strain 구축 • 제어 선도물질 유도체들의 marker 독성 유전자 발현억제 효능 파악 • HlyU의 활성을 억제하는 최적 선도물질 선발 • 최적 선도물질의 HlyU 제어 분자기전 규명 	최상호, 하남출
후속3차	독성인자 조절자 제어 선도물질 최적화 및 식품안전 후보물질 도출 <ul style="list-style-type: none"> • 선발된 제어 선도물질의 적용 범위 확대 • 제어 선도물질의 안전성 평가 • 식중독균 (패혈증 비브리오균)의 독성평가 pilot scale 모델식품 개발 • 개발된 모델식품을 이용한 선발된 선도물질의 효능 평가 • 식품안전 후보물질 제형의 최적화 	최상호, 하남출

- 1-2세부 (서울대 김도만, 우리두)

연차	연구개발 범위	연구자
최종	식품 맞춤형 천연 항균 소재 생산 최적화 및 적용	김도만, (주)우리두
후속1차	생물전환기술 활용 수용성 강화 식품 안전 천연 항균 소재 생산 최적화 및 적용	김도만

후속2차	생물전환기술 활용 향균 신바이오틱스 식품 안전 향균 소재 생산 최적화 및 적용	김도만, (주)우리두
후속3차	생물전환기술 활용 저열량 향균 천연 식품 안전 향균 소재 생산 최적화 및 적용	김도만, (주)우리두

○ 제 2핵심 : 식품 내 생물학적 위해인자 검출 및 제어기술의 현장적용 및 산업화
- 2-1세부 (세니젠 박정웅)

연차	연구개발 범위	연구자
최종	식중독균 검출 및 제어기술들의 제품화 및 상용화	박정웅
후속1차	Super-heated steam과 HOCl 병합 살균시스템의 최적화 및 제품화	박정웅
후속2차	식품품목별로 Multiplex Real-Time PCR kit 최적화 및 제품화	박정웅
후속3차	유기산과 HOCl 병합 살균시스템의 최적화 및 제품화	박정웅

- 2-1협동 (동국대 이광근, 서울대 강동현)

연차	연구개발 범위	연구자
최종	식품 내 생물학적 위해 인자 검출 및 제어기술의 현장 적용 및 산업화	
후속1차	식품 맞춤형 천연 향균 소재 생산 최적화 및 생물학적 위해 인자 저감화 기술 현장적용 및 산업화	김도만 강동현
후속2차	식품모델시스템을 활용한 식품의 가공·저장 중 유해물질 저감화 신규 가열기술 기반 조합 시스템 구축 및 식중독균 저감 메커니즘 분석	이광근 강동현
후속3차	식품모델시스템을 활용한 식품의 가공·저장 중 유해물질 저감화 기술 개발 시뮬레이션 예측모델 개발을 통한 신 기술의 산업화 적용 기반 확립	이광근 강동현

○ 제 3핵심 : 식중독균 제어를 위한 생물학적 안전 소재의 개발 및 산업화
- 3-1세부 (인트론 손지수)

연차	연구개발 범위	연구자
최종	식중독균 제어를 위한 유용 소재의 대량 생산 공정 구축 및 제제화	손지수
후속1차	유용 박테리오파지의 증식 및 정제 공정 개발 • 박테리오파지의 소규모 증식 및 정제 공정 개발 • 박테리오파지 기반의 적합 제형 개발 • 단기 보관 안정성 조사	손지수
후속2차	유용 파지 유래 단백질의 소규모 제조 시스템 개발 (생산/분리/정제) • 파지 유래 단백질의 소규모 발현 및 정제 공정 개발 • 파지 유래 단백질 기반의 적합 제형 개발 • 장기 보관 안정성 조사	손지수
후속3차	박테리오파지, 파지 유래 단백질의 산업적 제조 공정 scale-up 및 원료의 산업적 제조 공정 개발 • 박테리오파지 및 파지 유래 단백질의 대규모 증식, 발현 및 정제 공정 개발 • 현장 평가용 시료 제조	손지수

- 3-1협동 (서울대 유상열)

연차	연구개발 범위	연구자
최종	식중독균에 대한 항생제 대체 생물학적 제어기술 현장적용 및 산업화	
후속1차	생물학적 항균 소재 생산을 위한 박테리오파지 선정 및 특성 분석 <ul style="list-style-type: none"> • 1,2단계에서 우수한 균 사멸 효과를 나타내는 박테리오파지 선정 • Selection pressure 존재 하에 새로운 박테리오파지 분리 • 새롭게 분리된 박테리오파지의 특성 및 시퀀스 분석 	유상열
후속2차	다양한 제형의 박테리오파지 및 파지 유래 단백질 개발 <ul style="list-style-type: none"> • 박테리오파지 유래 단백질 확보 및 특성 분석을 통한 후보균 선정 • 선정된 박테리오파지 및 파지 유래 단백질의 제품화를 위한 제형 선별 • 다양한 제형의 박테리오파지 및 파지 유래 단백질 개발 조건 확립 	유상열
후속3차	생물학적 항균 소재 생산 조건 최적화 및 현장 적용 <ul style="list-style-type: none"> • 개발된 제품 평가를 위한 모델 선정 및 적용 방법 구축 • 다양한 제형의 박테리오파지 및 파지 유래 단백질 lab scale 생산 최적 조건 확립 • 다양한 제형의 박테리오파지 및 파지 유래 단백질 pilot scale 생산 최적 조건 확립 • 대상 모델 및 현장에서 생산된 제품 적용 및 평가 	유상열

2. 국내외 기술개발 동향

○ 제 1핵심

- 제 1-1세부(서울대 최상호, 하남출)

㉞ 국내외 관련분야 환경 변화

1) 기존의 제어기술들에 대한 식중독균의 내성

- 현재 사용되고 있는 식중독균 제어기술은 가열 하는 것 외에 다양한 항미생물제제 (anti-microbial agents)를 첨가하거나, 냉장, 낮은 산 (pH), 염 (salt)등의 stress를 이용하는 것이 그 주류를 이루고 있다. 하지만 식중독균은 이러한 항미생물제제나 stress들에 대하여 점차 내성을 갖게 되어 위와 같은 저장유통 조건에서 예전에 발견되지 않았던 새로운 내성 식중독균들이 검출되고 있는 현실이다. Fig. 1과 같이, 특정 항생제를 사용함에 따라 그에 대한 내성을 가진 식중독균들이 단기간에 출현하고 있다.

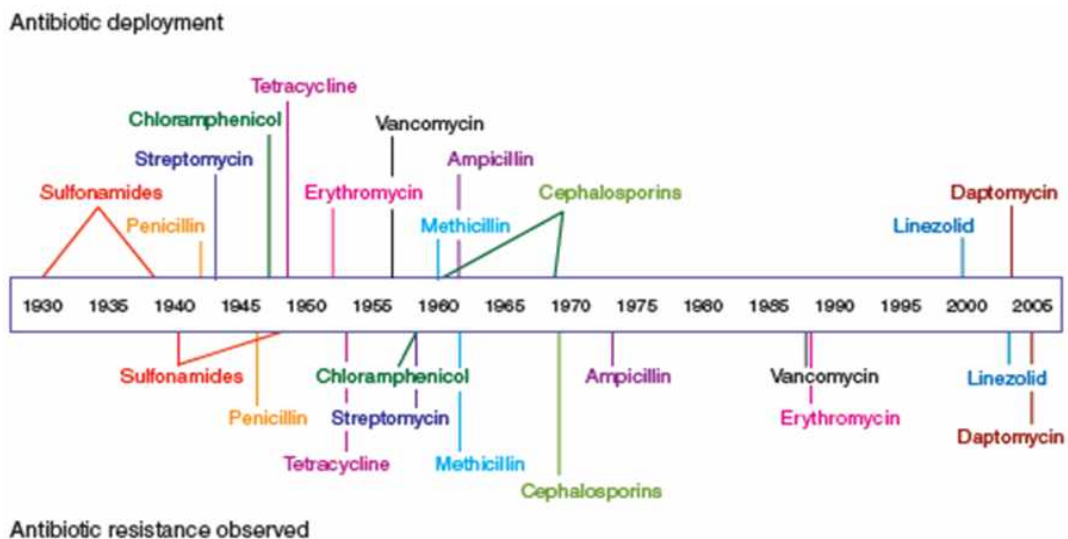


Fig 1. Timeline of antibiotic development and the evolution of antibiotic resistance.

항생제가 개발된 해와 각 항생제 내성균이 보고된 해를 각각 timeline의 위아래에 나타내었다 (Clatworthy *et al.*, 2007)

- 현재 사용되고 있는 모든 항생제는 세균의 단백질 합성이나 세포벽의 합성을 저해함으로써 식중독균의 성장 자체를 억제하는 기전을 가지고 있다 (Fig. 2). 이러한 기전을 가진 항생제들은 정도의 차이만 있을 뿐 궁극적으로 내성을 가진 식중독균의 출현이라는 문제를 초래하고 있다.

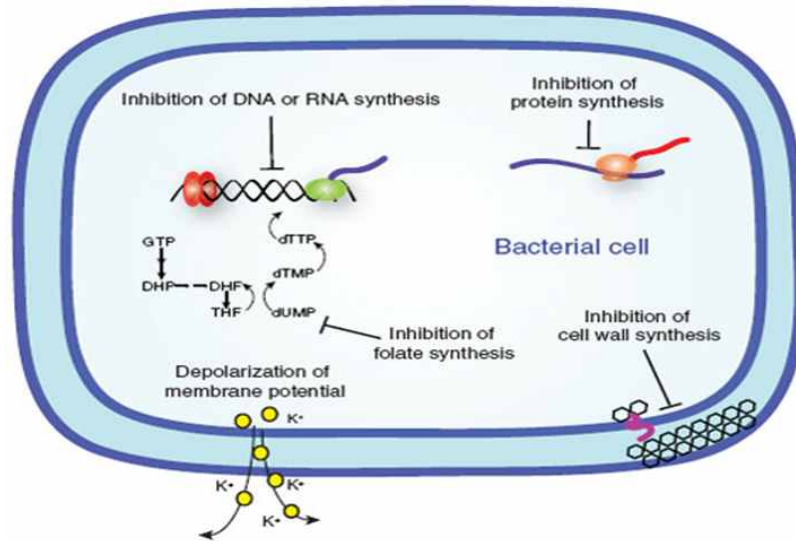
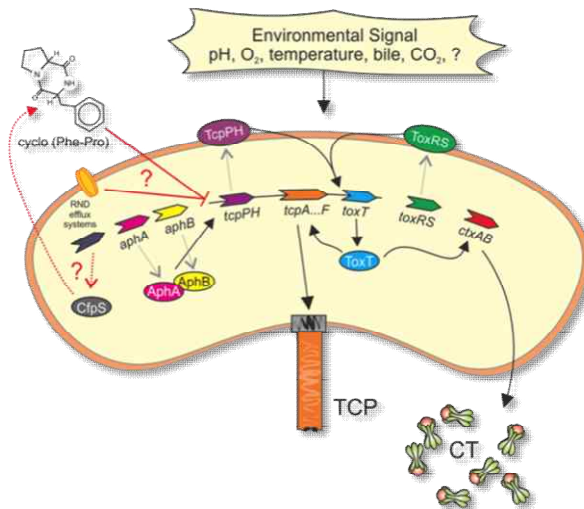


Fig. 2. Traditional targets of antibacterial compounds. 기존의 항생제는 DNA, RNA, 단백질 합성 저해, 세포벽 합성 저해, membrane potential의 depolarization과 같은 식중독균의 생존에 필수적인 과정을 저해하는 기전을 가진다 (Clatworthy *et al.*, 2007).

2) 새로운 제어타겟으로서 식중독균의 독성생성 유전자의 발현

- **Koch's postulates:** 1876년 독일의 R. Koch에 의하여 발표된 Koch의 가설 (Koch's postulates)은 모든 감염질환은 특정한 미생물 (즉 감염원인 균)에 의하여 발생한다는 주장이다 (Koch, 1876). 이러한 Koch의 가설은 그 후 식중독을 포함한 감염질환을 치료하기 위해서 감염 원인균의 성장을 억제하는 또는 감염 원인균을 사멸시키는 항생제를 개발하는 이론적인 바탕이 되었다.
- 하지만 외부의 새로운 유전자를 받아들이고 진화하는 능력이 뛰어난 미생물들의 경우 이처럼 성장자체를 억제하는 항생제들에 대하여 내성기전을 발전시키고 결과적으로 다양한 내성균들의 출현이라는 큰 문제를 야기하였다.
- **Molecular version of Koch's postulates:** Stanford 대학교 Dr. S. Falkow 등은 감염질환의 원인은 감염원인균 자체이기보다는 원인균의 독성 (toxins, 또는 독성인자라고 함)들을 주창하는 molecular version of Koch's postulate (Falkow, 1988)을 발표하였다.
- 따라서 molecular version of Koch's postulate는 감염원인균 자체의 성장을 억제하거나 사멸시키는 대신 감염원인균 독성의 생성 또는 활성을 억제함으로써 감염균의 제어가 가능하다는 것을 제시하고 있다 (Mekalanos, 1992).
- 이러한 독성인자의 생성이나 활성을 억제하는 방법은 감염원인균 자체의 성장을 억제하지 않는다는 점에서 기존의 항생제와 달리 내성균의 출현을 유발할 가능성이 매우 낮다.



Virulence factor production in *Vibrio cholerae*.

Fig. 3. 비브리오 콜레라균의 독성인자 발현 경로. 감염 질병을 유발하는 독성인자의 조절체계의 예 (*Virulence factor production in Vibrio cholerae*. Retrieved July 11, 2017, from <http://www.mvm.pitt.edu/node/315>).

㉔ 연구개발의 필요성

1) 기존 연구의 문제점: 독성생성 유전자 발현 조절체계 (regulatory network)의 이해 결여

- 식중독균이 인간을 감염하여 숙주 내에서 생존하고 증식하여 발병하기 위하여 새롭게 발현 시켜야 할 독성생성 유전자들은 한두 개의 유전자에 국한되는 것이 아니고, 서로 관련된 다양한 종류의 유전자들 (assembly of coordinated genes) 이다.
- 이러한 다양한 독성 유전자들의 발현은 외부환경의 변화를 인지하여 세포내로 전달하는 신호전달체계에 의하여 체계적이고 조화롭게 조절된다 (Miller *et al.*, 1989).
- 이러한 신호전달체계는 보통 외부의 환경의 신호를 인지하여 전달하는 sensor 단백질과 전달된 신호를 받아 특정유전자의 발현을 조절하는 regulator protein (조절자)로 구성된다 (Mitrophanov and Groisman, 2008).
- 이들 조절자 중 외부의 신호를 전달받아 다양한 유전자들의 발현을 조화롭게 조절하는 조절자를 global regulatory protein이라하며, 외부의 신호를 받아 다양한 독성인자들의 발현을 조절하는 조절자는 식중독균을 제어하기 위한 새로운 타겟이 될 수 있다 (Fig. 4).

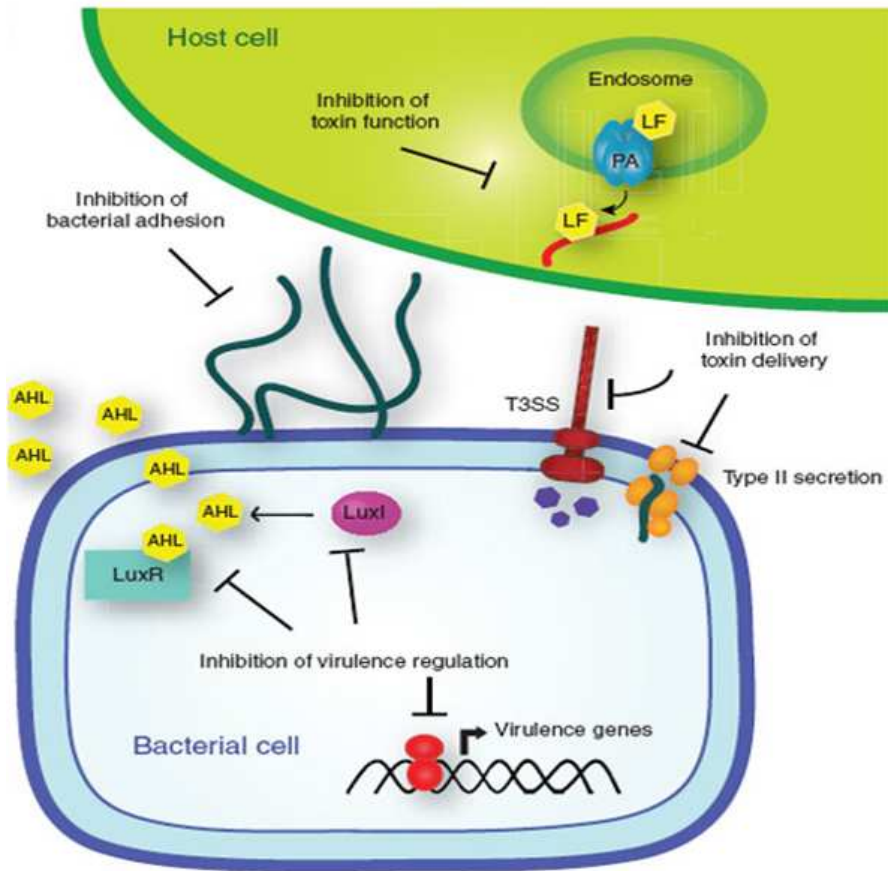


Fig. 4. Bacterial protein functions that can be targeted to inhibit virulence. Virulence inhibitors could target: toxin function (for example, *B. anthracis* LF catalytic activity or translocation through PA); toxin delivery, by inhibiting various bacterial systems such as type II or type III secretion (T3SS); virulence gene regulation (for example, AHL-mediated quorum sensing circuitry (LuxI or LuxR homologs) or transcriptional regulators that control virulence gene expression); or bacterial adhesion to host cells (for example, inhibition of the formation of pili by pilicides). (Clatworthy *et al.*, 2007)

- 하지만 기존의 식중독균 독성인자의 발현 조절체계 (regulatory network)에 대한 연구는 본 연구팀을 포함한 소수의 연구팀에서 시도하고 있을 뿐 매우 제한적인 현실이다 (Kim *et al.*, 2013, Lim *et al.*, 2014, Kim *et al.*, 2014, and Jang *et al.*, 2016).

2) 본 연구의 차별성

- 본 연구는 식중독균의 독성인자의 발현 조절체계를 이해하고 이를 표적으로 하는 저해제 개발이 중심이 된다. 독성인자의 생성만 억제하기 때문에 생장을 억제하는 다른 항생제나 식품소

독제와는 달리 내성 생성이 본질적으로 억제될 것이다.

- 3단계 연구를 통해 1, 2 단계에서 도출된 선도물질을 더욱 최적화하여 산업화의 기틀을 마련할 것이다.

- 제 1-2세부(서울대 김도만, 우리두)

㉠ 커큐미노이드를 함유한 강황(*Curcuma longa L.*)은 치매 예방, 간 질환, 우울증, 위장질환 치료, 숙취 해소, 변비 예방, 알츠하이머, 뇌 손상 보호, 혈관성 치매, 당뇨 및 항균 등의 특성이 있는 것으로 알려져 고령층의 건강 유지를 위한 기능성 식품 소재로서 그 가치가 매우 높음. 하지만, 매우 낮은 수용해성, 낮은 용액 내 안정성 및 장내투과/분배 정도 등으로 생체이용률이 매우 낮아 천연 기능 식품 소재로 활용이 제한됨. 따라서, 생물전환 기술을 이용하여 수용성이 강화된 기능성 식품안전 소재를 개발이 필요함.

㉡ 오미자는 항산화, 두뇌 회전 촉진, 중추 신경의 기능 강화, 혈액순환 개선 등 중·노년의 육체적, 정신적 건강에 필요한 성분이 많이 함유되어 있고, 항균특성이 있으며, “오미자청”으로 전국적으로 제조 판매가 되고 있는데, 제조과정에서 50%가량의 설탕을 첨가. 최근 당분의 과량 섭취에 따른 대사질환 질병과 뼈 건강 악화 그리고 집중력 저하 등 부작용이 많이 보고되고 있어 풍미가 우수한 저열량 오미자청(혹은 과일청) 제조방법을 생물전환 방법으로 개발하여 오미자청 혹은 과일청의 고유 기능과 더불어 항균특성을 과학적인 검증이 필요함.

㉢ 전 세계적으로 웰빙시대를 추구하는 경향에 맞추어 천연물에 대한 인식이 새로워지면서 유아와 고령자의 건강증진 및 기능성 식품 개발을 선도할 새로운 패러다임으로 천연물 소재에 관한 관심이 증가함. 소비자들은 건강과 안전을 추구함으로써 합성 화학물질 기반의 의약품, 기능성 식품, 화장품을 꺼리는 추세이며, 세계적 기업은 합성의약품의 대안으로 천연물 유래 신소재 개발에 박차를 가함.

㉣ 프로바이오틱스는 체내에 들어가서 건강에 좋은 작용을 하는 살아있는 균을 말하며, 현재까지 알려진 대부분의 프로바이오틱스는 젖산균이며 일부 *Bacillus*(간균) 등을 포함함. 프로바이오틱스를 섭취할 때, 프리바이오틱스(Prebiotics)라고 불리는 식이섬유, 올리고당 등과 함께 섭취하면 장내에서 유해균은 이용하지 못하고 프로바이오틱스만 이용할 수 있으므로 효과를 극대화할 수 있음. 일반적으로 프로바이오틱스와 프리바이오틱스를 함께 섭취할 수 있게 제조된 제품을 신바이오틱스(Synbiotics)라고 함. 본 연구에서는 프로바이오틱스의 성장을 촉진하면서 저열량, 저GI(Glycemic Index)의 난소화성 프리바이오틱스, 그리고 연구 중 개발되는 생물전환 천연 소재들을 포함하는 새로운 Synbiotics를 개발하고 발효 식음료에 대한 적용으로 식품안전 특성을 확보하고자 함.

㉤ 생체이용성을 증가시키기 위하여 adjuvant 이용(예; piperine), nano 입자 형성 (나노커큐민), 커큐민 유도체 합성하여 섭취하거나 polymeric delivery system을 이용한 제형이 의약학 분야에서 개발되고 있음(Naksuriya et al., Biomaterials 2014). 본 연구팀은 기존의 방법과는 달리 커큐미노이드 등과 같은 난수용성 천연기능 소재의 수용화를 위한 차별화된 원천 기술을 가지고

있어 이를 활용한 커큐미노이드의 수용성 및 생체이용 강화를 위하여 천연 감미소재이며 천연 용제 기능을 가지는 스테비올 배당체를 이용한 커큐미노이드 수용화 방법을 이용하여, 천연물에 포함된 여러 플라보노이드 물질 중 불용성 기능 성분을 수용화 하는 기술을 바탕으로 항균 식품안전 소재를 추가 개발하고 특성 연구를 진행함.

㉞ 생체이용성을 증가시키기 위한 다른 방법으로 당전이 효소를 이용한 천연 기능 소재의 배당체합성 기술은 본 연구팀에서 2단계 연구사업에서부터 꾸준히 개발하고 있고, 이미 확보한 김치 유래 레우코노스톡 균(*Leuconostoc* sp)을 포함하는 다양한 미생물들로부터 당전이 효소를 생산하여 불용성 혹은 난수용성 식품 및 화장품 소재를 수용화하는 기술을 확보하고 있음(Kim et al., J Agr Food Chem 2016). 3단계 연구에서는 추가 개발되는 천연 식품안전 플라보노이드들의 배당체를 확보하고, 수용화된 다양한 중합도의 프리바이오틱스 개발을 진행하였고, 난수용성 항균 천연 기능 소재들의 상업적인 활용성 다양화를 하는 방법을 제시하고자 하였음.

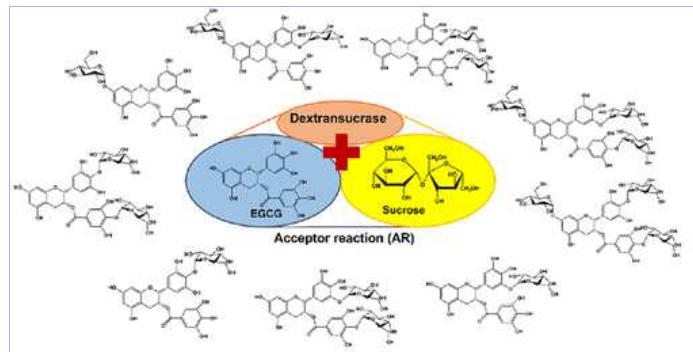


Fig. 1 EGCG 배당체화

○ 제 2핵심

- 제 2-1세부(세니젠 박정웅)

- 국내의 경우 초고온 과열 증기 관련 기술은 식품 분야에 있어 조리, 저장기간 증진과 관련되어 많은 연구가 진행되고 있으며 주된 내용은 초고온 과열 증기를 이용한 high temperature short time 처리를 통한 식품의 품질을 보존하는 방법에 관한 것임. 현재까지 초고온 과열 증기를 이용한 식중독 균 및 식중독 균 바이오필름 제어 연구는 보고된 바 없고, 식품 외 분야에 있어서는 폐기물 처리, 목재 건조 등에 있어 주로 적용되고 있음.
- 국내 한 연구팀은 고등어 조리에 있어 250 ℃의 초고온 과열 증기 처리를 적용하였으며 이를 통해 구이용 전기팬 조리에 비해 색깔, 텍스처, 맛, 냄새 등에서 월등한 품질 향상 효과를 가져 온다는 것을 확인하였음. 또한 영양 성분의 저하도 덜 일어나는 것을 확인하였음. (유광연 외, 2016).
- 국내 한 연구팀은 현미의 저장기간 증진을 위한 목적으로 초고온 과열 증기 처리를 적용하였음. 현미의 산패와 관련된 lipoxygenase의 경우 160 ℃, 200 ℃, 240 ℃ 초고온 과열 증기를 처리하였을 때 20 초, 15 초, 5 초 후 불활성화 되는 것을 확인할 수 있었음. 초고온 과열 증기를 처리한 시료를 15 일간 저장한 후 산가와 관능평가를 실시하였을 때, 산

- 가는 처리시간이 증가할수록, 온도가 높을수록 낮은 값을 나타내었으며, 관능평가 결과도 같은 경향을 보임. (김고래 외, 2016)
- 국외의 경우 국내와 마찬가지로 식품 분야에 있어 초고온 과열 증기 관련 연구는 식품의 조리, 품질증진, 건조에 대한 것이 주를 이루고 있으며 식중독 균 제어 관련 연구는 본 연구진의 연구 내용을 포함 몇 편의 논문이 보고된 바 있음.
 - 호주의 한 연구팀은 돼지고기의 건조에 초고온 과열 증기 및 건열 처리를 적용하였음. 그 결과 초고온 과열 증기 처리 시 건열 처리에 비해 품질 손상 없이 더 빠른 시간 내에 water activity를 감소시킬 수 있다는 것을 확인하였음. (Speckhahn et al., 2010)
 - 일본의 한 연구팀은 초고온 과열 증기와 적외선 가열의 병행 처리를 통하여 아몬드에 집중된 살모넬라를 제어하는 연구를 수행하였음. (Bari et al., 2010) 초고온 과열 증기 (115 °C)를 70 초간 처리한 후 적외선을 70 초간 순차적으로 처리하였을 때 5 log 이상의 제어 효과가 나타나는 것을 확인하였으며 아몬드의 품질에는 영향이 없다는 것을 확인하였음.
 - 과채류의 경우 superheated steam 처리를 장시간 하였을 때 일부 과채류에서 껍질이 벗겨지고 물렁해지는 결과가 나타났으며 열채류의 경우에도 변색이 확인되었음.
 - 최근 식중독균 제어 가열 신기술인 RF, SHS, ohmic heating에 대한 관심이 높아지면서, 가열 신기술을 이용한 식중독균 제어 연구가 이루어지고 있음. 특히 수분활성도가 낮은 식품 내 식중독균 제어를 위한 SHS 및 RF 적용 연구들이 활발하게 이루어지고 있음. 또한 액체 식품 및 반고체 식품의 살균을 위한 ohmic heating의 응용 연구들이 진행되고 있으며 이러한 연구들을 통해서 식품 내 식중독균 제어 뿐 아니라 식품의 품질 유지 및 보존성 향상을 위한 다방면의 접근이 이루어지고 있음.
 - 국내에서는 신 가열 기술 (RF, SHS, ohmic heating)의 단독 처리를 통한 식중독균 저감 연구가 수행된 바 있으나, 신 가열 기술을 기반으로 한 조합 시스템에 대한 연구는 전무한 실정임.
 - 시뮬레이션 예측 모델의 개발은 산업화 적용을 위해 필수적임에도 불구하고 신 가열 기술에 대한 시뮬레이션 예측 모델 개발 연구는 전무한 실정임.
 - 장 등에 따르면 47 개의 생식원료를 대상으로 일반세균 (총균수), Yeast and Molds, 대장균군, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*의 오염현황을 조사한 결과에 따르면 대장균군의 경우 15 개의 시료에서 102 CFU/g을 상회하는 것으로 나타났으며, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* 등 식중독 세균은 현미, 보리, 수수, 찹쌀 등 주로 곡류에서 검출되었으나 원료별로 뚜렷한 경향은 없었으며, 모두 102 CFU/g을 이하로 식중독을 일으킬 수 있는 균량은 검출되지 않았다고 보고하고 있음. 또한 18 개 회사 20 개의 최종제품에서는 대장균군의 경우 4 개 제품을 제외한 16 개 제품에서 검출되었으며, 식중독균의 균수는 대부분 102 CFU/g을 넘지 않았지만, *Staphylococcus aureus*는 1 개 제품을 제외한 모든 제품에서 검출되었으며 105 CFU/g을 초과하는 제품도 2 개가 있었고, *Bacillus cereus*가 11 개 제품에서 *Clostridium perfringens*가 15 개 제품에서 검출되어 위생상 문제가 있는 것으로 나타났음. (장 등, 시판생식의 제조공정 및 최종제품의 미생물분포, 식품과학회지 36(3), 2004)
 - Acetic acid, citric acid, lactic acid, tartaric acid, malic acid 등 다양한 유기산은 과채류에 내재하는 호냉성균과 중온성 균을 비롯한 다양한 부패 및 위해미생물에 강한 항균 활성을 보이는 것으로 알려져 있음. (Bari 등, 2005; Rico 등, 2007)

- 유기산은 미생물을 둘러싼 환경의 pH를 감소시켜 세포막의 투과성 및 이온 교환을 교란하며, 세포막 내부로 유입된 후 비헤리 형태로 전환되면서 세포막의 pH 균형 및 이온 교환의 항상성을 유실하게 하고 기능성 단백질을 변성시켜 위해 미생물을 사멸하게 함. (Beuchat, 2000; Van Immerseel 등, 2006)
- 많은 연구자들이 과채류의 위해 미생물을 살균 하기 위한 목적으로 ascorbic acid, citric acid, lactic acid 등의 천연 유기산을 다양한 온도, 시간 조건에서 적용해 왔으며, 다른 항균활성 물질과의 시너지 효과를 확인하기 위한 연구를 수행해 왔음. (Zhang과 Farber, 1996; Beuchat, 2000; Parish 등, 2003; Bari 등, 2005; Rico 등, 2007)
- 차아염소산 (hypochlorous acid, HOCl)은 염소 (Cl-)가 물에 용해 되었을 때 물 분자가 분해되어 생성된 산소와 염소가 결합하여 생성되는 차아염소산염 (ClO-)와 수소이온 (H+)이 결합하여 생성되는 물질임. (Unangst 등, 2004) 특히, 미산성차아염소산수는 인체에 유해할 수 있는 부작용이 매우 낮으면서 살균효과는 높은 것으로 알려져 있음. (Abadias 등, 2008; Koide 등, 2009; Rahman 등, 2010)

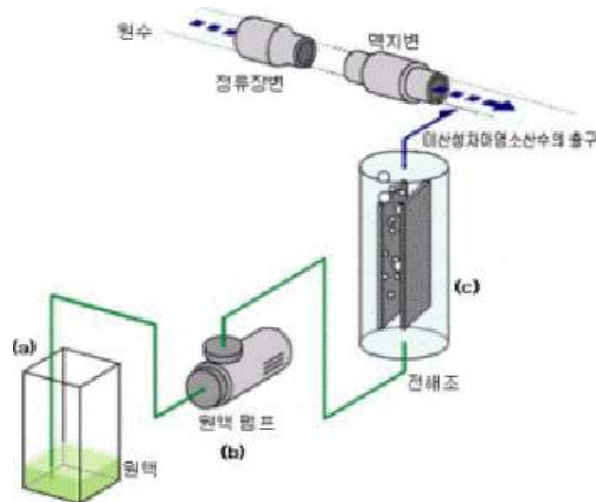


Fig 1. 차아염소산수 생성 프로세스

- 차아염소산은 살균 소독제로서 유리염소 성분이 세균의 세포막 투과성 장애를 유발하고 원형질을 산화시킴. 또한 차아염소산은 세균의 효소반응을 저해함으로써 강력한 살균 소독력을 나타냄. (Thomas 등, 1979) 특히, 전기분해로 얻어지는 차아염소산을 주성분으로 하는 전해수는 미생물의 세포벽, 지질 및 DNA 등에 작용하여 미생물의 대사기능을 억제시키는 강력한 살균작용을 나타냄. (Jeong and Park, 2013; Prutz 등, 1996; Xiong 등, 2010)
- 차아염소산수는 식품 염산수를 무격막 전해조로 전기분해하여 물로 희석시켜 조제 된 것을 말함.
- 국내의 경우 차아염소산을 이용한 살균 소독은 식품첨가물 공전에 의거하여 식품첨가물 살균소독제로 사용이 가능하도록 되어 있으며, 유효염소 10~80 ppm 이상을 함유하여야 하며, 과실류, 채소류 등 식품의 살균목적으로 사용이 가능하도록 되어 있음.
- 차아염소산수의 경우 세포막을 통과한 염소의 산화력에 의해 내부의 핵산이나 단백질을 파괴시켜 유해 미생물을 불활성화 시키는 기작으로 살균 소독이 진행됨.

- 식용 염산수를 염산탱크 (a)에 보존시킨 뒤 펌프(b)로 전해조(c)에 공급하고 전해조에 직전류가 걸리면서 전기 분해되어 생성 되게 된다. 그러나 살균력을 높이기 위해 유효염소의 농도가 높아져야 한다거나 살균하는데 걸리는 시간이 길다는 것이 단점으로 꼽히며, 아포 외피를 통과하기 힘들기 때문에 아포 형성균의 살균에는 적합하지 않다는 단점이 있음.
- 또한 유기물 존재 시 살균력이 저하되기 때문에 유제품 등 유기물이 많이 존재하는 식품의 살균에 있어서 적합하지 않다는 단점이 있음.
- super-heated steam 과 HOCl은 각각 식품에 있어 단독물질로써 살균소독이 가능 하지만 super-heated steam의 경우 물리적 처리로 인하여 장시간 혹은 고온에서 식품의 변색 혹은 텍스처의 변화가 발생되었으며, 차아염소산수의 경우 유기물의 존재 시에 살균력이 저하 된다는 단점이 있다. 그러므로 두 가지 살균소독 방법을 순차살균 처리를 통하여 식품의 외관을 변화시키지 않으며, 살균소독력의 상승효과를 기대할 수 있는 연구를 진행하고자 함.

㉓ 식중독균 검출 및 제어기술의 전망

- 식품산업별로 식중독균을 검출할 수 있는 신속검출법의 개발은 빠른 시간에 식중독의 원인을 찾아내 대응 방안을 마련할 수 있고, 식품원료와 식품을 제조하는 시설 및 작업장 내 미생물학적 안전성을 유지한다면 식품 제조 과정에서 야기할 수 있는 식중독을 예방할 수 있기 때문에 식품안전성 향상 및 사회, 경제적으로 많은 비용을 절감할 수 있을 것으로 기대됨.
- 최근 가열 및 비 가열 시스템을 기반으로 한 조합 시스템의 개발 및 적용에 대한 연구가 주목을 받고 있음. 특히 식품의 품질을 유지 및 향상 시킬 수 있는 조합 신기술에 대해 여러 기업들이 관심을 갖고 있음. 기존 연구의 결과들을 바탕으로 하여 가열 신기술의 문제점을 보완하고 그 효율을 증대시킬 수 있는 조합 시스템을 개발한다면 이는 식품안전성 향상 및 경제적으로도 많은 절감을 기대할 수 있을 것임.
- 식품원료와 식품제조시설 및 작업장 내 생물학적 안전성을 확보할 수 있는 살균 시스템의 적용은 식품 안전에 대한 관심과 국민 건강을 위해 지속적으로 강화될 것으로 보임.

㉔ 기존 연구의 문제점

- 유기산과 중성지방산의 시너지 효과에 대한 연구는 국내에서 수행된 바 있으나, 유기산과 HOCl (미산성차아염소산)을 병합살균 방법에 의한 시너지 효과에 대한 연구는 없는 상태이다. 또한 유기산을 이용한 신선편의식품에 대한 미생물 저감 효율을 평가하는 일부 연구는 되었으나 식품원료나 식품 제조 시설, 작업장에서 상승효과를 나타낼 수 있는 병합살균 시스템의 상용화 사례는 없음.
- 신 가열 기술을 통해 짧은 시간 안에 식중독 균을 사멸시킬 수 있음에도 불구하고 높은 온도에 의해서 식품의 품질이 변질될 가능성이 있음. 특히 온도에 의해 품질 변화가 쉽게 일어날 수 있는 여러 식품들에 대해서는 신 가열 기술의 단독 처리의 적용은 한계가 있음. 따라서 신 가열 기술의 처리 온도를 낮추면서 식품 안전성을 확보할 수 있는 조합 처리 시스템의 개발이 필요한 실정임.
- RF, SHS, ohmic heating 기술은 차세대 식품살균 및 공정살균 기술로써 각광 받고 있으나 시뮬레이션 예측 모델의 개발 연구가 미미한 상태임. 식품 산업에 신규 가열 살균을 적용

하기 위해서는 시뮬레이션 예측 모델의 개발 및 검증이 필수적임.

- multiplex real time PCR kit는 주로 병원성 바이러스 등 진단용으로 상용화 되었으며 식중독균을 검출하기 위한 real-time PCR kit도 시장에 진출한 상태이나 식품품목별에 따른 multiplex real-time PCR kit의 상용화 사례는 없음.

㉔ 본 연구의 차별성 및 필요성

- 최근에는 과일과 채소의 신선도에 미치는 영향은 적고 인체에 무해한 다양한 살균기술이 연구되고 있는데 이 중 한 방법이 각종 기능수인 전해수, 오존수, 차아염소산수 등을 이용한 세척임. 염소수를 사용할 경우 항균작용은 뛰어나지만 이미, 이취에 의한 관능적 품질 저하, 과채류의 손상 및 잔류염소에 의한 2차적 위해 등의 문제점이 있어 반드시 여러 번의 행균 과정을 거쳐 염소 농도를 식수와 동일한 수준으로 낮추어야 하는 문제가 있음. 한편 소량의 식염을 물에 첨가해 전기분해하여 얻어지는 전해수 (Electrolyzed water)는 강한 살균력과 함께 적용범위가 넓고, 미생물, 유기물과 접촉하여 살균한 후 휘발성 기체와 물로 되어 일반화학약품과는 달리 유해한 잔유물이 생기지 않고 인체에도 전혀 해를 미치지 않는 장점이 있음. 따라서 강력한 살균 효과를 갖는 전해수인 미산성차아염소산수와 유기산 또는 super-heated steam을 병합하여 식품원료 및 식품 제조 시설과 작업장에 적용할 경우 작업자와 식품에 안전하면서 위해를 야기할 수 있는 미생물을 제어할 수 있는 현장 적합형 제품을 상업화할 수 있을 것으로 보임.
- 본 연구에서는 신 가열 기술을 기반으로 하여 새로운 조합 처리 기술을 개발하고자 함. RF, SHS, ohmic heating 각각의 특성이 다르기 때문에 각 기술에 맞게 조합할 수 있는 물리적, 화학적 처리를 screening 하고자 함. 신 가열 기술을 기반으로 한 조합처리 기술을 개발한 후에는 식품 내 식중독균 저감에 대한 시너지 효과 및 식품 품질 변화를 확인하고자 함. 또한 조합 처리 기술의 적용을 통한 식품의 품질 향상 정도를 각 기술의 단독 처리와의 비교함으로써 조합 처리 시스템 적용의 식품 안전성 및 경제적 우수성을 검증할 것임. 이는 실제 식품 산업에 조합 처리 기술을 적용할 수 있는 실험적 토대로 될 것으로 사료됨.
- 현재 식품산업에서는 식품에 오염된 병원균을 제어하기 위한 신 가열 기술의 적용에 대한 관심이 증대되고 있음. 하지만 실험적인 결과와 산업에의 적용은 그 간극이 크기 때문에 실제 산업에 적용하기에 앞서 시뮬레이션 예측 모델의 개발은 필수적임. 이러한 시뮬레이션 예측 모델의 개발을 통해 식품 공정 조건별 병원성균 살균 효과를 예측할 수 있을 것이라 사료됨. 따라서 실제 식품 산업에 적용하기 위해 RF, SHS, ohmic heating 기술에 대한 시뮬레이션 예측 모델을 개발하는 것은 매우 중요함.
- 식품품목별 발생 건수가 높은 식중독균의 조합을 확인하고, 이를 동시에 검출하여 편의성을 높이는 multiplex real-time PCR 키트는 식품품목별 발생 빈도가 높은 식중독균 검출이 가능하기 때문에 신속한 검출 및 신속한 대응이 가능할 것으로 예상된다. 따라서 식품품목별로 식중독 사고 발생 시 신속한 대응을 위해서 맞춤형 신속 검출 키트의 상업화는 매우 중요함.

- 제 2-1협동(동국대 이광근, 서울대 강동현)

- 푸란은 현재 국제암기구(IARC)에서 잠재적 발암물질인 2B 등급으로 등재되어 관리되고 있다. RFP에서 제시된 바와 같이 식품의 가열공정을 위주로 한 식품제조 및 조리과정 중에 생성되는 푸란에 대한 저감화 연구는 국내외적으로 매우 미흡한 현실이다. 이는 푸란 형성이 생산 후 저장·유통 중에 생성되는 것이 아니라 열처리를 위주의 식품 제조과정 및 조리과정에서 생성되기 때문이다. 따라서 현 시점의 푸란 저감화 연구는 국제적으로도 의미 있는 사업이 될 것이다.
- 바이오제닉 아민은 단백질을 함유한 식품이 부패하거나 발효식품의 발효, 숙성 과정 중 생성되는 물질이기 때문에 단백질 함량이 높은 콩을 주원료로 하여 발효시키는 된장의 경우, 바이오제닉 아민에 쉽게 노출될 수 있으므로 지속적인 모니터링 및 관리가 필요하다.
- 최근 RF에 대한 관심이 높아지면서, 식품가열에 대한 상당한 연구가 이루어지고 있음. 특히, 육류 및 가공품, 과채류, 건조식품, 액체식품 등에 RF 처리를 통한 살균효과를 검증하기 위한 연구가 진행되어지고 있음. 또한 식품의 보존성을 향상시키기 위해 가공 후 RF처리에 관한 연구도 진행되어지고 있다.
- 국내에서는 RF 가열을 통한 목재의 건조, 곡류에서 해충 사멸 등의 연구가 수행된 바 있으나, 식품에 적용된 연구는 전무하며, Ohmic 가열, Super-heated steam 가열 등의 신규 가열 시스템을 통한 식품 병원성 미생물 제어 연구도 전무하다.
- 무선주파수 가열(Radio frequency: RF)은 1Ghz 이하의 고주파를 이용하는 장비설계를 지칭하는 말이다. 고주파 가열 방식 중 유전가열은 전극간에 피 가열체를 넣고, 고주파 전압을 가하면 다음 그림과 같이 쌍극자가 교류전계의 교변에 따라 방향을 변경하면서 인가주파수와 동일한 진동을 일으키게 된다. 진동효과는 열에너지로 변환되어 가열수단으로 이용된다. 즉, 전류에 의해 발생된 열로 식품 내·외부를 동시에 가열함으로써 기존 가열방법보다 급속도로 식품의 온도를 높여 품질 보존 및 병원균 살균에 탁월한 효과를 나타낸다.

○ 제 3핵심

- 제 3-1세부(인트론 손지수)

㉞ 국내 기술 수준 및 연구 현황

1) 기술 및 연구 현황

- 국내의 경우, 박테리오파지에 관련하여 활발히 연구를 진행하고 있는 기관들이 최근 많이 등장하고 있으며, 정부지원 연구도 늘어나고 있음.
- 국내 주요 연구 기관 및 연구자로는 서울대학교의 유상열 교수 (식품 세균제어 및 질병 제어에 있어 박테리오파지 활용 기술 개발 및 일부 파지 엔도리신 연구 수행), 서울대학교 최윤재 교수 (축산분야에서의 박테리오파지 활용 기술 개발), 서울대학교 박세창 교수 (수산분야에서의 박테리오파지 활용 기술 개발), 농촌진흥청의 허성기 박사 (식중독 관련 박테리오파지 활용 기술 개발), 중앙대학교 최창순 교수 (식중독 관련 박테리오파지 활용 기술 개발), 경희대학교 오창식 교수 (농업분야에서의 박테리오파지 활용 기술 개발), 가천대학교 박종현 교수 (식품 세균 제어 및 질병 제어에서의 박테리오파지 활용 기술 개발) 등이 있음. 기업차원의 연구기관으로는 (주)인트론바이오테크놀로지가 있음.

- 현재 박테리오파지는 국내에서 사용되어 발표된 연구사례가 아직까지 많이 보고되지 않았으나 박테리오파지에 대한 관심이 점차 늘고 있으며, 관련 연구를 활발히 진행하고 있는 추세임. 국내에서는 현재 사료첨가제 형태로 박테리오파지를 활용하고 있고, 관련 연구논문들의 결과를 일부 제시하면 다음과 같음.

A. 육성돈에게 박테리오파지를 사료첨가제로서 급여하여 실험을 진행하였을 때, “일반 사료를 급여” 한 그룹(N.C), “일반사료+항생제를 급여” 한 그룹(P.C)과 “일반사료+박테리오파지를 급여” 한 그룹(B.T)으로 무작위로 나누어 실험한 결과 N.C를 제외하고 P.C와 B.T에서 DM digestibility가 증가하였음.

B. 항생제와 박테리오파지를 사료에 첨가하여 급여한 돼지에서는 살모넬라와 대장균의 생균수가 감소됨을 확인할 수 있었지만, 항생제를 첨가한 돼지에서는 락토바실러스의 생균수도 감소되는 것을 확인하였음.

C. 산란계에 박테리오파지를 사료첨가제로서 급여 하여 산란율, 계란의 질, 배설물의 균총을 확인하였을 때, 박테리오파지를 첨가하지 않은 대조군과 박테리오파지를 농도에 따라 T1(최종 농도: 0.020%), T2(최종 농도: 0.035%)와 T3 (최종 농도: 0.050%)로 나눠 실험한 결과 0~3주차 기간 동안 T2와 T3가 대조군과 T1에 비해 생산지수(산란율 및 계란의 질)가 더 향상되었음을 확인함. 4~6주차에서는 대조군보다 박테리오파지를 급여한 산란계 집단에서 높은 산란율을 확인 하였음. T2는 4주차부터 호우유닛(haugh unit)이 대조군보다 증가하여 계란의 신선도가 높아지는 것을 확인하였고, T1과 T3도 5주차부터 대조군보다 계란의 신선도가 점차 향상되는 것을 확인할 수 있었음.

D. 한우 송아지에게 박테리오파지를 사료첨가제로 급여하였을 때, 송아지의 설사 발생율이 급격하게 감소하였고 연변 개체의 분변 지름이 감소하였음. 또한 소화율 및 사료효율개선으로 사료섭취량이 증가하였고 일당증체량 및 육질향상에 기여하였음. 급여 2주 후부 터 측사 내 악취감소 효과가 보였고, 분변 내 대장균, 클로스트리디움 퍼프리젠스 와 살모넬라 등 유해균이 대조군에 비해 10^{-1} 이상 감소된 것을 확인할 수 있었음.

㉠ 국외 기술 수준 및 연구 현황

1) 기술 및 연구 현황

- 세균에 대한 직접적 항균 작용을 나타낼 수 있는 용균성 박테리오파지는 현재 다양한 분야 (농업, 축산, 수산, 식품, 및 의료 등)에서 활용되고 있음.

Product	Description	Company	Website
AgriPhage™	Targets bacterial spot or bacterial speck on crops, with specific formulations for strains of <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> or <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i>	Omnilytics	http://www.phage.com
BioTector	Animal feed for control of <i>Salmonella</i> in poultry	CheilJedang Corporation	http://www.cj.co.kr/
EcoShield™	Targets <i>Escherichia coli</i> O157:H7 contamination in foods and food processing facilities	Intralytix	http://www.intralytix.com
FASTPlaque-Response™	Rapid detection of rifampicin resistance in smear-positive sputum specimens containing <i>M. tuberculosis</i>	Biotech Laboratories/Lab21	http://www.biotec.com
FASTPlaqueTB™	Rapid detection of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in human sputum samples	Biotech Laboratories/Lab21	http://www.biotec.com
ListShield™	Targets <i>Listeria monocytogenes</i> contamination in foods and food processing facilities	Intralytix	http://www.intralytix.com
LISTEX™ P100	A food processing aid that targets <i>L. monocytogenes</i> strains on food products	EBI Food Safety	http://www.ebifoodsafety.com
MRSA/MSSA Blood culture test	Determining of <i>Staphylococcus aureus</i> methicillin resistance or susceptibility directly from blood cultures	Microphage	http://microphage.com
MRSA Screening test	Identifies methicillin-resistant <i>Staph. aureus</i> (MRSA) for use in Infection Control programs	Microphage	http://microphage.com
MicroPhage MRSA/MSSA test	Differentiation of methicillin-resistant (MRSA) and methicillin-susceptible (MSSA) <i>Staph. aureus</i>	Microphage	http://microphage.com

Fig 1. 박테리오파지의 활용사례

- 전 세계적으로 항생제 사용량의 증가로 인한 항생제 다제내성균 (multi drug resistant bacteria) 출현의 문제가 크게 이슈화되면서 이를 해결할 수 있는 방안으로 기존의 항생제와는 다른 mode-of-action을 가지는 새로운 항생제 대체 소재 개발이 요구되었으며 이에 대한 후보 물질로 박테리오파지에 대한 관심이 높아지고 있음.
- 이러한 새로운 항생제 대체 후보물질로 활용 가능한 박테리오파지의 안전성은 이미 여러 문헌을 통해 증명된바 있으며^{1),2)}, 이에 더하여 United States Food and Drug Administration (USFDA) 및 US Department of Agriculture (USDA)는 박테리오파지를 Generally Recognized As Safe (GRAS)로 취급하며 그 안전성을 인정한 바 있음³⁾.
- 박테리오파지 기반 제품은 다양하게 상업화 되고 있음. 2006년 미국 식약청은 리스테리아 박테리오파지의 식품 적용을 허용 하였고 (ListShield), 2010년에는 미국의 Organic Materials Review Institute (OMRI)에서 리스테리아 박테리오파지를 유기농으로 판정하였음. 2011년 미국 식약청은 대장균 박테리오파지의 식품 적용도 허용하였으며 (EcoShield), 최근 살모넬라 박테리오파지의 식품첨가제로의 허가되었음 (SalmoShield). 또한 동물용 의약품으로 INT-401 (*Clostridium perfringens* 감염 처치용 제제)과 PLSV-1 (살모넬라 감염 처치용 제제)을 허가하기도 하였음.
- 또한, 박테리오파지의 농업분야에서의 활용도 보고되고 있음. 일부 사례를 제시하면 apple blossom의 *Erwinia amylovora* 감염 처치에도 활용되었으며⁴⁾, tomato의 *Ralstonia solanacearum* 및 *Xanthomonas campestris* 감염 처치에도 활용되었음⁵⁾. 관련하여 미국의 Omnilytics사에서는 biocontrol product인 AgriPhage 제품을 출시하였음. 이 제품은 처음에는 tomato와 pepper의 세균성점무늬병 (bacterial spot)을 처치하는 목적으로 개발되었지만 다양한 작물들에도 효과가 있다고 알려져 있음. 이 제품은 북아메리카와 남아메리카에서

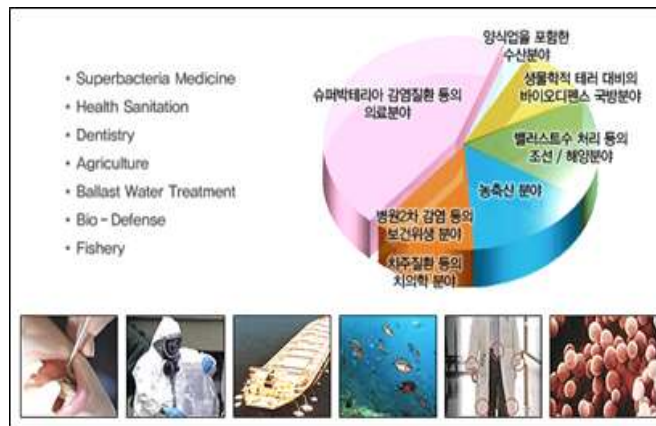
먼저 상업화되었으며 최근에는 아시아에서도 상업화에 성공하였음. 특히, 2006년에는 Organic Material Review Institute (MRI)로부터 유기농에 적합한 제품으로도 인정을 받았음.



<AgriPhage 제품 설명서 (출처: <http://www.omnilytics.com/home1.html>)>

㉔ 전망

- (주)인트론바이오테크놀로지사는 다른 산업 분야에서의 박테리오파지 활용을 위한 연구 개발도 활발하게 진행하고 있으며, 향후 박테리오파지의 응용연구 및 산업적 활용은 점차 증가할 것으로 예상됨.



<박테리오파지의 활용성>

- 제 3-1협동(서울대 유상열)

㉕ 국내외 연구현황 및 전망

- 2015년 WHO 통계에 의하면 매년 전 세계 인구 10명 중 1명이 식중독을 경험하며, 이중 평균 약 420,000명이 식중독 관련 질병으로 목숨을 잃고 있음¹⁾. 이와 같은 이유로 학계, 식품산업계, 정부기관, 그리고 소비자들 모두에게 식품 안전성 향상에 대한 요구는 꾸준히 증대되고

있으며, 식중독균 제어 기술의 중요성이 크게 부각되고 있음.

- 항생제 저항성 균인 슈퍼 박테리아가 출현하면서, 항생제를 대체하기 위한 다양한 연구 및 노력이 이루어지고 있음. 박테리오파지는 특정 세균을 강하게 사멸할 수 있는 능력을 가지고 있기 때문에 항생제의 대체재로 주목을 받고 있으며, 실제 병원균을 제어하기 위한 산업적 용도로 개발되고 있는 실정임²⁾.

- 미국 Intralytix 사에서 박테리오파지 cocktail 기법을 활용하여, ListShield™, EcoShield™, SalmoFresh를 개발하였고³⁾, 이 제품은 식품 첨가물로 사용하여 *Listeria*, *E coli* O157:H7, *Salmonella* 을 제어하는 생물학적 제재로 실제 이용되고 있음.

- 국내의 인트론바이오테크놀로지 사는 엔돌라이신으로 슈퍼박테리아 감염증을 치료하는 바이오신약을

개발하고 임상 1상을 통과하였음.

- 글로벌 항생제 시장이 2015년 기준 398억 달러 규모를 형성한 데 이어 2024년이면 570억 달러에 도달할 수 있다고 전망되었고, 2015년 9월 UN이 항생제 내성 문제를 현대 의학의 최대 위협으로 규정하고 국제적 공조, 대응의 필요성을 강조하면서 전 세계적으로 항생제 내성에 대한 관심이 커지고 있음.

3. 연구개발 내용 및 인력양성 프로그램 운영

3-1. 연구개발 내용

○ 제 1핵심

- 제 1-1세부(서울대 최상호, 하남출)

연차	연구개발 내용	연구자
최종	독성인자 발현제어 선도물질 유래 신개념 식품안전소재 도출	최상호
후속1차	독성인자 조절자 제어 선도물질의 효능 유전체기반 검증 - 패혈증 비브리오균의 독성인자 발현 조절자 HlyU의 활성을 제어하는 선도물질 CM2660의 효능을 검증함 - CM2660이 패혈증 비브리오균의 독성을 효과적으로 저해함을 human cell line과 mouse model을 이용하여 확인함 - CM2660 처리 유무에 따른 패혈증 비브리오균의 transcriptome을 비교 분석하였으며, CM2660에 의해 발현이 억제되는 독성 유전자 operon <i>rtxHCA</i> 및 <i>rtxBDE</i> 를 marker 유전자로 발굴함 - Marker 독성 유전자 operon <i>rtxHCA</i> 및 <i>rtxBDE</i> 의 발현 및 기능 특성을 규명함	최상호
후속2차	독성인자 조절자 제어 선도물질 유도체들의 구조-활성 상관관계 분석 - HlyU marker 독성 유전자- <i>lux</i> Reporter strain을 구축하고 screening 최적 조건을 결정함 - 제어 선도물질 유도체들의 marker 독성 유전자 발현억제 효능을 파악함 - 패혈증 비브리오균의 생장을 저해하지 않으면서 낮은 EC ₅₀ 을 값을 보이는 CM2660을 최적 선도물질로 선발함 - 최적 선도물질 CM2660의 HlyU 제어 분자기전을 규명함	최상호, 하남출
후속3차	독성인자 조절자 제어 선도물질 최적화 및 식품안전 후보물질 도출 - 제어 선도물질 CM2660의 패혈증 비브리오균 이외에 여러 병원성 비브리오균에 대한 독성 억제 효능을 확인함 - Human cell line과 mouse model을 이용하여 CM2660의 안전성을 검증함 - 패혈증 비브리오균에 의한 오염 가능성이 있는 식품 중 굴을 pilot scale 모델식품으로 선정함 - 모델식품 굴 접촉 시 패혈증 비브리오균의 독성 유전자 발현여부를 확인함 - 굴 접촉 시 CM2660의 패혈증 비브리오균 독성 유전자 발현억제 효능을 확인하였으며, 식품안전 후보물질로써 도출함 - 천연물을 이용한 패혈증 비브리오균의 독소 발현인자 HlyU의 억제제, CM2660의 제형을 개선함	최상호, 하남출

- 제 1-2세부(서울대 김도만, 우리두)

연차	연구개발 내용	연구자
최종	식품 맞춤형 천연 항균 소재 생산 최적화: 생물전환기술 활용 항균 신바이오틱스 식품 안전 항균 소재 생산 최적화 및 적용	김도만, (주)우리두
후속1차	- 유산균 발효액을 이용한 수용성 커큐미노이드 및 폴리페놀 화합물 생산 최적화 - 개발 식품 안전 소재의 항균, 항산화 등 식품 안전 특성 연구	김도만
후속2차	- 유산균 발효액을 이용한 난소화성 항균 신바이오틱스 화합물 생산	김도만,

	최적화 - 개발 식품 안전 소재의 항균, 항산화 등 식품 내 안전 및 물질 특성 연구	(주)우리두
후속3차	- 유산균 발효액을 이용한 저열량 항균 천연 감미 화합물 생산 최적화 - 개발 식품 안전 소재의 항균, 항산화 등 식품 내 안전과 물질 특성 연구 - 천연 및 발효 식음료 환경에 대한 적용으로 식품 안전 특성 확보	김도만, (주)우리두

○ 제 2핵심

- 제 2-1세부(세니젠 박정웅)

연차	연구개발 내용	연구자
최종	식중독균 검출 및 제어기술들의 제품화 및 상용화	박정웅
후속1차	- 현장모니터링을 통해 설비표면 및 작업장바닥 오염도 현황 조사 - Superheated steam 과 HOCl 소독제의 순차살균을 통한 상승효과 검증 - Superheated steam 과 HOCl을 기반으로한 설비표면 및 작업장바닥 용 맞춤형 살균시스템 개발 및 현장검증	박정웅
후속2차	- 현장수요조사를 통해 식품품목별 분석빈도 높은 식중독균 조합 조사 - 다양한 조합의 식중독균 multiplex realtime PCR kit 개발 - 5종 이상의 Multiplex Real-Time PCR kit 제품화 및 식품품목별 현장검증	박정웅
후속3차	- 유기산과 HOCl 복합처리를 통한 미생물 살균 상승효과 검증 - 유기산과 HOCl 복합처리용 식품원료 살균시스템 개발 - <i>Bacillus</i> 포자를 제어할 수 있는 식품원료 살균시스템 개발 및 현장 검증	박정웅

- 제 2-1협동(동국대 이광근, 서울대 강동현)

연차	연구개발 내용	연구자
최종	식품 내 생물학적, 화학적 위해인자 저감화 기술 현장적용 및 산업화	이광근 강동현
후속1차	식품 맞춤형 천연 항균 소재 생산 최적화 및 생물학적 위해인자 저감화 기술 현장 적용 및 산업화 - 생물전환기술 활용 수용성 강화 식품 안전 천연 항균 소재 생산 최적화 및 적용 - 신규 가열기술과 비가열 기술의 조합처리 시스템 구축 및 메커니즘 규명 - 생물전환기술 활용 항균 신바이오틱스 식품 안전 항균 소재 생산 최적화 및 적용 - 구축 된 조합 처리 시스템의 식품적용 연구를 통한 최적화 조건 확립 - 생물전환기술 활용 저열량 항균 천연 식품 안전 항균 소재 생산 최적화 및 적용	김도만 강동현

	<p>신규 가열기술과 비가열 기술의 조합처리 시스템 구축 및 메커니즘 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> - 최적 조합처리 구성을 결정하고 가장 효율적인 조합처리의 조건을 도출 및 비교 검증함 - 식품 특성을 고려하여 가정 효과적으로 병원성 미생물을 사멸시키는 처리 방법을 모색함 - 조합처리 후 식품의 색도, texture, 수분함량 등 주요 품질 변화를 측정하여 품질에 영향을 미치지 않으면서 효율적인 미생물 제어를 위한 최적 조건을 도출함 	
<p>후속2차</p>	<p>식품모델시스템을 활용한 식품의 가공·저장 중 유해물질 저감화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 불포화 지방산 다량 함유 고체 식품 중 퓨란 분석법 확립 및 유효성을 검증함 - 다소비 견과류(아몬드 등 5종)의 열처리 모델 시스템에서의 퓨란 생성량을 분석함 - 퓨란 생성과 온도와의 관계를 확인하기 위한 Kinetics 연구를 수행함 - 음료류 중 벤젠 분석법 확립 및 유효성을 검증함 - 시중에 유통되는 음료류 중 벤젠 분석을 완료함 - 음료 모델시스템을 활용한 벤젠 저감화 연구를 수행함 <p>구축된 조합 처리 시스템의 식품 적용 연구를 통한 최적화 조건 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ohmic-essential oil 조합처리를 통해 전기전도도 차이를 분석하고 효과적인 미생물 제어 효과를 검증함 - RF-자외선 조합처리를 통해 분말 식품에서 synergistic 미생물 제어 효과를 확인함 - SHS-lactic acid 조합처리를 통해 식품 표면에서의 효과적인 미생물 사멸을 확인함 - 처리 후 형광분석 및 전자현미경 분석을 통해 미생물 사멸 메커니즘을 규명함 	<p>이광근 강동현</p>
<p>후속3차</p>	<p>식품모델시스템을 활용한 식품의 가공·저장 중 유해물질 저감화 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 인스턴트 라면 중 퓨란 분석법 확립 및 유효성을 검증함 - 라면 모델시스템에서의 퓨란 생성량을 분석 및 저감화 연구를 진행함 - 유해물질 별 분석법 확립 및 유효성을 검증함 - 후추의 조리 및 가공 공정 중 바이오제닉 아민 함량 분석 연구를 진행함 - 김 열처리시스템모델에서의 Kinetics 연구를 수행함 - 고춧가루 열처리시스템모델에서의 Kinetics 연구를 수행함 - 4-Methylimidazole (4-MI) 분석법 확립 및 유효성을 검증함 - 4 종의 무기염 및 2종의 유기산을 첨가한 제 III형 캐러멜색소 모델 시스템을 개발함 - 제 III형 캐러멜색소 모델시스템에서의 색소 안정성 분석을 진행함 <p>시뮬레이션 예측 모델 개발을 통한 신기술의 산업화 적용 기반 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ohmic heating, RF, SHS 시스템의 시뮬레이션 예측 모델 개발을 위한 chamber 도식화 및 chamber의 재질별 물리화학적, 전지화학적 특 	<p>이광근 강동현</p>

	<p>성 등 주요 factor를 도출함</p> <ul style="list-style-type: none"> - Governing equation을 이용하여 boundary condition을 결정하고 mesh를 구성하여 미분방정식의 최적해를 구하기 위한 구성 단위의 모 집단으로 세분화 작업을 진행함 - 미생물의 D-value, Z-value등 살균력 및 온도저항성 관련 factor를 수식화하여 모델 식에 적용함 - 온도상승곡선 및 미생물 사멸 패턴 등을 시뮬레이션 예측 시스템을 통해 도출함 	
--	--	--

○ 제 3핵심

- 제 3-1세부(인트론 손지수)

연차	연구개발 내용	연구자
최종	식중독균 제어를 위한 유용 소재의 대량 생산 공정 구축 및 제제화	손지수
후속1차	유용 박테리오파지의 증식 및 정제 공정 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 3-1 협동과제팀 보유 박테리오파지들 중 산업적으로 활용가치가 높은 박테리오파지 5종에 대해 소규모 증식 및 정제 공정 개발 (증식액 기준 500 mL~1 L, 순도 80% 이상) - 산업화에 적합한 박테리오파지 기반 제형 개발 - 개별 박테리오파지 및 박테리오파지 각테일 제제를 대상으로 장기 보관 안정성 조사 실시 	손지수
후속2차	유용 파지 유래 단백질의 소규모 제조 시스템 개발 (생산/분리/정제) <ul style="list-style-type: none"> - 3-1 협동과제팀 보유 파지 유래 단백질들 중 산업적으로 활용가치가 높은 파지 유래 단백질 3종에 대해 소규모 발현 및 정제 공정 개발 (생산액 기준 500 mL~1 L, 순도 80% 이상) - 산업화에 적합한 파지 유래 단백질 기반 제형 개발 - 파지 유래 단백질의 단기 보관 안정성 조사 실시 	손지수
후속3차	박테리오파지 및 파지 유래 단백질의 산업적 제조 공정 scale-up, 원료의 산업적 제조 공정 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 박테리오파지의 대규모 증식 및 정제 공정 개발 (증식액 기준 50 L, 순도 90% 이상) - 파지 유래 단백질의 대규모 발현 및 정제 공정 개발 (생산액 기준 10 L, 순도 90% 이상) - 3-1 협동과제팀에서 실시될 유효성 평가 시험에 필요한 시료 제조 및 공급 	손지수

- 제 3-1협동(서울대 유상열)

연차	연구개발 내용	연구자
최종	식중독균에 대한 항생제 대체 생물학적 제어기술 현장적용 및 산업화	
후속1차	생물학적 항균 소재 생산을 위한 박테리오파지 선정 및 특성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 1,2단계에서 분리된 박테리오파지 중 건조한 환경 및 고온 환경에서 식중독균에 대한 우수한 사멸능을 갖는 후보군 선정 - 건조 및 고온 조건에서 식중독균에 대한 우수한 사멸능을 갖는 신규 박테리오파지 분리 - 신규 분리된 박테리오파지의 용해능 및 용균 활성 범위 등의 특성 분석 - NGS 기법을 활용한 분리된 박테리오파지의 염기서열 분석 	유상열
후속2차	다양한 제형의 박테리오파지 및 파지 유래 단백질 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 확보된 박테리오파지의 염기서열 정보에 기반하여 기존 항균 단백질과 상동성을 갖는 후보군 선정 - 선정된 항균 단백질 발현 및 용균 특성 분석 - 박테리오파지 및 항균 단백질의 실제 산업 조건 적용을 위한 최적의 제형 선정 - 선정된 제형에 대한 박테리오파지 및 항균 단백질 적용과 용균 	유상열

	특성 분석	
후속3차	식품 처리용 항균제 생산 조건 최적화 및 현장 적용 - 신규 개발 산업용 항균 제제의 다양한 대상 모델에서의 식중독균 사멸능 확인 - 다양한 처리 조건을 기반으로 최적의 용균 효과를 보이는 적용 방법 선정 - 3-1 세부가 보유한 기기 및 기술을 바탕으로 박테리오파지 및 항균 단백질 제제의 lab scale 및 pilot scale 생산 조건 구축 - 실제 현장 적용을 위한 제품 평가	유상열

3-2. 인력양성 프로그램 운영

○ 4차 산업혁명을 선도한 농·식품 분야 석·박사급 전문 인력 양성

- 국내외 농·식품분야 新 산업분야 육성을 위한 전문 인력 양성 체계 확립 및 양성 (10명)
- 식품 안전성 분야 전문 인력 교육 및 지원
- 미래 한국을 이끌어 갈 식품 안전성 분야 산업체 취업 (7명)
- 식품 안전성 분야 창업 지원 (전문가 컨설팅 연 2회 실시)
- 4차 산업혁명 융합 식품 안전성 인력 단기 속성 패키지 프로그램 운영 (7주차 교육, 연 2회 실시)
- 4차 산업혁명 선도 산업체 인력과의 교류 지원 (연 2회 실시)

○ 3단계 주요 추진실적

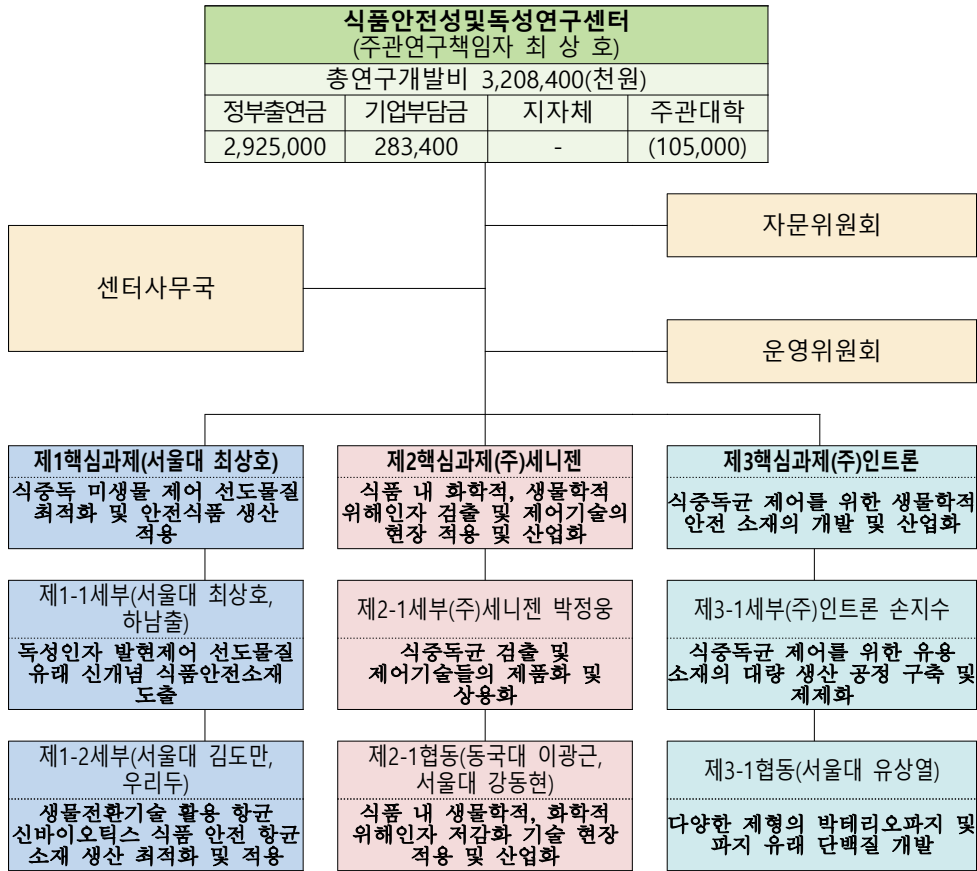
○ 주요성과

- 농·식품 분야 석·박사급 전문 인력 18명 양성
- 관련 연구 분야 산업체 등에 12명 취업
- 관련 연구 분야에 3명 진학(국내 및 국외 박사과정)
- 특허 출원 7건, 특허 등록 2건, 기술이전 3건 실시
- SCI 논문 13건(4건 추가 달성 예정), 학술발표 7건,
- 민간컨설팅 5건
- 전문 인력 양성을 위한 대학 교과 과정 5건 개설
- 산업계 인력 양성을 위한 전문 워크숍 4회 개최

○ 주요 추진내용

- 식품 안전성 분야 전문 석 박사 인력 양성
- 식품 안전성 분야 취업 지원
- 식품 안전성 분야 학술 대회 참여 지원 (참여 대학원생 선발 후 교육 지원)
- 식품 안전성 분야 창업 컨설팅
- 산업계 인력 교류 지원
- ARC 참여를 위한 인턴제 운영: 7주 단기 속과 패키지 교육 실시

4. 센터 운영 성과(1·2·3단계)



4-1. 핵심기술개발 성과 및 활용성과

가. 사업수행실적 총괄

(1) 정량적 성과(총괄)

성과지표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		인력양성			정책활용·홍보		기타	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	석사	박사	취업인력	정책활용		홍보전시
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	명	명				
가중치																				
최종목표	24	7		8		6	500		6			149		15	84	25	22			
1 단계	목표	6										49			26	7				
	실적	16	3									61	3	99	32	10	32			
2 단계	목표	8	1		4							64			36	12				
	실적	44	13		7	103		98.612				144	5	301	67	30	66		15	
3 단계	목표	10	6		4	6	500		6			36		15	22	6	22			
	실적	50	28		10	216.461	13	159.6	11			71	6	109	44	13	34		13	
최종	목표	24	7		8	6	500		6			149		15	84	25	22			
	실적	110	44		17	319.461	13	196.4.6	11			276	14	509	143	53	132		28	

성과지표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		인력양성			정책활용·홍보		기타	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	석사	박사	취업인력	정책활용		홍보전시
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	명	명				
가중치																				
최종목표	10	6		4		6	500		6			36		15	22	6	22			
후속 1차	목표	3	1			1	50		2			10		5	6		4			
	실적	15	9			1	113		4			15	2	27	9	1	6		1	
후속 2차	목표	4	2		2	1	150		2			13		5	8	4	11			
	실적	18	4		3	31.652	5	163	3			26	1	26	18	4	17		4	
후속 3차	목표	3	3		2	4	300		2			13		5	8	2	7			
	실적	17	15		7	184.809	7	132.0	4			30	3	56	17	8	11		9	
3 단계	목표	10	6		4	6	500		6			36		15	22	6	22			
	실적	50	28		10	216.461	13	159.6	11			71	6	109	44	13	34		13	

(가) 논문게재 성과

○ 1, 2단계

연번	게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외구분	SCI구분
			주저자	교신저자	공동저자				
1	2011	Complete genome sequence of <i>Vibrio vulnificus</i> MO6-24/O.	Jin Hwan Park	Sang Ho Choi		J. Bacteriol.	193(8)	국외	SCI
2	2011	Identification and Characterization of a Novel Serine Protease VvpS Containing Two Functional Domains and Essential for Autolysis of <i>Vibrio vulnificus</i> .	Moon Sub Lim	Sang Ho Choi	Byoung Sik Kim, Jong Gyu Lim,	J. Bacteriol.	193(15)	국외	SCI
3	2011	Cooperative regulation of the <i>Vibrio vulnificus</i> nan gene cluster by NanR protein, cAMP receptor protein, and N-acetylmannosamine 6-phosphate	Byoung Sik Kim	Sang Ho Choi	Jungwon Hwang, Myung Hee Kim	J. Biol. Chem.	286(47)	국외	SCI
4	2012	<i>Vibrio vulnificus</i> AphB is involved in interleukin-8 production via an NF- κ B-dependent pathway in human intestinal epithelial cells	Won-Bin Kim	Sang Ho Choi	Byung Cheol Lee	Biochem. Biophys. Res. Commun.	417(4)	국외	SCI
5	2012	Evidence that the <i>Vibrio vulnificus</i> Flagellar Regulator FlhF is Regulated by a Quorum Sensing Master Regulator SmcR	Seung Min Kim	Sang Ho Choi	Dong Hwan Lee	Microbiology	158	국외	SCI
6	2012	Complete genome sequence of <i>Vibrio vulnificus</i> bacteriophage SSP002	Hyun Sung Lee	Sang Ho Choi	Slae Choi	J. Virology	86(14)	국외	SCI
7	2012	Distinct Characteristics of Two2-Cys Peroxiredoxins of <i>Vibrio vulnificus</i> Suggesting Differential Roles in Detoxifying Oxidative Stress	Yeji Bang	Sang Ho Choi	Man Hwan Oh	J. Biol. Chem.	287(51)	국외	SCI

8	2013	Structural insights into the regulation of sialic acid catabolism by <i>Vibrio vulnificus</i> NanR and implications for survival and colonization	Jungwon Hwang, Byoung Sik Kim	Sang Ho Choi, Myung Hee Kim	Song Yee Jang 외 4명	PNAS	110(30)	국외	SCI
9	2013	LuxR Homologue SmcR Is Essential for <i>Vibrio vulnificus</i> Pathogenesis and Biofilm Detachment, and Its Expression is Induced by Host Cells	Seung Min Kim	Sang Ho Choi	Jin Hwan Park et al.	Infect. Immun.	81 (10)	국외	SCI
10	2013	<i>Vibrio vulnificus</i> Bacteriophage SSP002 as a Possible Biocontrol Agent	Hyun Sung Lee	Sang Ho Choi	Slae choi et al.	Appl. Environ. Microbiol.	80 (2)	국외	SCI
11	2014	IscR Is a Global Regulator Essential for Pathogenesis of <i>Vibrio vulnificus</i> and Induced by Host Cells	Jong Gyu Lim	Sang Ho Choi		Infect. Immun.	82 (2)	국외	SCI
12	2014	Low cell density regulator AphA upregulates the expression of <i>Vibrio vulnificus</i> iscR gene encoding the Fe-S cluster regulator IscR	Jong Gyu Lim, Jin Hwan Park	Sang Ho Choi		J. Microbiol.	52 (5)	국내	SCI E
13	2014	Distinct characteristics of OxyR2, a new OxyR-type regulator, ensuring expression of Peroxiredoxin 2 detoxifying low levels of hydrogen peroxide in <i>Vibrio vulnificus</i>	Suyeon Kim, Ye-Ji Bang	Sang Ho Choi	Dukun Kim, Jong Gyu Lim, Man Hwan Oh	Molecular Microbiology	93(5)	국외	SCI
14	2014	Characterization of the <i>Vibrio vulnificus</i> 1-Cys peroxiredoxin Prx3 and regulation of its expression by the Fe-S cluster regulator IscR in response to oxidative stress and iron starvation	Jong Gyu Lim	Sang Ho Choi	Ye-Ji Bang	Journal of Biological Chemistry	289	국외	SCI

15	2015	The <i>cabABC</i> Operon Essential for Biofilm and Rugose Colony Development in <i>Vibrio vulnificus</i>	Jin Hwan Park	Sang Ho Choi	Youmi Jo, Song Yee Jang, Haenaem Kwon, Yasuhiko Lrie, Matthew R. Parsek, Myung Hee kim	PLoS Pathogen s	11	국외	SCI
16	2016	Regulatory Characteristics of <i>Vibrio vulnificus gbpA</i> Encoding a Mucin-Binding Protein Essential for Pathogenesis	Kyung Ku Jang	Sang Ho Choi		Journal of Biological Chemistr y	291	국외	SCI
17	2017	The hydrogen peroxide hypersensitivity of OxyR2 in <i>Vibrio vulnificus</i> depends on conformational constraints	Inseong Jo, Dukyun Kim	Sang Ho Choi, Nam-Chul Ha	Ye-Ji Bang, Jinsook Ahn	Journal of Biological Chemistr y	292	국외	SCI
18	2016	Role of extracellular matrix protein CabA in resistance of <i>Vibrio vulnificus</i> biofilms to decontamination strategies	Jin Hwan Park	Sang Ho Choi	Byungho Lee, Youmi Jo	Internatio n al Journal of Food Microbiol ogy	236	국외	SCI
19	2017	Crystal structure of the regulatory domain of AphB from <i>Vibrio vulnificus</i> , a virulence gene regulator	Nohra Park, Saemee Song	Sang Ho Choi, Nam-Chul Ha	Garam Choi, Kyung Ku jang, Inseong Jo	Molecule s and Cells	40	국외	SCI
20	2016	OxyR2 functions as a three-state redox switch to tightly regulate production of Prx2, a peroxiredoxin of <i>Vibrio vulnificus</i>	Ye-Ji Bang	Sang Ho Choi, Nam-Chul Ha	Zee-Wo n Lee, Dukyun Kim, Inseong Jo	Journal of Biological Chemistr y	291	국외	SCI

21	2011	Intranasal immunization with plasmid DNA encoding spike protein of SARS-coronavirus/polyethyleneimine nanoparticles elicits antigen-specific humoral and cellular immune responses	Byoung Shik Shim	Cheol Heui Yun	Sung Moo Park 외 4명	BMC Immunology	11 (65)	국외	SCI
22	2011	<i>Staphylococcus aureus</i> induces IL-1 β expression through the activation of MAP kinases and AP-1, CRE and NF- κ B transcription factors in the bovine mammary gland epithelial cells	Kyoung Whun Kim	Seung Hyun Han	Jintaek Im 외 3명	Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases	34(4)	국외	SCI
23	2011	Lipoteichoic acid from <i>Lactobacillus plantarum</i> induces nitric oxide production in the presence of interferon-gamma in murine macrophages	Seok-Seong Kang	Seung Hyun Han	Young Hee Ryu 외 4명	Molecular Immunology	48(15-16)	국외	SCI
24	2011	Interactions of dendritic cells with cancer cells and modulation of surface molecules affect functional properties of CD8+ T cells	Min Ji Seo	Cheol Heui Yun	Ki Rak Kim 외 3명	Molecular Immunology	48 (15-16)	국외	SCI
25	2012	Identification of staphylococcal lipoteichoic acid-binding proteins in human serum by high-resolution LTQ-Orbitrap mass spectrometry	Kyoung-Soon Jang	Seung Hyun Han	Jung Eun Baik 외 6명	Molecular Immunology	50(3)	국외	SCI
26	2012	IFN- γ renders human intestinal epithelial cells responsive to lipopolysaccharide of <i>Vibrio cholerae</i> by down-regulation of DMBT1	Seok-Seong Kang	Seung Hyun Han	Jun Ho Jeon 외 4명	Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases	35(4)	국외	SCI

27	2012	Lipoteichoic acid of <i>Staphylococcus aureus</i> enhances IL-6 expression in activated human basophils	Jun Ho Jeon	Seung Hyun Han	Sun Kyung Kim 외 4명	Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases	35(4)	국외	SCI
28	2012	Gene expression profile of human peripheral blood mononuclear cells induced by <i>Staphylococcus aureus</i> lipoteichoic acid	Seok-Seong Kang	Seung Hyun Han	Hye Jin Kim 외 12명	International Immunopharmacology	13(4)	국외	SCI
29	2012	Design and Application of Chitosan Microspheres as Oral and Nasal Vaccine Carriers: an Updated Review	Mohammad Ariful Islam	Cheol-Heui Yun, Chong-Su Cho	Jannatul Firdous, Yun-Jaie Choi	International Journal of Nanomedicine	7	국외	SCI
30	2013	Induction of BAFF expression by IFN- γ via JAK/STAT signaling pathways in human intestinal epithelial cells	Sun-Je Woo	Seung Hyun Han	Jintaek Im 외 7명	Journal of Leukocyte Biology	93(3)	국외	SCI
31	2013	Alpha-amylase is a human salivary protein with affinity to lipopolysaccharide of <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Jung Eun Baik	Seung Hyun Han	Sun Woong Hong 외 7명	Molecular Oral Microbiology	28(2)	국외	SCI
32	2013	Curcumin Inhibits CD4+ T Cell Activation, but Augments CD69 Expression and TGF- β 1-Mediated Generation of Regulatory T Cells at Late Phase	Girak Kim	Cheol-Heui Yun	Mi Seon Jang 외 7명	PLoS One	8(4)	국외	SCIE
33	2013	Enhanced anti-cancer activity of human dendritic cells sensitized with gamma-irradiation-induced apoptotic colon cancer cells	Sun Kyung Kim	Seung Hyun Han	Cheol-Heui Yun, Seung Hyun Han	Cancer Letter	335(2)	국외	SCI

34	2013	Anti-bacterial and anti-toxic immunity induced by a killed whole cell-cholera toxin B subunit cholera vaccine is essential for protection against lethal bacterial infection in mouse pulmonary cholera model	Seok-Seong Kang	Seung Hyun Han	Jae Seung Yang 외 4명	Mucosal Immunology	6(4)	국외	SCI
35	2013	Lipoproteins are an important bacterial component responsible for bone destruction through the induction of osteoclast differentiation and activation	Jiseon Kim	Seung Hyun Han	Jihyun Yang 외 7명	Journal of Bone Mineral Research	28	국외	SCI
36	2013	Regulation of Endocytosis by Non-Viral Vectors for Efficient Gene Activity	Mohammad Ariful Islam	Cheol-Heui Yun, Chong-Su Cho	Jannatul Firdous, Yun-Jaie Choi	Journal of Biomedical Nanotechnology	10	국외	SCI
37	2013	<i>Orientia tsutsugamushi</i> infection induces CD4+ T cell activation via human dendritic cell activity	Hyuk Chu	Cheol-Heui Yun	Sung-Mo Park 외 11명	Journal of Microbiology and Biotechnology	23	국내	SCIE
38	2013	LTA suppresses effector T cells induced by <i>Staphylococcus aureus</i> -pulsed dendritic cells	Young Min Son	Cheol-Heui Yun	Ki-Duk Song 외 2명	Journal of Microbiology and Biotechnology	23	국내	SCIE
39	2013	Lipoteichoic acid of <i>Enterococcus faecalis</i> induces the expression of chemokines via TLR2 and PAFR signaling pathways	Ok-Jin Park	Seung Hyun Han	Ji Young Han, Jung Eun Baik, Jun Ho Jeon, Seok-Seong Kang, Cheol-Heui Yun,	Journal of Leukocyte Biology	94(6)	국외	SCI

40	2014	Differential profiles of salivary proteins with affinity to <i>Streptococcus mutans</i> lipoteichoic acid in caries-free and caries-positive human subjects	Sun Woong Hong	Seung Hyun Han	Deog-Gyu Seo, Jung Eun Baik, Kun Cho, Cheol-Heui Yun	Molecular Oral Microbiology	29(5)	국외	SCI
41	2014	IgE in the absence of allergen induces the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in the rat basophilic cell-line RBL-2H3	Ki Bum Ahn	Seung Hyun Han	Jun Ho Jeon, Seok-Seong Kang, Dae Kyun Chung, Cheol-Heui Yun	Molecular Immunology	62(1)	국외	SCI
42	2014	Evaluation of anticoagulants for serologic assays of cholera vaccination	Jae Seung Yang	Seung Hyun Han	Seok-Seong Kang, Cheol-Heui Yun	Clinical and Vaccine Immunology	21(6)	국외	SCI
43	2014	Gene expression profiling of bovine mammary gland epithelial cells stimulated with lipoteichoic acid plus peptidoglycan from <i>Staphylococcus aureus</i>	Jintaek Im	Seung Hyun Han	Jaehoon Lee, Jun Ho Jeon, Jung Eun Baik, Kyoung Whun Kim, Seok-Seong Kang, Cheol-Heui Yun, Heebal Kim	International Immunopharmacology	21(1)	국외	SCI

44	2014	Muramyl dipeptide potentiates staphylococcal lipoteichoic acid induction of cyclooxygenase-2 expression in murine macrophages	Ki Bum Ahn	Seung Hyun Han	Jun Ho Jeon, Jung Eun Baik, Ok-Jin Park, Seok-Seong Kang, Cheol-Heui Yun, Jong-Hwan Park	Microbes and Infection	16(2)	국외	SCI
45	2014	Lipoteichoic acid of <i>Streptococcus mutans</i> interacts with Toll-like receptor 2 through the lipid moiety for induction of inflammatory mediators in murine macrophages	Sun Woong Hong	Seung Hyun Han	Jung Eun Baik, Cheol-Heui Yun, Deog-Gyu Seo	Molecular Immunology	57(2)	국외	SCI
46	2015	TLR2, but not TLR4, plays a predominant role in the immune responses to cholera vaccines	Jae Seung Yang	Seung Hyun Han	Hye Jin Kim, Seok-Seong Kang, Kyoung Whun Kim, Dong Wook Kim, Cheol-Heui Yun, Soon-Jung Park, Ho Seong Seo, B. Brett Finlay	Journal of Leukocyte Biology	98(4)	국외	SCI
47	2015	<i>Enterococcus faecalis</i> inhibits osteoblast differentiation and induces chemokine expression	Ok-Jin Park	Seung Hyun Han	Jiseon Kim, Jihyun Yang, Cheol-Heui Yun	Journal of Endodontics	41(9)	국외	SCI

48	2015	<i>Staphylococcus aureus</i> induces IL-8 expression through its lipoproteins in the human intestinal epithelial cell Caco-2	Seok-Seong Kang	Seung Hyun Han	Su Young Noh, Ok-Jin Park, Cheol-Heui Yun	Cytokine	75(1)	국외	SCI
49	2015	<i>Enterococcus faecalis</i> lipoteichoic acid suppresses <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> lipopolysaccharide-induced IL-8 expression in human periodontal ligament cells	Jintaek Im	Seung Hyun Han	Jung Eun Baik, Kyoung Whun Kim, Seok-Seong Kang, Jun Ho Jeon, Ok-Jin Park, Hyun Young Kim, Kee-Yeon Kum, Cheol-Heui Yun	International Immunology	27(8)	국외	SCI
50	2015	Pyrosequencing analysis of subgingival microbiota in distinct periodontal conditions	Ok-Jin Park	Seung Hyun Han	H. Yi, J.H. Jeon, S.-S. Kang, K.-T. Koo, K.-Y. Kum, J. Chun, C.-H. Yun, S.H. Han	Journal of Dental Research	94(7)	국외	SCI
51	2015	Lipopolysaccharide of <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> induces the expression of chemokines MCP-1, MP-1 α , and IP-10 via similar but distinct signaling pathways in murine macrophages	Ok-Jin Park	Seung Hyun Han	Min-Kyung Cho, Cheol-Heui Yun	Immunobiology	220(9)	국외	SCI
52	2015	<i>Enterococcus faecalis</i> attenuates the differentiation of macrophages into osteoclasts	Ok-Jin Park	Seung Hyun Han	Jihyun Yang, Jiseon Kim, Cheol-Heui Yun	Journal of Endodontics	41(5)	국외	SCI

53	2015	Bacterial flagellin induces IL-6 expression in human basophils	Jun Ho Jeon	Seung Hyun Han	Ki Bum Ahn, Sun Kyung Kim, Jintaek Im, Cheol-Heui Yun	Molecular Immunology	65(1)	국외	SCI
54	2015	Differential profiles of gastrointestinal proteins interacting with peptidoglycans from <i>Lactobacillus plantarum</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>	Jung Eun Baik	Seung Hyun Han	Yung-Oh Jang, Seok-Seong Kang, Kun Cho, Cheol-Heui Yun	Molecular Immunology	65	국외	SCI
55	2015	Lipoprotein in the cell wall of <i>Staphylococcus aureus</i> is a major inducer of nitric oxide production in murine macrophages	Nam Jung Kim	Seung Hyun Han	Ki Bum Ahn, Hun Ho Jeon, Cheol-Heui Yun, B. Brett Finlay	Molecular Immunology	65	국외	SCI
56	2015	Lipoteichoic acid from <i>Lactobacillus plantarum</i> inhibits Pam2CSK4-induced IL-8 production in human intestinal epithelial cells	Su Young Noh	Seung Hyun Han	Seok-Seong Kang, Cheol-Heui Yun	Molecular Immunology	64	국외	SCI
57	2015	Protein profiles in mucosal and systemic compartments in response to <i>Vibrio cholerae</i> in a mouse pulmonary infection model	Seok-Seong Kang	Jung Eun Baik, Jae Seung Yang	Cheol-Heui Yun, Seung Hyun Han	Microbial Pathogenesis	86:10-17	국외	SCI
58	2015	Structural details of the OxyR peroxide-sensing mechanism.	Inseong Jo	You-Hee Cho, Nam-Chul Ha	In-Young Chung, Hee-Won Bae, Jin-Sik Kim, Saemee Song	PNAS	112	국외	SCI

59	2015	Crystal structure of DsbA from <i>Corynebacterium diphtheriae</i> and its functional implications for CueP in Gram-positive bacteria.	Si-Hyeon Um	Nam-Chul Ha	Jin-Sik Kim, Saemee Song, Nam Ah Kim, Seong Hoo Jeong	Molecules and Cells	38	국내	SCI
60	2016	Crystal structure of a soluble fragment of the membrane fusion protein HlyD in a type 1 secretion system of Gram-negative bacteria	Jin-Sik Kim	Nam-Chul Ha	Saemee Song, Minho Lee, Seunghwa Lee, Kangseok Lee	Structure	24	국외	SCI
61	2016	Crystal structures of the disulfide reductase DsbM from <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inseong Jo	Nam-Chul Ha	Nohra Park, In-Young Chung, You-Hee Cho	Acta Crystallogr D Struct Biol.	72	국외	SCI
62	2016	Design, synthesis, and anticancer activity of C8-substituted-4'-thionucleases as potential HSP90 inhibitors	Shuhao Qu, 정낙신			Bioorganic & Medicinal Chemistry	24(14)	국외	SCI
63	2017	Structural basis for the transglycosylase activity of a GH57-type glycogen branching enzyme from <i>Pyrococcus horikoshii</i>	Soohei Na	Jaeho Cha, Nam-Chul Ha	Minjeong Park, Inseong Jo	Biochem Biophys Res Commun.	484	국외	SCI
64	2017	Crystal structure of <i>Streptomyces coelicolor</i> RraAS2, an unusual member of the RNase E inhibitor RraA protein family	Nohra Park, Jihune Heo	Kangseok Lee, Nam-Chul Ha	Saemee Song, Inseong Jo	J Microbiol.	55	국외	SCI
65	2017	Purification, crystallization, and preliminary X-ray crystallographic analysis of VV2_1132, a LysR-type transcriptional regulator from <i>Vibrio vulnificus</i>	Yongdae Jang	Nam-Chul Ha	Garam Choi, Inseong Jo, Sang Ho Choi	Biodesign	5	국내	비SCI

66	2017	Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of VCA0593 with a c-di-GMP binding activity in <i>Vibrio cholera</i>	Yongdae Jang	Yeong-Jae Seok, Nam-Chul Ha	Jae-Woo Lee, Inseong Jo, Chaewon Park	Biodesign	6	국내	비 SCI
67	2012	A split luciferase complementation assay for studying in vivo protein-protein interactions in filamentous ascomycetes	Hee-Kyung Kim	Sung-Hwan Yun	Eun Ji Cho 외 3명	Current Genetics	58 (3)	국외	SCI
68	2012	FgVelB globally regulates sexual reproduction, mycotoxin production, and pathogenicity in the cereal pathogen <i>Fusarium graminearum</i>	Jungkwan Lee	Sung-Hwan Yun & Yin-Won Lee	Kilseon Myong 외 2명	Microbiology	158 (7)	국외	SCI
69	2012	Functional roles of a putative B' delta regulatory subunit and a catalytic subunit of protein phosphatase 2A in the cereal pathogen <i>Fusarium graminearum</i>	Hee-Kyung Kim	Sung-Hwan Yun		Plant Pathology Journal	28 (3)	국내	SCI E
70	2012	Functional analyses of individual mating-type (<i>MAT</i>) transcripts at <i>MAT</i> loci in <i>Fusarium graminearum</i> and <i>F. asiaticum</i>	Hee-Kyung Kim	Sung-Hwan Yun	Eun Ji Cho 외 2명	FEMS Microbiology Letters	337	국외	SCI
71	2013	Draft genome sequence of <i>Fusarium fujikuroi</i> B14, the causal agent of the bakanae disease of rice	Haeyoung Jeong	Sung-Hwan Yun	Seungho Lee 외 2명	Genome Announcements	1(1)	국외 (미국 ASM 발행)	비 SCI
72	2013	Functional roles of <i>FgLaeA</i> in controlling secondary metabolism sexual development and pathogenicity in <i>Fusarium graminearum</i>	Hee-Kyung Kim	Sung-Hwan Yun	Seungho Lee 외 4명	PLoS One	8(7)	국외	SCI E
73	2014	Crystallization and preliminary X-ray analysis of a novel type of lipolytic hydrolase from <i>Bacillus licheniformis</i>	Ju H	Kim Kyeong Kyu	Pandian R, Kim TD	Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.	270 (4)	국외	SCI

74	2014	Structural and kinetic bases for the metal preference of the M18 aminopeptidase from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Duc Nguyen D	Kim Kyeong Kyu	Pandian R, Kim D, Chul Ha S, Yoon HJ, Sun Kim K, Hee Yun K, Kim JH	Biochem Biophys Res Commun.	447	국외	SCI
75	2015	Structural basis for the substrate selectivity of a HAD phosphatase from <i>Thermococcus onnurineus</i> NA1.	Tri Duc Ngo	Kim Kyeong Kyu, Hye-Yeon Hwang	Binh Van Le, Vinod Kumar Subramani, Chi My Thi Nguyen, Hyun Sook Lee, Yona Cho	Biochem Biophys Res Commun	461	국외	SCI
76	2015	Crystal structure analysis of c4763, an uropathogenic <i>E. coli</i> specific protein	Hun Kim	Kim Kyeong Kyu	Jongkeun Choi, Doyoun Kim	Acta Crystallogr F Struct Biol Commun	71	국외	SCI
77	2011	A duplex real-time RT-PCR assay for the simultaneous genogroup-specific detection of noroviruses in both clinical and environmental specimens	박영빈	고광표		Virus Genes	43 (2)	국외	SCI
78	2012	Using propidium monoazide to distinguish between viable and nonviable bacteria, MS2, and murine norovirus	김성연	고광표		Letters in Applied Microbiology	55 (3)	국외	SCI
79	2012	Simultaneous Detection of Major Enteric Viruses using Combimatrix Microarray	김주미	고광표	김성연 박영빈 김혜진 민병섭 조재창 양재명 조유희	Journal of Microbiology	50 (6)	국외	SCIE

80	2012	Temperature and humidity influences on inactivation kinetics of enteric viruses on surfaces	김수정, 시지연	고광표	이정은	Environmental Science & Technology	46 (24)	국외	SCI
81	2014	<i>Vibrio Vulnificus</i> Induces the Inflammation of Mouse Ileal Epithelium: Involvement of Protein Kinase C and Nuclear Factor- κ B.	Gi Yeon Han	Sei-Jung Lee	Young Hyun Jung, Kyung Ku Jang, Sang Ho Choi	Journal of Life Science	24(6)	국내	비SCI
82	2015	<i>Vibrio vulnificus</i> VvhA induces NF- κ B-dependent mitochondrial cell death via lipid raft-mediated ROS production in intestinal epithelial cells.	S-J Lee	HJ Han	YH Jung, SY Oh, EJ Song	Cell Death & Disease	6	국외	SCIE
83	2015	<i>Vibrio vulnificus</i> VvpE inhibits mucin 2 expression by hypermethylation via lipid raft-mediated ROS signaling in intestinal epithelial cells. Cell Death and Disease.	S-J Lee	HJ Han	YH Jung, SY Oh, KK Jang, HS Lee, SH Choi	Cell Death & Disease	6	국외	SCIE
84	2015	<i>Vibrio (V.) vulnificus</i> VvpE stimulates IL-1 β production by the hypomethylation of the IL-1 β promoter and NF- κ B activation via lipid raft-dependent ANXA2 recruitment and ROS signaling in intestinal epithelial cells.	Sei-Jung Lee	Ho Jae Han	Eun Ju Song, Kyung Ku Jang, Sang Ho Choi	Journal of Immunology	195	국외	SCI
85	2016	<i>Vibrio vulnificus</i> VvhA induces autophagy-related cell death through the lipid raft-dependent c-Src/NOX signaling pathway.	Eun Ju Song, Sei-Jung Lee	Ho Jae Han	Hyeon Su Lim, Jun Sung Kim, Kyung Ku Jang, Sang Ho Choi	Scientific Reports	6	국외	SCI

86	2016	VvpE mediates the intestinal colonization of <i>Vibrio vulnificus</i> by the disruption of tight junctions	Sei-Jung Lee	Ho Jae Han	Young Hyun Jung, Jung Min Ryu, Kyung Ku Jang, Sang Ho Choi	International Journal of Medical Microbiology	306	국외	SCI
87	2016	Glycoprotein isolated from <i>Styrax japonica</i> Siebold et al. Zuccarini inhibits oxidative and pro-inflammatory responses in HCT116 colonic epithelial cells and dextran sulfate sodium-treated ICR mice	Sei-Jung Lee	Kye-Tae k Lim	Jin Lee, Sooyeon Song	Food and Chemical Toxicology	87	rnrdrh1	SCI
88	2016	Physiological understanding of host-microbial pathogen interactions in the gut	Sei-Jung Lee	Ho Jae Han	Sang Ho Choi	Korean Journal of Veterinary Science	2	국외	비SCI
89	2017	A <i>Vibrio vulnificus</i> VvpM induces IL-1 β production coupled with necrotic macrophage death via distinct spatial targeting by ANXA2	Sei-Jung Lee	Ho Jae Han	Sang Ho Choi	Frontiers in Microbiology	accepted	국외	SCI
90	2014	IgA+plasma cells in murine intestinal lamina propria as a positive regulator of Treg cell differentiation	Myun Soo Kim	Tae Sung Kim		Journal of Leukocyte Biology	95(3)	국외	SCI
91	2014	IL-32gamma induces chemotaxis of activated T cells via dendritic cell-derived CCL5	Mee-Hye Son	Tae Sung Kim	Mi Young Jung, Seula Choi, Daeho Cho	Biochem. Biophys. Res. Commun.	450(1)	국외	SCI
92	2014	IL-18 Enhances Immunosuppressive Responses by Promoting Differentiation into Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells	Hui Xuan Lim	Tae Sung Kim	Hye-Jin Hong, Daeho Cho	Journal of Immunology	193	국외	SCI

93	2016	5-diphenylacetamido-indirubin-3'-oxime as a novel mitochondria-targeting agent with anti-leukemic activities	Ju Han Song	Tae Sung Kim	Jung-Eun Lee, Kyung-Min Cho, Su-Ho Park, Hyeoung-Joon Kim, Yong-Chul Kim	Molecular Carcinogenesis	55(5)	국외	SCI
94	2016	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> antimicrobial activity of psammaphin A, a marine natural product, against <i>Vibrio vulnificus</i> infection.	Byung Cheol Lee	Tae Sung Kim	Arim Lee, Jee Hyung Jung, Sang Ho Choi	Molecular Medicine Report	14(2)	국외	SCI
95	2016	Costunolide, a sesquiterpene lactone, inhibits the differentiation of pro-inflammatory CD4+ T cells through the modulation of mitogen-activated protein kinases.	Eunchong Park	Tae Sung Kim	Ju Han Song, Myun Soo Kim, Su-Ho Park	International Immunopharmacology	40	국외	SCI
96	2017	IL-33 inhibits the differentiation and immunosuppressive activity of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice.	Hui Xuan Lim	Tae Sung Kim	Seulah Choi, Daeho Cho	Immunology and Cell Biology	95	국외	SCI
97	2017	l-Asparaginase-mediated downregulation of c-Myc promotes 1,25(OH)2D3-induced myeloid differentiation in acute myeloid leukemia cells.	Ju Han Song	Tae Sung Kim	Eunchong Park, Myun Soo Kim, Kyung-Min Cho, Su-Ho Park, Arim Lee, Jiseon Song, Hyeoung-Joon Kim, Jeong-Tae Koh	International Journal of Cancer	140	국외	SCI

98	2017	Aminoacyl tRNA Synthetase-- Interacting Multifunctional Protein 1 Activates NK Cells via Macrophages In Vitro and In Vivo.	Myun Soo Kim	Tae Sung Kim	Ju Han Song, Edward P. Cohen, Daeho Cho	Journal of Immunology	198	국외	SCI
99	2012	Suppression of tumor growth in xenograft model mice by small interfering RNA targeting osteopontin delivery using biocompatible poly(amino ester)	Arash Minai-Tehrani, Hu-Lin Jiang	Myung-Haing Cho	You-Kyung Kim, Youn-Sun Chung, Kyeong-Nam Yu, Ji-Eun Kim 외 7명	International Journal of Pharmaceutics	431(1-2), 2012	국외	SCI
100	2013	Formation of carcinogenic 4(5)-methylimidazole in caramel model systems: A role of sulphite	Kwang-Geun Lee			Food Chemistry	136(3), 1165-1168	국외	SCI
101	2013	Analysis and risk assessment of ethyl carbamate in various fermented foods	Kwang-Geun Lee			European Food Research and Technology	236(5), 891-898	국외	SCI
102	2013	Lead and cadmium in functional health foods and Korean herbal medicines		Kwang-Geun Lee		Food additive and Contaminant: part B	6(2):146-149	국외	SCI
103	2012	Quality Characteristics of <i>Songpyeon</i> Cotaining Different Fillings during Storage	Yi-Hua Wen	Jong-Bang Eun		Food Sci. Biotechnology	22(1)	국내	SCI(E)
104	2013	Effect of Temperature on Oxidation Kinetics of Walnut and Grape Seed Oil	Bipin Vaidya	Jong-Bang Eun		Food Sci. Biotechnology	22(S)	국내	SCI(E)
105	2013	Physicochemical Characteristics and Functional Components of Mudeungsan Watermelon and the other Cultivars from Korea	Jeong Yeon Kim	Jong-Bang Eun	Sung Hee Lee 외 2명	KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOLOGY	45(3)	국내	비SCI

106	2013	Microbial Quality of Fresh Vegetables in Restaurants around School	So Hyun Jo	Jong-Ba ng Eun	Hyun Jung Chung 외 3명	Korean J Food Preserv.	20(3)	국내	비SCI
107	2013	Analysis of mercury and methylmercury in Korean herbal medicine and functional health foods	Donghun Lee	Kwang-Geun Lee		Food Add Contam B	6(4)	국외	SCI
108	2013	Volatile Chemicals Isolated from Rice Beers Brewed with Three Medicinal Plants	Jihye Lyu	Kwang-Geun Lee		J. Institute Brewing, Wiley	119(4)	국외	SCI
109	2013	Antibacterial and antioxidant properties of various medicinal plants used in oriental medicine.	Junho Seo	Kwang-GeunLee		Natural Product Communication	8(6)	국외	SCI E
110	2014	Volatile compounds as a marker of tofu (soybean curd) freshness during storage	Seonmi Lee	Kwang-Geun Lee		J Agric. Food Chemistry	62(3)	국외	SCI
111	2015	Analysis of aflatoxin M1 and M2 in commercial dairy products using high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector	Donghun Lee	Kwang-Geun Lee		Food control	50	국외	SCI
112	2014	Reduction of Carcinogenic 4(5)-methylimidazole in a Caramel Model System: Influence of Food Additives	Seulgi Seo	Kwang-Geun Lee	Mi-Hyun Ka	J Agric. Food Chemistry	62	국외	SCI
113	2014	Formation and reduction of furan in Maillard reaction model systems consisting of various sugars/amino acids/furan precursors	Heera Cho	Kwang-Geun Lee		J Agric. Food Chemistry	62	국외	SCI
114	2015	Analysis of aflatoxins in herbal medicine and health functional foods	Donghun Lee	Kwang-Geun Lee	Jihye Lyu	Food control	48	국외	SCI
115	2014	Correlating Current Consumer Perception and Consumer Acceptability of Traditional Doenjang in Korea	Mina K. Kim	Kwang-Geun Lee		J of Food Sci	79	국외	SCI

116	2015	Formation and reduction of carcinogenic furan in various model systems containing food additives	Jin-sil Kim	Kwang-G eun Lee	Jae-You ng Her	Food chemistr y	189	국내	SCI
117	2015	Formation and reduction of furan in a soy sauce model system	Min Yeop Kim	Kwang-G eun Lee	Jae-You ng Her, Mina K. Kim	Food chemistr y	189	국내	SCI
118	2015	Effect of citrulline, urea, ethanol, and urease on the formation of ethyl carbamate in soybean paste model system	Yong Gun Kim	Kwang-G eun Lee	Jihye Lyu, Mina K. Kim	Food chemistr y	189	국내	SCI
119	2015	Reduction of aflatoxin B ₁ in soybean-based model systems	Jongin Lee	Kwang-G eun Lee	Jae-You ng Her	Food chemistr y	189	국내	SCI
120	2015	Development of a spray freeze-drying method for preparation of shiitake mushroom (<i>Lentinus edodes</i>) powder	Jae-You ng Her	Kwang-G eun Lee	Min Suk Kim, Mina K. Kim	Internatio nal Journal of Food Science and Technolo gy	50(10)	국내	SCI
121	2015	Effect of Various Food Additives on the Levels of 4(5)-Methylimidazole in a Soy Sauce Model System	S Lee	KG Lee	J Hwang, JB Lee	Journal Of Food Science	81(1)	국내	SCI
122	2015	Analysis and risk assessment of 4(5)-methylimidazole in brown colored foods and beverages	S Lee	KG Lee		Food Additives & Contamin ants: Part B	9(1)	국내	SCI
123	2016	Safety and technological characterization of coagulase-negative staphylococci isolates from traditional Korean fermented soybean foods for starter development	Do-Won Jeong	Kwang-G eun Lee		Internatio nal Journal of Food Microbiol ogy	236(Nov) , 9-16	국내	SCI
124	2017	Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons levels and risk assessment for 412 food items from food service facilities in Korea	SW Park	Kwang-G eun Lee		Food Additives and Contamin ants: Part B	10(2)	국내	SCI

125	2017	Effect of the solvent composition and annealing process on the preparation of spray freeze-dried acetaminophen powder	Her Jae-Young	Kwang-G eun Lee		Int. J of Drying Technology	35(5)	국내	SCI
126	2016	Analysis of PCBs (polychlorinated biphenyls), heavy metals, and omega-3 fatty acids in functional fish oil supplements	JB Lee	Kwang-G eun Lee		Int J of Food Sci Tech	51(10)	국내	SCI
127	2011	Optimizing Conditions for TEMPO/NaOCl-Mediated Chemoselective Oxidation of Primary Alcohols in Sweet Potato Residue	YuNa Kim	Pahn-Shi ck Chang	Kyung Min Park 외 1명	Food and Bioprocess Technology	DOI 10.1007/s11947-011-0740-2(2011)	국외	SCI
128	2011	Optimal production and structural characterization of erythorbyl laurate obtained through lipase-catalyzed esterification	Da Eun Lee	Pahn-Shi ck Chang	Kyung Min Park 외 1명	Food Science and Biotechnology,	21(4)	국외	SCI
129	2012	Serial connection of packed-bed reactors with different reaction temperatures: enhanced operational stability for enzymatically interesterified <i>trans</i> -free lipid production	Jong Won Won	Pahn-Shi ck Chang	Kyung Min Park, Seung Jun Choi	Eur. Food Res. Technol.	235	국외	SCI
130	2013	Development of the simple and sensitive method for lipoxygenase assay in AOT/isooctane reversed micelles	Kyung Min Park	Pahn-Shi ck Chang	Yu Na Kim, Seung Jun Choi	Food Chem.	138	국외	SCI
131	2013	Enhancing operational stability and exhibition of enzyme activity by removing water in the immobilized lipase-catalyzed production of erythorbyl laurate	Da Eun Lee	Pahn-Shi ck Chang	Kyung Min Park 외 2명	Biotechnol. Prog.	29(4)	국외	SCI

132	2013	Strain improvement by overexpression of the <i>laeA</i> gene in <i>Monascus pilosus</i> for the production of <i>Monascus</i> -fermented rice	이상섭	이인형	이진희	J. Microbiol. Biotechnol.	23(7)	국내	SCIE
133	2013	A proposal to unify two subspecies of <i>Staphylococcus equorum</i> : <i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>equorum</i> and <i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>linens</i>	Do-Won Jeong	Jong-Ho on Lee	Hye-Rim Kim, Seulhwa Han, Che Ok Jeon	Antonie van Leeuwenhoek	104(6)	국외	SCI
134	2014	Bacterial Community Migration in the Ripening of Doenjang, a Traditional Korean Fermented Soybean Food	Do-Won Jeong	Jong-Ho on Lee	Hye-Rim Kim, Gwangsi ck Jung, Seulhwa Han, Cheong-Tae Kim	Journal of Microbiology and Biotechnology	24(5)	국내	SCIE
135	2014	An evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid production in <i>Aspergillus oryzae</i>	Nam Yeun Kim	Geun Eog Ji	Jin Hee Lee, Inhyung Lee	Journal of Food Protection	77(6)	국외	SCI
136	2014	Reliable and simple detection of ochratoxin and fumonisin production in black <i>Aspergillus</i>	Nam Yeun Kim	Geun Eog Ji	Inhyung Lee	Journal of Food Protection	77(4)	국외	SCI
137	2014	Genetic diversity of <i>Staphylococcus equorum</i> isolates from Saeu-jeotgal evaluated by multilocus sequence typing	정도원	이종훈		Antonie van Leeuwenhoek	106	국외	SCI
138	2015	Genetic diversity and antibiotic resistance of <i>Staphylococcus saprophyticus</i> isolates from fermented foods and clinical samples	이빛나리	이종훈	정도원	J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.	58	국외	SCIE
139	2014	Safety Evaluation of Filamentous Fungi Isolated from Industrial <i>Doenjang Koji</i>	이진희	이인형		J. Microbiol. Biotechnol.	24	국내	SCIE

140	2014	Safety and technological characterization of <i>Staphylococcus equorum</i> isoates from jeotgal, a Korean high-salt-fermented seafood, for starter development	정도원	이중훈		Int. J. Food Microbiol.	188	국외	SCI
141	2015	Overexpression of the <i>laeA</i> gene leads to increased production of cyclopiazonic acid in <i>Aspergillus fumisynnematus</i>	Eun Jin Hong	Inhyung Lee	Na Kyeong Kim, Doyup Lee, Won Gon Kim	Fungal Biology	119(11)	국외	SCI
142	2017	Characterization of <i>Aspergillus sojae</i> isolated from <i>meju</i> , Korean traditional fermented soybean brick	Kyung Min Kim	Inhyung Lee.		Journal of Microbiology and Biotechnology	26	국내	SCI E
143	2016	Identification of Oligosaccharides in Human Milk Bound onto the Toxin A Carbohydrate Binding Site of <i>Clostridium difficile</i>	Nguyen TT	D Kim	JW Kim, JS Park, KH Hwang, TS Jang, CH Kim	Journal Of Microbiology And Biotechnology	26(4)	국내	SCI
144	2016	Glucooligosaccharide Production by <i>Leuconostoc mesenteroides</i> Fermentation with Efficient pH Control, using a Calcium Hydroxidesucrose Solution	Sun Lee	Doman Kim	Nguyen Thi Thanh Hanh, Jae-Young Cho, Ji Youn Kim, Young Hwan Moon, Su-Cheong Yeom, Geun-Jong Kim,	Biotechnol. Bioprocess Eng	21	국내	SCI

145	2017	Production of steviol from steviol glucosides using α -glycosidase from <i>Sulfolobus solfataricus</i>	Thi Thanh Hanh Nguyen	Doman Kim	Seong-B o Kim, Nahyun M Kim, Choongil Kang, Byoungsang Chung, Jun-Seo ng Park	Enzyme and Microbial Technology	93	국외	SCI
146	2017	Enhancement of water soluble wheat bran polyphenolic compounds using different steviol glucosides prepared by thermostable β -galactosidase	Hee-jung Lim	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Nahyun M. Kim, Gha-hyun J. Kim, Kyeonghwan Hwang, Jun-Seo ng Park, Atsuo Kimura	Functional Foods in Health and Disease	6(10)	국외	비SCI
147	2017	Functional Properties of Novel Epigallocatechin Gallate Glucosides Synthesized by Using Dextranucrase from <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-1299CB4	Kim J	Kim D	Nguyen TT, Kim NM, Moon YH, Ha JM, Park N, Lee DG, Hwang KH, Park JS	Journal of Agricultural and Food Chemistry	64(48)	국외	SCI

148	2017	Facile preparation of water soluble curcuminoids extracted from turmeric (<i>Curcuma longa</i> L.) powder by using steviol glucosides	Nguyen TT	Kim D	Si J, Kang C, Chung B, Chung D	Food Chemistry	214	국외	SCI
149	2017	The effect of fermented buckwheat on producing L-carnitine- and γ -aminobutyric acid (GABA)-enriched designer eggs	Park Namhyeon	Kim Doman	Lee Tae-Kyung, Nguyen Thi Thanh Hanh, An Eun-Bae, Kim Nahyun M, You Young-Hyun, Park Tae-Sub	Journal of the Science of Food and Agriculture	97	국외	SCI
150	2017	Inhibitory effect of flavonoids against NS2B-NS3 protease of ZIKA virus and their structure activity relationship. Biotechnol	Hee-jung Lim	Doman Kim.	Thi Thanh Hanh Nguyen, Nahyun M. Kim, Jun-Seo ng Park, Tae-Su Jang	Lett Springer	39(3)	국외	SCI
151	2012	Characterization of LysB4, an endolysin from the <i>Bacillus cereus</i> -infecting bacteriophage B4,	Son B	Ryu S	Yun J, Lim JA, Shin H, Heu S,	BMC Microbiology	12(33)	국외	SCI
152	2012	Complete Genome Sequence of <i>Bacillus cereus</i> Bacteriophage PBC1	Kong M	Ryu S	Kim M	Journal of Virology	86(11)	국외	SCI

153	2012	Receptor Diversity and Host Interaction of Bacteriophages Infecting <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium	Shin H	Ryu S	Lee JH, Kim H, Choi Y, Heu S	PloS One	7(8)	국외	SCI
154	2013	Complete Genome Sequence Analysis of Bacterial Flagellum-Targeting Bacteriophage Chi.	Lee JH	Ryu S	Shin H, Choi Y	Arch. Virol	158(10)	국외	SCI
155	2013	Characterization and Complete Genome Sequence of a Virulent Bacteriophage B4 Infecting Food-borne Pathogenic <i>Bacillus cereus</i> .	Lee JH	Ryu S	Shin H, Son B, Heu S	Arch. Virol	158(10)	국외	SCI
156	2013	Characterization and Complete Genome Sequence Analysis of <i>Staphylococcus aureus</i> Bacteriophage SA12	Chang Y, Lee JH	Ryu S	Shin H, Heu S	Virus Genes	47(2)	국외	SCI
157	2013	Characterization and genomic analysis of two <i>Staphylococcus aureus</i> bacteriophages isolated from poultry/livestock farms	Yoon H, Yun J	Heu S	Lim J, Roh E, Jung K, Chang Y, Ryu S	Journal of General Virology	94(11)	국외	SCI
158	2014	Genomic Investigation of Lysogen Formation and Host Lysis Systems of the Salmonella Temperate Bacteriophage SPN9CC	Shin H	Ryu S	Lee JH, Yoon H, Kang DH	Applied and Environmental Microbiology	80(1)	국외	SCI

159	2014	Anti-tumoral effect of the mitochondrial target domain of Noxa delivered by an engineered Salmonella Typhimurium	Jeong J	Choy H	Kim K, Lim D, Jeong K, Hong Y, Nguyen Vu H., Kim TH, Ryu S, Lim J, Kim J, Kim G, Kim S, Min J	Plos One	9(1)	국외	SCI
160	2015	Bacteriophage PBC1 and its endolysin as an antimicrobial agent against <i>B. cereus</i>	Kong M			Appl. Environ. Microbiol.	81	국외	SCI
161	2015	Inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> Typhimurium and <i>Listeria monocytogenes</i> in apple juice at different pH levels by gaseous ozone treatment	Song WJ			J. Appl. Microbiol.	doi: 10.1111/jam.12861	국외	SCI
162	2015	Isolation and Genome Characterization of the Virulent <i>Staphylococcus aureus</i> Bacteriophage SA97	Yoonjee Chang			Viruses	7	국외	SCI
163	2015	Complete genome sequence of <i>Staphylococcus equorum</i> KS1039 isolated from Saeu-jeotgal, Korean high-salt-fermented seafood.	Do-Won Jeong			Journal of Biotechnology	219	국외	SCI
164	2016	A Bioactive Constituent of Ginger, 6-Shogaol, Prevents Adipogenesis and Stimulates Lipolysis in 3T3-L1 Adipocytes.	Sujin Suk, Sangwon Seo			Journal of Food Biochemistry	40	대한민국	SCI
165	2016	Bakuchiol suppresses proliferation of skin cancer cells by directly targeting Hck, Blk, and p38 MAP kinase	Jong-Eun Kim, Jae Hwan Kim			Oncotarget	7	대한민국	SCI

166	2017	Characterization of a novel cell wall binding domain-containing <i>Staphylococcus aureus</i> endolysin LysSA97	Yoonjee Chang			Applied Microbiology and Biotechnology	101	국외	SCI
167	2017	Endolysin LysSA97 is synergistic with carvacrol in controlling <i>Staphylococcus aureus</i> in foods	Yoonjee Chang, Hyunjin Yoon			International Journal of Food Microbiology	244	국외	SCI
168	2017	Osajin Inhibits Solar UV-Induced Cyclooxygenase-2 Expression Through Direct Inhibition of RSK2	Jong-Eun Kim			Journal of Cellular Biochemistry		국외	SCI
169	2017	Gingerenone A attenuates monocyte-endothelial adhesion via suppression of I Kappa B kinase phosphorylation.	Hee Joo Kim, Joe Eun Son, Jae Hwan Kim			Journal of Medical Virology		국외	SCI
170	2017	Gingerenone A, a polyphenol present in ginger, suppresses obesity and adipose tissue inflammation in high-fat diet-fed mice	Sujin Suk			Molecular Nutrition & Food Research		국외	SCI
171	2017	3,3'-Diindolylmethane suppresses high-fat diet-induced obesity through inhibiting adipogenesis of pre-adipocytes by targeting USP2 activity	Yang, H.			Mol. Nutr. Food Res.		국외	Sci
172	2017	Characterization of a Novel Endolysin LysSA11 and Its Utility as a Potent Biocontrol Agent against <i>Staphylococcus aureus</i> on Food and Utensils	Yoonjee Chang, Minsik Kim	Ryu S		Food Microbiology		국외	Sci
173	2011	Development of oscillation method for reducing foodborne pathogens on lettuce and spinach	Sung Youn Kim	Dong-Hyun Kang	Hun gu Sagong, Sang ryeol Ryu, Jae Hyung Mah	Int. J. Food. Microbiol.	145	국외	SCI

174	2011	Inactivation of foodborne pathogens in fruit juices using ohmic heating	Hun gu Sagong	Dong-Hyun Kang	Sang Hyun Park, Young Jin Choi, Sang ryeol Ryu	J. Food Prot.	74(6)	국외	SCI
175	2012	Radio-frequency heating to inactivate Salmonella Typhimurium and Escherichia coli O157:H7 on black and red pepper spice	Sung-Youn Kim	Dong-Hyun Kang	Hun-Gu Sagong, Sang Ho Choi, Sangryeol Ryu	Int. J. Food. Microbiol.	153: 171-175	국외	SCI
176	2012	Effect of continuous ohmic heating to inactivate Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes in orange juice and tomato juice	Soo-Yeon Lee	Dong-Hyun Kang	Hun-Gu Sagong, Sangryeol Ryu,	J. Applied Microbiol.	112: 723-731	국외	SCI
177	2012	Synergistic Effect of Steam and Lactic Acid against Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, and Listeria monocytogenes Biofilms on Polyvinyl Chloride and Stainless Steel	Ga-Hee Ban	Dong-Hyun Kang	S.H. Park, S.O. Kim, S. Ryu,	Int. J. Food. Microbiol.	157: 218-223	국외	SCI
178	2012	Evaluation of near-infrared pasteurization in controlling Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, and Listeria monocytogenes in ready-to-eat sliced ham	Jae-Won Ha	Dong-Hyun Kang	Sang-ryeol Ryu	Applied and Environmental Microbiology	78: 6458-6465	국외	SCI
179	2012	Effect of frequency and waveform on inactivation of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium in salsa by ohmic heating	Su-Yeon Lee	Dong-Hyun Kang	Sang-ryeol Ryu	Applied and Environmental Microbiology	79: 10-17	국외	SCI

180	2013	Inactivation of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium and <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in peanut butter cracker sandwiches by radio-frequency heating	Jae-Won Ha	Dong-Hyun Kang	Sung-Youn Kim, Sang-ryeol Ryu	Food Microbiology	34: 145-150	국외	SCI
181	2013	Simultaneous Near-Infrared Radiant Heating and UV Radiation for Inactivating <i>Escherichia coli</i> O157:H7 and <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium in Powdered Red Pepper (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Jae-Won Ha	Dong-Hyun Kang		Applied and Environmental Microbiology	79: 6568-6575	국외	SCI
182	2013	Effect of Electroporation by Ohmic heating for Inactivation of <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium and <i>Listeria monocytogenes</i> in Buffered Peptone Water and Apple juice	Il-Kyu Park	Dong-Hyun Kang		Applied and Environmental Microbiology	79: 7122-7129	국외	SCI
183	2014	Synergistic Bactericidal Effect of Simultaneous Near-Infrared Radiant Heating and UV Radiation against <i>Cronobacter sakazakii</i> in Powdered Infant Formula	Jae-Won Ha	Dong-Hyun Kang		Applied and Environmental Microbiology	80: 1858-1863	국외	SCI
184	2014	Inactivation of biofilm cells of foodborne pathogens by steam pasteurization	Sang-Hyun Park	Dong-Hyun Kang		European Food Research and Technology	238: 471-476	국외	SCI
185	2014	Effects of gamma irradiation for inactivating <i>Salmonella Typhimurium</i> in peanut butter product during storage	Ga-Hee Ban	Dong-Hyun Kang		International Journal of Food Microbiology	171: 48-53	국외	SCI
186	2014	Inactivation of <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> spores in apple and orange juice concentrates by gamma irradiation	Su-Yeon Lee	Dong-Hyun Kang	Sang-Hyun Park	Journal of Food Protection	77: 339-344	국외	SCI

187	2014	Infrared sensor-based aerosol sanitization system for controlling <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella Typhimurium</i> , and <i>Listeria monocytogenes</i> on fresh produce	Sang-Oh Kim	Dong-Hyun Kang	Jae-Won Ha, Ki-Hwan Park, Myung-Sub Chung	Journal of Food Protection	77: 977-980	국외	SCI
188	2014	Inactivation kinetics of <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i> , and <i>Listeria monocytogenes</i> in ready-to-eat sliced ham by near-infrared heating at different radiation intensity	Jae-Won Ha	Dong-Hyun Kang		Journal of Food Protection	77:1224-1228	국외	SCI
189	2015	Combining lactic acid spray with NIR radiant heating to inactivate <i>Salmonella enterica serovar Enteritidis</i> on almond and pine nut kernels	Jae-Won Ha			Applied and Environmental Microbiology	81	국외	SCI
190	2015	Combination treatment of chlorine dioxide gas and aerosolized sanitizer for inactivating foodborne pathogens	Sang-Hyun Park			International Journal of Food Microbiology	207	국외	SCI
191	2015	Comparative effects of ohmic and conventional heating for inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enterica Serovar Typhimurium</i> and <i>Listeria monocytogenes</i>	Sang-Soon Kim			Journal of Food Protection	78	국외	SCI
192	2015	Comparison of a 4-section Spindle and Stomacher for efficacy of detaching microorganisms from fresh vegetables	Do-Kyun Kim			Journal of Food Protection	78(7)	국외	SCI

193	2015	Effect of a 915 MHz microwave system on inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157 H7, <i>Salmonella</i> Typhimurium, and <i>Listeria monocytogenes</i> in salsa	Hye-Jun g Sung			LWT - Food Science and Technology	59	국외	SCI
194	2015	Effect of thiamine dilaurylsulfate against <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Bacillus cereus</i> spores in custard cream	Mi-Ran Choi			LWT - Food Science and Technology	60	국외	SCI
195	2015	Effect of pH for inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium and <i>Listeria monocytogenes</i> in orange juice by ohmic heating	Ji-Yeon Lee			LWT - Food Science and Technology	62	국외	SCI
196	2015	Effect of milk fat content on the performance of ohmic heating for inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium and <i>Listeria monocytogenes</i>	김상순			J. Applied Microbiol	119	국외	SCI
197	2015	Comparison of pH effects on ohmic heating and conventional heating for inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium and <i>Listeria monocytogenes</i> in orange juice	김상순			LWT - Food Science and Technology	64	국외	SCI
198	2016	Fundamental Characteristics of Deep-UV Light-Emitting Diodes and Their Application To Control Foodborne Pathogens	신주연			Appl. Environ. Microbiol.	82	국외	SCI

199	2016	Using UVC Light-Emitting Diodes at Wavelengths of 266 to 279 Nanometers To Inactivate Foodborne Pathogens and Pasteurize Sliced Cheese	김수지			Appl. Environ. Microbiol.	82	국외	SCI
200	2016	Effect of sanitizer combined with steam heating on the inactivation of foodborne pathogens in a biofilm on stainless steel	반가희			Food Microbiol.	55	국외	SCI
201	2016	Effect of sequential dry heat and hydrogen peroxide treatment on inactivation of <i>Salmonella</i> Typhimurium on alfalfa seeds and seeds germination	홍은정			Food Microbiol.	53	국외	SCI
202	2016	Inactivation of <i>Salmonella</i> Senftenberg, <i>Salmonella</i> Typhimurium and <i>Salmonella</i> Tennessee in peanut butter by 915 MHz microwave heating	송원재			Food Microbiol.	53	국외	SCI
203	2016	Enhanced antimicrobial effect of organic acid washing against foodborne pathogens on broccoli by vacuum impregnation	강준원			Int. J. Food Microbiol.	217	국외	SCI
204	2016	Development of an improved selective medium for the detection of <i>Shigella</i> spp.	이지연			LWT - Food Science and Technology	65	국외	SCI
205	2016	Effectiveness of Superheated Steam for Inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Salmonella</i> Enteritidis phage type 30, and <i>Listeria monocytogenes</i> on Almonds and Pistachios	반가희			Int. J. Food Microbiol.	220	국외	SCI

206	2016	Effect of Power Levels on Inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> Typhimurium, and <i>Listeria monocytogenes</i> in Tomato Paste Using 915-Megahertz Microwave and Ohmic Heating	Sang-So on Kim, Hye-Jun g Sung			Journal of Food Protection	79(9)	국외	SCI
207	2016	Influence of water activity on inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> Typhimurium and <i>Listeria monocytogenes</i> in peanut butter by microwave heating	Won-Jae Song			Food Microbiology	60	국외	SCI
208	2017	Application of a 222-nm krypton-chlorine excilamp to control foodborne pathogens on sliced cheese surfaces and characterization of the bactericidal mechanisms	Jae-Won Ha, Jae-Ik Lee			International Journal of Food Microbiology	17	국외	SCI
209	2017	Synergistic effect of carvacrol and ohmic heating for inactivation of <i>E. coli</i> O157:H7, <i>S. Typhimurium</i> , <i>L. monocytogenes</i> , and MS-2 bacteriophage in salsa	Sang-So on Kim			Food Control	73(B)	국외	SCI
210	2017	Application of low frequency pulsed ohmic heating for inactivation of foodborne pathogens and MS-2 phage in buffered peptone water and tomato juice, Food Microbiology	Sang-So on Kim			Food Microbiology	63	국외	SCI
211	2017	Investigation of optimum ohmic heating conditions for inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium, and <i>Listeria monocytogenes</i> in apple juice	Il-Kyu Park, Jae-Won Ha			BMC Microbiology	63	국외	SCI

212	2017	Combination treatment of ohmic heating with various essential oil components for inactivation of food-borne pathogens in buffered peptone water and salsa	Sang-So on Kim			Food Control	80	국외	SCI
213	2017	Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength UVC-LEDs for inactivation of Gram positive and Gram negative foodborne pathogenic bacteria and yeasts	Do-Kyun Kim, Soo-Ji Kim			Food Research International	97	국외	SCI

○ 3단계

연번	게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
			주저자	교신저자	공동저자				
1	2017	Identification and characterization of <i>Vibrio vulnificus</i> <i>plpA</i> encoding a phospholipase A ₂ essential for pathogenesis	Kyung Ku Jang	Sang Ho Choi	Zee-Won Lee, Bityeoul Kim, Young Hyun Jung, Ho Jae Han, Myung Hee Kim, Byoung Sik Kim	Journal of Biological Chemistry	292(41)	국외	SCI
2	2018	<i>Vibrio vulnificus</i> infection induces the maturation and activation of dendritic cells with inflammatory Th17-polarizing ability	Arim Lee	Sang Ho Choi	Hui Xuan Lim, Myun Soo Kim, Daeho Cho, Kyung Ku Jang, Tae Sung Kim	International Journal of Molecular Medicine	41(1)	국외	SCI
3	2018	Melatonin inhibits apoptotic cell death induced by <i>Vibrio vulnificus</i> VvhA via melatonin receptor 2 coupling with NCF-1	Sei-Jun g Lee	Sang Ho Choi	Hyun Jik Lee, Young Hyun Jung, Jun Sung Kim, Ho Jae Han	Cell Death and Disease	9	국외	SCI
4	2018	Development of safe and flavor-rich Doenjang (Korean fermented soybean	Eun Jin Lee	Sang Ho Choi	Jiye Hyun Yong-Ho Choi, Byung-Serk Hurh,	Journal of Food Science	83(6)	국외	SCIE

		paste) using autochthonous mixed starters at the pilot plant scale.			Inhyung Lee				
5	2018	Crystal structure of peroxiredoxin 3 from <i>Vibrio vulnificus</i> and its implications for scavenging peroxides and nitric oxide,	Jinsook Ahn	Sang Ho Choi, Nam-Chul Ha		IUCrJ	5(82-92)	국외	SCI
6	2018	A novel tetrameric assembly configuration in VV2_1132, a LysR-type transcriptional regulator in <i>Vibrio vulnificus</i> ,	Yongdae Jang	Sang Ho Choi, Nam-Chul Ha		Molecules and Cells	41(4)	국내	SCI
7	2018	Purification and preliminary analysis of the regulatory domain of MexT from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , a LysR-type transcriptional activator of the MexEF-OprN multidrug efflux pump	Suhyeon Kim	Nam-Chul Ha		Biodesign	6(42-45)	국내	비SCI
8	2018	<i>Vibrio vulnificus</i> RtxA is a major factor driving inflammatory T helper type 17 cell responses <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	Arim Lee	Sang Ho Choi	Myun Soo Kim, Daeho Cho, Kyung Ku Jang, Tae Sung Kim	Frontiers in Immunology		국외	SCIE
9	2018	Structure-based protein engineering of bacterial β -xylosidase to increase the production yield of xylobiose from xylose	Seokho Hong	Nam-Chul Ha		Biochemical and Biophysical Research Communications	501(3): 703-710.	국외	비SCI

10	2019	Small-molecule inhibitor of HlyU attenuates virulence of <i>Vibrio</i> species	Zee-Won Lee	Sang Ho Choi	Byoung Sik Kim, Kyung Ku Jang, Ye-Ji Bang, Suhyeon Kim, Nam-Chul Ha, Young Hyun Jung, Hyun Jik Lee, Ho Jae Han, Jong-Seo Kim, Jeesoo Kim, Pramod K. Sahu, Lak Shin Jeong, Myung Hee Kim	Scientific Reports		국외	SCI
11	2019	Structural basis for HOCl-recognition and regulation mechanisms of HypT, a hypochlorite-specific transcriptional regulator	Inseong Jo	Nam-Chul Ha	Dajeong Kim, Taehoon No, Seokho Hong, Jinsook Ahn, Sangryeol Ryu	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	116(9)	국외	SCI
12	2019	Recent paradigm shift in the assembly of the bacterial tripartite efflux pumps and type I secretion system	Inseong Jo	Nam-Chul Ha	Inseong Jo, Jin-Sik Kim, Yongbin Xu, Jaekyung Hyun, Kangseok Lee	Journal of Microbiology	57(3)	국내	SCIE
13	2019	Crystal structure of LysB4, an endolysin from <i>Bacillus cereus</i> -targeting bacteriophage B4	Seokho Hong	Nam-Chul Ha	Seokho Hong, Bokyung Son, Sangryeol Ryu	Molecules and Cells	42(1)	국내	SCIE
14	2019	Assembly model of the heavy metal efflux pump CusBAC based on the protein-protein interaction	Seokho Hong	Nam-Chul Ha	Seokho Hong, Jin-Sik Kim, Inseong Jo, So-Young Jun	Biodesign	7(1)	국내	비SCI
15	2019	Crystal structure of SAV0927 and its functional	Soyeon Jeong	Nam-Chul Ha	Hyo Jung Kim, Ae-Ran Kwon	Journal of Microbiology	29(3)	국내	SCIE

		implications				ogy and Biotechnology			
16	2019	Transcriptomic Identification and Biochemical Characterization of HmpA, a Nitric Oxide Dioxygenase, Essential for Pathogenesis of <i>Vibrio vulnificus</i>	Dukyun Kim, Eun Jung Na	Sang Ho Choi	Suhyeon Kim, Jung Sung Kim, Young Hyun Jung, Jiafu Cao, Ho Jae Han, Iel Soo Bang, Jin-Wook Yoo, Nam-Chul Ha	Frontiers in Microbiology	10	국외	SCIE
17	2019	Crystal Structure of Bacterial Cystathionine Γ -Lyase in The Cysteine Biosynthesis Pathway of <i>Staphylococcus aureus</i>	Dukwon Lee	Nam-Chul Ha	Soyeon Jeong, Jinsook Ahn, Ae-Ran Kwon	Crystals	9(12)	국외	SCIE
18	2019	Structural basis for lamin assembly at the molecular level	Jinsook Ahn	Nam-Chul Ha	Inseong Jo, So-mi Kang, Seokho Hong, Suhyeon Kim, Soyeon Jeong, Yong-Hak Kim, Bum-Joon Park	Nature communications	10(1)	국외	SCIE
19	2019	Purification and preliminary analysis of the nuclease and capping domain of the DNA repair exonuclease SbcD from the Gram- positive bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	Jinwook Lee	Nam-Chul Ha	Inseong Jo, Aeran Kwon	Biodesign	7(4)	국내	비SCI
20	2020	Real-Time Measurement of the Liquid Amount in Cryo-Electron Microscopy Grids Using Laser	Jinsook Ahn	Nam-Chul Ha	Dukwon Lee, Inseong Jo, Hyeongseop Jeong, Jae-Kyung Hyun, Jae-Sung	Molecules and Cells	43(3)	국내	SCIE

		Diffraction of Regular 2-D Holes of the Grids			Woo, Sang-Ho Choi					
21	2020	Cleavage-dependent activation of ATP-dependent protease HslUV from <i>Staphylococcus aureus</i>	Soyeon Jeong	Nam-Chul Ha	Jinsook Ahn, Ae-Ran Kwon	Molecules and Cells	계재예 정	국내	SCIE	
22	2018	Production of steviol from steviol glucosides using β -glucosidase from a commercial pectinase, Sumizyme PX	Thi Thanh Hanh Nguyen	Doman Kim	Changseop Seo, Bon-Cheol Gu, Hee-Jung Lim, Jung-Min Ha, Seong-Bo Kim, Jun-Seong Park	Biotechnology Letters	40(1)	국외	SCI	
23	2018	Decrease of insoluble glucan formation in <i>Streptococcus mutans</i> by co-cultivation with <i>Enterococcus faecium</i> T7 and glucanase addition	Shin-Hye Yu.	Doman Kim	So-Hyung Kwak, Thi Thanh Hanh, Nguyen, Ye-Seul, Seo, Chaeri, Song, Il Kyoon, Mok	Biotechnology Letters	40(1)	국외	SCI	
24	2018	The use of fermented buckwheat to produce l-carnitine enriched oyster mushroom.	Tae-kyung Lee	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Namhyeon Park, So-Hyung Kwak, Jeesoo Kim, Shina Jin, Gyu-Min Son, Jaewon Hur, Jong-In Choi	AMB Express	40(2)	국외	SCI	
25	2018	Characterization of quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i>) fermented by <i>Rhizopus oligosporus</i> and its	Jaewon Hur	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Namhyeon Park, Jeesoo Kim	AMB Express	8(1)	국외	SCI	

		bioactive properties							
26	2018	Composition and biochemical properties of l-carnitine fortified Makgeolli brewed by using fermented buckwheat	Namhyeon Park	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Gang-Hee Lee, Shi-Na Jin, So-Hyung Kwak, Tae-Kyung Lee, Yeong-Hwan Choi, Seong-Bo Kim, Atsuo Kimura	Food Sci Nutr.	8(1)	국외	SCI
27	2019	Anti-cariogenic Characteristics of Rubusoside	Jeesoo Kim	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Juhui Jin, Iis Septiana, Gyu-Min Son, Gang-Hee Lee, You-Jin Jung, Dilshad Qureshi, Il Kyoon Mok, Kunal Pal, Soo-Yeon Yang, Seong-Bo Kim	Biotechnology and Bioprocess Engineering	6(8)	국내	SCI
28	2019	Brewing Rutin-Enriched Lager Beer with Buckwheat Malt as Adjuncts	Yang Deng	Doman Kim	Juho Lim, Gang-Hee Lee, Thi Thanh Hanh Nguyen, Yang Xiao, Meizi Piao	J. Microbiol. Biotechnol	29(6)	국내	SCI
29	2019	Antimelanogenesis Effects of Fungal Exopolysaccharides Prepared from Submerged Culture of Fomitopsis castanea Mycelia	Juhui Jin	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Changmu Kim	J. Microbiol. Biotechnol	29(6)	국내	SCI

30	2019	Composition and biochemical properties of ale beer enriched with lignans from Schisandra chinensis Baillon (omija) fruits.	Yang Deng	Doman Kim	Juho Lim, Thi Thanh Hanh Nguyen, Il-Kyoon Mok, Meizi Piao	Food Science and Biotechnology	29(8)	국내	SCI
31	2020	Synthesis and characterization of stevioside having low degree polymerized glucosides using dextransucrase and dextranase	Gyumin Son	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Byeongsu Park, Sohyung Kwak, Juhui Jin, Young-Min Kim, Young-Hwan Moon, Sunghee Park, Seong-Bo Kim	Enzyme and Microbial Technology	132(1)	국외	SCI
32	2020	Enzymatic synthesis and biological characterization of a novel mangiferin glucoside	Iis Septiana	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Sangyong Lim, Seonmin Lee, Byeongsu Park, Sohyung Kwak, Sunghee Park, Seong-Bo Kim	Enzyme and Microbial Technology	134(3)	국외	SCI
33	2020	Fermented Wild Ginseng by <i>Rhizopus oligosporus</i> Improved L-Carnitine and Ginsenoside Contents	Ganghee Lee	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Tae Yun Lim, Juho Lim, Byeongsu Park, Seonmin Lee, Il-Kyoon	Molecules	25(9)	국외	SCI

					Mok, Kunal Pal, Sangyong Lim				
34	2019	Enzymatic production of steviol glucosides using β -glucosidase and their applications	Thi Thanh Hanh Nguyen	Doman Kim	Changseop Seo, So-Hyung Kwak, Jeesoo Kim, Hee-Kyoung Kang, Seong-Bo Kim	Enzymes in Food Biotechnology	단행본 (Chapter 23)	국외	비SCI
35	2020	Enzymatic synthesis of flavonoid glucosides and their biochemical characterization	Thi Thanh Hanh Nguyen	Doman Kim	Juhui Jin, Iis Septiana, Dilshad Quereshi, Kunal Pal	Biopolymer-based formulations: biomedical and food applications	단행본 (Chapter 2)	국외	비SCI
36	2020	Enhancement of neuroprotection, antioxidant capacity, and water-solubility of crocins by transglucosylation using dextransucrase under high hydrostatic pressure	Il-Kyoon Mok	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Dong Hoi Kim, Jae Wook Lee, Sangyong Lim, Ho-yong Jung, Taeyun Lim, Kunal Pal	Enzyme and Microbial Technology	140(10)	국외	SCI
37	2017	Analysis of Ethyl Carbamate in Plum Wines Produced in Korea	JB Lee, MK Kim	Kwang-G eun Lee		Food Science and Biotechnology	27	국내	SCIE
38	2017	Organic acids as a freshness indicator for tofu (soybean curd)	Jae-Young Her	Kwang-G eun Lee		J Food Sci Tech-Mysore	54	국내	SCI
39	2017	Furan Levels and Sensory Profiles of Commercial Coffee Products Under Various Handling	JS Han	Kwang-G eun Lee		J Food Sci.	82	국내	SCI

		Conditions							
40	2017	Reduction of 4(5)-methylimidazole using cookie model systems	Min-Ch eol Jung	Kwang-G eun Lee		J Food Sci	82	국내	SCI
41	2017	Combined inhibitory effect of milk fat and lactose for inactivation of foodborne pathogens by ohmic heating	Sang-Soon Kim	Dong-Hyun Kang		LWT-Food Science and Technology	86	국외	SCI
42	2018	Comparison of the effect of saturated and superheated steam on the inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> Typhimurium and <i>Listeria monocytogenes</i> on cantaloupe and watermelon surfaces	Sun-Ah Kwon	Dong-Hyun Kang		Food Microbiology	72	국외	SCI
43	2018	Inhibition of Initial Attachment of Injured Salmonella Typhimurium onto Abiotic Surfaces	Woo-Ju Kim, Ki-Ok Jeong	Dong-Hyun Kang		Journal of Food Protection	81	국외	SCI
44	2018	Monitoring and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) in processed foods and their raw materials	Jaewook Lee	Kwang-G eun Lee		Food Control	92	국외	SCI
45	2018	Reduction of biogenic amine contents in fermented soybean paste using food additives	Jun-Yo ung Lee	Kwang-G eun Lee		LWT	98	국외	SCI
46	2019	Validation of analytical method for furan determination in eight food matrices and its levels in	SY Jeong	Kwang-G eun Lee		Journal of Separation Science	42	국외	SCI

		various foods							
47	2019	Analytical method to detect adulteration of ground roasted coffee	Song, HY,	Kwang-G eun Lee		Journal of Food Science and Technology	54	국외	SCI
48	2018	Application of continuous-type pulsed ohmic heating system for inactivation of foodborne pathogens in buffered peptone water and tomato juice	Sang-S oon Kim	Dong-Hyun Kang		LWT-Food Science and Technology	93	국외	SCI
49	2018	Inactivation dynamics of 222 nm krypton-chlorine excilamp irradiation on Gram-positive and Gram-negative foodborne pathogenic bacteria	Jun-W on Kang	Dong-Hyun Kang		Food Research International	109	국외	SCI
50	2018	Effect of intermittent 222 nm krypton-chlorine excilamp irradiation on microbial inactivation in water	Jae-Wo n Ha	Dong-Hyun Kang		Food Control	90	국외	SCI
51	2018	UVC-LED Irradiation effectively inactivates aerosolized viruses, bacteria, and fungi in a chamber-type air disinfection system	Do-Ky un Kim	Dong-Hyun Kang		Applied and Environmental Microbiology	84	국외	SCI
52	2018	Inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella typhimurium</i> , and <i>Listeria monocytogenes</i> on cherry tomatoes and oranges by superheated steam	Ga-He e Ban	Dong-Hyun Kang		Food Research International	112	국외	SCI
53	2018	Inactivation of	Woo-J	Dong-		LWT-Food	96	국외	SCI

		foodborne pathogens influenced by dielectric properties, relevant to sugar contents, in chili sauce by 915 MHz microwaves	u Kim	Hyun Kang		Science and Technology			
54	2019	Effect of gamma irradiation on inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> Typhimurium and <i>Listeria monocytogenes</i> on pistachios	Won-Jae Song	Dong-Hyun Kang		Letters in Applied Microbiology	68	국외	SCI
55	2019	Susceptibility of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 grown at low temperature to the krypton-chlorine excilamp	Jae-Ik Lee, Sang-Soon Kim	Dong-Hyun Kang		Scientific Reports	9	국외	SCI
56	2019	Sequential treatment of hydrogen peroxide, vacuum packaging, and dry heat for inactivating <i>Salmonella</i> Typhimurium on alfalfa seeds without detrimental effect on seeds viability	Eun-Jeong Hong	Dong-Hyun Kang		Food Microbiology	77	국외	SCI
57	2019	Analysis and reduction of benzene in various beverages such as vitamin drinks and cranberry juice	Ki-Joo Jang, Seong-Min Hong	KG Lee		LWT	115	국외	SCI

58	2019	ATP degradation products as freshness indicator of flatfish during storage	JH Hwang, JS Kim, HS Choi, Mina K Kim	KG Lee		Food Science and Biotechnology	28(6)	국외	SCIE
59	2020	Analysis of furan in semi-solid and paste type foods	YJ Seok,	KG Lee		Food Science and Biotechnology	29(2)	국외	SCIE
60	2020	Correlation analysis between the concentration of a-dicarbonyls and flavor compounds in soy sauce	S Kim, J Kwon, Y Kim	KG Lee		Food Bioscience	36	국외	SCIE
61	2020	Development of Caramel colour with improved colour stability and reduced 4-methylimidazole	SM Hong, M Park	KG Lee		Food Additives & contaminants: Part A	37	국외	SCIE
62	2020	Analysis of furan and monosaccharides in various coffee beans	YJ Kim, J Choi, G Lee	KG Lee		Journal of Food Science and Technology	57	국외	SCIE
63	2020	Effect of roasting conditions on the formation and kinetics of furan in various nuts	CY Cha	KG Lee		Food Chemistry	331	국외	SCIE
64	2019	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	Sun-Ah Kown	Dong-Hyun Kang		Food Microbiology	82	국외	SCI
65	2019	Synergistic effect of ohmic heating and	Sang-So on Kim	Dong-Hyun Kang		Food Control	102	국외	SCI

		UV-C irradiation for inactivation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes in buffered peptone water and tomato juice							
66	2019	Resistance of Escherichia coli O157:H7 ATCC 35150 to ohmic heating as influenced by growth temperature and sodium chloride concentration in salsa	Sang-So on Kim	Dong-Hyun Kang		Food Control	103	국외	SCI
67	2019	Inactivation of Staphylococcus aureus biofilms on food contact surfaces by superheated steam treatment	Soo-Hwan Kim	Dong-Hyun Kang		Journal of Food Protection	82	국외	SCI
68	2020	Inactivation of Bacillus cereus spores on stainless steel by combined superheated steam and UV-C irradiation treatment	Sang-So on Kim	Dong-Hyun Kang		Journal of Food Protection	83	국외	SCI
69	2020	Antimicrobial efficacy of cold plasma treatment against food-borne pathogens on various foods	Jin-Young Han	Dong-Hyun Kang		Journal of Physics D: Applied Physics	53	국외	SCI
70	2020	Inactivation efficacy of a sixteen UVC LED module to control foodborne pathogens on selective media and sliced deli meat and spinach surfaces	Do-Kyun Kim	Dong-Hyun Kang		LWT-Food Science and Technology	130	국외	SCI
71	2020	Inactivation Kinetics and Membrane Potential of Pathogens in Soybean Curd Subjected to	Eun-Rae Cho	Dong-Hyun Kang		Applied and Environmental Microbiology	86	국외	SCI

		Pulsed Ohmic Heating Depending on Applied Voltage and Duty Ratio				gy			
72	2018	Clostridium perfringens Virulent Bacteriophage CPS2 and Its Thermostable Endolysin LysCPS2	Eunsu Ha, Bokyung Son	Ryu S		Viruses	10(5)	국외	SCi
73	2018	The Auxiliary Role of the Amidase Domain in Cell Wall Binding and Exolytic Activity of Staphylococcal Phage Endolysins	Bokyung Son, Minsuk Kong	Ryu S		Viruses	10(6)	국외	SCi
74	2019	LysPBC2, a novel endolysin harboring a Bacillus cereus spore binding domain	Minsuk Kong	Ryu S		Applied and Environmental Microbiology	85(5):e02462-18	국외	SCi
75	2019	Mutation of a Staphylococcus aureus temperate bacteriophage to a virulent one and evaluation of its application	Yoonje Chang	Ryu S	Jaewoo Bai, Ju-Hoon Lee	Food Microbiology	82: 523-532	국외	SCi
76	2019	Effective removal of staphylococcal biofilms on various food contact surfaces by Staphylococcus aureus phage endolysin LysCSA13	Yoyeon Cha	Ryu S	Bokyung Son	Food Microbiology	84: 103245	국외	SCi
77	2019	Capsular Polysaccharide Is a Receptor of a Clostridium perfringens	Eunsu Ha	Ryu S	Jihwan Chun, Minsik Kim	Viruses	11(11)	국외	SCi

		Bacteriophage CPS1							
--	--	--------------------	--	--	--	--	--	--	--

(나) 특허 성과

○ 1, 2단계

연번	출원된 특허					등록된 특허				
	출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
1						2013	병원성 미생물의 의사소통 저해제 및 이를 이용한 항균 조성물	서울대학교 산학협력단	대한민국	제 10-12636 96호
2	2014	ManNAc-6P 및 NanR 단백질 결합체의 결정화 방법 및 그의 입체 구조	서울대학교 산학협력단/한국생명공학연구원	미국	14/310,879					
3	2012	리포테이코산 또는 그유도체를 포함하는 생물막 형성 방지 또는 저해제 및 이를 이용한 생물막 형성 방지 또는 저해방법	서울대학교 산학협력단	대한민국	제10-2012-0151800호					
4	2013	리포테이코산 또는 그유도체를 포함하는 생물막 형성 방지 또는 저해제 및 이를	(재)서울대학교 산학협력단, (한○○, 안○○, 백○○, 윤○○)	해외	PCT/KR 2013/011876					

		이용한 생물막 형성 방지 또는 저해 방법								
5	2014	Bone loss preventing and bone regeneration or bone formation promoting pharmaceuti- cal composition comprising muramyl dipeptide	서울대 학교 산학협 력단	미국	14401408					
6	2012	사상성 자낭균류에 서 생체내 단백질 상호작용 분석용 백터 및 이를 이용한 스플릿 루시페라아 제 보완 분석방법	순천향 대 산학협 력단	대한민 국	제10-20 12-0059 925호					
7	2013	중합효소 연쇄반응에 의한 곰팡이 푸자리움 컬모류의 종 특이적 검출을 위한 올리고뉴클 레오티드 및 이를 포함하는 키트	순천향 대 산학협 력단	대한민 국	제10-20 13-0043 058호					
8	2013	북미반딧불 이 (<i>Photinus pyralis</i>) 루시페라아 제	순천향 대 산학협 력단	대한민 국	제10-20 13-0063 705호					

		유전자를 이용한 <i>Fusarium</i> 속 곰팡이의 주요 곰팡이독소 생성 검정법								
9						2014	중합효소 연쇄반응에 의한 곰팡이 푸자리움 컬모류의 종 특이적 검출을 위한 올리고뉴클레오티드 및 이를 포함하는 키트	순천향대 산학협력단	대한민국	10-1460244
10	2015	항독성 또는 항병원성 활성을 갖는 레이오딘 화합물 및 이의 용도	성균관대 산업협력단	대한민국	10-2015-0094170					
11	2012	진공포장과 레토르트 살균을 이용한 실온 유통 가능 모시잎 송편 제품 개발	전남대학교/ (발명자 은○○)	대한민국	10-2012-0068233					
12	2013	잠재적 발암물질인 4-methylimidazole의 저감화 방법	동국대학교/ 이광근	대한민국	10-1450094					
13	2013	된장용 대두 및 이의	전남대학교/ 은○○	대한민국	10-2013-0064189					

		제조방법								
14	2013	혼합 중균을 이용한 된장 제조 방법	전남대 학교/ 은○○	대한민 국	10-2013 -006445 6					
15	2013	잔틴옥시다 아제와 니트로블루 테트라졸리 움 지시약의 혼합액의 색 변화를 통한 수산물의 선도 확인방법	이광근, 김○○	대한민 국	10-2013 -010037 0					
16	2013	퓨란의 저감화 방법	동국대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2013 -002737 9					
17						2014	잠재적 발암물질 인 4-methyl imidazole 의 저감화 방법	동국대학 교 산학협력 단	대한민 국	10-14789 10
18						2014	된장용 대두 및 이의 제조방법	전남대학 교산학협 력단	대한민 국	10-2013- 0064456
19						2014	퓨란의 저감화 방법	동국대학 교 산학협력 단	대한민 국	10-14666 89
20	2016	발효식품의 바이오제닉 아민 저감화 방법	동국대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2016 -002195 3					
21	2011	역미셀계를 이용한 리폭시제나 아제 활성 측정방법	장○○, 박○○, 최○○	대한민 국	10-2011 -007129 0					
22	2012	AOT 간섭을 배제한	장○○, 권○○,	대한민 국	10-2012 -007158					

		역미셀계 내 리파아제 활성 측정방법(Lipase assay in reversed micellar system without interference of AOT)	박○○, 최○○			6					
23						2013	역미셀계를 이용한 리폭시제나아제 활성 측정방법	서울대학교산학협력단	대한민국	10-1329361	
24						2014	AOT 간섭을 배제한 역미셀계 내 리파아제 활성 측정방법(Lipase assay in reversed micellar system without interference of AOT)	서울대학교산학협력단	대한민국	10-1432127	
25	2017	안전성이 검증된 장류 발효 균주 및 이를 이용하여 제조한 장	(재)서울대학교산학협력재단	대한민국		10-2017-0051870					
26	2015	L 카르니틴 함유 발효 산물을 이용한 L 카르니틴 함유 버섯의 재배 방법 및 이에 의하여 재배된 L 카르니틴	서울대학교산학협력단	대한민국		10-2015-0180873					

		함유 기능성 버섯								
27	2015	올리고당 함유 당밀의 제조 방법, 이에 의해서 제조된 올리고당고 함유 당밀 및 이의 용도	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2015 -017804 5					
28	2015	L-카르니틴 이 풍부한 발효산물의 제조방법 및 상기방법에 의해 제조된 발효 산물	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2015 -016434 2					
29	2015	애완동물 구강 건강 보조 소재	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2015 -014600 3					
30	2016	두부 유청으로부터 올리고당 제조 방법 및 이에 의하여 제조 된 올리고당	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2016 -004980 0					
31	2016	스테비올배 당체를 이용한 올금으로부터 의 수용화된 커큐미노이 드의 추출방법	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2016 -004601 2					
32	2014	올리고당 고함유 오미자청의 제조방법, 이에 의하여 제조된	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2016 -004452 4					

		올리고당 고함유 오미자청 및 이의용도								
33	2016	신규한 아스트라갈 린 갈락토사이 드 및 이의 제조 방법	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2016 -004277 7					
34	2016	미생물 이용한 고체 발효커피의 제조 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 고체 발효커피	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2016 -002719 0					
35	2016	올리고당 고함유 발효커피시 럽의 제조 방법 및 이에 의하여 제조된 올리고당 고함유 발효커피시 럽	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2015 -002972 7					
36	2016	발효 팔 요거트 및 이의 제조 방법	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2016 -000928 2					
37	2015	수용화 총 폴리페놀함 량 강화된 밀 가공식품의 제조방법	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2015 -018610 6					
38	2016	지카바이러 스 감염질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2016 -005515 7					

39						2017	GLUT1, GLUT5, 또는 GLUT1 및 GLUT5 활성 억제용 조성물	서울대학 교 산학협력 단	대한민 국	10-17348 57
40	2017	천연물 한방소재 성분 아스트라갈 린의 갈락토사이 드 배당체 합성 방법	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국		10-2017 -004530 9				
41	2016	올리고당 고함유 당밀의 제조 방법, 이에 의하여 제조된 올리 고당 고함유 당밀 및 이의 용도	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국		10-2016 -016566 8				
42	2017	스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이 드 의 추출 방법및 이에 의하여 추출된 수용성이 증가된 커큐 미노이드	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국		10-2017 -004939 1				
43	2017	올리고당 고함유 오미자청의 제조 방법, 이에 의하여 제조된	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국		10-2017 -004746 3				

		올리고당 고함유 오미자청 및 이의 용도								
44	2016	글루칸수크 라아제의 고효율 생산을 위한 변형 류코노스톡 속 균주 및 상기 균주를 이용한 스테비오사 이드 배당체의 합성 방법	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2016 -015355 7					
45	2016	발효 메밀을 이용한 L-카르니틴 이 풍부한 기능성 막걸리의 제조 방법	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2016 -016159 5					
46	2016	L-카르니틴 이 풍부한 퀴노아 발효산물의 제조 방법	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2016 -016931 2					
47	2016	미생물 이용한 고체 발효커피의 제조 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 고체 발효커피	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2016 -015875 1					
48	2017	맛, 풍미 및 기능성 성분이 강화된 커피 및 이의 제조 방법	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2017 -006456 4					

49	2017	기능성이 향상된 발효 발아 메밀의 제조 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 발효 발아 메밀의 용도	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2017-0059823					
50	2017	수용성 및 생체이용률이 향상된 EGCG 프락토사이드의 제조 방법	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2017-0059822					
51	2012	T7 과지를 이용한 바실러스 과지 엔도라이신 유전자의 스크리닝 방법	유상렬, 최○○	대한민국	10-2012-0078649					
52					2012	펩티다아제 활성이 있는 엔도라이신 LysB4, 이를 포함하는 식품 및 사료 조성물	유상렬, 손○○	대한민국	10-1177358	
53	2013	포도상구균에 대해 숙주감수성을 나타내는 박테리오파지 SA12 및 이를 함유하는 조성물	유상렬, 장○○	대한민국	10-2013-0061228					
54	2015	황색포도상구균에 대해	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2015-0078500					

		숙주감수성을 나타내는 박테리오파지 시포비리데 패밀리 SAP4 및 이를 함유하는 조성물	단 (유상렬 박○○ 장○○)							
55	2015	바실러스 세레우스 세포벽 결합 폴리펩타이드 및 바실러스 세레우스 검출용 매개체	서울대학교 산학협력단 (유상렬 공○○ 나○○)	대한민국	10-2015-0080121					
56	2016	새로운 호스트 바인딩 도메인을 갖는 포도상구균 박테리오파지 SA11 유래의 신규 엔도라이신 LysSA11 및 이를 포함하는 세균 사멸용 조성물	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2016-0007766					
57						2016	포도상구균에 대해 숙주감수성을 나타내는 박테리오파지 SA12 및 이를 함유하는 조성물	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-1596665
58	2016	무씨 (나복자,	서울대학교	대한민국	7/1 이전 출원					

		내복자) 10%, 30% EtOH 추출물의 항산화능 및 항균효능을 활용한 차별화된 천연물 유래 식품 보존료	산학협 력단		예정					
59	20197	설포라핀을 다량 함유하는 무씨 추출물의 제조방법 및 이로부터 추출된 무씨 추출물을 함유하는 체중, 혈당조절용 및 지방간 예방용 식품 조성물, 약품 조성물, 동물용 의약품	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2017 -005574 7					
60	2010	향상된 기능의 살모넬라 타이피무리 움 선택 분별 배지	강동현, 유상렬, 박○○	한국	10-2010 -012623 8					
61	2010	미생물균질 기	강동현, 유상렬, 사공○ ○	한국	10- 2010- 0034930					
62	2012	리스 테리아 모노사이토 제니스 선택 배양용 배지	강동현, 유상렬, 장○○, 박○○	한국						

		조성물									
63	2013	고춧가루 살균장치	강동현, 하○○	한국	10-2013-0085908						
64	2013	황색포도상구균 분별을 위한 미생물 배지	강동현, 유상렬, 천○○	한국	10-2013-0106623						
65	2014	조제분유 살균장치	강동현, 하○○	한국	10-2014-0027859						
66						2014	고춧가루 살균장치	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-1468638	
67	2014	슬라이스 햄 살균장치	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0103534						
68	2014	과열수증기를 이용한 바이오필름의 제거방법	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2014-0040617						
69						2015	황색포도상구균 분별을 위한 미생물 배지	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-1485947	
70	2015	향상된 기능의 쉬겔라 균 선택 분별용 배지	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2015-0034015						
71	2015	견과류 살균장치	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2015-0056303						
72						2016	과열수증기를 이용한 바이오필름의 제거방법	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-1587244	
73						2016	조제분유 살균장치	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-1626316	

74	2016	슬라이스 치즈 표면 살균 방법	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2016-0081305					
75						2016	슬라이스 햄 살균장치	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-1674077
76						2017	발효 팔요거트 및 이의 제조 방법	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-1764887

○ 3단계

출원된 특허						등록된 특허				
연번	출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
1						2018	안전성이 검증된 장류 발효 균주 및 이를 이용하여 제조된 장	서울대학교 산학협력단	한국	10-1926183
2						2018	설포라핀을 다량 함유하는 무씨 추출물의 제조방법 및 이로부터 추출된 무씨 추출물을 함유하는 체중, 혈당조절용 및 지방간	서울대학교 산학협력단	한국	10-1907179
3	2018	RTX 독소 생성 저해제 및 이를 이용한 비브리오팀 감염증 치료용 조성물	서울대학교 산학협력단	한국	10-2018-0139927					
4	2018	전자현미경	서울	한국	10-2018					

		용 그리드의 액체양 측정장치	대학교산학협력단		-0081070					
5	2019	전자현미경용 그리드 샘플 제작장치	서울대학교 산학협력단	미국	PCT/KR 2019/007980					
6	2019	RTX 독소 생성 저해제 및 이를 이용한 비브리오팀 감염증 치료용 조성물	서울대학교산학협력단	미국	PCT/KR 2019/000218					
7	2020	RTX 독소 생성 저해제 및 이를 이용한 비브리오팀 감염증 치료용 조성물	서울대학교산학협력단	미국	16/637,053					
8	2017	변형 류코노스톡속 균주를 이용한 스테비오사이드 배당체의 합성 방법 및 이에 의하여 제조된 신규한 스테비오사이드 배당체	서울대학교 산학협력단	한국	10-2017-0152472	2019	변형 류코노스톡속 균주를 이용한 스테비오사이드 배당체의 합성 방법 및 이에 의하여 제조된 신규한 스테비오사이드 배당체	서울대학교 산학협력단	한국	10-1997597
9	2017	변형 류코노스톡속 균주를	서울대학교	미국	PCT/KR 2017/013100					

		이용한 스테비오사이드 배당체의 합성 방법 및 이에 의하여 제조된 신규한 스테비오사이드 배당체	산학협력단							
10	2017	미생물을 이용한 고체 발효 커피의 제조방법 및 이에 의하여 제조된 고체 발효 커피	서울대학교 산학협력단	한국	10-2017-0161098	2019	미생물을 이용한 고체 발효 커피의 제조방법 및 이에 의하여 제조된 고체 발효 커피	서울대학교 산학협력단	한국	10-1994276
11	2017	발효 메밀을 이용한 L-카르니틴이 풍부한 기능성 막걸리의 제조 방법 및 이에 의하여 제조된 기능성 막걸리	서울대학교 산학협력단	한국	10-2017-0163469	2019	발효 메밀을 이용한 L-카르니틴이 풍부한 기능성 막걸리의 제조 방법 및 이에 의하여 제조된 기능성 막걸리	서울대학교 산학협력단	한국	10-2028067
12	2017	인삼류로부터 진세노사이드를 고효율로 추출하는 방법 및 이에 의하여 추출된 진세노사이드	서울대학교 산학협력단	한국	10-2017-0165304	2020	인삼류로부터 진세노사이드를 고효율로 추출하는 방법 및 이에 의하여 추출된 진세노사이드	서울대학교 산학협력단	한국	10-2099345
13	2017	인간 타이로시나아제의 발현 방법 및 이에 의하여 제조된 인간 타이로시나	서울대학교 산학협력단	한국	10-2017-0181262					

		아제의 용도								
14	2017	발효 산양삼추출액의 제조방법 및 이에 의하여 제조된 발효 산양삼추출액	서울대학교 산학협력단	한국	10-2017-0181261					
15	2018	버섯 배양액을 포함하는 화장료 조성물	서울대학교 산학협력단	한국	10-2018-0050927					
16	2018	L-카르니틴 함유 강황 발효 산물	서울대학교 산학협력단	한국	10-2018-0050929					
17	2018	저열량 카스카라 시럽의 제조 방법	서울대학교 산학협력단	한국	10-2018-0054418					
18	2018	레반수크라 아제를 이용한 루부소사이드-프락토사이드의 합성 방법	서울대학교 산학협력단	한국	10-2018-0075351					
19	2018	글루칸수크라 아제를 이용한 스테비오사이드 배당체의 합성 방법	서울대학교 산학협력단	한국	10-2018-0101326					
20	2018	커피잎 추출물, 프리바이오틱스, 또는 커피잎 추출물 및 프리바이오틱스	서울대학교 산학협력단	한국	10-2018-0107672					

		티스를 유효성분으로 포함하는 구강 세균 억제용 조성물							
21	2018	L-카르니틴을 포함하는 발효 홍삼 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 발효 홍삼	서울대학교 산학협력단	한국	10-2018-0110073				
22	2018	루부소사이드를 유효성분으로 포함하는 구강 세균 억제용 조성물	서울대학교 산학협력단	한국	10-2018-0110143				
23	2018	저열량의 올리고당 고함유 콤포차 제조방법	서울대학교 산학협력단	한국	10-2018-0117294				
24	2018	L-카르니틴이 풍부한 강황 발효산물의 제조 방법 및 이의 용도	서울대학교 산학협력단	한국	10-2018-0118114				
25	2018	크로신 글루코사이드의 제조 방법 및 크로신 글루코사이드를 포함하는 항산화, 항염증, 항우울증, 기억력 향상, 항종양, 신경세포보	서울대학교 산학협력단	한국	10-2018-0138950				

		호 효과 등 다양한 생리활성 개선용 약학적 조성물								
26	2018	유산균 균주를 이용하여 제조된 올리고당을 포함하는 난수 용성 물질의 수용액 가용화 조성물	서울 대학 교 산학 협력 단	한국	10-2019 -016255 5					
27	2019	발효 산양삼 제조 방법	서울 대학 교 산학 협력 단	한국	10-2019 -004829 2					
28	2019	리조푸스 속 균주를 이용한 난용성 폴리페놀 화합물의 수용화 방법 및 상기 방법으로 제조된 수용화된 폴리페놀 화합물	서울 대학 교 산학 협력 단	한국	10-2019 -009222 1					
29	2019	리조푸스 속 균주를 이용한 발효 강화 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 발효 강화	서울 대학 교 산학 협력 단	한국	10-2019 -009251 8					
30	2019	수용성 커큐미노이 드의 함량이	서울 대학 교	한국	10-2019 -009286 4					

		증가된 강황 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 수용성 커큐미노이 드의 함량이 증가된 강황	산학 협력 단							
31	2019	발효당을 이용한 저열량의 콤부차 제조방법	서울 대학 교 산학 협력 단	한국	10-2019 -012241 6					
32	2019	크로신 배당체 및 상기 크로신 배당체 화합물의 제조방법	서울 대학 교 산학 협력 단	한국	10-2019 -012982 4					
33	2019	효소 및 초고압처리 에 의한 진세노사이 드 Rg3의 생산방법	서울 대학 교 산학 협력 단	한국	10-2019 -014501 2					
34	2020	모그로사이 드 배당체를 포함하는 난수용성 물질의 수용액 가용화 조성물	서울 대학 교 산학 협력 단	한국	10-2020 -005104 3					
35	2020	신종 코로나바이 러스 주요 단백질 가수분해효 소의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으 로 포함하는 신종 코로나바이 러스 감염의	서울 대학 교 산학 협력 단	한국	10-2020 -004985 3					

		예방 또는 치료용 약학적 조성물								
36	2020	모나콜린 K 및 L-카르니틴 을 모두 포함하는 건강 기능 식품 발효 소재의 제조 방법	서울 대학 교 산학협 력단	한국	10-2020 -010072 3					
37	2020	발효 산양삼 잎 제조방법 및 이를 이용한 카르니틴 및 모나콜린의 생산방법	서울 대학 교 산학협 력단	한국	10-2020 -010072 2					
38					2018	올리고당 고함유 발효커피시럽 의 제조 방법 및 이에 의하여 제조된 올리고당 고함유 발효커피시럽	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-1818 609	
39					2018	글루칸수크라 아제의 고효율 생산을 위한 변형 류코노스톡속 균주	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-1863 321	
40					2018	L-카르니틴이 풍부한 발효산물의 제조 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 발효산물	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-1873 514	
41					2018	L 카르니틴 함유 발효 산물을 이용한 L	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-1894 423	

							카르니틴 함유 버섯의 재배 방법 및 이에 의하여 재배된 L 카르니틴 함유 기능성 버섯			
42						2018	애완동물 구강 건강 보조 소재	서울대학교 산학협력단	한국	10-1911290
43						2018	스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법 및 이에 의하여 추출된 수용성이 증가된 커큐미노이드	서울대학교 산학협력단	한국	10-1924159
44						2019	올리고당 고함유 당밀의 제조 방법, 이에 의하여 제조된 올리고당 고함유 당밀 및 이의 용도	서울대학교 산학협력단	한국	10-1964115
45						2019	신규한 EGCG 배당체 및 이의 제조 방법	서울대학교 산학협력단	한국	10-1995244
46						2019	레반수크라아제를 이용한 루부소사이드-프락토사이드의 합성 방법	서울대학교 산학협력단	한국	10-2050863
47						2020	올리고당 고함유 오미자청의 제조 방법, 이에 의하여 제조된	서울대학교 산학협력단	한국	10-2015807

							올리고당 고함유 오미자청 및 이의 용도			
48						2020	천연물 한방소재 성분 아스트라갈린 의 갈락토사이드 배당체 합성 방법	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-2095 341
49	2016	발효식품의 바이오제닉 아민 저감화 방법	동국 대학 교 산학협 력단	대한 민국	10-2016 -002195 3	2017	발효식품의 바이오제닉 아민 저감화 방법	동국대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-1806 519
50	2018	제 3형 캐러멜 색소의 제조 방법 및 그로부터 제조된 제2형 캐러멜 색소	동국 대학 교 산학협 력단	대한 민국	10-2018 -008694 1	2020	제3형 캐러멜 색소의 제조 방법 및 그로부터 제조된 제 3형 캐러멜 색소	동국대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2122 070
51	2019	병원성 미생물 살균장치 및 이를 이용 시스템	서울 대학 교 산학협 력단	대한 민국	10-2019 -000899 4					
52	2018	신규한 살모넬라 하이델베르 그 박테리오파 지 Sal-HEP-1 및 이의 살모넬라 하이델베르 그 균 증식 억제 용도	(주)인 트론 바이 오테 크놀 로지	한국	10-2018 -002049 5	2019	신규한 살모넬라 하이델베르그 박테리오파지 Sal-HEP-1 및 이의 살모넬라 하이델베르그 균 증식 억제 용도	(주)인 트론바 이오테 크놀로 지	한국	KR10-2 041109
53	2018	신규한 스트렙토코 커스 스위스 박테리오파 지 Str-SUP-1 및 이의 스트렙토코 커스 스위스	(주)인 트론 바이 오테 크놀 로지	한국	10-2018 -006406 2	2020	신규한 스트렙토코커 스 스위스 박테리오파지 Str-SUP-1 및 이의 스트렙토코커 스 스위스 균 증식 억제	(주)인 트론바 이오테 크놀로 지	한국	KR10-2 073086

		균 증식 억제 용도					용도			
54	2018	신규한 스트렙토코커스 수이스 박테리오파지 Str-SUP-2 및 이의 스트렙토코커스 수이스 균 증식 억제 용도	(주)인트론 바이오 테크놀로지	한국	10-2018-0064064	2020	신규한 스트렙토코커스 수이스 박테리오파지 Str-SUP-2 및 이의 스트렙토코커스 수이스 균 증식 억제 용도	(주)인트론 바이오 테크놀로지	한국	KR10-2073088
55	2018	신규한 스트렙토코커스 수이스 박테리오파지 Str-SUP-3 및 이의 스트렙토코커스 수이스 균 증식 억제 용도	(주)인트론 바이오 테크놀로지	한국	10-2018-0064065	2020	신규한 스트렙토코커스 수이스 박테리오파지 Str-SUP-3 및 이의 스트렙토코커스 수이스 균 증식 억제 용도	(주)인트론 바이오 테크놀로지	한국	KR10-2073094
56	2018	대장균 박테리오파지 Esc-COP-14 및 이의 병원성 대장균 증식 억제 용도	(주)인트론 바이오 테크놀로지	한국	10-2018-0080284	2020	대장균 박테리오파지 Esc-COP-14 및 이의 병원성 대장균 증식 억제 용도	(주)인트론 바이오 테크놀로지	한국	KR10-2073095
57	2019	신규한 살모넬라 하이델베르그 박테리오파지 Sal-HEP-1 및 이의 살모넬라 하이델베르그 균 증식 억제 용도	(주)인트론 바이오 테크놀로지	PCT	PCT/KR 2019/001896					
58	2019	신규한 스트렙토코커스 수이스 박테리오파지 Str-SUP-1 및 이의 스트렙토코	(주)인트론 바이오 테크놀로지	PCT	PCT/KR 2019/006558					

		커스 수이스 균 증식 억제 용도								
59	2019	신규한 스트렙토코 커스 수이스 박테리오파 지 Str-SUP-2 및 이의 스트렙토코 커스 수이스 균 증식 억제 용도	(주)인 트론 바이 오테 크놀 로지	PCT	PCT/KR 2019/00 6562					
60	2019	신규한 스트렙토코 커스 수이스 박테리오파 지 Str-SUP-3 및 이의 스트렙토코 커스 수이스 균 증식 억제 용도	(주)인 트론 바이 오테 크놀 로지	PCT	PCT/KR 2019/00 6566					
61	2019	대장균 박테리오파 지 Esc-COP-14 및 이의 병원성 대장균 증식 억제 용도	(주)인 트론 바이 오테 크놀 로지	PCT	PCT/KR 2019/00 6903					
62						2017	새로운 호스트 바인딩 도메인을 갖는 포도상구균 박테리오파지 SA11 유래의 신규 엔도라이신 LysSA11 및 이를 포함하는 세균 사멸용 조성물	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-1796 279
63						2018	클로스트리디 움 퍼프린젠스 세포벽 결합	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-1818 498

							폴리펩타이드 및 클로스트리디 움 퍼프린젠스 검출용 매개체			
64						2018	포도상구균 박테리오파지 유래 신규 엔도라이신 LysSA97과 에센셜 오일 성분을 함유하는 세균 사멸용 조성물	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-1818 499
65	2019	클로스트리 디움 퍼프린젠스 용해능을 가진 내열성 엔도라이신 LysCPD2	서울 대학 교 산학협 력단	대한 민국	10-2019 -001300 5	2019	클로스트리디 움 퍼프린젠스 용해능을 가진 내열성 엔도라이신 LysCPD2	서울대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2035 283
66	2020	황색포도상 구균 유래 점보박테리 오파지 PALS2 및 그 유래의 엔도라이 신 LysPALS21과 LysPALS22	서울 대학 교 산학협 력단	대한 민국	10-2020 -006041 8					
67	2020	내열성 박테리오파 지 TS3, TS6, TS13 및 이를 포함하는 살모넬라 억제용 조성물	서울 대학 교 산학협 력단	대한 민국	10-2020 -006181 4					

(다) 기술료징수 현황

○ 1, 2단계

- 기술이전 및 기술지도 내용

※ 명칭, 관련업체명, 지도내용 등

구분	시행일	기술지도 업체(담당자)	기술지도 내역
2-2 (장판식)	2011.06.07 (1차) 2011.06.24 (2차) 2011.07.05 (3차)	세니젠(김○○ 연구원)	· 농식품 유래 조효소액 추출과정 (intracellular enzyme) · Lipase 활성 분석법 개선방안 · 역미셀계를 이용한 lipoygenase 활성 분석법
2-1 (조명행)	2011.11.18 ~12.16	몽골보건부(Public Health Institute of Ministry of Health) Poison Information Cewnter의 센터장 Dr. Unursaikhan	· 식품중잔류농약, 중금속분석과 식품유래신경독성물질의 위해성평가 기법전수
1-2 (한승현)	2009년~2011년	(주)RNA	· 미생물로부터 LTA정제기술과 세포분화 및 활성평가 기술지도 (계량적 성과: 특허 1개, 논문3편)
3-1 (유상렬)	2010년~2011년	(주)CJ 제일제당	· 살모넬라 조기 검출 시스템 및 phage를 이용한 살모넬라 제어 기술 개발
3-3 (강동현)	2010년~2011년	(주)삼립	· Bubbling 살균수 적용 및 제빵류의 살균을 위한 RF 처리 기술 도입

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료
1	지식재산권	유전체조작 효소의 분리 정제 기술	(주)톨젠	2014.06.03	4,000,000원
2	통상실시권	난용성 소재의 수용해성 개선 방법	(주)SNH	2015.11.12	30,000,000원
3	노하우	고체 및 반고체 식품 적용을 위한 고주파수 ohmic 가열 살균 기술	(주)세니젠	2014.05.21	10,000,000원
4	노하우	얼음제조기용 살균제 조성에 대한 노하우	(주)세니젠	2015.08.20	선급 기술료 5,000,000원
5	지식재산권	조제분유살균장치	웅지전자	2016.12.06	19,000,000원
6	미생물 균주	한국 전통장류에서 분리한 521종의 균주 기술	샘표식품	2017.07.24	10,000,000원
7	전용실시권	설포라핀을 다량 함유하는 무씨 추출물의 제조방법 및 이로부터 추출된 무씨 추출물을 함유하는 체중, 혈당조절용 및 지방간 예방용 식품 조성물, 약품 조성물, 동물용 의약품	(주)밥스누	2017.08.07	25,000,000원
합계					103,000,000원

○ 3단계

N O	기술이전유 형	기술실시 계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료
1	통상실시권	<ul style="list-style-type: none"> Rabbit polyclonal antibody to Prx1 (<i>Vibrio vulnificus</i>) Rabbit polyclonal antibody to Prx2 (<i>Vibrio vulnificus</i>) Rabbit polyclonal antibody to Prx2-SO₃ (<i>Vibrio vulnificus</i>) 	(주)영인프론티어	2018.02.27	0
2	통상실시권	전자현미경용 그리드 샘플 제작장치	엑스탬바이오랩	2019.12.23	20,000,000
3	통상실시권	항산화 및 항균 기능 소재 합성균주의 발효 배양액 생산 기술 및 발효용 스타터 유지 기술	농업회사법인 (주)우리두	2019.02.22	10,000,000
4	통상실시권	대한민국특허출원 제 2017-0181261호 및 관련 노하우	지식과나눔	2019.03.21	20,000,000
5	통상실시권	대한민국 특허 제 863321호 및 노하우	한주F&B	2019.05.21	20,500,000 (선급)
6	통상실시권	대한민국 특허 제 863321호 및 노하우	한주F&B	2019-05-21	4,309,588 (경상)
7	노하우	대장균 O157:H7의 검출을 위한 배지 조성물	(주)세니젠	2020.03.30	10,000,000
8	직접실시	식중독균에 제어력을 갖는 박테리오파지 및 파지 유래 단백질의 개발 기술	(주)인트론바이오테크놀로지	2019.04.09	1,652,000
9	기술이전	펩티다아제 활성이 있는 엔돌라이신 LysB4, 이를 포함하는 식품 및 사료 조성물	(주)인트론바이오테크놀로지	2020.03.19	80,000,000
10	기술이전	클로스트리디움 퍼프린젠스 박테리오파지 CPD2 및 이의 증식용 숙주	(주)인트론바이오테크놀로지	2020.03.19	25,000,000
11	기술이전	클로스트리디움 퍼프린젠스 박테리오파지 CPD4 및 이의 증식용 숙주	(주)인트론바이오테크놀로지	2020.03.19	25,000,000
합계					216,461,588

(라) 사업화 성과 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2			
	소요예산(백만원)	40			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0.92	5		
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	5	20	
국외					
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	9215 만원	
			향후 3년간 매출		
		관련제품	개발후 현재까지		
			향후 3년간 매출		
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 5 % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 20 % 국외 : 2 %	
			관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
		세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
			3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		위

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3년			
	소요예산(백만원)	267			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		2	3	4.5	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0.5	2.6	4.75
국외		-	-	-	
	향후 관련기술,				

	제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)	-	-	-
	수출	-	-	-

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	7.35 억원
			향후 3년간 매출	억원
		관련제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		위

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	7.1 억원
			향후 3년간 매출	30 억원
		관련제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 7.1 억원 국외 : -
			향후 3년간 매출	국내 : 15 억원 국외 : 15 억원
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		1위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		1위

(마) 학술 및 국제협력 성과

- ① 국내외 학술회의 개최 (※ 학술회의명, 개최 예정 년도, 참석자 규모, 회의내용 등 기재)
- ② 국제공동세미나 (※ 세미나명, 개최 예정 기간, 참가자 규모, 세미나내용 등 기재)
- ③ 방문연구 (※ 상대기관, 방문과학자, 방문내용 등 기재)
- ④ 협력기관 (※ 상대기관, 국가명, 협력내용 등 기재)
- ⑤ 기타협력 (※ 센터사업 중 연관 있는 사항을 중심으로 기재)

(바) 기타 주요연구 성과 (자유 기술)

○ 제 1핵심 : 식중독 미생물 제어 선도물질 최적화 및 안전식품 생산 적용

- 제 1-1세부 (서울대 최상호, 하남출)

연차	연구내용	연구결과
후속1차년도	<ul style="list-style-type: none"> • CM2660의 패혈증 비브리오균 독성 저해 효과를 human cell line과 mouse model을 이용하여 평가함 	<ul style="list-style-type: none"> • CM2660은 패혈증 비브리오균의 human epithelial cell 감염 시 나타나는 cell rounding 과 actin oligomerization을 효과적으로 저해하였으며, 또한 패혈증 비브리오균의 mouse 감염 시 mouse survival을 증가시키고, mouse의 inflammatory responses 및 간, 신장 기능 손상을 완화함
	<ul style="list-style-type: none"> • 패혈증 비브리오균에 CM2660 또는 DMSO (대조군)를 처리하고 RNA를 분리하여 샘플 간 유전자 발현 양상의 차이를 분석함 	<ul style="list-style-type: none"> • CM2660 처리는 HlyU에 의하여 발현이 조절되는 독성 유전자 rtxA, vvhA, plpA를 포함하여 여러 유전자의 발현을 hlyU mutant수준으로 변화시킴
	<ul style="list-style-type: none"> • CM2660에 의하여 발현이 조절되는 패혈증 비브리오균의 유전자들 중에서 CM2660 처리에 의하여 발현이 억제되는 독성 유전자 또는 operon을 조사함 	<ul style="list-style-type: none"> • CM2660에 의해 발현이 감소하는 rtxHCA 및 rtxBDE operon을 marker 독성 유전자로 발굴함
	<ul style="list-style-type: none"> • Marker 독성 유전자 operon rtxHCA 및 rtxBDE의 발현 및 기능 특성을 조사함 	<ul style="list-style-type: none"> • 독성 유전자 rtxA가 growth phage 의존적으로 발현되며, mid-exponential phase에서 maximum으로 발현됨을 확인함 • rtxHCA, rtxBDE operon의 transcription start site를 결정하고 promoter activity가 host cell 노출 시 가장 높게 나타남을 확인함

		<ul style="list-style-type: none"> MARTX toxin 분비에 rtxE가 encoding하는 ATP binding protein RtxE가 필수적임을 확인함
후속2차년도	<ul style="list-style-type: none"> HlyU marker 독성 유전자 rtxA의 promoter region을 promoterless lux operon에 fusion시킨 Reporter plasmid를 제작하고, 이를 패혈증 비브리오균에 도입시켜 Reporter strain을 구축하였으며, screening을 위한 최적 조건을 설정함 	<ul style="list-style-type: none"> HlyU marker 독성 유전자 rtxA를 포함한 rtxHCA operon의 promoter region을 promoterless lux operon을 가지고 있는 pBBR_lux plasmid에 cloning하여 Reporter plasmid를 제작함 Reporter plasmid를 패혈증 비브리오균에 도입시킴으로써 Reporter strain을 구축하고, 이를 배양하면서 시간대별로 growth(A600) 및 luminescence를 측정하여 relative luminescence unit (RLU)을 계산하고, 배양 1.5시간 후 가장 높은 RLU를 나타냄을 확인함
	<ul style="list-style-type: none"> 구축한 Reporter strain에 다양한 농도의 제어 선도물질 CM2660과 그 유도체들 (총 15종)을 처리하고 Lux assay를 수행함 	<ul style="list-style-type: none"> Reporter strain에 다양한 농도의 CM2660 및 유도체 14종을 처리하고 Lux assay를 수행한 후, 각 유도체의 half maximal effective concentration (EC50)을 결정함 CM2660은 30.97 μM의 EC50를 나타내었으며, CM2660보다 높은 효능(낮은 EC50)을 보이는 유도체들이 있었으나, 패혈증 비브리오균의 성장을 저해하여 선발 과정에서 제외함
	<ul style="list-style-type: none"> HlyU의 활성을 억제하는 최적 선도물질을 선발함 	<ul style="list-style-type: none"> 패혈증 비브리오균의 성장을 저해하지 않으면서 높은 rtxA 발현억제 효능을 보이는 CM2660을 최적 선도물질로 선발함
	<ul style="list-style-type: none"> CM2660을 HlyU에 처리 후 mass spectrometric analysis 및 mutational analysis를 수행함 	<ul style="list-style-type: none"> CM2660은 HlyU의 Cys30 잔기와 반응하여 공유 결합을 형성함 HlyU의 Cys30 잔기와, Cys30 근처의 Cys96 잔기를 각각 serine으로 치환한 mutant를 구축 및 정제함 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 및 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 수행한 결과, cysteine이 serine으로 치환된 mutant HlyU는 CM2660에 대해 내성을 가짐을 확인함
후속3차년도	<ul style="list-style-type: none"> 제어 선도물질 CM2660의 패혈증 비브리오균 이외에 여러 병원성 비브리오균에 대한 독성 	<ul style="list-style-type: none"> CM2660은 병원성 비브리오균인 장염 비브리오균, 비브리오 알기놀리티쿠스, 비브리오 콜레라균의 독성 유전자 발현 및 독성 관련 표현형(cytotoxicity, hemolytic activity)을 억제함

	억제 효능을 확인함	
	<ul style="list-style-type: none"> Human cell line과 mouse model을 이용하여 CM2660의 안전성을 검증함 	<ul style="list-style-type: none"> CM2660이 INT-407 human epithelial cell에 세포 독성(cytotoxicity)을 보이지 않으며, mouse 투여 시 모든 mouse가 생존함을 확인함
	<ul style="list-style-type: none"> 패혈증 비브리오균에 의한 오염 가능성이 있는 식품 중 굴을 pilot scale 모델식품으로 선정하고, 굴 접촉 시 패혈증 비브리오균의 독성 유전자 발현여부를 확인함 	<ul style="list-style-type: none"> 굴에 패혈증 비브리오균을 접촉시키고, qRT-PCR을 수행하여 굴에 접촉한 패혈증 비브리오균에서 독성 유전자 rtxA의 발현이 대조군 대비 유의미하게 증가함을 확인함
	<ul style="list-style-type: none"> 굴 접촉 시 CM2660의 패혈증 비브리오균 독성 유전자 발현억제 효능을 확인하고, 식품안전 후보물질로써 도출함 	<ul style="list-style-type: none"> CM2660이 굴 접촉 시 패혈증 비브리오균의 rtxA 발현을 효과적으로 억제함을 확인하였으며, CM2660을 독성인자 발현제어 선도물질 및 식품안전 후보물질로 도출함
	<ul style="list-style-type: none"> 패혈증 비브리오의 독소 활성 억제에 관여하는 천연물 스크리닝 	<ul style="list-style-type: none"> Hemolytic assay를 이용하여 20 여종의 천연물 중 균의 생장은 저해하지 않고, 독소 활성에만 영향을 미치는 천연 물질인 우르솔산 발굴
	<ul style="list-style-type: none"> 우르솔산의 제형개선 	<ul style="list-style-type: none"> DMSO가 아닌 식품에 처리 가능한 용매 중 에탄올에 우르솔산을 용해하여 DMSO와 유사한 효과를 나타내는지 확인 100 μM 우르솔산이 패혈증 비브리오의 독소 활성에 영향을 미침을 확인
	<ul style="list-style-type: none"> 천연물을 이용한 패혈증 비브리오균의 독소 발현인자 HlyU의 억제제 CM2660의 제형 개선 	<ul style="list-style-type: none"> 천연물인 우르솔산 CM2660을 병용 처리하여 DMSO가 아닌 에탄올에 CM2660을 용해하여 DMSO와 유사한 효과를 나타냄 100 μM 우르솔산 병용처리시 CM2660의 농도를 10 μM까지 낮게 사용할 수 있음을 확인

- 제 1-2세부 (서울대 김도만)

연차	연구내용	연구결과
후속1차년도		
후속2차년도	<ul style="list-style-type: none"> 유산균 발효 및 발효액을 이용한 난소화성 향균 프리바이오틱스 및 신바이오틱스 화합물 	<ul style="list-style-type: none"> 파일럿 스케일 당전이 효소 생산 수율(역가) 확인: 산업 배지 조성 최적화, 배양조건 최적화 미생물배양액(효소)의 보관, 안정성, 배양액

	<p>생산 최적화</p>	<p>의 품질(효소 역가) 유지 조건 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> 천연 향균 소재(오미자, 오미자 부산물, 커피 나무 부산물), 스테비올 배당체 그리고 설탕의 효소 생물전환 공정 개발
	<ul style="list-style-type: none"> 개발 식품 소재의 향균, 항산화 등 식품 내 물질 특성 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 개발 소재의 항산화 특성 확인 치아 건강 관련 항 충치 기능 정보 확보 생물전환 천연 향균 소재 포함 건강 식음료의 특성 연구
	<ul style="list-style-type: none"> 천연 및 발효 식음료 환경에 대한 적용 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 메밀 준비 및 활용 연구: 발효 음료(콤부차, 맥주 등) 제조 및 성분 연구 발효 음료 종균 개발 저열량, 항산화 특성 소재 활용 음료 개발(발효 메밀 맥주, 다양한 과채 즙의 저열량 콤부차 등)
후속3차년도	<ul style="list-style-type: none"> 발효 배양액 생산 및 수용화 천연 향균 소재 생산 	<ul style="list-style-type: none"> 개발한 당전이 효소 고생산 균의 효소 생산, 파일럿 스케일 효소 수용체 반응 최적화 스테비아를 수용체로 수 리터 규모의 스테비오사이드 수용체 반응
	<ul style="list-style-type: none"> 스테비오사이드 생물전환 산물들의 향균 및 기타 특성 확인 	<ul style="list-style-type: none"> 스테비오사이드 생물전환 산물 포함하는 발효 음료 제조. 산물의 구성 확인 및 항산화, 향균특성 성분 분석과 특정 성분들의 시너지 특성 확인
	<ul style="list-style-type: none"> 저열량 과실 음료(청 등) 제조를 위한 올리고당 합성 	<ul style="list-style-type: none"> 균 배양액과 천연 항산화 소재 배당체 및 수용화 용액 준비 및 과실청(음료) 내 올리고당 합성을 위한 생물전환 조건 연구; 최적 생물전환조건 연구 진행
	<ul style="list-style-type: none"> 스테비올 올리고당 함유(발효) 식음료의 기능성 확보 	<ul style="list-style-type: none"> 치아 건강 관련 항 충치 기능성, 비만 억제 및 항당뇨 관련 분자 수준의 기능 정보 확보

○ 제 2핵심 : 식품 내 생물학적 위해인자 검출 및 제어기술의 현장적용 및 산업화

- 제 2-1세부 (세니젠 박정웅)

연차	연구내용	연구결과
후속1차년도	<ul style="list-style-type: none"> 현장모니터링을 통한 설비표면 및 작업장바닥 오염도 현황 조사 Super-heated steam과 HOCl 소독제의 순차살균을 통한 상승효과 검증 	<ul style="list-style-type: none"> 식품제조 및 가공업체를 선정하여 현장모니터링을 실시를 통해 우선적용 대상을 선정함 Super-heated steam과 HOCl 소독제의 병합처리 연구를 수행하여 상승효과를 도출 할 수 있는 최적화 조건 확립함 개발된 시작품을 활용하여 실제 식품제조 및 가공업체에 설치하여 설비 표면과 작업장바닥 대상으로 제어효과 검증함

	<ul style="list-style-type: none"> • Super-heated steam과 HOCl을 기반으로 맞춤형 살균시스템 개발 및 현장 검증 	
후속2차년도	<ul style="list-style-type: none"> • 현장수요조사를 통해 식품품목별 분석 빈도가 높은 식중독균 조합 조사 • 다양한 조합의 식중독균 multiplex real-time PCR kit 개발 • 5종 이상의 multiplex real-time PCR kit 제품화 및 식품품목별 현장 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • 식품품목별 식중독균 조사를 통해 5종 이상의 위해요인이 높은 식중독균 그룹화 진행함 • 식중독균 검출을 위한 primer 및 probe 세트 선정하였으며 특이성을 검증함 • 식품품목별 특이도, 민감도 평가를 통해 multiplex real-time PCR 최적화 조건 확립하였으며, 현장검증을 진행함
후속3차년도	<ul style="list-style-type: none"> • 유기산과 HOCl 복합처리를 통한 미생물 살균 상승효과 검증 • 유기산과 HOCl 복합처리용 식품원료 살균시스템 개발 • <i>Bacillus</i> 포자를 제어할 수 있는 식품원료 살균시스템 개발 및 현장 검증 	<ul style="list-style-type: none"> • 유기산과 HOCl 복합처리 극대화를 위한 최적화 조건을 확립함 • 식품원료 3종에 대해 복합처리에 의한 상승효과를 검증하였으며 복합처리에 따른 식품원료의 관능학적 품질 특성을 평가함 • 유기산과 HOCl 복합 살균시스템을 제작하여 식품원료에 있는 <i>Bacillus</i> 포자 제어효과를 검증함

- 제 2-1협동 (동국대 이광근, 서울대 강동현)

서울대 김도만

연차	연구내용	연구결과
후속1차년도	<ul style="list-style-type: none"> • 유산균발효액을 이용한 커큐미노이드배당체합성 조건 확인 	<ul style="list-style-type: none"> • 유산균발효액을 이용한 커큐미노이드배당체합성: 배당체는 중합도 3개 이상의 것 확인
	<ul style="list-style-type: none"> • 강황발효미생물선발, 동정과 강황, 퀴노아 발효 	<ul style="list-style-type: none"> • 강황발효미생물 3종선발하고 동정함 • 이 균 중 리조프스 울리고스포르스균을 이용하여 강황발효. 강황발효 전/후의 성분분석. 카르니틴의 함량이 40%증가확인 • 선발균과 리조프스 오리재균을 이용하여 퀴노아를 발효함 • 발효퀴노아는 항산화성분의 증가, 카르니틴과

		가바성분의 증가를 확인 함
	<ul style="list-style-type: none"> 발효강황, 퀴노아의 물질특성 확인 	<ul style="list-style-type: none"> 발효강황, 퀴노아의 발효 전/후의 큰 차이는 지방대사에 관여하는 카르니틴함량이 발효 후 크게 증가함 특히, 발효 퀴노아는 항산화특성, 총페놀함량 등의 증가를 보임
	<ul style="list-style-type: none"> 항산화 플라보노이드 망기페린의 수용화 및 특성연구 	<ul style="list-style-type: none"> 항산화 플라보노이드 망기페린의 수용화 및 특성연구는 천연용제인 루부소사이드를 이용하여 진행함. 루부소사이드를 이용한 수용성은 5.2배 증가함 루부소사이드는 뮤탄수크라제의 활성을 억제하는 특성을 처음으로 확인함 또한, 망기페린자체 그리고 루부소사이드로 수용화한 망기페린도 항충치 특성이 있음을 확인함
	<ul style="list-style-type: none"> 유산균 발효액을 이용한 카페익산과 클로로제닉산의 배당체 구조결정 및 특성연구 	<ul style="list-style-type: none"> 유산균 발효액을 이용한 카페익산의 배당체 구조를 결정(caffeic acid-3-O-α-D-glucopyranoside)하고 항산화, 갈변억제 특성(11배)과 수용성 증가 특성을 확인함 클로로제닉산의 배당체를 합성함. 구조는 클로로제닉산-4"-O-α-D-글루코피라노시드(CHG) 구조로 확인함
	<ul style="list-style-type: none"> 유산균 발효액을 이용한 저칼로리 카스카라시럽 제조와 특성연구 	<ul style="list-style-type: none"> 유산균 발효액을 이용한 저칼로리 카스카라시럽 제조. 다양한 중합도의 올리고당을 함유하며, 따라서 20%이상 칼로리가 저감될 것으로 기대함 단맛은 다소 떨어져 추가 맛시험을 통해 관능성을 향상시킬 필요 망기페린의 배당체를 제조함
후속2차년도		
후속3차년도		

동국대 이광근

연차	연구내용	연구결과
후속1차년도		
후속2차년도	<ul style="list-style-type: none"> 열처리 아몬드류의 퓨란 생성량 분석 및 열처리 	<ul style="list-style-type: none"> 불포화 지방산 다량 함유 고체 식품 중 퓨란 분석법 확립 및 유효성을 검증 완료

	<p>모델시스템을 이용한 퓨란 생성 저감화</p> <ul style="list-style-type: none"> 안식향산 함유 음료의 벤젠 분석 및 음료 모델 시스템을 이용한 벤젠 생성 저감화 	<ul style="list-style-type: none"> 음료류 중 벤젠 분석법 확립 및 유효성을 검증 완료 시중에 유통되는 음료류 중 벤젠 분석을 완료 음료 모델시스템을 활용한 벤젠 저감화 연구를 수행
후속3차년도	<ul style="list-style-type: none"> 식품모델시스템(라면류)을 활용한 조리 및 가공 공정 중 퓨란 저감화 잠재적 위해요소 함유 식품(후추, 고춧가루, 김)의 조리 및 가공 공정 중 생성 유해물질(퓨란, 바이오제닉아민) 분석 식품첨가물을 활용한 캐러멜 색소 개발을 통한 유해물질(4-MI) 저감화 	<ul style="list-style-type: none"> 인스턴트 라면 중 퓨란 분석법 확립 및 유효성을 검증함 라면 모델시스템에서의 퓨란 생성량을 분석 및 저감화 연구를 진행함 유해물질 별 분석법 확립 및 유효성을 검증함 잠재적 위해요소 함유 식품 3종에서의 2종의 유해물질 함량 분석을 진행함. 김 열처리시스템모델에서의 Kinetics 연구를 수행함 고춧가루 열처리 시스템모델에서의 Kinetics 연구를 수행함 4-Methylimidazole (4-MI) 분석법 확립 및 유효성을 검증함 4종의 무기염 및 2종의 유기산을 첨가한 제Ⅲ형 캐러멜색소 모델시스템을 개발함 제Ⅲ형 캐러멜색소 모델시스템에서의 색소 안정성 분석을 진행함

서울대 강동현

연차	연구내용	연구결과
후속1차년도	<ul style="list-style-type: none"> 신규 가열기술과 비가열 조합처리 시스템 구축 및 메커니즘 규명 	<ul style="list-style-type: none"> 최적 조합처리 구성을 결정하고 효율적인 처리 조건을 도출 형광분석을 통해 미생물 사멸 메커니즘 규명
후속2차년도	<ul style="list-style-type: none"> 조합처리 시스템의 식품 적용 연구 및 최적 조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 신규 가열 기술과 비가열 기술의 조합 처리를 통해 synergistic effect 검증 형광분석 및 전자현미경 분석을 통해 미생물 사멸 메커니즘 규명
후속3차년도	<ul style="list-style-type: none"> 신규 가열 기술의 시물레이션 예측 모델 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 처리 chamber 도식화 및 미생물 살균 factor 수식화 온도 상승 profile의 예측값 및 실제 측정값 비교를 통한 정합성 확인 미생물 사멸 패턴 예측 및 정량적 평가로 정합성 평가

○ 제 3핵심 : 식중독균 제어를 위한 생물학적 안전 소재의 개발 및 산업화

- 제 3-1세부 (인트론 손지수)

연차	연구내용	연구결과
후속1차년도	<p>유용 박테리오파지의 증식 및 정제 공정 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> 3-1 협동과제팀 보유 박테리오파지들 중 산업적으로 활용가치가 높은 박테리오파지 5종에 대해 소규모 증식 및 정제 공정 개발 (증식액 기준 500 mL~1 L, 순도 80% 이상) 산업화에 적합한 박테리오파지 기반 제형 개발 개별 박테리오파지 및 박테리오파지 콕테일 제제를 대상으로 장기 보관 안정성 조사 실시 	<ul style="list-style-type: none"> 소규모 증식 공정 개발은 working volume 50 ml, 1 L 수준으로 단계별로 구분하여 실시. 높은 박테리오파지 titer를 담보할 수 있는 증식 공정을 확립. 컬럼 크로마토그래피 기법에 기반한 정제를 실시하여 적합 순도를 갖는 정제 공정을 구축. 버퍼 및 부형제의 조성을 고려하여 고상 및 액상 제형으로 시료를 제조한 후 titer를 상호 비교함으로써 최적 제형 조건 확립. 산업화를 고려하여 개별 및 혼합 박테리오파지 제제의 장기 안정성 조사 시험 실시.
후속2차년도	<p>유용 파지 유래 단백질의 소규모 제조 시스템 개발 (생산/분리/정제)</p> <ul style="list-style-type: none"> 3-1 협동과제팀 보유 파지 유래 단백질들 중 산업적으로 활용가치가 높은 파지 유래 단백질 3종에 대해 소규모 발현 및 정제 공정 개발 (생산액 기준 500 mL~1 L, 순도 80% 이상) 산업화에 적합한 파지 유래 단백질 기반 제형 개발 파지 유래 단백질의 단기 보관 안정성 조사 실시 	<ul style="list-style-type: none"> 소규모 발현시스템 개발은 working volume 100 ml, 500 ml 수준으로 단계별로 구분하여 실시. 컬럼 크로마토그래피 기법에 기반한 정제를 실시하여 적합 순도를 갖는 정제 공정을 구축. 버퍼 및 부형제의 조성을 고려하여 시료를 제조한 후 파지 유래 단백질의 안정성 조사 (가혹 조건 포함) 및 항균 활성을 상호 비교 분석함으로써 최적 제형 조건 확립. 산업화를 고려하여 파지 유래 단백질 제제의 온도별 단기 보관 안정성 조사 시험 실시.
후속3차년도	<p>박테리오파지 및 파지 유래 단백질의 산업적 제조 공정 scale-up, 원료의 산업적 제조 공정 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> 박테리오파지의 대규모 증식 및 정제 공정 개발 (증식액 기준 50 L, 순도 90% 이상) 파지 유래 단백질의 대규모 발현 및 정제 공정 	<ul style="list-style-type: none"> 박테리오파지의 대규모 증식 및 정제 공정 개발은 working volume 50 L 수준으로 실시하였고, 컬럼 크로마토그래피 기반 정제를 실시하여 적합 순도를 갖는 정제 공정을 구축. 파지 유래 단백질의 대규모 발현 및 정제 공정 개발은 working volume 10 L 수준으로 실시하였고, 컬럼 크로마토그래피 기반 정제를 실시하여 적합 순도를 갖는 정제 공정을 구축. 확립된 공정을 적용하여 유효성 평가 시험용

	개발 (생산액 기준 10 L, 순도 90% 이상) • 3-1 협동과제팀에서 실시될 유효성 평가 시험에 필요한 시료 제조 및 공급	
--	--	--

- 제 3-1협동 (서울대 유상열)

연차	연구내용	연구결과
후속1차년도	생물학적 항균 소재 생산을 위한 박테리오파지 선정 및 특성 분석 • 1,2단계에서 분리된 박테리오파지 중 건조한 환경 및 고온 환경에서 식중독균에 대한 우수한 사멸능을 갖는 후보균 선정 • 건조 및 고온 조건에서 식중독균에 대한 우수한 사멸능을 갖는 신규 박테리오파지 분리 • 신규 분리된 박테리오파지의 용해능 및 용균 활성 범위등의 특성 분석 • NGS 기법을 활용한 분리된 박테리오파지의 염기서열 분석	• 1, 2 단계에서 분리한 iEPS5, BSP22, SFP10 박테리오파지의 Host range, thermal stability, pH stability 등 특성 분석을 통해 공정화에 적합한 파지이를 확인함. • 살모넬라 감염 파지 AP3, AP4, 황색포도상구균 감염 파지 ASP1, ASP2를 새롭게 분리함. • 유전체 분석을 통해 선별된 파지가 항생제 독성, 항생제 내성 유전자 존재 유무를 확인함.
후속2차년도	다양한 제형의 박테리오파지 및 파지 유래 단백질 개발 • 확보된 박테리오파지의 염기서열 정보에 기반하여 기존 항균 단백질과 상동성을 갖는 후보균 선정 • 선정된 항균 단백질 발현 및 용균 특성 분석 • 박테리오파지 및 항균 단백질의 실제 산업 조건 적용을 위한 최적의 제형 선정 • 선정된 제형에 대한 박테리오파지 및 항균 단백질 적용과 용균 특성 분석	• 박테리오파지의 염기서열을 기반으로 황색포도상구균을 저감화할 수 있는 신규 항균 단백질 PALS21, PALS22를 확보함 • 이들의 제어능력과 감염 범위 분석을 통해 항균 단백질로서의 기능을 확인하였으며, 다양한 buffer에서의 활성과 더불어 thermal stability, pH stability를 측정하여 산업화 가능 여부를 확인함 • 살모넬라 감염파지 AP3와 AP4의 숙주 제어 능력, 감염 범위 등을 확인하여 신규 항균제로서의 가능성을 확인하고, Thermal stability, pH stability 분석 등을 통해 산업화 가능 여부를 확인함.
후속3차년도	생물학적 항균 소재 생산 조건 최적화 및 현장 적용	• 선별된 신규 항균제에 대하여, 최대 500 mL 까지 생산 volume을 증가시키고, 다양한

<p>도</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 신규 개발 산업용 항균 제제의 다양한 대상 모델에서의 식중독균 사멸능 확인 • 다양한 처리 조건을 기반으로 최적의 용균 효과율을 보이는 적용 방법 선정 • 3-1 세부가 보유한 기기 및 기술을 바탕으로 박테리오파지 및 항균 단백질 제제의 lab scale 및 pilot scale 생산 조건 구축 • 실제 현장 적용을 위한 제품 평가 	<p>배양, 발현 조건 등을 대입하여 산업 scale에서의 생산 조건을 확립함.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3-1 세부와의 협업을 통해 해당 신규 항균제의 제형화를 시도하였으며, 산업 적용에 적합한 분말 형태로 제조함. • 이를 우유, 육계 제품, 햄슬라이스 등 다양한 model 식품에 적용하여 제품 현장화하였으며, 식중독균이 억제되는 것을 확인함으로써 그 유효성을 확인함.
----------	---	--

나. 세부과제별 사업수행 실적

(1) 제 1-1 세부과제(서울대 최상호, 하남출) : 독성인자 발현제어 선도물질 유래 신개념 식품안전소재 도출

(가) 정량적 성과

성과지표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		인력양성			정책활용·홍보		기타	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	석사	박사	취업인력	정책활용		홍보전시
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	명	명				
가중치																				
최종목표																				
후속 1차	목표											4		2	2		1			
	실적	1										6	2	21	3		1			
후속 2차	목표		1									4		2	2	1	2			
	실적	2	2	1								6	1	15	3	1	3		4	
후속 3차	목표											2		2	2	1	3			
	실적	2			1	20	1	92				5	1	25	4	4	3		9	
3단계	목표		1									10		6	6	2	6			
	실적	5	2		2	20	1	92				17	4	61	10	5	7		13	

① 논문게재 성과

연번	게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
			주저자	교신저자	공동저자				
1	2017	Identification and characterization of <i>Vibrio vulnificus</i> <i>plpA</i> encoding a phospholipase A ₂ essential for pathogenesis	Kyung Ku Jang	Sang Ho Choi	Zee-Won Lee, Bityeoul Kim, Young Hyun Jung, Ho Jae Han, Myung Hee Kim, Byoung Sik Kim	Journal of Biological Chemistry	292(41)	국외	SCI
2	2018	<i>Vibrio vulnificus</i> infection induces the maturation and activation of dendritic cells with	Arim Lee	Sang Ho Choi	Hui Xuan Lim, Myun Soo Kim, Daeho Cho, Kyung Ku Jang, Tae Sung Kim	International Journal of Molecular Medicine	41(1)	국외	SCI

		inflammatory Th17-polarizing ability							
3	2018	Melatonin inhibits apoptotic cell death induced by <i>Vibrio vulnificus</i> VvhA via melatonin receptor 2 coupling with NCF-1	Sei-Jun g Lee	Sang Ho Choi	Hyun Jik Lee, Young Hyun Jung, Jun Sung Kim, Ho Jae Han	Cell Death and Disease	9	국외	SCI
4	2018	Development of safe and flavor-rich Doenjang (Korean fermented soybean paste) using autochthonous mixed starters at the pilot plant scale.	Eun Jin Lee	Sang Ho Choi	Jiye Hyun Yong-Ho Choi, Byung-Serk Hurh, Inhyung Lee	Journal of Food Science	83(6)	국외	SCIE
5	2018	Crystal structure of peroxiredoxin 3 from <i>Vibrio vulnificus</i> and its implications for scavenging peroxides and nitric oxide,	Jinsook Ahn	Sang Ho Choi, Nam-Chul Ha		IUCrJ	5(82-92)	국외	SCI
6	2018	A novel tetrameric assembly configuration in VV2_1132, a LysR-type transcriptional regulator in <i>Vibrio vulnificus</i> ,	Yongdae Jang	Sang Ho Choi, Nam-Chul Ha		Molecules and Cells	41(4)	국내	SCI
7	2018	Purification and preliminary analysis of the regulatory	Suhyeon Kim	Nam-Chul Ha		Biodesign	6(42-45)	국내	비SCI

		domain of MexT from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , a LysR-type transcriptional activator of the MexEF-OprN multidrug efflux pump							
8	2018	<i>Vibrio vulnificus</i> RtxA is a major factor driving inflammatory T helper type 17 cell responses <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	Arim Lee	Sang Ho Choi	Myun Soo Kim, Daeho Cho, Kyung Ku Jang, Tae Sung Kim	Frontiers in Immunology	9:2095	국외	SCIE
9	2018	Structure-based protein engineering of bacterial β -xylosidase to increase the production yield of xylobiose from xylose	Seokho Hong	Nam-Chul Ha		Biochemical and Biophysical Research Communications	501(3):703-710.	국외	비SCI
10	2019	Small-molecule inhibitor of HlyU attenuates virulence of <i>Vibrio</i> species	Zee-Won Lee	Sang Ho Choi	Byoung Sik Kim, Kyung Ku Jang, Ye-Ji Bang, Suhyeon Kim, Nam-Chul Ha, Young Hyun Jung, Hyun Jik Lee, Ho Jae Han, Jong-Seo Kim, Jeesoo Kim, Pramod K. Sahu, Lak Shin Jeong, Myung Hee Kim	Scientific Reports	4346	국외	SCI
11	2019	Structural basis for	Inseong Jo	Nam-Chul Ha	Dajeong Kim, Taehoon	Proceedings of the	116(9)	국외	SCI

		HOCl-recognition and regulation mechanisms of HypT, a hypochlorite-specific transcriptional regulator			No, Seokho Hong, Jinsook Ahn, Sangryeol Ryu	National Academy of Sciences of the United States of America			
12	2019	Recent paradigm shift in the assembly of the bacterial tripartite efflux pumps and type I secretion system	Inseong Jo	Nam-Chul Ha	Inseong Jo, Jin-Sik Kim, Yongbin Xu, Jaekyung Hyun, Kangseok Lee	Journal of Microbiology	57(3)	국내	SCIE
13	2019	Crystal structure of LysB4, an endolysin from <i>Bacillus cereus</i> -targeting bacteriophage B4	Seokho Hong	Nam-Chul Ha	Seokho Hong, Bokyung Son, Sangryeol Ryu	Molecules and Cells	42(1)	국내	SCIE
14	2019	Assembly model of the heavy metal efflux pump CusBAC based on the protein-protein interaction	Seokho Hong	Nam-Chul Ha	Seokho Hong, Jin-Sik Kim, Inseong Jo, So-Young Jun	Biodesign	7(1)	국내	비SCI
15	2019	Crystal structure of SAV0927 and its functional implications	Soyeon Jeong	Nam-Chul Ha	Hyo Jung Kim, Ae-Ran Kwon	Journal of Microbiology and Biotechnology	29(3)	국내	SCIE
16	2019	Transcriptomic Identification and Biochemical Characterization of HmpA, a Nitric Oxide Dioxygenase, Essential for Pathogenesis of <i>Vibrio vulnificus</i>	Dukyun Kim, Eun Jung Na	Sang Ho Choi	Suhyeon Kim, Jung Sung Kim, Young Hyun Jung, Jiafu Cao, Ho Jae Han, Iel Soo Bang, Jin-Wook Yoo, Nam-Chul Ha	Frontiers in Microbiology	10	국외	SCIE
17	2019	Crystal	Dukwon	Nam-Ch	Soyeon	Crystals	9(12)	국외	SCIE

		Structure of Bacterial Cystathionine Γ -Lyase in The Cysteine Biosynthesis Pathway of <i>Staphylococcus aureus</i>	Lee	ul Ha	Jeong, Jinsook Ahn, Ae-Ran Kwon				
18	2019	Structural basis for lamin assembly at the molecular level	Jinsook Ahn	Nam-Chul Ha	Inseong Jo, So-mi Kang, Seokho Hong, Suhyeon Kim, Soyeon Jeong, Yong-Hak Kim, Bum-Joon Park	Naturecommunications	10(1)	국외	SCIE
19	2019	Purification and preliminary analysis of the nuclease and capping domain of the DNA repair exonuclease SbcD from the Gram-positive bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	Jinwook Lee	Nam-Chul Ha	Inseong Jo, Aeran Kwon	Biodesign	7(4)	국내	비SCI
20	2020	Real-Time Measurement of the Liquid Amount in Cryo-Electron Microscopy Grids Using Laser Diffraction of Regular 2-D Holes of the Grids	Jinsook Ahn	Nam-Chul Ha	Dukwon Lee, Inseong Jo, Hyeongseop Jeong, Jae-Kyung Hyun, Jae-Sung Woo, Sang-Ho Choi	Molecules and Cells	43(3)	국내	SCIE
21	2020	Cleavage-dependent activation of	Soyeon Jeong	Nam-Chul Ha	Jinsook Ahn, Ae-Ran Kwon	Molecules and Cells	43(8):694-704	국내	SCIE

		ATP-dependent protease HslUV from <i>Staphylococcus aureus</i>								
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

② 특허 성과

출원된 특허						등록된 특허				
연번	출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
1						2018	안전성이 검증된 장류 발효 균주 및 이를 이용하여 제조된 장	서울대학교산학협력단	한국	10-1926183
2						2018	실포라핀을 다량 함유하는 무씨 추출물의 제조방법 및 이로부터 추출된 무씨 추출물을 함유하는 체중, 혈당조절용 및 지방간	서울대학교산학협력단	한국	10-1907179
3	2018	RTX 독소 생성 저해제 및 이를 이용한 비브리오팀 감염증 치료용 조성물	서울대학교산학협력단	한국	10-2018-0139927					
4	2018	전자현미경용 그리드의 액체양 측정장치	서울대학교산학협력단	한국	10-2018-0081070					

5	2019	전자현미경용 그리드 샘플 제작장치	서울대학 교 산학협력 단	미국	PCT/KR 2019/00 7980					
6	2019	RTX 독소 생성 저해제 및 이를 이용한 비브리오팀 감염증 치료용 조성물	서울대학 교산학협 력단	미국	PCT/KR 2019/00 0218					
7	2020	RTX 독소 생성 저해제 및 이를 이용한 비브리오팀 감염증 치료용 조성물	서울대학 교산학협 력단	미국	16/637,0 53					

③ 기술료징수 현황

기 징수액	당해연도 징수액	향후 징수액	합계
	20,000,000		20,000,000

- 기술이전 및 기술지도 내용

※ 명칭, 관련업체명, 지도내용 등

N O	기술이전유 형	기술실시 계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료
1	통상실시권	<ul style="list-style-type: none"> Rabbit polyclonal antibody to Prx1 (<i>Vibrio vulnificus</i>) Rabbit polyclonal antibody to Prx2 (<i>Vibrio vulnificus</i>) Rabbit polyclonal antibody to Prx2-SO₃ (<i>Vibrio vulnificus</i>) 	(주)영인프론티어	2018.02.27	0
2	통상실시권	전자현미경용 그리드 샘플 제작장치	엑스템바이오랩	2019.12.23	20,000,000
합계					20,000,000

④ 사업화 성과 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2			
	소요예산(백만원)	40			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0.92	5		
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	5	20	
국외					
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	9215 만원	
			향후 3년간 매출		
		관련제품	개발후 현재까지		
			향후 3년간 매출		
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 5 % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 20 % 국외 : 2 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
			세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위	위
			3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위	위	

(나) 정성적 성과

구분	연구목표	주요 연구 성과
1 단계	1차년도 • 폐혈증 비브리오균의 구조적 및 기능적 유전체 분석	• 폐혈증 비브리오균 MO6-24/O의 genomic DNA shotgun library를 제작 • Gene prediction과 functional annotation 수행
	2차년도 • 숙주 내에서 특이적으로 발현되는 폐혈증 비브리오균 독성인자 동정	• in vitro 발현 유전자 profile과 비교하여 숙주 환경 특이적으로 과 발현되는 유전자 rtx operon, smcR 등을 동정

	3차년도	<ul style="list-style-type: none"> 패혈증 비브리오균 독성 인자들의 기능적 특성 규명 	<ul style="list-style-type: none"> 2년차에서 동정된 독성인자 flgBCDE, prx3의 isogenic mutant와 이들의 조절자인 iscR의 isogenic mutant를 개발 개발한 mutant들의 in vitro phenotype을 평가하고 human 장내 상피세포 및 mouse 감염 모델을 이용하여 in vitro cytotoxicity와 in vivo virulency 비교
2 단계	4차년도	<ul style="list-style-type: none"> 패혈증 비브리오균 독성 인자들의 발현특성 규명 및 조절자 동정 	<ul style="list-style-type: none"> 패혈증 비브리오균의 주요 독성인자 유전자 rtx 등의 promoter mapping 독성인자 유전자의 fusion reporter 구축 독성인자의 발현 특성 규명 및 - 독성인자의 cis-, trans-acting regulatory elements 동정
	5차년도	<ul style="list-style-type: none"> 패혈증 비브리오균 독성 인자 발현 조절자의 특성 규명 및 제어타겟 발굴 	<ul style="list-style-type: none"> 패혈증 비브리오균의 독성인자 발현조절자 HlyU, SmcR, IscR 등의 특성 규명 발현조절자의 cis-, trans-acting regulatory elements를 동정함으로써 global regulator 간의 regulatory hierarchy 결정 발현조절자의 타겟 독성인자 유전자에 대한 조절을 확인함으로써 새로운 제어 타겟으로 발굴
	6차년도	<ul style="list-style-type: none"> High-throughput(HTP) screening을 통한 패혈증 비브리오균의 독성인자 발현 제어물질 동정 	<ul style="list-style-type: none"> 패혈증 비브리오균 독성인자 발현조절자의 구조 modeling과 virtual screening 독성인자 발현 제어물질 동정을 위한 HTP screening system 구축 Library screening을 통한 제어물질 동정
	7차년도	<ul style="list-style-type: none"> 패혈증 비브리오균 독성 인자 발현 제어물질의 특성 및 활성 규명 	<ul style="list-style-type: none"> 패혈증 비브리오균 독성인자 발현 제어물질의 유도체 화합물 라이브러리 구축 및 screening 제어물질 후보군의 패혈증 비브리오균 생장 저해 및 세포 독성 확인 제어물질 후보군의 패혈증 비브리오균 virulence 제어 활성 in vitro 및 ex vivo 확인
	후속 1차년도	<ul style="list-style-type: none"> 독성인자 조절자 제어 선도물질의 효능 유전체 기반 검증 	<ul style="list-style-type: none"> 독성인자 조절자 제어 선도물질 CM2660의 패혈증 비브리오균 독성 유전자 발현 및 독성 관련 표현형 억제 여부 확인 rtxHCA 및 rtxBDE operon을 marker 독성 유전자로 발굴, 발현 및 기능 특성 규명
3 단계	후속 2차년도	<ul style="list-style-type: none"> 독성인자 조절자 제어 선도물질 유도체들의 구조-활성 상관관계 분석 	<ul style="list-style-type: none"> HlyU marker 독성 유전자 rtxA-lux reporter strain 구축, 이를 이용하여 제어 선도물질과 유도체들의 효능 파악 최적 선도물질 CM2660 선발 및 HlyU 제어 분자 기전 규명
	후속	<ul style="list-style-type: none"> 독성인자 조절자 제어 	<ul style="list-style-type: none"> CM2660의 독성 억제 효능 적용 범위 확대 및 안

	3차년도	선도물질 최적화 및 식품안전 후보물질 도출	전성 검증 • 모델식품 굴 접촉 시 CM2660의 패혈증 비브리오팀독성 유전자 발현억제 효능 확인 • 천연물을 이용한 CM2660의 제형 개선
--	------	-------------------------	---

(다) 기타 주요연구 성과 (자유 기술)

① 1-3차년도 전체 요약

독성인자 발현제어 선도물질 유래 신개념 식품안전소재 도출

- 후속 1-3차 기간 동안 1, 2단계를 통하여 개발된 HlyU 제어 선도물질인 CM2660의 효능을 유전체 기반에서 검증하였고, 독성 유전자들의 발현 억제 효능을 분석하였음. 그리고 HlyU와 CM2660의 복합체 구조를 규명하여 CM2660이 어떠한 기작으로 독성 유전자들의 발현을 억제하는지 분석하였음. 그리고 그 물질을 모델 식품에 적용하여 효능을 평가하고, 효능의 극대화를 위한 최적의 처리조건을 확립하여 신개념 식품안전소재를 도출함.

② 1차년도 요약 (후속 1년차 연구목표: 독성인자 조절자 제어 선도물질의 효능 유전체 기반 검증)

㉠ 패혈증 비브리오팀독성의 독성인자 조절자 HlyU 제어 선도물질 CM2660의 효능 검증

- 독성인자 조절자 HlyU의 기능을 저해하는 제어 선도물질 CM2660의 효능을 검증하기 위해 human cell line과 mouse model을 이용하였음. CM2660을 처리했을 경우 대조군(DMSO)과 비교하여 패혈증 비브리오팀독에 감염된 HeLa human epithelial cell의 cell rounding이 매우 감소하는 것을 확인함. 패혈증 비브리오팀독의 MARTX toxin에 의해 일어나는 actin oligomerization 또한 CM2660에 의해 약화되는 것을 Western blot analysis를 통해 확인함. 뿐만 아니라, CM2660을 패혈증 비브리오팀독과 함께 mouse에 피하 주사했을 경우 대조군에 비해 mouse survival이 유의미하게 증가하였고, 간 및 신장 기능 장애와 cytokine 생성, macrophage infiltration이 완화됨을 확인함.

㉡ CM2660의 HlyU regulon 발현에 주는 영향 분석

- CM2660이 패혈증 비브리오팀독의 유전자 발현 양상에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해, 패혈증 비브리오팀독에 CM2660 및 DMSO (대조군)를 처리하고 RNA를 분리하여 유전자 발현 profile (transcriptome)을 조사함. CM2660을 처리하였을 때 대조군에 비해 패혈증 비브리오팀독의 독성 유전자인 rtxA, vvhA, plpA의 발현이 모두 hlyU mutant 수준으로 유의미하게 감소하였음을 확인함.

㉢ CM2660에 의하여 발현이 억제되는 marker 독성 유전자 또는 operon 발굴

- CM2660에 의해 발현이 억제되는 독성 유전자들 중, rtxHCA 및 rtxBDE operon을 발굴함. rtxHCA, rtxBDE 유전자들은 각각 operon으로 발현되며, 반대 방향에 위치하여 divergent transcription됨을 확인함.

㉣ Marker 독성 유전자들의 발현 및 기능적인 특성 규명

- Marker 독성 유전자로 발굴한 rtxHCA 및 rtxBDE operon의 transcription start site를 결정함. 여러 growth phase 및 다양한 환경에서 rtxHCA, rtxBDE promoter activity를 조사하여,

rtxA 유전자가 growth phase 의존적으로 발현되며 mid-exponential phase에서 가장 높게 발현됨을 관찰함. 또한 rtxHCA 및 rtxBDE의 promoter activity가 host cell에 노출되었을 때 LBS, MEM 배지보다 높게 나타남을 확인함. MARTX toxin 분비에 필요한 transporter RtxE를 encoding하는 rtxE 유전자의 isogenic mutant를 이용하여 rtxE가 knock-out되었을 경우 MARTX toxin이 분비되지 않음을 확인함.

㉓ HlyU 타겟 선도물질 구조-활성 상관관계에 따른 물질 합성

㉔ 패혈증 비브리오균의 독소발현인자인 HlyU과 CM2660간의 구조 연구

- HlyU을 억제하는 CM2660과 결합 방식을 Mass 분석을 통해 분석하여, Cys30에 특이적으로 CM2660이 공유결합함을 밝힘.

㉕ HOCl에 대한 내성을 나타내는 독소인자 구조 연구

- 식품산업에서 식품 살균 및 공장의 조리 시설의 살균 소독에 HOCl은 중요하게 사용되는 식품소독제임.

- HOCl을 감지하는 전사 인자로 살모넬라균 유래 HypT의 구조를 토대로 작동메커니즘을 규명함.

- HOCl을 감지하는 전사 인자로 살모넬라균 유래 RclR의 초기 회절상 획득함.

㉖ Bacteriophage 유래 autolysin의 구조 연구

- Bacteriophage 유래 autolysin은 차세대 식품소독제로 주목을 받음.

- Bacillus cereus를 감염하는 Bacteriophage 유래 autolysin에 대한 구조를 밝혀 기질 특이성에 대한 분자기작을 제시함.

㉗ 황색포도상구균의 저항인자 구조 연구

- 중요한 식중독균중 하나인 황색포도상구균은 인체의 면역반응에 대해 저항성을 지니고 있음.

- 이 면역반응 저항성을 나타내는데 중요한 역할을 하는 protease인 HslV의 구조를 규명하여, 이에 대한 억제 물질 개발을 위한 구조정보를 제공함.

- 항생제를 비롯한 소독 물질에 대한 유출펌프의 조절인자인 MexT에 대한 구조연구를 수행함.

③ 1차년도 상세 내용(후속 1년차 연구목표 : 독성인자 조절자 제어 선도물질의 효능 유전체기반 검증)

㉘ 패혈증 비브리오균의 독성인자 조절자 HlyU 제어 선도물질 CM2660의 효능 검증

- 1, 2단계 연구를 통해 패혈증 비브리오균의 독성인자 조절자 HlyU의 기능을 저해하는 제어 선도물질 CM2660을 발굴하였다. CM2660의 효능을 다방면으로 평가하기 위해, HeLa human epithelial cell line과 mouse model을 이용하여 패혈증 비브리오균의 독성을 조사하였다.

1) Cell morphology analysis

A. 6-well culture plate에 HeLa human epithelial cell을 배양하였다.

B. CM2660 50 μ M 또는 1% DMSO와 함께 *Vibrio vulnificus* FORC_009 wild type 또는 *hlyU* mutant를 MOI 2로 infection시켰다. 대조군으로는 phosphate-buffered saline (PBS)과 DMSO (PBS+DMSO), 또는 *hlyU* mutant와 DMSO (*hlyU*+DMSO)를 처리하였다.

C. 37°C에서 1 h incubation 후, Hoechst® 33342 (final 5 μ g/ml; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)와 rhodamine-phalloidin (one unit per microscope slide; Thermo Fisher

Scientific)로 각각 10분 간 staining하였다.

D. Cell imaging system (EVOS®, Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 cell morphology를 촬영하였다.

실험 결과, DMSO와 함께 *V. vulnificus* wild type에 감염된 cell은 rounding되었으나, CM2660과 함께 감염된 경우는 대조군인 PBS+DMSO 또는 *hlyU*+DMSO와 비슷한 cell morphology를 보였다 (Fig. 1). 이를 통해 CM2660이 *V. vulnificus* wild type에 의해 일어나는 cell rounding을 효과적으로 저해함을 확인하였다.

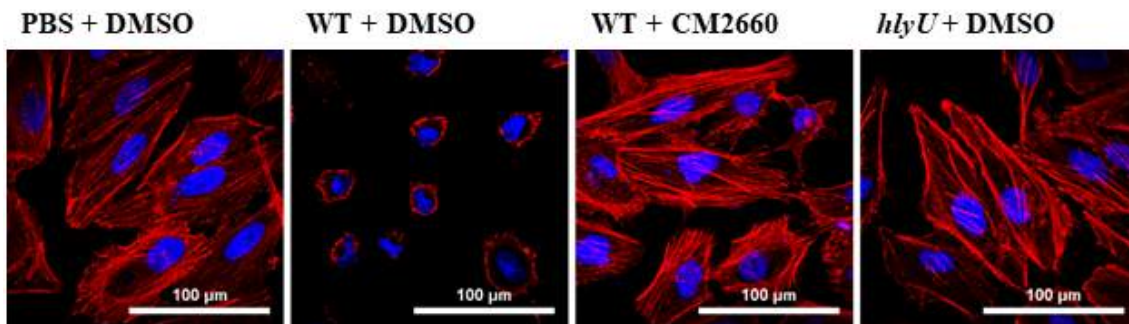


Fig 1. Effects of CM2660 on the cell rounding caused by *V. vulnificus*. Morphological changes of HeLa cells infected with the *V. vulnificus* strains along with CM2660 or DMSO were photographed. WT, wild type; *hlyU*, *hlyU* mutant.

2) Western blot analysis

A. Cell morphology change를 관찰했을 때와 동일한 조건에서, *V. vulnificus* FORC_009 wild type 및 *hlyU* mutant에 infection된 HeLa cell을 sampling하였다.

B. SDS-PAGE를 수행하고 (Kim and Satchell. 2016), horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti- β actin antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA; 1:10,000), mouse anti- β -tubulin antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 1:10,000), HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody (Cell Signaling technology; 1:10,000)를 이용하여 β -actin과 β -tubulin을 각각 detection하였다.

Actin oligomerization은 *V. vulnificus* MARTX toxin의 여러 effector domain 중 actin crosslinking domain (ACD)에 의해 일어나는 것으로 보고되어 있다 (Fullner and Mekalanos, 2000). *V. vulnificus* MO6-24/O strain에는 ACD effector가 없으므로 (Kwak et al., 2007), ACD effector가 있는 *V. vulnificus* FORC_009 strain을 이용하였다. 실험 결과, DMSO와 함께 *V. vulnificus* wild type에 감염된 cell은 매우 높은 수준의 actin oligomerization을 보여, 높은 분자량의 band가 detection되었으나, CM2660과 함께 감염된 경우는 대조군에 비해 낮은 수준의 oligomerization을 보였다 (Fig. 2). 이를 통해 CM2660이 *V. vulnificus* wild type에 의해 일어나는 actin oligomerization을 효과적으로 저해함을 확인하였다.

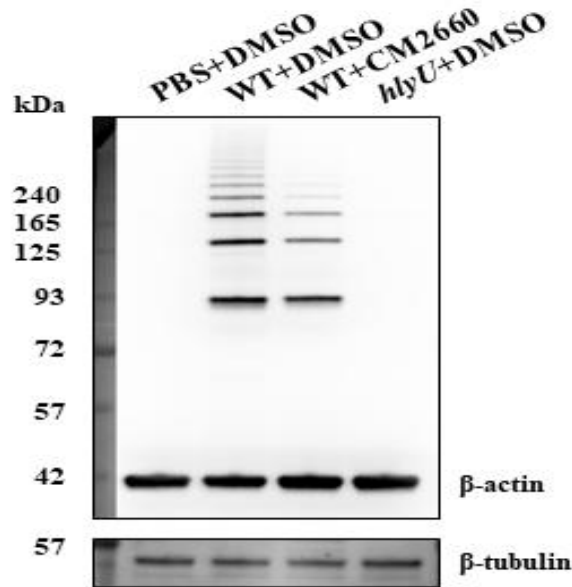


Fig 2. Effects of CM2660 on the actin oligomerization of host cells by *V. vulnificus*.

Actin oligomerization in the HeLa cells infected with the *V. vulnificus* strains talong with CM2660 or DMSO was analyzed by Western blot analysis. WT, wild type; *hlyU*, *hlyU* mutant.

3) Mouse survival test

- A. 7주령 Institute of Cancer Research (ICR) female mouse를 하루 이상 적응시켰다.
- B. A_{600} of 0.5까지 배양한 *V. vulnificus* MO6-24/O wild type과 *hlyU* mutant를 PBS로 희석하여 7.5×10^6 CFU/ml로 준비하였다.
- C. Isoflurane을 이용하여 mouse를 마취시킨 뒤, 10% DMSO 또는 1.4 mg/kg body weight의 CM2660을 *V. vulnificus*와 함께 섞어 100 μ l씩 등 쪽 피부로 피하 주사하였다.
- D. 36 h 동안 mouse survival을 관찰하였다.

실험 결과, Fig. 3에서와 같이 대조군(DMSO)과 함께 *V. vulnificus* wild type을 투여한 mouse는 투여 후 15시간 내에 10마리 모두 사망하였다. 그러나 CM2660을 함께 투여한 mouse는 10마리 중 2마리만이 사망하였다. WT+DMSO group과 WT+CM2660 group의 survival rate은 통계적으로 매우 유의미한 차이를 보였다 (log rank test, $p < 0.0001$). 한편, *hlyU* mutant 또는 CM2660만을 주사한 mouse는 10마리 모두 생존하였다. WT+CM2660 group과 *hlyU*+DMSO group간 survival rate는 통계적으로 유의미한 차이를 보이지 않았다.

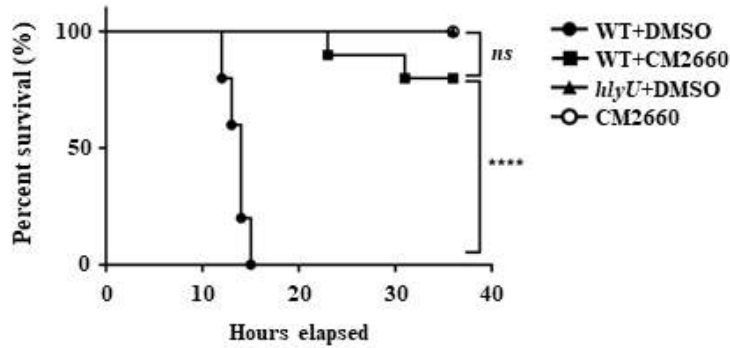


Fig 3. Effects of CM2660 on survival of mice infected with *V. vulnificus*.

Survival of the mice anesthetized with isoflurane and subcutaneously injected with wild type ($n = 10$), wild type with CM2660 ($n = 10$), *hlyU* mutant ($n = 5$) at doses of 7.5×10^5 CFU, and CM2660 alone ($n = 5$, control). Statistical significance was determined by log rank test (****, $p < 0.0001$; ns, not significant). WT, wild type; *hlyU*, *hlyU* mutant.

4) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

- Mouse survival test와 동일한 조건으로 mouse에 *V. vulnificus* MO6-24/O strains를 infection 시켰다.
- Infection 7 h 후, mouse를 sacrifice하고 cardiac puncture를 이용하여 blood sample을 채취 하였다.
- 채취한 blood sample을 $1,000 \times g$, 10 min 원심분리하였다.
- Blood plasma 내 IL-1 β 와 IL-6 level을 commercial ELISA kit (IL-1 β 의 경우 R&D systems, Minneapolis, MN, IL-6의 경우 AbFrontier, Seoul, Republic of Korea)를 이용하여 분석하였다.

V. vulnificus 감염 시, pro-inflammatory cytokine IL-1 β 와 IL-6의 분비가 증가한다는 보고가 있다 (Shin et al., 2002). 이와 일치하게, IL-1 β 와 IL-6 level은 *V. vulnificus* wild type 감염 시 매우 증가하였다 (Fig. 4; WT+DMSO). 그러나 CM2660을 함께 투여했을 때는 유의미하게 cytokine level이 감소한 것을 볼 수 있었다 (Fig. 4; WT+CM2660). 따라서 *V. vulnificus* 감염에 의해 일어나는 pro-inflammatory cytokine 분비가 CM2660에 의해 감소하였다고 할 수 있다.

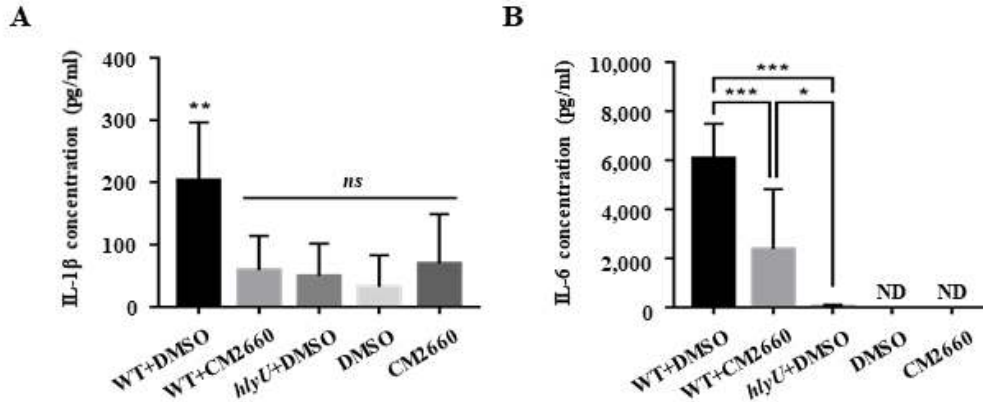


Fig 4. Effects of CM2660 on pro-inflammatory cytokine levels in the blood plasma of mice infected with *V. vulnificus*.

The cytokine levels of IL-1 β (A) and IL-6 (B) in the blood plasma of each group ($n = 8$) were quantified by ELISA. Statistical significance was determined by one-way ANOVA (***, $p < 0.0005$; *, $p < 0.05$; *ns*, not significant; ND, not determined). WT, wild type; *hlyU*, *hlyU* mutant.

5) Immunohistochemical analysis

A. Mouse survival test와 동일한 조건으로 mouse에 *V. vulnificus* MO6-24/O strains를 infection 시켰다.

B. 7 h 후, mouse를 sacrifice하고 infection site 주위의 skin tissue sample을 채취하여 optimum cutting temperature (O.C.T) compound (Sakura Finetek, Torrance, CA)에 embedding하고 -80°C에 보관하였다.

C. Frozen tissue sample을 20 μ m 두께로 절단한 뒤, silane-coated slide (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) 위에서 80% acetone을 10 min 처리하여 고정시켰다.

D. PBS로 wash하고, 5% normal goat serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)로 20 min 간 blocking하였다.

E. F4/80 antibody (1:100 dilution, Santa Cruz, Paso Robles, CA)로 2 h incubation하였다.

F. PBS로 세 번 wash하고, Alexa Fluor 488®-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1:200 dilution, Thermo Fisher Scientific)로 1 h incubation하였다.

G. 이어 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Thermo Fisher Scientific) solution (5 μ g/ml)으로 5 min incubation하였다.

H. Eclipse Ts2® fluorescence microscopy (Nikon, Tokyo, Japan)로 fluorescence image를 촬영하였고, MetaMorph software (Universal Imaging, West Chester, PA)를 이용하여 F4/80 및 DAPI의 colocalization을 분석하였다.

V. vulnificus 감염 시 분비되는 cytokine은 macrophage와 같은 immune cell recruitment를 유도한다 (Kumar et al., 2011; Akira et al., 2006). 마찬가지로, 본 실험에서도 *V. vulnificus* wild type 감염 시 mouse의 infection site에 F4/80 macrophage가 infiltration된 것이 관찰되었다

(Fig. 5; WT+DMSO). CM2660의 동시 투여 시, infiltrated macrophage의 숫자는 유의미하게 감소하였으며 (Fig. 5; WT+CM2660), *hlyU* mutant 감염 시의 수준과 비슷한 정도로 관찰되었다 (Fig. 5; *hlyU*+DMSO). DMSO 또는 CM2660을 단독으로 주사한 경우 macrophage infiltration은 관찰되지 않았다 (Fig. 5; DMSO or CM2660). 그러므로 CM2660은 IL-1 β , IL-6와 같은 pro-inflammatory cytokine의 분비를 완화시켰을 뿐더러, 이어 발생하는 macrophage infiltration도 효과적으로 감소시켰다고 할 수 있다.

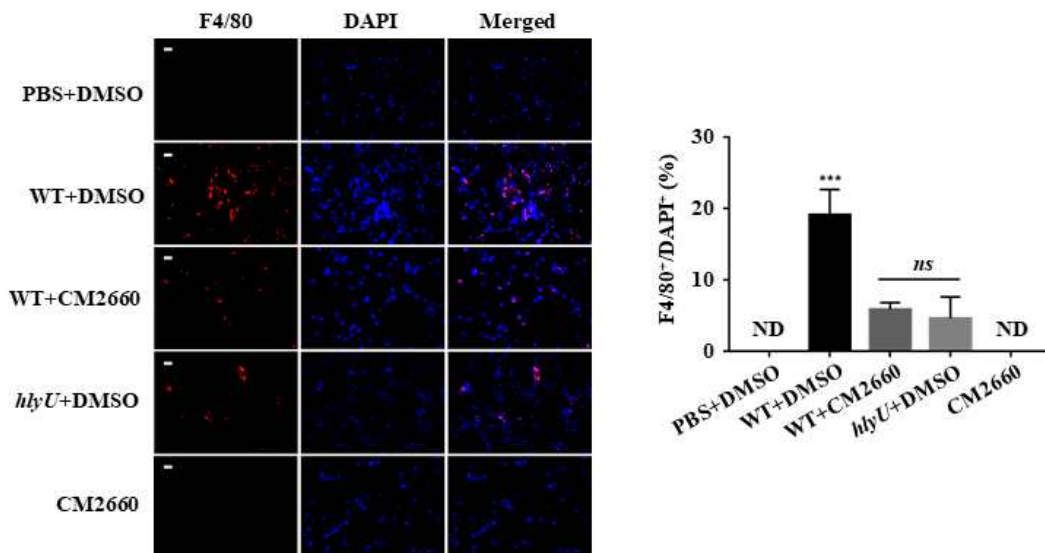


Fig 5. Effects of CM2660 on macrophage infiltration to the infection site of mice infected with *V. vulnificus*.

Infiltration of macrophages at the injection sites was determined using skin tissue samples that were immune-stained with F4/80 antibody (for macrophages, red) and DAPI (for nucleus, blue) for counter staining. The percentage of F4/80⁺ cells in DAPI⁺ cells was analyzed by using MetaMorph software. Scale bars, 10 μ m ($n = 4$). Statistical significance was determined by one-way ANOVA (***, $p < 0.0005$; *ns*, not significant; ND, not determined). WT, wild type; *hlyU*, *hlyU* mutant.

6) Blood biochemical analysis

- Mouse survival test와 동일한 조건으로 mouse에 *V. vulnificus* MO6-24/O strains를 infection 시켰다.
- 7 h 후, mouse를 sacrifice하고 cardiac puncture를 이용하여 blood sample을 채취하였다.
- 채취한 blood sample을 heparin-coated tube (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME)에 담아 수의대 동물병원 내 혈액분석검사실에 분석 의뢰하였다.
- Biochemistry autoanalyzer (Hitachi 7180 autoanalyzer, High-Technologies Corp., Tokyo, Japan)를 이용하여 분석을 수행하였다 (Jang et al., 2017).

분석 결과, *V. vulnificus* wild type에 감염된 mouse의 blood plasma에서 대조군(PBS+DMSO)에 비해 유의미하게 낮은 total protein(TP)과 albumin(ALB) level이 관찰되었다 (Table 1). 반면, aspartate aminotransferase(AST) 및 blood urea nitrogen(BUN) level은 대조군에 비해 유의미하게 높았다. 이는 *V. vulnificus* 감염에 의해 mouse의 간 및 신장 기능에 장애가 생겼음을 의미한다. 그러나 CM2660을 함께 투여한 mouse에서는 이러한 간 및 신장 기능 장애가 나타나지 않았으므로, CM2660이 *V. vulnificus* 감염에 의한 병리생리학적인 변화를 완화시켰다고 할 수 있다. 한편, alanine aminotransferase(ALT)와 creatine(CREA) level은 실험한 모든 group에서 유의미하게 변화하지 않은 것으로 나타났다.

Parameter	PBS+DMSO	WT+DMSO	WT+CM2660	<i>hlyU</i> +DMSO	CM2660
TP (g/dl)	5.42±0.23	4.38±0.42 *	5.09±0.56	5.48±0.26	5.52±0.17
ALB (g/dl)	3.36±0.19	2.61±0.24 *	3.06±0.37	3.38±0.17	3.43±0.14
AST (U/l)	79.5±38.71	312.9±223.7 *	216.3±179.1	80.67±31.06	139.5±71.72
ALT (U/l)	42.17±17.59	43.00±43.10	57.63±47.61	46.67±28.02	48.83±29.94
BUN (mg/dl)	15.57±2.93	29.31±11.0 *	19.01±8.16	16.13±2.56	15.70±3.19
CREA (mg/dl)	0.34±0.05	0.34±0.10	0.33±0.08	0.35±0.06	0.34±0.05

Table 1. Biochemical parameters in the blood plasma of mice infected with *V. vulnificus*.

The levels of TP, ALB, AST, ALT, BUN, and CREA in the blood plasma of each group [WT+DMSO (n = 10), WT+CM2660 (n = 8), *hlyU*+DMSO (n = 6), DMSO (n = 6, control), and CM2660 (n = 6, control)] were determined by blood biochemical analysis. The data represent the mean ± SD. Statistical significance was determined by one-way ANOVA (*, $p < 0.05$ relative to PBS+DMSO). WT, wild type; *hlyU*, *hlyU* mutant.

Ⓢ CM2660의 HlyU regulon 발현에 주는 영향 분석

- CM2660을 처리하였을 때, *V. vulnificus* wild type의 유전자 발현 profile을 분석하고, 이를 *hlyU* mutant의 유전자 발현 profile과 비교하고자 하였다. *V. vulnificus* wild type 또는 *hlyU* mutant에 20 μ M의 CM2660 또는 1% DMSO를 처리하고, RNA를 분리한 후 RNA-sequencing을 진행하였다.

1) RNA-sequencing

A. Sampling

- V. vulnificus* wild type 및 *hlyU* mutant를 A_{600} of 0.2까지 배양하였다.
- (a)의 culture 600 μ l에 1% DMSO 또는 20 μ M CM2660을 처리하고, 추가로 A_{600} of 0.5까지 배양하였다.
- Bacterial RNA Protect reagent (Qiagen, Valencia, CA) 1.2 ml을 넣고 상온에서 5 min 방치하여 RNA의 degradation을 막고, centrifugation을 통해 pellet을 얻은 뒤 -80°C에 보관하였다.

이렇게 얻은 cell pellet으로부터 RNA를 isolation하였다. RNA degradation이 발생하지 않도록 주의하였다.

B. RNA purification

a) -80°C deep freezer에 보관된 cell pellet을 상온에서 녹이고, 65°C 로 preheating한 QIAzol Lysis Reagent (Qiagen)를 처리하여 lysis시켰다.

b) $200\ \mu\text{l}$ 의 chloroform을 처리하고 원심분리하면 aqueous phase와 organic phases로 분리가 되는데, 여기서 upper, aqueous phase에는 RNA가 존재하며 DNA와 protein은 중간층에 존재할 것이다.

c) aqueous phase만을 조심스럽게 확보하고 EtOH를 처리하여 RNA molecules의 precipitation을 얻었다.

d) Precipitation된 RNA molecules은 miRNeasy Mini kit(Qiagen)의 recommended protocol을 사용하여 total RNA를 확보하였고, NanoDrop UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 농도 및 순도를 결정하였다.

e) 확보한 total RNA에 DNA가 contamination이 될 경우 RNA-seq 수행 이후 analysis에 오류가 발생할 수 있으므로, RNase-Free DNase (Qiagen)을 사용하여 room temperature에서 20 min 반응시킴으로써 확실하게 제거하였다.

f) DNA가 제거되었다고 판단된 sample의 RNA를 분리하기 위하여 소량의 elution으로 고농도의 RNA를 분리할 수 있는 RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen, Valencia, CA)의 recommended protocol을 사용하였고, 마찬가지로 NanoDrop UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 농도 및 순도를 결정하였다.

g) Chunlab (Seoul, Korea)에서 RNA의 quality control (QC)을 의뢰하였다 (Fig. 6).

QC Result of RNA

► Quantity

Sample Name	Concentration (ng/ul)	Volume (ul)	Total amount (ug)	rRNA Ratio [23S/16S] [28S/18S]	RIN Value	QC Result
1. WD1	419.335	50	20.96	1.8	N/A	Pass
2. WD2	352.05	49	17.25	1.9	9.6	Pass
3. WD3	307.92	52	16.01	2.0	N/A	Pass
4. WC1	407.07	46	18.72	1.9	N/A	Pass
5. WC2	317.79	46	14.61	1.8	9.7	Pass
6. WC3	423.745	47	19.91	2.0	N/A	Pass
7. hD1	369.36	49	18.09	1.8	9.8	Pass
8. hD2	361.36	47	16.98	1.8	9.2	Pass
9. hD3	307	47	14.42	1.9	9.2	Pass
10. hC1	318.575	49	15.61	2.0	9.3	Pass
11. hC2	286.455	48	13.74	1.7	9.1	Pass
12. hC3	376.57	48	18.07	2.0	N/A	Pass

Fig 6. QC results of RNA samples.

WD, DMSO-treated wild type; WC, CM2660-treated wild type; hD, DMSO-treated *hlyU* mutant; hC, CM2660-treated *hlyU* mutant.

이렇게 분리한 RNA sample 중 group별로 각 2개씩 (WT 1, 3번, *hlyU* 2, 3번) biological duplicate를 Chunlab (Seoul, South Korea)에 RNA-sequencing을 의뢰하였다.

C. RNA-sequencing

a) Agilent 2100 Bioanalyzer와 Agilent RNA 6000 Nano reagents (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)를 이용하여 total RNAs의 quality를 측정한다.

b) Ribo-Zero™ rRNA Removal Kits (Epicentre, Madison, WI)를 이용하여 rRNAs를 제거하고 mRNA만을 선택적으로 enrichment한다.

c) TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (Illumina, SanDiego, CA)를 이용해 Enriched mRNA를 cDNA library로 만든다. 이후 Agilent 2100 Bioanalyzer와 Agilent DNA 1000 Reagents (Agilent Technologies)를 이용하여 cDNA library의 quality를 평가한다. 이 때 biological replication을 위해 두 개의 독립적인 sample에서 RNA를 추출하여 cDNA library를 구축한다.

d) Hiseq 2500(Illumina)장비를 이용해 각각의 cDNA library로부터 strand-specific하고 paired-ended 100 nucleotide reads를 얻는다.

e) RNA-seq으로부터 얻은 reads를 *V. vulnificus* MO6-24/O reference genome에 mapping하여 상대적인 발현정도를 reads per kilobase of transcript per million mapped sequence

reads(RPKM)로 나타내어 분석한다.

RPKM 값을 기준으로, 유전자 발현량의 절대적 차이를 4배, 신뢰도는 95% (p -value<0.05)로 하여 그 조건을 결정하고 통계 분석하였다. Group 간 유의미하게 발현량이 변화한 유전자들을 heatmap을 그려 나타내었다 (Fig. 7).

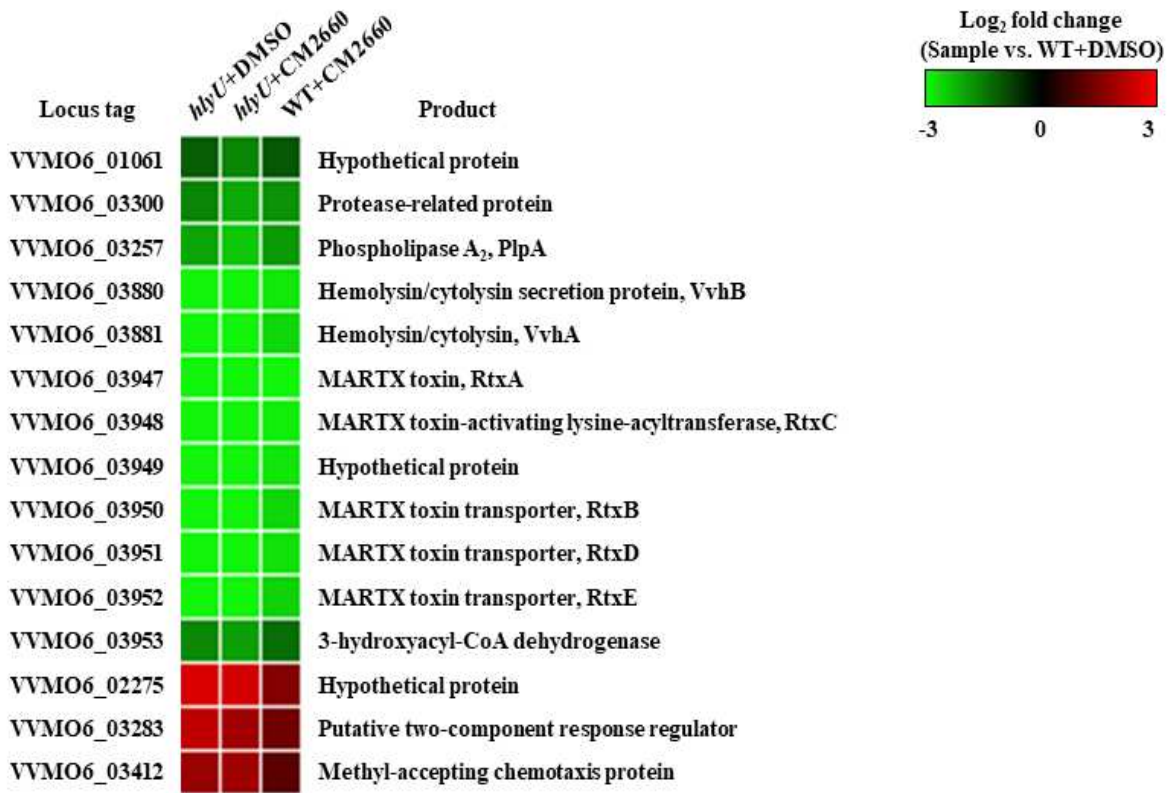


Fig 7.

Effects of CM2660 on HlyU regulon expression.

The fold changes of whole transcriptome expression in the DMSO-treated *hlyU* mutant, CM2660-treated *hlyU* mutant, and CM2660-treated wild type (WT) relative to that in the DMSO-treated wild type (WT) were examined by RNA sequencing. Fold changes of the expression of 15 genes in the indicated samples relative to those in the DMSO-treated wild type ($p < 0.05$; fold change ≥ 2) are shown in the heat map with colors representing the \log_2 RPKM ratio. Locus tags of genes in the *V. vulnificus* MO6-24/O genome (GenBank accession numbers CP002469 and CP002470) and their gene products are shown.

㊦ CM2660에 의하여 발현이 억제되는 marker 독성 유전자 또는 operon 발굴

- 앞서 진행한 RNA-sequencing 결과로부터, CM2660에 의해 발현이 억제되는 독성 유전자들을 파악하였다. 아래 Table 2와 같이, phospholipase A₂를 encoding하는 *p/pA*, hemolysin을 encoding하는 *vvhBA* operon과 MARTX toxin 및 분비에 필요한 transporter를 encoding하는 *rtxHCA* 및 *rtxBDE*의 발현이 CM2660에 의해 유의미하게 감소하였다. 이들 중 *rtxHCA* 및

*rtxBDE*는 서로 반대 방향에 위치하여 divergent transcription되는 operon으로 (Liu et al., 2007, Lee et al., 2008), *V. vulnificus* 외에 *V. cholerae*, *V. anguillarum*에도 매우 유사하게 보존되어 있었다 (Lee et al., 2007, Li et al., 2008) (Fig. 8).

Locus tag	Fold change (Log ₂)	p-value	Product
VVMO6_03257	-1.88	1.85E-09	Phospholipase A ₂ , PlpA
VVMO6_03880	-2.83	2.12E-37	Hemolysin/cytolysin secretion protein, VvhB
VVMO6_03881	-2.63	1.23E-44	Hemolysin/cytolysin, VvhA
VVMO6_03947	-3.11	1.80E-74	MARTX toxin, RtxA
VVMO6_03948	-2.91	3.71E-46	MARTX toxin-activating lysine-acyltransferase, RtxC
VVMO6_03949	-2.81	8.74E-42	Hypothetical protein
VVMO6_03950	-2.62	2.11E-46	MARTX toxin transporter, RtxB
VVMO6_03951	-2.76	5.81E-44	MARTX toxin transporter, RtxD
VVMO6_03952	-2.58	3.70E-45	MARTX toxin transporter, RtxE

Table 2. List of virulence genes differentially expressed in the CM2660-treated wild type. Fold changes of the expression of 9 virulence genes in the CM2660-treated wild type relative to those in the DMSO-treated wild type ($p < 0.05$; fold change ≥ 2) are shown. Locus tags of genes in the *V. vulnificus* MO6-24/O genome (GenBank accession numbers CP002469 and CP002470) and their gene products are shown.

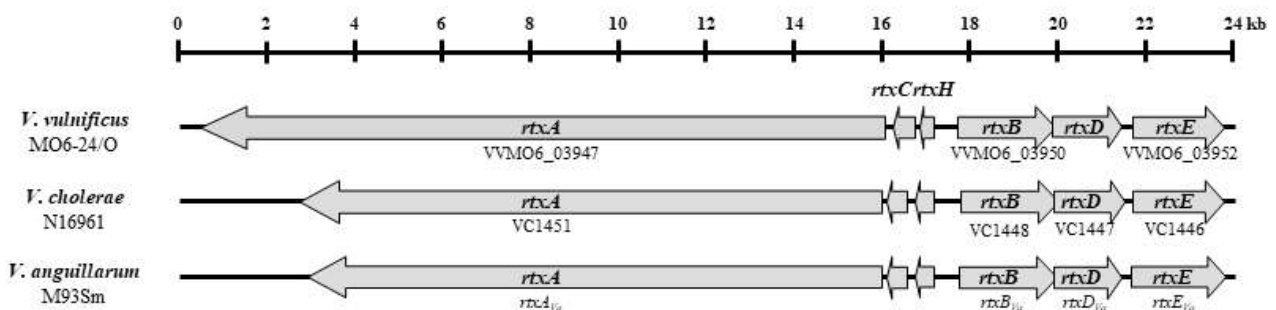


Fig 8. Comparison of the *rtx* operon organization in *V. vulnificus* with those of *V. cholerae* and *V. anguillarum*.

The *rtxA* operon in *V. vulnificus* MO6-24/O, *V. cholerae* N16961, *V. anguillarum* M93Sm.

㉔ Marker 독성 유전자들의 발현 및 기능적인 특성 규명

- Marker 독성 유전자로 발굴한 *rtxHCA* 및 *rtxBDE* operon의 발현 및 기능적인 특성을 조사하였다. *rtxHCA* 및 *rtxBDE* operon의 transcription start site를 각각 결정하였고, promoter activity를 여러 growth phase와 다양한 환경 조건에서 관찰함으로써 발현 특성을 알아보았다. MARTX toxin 분비에 관여하는 MARTX toxin transporter 중 ATP binding protein RtxE의 역할을 규명하기 위해, *rtxE* isogenic mutant를 이용하여 MARTX toxin이 분비되는지 확인하였다.

1) Primer extension analysis

A. *V. vulnificus* wild type을 LBS에서 exponential phase까지 배양한 뒤, RNeasy mini kit

(Qiagen)를 이용하여 total RNA를 purify하였다.

B. *RtxA*-PE1 primer (5' -CCATTCTTGGATCTTCTAGCATGT-3')를 [γ - 32 P]ATP로 labeling하고, RNA와 mix한 뒤 SuperScript II RNase H⁻ reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 cDNA를 제작하였다.

C. 이렇게 만들어진 cDNA를 6% polyacrylamide gel에 resolving하고, sequencing ladder를 함께 내려 transcription start site를 확인하였다. 실험결과는 BAS plate에 노출시킨 후 phosphorimage analyzer를 이용하여 분석하였다.

실험 결과, *rtxA*를 포함한 *rtxHCA* operon의 transcription start site는 translation initiation codon으로부터 166-bp upstream에 하나 존재하고 있음을 알 수 있었고, 이를 토대로 RNA polymerase sigma factor 70 이 결합하는 위치인 consensus -10 (TTTAAT)과 -35 (ATGGCT) 지점을 예측하였다 (Fig. 9).

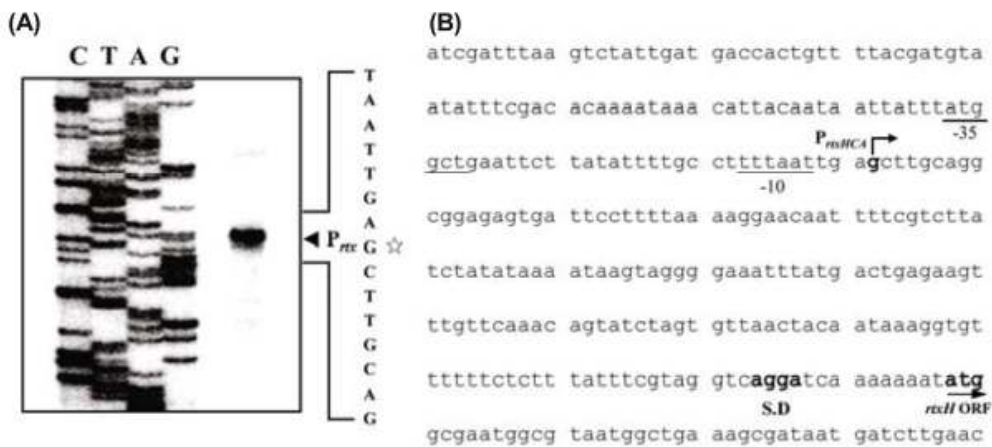


Fig 9. Primer extension analysis of *rtxHCA* transcript and sequence of *rtxHCA* upstream region.

(A) The transcription start site was determined by primer extension of RNA derived from *V. vulnificus* MO6-24/O grown to mid-exponential phase in LBS. Lanes G, A, T, and C represent the nucleotide sequencing ladders of *rtxHCA* upstream region. The transcription start site for P_{rtxHCA} is indicated by a white star. (B) Transcription start site is indicated by bent arrow. Possible promoters (-10 and -35) are shown underlined with continuous lines for the *rtxHCA* promoter. The ATG translation initiation codon and putative ribosome binding site (AGGA) are indicated in boldface type. ORF, open reading frame.

마찬가지로, 여러 growth phase 별로 sampling한 RNA를 이용하여 *rtxHCA* promoter activity를 측정하였다. *rtxA* mRNA level은 mid-exponential growth phase에서 최대로 나타났다 (Fig. 10).

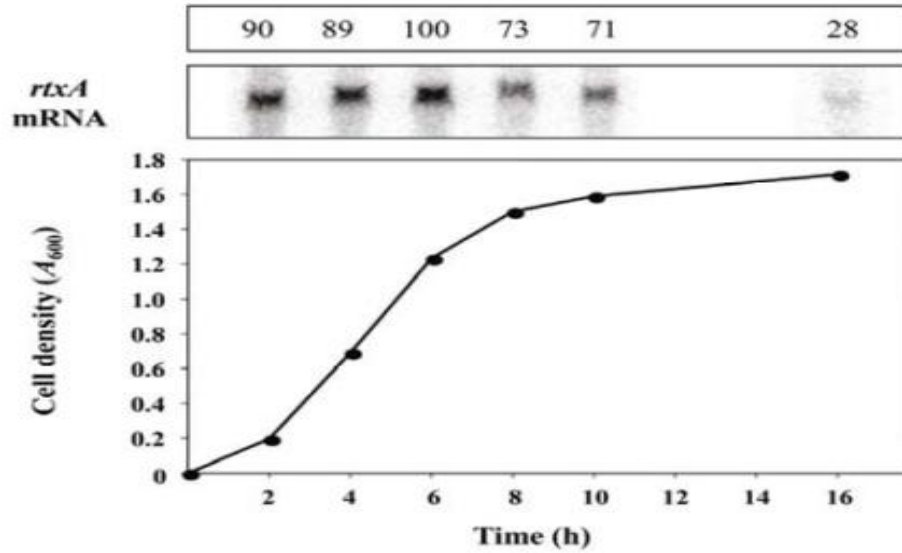


Fig 10. Growth kinetics and growth phase-dependent expression of *rtxHCA*.

Samples of the cultures were removed at the time points as indicated. Samples were analyzed for P_{rtxHCA} activity (top) and cell density (A_{600}) (bottom). The relative levels of the P_{rtxHCA} activity relative to the level of the P_{rtxHCA} activity of cells grown for 6 h are presented. Growth of MO6-24/O is indicated by the filled circles.

rtxBDE operon의 transcription start site도 *rtxHCA* operon과 같은 방법으로 결정되었다 (Fig. 11).

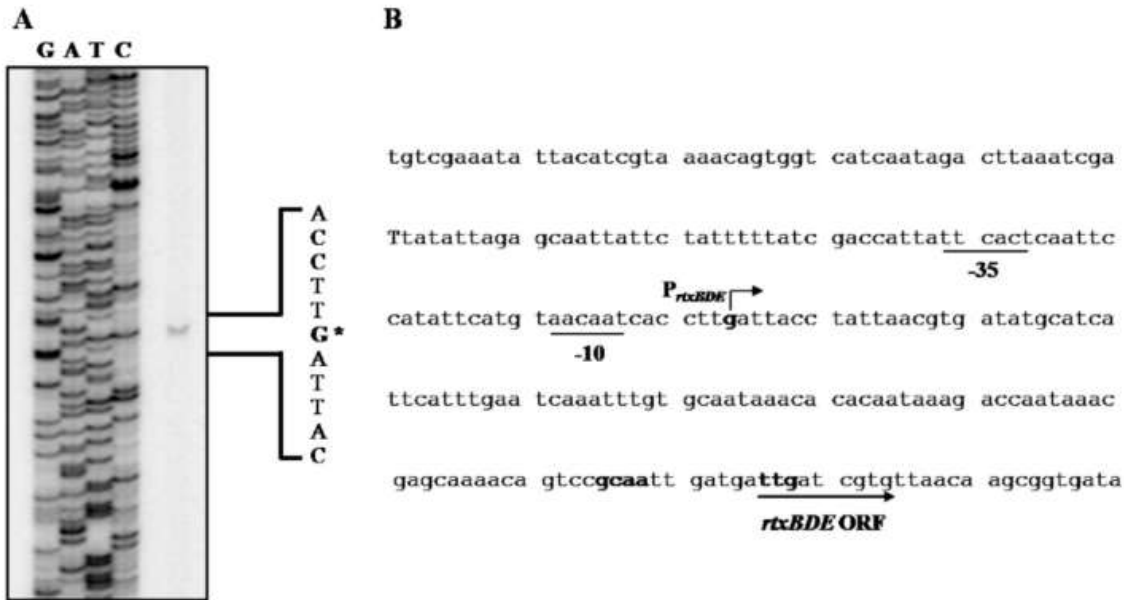


Fig 11. Identification of a transcription start site of the *rtxBDE* operon and sequence analysis of the *rtxBDE* upstream region.

(A) The transcription start site was determined by primer extension of the RNA derived from M06-24/O (pMW0504; pCOS5 with *rtxBDE*) grown to mid-exponential phase in LBS. Lanes G, A, T, and C represent the nucleotide sequencing ladders of pMW0504. The asterisk indicates the site of transcription start. (B) The transcription start site is indicated by a bent arrow, and the putative promoter regions (-10 and -35) are underlined. The TTTG translation initiation codon and putative ribosome binding site (GCAA) are in boldface.

이러 다양한 환경에서 *rtxHCA* 및 *rtxBDE* operon의 발현 양상을 조사하였다. Host cell 노출 조건에서 *rtxHCA* 및 *rtxBDE* promoter activity를 확인하기 위해, INT-407 cell에 2 h 노출된 *V. vulnificus* wild type cells에서 RNA를 분리하여 위와 동일하게 primer extension analysis를 수행하였다. 대조군으로는 LBS 또는 MEM에 노출된 *V. vulnificus* cells의 RNA를 사용하였다. 그 결과, host cell (INT-407)에 노출된 *V. vulnificus* cell에서 LBS 또는 MEM보다 높은 P_{rtxHCA} activity 및 P_{rtxBDE} activity가 나타났다 (Fig. 12 and 13).

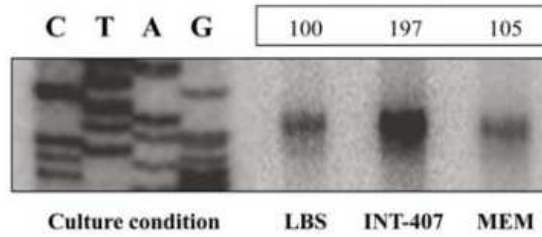


Fig 12. P_{rtxHCA} activity in *V. vulnificus* grown under different conditions.

RNA derived from MO6-24/O exposed to INT-407 cells, or grown in different media such as LBS, MEM, as indicated. The activities of P_{rtxHCA} were determined separately by primer extension of the RNA. Lanes G, A, T, and C represent the nucleotide sequencing ladders of *rtxHCA* upstream region. The levels of the P_{rtxHCA} activity are presented relative to the level of the P_{rtxHCA} activity of *V. vulnificus* grown in LBS.

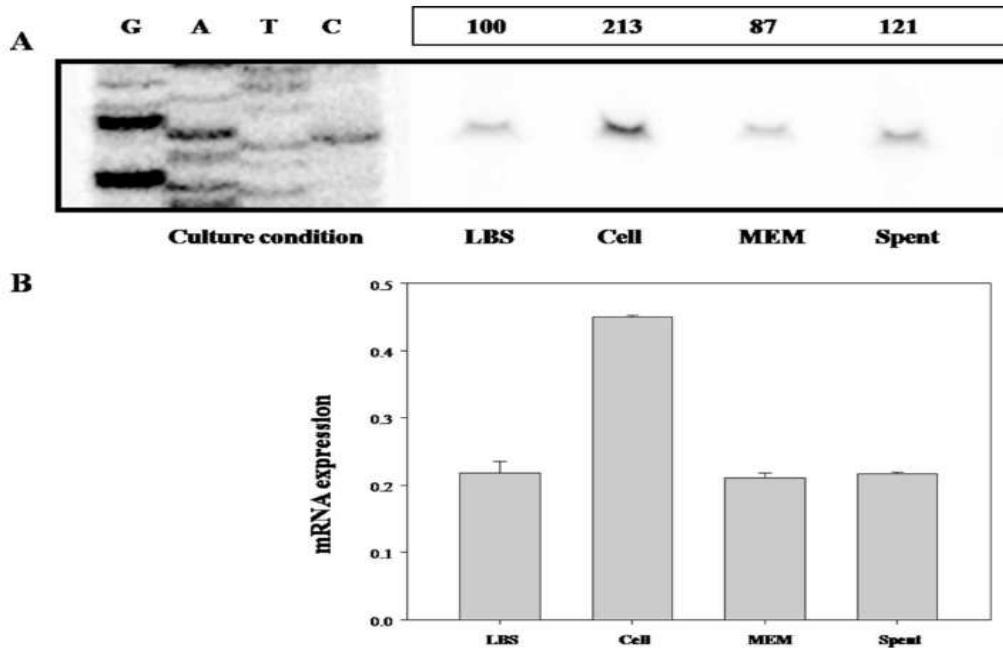


Fig 13. P_{rtxBDE} activity in *V. vulnificus* cells grown under different conditions.

Results for RNA derived from M06-24/O (pMW0504) exposed to INT-407 cells (cell) or grown with different media such as LBS, MEM, and INT-407-spent MEM (spent) are indicated. (A) The activities of P_{rtxBDE} were determined separately by primer extension of the RNA. Lanes G, A, T, and C represent the nucleotide sequencing ladders of pMW0504. The relative levels of the P_{rtxBDE} activity relative to the level of the P_{rtxBDE} activity of *V. vulnificus* grown with LBS are presented. (B) For the real-time PCR analysis, the expression level of *rtxBDE* was normalized to the 16S rRNA expression level. Averages and standard errors of the means were calculated from at least three independent experiments.

2) SDS-PAGE and Western blot analysis

- V. vulnificus* wild type, *rtxE* mutant, complemented strain을 배양하고, INT-407 human epithelial cell에 MOI 100으로 2 h 동안 감염시켰다.
- V. vulnificus* cells를 회수한 뒤, cell lysate과 supernatant로 분리하였다.
- 분리한 supernatant를 농축하고, 30 μ g의 concentrated supernatants를 SDS-PAGE로 분리하였다.
- 한편, *V. vulnificus* wild type, *rtxA* mutant, *rtxE* mutant cells로부터 sonication을 이용하여 cell을 lysis하고 원심분리하여 lysates을 얻었다.
- 10 μ g의 cell lysates을 SDS-PAGE로 분리한 뒤, rabbit anti-*V. vulnificus* RtxA antibody를 이용하여 RtxA protein을 detection하였다.

RtxE는 MARTX toxin (RtxA) transporter protein인 ATP binding protein으로 알려져 있다. *rtxE*

가 knock-out된 mutant에서는 fragmented RtxA protein에 해당하는 band가 나타나지 않았다 (Fig. 14A). *rtxE* 유전자를 complementation한 strain에서는 fragmented RtxA protein에 해당하는 band가 관찰되었고, RtxE가 RtxA의 secretion에 관여함을 알 수 있었다. 또한, *rtxE* mutant의 cell lysates에서 WT보다 매우 높은 수준의 fragmented RtxA protein band가 관찰되어, 생성된 RtxA protein이 secretion되지 못하고 cell 내 존재하는 것으로 확인되었다 (Fig. 14B).

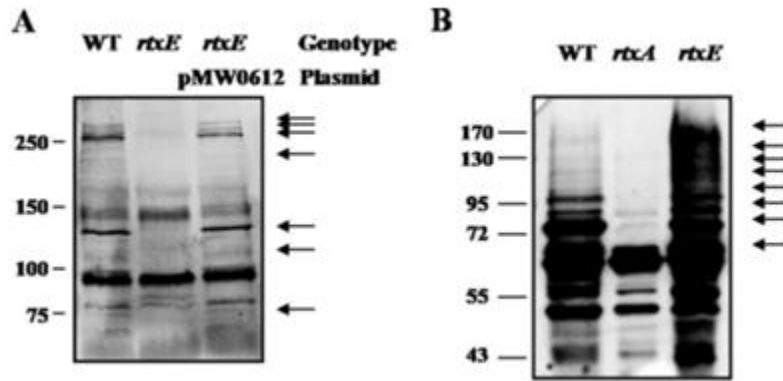


Fig 14. Effects of mutation in the *rtxE* gene on the secretion of RtxA.

(A) For each lane, 30 μ g of the proteins of concentrated supernatants from M06-24/O (WT), mutant MW061 (*rtxE*), or a complemented strain incubated with INT-407 (MOI of 100; 2 h) was loaded. (B) The bacterial cells were harvested, washed, and broken by sonication (ultrasonic processor; Sonics & Materials, Inc., CT). After centrifugation, 10 μ g of the proteins of the clarified lysates was loaded for each lane. The proteins were separated by SDS-PAGE, and RtxA was detected by a Western blot analysis using rabbit anti-*V. vulnificus* RtxA antibody. The fragmented RtxA proteins are indicated by arrows.

종합적으로, 후속 1차년도 연구를 통해 *V. vulnificus*의 독성인자 발현 조절자 HlyU의 제어 선도물질 CM2660의 효능을 검증하였다. CM2660과 함께 *V. vulnificus*에 감염된 HeLa cell의 cell rounding과 actin oligomerization은 대조군(DMSO)에 비하여 약화되었고, 이는 CM2660이 *V. vulnificus*의 cytopathicity를 저해하였음을 의미한다. 또한 *V. vulnificus*를 mouse에 피하 주사하였을 때, 대조군은 10마리 모두 15시간 이내 사망한 반면, CM2660을 동시 투여한 경우는 10마리 중 2마리만이 사망하였고, 통계적으로 매우 유의미한 수준의 mouse survival 증가를 나타내었다. *V. vulnificus* 감염에 의해 일어나는 면역 반응인 cytokine 분비와 infection site로의 macrophage infiltration도 CM2660에 의해 현저히 저해되었다. 대조군이 mouse의 간 및 신장 기능 장애를 의미하는 지표들을 나타낸 반면, CM2660을 동시 투여한 경우에는 그러한 변화가 보이지 않았다. 이러한 실험 결과로부터 CM2660이 human cell line과 mouse model에서 *V.*

*vulnificus*의 독성을 효과적으로 억제함을 확인하였다.

CM2660이 *V. vulnificus*의 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 RNA-sequencing을 수행하였고, 유전자 발현 양상의 변화를 조사하였다. DMSO-treated wild type, CM2660-treated wild type, DMSO-treated *hlyU* mutant, CM2660-treated *hlyU* mutant의 transcriptome을 분석하였고, DMSO-treated wild type의 transcriptome과 비교하여 $p < 0.05$; fold change ≥ 2 의 조건을 만족하는 유전자들을 조사하였다. 총 15개 유전자가 통계적으로 유의미하게 다른 발현 양상을 보였으며, *plpA*, *vvhA*, *rtxA*와 같은 독성 유전자들이 포함되었다. 이 중에서 *rtxHCA* 및 *rtxBDE* 유전자들은 operon으로 전사되며, *V. vulnificus*의 중요한 독성인자인 MARTX toxin과 MARTX toxin 분비에 필요한 transporter를 encoding한다. 따라서 이들을 marker 독성 유전자로 발굴하였다.

발굴한 *rtxHCA* 및 *rtxBDE* operon의 transcription start site를 결정하였고, 여러 growth phase 및 다양한 성장 조건에서 *rtxHCA*, *rtxBDE* promoter activity를 조사하였다. P_{rtxHCA} activity는 mid-exponential phase에서 가장 높게 나타났고, host cell 노출 시 P_{rtxHCA} , P_{rtxBDE} activity가 LBS 또는 MEM보다 높게 나타남을 확인하였다. 또한 MARTX toxin transporter의 ATP binding protein인 RtxE가 knock-out된 경우 RtxA protein이 분비되지 않음을 확인하였다. 이러한 marker 독성 유전자의 발현 및 기능 특성은 후속 2차년도 연구의 marker 독성 유전자 reporter strain 구축에 이용될 수 있다.

㉔ HlyU 타겟 선도물질 구조-활성 상관관계에 따른 물질 합성

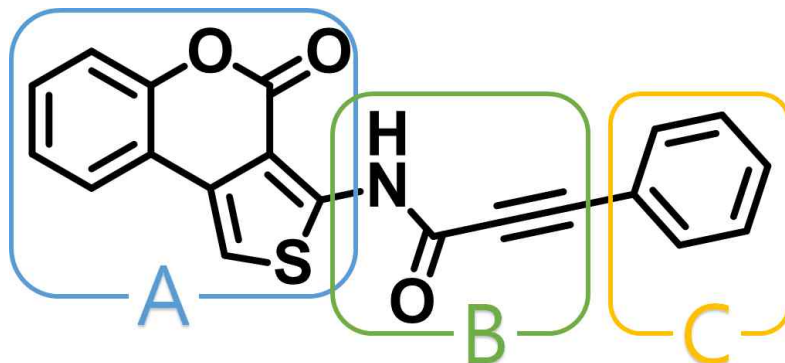


Fig 15. 선행 연구에서 도출된 선도물질

- Fig 15. 의 물질은 선행연구로부터 도출된 선도 물질로 B 구역의 삼중결합이 중요한 약리단으로 밝혀짐. 이에, 다른 A 구역과 C 구역에 대해 구조-활성 상관관계 연구를 통해 각 부분의 간소화 혹은 생략된 물질을 설계하고 합성하고자 하였음.
- A 구역의 큰 heterocyclic 구조는 밝혀진 3차원 구조에서 이탈기뿐만 작용하는 것으로 유추되어, 간소화를 시도한 물질을 합성하였고 합성법은 다음과 같음.

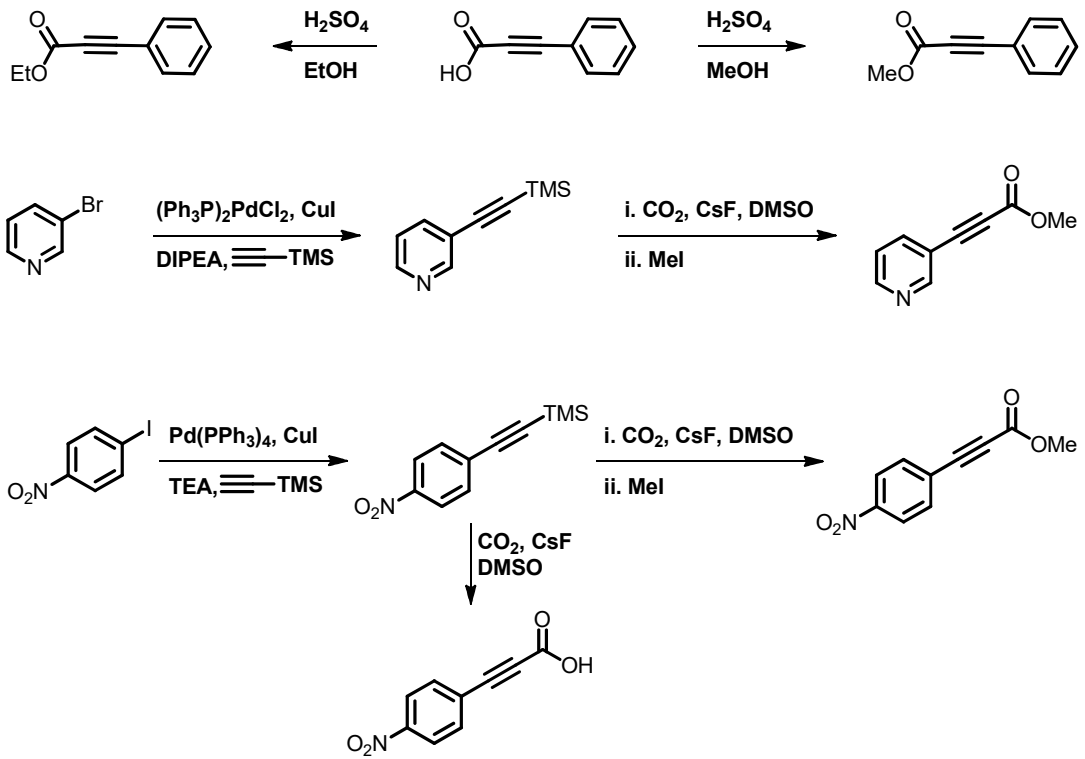


Fig 16. A 구역 간소화 유도체들의 합성법

- 또한 A 구역의 큰 작용기가 이탈기로 작용하는 것을 상정하여 이탈된 작용기가 생체에서 익숙한 물질인 아미노산으로 치환된 유도체 또한 합성하였음.

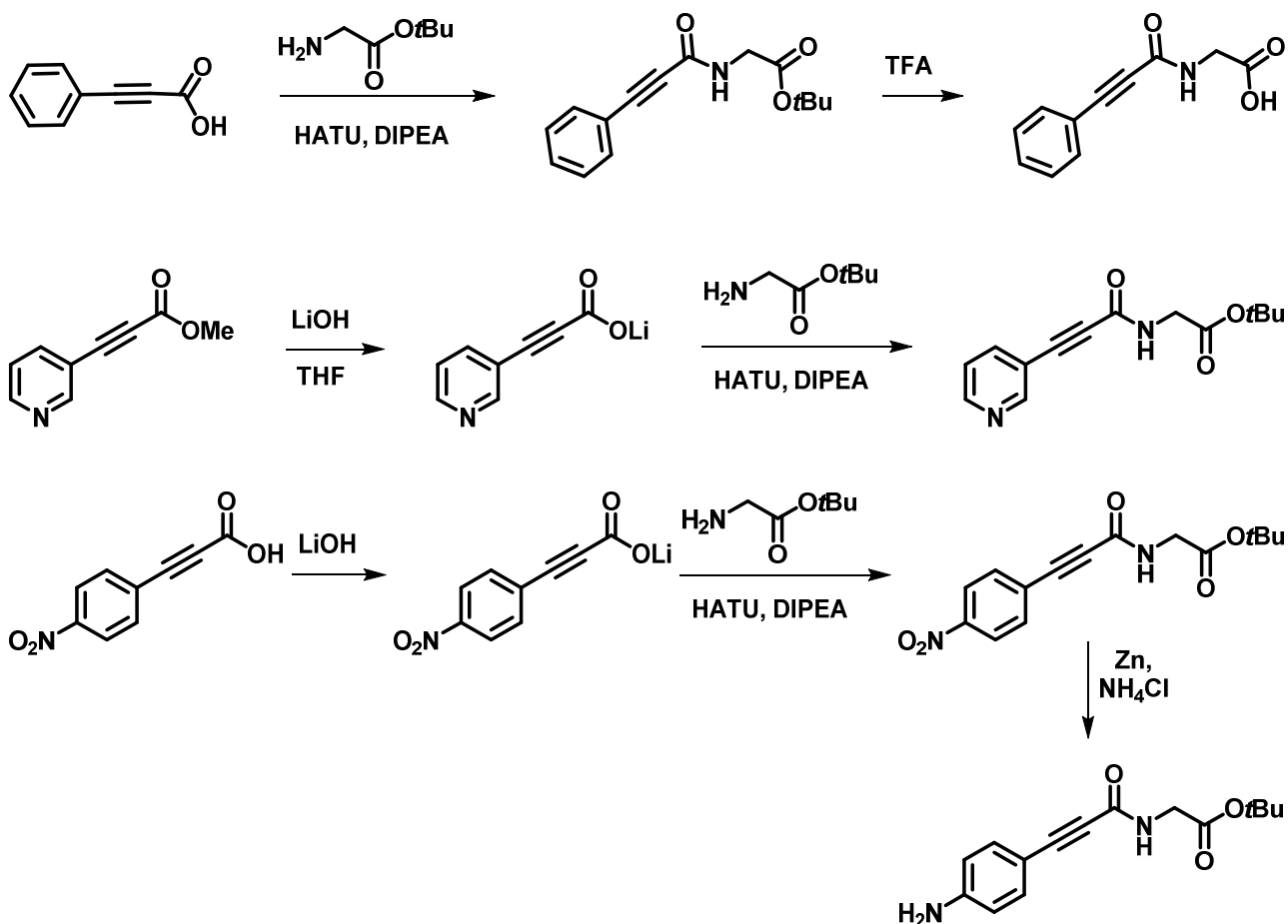


Fig 17. A 구역 아미노산 치환 유도체들의 합성법

- C 구역의 방향족 고리 작용기는 약물학적인 개선을 위해 hetero atom 인 질소가 도입된 유도체들을 A 구역 변형 유도체들과 함께 합성하였음.
- 또한 C 구역의 방향족 고리 작용기가 직접적인 억제 활성 기전과 관련이 없으므로 생략시킨 물질을 설계하였고 이와 동시에 B 구역의 삼중결합 약리단을 변경하여 선도 물질과 비교 분석을 수행하기 위해 다음과 같은 두 물질을 합성하였다.

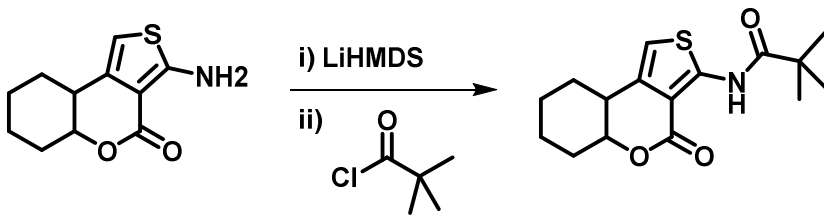
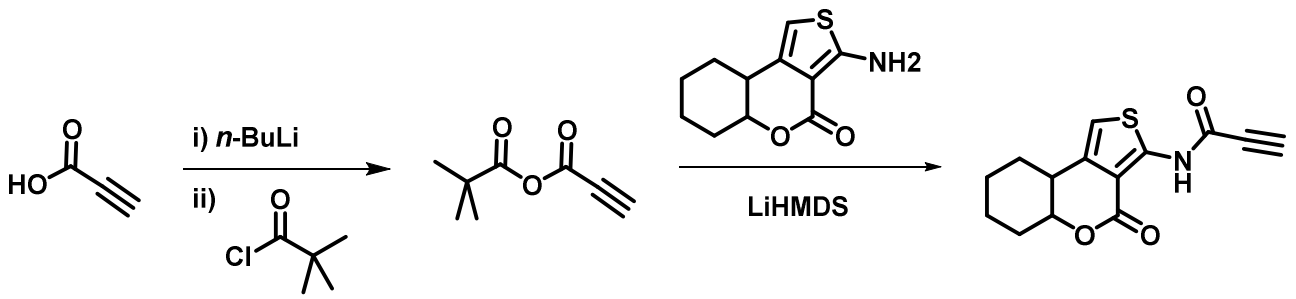


Fig 18. B, C 구역 변형 유도체들의 합성법.

- 총 12종의 물질을 선도물질로부터 설계 및 합성을 완료하였으며 그 구조는 다음과 같다.

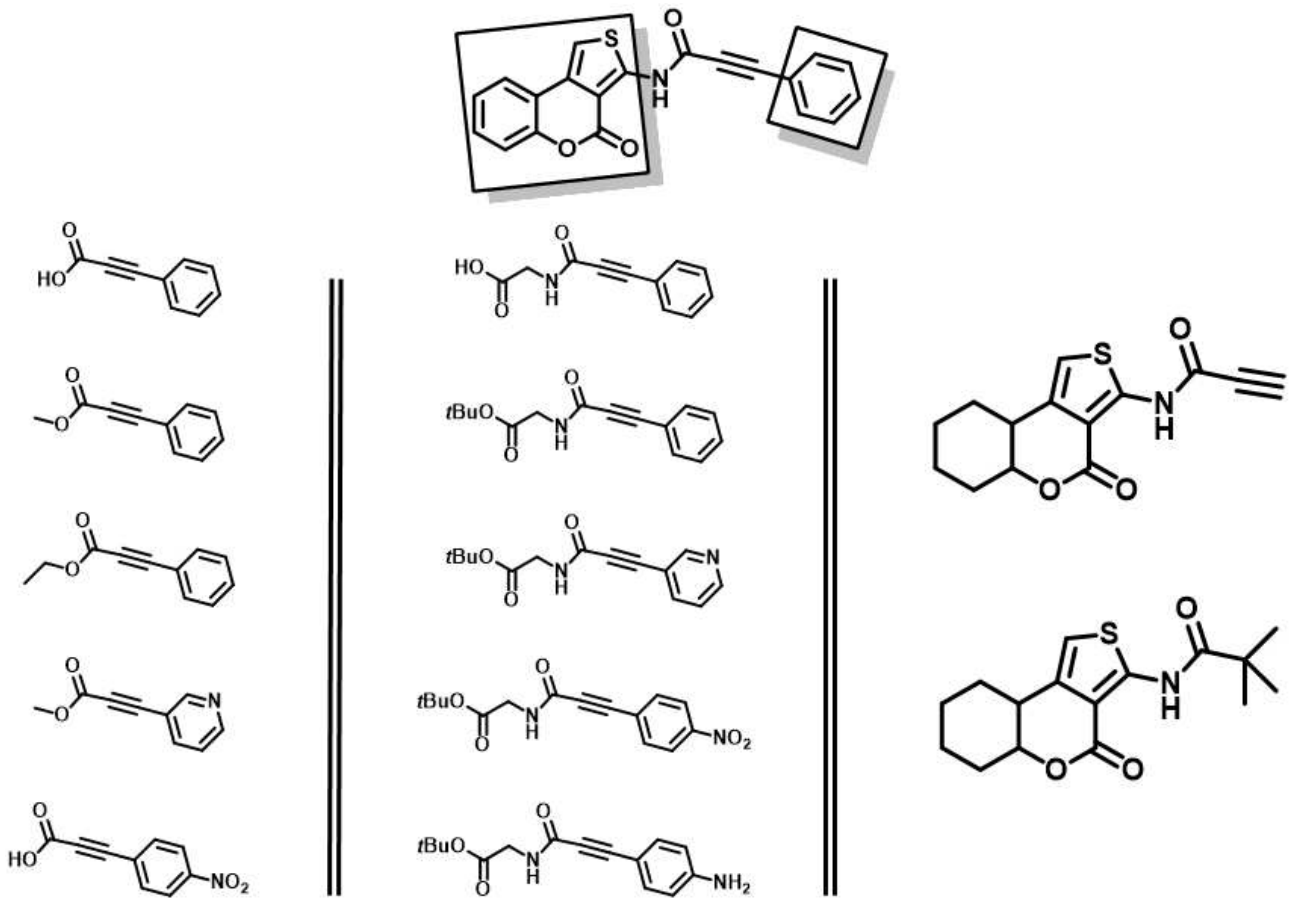


Fig 19. 합성된 유도체 12종의 구조.

1) 합성된 유도체들의 생리활성 평가

- 합성된 유도체들은 현재 생리활성 평가가 진행중에 있으며 차후 결과를 토대로 더욱 개선된 유도체들을 설계 및 합성할 예정이다.

2) 선도물질에서의 약리단 규명

- 선도물질의 B 구역의 삼중결합이 독성인자 저해에 중요한 역할을 수행하는 약리단으로 규명 되었으며 밝혀진 입체구조와 추정되는 기전은 다음과 같다.



Fig 20. 식중독균 독성인자에 결합한 선도물질의 입체구조.

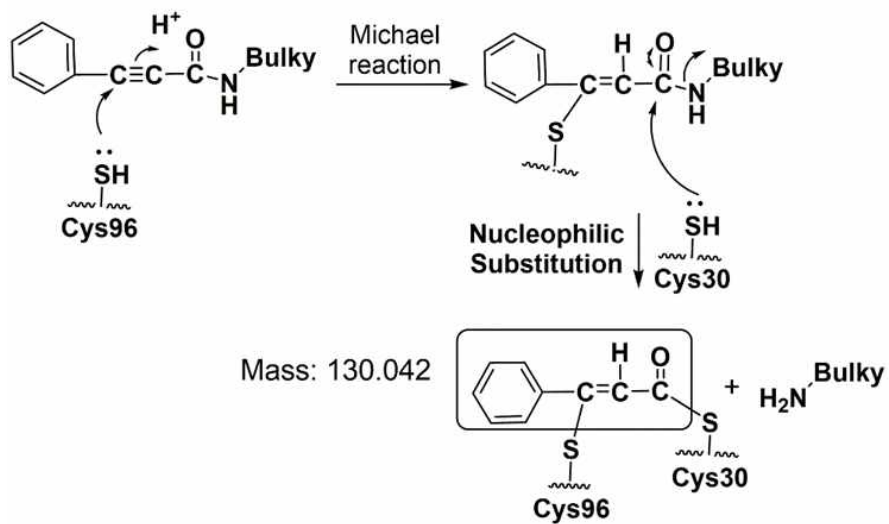


Fig 21. 유추한 선도물질 작용기전.

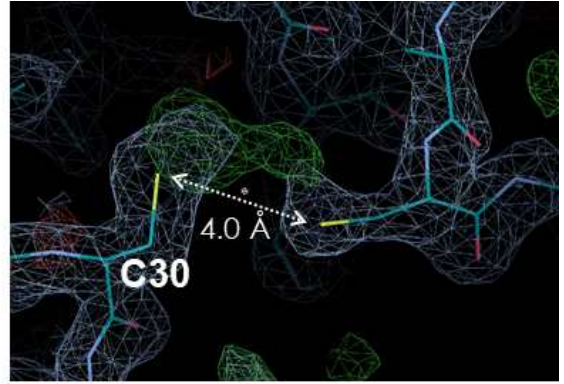
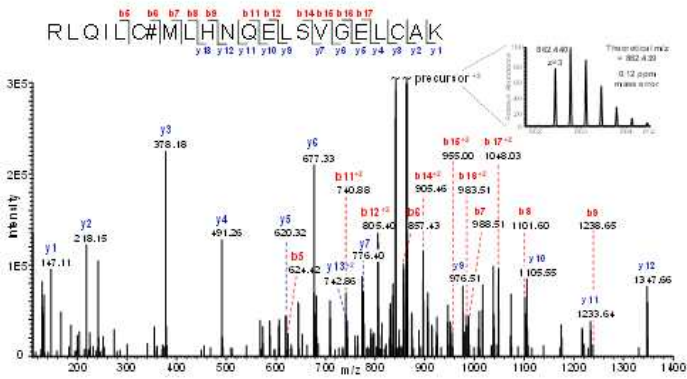
- 규명된 약리단은 본 연구과제를 수행함에 있어 중요한 약리단으로 설정하고 앞서 서술한 유도체 설계에 적용함.

3) 합성된 유도체의 HlyU 저해기전 규명

- 독성인자 억제효과가 유효한 물질들에 대하여 3차원 구조분석등의 기법을 사용하여 저해 기전을 밝히고자 함.
- 현재 생리활성 평가가 진행중이며, 생리활성 결과가 도출되면 선도물질과 비교 분석을 할 예정이다.
- 패혈증비브리오균의 독소발현인자인 HlyU를 억제하여 차세대 식품소독제로 개발된 CM2660의 작동 기작을 밝히기 위해서 HlyU와 CM2660간의 결합구조를 규명하였다. Mass 분석을 통해 CM2660의 조각이 HlyU의 Cys30번 잔기에 공유결합을 통해 결합함을 밝혀냈다. 또한 식품산업에서 식품 살균 및 공장의 조리 시설의 살균 소독에 HOCl은 중요하게 사용되는 식품소독제이다. 하지만 식중독균들은 HOCl에 대한 방어 시스템을 가지고 있는데, 그중 HOCl을 감지하는 전사 인자로 HypT와 RclR를 가지고 있다. 본 연구에서는 두 단백질 HypT와 RclR의 구조 규명을 통해서 그 작동메커니즘을 이해하고, 궁극적으로는 두 단백질의 저해제를 찾아 HOCl의 사용 농도를 줄이고 효과를 극대화 시키고자 한다. 이번 연도에서는 HypT의 작동원리를 밝혔으며, RclR의 초기 결정 회절데이터를 획득하였다. 또한 중요한 식중독균중 하나인 황색포도상구균의 면역저항 작용에 중요한 protease인 HslV의 구조를 고해상도로 규명하였다. 차세대 식품소독제로 주목을 받는 Bacteriophage 유래 autolysin에 대한 연구를 수행하였다. Bacillus cereus에 감염하는 bacteriophage 유래 autolysin의 3차원 구조를 규명하고 이의 기질 특이성에 대한 분자기작을 제시하였다. 이외에 황색포도상구균의 항생제를 비롯한 소독 물질에 대한 유출펌프의 조절인자인 MexT에 대한 구조연구를 수행하였다.

㉞ 패혈증 비브리오균의 독소발현인자인 HlyU과 CM2660간의 구조 연구

- HlyU을 억제하는 CM2660과 결합 방식을 Mass 분석을 통해 분석하여, Cys30에 특이적으로 CM2660이 공유결합함을 밝힘.
- RNA IBS 연구단의 김종서 박사연구실과 공동연구를 통해서 Cys30에 131Da의 분자량을 가진 조각이 공유결합으로 결합함을 밝힘. 이는 복합구조에서 Cys30의 전자밀도보다는 작지만, 구조적 flexibility를 감안하면 이를 설명할 수 있음.



130 Da adduct at Cys30

Fig 22. Cys30 잔기 간의 공유결합

⊕ HOCl에 대한 내성을 나타내는 독소인자 구조 연구

- 식품산업에서 식품 살균 및 공장의 조리 시설의 살균 소독에 HOCl은 중요하게 사용되는 식품소독제이며, 살모넬라의 경우 HypT와 RclR에 의해 HOCl이 sensing이 되며 방어 유전자의 발현이 조절됨.
- HOCl을 감지하는 전사 인자로 살모넬라균 유래 HypT의 구조를 토대로 작동메커니즘을 규명함.
- HypT가 DNA에 결합하는 위치를 EMSA와 DNase I footprinting 실험을 통해 규명함 (유상렬 교수 연구실)
- 이를 통해 HypT 타겟 프로모터의 구성을 HypT 결합 부위를 추가하여 재분석함.

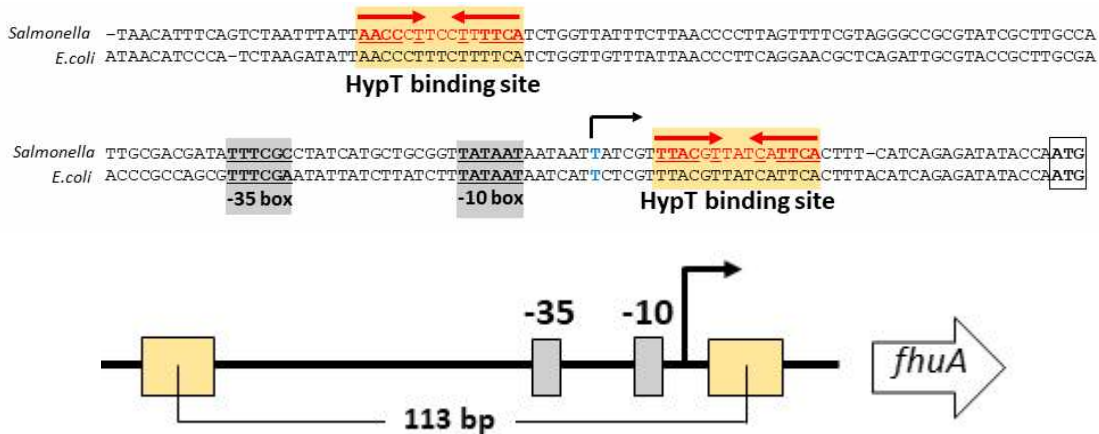


Fig 23. HypT의 binding site 예측

- HypT의 DNA 결합 도메인 dimer가 결합하는 위치는 약 100 bp의 간격을 두고 떨어져 있으며 그 사이에 $\sigma 70$ 이 결합하는 -10, -35 박스가 위치함.
- 위의 프로모터에 HypT가 HOCl 여부에 따라 어떤 방식으로 결합하여 유전자 발현을 조절하는지를 규명하기 위하여, HypT의 M206Q 뮤턴드 구조를 분석.

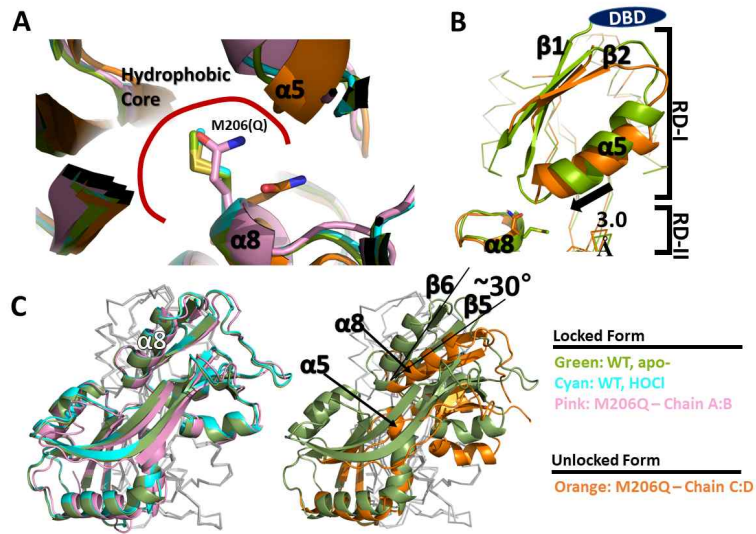


Fig 24. HypT M206Q의 구조

- M206Q 뮤턴트 구조를 분석한 결과, HypT가 HOCl을 감지하고 M206이 산화 되었을 때, $\alpha 8$ 헬릭스와 그 근처 구조가 30도 가량 회전함을 관찰함.

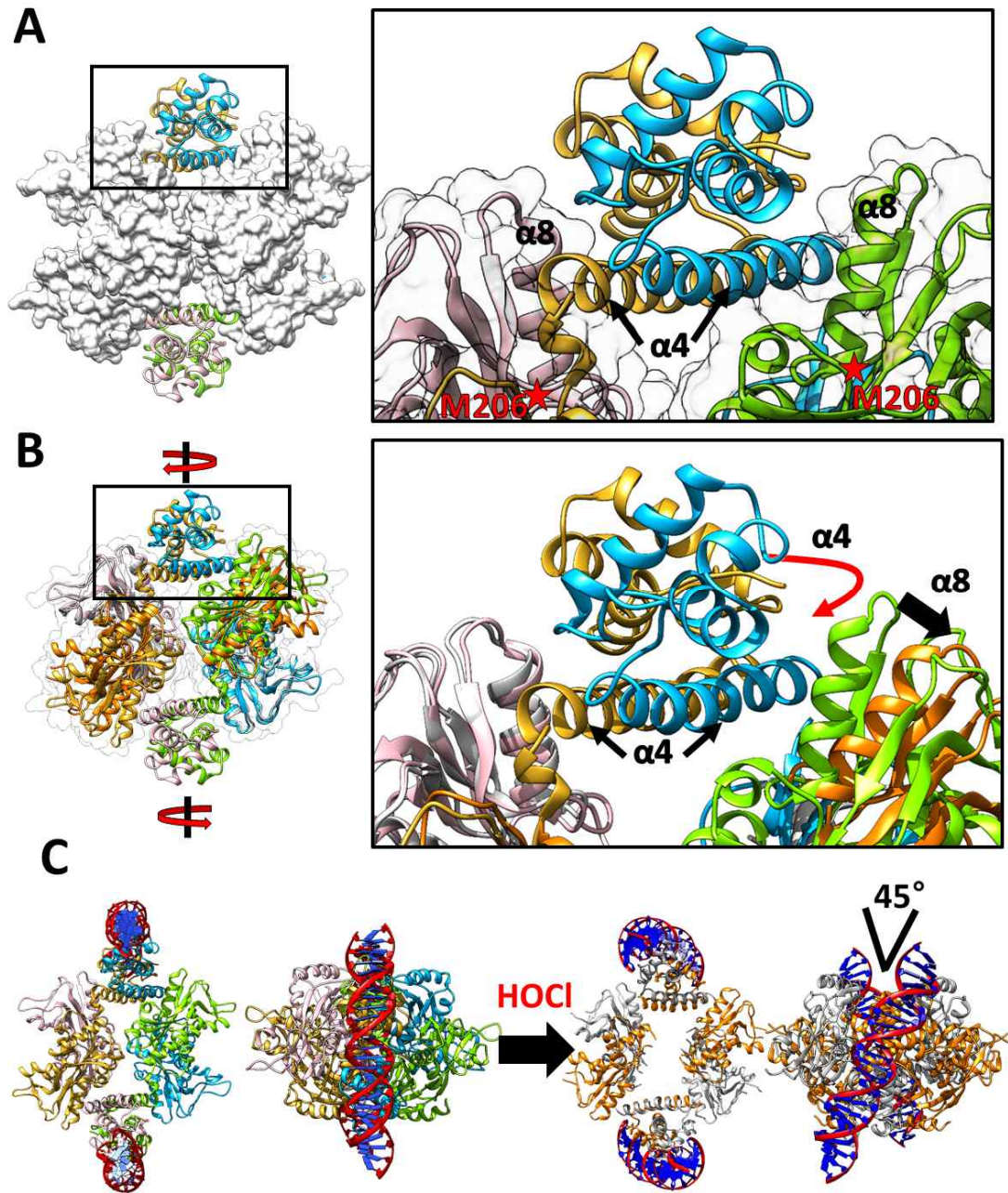


Fig 25. HypT M206Q의 구조적 변화

- $\alpha 8$ 헬릭스의 구조적 변화는 DNA 결합 도메인의 회전을 유도하며, 결과적으로 결합하는 DNA간의 각도가 45도이며 negative supercoility를 가질 것으로 예측.

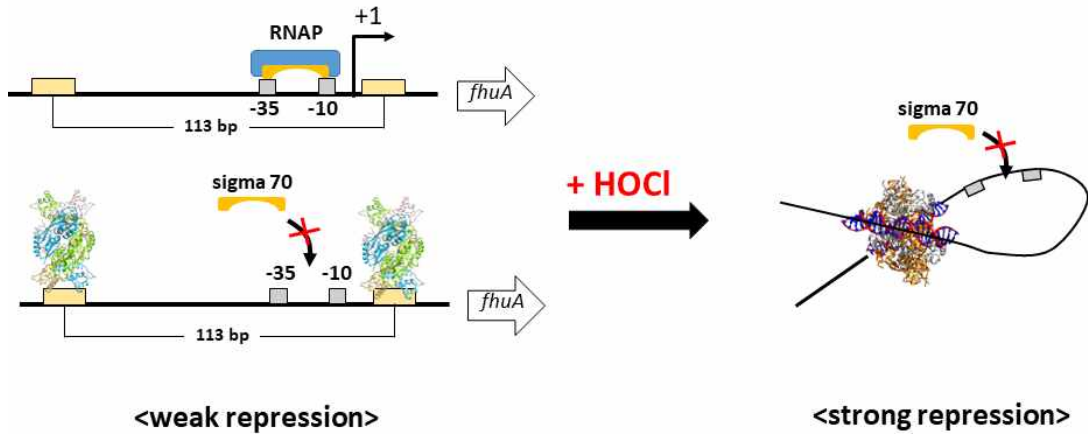


Fig 26. 산화적 스트레스에 의한 HypT의 결합 기작 예측

- 구조적 정보와 DNase I footprinting 데이터를 종합하여 보았을 때, 위와 같은 최종 조절 메커니즘을 제시.
- HOCl을 감지하는 전사 인자로 살모넬라균 유래 RclR의 초기 회절상 획득함.
- RclR의 발현양을 늘이기 위해 다양한 vector 시스템을 스크리닝 하였으며, 발현양이 많은 플라스미드를 제작함.
- 과발현 및 고순도, 고농도 단백질 확보함.

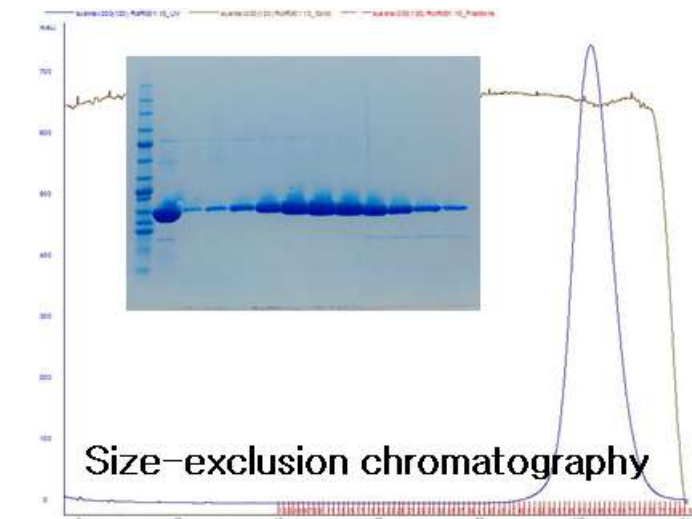


Fig 27. HypT의 Size-exclusion chromatography profile

- 정제 방법 최적화를 통해 초기 결정화 조건 탐색 성공함.
- 저해상도 X-ray 회절 데이터를 획득하였으며 향후 고해상도 데이터 획득 전략과 페이징 문제 해결 전략 수립.

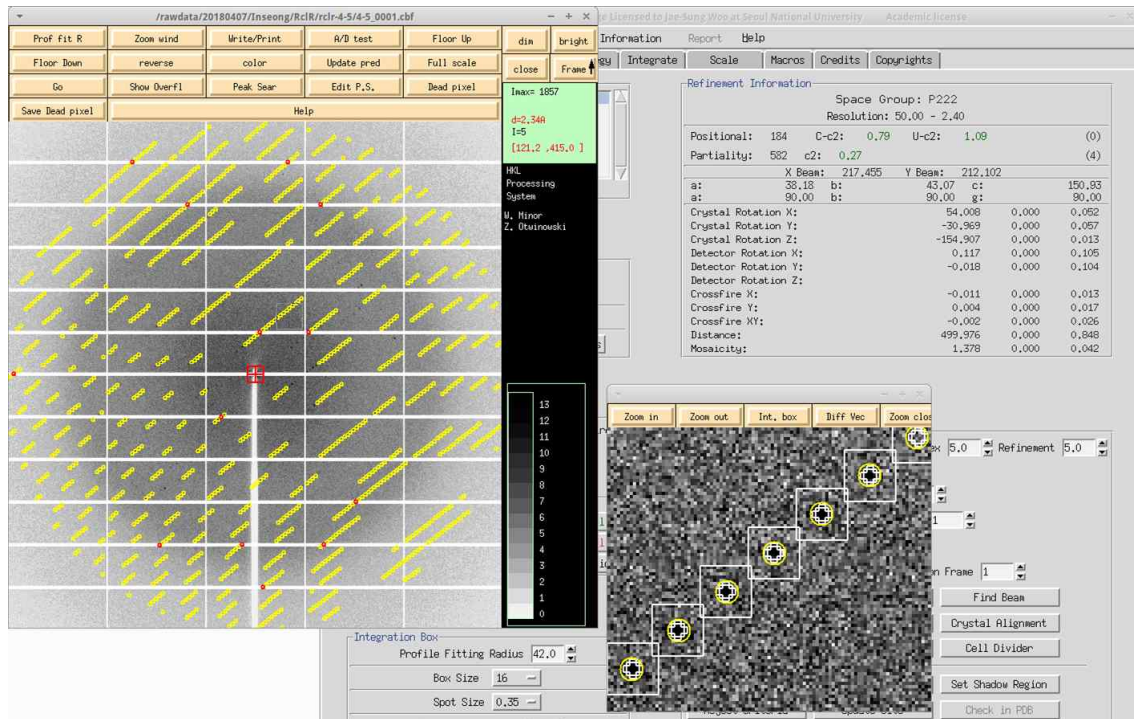


Fig 28. HypT 단백질 결정의 회절상

㊤ Bacteriophage 유래 autolysin의 구조 연구

- Bacteriophage 유래 autolysin은 차세대 식품소독제로 주목을 받음.
- Bacillus cereus를 감염하는 Bacteriophage 유래 autolysin에 대한 구조를 밝혀 기질 특이성에 대한 분자기작을 제시함.

Bacteriophage infecting *Bacillus cereus*
Autolysin, EAD of LysB4

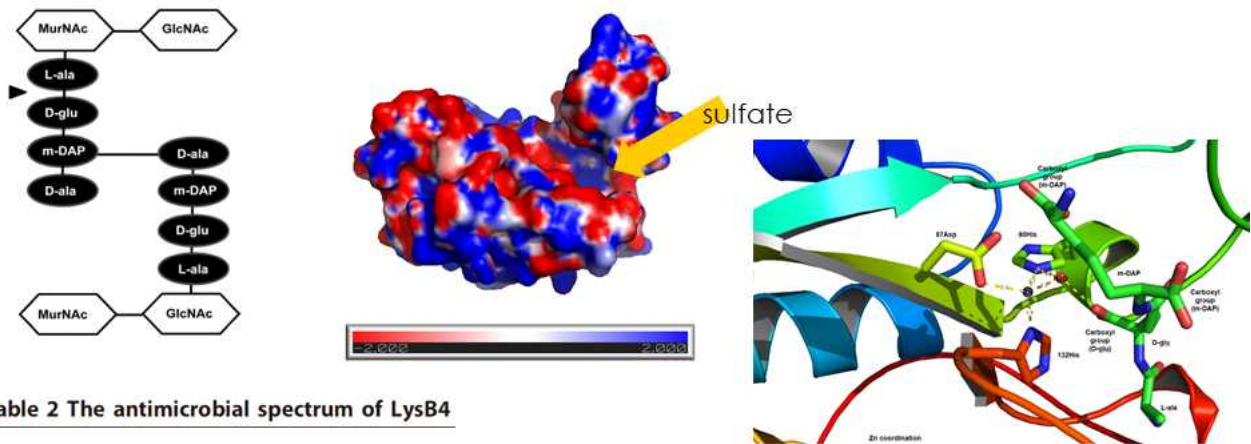


Table 2 The antimicrobial spectrum of LysB4

<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	D-Gln L-Lys
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-	D-Gln L-Lys
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> ATCC 11454	-	D-Glu L-Lys
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258	-	D-Glu L-Lys
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	D-Glu m-DAP

Fig 29. Autolysin의 활성부위

㉔ 황색포도상구균의 저항인자 구조 연구

- 중요한 식중독균중 하나인 황색포도상구균은 인체의 면역반응에 대해 저항성을 지니고 있음.
- 병원균이 숙주에 감염 시 숙주의 방어 시스템으로 인해 감염균 내부에 aggresome 생성하게 되고 병원균에서는 이를 극복하기 위한 방안으로 protease를 이용하여 aggresome을 제거함.
- 병원균의 protease는 병원균의 virulence를 조절할 수 있는 방식으로 예측되며, 주요 식중독균을 제어할 수 있는 신약의 타겟이 될 수 있으므로, aggresome을 substrate로 하는 protease의 분자적 메커니즘을 확인하기 위한 3차원 구조 규명이 필요함.
- 황색포도상구균의 intercellular protease인 HslV의 3차원 구조를 X선 결정학을 이용하여 규명함.
- HslV 정제
His-tag을 이용하여 Ni-NTA 후 TEV로 His-tag 제거 후 anion exchange chromatography 와 Size exclusion chromatography 진행하여 19 kDa HslV를 정제.

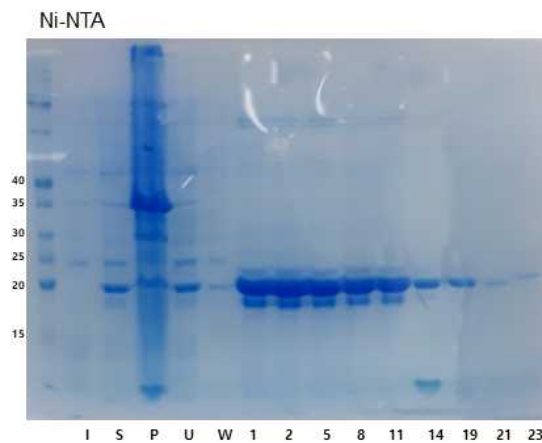


Fig 30. Ni-NTA SDS-PAGE gel 결과

- Crystalization 및 X-ray diffraction data
1.5 M Lithium sulfate monohydrate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5 의 조건으로 crystal optimization 하였으며 육각기둥 모양의 crystal을 얻음.
30% HAMPTON cryo 3(12.5% ethylene glycol, 12.5% MPD, 12.5% Propandiol, 12.5% Glycerol, 12.5 nM NDSB201)로 PAL-5C Beamline을 사용하여 2.0 Å diffraction data를 얻었음.
- Crystallography를 이용한 HslV의 3차원 구조
황색포도상구균의 HslV는 12개의 chain이 6개씩 2줄의 ring을 이루어 전체적으로 double doughnut 형태를 보임
기존에 알려진 대장균(*E. coli*)과 헤모필루스 인플루엔자균(*H. influenzae*)의 HslV 구조와 달리 12개 chain의 orientation이 동일하지 않아 비대칭적인 육면체를 보임.

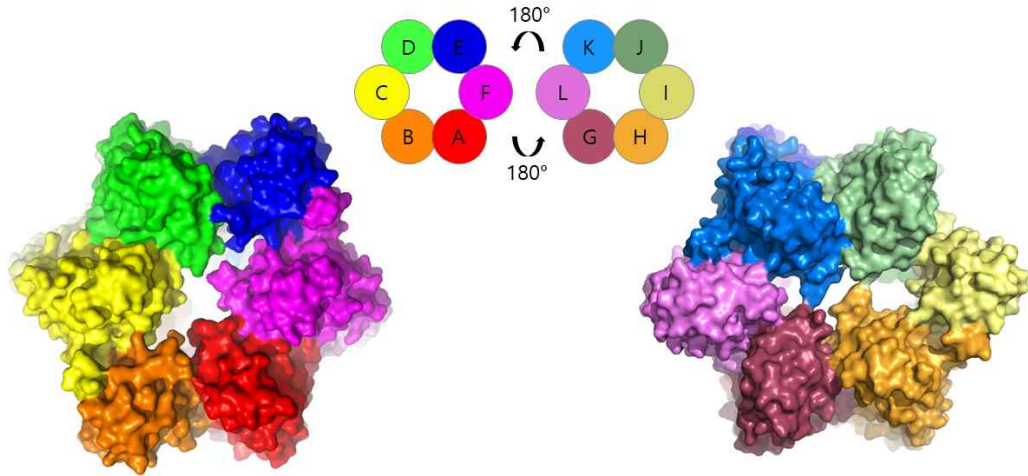


Fig 31. HslV 3차원 구조의 윗면과 아랫면

황색포도상구균의 HslV의 12개 chain 중 4개가 다른 orientation을 보였으며 이들은 서로 대칭적으로 존재하며, 이로 인해 기존의 HslV 구조와는 달리 측면이 벌어지는 것을 확인함.

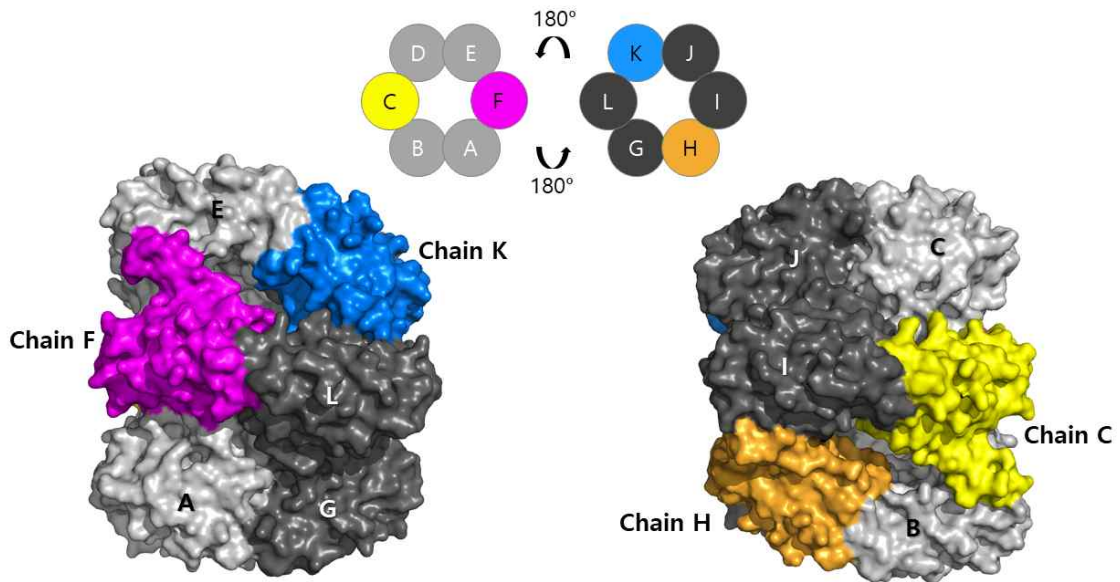


Fig 32. HslV 3차원 구조의 측면

- EM을 이용한 2차원 구조 확인

Negative staining으로 준비한 시료를 바이오투과전자현미경 120 kV을 이용해 확인.

해상도가 낮아 2D class 구분이 힘들. 그러나 solution 상에서도 Topview로 추정되는 형태가 정육면체를 이루고 있지 않음을 확인함.

Top view

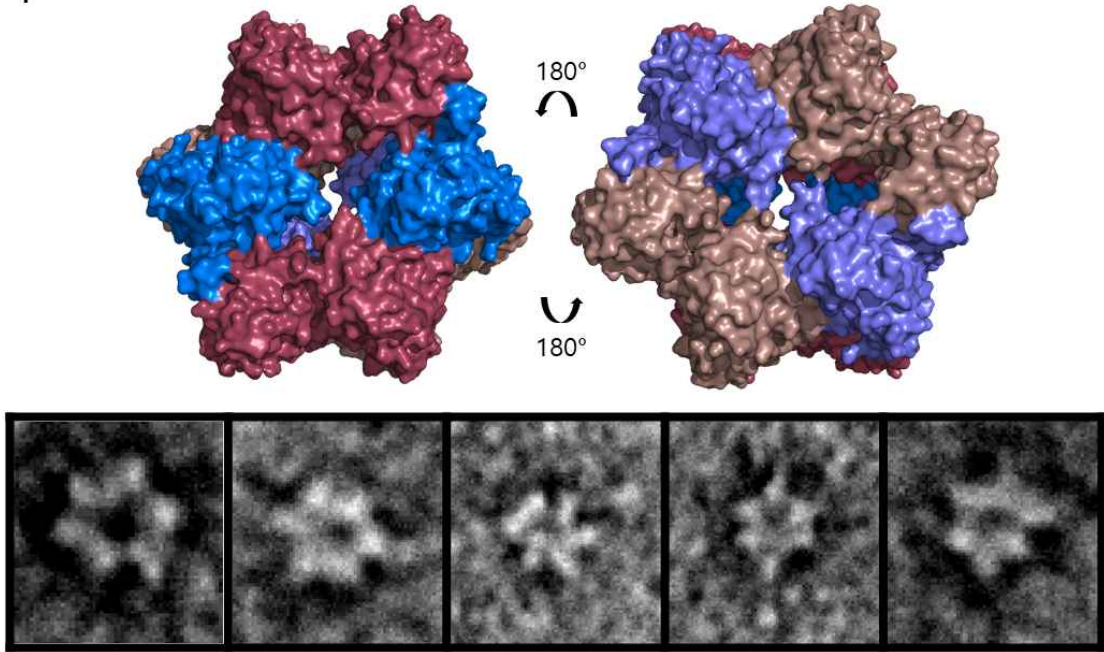


Fig 33. EM 자료와 crystal 3차원 윗면 구조 비교

- 항생제를 비롯한 소독 물질에 대한 유출펌프의 조절인자인 MexT에 대한 구조연구를 수행함.
- MexT regulatory domain의 순수 정제: 95%이상의 순도로 정제함.

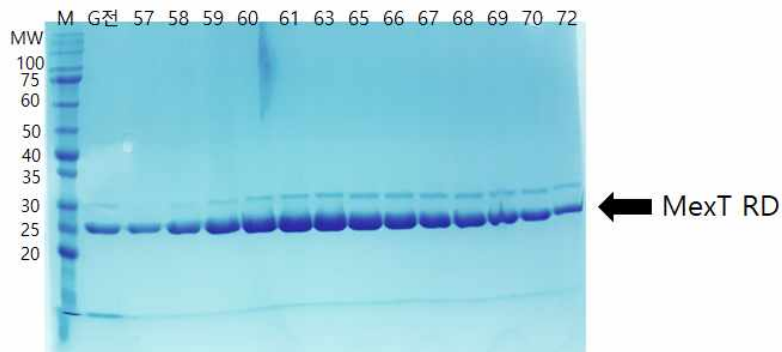


Fig 34. MexT의 SDS-PAGE gel 결과

- 결정화와 X선 회절상 획득 (2.5 Å의 해상도)

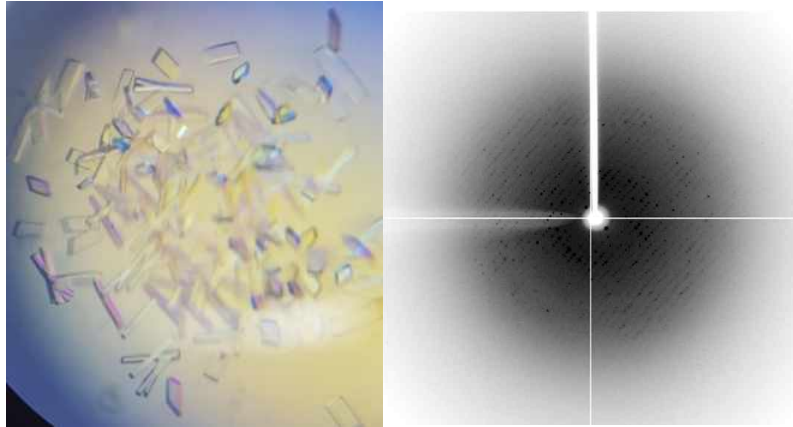


Fig 35. MexT 단백질 결정과 회절상

- 현재 phasing을 위해서 Se-Met으로 치환한 결정을 제조함.

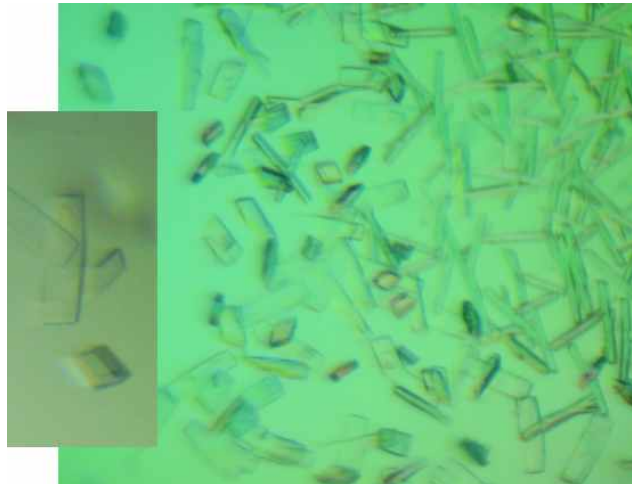


Fig 36. MexT Se-Met의 단백질 결정

④ 2차년도 요약

㉓ HlyU marker 독성 유전자-*lux* Reporter strain 구축

- 독성인자 조절자 제어 선도물질 유도체들의 효능을 조사하기 위해, 후속 1차년도 연구를 통해 발굴한 HlyU marker 독성 유전자 *rtxA*의 promoter region을 이용하여 Reporter strain을 구축함. *rtxA* promoter region을 promoterless *lux* operon을 가지고 있는 pBBR_*lux* plasmid에 fusion시켜 Reporter plasmid를 제작하고, 이를 *V. vulnificus*에 도입시킴. 이렇게 제작한 Reporter strain의 최적 screening 조건을 설정하기 위해 strain을 배양하면서 시간대별로 growth(A_{600})와 luminescence를 측정하여 RLU를 계산함. 그 결과 Reporter strain을 배양하고 1.5시간 후가 최적의 screening 조건임을 결정함.

㉔ 제어 선도물질 유도체들의 marker 독성 유전자 발현억제 효능 파악

- 앞서 구축한 Reporter strain을 이용해 Lux assay를 수행함으로써 후속 1차년도에서 확보한 제어 선도물질 CM2660의 유도체들의 *rtxA* 발현억제 효능을 파악함. Reporter strain에 10^{-10} ~ 10^{-3} M의 농도로 유도체들을 처리하고, 1.5 시간 배양 후 growth(A_{600})와 luminescence를 측정하여 RLU를 계산함. 이를 바탕으로 각 유도체들의 half maximal effective concentration

(EC₅₀)을 결정함. 실험 결과, CM2660은 30.97 μ M의 EC₅₀ 값을 나타냄. CM2660보다 더 낮은 EC₅₀ 값을 나타내는, 즉 더 뛰어난 효능을 보이는 유도체들이 있었으나, 추가 실험 결과 *V. vulnificus*의 성장을 저해하는 것으로 밝혀져 선발 과정에서 제외함. 최종적으로 *V. vulnificus*의 성장을 저해하지 않으면서 낮은 EC₅₀ 값을 보이는 CM2660을 최적 선도물질로 선발함.

㉔ HlyU의 활성을 억제하는 최적 선도물질 선발 및 최적 선도물질의 HlyU 제어 분자기전 규명
- CM2660의 HlyU 제어 메커니즘을 규명하고자, EMSA를 수행하여 CM2660 유무에 따른 HlyU의 DNA 결합 능력을 조사함. CM2660은 HlyU가 target promoter DNA에 결합하는 것을 방해함으로써 HlyU의 활성을 억제함. 또한 CM2660을 HlyU 단백질에 처리한 후 mass spectrometric analysis를 수행함. Mass 분석 결과 CM2660은 HlyU의 Cys30 잔기와 반응하여 공유 결합을 일으킴. 이를 바탕으로 HlyU의 Cys30 잔기와 Cys30 잔기 근처의 Cys96 잔기를 각각 serine으로 치환시켜 mutational analysis를 수행함. 제작한 mutant HlyU 단백질을 정제하거나 *V. vulnificus* 내에서 발현시켜 cysteine이 serine으로 치환된 경우 CM2660이 어떠한 영향을 미치는지 조사함. 실험 결과, CM2660은 HlyU 단백질의 DNA 결합 능력을 감소시켰으나 mutant HlyU 단백질의 DNA 결합 능력은 덜 감소시켰음. 마찬가지로 CM2660을 *V. vulnificus*에 처리했을 때는 *rtxA* 발현량이 감소하였으나 mutant HlyU가 발현되는 *V. vulnificus*의 *rtxA* 발현량은 CM2660 하에서 감소하지 않았음. 이를 통해 CM2660이 HlyU의 Cys30 잔기와 반응함으로써 HlyU의 활성을 억제하는 것을 밝혀냄.

⑤ 2차년도 상세 내용

㉕ HlyU marker 독성 유전자-*lux* Reporter strain 구축

- 후속 1차년도 연구를 통해, *V. vulnificus*에서 HlyU에 의해 발현이 유도되는 marker 독성 유전자 *rtxA*를 발굴하였다. *rtxA* 유전자는 *rtxHCA* operon으로 존재하며, *rtxHCA* promoter region에 HlyU가 직접 결합한다는 사실이 알려져 있다 (Liu et al. 2007). 따라서 이 *rtxHCA* promoter region을 promoterless *lux* operon을 가지고 있는 pBBR-*lux*에 cloning하여 Reporter plasmid를 제작하고 이를 포함한 Reporter strain을 구축하였다.

1) Reporter strain construction

- A. Marker 독성 유전자 *rtxHCA* operon의 promoter region을 PrtxA-F (5' -GAGCTCGAATCAAATAAAAATGGC-3'), PrtxA-R (5' -ACTAGTTATTTTTTTGATCCTGGCCTAC-3')을 이용하여 PCR로 증폭하였다.
- B. 이를 High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim, Germany)를 사용해 정제한 후, promoterless *luxCDABE*를 포함하는 pBBR-*lux* (Lenz et al. 2004)에 ligation 하였다.
- C. 이렇게 만들어진 reporter plasmid를 pKK1305라 명명하고, *Escherichia coli* S17-1 λ *pir* strain에 transformation 시켰다. 이 donor strain을 *V. vulnificus* MO6-24/O wild type에 conjugation 하였다.
- D. Polymyxin B와 pBBR-*lux*의 selective marker 항생제인 chloramphenicol을 포함한 Luria-Bertani supplemented with 2% (w/v) NaCl (LBS) 배지를 이용하여 pKK1305를 포함한 *V. vulnificus* 만을 선별하였다.

2) Optimization of screening conditions

- A. Reporter plasmid를 포함한 *V. vulnificus* reporter strain을 3 $\mu\text{g/ml}$ 의 chloramphenicol을 포함한 LBS (LBS/Cm3) broth에 접종하고 30°C 에서 O/N 배양하였다.
- B. O/N culture를 fresh한 LBS/Cm3 broth에 1/100 subculture하고, 30°C 에서 A_{600} of 0.2까지 배양하였다.
- C. 200 μl 의 배양액을 따서 96-well black plate에 담고, 이를 30°C 에서 shaking하면서 배양하였다.
- D. 매 시간 microplate reader (Infinite™ M200 microplate reader, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 A_{600} 과 luminescence를 측정하였다.
- E. Luminescence 값을 A_{600} 값으로 나누어 RLU를 계산하였다 (Kim et al. 2018).

96-well black plate에서 Reporter strain을 배양하며 측정한 A_{600} 과 luminescence 값을 이용하여 RLU를 계산하고, 이를 배양 시간에 따라 그래프로 도시하였다. 그 결과, RLU가 점점 증가하다가 감소하는 양상이 나타났다. RLU 값은 배양 1.5시간 후에 최대로 나타났다 (Fig. 37). 따라서 Reporter strain의 RLU 값이 최대인 배양 1.5시간 후에서 screening하여 제어 선도물질 유도체들의 효능을 조사하고자 한다.

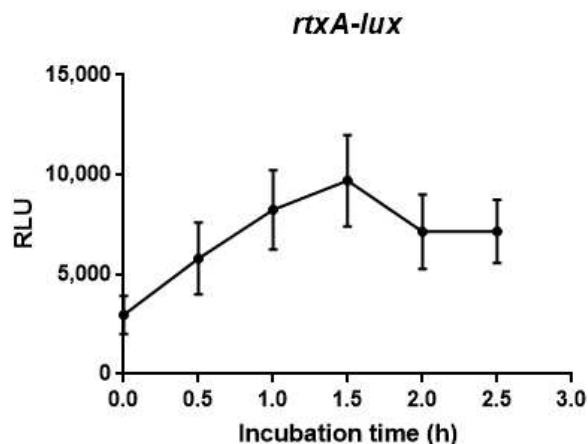


Fig 37. Screening results of *V. vulnificus* reporter strain.

Error bars represent the standard deviation (SD) from biological triplicates.

㉔ 제어 선도물질 유도체들의 marker 독성 유전자 발현억제 효능 파악

- 앞서 구축한 *V. vulnificus* reporter strain과 screening 조건을 이용하여 Lux assay를 수행함으로써 CM2660과 후속 1차년도에서 확보한 제어 선도물질 유도체 14종의 EC_{50} 를 결정하고, *rtxA* 유전자 발현억제 효능을 비교하였다. 제어 선도물질 유도체 14종의 구조는 다음과 같다.

1) Lux assay

A. 앞에서 제작한 pKK1305를 포함하고 있는 *V. vulnificus*를 LBS/Cm broth에 접종하고, 30°C 에

서 O/N 배양하였다.

B. O/N culture를 fresh한 LBS/Cm3 broth에 1/100 subculture하고, 30°C 에서 A_{600} of 0.2까지 배양하였다.

C. 96-well black plate를 준비하고, 제어 선도물질 유도체들을 10배 단위로 희석하여 최종 농도 10^{-10} ~ 10^{-3} M가 되도록 2 μ l씩 분주하였다. 대조군으로는 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 분주하였다.

D. A_{600} of 0.2의 배양액 98 μ l를 96-well black plate에 분주하고, 이를 30°C 에서 shaking하면서 배양하였다.

E. 1.5 시간 후, microplate reader를 이용하여 A_{600} 과 luminescence를 측정하였다.

F. Luminescence 값을 A_{600} 값으로 나누어 RLU를 계산하였다. 이를 농도에 도시하여 그래프를 그리고, GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA)를 이용하여 EC_{50} 를 계산하였다.

제어 선도물질 유도체 14종의 농도에 따른 RLU 값을 결정하고 아래 그래프로 도시하였으며, EC_{50} 를 계산하여 오른쪽 표로 나타내었다 (Fig. 38). EC_{50} 는 half maximal effective concentration을 의미하므로, 낮은 EC_{50} 를 가질수록 효능이 뛰어난 물질이라고 할 수 있다. CM2660의 EC_{50} 는 30.97 μ M로 결정되었으며, LJ4527, LJ4528, LJ4529, LJ4530, LJ4535는 각각 0.17, 0.5, 3.26, 2.29, 7.31 μ M의 EC_{50} 를 가지는 것으로 나타났다. 하지만 이 화합물들은 100 μ M~1 mM의 고농도 조건에서 Reporter strain의 성장을 크게 저해하였다. 따라서 내성을 유발할 가능성이 있으므로 추후 실험에서 제외하였으며, 고농도 조건에서도 Reporter strain의 성장을 저해하지 않으면서 뛰어난 *rtxA* 발현억제 효능을 보이는 CM2660을 최적 선도물질로 선발하였다.

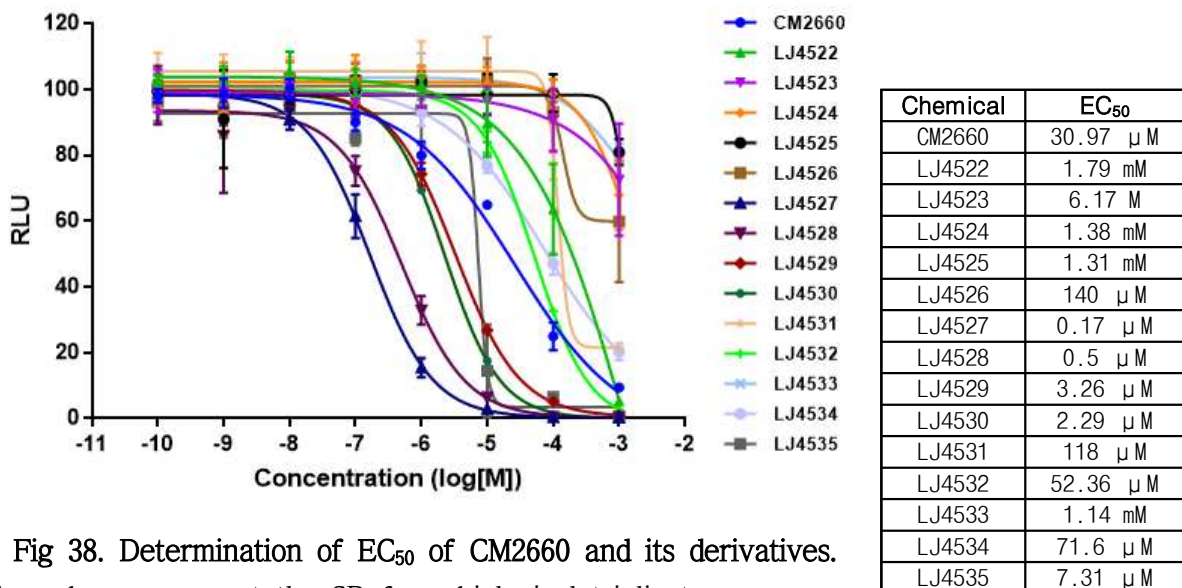


Fig 38. Determination of EC_{50} of CM2660 and its derivatives.

Error bars represent the SD from biological triplicates.

㊦ HlyU의 활성을 억제하는 최적 선도물질 선발 및 최적 선도물질의 HlyU 제어 분자기전 규명 - 앞선 결과를 통해 CM2660 및 그 유도체들의 효능을 파악하고 비교하였다. CM2660은 가장

높은 독성 유전자 발현억제 효능을 보이며, *V. vulnificus*의 성장을 저해하지 않기 때문에 내성을 유발할 가능성이 매우 낮을 것으로 예상된다. 따라서 CM2660을 HlyU의 활성을 억제하는 최적의 선도물질로 선발하였다. 이어서 CM2660이 HlyU의 DNA 결합을 방해함으로써 HlyU의 활성을 억제하는지 확인하기 위해 EMSA를 수행하였다. 또한 CM2660의 HlyU 제어 메커니즘을 분자 수준에서 규명하고자 HlyU 단백질에 CM2660을 처리하고 mass spectrometric analysis를 수행하였다. Mass 분석 결과, CM2660은 HlyU의 Cys30 잔기와 반응하여 공유 결합을 형성하였다. 이를 바탕으로 HlyU의 Cys30 잔기와, CM2660과 반응할 가능성이 있는 Cys30 잔기 주변의 Cys96 잔기를 각각 loss-of-function mutation하고 HlyU의 mutational analysis를 수행하였다. HlyU-C30S 또는 C96S mutant 단백질을 정제하거나, 또는 *V. vulnificus hlyU* mutant에서 발현시켜 CM2660에 의한 mutant HlyU의 활성 제어 여부를 조사하였다.

1) EMSA

- A. *V. vulnificus* MO6-24/O gDNA의 *rtxHCA*의 promoter region에 상보적으로 결합하는 PrtxA-EMSA-F (5' -TCAAATAAAATGGCGGGTGT-3'), PrtxA-EMSA-R (5' -CCTTCAAAAACGCTGCAAT-3' primer 한 쌍을 이용하여 PCR로 증폭시켰다.
- B. 증폭시킨 DNA fragment를 정제하고, pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI)에 cloning하여 template plasmid를 제작하였다.
- C. T4 polynucleotide kinase(NEB)를 이용하여 reverse primer PrtxA-EMSA-R을 [γ -³²P] ATP로 radiolabeling 하였다.
- D. (B)에서 제작한 template plasmid와 labeled PrtxA-EMSA-R primer, unlabeled PrtxA-EMSA-F primer 한 쌍으로 PCR 증폭 후 정제하여 DNA probe를 제작하였다.
- E. 정제한 HlyU protein과 P_{rtxA} DNA probe (5 nM), 비특이적인 binding을 막기 위한 0.1 μ g의 poly(dI-dC), reaction buffer (10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, and 5% glycerol)를 섞은 후 25°C, 30 min incubation하였다.
- F. 이 때 CM2660을 아래 그림에 나타난 대로 첨가하였다. 대조군으로는 DMSO를 최종 10% (v/v)로 첨가하였다.
- G. Incubation 후 loading dye와 함께 6% polyacrylamide gel에서 100V, 1 h 전기영동하였다.
- H. 전기 영동한 gel은 3M paper 위로 옮긴 뒤 vacuum을 걸어 dry 하며, 이를 BAS film에 노출시키고 이후 phosphorimage analyzer (Typhoon FLA7000, GE Healthcare, Little Chalfont, UK)로 확인하였다 (Jang et al. 2016).

실험 결과, CM2660이 없을 때 HlyU는 농도에 비례하여 DNA에 결합하였으나, CM2660이 존재할 때는 DNA에의 결합이 감소하였다 (Fig. 39; DMSO vs. CM2660). HlyU 활성을 저해하지 않는 random molecule이 존재할 때 HlyU의 DNA 결합 능력은 영향을 받지 않았다 (Fig. 39; Control). CM2660이 HlyU의 dissociation constant (K_d)에 영향을 미치는지 알아보기 위해, CM2660의 유무 하에서 HlyU를 농도별로 DNA와 반응시켜 EMSA를 수행하고, 이를 binding curve로 나타내었다 (Lee et al. 2008). Fig. 40에서 보듯, CM2660이 없을 때 HlyU의 K_d 는 25.16 nM로 나타났으나, CM2660이 2.5 μ M 존재할 때 HlyU의 K_d 는 54.83 nM로 나타났다. 이를 통해 CM2660이 DNA와 HlyU의 반응 시 free HlyU와 DNA에 결합한 HlyU 사이 평형에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 실제로, CM2660을 농도별로 처리하였을 때 HlyU와 결합한

DNA의 양이 점점 감소하였다 (Fig. 41). 이러한 실험들을 통해 CM2660은 HlyU이 DNA에 결합하는 것을 방해함으로써 HlyU의 활성을 억제함을 밝혔다.

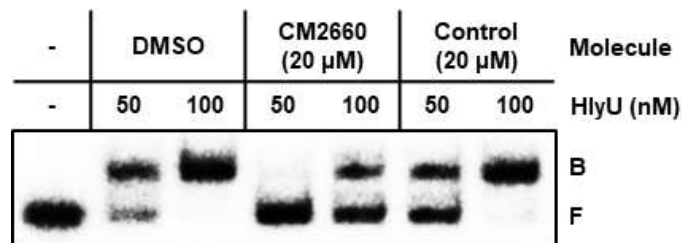


Fig 39. EMSA of the HlyU and the *rtxA* regulatory DNA complexes.

HlyU protein (50 or 100 nM) was added to the radioactively-labeled P_{rtxA} DNA along with either DMSO, CM2660 (20 μ M), or a random chemical (20 μ M, control), and the complexes were separated as described above. B, bound DNA; F, free DNA.

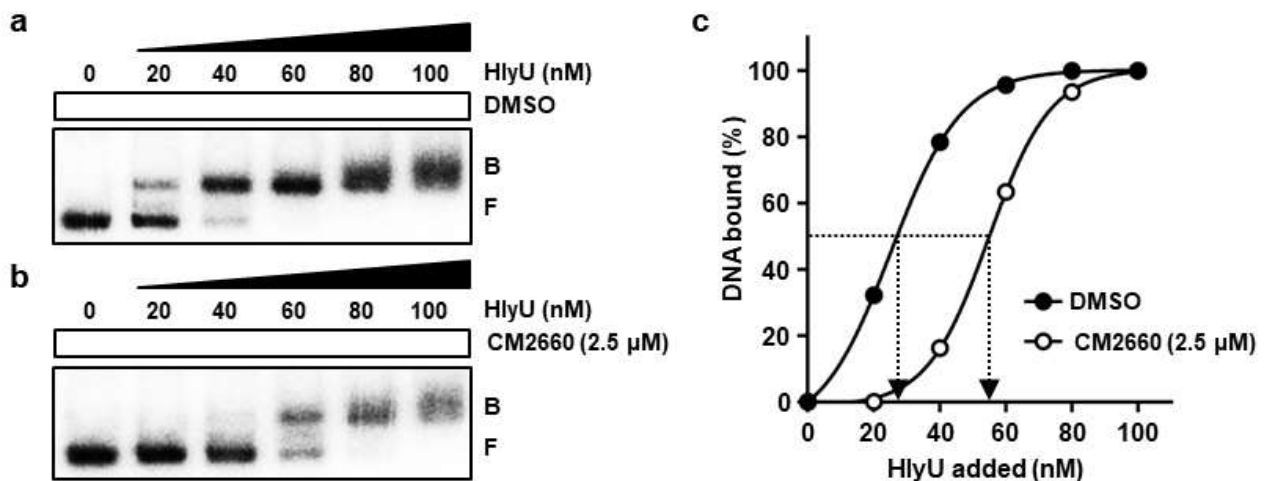


Fig 40. Effect of CM2660 on the dissociation constant (K_d) for HlyU. (a and b)

The labeled probe DNA was mixed with increasing amounts of HlyU as indicated, and then the complexes were separated as described above. B, bound DNA; F, free DNA. (c) The relative affinities of HlyU in the presence or absence of CM2660 were compared using the data from (a) and (b). The concentration of bound DNA was calculated and plotted against the concentration of HlyU added. Each arrow points to the position of half-maximal binding corresponding to the K_d .

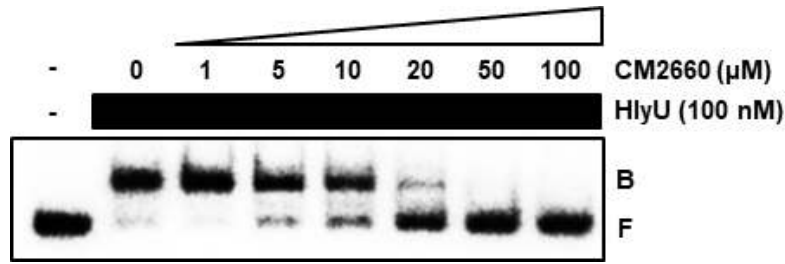


Fig 41. EMSA of the HlyU and the *rtxA* regulatory DNA complexes with increasing concentrations of CM2660.

HlyU protein (100 nM) was added to the labeled probe DNA along with increasing concentrations of CM2660 as indicated, and then the complexes were separated as described above. B, bound DNA; F, free DNA.

2) Site-directed mutagenesis

A. *hlyU* ORF를 포함하는 complementation vector pZW1510 (Jang et al. 2017) 또는 protein expression vector pZW1610 (Lee et al. 2019)를 template로 준비하였다.

B. Cys30, Cys96 잔기를 encoding하는 TGC를 serine을 encoding하는 TCC로 치환하기 위해, HlyUC30S-F (5' -GACGCCTGCAAATCTTATCCATGCTACACAATCAAGAG-3'), HlyUC30S-R (5' -CTCTTGATTGTGTAGCATGGATAAGATTTGCAGGCGTC-3') primer 한 쌍과, HlyUC96S-F (5' -GCACAGTCTTTATTCGGAAGAATAATGCTTTTGCCTGCC-3'), HlyUC96S-R (5' -GGCACGCAAAGCATTATTCTTCGGAATAAAGACTGTGC-3') primer 한 쌍을 준비하였다.

C. QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Loveland, CO)를 이용하여 site-directed mutagenesis를 수행하였다 (Bang et al. 2016).

D. 먼저, DNA template와 primer 한 쌍, reaction buffer, dNTP를 섞어 protocol대로 PCR 증폭하였다.

E. DpnI을 37°C, 1 h 동안 처리하여 methylated, non-mutated parental DNA template를 digestion하였다.

F. Resulting mixture를 *E. coli* XL-1 blue strain에 transformation하고, 100 μg/ml의 ampicillin (Ap)이 첨가된 LB 배지 (LB/Ap)에 spreading하여 37°C 에서 배양하였다.

G. DNA sequencing을 통해 mutation이 성공적으로 일어났는지 확인하였다. Cys30 잔기가 serine으로 치환된 complementation vector를 pZW1511, Cys96 잔기가 serine으로 치환된 complementation vector를 pZW1512라 명명하였다. 마찬가지로, Cys30 잔기가 serine으로 치환된 protein expression vector를 pZW1611, Cys96 잔기가 serine으로 치환된 protein expression vector를 pZW1612라 명명하였다.

3) Purification of mutant HlyU protein

A. 위에서 제작한 pZW1610, pZW1611, pZW1612를 각각 *E. coli* BL21 (DE3)에 transformation 시켰다.

B. 이 strain들을 LB/Ap, 37°C 에서 배양하고, A_{600} of 0.5에서 isopropyl β

-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 최종 농도 1 mM이 되도록 첨가하여 induction 시켰다. C. Ni-NTA affinity column (Qiagen, Valencia, CA)을 이용하여 HlyU 단백질을 정제하였고, 정제된 단백질은 -80°C에 보관하며 추후 실험에서 사용하였다.

4) Mass spectrometric analysis

- 정제된 HlyU 단백질들을 desalting buffer (20 mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl)로 desalting하여 준비하였다.
- 여기에 CM2660을 10배의 molar ratio가 되도록 처리하고, 4°C에서 30분 incubation 하였다.
- 이를 non-reducing SDS-PAGE로 분리한 뒤, mass spectrometric analysis를 수행하였다.

아래 Fig. 42과 같이, HlyU을 억제하는 CM2660과 결합 방식을 Mass 분석을 통해 분석하여, Cys30에 CM2660이 공유결합을 함을 밝혔다. Mass 분석 결과 Cys30 잔기에만 130 Da의 분자량을 가진 조각이 특이적으로 공유결합으로 결합함을 보여주었다. 이는 X선 회절학을 통해서 규명된 고해상도 결정구조에서 보여준 Cys30 부근의 전자밀도와도 일치하는 결과이다. HlyU-C30S mutant와 HlyU-C96S mutant에 대한 질량분석결과에서는 CM2660 처리 시 이러한 변화를 볼 수 없었다. 이는 Cys30이 CM2660과 결합하는 잔기임을 입증하는 결과이다. 또한, CM2660을 처리하였을 때 HlyU의 구조가 변화하였고, Cys30과 Cys96 사이 거리가 감소하였다 (Fig. 43). 이러한 구조 변화에 의해 HlyU의 DNA 결합 능력이 감소한 것으로 생각된다 (Figs. 39, 40, 41). 위 결과들을 토대로 CM2660의 HlyU 억제 메커니즘을 제시하였다 (Fig. 44).

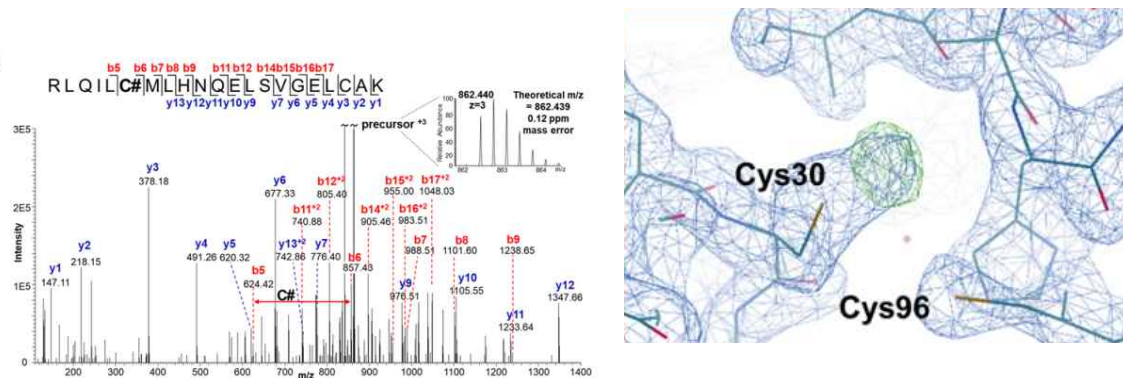


Fig 42. Ms/Ms spectrum of Cys30-modified peptide from the CM2660-treated HlyU protein and electron density map around Cys30 of the CM2660-treated HlyU structure.

C# indicates the mass shift of C₉H₆O (#=+130.042 Da) by the cysteine modification. Both N- and C-terminal fragment ion series are represented as b and y series, respectively (e.g. b5, b6, b7... and y1, y2, y3...), and the annotated fragment ions are marked in the inserted peptide sequence. The observed precursor ion (monoisotopic m/z 862.440) in the inserted high resolution MS spectrum matched exactly with a theoretical m/z (862.439).

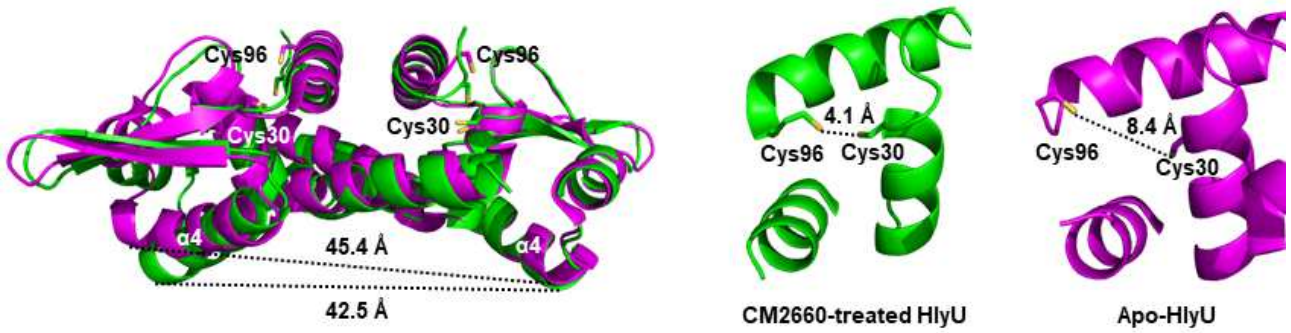


Fig 43. Structural comparison of the CM2660-treated HlyU (green) and the apo-HlyU (magenta).

The distance between the DNA-binding helices ($\alpha 4$) are indicated. Close-up views around Cys30 and Cys96 of the CM2660-treated HlyU and the apo-HlyU. The distances between sulfur atoms of the two cysteine residues are indicated.

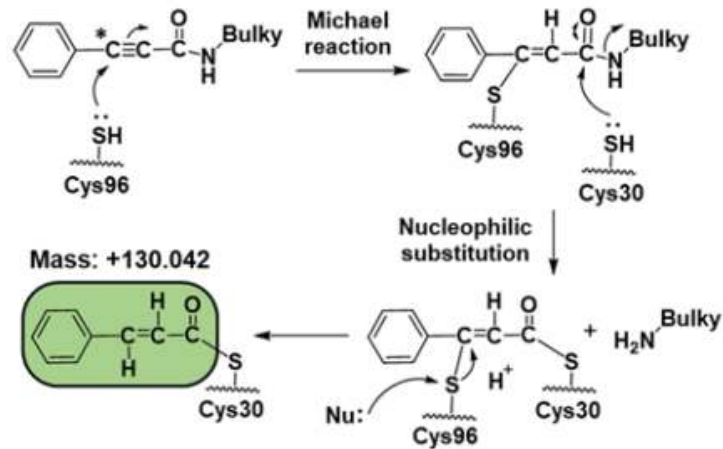


Fig 44. Electron density map과 mass data를 토대로 제시한 CM2660의 HlyU 억제 작동 메커니즘

위 결과를 검증하기 위해, HlyU의 Cys30, Cys96 잔기가 serine으로 치환된 mutant protein을 이용하여 EMSA를 수행하였다. 실험 결과, wild-type HlyU, HlyU-C30S, HlyU-C96S는 P_{rtxA} DNA에 모두 결합하여 HlyU-DNA complex를 형성하였다 (Fig. 45; in the absence of CM2660). 그러나 10 μ M의 CM2660이 존재할 때, wild-type HlyU의 경우에는 CM2660에 의해 HlyU의 DNA 결합 능력이 감소하여 HlyU-DNA complex의 형성이 저해된 반면, HlyU-C30S나 HlyU-C96S의 경우에는 CM2660에 의해 DNA 결합 능력이 덜 감소하여 더 많은 complex가 형성된 것을 볼 수 있었다 (Fig. 45; in the presence of CM2660). 따라서 HlyU의 Cys30, Cys96 잔기가 CM2660의 HlyU 활성 억제에 관여하는 것으로 판단된다.

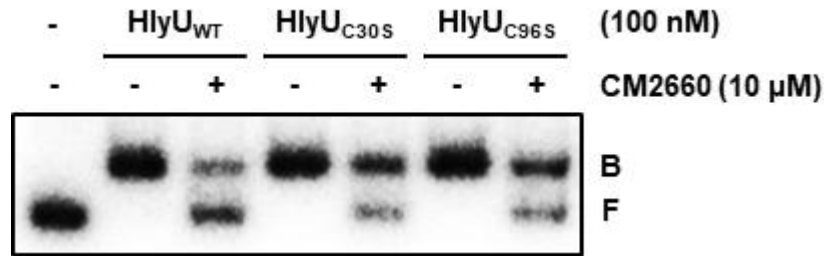


Fig 45. EMSA of the wild-type (WT), C30S mutant, or C96S HlyU proteins and the radioactively-labeled P_{rtxA} DNA complexes.

The HlyU proteins (100 nM) were added to the probe DNA along with either DMSO or CM2660 (10 μ M) as indicated, and then the complexes were separated as described above. B, bound DNA; F, free DNA.

5) qRT-PCR analyses

- A. 앞서 제작한 pZW1510, pZW1511, pZW1512를 *V. vulnificus* hlyU mutant에 각각 conjugation 시켜 wild-type HlyU, Cys30 잔기가 serine으로 치환된 HlyU (HlyU-C30S), Cys96 잔기가 serine으로 치환된 HlyU (HlyU-C96S)를 발현하는 strain들을 제작하였다.
- B. 이를 LBS/Cm3 broth에 seeding하고 30°C 에서 O/N 배양하였다.
- C. O/N culture를 fresh LBS/Cm3 배지에 1/100 subculture하고, 30°C 에서 배양하였다.
- D. A_{600} of 0.2에서 CM2660을 최종 농도 20 μ M로 첨가하고 A_{600} of 0.5까지 추가 배양하였다. 대조군으로는 DMSO를 최종 2% (v/v)로 첨가하였다.
- E. A_{600} of 0.5의 배양액 500 μ l에 RNaprotect Bacteria Reagent (Qiagen) 1 ml을 처리하고 vortexing 한 후 5 min incubation 하였다.
- F. 5,000 \times g, 10 min centrifugation한 후, pellet만 -20°C 에 보관하였다.
- G. RNeasy Mini Kit (Qiagen)를 이용하여 total RNA를 분리하고, Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)로 농도를 측정하였다.
- H. 1 μ g의 RNA를 iScriptTM cDNA synthesis kit (Bio-rad, Hercules, CA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.
- I. Chromo 4 real-time PCR detection system (Bio-Rad)와 *rtxA* qRT-PCR primer 한 쌍을 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 16S rRNA 발현량을 internal reference로 사용하여 normalization 하였다 (Jo et al. 2017).

qRT-PCR 결과, wild-type HlyU가 발현되는 *V. vulnificus*에 CM2660을 처리하였을 때에는 *rtxA* 발현량이 매우 감소하였다 (Fig. 46; HlyU_{WT}). HlyU-C30S 또는 HlyU-C96S가 발현되는 *V. vulnificus*는 CM2660이 존재함에도 불구하고 대조군과 비슷한 수준의 *rtxA* 발현량을 보였다 (Fig. 46; HlyU_{C30S} and HlyU_{C96S}). 이는 앞서 Fig. 45에서 나타난 결과와 일치하며, CM2660이 *in vitro*, *in vivo* 모두에서 HlyU의 Cys30, Cys96 잔기와 반응함으로써 HlyU의 DNA 결합 능력을 감소시키고 *rtxA* 발현을 억제함을 의미한다.

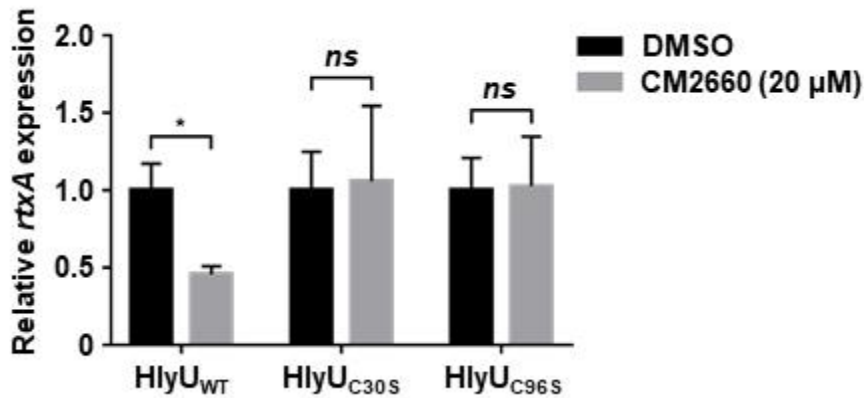


Fig 46. Expression of *rtxA* in the *hlyU* mutants expressing wild-type or mutants HlyU grown in the absence or presence of CM2660.

The *rtxA* transcript levels in the total RNA of the cells were quantified by qRT-PCR and expressed using the transcript level of each group in the presence of DMSO as 1. Error bars represent the SD from biological triplicates. Statistical significance was determined by the Student's *t*-test (*, $p < 0.05$; *ns*, not significant).

일련의 실험을 수행하여 CM2660의 mutant HlyU 제어 활성을 *in vitro*, *in vivo*에서 파악하였다. CM2660은 HlyU의 DNA-binding activity를 저해함으로써 기능하였고, HlyU의 Cys30 잔기와 공유 결합하여 HlyU의 활성을 저해하였다. HlyU의 Cys30 잔기를 serine으로 mutation시킨 mutant HlyU (HlyU-C30S)는 CM2660이 존재하더라도 DNA에 binding하였다. 이로 인해 CM2660이 존재하더라도 HlyU-C30S를 발현시키는 *V. vulnificus* strain에서는 *rtxA* 발현이 감소하지 않았다. 따라서 CM2660의 HlyU 활성 억제에 있어 CM2660과 Cys30 잔기 사이의 공유 결합이 필요함을 알 수 있었다.

또한, CM2660이 Cys30의 thiol group과 반응하여 공유 결합을 형성한다는 결과를 토대로, CM2660이 Cys30 근처에 존재하는 Cys96의 thiol group과 반응할 수 있는지 HlyU-C96S를 이용하여 알아보았다. Fig. 45와 Fig. 46에서 나타난 것과 같이, HlyU-C96S는 CM2660이 존재하더라도 DNA에 binding이 가능하였고, *V. vulnificus*의 *rtxA* 발현을 wild-type HlyU가 존재할 때와 비슷한 수준으로 유도하였다. 그러나 Fig. 42의 mass spectrometry 결과에서 Cys96 잔기는 변형되지 않은 것으로 나타났다. 이러한 사실을 종합해 볼 때, Cys96은 CM2660과의 반응을 통해 CM2660이 일으키는 HlyU의 공유 결합 반응에 관여하지만, 결과적으로는 Cys30만이 CM2660과 공유 결합을 이룬다고 판단된다 (Fig. 44).

위 실험들을 통해 CM2660이 HlyU의 Cys30 잔기에 공유 결합함으로써 HlyU의 DNA 결합 능력을 감소시키는 제어 메커니즘으로 *rtxA*와 같은 독성 유전자의 발현을 감소시킴으로써 *V. vulnificus*의 독성 발현을 제어함을 알 수 있었다. CM2660처럼 target 단백질의 cysteine 잔기와 공유 결합하는 제어물질은 cysteine 잔기의 희소성과 높은 반응성으로 인해 특이적인 제어물질

이 될 수 있다는 장점을 지닌다 (Lagoutte R et al. 2017). 후속 3차년도에서는 선발된 제어 선도물질 CM2660이 다른 병원성 비브리오 종에 대해 독성 억제 효능을 가지는지 알아볼 예정이다. 또한 동물 모델을 사용하여 CM2660의 안전성을 평가할 것이다. 모델식품을 이용하여 패혈증 비브리오균의 독성을 평가하고, 제어 선도물질의 효능을 평가함으로써 식품안전 후보물질로 개발할 계획이다.

⑥ 3차년도 요약

㉓ 선발된 제어 선도물질 CM2660의 적용 범위 확대

- 제어 선도물질 CM2660의 패혈증 비브리오균 이외에 여러 병원성 비브리오균에 대한 독성 억제 효능을 확인하였음. CM2660을 처리했을 경우 대조군(DMSO)과 비교하여 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*), 비브리오 알기놀리티쿠스(*Vibrio alginolyticus*), 비브리오 콜레라균(*Vibrio cholerae*)의 독성 유전자 발현이 감소하는 것을 확인함. CM2660은 또한 *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*에 감염된 INT-407 human epithelial cell의 cytotoxicity를 농도 의존적으로 저해하였고, *V. cholerae*의 hemolytic activity를 감소시킴. CM2660은 모든 병원성 비브리오 종의 growth를 저해하지 않으며, 따라서 내성을 유발할 가능성이 낮음을 확인함.

㉔ 제어 선도물질 CM2660의 안전성 평가

- 제어 선도물질 CM2660의 안전성을 평가하기 위해, human cell line과 mouse model을 이용하여 실험을 수행함. CM2660은 1~500 μ M 농도 조건에서 INT-407 human epithelial cells에 대한 세포 독성을 나타내지 않았으며, mouse model 실험 시 생체 내에서 독성을 나타내지 않음.

㉕ 모델식품을 이용한 패혈증 비브리오균의 독성 평가

- 식품 내 존재하는 패혈증 비브리오균의 독성을 평가하기 위해, pilot scale 모델식품으로 굴을 선정함. qRT-PCR을 통해 조사한 결과, 굴 접촉 시 패혈증 비브리오균의 독성 유전자 *rtxA*의 발현이 유도됨을 확인함.

㉖ 모델식품을 이용한 제어 선도물질의 효능 평가

- CM2660이 굴 접촉 시 유도되는 *rtxA* 발현을 억제하는지 조사함. qRT-PCR 결과, 대조군에 비교하여 CM2660은 패혈증 비브리오균의 *rtxA* 발현을 유의미하게 감소시킴을 확인함.

㉗ 패혈증 비브리오의 독소 활성 억제에 관여하는 천연물 스크리닝

- Hemolytic assay를 이용하여 20 여종의 천연물 중 균의 생장은 저해하지 않고, 독소 활성에만 영향을 미치는 천연 물질인 우르솔산을 발굴함.

㉘ 우르솔산의 제형 개선

- DMSO가 아닌 식품에 처리 가능한 용매 중 에탄올에 우르솔산을 용해하여 DMSO와 유사한 효과를 나타내는지 확인함. 100 μ M 우르솔산이 패혈증 비브리오의 독성활성에 영향을 미침을 확인함.

㉙ 천연물을 이용한 패혈증 비브리오균의 독소 발현 인자 HlyU의 억제제 CM2660의 제형 개선

- 천연물인 우르솔산 CM2660을 병용 처리하여 DMSO가 아닌 에탄올에 CM2660을 용해하여 DMSO와 유사한 효과를 나타냄. 100 μ M 우르솔산을 병용 처리 시 CM2660의 농도를 10 μ M까지 낮게 사용할 수 있음을 확인함.

⑦ 3차년도 상세 내용

㉞ 선발된 제어 선도물질 CM2660의 적용 범위 확대

- 후속 1, 2차년도 연구를 통해 최종적으로 선발한 제어 선도물질 CM2660이 패혈증 비브리오균 이외에 여러 병원성 비브리오균의 독성을 억제하는지 조사하였다. 식중독을 일으키는 다른 병원성 비브리오 종으로는 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*), 비브리오 알기놀리티쿠스(*Vibrio alginolyticus*), 비브리오 콜레라균(*Vibrio cholerae*) 등이 있다. 먼저 전 세계적으로 해산물에 의한 위염, 설사, 구토 및 발열을 일으키는 원인균인 장염 비브리오균에 대한 CM2660의 독성 억제 효능을 조사하였다.

1) qRT-PCR analyses

A. *V. parahaemolyticus*를 1% fetal bovine serum (FBS)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 37°C에서 O/N 배양하였다.

B. O/N culture를 동일한 fresh broth에 1/100 subculture하고, 37°C에서 배양하였다.

C. A_{600} of 0.2에서 CM2660을 최종 농도 20 μ M로 첨가하고 3시간 동안 추가 배양하였다. 대조군으로는 DMSO를 최종 2% (v/v)로 첨가하였다.

D. A_{600} of 0.5의 배양액 500 μ l에 RNeasy Protect Bacteria Reagent (Qiagen) 1 ml을 처리하고 vortexing 한 후 5 min incubation 하였다.

E. 5,000 \times g, 10 min centrifugation한 후, pellet만 -20°C에 보관하였다.

F. RNeasy Mini Kit (Qiagen)를 이용하여 total RNA를 분리하고, Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)로 농도를 측정하였다.

G. 1 μ g의 RNA를 iScript™ cDNA synthesis kit (Bio-rad, Hercules, CA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

H. Chromo 4 real-time PCR detection system (Bio-Rad)와 *rtxA* qRT-PCR primer 한 쌍을 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 16S rRNA 발현량을 internal reference로 사용하여 normalization 하였다 (Lee et al. 2019).

qRT-PCR 결과, *V. parahaemolyticus*의 세포 독성을 유발하는 Type III secretion system-1 (T3SS-1)의 여러 유전자 발현이 CM2660에 의해 동시에 감소하였다 (Fig. 47). *V. parahaemolyticus*의 HlyU는 T3SS-1 관련 유전자 발현에 필수적인 *exsA* 유전자의 발현을 유도하기 때문에 (Getz et al. 2019), CM2660이 *V. parahaemolyticus* HlyU를 억제하여 *exsA* 및 T3SS-1 관련 유전자들의 발현을 감소시킨 것으로 볼 수 있다.

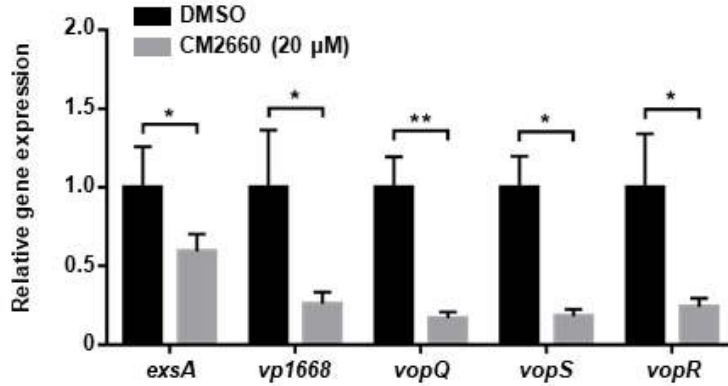


Fig 47. Expression of T3SS-1 associated genes in *V. parahaemolyticus* grown in the absence or presence of CM2660.

V. parahaemolyticus was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 1% fetal bovine serum (FBS) for 3 h along with CM2660 (20 μ M) or DMSO (control). The transcript levels of *exsA*, *vp1668*, *vopQ*, *vopS*, and *vopR* in the total RNA of the cells were quantified by qRT-PCR and expressed using each transcript level in the presence of DMSO as 1. Error bars represent the SD from biological triplicates. Statistical significance was determined by the Student's *t*-test (**, $p < 0.005$; *, $p < 0.05$; *ns*, not significant).

CM2660의 T3SS-1 관련 유전자 발현의 감소가 *V. parahamolyticus*의 세포 독성 감소로 이어지는지 확인하고자, LDH release assay를 수행하였다.

2) LDH release assay

A. Cytotoxicity test를 위해 INT-407 human epithelial cell line을 배양하였다.

B. 실험 전날, 항생제가 포함된 growth media에 host cell을 일정한 수로 희석하여 96 well plate에 깔고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 또한 *V. parahaemolyticus*를 LBS에 접종하고 37°C에서 overnight으로 배양하였다.

C. 실험 당일, 배양한 overnight culture를 새 배지에 1/100 subculture하고 37°C에서 A_{600} of 0.5까지 배양하였다. 그 사이 host cell plate의 growth media를 버리고 assay media를 100 μ l씩 분주하였다.

D. 배양한 *V. parahaemolyticus*와 다양한 농도의 CM2660을 각 well에 infection시켰다. 대조군으로는 DMSO를 최종 2% (v/v)로 첨가하였다.

E. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 96 well plate를 1000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액 100 μ l를 회수하여 새 96 well plate에 옮겨 담았다. 이후 LDH release kit (Takara)의

assay solution을 100 μ l씩 넣고 30분간 상온에서 빛에 노출시키지 않고 반응시켰다.

F. Tecan으로 590 nm에서의 absorbance를 측정하였다.

G. 측정된 A590 값을 이용하여 다음과 같이 cytotoxicity를 계산하였다.

Cytotoxicity (%) = (experimental value - negative control) / (positive control - negative control)

실험 결과, 첨가한 CM2660의 농도에 비례하여 INT-407 human epithelial cells에 대한 *V. parahaemolyticus*의 세포 독성이 감소하였다 (Fig. 48). 이를 통해 CM2660이 *V. parahaemolyticus*의 T3SS-1 유전자 발현 및 세포 독성을 효과적으로 억제함을 확인하였다.

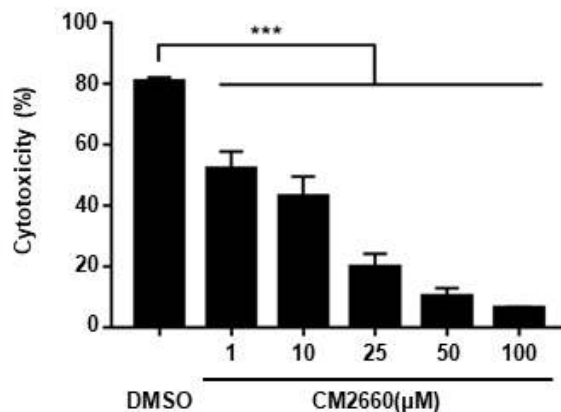


Fig 48. CM2660 reduces the cytotoxicity of *V. parahaemolyticus* towards INT-407 human epithelial cells.

V. parahaemolyticus at an MOI of 10 treated with various concentrations of CM2660 or DMSO (final concentration of 1%) was infected with INT-407 human epithelial cells and incubated at 37°C for 2 h. The cytotoxicity was measured by LDH release assay and expressed using the total LDH activity of the cells completely lysed by 5% (v/v) Triton X-100 as 100%. Error bars represent the SD. Statistical significance was determined by one-way ANOVA (***, $p < 0.0005$).

다음으로, 사람에게 이염 및 상처 감염을 일으키는 *V. alginolyticus*에 대한 CM2660의 독성 억제 효능을 조사하였다. *V. alginolyticus* 또한 T3SS를 가지고 있으며 세포 독성을 유발하기 때문에, *V. parahaemolyticus*와 같은 방법으로 T3SS 유전자 발현과 세포 독성을 측정하였다. qRT-PCR 및 LDH release assay 결과, *V. alginolyticus*의 T3SS 관련 유전자 발현 및 INT-407

human epithelial cells에 대한 세포 독성이 CM2660에 의해 유의미하게 감소하였다 (Figs. 49 and 50). 이를 통해 CM2660이 *V. alginolyticus*의 T3SS 유전자 발현 및 세포 독성 또한 효과적으로 억제함을 확인하였다.

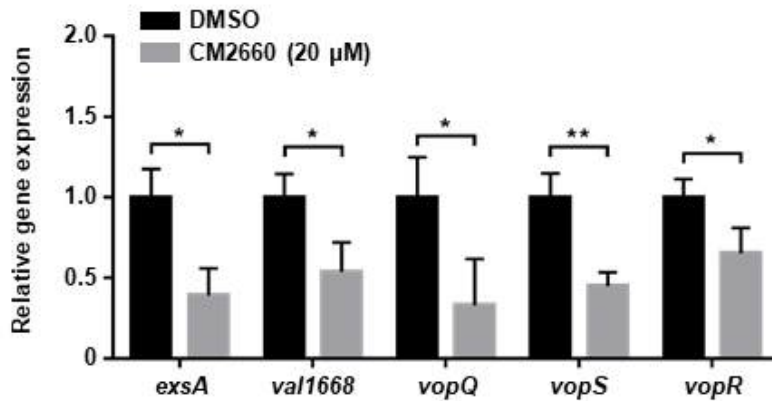


Fig 49. Expression of T3SS associated genes in *V. alginolyticus* grown in the absence or presence of CM2660.

V. alginolyticus was grown in tryptic soy broth supplemented with 1% (w/v) NaCl to A_{600} of 0.5 along with CM2660 (20 μ M) or 2% DMSO (control). The transcript levels of each gene in the total RNA of the cells were quantified by qRT-PCR and expressed using each transcript level in the presence of DMSO as 1. Error bars represent the SD from biological triplicates. Statistical significance was determined by the Student's *t*-test (**, $p < 0.005$; *, $p < 0.05$; *ns*, not significant).

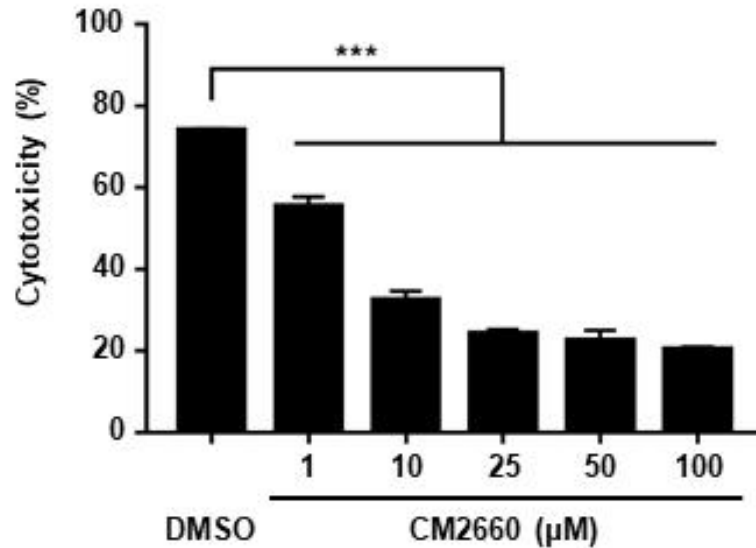


Fig 50. CM2660 reduces the cytotoxicity of *V. alginolyticus* towards INT-407 human epithelial cells.

V. alginolyticus at an MOI of 10 treated with various concentrations of CM2660 or DMSO (final concentration of 1%) was infected with INT-407 human epithelial cells and incubated at 37°C for 4 h. The cytotoxicity was measured by LDH release assay and expressed using the total LDH activity of the cells completely lysed by 5% (v/v) Triton X-100 as 100%. Error bars represent the SD. Statistical significance was determined by one-way ANOVA (***, $p < 0.0005$).

이어서, 콜레라의 원인균이며 대량의 물 설사를 유발하는 *V. cholerae*에 대한 CM2660의 독성 억제 효능을 조사하였다. 먼저 *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*와 마찬가지로 qRT-PCR analyses를 수행하여 *V. cholerae*의 독성 유전자 발현 여부를 알아보았다. qRT-PCR 결과, *V. cholerae*에서 HlyU에 의해 활성화되는 hemolysin 유전자 *hlyA* 발현이 CM2660에 의해 유의미하게 감소하였다 (Mukherjee et al. 2015) (Fig. 51). 또한, *hlyA*와 divergent 하게 전사되는 hemolysin 유전자인 *tlh* 발현도 CM2660 처리 시 유의미하게 감소하였다 (Fig. 51). 이를 통해, CM2660이 *V. cholerae* HlyU를 억제하여 hemolysin 유전자 *hlyA*와 *tlh*의 발현을 감소시킴을 확인하였다.

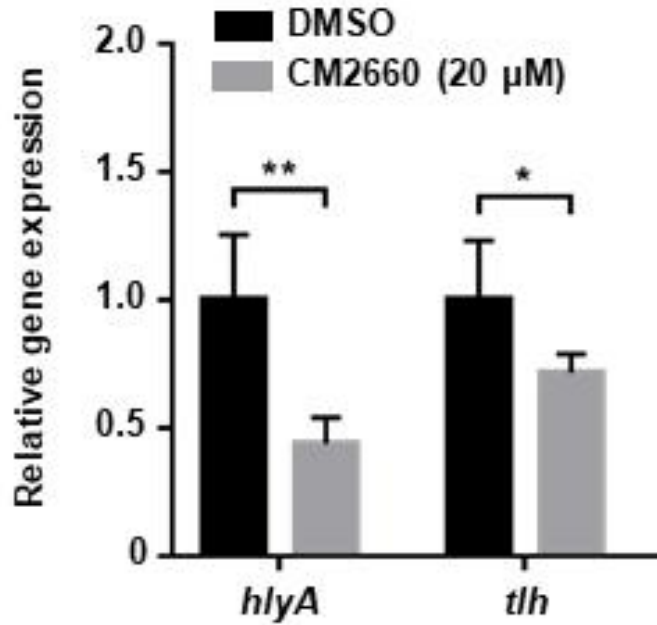


Fig 51. Expression of T3SS associated genes in *V. alginolyticus* grown in the absence or presence of CM2660.

V. cholerae was grown in Luria-Bertani broth to A_{600} of 0.5 along with CM2660 (20 μ M) or 2% DMSO (control). The transcript levels of *hlyA* and *tlh* in the total RNA of the cells were quantified by qRT-PCR and expressed using each transcript level in the presence of DMSO as 1. Error bars represent the SD from biological triplicates. Statistical significance was determined by the Student's *t*-test (**, $p < 0.005$; *, $p < 0.05$; *ns*, not significant).

이러한 hemolysin 유전자 발현 감소가 *V. cholerae*의 용혈 활성 감소로 이어지는지 확인하고자, hemolysis assay를 수행하였다.

3) Hemolysis assay

- V. cholerae*를 LB broth, 37°C 에서 O/N 배양하였다.
- O/N culture를 동일한 fresh broth에 1/100 subculture하고, 37°C 에서 배양하였다.
- A_{600} of 0.2에서 CM2660을 최종 농도 20 μ M로 첨가하고 A_{600} of 0.5까지 추가 배양하였다. 대조군으로는 DMSO를 최종 2% (v/v)로 첨가하였다.
- A_{600} of 0.5의 배양액을 4°C 에서 5,000 $\times g$, 10 min centrifugation 하여 cell pellet과 supernatant로 분리하였다.
- Supernatant를 Puradisc™ 25 mm syringe filter (pore size 0.2 μ m; GE healthcare)를 이용하

여 filtration 하고, Amicon Ultra-15 (cut-off 10 kDa; Millipore, Temecula, CA)를 이용하여 농축하였다.

F. 농축한 supernatant 10 μ l를 7% horse blood agar에 떨어뜨리고, 37°C에서 배양하였다.

실험 결과, CM2660 없이 배양된 *V. cholerae*의 supernatant는 blood agar에 hemolysis를 일으켰지만, CM2660과 함께 배양된 경우에는 매우 낮은 hemolysis를 일으켰다 (Fig. 52). 이를 통해, CM2660이 *V. cholerae*의 hemolytic activity를 저해함을 알 수 있었다.



Fig 52. Hemolytic activities of the culture supernatants of *V. cholerae* grown in the absence or presence of CM2660.

V. cholerae grown in Luria-Bertani broth to A_{600} of 0.5 along with CM2660 (20 μ M) or 2% DMSO (control) were harvested and fractionated into cells and supernatants. Ten microliters of the concentrated supernatants were spotted onto 7% horse blood agar plate. Three different culture supernatants were spotted and monitored after incubation at 37°C for 24 h.

CM2660이 *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, 및 *V. cholerae*의 성장을 저해한다면, 내성을 유발할 가능성이 있다. 따라서 CM2660이 이들 병원성 비브리오 종의 성장에 미치는 영향을 조사하였다.

4) Growth kinetics

A. *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*를 각각 LBS, tryptic soy broth supplemented with 1% (w/v) NaCl, LB broth에 접종하고 37°C에서 overnight으로 배양하였다.

B. 배양한 overnight culture를 각각 새 배지에 1/100 subculture하고 37°C에서 A_{600} of 0.2까지 배양하였다.

C. 화합물을 2% (v/v), 최종 농도 0~1000 μ M이 되도록 희석하여 준비하였다.

D. A_{600} of 0.2의 culture를 24 well plate (SPL)에 490 μ l씩 분주하고, 화합물을 10 μ l씩 처리하였다. Control 그룹에는 DMSO를 10 μ l 처리하였으며, 바깥쪽 well에는 3차 증류수를 채워 증발을 방지하였다.

E. 30°C 에서 배양하면서 Tecan으로 매 시간 A_{600} 을 측정하였다.

F. 시간에 따른 A_{600} 을 그래프로 나타내었다.

실험 결과, CM2660은 모든 병원성 비브리오 종의 growth를 저해하지 않았다 (Fig. 53). 따라서 CM2660은 내성을 유발할 가능성이 낮으며, 기존의 항생제와 달리 새로운 개념의 식품안전 후보물질로 개발될 수 있다.

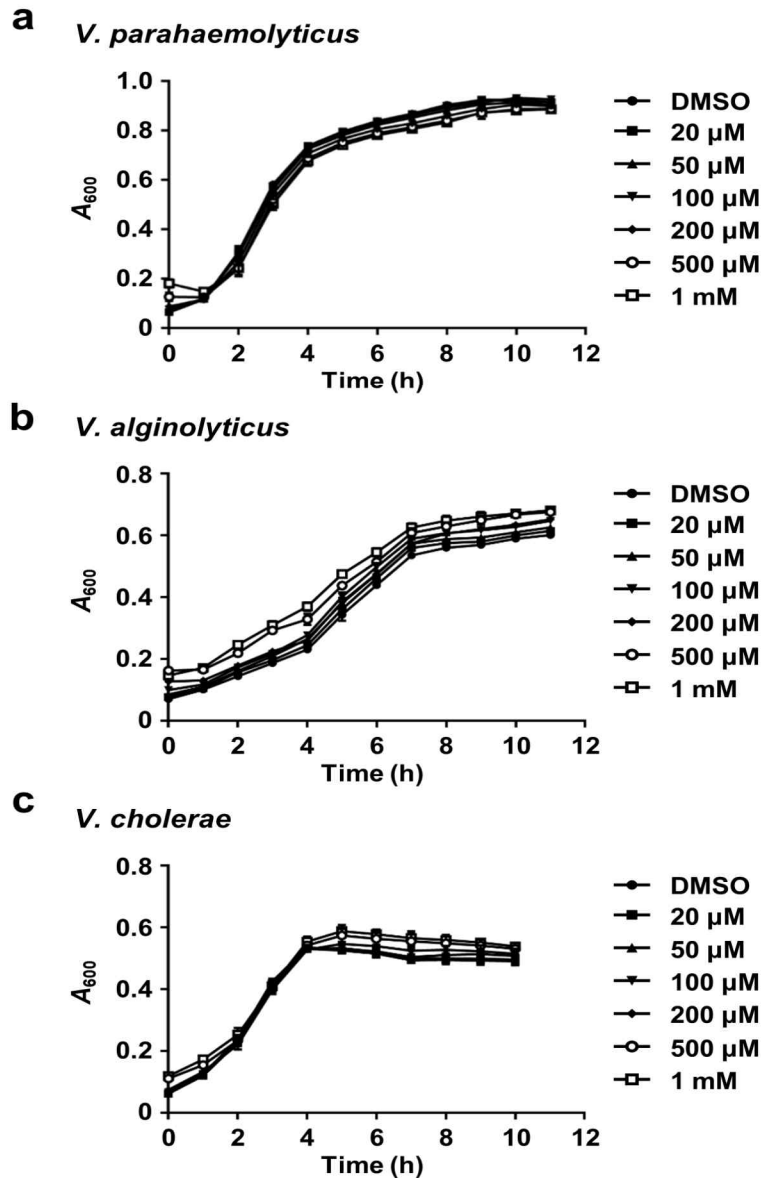


Fig 53. Effect of CM2660 on growth of other *Vibrio* species. *V. parahaemolyticus* (a), *V. alginolyticus* (b), and *V. cholerae* (c) were grown at 37° C in LBS, tryptic soy broth supplemented with 1% (w/v) NaCl, and LB, respectively, along with various concentrations of CM2660 or 2% DMSO (control). Their growth was monitored at 1 h intervals using a microplate reader.

㊦ 제어 선도물질 CM2660의 안전성 평가

- 제어 선도물질 CM2660의 안전성을 평가하기 위해, human cell line과 mouse model을 이용하여 실험을 수행하였다. Human cell line에 대한 CM2660의 세포 독성은 위와 같은 방법으로 측정되었다. 실험 결과, *V. vulnificus* wild type이 multiplicity of infection (MOI) 10에서 100%의 세포 독성을 나타냈으나 CM2660은 1~500 μM 농도 조건에서 INT-407 human epithelial cells에 대한 세포 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 54). 이는 CM2660이 세포 독성을 나타내지 않

는 안전한 화합물임을 의미한다.

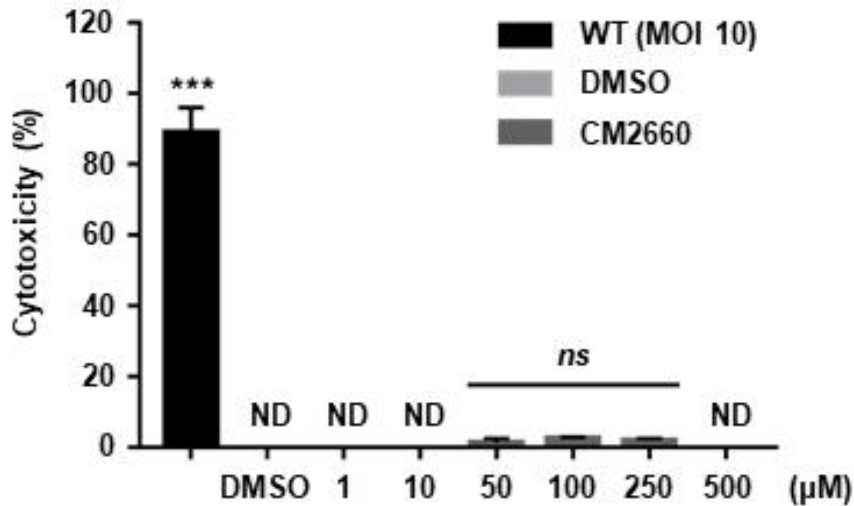


Fig 54. Cytotoxicity test of CM2660 towards host cells.

INT-407 human epithelial cells (2×10^4 cells) were treated with wild-type *V. vulnificus* at an MOI of 10, 1 to 500 M of CM2660 or DMSO, respectively, for 3 h. The cytotoxicity was measured by LDH release assay and expressed using the total LDH activity of the cells completely lysed by 5% (v/v) Triton X-100 as 100%. Error bars represent the SD. Statistical significance was determined by one-way ANOVA (***, $p < 0.0005$; ns, not significant; ND, not detected). WT, wild type.

이어서 CM2660이 생체 내에서 독성을 나타내는지 확인하기 위해 mouse model을 이용하여 실험을 수행하였다.

1) Mouse survival test

- 7주령 Institute of Cancer Research (ICR) female mouse를 하루 이상 적응시켰다.
- A_{600} of 0.5까지 배양한 *V. vulnificus* MO6-24/O wild type과 *hlyU* mutant를 PBS로 희석하여 7.5×10^6 CFU/ml로 준비하였다.
- Isoflurane을 이용하여 mouse를 마취시킨 뒤, 10% DMSO 또는 1.4 mg/kg body weight의 CM2660을 *V. vulnificus*와 함께 섞어 100 μ l씩 등 쪽 피부로 피하 주사하였다.
- 36 h 동안 mouse survival을 관찰하였다.

실험 결과, Fig. 55와 같이 대조군(DMSO)과 함께 wild-type *V. vulnificus*를 투여한 mouse는 투여 후 15시간 내에 10마리 모두 사망하였다. 그러나 CM2660을 함께 투여한 mouse는 10마리 중 2마리만이 사망하였고, 대조군에 비해 통계적으로 매우 유의미한 차이를 보였다. 한편, *hlyU* mutant 또는 CM2660만을 주사한 mouse는 10마리 모두 생존하였으며, 이는 CM2660이 생체 내

에서 독성을 나타낼 가능성이 낮은 안전한 제어 선도 물질임을 제시한다.

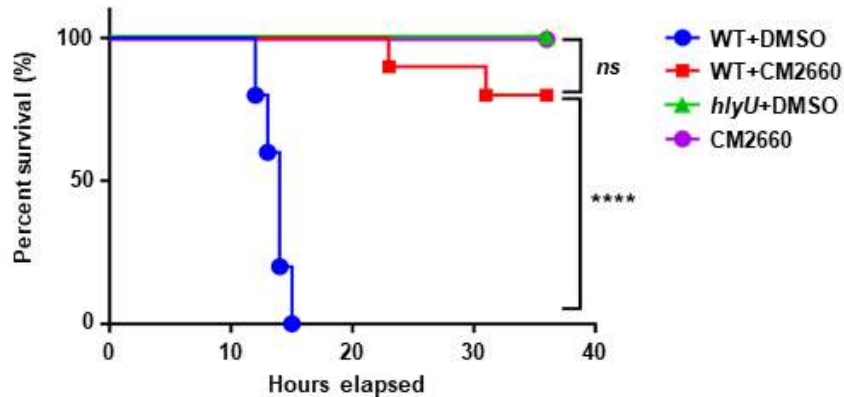


Fig 55. Effects of CM2660 on the survival of mice infected with *V. vulnificus*.

Survival of the mice anesthetized with isoflurane and subcutaneously injected with wild type ($n = 10$), wild type with CM2660 ($n = 10$), *hlyU* mutant ($n = 5$) at doses of 7.5×10^5 colony forming unit (CFU), or CM2660 alone ($n = 5$, control). Statistical significance was determined by log rank test (****, $p < 0.0001$; ns, not significant). WT, wild type; *hlyU*, *hlyU* mutant.

㉔ 모델식품을 이용한 패혈증 비브리오균의 독성 평가

- 패혈증 비브리오균은 굴, 조개와 같은 어패류를 날것으로 혹은 충분한 가열 없이 섭취할 경우 사람에게 감염되어 식중독을 일으킨다. 식품 내 존재하는 패혈증 비브리오균의 독성을 평가하기 위해, pilot scale 모델식품으로 굴을 선정하였다. 굴 접촉 시 패혈증 비브리오균의 독성 유전자가 발현되는지 조사하였다.

1) qRT-PCR analyses

- Wild-type *V. vulnificus*를 LBS에 접종하고, 30°C 에서 O/N 배양하였다.
- O/N culture를 동일한 fresh broth에 1/100 subculture하고, 30°C 에서 A_{600} of 0.5까지 배양하였다.
- 시판 굴을 흐르는 tap water로 3회 wash 하고, VFMG(*Vibrio fischeri* minimal medium containing 32.6 mM glycerol) broth 38 ml이 든 비커에 담가 준비하였다.
- A_{600} of 0.5의 배양액을 $1,500 \times g$, 10 min centrifugation한 후, pre-warmed VFMG로 wash 하였다.
- VFMG를 이용하여 *V. vulnificus*를 1×10^9 CFU/ml이 되도록 희석하고, 2 ml을 각각 굴이 있는 비커와 없는 비커에 final 5×10^7 CFU/ml이 되도록 접종하였다.
- 이를 30°C 에서 1, 2 시간 동안 배양하였다.
- 샘플 내 상층액을 30 ml 회수하여 4°C, $5,000 \times g$, 10 min centrifugation 하였다.

- H. Supernatant를 제거한 뒤, RNase-free cold PBS 10 ml로 cell pellet을 wash 하고, 다시 4°C, 5,000 × g, 10 min centrifugation 하였다.
- I. Supernatant를 제거한 뒤, RNase-free cold PBS 1 ml로 cell pellet을 resuspension하고 RNprotect Bacteria Reagent (Qiagen) 2 ml을 처리하였다.
- J. 이를 vortexing 한 후 5 min incubation 하였다.
- K. 5,000 × g, 10 min centrifugation한 후, pellet만 -20°C에 보관하였다.
- L. RNeasy Mini Kit (Qiagen)를 이용하여 total RNA를 분리하고, Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)로 농도를 측정하였다.
- M. 1 μg의 RNA를 iScript™ cDNA synthesis kit (Bio-rad, Hercules, CA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.
- N. Chromo 4 real-time PCR detection system (Bio-Rad)와 *rtxA* qRT-PCR primer 한 쌍을 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 16S rRNA 발현량을 internal reference로 사용하여 normalization 하였다 (Lee et al. 2019).

qRT-PCR 결과, 굴에 접촉한 *V. vulnificus*에서 독성 유전자 *rtxA* 발현이 접촉 후 1, 2시간 모두에서 증가하였다 (Fig. 56). 굴에 1시간 접촉 시, *rtxA* 발현은 접촉하지 않은 경우에 비해 7배 증가하였으며, 2시간 접촉 시에는 약 12배까지 증가하였다. 또한 이러한 결과를 통해 굴이 패혈증 비브리오균의 독성을 평가할 수 있는 pilot scale의 모델식품으로써 사용될 수 있음을 제시하였다.

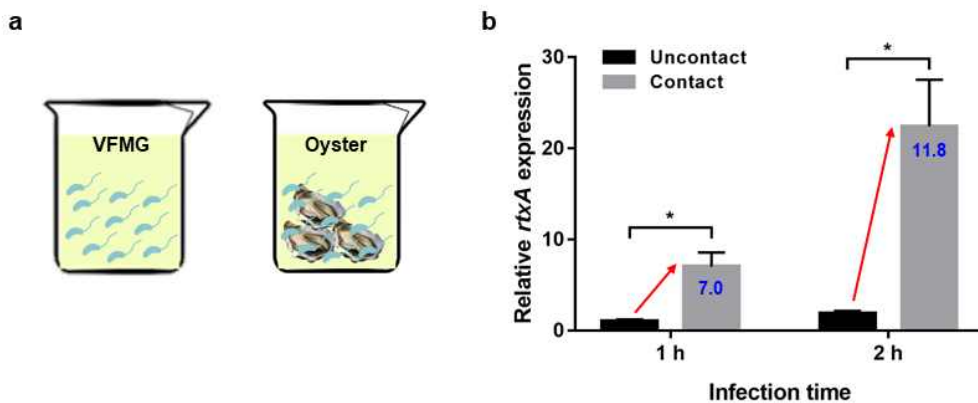


Fig 56. Expression of *rtxA* in *V. vulnificus* upon exposure to oyster.

(a) Schematic representation of *V. vulnificus* upon exposure to oyster. (b) *V. vulnificus* was statically grown in VFMG in the absence or presence of oyster for 1 and 2 h at 30°C. The *rtxA* transcript levels in the total RNA of the cells were quantified by qRT-PCR and expressed using the transcript level of each infection time in the absence of oyster as 1. Error bars represent the SD from biological triplicates. Statistical significance was determined by the Student's *t*-test (*, $p < 0.05$).

㉔ 모델식품을 이용한 제어 선도물질의 효능 평가

- 앞선 실험을 통해 모델식품 굴 접촉 시 패혈증 비브리오균의 독성 유전자 *rtxA*가 유도됨을 확인하였다. 이어서, CM2660이 굴 접촉 시 유도되는 *rtxA* 발현을 억제하는지 조사하였다. 실험은 위와 동일한 방법으로 수행하였으며, 굴이 든 비커에 *V. vulnificus* 접종 시 CM2660을 최종 농도 50 μ M로, 대조군으로는 DMSO를 최종 1% (v/v)로 첨가하였다. qRT-PCR 결과, 대조군에 비교하여 CM2660은 *V. vulnificus*의 *rtxA* 발현을 약 5배 감소시켰다 (Fig. 57). 이러한 CM2660의 패혈증 비브리오균 독성 유전자 발현억제 효능은 1, 2시간 모두에서 나타났으며, CM2660이 굴 접촉 시 발현되는 *V. vulnificus*의 *rtxA* 발현을 성공적으로 억제시킴을 의미한다.

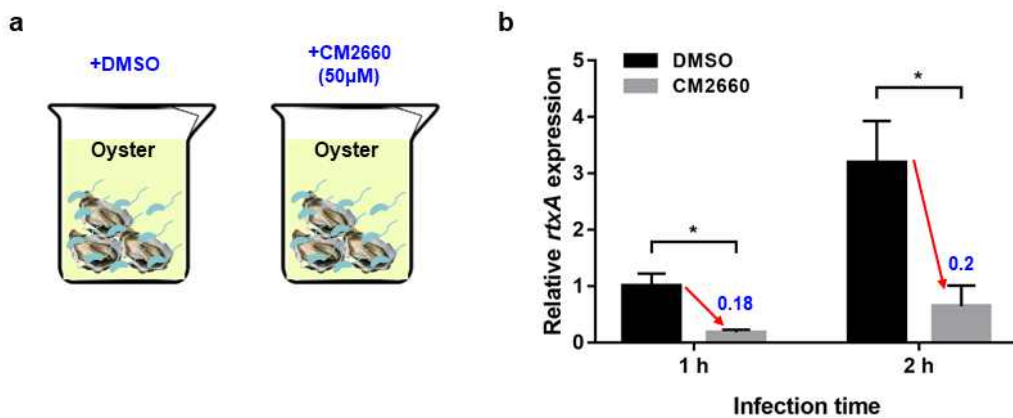


Fig 57. Effect on CM2660 on the *rtxA* expression in *V. vulnificus* upon exposure to oyster.

(a) Schematic representation of *V. vulnificus* upon exposure to oyster in the absence or presence of CM2660. (b) *V. vulnificus* was statically grown in VFMG in the presence of oyster along with CM2660 (50 μ M) or DMSO (control) for 1 and 2 h at 30 $^{\circ}$ C. The *rtxA* transcript levels in the total RNA of the cells were quantified by qRT-PCR and expressed using the transcript level of each infection time in the absence of oyster as 1. Error bars represent the SD from biological triplicates. Statistical significance was determined by the Student's *t*-test (*, $p < 0.05$).

종합적으로, CM2660은 패혈증 비브리오균을 비롯하여 장염 비브리오균, 비브리오 알기놀리티쿠스, 비브리오 콜레라균과 같은 여러 병원성 비브리오 중에 대해 독성 억제 효능을 보였다. CM2660이 이들 미생물의 성장을 저해하지 않았으며, human cell line과 mouse model에서 독성을 나타내지 않았기 때문에 CM2660은 내성을 유발할 가능성이 낮은 안전한 식품안전 후보물질로 개발될 수 있다. 국내외로 널리 소비되는 굴을 패혈증 비브리오균의 독성을 평가할 수 있는 pilot scale의 모델식품으로 개발하였으며, 굴 접촉 시 패혈증 비브리오균의 독성 유전자 *rtxA* 발현이 유도됨을 확인하였다. CM2660을 함께 처리하였을 때, 굴 접촉 시 유도되는 패혈증 비브리오균의 *rtxA* 발현이 효과적으로 감소되었다. 이러한 연구 결과를 통해 CM2660을 독성인자 발현제어 선도물질로 도출할 수 있었다. 본 과제의 연구 결과는 식중독 미생물 제어기술 개발의 model로서 항미생물 식품안전소재 산업의 경쟁력을 향상시키는 원천기술로 활용될

수 있을 것이다.

㉔ 패혈증 비브리오의 독소활성 억제에 관여하는 천연물 스크리닝

- 천연물을 이용한 패혈증 비브리오균의 독소 발현인자 HlyU의 억제제 CM2660의 제형 개선 시도

앞서 3단계 연구를 통해 패혈증 비브리오균의 독성인자 조절자 HlyU의 기능을 저해하는 선도 물질 CM2660을 발굴하였고 이의 효능을 검증하였다. CM2660의 용해도가 낮아 모두 DMSO를 용매로 사용하여 진행되었으며, 식품산업에서 적용이 가능한 제형으로의 개선이 필요하다. 천연물을 병용 처리하여 CM2660의 용해도를 개선하고 패혈증 비브리오균을 제어하는데 시너지 효과를 얻고자 하였다.

- 천연물 중 가격이 저렴하고 독성이 적은 후보군 20여종을 선정.

- Hemolytic assay를 이용하여 20 여종의 천연물 중 균의 생장은 저해하지 않고, 독소활성에만 영향을 미치는 물질 확인.

Water		DMSO		DMSO	
A1	Hordenine HCl	C2	Ursolic acid	D1	Naringenin
A2	Choline Bitrate	C3	Phenylpriacetam	D2	Piperine
A3	Phenylbut HCl	C4	Morin	D3	<i>trans</i> -cinnamaldehyde
A4	Inosine	C5	Curcumin	D4	Aspirin
A5	Yohimbine HCl	C6	Oleamide	D5	Caffeine
A6	Vanillin	C7	Noopept		
A7	GABA	C8	Quercetin		
A8	Synephrine	C9	Icarin		
A10	L-Theanine	C10	Baicalin		
		C11	Zingerone		

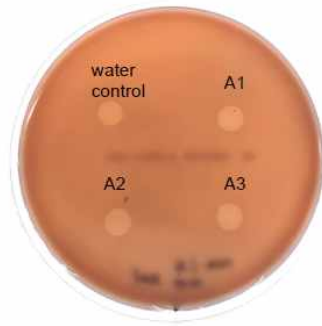
Table 3. 천연물 20여종

1) Hemolytic assay

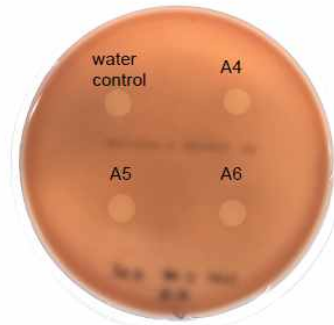
A. 후보로 선정된 천연물을 100 μ M 로 처리한 배지에 OD600 0.5까지 배양한 *V. vulnificus* MO6-24/O wild type 를 1% 처리하여 OD600 0.5 이상 배양하였다.

B. *V. vulnificus* MO6-24/O wild type 를 배양한 배지를 농축하여 secretion 된 단백질을 농축하여 Blood agar plate에 dotting 하였다.

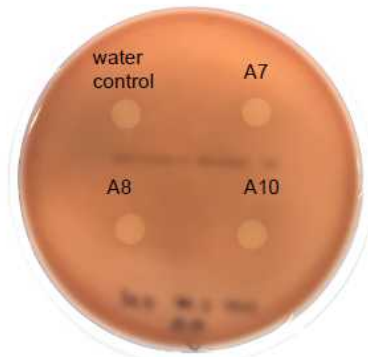
C. 대조군(DMSO) 와 비교하여 hemolysis가 적게 일어난 천연물을 확인했다.



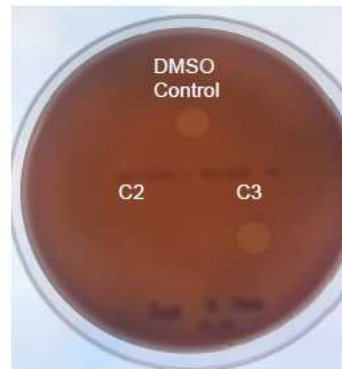
OD
Control 0.519
A1 0.526
A2 0.506
A3 0.569



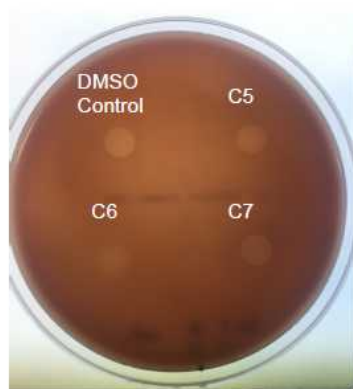
OD
Control 0.519
A4 0.567
A5 0.412
A6 0.527



OD
Control 0.539
A7 0.644
A8 0.408
A10 0.402



OD
Control 0.533
C2 0.607
C3 0.497
C4 0.084



OD
Control 0.582
C5 0.556
C6 0.585
C7 0.634



OD
Control 0.582
C9 0.567
C10 0.568



OD	Value
Control	0.725
C11	0.696
D1	0.122
D2	0.192
D3	0.186
D4	0.633
D5	0.613

Fig 58. hemolysis inhibition 천연물 스크리닝

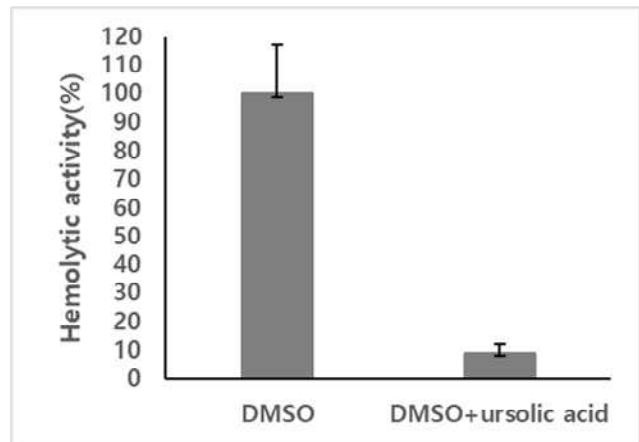
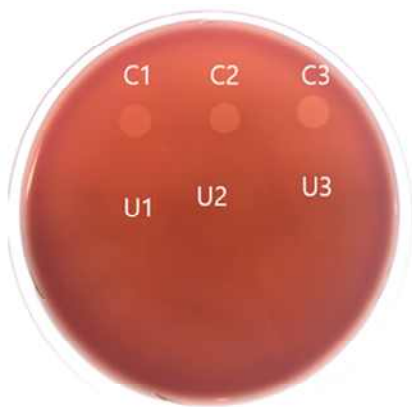


Fig 59. 우르솔산의 hemolysis inhibition

실험결과, 후보군 중 우르솔산(Ursolic acid)이 패혈증 비브리오의 생장은 억제하지 않으면서 독소활성 억제에 관여함을 확인하였다.

㉞ 우르솔산의 제형개선

- DMSO가 아닌 식품에 처리 가능한 용매 중 에탄올에 우르솔산을 용해하여 DMSO와 유사한 효과를 나타내는지 확인하고자 하였다.

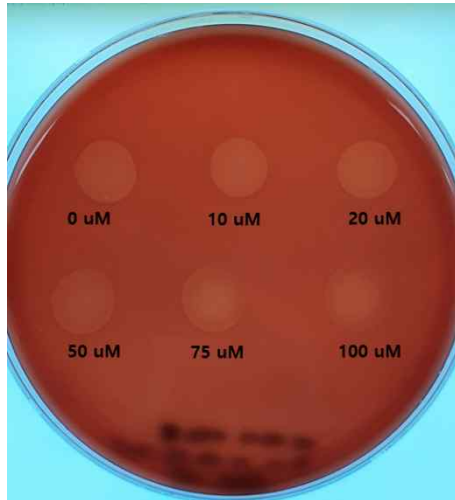


Fig 60. 용매가 에탄올인 우르솔산의 hemolytic activity

- 실험결과 에탄올에 용해시킨 100 μM 우르솔산이 패혈증 비브리오의 독성활성에 영향을 미침을 확인하였다.

㉔ 우르솔산과 CM2660의 병용처리를 이용한 용해도 개선

1) 에탄올을 용매로 용해가능한 농도에서의 hemolytic activity 확인

CM2660은 2% 에탄올에서 200 nM까지 용해 가능하며, 우르솔산은 50 μM 까지 용해 가능하다.

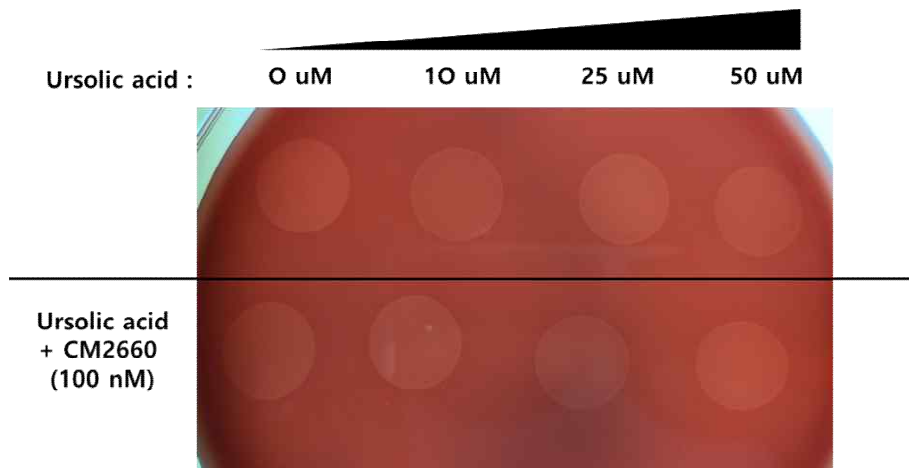


Fig 61. 2% 에탄올에 용해가능한 농도에서의 hemolytic activity

2) 초음파분산기를 이용한 균질혼합물로 처리하여 hemolytic activity 확인

CM2660 화합물의 균등한 분산을 위해 초음파분산기(sonicator)를 이용한 후 우르솔산과 섞은 뒤 hemolytic assay를 진행하였다. 3단계 연구에서 효능이 확인되었던 20 μM CM2660의 용해도를 증가시킬 수 있는 우르솔산의 농도를 확인하고자 0 - 100 μM 우르솔산을 병용처리 하였다.

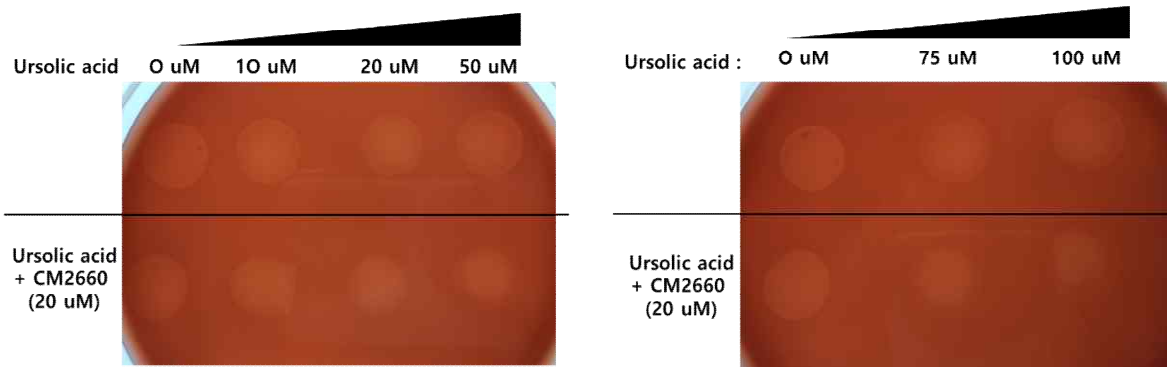


Fig 62. CM2660의 용해도 향상에 효과적인 우르솔산 농도확인

실험결과, CM2660을 단일처리 할 때 비해 우르솔산을 병용처리 할 때 CM2660의 용해도가 개선되어 패혈증 비브리오의 독성인자 규제가 가능함을 확인하였다. 이때 우르솔산의 농도는 50 uM 이상에서 나타나며, 100 uM 우르솔산에서 확연한 비교가 가능하였다.

3) 패혈증 비브리오의 독성인자 제어를 위해 우르솔산 병용처리시 최저 CM2660 농도 확인

우르솔산과 CM2660을 병용처리시 용해도의 개선을 확인하였고 100 uM 우르솔산 처리시 활성을 보이는 최저 CM2660 농도를 확인하고자 하였다.

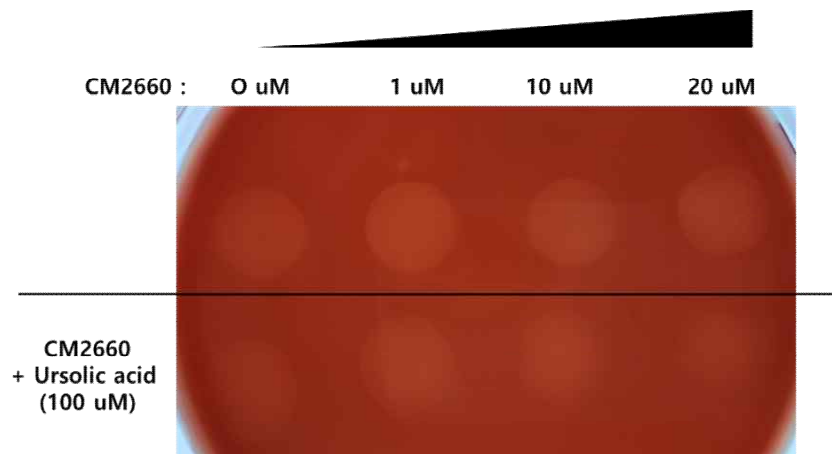


Fig 63. 우르솔산 병용처리시 효과적인 CM2660 농도 확인

실험결과 100 uM 우르솔산 병용처리시 CM2660의 농도를 10 uM까지 낮게 사용할 수 있음을 확인하였다.

(2) 제 1-2 세부과제 (서울대 김도만): 식품 맞춤형 천연 향균 소재
 생산 최적화 및 적용
 (가) 정량적 성과

성과지표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		인력양성			정책활용·홍보		기타	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	석사	박사	취업인력	정책활용		홍보전시
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	명	명				
가중치																				
최종목표																				
후속 1차	목표	2	1									1		2	1		1			
	실적	10	5									2		4	1		1		1(시제품)	
후속 2차	목표	2	1		1							2		1		1				
	실적	11	2		1	30						4		2	2	1				
후속 3차	목표	1	1									3		1						
	실적	9	8		2	24,809	2					7	2	3	2				2(시제품)	
3단계	목표	5	3		1							6		2	3		2			
	실적	30	15		3	54,809	2					13	2	9	5		2		3	

① 논문게재 성과-3단계실적

연번	게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
			주저자	교신저자	공동저자				
1	2018	Production of steviol from steviol glucosides using β -glucosidase from a commercial pectinase, Sumizyme PX	Thi Thanh Hanh Nguyen	Doman Kim	Changseop Seo, Bon-Cheol Gu, Hee-Jung Lim, Jung-Min Ha, Seong-Bo Kim, Jun-Seong Park	Biotechnology Letters	40(1)	국외	SCI
2	2018	Decrease of insoluble glucan formation in <i>Streptococcus mu</i>	Shin-Hye Yu.	Doman Kim	So-Hyung Kwak, Thi Thanh Hanh, Nguyen, Ye-Seul, Seo,	Biotechnology Letters	40(1)	국외	SCI

		<i>tansbyco-cultivation with En terococcus faecium T7 and glu canase addition</i>			Chaeri, Song, Il Kyoon, Mok				
3	2018	The use of fermented buckwheat to produce l-carnitine enriched oyster mushroom.	Tae-kyung Lee	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Namhyeon Park, So-Hyung Kwak, Jeosoo Kim, Shina Jin, Gyu-Min Son, Jaewon Hur, Jong-In Choi	AMB Express	40(2)	국외	SCI
4	2018	Characterization of quinoa (Chenopodium quinoa) fermented by Rhizopus oligosporus and its bioactive properties	Jaewon Hur	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Namhyeon Park, Jeosoo Kim	AMB Express	8(1)	국외	SCI
5	2018	Composition and biochemical properties of l-carnitine fortified Makgeolli brewed by using fermented buckwheat	Namhyeon Park	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Gang-Hee Lee, Shi-Na Jin, So-Hyung Kwak, Tae-Kyung Lee, Yeong-Hwan Choi, Seong-Bo Kim, Atsuo Kimura	Food Sci Nutr.	8(1)	국외	SCI
6	2019	Anti-cariogenic Characteristics of Rubusoside	Jeosoo Kim	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Juhui Jin, Iis Septiana, Gyu-Min Son, Gang-Hee Lee, You-Jin Jung, Dilshad Qureshi, Il Kyoon Mok, Kunal Pal, Soo-Yeon Yang, Seong-Bo Kim	Biotechnology and Bioprocess Engineering	6(8)	국내	SCI

7	2019	Brewing Rutin-Enriched Lager Beer with Buckwheat Malt as Adjuncts	Yang Deng	Doman Kim	Juho Lim, Gang-Hee Lee, Thi Thanh Hanh Nguyen, Yang Xiao, Meizi Piao	J. Microbiol. Biotechnol	29(6)	국내	SCI
8	2019	Antimelanogenesis Effects of Fungal Exopolysaccharides Prepared from Submerged Culture of Fomitopsis castanea Mycelia	Juhui Jin	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Changmu Kim	J. Microbiol. Biotechnol	29(6)	국내	SCI
9	2019	Composition and biochemical properties of ale beer enriched with lignans from Schisandra chinensis Baillon (omija) fruits.	Yang Deng	Doman Kim	Juho Lim, Thi Thanh Hanh Nguyen, Il-Kyoon Mok, Meizi Piao	Food Science and Biotechnology	29(8)	국내	SCI
10	2020	Synthesis and characterization of stevioside having low degree polymerized glucosides using dextranucrase and dextranase	Gyumin Son	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Byeongsu Park, Sohyung Kwak, Juhui Jin, Young-Min Kim, Young-Hwan Moon, Sunghee Park, Seong-Bo Kim	Enzyme and Microbial Technology	132(1)	국외	SCI
11	2020	Enzymatic synthesis and biological characterization of a	lis Septiana	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Sangyong Lim, Seonmin Lee, Byeongsu Park,	Enzyme and Microbial Technology	134(3)	국외	SCI

		novel mangiferin glucoside			Sohyung Kwak, Sunghee Park, Seong-Bo Kim				
12	2020	Fermented Wild Ginseng by <i>Rhizopus oligosporus</i> Improved L-Carnitine and Ginsenoside Contents	Ganghee Lee	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Tae Yun Lim, Juho Lim, Byeongsu Park, Seonmin Lee, Il-Kyoon Mok, Kunal Pal, Sangyong Lim	Molecules	25(9)	국외	SCI
13	2019	Enzymatic production of steviol glucosides using β -glucosidase and their applications	Thi Thanh Hanh Nguyen	Doman Kim	Changseop Seo, So-Hyung Kwak, Jeeseo Kim, Hee-Kyoung Kang, Seong-Bo Kim	Enzymes in Food Biotechnology	단행본 (Chapter 23)	국외	비SCI
14	2020	Enzymatic synthesis of flavonoid glucosides and their biochemical characterization	Thi Thanh Hanh Nguyen	Doman Kim	Juhui Jin, Iis Septiana, Dilshad Quereshi, Kunal Pal	Biopolymer-based formulations: biomedical and food applications	단행본 (Chapter 2)	국외	비SCI
15	2020	Enhancement of neuroprotection, antioxidant capacity, and water-solubility of crocins by transglucosylation using dextransucrase under high hydrostatic pressure	Il-Kyoon Mok	Doman Kim	Thi Thanh Hanh Nguyen, Dong Hoi Kim, Jae Wook Lee, Sangyong Lim, Ho-yong Jung, Taeyun Lim, Kunal Pal	Enzyme and Microbial Technology	140	국외	SCI

② 특허 성과-3단계실적

출원된 특허						등록된 특허				
연번	출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
1	2017	변형 류코노스톡속 균주를 이용한 스테비오사이드 배당체의 합성 방법 및 이에 의하여 제조된 신규한 스테비오사이드 배당체	서울대학교 산학협력단	한국	10-2017-0152472	2019	변형 류코노스톡속 균주를 이용한 스테비오사이드 배당체의 합성 방법 및 이에 의하여 제조된 신규한 스테비오사이드 배당체	서울대학교 산학협력단	한국	10-1997597
2	2017	변형 류코노스톡속 균주를 이용한 스테비오사이드 배당체의 합성 방법 및 이에 의하여 제조된 신규한 스테비오사이드 배당체	서울대학교 산학협력단	미국	PCT/KR2017/013100					
3	2017	미생물을 이용한 고체 발효 커피의 제조방법 및 이에 의하여 제조된 고체 발효 커피	서울대학교 산학협력단	한국	10-2017-0161098	2019	미생물을 이용한 고체 발효 커피의 제조방법 및 이에 의하여 제조된 고체 발효 커피	서울대학교 산학협력단	한국	10-1994276
4	2017	발효 메밀을 이용한 L-카르니틴이 풍부한 기능성 막걸리의	서울대학교 산학협력단	한국	10-2017-0163469	2019	발효 메밀을 이용한 L-카르니틴이 풍부한 기능성 막걸리의	서울대학교 산학협력단	한국	10-2028067

		제조 방법 및 이에 의하여 제조된 기능성 막걸리					제조 방법 및 이에 의하여 제조된 기능성 막걸리			
5	2017	인삼류로부터 진세노사이드를 고효율로 추출하는 방법 및 이에 의하여 추출된 진세노사이드	서울대학교 산학협력단	한국	10-2017-0165304	2020	인삼류로부터 진세노사이드를 고효율로 추출하는 방법 및 이에 의하여 추출된 진세노사이드	서울대학교 산학협력단	한국	10-2099345
6	2017	인간 타이로시나아제의 발현 방법 및 이에 의하여 제조된 인간 타이로시나아제의 용도	서울대학교 산학협력단	한국	10-2017-0181262					
7	2017	발효 산양삼추출액의 제조방법 및 이에 의하여 제조된 발효 산양삼추출액	서울대학교 산학협력단	한국	10-2017-0181261					
8	2018	버섯 배양액을 포함하는 화장료 조성물	서울대학교 산학협력단	한국	10-2018-0050927					
9	2018	L-카르니틴 함유 강황 발효 산물	서울대학교 산학협력단	한국	10-2018-0050929					
10	2018	저열량 카스카라 시럽의 제조 방법	서울대학교 산학협력단	한국	10-2018-0054418					
11	2018	레반수크라	서울대	한국	10-2018					

		아제를 이용한 루부소사이드-프락토사이드의 합성 방법	학교 산학협력단			-007535 1				
12	2018	글루칸수크라아제를 이용한 스테비오사이드 배당체의 합성 방법	서울대학교 산학협력단	한국		10-2018 -010132 6				
13	2018	커피잎 추출물, 프리바이오틱스, 또는 커피잎 추출물 및 프리바이오틱스를 유효성분으로 포함하는 구강 세균 억제용 조성물	서울대학교 산학협력단	한국		10-2018 -010767 2				
14	2018	L-카르니틴을 포함하는 발효 홍삼 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 발효 홍삼	서울대학교 산학협력단	한국		10-2018 -011007 3				
15	2018	루부소사이드를 유효성분으로 포함하는 구강 세균 억제용 조성물	서울대학교 산학협력단	한국		10-2018 -011014 3				
16	2018	저열량의 올리고당 고함유 콤부차 제조방법	서울대학교 산학협력단	한국		10-2018 -011729 4				
17	2018	L-카르니틴이 풍부한	서울대학교	한국		10-2018 -011811				

		강황 발효산물의 제조 방법 및 이의 용도	산학협 력단		4					
18	2018	크로신 글루코사이드의 제조 방법 및 크로신 글루코사이드를 포함하는 항산화, 항염증, 항우울증, 기억력 향상, 항종양, 신경세포보호 효과 등 다양한 생리활성 개선용 약학적 조성물	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-2018 -013895 0					
19	2018	유산균 균주를 이용하여 제조된 올리고당을 포함하는 난수 용성 물질의 수용액 가용화 조성물	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-2019 -016255 5					
20	2019	발효 산양삼 제조 방법	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-2019 -004829 2					
21	2019	리조푸스 속 균주를 이용한 난용성 폴리페놀 화합물의 수용화 방법 및 상기	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-2019 -009222 1					

		방법으로 제조된 수용화된 폴리페놀 화합물								
22	2019	리조푸스 속 균주를 이용한 발효 강화 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 발효 강화	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-2019 -009251 8					
23	2019	수용성 커큐미노이 드의 함량이 증가된 강화 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 수용성 커큐미노이 드의 함량이 증가된 강화	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-2019 -009286 4					
24	2019	발효당을 이용한 저열량의 콤부차 제조방법	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-2019 -012241 6					
25	2019	크로신 배당체 및 상기 크로신 배당체 화합물의 제조방법	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-2019 -012982 4					
26	2019	효소 및 초고압처리 에 의한 진세노사이 드 Rg3의 생산방법	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-2019 -014501 2					
27	2020	모그로사이 드 배당체를 포함하는 난수용성	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-2020 -005104 3					

		물질의 수용액 가용화 조성물								
28	2020	신종 코로나바이러스 주요 단백질 가수분해효소의 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 신종 코로나바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물	서울대학교 산학협력단	한국	10-2020-0049853					
29	2020	모나콜린 K 및 L-카르니틴을 모두 포함하는 건강 기능 식품 발효 소재의 제조 방법	서울대학교 산학협력단	한국	10-2020-0100723					
30	2020	발효 산양삼잎 제조방법 및 이를 이용한 카르니틴 및 모나콜린의 생산방법	서울대학교 산학협력단	한국	10-2020-0100722					
31						2018	올리고당 고함유 발효커피시럽의 제조 방법 및 이에 의하여 제조된 올리고당 고함유 발효커피시럽	서울대학교 산학협력단	한국	10-1818609

32					2018	글루칸수크 라아제의 고효율 생산을 위한 변형 류코노스톡 속 균주	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-1863 321
33					2018	L-카르니틴 이 풍부한 발효산물의 제조 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 발효산물	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-1873 514
34					2018	L 카르니틴 함유 발효 산물을 이용한 L 카르니틴 함유 버섯의 재배 방법 및 이에 의하여 재배된 L 카르니틴 함유 기능성 버섯	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-1894 423
35					2018	애완동물 구강 건강 보조 소재	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-1911 290
36					2018	스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이 드의 추출 방법 및 이에 의하여 추출된 수용성이 증가된 커큐미노이 드	서울대 학교 산학협 력단	한국	10-1924 159
37					2019	올리고당 고함유 당밀의 제조	서울대 학교 산학협	한국	10-1964 115

							방법, 이에 의하여 제조된 올리고당 고함유 당밀 및 이의 용도	력단		
38					2019	신규한 EGCG 배당체 및 이의 제조 방법	서울대학교 산학협력단	한국	10-1995244	
39					2019	레반수크라아제를 이용한 루부소사이드-프락토사이드의 합성 방법	서울대학교 산학협력단	한국	10-2050863	
40					2020	올리고당 고함유 오미자청의 제조 방법, 이에 의하여 제조된 올리고당 고함유 오미자청 및 이의 용도	서울대학교 산학협력단	한국	10-2015807	
41					2020	천연물 한방소재 성분 아스트라갈린의 갈락토사이드 배당체 합성 방법	서울대학교 산학협력단	한국	10-2095341	

③ 기술료징수 현황

기 징수액	당해연도 징수액	향후 징수액	합계
50,500,000	4,309,588		54,809,588

- 기술이전 및 기술지도 내용

※ 명칭, 관련업체명, 지도내용 등

N O	기술이전 유형	기술실시 계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료
1	통상실시권	항산화 및 항균 기능 소재 합성균주의 발효 배양액 생산 기술 및 발효용 스타터 유지 기술	농업회사법인(주)우리두	2019-02-22	10,000,000
2	통상실시권	대한민국특허출원 제 2017-0181261호 및 관련 노하우	지식과나눔	2019-03-21	20,000,000
3	통상실시권	대한민국 특허 제 863321호 및 노하우	한주F&B	2019-05-21	20,500,000 (선급)
4	통상실시권	대한민국 특허 제 863321호 및 노하우	한주F&B	2019-05-21	4,309,588 (경상)
합계					54,809,588

④ 사업화 성과 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(백만원)				
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내			
국외					
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

항목	세부항목		성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	억원
		관련제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
				국내 : % 국외 : %

항목	세부항목			성 과
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
	경쟁력 순위	3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		위

(나) 정성적 성과

구분	연구목표	주요 연구 성과	
1 단 계	1차년도		
	2차년도		
	3차년도		
2 단 계	4차년도		
	5차년도		
	6차년도	<ul style="list-style-type: none"> 미생물 생물전환 조건, 식품안전 소재 대량 생산 조건 확보 	<ul style="list-style-type: none"> 발효식품 유래 당전이 효소 생산 류코노스톡균 개발, 생물전환 특성 확인, 루부소사이드를 활용한 올리아놀릭산, EGCG의 수용화 수용화 향상된 올리아놀릭산, 수용화된 EGCG의 항산화, 올리아놀릭산의 항생제 활성 시너지 특성 확인 특허출원 13건, 기술이전 1건 및 SCI급 논문 2편, 인력양성 2인 실적
7차년도	<ul style="list-style-type: none"> 수용화 천연 식품 안전소재의 식품 품질 및 안전 관련 특성 정보를 확보 	<ul style="list-style-type: none"> 당전이 β-galactosidase 활성 단백질 발현, 특성 연구 여러 가지 수용화 천연 페놀 화합물의 지카바이러스 활성 억제 특성 연구 수용화 올리아놀릭산의 제조 및 식품안전 소재로의 기능 연구 및 활용성 개발 특허출원 11건, 등록 1건, SCI급 논문 5편, 인력양성 2인 실적 	
3 단 계	후속 1차년도	<ul style="list-style-type: none"> 생물 전환 기술 활용 수용성 강 화식품 안전 천연 향균 소재 생산 최적화 및 적용 	<ul style="list-style-type: none"> 유산균 발효액을 이용한 수용성 커큐미노이드 및 폴리페놀 화합물 생산 최적화 개발 식품 안전 소재의 향균, 항산화 등 식품 안전 특성 연구 발효 식음료 환경에 대한 적용으로 식품 안전 특성 확보 SCI 논문 3, 특허등록 4건, 특허출원 6건과 인력양성 1인 실적
	후속 2차년도	<ul style="list-style-type: none"> 생물 전환 기술 활용 향균 신바이오틱스 식품 안전 향균 소재 생산 최적화 및 적용 	<ul style="list-style-type: none"> 유산균 발효 및 발효액을 이용한 난소화성 향균 프리바이오틱스 및 신바이오틱스 화합물 생산 최적화 개발 식품 소재의 향균, 항산화 등 식품 내 물질 특성 연구 천연 및 발효 식음료 환경에 대한 적용 SCI 논문게재 3편, 특허등록 7건, 특허출원 10건과 인력양성 2인 실적

후속 3차년도	<ul style="list-style-type: none"> 생물 전환 기술 활용 저열량 항균 천연 식품 안전 항균 소재 생산 최적화 및 적용 	<ul style="list-style-type: none"> 발효 배양액 생산 및 수용화 천연 항균 소재 생산 스테비오사이드 생물전환 산물들의 항균 및 기타 특성 확인 저열량 과실 음료(청 등) 제조를 위한 올리고당 합성 스테비올 올리고당 함유 (발효) 식음료의 기능성 확보 SCI 논문게재 6편, 게재승인 1편, 특허등록 4건, 특허출원 5건과 인력양성 2인, 기술이전 3건 실적
------------	---	---

(다) 기타 주요연구 성과

① 1-3차년도 전체 요약

- 후속 연구 기간에 항균과 항산화 특성이 우수한 난수용성인 소재의 수용성 강화 방법을 연구하고 산물의 특성을 확인하였으며, 생물전환기술로 항균 식품안전 항균 소재를 제조하고, 생산 조건을 최적화하는 연구를 진행하였고, 저열량 감미소재로서 항균특성을 가지는 난소화성 스테비올 올리고당의 생산, 개발 소재를 활용한 다양한 발효식품, 음료 등을 제조함.
- 개발 소재들의 항균특성과 난수용성 기능 소재의 수용화 특성을 활용하여 차별화된 발효 음료 혹은 식품을 제조하고, 항산화, 항균특성과 더불어 기능성을 연구함.
- 연구결과는 12편의 SCI급 논문게재와 1편의 게재승인, 2편의 북챗터, 특허출원 21건, 특허등록 14건, 그리고 5명의 인력양성과 3건의 기술이전 실적을 얻음.

② 1차년도 요약

- 항균과 항산화 특성이 우수하지만 난수용성인 소재의 생이용성을 향상하려 수용성 강화 방법을 연구하고 산물의 특성을 확인함.
- 구체적으로 ㉠ 커큐미노이드의 수용체 반응조건 확인, 강황 발효 미생물 선별 및 발효조건 연구, 주요 성분 LC/MS 분석, 그리고 강황의 주요 폴리페놀 성분들의 수용화 연구를 진행하였고, ㉡ 유산균 발효액을 이용하여 커큐미노이드 배당체합성 여부 확인, 강황 발효 미생물선발, 강황 발효균을 이용한 강황, 퀴노아 발효와 발효 퀴노아의 항산화 및 물질특성 확인을 진행하였으며, ㉢ 유산균 발효액을 이용하여 카페인산과 클로로젠산의 배당체를 제조하고 구조 결정 및 특성 연구를 진행함.
- 연구결과는 2편의 SCI급 논문게재와 6건 특허출원, 그리고 1건의 특허등록의 실적을 얻고, 1명의 인력을 양성함.

③ 1차년도 상세 내용

㉠ 유산균 발효액을 이용한 수용성 커큐미노이드 및 폴리페놀 화합물 생산 최적화:

1) 커큐미노이드 수용체 반응

A. 텍스트란수크라아제 이용 커큐미노이드 배당체화: 배당체 실험 최적 조건은 아래와 같음.

Stock	최종농도
500mM curcumin(DMSO)	100mM
2M sucrose	400mM
<i>L. mesenteroides</i> 1299 텍스트란수크라제	15Unit/ml
0.4M Na-Ac buffer(pH 5.2)	20mM
Dw	
총부피	25mL

Table 1. 커큐미노이드 배당체화 조건

- a) 반응온도는 28° C였고, 설탕이 모두 소모될 때까지 진행함. 반응 결과 배당체가 TLC 분석에서 확인됨. 사용한 플레이트는 Silica gel 60F₂₅₄ TLC plate (Merck, Darmstadt, Germany)이고 전개 용매로서 nitromethane:n-propanol:water[2 : 5 : 1.5 (v/v/v)]을 사용.
- b) HPLC(Xbridge™ C18 5 μm 4.6X150mm Column) 분석 후 각 분획 별 용출된 반응 산물은 다시 DHB matrix를 이용하여 MALDI-TOF-MS analysis를 하고, 분자량이 1006.28임을 확인.

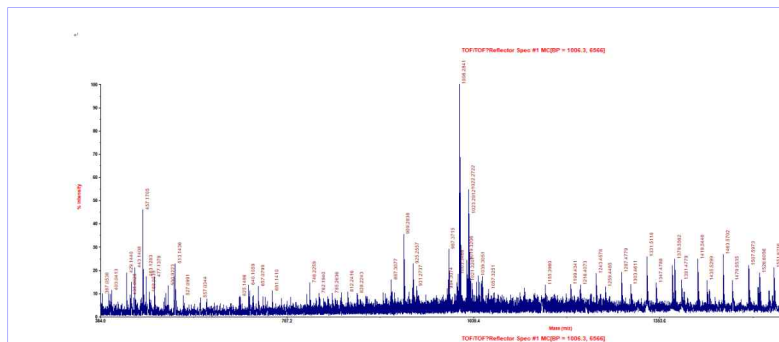


Fig 1. 커큐미노이드 배당체의 MALDI-TOF-MS

- c) 이는 커큐민의 분자량 368.39에서 3분자의 포도당(Mw. 180)이 붙으며 3분자의 물(Mw. 18)이 떨어지면서 한 물의 포도당 분자량당 162g의 포도당 세 분자가 결합한 배당체로 확인함.

B. 강황 발효 미생물 선발 및 발효조건 연구와 주요 성분 LC/MS 분석

- a) Tempeh와 Onchom에서 강황 발효균을 분리하였고, Biolog 장비로 생화학적 특성을 확인하였으며, 16srRNA 염기서열의 추가 확인 결과 *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus microsporus* 와 *Neurospora crassa*로 확인함.
- b) 이 균들로 강황 발효를 진행함. 발효는 강황 가루와 물을 1:2(w/v) 비율로 섞어 반죽 후 121°C 에서 15분간 autoclaving 이후 접종. 3일간 30°C incubator에서 발효 후 성분 구성 분석함. 결과로, *R. oligosporus*를 이용한 시료에서만 발효가 진행됨.

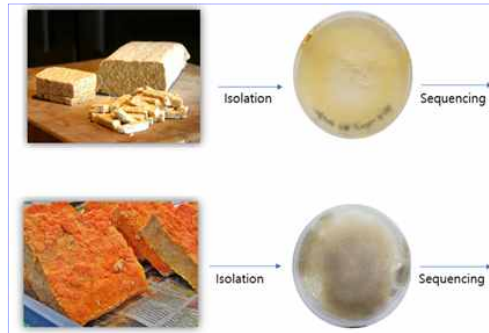


Fig 2. 강황 발효 균 선발 과정: 템페와 오츠 사용.

c) 멸균 후 발효 강황에서 Curcuminoid의 양이 줄어들고, polyphenolic 화합물의 양은 증가함. 발효 강화의 Surface sample과 bottom sample을 비교하면, Curcumin과 vanillin을 제외한 다른 content에서는 차이가 없음. Vanillin의 경우 bottom sample에서 surface sample보다 더 많은 양이 정량됨.

d) 또한, 발효가 주로 일어난 Surface sample의 경우, control보다 카르니틴양의 증가를 확인함. Surface sample에서 정량된 카르니틴의 양은 Bottom sample에서 정량된 카르니틴의 양보다 많았음. 이는 균의 성장을 강황에서 고르게 진행되도록 하면 더 많은 카르니틴의 생산을 기대하게 함.

표. 강황가루 발효 전/후의 커큐미노이드와 플라보노이드 성분

	Curcumin (mg/g)	Bisdemethoxy Curcumin (mg/g)	Demethoxy Curcumin (mg/g)	Vanillin (mg/100g)	p-Coumaric acid (mg/100g)	Vanillic acid (mg/100g)	Ferulic acid (mg/100g)	Naringenin (mg/100g)
Control	6.20 ± 0.38	0.10 ± 0.01	1.65 ± 0.12	5.61 ± 0.38	0.85 ± 0.11	5.69 ± 0.47	5.42 ± 0.41	0.50 ± 0.02
Autoclaved control	5.33 ± 0.10	0.08 ± 0.00	1.36 ± 0.04	12.20 ± 0.19	3.14 ± 0.07	8.18 ± 0.25	15.05 ± 0.41	0.57 ± 0.02
Flat type	5.01 ± 0.48	0.07 ± 0.01	1.23 ± 0.12	3.28 ± 0.20	3.11 ± 0.22	7.20 ± 0.47	13.85 ± 1.02	0.44 ± 0.13
Mixed type	5.01 ± 0.17	0.07 ± 0.00	1.23 ± 0.03	3.62 ± 0.08	3.13 ± 0.14	7.53 ± 0.30	14.82 ± 0.34	0.54 ± 0.02
Surface	5.07 ± 0.21	0.07 ± 0.00	1.23 ± 0.05	1.71 ± 0.12	2.73 ± 0.05	6.60 ± 0.90	13.07 ± 0.21	0.50 ± 0.02
Bottom	4.90 ± 0.84	0.07 ± 0.02	1.24 ± 0.26	5.14 ± 0.80	2.77 ± 0.52	6.91 ± 0.98	13.27 ± 2.33	0.50 ± 0.07

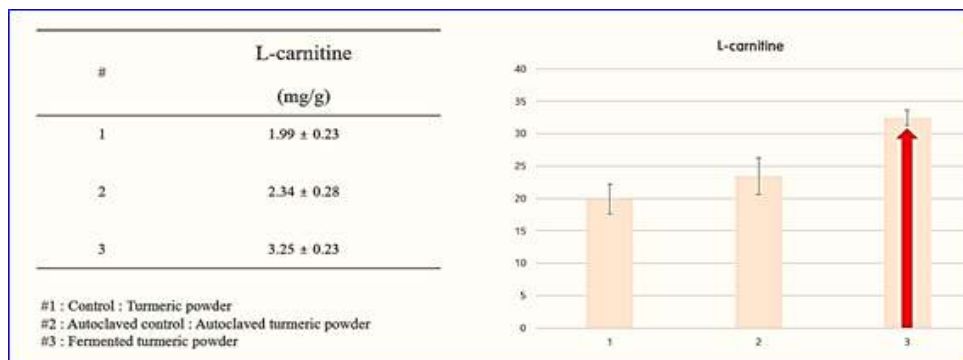


Table 2. 강황 발효 후 L-카르니틴 함량변화

④ 개발 식품 안전 소재의 항균, 항산화 등 식품 안전 특성 연구

1) 강황 발효균을 이용한 퀴노아 발효

A. 발효 퀴노아 준비:

- a) 퀴노아를 물에 12시간 상온에서 불리고 멸균기에서 20분간 찌고 70g을 소분. 1%에 해당하는 700ul의 곰팡이 spore를 희석한 물을 퀴노아에 접종.
- b) 30℃의 배양기에서 퀴노아를 담은 그릇에 랩을 잘 씌워 수분이 날아가지 않는 환경을 조성하여 3, 5일간 발효. 발효시킨 퀴노아를 하루 동안 -80℃에서 동결시킨 후에 3일간 동결건조.



Fig 3. 발효시킨 퀴노아 (왼쪽1~3: *R. oligosporus*, 오른쪽 4~6: *R. oryzae*)

B. 총 페놀 함량 측정:

- a) 동결건조한 퀴노아를 3차 증류수에 현탁 하여 0.1g/ml로 준비하고, 1시간 동안 shaking 하여 추출. 12,000rpm에 5분간 원심분리하여 상층액의 추출물을 가지고 실험.
- b) 총 페놀 함량 측정은 Folin-ciocalteu's 방법으로 진행하였으며, standard로 gallic acid를 사용하여 페놀 함량 값을 얻음. 샘플 120ul에 Folin-ciocalteu's 시약 15ul를 넣고 3분간 암소에서 반응시킨 뒤, 10%(w/v)의 sodium carbonate를 15ul 넣고 30분 뒤에 760nm에서 흡광도를 측정.

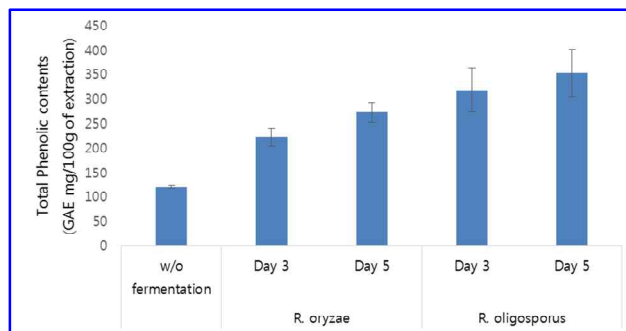


Fig 4. 발효 퀴노아의 총 페놀 함량

- c) 폴리페놀의 함량이 발효 후에 증가함. 폴리페놀류의 예로는 플라보노이드가 있으며, 이는 항산화, 항염증, 항알러지의 작용이 있음. 폴리페놀이 풍부한 퀴노아를 발효시켰을 때 어떠한 변화가 있는지 확인함.

d) 발효하지 않은 귀노아에서는 121.55mg/100g, *R. oryzae*로 각각 3일, 5일 발효 시에는 2배가량 증가한 폴리페놀 함량을 보임. *R. oligosporus*로 발효한 3일, 5일 각각의 값은 319.49mg/100g, 354.24mg/100g로 발효 전보다 3배가량 함량이 증가.

C. 항산화 특성 확인: DPPH 라디칼 scavenging activity 측정

a) 동결건조한 발효 귀노아를 0.1g/ml로 메탄올에 녹여 준비하고, 1시간 동안 shaking 하여 추출. 12,000rpm에 5분간 원심분리하여 상층액의 추출물을 가지고 실험. 1mM의 2,2-dipheyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 20ul, 귀노아 샘플 20ul, 에탄올 160ul를 96 well plate에 30분간 반응시킨 뒤 517nm의 흡광도를 측정.

b) 결과로, 발효 전에는 19.6%, *R. oryzae*로 발효했을 때에는 3일 및 5일 발효에서 각각 54.9%, *R. oligosporus*로 발효했을 때에는 3일 및 5일 발효에서 각각 45.2%와 52.5%의 항산화능이 있었음. 이 결과 발효한 귀노아에서 2.3-2.9배 증가한 효과를 확인.

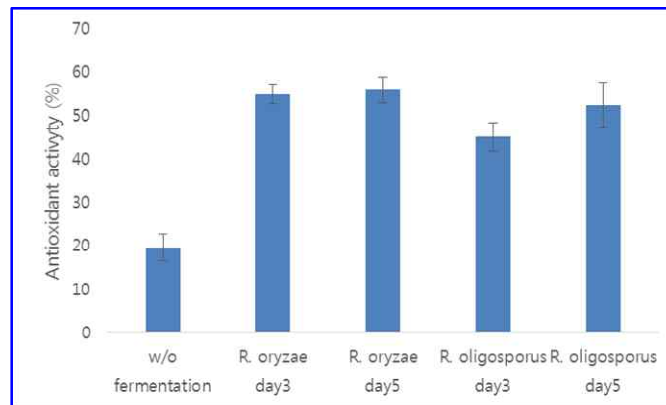


Fig 5. 50% 희석된 발효 귀노아의 DPPH antioxidant activity (%)

	SC ₅₀ (mg/ml)
w/o fermentation	N.D.
<i>R. oryzae</i> day3	4.32 0.27
<i>R. oryzae</i> day5	4.24 0.09
<i>R. oligosporus</i> day3	5.44 0.44
<i>R. oligosporus</i> day5	4.84

Table 3. 발효 귀노아의 DPPH SC₅₀

D. LC/MS를 이용한 L-carnitine, GABA, Rutin, quercetin 분석

a) 동결건조 귀노아를 0.1g/ml로 L-carnitine, GABA 분석을 위해 3차 증류수 추출, Rutin, quercetin 분석을 위해 70% 에탄올로 1시간씩 추출하여 준비함. 이를 acetonitrile에 10% 농도로 녹여 필터링하여 UPLC-MS 기계로 분석함.

Parameters	Conditions
Instrument	Waters ACQUITY H-class
Detector	Qda detector
Column	Waters ACQUITY UPLC BEH Hilic (1.7 μ m, 2.1100 mm)
Mobile phase A	15 mM ammonium formate with 0.1% (v/v) formic acid
Mobile phase B	Acetonitrile with 0.1% (v/v) formic acid
Injection volume	1 μ l
temperature	Column temperature: 40°C Sample temperature: 10°C

Table 4. L-carnitine과 GABA의 LC/MS 분석조건

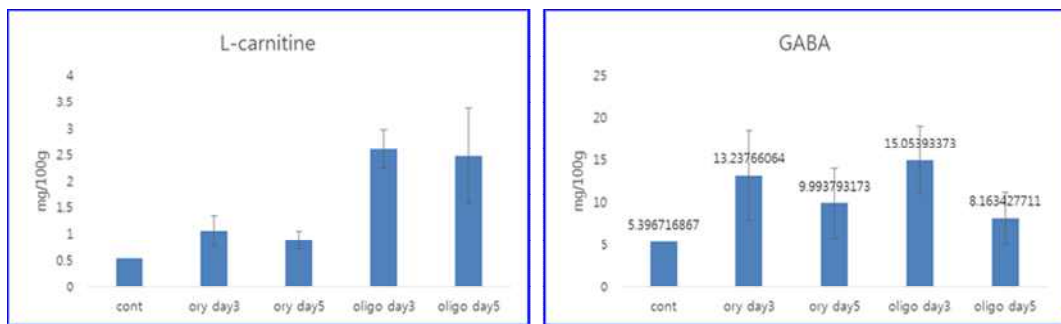


Fig 6. 발효 퀴노아의 L-carnitine, 가바 함량

b) 물로 추출하여 분석한 L-carnitine과 GABA의 양은 각각 *R. oligosporus*와 *R. oryzae*로 발효시켰을 때 함량이 증가. L-carnitine은 *R. oligosporus* 발효에서 2.5배가량 높았고, 발효 전에는 0.55mg/100g, 발효 후에는 1.07mg/100g, 0.89mg/100g, 2.62mg/100g, 2.48mg/100g을 확인.

c) 퀴노아의 발효 결과로, 발효하지 않은 퀴노아보다 약 2~5배 증가한 L-carnitine의 함량을 확인.

d) GABA의 함량은 두 곰팡이 간의 큰 생성량의 차이를 보이지 않았으며, 발효하지 않은 퀴노아의 5.40mg/100g의 함량에 비교해 순서대로 13.24mg/100g, 9.99mg/100g, 15.05mg/100g, 8.16mg/100g으로 약 2~3배 증가한 GABA의 함량을 확인함.

E. 이상의 결과로, L-카르니틴과 가바가 증가한 퀴노아를 제조하고, 발효 퀴노아의 항산화 특성 및 총 폴리페놀 성분을 확인한 결과 총 페놀 함량은 발효하기 전보다 3배가량 증가하였으며, 항산화 능력은 2.3 - 2.9배가량 증가함. 또한, 기능성 성분인 L-카르니틴과 가바의 양은 실험 조건에 따라 L-카르니틴은 2~5배 증가하였으며, 가바의 양은 2~3배 증가함. 발효시킨 퀴노아에서 가장 좋은 항산화 능은 *R. oryzae*로 5일간 발효시킨 퀴노아에서 확인.

2) 폴리페놀 성분 수용화 연구

A. 망기페린(C₁₉H₁₈O₁₁, Mr = 422.33 g/mol) 수용화 연구

a) 망기페린은 항산화, 면역, 항염증, 항균특성의 다양한 생리적인 기능으로 잘 알려진 *Mangifera indica* L. 잎의 주요 성분임. 하지만 물에 대한 용해도가 낮아 식품 산업과 약품으로 개발이 제한됨. 본 연구에서는 커피나무 잎에 있는 항산화 물질인 망기페린을 루부소사이드를 이용하여 수용성을 증가 연구를 진행함.

b) 그림에서처럼 young 잎에는 망기페린이 많이 들어 있음.

c) 루부소사이드를 이용하여 망기페린을 수용화하면 최대 788mg/100ml로 녹임. 이는 151mg/100mL의 수용성보다 5.2배 증가한 양임.

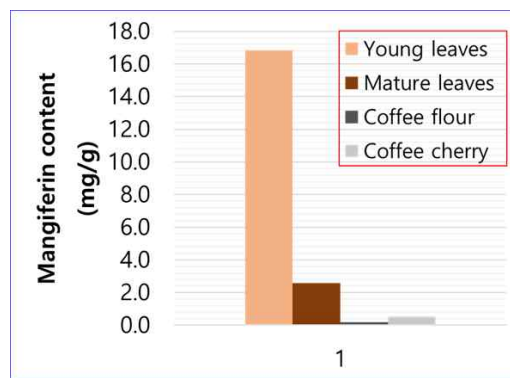


Fig 7. 커피잎, 커피체리와 체리분말 속의 망기페린 양 비교

B. 물에 녹인 망기페린, 루부소사이드 혹은 망기페린 추출물의 항충치 기능을 확인함: 뮤탄수크라제(mutansucrase)는 *Streptococcus mutans* 등에 의해 생산되는 효소로 설탕을 이용하여 불용성 글루칸인 ‘뮤탄’을 합성하고, 결과적으로 충치 형성에 주요한 역할을 하여 항충치 및 치주질환 예방을 위한 표적 효소임.

a) 루부소사이드의 뮤탄수크라아제 활성 저해 효과

㉠ 효소: 충치균으로부터 뮤탄수크라아제를 생산, 정제함.

㉡ 포도당 전이효소의 저해 효과 확인: 효소 저해 확인 반응은 기질로 루부소사이드 50mM, 설탕 500mM, 완충용액으로 Sodium phosphate buffer(pH 6.5), 효소농도 0.1U/ml로 반응. 37°C에서 12시간 동안 반응. 대조군은 설탕 500mM만을 기질로 사용.

㉢ TLC를 이용한 뮤탄수크라아제의 억제 효과 확인: 반응 이후, 원심분리하여 불용성 글루칸(Mutan)을 제거한 상등액을 TLC로 전개. Acetonitrile:water = 85:15(v/v)로 1회 올린 후, 0.3% (w/v) N-(1-naphthyl)-ethylenediamine. 5(v/v) H₂SO₄ in methanol 용액으로 코팅 후 125° C 5분 동안 황산 발색.

㉔ 불용성 Mutan 형성 비교: 원심분리하여 얻은 불용성 글루칸을 다시 동량의 1M NaOH에 녹임. TLC에 로딩한 후 0.3%(w/v) N-(1-naphthyl)-ethylenediamine, methanol 용액 중 5%(v/v) H₂SO₄ 용액으로 코팅 후 125° C에서 5분 동안 황산 발색 농도 분석. 루부소사이드 자체 항충치 특성 있음을 확인.

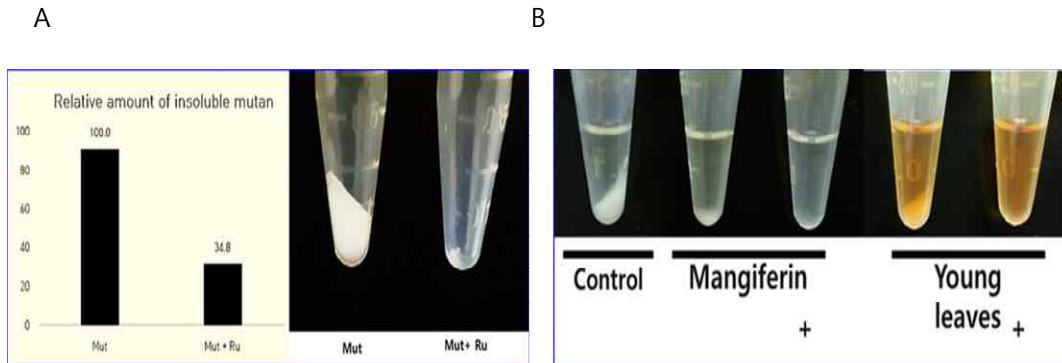


Fig 8. 루부소사이드(A), 망기페린(B), 그리고 커피잎 추출물(B)의 항 뮤탄 형성 특성

b) 망기페린, 그리고 루부소사이드로 수용화한 망기페린의 특성 확인 결과, 망기페린 자체도 항충치 특성이 있음을 확인함.

㉕ 유산균 발효액을 이용한 카페인산과 클로로젠산의 배당체 구조 결정 및 특성 연구:

1) 글루칸수크라아제를 이용한 카페인산의 배당체화

A. 카페인산은 여러 과일, 채소, 카피 등 많은 식물체에서 확인이 되는 항산화 물질로 항균특성과 더불어 염증 특성을 억제하며, 인슐린 저항성 예방에 도움이 됨. 연구에서는 배당체를 합성하여 물질특성과 기능성의 변화를 확인함.

a) 결과로, 합성한 배당체는 caffeic acid-3-O- α -d-glucopyranoside로 구조를 확인하고, 3배 높은 수용해성을 가짐을 확인함.

b) 또한, 수용액 내에서 11.5배가량 갈변이 억제되는 특성을 확인함.

B. 수용체 반응조건 확인

a) 수용체인 카페인산의 농도, 효소 활성, 그리고 기질인 설탕 농도를 3가지의 매개변수로 하여 배당체 수율 최적화 연구를 진행함. 사용한 매개변수 상관 식은 $Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3$ 이었음.

매개변수	활성/농도	Symbol code	수준				
			- 1.682 ^b	- 1	0	+ 1	+ 1.682 ^b
효소	(mU/ml)	X ₂	61.4	300	650	1000	1238.6
카페인산	mM	X ₃	30.7	150	325	500	619.3
설탕	mM	X ₁	10.2	150	355	560	699.8

b) 결과로, 얻은 상관 관계식은 $Y = -268.1 + 0.39X_1 + 0.44X_2 + 1.05X_3 - 0.00043X_1^2 - 0.00019X_2^2 - 0.0013X_3^2 - 0.0001X_1X_2 - 0.00011X_1X_3 - 0.0002X_2X_3$ 였고, 355mM 설탕, 650U/L 텍스트란수크라제, 그리고 325mM 카페인산이 있을 때 153mM의 배당체를 생산함.

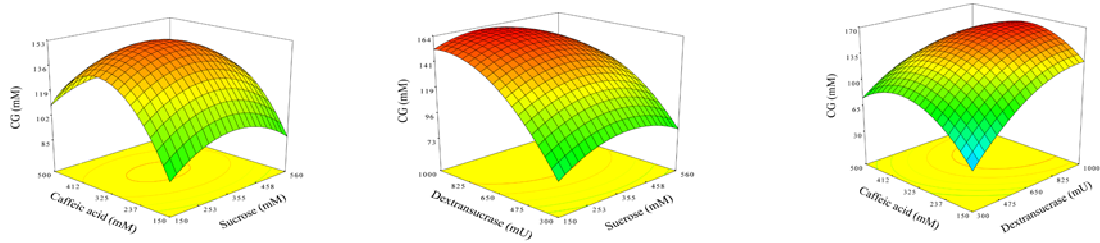


Fig 9. RSM을 이용한 카페인산 배당체 제조 최적 조건 확인

c) 정제한 배당체의 구조는 NMR분석으로 결정함. 결과로, 사용한 카페익산의 ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, 그리고 HMBC spectra(A, C, E, G, J)와 카페인산 배당체 spectra(B, D, F, H, I, K)는 아래와 같음.

d) 결과로, carbon signals 130.90ppm은 C-1, 117.04ppm은 C-5, 118.91ppm은 C-6, 137.75ppm은 C-1', 125.41ppm은 C-2', 그리고 170.54ppm은 C-3' 였음. 분자량은 $365(\text{M}+\text{Na})$ 이고, doublet signal($J=3.5\text{ Hz}$)은 5.23ppm이어서 α -linkage임을 확인할 수 있었고, 결과로 카페인산 배당체의 구조는 caffeic acid-3-O- α -D-glucopyranoside로 확인함.

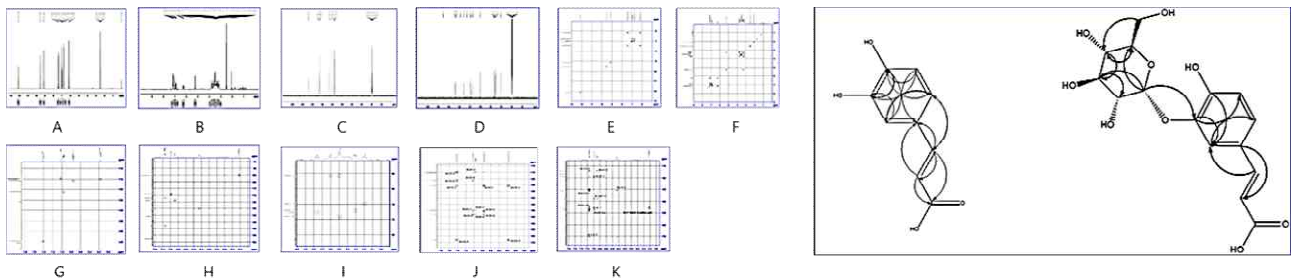


Fig 10. 카페인산과 배당체의 NMR 분석 데이터와 HMBC correlation

시료	수용성(μM)	용액 내 갈변 정도(%)
카페인산	6.5 ± 0.05^a	100 ± 0.012^a
카페인산 배당체	20.5 ± 0.12^a	8.72 ± 0.019^a

^a Mean \pm standard deviation (n = 3).

Carbon position	Chlorogenic acid (δ)		Chlorogenic acid glucoside (δ 1)		
	δ C	δ H	δ 1 C	(δ 1 - δ)	δ H
Chlorogenic acid					
1	73.50				
2	36.45	5.07 (1H, m)	36.56	(0.11)	1.93, 2.02 (2H, m)
3		5.11 (1H, m)	71.14		5.09
4	68.40	3.63 (1H, m)	70.62	(2.22)	3.56
5	70.44	3.94 (1H, m)	68.40	(-2.04)	3.92
6	37.18	5.07 (1H, m)	37.27	(0.09)	1.77, 2.07 (2H, m)
7	174.85		175.15	(0.3)	
1'	125.60		128.85	(3.25)	
2'	115.74	7.04 (1H, d, J = 1.17 Hz)	115.00	(-0.73)	7.15 (1H, d, J = 2 Hz)
3'	145.53	9.15 (1H, s)	147.32	(1.79)	8.91 (1H, s)
4'	148.30	9.57 (1H, s)	147.12	(-1.17)	
5'	114.73	6.77 (1H, d, J = 8.20 Hz)	116.84	(2.11)	7.21 (1H, d, J = 8.5 Hz)
6'	121.31	6.99 (1H, dd, J = 1.17, 8.20 Hz)	120.76	(-0.55)	7.09 (1H, dd, J = 2, 8.5 Hz)
7'	144.89	7.43 (1H, d, J = 16.11 Hz)	144.31	(-0.58)	7.47 (1H, d, J = 16 Hz)
8'	114.31	6.16 (1H, d, J = 16.11 Hz)	116.43	(2.12)	6.32 (1H, d, J = 16 Hz)
9'	165.71		165.61	(-0.1)	
Glucose					
1"			99.53		5.32 (1H, d, J = 3.5 Hz)
2"			71.97		3.34 (1H, m)
3"			73.08		3.69 (1H, m)
4"			69.90		3.18 (1H, m)
5"			73.87		3.45 (1H, m)
6"			60.67		3.49, 3.60 (2H, m)

e) 카페인산과 그 배당체의 수용성과 용액 내 안정성은 다음과 같음. 3배가량의 수용성 증가를 확인하고, 갈변 억제 특성 확인함.

f) DPPH radical-scavenging 활성: 배당체인 caffeic acid-3-O- α -d-glucopyranoside IC₅₀ value는 0.55mM로 caffeic acid와 비슷(IC₅₀=0.38mM)

2) 글루칸수크라제를 이용한 클로로젠산의 배당체 제조:

a) 항산화, 항균, 불안 완화 작용 및 간, 항암 효과가 알려진 클로로젠산의 배당체를 합성하여 기능과 물성의 변화를 확인함.

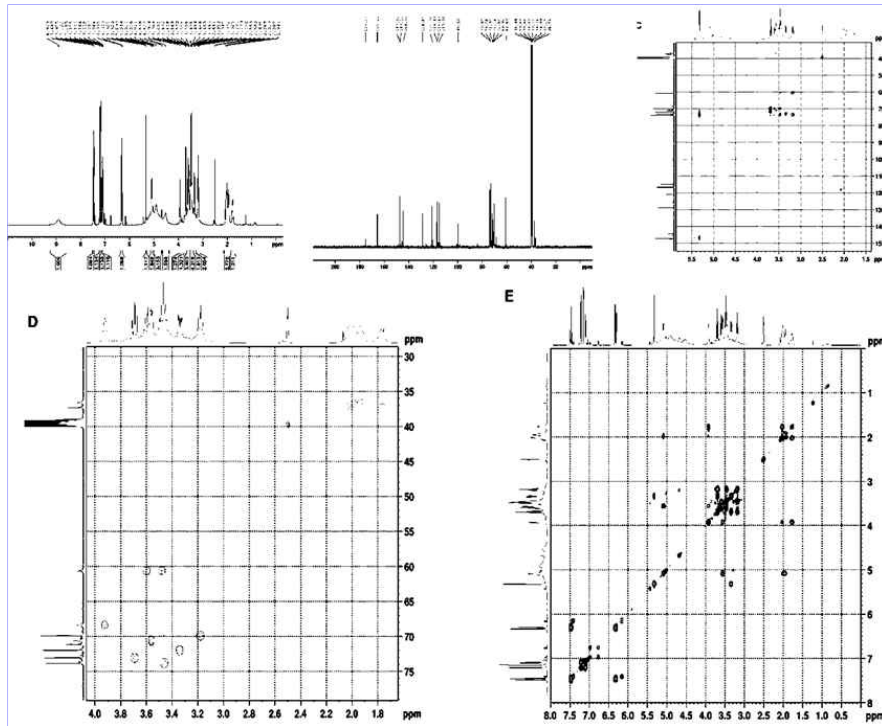


Fig 11. 클로로젠산의 ^1H spectra(A), ^{13}C spectra(B), HMBC spectra(C), HSQC spectra(D), 그리고 COSY spectra(E)

b) 다음은 클로로젠산의 ^1H spectra(A), ^{13}C spectra(B), HMBC spectra(C), HSQC spectra(D), 그리고 COSY spectra(E) 결과임. 클로로젠산-4"-0- α -D-글루코피라노시드(CHG) 구조로 확인하였고, CHG의 생산 수율은 RSM에 의해 44.0% 또는 141mM이었음. CHG는 클로로젠산보다 향상된 대장 암세포의 성장 억제 특성이 있었음.

3) 유산균 발효액을 이용한 저칼로리 카스카라 시럽 제조와 특성 연구

a) 건조 cascara 8g당 100ml의 끓는 물을 넣고 7분 동안 우려낸 다음 설탕 50%(w/v)를 첨가. Cascara 혼합물(20ml)은 Dextranucrase(5U/ml) 효소를 이용하여 2시간 동안 28°C 에서 반응. TLC와 HPLC를 이용 반응물 확인

b) 그 결과, 다양한 중합도의 올리고당을 포함하는 카스카라시럽을 제조함.

c) 카스카라에는 망기페린이 포함되어있고, 망기페린은 글루칸수크라아제의 수용체반응(아래 그림)으로 배당체화 할 수 있어 망기페린 배당체도 포함될 수 있겠음.

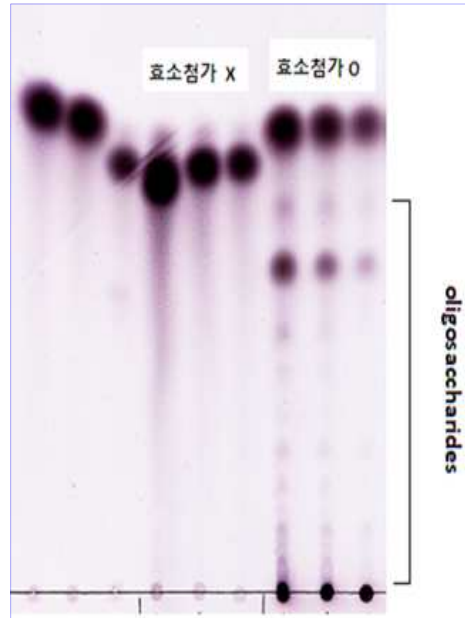


Fig 12. 유산균 발효액을 이용한 저칼로리의 Cascara 올리고당 시럽 제조

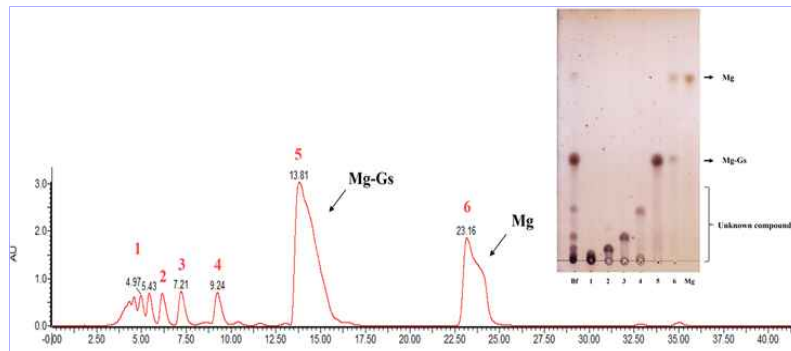


Fig 13. 망기페린의 글루칸수크라아제 수용체 반응 산물 분석

④ 2차년도 요약

- 생물전환기술로 향균 신바이오틱스 식품안전 향균 소재를 제조하고, 생산 조건을 최적화하는 연구를 진행함.
- 발효 배양액 생산 최적화, 수용화 천연 향균 소재와 난소화성 올리고당 조합 생물전환 공정 최적화, 스테비올 올리고당, 난소화성 올리고당 함유 신바이오틱스 소재 및 식음료의 특성 연구를 통해 향후 제품 업그레이드를 위한 기능성 연구와 생물전환 천연 향균 소재 포함 건강 음료의 감미질 및 기호도 조사를 진행
- SCI급 논문 4편, 특허등록 3건, 그리고 출원 13건의 실적과 2인의 인력양성 실적을 얻음.

⑤ 2차년도 상세 내용

㉞ 유산균 발효액을 이용한 난소화성 프리바이오틱스 생산 최적화

- 1) 파일럿 스케일 당전이 효소 생산 수율(역가) 최적화: 산업 배지 조성 최적화, 배양조건 최적화

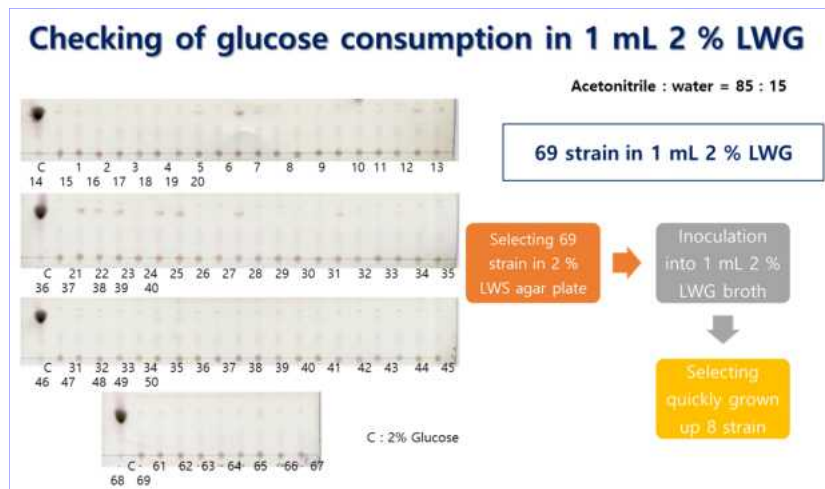


Fig 14. 69종의 미생물 중 구성적으로 당전이 효소 고생산 균주 개발

- a) 효소 고효율 생산 균주 선발: 당전이 효소 생산 69개 균주 중 8균을 포도당 소비 특성으로 우선 선발(구성적 효소 고생산 균 선발).
- b) 8균 중 2% 포도당을 이용하여 효소 고생산균 선발(100ml 배양)

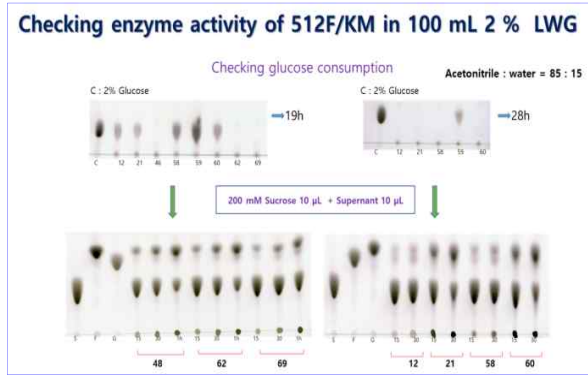


Fig 15. 8종의 미생물 중 구성적으로 당전이 효소 고생산 균주 개발

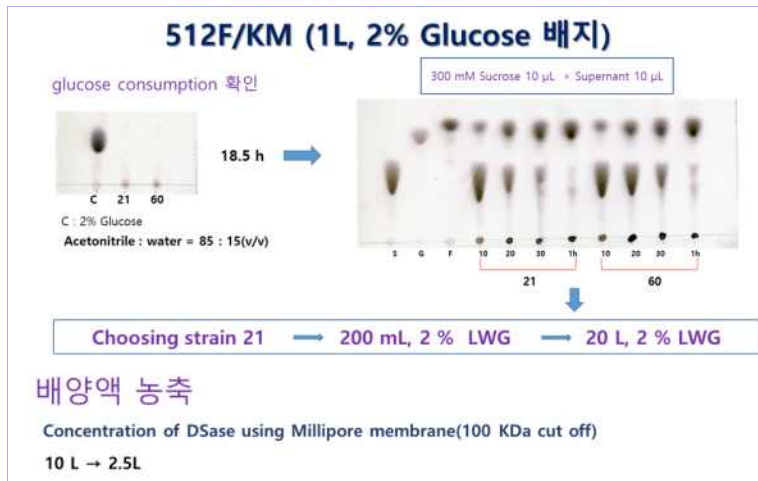


Fig 16. 최종 1종의 미생물로 구성적으로 당전이 효소 고생산(20l 발효)

c) 1리터 배양에서 활성이 우수한 균 선발; 이후 1균을 20리터 배양하고, 이중 10리터를 2.5리터로 membrane(100K cut-off)을 이용하여 농축함. 농축 후 활성과 수율을 확인.

2) 미생물배양액(효소)의 보관, 안정성, 배양액의 품질(효소 역가) 유지 조건

a) 최적 배양조건에서 63.08U/ml 생산. 농축 후에도 98% 이상 활성 유지

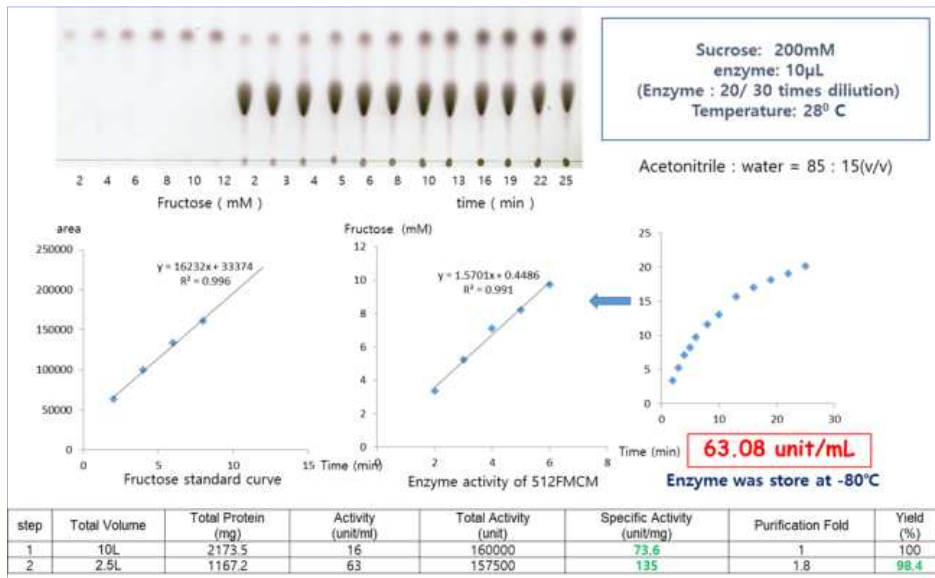


Fig 17. 최종 선발 균의 발효 후 효소 활성 확인

b) 당전이 효소의 활성 유지를 위한 첨가 소재 확인: 효소 분말화 시 비소화성 올리고당(NDOS)의 첨가가 효소 활성 유지에 좋음 확인(가속 실험 조건: 40° C, 30분 반응)

Sample	Product (%)
Control	9%
Cellibiose	18%
Mellibiose	17%
Fructo oligosaccharide	14%
Raffinose	7%
Erithritol	23%
tagatose	19%
palatose	11%
NDOs	37%
Steviol NDOs	19%
trehalose	32%

④ 개발 유산균 발효액을 이용한 수용성 강화 향균 소재 생산 및 식품 내 물질특성 연구: 천연 향균 소재 농축액(오미자), 스테비올 배당체 그리고 설탕의 효소 생물전환

1) 저열량 오미자청(오미자 올리고당)의 특성 연구

A. 1차연도에 개발한 저열량 오미자청 준비



Fig 18. pH별 오미자청 올리고당 제조 후 올리고당액과 올리고당의 다양한 중합도 당 구성

TLC 결과

- 개발한 당전이 오미자청(그림, 중합도 9이상의 올리고당 함유)은 40 brix의 오미자 농축액(평창)에 10% Calcium hydroxide를 포함하는 25% 설탕 액으로 오미자 농축액이 pH 3.8 이상이 되도록 함.
- 설탕 농도가 최종 50%(w/v)가 되도록 넣고, 512F/KM과 B-1355C/KM 발효액을 당전이 활성으로 각각 10unit/ml과 1unit/ml이 되도록 넣어 반응시킴(37° C).

B. 저열량 오미자 올리고당의 항산화 특성 확인

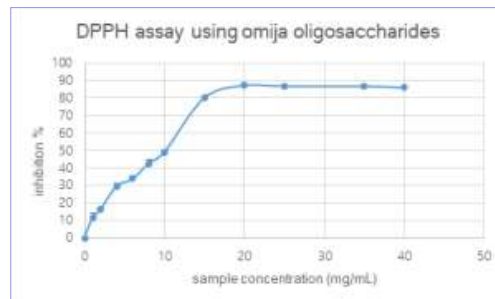


Fig 19. 저열량 오미자 올리고당의 항산화 특성

- DPPH를 1mM이 되도록 100% MeOH에 녹여 시약을 준비. MeOH 100% 140ul와 샘플 40ul를 먼저 반응시키고, 20ul DPPH 시약을 첨가하여 1분 동안 vortexing 후 30분 동안 25°C 에서 빛을 차단하여 반응함. 517nm에서 흡광도를 측정하여 SC₅₀값을 구함.
- 결과로 오미자 올리고당의 SC₅₀값은 10mg/ml임을 확인.

C. 오미자 올리고당의 MIC assay를 이용한 항균 활성 확인

- Optical density 를 1.0 으로 맞춘 *S. mutans* 균을 5ul, BHI 배지를 95ul 넣고, 100ul 의 오미자 올리고당을 연속적으로 희석하여 96 well plat 에 넣음. 24 시간 37°C 에서 배양하여 A₆₀₀ 에서 흡광도를 측정하여 MIC 값을 구하고 흡광도가 0 이 나온 가장 낮은 농도(MIC)의 well 에서 BHI

agar 배지에 도달하여 샘플이 균을 inhibition 하는지 완전히 죽이는 성장 억제 특성이 있는지를 확인함.

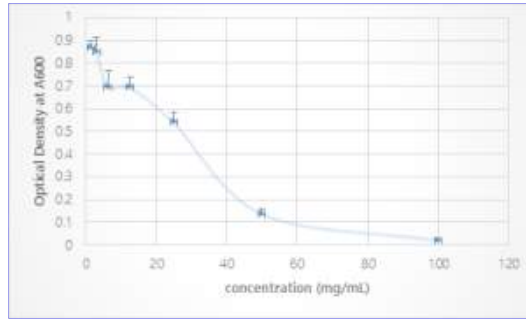


Fig 20. 오미자 올리고당의 농도에 따른 항균특성 확인

b) 결과로 오미자 올리고당의 농도가 100mg/ml 일 때, *S. mutans* 균의 성장을 억제하는 것을 확인하였고, 이를 agar 배지에 도달하니 균이 자라는 것을 확인하여 오미자 올리고당은 균을 사멸하는 물질이 아니라 균의 성장을 억제하는 효과가 있음을 확인함.

D. 오미자 올리고당의 mutansucrase inhibition assay를 통한 항충치 효과 확인

a) *S. mutans* 균에서 얻은 mutansucrase(0.1U/ml)를 100mM 설탕, 20mM sodium phosphate를 넣고 37° C, pH 6.8에서 12시간 반응 함, 여기에 6.25%~50%(v/v)의 시료를 각각 넣음. Positive control로는 샘플을 넣지 않고, Negative control은 설탕을 넣지 않음.

b) 원심분리 후, 효소 반응으로 형성되는 불용성 글루칸을 물로 3번 이상 씻어준 후 동량의 1M NaOH로 녹여 TLC로 총 양을 분석함. AlphaEaseFC 4.0 Image Program을 이용하여 정량적으로 분석함.

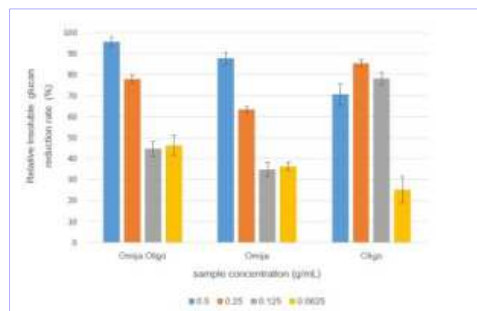


Fig 21. 오미자 올리고당, 오미자 추출물, 올리고당의 항-뮤탄 특성

c) 결과로 오미자 올리고당, 오미자, 그리고 올리고당을 500mg/mL의 농도로 준비한 경우는 positive control에 비해 각각 96%, 88%, 그리고 71% 억제 효과를 보임. 250mg/mL은 각각 78%, 63%, 그리고 85% 억제 효과가 나타남. 125mg/mL의 농도에서는 각각 45%, 35%, 그리고 78% 불용성 글루칸 형성의 억제를 확인함. 오미자 올리고당은 오미자와 올리고당의 두 특성이 뮤탄의 형성을 억제하는 것을 확인함.

d) 특히 오미자의 경우는 pH가 다른 시료에 비해 낮아 pH에 의한 억제 특성도 있을 것으로 생각함. 이는 62.5mg/ml의 농도로 샘플을 처리하였을 때, 각각 46%, 36%, 그리고 25%의 불용성 글루칸 형성 억제를 확인.

E. 오미자 올리고당 중 총 페놀 화합물량

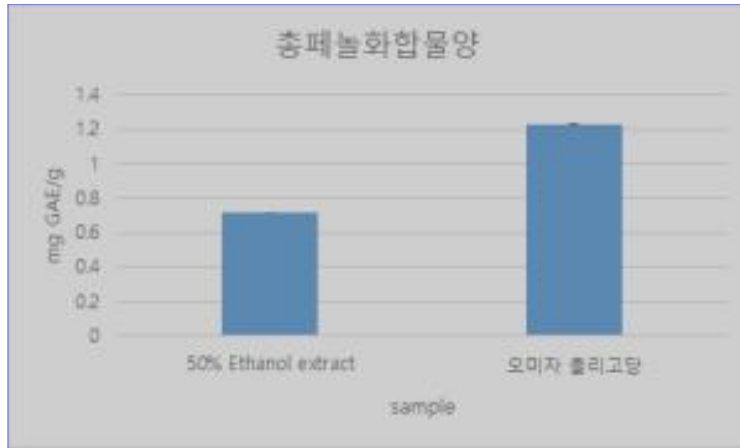


Fig 22. 오미자 올리고당 중 총 페놀 화합물량

- a) Folin-Ciocalteu Reagent (FCR) assay에 따라 총 페놀 화합물 함량을 결정함.
- b) 약 1.2mg GAE/g 오미자 분말로 확인함.

F. 오미자 부산물 항균특성

- a) 오미자시럽을 만들기 위해서 추출하고 남은 오미자껍질과 씨의 성분을 물과 에탄올로 추출하여 특성을 확인함.

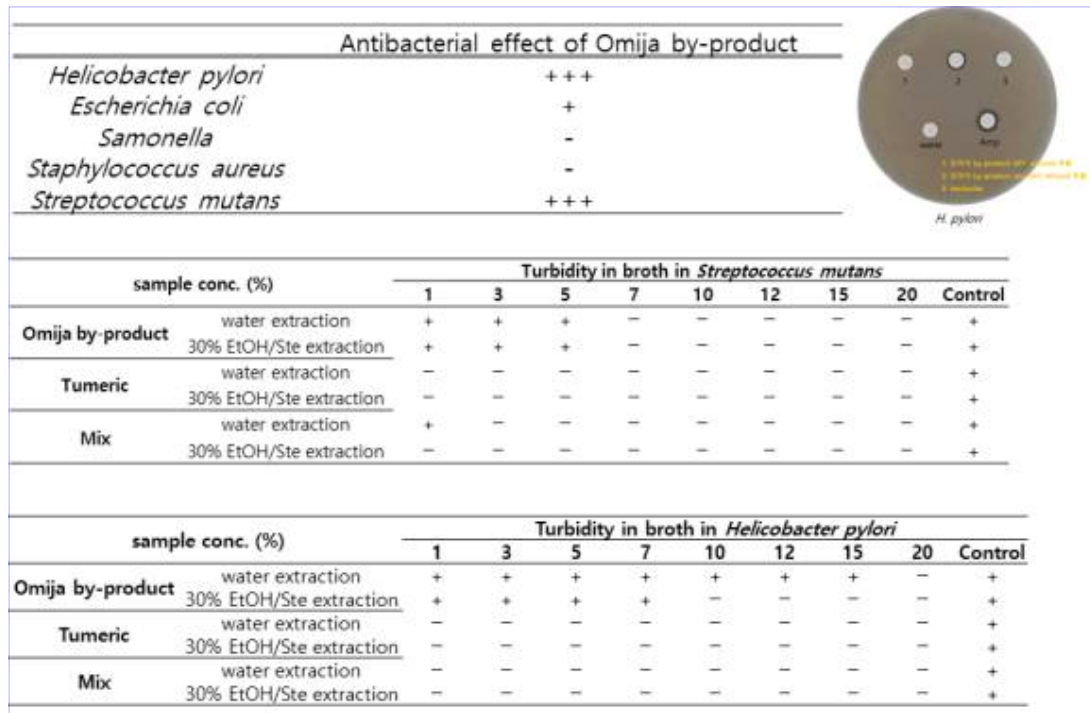


Fig 23. 오미자 부산물의 항균특성

- b) 그 결과, 추출물은 *H. pylori*와 *S. mutans*의 성장을 억제함을 확인. 이 성분은 농도별로 두 균의 성장에 영향을 주는 정도를 확인하였으며, 물 추출성분과 30% 에탄올 액/스테비오사이드 추출물에서 모두 5%의 농도에서 류탄스균의 성장 억제를 확인함.
- c) 헬리코박터 파이롤리 균의 경우는 30% 에탄올/스테비오사이드 추출물에서 물 추출물의 경우에서보다 더 높은 균 성장 억제 특성을 확인. 항균특성은 각 시료에 들어 있는 오미자의 항균 성분인 시잔드린과 고미신의 역할로 예측됨.

(g/Kg)	Omija By-Product (<i>Schisandra chinensis</i>)		
	Schisandrin	Gomisin A	Gomisin N
DW extract(Ex)	10.74±0.19	0.83±0.03	0.52±0.02
30% EtOH Ex	12.63±0.23	1.19±0.05	ND
30% EtOH+ Stevioside Ex	21.90±0.28	4.55±0.06	8.17±0.10
100% EtOH Ex	15.86±0.22	3.06±0.05	20.80±0.20
100% EtOH+ Stevioside Ex	16.22±0.24	3.51±0.04	17.63±0.03

Table 5. 시료별 오미자 리그난 성분 함량 비교

- d) 오미자 가공 부산물에 들어 있는 성분은 물과 30% 에탄올/스테비오사이드로 추출한 시료에서 모두 오미자의 지표 물질인 시잔드린과 고미신 A, 고미신 N이 물 추출물에서 더 많이 확인됨.

2) 난수용성 올리고당 함유 저열량 천연 감미소재

- a) 유산균 발효액 2가지를 이용하여 난수용성 올리고당을 합성함. 2가지의 올리고당을 준비
- b) 한 가지는 설탕액을 올리고당화(발효설탕)한 시료이고 다른 한 가지는 스테비오사이드와 설탕의 혼합기질에 발효액으로 효소 반응을 한 올리고당(스테비올 올리고당)임.

A. 각 시료의 열량 확인

- a) 각 시료의 칼로리를 비교한 결과 발효 설탕(설탕 발효액 반응 난소화성 올리고당)은 열량이 설탕액에 비해 33% 정도였으며, 스테비올 올리고당은 설탕액과 스테비오사이드를 혼합한 액에 비해 49.5%의 열량을 보임.

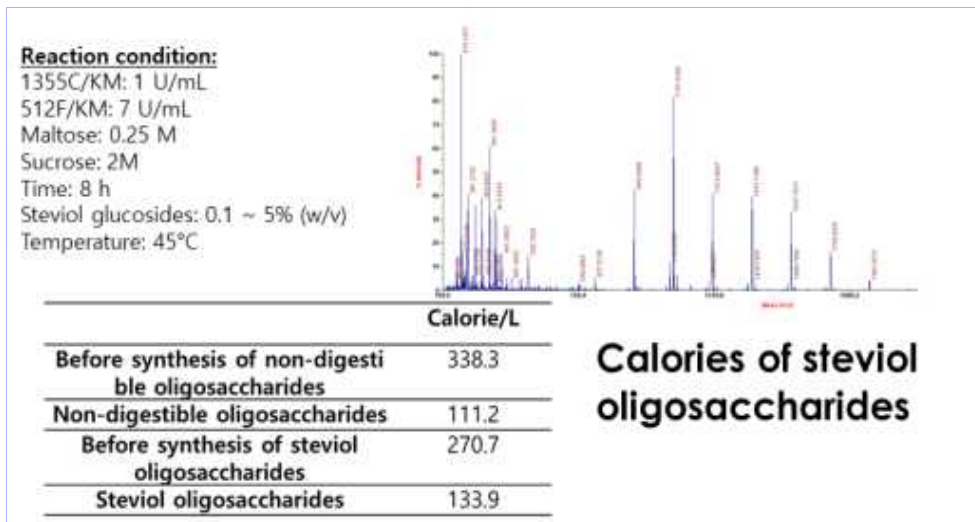


Fig 24. 스테비올 올리고당의 열량

- b) 특히 스테비올 올리고당은 감미 특성이 우수하고 감미도가 설탕액에 비해 100배 이상 높아 다양한 식품 감미 소재로 활용을 기대하게 함.

B. 스테비올 올리고당을 이용한 난수용성 강황 성분의 수용화

- a) 강황 가루를 물에 현탁하여 충분히 vortexing을 한 후 수용화된 커큐미노이드 성분의 양을 확인한 결과 거의 확인되지 않음.
- b) 하지만 스테비올 올리고당의 농도를 증가시키면 100% 스테비올 올리고당을 이용하는 경우 10%를 이용하는 경우에 비해 150배 이상 수용화된 커큐미노이드가 증가함을 확인함.

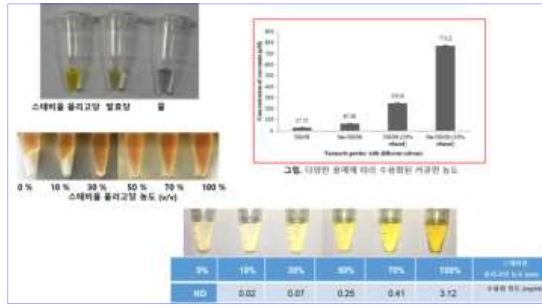


Fig 25. 스테비올 올리고당 % 별 수용화 강황 커큐미노이드 양 변화

C. 스테비올 올리고당의 뮤탄 형성 억제 특성

a) 스테비올 올리고당을 0.5% ~ 3%로 뮤탄수크라아제와 설탕의 반응기에 넣어주는 경우 불용성 글루칸 형성 억제 정도가 80% 이상 증가함을 확인함. 이는 스테비오사이드와 올리고당의 시너지 특성으로 생각함.

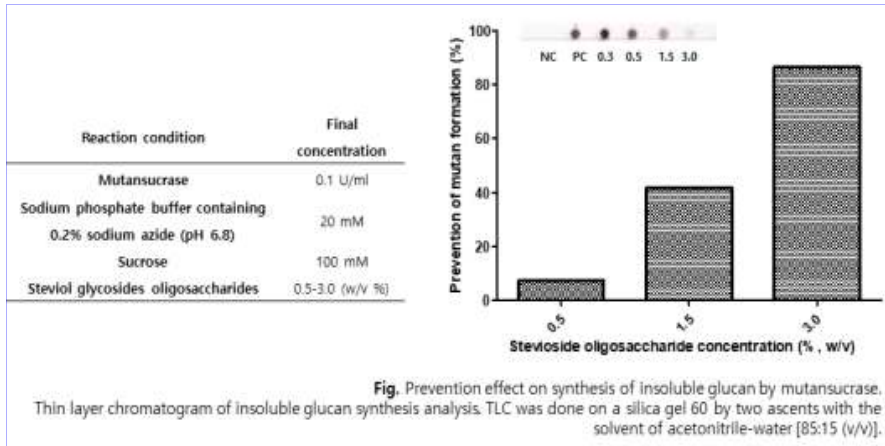


Fig 26. 스테비올 올리고당 % 별 불용성 글루칸(뮤탄) 형성 억제 특성

㊤ 천연 및 발효 식품료 환경에 대한 적용

1) L-카르니틴 강화 발효 메밀의 활용

a) 발효 메밀을 이용한 L-카르니틴 강화 막걸리

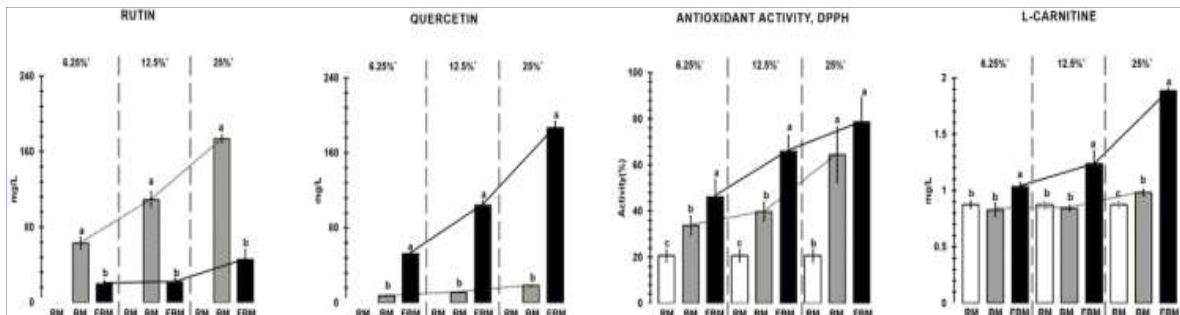


Fig 27. 발효 메밀을 이용한 막걸리 제조 후 성분 비교

- b) 결과로 쌀막걸리에서는 확인되지 않은 항산화, 항균 소재인 루틴과 퀘르세틴의 함량이 (발효) 메밀을 첨가한 막걸리에서 많이 증가.
- c) 특히 발효 메밀을 이용한 경우 두 성분의 함량이 많이 증가하였고, L-카르니틴의 양도 쌀막걸리나 메밀 막걸리에서 확인되지 않던 것이 확인됨. 이러한 결과로 쌀막걸리나 메밀 막걸리의 경우보다 발효 메밀 막걸리의 항산화 특성이 많이 증가한 결과를 보이는 것으로 생각됨.
- d) 쌀막걸리와 비교하여 색깔이 메밀 색이 나는 것 외에 관능성은 쌀막걸리와 비슷하였음.

Type	Appearance	Flavor	Bitterness	Sweetness	Sourness	Overall
RM	7.4±1.2 ^a	5.2±2.0	4.5±1.2	4.9±2.3	5.5±1.6	5.6±1.6
BM_6.25	7.3±1.6 ^a	5.4±1.4	5.8±1.4	5.3±2.2	5.0±2.2	5.8±1.9
BM_12.5	6.6±1.3 ^a	5.8±1.2	5.5±2.1	4.7±2.1	5.2±1.6	5.5±1.9
BM_25	6.4±1.1 ^a	5.9±1.1	5.3±0.9	4.6±1.9	5.1±2.0	5.2±1.2
FBM_6.25	5.7±1.4 ^{a,b}	6.3±1.6	5.4±2.0	5.5±2.0	5.4±1.9	5.6±2.2
FBM_12.5	4.3±1.3 ^{b,c}	5.1±1.3	5.1±1.9	4.6±2.3	5.1±2.3	5.5±2.0
FBM_25	3.7±1.6 ^c	4.8±1.4	5.0±1.7	4.8±2.2	4.8±2.4	4.7±1.8

Table 6. 메밀, 발효 메밀 및 쌀로 제조한 막걸리 맛특성 비교

B. 발효 메밀을 이용한 L-카르니틴 증가 느타리버섯 재배

a) 곰팡이를 이용한 메밀 및 밀기울의 발효: 밀기울 15g, 메밀가루 15g, 밀기울과 메밀가루 혼합물 15g을 무게를 재고 각각 250 ml 삼각플라스크에 넣어 멸균(121°C, 15분)한 뒤 Dry oven(60°C)에서 3시간 동안 건조. 건조한 시료에 멸균 증류수 20ml를 넣고 아래의 표에서와같이 균주를 각각 접종한 후, 30°C에서 3일간 발효. 리조푸스 오리재(*Rhizopus oryzae*), 리조푸스 올리고스포르스(*Rhizopus oligosporus*)는 감자 덱스트로스 한천(potato dextrose agar; PDA) 배지에 도말 하여 30°C에서 3일간 배양함.

발효 원료	사용 균주	사용 균주
밀기울	<i>R. oryzae</i>	<i>R. oligosporus</i>
밀기울 + 메밀가루	<i>R. oryzae</i>	<i>R. oligosporus</i>
메밀가루	<i>R. oryzae</i>	<i>R. oligosporus</i>

Table 7. 버섯 배지 원료와 발효균

b) 발효 산물의 L-카르니틴 함량 측정 결과는 아래와 같음. 표에서 *R. oryzae* 균주로 메밀가루를 발효시키는 경우 밀기울 단독 또는 밀기울과 메밀가루를 혼합하는 경우보다 L-카르니틴 생성이 2배 이상 많이 되었고, *R. oligosporus*의 경우에는 밀기울과 메밀가루를 혼합하는 경우 L-카르니틴이 가장 많이 생성됨.

	<i>R. oryzae</i> (mg/100 g)	<i>R. oligosporus</i> (mg/100 g)
밀기울	1.4	1.1
밀기울 + 메밀 가루	1.5	4.3
메밀 가루	3.4	3.6

Table 8. 버섯 배지 원료 종류에 따른 L-카르니틴 생성량

c) 발효 산물을 이용한 버섯의 L-카르니틴 함량 비교: 발효 산물에 의한 실제 버섯의 함량 비교를 위해 느타리버섯을 재배해 L-카르니틴 함량을 비교함. 850ml 병에 폐면, 폐면 펠렛, 면실 박, 밀기울, 팽화 왕겨, 옥수수 이삭속(콘코브) 등이 혼합된 같은 배지를 510g씩 채우고 무균상태에서 노랑 느타리버섯 종균을 같게 seeding 함. 종균이 투입된 배양 병은 다음 표와 같이 10ml씩 첨가물을 처리한 후 직사광선이 들지 않는 상태에서 온도를 20 또는 22°C로 조절하고, 습도 역시 65~75%로 조절된 환경에서 배양함.

Group	첨가물 (총 10ml)
A	증류수 10mL
B	메밀가루+균 혼합물 10ml
C	발효메밀추출물 2g + 증류수(remain)
D	L-카르니틴 20mg + 증류수(remain)

Table 9. 버섯 시료

d) 배양 종료 후 효소 분석법으로 L-카르니틴 함량을 측정함. 각 샘플을 적당히 희석한 후 reaction mix 50 μ l에 시료 10 μ l 와 buffer 40 μ l를 넣어 줌. 이때, blank는 증류수10 μ l에 buffer 40 μ l를 넣어주고 reaction mix를 넣어 줌. 같은 조건으로 다른 well에 reaction mix에서 enzyme 만 제거한 후 50 μ l를 넣어 샘플 속의 L-카르니틴 양을 측정함. 그 결과는 표와 같음.

	노랑 느타리버섯			
	무게 (g)	A 비례 무게 (%)	건조 시료 200mg당 L-카르니틴양 (μ g)	A 대비 L-카르니틴양 (%)
A	16.35	100	104.5	100
B	30.25	185.0	204.7	195.9
C	50.06	306.2	217.4	208.0
D	23.64	144.6	582.6	557.5

Table 10. 버섯 시료별 L-카르니틴의 양 비교

e) 일반 배지보다 메밀과 발효균을 섞어준 (B)의 경우 버섯의 성장이 85% 더 촉진되었으며, 버섯 중 L-카르니틴 양도 약 96% 증가함. 발효 메밀의 추출물이 첨가된 (C)는 성장을 200% 이상 촉진하였으며, L-카르니틴의 양도 200% 이상 증가됨. 이는 카르니틴을 직접 투여한 (D)에서도 확인되어 무게는 약 45% 증가하는 데 그쳤으나, 버섯 중의 카르니틴의 양은 500% 이상으로 증가 되어 버섯의 배지에 메밀+발효용 균, L-카르니틴 함유 발효 메밀 추출물 및 L-카르니틴 직접 투여를 통해 버섯의 L-카르니틴의 함량이 증가한 것을 확인함.

f) 리조푸스 올리고스포로스 균을 이용한 단메밀(CB)과 쓴메밀(TB)의 발효 전후의 L-카르니틴, 총 페놀 함량, 퀘르세틴, 루틴의 양을 확인함. 이때 구성 배지의 조성 과 발효 결과는 다음과 같음.

G: 기본배지; CB: 단 메밀; FCB: 발효 단메밀; TB: 쓴 메밀; FTB: 발효 쓴메밀

Medium	Medium composition (g/bottle)							Medium weight per bottle (g)	Buckwheat proportion to medium (% w/w)	Buckwheat proportion to total medium weight (%w/w)
	Poplar saw dust	Cotton seed meal	Beet pulp	Buckwheat						
				CB	FCB	TB	FTB			
G	144.7	36.2	36.2	-	-	-	-	620	0	0
CB	135.3	33.8	33.8	14.0	-	-	-	620	20.74	2.26
FCB	135.3	33.8	33.8	-	14.0	-	-	620	20.74	2.26
TB	135.3	33.8	33.8	-	-	14.0	-	620	20.74	2.26
FTB	135.3	33.8	33.8	-	-	-	14.0	620	20.74	2.26

Table 11. 배지의 조성과 발효 결과

g) 발효 메밀의 L-carnitine과 총 페놀 함량 수준

㉠ 1kg의 단 메밀과 쓴 메밀은 각각 11.3mg과 6.2mg의 L-carnitine 포함함. *R. oligosporus* 발효 후 두 시료에서의 L-carnitine은 증가 함[1kg 메밀 기준; 11.3mg에서 26.2mg(FCB), 6.2mg에서 38.4mg(FTB)].

㉡ 발효 후 쓴 메밀에서의 증가가 단 메밀에서의 증가보다 큼. 쓴 메밀은 619.4% 증가, 단 메밀은 231.8% 증가.

㉢ 총 페놀 함량은 발효 후 증가함. 하지만 퀘르세틴의 경우 발효 후 두 시료에서 모두 감소함. 반면에, 루틴의 양은 쓴 메밀에서 발효 후 3,923.2에서 5,148.1 mg/kg으로 증가함.

CB: 단 메밀; FCB: 발효 단메밀; TB: 쓴 메밀; FTB: 발효 쓴메밀. TPC: 총 페놀함량은 garlic acid equivalent (GAE). Each mean value was written with standard error of the mean (SEM). For each parameter, asterisk star (* or **) means significantly different ($p < 0.05$ or $p < 0.01$) from non-fermented buckwheat.

Buckwheat	L-carnitine (mg/kg)	Total phenolic content(mg GAE/kg)	Quercetin (mg/kg)	Rutin (mg/kg)
CB	11.3 ± 0.4	1470.1 ± 57.9	19.3 ± 0.4	75.9 ± 4.5
FCB	26.2 ± 0.6**	3466.8 ± 102.6**	14.7 ± 0.8**	71.4 ± 2.0
TB	6.2 ± 0.1	5372.3 ± 114.5	3155.6 ± 68.3	3923.2 ± 90.7
FTB	38.4 ± 0.5**	7279.3 ± 176.2**	2619.0 ± 89.7**	5148.1 ± 188.5**

Table 12. 배지의 조성에 따른 버섯 성분 비교

h) 발효 메밀을 이용하여 성장한 버섯들의 L-carnitine 함량 수준

㉠ 느타리버섯을 FCB(발효단메밀) medium에 키웠을 때 기본 배지(G)에서 키운 경우보다 L-carnitine 양은 22.3% 증가함.

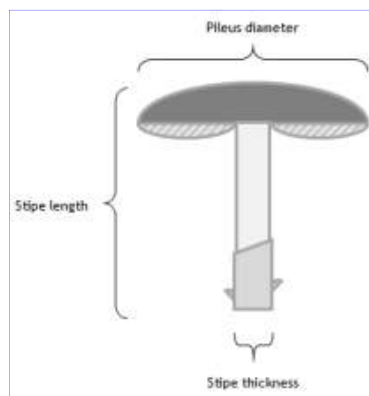


Fig 28. 버섯 부위 용어

㉡ 증가 정도는 발효 쓴 메밀(FTB)보다 발효 단 메밀을 사용하는 경우 더 증가 됨.

i) 메밀 배지에서 재배한 버섯의 외형상 특징

㉠ 버섯의 무게와 수분의 양은 모든 시료에서 비슷함.

㉡ 버섯의 크기[total size index (TSI)]는 FCB 배지에서 자란 경우가 기본 배지에서 자란 것에 비해 많이 증가함.

G: Basal medium; CB: Common buckwheat; FCB: Fermented common buckwheat; TB: Tartary buckwheat; FTB: Fermented Tartary buckwheat. For each parameter, values in the same column with asterisk star (* or **) are significantly different ($p < 0.05$ or $p < 0.01$) from basal medium (G). Each mean value was written with standard error of the mean (SEM). + Total size index =

medium	Cultivation Number	Sampling number	Formation rate(%)	Mushroom weight (g/bunch)	Moisture (%)	Pileus diameter (cm)	Stipe length (cm)	Stipe thickness (cm)	Color			Total size index†
									L*	a*	b*	
G	48	10	97.9	170.6 ± 7.8	89.7 ± 0.3	3.0 ± 0.1	8.1 ± 0.4	1.2 ± 0.0	41.8 ± 0.9	2.6 ± 0.1	4.1 ± 0.2	52.1 ± 6.3
CB	32	10	96.9	187.3 ± 7.8	88.1 ± 0.5	3.0 ± 0.2	10.3 ± 0.5**	1.3 ± 0.1	50.1 ± 1.6**	3.6 ± 0.2**	6.3 ± 0.5**	78.9 ± 11.5
FCB	32	10	93.8	181.4 ± 5.3	88.3 ± 0.4	4.0 ± 0.2**	9.5 ± 0.6	1.4 ± 0.0	50.6 ± 0.9**	3.6 ± 0.1**	6.5 ± 0.4**	100.7 ± 11.7*
TB	32	10	96.9	180.9 ± 10.5	89.7 ± 0.2	3.2 ± 0.2	10.0 ± 0.5	1.3 ± 0.0	48.2 ± 0.8**	3.5 ± 0.1**	5.8 ± 0.4	80.9 ± 11.6
FTB	32	10	96.9	182.6 ± 9.0	89.5 ± 0.2	3.2 ± 0.2	10.1 ± 0.3	1.3 ± 0.0	49.2 ± 0.8**	3.6 ± 0.1**	6.6 ± 0.4**	82.1 ± 11.5

Table 13. 배지 조성에 따른 재배 버섯 특성

j) 메밀 배지에서 재배한 버섯 추출물의 항산화 특성

㉠ 버섯 시료의 에탄올 추출물에 대한 항산화 특성을 DPPH 방법으로 확인하였고 0.2 ~ 1.5 mg/ml 가량 확인됨.

㉡ 라디칼 소거 능은 농도 의존적으로 증가함. 1.5 mg/mL의 시료 농도에서 기본 배지에서 재배한 버섯은 25.9%이었고, 2가지 단 메밀 모두 38.7%였으며, 쓴 메밀과 발효 쓴 메밀은 각각 28.7과 30.9%의 라디칼 소거 능력을 보임.

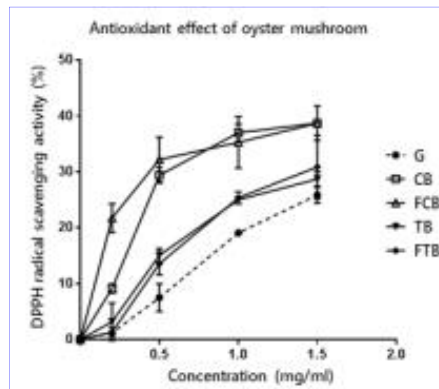


Fig 29. 메밀 배지에서 재배한 버섯 추출물의 항산화 특성

k) 메밀 배지에서 재배한 버섯 추출물의 세포 독성(against Raw 264.7)

㉠ 버섯 자실체의 에탄올 추출물을 Raw 264.7 cells에 처리하여 세포 독성을 확인(18.75 ~ 1,200 μg/ml).

㉡ 0~75 μg/ml 농도에서 Raw 264.7 cells의 생존은 90%이었음. 300 μg/ml에서는 세포 생존율은 58.9 ~ 67.8% 었음.

㉢ L-카르니틴이 스트레스를 완화하는 특성이 있지만, 세포 생존율과의 관련성은 더 확인을 해 보아야 할 것임. 특히 발효한 쓴 메밀에서 키운 버섯의 추출물 결과는 더 확인이 필요할 것임.

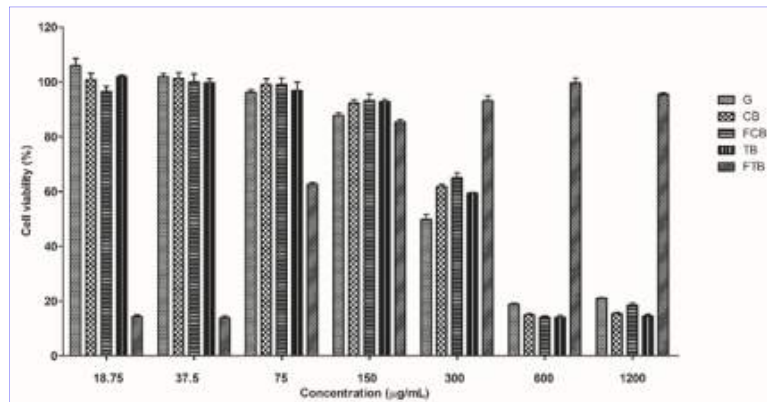


Fig 30. 메틸 배지에서 재배한 버섯 추출물의 세포 독성

C. 천연 및 발효 식품 환경에 대한 적용



Fig 31. 콤부차 스코비와 스코비 미생물 사진

a) 콤부차

- ㉠ 콤부차(combucha)는 국내에서 홍차 버섯으로 알려진 박테리아와 효모의 공생 군사체에 의한 발효로 얻어지는 발효 음료로서 주로 홍차와 설탕을 주원료로 제조.
- ㉡ 콤부차는 홍차와 설탕의 혼합액에 발효제로서 효모에 의한 알코올 발효와 초산균에 의한 초산발효 작용 때문에 제조. 특히, 정치 배양을 통한 콤부차 음료의 제조에서 초산균은 주된 대사산물로써 아세트산을 생산하는 동시에 생고분자 물질인 미생물 셀룰로오스를 발효액 표면에 두꺼운 막 형태로 생산.
- ㉢ 콤부차는 활성산소 생성억제를 통한 항산화능, 항균능, 항암능, 상처 치료 효과, 간기능 보호 등과 같은 다양한 생리활성을 갖는다고 보고되어 있고, 최근에는 콤부차가 체내 독소를 배출하며 면역력을 높일 뿐만 아니라, 위장 및 대장에 유익한 유산균이 많아 소화를 돕는다고 알려져 있음.
- ㉣ 본 연구에서는 개발된 감미소재인 스테비올 올리고당을 이용하여 저열량의 콤부차를 개발

하고자 함. 그리고 제조 콤부차의 특성을 확인함.

㉔ 20여 종의 과채즙, 허브 등의 콤부차를 제조함. 그리고 각 샘플에 맞는 스코비를 개발함.

㉕ 오미자 콤부차의 경우 설탕을 첨가한 것, 발효설탕(설탕액을 유산균 배양액으로 당전이 반응 후 제조한 올리고당)을 첨가한 것, 그리고 스테비올 올리고당을 첨가한 것을 각각 준비하여 그 특성을 확인함.

㉖ 결과로 pH는 발효가 진행함에 따라 낮아지고, 각 샘플들은 2.2 ~ 2.9정도 임을 확인. 오미자 콤부차의 경우 넣어준 당에 따라 차이가 있으나 2.3 ~ 2.6 범위임.

No	Samples	pH			
		d-0	d-5	d-10	d-15
1	Omija sugar	2.54	2.51	2.35	2.34
2	Omija OS	2.78	2.68	2.58	2.58
3	Omija steviol OS	2.65	2.46	2.39	2.35

Table 14. 오미자 시료별 콤부차 pH

㉗ 오미자 콤부차의 경우 모든 탄소원에 대해서 발효가 잘 진행되었으며 총폴리 페놀 화합물의 양은 다음 표와 같음.

Total phenolic contents (mgGAE/g)			
	Sugar	Oligosaccharide	Steviol Oligosaccharide
Day0 (before SCOBY)	7.72 ± 0.51	8.01 ± 0.51	8.34 ± 0.08
Day 0 (after SCOBY)	7.36 ± 0.03	7.91 ± 0.31	8.83 ± 0.26
Day 5	8.00 ± 0.10	9.22 ± 0.03	10.00 ± 0.11
Day 10	9.27 ± 0.28	9.32 ± 0.16	10.21 ± 0.27
Day 15	8.47 ± 0.21	8.84 ± 0.06	10.17 ± 0.19

Table 15. 오미자 콤부차의 총 페놀 함량

㉘ 발효가 진행됨에 따라 증가하였으며, 특히 스테비올 올리고당을 사용한 오미자 콤부차에서 많이 증가함을 확인함. 이는 스테비올 올리고당의 난수용성 소재 수용화 능력과 관련이 있을 것으로 생각됨.

㉙ 오미자 콤부차의 사용 당 종류별 열량을 확인함. 결과로 콤부차 자체의 열량은 일반 과채즙 음료보다 낮음(일반 콤부차는 50~60kcal/200ml). 더군다나, 발효설탕 혹은 스테비올 올리고당을 사용한 오미자 콤부차는 설탕을 사용하였을 때 보다 35% 이상 감소함.

Sample	Lignan compound (mg/100 mL)		
	Schisandrin	Gomisin A	Gomisin N
Kombucha with sugar	10.13 ± 1.53	2.05 ± 0.39	0.74 ± 0.07
Kombucha with OS	11.41 ± 0.29	2.29 ± 0.04	1.19 ± 0.03
Kombucha with Ste OS	10.96 ± 0.20	2.29 ± 0.03	1.03 ± 0.02
Concentrated omija	1046.33 ± 26.54	147.67 ± 4.62	157 ± 2.65

Table 16. 오미자 콤부차의 리그난 성분

㉞ 각 오미자 콤부차의 평균 및 항산화 성분인 리그난 성분의 구성을 확인함. 세 가지 오미자 콤부차에서 오미자의 지표 성분인 시잔드린, 고미신 등이 그대로 확인됨.

㉟ 맛테스터기를 이용하여 8가지 맛 특성을 확인함. 사용한 탄수화물 성분에 따른 차이가 없이 비슷한 패턴의 안정적인 맛 패턴을 확인함. 단맛의 경우 스테비올 올리고당을 이용하여 제조한 콤부차는 매우 우수한 단맛(설탕 콤부차 대비 10배가량 단맛)이었고, 설탕 콤부차, 그리고 발효 설탕(올리고당) 콤부차(설탕 콤부차 대비 40% 단맛)을 이용한 순으로 단맛이 있음.



Fig 32. 오미자 콤부차 맛테스트 결과

b) 발효 메밀 맥주

㉠ 맥주는 맥아를 발효한 슬로, 제맥 단계, 맥아 분쇄 단계, 담금(Mashing) 단계(분쇄된 맥아 및 주조용수를 혼합하여 맥즙을 제조하는 단계), 맥즙 자비 단계, 발효 및 숙성하는 단계가 필요.

㉡ 최근 소비자의 입맛과 건강을 충족시키기 위하여 특정 식품의 맛과 향을 첨가한 맥주, 알코올 도수를 낮춘 맥주 등이 개발되고 있으며, 특히, 기능성 성분을 함유한 맥주에 대한 수요도 증가하고 있음.

㉢ 본 연구 과정에서 제조한 발효 메밀과 오미자를 사용하여 특별한 성분이 강화된 맥주를 제조하고 퀘르세틴, 루틴, 리그난, L-카르니틴 등의 함량을 확인함.

㉣ 제조 맥주의 종류와 방법은 다음과 같음.

㉠ 발효 메밀 분말을 부원료로 넣은 라거 맥주 제조

발효에 사용할 미생물(*R. oligosporus*)은 potato dextrose agar에 도말한 후 28°C로 유지해 포자를 충분히 생성시켜 준비함. 위에 배조한 메밀 1g당 *R. oligosporus*를 약 1만 개 정도 접종하였고, 최종적으로 배조한 메밀 60g에 약 60만 개의 *R. oligosporus*를 접종한 후 28°C에서 일주일

동안 발효함. 발효한 메밀은 분쇄하여 분말 형태로 준비함.

재료	양	비고
필스너용 맥아	1.1kg	Weyermann specialty malting company
발효 메밀 분말	0.3kg	20% of total malt amount
라거맥주용 효모	5.6g	US-23(<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , KCCM-11215)
물	5.6L	
홉	2.8g	<ul style="list-style-type: none"> • 홉은 Yakima Chief-Hopunion에서 구매. • Nugget hop(pellet type, 1.5g) • 맥즙의 온도가 100°C에 도달하고 5분이 경과한 후 펠릿을 맥즙에 투입. • Amarillo hop(pellet type, 5g) • 맥즙의 온도가 100°C에 도달하고 30분이 경과한 후 펠릿을 맥즙에 투입. • Citra hop(pellet type, 3g) • 맥즙의 온도가 100°C에 도달하고 50분이 경과한 후 펠릿을 맥즙에 투입.
산소		발효 전 15분간 효모가 들어간 맥아즙에 주입

Table 17. 맥주 제조 재료 및 제조과정

재료	양	비고
Pale Ale Malt	1.15kg	Weyermann Specialty Malting Company
Carared Malt	0.2kg	20% of total malt amount
에일 맥주용 효모	5.6g	US-05(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
물	5.6L	
홉	9.5g	<ul style="list-style-type: none"> • Yakima Chief-Hopunion 에서 구매한 홉을 이용. • Nugget hop(pellet type, 1.5g) • 맥즙의 온도가 100°C에 도달하고 5분이 경과 후 펠릿을 투입. • Amarillo hop(pellet type, 5g) • 맥즙의 온도가 100°C에 도달하고 30분이 경과 후 펠릿을 투입. • Citra hop(pellet type, 3g) • 맥즙의 온도가 100°C에 도달하고 50분이 경과 후 펠릿을 투입.
산소	/	• 효모액을 발효조에 투입한 후 15분간 발효조에 주입.

Table 18. 오미자를 부재료로 첨가한 에일 맥주

㉞ 건조 오미자 분말 준비

오미자의 리그난(Lignan, 예를 들면 Schisandrin, Gomisin A, Gomisin N) 성분을 충분히 추출하기 위해 건조된 오미자를 씨앗까지 분쇄함.

㉟ 맥주 제조 후 맥주의 특성 분석: 메밀 맥주(라거, 에일)에 포함된 퀘르세틴, 루틴 함량 분석

	UPLC 분석조건
System	Waters H-class
Detector	QDa detector
Column	Acquity UPLC BEH C18 column (1.7 μ m, 2.1x100mm)
Flow rate	0.3 ml/min
Solvent	A: triply distilled water(0.1% formic acid) B: acetonitrile(0.1% formic acid)
MS condition	Rutin : ESI-, 609.0 m/z, CE: 1.5kV, CV: 20V Quercetin: ESI-, 303.0 m/z, CE: 1.5kV, CV: 10V

Gradient		
Time(min)	Solvent A(%)	Solvent B(%)
0 ~ 0.5	95	5
0.5 ~ 1	90	10
1 ~ 2	90	10
2.1 ~ 4	85	15
4 ~ 10	77	23
10 ~ 12	50	50
12 ~ 15	40	60
15 ~ 16	0	100
16.1 ~ 20	95	5

Table 19. 성분 분석 조건

- ㉠ 위의 LC 조건에 따라 메밀 맥주에 포함된 루틴, 퀘르세틴 성분을 분석
 ㉡ 결과로 메밀 맥주의 경우 루틴과 퀘르세틴의 함량은 표와 같음.

	Rutin(g/Kg)	Quercetin(g/Kg)
Lager with 20% of buckwheat	0.14 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01
Ale with 20% of buckwheat	0.02 \pm 0.00	0.30 \pm 0.01
Results were indicated mean \pm STD(n \geq 1).		

Table 20. 맥주의 루틴, 퀘르세틴 양

메밀 에일 맥주에 함유된 퀘르세틴(quercetin) 성분은 약 0.30g/kg, 메밀 라거 맥주에 함유된 퀘르세틴 성분은 약 0.19g/kg임.

- ㉞ 메밀 에일 맥주는 메밀 라거 맥주보다 퀴르세틴 성분을 약 58% 더 많이 함유하는 것으로 확인됨.
- ㉟ 메밀 라거 맥주에 함유된 루틴(Rutin) 성분은 약 0.14g/kg, 메밀 에일 맥주에 함유된 루틴 성분은 약 0.02g/kg임.
- ㊱ 메밀 라거 맥주는 메밀 에일 맥주보다 루틴 성분을 약 700% 더 많이 함유하는 것으로 확인됨.
- ㊲ 맥주 제조 후 맥주의 특성 분석: 메밀 맥주(라거, 에일)에 포함된 시잔드린, 고미신 함량 분석

	UPLC 분석조건
System	Waters H-class
Detector	QDa detector
Column	Acquity UPLC BEH C18 column (1.7 μ m, 2.1x100mm)
Flow rate	0.3 ml/min
Solvent	A: triply distilled water(0.1% formic acid) B: acetonitrile(0.1% formic acid)
MS condition	Schisandrin : ESI-, 415.29 m/z, CE: 1.5kV, CV: 15V Gomisin A: ESI-, 399.25 m/z, CE: 1.5kV, CV: 15V Gomisin B: ESI-, 401.25 m/z, CE: 1.5kV, CV: 15V

Gradient		
Time(min)	Solvent A(%)	Solvent B(%)
0 ~ 0.2	95	5
0.2 ~ 0.3	90	10
0.3 ~ 3.0	45	55
3.0 ~ 4.5	35	65
4.5 ~ 6.0	25	75
6.0 ~ 7.0	20	80
7.0 ~ 7.5	0	100
7.5 ~ 10	95	5

Table 21. 오미자 맥주에 포함된 리그난 성분 분석

㉞ 분석 결과,

	시잔드린(mg/100mL)	GomisinA(mg/100mL)	GomisinN(mg/100mL)
일반 에일맥주	0	0	0
70g 오미자 첨가 에일 맥주	405.6±1.92	74.1±8.3	101.7±11.3
140g 오미자 첨가 에일 맥주	1083±10.93	182.8±2.6	762.8±16.7
Results were indicated mean ± STD(n≥1).			

㉠ 시잔드린(schisandrin)은 오미자 분말 140g이 함유된 맥주에서 약 1083.3 mg/100ml 만큼 측정되었으며, 이는 오미자 분말 70g이 함유된 맥주에 함유된 양(약 405.6mg/100ml)보다 약 2.7배 높은 것으로 확인.

㉡ Gomisin A는 오미자 분말 140g이 함유된 맥주에서 약 182.8mg/100ml 만큼 측정되었으며, 이는 오미자 분말 70g이 함유된 맥주에 함유된 양(약 74.1mg/100ml) 보다 약 2.5배 높은 것으로 확인.

㉢ Gomisin N은 오미자 분말 140g이 함유된 맥주에서 약 762.8mg/100ml 만큼 측정되었으며, 이는 오미자 분말 70g이 함유된 맥주에 함유된 양(약 101.7mg/100ml) 보다 약 7배 이상 높은 것으로 확인.

㉣ 오미자가 포함되지 않은 맥주는 시잔드린, Gomisin A, 및 Gomisin N이 모두 검출되지 않음.

㉤ 커피나무 부산물인 커피체리 껍질(카스카라) 활용

1) 커피나무 잎에 있는 활성 성분

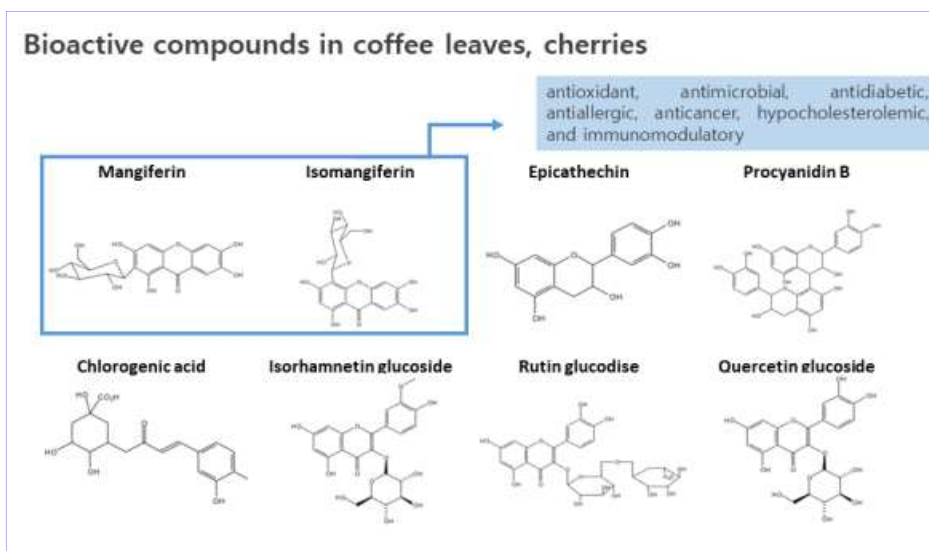


Fig 33. 커피나무 잎에 있는 활성 성분

2) 이 성분들의 항균, 항바이러스 특성이 알려져 있음.

Antimicrobial Activity
Prevotella intermedia, Porphyromonas gingivalis, Bacillus pumilus, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Staphylococcus citreus, Escherichia coli, Salmonella agona, Klebsiella pneumoniae, Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans, Thermoascus aurantiacus, Trichoderma reesei, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus. (More effective against Gram-positive microorganisms)

Antiviral Activity
 herpes simplex virus type 1 (HSV-1) & type 2 (HSV-2): Inhibition of replication

Annual Research & Review in Biology 5: 307-320, 2015

Fig 34. 커피체리 성분의 항균, 항바이러스 특성

3) 본 연구에서 사용한 카스카라의 항산화, 항균 성분의 분석 결과는 다음과 같음.

#NQ : Not quantified, #ND : Not detected

Cascara extracts(mg/g)		
Phenolic compounds	Ethanol extract	Water extract
Curcumin	ND	ND
Bisdemethoxycurcumin	ND	ND
Demethoxycurcumin	ND	ND
Vanillin	0.02 ± 0.00	0.06 ± 0.01
Ferulic acid	0.4 ± 0.05	ND
p-Coumaric acid	0.035 ± 0.02	NQ
Naringenin	ND	ND
Vanillic acid	1.68 ± 0.11	ND
Rutin	2.22 ± 0.057	0.51 ± 0.01
Quercetin	0.65 ± 0.04	0.46 ± 0.00
Chlorogenic acid	28.35 ± 1.99	16.78 ± 1.19
p-Hydrobenzoic acid	0.31 ± 0.021	ND
Gallic acid	0.87 ± 0.029	0.41 ± 0.023

Table 22. 카스카라의 항산화, 항균 성분의 분석 결과

a) Cascara의 phenolic compounds 분석 결과 다른 compounds에 비해 물 추출, 에탄올 추출, 두 추출 조건 모두에서 Chlorogenic acid의 함량이 높았음.

b) rutin, vanillic acid, gallic acid 순으로 많이 포함되어 항산화, 항균 소재가 많음을 확인.

4) 카스카라 추출물의 항산화 능을 DPPH 시험 방법으로 분석함.

Trolox (mg)/g extract

		Mean	Std
1	Cascara w	7.42	1.58
2	Cascara E	7.19	1.06

Table 23. 카스카라 추출물의 항산화 능

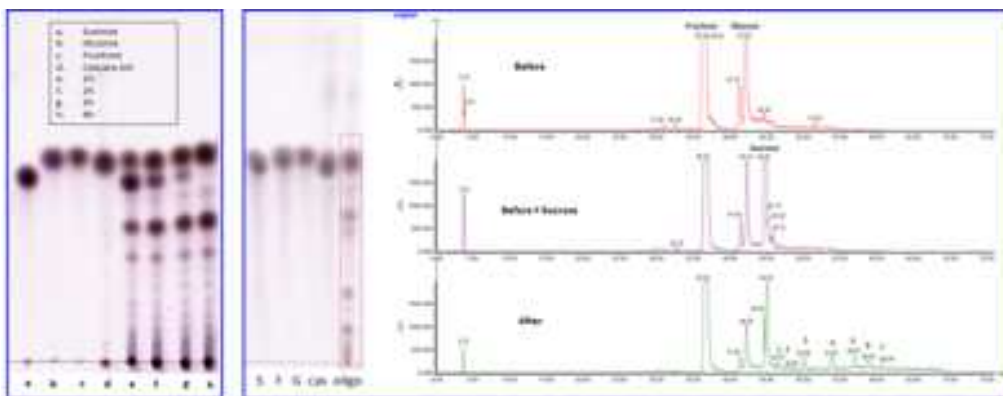
결과로, 물추출물, 에탄올 추출물에서 모두 항산화 능을 확인함.

5) 저열량의 카스카라 시럽 제조(난소화성 올리고당 함유 카스카라 시럽 제조)

a) 당 전이 반응 조건은 다음 표와 같음.

	양	총량
설탕	600mg	60%(w/v)
400mM Na-Ac buffer(pH 5.2)	0.05mL	20mM
Cascara Extract		100mg
Glucansucrase B-512F/KM		3U
Glucansucrase B-1299C/KM		2U
총 부피		1mL

Table 24. 카스카라 당 전이 반응 조건



(좌: 덱스트란 제거 전 반응액; 시간에 따라, 우: 덱스트란 제거 후 반응액)

Fig 35. 카스카라 당전이 반응 결과

b) 결과로 Cascara 추출물과 설탕을 포함하는 샘플에 60% 에탄올로 덱스트란을 침전시켜 제거하고 얻은 시료를 HPLC-ELSD로 올리고당을 분석한 결과 7개 이상의 올리고당 확인.

6) 3가지의 카스카라 시럽을 준비함

a) 맛테스터기를 이용하여 맛 확인

㉠ Cascara 당전이 올리고당(cascara syrup-glycosylation): 두 가지 글루칸합성효소를 3U : 2U 비율로 반응시켜서 만든 올리고당. 카스카라 분말과 설탕, 효소를 동시에 반응.

㉡ Cascara 스테비올 올리고당(cascara syrup-Ste NGOs): 상업용 스테비오사이드 30그램, 설탕

686그램, 512효소: 1355효소(700유닛:100유닛) 넣어 스테비올 올리고당을 1리터 제조. 이후 100그램의 카스카라분말을 첨가하여 제조.

㉔ 카스카라 NGO 올리고당(cascara syrup-NGOs): 설탕 686그램, 512효소: 1355효소(700유닛:100유닛) 넣어 1L 제조. 이후 100그램의 카스카라분말을 첨가하여 제조.

㉕ Control: 상용 클래식 슈가 시럽(커피용 시럽).

㉖ 실험은 평균적으로 커피에 넣는 시럽 농도인 12.5%로 희석하여 진행.

b) 결과로, 세 가지 샘플 모두 control보다 saltiness가 강하게 나타났고, glycosylation 한 샘플의 경우 control보다 sourness가 약했으며, NGOs와 glycosylation 샘플은 control보다 umami가 높았음.

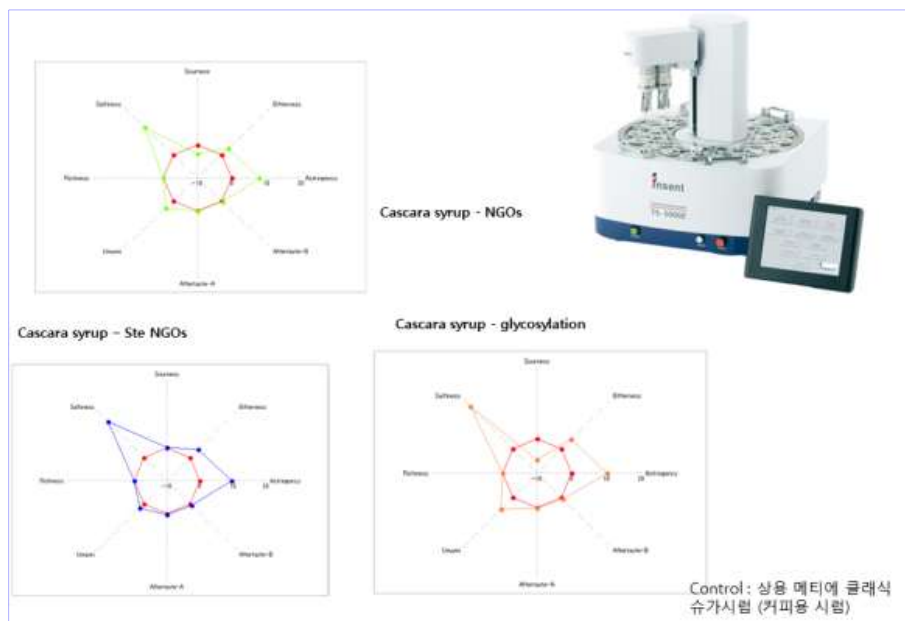


Fig 36. 카스카라 시럽의 맛테스티기 결과

7) 카스카라 시럽의 뮤탄합성 효소 활성 억제 확인

a) Cascara 당전이 올리고당 시럽의 mutansucrase inhibition test 진행함. 1%~12.5%까지 실험을 진행.

b) 뮤탄수크라아제의 불용성 글루칸합성 정도는 Inhibition은 시럽 농도가 높아지면서 점점 증가하였고 12.5% 농도에서 inhibition이 46% 보임. Cascara 추출물만을 같은 농도로 처리하였을 때는 mutansucrase 활성 저해가 나타나지 않음.

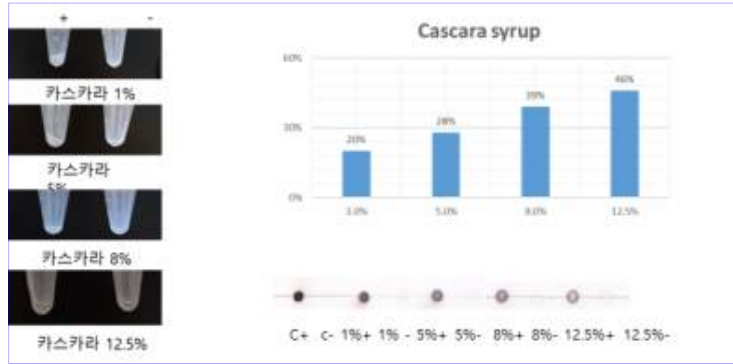


Fig 37. 카스카라 시럽의 불용성 글루칸 합성 억제

c) 따라서 cascara 당전이 올리고당 시럽의 inhibition은 올리고당의 효과일 수 있겠음.

8) 카스카라 분말과 설탕으로 만든 시럽과 카스카라 당전이 올리고당 시럽과의 칼로리 계산 결과는 다음과 같음.

Sample	Glucose(g/L)	Fructose(g/L)	Total sugar(g/L)
Sugar mixed cascara	244.2	262.2	506.3
Cascara syrup	94.8	163.1	257.9

Table 25. 카스카라 시럽의 열량 비교

a) 카스카라 당전이 올리고당 시럽의 경우 열량이 49% 감소함.

b) 하지만 감미특성이 다소 저하되어, 카스카라 스테비올 올리고당 시럽과 혼합하여 더 좋은 감미 특성의 카스카라 올리고 시럽을 구성할 수 있겠음.

9) 카스카라 당전이 올리고당시럽의 프리바이오틱스 특성 확인

✓ *Salmonella typhimurium* 과 *Bifidobacterium bifidum*

• Single cultivation				• Mixed cultivation			
Cultivation time(h)	Measurement	Cascara syrup		Cultivation time(h)	Measurement	Cascara syrup	
		<i>S. typhimurium</i>	<i>B. bifidum</i>			<i>S. typhimurium</i>	<i>B. bifidum</i>
0	log(CFU)/ml	5.88±0.0	6.12±0.0	0	log(CFU)/ml	6.36±0.0	6.47±0.0
	pH	6.3	6.3		pH	6.3	
6	log(CFU)/ml	6.48±0.4	7.60±0.1	6	log(CFU)/ml	6.6±0.2	8.39±0.2
	pH	5.86	5.66		pH	5.39	
12	log(CFU)/ml	7.11±0.0	8.08±0.3	12	log(CFU)/ml	7.11±0.6	8.15±0.4
	pH	5.93	4.92		pH	4.89	
18	log(CFU)/ml	8.10±0.1	8.78±0.1	18	log(CFU)/ml	5.90±0.3	8.72±0.0
	pH	5.89	4.75		pH	4.73	
24	log(CFU)/ml	8.53±0.3	9.04±0.2	24	log(CFU)/ml	0	9.84±0.1
	pH	5.87	4.69		pH	4.61	

Table 26. 카스카라 당전이 올리고당시럽의 프리바이오틱스 특성 확인

- a) Cascara 당전이 올리고당 syrup의 prebiotics 효과 여부를 확인. 살모넬라균과 비피도박테리움 균 사용. 시럽을 MRS 배지의 탄수화물 비율인 2%를 넣고, 균은 O.D1값에서 2% 접종.
- b) 결과로, 혼합 배양에서 24시간에 살모넬라균의 성장이 완전히 저해되는 것을 확인. 이때 pH는 4.6이었음.

⑥ 3차년도 요약

- 3차년도 연구에서는 생물전환기술 활용 항균 저열량 감미소재로서 항균특성을 가지는 난소화성 스테비올 올리고당의 생산을 수 리터 규모로 최적화하고 특성을 규명함.
- 또한, 개발 소재를 활용한 다양한 발효식품, 음료 등을 제조하고, 이 성분의 항균특성과 더불어 난수용성 기능 소재의 수용화 특성을 활용하여 차별화된 발효음료 혹은 식품을 제조하고 항산화, 항균특성과 더불어 기능성을 연구함.
- 4건의 특허등록과 6건의 SCI급 논문게재, 그리고 3건의 기술이전과 2명의 인력을 양성함.

⑦ 3차년도 상세 내용

㉑ 발효 배양액 생산 및 수용화 천연 항균 소재 생산

1) 당전이 효소 고생산균의 효소 생산과 농산물 추출물의 수용체 반응

A. 발효 배양액 생산 : 당전이 효소 고생산균의 효소 생산을 진행함.

a) 512F/KM-21균 사용

b) 1리터, 2% Glucose 배지 사용 발효: 결과로 16U/ml의 활성 생산. 상등액 내의 단백질은 거의 원하는 효소로 specific activity는 135U/mg까지 얻음.

step	Total Volume	Total Protein(mg)	Activity(unit/ml)	Total Activity(unit)	Specific Activity(unit/mg)	Purification Fold	Yield(%)
1	10L	2173.5	16	160000	73.6	1	100
2	2.5L	1167.2	63	157500	135	1.8	98.4

Table 27. 당전이 효소 고생산균의 효소 생산

㉒ 스테비오사이드 생물전환 산물들의 특성 확인

1) 산물의 구성 확인 및 항산화 특성 분석

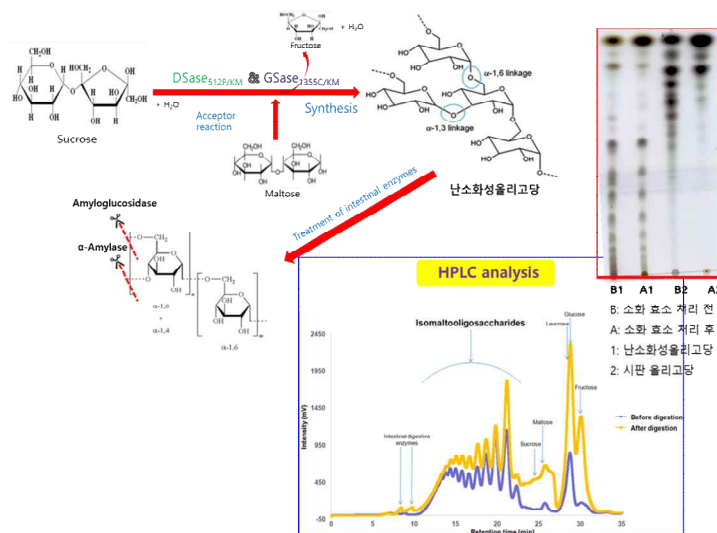


Fig 38. 오미자 올리고당 제조를 위한 난소화성 올리고당 제조방법 및 제조 올리고당의 당 구성

㉔ 저열량 과실음료(청 등) 제조를 위한 올리고당 합성

1) 저열량 오미자 올리고당 정보 확보

A. 저열량과실음료(청 등) 제조를 위한 복합 효소 올리고당 합성

a) 방법은 다음과 같음.

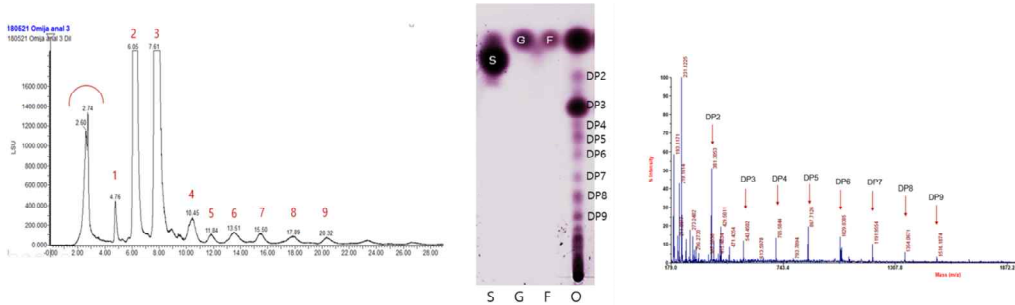


Fig 39. 오미자 올리고당 구성

b) 결과로 주로 중합도 2-3의 올리고당이 많이 생성됨.

c) 외에도, 중합도 2-9까지의 프리바이오틱스로의 기능이 좋은 올리고당으로 구성 확인함.

B. 오미자청과 오미자 올리고당의 열량 비교

a) 오미자청의 경우 200ml당 열량이 50.48kcal인데 비해 저열량 올리고 오미자청은 19.62kcal로 60% 이상의 열량 감소 확인함.

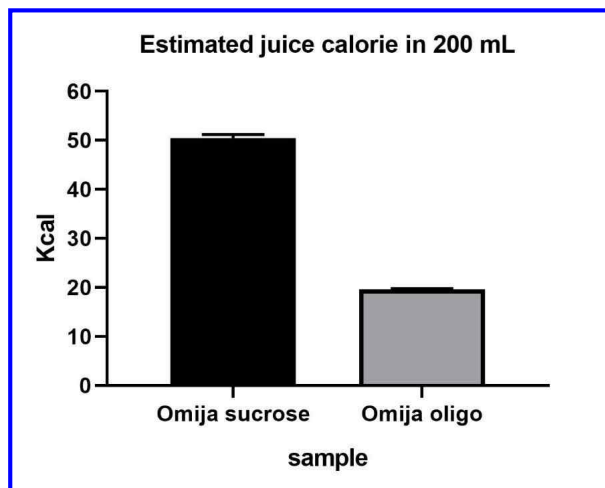


Fig 40. 오미자청과 오미자 올리고당의 열량 비교

C. 오미자 올리고당의 구강 내 불용성 플라크 형성 mutansucrase의 활성 저해 결과

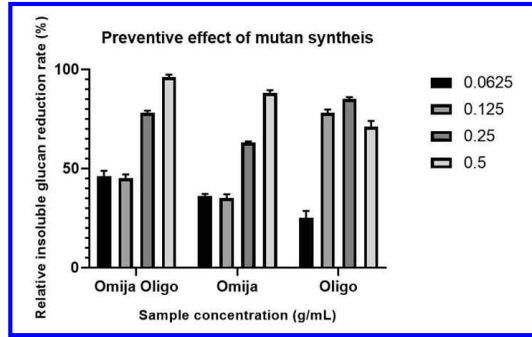


Fig 41. 오미자 올리고당의 구강 내 불용성 플라크 형성 mutansucrase의 활성 저해

- 오미자추출물, 올리고당 자체도 뮤탄수크라아제의 활성을 억제함.
- 오미자청 올리고당은 뮤탄수크라아제의 활성을 억제하는 특성이 더 커 62.5mg/ml를 처리한 경우 불용성 글루칸의 형성을 46% 감소시킴.
- 올리고당의 양이 증가할수록 저해 특성은 더 커짐.

2) 저열량 오미자 올리고당 특성 확인

A. 항산화 특성

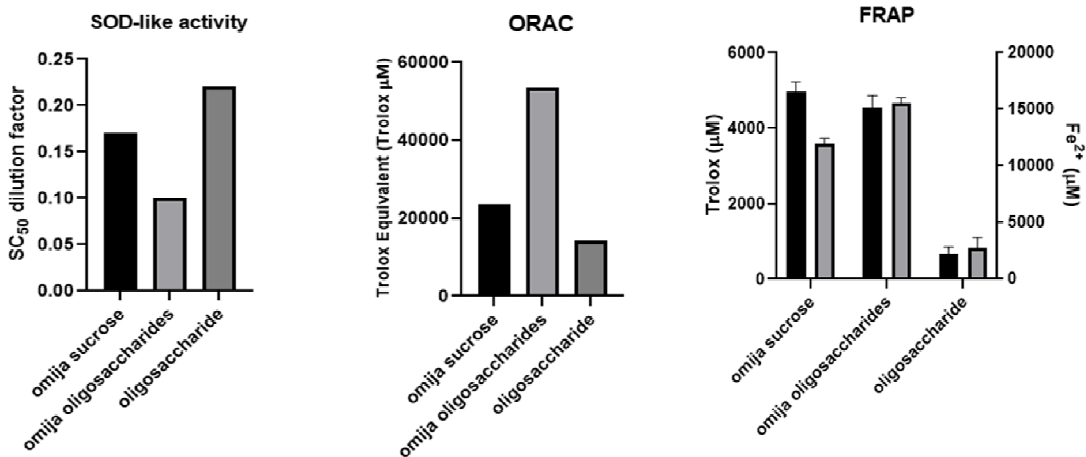


Fig 42. 오미자 올리고당의 항산화 특성 확인

- 오미자 올리고당에서 scavenging activity가 가장 높아서 SC₅₀ 값이 가장 낮음.
- ORAC Assay(Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay)
- FRAP assay(ferric reducing antioxidant power assay)

B. 맛테스트: Sensory test machine(Insent) 사용하여 맛 비교함. 오미자청과 비슷한 오미자 올리고당의 맛을 확인함.

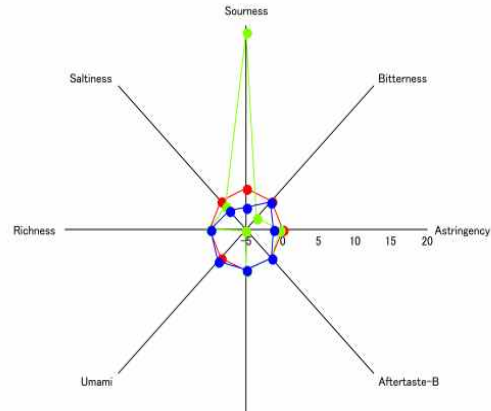


Fig 43. 오미자청, 오미자 올리고당의 맛테스터기 결과. 빨간색 - 오미자 청, 파란색 - 오미자 올리고당, 연두색 - 오미자 분말 주스(상용)

㉔ 스테비올 올리고당 함유 (발효) 식음료의 기능성 확보

1) 난소화성 올리고당 함유 저열량 천연 감미소재(스테비올 올리고당)제조

A. 두가지의 dextransucrases 사용: 512F/KM 덱스트란수크라아제, 1355C/KM 얼터난수크라아제

a) 반응조건: 1355C/KM: 1U/ml, 512F/KM: 7U/ml, Maltose: 0.25M, Sucrose: 2M, 반응 시간: 8 h, 스테비올 배당체: 0.1 ~ 5% (w/v), 반응온도 45° C로 진행함.

b) 합성 후 중합도 분포는 다음과 같음.

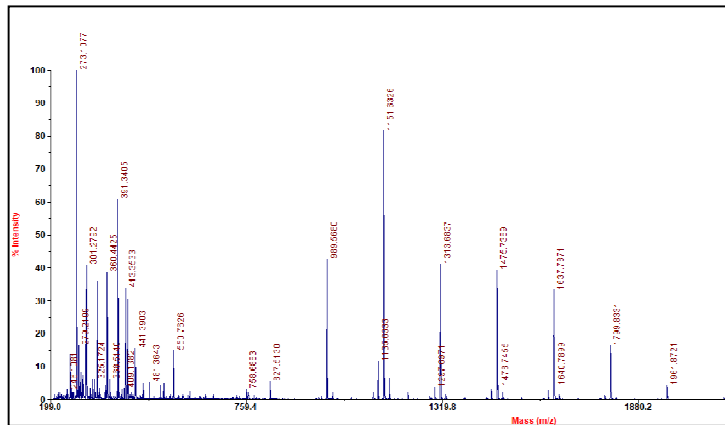


Fig 44. 스테비오사이드 올리고당 제조

c) 스테비올 올리고당의 열량: 제조 올리고당의 열량은 설탕용액의 40%가량의 열량임.

	Calorie/L
Before synthesis of non-digestible oligosaccharides	338.3
Non-digestible oligosaccharides	111.2
Before synthesis of steviol oligosaccharides	270.7
Steviol oligosaccharides	133.9

Table 28. 난소화성 스테비올 올리고당

d) 스테비올 올리고당의 배당체 구조는 다음과 같음.

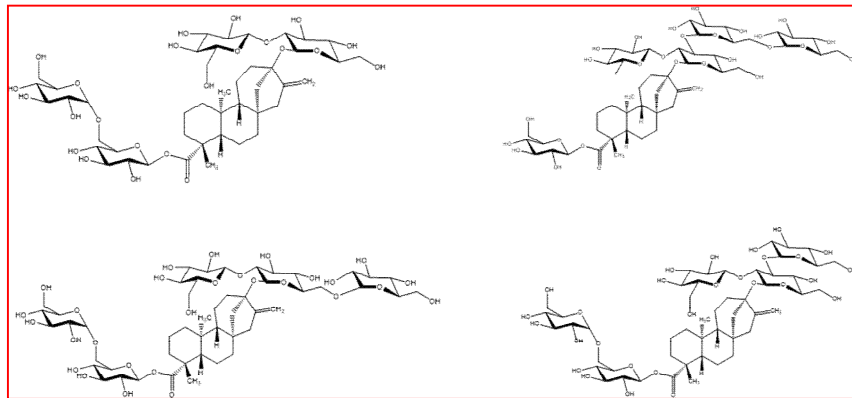


Fig 45. 스테비올 올리고당 구조

2) 난소화성 올리고당 함유 저열량 감미소재: 저열량 카스카라 시럽

난소화성 올리고당 함유 저열량 감미소재: 저열량 카스카라 시럽

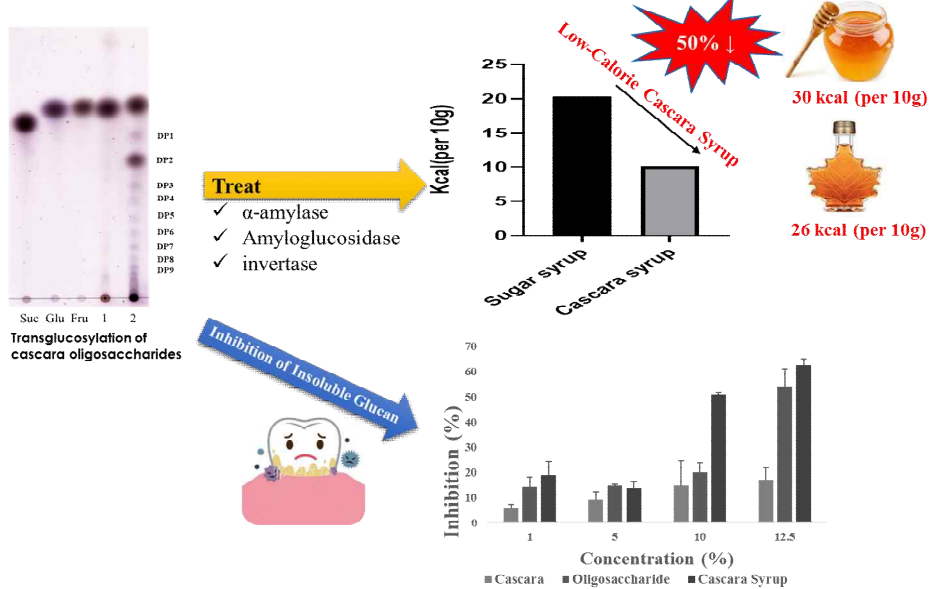


Fig 46. 카스카라 난소화성 시럽의 특성

- a) 중합도는 다양하여 2-9의 중합도를 가지는 올리고당으로 구성.
- b) 열량을 확인함. 설탕 시럽보다 50%가량 낮은 열량으로 구성, 10그램당 10kcal임.

c) 항충치 기능은 농도가 증가 될수록 증가하며, 난소화성 올리고당의 수준 혹은 그 이상으로 효과가 있음.

3) 난소화성 올리고당 함유 저열량 감미소재: 시럽의 항산화 특성

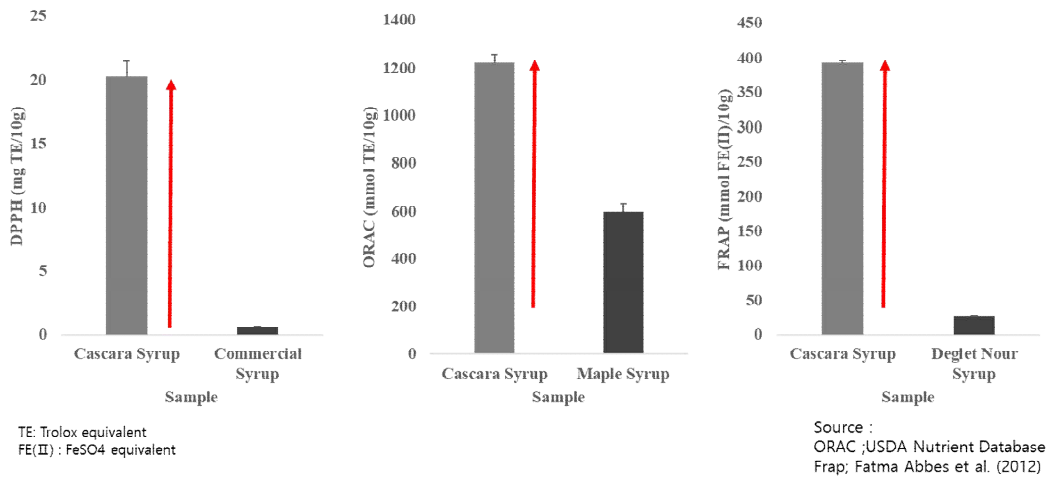


Fig 47. DPPH, ORAC, FRAP value of cascara syrup

- 카스카라 올리고당 시럽의 항산화 특성을 확인함. 3가지의 항산화 특성 확인하는 방법 모두에서 일반 상용화된 시럽에 비해 항산화 특성이 매우 높음을 확인함.

4) 커피잎 차를 제조함(제조방법은 아래 그림과 같음).

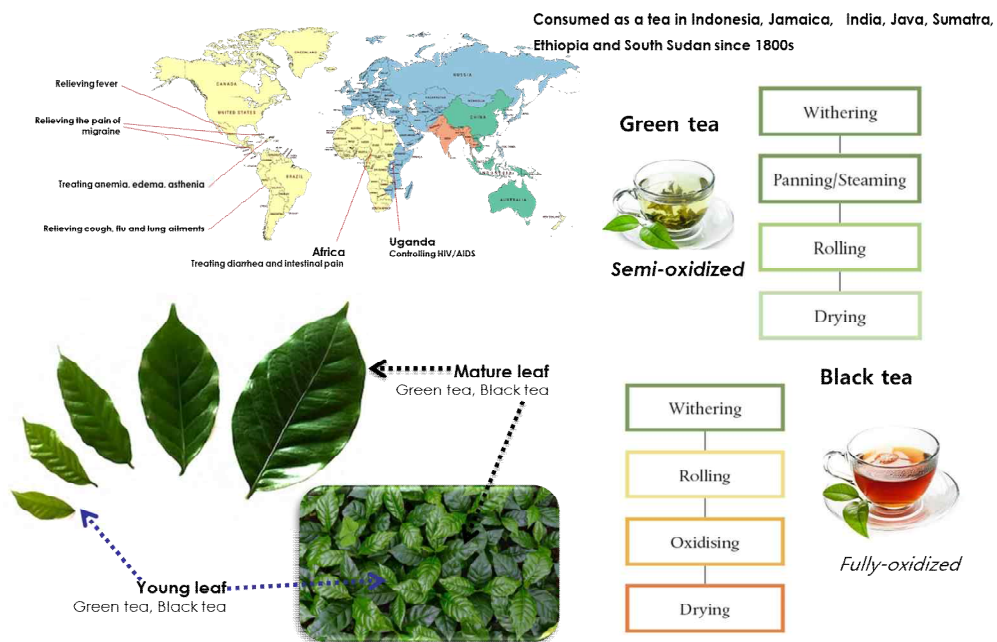


Fig 48. 커피잎차 제조과정. 녹차, 홍차를 제조하는 방법으로 진행함.

5) 커피 잎 차 활성 성분을 확인함.

a) Chlorogenic acid, Caffeine, Mangiferrin과 Catechin을 확인하였고, Chlorogenic acid가 가장 많았으며, Caffeine, Mangiferin, 그리고 Catechin순으로 확인됨.

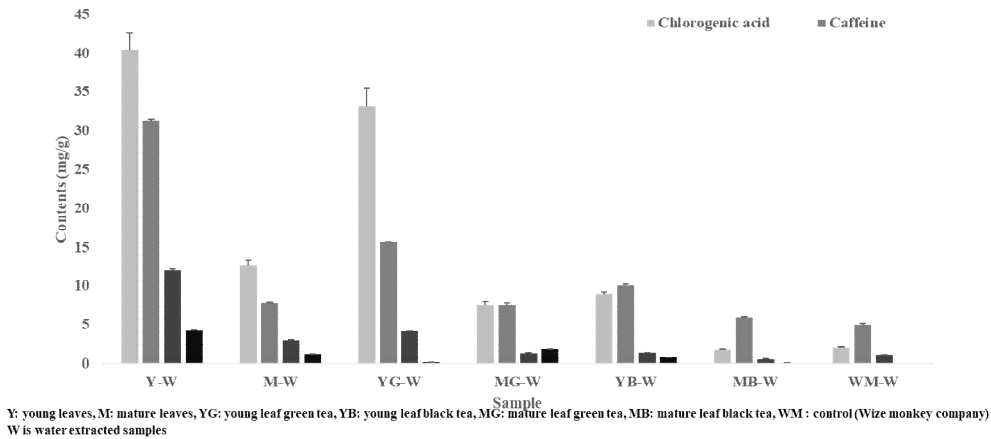


Fig 49. 커피 잎 차 활성 성분 구성

b) 또한 Mature leaf으로 제조한 차보다 Young leaf으로 제조한 차에 활성 성분이 더 많음.

c) Black tea보다는 Green tea로 제조한 경우 활성 성분이 더 많음.

d) 산업적으로 생산된 제품보다 연구실에서 제조한 차에 활성 성분이 더 많음.

6) 커피 잎 차 성분 중 총 페놀양, 총 플라보노이드양, 탄닌 양을 확인함.

a) Young leaf으로 제조한 차에 Mature leaf으로 제조한 차보다 총 페놀양, 총 플라보노이드양, 탄닌양이 있음을 확인함.

b) Green tea에 Black tea보다 위의 성분이 더 많음을 확인함.

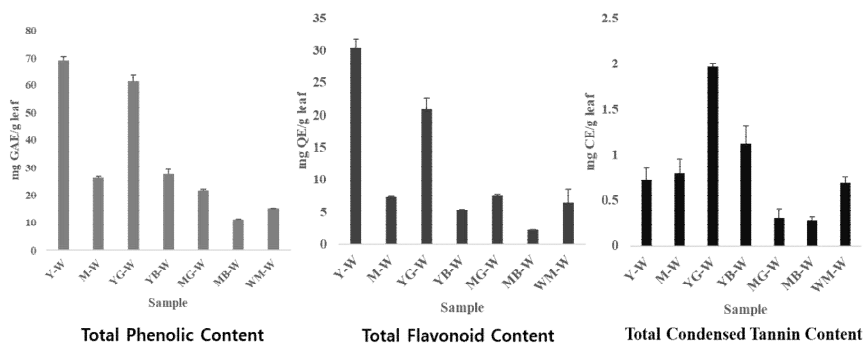


Fig 50. 총 페놀양, 총 플라보노이드양, 탄닌양

7) 커피 잎 차의 항산화 능력 정도를 확인함

a) Young leaf으로 제조한 차에 Mature leaf으로 제조한 차보다 항산화 능력이 더 많음을 확인함.

b) Green tea에 Black tea보다 항산화 능력이 더 많음을 확인함.

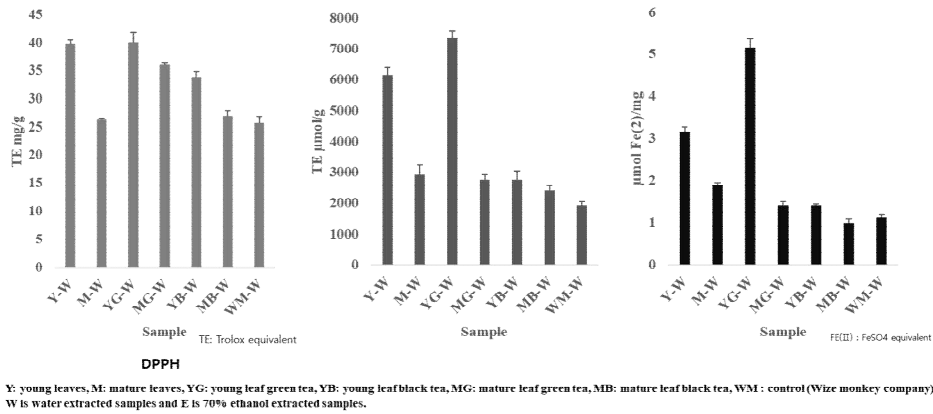


Fig 51. 커피 잎 차의 DPPH, ORAC, FRAP value

8) 생물전환 천연 향균 소재를 포함하는 음료 제조 및 특성 조사

A. 리그난이 강화된 오미자 에일 맥주 제조 및 구성 성분

- a) 제조과정에 따라 맥주 중 기능 성분의 양 차이 확인. 최적 제조 프로세스를 개발함(그림).
- b) 오지자는 boiling의 초기에 넣어주는 것이 가장 항산화 능 좋은 맥주를 제조하게 함. 또한, 플라보노이드와 페놀 화합물의 양도 많음.

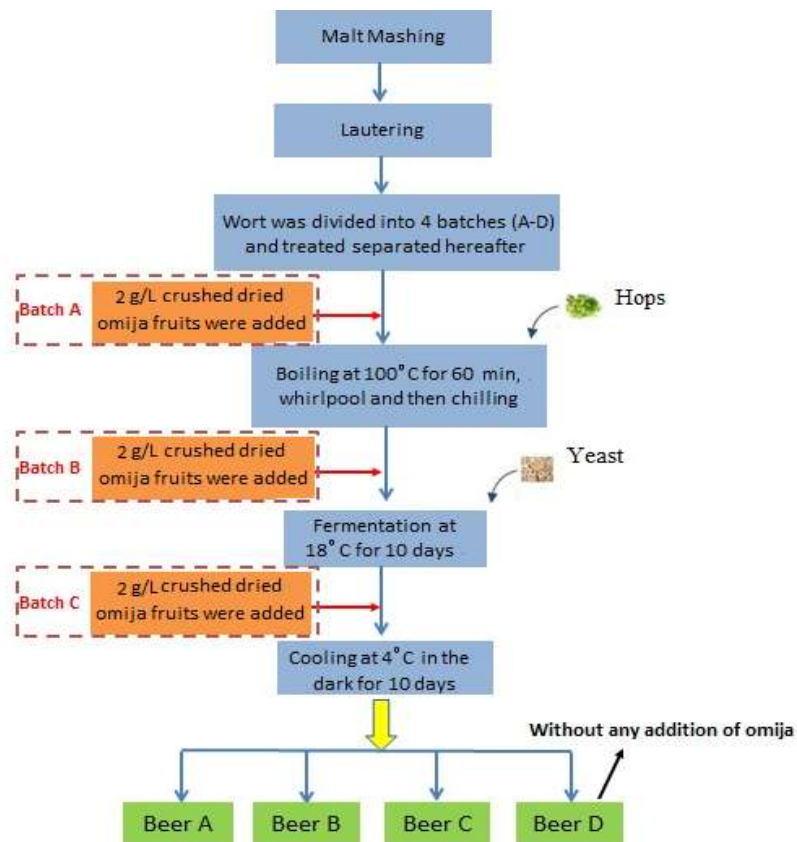


Fig 52. 오미자 맥주 제조 과정

b) 맥주에 schisandrin, gomisinA 그리고 gomisinB의 양은 12.10mg/ml, 3.12mg/ml 그리고 0.86mg/ml임.

c) 맥주 생산 과정(A-C)에서 crushed dried omija fruits은 각각 다른 공정 중에 첨가함. Control beer(D)는 오미자 과실 넣지 않고 제조.

d) 오미자를 넣어 주면서 맥주의 색은 짙은 적색으로 발전해 감. pH는 저하 되고, 쓴맛은 감소. 그리고 diacetyl, acetaldehyde는 다소 증가함.

Properties	Beer A	Beer B	Beer C	Beer D
Original extract (°Plato)	13.11 ± 0.02 ^a	13.09 ± 0.04 ^a	13.10 ± 0.03 ^a	13.14 ± 0.03 ^a
Ethanol content (% v/v)	5.20 ± 0.10 ^a	5.10 ± 0.10 ^a	5.10 ^a	5.2 ± 0.10 ^a
pH	4.05 ± 0.03 ^c	4.22 ± 0.03 ^{bc}	4.36 ± 0.02 ^b	4.77 ± 0.04 ^a
Color (EBC)	28.60 ± 0.10 ^a	26.6 ± 0.10 ^b	25.8 ± 0.20 ^{bc}	23.4 ± 0.10 ^c
Bitterness (IBU)	29.3 ± 0.20 ^a	27.9 ± 0.09 ^b	26.8 ± 0.11 ^b	24.4 ± 0.10 ^c
Colloidal haze (EBC)	1.18 ± 0.09 ^b	1.21 ± 0.07 ^b	7.19 ± 0.11 ^a	0.24 ± 0.02 ^c
Viscosity (cP)	1.57 ± 0.10 ^a	1.56 ± 0.10 ^a	1.52 ± 0.10 ^b	1.51 ^b
Diacetyl (µg/L)	96.80 ± 1.70 ^a	89.7 ± 0.80 ^a	89.6 ± 1.10 ^a	90.1 ± 1.0 ^a
Acetaldehyde (mg/L)	8.77 ± 0.42 ^a	8.01 ± 0.26 ^b	7.94 ± 0.45 ^b	8.03 ± 0.33 ^b
Ethyl acetate (mg/L)	30.15 ± 0.28 ^a	27.55 ± 0.30 ^b	28.02 ± 0.31 ^b	27.69 ± 0.25 ^b
Isoamyl acetate (mg/L)	2.50 ± 0.17 ^a	2.21 ± 0.16 ^b	2.22 ± 0.14 ^b	2.13 ± 0.11 ^b
Ethyl hexanoate (mg/L)	0.19 ± 0.02 ^a	0.14 ± 0.03 ^b	0.13 ± 0.02 ^b	0.14 ± 0.03 ^b
Ethyl caprylate (mg/L)	0.14 ± 0.03 ^a	0.15 ± 0.02 ^a	0.15 ± 0.02 ^a	0.16 ± 0.01 ^a
Propanol (mg/L)	14.12 ± 0.10 ^a	14.15 ± 0.13 ^a	14.04 ± 0.10 ^a	14.11 ± 0.12 ^a
Isobutanol (mg/L)	23.10 ± 0.14 ^a	22.99 ± 0.08 ^a	23.05 ± 0.21 ^a	23.11 ± 0.14 ^a
Isoamyl alcohol (mg/L)	57.15 ± 0.30 ^a	57.12 ± 0.21 ^a	56.62 ± 0.38 ^a	57.07 ± 0.35 ^a

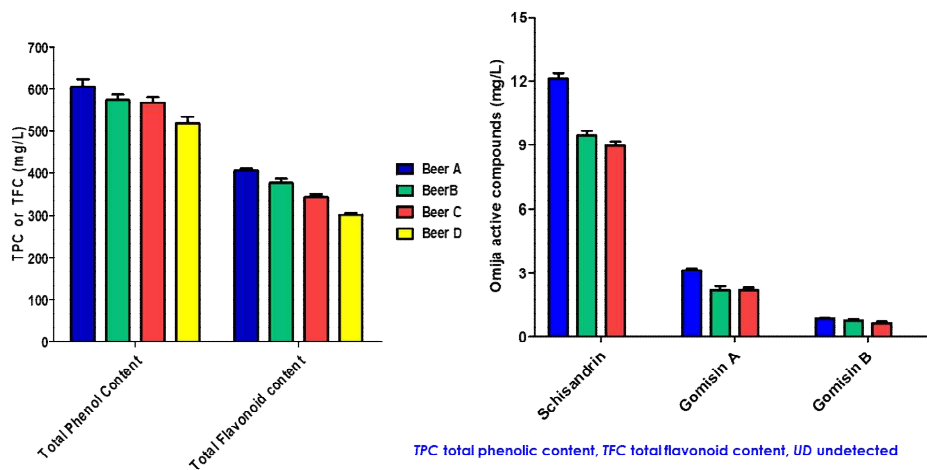


Fig 53. 총페놀함량과 총플라보노이드 함량 증가

e) 만들어진 오미자 맥주는 오미자의 3가지 주된 리그난 성분이 증가(시잔드린, 고미신A, 고미신B)

f) 제조 오미자 맥주들의 산화적 안정성

㉠ 오미자맥주들은 모두 비교군인 무첨가 맥주에 비해서 라디칼 소거능(DPPH)이 향상

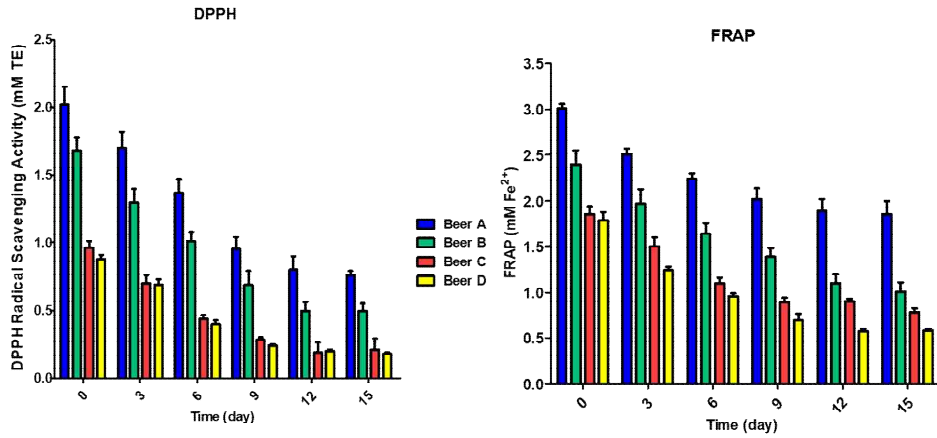


Fig 54. 오미자 맥주의 DPPH, FRAP value

㉡ 다른 방식의 항산화 능 분석방법인 FRAP 방법에 관한 결과도 오미자 맥주들의 향상을 확인할 수 있었음.

g) 감미 특성 확인

맥주 제조 시 초기 보일링 시기에 오미자를 넣고 맥주를 제조하는 방식이 가장 좋은 맛 시험 결과를 줌.

8) 스테비올 배당체 생물전환 산물들의 특성 확인

A. 루부소사이드 감미소재의 특성

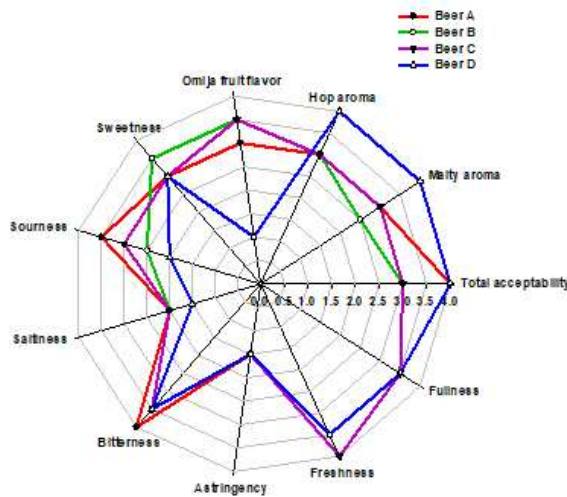


Fig 55. 오미자 첨가 맥주들의 공정에 따른 맛 특성 비교

a) 천연 감미료 시장은 2015년 기준 국내 2100억 원, 국제 약 8조7000억 원 규모로 연평균 5.05%의 성장률을 보임.

b) 루부소사이드: 감미소재로서, 불용성 물질의 수용화 가용제로서, 그리고 혈당 저하 소재로 많은 연구결과가 있음.

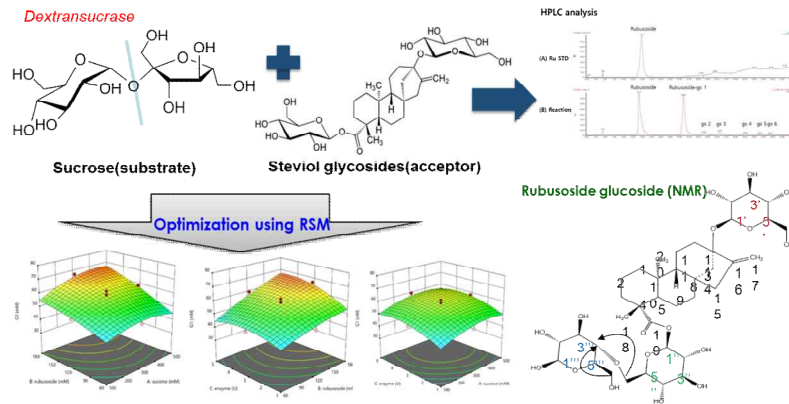


Fig 56. 루부소사이드 제조방법 및 최적화 연구, 그리고 제조된 루부소사이드 배당체 구조

- ㉠ 루부소사이드 배당체 수율: 사용 루부소사이드 기준 48.9%(58.6mM)
- ㉡ 제조 최적 조건(RSM 결과): 1. Sucrose: 300mM, 2. Rubusoside: 120mM, 3. Enzyme: 3U

c) 불용성 글루칸합성 억제 특성: 루부소사이드는 뮤탄수크라아제 활성 억제 반응조건에서 15% inhibition activity를 보임.

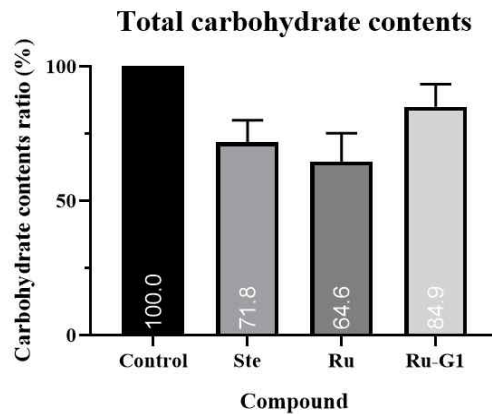


Fig 57. 루부소사이드, 루부소사이드 배당체의 뮤탄수크라아제 불용성 글루칸 합성 저해

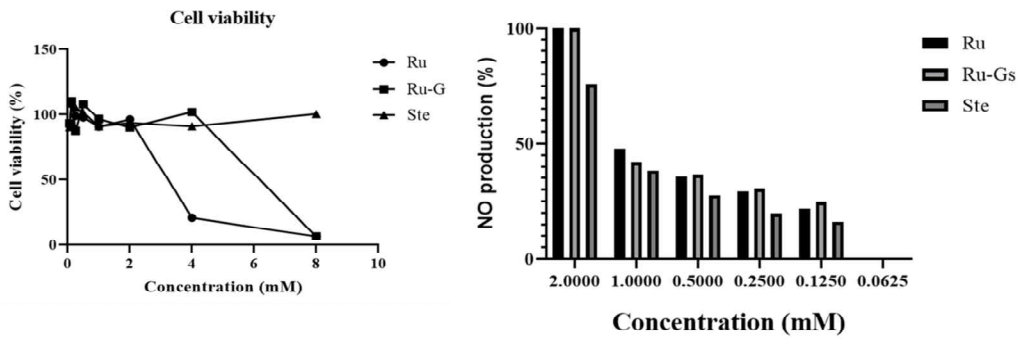


Fig 58. 루부소사이드 세포 독성 시험과 항-염 특성 관련 NO 생성억제 확인

d) 루부소사이드 배당체의 항-염 특성

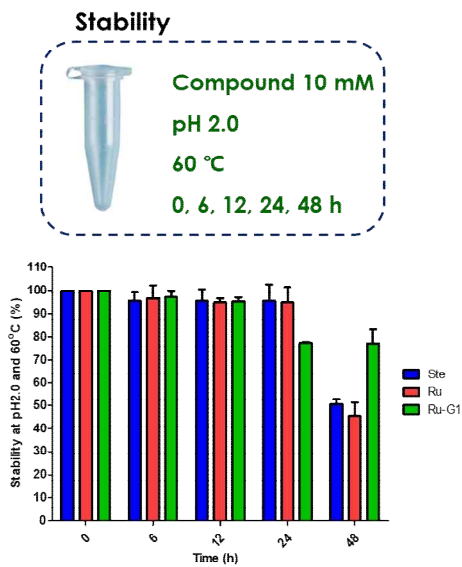


Fig 59. 낮은 pH에서 배당체의 구조 안정성이 우수함.

e) 루부소사이드 배당체의 특성 연구: 안정성과 맛테스트

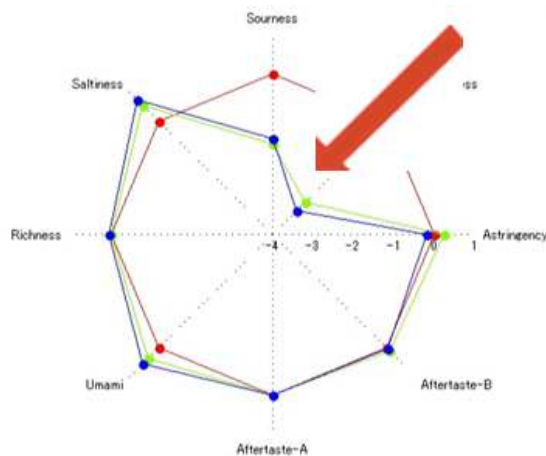


Fig 60. 제조 맥주의 맛테스트 확인

f) 불용성 성분의 수용화: 결과로 루부소사이드와 비슷한 정도로 루부소사이드 배당체도 기능성 불용성 성분을 수용화함.

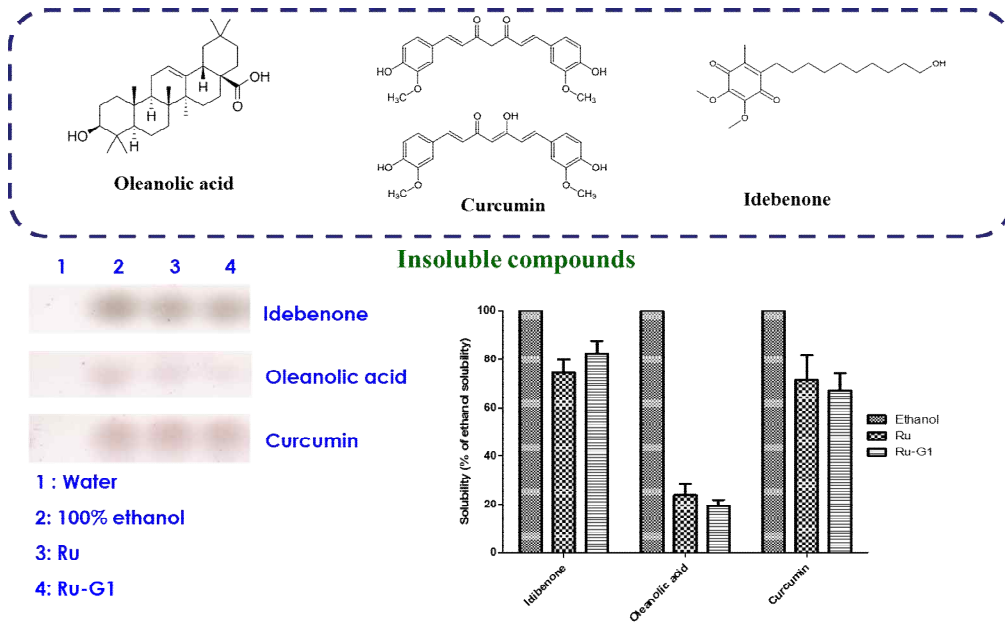


Fig 61. 이데베논, 올리아놀산, 그리고 커큐민의 루부소사이드 배당체를 이용한 수용화

(3) 제 2-1세부(세니젠 박정웅) : 식품 내 생물학적, 화학적 위해 인자 저감화 기술 현장적용 및 산업화

(가) 정량적 성과

성과지표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과		인력양성			정책활용·홍보		기타	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	석사	박사	취업인력	정책활용		홍보전시
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	명	명				
가중치																				
최종목표																				
후속 1차	목표					1	50													
	실적					1	113		1											
후속 2차	목표					1	150		1											
	실적					5	163		2											
후속 3차	목표					1	200		1											
	실적					1	510		3											
3단계	목표					3	400		2											
	실적					7	786		6											

① 논문게재 성과

연번	게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
			주저자	교신저자	공동저자				

② 특허 성과

출원된 특허						등록된 특허				
연번	출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호

③ 기술료징수 현황

기 징수액	당해연도 징수액	향후 징수액	합계

- 기술이전 및 기술지도 내용

※ 명칭, 관련업체명, 지도내용 등

N O	기술이전유형	기술실시 계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료
합계					

④ 사업화 성과 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3년			
	소요예산(백만원)	267			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		2	3	4.5	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0.5	2.6	4.75
국외		-	-	-	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	-	-	
	수 출	-	-	-	

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	7.35 억원
			향후 3년간 매출	억원
		관련제품	개발후 현재까지	억원
			향후 3년간 매출	억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		위

(나) 정성적 성과

구분	연구목표	주요 연구 성과
1단계 1차년도	• 해당사항 없음	• 해당사항 없음

	2차년도	• 해당사항 없음	• 해당사항 없음
	3차년도	• 해당사항 없음	• 해당사항 없음
2단계	4차년도	• 해당사항 없음	• 해당사항 없음
	5차년도	• 해당사항 없음	• 해당사항 없음
	6차년도	• 해당사항 없음	• 해당사항 없음
	7차년도	• 해당사항 없음	• 해당사항 없음
3단계	후속 1차년도	• 식품제조설비 및 작업장 살균시스템 제품화	<ul style="list-style-type: none"> • Super-heated steam과 HOCl 소독제의 순차살균을 통한 상승효과 검증 • Super-heated steam과 HOCl을 기반으로한 설비표면 및 작업장 바닥용 맞춤형 살균시스템 개발 및 현장검증
	후속 2차년도	• 식품품목별 맞춤형 Multiplex Real-Time PCR kit 제품화	<ul style="list-style-type: none"> • 현장수요조사를 통해 식품품목별 분석빈도 높은 식중독균 조합 조사 • 5종 이상의 Multiplex Real-Time PCR kit 제품화 및 식품품목별 현장검증
	후속 3차년도	• 식품원료 살균용 살균소독 시스템 제품화	<ul style="list-style-type: none"> • 유기산과 HOCl 복합처리를 통한 미생물 살균 상승효과 검증 • <i>Bacillus</i> 포자를 제어할 수 있는 식품원료 살균시스템 개발 및 현장검증

(다) 기타 주요연구 성과 (자유 기술)

① 1-3차년도 전체 요약

㉞ 식품제조설비 및 작업장 살균시스템 제품화

실제 식품제조 및 가공업체 4 곳을 모니터링한 후 주로 오염되는 표준균주 2 종을 선별하여 Super-heated steam과 HOCl 소독제의 순차살균 적용에 따른 상승효과를 검증하였으며, 이를 실제 현장 설비표면 및 작업장 바닥에 적용하여 현장 검증을 완료.

㉟ 식품품목별 맞춤형 Multiplex Real-Time PCR kit 제품화

현장 수요현장 수요조사를 통해 식품품목별 분석 빈도가 높은 식중독균을 조사하였고, 다양한 식중독균 조합을 통해 multiplex real time PCR kit를 개발하였으며, 이를 실제 현장에서 검증하여 상품화를 완료.

㉔ 식품원료 살균용 살균소독 시스템 제품화

식품에 많이 활용되는 유기산 중 넓은 pH 범위에서 가장 효과가 좋은 유기산을 선정하여 NaOCl과 복합처리 시 미생물 살균효과를 극대화 하였으며, *Bacillus* 포자를 제어할 수 있는 식품원료 살균시스템 제작하여 현장 검증을 완료.

② 1차년도 요약

㉑ 현장모니터링을 통한 설비표면 및 작업장 바닥 오염도 현황 조사

- 실제 식품제조 및 가공업체 4 곳을 선정하여 현장모니터링을 실시하였음.
- 각 식품제조 및 가공업체의 샘플링 지점은 설비의 종류 (컨베이어, 파이프 형식)에 따라 다양하게 선정함.
- 설비표면 및 바닥에 따라 일반세균, 대장균, 대장균군에 대한 정량평가를 실시하였으며, 일반세균에서 검출된 균들은 현미경 및 기타 방법들을 이용하여 분리 배양하여 동정하였음.
- 총 4 곳의 샘플을 분석하였을 시, *Bacillus* spp., *Geobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.가 샘플 및 설비의 종류에 무관하게 검출 빈도수가 높게 나타남.

㉒ Super-heated steam과 HOCl 소독제의 순차살균을 통한 상승효과 검증

- 현장 모니터링 결과를 바탕으로 설정한 표준균주 2 종 (*Streptococcus* spp., *Bacillus* spp.)을 대상으로 직접 제조한 HOCl generator 및 SHS generator 효율을 평가함.
- HOCl 단독처리 결과의 경우, 상에서의 효과는 매우 좋다고 알려졌으나 실제로 표면에 건조된 균에 대해서는 20 초 처리시간 동안 약 1 log 살균 효과를 보임.
- SHS 장치 단독처리 결과의 경우, 10 초 이상의 처리에서 3 log 이상의 살균 효과를 나타내었으나 실제 15 초 이상 처리 시 높은 온도로 인해 작업자의 화상 위험이 존재하였음.
- 표준균주 2 종에 대해 순차처리를 진행한 결과, SHS 10 초 및 HOCl 5 분 처리 시 시너지 효과로 2 log 이상의 살균을 확인함.

㉓ Super-heated steam과 HOCl을 기반으로 한 설비표면 및 작업장 바닥용 맞춤형 살균시스템 개발 및 현장검증

- HOCl 처리 5 분 및 SHS generator 처리 10 초를 활용하여 실제 현장을 대상으로 설비 표면 및 작업장 바닥을 살균한 결과 처리 전 일반세균수는 평균 5.12 log에서 처리 후 1.27 log로 현저히 감소된 것을 확인함.

③ 1차년도 상세 내용

연구목표 : 식품제조설비 및 작업장 살균시스템 제품화

가. 현장모니터링을 통한 설비표면 및 작업장 바닥 오염도 현황 조사

A. 각각에 대한 현장 조사로 진행한 결과

a) A사 작업환경 내 미생물 오염도 조사

단위: log CFU/cm²

샘플링위치	작업 중	작업 후
1. 골절기 표면	1.00	3.58
2. 골절기 칼날	3.35	3.49
3. 다이서 내부	3.43	6.07
4. 다이서 칼날	3.28	3.99
5. 컨베이어벨트 표면	3.65	3.77
6. 바닥-1	-	6.25
7. 바닥-2	-	2.84
8. 바닥-3	4.07	4.20
※ 모든 공정과정에서 대장균 및 대장균군은 검출되지 않음. (검출한계: 1 CFU/cm ²) ※ 모든 공정과정에서 동일한 2 가지 균이 검출되었음. 6 번 작업장 바닥에서만 다른 균 1 종류가 검출되어 총 3 종류 균으로 다음 추가분석 진행함.		

Table 1. A사 작업환경 내 미생물 오염도 조사

b) Bacteria 실험 결과

- ㉠ 일반세균 실험 결과, 공정 전 라인에서 최대 6.08 log CFU/cm²이 검출되었음.
- ㉡ 육류제품의 특성상 전반적으로 미생물의 수가 많으나, 전체적으로 3 종류의 미생물만 존재하여 관리가 잘 이루어지고 있다고 볼 수 있음.

c) A사 균 동정 실험결과

- ㉢ A사 균 동정 실험결과는 다음 표와 같음.

발견위치	우점종 여부	그람 염색결과	균 동정결과
전 공정	O	양성	<i>Geobacillus toebii</i>
골절기 표면 및 칼날, 컨베이어벨트 표면	X	양성	<i>Streptococcus pluranimalium</i>
다이서 칼날, 컨베이어벨트 표면, 바닥-3	X	음성	<i>Pantoea agglomerans</i>

Table 2. A사 균 동정 실험결과

㉔ 각각의 검출된 균의 특징은 다음과 같음.

균주명	특징
<i>Geobacillus toebii</i>	건초 및 퇴비에서 주로 발견되는 균이며 이동성이 있고 높은 온도에서 견딜 수 있는 균으로 인체에는 무해한 것으로 알려져 있음. 본 샘플링 결과 중 가장 많이 검출된 균이며, 포자를 형성하여 열, 화학물질 등에 매우 강한 균임. 대한민국의 축산물에 주로 발견되는 균으로 알려져 있음.
<i>Streptococcus pluranimalium</i>	그람 양성균으로 이동성이 없는 균으로 TSA에서 투명하게 자라는 것이 특징이며, 소의 장내나 호흡기, 우유에서 주로 검출되는 균임. 인체에 위험성은 없음.
<i>Pantoea agglomerans</i>	그람 음성균으로 식품의 표면, 씨앗, 동물이나 사람의 분변에서 많이 검출됨. 벌꿀생산과정에서도 많이 발견된다고 알려져 있음. 상처 등의 피부로 들어가지 않는 이상 인체에는 무해하나 과일나무에 병을 일으키는 균으로 알려져 있음. (배, 사과나무 등) 추운 환경, 빛, 공기순환이 잘 되는 환경에서 잘 퍼질 수 있음.

Table 3. A사 검출된 균의 특징

d) B사 작업환경 내 미생물 오염도 조사

단위: log CFU/cm²

샘플링위치	일반세균	대장균군
1. 칭량통	-	-
2. 칭량용 국자	3.38	-
3. 정제수 계량통	3.66	-
4. 알뜰 주걱	-	-
5. 바닥-1	4.12	2.78
6. 바닥-2	3.08	-
7. 후드내벽	3.45	-
8. 와건통 (정제수 담는 통)	-	-
9. 배합탱크 내부	-	-
10. 배합탱크 소스 배출구 내부 (소스포장실)	-	-
11. 바닥-3	3.97	-
12. 소스 담는 통 (스테인리스)	-	-
13. 소스 이동 호스 내부	-	-
14. 소스포장실 플라스틱 통	-	-
15. 실린더 (소스포장실)	-	-
16. 소스 배출구 내부 (실린더 장착부분)	-	-

※ ‘-’ 표시는 일반세균, 대장균 및 대장균군이 검출되지 않음. (검출한계 : 1 CFU/cm²)

Table 4. B사 작업환경 내 미생물 오염도 조사

e) Bacteria 실험결과

- ㉠ 일반세균 실험 결과, 공정 전 라인에서 최대 3.66 log CFU/cm²이 바닥에서는 최대 4.12 log CFU/cm² 이 검출되었음.
- ㉡ 전반적인 미생물 분포가 원료 보관 및 배합실에 집중되어 있으며, 포장실 에서는 현저하게 낮은 균수를 보임.

f) B사 균 동정 실험결과

- ㉠ B사 균의 특징은 다음 표와 같음.

발견위치	우점종 여부	그람 염색결과	균 동정결과
1. 칭량용 국자	O	양성	<i>Gemella morbillorum</i>
2. 정제수 계량통	O	양성	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
3. 바닥-1	O	양성	<i>Kocuria rhizophila</i>
	X	음성	<i>Leclercia adecarboxylata</i>
	X	양성	<i>Aerococcus viridans</i>
4. 바닥-2	O	양성	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>
5. 후드내벽	O	양성	<i>Geobacillus toebii</i>
6. 바닥-3	O	양성	<i>Granulicatella elegans</i>

Table 5. B사 균 동정 실험결과

- ㉡ 각각의 검출된 균의 특징은 다음과 같음.

균주명	특징
<i>Gemella morbillorum</i>	포자를 형성할 수 없으며 이동성이 없는 균으로 이산화탄소함량이 높은 환경에서 잘 번식하며, 인체의 구강내, 장내에서 주로 발견되는 균임. 인체에 해로움은 극히 적은 것으로 알려져 있음.
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	황색포도상구균 (<i>Staphylococcus aureus</i>)과 비슷한 성질을 지니며, 인체 피부에 주로 분포하는 균으로 알려져 있음. 인체의 피부 상처 등으로 침투할 시 병을 일으킨다고 알려져 있음.
<i>Kocuria rhizophila</i>	이 균은 토양과 물에 많이 분포하며 면역력이 약한 사람들에게 때때로 병을 일으키는 균임. 항생제의 효능 및 식품산업에서 가공 전 후의 살균 효과를 볼 때 지표균으로도 쓰인다고 알려져 있음.
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	운동성이 있는 통성혐기성 그람 음성간균으로 이 세균은 음식이나 물 등의 환경에서 분리되며, 단독의 균으로 인체에 피해를 입히는 경우는 극히 적은 것으로 알려져 있음.
<i>Aerococcus viridans</i>	토양 및 육류제품에서 주로 발견되는 균이며, 공기 중의 먼지에서도 주로 발견됨. 같은 균들끼리 군집을 이루며 자라는 것이 특징이며 인체에 유해한 균은 아님.

Table 6. B사 검출된 균의 특징 1

균주명	특징
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	이 균은 공기가 있는 환경에서만 살아남을 수 있는 포자를 형성하는 그람 양성균으로 20 ~ 70 도 안의 환경에서도 자랄 수 있으며 토양에 널리 분포함. 병원균은 아니지만 여러 과일이 포함된 가공품의 경우, 특이한 이취 (guaiacol 에 의한)를 생성하여 품질저하의 주요 원인균으로 알려져 있음.
<i>Geobacillus toebii</i>	건초 및 퇴비에서 주로 발견되는 균이며 이동성이 있고 높은 온도에서 견딜 수 있는 균임. 인체에는 무해한 것으로 알려져 있음. 본 샘플링 결과 중 가장 많이 검출된 균이며, 포자를 형성하여 열, 화학물질 등에 매우 강한 균임. 대한민국의 축산물에 주로 발견되는 균으로 알려져 있음.
<i>Granulicatella elegans</i>	이 균은 포자를 형성할 수 없으며 이동성이 없는 균임. 주로 동물이나 인체의 구강과 상기도, 요생식관, 위장관 등에 상재균으로 존재하나, 주로 심내막염을 유발하는 균임.

Table 7. B사 검출된 균의 특징 2

g) C사 작업환경 내 미생물 오염도 조사

단위: log CFU/cm²

위치	일반세균	대장균군	균 종류
1. 냉동과일선별대	2.68	0	2
2. 바닥-1	0	0	0
3. 선별된 냉동과일 보관용 배트 (VAT)	0	0	0
4. 조합탱크 뚜껑 안쪽	0	0	0
5. 조합탱크 내부 측면	2.61	0	2
6. 바닥-2	0	0	0
7. 계량용 국자	4.00	0	1
8. 계량컵	1.86	0	1
9. 충전기 호퍼 뚜껑 안쪽	2.56	0	1
10. 충전기 호퍼 내부 측면	2.56	0	1
11. 충전기 몰드	1.50	0	2
12. 바닥-3	2.32	0	2
13. 조합탱크 뚜껑 안쪽	0	0	0
14. 조합탱크 내부 측면	0	0	0
15. 바닥-4	2.64	2.00	2
16. 충전기 몰드	0	0	0
17. 바닥-5	2.70	0	2

※ ‘-’ 표시는 일반세균, 대장균 및 대장균군이 검출되지 않음. (검출한계 : 1 CFU/cm²)

Table 8. C사 작업환경 내 미생물 오염도 조사

h) Bacteria 실험결과

- ㉠ 일반세균 실험 결과, 젤리공전 전 라인에서 최대 2.68 log CFU/cm²이 검출되었음.
- ㉡ 푸딩공정 라인의 경우, 공정라인에서는 균이 검출되지 않았으며, 바닥에서만 최대 2.70 log CFU/cm², 대장균군의 경우 2 CFU/cm² 로 전반적인 미생물관리가 잘 이루어지고 있음.

i) C사 균 동정 실험결과

- ㉠ C사 동정한 균의 특징은 다음 표와 같음.

발견위치	우점종 여부	그람 염색결과	균 동정결과
1. 냉동과일선별대	O	음성	<i>Oligella ureolytica</i>
2. 조합탱크 내부 측면	O	양성	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
	X	양성	<i>Gardnerella vaginalis</i>
3. 계량용 국자	O	양성	<i>Geobacillus toebii</i>
4. 계량컵	O	음성	<i>Sphimonas paucimobilis</i>
5. 바닥-3	O	음성	<i>Sphimonas paucimobilis</i>
	X	음성	<i>Kluyvera intermedia</i>
6. 바닥-4	O	음성	<i>Leclercia Adecaboxylata</i>
	X	음성	<i>Kluyvera intermedia</i>
7. 바닥-5	O	양성	<i>Oligella ureolytica</i>
	X	양성	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>

Table 9. C사 균 동정 실험결과

- ㉡ 각각의 검출된 균의 특징은 다음과 같음.

균주명	특징
<i>Oligella ureolytica</i>	이 균은 이동성이 있는 그람 음성균으로 요로감염증이 있는 사람에게서 주로 발견되며 인체의 귀, 상처부위에서도 발견된 적이 있음. 인체에 감염될 시 소변을 알칼리화하여 요로 염석을 일으킴. 항생제에 저항성이 높다고 알려져 있음.
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	토양, 식품 등 다양한 환경에 존재하는 균이며, 포자의 경우 내열성이 가장 높은 균으로 알려져 있기 때문에 멸균여부의 지표균으로도 사용됨. 인체에는 무해한 균으로 알려져 있음.
<i>Gardnerella vaginalis</i>	작고 포자를 형성할 수 없는 그람 양성균이며, 여성에게 세균성 질감을 일으키는 균으로 알려져 있음.
<i>Geobacillus toebii</i>	건초 및 퇴비에서 주로 발견되는 균이며 이동성이 있고 높은 온도에서 견딜 수 있는 균임. 인체에는 무해한 것으로 알려져 있음.

Table 10. C사 검출된 균의 특징 1

균주명	특징
<i>Sphimonas paucimobilis</i>	이 균은 공기가 존재하는 곳에서만 자라는 그람 음성균으로 sphingans 와 같은 물질을 생성할 수 있기 때문에 미생물 대사공학 쪽에서 많이 이용하는 균임. lignin 관련 비페닐 화학 합성물을 분해 가능하며 토양에서 주로 발견됨. 이러한 다양한 화합물을 분해할 수 있으며 낮은 영양상태에서도 자랄 수 있기 때문에 환경에 많이 분포하고 있음. 인체에는 호흡기관 관련 질환을 일으킨다고 알려져 있음.
<i>Kluyvera intermedia</i>	이 균은 물이나 토양에 분포하며 면역력이 약한 사람에게 병을 일으킬 수 있는 균으로 알려져 있음.
<i>Leclercia Adecaboxylata</i>	이 균은 운동성이 있는 통성 혐기성, 그람 음성 간균으로 음식이나 물 등의 환경에서 분리되며, 사람에게 병을 일으키는 경우는 드뭄.
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	이 균은 공기가 있는 환경에서만 살아남을 수 있는 포자를 형성하는 그람 양성균으로 20 ~ 70 도 안의 환경에서도 자랄 수 있으며 토양에 널리 분포함. 병원균은 아니지만 주스의 경우, 특이한 이취 (guaiacol 에 의한)를 생성하여 품질저하의 주요 원인균으로 알려져 있음.

Table 11. C사 검출된 균의 특징 2

j) D사 작업환경 내 미생물 오염도 조사

단위: log CFU/cm²

위치	총 균수	대장균	대장균군
1. 샘플1 보관 탱크 벽면	4.04	-	-
2. 샘플2 보관탱크 벽면	6.81	-	-
3. 샘플 공급	4.43	-	-
4. 마쇄	2.39	-	0.78
5. Side belt	1.98	-	-
6. 하단 롤러	6.95	-	3.28
7. 하단 압착 필터	6.61	0.78	1.11
8. 상단 압착 필터	1.96	-	0.47
9. 파쇄기	7.22	-	1.00
10. 상단 압착포	2.67	-	0.84
11. 하단 압착포	2.32	-	0.95
12. 압착포 쪽 롤러	5.43	-	0.95
13. 완제품이동가이드	6.83	-	1.00
14. 이동가이드 옆판	2.56	-	0.78
15. 칼날 대	7.07	-	1.00

※ ‘-’ 표시는 일반세균, 대장균 및 대장균군이 검출되지 않음. (검출한계 : 1 CFU/cm²)

Table 12. D사 작업환경 내 미생물 오염도 조사

k) Bacteria 실험결과

- ㉠ 마쇄 공정과정 이후 대장균군이 검출되어 현행식품기준 및 규격상의 기준인 1 log CFU/cm² 이상인 공정도 2 군데 존재: 교차 오염이 일어날 가능성이 있음.
- ㉡ 마쇄 이후 공정에서 더 많은 균이 검출됨: 마쇄 이후 공정에서 더 높은 습도로 인해 균이 잘 자랄 수 있는 환경임.
- ㉢ 전반적으로 상단부분보다는 하단부분에서 더 많은 균이 검출되었음 : 하단 부분살균작업 및 공정 중 사용하는 물에 대한 소독 필요.

l) D사 균 동정 실험결과

㉠ D사 동정한 균의 특징은 다음 표와 같음.

발견위치	우점종 여부	그람 염색결과	균 동정결과
샘플 2 보관탱크 벽면	X	양성	<i>Staphylococcus Vitulinus</i>
샘플 2 보관탱크 벽면	X	양성	<i>Bacillus cereus</i>
샘플 2 보관탱크 벽면	O	양성	<i>Streptococcus sanguinis</i>
대두공급	X	양성	<i>Bacillus mycoides</i>
하단롤러	O	음성	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
하단압착필터	X	음성	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
상단압착필터	X	음성	<i>Enterobacter cloacae</i>
완제품 이동가이드	O	음성	<i>Raoultella planticola</i>

Table 13. D사 균 동정 실험결과

㉡ 각각의 검출된 균의 특징은 다음과 같음.

균주명	특징
<i>Staphylococcus Vitulinus</i>	이 균은 주로 식품과 동물에서 유래되며 fructose, trehalose, mannitol & sucrose 를 분해하여 산을 생성할 수 있는 특징을 가지고 있음. 병원성에 대해서는 알려진 바가 없는 균임.
<i>Bacillus cereus</i>	Spore 를 형성할 수 있으며, 식중독을 일으킴. 식품에 5 log CFU 이상 함유되어 있어야 식중독을 일으킴. 샘플링결과 <i>Bacillus cereus</i> 는 약 1 log CFU 미만으로 검출됨.
<i>Streptococcus sanguinis</i>	주로 건강한 사람의 입 속에서 서식하며 충치를 유발하는 균으로 알려져 있음. 혈관안으로 직접 들어가게 될 경우, 위험하며 치료도 어려운 균임. Spore 를 형성하지 않기 때문에 열로 쉽게 죽일 수 있는 균임.
<i>Bacillus mycoides</i>	토양에 주로 분포하며 배지상에서 자랐을 경우 크기가 약 3 μm보다 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 질소고정능력이 있음.

Table 14. D사 검출된 균의 특징 1

균주명	특징
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	대장균 군 중 하나이며 토양에 많이 분포함. 면역력이 약한 사람에게 감염될 경우, 병원성 대장균과 비슷한 식중독을 유발할 수 있으며, 공기 중으로 는 감염되지 않고 접촉을 통해서만 감염되는 특징이 있음.
<i>Enterobacter cloacae</i>	장내에 많이 서식하며 병을 일으키지 않는 균임. 물, 토양 등에 널리 분포 함.
<i>Raoultella planticola</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 와 거의 유사한 균이며 10 °C의 환경에서도 자랄 수 있 다는 점이 차이점임. 물과 토양에 많이 분포하며 인체에 감염되어 병을 일으킨 사례는 거의 없음.

Table 15. D사 검출된 균의 특징 2

㉔ Super-heated steam 과 HOCl 소독제의 순차살균을 통한 상승효과 검증

a) Steam 및 HOCl 반응 장치 제작

- ㉕ 먼저 실험하기에 앞서 현장적용과 유사하게 만들기 위한 실험 장치를 제작하였음.
- ㉖ CAD 프로그램을 이용하여 아래 그림과 같이 설계를 진행하였으며 이를 바탕으로 실제 장 비 제작을 진행함.

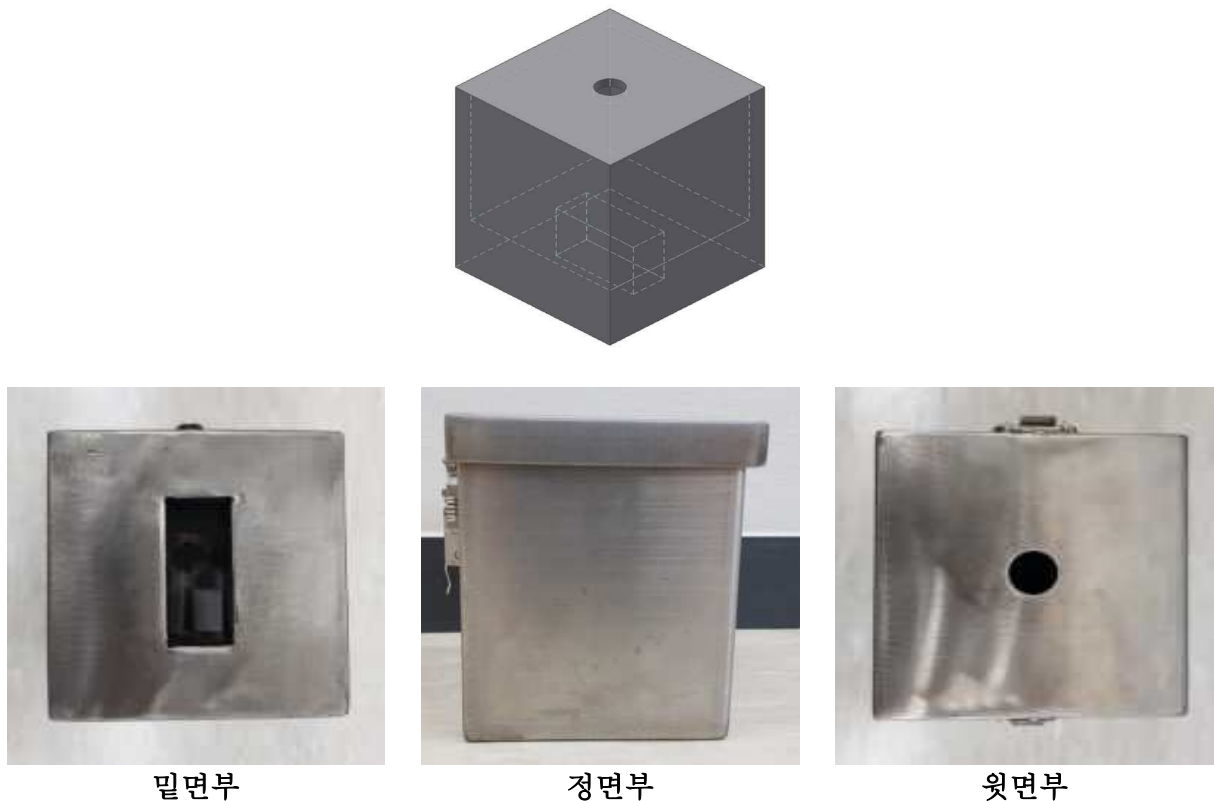


Fig 1. Steam 및 HOCl 반응 장치 제작

- ㉗ 현장모니터링을 다니면서 조사해본 결과, 실제 공정표면 및 바닥을 살균 소독할 시 평균적 으로 10 cm 거리를 두고 살균제를 분사하거나 처리를 진행하였음. 또한 HOCl의 경우, 넓은 표 면에서 처리 시 주변 습도 등으로 인해 살균에 영향을 받을 수 있고 Spray 사용 시 고르

계 HOCl의 분사가 어려움이 있음. 이를 바탕으로 스테인리스를 이용하여 10 cm 거리 및 고르게 HOCl의 분사를 위한 장치를 개발함. 위의 사진대로 밑면에 표준균주들을 접종한 스테인리스를 두고 윗면에서 HOCl 및 SHS 처리를 진행하였음.

b) 2 x 5 cm 스테인리스판 제작



Fig 2. 2 x 5 cm
스테인리스판 제작

㉠ 대부분의 작업 공정에서 재질은 스테인리스로 되어 있음. 따라서 직접 제작한 SHS 및 HOCl generator의 검증실험을 위해 스테인리스는 2 x 5 cm형태의 쿠폰형태로 제작함. 쿠폰의 크기는 균 접종 이후 탈리를 위해 적합한 크기를 고려하여 제작하였음.

c) 균 준비

㉠ 표준균주인 *Staphylococcus aureus* 및 *Bacillus cereus* 는 KCTC를 통해 분양 받았음. 각각의 균주들을 TSB 5 mL에 24 ~ 48 hr동안 배양하였음. 배양한 균들을 원심분리기를 이용하여 13,000 rpm으로 1 분여간 원심분리한 후 상등액을 제거하여 pellet을 얻음. 이와 같은 방법을 2 번 동안 PBS를 이용하여 washing 하여 최종적으로 약 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL의 균액을 얻음.

d) 균의 접종 및 탈리, 계수 방법

㉠ 균의 접종방법은 다음과 같음. 클린 벤치에서 Autoclave로 멸균한 스테인리스 쿠폰 하나 당 준비한 균액 100 uL을 1 cm²당 약 10 uL 씩 spotting 방법을 이용하여 접종하였음. 이후, 2 시간동안 건조하여 표준균주들을 완전히 건조된 상태로 만듦.

㉡ 처리한 이후, 대조군 및 실험군은 유리비드 3 g 및 30 mL의 중화배지 (D/E Neutralizing) 가 포함된 건조된 50 mL conical tube에 넣고 2 분간 vortexer을 이용하여 3000 rpm으로 vortexing 하여 탈리함.

㉢ 탈리된 *Bacillus cereus* 는 MYP 배지를 이용하여, *Staphylococcus aureus*는 BPA 배지를 이용하여 serial dilution방법으로 희석하여 도말한 뒤 24 ~ 48 시간 배양하여 최종적인 균수를 확인함. 배양 한 후 의심되는 콜로니에 대해서는 Real time PCR 방법을 이용하여 검증하는 확인시험과정을 거침. 아무것도 처리하지 않은 대조군의 경우, *Bacillus cereus*는 $6.61 \pm 0.27 \log \text{CFU/cm}^2$ 이며, *Staphylococcus aureus*는 $6.30 \pm 0.10 \log \text{CFU/cm}^2$ 임.

e) 통계처리

㉠ 실험은 3 번 반복하여 평균을 내었으며 각각의 처리결과에 대한 통계처리는 SAS프로그램을 이용하여 유의수준 0.05 에서 유의적인 차이가 발생하였는지 확인하였음.

f) Super Heated Steam 단독 처리

- ㉠ Super Heated Steam Generator을 예열과정을 거쳐 배출하는 부분의 Steam의 최종온도가 250 °C가 되도록 함. 250 °C 도달 후 각 표준균주들을 접종한 스테인리스 쿠폰들을 시간별 (5 ~ 15 초)로 처리하였음. 처리한 이후, 잔열로 인한 살균효과를 막기 위해 냉장 보관한 유리비드를 첨가한 중화배지가 들은 50 mL conical tube에 즉시 넣은 후, 약 2 분간 냉장 보관하여 잔열로 인한 살균효과를 방지함. 이후 위에 서술한 방식대로 탈리하고 계수하여 정량적인 살균효과를 확인하였음.
- ㉡ Steam단독처리 결과는 아래 표와 같음.

SHS 처리	처리시간	MYP	BPA
	5 초	1.51 ± 0.19 A	1.63 ± 0.30 A
	10 초	2.78 ± 0.14 B	2.21 ± 0.24 B
	15 초	3.46 ± 0.01 C	3.03 ± 0.25 C

Table 16. Steam 단독처리 결과

g) HOCl 단독 처리

- ㉠ 직접 제작한 HOCl Generator을 이용하여 40 ppm 수준의 HOCl 용액을 얻었음. 40 ppm으로 설정한 이유는 시중에서 많이 판매되고 있는 HOCl 살균제들의 잔류염소 ppm을 측정하여 참고한 후, 실제 산업체에서 사용할 시 세정이 쉽고 염소냄새가 적은 ppm 조건으로 설정하였음. 접종한 스테인리스 쿠폰을 직접 제작한 실험장치 밀면에 두고 40 ppm의 HOCl 1 mL을 분사한 후, 반응시간 (5 ~ 20 분)별로 살균효과를 측정하였음. 반응시간에 도달한 이후에는 추가적인 HOCl의 살균효과를 막기 위해 곧바로 HOCl 중화배지라고 알려진 D/E 중화배지 및 탈리를 위한 유리비드를 넣은 conical tube에 넣어 추가적인 살균효과를 방지함.
- ㉡ HOCl 단독 처리 시 살균 효과가 낮아 분사하는 양을 약 5 mL까지 늘려보았으나 감소율에는 큰 차이가 없었음.

HOCl 처리	처리시간	MYP	BPA
	5 분	0.18 ± 0.04 A	0.24 ± 0.21 A
	10 분	0.39 ± 0.10 A	0.31 ± 0.19 A
	15 분	0.63 ± 0.23 B	1.02 ± 0.09 B

Table 17. HOCl 단독처리 결과

h) SHS 및 HOCl 순차살균 실험

- ㉠ SHS 및 HOCl 순차살균 실험을 위해 각각 단독 처리한 조건들을 조합하여 예비 실험을 진행함. 그 결과 SHS 10 초 및 HOCl 5 분의 순차살균의 경우가 가장 적은시간으로 가장 높은 살균효과를 나타냄. 순차살균을 위해 SHS를 위에 서술한 방식대로 처리한 이후, 잔열로 인한 추가적인 살균효과를 막기 위해 멸균한 통에 즉시 보관하여 냉동된 상태인 아이스 팩 및 냉장고에 보관하여 약 2 분간 보관함. 실제 온도를 측정해본 결과, 약 3 ~ 4 초 이내에 25 °C 이하로 내려감을 확인함. 이후, HOCl을 1 mL 분사한 후 5 분의 반응시간을 거친 이후에 D/E 중화배지 및 유리비드가 들은 conical tube에 넣어 탈리 후 계수하였음.

Combination	처리시간	MYP	BPA
	10 초 + 5 분	> 6.13 ± 0.26	> 5.82 ± 0.10
※Detection limit: log 3 CFU/cm ²			

Table 18. HOCl 및 Steam 순차살균 결과

㉔ Super-heated steam 과 HOCl 을 기반으로한 설비표면 및 작업장 바닥용 맞춤형 살균시스템 개발 및 현장검증

a) SHS 및 HOCl 현장검증 실험

- ㉠ 처리 표면의 경우 (주세니젠에서 개발한 비구획장치인 Beamtemplate를 활용하여 10 cm X 10 cm 면적을 구획하였음. 개발한 HOCl Generator를 이용하여 40 ppm 수준의 HOCl 용액을 생산한 후 현장에 적용하였으며, HOCl 40 ppm을 5 분 동안 처리 한 후 SHS generator를 활용하여 10 초 동안 순차 처리함. 처리가 끝난 표적 표면은 swab을 활용하여 샘플링 하였으며 샘플분석은 tryptic soy agar에 spreading 한 후 일반세균 수를 개체하여 처리 전과 후를 비교함.
- ㉡ HOCl 및 SHS generator 순차처리를 통해 현장검증을 한 결과 처리 전 일반세균 수에 비해 처리 후 일반세균수가 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었음.

단위: Log CFU/cm²

위치	처리 전 세균 수	처리 후 세균 수
1. 보관탱크 벽면 1	4.04	ND
2. 보관탱크 벽면 2	6.81	ND
3. 보관탱크 주변 바닥	-	1.64
4. 마쇄 (맷돌)	2.39	ND
5. 마쇄주변 바닥	-	ND
6. 압착포 쪽 롤러	5.43	0.90
7. 완제품 이동 가이드	6.83	ND
8. 설비장 바닥	-	ND
※ ND: Non-Detected, Detection limit: 0.1 CFU/cm ²		

Table 19. 현장검증 평가 결과



Fig 3. 현장 평가 사진

④ 2차년도 요약

㉓ 현장수요조사를 통해 식품품목별 분석 빈도가 높은 식중독균 조합 조사
 식품품목별 위해 요인이 큰 식중독 세균 조사하여 총 10 종의 미생물을 선정
 식품품목별로 총 5 개 그룹으로 그룹화를 완료

㉔ 다양한 조합의 식중독균 multiplex real time PCR kit 개발

각각의 식중독균에 따른 target gene 선정 후 primer 및 probe 세트 선정
 주요 식중독균 16 종에 대해 특이성 검증을 완료하였으며, 그룹화한 multiplex에 대하여 최적화
 조건 확립

㉕ 5종 이상의 multiplex real time PCR kit 제품화 및 식품품목별 현장 검증

총 5 종의 multiplex Real time PCR kit에 대하여 상품화를 완료
 각각의 PCR kit에 대하여 현장검증 완료

④ 2차년도 상세 내용

연구목표 : Multiplex real time PCR kit 개발 및 제품화

㉓ 식품 품목별 맞춤형 multiplex real time PCR kit 개발 및 제품화

1) 현장수요조사를 통해 식품품목별 분석빈도가 높은 식중독균 조합 조사

- 문헌조사 및 실제 식품산업현장 조사를 진행하여 품목별 분석 빈도가 높은 식중독균 조합을 조사하였음.
- 2002 년부터 현재까지 식중독균별 식중독 발생건수를 조사해본 결과, 병원성대장균, 살모넬라, 장염비브리오균, 황색포도상구균 순으로 식중독 발생 건수가 높음을 보이고 있음.

원인물질	구분	2002년	2003년	2004년	2005년	2006년	2007년	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년	2013년	2014년	2015년	2016년	2017년	2018년	2019년	합계
병원성대장균	발생건수	2	6	21	15	38	62	36	37	28	32	31	31	38	39	57	47	59	undefin	579
살모넬라	발생건수	25	17	23	22	22	42	22	17	27	24	9	13	24	13	21	20	18	undefin	359
장염비브리오균	발생건수	10	22	15	17	25	33	24	12	18	9	11	5	7	5	22	9	10	undefin	254
황색포도상구균	발생건수	8	13	11	16	32	38	15	12	19	10	5	5	15	11	1	0	4	undefin	215
바실러스세레우스	발생건수	0	3	2	1	5	1	14	0	14	6	6	8	11	6	3	10	16	undefin	106
기타세균	발생건수	2	6	13	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	5	undefin	31
불명	발생건수	28	47	52	26	77	221	157	100	105	108	129	89	157	144	177	147	123	undefin	1,887
진행중	발생건수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	undefin	29
합계	발생건수	75	114	137	98	200	397	268	178	211	191	191	151	252	218	281	234	258	29	3,483

Table 20. 식중독균별 식중독발생 건 수

[자료출처: 식약처 식중독 발생통계]

- 원인식품별 국내 식중독 발생 현황을 통해 식중독 검증이 필요한 식품군을 확인할 수 있음. 발생 건수 상위 5 가지로는 어패류, 야채류, 육류, 복합조리식품, 난류 순이며, 발생 환자 수 상위 5 가지로는 야채류, 육류, 복합조리식품, 어패류, 난류 순으로 나타남.

구분		2010	2011	2012	2013	2014	2015
계	건수	271	249	266	235	349	339
	환자수	7218	7105	6058	4958	7466	6,046
어패류 및 그 가공품	건수	24	9	16	23	16	15
	환자수	405	291	326	216	185	179
육류 및 그 가공품	건수	12	9	6	17	15	19
	환자수	173	200	231	457	838	1,489
유류 및 그 가공품	건수	1	1	0	0	0	0
	환자수	25	9	0	0	0	0
난류 및 그 가공품	건수	5	2	0	2	4	3
	환자수	110	132	0	123	990	66
야채류 및 그 가공품	건수	12	10	24	23	14	5
	환자수	327	1335	1546	1178	1301	187
복합 조리 식품	건수	17	16	9	11	11	13
	환자수	656	1139	157	350	284	281
곡류 및 그 가공품	건수	4	0	0	0	1	0
	환자수	146	0	0	0	33	0
기타*	건수	17	13	6	19	10	14
	환자수	1358	646	382	884	218	475
불명	건수	179	189	205	140	278	167
	환자수	4018	3353	3416	1750	3617	2,076

Table 21. 연도별 원인 식품별 국내 식중독 발생 현황 (5 개년 현황)

[자료 출처: 식약처 식중독 발생통계]

- 본 연구진은 (주)세니젠 식품관련 고객사 중 PCR 기기를 보유한 약 100 여개 사를 대상으로 현장수요조사를 진행하였음.
- 현장수요조사 결과, 모든 식품군에서 조사하는 주요 균으로는 장출혈성대장균(EHEC) 및 장독소성 대장균 (ETEC)임.
- 어패류 및 그 가공품관련 업체에서는 *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*를 주로 검사함.
- 난류, 육류, 유류 및 그 가공품 관련 업체에서는 *Salmonella* spp. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*를 주로 검사함.
- 복합조리식품, 곡류 및 그 가공품 관련 업체에서는 *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*를 주로 검사함.
- 이를 바탕으로 본 연구에서는 EHEC, ETEC, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* 에 대한 Multiplex Real time PCR kit를 개발하여 상업화하였으며, 각각의 그룹은 다음 표와 같음.

그룹	식중독균명(유전자명)
M1	EHEC(VT1, VT2)
M2	ETEC(LT, ST)
M3	<i>Bacillus cereus</i>
	<i>Yersinia enterocolitica</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
M4	<i>Vibrio cholerae</i>
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
	<i>Vibrio vulnificus</i>
M5	<i>Salmonella</i> spp.
	<i>Listeria monocytogenes</i>

Table 22. Multiplex Real time PCR kit group

- EHEC 및 ETEC의 경우, strain에 따라서 두 독소유전자를 모두 보유하고 있거나 둘 중 하나의 독소 유전자만을 보유하고 있기 때문에 두 유전자를 모두 검출할 수 있는 Multiplex Real time PCR kit 그룹으로 설정하였음.

2) 다양한 조합의 식중독균 multiplex real time PCR kit 개발

- (주)세니젠은 아래 그림과 같은 방식으로 식중독 세균 5그룹에 대한 multiplex Real time PCR 키트를 개발하였음.

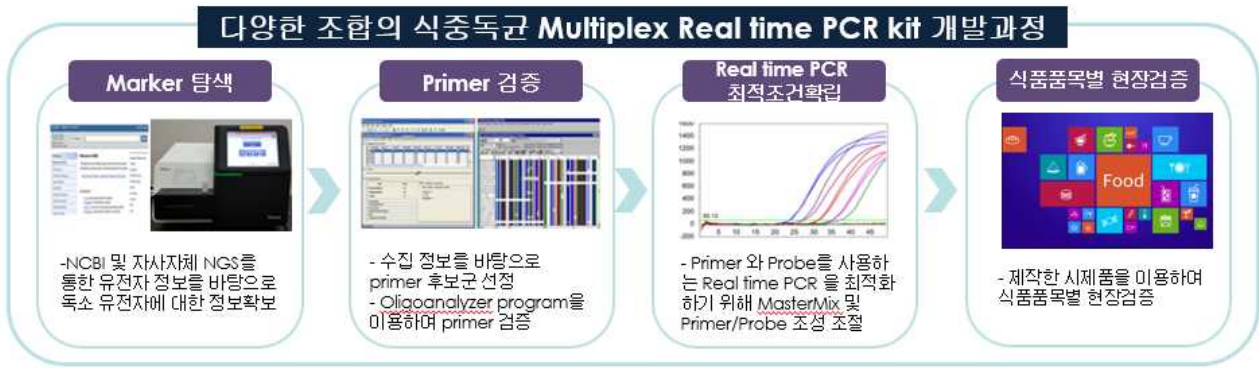


Fig 4. 다양한 조합의 식중독균 Multiplex Real time PCR kit 개발과정

A. 유전자 마커 탐색

a) 자사가 보유하고 있는 대상 식중독균 및 기타 환경, 기관에서 수집한 대상 식중독균에 대한 유전자마커 탐색 결과는 다음과 같음.

- 각 식중독균에 대한 자사 보유 isolate에 대하여 Illumina MiSeq platform을 이용한 draft genome sequencing 진행 후, reference strain의 genome에 mapping하여주었음.
- Data 신뢰도 확보를 위해 NCBI에 보고된 각 식중독 균주에 대하여 추가적으로 Mapping 분석을 수행하였음.
- NCBI의 RefSeq 데이터베이스를 활용하여 각 식중독균의 유전체 정보를 100 개 이상 확보하였으며, 이 유전체 정보로부터 약 3,000 개의 유전자를 분리, 획득해내었음.
- 이와 같이 획득해낸 유전자들에서부터, 각 유전자별로 종 내에서 어떠한 변이가 있는지를 확인하고자 하였으며, 이를 Multiple Sequence Alignment 작업을 통해 알아보았음.

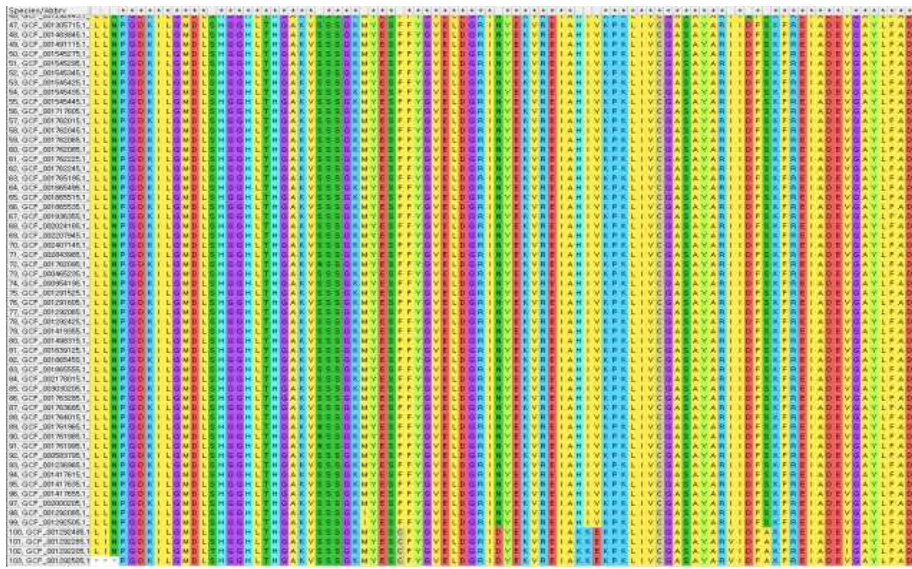


Fig 5. Multiple Sequence Alignment를 통한 유전자 내 상동성 계산 예시

- 또한, 아래와 같은 수식을 통해 각 유전자의 nucleotide diversity를 계산하여서 수치적으로 어느 정도의 종 내 변이율을 가지는지 계산하였으며, 이를 토대로 가장 변이율이 낮은 유전

자의 서열을 확보하고자 하였음.

$$\pi = \sum_{i,j} x_i x_j \pi_{ij} = 2^* \sum_{i=2}^n \sum_{j=1}^{i-1} x_i x_j \pi_{ij} \quad (\text{Nei and Li, 1979})$$

* 위 수식에서 x_i, x_j 는 각각 i 번째, j 번째 서열의 빈도를 의미하며, π_{ij} 는 i 번째 및 j 번째 서열 사이의 염기서열 차이 수를 의미함.

- 각 균주에 대한 Marker 유전자 후보를 찾은 후 각 유전자의 toxic effect 및 선행연구 진행 여부 등을 종합적으로 판단하여 각각의 균주에 대한 유전자를 최종 marker로 선정하였음
- 각 Marker에 대하여 추가적인 염기서열 상동성 분석을 진행하고, 가장 universal 한 부분을 찾아 primer로 제작하였음.
- 각 식중독 균별 Marker는 아래 표와 같음.

그룹	식중독균명	Target 유전자
M1	EHEC	<i>VT1, VT2</i>
M2	ETEC	<i>ST, LT</i>
M3	<i>Bacillus cereus</i>	<i>hbl</i>
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>inv</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femA</i>
M4	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>hly</i>
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tlh</i>
	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>vvh</i>
M5	<i>Salmonella spp.</i>	<i>invA</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>prfA</i>

Table 23. 식중독 균별 Marker 탐색과정을 통한 Target 유전자

B. Primer 선정

- 각 대상 식중독 세균에 대한 최종 primer는 다음과 같음.

Group	Pathogen	Target gene	Primer	Sequence (5' -> 3')
1	EHEC	<i>VT1</i>	F	GCG GTT ACA TTG TCT GGT GA
			R	AAC CGT AAC ATC GCT CTT GC
			P	Cy5- CTG CAT CCC CGT ACG ACT GA -BHQ2
		<i>VT2</i>	F	TGA AGA AGA TGT TTA TGG CGG T
			R	TTC CTG TCA ACT GAG CAC TTT
			P	FAM- ATG GCG GCG GAT TGT GCT A -BHQ1
2	ETEC	<i>ST</i>	F	CAT GTT CCG GAG GTA ATA TGA AG
			R	TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC AGG
			P	CY5- CAC CTT TCG CTC AGG ATG CTA AAC CA -BHQ2
		<i>LT</i>	F	CTG CTA ATC TGT AAC CAT CCT CTG
			R	GAT GAA CGA TTA CAT CGT AAC AGG

			P	FAM- TTC TGT AAT ACC GGT CTC TAT ATT CC -BHQ1
3	<i>Bacillus cereus</i>	<i>hbl</i>	F	CCC GAA GGA CTG AAG AAA GCA TT
			R	TGA ATC TGT GGC TTC GCT GTA T
			P	FAM- AGA GGG GGG AGA GTT GCT CAA AAA- BHQ1
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>inv</i>	F	GCG TAA TAT CGA CAT CTC CTA
			R	TGG TGT TCC GGT AAC TAT TAG
			P	CY5- TGC TGA CAA CTA TAC CGC CAG T- BHQ2
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femA</i>	F	GGA AGT TAT GCC GTG CAA TG
			R	CCA GCA TCT TCA GCA TCT TC
			P	VIC- AAT CAT GGC ATT GAC CGT TA - MGB
4	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>hly</i>	F	CGC AAT ATC CAG TCC AAC
			R	CAG CAT TGT AAT ATT TTA TTG CAT G
			P	CY5- AAT AAT ATC CGC CGC TTC ACC -BHQ2
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>vvh</i>	F	TAC CGC AGA ATG AGA ACA
			R	CGG TTG TTG ATG CGA TAG
			P	VIC- TAC TTA CGG TTA CTC CAT CGG T -MGB
	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>tlh</i>	F	CGG TCA ATG TAG AGG TCT C
			R	CGA ACA CAG CAG AAT GAC
			P	FAM- CCG CTG CCA TTG TAT AGT CTT -BHQ1
5	<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	F	CCA GAT CCA TAC ATC ATC GTC
			R	ACT GGA AGT AAG TGG TTG C
			P	CY5- ACG CTG ATA CAG ATA CTT GGC A- BHQ2
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>prfA</i>	F	TTC GGT TCA AGT TCA CGA C
			R	TGC GGC GGA AAT TTT ACT AG
			P	FAM- CCA TCC AAA GCT CAG AAC GAG AAA G -BHQ1

Table 24. 각 식중독 균 별 최종 선정 primer

- F, R, P primer는 각각 Forward, Reverse, Probe primer를 의미하여 Probe primer의 경 5'에는 fluorescence dye, 3'에는 Quencher를 붙여 사용하였음.
- 각 primer는 Primersoft사의 AlleID7 프로그램을 이용하여 제작하였음 .
- 각 식중독균 및 유전자별로 5 가지 이상의 primer를 제작한 이후, 검증과정을 통해 가장 효율성이 높은 primer를 최종 primer로 선정하였음.

C. Primer 검증 및 최적화

- 선정된 F, R, P primer를 이용하여 Real time PCR 기술로 주요 16 종 식중독균에 대한 위양성 검증 및 최적화 결과는 다음과 같음.
- 균주별 민감도 실험을 위해 자체적으로 샘플링 한 환경 분리 균주 및 대학병원을 통해 구한 임상분리 균주를 준비하였음.
- 균주 별 선택 증균 배지에 단일 콜로니만을 키운 후, DNA를 추출하여 민감도 실험을 진행하였음.
- 민감도 실험 결과는 아래 표와 같음.

균주이름	환경분리균주 민감도 실험 결과	임상분리균주 민감도 실험 결과
EHEC	45/45 (100%)	10/10 (100%)
<i>Listeria monocytogenes</i>	51/53 (96,22%)	31/31 (100%)
<i>Salmonella</i> spp.	61/61 (100%)	25/25 (100%)
<i>Bacillus cereus</i>	31/31 (100%)	7/7 (100%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	28/29 (96.55%)	14/14 (100%)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	41/41 (100%)	27/27 (100%)
ETEC	24/24 (100%)	13/13 (100%)
<i>Vibrio cholerae</i>	31/31 (100%)	5/5 (100%)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	24/24 (100%)	13/13 (100%)
<i>Vibrio vulnificus</i>	26/26 (100%)	11/11 (100%)

Table 25. 민감도 실험 결과

- 1 시간 이내 검출 여부를 확인하기 위하여 총 40 cycle 반응 중 35 cycle 이내 CT 확인을 진행함.
- 위양성 검증을 위해 사용한 주요 16 종 식중독 균에 대한 정보는 다음과 같음.

균주이름	균주의 출처
<i>Campylobacter jejuni</i>	KCTC 15212
<i>Campylobacter coli</i>	NCTC 11168
<i>Clostridium perfringens</i>	NCCP 15911
<i>Vibrio vulnificus</i>	CMCP6
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCTC 2471
<i>Vibrio cholerae</i>	NCCP 14552
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCCP 14552
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 700720
<i>Bacillus cereus</i>	KCTC 3624
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 55076
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 27664
EHEC	ATCC 43895
EAEC	NCCP 14039
ETEC	NCCP 15732
EPEC	NCCP 15661
EIEC	NCCP 15663

Table 26. 위양성 검증용 16종 식중독 균주

- 각각 균주에 대한 증균 액체 배지에서 37 °C, 24-48 시간 동안 배양한 후, Intron 사의 G-spin 키트를 이용하여 DNA를 추출한 후 위양성 검증실험에 사용하였음.
- 모든 실험은 3 반복을 진행하였음.
- Real time PCR 기기는 ABI사의 7500 fast 기기를 사용하여 실험하였음.
- PCR 반응 조건은 다음과 같음.

단계	온도	시간
1. Preheating	50 °C	2 분
2. Initial denaturation	95 °C	10 분
3. Denaturation	95 °C	15 초
4. Annealing	60 °C	1 분

- 1, 2 번은 처음 1 회만 실시하며 3, 4 번 단계를 35 cycle까지 진행하였음 .
- M1에 대한 multiplex의 Real time PCR 결과는 다음과 같으며 위양성결과를 나타내지 않음을 확인함.

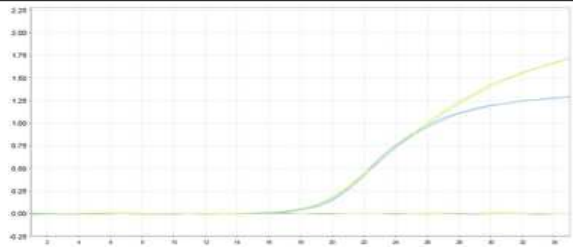
기기명	ABI 7500 fast 기기
그래프	
평균 Ct value	EHEC (VT1) : 20.81 ± 0.09 EHEC (VT2) : 19.91 ± 0.15

Table 27. M1 multiplex Real time PCR 결과

- M2에 대한 multiplex의 Real time PCR 결과는 다음과 같으며 위양성결과를 나타내지 않음을 확인함.

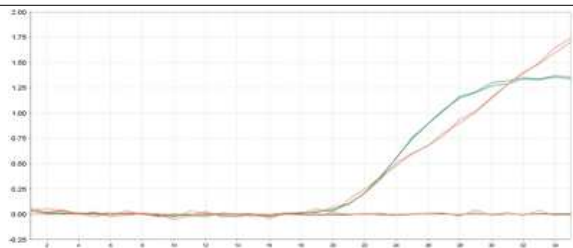
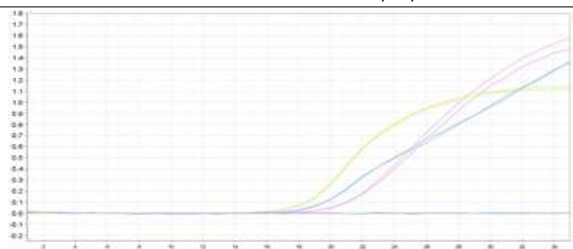
기기명	ABI 7500 fast 기기
그래프	
평균 Ct value	ETEC (ST) : 21.74 ± 0.14 ETEC (LT) : 21.62 ± 0.32

Table 28. M2 multiplex Real time PCR 결과

- M3에 대한 multiplex의 Real time PCR 결과는 다음과 같으며 위양성결과를 나타내지 않음을 확인함.

기기명	ABI 7500 fast 기기
그래프	
평균 Ct value	<i>Staphylococcus aureus</i> (femA) : 21.93 ± 0.07 <i>Bacillus cereus</i> (hbl) : 19.92 ± 0.03

value	<i>Yersinia enterocolitica</i> (inv) : 18.93 ± 0.06
-------	---

Table 29. M3 multiplex Real time PCR 결과

- M4에 대한 multiplex의 Real time PCR 결과는 다음과 같으며 위양성결과를 나타내지 않음을 확인함.

기기명	ABI 7500 fast 기기
그래프	
평균 Ct value	<i>Vibrio cholerae</i> (hly) : 16.57 ± 0.19 <i>Vibrio vulnificus</i> (vvh) : 14.87 ± 0.25 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (tlh) : 17.80 ± 0.91

Table 30. M4 multiplex Real time PCR 결과

- M5에 대한 multiplex의 Real time PCR 결과는 다음과 같으며 위양성결과를 나타내지 않음을 확인함.

기기명	ABI 7500 fast 기기
그래프	
평균 Ct value	<i>Listeria monocytogenes</i> (prfA) : 18.24 ± 0.23 <i>Salmonella</i> spp. (invA) : 18.75 ± 0.17

Table 31. M5 multiplex Real time PCR 결과

3) 5 종이상의 Multiplex Real time PCR kit 제품화 및 식품품목별 현장검증

A. 식품품목별 특이도, 민감도 평가

- 실제로 개발한 제품이 관련 식품에 적용 가능한지 확인하기 위해 식품 품목별 특이도, 민감도 평가를 진행함.
- Real time PCR은 식품의 다양한 인자들(금속이온, 지질분자, 탄수화물 등)에 의해 반응이 저해될 수 있으므로 실제 적용실험은 미생물배양액 균액만 가지고하는 실험과 다른 결과가 나올 수 있음.
- 또한 식품품목별로 본래 보유하고 있는 균의 DNA나 식품자체의 DNA로 인해 위양성 결과가

도출 될 수 있으므로 이에 대한 특이도 및 민감도 평가를 진행함.

- 각 그룹에 대하여 3 가지 이상의 식품품목을 선정하여 샘플로 사용하였으며, 주변 식료품점에서 샘플을 구매하였음.
- 각 식품은 식품품목별로 식중독 사고가 빈번하거나 PCR 저해요인이 염 등이 많은 식품위주로 사용하였음.
- 각 그룹별 검사한 식품품목은 아래 표와 같음.

그룹	식중독균 명 (유전자명)	식품품목
M1	EHEC	돼지고기
		상추
		닭고기
M2	ETEC	돼지고기
		상추
		닭고기
M3	<i>Bacillus cereus</i>	소세지
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	두부
	<i>Staphylococcus aureus</i>	상추
M4	<i>Vibrio cholerae</i>	명란젓
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	홍합
	<i>Vibrio vulnificus</i>	훈제연어
M5	<i>Salmonella</i> spp.	훈제연어
	<i>Listeria monocytogenes</i>	닭고기
		오리고기

Table 32. 각 그룹별 검사할 식품품목

- 각각의 식중독균에 대한 Primer set가 식중독 균을 실제 식품에서 어느 수준까지 검출될 수 있는지 여부를 검증하였음.
- 각각의 식중독 균을 선택증균배지에 37 °C, 24-48 시간동안 배양한 후, 3M사의 saline dilution 용액을 이용하여 10 배씩 희석한 후 각 용액 1 mL씩을 검사하고자하는 식품품목에 접종한 후, 균질화시킨 용액에서 intron 사의 G-spin 키트를 이용하여 DNA를 추출한 후 Real time PCR을 진행하였음.
- 각 균질화한 용액에 대하여 각각의 식중독균의 선택배지에 도달하여 37°C, 24-48시간동안 배양한 후, 균수를 정량적으로 측정하여 개발한 PCR 키트에 대한 민감도를 측정하였음.
- 각 실험은 3 반복을 진행하였음.
- 결과는 2 log CFU/mL 수준에서의 CT 평균값 및 선택배지에 도달한 실제 정량한 균의 평균값을 나타내었음.
- 식품 내부인자로 인한 Real time PCR 특이도를 관찰하기 위해 아무 처리하지 않은 식품 균질화 용액에서 DNA를 추출한 후 Real time PCR을 진행하였음.
- 상세한 결과는 아래와 같음.
- M1에 대한 multiplex의 Real time PCR 결과는 다음과 같으며 2 log CFU/ml 이하 수준으로 검출 가능하며, 식품 내부인자로 인한 위양성결과를 나타내지 않음을 확인함.

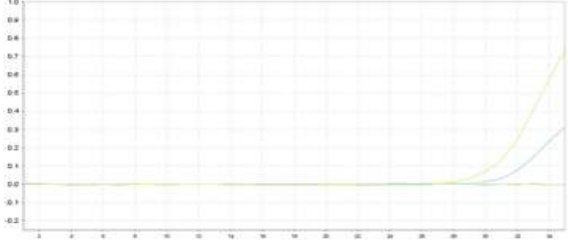
기기명	ABI 7500 fast 기기
그래프	
평균 Ct value	EHEC (VT1) : 31.08 ± 0.39 EHEC (VT2) : 28.94 ± 0.27

Table 33. M1에 대한 식품품목별 특이도 및 민감도 검증 결과

- M2에 대한 multiplex의 Real time PCR 결과는 다음과 같으며 2 log CFU/mL 이하 수준으로 검출 가능하며, 식품 내부인자로 인한 위양성결과를 나타내지 않음을 확인함

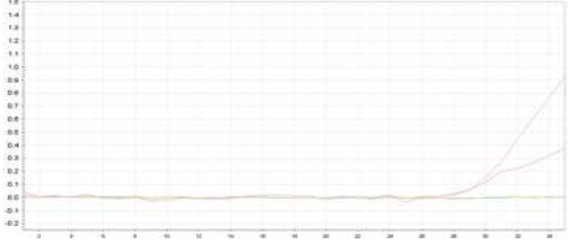
기기명	ABI 7500 fast 기기
그래프	
평균 Ct value	ETEC (ST) : 28.57 ± 0.18 ETEC (LT) : 29.95 ± 0.14

Table 34. M2에 대한 식품품목별 특이도 및 민감도 검증 결과

- M3에 대한 multiplex의 Real time PCR 결과는 다음과 같으며 2 log CFU/mL 이하 수준으로 검출 가능하며, 식품 내부인자로 인한 위양성결과를 나타내지 않음을 확인함

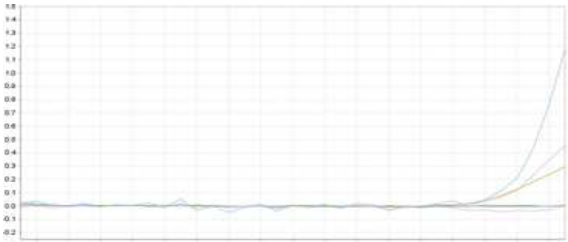
기기명	ABI 7500 fast 기기
그래프	
평균 Ct value	<i>Staphylococcus aureus</i> (femA) : 28.91 ± 0.13 <i>Bacillus cereus</i> (hbl) : 30.35 ± 0.03 <i>Yersinia enterocolitica</i> (inv) : 28.65 ± 0.22

Table 35. M3에 대한 식품품목별 특이도 및 민감도 검증 결과

- M4에 대한 multiplex의 Real time PCR 결과는 다음과 같으며 2 log CFU/mL 이하 수준으로 검출 가능하며, 식품 내부인자로 인한 위양성결과를 나타내지 않음을 확인함

기기명	ABI 7500 fast 기기
그래프	
평균 Ct value	<i>Vibrio cholerae</i> (hly) : 25.50 ± 0.12 <i>Vibrio vulnificus</i> (vvh) : 26.22 ± 0.24 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (tlh) : 28.83 ± 0.26

Table 36. M4에 대한 식품품목별 특이도 및 민감도 검증 결과

- M5에 대한 multiplex의 Real time PCR 결과는 다음과 같으며 2 log CFU/mL 이하 수준으로 검출 가능하며, 식품 내부인자로 인한 위양성결과를 나타내지 않음을 확인함

기기명	ABI 7500 fast 기기
그래프	
평균 Ct value	<i>Listeria monocytogenes</i> (prfA) : 25.15 ± 0.28 <i>Salmonella</i> spp. (invA) : 29.89 ± 0.16

Table 37. M5에 대한 식품품목별 특이도 및 민감도 검증 결과

B. 제품 현장검증

- 실제 가공식품공장 2 곳, 육가공공장 1 곳을 섭외하여 5 가지 그룹에 대한 Real time PCR kit의 현장검증을 진행하였음.
- Real time PCR기기는 각 현장에서 보유하고 있는 ABI 사의 7500기기를 사용하였음.
- Positive control DNA는 증폭 서열을 Plasmid에 합성한 유전자로 사용하였으며 식품품목을 증균한 용액을 자사에서 식품공전을 기반으로 만든 Genelix Rapid DNA extraction kit를 이용하여 DNA를 추출하고 PCR 실험을 진행하였음.
- 모든 현장에서 양성결과는 발견되지 않았으며, 총 실험 시간은 2 시간 이내로 신속하게 증균 배양액의 식중독균 감염여부를 판단할 수 있음.
- 상세 결과는 하단에 기재하였음.

- M1에 대한 multiplex의 Real time PCR 현장검증 결과는 다음과 같으며 모든 실험에서 Positive Control을 제외하고 증균 배양액에서 균이 검출되지 않음.

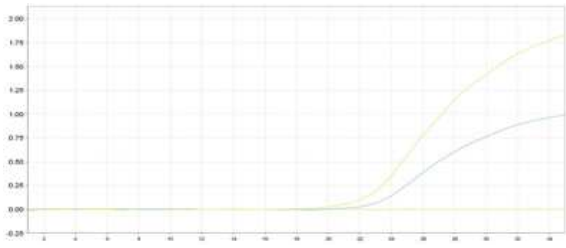
기기명	ABI 7500 기기
그래프	
평균 Ct value	EHEC (VT1) : 23.08 ± 0.12 EHEC (VT2) : 21.37 ± 0.21

Table 38. M1의 현장검증 결과

- M2에 대한 multiplex의 Real time PCR 현장검증 결과는 다음과 같으며 모든 실험에서 Positive Control을 제외하고 증균 배양액에서 균이 검출되지 않음.

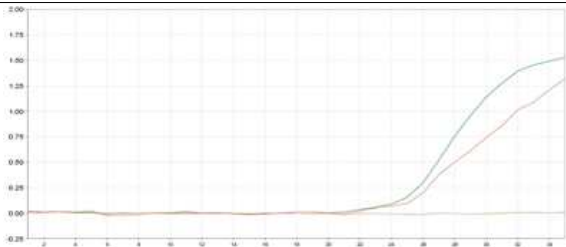
기기명	ABI 7500 기기
그래프	
평균 Ct value	ETEC (ST) : 23.12 ± 0.06 ETEC (LT) : 25.59 ± 0.17

Table 39. M2의 현장검증 결과

- M3에 대한 multiplex의 Real time PCR 현장검증 결과는 다음과 같으며 모든 실험에서 Positive Control을 제외하고 증균 배양액에서 균이 검출되지 않음.

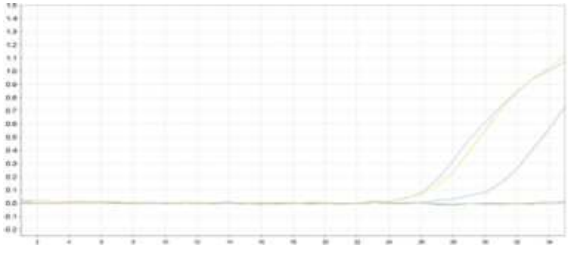
기기명	ABI 7500 기기
그래프	
평균 Ct value	<i>Staphylococcus aureus</i> (femA) : 28.14 ± 0.12 <i>Bacillus cereus</i> (hbl) : 25.33 ± 0.23 <i>Yersinia enterocolitica</i> (inv) : 25.09 ± 0.17

Table 40. M3의 현장검증 결과

- M4에 대한 multiplex의 Real time PCR 현장검증 결과는 다음과 같으며 모든 실험에서 Positive Control을 제외하고 증균 배양액에서 균이 검출되지 않음.

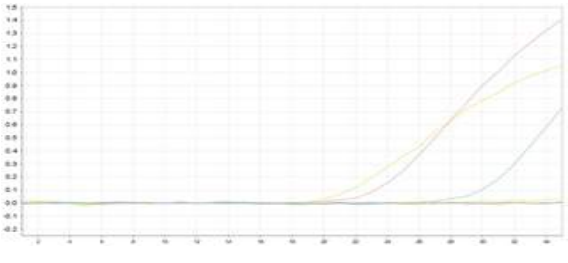
기기명	ABI 7500 기기
그래프	
평균 Ct value	<i>Vibrio cholerae</i> (hly) : 19.29 ± 0.07 <i>Vibrio vulnificus</i> (vvh) : 30.99 ± 0.22 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (tlh) : 21.47 ± 0.08

Table 41. M4의 현장검증 결과

- M5에 대한 multiplex의 Real time PCR 현장검증 결과는 다음과 같으며 모든 실험에서 Positive Control을 제외하고 증균 배양액에서 균이 검출되지 않음.

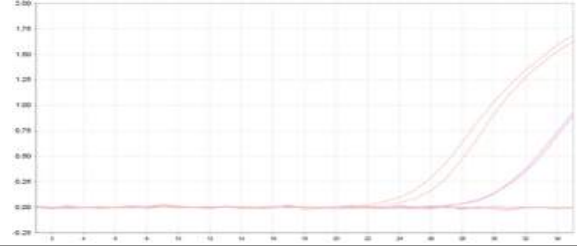
기기명	ABI 7500 기기
그래프	
평균 Ct value	<i>Listeria monocytogenes</i> (prfA) : 24.73 ± 0.83 <i>Salmonella</i> spp. (invA) : 31.10 ± 0.06

Table 42. M5의 현장검증 결과

⑥ 3차년도 요약

연구목표 : 유기산과 HOCl 병합 살균시스템의 최적화 및 제품화

㉓ 유기산과 HOCl 복합처리를 통한 미생물 살균 상승효과 검증

- 총 3 종의 유기산 중 넓은 범위 (pH 4 ~ 7)의 pH 조건에서 살균 효과가 뛰어난 phytic acid 를 최적 유기산으로 선정
- 100 mL 기준 NaOCl 50 ppm와 phytic acid 13 uL (pH 6으로 조절) 복합처리 조건에서 미생물 살균 극대화하기 위한 최적화 조건으로 확립
- PI staining을 통한 미생물의 cell integrity 붕괴 확인, MDA 분석을 통한 미생물의 지질 과산화 정도 파악 및 글루코오스 ATP 측정을 통해 복합처리에 따른 미생물 살균 메커니즘을 규명

㉔ 유기산과 HOCl 복합처리용 식품원료 살균시스템 개발

- 대표적인 식품원료 사과, 상추, 깻잎을 선정하여 임의 오염시킨 후 복합처리에 따른 살균 효과를 검증
- 살균 및 세척 횟수에 따른 이화화학적 특성 (pH, 잔류염소) 및 저장일수에 따른 일반세균수 변화, 관능학적품질 특성 (외관, 색상, 염소취, 조직감) 평가를 통해 처리조건에 따른 과채류의 품질 특성 평가
- 현장 적용 가능한 pilot scale 살균 시스템을 제작

㉕ *Bacillus* 포자를 제어할 수 있는 식품원료 살균시스템 현장 검증

- 식품원료 중 사과를 대상으로 *Bacillus* 포자에 대한 복합처리 시스템의 살균 효과를 검증
- 복합처리 시스템의 사용 매뉴얼을 제작

⑥ 3차년도 상세 내용

㉓ NaOCl과 유기산 복합처리를 통한 미생물 살균 상승효과 검증

A. NaOCl과 유기산 복합 처리에 따른 효과 검증 및 유기산 선정

a) 과채류 소독제로 활용하기 위해 유기산 중 일상생활에 많이 사용되고 있으며 식품첨가물로 지정된 유기산 3종 (Malic acid, Citric acid, Phytic acid)을 선정함.

b) *Bacillus subtilis* stock 제조

㉠ *Bacillus subtilis* spore ATCC 6633 단일 colony를 Nutrient broth 300 mL에 18 hr 동안 배양 하였음.

㉡ 배양한 broth는 Centrifuge를 활용하여 4500 rpm에서 15 분 동안 cell down 한 후 상등액을 제거함.

㉢ 남아있는 pellet은 Centrifuge (4500 rpm, 15 분) 및 PBS (phosphate buffered saline)를 활용 하여 3 회 washing 한 후 최종적으로 $10^8 \sim 10^9$ CFU/mL의 stock을 제조함.

c) *Bacillus subtilis* spore stock 제조

㉠ *Bacillus subtilis* stock을 PBS를 활용하여 10^8 CFU/mL로 희석한 후 1/10 농도의 Nutrient agar 배지에 spreading을 함.

㉡ 37 °C에서 5 일 동안 배양한 후 spreader를 활용하여 배지 위에 자란 colony들을 긁어내어 Centrifuge tube에 모아줌.

㉢ Centrifuge tube에 모인 pellet은 원심분리기를 활용하여 4500 rpm에서 15 분 동안 cell down 한 후 상등액을 제거함.

㉣ 남아있는 pellet은 Centrifuge (4500 rpm, 15 분) 및 PBS (phosphate buffered saline)를 활용 하여 3 회 washing 처리하여 stock을 제조함.

㉤ Stock은 실험 전 80 °C water bath에서 20 분 동안 가열한 후 실험에 사용함.

d) NaOCl의 농도 측정

㉠ 측정하고자 하는 시료를 1/10 씩 serial dilution 하여 100 ppm 이하의 농도 제조함.

㉡ 분석방법의 경우 DPD 시약 발색에 의한 흡광 광도법을 활용하였으며, 잔류염소측정 장비 (HI96771C, HANNA)를 활용하여 free chlorine 농도를 측정함.

e) *Bacillus subtilis* spore 살균 효율 실험

㉠ 50 ppm 농도의 NaOCl 100 mL에 Malic acid, Citric acid, Phytic acid을 각각 주입하여 최종 NaOCl에 첨가된 유기산의 농도가 7 ppm, 30 ppm, 70 ppm, 200 ppm, 700 ppm이 되도록 함.

㉡ NaOCl과 각각의 유기산을 혼합한 용액 30 mL을 50 mL reactor에 넣고 200 rpm 조건에서 실험을 진행함.

㉢ Sampling tube에는 quenching reagent 100 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 를 100 uL를 미리 주입해 놓음.

㉣ 실험에 활용된 *Bacillus subtilis* spore의 초기 농도는 5×10^6 CFU/mL로 하였으며, Sampling time은 0 분, 1 분, 2 분 3 분으로 함.

f) *Bacillus subtilis* spore 분석

㉠ Sampling 한 균액은 PBS 용액을 활용하여 serial dilution 함.

㉡ 희석한 용액은 Nutrient agar에 100 uL 씩 분주 후 spreading을 진행하였으며, 37 °C에서 1 일 동안 배양한 후 균수를 확인함.

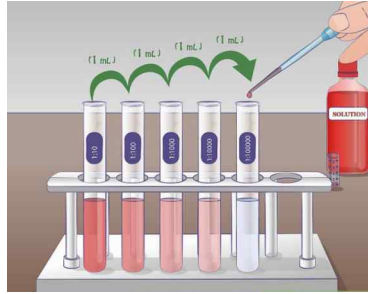


Fig 6. Serial dilution method

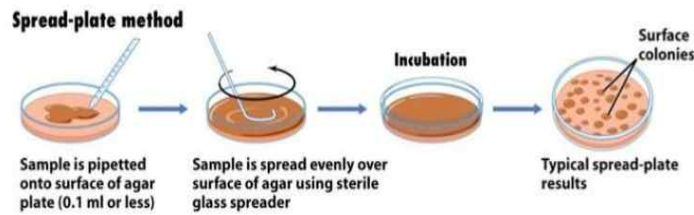
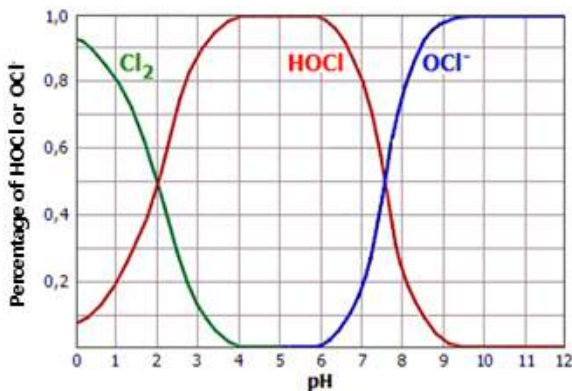


Fig 7. Spread plate method

g) NaOCl과 유기산 복합 처리에 따른 효과 검증 및 유기산 선정 결과

- ㉠ *Bacillus subtilis* spore 대상으로 NaOCl 50 ppm에 각각의 유기산을 복합 처리 한 결과 Malic acid와 Citric acid의 경우 주입농도 70 ppm (pH 5 ~ 6)에서 가장 높은 살균효율을 나타냄.
- ㉡ Phytic acid의 경우 NaOCl 50 ppm과 복합처리 한 결과 다양한 주입농도 70 ppm, 200 ppm, 700 ppm (pH 2.6 ~ 7.0)에서 살균효율이 고르게 높게 나타남.
- ㉢ pH 5 ~ 6에서 살균효율이 높게 나타난 이유는 중성 pH에서 NaOCl이 H₂O와 반응하면, HOCl을 형성하게 되는데 pH 5 ~ 6 범위에서는 OCl⁻ 및 Cl₂에 비해 살균력이 훨씬 높은 HOCl의 함량이 높게 나타나기 때문임.
- ㉣ 유기산 3 종 중 NaOCl과 복합 처리한 결과 넓은 pH 범위에서 높은 살균력을 나타낸, phytic acid를 복합 처리 유기산으로 선정함.



❖ Hydrolysis of hypochlorite

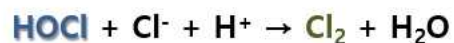


Fig 8. pH 범위에 따른 HOCl 및 OCl⁻의 비율

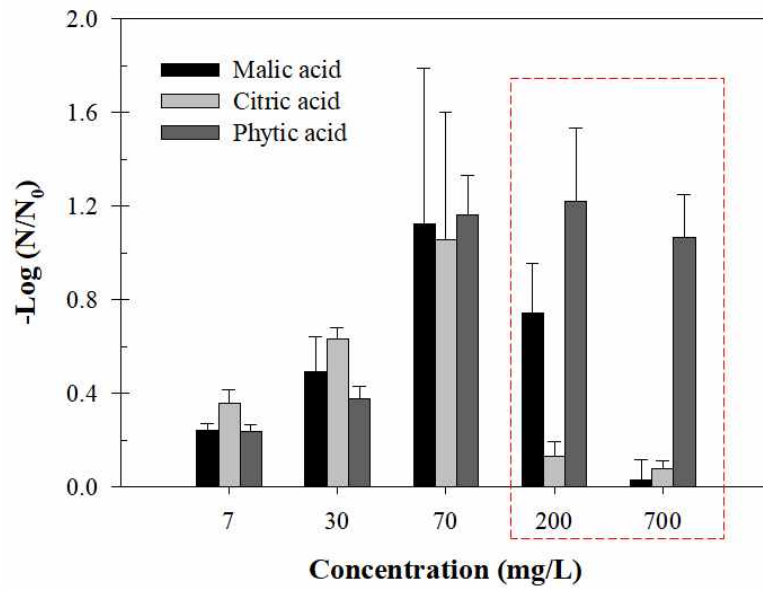


Fig 9. NaOCl 및 유기산 복합처리 실험 결과 (유기산 주입 농도 기준)

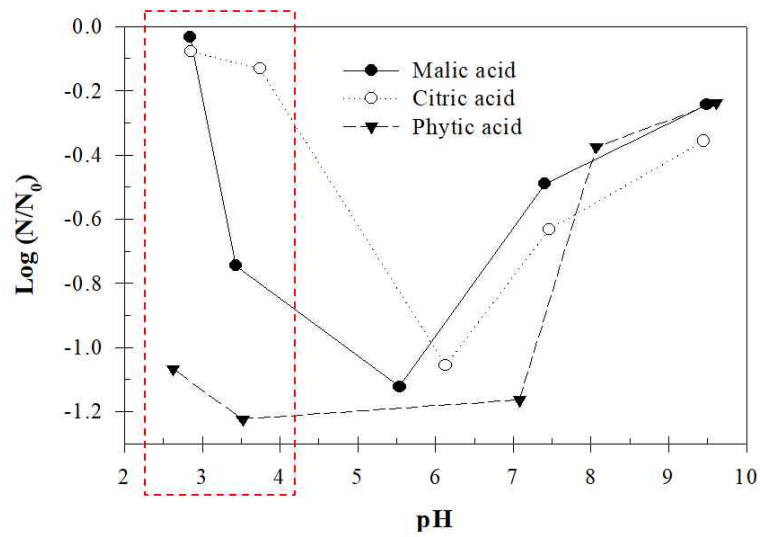


Fig 10. NaOCl 및 유기산 복합처리 실험 결과 (pH 기준)

		주입량 (mg/L)				
		7	30	70	200	700
Log (N/N ₀)	Malic acid	-0.24 ± 0.02	-0.49 ± 0.15	-1.12 ± 0.66	-0.74 ± 0.20	-0.03 ± 0.08
	Citric acid	-0.35 ± 0.06	-0.63 ± 0.04	-1.05 ± 0.54	-0.13 ± 0.06	-0.07 ± 0.03
	Phytic acid	-0.23 ± 0.02	-0.37 ± 0.05	-1.16 ± 0.16	-1.22 ± 0.31	-1.06 ± 0.18

Table 43. NaOCl 50 ppm에 유기산 주입량에 따른 *Bacillus subtilis* spore 살균 효율

		주입량 (mg/L)				
		7	30	70	200	700
pH	Malic acid	9.49	7.41	5.54	3.43	2.84
	Citric acid	9.45	7.46	6.13	3.74	2.85
	Phytic acid	9.61	8.07	7.08	3.52	2.62

Table 44. NaOCl 50 ppm에 유기산 주입량에 따른 pH

B. *Bacillus subtilis* spore 살균 효율 극대화를 위한 NaOCl 및 유기산 최적화 조건 확립

a) NaOCl 및 phytic acid의 용액 제조

㉠ 4 ~ 5 %의 고농도 NaOCl를 3차 증류수로 희석하여 50 ppm을 만들어 주었으며, 단일 처리 시 phytic acid 주입량의 경우 3차 증류수에 주입하여 phytic acid 원액을 주입하여 pH 2, pH 4, pH 6을 만듦.

㉡ 복합처리 시에는 NaOCl 50 ppm에 phytic acid 원액을 주입하여 pH 2, pH 4, pH 6, pH 8을 만들어줌.

b) NaOCl 및 phytic acid의 단일처리 및 복합처리 실험

㉠ 각각의 제조 용액에 *Bacillus subtilis* spore를 주입하여 초기농도가 1×10^6 CFU/mL가 되도록 함.

㉡ Sampling time의 경우 단일 처리 시 0 분, 2.5 분, 5 분, 10 분에 각각 진행하였으며, 복합 처리 시 0 분, 1.5 분, 3 분, 5 분에서 진행함.

㉢ 처리조건에 NaOCl이 들어가 있는 경우, sampling tube에는 미리 quenching reagent 100 mM Na₂S₂O₃를 100 uL를 미리 주입해 놓음.

㉣ Sampling 한 균액은 PBS 용액을 활용하여 serial dilution 한 후 Nutrient agar에 100 uL 씩 분주하여 spreading을 진행함.

c) NaOCl 및 phytic acid의 단일 처리 결과

㉠ 50ppm의 NaOCl 단일처리 10 분 동안 처리 시, CT값은 133 (mg/L*min)으로 *Bacillus subtilis* spore를 -0.60 ± 0.05 Log의 낮은 살균 효과를 나타냄.

㉡ NaOCl (차아염소산 나트륨)의 경우 강 염기성 조건에서는 HOCl에 비해 살균력이 낮은 OCl⁻ 이온 상태로 존재하기 때문임.

㉢ pH 조건별 phytic acid 단일처리 결과 살균 효과는 -0.06 ± 0.01 Log으로 거의 나타나지 않음.

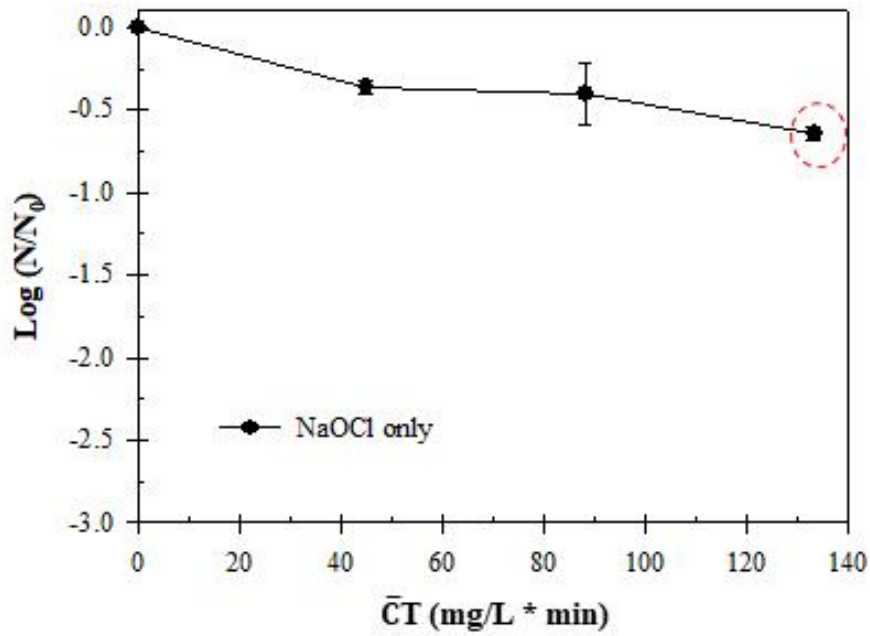


Fig 11. NaOCl 단일 처리 결과

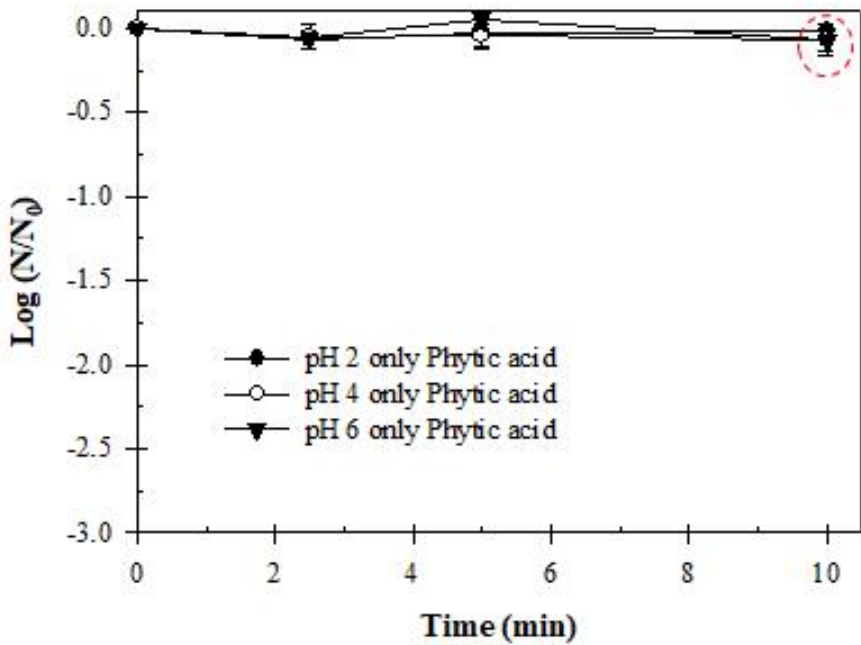


Fig 12. phytic acid 단일 처리 결과

d) NaOCl 및 phytic acid의 pH별 복합 처리 결과

㉠ pH 8의 경우 살균 효과는 -2.38 ± 0.11 Log로 다소 낮게 나타났지만, 그에 비해 pH 2, pH 4, pH 6의 경우 살균 효과는 -3.60 ± 0.13 Log, -4.18 ± 0.09 Log, -4.17 ± 0.11 Log로

Bacillus subtilis spore에 매우 뛰어난 살균 효과를 나타냄.

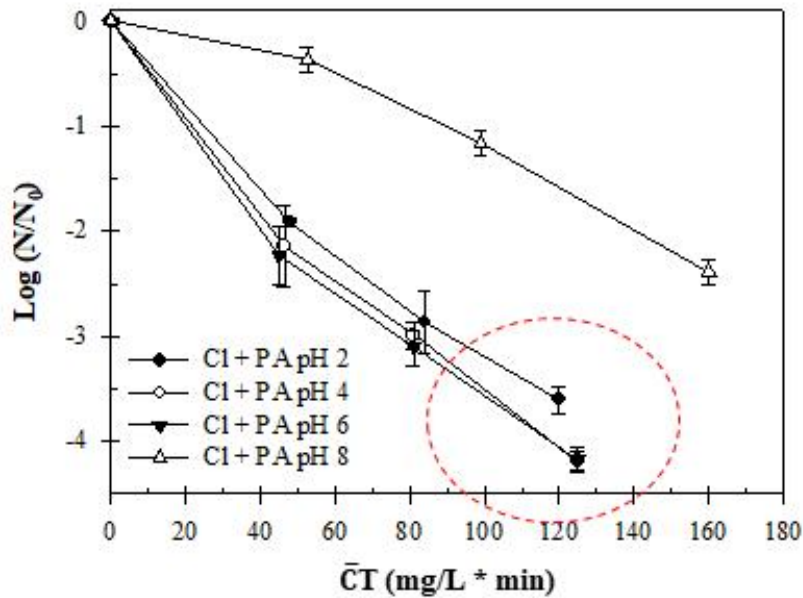


Fig 13. NaOCl 및 phytic acid 복합 처리 결과

e) 다양한 식중독균 및 *Bacillus* spore 2 종에 대한 복합처리 방법

㉠ 주요 식중독균인 *Escherichia coli* (Nutrient broth), *Salmonella typhimurium* (Luria bertani broth), *Staphylococcus aureus* (Luria bertani broth), *Listeria monocytogenes* (Brain heart infusion broth)을 각각의 broth에 37 °C, 18 hr 동안 배양하여 stock을 제조함.

㉡ *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus atrophaeus*의 경우 Nutrient broth에 배양하여 stock을 제조한 후 1/10 Nutrient agar에 spreading하여 5 일 배양을 통해 spore를 제조함.

㉢ 복합 처리 수의 경우 NaOCl 50 ppm에 phytic acid를 첨가하여 pH 6으로 맞춰줌.

㉣ Reacter에 복합처리 수를 30 mL 주입한 후 미생물 stock 주입 시, 초기농도가 1×10^6 CFU/mL이 되도록 함.

㉤ 일반 식중독균의 경우 sampling time은 0 sec, 2 sec, 4 sec, 6 sec에서 진행하였으며, spore의 경우 0 min, 1 min, 3 min, 5 min에 샘플링을 진행함.

㉥ Samping tube에는 미리 quenching reagent 100 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 를 100 uL를 주입하였으며, 미생물 분석은 spreading 방법을 활용하여 분석함.

f) 다양한 식중독균 및 *Bacillus* spore 2 종에 대한 복합처리 결과

㉦ 일반 식중독균의 경우 처리 시간 2 sec 만에 -4 log 이상의 살균 효율을 나타내었음.

㉧ *Bacillus subtilis* spore의 경우 3 분 복합처리 시, -3.5 ± 0.15 Log의 살균효율을 나타내었으며 5 분 복합처리 시, -4.2 ± 0.08 Log를 나타냄.

㉨ *Bacillus atrophaeus*의 경우 3 분 복합처리 시, -3.7 ± 0.03 Log의 살균효율을 나타냄.

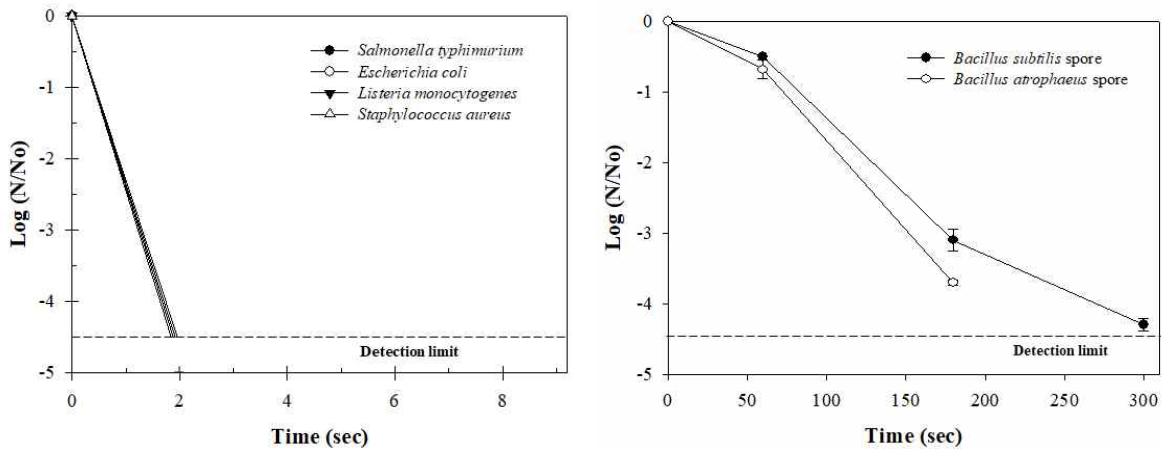


Fig 14. 다양한 식중독균 및 *Bacillus* spore 2종에 대한 복합처리 살균 효율

C. 복합처리에 따른 미생물 살균 메커니즘 규명

a) PI staining 분석 방법

- ㉠ PI staining stock은 Propidium iodide (Sigma P4170, USA) 시약 1 uL를 1 mL 3차 증류수에 용해시켜 제조하였으며, 제조 후 호일에 감싸 4 °C 냉장고에 보관함.
- ㉡ 처리 조건의 경우 control, NaOCl 7 ppm, phytic acid 400 ppm, free chlorine 7 ppm + phytic acid 400 ppm의 4가지 조건에서 진행함.
- ㉢ 반응 후 3500 rpm, 4 °C, 15 분 동안 cell down 시켜 pellet을 모은 후 만들어 놓은 PI staining stock을 10 uL 주입하여 30 분 동안 염색함.
- ㉣ 염색이 끝난 pellet은 PBS (Phosphate buffer solution, pH 7.1)로 2회 washing을 해 준 후 96 well plate (SPL Life Sciences Co.)에 각각 100 uL씩 주입함.
- ㉤ Microplate reader (Tecan infinite M200)기기로 파장을 Excitation: 535 nm, Emission: 617 nm로 설정하여 RFU (Relative Fluorescence Units)를 측정함.

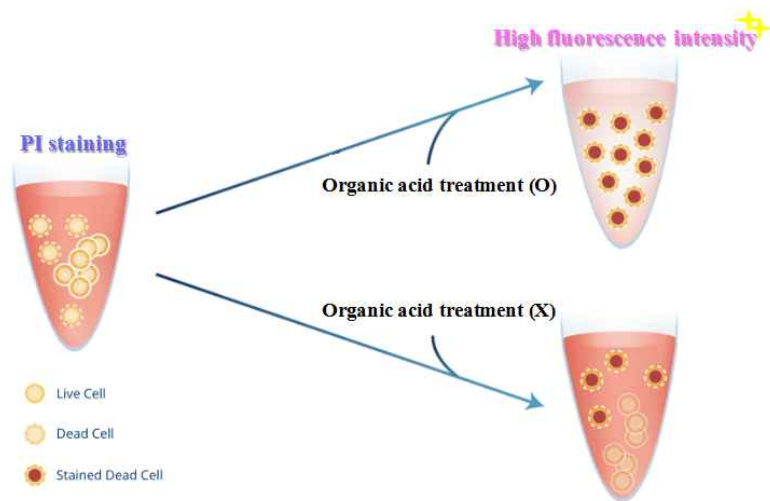


Fig 15. PI Staining

b) PI staining 분석 결과

- ㉠ PI는 DNA에 결합하여 핵을 염색하는 형광염료로 온전한 지질 이중층은 가로지르지 못하지만, membrane integrity가 붕괴될 경우 DNA에 삽입되어 형광을 나타냄.
- ㉡ Phytic acid을 단일처리 할 경우, *Bacillus subtilis* spore에 살균 효율에는 영향이 거의 없지만, 처리하지 않은 control 조건 및 NaOCl과 복합 처리 시 현저히 fluorescence의 수치가 높게 나타남.
- ㉢ Phytic acid의 경우 NaOCl 미생물 내 지질 이중층으로 보다 쉽게 유입될 수 있도록 cell membrane integrity 시키는 것으로 판단됨.

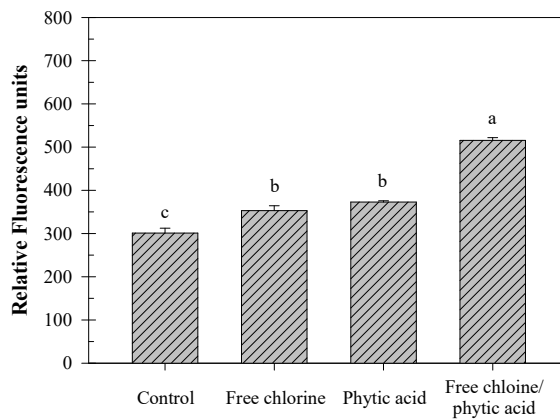


Fig 16. PI 분석 결과

c) MDA 분석 방법

- ㉠ *Bacillus subtilis* spore 1×10^6 CFU/mL를 control, NaOCl 7 ppm, phytic acid 400 ppm, free chlorine 7 ppm + phytic acid 400 ppm의 4 가지 조건에서 처리를 진행함.
- ㉡ 처리된 균액은 5 분 동안 6000 rpm 조건에서 centrifuge를 진행함.
- ㉢ 모여진 pellet을 10 mM PBS (pH 7.2) 200 uL에 현탁시키고 95 °C에서 30 분 동안 cell lysis 시킴.
- ㉣ Thiobarbituric acid (TBA)와 pellet 현탁액, MDA (malondialdehyde) 용액을 동등한 비율로 혼합하고 65 °C 조건에서 45 분 동안 배양함.
- ㉤ MDA 총량은 spectrophotometer를 활용하여 540 nm에서 흡광도를 측정함.

d) MDA 분석 결과

- ㉠ MDA 측정은 원형질막 산화 (지질 과산화) 정도를 확인하기 위해 측정함.
- ㉡ NaOCl 7 ppm을 단독 처리 시, control 대비 MDA 농도 값의 변화는 나타나지 않았으므로, NaOCl 단독처리만으로는 지질 과산화를 유발하기에 충분하지 않는 것으로 판단됨.
- ㉢ Phytic acid를 단독 처리하였을 시, control 대비 MDA 농도 값의 다소 상승한 것을 확인할 수 있었으며, NaOCl과 복합처리 시에는 MDA 농도 값이 2 배 이상 증가한 것을 확인함.

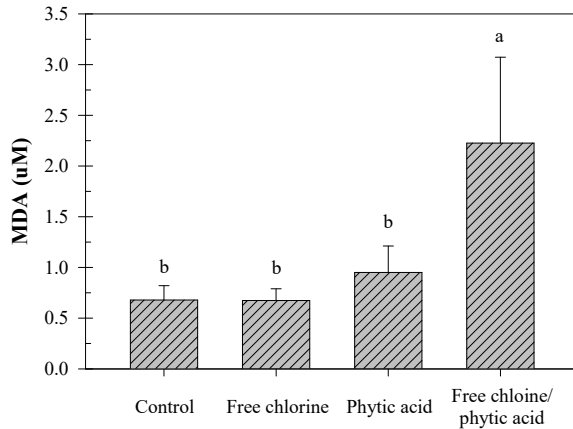


Fig 17. MDA 분석 결과

e) ATP 분석 방법

- ㉠ *Bacillus subtilis* spore 1×10^6 CFU/mL를 control, NaOCl 7 ppm, phytic acid 400 ppm, free chlorine 7 ppm + phytic acid 400 ppm의 4 가지 조건에서 처리를 진행함.
- ㉡ 처리된 균액은 5 분 동안 6000 rpm 조건에서 centrifuge를 진행한 후 모여진 pellet을 10 mM PBS (pH 7.2) 200uL에 현탁시킴.
- ㉢ 14,200 rpm 조건에서 15 분 동안 볼텍싱을 진행한 다음 ATP bioluminescent assay kit (Sigma-Aldrich Co., USA) 및 tube luminometer (Lumat LB 9508, Berthold, Germany)를 활용하여 ATP를 측정함.

f) ATP 분석 결과

- ㉠ NaOCl 및 phytic acid의 단일 처리 및 복합 처리 시 세포 내부로부터 누출된 glucose 양을 측정하였을 시, Control에 비해 상당한 ATP 누출을 보임.
- ㉡ phytic acid는 미생물을 직접 살균 시키지는 충분하지 않지만 membrane disintegration 및 세포 소기관의 누출을 촉진하여 NaOCl에 의한 *Bacillus subtilis* spore 살균 효율을 상승한 것으로 판단됨.

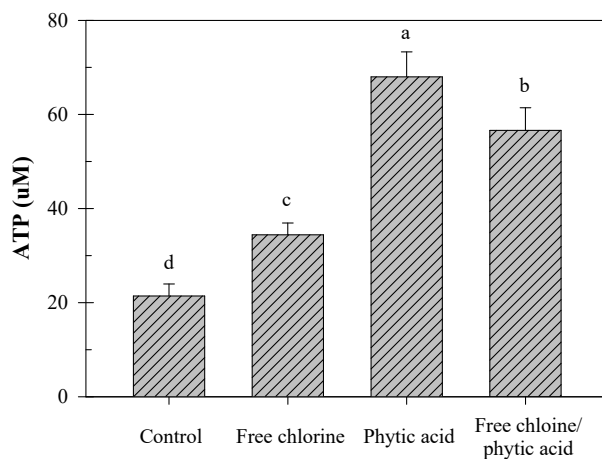


Fig 18. ATP 분석 결과

㉔ NaOCl과 유기산 복합처리를 활용한 식품원료 살균 시스템 검증 및 개발

A. 식품원료 대상으로 복합처리 시 살균 효율 검증

a) 과채류 실험 표면 준비

㉑ 사과, 상추, 깻잎의 표면을 1 cm X 1 cm로 잘라낸 후 1×10^6 CFU/mL 농도의 *Bacillus subtilis* spore를 10 uL 씩 10 회 spotting 함.

㉒ Clean bench 내에서 1 시간 동안 건조시킴.

b) NaOCl 및 유기산 복합처리 용액 제조

㉑ NaOCl 농도별 실험의 경우, NaOCl 원액을 희석하여 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm 의 NaOCl 희석액을 제조한 후 phytic acid를 첨가하여 pH 6으로 조절함.

㉒ NaOCl pH별 실험의 경우, 50 ppm NaOCl 희석액에 phytic acid를 첨가하여 pH 4, pH 5, pH 6, pH 7로 맞춰줌.

	pH			
	4	5	6	7
Phytic acid 주입량 (uL)	352	260	168	120

Table 45. NaOCl 50 ppm, 1 L 기준 pH 조절에 들어가는 phytic acid 원액의 량

c) 복합처리 실험 및 분석

㉑ 각각 제조한 복합처리 용액을 15 mL conical tube에 3 mL씩 담은 후, 인위 오염시킨 건조된 과채류 표면을 5 분 동안 침지하여 처리함.

㉒ 5분 반응시간에 맞춰 quenching reagent 200 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 를 100 uL를 주입함.

㉓ 복합처리가 끝난 균액은 PBS 용액을 활용하여 serial dilution 한 후 Nutrient agar에 100 uL 씩 분주하여 spreading을 진행함.

㉔ Spreading 된 배지는 37 °C에서 18 hr 동안 incubation 시킴.

d) 사과 표면 대상으로 복합처리 결과

㉑ NaOCl 및 phytic acid를 복합처리 한 결과 NaOCl 농도가 높아질수록 살균 효과가 높게 나타났으며, NaOCl 농도를 200 ppm까지 높일 시 복합처리를 할 시 *B. subtilis* spore가 -2.19 ± 0.02 Log 불활성화 되는 것으로 나타남.

㉒ NaOCl 50 ppm에 phytic acid를 활용하여 다양한 pH 범위에서 살균효율 평가한 결과 pH 4, pH 5, pH 6, pH 7에 대하여 각각 -1.54 ± 0.02 Log, -1.65 ± 0.04 Log, -1.37 ± 0.06 Log, -1.29 ± 0.02 Log의 살균 효율을 나타냄.

㉓ 과채류에 적용하여 살균효율을 평가한 결과 invitro 실험 결과와 유사하게 phytic acid를 활용하여 pH를 조절 시 넓은 pH 범위에서 미생물 불활성화가 가능하다는 것을 확인함.

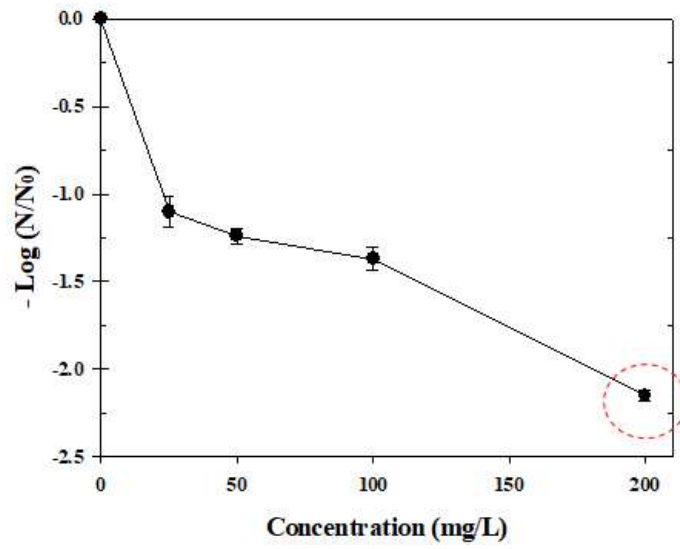


Fig 19. NaOCl 농도별 복합처리 결과

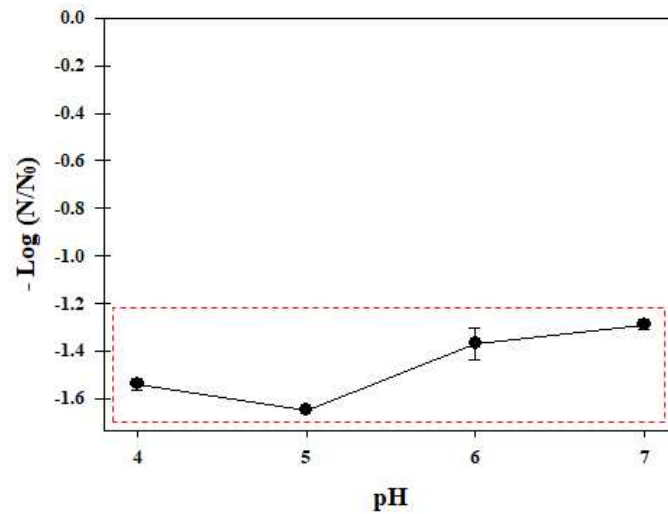


Fig 20. NaOCl pH 별 복합처리 결과

d) 식품원료 3종 대상으로 복합처리 결과

㉠ 사과, 깻잎, 상추를 대상으로 복합처리 한 결과 *B. subtilis* spore의 살균 효율은 각각 -1.39 ± 0.04 , -1.70 ± 0.07 , -1.88 ± 0.01 로 모든 과채류에서 *B. subtilis* spore에 대해 살균 효율을 나타냄.

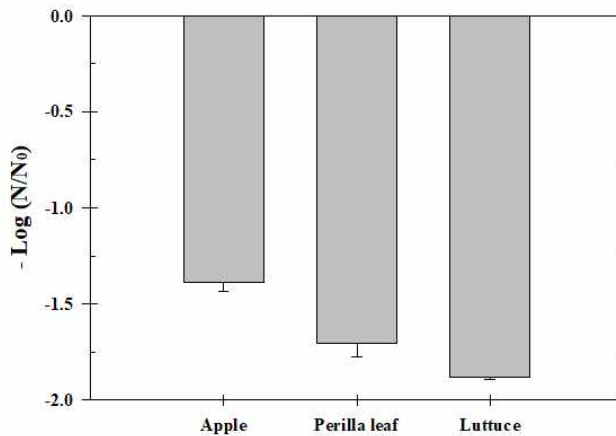


Fig 21. 식품원료 3 종에 대한 복합처리 결과

B. 복합처리에 따른 식품원료의 관능학적 품질을 포함한 품질특성 평가

a) 과채류 전처리 방법

- ㉠ 사과와 감의 경우 일정한 크기로 잘라내었으며 깻잎 및 상추의 경우 비교적 일정한 크기로 선별하여 각각의 처리구 무게는 5 ± 0.1 g로 함.
- ㉡ 분석 시, 사과와 감의 경우 표면 (껍질) 부분만 벗겨내어 분석을 진행하였음.
- ㉢ 실험은 NaOCl 200 ppm, NaOCl 50 ppm + phytic acid 16 uL (pH 6) 2 가지 조건을 활용하여 처리수의 용량은 처리구 중량의 20 배로 하여 5 분간 처리한 후 건져냄.
- ㉣ 세척수의 경우 처리구 중량의 20 배로 하여 10 초 동안 0 회, 1 회, 2 회, 3 회 세척한 다음 건져내어 자연탈수 한 뒤 냉장고 4 °C에 보관하면서 시료로 활용하였음.

세척 및 처리수	pH	잔류 염소 농도 (ppm)
TW ¹⁾	6.95 ± 0.02	0.04 ± 0.02
NaOCl-50 + PA ²⁾	6.00 ± 0.16	50 ± 0.32
NaOCl-200 ²⁾	11.0 ± 0.24	200 ± 0.22

※ TW: 수돗물, NaOCl-50 + PA: NaOCl 50 ppm + phytic acid (pH 6), NaOCl-200: NaOCl 200 ppm
 ※ 1): 세척수, 2): 처리수

Table 46. 과채류 세척에 사용되는 처리수의 물리 화학적 특성

b) 이화학적 특성 분석 (pH 측정)

- ㉠ 각각 전 처리된 시료에 45 mL의 수돗물을 붓고 stomacher (bagmixer 100 minimix, interscience)로 2 분간 8의 세기로 균질화 시킨 후 시험용액으로 사용함.
- ㉡ pH meter (LE438, mettler toledo)를 사용하여 각 시료마다 실온에서 3 회 반복하여 측정함.

c) 이화학적 특성 분석 (잔류염소 분석)

- ㉠ 각각 전 처리된 시료에 45 mL의 수돗물을 붓고 stomacher (bagmixer 100 minimix, interscience)로 2 분간 8의 세기로 균질화 시킨 후 시험용액으로 사용함.
- ㉡ 균질화 시킨 시험용액은 DPD 시약 발색에 의한 흡광 광도법을 활용하여 분석하였으며, 잔

류염소측정기 (HI96771C, HANNA) 제품을 활용하여 free chlorine 농도를 측정함.

d) pH 측정 결과

- ㉠ NaOCl과 phytic acid를 혼합 처리한 조건의 경우 세척 횟수가 증가할수록 pH가 증가하였으며, NaOCl을 단독 처리한 경우 세척 횟수가 증가할수록 pH가 감소하였음.
- ㉡ 세척 횟수가 증가함에 따라 세척수로 활용된 수돗물의 pH에 가까워지는 것을 확인함.
- ㉢ NaOCl 200 ppm으로 처리한 과채류의 경우 세척 전 pH가 8 이상으로 최소 1회 이상 세척해야 할 것으로 판단됨.

처리 조건	세척 횟수	pH		
		사과	깻잎	상추
NaOCl-50 + PA	0	6.33 ± 0.12	6.50 ± 0.12	6.95 ± 0.12
	1	7.12 ± 0.32	7.02 ± 0.38	7.32 ± 0.17
	2	7.18 ± 0.27	7.15 ± 0.19	7.28 ± 0.20
	3	7.22 ± 0.15	7.16 ± 0.04	7.31 ± 0.17
NaOCl-200	0	8.34 ± 0.05	8.06 ± 0.07	8.49 ± 0.22
	1	7.54 ± 0.13	7.41 ± 0.15	7.54 ± 0.21
	2	7.47 ± 0.22	7.37 ± 0.24	7.57 ± 0.08
	3	7.31 ± 0.12	7.32 ± 0.26	7.43 ± 0.04

※ TW: 수돗물, NaOCl-50 + PA: NaOCl 50 ppm + phytic acid (pH 6), NaOCl-200: NaOCl 200 ppm.

Table 47. 세척 횟수에 따른 과채류 pH 변화

e) 잔류 염소량 분석 결과

- ㉠ 두 처리 조건 모두 세척 횟수가 증가할수록 잔류염소 농도는 낮아지는 것을 확인함.
- ㉡ NaOCl 200 ppm으로 처리 시, 초기 세척하지 않았을 경우 잔류 염소가 5 ~ 6 ppm 정도로 잔류 염소가 높은 농도로 남아 있는 것을 확인함.
- ㉢ NaOCl 200 ppm으로 과채류를 처리한 경우 충분한 세척이 필요할 것으로 판단됨.
- ㉣ NaOCl 및 phytic acid를 복합처리 한 경우에는 잔류하는 염소의 농도가 NaOCl 200 ppm으로 처리한 경우보다 훨씬 더 낮은 것을 확인함.
- ㉤ 두 가지 처리 조건 중 복합처리 한 것이 세척부분에서 편의성이 더 뛰어나며, 잔류 염소에 대한 안전성이 높을 것으로 판단됨.

처리 조건	세척 횟수	잔류 염소 농도 (ppm)		
		사과	깻잎	상추
NaOCl-50 + PA	0	0.24 ± 0.03	1.30 ± 0.01	0.28 ± 0.02
	1	0.14 ± 0.05	0.10 ± 0.04	0.16 ± 0.01
	2	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.01
	3	0.01 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.02 ± 0.02
NaOCl-200	0	5.58 ± 0.04	5.70 ± 0.25	6.70 ± 0.31
	1	0.73 ± 0.05	0.73 ± 0.08	0.26 ± 0.12
	2	0.16 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.13 ± 0.04
	3	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.03

※ TW: 수돗물, NaOCl-50 + PA: NaOCl 50 ppm + phytic acid (pH 6), NaOCl-200: NaOCl 200 ppm.

Table 48. 세척 횟수에 따른 잔류염소 농도 변화

f) 저장 기간에 따른 일반세균 수 분석

- ㉠ 사과와 상추의 처리 시 일정한 크기로 잘라내었으며 깻잎 및 상추의 경우 비교적 일정한 크기로 선별하여 각각의 처리구 무게는 5 ± 0.1 g을 나타내었음.
- ㉡ 처리 조건의 경우 증류수, NaOCl 200 ppm, NaOCl 50 ppm + phytic acid 16 uL 3가지 조건에 대해 처리구 중량의 20 배로 하여 5 분간 처리한 후 건져냄.
- ㉢ 처리구의 중량의 20 배로 하여 수돗물에 30 초간 세척한 후 건져내어 자연탈수 한 뒤 4 °C 및 상온 조건에 나누어 보관하였음.
- ㉣ 0일의 경우 실험 직후 바로 분석을 진행하였으며 1 일, 3 일, 5 일의 경우 보관 기간에 맞춰 샘플을 꺼내어 분석을 진행함.
- ㉤ 사과, 상추, 깻잎의 일정량의 처리구를 멸균 용기에 채취하여 9 배 양의 PBS (pH 7.1)에 가하여 stomacher (bagmixer 100 minimix, interscience)를 이용하여 2 분간 8의 세기로 균질화 시킴.
- ㉥ 균질화 된 시료는 serial dilution을 통하여 희석한 후 tryptic soy agar를 활용하여 분석함.

g) 저장 기간에 따른 일반세균 수 분석 결과

- ㉠ 저장기간이 지남에 따라 모든 조건에서 일반세균수는 증가하는 것으로 나타남.
- ㉡ 증류수 처리 조건에 비해 NaOCl + phytic acid 복합처리 및 NaOCl 단독처리 한 것이 대체로 일반세균 수가 낮게 나타남.
- ㉢ 4 °C에 비해 상온에 보관할 경우 일반세균 수가 훨씬 더 빠르게 증가하는 것을 확인함.
- ㉣ NaOCl + phytic acid 복합처리 및 NaOCl 단독처리 시 보관일수에 따른 일반세균수는 크게 차이가 없게 나타남.

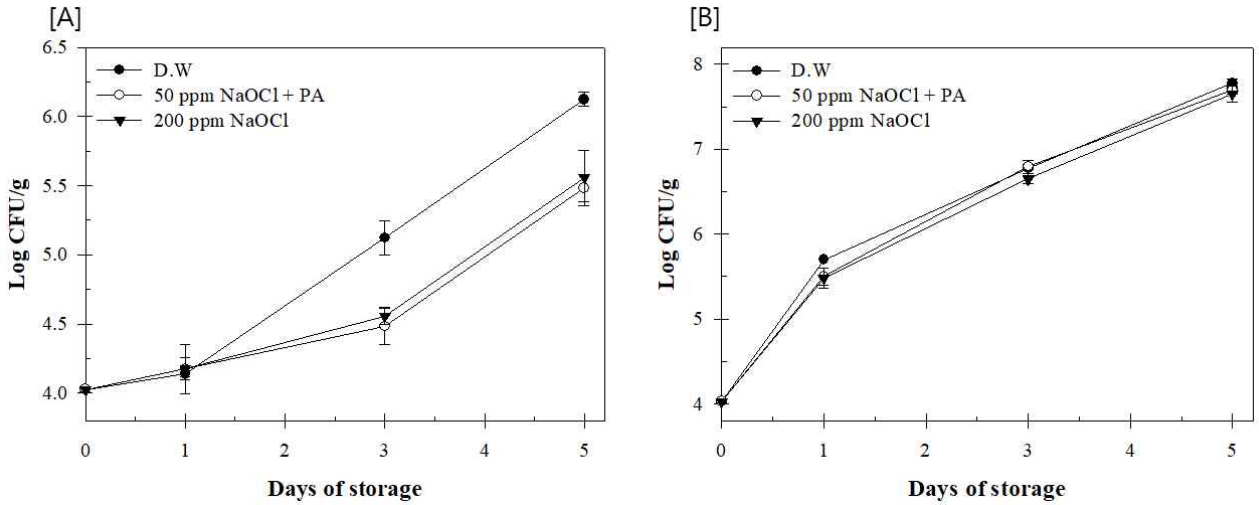


Fig 22. 저장 기간에 따른 사과 일반세균수 변화 [A] 4 °C 보관, [B] 25 °C 보관 (사과)

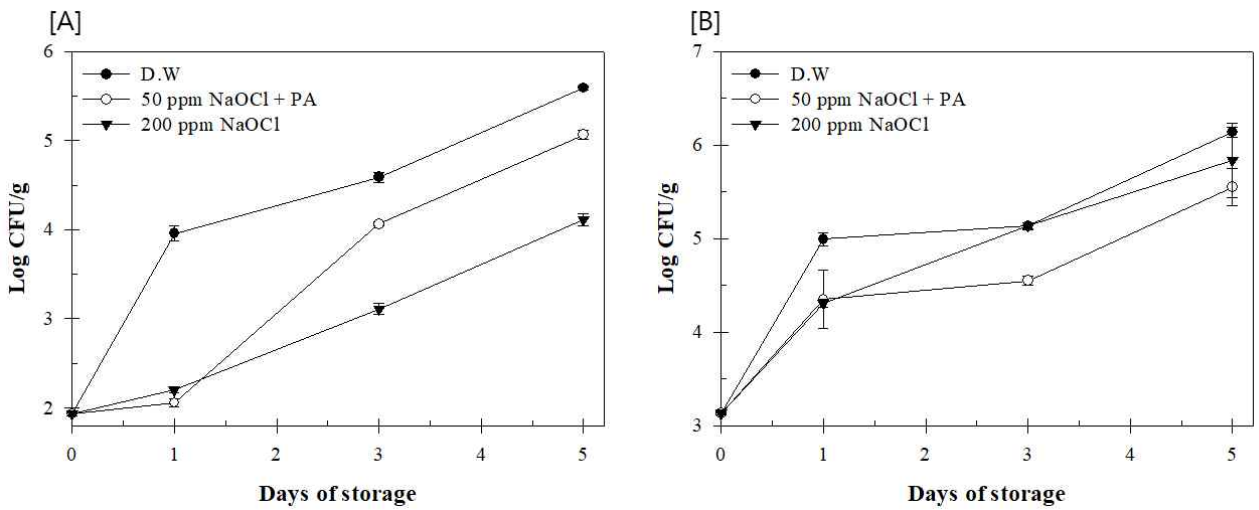


Fig 23. 저장 기간에 따른 깻잎의 일반세균수 변화 [A] 4 °C 보관, [B] 25 °C 보관 (깻잎)

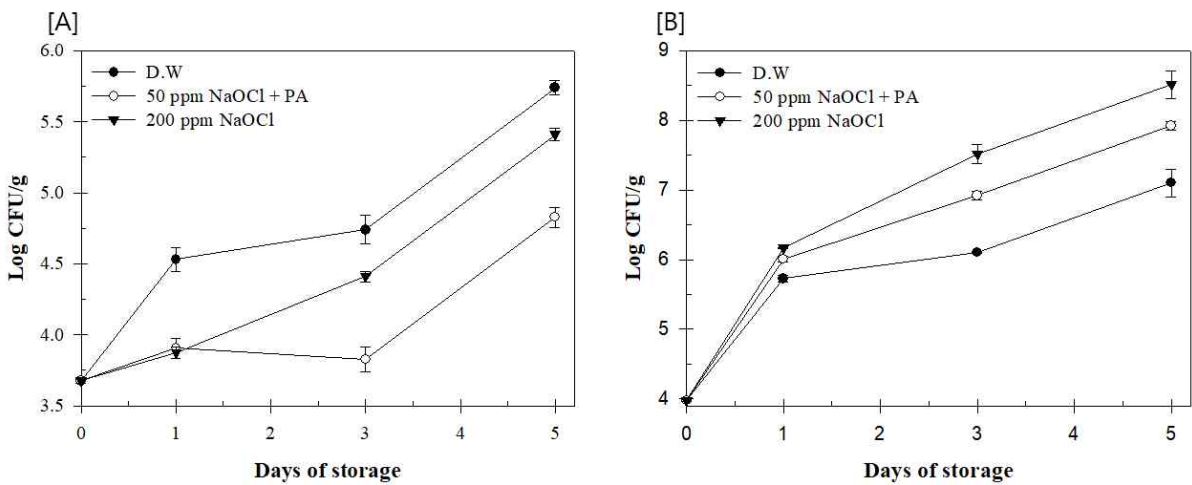


Fig 24. 저장 기간에 따른 상추의 일반세균수 변화 [A] 4 °C 보관, [B] 25 °C 보관 (상추)

h) 관능학적인 품질 특성 평가 방법

- ㉠ 사과, 깻잎, 상추의 NaOCl 50 ppm+ phytic acid 16 uL (pH 6으로 조절) 복합처리 및 NaOCl 단독처리를 진행한 후 외관, 색깔, 염소취, 조직감에 어떠한 변화가 있는지 확인함.
- ㉡ 처리 조건의 경우 NaOCl 50 ppm + phytic acid 16 uL의 복합처리와 NaOCl 200 ppm, 500 ppm, 2000 ppm, 5000 ppm, 20000 ppm 단독처리를 진행함.
- ㉢ 처리 시간의 경우 0 시간, 1 시간, 3 시간, 5 시간, 10 시간, 15 시간을 처리하였으며, 처리 시간에 맞춰 처리구 중량의 20 배의 증류수를 주입하여 10 초 동안 3 회 세척한 다음 건조하여 자연탈수 한 뒤 냉장고 4 ℃에 보관하면서 시료로 활용하였음.
- ㉣ 현미경 관찰의 경우 스테레오 마이크로스코프 (Stemi 508, ZEISS)를 활용하여 사과, 깻잎, 상추의 외부 표피 및 모서리 부분을 촬영함.

i) 상추 외관

- ㉠ NaOCl 단독처리 200 ppm 및 NaOCl + phytic acid 복합처리의 경우 처리시간 1 시간 까지는 외관상 표피의 손상이 관찰되지 않았으나 3 시간부터는 표피의 구멍 및 모서리 부분의 손상이 일어난 것을 확인함.
- ㉡ NaOCl 단독처리 500 ppm 이상부터는 1 시간 처리만으로도 외부 표피가 손상된 것을 확인하였으며, 시간이 지날수록 점차 손상 정도가 커짐.

j) 상추 색상

- ㉠ NaOCl 단독처리 2000 ppm 이하 및 NaOCl + phytic acid 복합처리의 경우 처리시간에 따른 색상의 변화는 거의 관찰되지 않음.
- ㉡ NaOCl 단독처리 5000 ppm 이상의 농도부터는 1 시간 접촉만으로도 상추의 색상이 변화된 것을 확인함.

k) 상추의 염소취

- ㉠ 각각의 조건으로 처리 시, NaOCl 단독처리 2000 ppm 이하 및 NaOCl + phytic acid 복합처리를 후 세척한 조건에서 보관한 원물에서는 염소취가 발생하지 않음.
- ㉡ NaOCl 단독처리 5000 ppm 이상 조건에서는 3 회 세척하였음에도 불구하고 염소취가 남아있음.

D) 상추의 조직감

- ㉠ NaOCl 단독처리 50 ppm의 경우 15 시간 처리했음에도 불구하고 조직감의 변화는 거의 나타나지 않음.
- ㉡ NaOCl 단독처리 200 ppm 및 NaOCl + phytic acid 복합처리의 경우 1 시간까지 조직감에는 문제가 없었으나 처리 시간에 따라 조직이 약해지는 것을 확인할 수 있었음.
- ㉢ NaOCl 단독처리 5000 ppm의 경우 처리시간 3 시간 이후 NaOCl 단독처리 20000 ppm의 경우 처리시간 1 시간 이후 조직이 매우 흐물흐물하게 된 것을 확인함.

관찰부분	처리조건 (ppm)					
	NaOCl 50 + P ¹⁾	NaOCl 200	NaOCl 500	NaOCl 2000	NaOCl 5000	NaOCl 20000
모서리 부분						
표피 부분						

※ 1) NaOCl 50 + P: NaOCl 50 ppm + phytic acid 16 uL (pH 6 조절)

Table 49. 조건별 3 시간 처리 시 스테레오 현미경 관찰 결과 (상추)

처리시간	처리조건					
	3 시간		5 시간		10 시간	
	N 50+PA ¹⁾	N 200 ²⁾	N 50+PA ¹⁾	N 200 ²⁾	N 50+PA ¹⁾	N 200 ²⁾
모서리 부분						
표피 부분						

※ 1) N 50+PA: NaOCl 50 ppm + phytic acid 16 uL (pH 6 조절)
 ※ 2) N 200: NaOCl 200 ppm

Table 50. 처리 시간에 따른 스테레오 현미경 관찰 결과 (상추)

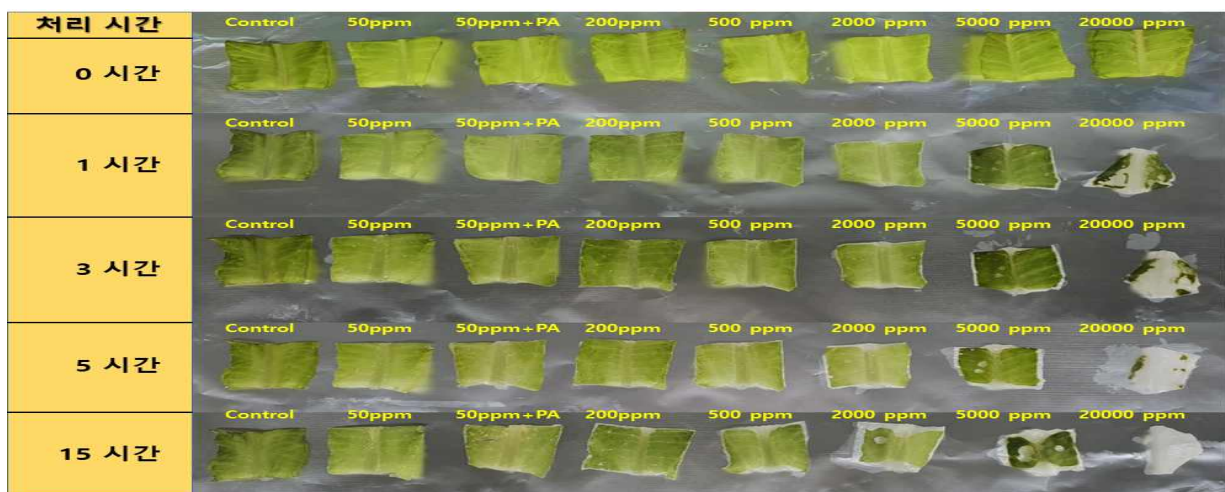


Fig 25. 처리 조건별 상추의 외관 및 색상 변화

m) 깻잎 외관

- ㉠ NaOCl 단독처리 200 ppm 및 NaOCl + phytic acid 복합처리의 경우 처리시간 1 시간까지는 외관상 표피의 손상이 관찰되지 않았으나 3 시간부터는 모서리 부분의 손상이 일어난 것을 확인함.
- ㉡ NaOCl 단독처리 500 ppm 이상부터는 1 시간 처리만으로도 외부 표피가 손상된 것을 확인하였으며, 시간이 지날수록 점차 손상 정도가 커짐.

n) 깻잎 색상

- ㉠ 깻잎의 경우 NaOCl 단독처리 500 ppm 이하 및 NaOCl + phytic acid 복합처리의 경우 처리 시간에 따른 색상의 변화는 거의 관찰되지 않음.
- ㉡ NaOCl 단독처리 2000 ppm의 농도에서는 15 시간 접촉 시, 검은 반점이 나타났으며, 5000 ppm 이상의 농도 조건에서는 접촉시간 1 시간 만에 접촉만으로도 엽록소 탈색이 일어나는 것을 확인함.

o) 깻잎 염소취

- ㉠ 각각의 조건으로 처리 시, NaOCl 단독처리 5000 ppm 이하 및 NaOCl + phytic acid 복합처리를 후 세척한 조건에서 보관한 원물에서는 깻잎의 향에 의해 염소취가 느껴지지 않음.
- ㉡ NaOCl 단독처리 5000 ppm 이상 조건에서는 3 회 세척하였음에도 불구하고 염소취가 남아 있음.

p) 깻잎 조직감

- ㉠ NaOCl 단독처리 50 ppm의 경우 15 시간 처리했음에도 불구하고 조직감의 변화는 거의 나타나지 않음.
- ㉡ NaOCl 단독처리 500 ppm 이하 및 NaOCl + phytic acid 복합처리의 경우 1 시간까지 조직감에는 문제가 없었으나 처리 시간에 따라 조직이 약해지는 것을 확인할 수 있었음.
- ㉢ NaOCl 단독처리 5000 ppm 및 20000 ppm의 경우 처리시간 1 시간 만에 조직이 매우 손상되었으며, 20000 ppm의 경우 매우 흐물흐물해짐.

관찰부분	처리조건 (ppm)					
	NaOCl 50 + P ¹⁾	NaOCl 200	NaOCl 500	NaOCl 2000	NaOCl 5000	NaOCl 20000
모서리 부분						
표피 부분						

※ 1) NaOCl 50 + P: NaOCl 50 ppm + phytic acid 16 uL (pH 6 조절)

Table 51. 조건별 3 시간 처리 시 스테레오 현미경 관찰 결과 (깻잎)

처리조건						
처리시간	3 시간		5 시간		10 시간	
관찰부분	N 50+PA ¹⁾	N 200 ²⁾	N 50+PA ¹⁾	N 200 ²⁾	N 50+PA ¹⁾	N 200 ²⁾
모서리 부분						
표피 부분						

※ 1) N 50+PA: NaOCl 50 ppm + phytic acid 16 uL (pH 6 조절)
 ※ 2) N 200: NaOCl 200 ppm

Table 52. 처리 시간에 따른 스테레오 현미경 관찰 결과 (깻잎)

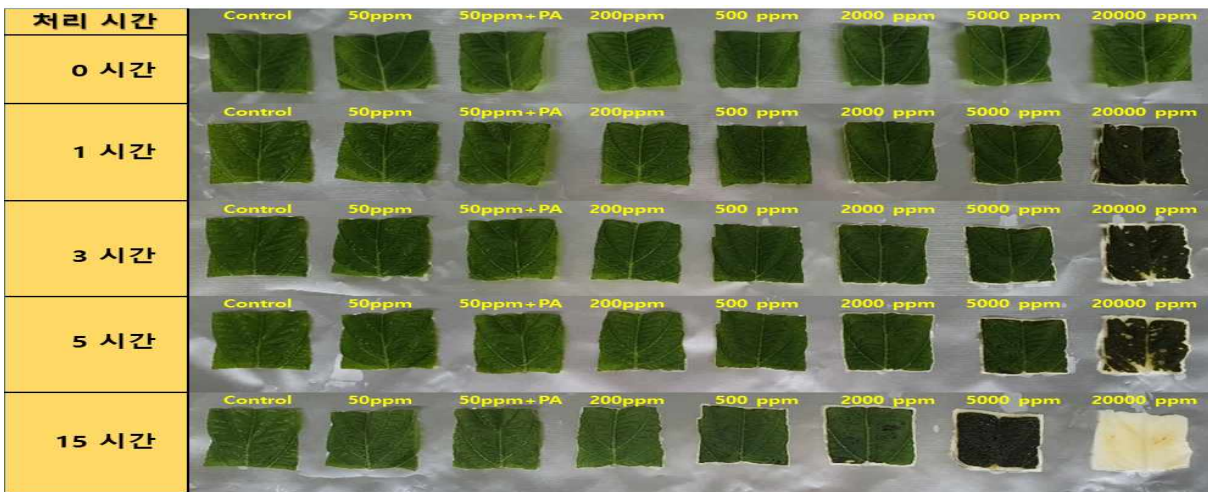


Fig 26. 처리 조건별 깻잎의 외관 및 색상 변화

q) 사과 외관

- ㉠ NaOCl 단독처리 200 ppm 및 NaOCl + phytic acid 복합처리의 경우 처리시간 15 시간 까지 외관상 큰 변화는 관찰되지 않음.
- ㉡ NaOCl 단독처리 500 ppm은 처리 시간 5 시간 이후, 2000 ppm의 3 시간 이후 사과 껍질 및 내부가 손상된 것을 확인할 수 있었음.
- ㉢ NaOCl 단독처리 5000 ppm 및 20000 ppm의 경우 1 시간 만에 사과 껍질 및 내부가 손상된 것을 확인함.

r) 사과 색상

- ㉠ NaOCl 단독처리 200 ppm 이하 및 NaOCl + phytic acid 복합처리의 경우 처리시간에 따른 색상의 변화는 거의 관찰되지 않음.
- ㉡ NaOCl 단독처리 500 ppm의 농도는 3 시간, 2000 ppm 이상의 농도에서는 1 시간 만에 사과 내부의 색상이 하얗게 얼어지는 것을 확인함.

s) 사과 염소취

- ㉠ 각각의 조건으로 처리 시, NaOCl 단독처리 500 ppm 이하 및 NaOCl + phytic acid 복합처리를 후 세척한 조건에서 보관한 원물에서는 염소취가 느껴지지 않음.
- ㉡ NaOCl 단독처리 2000 ppm 이상 조건에서는 3 회 세척하였음에도 불구하고 염소취가 남아있음.

t) 사과 조직감

- ㉠ NaOCl 단독처리 50 ppm의 경우 15 시간 처리했음에도 불구하고 조직감의 변화는 거의 나타나지 않음.
- ㉡ NaOCl 단독처리 200 ppm 이하 및 NaOCl + phytic acid 복합처리의 경우 5 시간까지 조직감에는 문제가 없었으나 처리 시간에 지남에 따라 조직이 약해지는 것을 확인할 수 있었음.
- ㉢ NaOCl 단독처리 5000 ppm 및 20000 ppm의 경우 처리시간 1 시간 만에 조직이 매우 손상되었으며, 20000 ppm의 경우 매우 흐물흐물해짐.

관찰부분	처리조건					
	NaOCl 50 + P ¹⁾	NaOCl 200	NaOCl 500	NaOCl 2000	NaOCl 5000	NaOCl 20000
모서리 부분						
표피 부분						

※ 1) NaOCl 50 + P: NaOCl 50 ppm + phytic acid 16 uL (pH 6 조절)

Table 53. 조건별 3 시간 처리 시 스테레오 현미경 관찰 결과 (사과)

처리조건						
처리시간	3 시간		5 시간		10 시간	
관찰부분	N 50+PA ¹⁾	N 200 ²⁾	N 50+PA ¹⁾	N 200 ²⁾	N 50+PA ¹⁾	N 200 ²⁾
모서리 부분						
표피 부분						

※ 1) N 50+PA: NaOCl 50 ppm + phytic acid 16 uL (pH 6 조절)
 ※ 2) N 200: NaOCl 200 ppm

Table 54. 처리 시간에 따른 스테레오 현미경 관찰 결과 (사과)



Fig 27. 처리 조건별 사과외관의 외관 및 색상 변화

C. 도출된 유기산과 HOCl 최적 조건을 바탕으로 현장 적용 가능한 Pilot scale 살균시스템 제작

a) 복합 살균시스템 장치

㉠ 소금물 (NaCl)을 전기화학적 방법으로 전기분해하여 나트륨을 추출한 뒤 물과 반응시켜 차아염소산나트륨을 만들어냄.

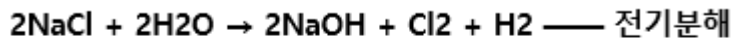


Fig 28. 차아염소산 나트륨 형성 원리

㉡ 본 장비는 10 ~ 50 ppm의 차아염소산나트륨을 생산함.

㉢ Main 배관에 설치된 자동 밸브가 개방되면, 소금물이 전해조로 유입되게 되며 유량계가 원수의 흐름을 감지하여 정류기를 작동시킴.

㉣ 정류기가 작동됨과 동시에 식품첨가물용 유기산을 정량 펌프를 통해 주입해 주면, 장비 본체 Out port를 통해 나오는 차아염소산 나트륨과 유기산이 혼합되어 최종 처리수가 생성되게 됨.

㉤ 최종 세팅된 전압과 전류 수치를 통하여 안정적으로 전해질이 전해조에 공급되는지 확인 가능함.

㉥ 부식을 억제하기 위해 장비의 케이스는 SUS 304 재질로 제작하여 내구성을 높임.

㉦ 유기산을 공급 장치 부는 유기산 원재료에 존재할 수 있는 미생물 및 이물을 제거하기 위해 공급 펌프 앞단에 UV-C sterilizer 및 membrane filter를 설치하여, 오염을 사전에 방지함.



Fig 29. 복합 살균시스템 장치 전경



Fig 30. 복합 살균시스템 장치 내부



Fig 31. 복합 살균시스템 장치 계기판

구분	조건
Dimension	본체 : 500 W×400 D×1,100 H (독립자립형)
Weight	본체 : ~50 kg
입력 전원	단상, 220 V(AC), 60 Hz
평균 소비전력	500 W (정류기 및 순환펌프 사용전력 포함)
최대 소비전력	1 kw (분전반 기준)
차아염소산나트륨 생성량	Max. 10 LPM / 잔류염소 10 ~ 50 ppm / 시간당 0.6 ton
Operation/Design pressure	0.5 bar / 1.0 bar

Table 55. 복합 살균시스템 장치의 기본 사양

b) 복합 살균시스템의 사양

- ㉠ 전해조의 크기는 224 mm X 264 mm로 설계 압력은 1 bar로 함.
- ㉡ 정류기의 경우 직류 전원 공급 장치로 input의 경우 AC, 220 V-3 ϕ (4 W), 60 Hz Output의 경우 DC, 5 V-100 A를 나타냄.
- ㉢ 케이스의 경우 SUS 304 재질로 제작하였으며, 두께는 1.6 t를 활용함.
- ㉣ 소금물 투입 펌프의 경우, Diaphragm 제품을 활용하였으며 10 bar, 0.11 LPM을 나타냄.
- ㉤ 유량계는 차압식 유량계를 활용하였으며, 측정범위는 4 ~ 20 LPM을 나타냄.
- ㉥ 자동 밸브의 경우 솔레노이드 밸브를 사용하였으며, 재질은 STS 304를 활용함.
- ㉦ 장비 내부 배관의 경우 15 A CPVC/1/2"Flexible PE Tube (10 bar)를 사용함.

㉧ *Bacillus* 포자를 제어할 수 있는 식품원료 살균시스템 현장 검증.

A. 개발된 살균시스템의 식품원료 내 *Bacillus* 포자 살균 효과 현장 검증

a) 현장 대체 실험 방법

- ㉠ COVID-19로 인해 실제 식품 현장 출입이 제한된 상황이며, 현장 내 개발된 복합 살균 시스템을 직접 설치하여 평가하기에 어려움이 있어 실험실 내부에서 현장 모사 실험으로 현장 검

증을 진행함.

- ㉠ 과채류 중 사과를 현장 대체 실험 대상으로 선정함.
- ㉡ 사과를 인위로 오염시키기 위해 *Bacillus subtilis* spore를 PBS (pH 7.1)을 활용하여 10^6 CFU/mL로 희석한 후 스프레이를 활용하여 3 cm X 3 cm의 일정한 표면에 1 mL 분사함.
- ㉢ *Bacillus subtilis* spore를 분사한 사과는 clean bench 내에서 1 시간 동안 건조시켜 인위로 오염시킴.
- ㉣ 과채류 살균 처리수의 경우 수돗물과 복합 살균 시스템에 의해 형성된 NaOCl 50 ppm, NaOCl 50 ppm + phytic acid (최종 pH 6로 조절) 3 가지 조건에서 처리를 진행함.
- ㉤ 처리 시간의 경우 30 초 및 1 분 동안 침지하여 처리를 하였으며, 침지 수조에는 수중 펌프 (HJ-952, Amazon)를 설치하여 처리하고자 하는 원물이 처리수에 잘 접촉될 수 있도록 함.
- ㉥ 샘플 채취 전 quenching reagent 100 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 를 sampling bag에 100 uL씩 주입해 놓았으며, 처리가 끝난 사과의 경우 처리구 중량의 9 배 양의 PBS (pH 7.1)를 가하여 stomacher (bagmixer 100 minimix, interscience)를 이용하여 1 분간 8의 세기로 균질화 시킴.
- ㉦ 균액은 PBS (pH 7.1) 용액을 활용하여 serial dilution 함.
- ㉧ 희석한 용액은 Nutrient agar에 100 uL 씩 분주 후 spreading을 진행하였으며, 37 °C에서 1 일 동안 배양한 후 균수를 확인함.

b) 사과를 활용한 현장 모사 테스트 결과

- ㉠ 수돗물만으로 1 분간 침지하였을 시, *Bacillus subtilis* spore가 -1.32 ± 0.1 Log 만큼 Log 감소율이 확인되었으며, 이는 세척 작용에 의해 인위 접종된 *Bacillus subtilis* spore가 떨어져 나간 것으로 판단됨.
- ㉡ NaOCl 50 ppm으로 처리하였을 시에도 수돗물과 유사하게 1 분간 처리 시, -1.63 ± 0.15 Log 감소율을 나타냄.
- ㉢ NaOCl 50 ppm + phytic acid 복합처리 시, *Bacillus subtilis* spore의 Log 감소율은 -3.25 ± 0.05 Log로 수돗물과 NaOCl 50 ppm에 비해 Log 감소율이 훨씬 크게 나타남.
- ㉣ 복합처리 시, NaOCl과 유기산 (phytic acid)은 *Bacillus subtilis* spore 살균 효과뿐만 아니라, 세척작용이 복합적으로 작용하여 99.9 % 이상의 감소한 것으로 판단됨.

조건	처리 시간	Log 감소율
Control	0 초	0
Tap water	30 초	-0.14 ± 0.03
	1 분	-1.32 ± 0.10
NaOCl-50	30 초	-0.41 ± 0.10
	1 분	-1.63 ± 0.15
NaOCl-50 + PA	30 초	-3.00 ± 0.11
	1 분	-3.25 ± 0.05

※ NaOCl-50: NaOCl 50 ppm, NaOCl-50 + PA: NaOCl 50 ppm 에 phytic acid 을 주입하여 pH 6 로 조절함.

Table 56. 사과를 활용한 현장 모사 테스트 결과



Fig 32. 현장 모사실험 준비



Fig 33. 현장 모사 실험 처리 수조 및 실험 장면

c) 처리 수에 남아있는 *bacillus subtilis* spore 분석 방법

㉠ 과채류를 처리하고 수중에 남아있는 *bacillus subtilis* spore가 존재하는지 확인하기 위해 1×10^6 CFU/mL *bacillus subtilis* spore를 사과 10 개에 1 mL씩 임의 접종함.

㉡ 임의 접종한 사과는 1 시간동안 건조시킨 뒤 총 3 조건 (수돗물, NaOCl 50 ppm, NaOCl 50 ppm + 유기산)의 처리수 50 L에 1 분 동안 침지시킴.

㉢ 침지가 끝난 사과는 수조에서 빼낸 후 500 mL씩 3 반복 sampling함.

- ㉞ Sampling 한 시료는 원심분리기 (4500 rpm, 40 분)를 활용하여 1 mL로 농축시킴.
- ㉟ 1 mL로 농축된 균액은 spreading 방법을 활용하여 분석함.

d) 처리 수에 남아있는 *bacillus subtilis* spore 분석 결과

- ㊱ 1 X 10⁶ CFU/mL을 임의로 접종한 사과 10 개에서 검출될 수 있는 *bacillus subtilis* spore의 최대 수는 1 X 10⁷ CFU/mL이며, 이 중 수조에 용량 대비 Sampling 한 용량은 전체 용량 대비 1/100 수준이므로, 최대 검출될 수 있는 *bacillus subtilis* spore 수는 1 X 10⁵ CFU/mL을 나타냄.
- ㊲ 수돗물 및 NaOCl 50 ppm으로 처리한 경우, *bacillus subtilis* spore 수중에 남아있는 것으로 확인하였으며, 처리수 방출에 의한 교차오염의 위험성이 있는 것을 확인함.
- ㊳ NaOCl 50 ppm + phytic acid (pH 6으로 조절)의 복합 처리의 경우 수중에 남아있는 미생물 없이 *bacillus subtilis* spore를 살균하는 것을 확인함.

처리 조건	처리 시간 (분)	검출된 미생물 수 (Log CFU/mL)	초기 주입량 대비 검출비율 (%)
Tap water	1	3.09 ± 0.26	61 %
NaOCl-50	1	2.92 ± 0.24	58 %
NaOCl-50 + PA	1	0	0 %
※ NaOCl-50: NaOCl 50 ppm, NaOCl-50 + PA: NaOCl 50 ppm에 유기산을 주입하여 pH 6로 조절함. ※ 검출한계: 10 CFU/mL			

Table 57. 처리 수에 남아있는 *bacillus subtilis* spore의 수

B. 유기산과 HOCl 병합살균 시스템의 현장 매뉴얼 제작

- ㊴ NaOCl 및 유기산 복합 살균 시스템의 실제 사용하는데 있어 도움을 주기 위해 매뉴얼을 제작하였음.
- ㊵ 해당 매뉴얼은 1. *Bacillus* spp. spore 오염 사례 및 살균의 필요성, 2. 식품 산업 현장 살균을 위한 NaOCl 및 유기산의 복합처리 시스템 소개, 3. 현장형 NaOCl 및 유기산의 복합처리 시스템의 적용 방법 등으로 구성되어 있음.

Bacillus 포자 제어 가능한
식품원료 살균용 살균소독 시스템



농식품기술융합창업인재양성사업

Fig 34. 식품원료 살균용 살균소독 시스템 매뉴얼 표지

(4) 제 2-1협동(동국대 이광근, 서울대 강동현) : 식품 내 생물학적, 화학적 위해인자 저감화 기술 현장적용 및 산업화

(가) 정량적 성과

성과지표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과		인력양성			정책활용·홍보		기타	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	석사	박사	취업인력	정책활용		홍보전시
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	명	명				
가중치																				
최종목표																				
후속 1차	목표											5	1	2		1				
	실적		1									7	1	3	1	2				
후속 2차	목표											5	2	4	1	6				
	실적	2										13	6	9	1	9				
후속 3차	목표			1								6	2	4	0	3				
	실적		1	1	10							15	11	8	2	5				
3단계	목표			1								16	5	10	1	10				
	실적	2	2	1	10							35	18	20	4	16				

① 논문게재 성과

연번	게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
			주저자	교신저자	공동저자				
1	2017	Analysis of Ethyl Carbamate in Plum Wines Produced in Korea	JB Lee, MK Kim	Kwang-G eun Lee		Food Science and Biotechnology	27	국내	SCIE
2	2017	Organic acids as a freshness indicator for tofu (soybean curd)	Jae-Youn g Her	Kwang-G eun Lee		J Food Sci Tech-Mysore	54	국내	SCI
3	2017	Furan Levels and Sensory Profiles of Commercial Coffee Products Under Various Handling Conditions	JS Han	Kwang-G eun Lee		J Food Sci.	82	국내	SCI
4	2017	Reduction of 4(5)-methylimidazole using cookie model systems	Min-Cheo l Jung	Kwang-G eun Lee		J Food Sci	82	국내	SCI
5	2017	Combined inhibitory	Sang-	Dong-		LWT-Food	86	국외	SCI

		effect of milk fat and lactose for inactivation of foodborne pathogens by ohmic heating	Soon Kim	H y u n Kang		Science and Technology			
6	2018	Comparison of the effect of saturated and superheated steam on the inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> Typhimurium and <i>Listeria monocytogenes</i> on cantaloupe and watermelon surfaces	Sun-Ah Kwon	Dong-H y u n Kang		Food Microbiology	72	국외	SCI
7	2018	Inhibition of Initial Attachment of Injured <i>Salmonella</i> Typhimurium onto Abiotic Surfaces	Woo-Ju Kim, Ki-Ok Jeong	Dong-H y u n Kang		Journal of Food Protection	81	국외	SCI
8	2018	Monitoring and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) in processed foods and their raw materials	Jaewook Lee	Kwang-G eun Lee		Food Control	92	국외	SCI
9	2018	Reduction of biogenic amine contents in fermented soybean paste using food additives	Jun-Young Lee	Kwang-G eun Lee		LWT	98	국외	SCI
10	2019	Validation of analytical method for furan determination in eight food matrices and its levels in various foods	S Y Jeong	Kwang-G eun Lee		Journal of Separation Science	42	국외	SCI
11	2019	Analytical method to detect adulteration of ground roasted coffee	S o n g , HY,	Kwang-G eun Lee		Journal of Food Science and Technology	54	국외	SCI
12	2018	Application of continuous-type pulsed ohmic heating system for inactivation of foodborne pathogens in buffered peptone water and tomato juice	Sang-Soon Kim	Dong-H y u n Kang		LWT-Food Science and Technology	93	국외	SCI

13	2018	Inactivation dynamics of 222 nm krypton-chlorine excilamp irradiation on Gram-positive and Gram-negative foodborne pathogenic bacteria	Jun-Won Kang	Dong-Hyun Kang		Food Research International	109	국외	SCI
14	2018	Effect of intermittent 222 nm krypton-chlorine excilamp irradiation on microbial inactivation in water	Jae-Won Ha	Dong-Hyun Kang		Food Control	90	국외	SCI
15	2018	UVC-LED Irradiation effectively inactivates aerosolized viruses, bacteria, and fungi in a chamber-type air disinfection system	Do-Kyun Kim	Dong-Hyun Kang		Applied and Environmental Microbiology	84	국외	SCI
16	2018	Inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> typhimurium, and <i>Listeria monocytogenes</i> on cherry tomatoes and oranges by superheated steam	Ga-Hee Ban	Dong-Hyun Kang		Food Research International	112	국외	SCI
17	2018	Inactivation of foodborne pathogens influenced by dielectric properties, relevant to sugar contents, in chili sauce by 915 MHz microwaves	Woo-Ju Kim	Dong-Hyun Kang		LWT-Food Science and Technology	96	국외	SCI
18	2019	Effect of gamma irradiation on inactivation of <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> Typhimurium and <i>Listeria monocytogenes</i> on pistachios	Won-Jae Song	Dong-Hyun Kang		Letters in Applied Microbiology	68	국외	SCI
19	2019	Susceptibility of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 grown at low temperature to the krypton-chlorine excilamp	Jae-Ik Lee, Sang-Soon Kim	Dong-Hyun Kang		Scientific Reports	9	국외	SCI
20	2019	Sequential treatment of hydrogen peroxide, vacuum packaging, and dry heat for inactivating <i>Salmonella</i> Typhimurium	Eun-Jeong Hong	Dong-Hyun Kang		Food Microbiology	77	국외	SCI

		on alfalfa seeds without detrimental effect on seeds viability							
21	2019	Analysis and reduction of benzene in various beverages such as vitamin drinks and cranberry juice	Ki - J o o J a n g , Seong-Mi n Hong	KG Lee		LWT	115	국외	SCI
22	2019	ATP degradation products as freshness indicator of flatfish during storage	J H H w a n g , J S Kim, H S Choi, Mina K Kim	KG Lee		Food Science a n d Biotechnolog y	28(6)	국외	SCIE
23	2020	Analysis of furan in semi-solid and paste type foods	YJ Seok,	KG Lee		Food Science a n d Biotechnolog y	29(2)	국외	SCIE
24	2020	Correlation analysis between the concentration of a-dicarbonyls and flavor compounds in soy sauce	S Kim, J Kwon, Y Kim	KG Lee		F o o d Bioscience	36	국외	SCIE
25	2020	Development of Caramel colour with improved colour stability and reduced 4-methylimidazole	SM Hong, M Park	KG Lee		F o o d Additives & contaminants : Part A	37	국외	SCIE
26	2020	Analysis of furan and monosaccharides in various coffee beans	YJ Kim, J Choi, G Lee	KG Lee		Journal of Food Science a n d Technology	57	국외	SCIE
27	2020	Effect of roasting conditions on the formation and kinetics of furan in various nuts	CY Cha	KG Lee		F o o d Chemistry	331	국외	SCIE
28	2019	Combination effect of saturated or superheated steam and lactic acid on the inactivation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhiumrium and Listeria monocytogenes on cantaloupe surfaces	Sun - A h Kown	Dong-Hy un Kang		F o o d Microbiolog y	82	국외	SCI
29	2019	Synergistic effect of ohmic heating and UV-C irradiation for inactivation of Escherichia coli O157:H7,	Sang-Soo n Kim	Dong-Hyu n Kang		Food Control	102	국외	SCI

		SalmonellaTyphimurium and Listeria monocytogenes in buffered peptone water and tomato juice								
30	2019	Resistance of Escherichia coli O157:H7 ATCC 35150 to ohmic heating as influenced by growth temperature and sodium chloride concentration in salsa	Sang-Soo n Kim	Dong-Hyu n Kang		Food Control	103	국외	SCI	
31	2019	Inactivation of Staphylococcus aureus biofilms on food contact surfaces by superheated steam treatment	Soo-Hwan Kim	Dong- H y u n Kang		Journal of F o o d Protection	82	국외	SCI	
32	2020	Inactivation of Bacillus cereusspores on stainless steel by combined superheated steam and UV-C irradiation treatment	Sang-Soo n Kim	Dong- H y u n Kang		Journal of F o o d Protection	83	국외	SCI	
33	2020	Antimicrobial efficacy of cold plasma treatment against food-borne pathogens on various foods	Jin-Young Han	Dong- H y u n Kang		Journal of Physics D: Applied Physics	53	국외	SCI	
34	2020	Inactivation efficacy of a sixteen UVC LED module to control foodborne pathogens on selective media and sliced deli meat and spinach surfaces	Do-Kyun Kim	Dong- H y u n Kang		LWT-Food Science and Technology	130	국외	SCI	
35	2020	Inactivation Kinetics and Membrane Potential of Pathogens in Soybean Curd Subjected to Pulsed Ohmic Heating Depending on Applied Voltage and Duty Ratio	Eun-Rae Cho	Dong- H y u n Kang		Applied and Environment al Microbiology	86	국외	SCI	

② 특허 성과

출원된 특허						등록된 특허				
연 번	출원일	특허명	출원인	출원 국	출원번호	등록일	특허명	등록인	등록국	등록번 호
1	2016	발효식품의 바이오제닉 아민 저감화 방법	동국대학교 산학협력단	대한민국	10-2016-0021953	2017	발효식품의 바이오제닉 아민	동국대학교 산학협력단	대한민국	10-1806519

							저감화 방법			
2	2018	제 3형 캐러멜 색소의 제조 방법 및 그로부터 제조된 제2형 캐러멜 색소	동국 대학교 산학 협력단	대한 민국	10-2018- 0086941	2020	제3형 캐러멜 색소의 제조 방법 및 그로부터 제조된 제 3형 캐러멜 색소	동국대 학교 산학협 력단	대한민 국	10-2122 070
3	2019	병원성 미생물 살균장 치를 이용한 시스템	서울 대학교 산학 협력단	대한 민국	10-2019- 0008994					

③ 기술료징수 현황

기 징수액	당해연도 징수액	향후 징수액	합계
	10,000,000		10,000,000

- 기술이전 및 기술지도 내용

※ 명칭, 관련업체명, 지도내용 등

N O	기술이전유 형	기술실시 계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료
1	노하우	• 대장균 O157:H7의 검출을 위한 배지 조성물	(주)세니젠	2020.03.30	10,000,000원
합계					10,000,000원

④ 사업화 성과 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(백만원)				
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내			
국외					
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				

무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)			
	수출			

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

(나) 정성적 성과

○동국대 이광근

구분	연구목표	주요 연구 성과
1 단계	1차년도	
	2차년도	
	3차년도	<ul style="list-style-type: none"> • 푸란의 생성기작 규명 및 저감화 연구 • 푸란 생성 관련 지표물질 상관관계 연구 • 전통 장류 맞춤형 푸란 및 EC 분석법 개발 • 전통발효식품(된장)의 안전성 확보를 위한 제조 공정 탐색

2 단계	4차년도	<ul style="list-style-type: none"> • 전통발효식품 공정연구를 통한 식품모델시스템 확립 • 메일라드 반응 모델시스템을 활용한 푸란 저감화 연구 • 실제 전통발효식품 시스템을 활용한 에틸카바메이트 저감화 연구 • 종균 이용 메주 생산 공정 기반 연구 	<ul style="list-style-type: none"> • 개량식 된장 및 간장의 제조공정 탐색 • 공정변화를 통한 식품모델시스템 구축 • 푸란 저감화를 위한 간장 모델시스템 구축 및 최적 식품첨가물 선별 • 푸란 저감화를 위한 첨가물 농도 최적화 • 에틸카바메이트 전구체 첨가를 통한 된장모델 내에서의 에틸카바메이트 저감화 • 우레아제(Urase)를 이용한 에틸카바메이트 저감화 • 종균을 이용한 메주 생산 공정 구축 완료
	5차년도	<ul style="list-style-type: none"> • 전통발효식품 맞춤형 바이오제닉 아민 분석법 개발 • 식품모델시스템을 활용한 바이오제닉 아민 저감화 연구 • 종균 이용 된장의 품질평가 시스템 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 바이오제닉 아민의 분석 중 pH조절의 필요성 확인 • 분석기기조건(HPLC)의 최적화 • 분석법의 유효성 검증 • 전통발효식품 맞춤형 바이오제닉 아민 분석법 개발 • 바이오제닉 아민 생성균주 모델에서의 저감화 연구 • 된장 제조공정 중 바이오제닉 아민 주요 관리점 선정 • 실제 식품모델에서의 바이오제닉 아민의 저감화 연구 • 전통발효식품에서의 바이오제닉 아민, 푸란, 에틸카바메이트, 향기성분의 분석법 확립 • 종균 후보균주에 따른 바이오제닉 아민, 푸란, 향기성분 분석
	6차년도	<ul style="list-style-type: none"> • 전통발효식품의 주원료인 대두에서 아플라톡신의 분석법 확립 및 저감화 기술개발 • 전통발효식품 중 화학위해인자(바이오제닉 아민, 푸란, 에틸카바 	<ul style="list-style-type: none"> • 아플라톡신의 분석법 확립 • 화학적 처리를 통한 아플라톡신의 저감화 기술 개발 • 물리적 처리를 통한 아플라톡신의 저감화 기술 개발

		<p>메이트) 최적 저감화 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> • 종균의 최적화를 위한 품질(향기 성분 분석) 및 안전성 평가(바이오제닉 아민 분석) 	<ul style="list-style-type: none"> • 전통발효식품 모델시스템에서 기 확립된 저감화물질이 각 위해인자에 미치는 영향 확인 • 전통발효식품 모델시스템에서 화학위해인자의 종합적 저감화 방안 도출 • 종균후보 균주에 따른 화학적 위해성분인 바이오제닉 아민 분석 • 종균후보 균주에 따른 향기성분 분석
7차년도		<ul style="list-style-type: none"> • 전통발효식품(된장) 모델시스템에서 화학적위해인자의 최적 저감화 방안도출 • 전통발효식품(된장)의 생산 공정 중 취발성 대사체(향기성분) 연구 • 전통발효식품(된장)의 유해물질 저감화 가이드라인 구축 	<ul style="list-style-type: none"> • 전통발효식품에서 화학적 위해인자로 선정된 에틸카바메이트, 바이오제닉 아민, 푸란을 동시에 저감화 시키기 위한 최적화된 방안을 된장 모델시스템을 이용하여 확인 • 에틸카바메이트 저감화 방안으로 Urease, 바이오제닉 아민의 저감화 방안으로 천연추출물(DFCE, 미나리, 콩껍질, 풋고추, 양파 추출물3% w/w)과 Catechin 혼합물, 푸란 저감화 방안으로 MgSO4와 Na2SO3 확인함 • 비교적 낮은 온도에서 향기성분 추출이 가능하고, 비극성용매를 사용하여 비극성의 화학성질을 가진 성분을 추출하는데 효율이 좋은 DRP-LLE방법을 향기성분 추출 방법으로 채택 • 추출과정 이후 향기성분의 분리는 휘발성이 강한 향기성분의 특징을 고려하여 GC를 이용하여 수행 • 된장 제조 공정별, 제도 단계별 향기성분의 분석을 통해, 각 공정이 전통발효식품의 풍미에 미치는 영향에 대해 분석 • 제조 공정별 안전성에 관한 연구 결과를 토대로 산업체에 적용될

			수 있는 된장 제조 공정 단계별 유해물질 저감화 방안가이드라인을 작성함
3 단 계	후속 1차년도		
	후속 2차년도	<ul style="list-style-type: none"> 열처리 아몬드의 퓨란 생성량 분석 및 열처리 모델시스템을 이용한 퓨란 생성 저감화 안식향산 함유 음료의 벤젠 분석 및 음료 모델시스템을 이용한 벤젠 생성 저감화 	<ul style="list-style-type: none"> 불포화 지방산 다량 함유 고체 식품 중 퓨란 분석법 확립 및 유효성을 검증 완료 음료류 중 벤젠 분석법 확립 및 유효성을 검증 완료 시중에 유통되는 음료류 중 벤젠 분석을 완료 음료 모델시스템을 활용한 벤젠 저감화 연구를 수행
	후속 3차년도	<ul style="list-style-type: none"> 식품모델시스템(라면류)을 활용한 조리 및 가공 공정 중 퓨란 저감화 잠재적 위해요소 함유 식품(후추, 고춧가루, 김)의 조리 및 가공 공정 중 생성 유해물질(퓨란, 바이오제닉아민)분석 식품첨가물을 활용한 캐러멜 색소 개발을 통한 유해물질(4-MI) 저감화 	<ul style="list-style-type: none"> 인스턴트 라면 중 퓨란 분석법 확립 및 유효성을 검증함 라면 모델시스템에서의 퓨란 생성량을 분석 및 저감화 연구를 진행함 유해물질 별 분석법 확립 및 유효성을 검증함 잠재적 위해요소 함유 식품 3종에서의 2종의 유해물질 함량 분석을 진행함. 김 열처리시스템모델에서의 Kinetics 연구를 수행함 고춧가루 열처리 시스템모델에서의 Kinetics 연구를 수행함 4-Methylimidazole (4-MI) 분석법 확립 및 유효성을 검증함 4종의 무기염 및 2종의 유기산을 첨가한 제 III형 캐러멜색소 모델시스템을 개발함. 제 III형 캐러멜색소 모델시스템에서의 색소 안정성 분석을 진행함.

○서울대 강동현

구분		연구목표	주요 연구 성과
1 단 계	1차년도	<ul style="list-style-type: none"> 식품종류에 따른 RF 가열의 효과를 검증한다. 또한 RF 가열 효과에 영향을 미치는 식품의 물리/화학적 특성을 규명하며 최적화를 시킨다 	<ul style="list-style-type: none"> Pilot scale의 RF 초고속 가열 시스템 구축함 RF가열에 따른 온도상승 정도 확인을 통한 적합한 식품군 선별함 열화상적외선 카메라를 이용한 RF 식품가열의 균일성 조사함 RF가열의 식중독균 제어 효과 기초 검증함
	2차년도	<ul style="list-style-type: none"> Ohmic 가열 처리 시스템을 도입하며 가열조건을 최적화 한다 	<ul style="list-style-type: none"> 식품의 염분함량, 수분함량 등 화학적 특성에 따른 RF 가열 양상 차이 확인함 식품의 깊이별 가열 정도 비교 및 깊이별로 접종된 식중독균의 제어 효과 확인함 배치 타입 Ohmic 가열 시스템 구축 및 액상 식품내의 식중독균 제어 효과 검증함
	3차년도	<ul style="list-style-type: none"> 연속형 ohmic 가열 처리시스템을 도입하며 식중독균 제어능력을 평가한다. 또한 RF 유전자열에 영향을 미치는 dielectric property에 대해 연구한다 	<ul style="list-style-type: none"> 산업적용을 위한 연속형의 Ohmic 가열 시스템을 구축함 기존 가열 방법 대비 식중독균 제어 효과를 비교 검증함 Precision impedance analyzer를 포함한 유전을 측정 장비 구축함 식품군별 화학적, 물리적 변화 요인에 따른 유전을 측정 및 가열 양상 비교함
2 단 계	4차년도	<ul style="list-style-type: none"> ohmic 시스템을 고체 및 반고체 식품에 적용하기 위해 시스템을 구축하고 electrode 부식 방지를 위한 최적 조건 확립 및 시스템의 식중독균 저감화 효과를 규명한다 	<ul style="list-style-type: none"> 고체 및 반고체 식품 적용을 위한 고주파수 Ohmic 가열 시스템 구축 Electrode 부식 방지를 위한 최적 처리 조건 확립 고주파수 Ohmic 가열 기술을 이용한 target 식품 내 식중독균 저감화 효과 규명
	5차년도	<ul style="list-style-type: none"> 식품 내 수분함량, 유전손실율, 가열효율 간 종합연계를 통해 RF 유전자열을 최적화하며 그 요인에 따른 식중독균 제어 효과 평가함 	<ul style="list-style-type: none"> 식품 내 수분함량, 유전손실율, 가열효율 간의 종합 연계를 통한 RF 유전자열의 최적화 Dielectric loss factor의 변화요인

3 단 계		다. 또한 액상 식품의 pH 변화에 따른 ohmic 시스템의 가열 및 식중독균 제어 특성을 규명한다	(수분함량)에 따른 RF 기술의 식중독균 저감화 영향 평가 <ul style="list-style-type: none"> 액상 식품 pH 변화에 따른 ohmic 가열 및 식중독균 제어효율 분석
	6차년도	<ul style="list-style-type: none"> Super-heated steam 가열 시스템을 구축하며 구축된 시스템을 이용하여 공정 내 bio-film에 대한 제어효과를 규명한다 	<ul style="list-style-type: none"> Super-heated steam 가열 살균 시스템 구축 및 적용 최적화 Super-heated steam의 단독처리를 통한 공정 내 bio-film 제어효과 규명 기존 saturated-steam 기술과의 bio-film 제어효과 비교 검증
	7차년도	<ul style="list-style-type: none"> 견과류 염분함량에 따른 RF 및 super-heated steam의 식중독균 제어효과 평가 및 식품 품질변화를 평가한다 	<ul style="list-style-type: none"> 피스타치오 내 S. enterica를 4 log 이상 저감하기 위한 RF heating의 처리 조건 확립 아몬드 및 피스타치오 내 E. coli O157:H7, S. Typhimurium, L. monocytogenes 및 S. Enteritidis PT 30을 저감화하기 위한 SHS 처리 조건 확립 염분 함량별 피스타치오의 RF 처리 전후 색 및 산패 정도(peroxide value, acid value) 확인을 통해 최적 처리 조건 확립 아몬드 및 피스타치오의 SHS 처리 전후 산패 정도 (peroxide value, acid value) 확인을 통한 최적 처리 조건 확립
후속 1차년도	<ul style="list-style-type: none"> 신규 가열기술과 조합 가능한 기술 screening, 조합된 기술의 살균력 평가를 위한 시너지 효과 확인, 시너지 효과가 나타나는 조합 처리에 대한 병원성균 저감화 메커니즘 규명한다 	<ul style="list-style-type: none"> 신규 가열 기술인 Ohmic,과 조합 가능한 essential oil components를 screening하여 조합 시스템을 구축 신 가열 기술 기반 조합 시스템의 식중독 균 저감 정도를 확인하였으며 이로부터 시너지 효과를 검증 신 가열 기술 기반 조합 시스템을 통한 식중독 균의 저감 메커니즘을 확인 	
후속 2차년도	<ul style="list-style-type: none"> 각 신 가열 기술 기반 조합 처리 시스템의 적용 가능한 식품 선별한다 	<ul style="list-style-type: none"> RF-UV 조합 처리 시스템을 통한 분말 내 식중독 균 저감화 SHS-LA 조합 처리를 통한 과채류 	

		<ul style="list-style-type: none"> • 각 조합 처리 시스템의 저감화 효과와 품질 변화 확인을 통한 처리 조건의 최적화한다 	<p>표면 내 식중독균 저감화</p> <ul style="list-style-type: none"> • RF-UV 조합 처리를 통한 식중독균 저감 및 품질 변화를 고려한 최적 처리 조건 확립 • SHS-LA 조합 처리를 통한 식중독균 저감 및 품질 변화를 고려한 최적 처리 조건 확립
<p>후속 3차년도</p>		<ul style="list-style-type: none"> • 신규 가열 시스템의 시뮬레이션 예측 시스템 개발 및 다양한 factor를 기반으로 정합성을 평가한다 	<ul style="list-style-type: none"> • Ohmic, RF, SHS 가열 시스템의 시뮬레이션 예측 시스템 개발을 위해 Comsol multiphysics 프로그램을 설정하고 chamber를 도식화 • Governing equation을 통해 boundary condition 결정 및 chamber를 mesh로 세분화하여 최적 해를 도출 • 온도상승 profile 분석을 통해 실제 측정값과 예측값의 정합성 평가 • 미생물 사멸 예측 패턴과 실제 정량적 미생물 제어 효과를 비교 분석하여 시뮬레이션 예측 모델의 정합성 평가

(다) 기타 주요연구 성과 (자유 기술)

①1-3차년도 전체 요약

• 동국대(이광근)

㉓ 열처리 아몬드류의 퓨란 생성량 분석 및 열처리 모델시스템을 이용한 퓨란 생성 저감화

- 불포화 지방산 다량 함유 고체 식품 중 퓨란 분석법 확립 및 유효성을 검증함
- 다소비 견과류(아몬드 등 5종)의 열처리 모델시스템에서의 퓨란 생성량을 분석함
- 퓨란 생성과 온도와의 관계를 확인하기 위한 Kinetics 연구를 수행함

㉔ 안식향산 함유 음료의 벤젠 분석 및 음료 모델시스템을 이용한 벤젠 생성 저감화

- 음료류 중 벤젠 분석법 확립 및 유효성을 검증함
- 시중에 유통되는 음료류 중 벤젠 분석을 완료함
- 음료 모델시스템을 활용한 벤젠 저감화 연구를 수행함

㉕ 식품모델시스템(라면류)을 활용한 조리 및 가공 공정 중 퓨란 저감화

- 인스턴트 라면 중 퓨란 분석법 확립 및 유효성을 검증함
- 라면 모델시스템에서의 퓨란 생성량을 분석 및 저감화 연구를 진행함.

㉔ 잠재적 위해요소 함유 식품(후추, 고춧가루, 김)의 조리 및 가공 공정 중 생성 유해물질(퓨란, 바이오제닉아민) 분석

- 후추 중 바이오제닉아민 분석법 확립 및 유효성 검증
- 가공 후추 조리 과정 중 유해물질 바이오제닉아민 생성량 분석
- 고춧가루 중 퓨란 분석법 확립 및 유효성 검증
- 고춧가루 조리 공정 중 퓨란 함량 분석
- 고춧가루의 열처리 모델시스템(굽기)을 활용한 Kinetics 연구
- 김 중 퓨란 분석법 확립 및 유효성 검증
- 조리법에 따른 김 중 퓨란 함량 분석
- 김의 열처리 모델시스템(굽기)을 활용한 Kinetics 연구

㉕ 식품첨가물을 활용한 캐러멜 색소 개발을 통한 유해물질(4-MI) 저감화

- 식품(캐러멜 색소) 중 4-MI (4-methylimidazole) 분석법 확립 및 유효성 검증
- 4종의 무기염 및 2종의 유기산을 첨가한 제 III형 캐러멜색소 모델시스템을 개발함
- 제 III형 캐러멜 색소 모델시스템 구축 및 color intensity & Hue index 평가
- 캐러멜 색소 모델시스템에서의 색소 안정성 평가

• 서울대(강동현)

㉖ 신규 가열기술 기반 조합 시스템 구축 및 식중독균 저감 메커니즘 분석

- Ohmic heating과 조합 가능한 여러 기술을 screening하여 Ohmic-essential oil 시스템 구축
- Ohmic-essential oil 시스템의 적용을 통한 식중독균 저감에 대한 시너지 효과 확인
- 조합 시스템의 식중독균 저감 메커니즘을 PI 및 DiBAC₄(3) uptake value를 통해 확인

㉗ Radio Frequency heating과 UV 조합 처리를 통한 식중독균 제어 및 저감 메커니즘 규명

- RF-UV 조합 처리를 통한 분유 내 식중독균 저감화 대한 시너지 효과가 관찰되었음
- RF-UV 조합 처리가 분말 식품 내 식중독균의 세포막 파괴에 시너지 효과를 나타냄
- RF-UV 조합 처리 전 후 분유의 색 변화를 관찰한 결과 대조군과 유의적인 차이가 없음을 확인함

㉘ Superheated steam과 Lactic acid 조합 처리를 통한 식중독균 제어 및 메커니즘 규명

- SHS-LA 조합 처리를 통해 과채류 표면 내 식중독균을 sublethal injury 없이 효과적으로 제어할 수 있음을 확인함
- SHS-LA 조합 처리를 통해 과채류의 품질 (색 및 텍스처) 변화를 확인 해본 결과 대조군과 유의적인 차이가 없음을 관찰함

㉙ Ohmic heating, RF, SHS 시뮬레이션 예측 모델 개발

- 신규 가열 시스템에 적용하는 chamber의 도면 구성 및 주요 factor 도출하였음
- Governing equation을 통해 boundary condition을 결정함
- 각 chamber의 도면을 mesh로 세분화하여 미분방정식의 최적 solution을 구할 수 있도록 최적화를 진행함

- 온도 상승 예측값과 실제 측정값을 비교하여 정합성을 평가함
- 각 시스템별 병원성 미생물 사멸 예측 패턴과 실제 정량적 미생물 제어 효과를 비교하여 시뮬레이션 예측 모델의 정확도를 검증함

② 1차년도 요약

- 2-1 협동: 식품 내 생물학적, 화학적 위해인자 저감화 기술 현장적용 및 산업화
연구목표: 식품 맞춤형 천연 항균 소재 생산 최적화 및 생물학적 위해인자 저감화기술 현장 적용 및 산업화

*2-1 협동 서울대학교 김도만 교수 연구 내용은 1핵심으로 이관

㉠ 신규 가열기술 기반 조합 시스템 구축 및 식중독 균 저감 메커니즘 분석

- Ohmic heating과 조합 가능한 여러 기술을 screening하여 Ohmic-essential oil 시스템 구축
- Ohmic-essential oil 시스템의 적용을 통한 식중독균 저감에 대한 시너지 효과 확인
- 조합 시스템의 식중독균 저감 메커니즘을 PI 및 DiBAC₄(3) uptake value를 통해 확인

③ 1차년도 상세 내용

- 2-1 협동 (식품 맞춤형 천연 항균 소재 생산 최적화 및 생물학적 위해인자 저감화기술 현장 적용 및 산업화)

연구목표 : 생물전환기술 활용 수용성 강화 식품 안전 천연 항균 소재 생산 최적화 및 적용, 신규 가열기술과 비가열 기술의 조합처리 시스템 구축 및 메커니즘 규명

*2-1 협동 서울대학교 김도만 교수 연구 상세 내용은 1핵심으로 이관

서울대 상세 내용

㉠ Ohmic heating과 essential oil components 조합 처리를 통한 식중독균 제어 및 저감 메커니즘 규명

- 음 가열은 빠르고 균일한 가열을 통해서 식품 내 식중독균을 짧은 시간 안에 효과적으로 제어하는 기술로 알려져 있다. 하지만 음 가열 단독 처리 시 높은 온도에 의해서 식품의 품질이 변질될 가능성이 있다. 음 가열을 다른 항균 처리와 조합하여 식중독균 저감에 대해서 시너지 효과를 나타낸다면 음 가열의 처리 시간을 단축하여 식품의 품질을 보다 잘 보존할 수 있다. 따라서 1년차 연구를 통해서 음 가열을 항균력이 있다고 알려져 있는 여러 에센셜 오일 성분과 조합 처리하였다. Buffered peptone water(BPW)에 E. coli O157:H7, S. Typhimurium., L. monocytogenes를 접종한 뒤 에센셜 오일 성분인 carvone, eugenol, thymol, citral과 음 가열을 조합 처리한 결과, thymol과 citral과 조합 처리하였을 경우에는 시너지 효과를 나타냈지만 carvone이나 eugenol과 조합처리했을 때는 시너지 효과를 나타내지 않았다. 저감 메커니즘을 규명한다면 어떤 에센셜 오일 성분과 조합하였을 때 보다 효과적인지를 확인할 수 있기 때문에 메커니즘을 세포막 파괴와 세포막 전위 변화를 통해서 살펴보았다. 이러한 연구를 통해서

기존 음 가열을 기반으로 한 조합 처리시스템을 구축하고 이를 식품에 효과적으로 적용할 수 있는 토대를 마련할 수 있었다.

- 펄스 음 가열 장치

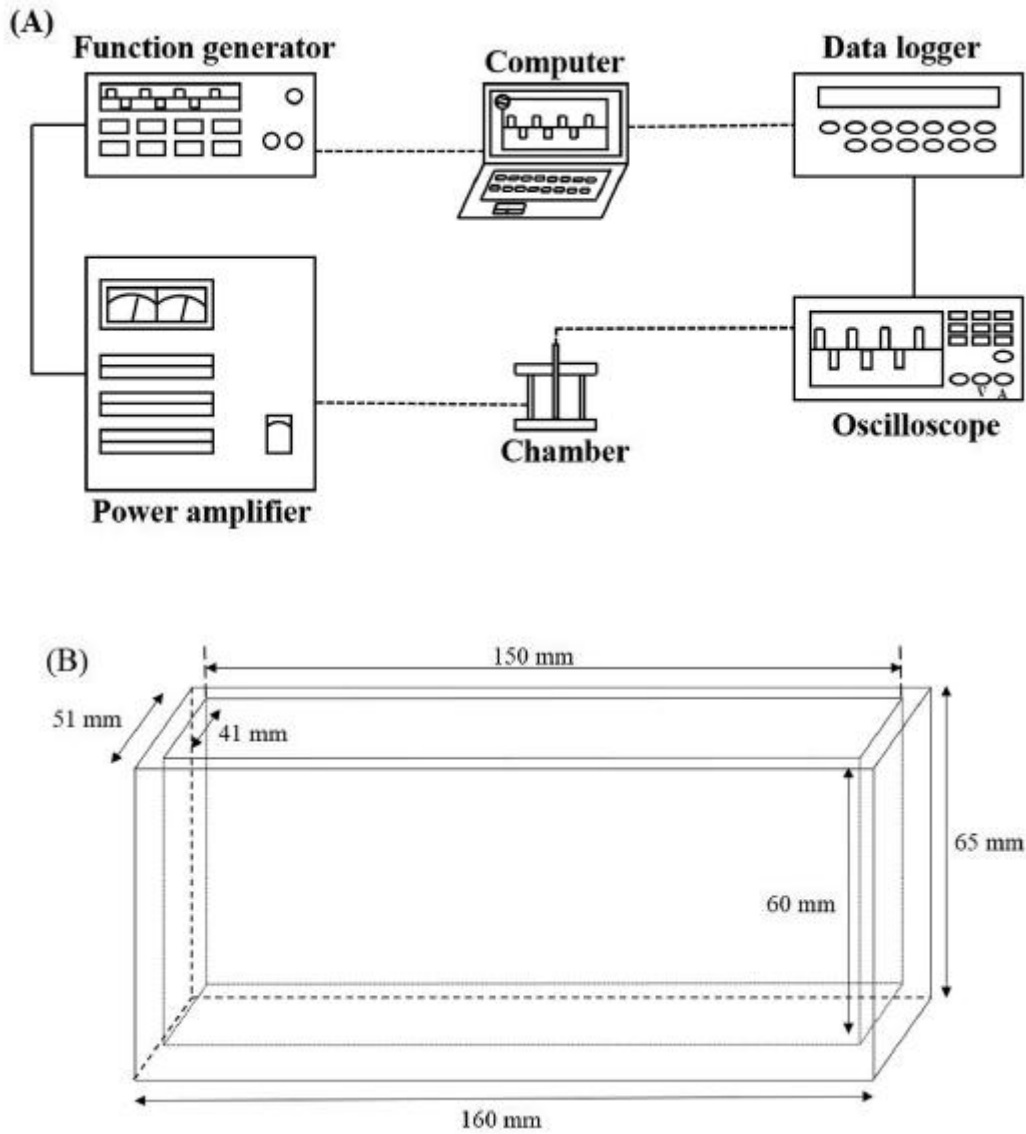


Fig 1. Schematic diagram of the pulsed ohmic heating system (A) and treatment chamber (B) at Seoul National University (Seoul, Korea)

- Fig. 1은 실험실에 구축된 pulsed ohmic heating system의 모식도이다. Function generator에서 입력해준 파형과 주파수를 갖는 전류가 흘러나와 power amplifier에서 전압이 증폭되어 (B)의 형태를 갖는 treatment chamber에서 처리된다. 처리 되는 도중 전류의 파형과 주파수를 Oscilloscope를 통해서 확인하였으며 이를 data logger를 통해서 computer에 입력하였다.

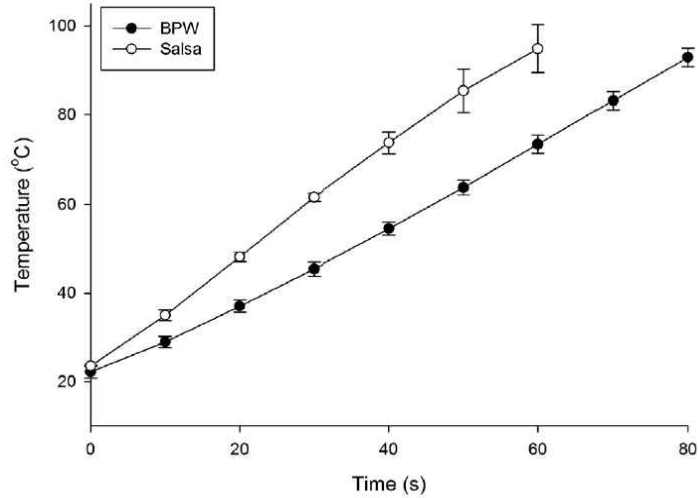


Fig 2. Temperature history of buffered peptone water (BPW) and salsa subjected to pulsed ohmic heating (0.05 duty ratio, 500 Hz) without essential oil components. Electric field strengths were 13.3 V_{rms}/cm and 11.5 V_{rms}/cm for BPW and salsa, respectively. The temperature history was not significantly influenced by addition of 1.0mM essential oil components ($p > 0.05$)

- Fig. 2는 BPW와 살사에 펄스 음가열 처리했을 때 온도 상승 정도를 보여준다. BPW와 살사를 각각 13.3 V_{rms}/cm 와 11.5 V_{rms}/cm 의 음가열 처리 시 90°C까지 올라가는데 60초와 80초의 시간이 걸렸다. 에센셜 오일 성분을 첨가하는 것이 펄스 음가열 처리를 통한 온도 상승에 유의적인 영향을 나타내지 않았다 ($p > 0.05$).

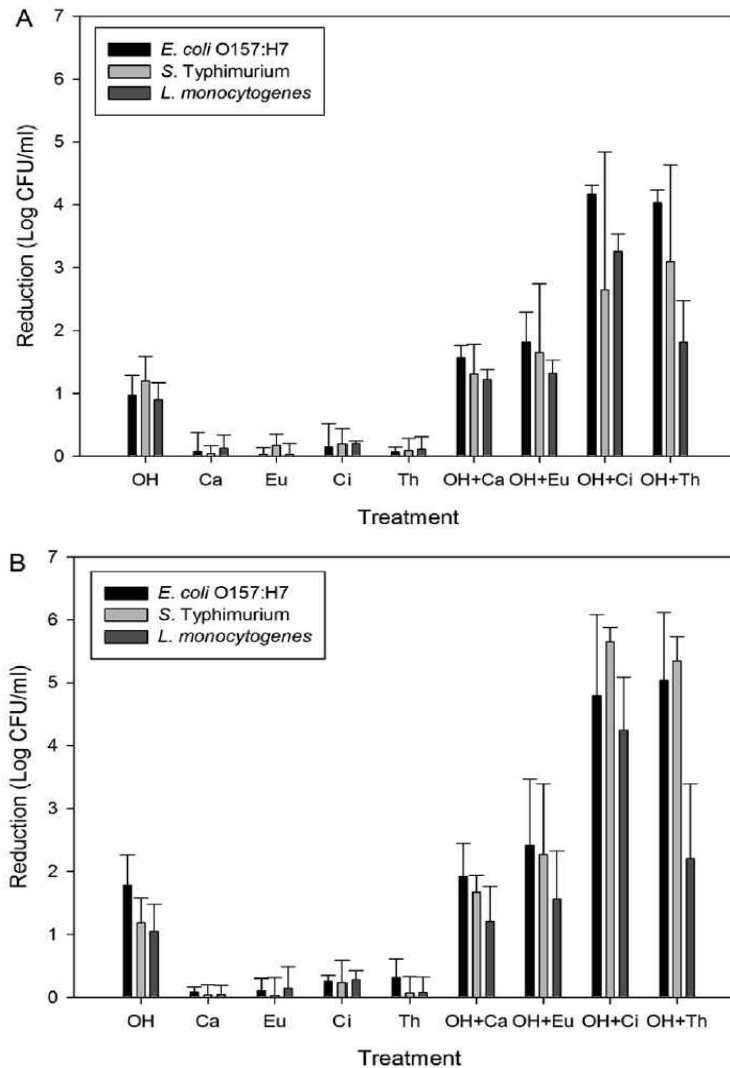


Fig 3. Reduction (log CFU/ml) of *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, and *L. monocytogenes* subjected to ohmic heating (OH), individual essential oil treatments, and combination treatments in BPW. Populations were enumerated using resuscitation media (A) and selective media (B).

Ca : carvone, Eu : eugenol, Th : thymol, Ci : citral

- Fig. 3은 BPW에서 음 가열 처리, 에센셜 오일 성분 처리 및 조합 처리 시 *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes*의 저감화 정도를 나타낸다. 먼저, 비선택배지에서 배양하였을 때 4종류의 에센셜 오일 성분은 모두 저감화 효과가 매우 미미하였다 (< 1 log CFU/ml). 음 가열은 세 종류의 식중독균에 대해서 모두 1 log CFU/ml 정도의 저감효과를 나타냈다. 조합 처리 하였을 경우에는 carvone 또는 eugenol과의 조합 처리는 세 종류의 식중독균의 저감에 대해서 모두 시너지 효과를 나타내지 않았지만, citral 및 thymol과 조합 하여 처리하였을 경우에는 세 종류의 식중독균에 대해서 모두 시너지 효과를 나타냈다. 선택배지에서 배양하였을 경우에도 같은 경향이 관찰되었으며 비선택배지에 배양했을 때보다 전반적으로 저감 정도가 높게

나타났다. 이를 통해서 옴 가열을 carvone 또는 eugenol과 조합 처리하는 것보다는 citral 또는 thymol과 조합 처리하는 것이 보다 효과적이라는 것을 확인할 수 있었다.

	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. Typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>
OH ^b	1.47 ± 0.62 A	-3.99 ± 3.70 A	30.27 ± 16.06 B
Carvone	1.52 ± 1.51 A	-1.49 ± 2.65 AB	-1.19 ± 0.64 A
Eugenol	0.78 ± 3.69 A	-1.26 ± 2.10 AB	5.35 ± 0.64 AB
Citral	1.01 ± 3.37 A	-3.69 ± 5.83 AB	4.52 ± 4.39 AB
Thymol	2.61 ± 0.68 A	1.92 ± 3.78 B	12.87 ± 4.76 AB
OH + Carvone	8.67 ± 2.88 A	2.73 ± 4.59 B	63.12 ± 23.29 C
OH + Eugenol	8.30 ± 4.19 A	2.77 ± 1.37 B	70.69 ± 12.19 C
OH + Citral	31.02 ± 13.0 B	16.47 ± 3.45 C	132.71 ± 19.73 D
OH + Thymol	26.20 ± 9.37 B	15.21 ± 5.86 C	112.63 ± 20.17 D

Table 1. PI uptake values of *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, and *L. monocytogenes* subjected to individual ohmic heating (OH), essential oil, and combination treatments.

	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. Typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Carvone	7.36 ± 0.82 A	-3.30 ± 35.92 A	55.44 ± 19.3 A
Eugenol	-1.06 ± 12.2 A	173.60 ± 142.1 A	108.45 ± 15.6 B
Citral	32.65 ± 5.97 A	1144.83 ± 291.8 B	132.78 ± 16.3 BC
Thymol	842.73 ± 84.3 B	1065.83 ± 238.0 B	154.41 ± 8.96 C

Table 2. DiBAC₄(3) values of *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, and *L. monocytogenes* subjected to individual essential oil treatments.

- Table 1은 옴 가열 처리, 에센셜 오일 성분 처리, 조합 처리에 의한 세포막 손상 정도 (PI uptake) 결과이다. 에센셜 오일 성분 또는 옴 가열 단독 처리에 의해서는 세포막 손상이 거의 일어나지 않았다. 조합 처리하였을 때에는 단독처리에 비해서 전반적으로 PI uptake 값이 증가함을 관찰할 수 있었으며 특히 citral 또는 thymol과 조합 처리 했을 때 PI uptake 값이 carvone 또는 eugenol과 조합 처리하였을 보다 유의적인 큰 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$). 이를 통해 옴 가열을 citral과 thymol과 조합 처리하였을 때 보다 심각한 세포막 손상을 일으키기 때문에 식중독균 저감에 대해서 시너지 효과를 나타낸다고 추론할 수 있었다. 특정 에센셜 오일이 옴 가열과 조합 처리 되었을 때 더 큰 세포막 손상을 일으키는 이유를 알아보기 위해 에센셜 오일 성분에 의한 식중독균의 세포막 전위 변화를 측정하였다. 그 결과 전반적으로 citral 또는 thymol에 의한 세포막 전위 변화가 carvone 또는 eugenol에 의한 세포막 전위 변화 보다 값이 컸으며 특히 thymol의 경우에는 세포막 전위 변화 값 (DiBAC₄(3) value)이 carvone 또는 eugenol 처리에 의한 값보다 유의적으로 큰 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$). 위의 결과를 종합하였을 때, 세포막 전위 변화를 크게 일으킬 수 있는 특정 에센셜 오일 성분과 옴 가열을 조합하여 식중독균에 처리하였을 때 단독 처리에 비해서 심각한 세포막 손상 정도를 일으

킬 수 있으며 이에 따라서 식중독균 저감에 대한 시너지 효과를 나타냄을 그 메커니즘으로 제시할 수 있다.

④ 2차년도 요약

- 본 연구과제의 후속 2차년도 연구를 성공적인 수행을 통하여 연구지반지표, 사업화지표, 인력양성지표 모두 목표 대비 실적을 완수하였다. 식품 안전성 분야의 연구결과로 Scientific Reports, Food Microbiology 등을 비롯한 13건의 학술적으로 뛰어난 SCI급 논문을 발표하였다. 본 사업의 연구내용을 토대로 2건의 특허를 출원하였으며, 식품안전성 분야 연구인력으로 1명의 박사학위자와 9명의 석사학위자를 배출하였다.
- 후속 2차년도에서는 각 세부 및 협동에서 계획한 대로 2-1세부과제는 현장 수요조사를 통해 식품품목별 분석 빈도가 높은 식중독균을 조사하였고, 다양한 식중독균 조합을 통해 multiplex real time PCR kit를 개발하였다. 이를 실제 현장에서 검증하여 상품화를 완료하였다. 2-1협동과제에서는 아몬드 열처리 후 생성되는 퓨란의 양을 분석하였고, 열처리 모델시스템을 이용하여 퓨란의 생성량을 제어하였다. 또한 안식향산을 함유하고 있는 음료의 벤젠을 분석하였고 모델시스템을 이용하여 이를 저감화 하였다. 추가적으로 신규 가열기술인 RF heating, superheated steam과 비가열 기술의 조합처리를 통해 식중독균을 제어하고 저감화 메커니즘을 분석하였다.

• 2-1 협동: 식품 내 생물학적, 화학적 위해인자 저감화 기술 현장적용 및 산업화

동국대 세부 연구목표: 식품모델시스템을 활용한 식품의 가공, 저장 중 유해물질 저감화

㉠ 열처리 아몬드의 퓨란 생성량 분석 및 열처리 모델시스템을 이용한 퓨란 생성 저감화

- 불포화 지방산 다량 함유 고체 식품 중 퓨란 분석법 확립 및 유효성을 검증함
- 다소비 견과류(아몬드 등 5종)의 열처리 모델시스템에서의 퓨란 생성량을 분석함
- 퓨란 생성과 온도와의 관계를 확인하기 위한 Kinetics 연구를 수행함

㉡ 안식향산 함유 음료의 벤젠 분석 및 음료 모델시스템을 이용한 벤젠 생성 저감화

- 음료류 중 벤젠 분석법 확립 및 유효성을 검증함
- 시중에 유통되는 음료류 중 벤젠 분석을 완료함
- 음료 모델시스템을 활용한 벤젠 저감화 연구를 수행함

서울대 세부 연구목표: 신규 가열기술 기반 조합 시스템 구축 및 식중독균 저감 메커니즘 분석

㉢ Radio Frequency heating과 UV 조합 처리를 통한 식중독균 제어 및 저감 메커니즘 규명

- RF-UV 조합 처리를 통한 분유 내 식중독균 저감화 대한 시너지 효과가 관찰되었음
- RF-UV 조합 처리가 분말 식품 내 식중독균의 세포막 파괴에 시너지 효과를 나타냄
- RF-UV 조합 처리 전 후 분유의 색 변화를 관찰한 결과 대조군과 유의적인 차이가 없음을 확인함

㉣ Superheated steam과 Lactic acid 조합 처리를 통한 식중독균 제어 및 메커니즘 규명

- SHS-LA 조합 처리를 통해 과채류 표면 내 식중독 균을 sublethal injury 없이 효과적으로 제어할 수 있음을 확인함
- SHS-LA 조합 처리를 통해 과채류의 품질 (색 및 텍스처) 변화를 확인 해본 결과 대조군과 유의적인 차이가 없음을 관찰함

⑤ 2차년도 상세 내용

- 2-1 협동 (식품 내 생물학적, 화학적 위해인자 저감화 기술 현장적용 및 산업화)

동국대 세부 연구목표 : 식품 모델시스템을 활용한 식품의 가공·저장 중 유해물질 저감화 신규 가열기술 기반 조합 시스템 구축 및 식중독균 저감 메커니즘 분석

㉞ 열처리 아몬드류의 퓨란 생성량 분석 및 열처리 모델시스템을 이용한 퓨란 생성 저감화

- 식품 제조 과정에서 불포화 지방산이 가열 분해되면 퓨란이 생성됨. 불포화 지방산 중 linoleic acid 에 열이 가해졌을 시 퓨란이 가장 많이 생성된다는 연구 보고가 있음 (Vranová J et al, 2009)
- 시중 판매되는 아몬드는 대부분 로스팅 과정을 거쳐서 유통되고 있으며, 제빵 과정에 아몬드 가루가 사용됨을 확인함. 약 50%의 지방 함량을 가지고 있는 아몬드는 불포화 지방산 중 linoleic acid를 다량 함유하고 있음. 아몬드 이외에도 최근 소비량이 급증한 견과류 4종을 추가하여 본 실험을 진행함
- 불포화 지방산을 다량 함유 고체 식품의 퓨란 분석법을 확립하고 이에 대한 유효성 검증을 하고자 함. 확립된 분석법을 이용하여 아몬드 로스팅 조건에 따른 퓨란 생성량을 분석하고, 로스팅 조건 조절을 통한 퓨란 저감화를 진행함

㉟ 불포화 지방산 다량 함유 고체 식품 중 퓨란 분석법 확립 및 유효성 검증

- 본 연구에서는 휘발성 유기물질인 퓨란의 추출방법 중 하나인 SPME와 GC-MS를 이용한 휘발성 유기물질 분석법을 기반으로 고체 식품에서 퓨란을 분석함

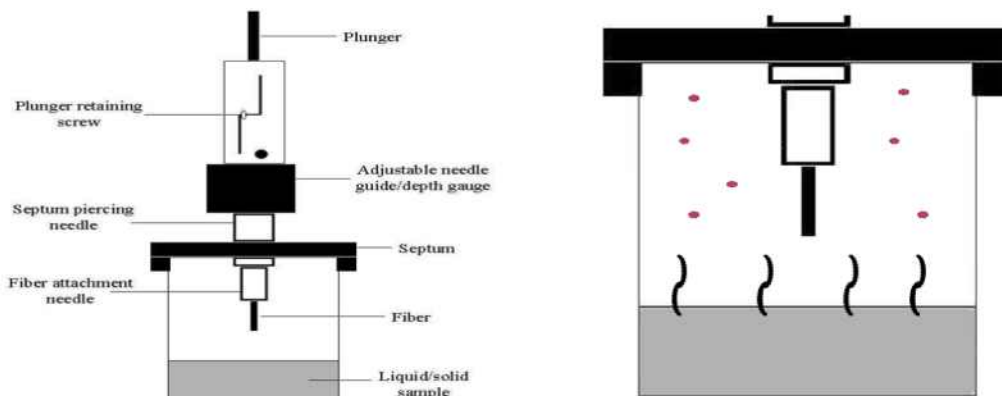


Fig 4. SPME 장치의 모식도

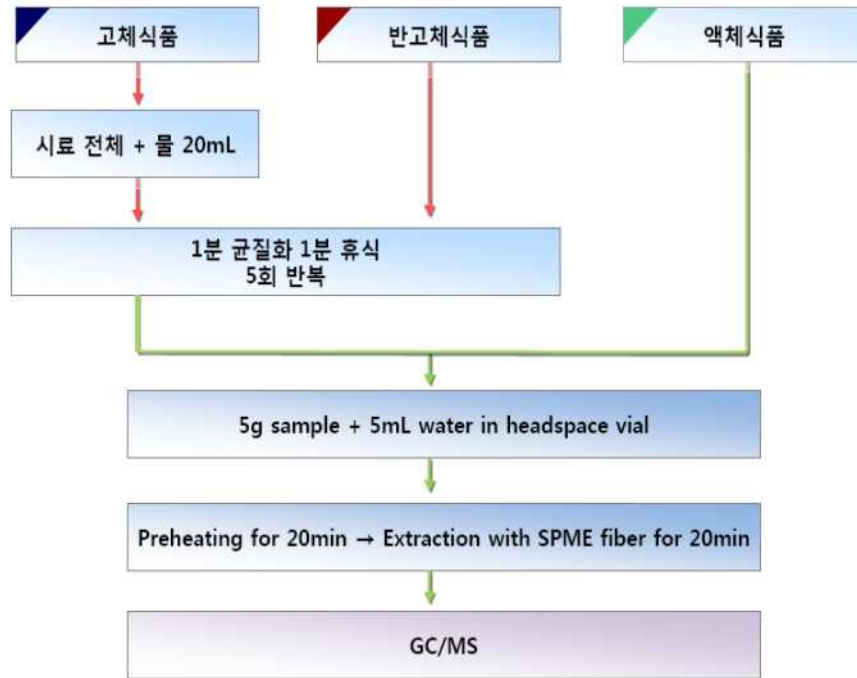


Fig 5. 퓨란 분석 단계

- 퓨란의 정확한 정량분석을 위하여 내부표준물질(internal standard)로 d4-퓨란을 선정함. 퓨란의 분석은 SIM 모드를 통해 표적이온을 39, 42, 68, 72m/z로 하여 진행하였음. 퓨란 정성분석을 위한 이온은 39와 42 m/z를 이용하였고 d4-퓨란 정성분석을 위한 이온은 68과 72 m/z를 이용하였음. 퓨란과 d4-퓨란 정량을 위한 이온 비율은 39와 68 m/z를 이용함
- 분석용 컬럼은 HP Plot-Q (15 m, 0.32 mm I.D. 20 μm film)을 사용하였고, SPME fiber는 Supelco사의 Carboxen/Poludimethylsiloxane (CAR/PDMS)를 사용함. 균질기는 독일 IKAR-WERKE사의 ULTRA-TURRAXR T25basic 모델을 사용하며, vial은 미국 Aglient사의 20 mL headspace vial을 사용함. GC 기기 조건은 다음과 같음

GC			
Column	HP plot-Q (15 m x 0.32 mm I.D. x 20 μm film)		
	Rate	Temperature	Hold time
Oven		50°C	2 min
	25°C/min	230°C	5 min
	Post run	230°C	5 min
Flow	1.5 ml/min, helium		
Injection	250°C, splitless mode		
MS			
Detector	230°C		
SIM mode	39, 68, 42, 72 m/z		

Table 3. GC 기기 조건

- 확립된 분석방법의 신뢰성을 검증하기 위해 미국 FDA (Food and Drug Administration) 및 AOAC 에서 제시한 가이드라인 방법에 따라 직선성 (Linearity), 정밀도 [Precision: 일내정밀도 (Intra-day precision), 일간정밀도 (Inter-day precision)], 회수율 (Recovery), 검출한계 (LOD), 정량한계 (LOQ) 등을 확인하여 검증함.(AOAC International, 2007, Codex Alimentarius, 2003, Food and Drug Administration, 1997)

1) 유효성 검증

A. 직선성 (Linearity)

- 직선성이란 일정한 범위 내에 있는 시료 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻을 수 있는 능력으로서 데이터를 간단히 그래프로 나타내면 Response와 농도의 관계에 대한 특징을 쉽게 알아볼 수 있음. 장비의 Response와 농도의 관계식을 직선 모델 $y=ax+b$ 로 만들 때, 고전적인 최소 제곱 회귀법이 사용됨. 검량곡선의 상관계수 (R^2)를 구하여 직선성을 확인함

B. 검량곡선 작성(Calibration Curve)

- 검량곡선에서 얻어진 표준물질과 내부표준물질의 정량이온 피크에 대한 면적비(표준물질/내부표준물질)를 구하여 Y축으로 하고 표준물질의 농도를 X축으로 하여 검량곡선을 작성하여 정량함

C. 정밀도 (Precision)

- 일내정밀도 (Intra-day precision; repeatability)
: 동일한 조건하에 하루 동안 반복적인 작업 시행하여 일내정밀도를 구함
- 일간정밀도 (Inter-day precision; intermediate precision)
: 동일한 조건하에 동일한 장비를 사용하여 실험날짜를 달리하여 시행하여 일간정밀도를 구함
- 각 표준물질의 농도를 최소 3개 포인트, 최소 5회 반복 측정하여 precision을 구함
- 각 농도의 coefficient of variation (CV)가 15%를 초과하지 않아야 함

D. 회수율 (Recovery)

- blank sample 또는 시료에 표준물질을 첨가하여 분석. 그 결과 값의 회수율을 구함
회수율(Total Recovery, %) = $(A-B)/C \times 100$
A: 공시료(또는 시료)에 표준물질을 첨가한 후 농도
B: 공시료(또는 시료) 용액의 농도
C : 첨가한 표준물질의 농도

E. 정확도 (Accuracy)

- 매질 인증표준물질 (Cirtified reference material, CRM)을 Food and Environment Research Agency (FAPAS, UK) 등에서 구입하여 분석 후 측정된 농도를 인증 값으로 나눈 비율로 분석회수율을 계산함
- 최소 3-10번 반복 결과의 % error 값을 사용함
- CRM이 없는 경우, 표준품을 3농도 level로 spiking 하여 회수율을 계산함

F. 검출한계 (Limit of Detection, LOD), 정량한계 (Limit of Quantification, LOQ) 확인

- 검출한계 (Limit of Detection, LOD)

: LOD는 기기 상 peak으로 인정할 수 있는 한계를 의미함

: 분석 크로마토그램 상에서 signal to noise (S/N)의 3배 이하의 값으로 계산

- 정성한계 (Limit of Quantification, LOQ)

: LOQ는 기기 상으로 신뢰성 있게 정량할 수 있는 한계를 의미함

: 각 표준물질을 최소농도로 5-10회 반복 측정하여 구함

: LOQ는 S/N의 10배 이하의 값으로 계산함

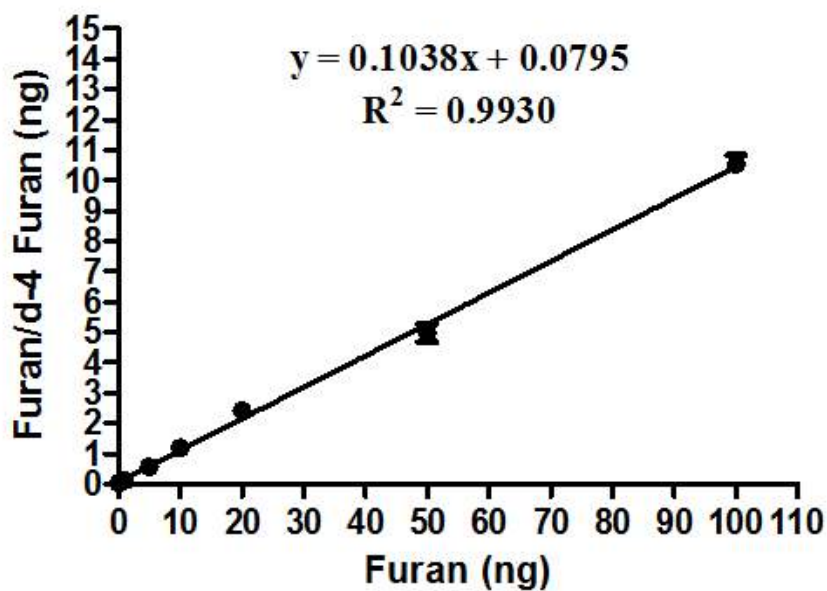


Fig 6. 퓨란 검량 곡선

Equation	Linearity Correlation Coefficient (r^2)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
$y = 0.1038x + 0.0795$	0.9930	0.09	0.27

Table 4. 직선성 확인 및 검출한계, 정량한계

Concentration (ng/mL)	Precision (% RSD)		Recovery (%)
	Intraday	Interday	
1	1.12	1.64	110.5
50	1.04	1.09	94.7
100	0.98	1.58	97.1

Table 5. 정밀도 및 회수율

- 퓨란 정량을 위해 6가지 농도조건을 이용하여 검량 곡선을 작성하였음, 검량곡선에서 얻어진 표준물질인 퓨란과 내부표준물질인 d-4 furan의 정량이온 피크에 대한 면적비를 구하여 y축으로 하고 표준물질의 농도를 x축으로 하여 검량 곡선을 작성함. 최소 제곱 회귀분석법을 이용하여 최종적으로 구한 검량 곡선은 다음과 같음

$$y=0.1038x+0.795$$

$$r^2=0.9930$$

- 정밀도와 회수율을 구하기 위하여 동일한 조건하에 동일한 장비를 사용하여 3가지 농도(1, 50, 100ng/mL)에서 실험을 진행하였으며, 각 농도별 실험 샘플 수는 5샘플로 진행하였음. 일간 정밀도는 5일간 진행하였음

㊤ 열처리 모델시스템에 따른 온도조건, 시간조건 설정 및 그에 따른 퓨란 분석

- 로스팅 온도 6 가지(150℃, 160℃, 170℃, 180℃, 190℃, 200℃) 그리고 로스팅 시간 5 가지(5분, 10분, 15분, 20분, 25분)에서 로스팅(총 30건)을 수행함
- 로스팅(로스팅기: CBR-101)은 3차원 회전 뒤틀림 방식으로 냉각방식은 강제 송풍방식이며, 가열방식은 간접 열풍방식임
- CBR-101 로스팅기를 이용하여 견과류 5종인 아몬드, 땅콩, 캐슈넛, 헤이즐넛, 사차인치를 로스팅함

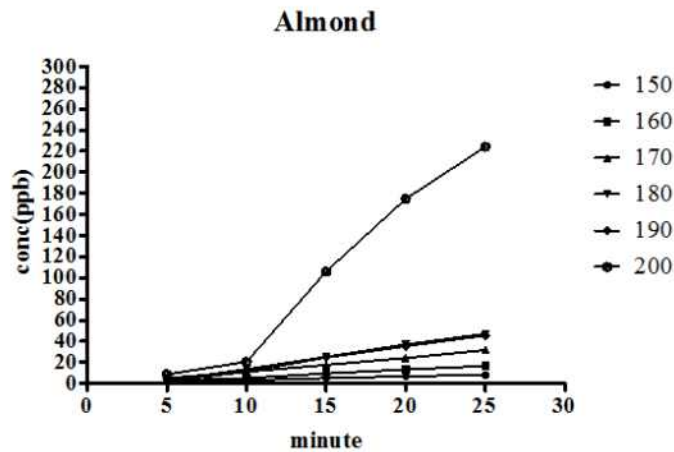


Fig 7. 아몬드의 온도, 시간 조건에 따른 퓨란 생성량

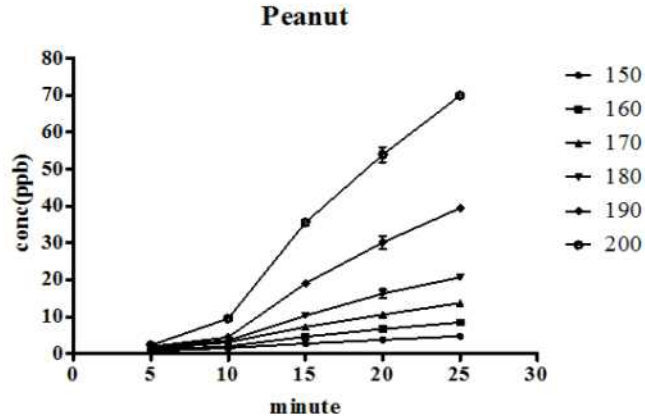


Fig 8. 땅콩의 온도, 시간 조건에 따른 퓨란 생성량

- 아몬드와 견과류의 경우 200°C로 로스팅 할 경우 10분을 기점으로 퓨란 생성량이 급증하며, 25분간 로스팅시 최대 224 ppb의 퓨란이 생성됨
- 땅콩의 경우는 190°C, 200°C로 로스팅 경우 10분을 기점으로 퓨란 생성량이 급증하며, 25분간 로스팅 시 최대 70 ppb의 퓨란이 생성됨

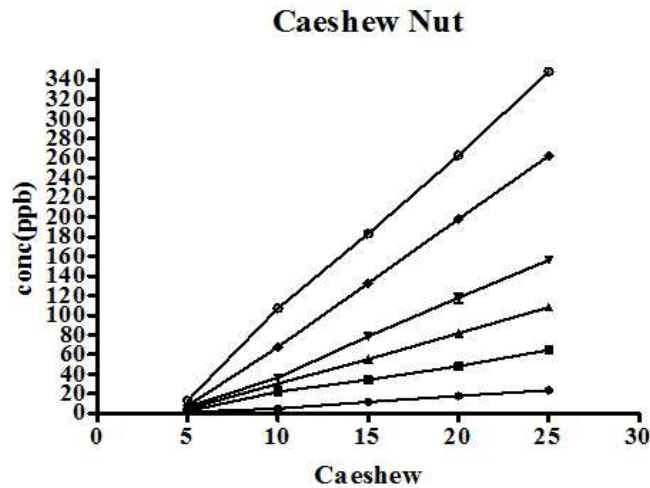


Fig 9. 캐슈넛의 온도, 시간 조건에 따른 퓨란 생성량

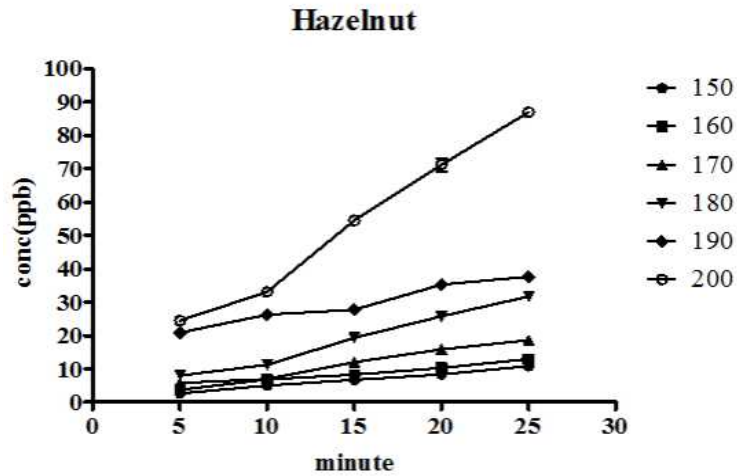


Fig 10. 헤이즐넛의 온도, 시간 조건에 따른 퓨란 생성량

- 캐슈넛의 경우 시간조건과 상관없이 퓨란 생성량이 일정하게 증가하는 경향을 보였음.

25분간 로스팅 시 최대 348 ppb의 퓨란이 생성됨

- 헤이즐넛의 경우는 190°C, 200°C로 로스팅 경우 10분을 기점으로 퓨란 생성량이 급증하며,

25분간 로스팅 시 최대 70 ppb의 퓨란이 생성됨

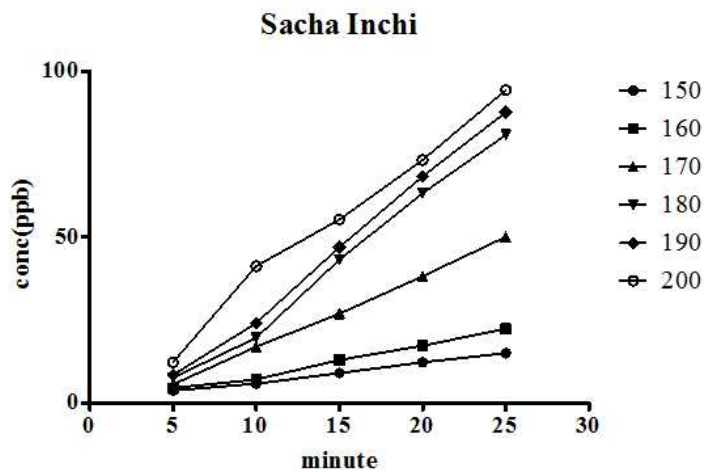


Fig 11. 사차인치치의 온도, 시간 조건에 따른 퓨란 생성량

- 사차인치치의 경우는 시간조건과 상관없이 퓨란 생성량이 일정하게 증가하는 경향을 보였음.

25분간 로스팅 시 최대 93 ppb의 퓨란이 생성됨을 확인함

㉔ 아몬드 열처리 모델시스템을 활용한 퓨란 생성량 분석 결과를 이용한 Kinetics 연구

1) 아몬드 시료

- 열처리 모델시스템에 따라서 6가지 온도와 5가지 시간 조건에서 로스팅을 수행함. 로스팅 데이터 결과를 회기분석하여 각 온도 조건에 해당하는 기울기 값을 구함. 기울기 값은 퓨란 Kinetics 연구에 사용함
- 대부분의 식품의 경우 온도조건에 대하여 0차 반응을 따름. 견과류 5종도 0차 반응 조건을 만족함. 이를 바탕으로 퓨란 Kinetics 연구를 위하여 온도조건에 의존적인 속도상수를 구하고 자아레니우스 방정식을 활용하여 활성화 에너지를 구함

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad \ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right)$$

k = Rate constant
A = Pre-exponential factor
E_a = Activation energy
R = Gas constant
T = Absolute temperature, K

Fig 12. 아레니우스 속도 방정식

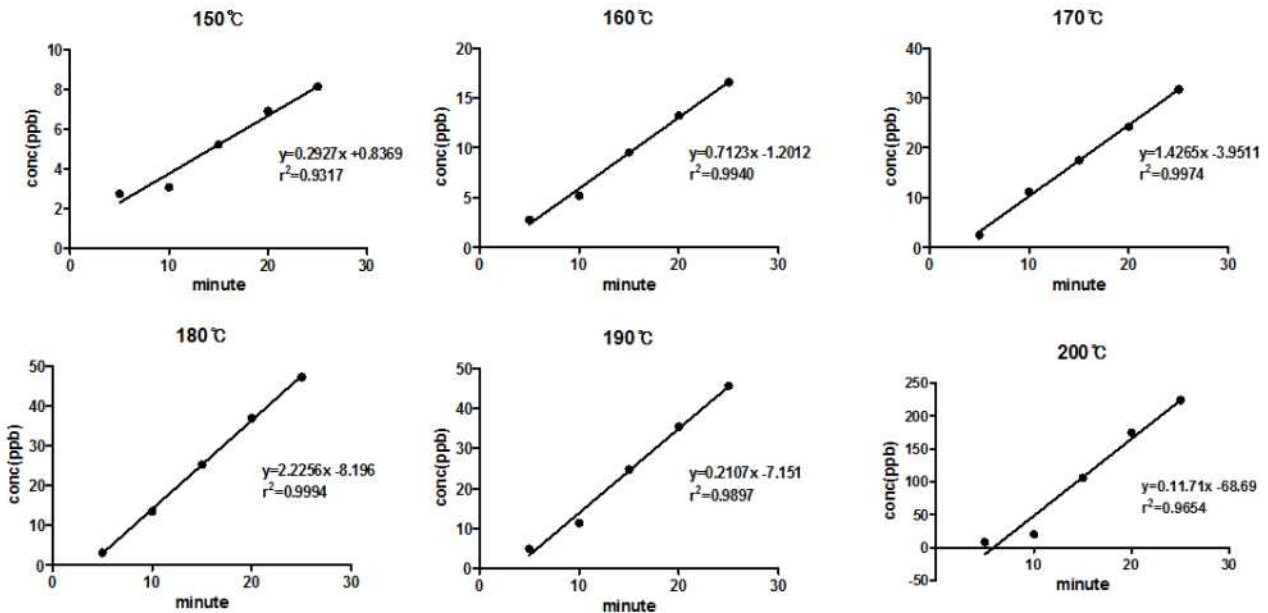


Fig 13. 아몬드의 로스팅 온도와 시간에 따른 퓨란 생성량의 회기분석

- 아레니우스 방정식을 통하여 활성화 에너지를 구하기 위해서는 각 온도조건에서 시간의 변화에 따른 1차 함수식을 구함. 그 함수식의 기울기 값 (k)를 이용하여 아레니우스 식에 적용하여 활성화 에너지를 구함. 결과는 아래 표와 같음

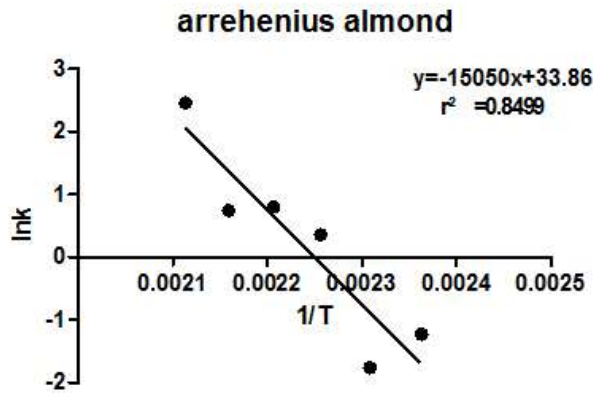


Fig 14. 회기분석을 이용하여 구한 k값을 활용하여 구한 아레니우스 식

°C	T	1/T	k	lnk
150	423.15	0.002363	0.2927	-1.22861
160	433.15	0.002309	0.1723	-1.75852
170	443.15	0.002257	1.4265	0.355224
180	453.15	0.002207	2.2256	0.800027
190	463.15	0.002159	2.1066	0.745075
200	473.15	0.002113	11.707	2.460187

Table 6. 회기분석을 이용하여 구한 결과 값

- 아몬드 의 경우 회기분석을 통해 구한 기울기 값을 이용하여 아레니우스 식에 적용하여 구한 식은 다음과 같음

$$y = -15050x + 33.86$$

$$r^2 = 0.8499$$

활성화에너지 : 125.134kJ/mol

2) 땅콩 시료

- 아몬드 시료와 동일한 방식으로 결과 값을 구함

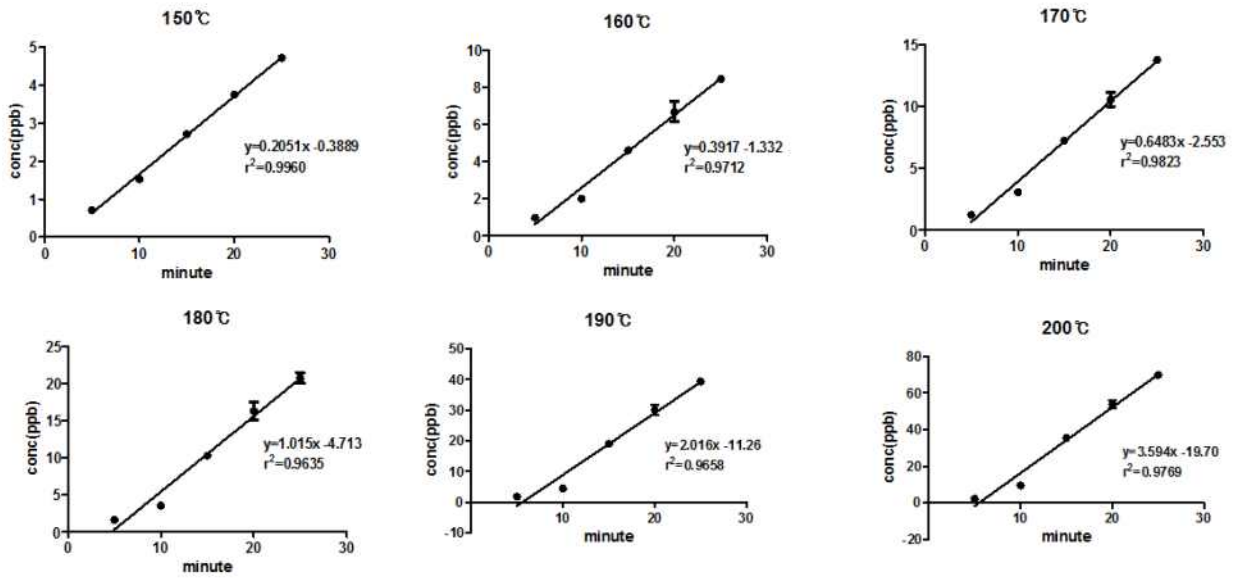


Fig 15. 땅콩의 로스팅 온도와 시간에 따른 퓨란 생성량의 회기분석

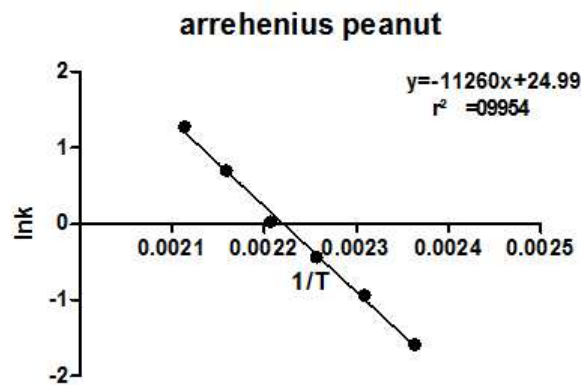


Fig 16. 회기분석을 이용하여 구한 k값을 활용하여 구한 아레니우스 식

°C	T	1/T	k	lnk
150	423.15	0.002363	0.2051	-1.58426
160	433.15	0.002309	0.3917	-0.93726
170	443.15	0.002257	0.6483	-0.4334
180	453.15	0.002207	1.029	0.028587
190	463.15	0.002159	2.0162	0.701215
200	473.15	0.002113	3.5937	1.279182

Table 7. 회기분석을 이용하여 구한 결과 값

- 땅콩의 경우 회기분석을 통해 구한 기울기 값을 이용하여 아레니우스 식에 적용하여 구한 식은 다음과 같음

$$y = -12260x + 24.99$$

$$r^2 = 0.9954$$

활성화에너지 : 93.58238 kJ/mol

3) 캐슈넛 시료

- 아몬드 시료와 동일한 방식으로 결과 값을 구함

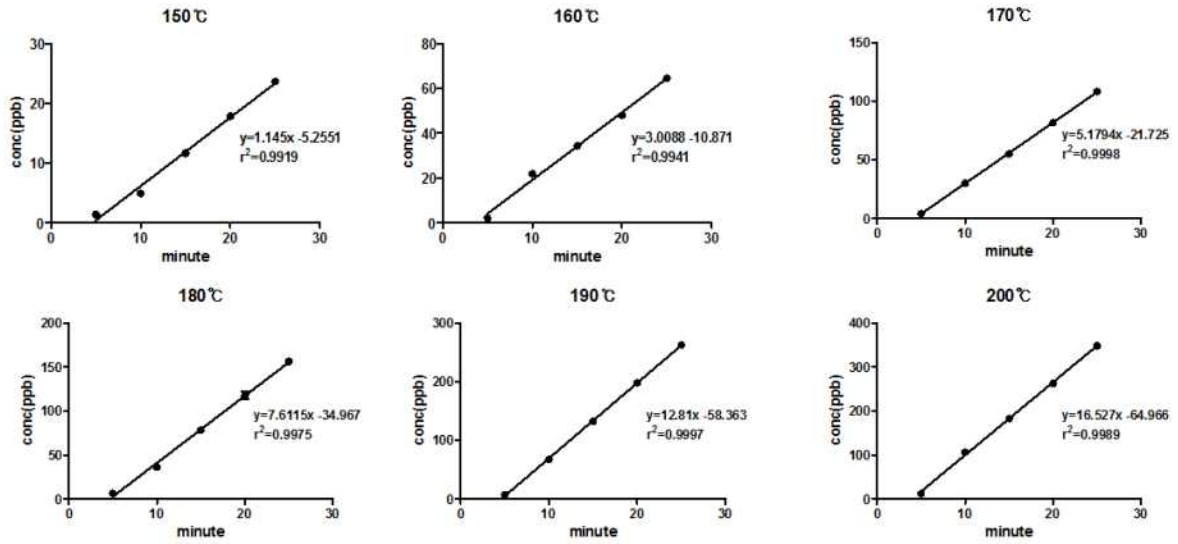


Fig 17. 캐슈넛의 로스팅 온도와 시간에 따른 퓨란 생성량의 회기분석

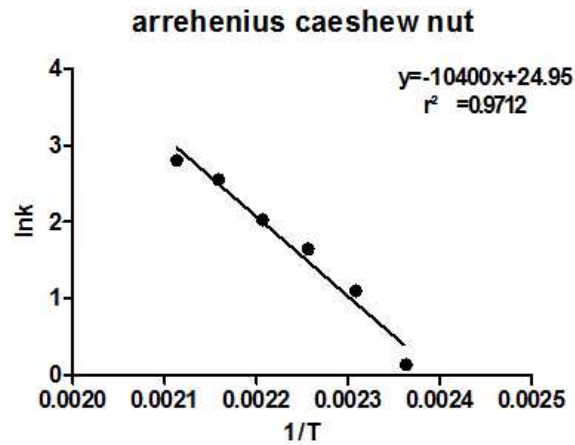


Fig 18. 회기분석을 이용하여 구한 k값을 활용하여 구한 아레니우스 식

℃	T	1/T	k	lnk
150	423.15	0.002363	1.145	0.135405
160	433.15	0.002309	3.0088	1.101541
170	443.15	0.002257	5.1794	1.644689
180	453.15	0.002207	7.6115	2.02966
190	463.15	0.002159	12.81	2.550226
200	473.15	0.002113	16.527	2.804995

Table 8. 회기분석을 이용하여 구한 결과 값

- 캐슈넛의 경우 회기분석을 통해 구한 기울기 값을 이용하여 아레니우스 식에 적용하여 구한 식은 다음과 같음

$$y = -10400x + 24.95$$

$$r^2 = 0.9712$$

활성화에너지 : 86.4656kJ/mol

4) 헤이즐넛 시료

- 아몬드 시료와 동일한 방식으로 결과 값을 구함

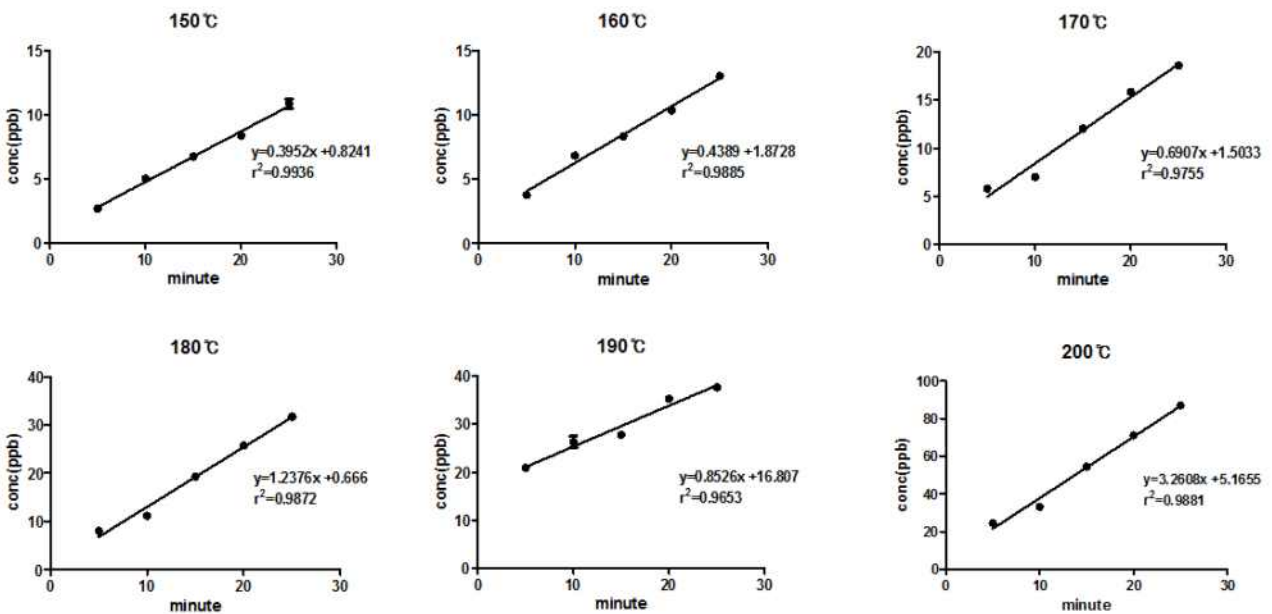


Fig 19. 헤이즐넛의 로스팅 온도와 시간에 따른 퓨란 생성량의 회기분석

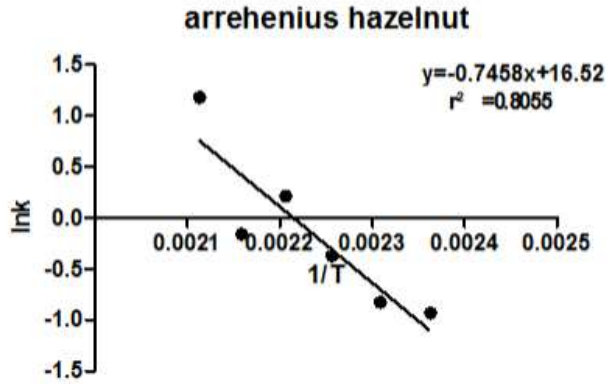


Fig 20. 회기분석을 이용하여 구한 k값을 활용하여 구한 아레니우스 식

℃	T	1/T	k	lnk
150	423.15	0.002363	0.3952	-0.92836
160	433.15	0.002309	0.4389	-0.82348
170	443.15	0.002257	0.6907	-0.37005
180	453.15	0.002207	1.2376	0.213174
190	463.15	0.002159	0.8526	-0.15946
200	473.15	0.002113	3.2608	1.181973

Table 9. 회기분석을 이용하여 구한 결과 값

- 캐슈넛의 경우 회기분석을 통해 구한 기울기 값을 이용하여 아레니우스 식에 적용하여 구한 식은 다음과 같음

$$y = -7458x + 16.52$$

$$r^2 = 0.8055$$

활성화에너지 : 62.00415kJ/mol

5) 사차인치 시료

아몬드 시료와 동일한 방식으로 결과 값을 구함

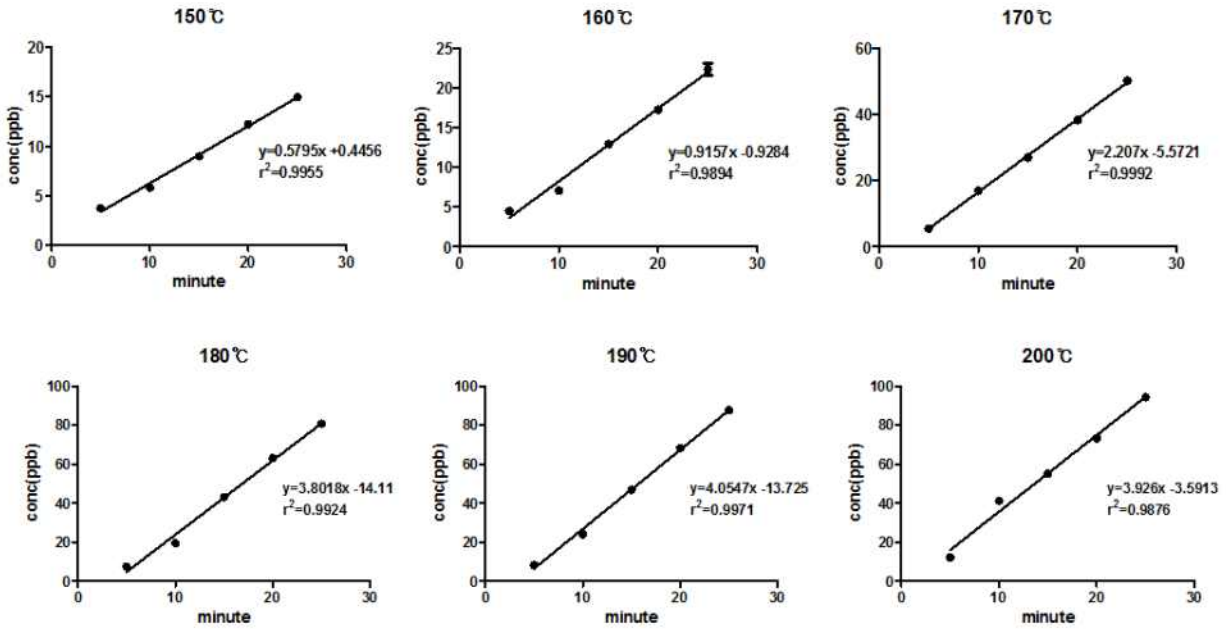


Fig 21. 사차인치치의 로스팅 온도와 시간에 따른 퓨란 생성량의 회기분석

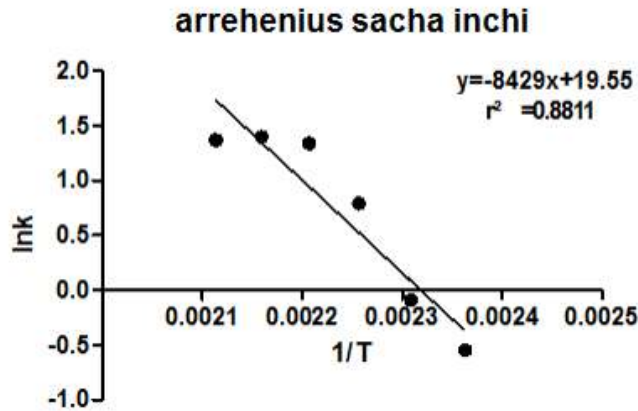


Fig 22. 회기분석을 이용하여 구한 k값을 활용하여 구한 아레니우스 식

°C	T	1/T	k	lnk
150	423.15	0.002363	0.5795	-0.54559
160	433.15	0.002309	0.9157	-0.08807
170	443.15	0.002257	2.207	0.791634
180	453.15	0.002207	3.8018	1.335475
190	463.15	0.002159	4.0547	1.399877
200	473.15	0.002113	3.926	1.367621

Table 10. 회기분석을 이용하여 구한 결과 값

- 사차인치치의 경우 회기분석을 통해 구한 기울기 값을 이용하여 아레니우스 식에 적용하여 구

한 식은 다음과 같음

$$y = -8429x + 19.55$$

$$r^2 = 0.8811$$

활성화에너지 : 70.07871 kJ/mol

- 각각의 결과를 정리하면 다음과 같음

	Ea (kJ/mol)	Arrheniuseq
Almond	125.134	Y= -15050x+33.86
Peanut	93.58238	Y= -12260x+24.99
Caeshew nut	86.4656	Y= -10400x+24.95
Hazelnut	62.00415	Y= -7458x+16.52
Sachainchi	70.07871	Y= -8429x+19.55

Table 11. 아레니우스식과 활성화 에너지

- 5가지 시료 중 아몬드와 피칸의 경우가 활성화 에너지 Ea값이 125.134 kJ/mol로 가장 높음. 이는 아몬드가 온도 조건에 가장 의존도가 높음을 의미함. 헤이즐넛의 경우가 활성화 에너지가 62.00415 kJ/mol로 가장 작은 값으로 온도 조건에 따른 의존도가 가장 낮음을 확인함
- 온도조건 200°C, 시간 조건 10분을 기점으로 아몬드와 땅콩의 경우는 퓨란 생성량이 급격하게 상승하는 것을 확인함. 이는 활성화 에너지 값과 같은 경향임
- kinetic parameter인 활성화 에너지를 이용하면 퓨란 생성 기작의 이해를 도울 수 있음. 퓨란 생성 기작에는 다양한 경로가 존재함. 이 중 한 가지 경로만을 설정하여 분석 시 반응경로를 정확히 예측하기 어려움. 그러나 본 실험에서 구한 kinetic parameter인 활성화 에너지를 통해 퓨란 생성량을 예측할 수 있는 기준으로 사용 가능함

㉓ 안식향산 함유 음료의 벤젠 분석 및 음료 모델시스템을 이용한 벤젠 생성 저감화

- 벤젠은 IARC에서 1급 발암물질로 분류하고 있는 물질로 비타민 C 함유 음료 중 벤젠이 생성되어 사회적으로 문제가 됨에 따라 위해성 검토가 필요함. 이에 음료류에 적합한 벤젠의 분석법을 확립하고 이에 대한 유효성 검증을 진행함. 확립된 분석법을 이용하여 시판중인 음료류 중 벤젠 함유량의 실태조사를 하고, 이를 바탕으로 위해도 평가를 실시하였음

㉔ 음료류 중 벤젠 분석법 확립 및 유효성 검증

- 본 연구에서는 휘발성 유기물질인 벤젠의 추출방법 중 하나인 headspace와 GC-MS를 이용한 휘발성 유기물질 분석법을 기반으로 음료류에서 벤젠을 분석함. Headspace법은 수용액 등에서 존재하는 휘발성 물질을 추출하는데 유용한 방법으로 적은 시료 양과 염색효과를 이용하여 이들 물질의 추출과 농축 효율을 증대시킬 수 있음

- 음료류 중 벤젠의 정확한 정량분석을 위하여 내부표준물질(internal standard)로 d6-벤젠을 선정함. 음료류 중 벤젠의 분석은 SIM 모드를 통해 표적이온을 77, 78, 82, 84 m/z로 하여 진행하였음. 벤젠 정성분석을 위한 이온은 77과 78 m/z를 이용하였고 d6-벤젠 정성분석을 위한 이온은 82와 84 m/z를 이용하였음. 벤젠과 d6-벤젠 정량을 위한 이온 비율은 78과 84 m/z를 이용함

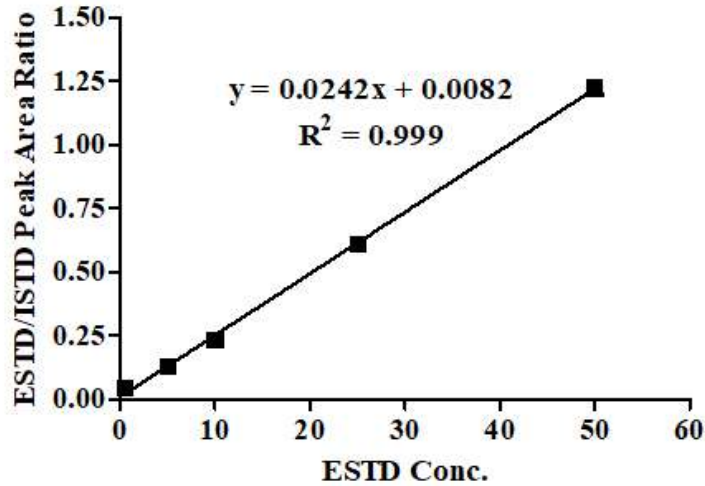


Fig 23. 벤젠 검량 곡선

Linearity		LOD (ppb)	LOQ (ppb)
Equation	Correlation Coefficient (r ²)		
y = 0.0242x + 0.0082	0.9990	0.20	0.61

Table 12. 직선성 확인 및 검출한계, 정량한계

Concentration (ng/mL)	Precision (% RSD)		Recovery (%)
	Intraday	Interday	
5	1.05	0.94	96.6
50	1.27	1.39	91.6
100	0.87	1.66	100.5

Table 13. 정밀도 및 회수율

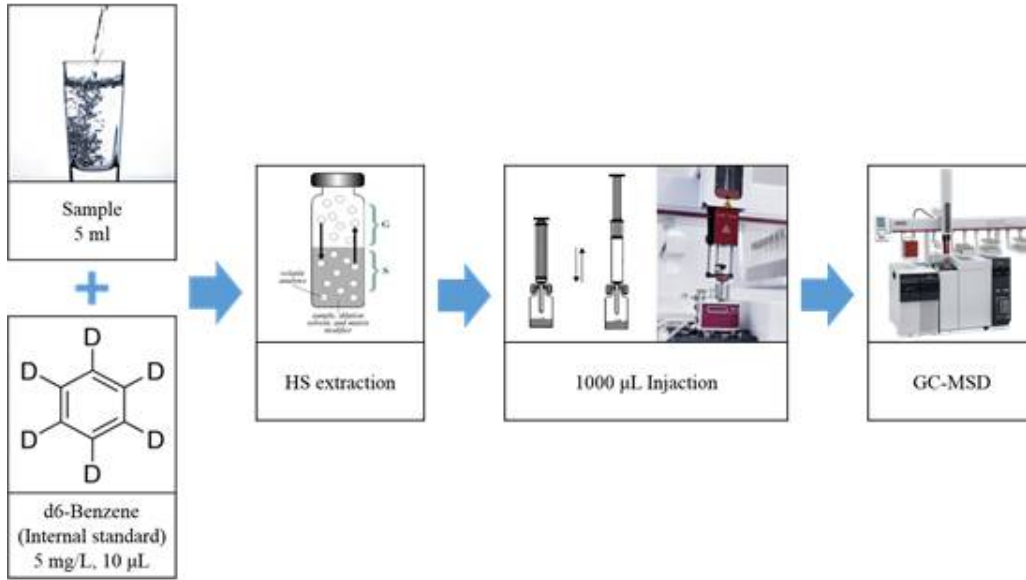


Fig 24. Headspace-GC-MS를 이용한 벤젠의 분석법 예

HS-GC/MS 추출			
Incubation temp.	40 °C	syringe temp.	40 °C
incubation time	30 min	Injection volume	1000 µL
Agitator soeed	250 rpm	Injection speed	200 µL/s
Fill volume	2500 µL	fill speed	200 µL/s

Table 14. 벤젠 추출을 위한 HS-GC/MS 분석 조건

- 컬럼은 내경이 250 µm인 DB-5MS(30m)를 사용하며, 분할비는 40:1으로 조절하고
 오븐온도는 40 °C에서 180 °C까지 단계별로 승온 시키면서 분석함. 벤젠을 추출하기 위해서
 GERSTEL사의 MultiPurpose Sampler (MPS) for GC/MS를 사용 함. GC 기기조건은 다음과 같음

GC-MS					
Column	DB-5MS(30 m * 0.25 mm I.D. * 0.25 μm, film thickness)				
Carrier gas	He at 0.8 mL/min				
Split ratio	1/40				
Injection port temp.	200 °C				
Transferline temp.	230 °C				
Oven temp. program	Initial temp.	Initial time	Rate	Final temp.	Final time
	(°C)	(min)	(°C/min)	(°C)	(min)
	40	5	15	180	0

Fig 15. 벤젠 분석을 위한 GC-MS 기기 조건 예

- 확립된 분석방법의 신뢰성을 검증하기 위해 미국 FDA (Food and Drug Administration) 및 AOAC 에서 제시한 가이드라인 방법에 따라 직선성 (Linearity), 정밀도 [Precision: 일내정밀도 (Intra-day precision), 일간정밀도 (Inter-day precision)], 회수율 (Recovery), 검출한계 (LOD), 정량한계 (LOQ) 등을 확인하여 검증하였음(AOAC International, 2007, Codex Alimentarius, 2003, Food and Drug Administration, 1997)

㊦ 시중에 유통되는 음료류 중 벤젠 분석

- 본 연구에서는 비타민C 및 안식향산나트륨의 배합비에 따른 벤젠의 생성량을 조사하고자, 비타민 음료를 대상으로 분석을 수행함. 시중에 판매중인 비타민 음료 24종 중 4종의 제품에서 LOD이상의 벤젠이 검출됨. 상세 결과는 아래 표와 같음

Sample name	Company	Benzene (ppb)
VB1	A	nd
VB2	A	nd
VB3	B	nd
VB4	B	nd
VB5	B	nd
VB6	C	nd
VB7	C	0.941(±0.016)
VB8	C	3.062(±0.162)
VB9	D	nd
VB10	E	nd
VB11	F	nd
VB12	F	nd
VB13	F	nd
VB14	F	nd
VB15	F	nd
VB16	F	nd

VB17	F	nd
VB18	G	nd
VB19	G	1.705(±0.064)
VB20	G	1.970(±0.148)
VB21	G	nd
VB22	H	nd
VB23	I	nd
VB24	J	nd

Table 16. 시판 비타민 음료의 벤젠 함량 분석 결과

㉠ 음료 모델시스템을 활용한 벤젠 생성량 분석 및 저감화

- 실제 음료 제조 공정에 의거하여 비타민 C와 안식향산나트륨이 반응해 벤젠을 생성하는 조건을 확인하기 위해 비타민 C 및 안식향산나트륨의 농도를 각각의 변수로 하여 다음과 같이 배합비를 설정함

Component	% of total
Ascorbic acid(vitamin C)	0(V1), 0.5(V2), 1.0(V3), 1.5(V4), 2.0(V5), 2.5(V6)
Sodium benzoate	0(B1), 0.01(B2), 0.02(B3), 0.03(B4), 0.04(B5), 0.05(B6)
Liquid fructose	10
Citric acid	0.1
Sodium Citrate	0.1
flavoring agent	0.1
Total	100mL

Table 17. 비타민 C 및 안식향산나트륨 조건별 배합비

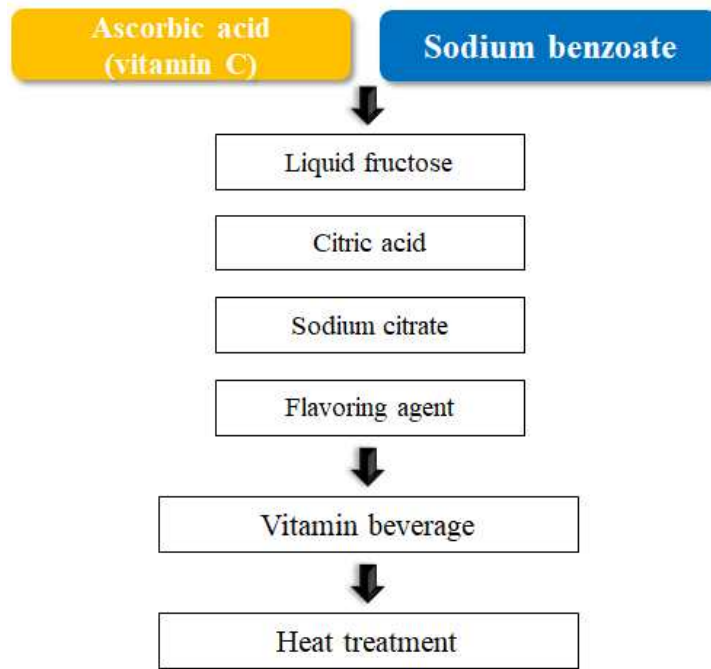


Fig 25. 비타민 음료 제조공정 모식도

- 비타민 C 함량을 1.5%로 고정한 뒤 안식향산나트륨의 농도를 0부터 0.05%까지 0.01%씩 증가하여 첨가한 샘플을 제조한 후 열수 처리를 하지 않은 상태와 50°C, 100°C 에서 열처리한 샘플의 벤젠 함량을 비교하였음. 실험 결과, 100°C 열수처리 샘플에서만 벤젠이 유의적인 차이를 보였으며 안식향산나트륨의 농도가 증가할수록 벤젠 생성량이 증가함

sample	Without-heating Benzene (ppb)	Heating (50°C) Benzene (ppb)	Heating (100°C) Benzene (ppb)
B1 sodium benzoate 0%	1.55 ± 0.09a,b,C	1.37 ± 0.08a,B	0.28 ± 0.00a,A
B2 sodium benzoate 0.01%	1.37 ± 0.12a,A	1.47 ± 0.15a,b,A	2.26 ± 0.07b,B
B3 sodium benzoate 0.02%	1.42 ± 0.19a,b,A	1.52 ± 0.20ba,b,A	3.89 ± 0.03c,B
B4 sodium benzoate 0.03%	1.47 ± 0.20a,b,A	1.73 ± 0.09b,B	5.19 ± 0.02d,C
B5 sodium benzoate 0.04%	1.84 ± 0.35b,c,A	1.72 ± 0.20b,A	6.83 ± 0.08e,B
B6 sodium benzoate 0.05%	2.03 ± 0.34c,A	2.27 ± 0.26c,A	9.18 ± 0.3f,B

Table 18. 안식향산나트륨(sodium benzoate)의 농도에 따른 벤젠 함량 결과 표

- 1) All values are shown as mean ± S.D. (standard deviation) (n=3)
- 2) Different letters indicate significant mean differences according to Duncan's test between each samples (p<0.05)

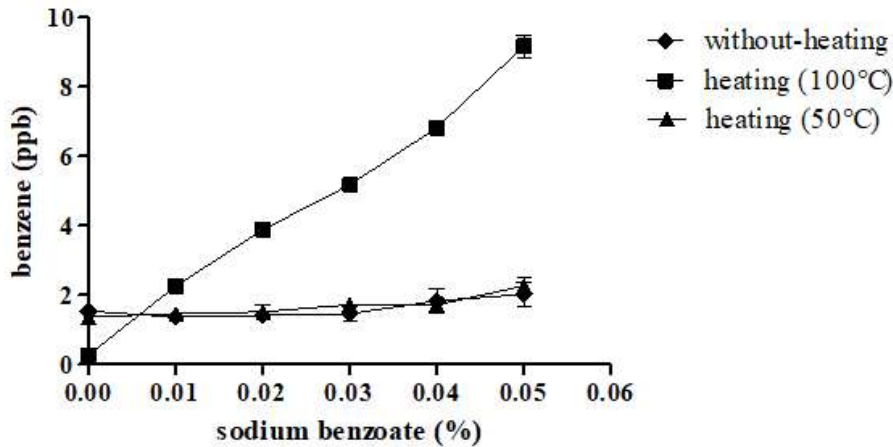


Fig 26. 안식향산나트륨(sodium benzoate)의 농도에 따른 벤젠 함량 결과 그래프

- 안식향산나트륨 함량을 0.03%로 고정한 뒤 비타민 C의 농도를 0부터 5%까지 0.5%씩 증가하여 첨가한 샘플을 제조한 후 열수 처리를 하지 않은 상태와 50°C, 100°C에서 열처리하여 벤젠 함량을 비교하였음. 실험 결과, 비타민 C 함량 0.5% 샘플에서 가장 많은 벤젠이 생성되었으며 이후 농도에서는 비타민 C의 항산화 작용으로 인해 벤젠 함량이 감소함을 확인함. 또한 열수처리 온도조건 100°C 샘플에서 벤젠이 유의적인 차이를 보였음

sample	Without-heating Benzene (ppb)	Heating (50°C) Benzene (ppb)	Heating (100°C) Benzene (ppb)
V1 vitamin C 0%	1.37 ± 0.13a,A	1.45 ± 0.16a,A	1.91 ± 0.10a,B
V2 vitamin C 0.5%	1.62 ± 0.28a,A	2.89 ± 0.58a,B	22.99 ± 0.17e,C
V3 vitamin C 1.0%	1.48 ± 0.35a,A	2.60 ± 0.59a,b,B	11.79 ± 0.13d,C
V4 vitamin C 1.5%	1.51 ± 0.28a,A	1.81 ± 0.28b,c,A	7.15 ± 0.11c,B
V5 vitamin C 2.0%	1.50 ± 0.08a,A	2.47 ± 0.51b,c,A	5.61 ± 0.80b,B
V6 vitamin C 2.5%	1.36 ± 0.02a,A	1.56 ± 0.20c,A	5.1 ± 0.90b,B

Table 19. 비타민 C 농도에 따른 벤젠 함량 결과 표

- 1) All values are shown as mean ± S.D. (standard deviation) (n=3)
- 2) Different letters indicate significant mean differences according to Duncan's test between each samples (p<0.05)

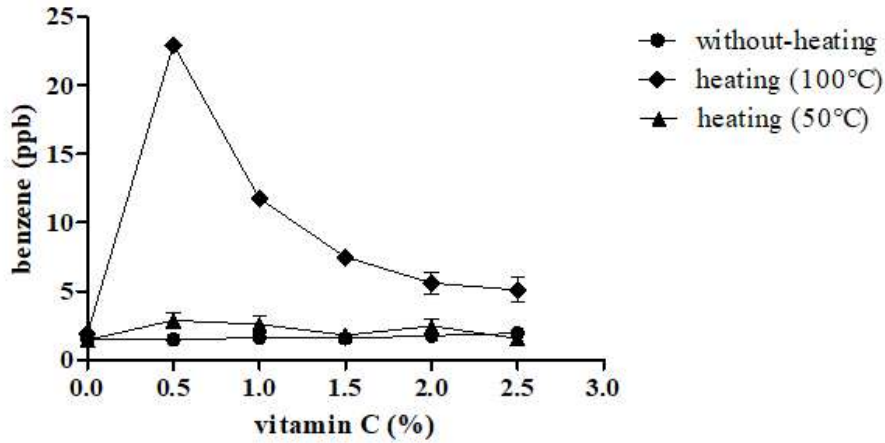


Fig 27. 비타민 C 농도에 따른 벤젠 함량 결과 그래프

- 비타민 C의 농도가 안식향산나트륨의 농도보다 높으면 항산화반응으로 인해 벤젠이 저감화되는 것을 확인함. 안식향산을 함유한 과일 주스의 제조 과정 중 벤젠이 생성될 가능성이 있음. 이에 과일류 음료 4종(블루베리, 크랜베리, 푸룬, 포도)을 선정하여 모니터링을 수행함
- 보관온도 4°C, 25°C, 40°C 에서 10일간 보관 후 벤젠을 분석함. 보존료인 안식향산나트륨을 사용하지 않아도 천연유래 성분으로 인해 벤젠이 생성될 수 있음을 확인함

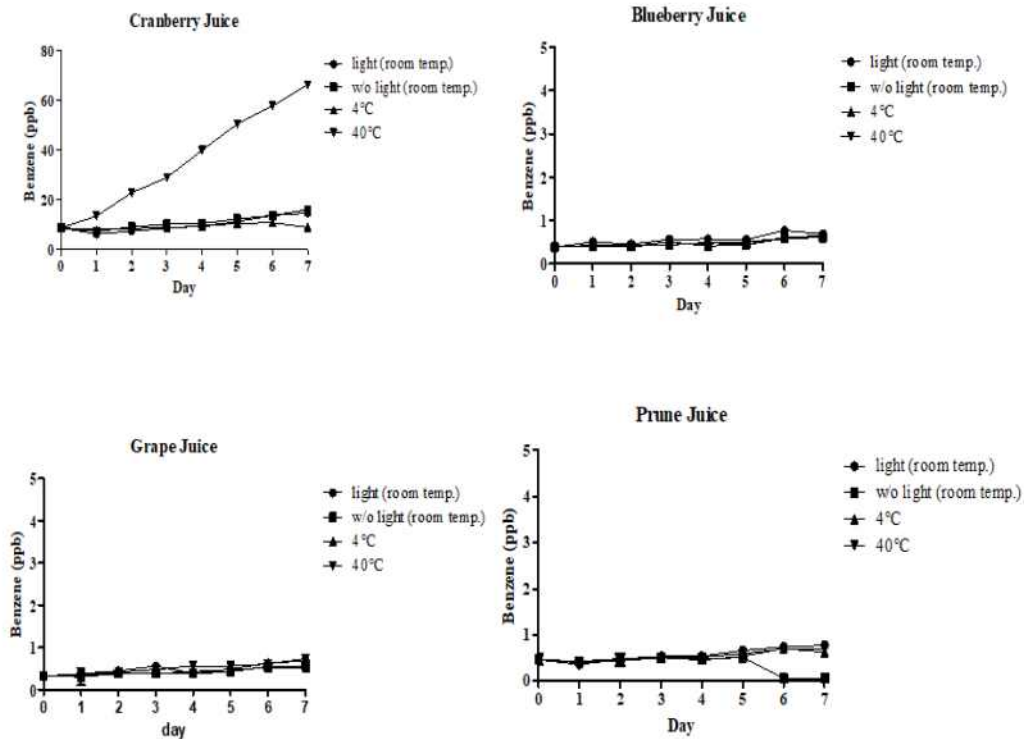


Fig 28. 천연유래 안식향산나트륨 함유 과일주스 4종의 벤젠 분석결과 그래프

- 크랜베리 주스가 벤젠이 가장 높게 검출됨. 이를 저감화 하기 음료모델시스템에 따라서 4종의 항산화제(Catechin, Tannic acid, Gallic acid, Chlorogenic acid)와 4종(Glucose, Fructose, Sucrose, xylose)당류 조건으로 샘플을 제조함

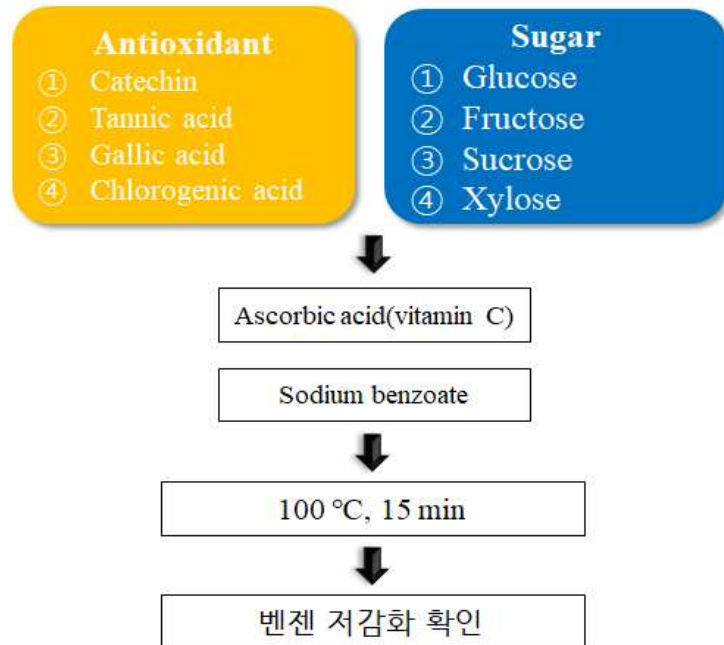


Fig 29. 음료 모델시스템 벤젠 저감화 샘플 제조 방법

- 크랜베리 주스에 항산화제를 첨가하였을 때 벤젠 저감화를 확인하였음. 항산화제 종류별 효과를 비교하면 Gallic acid, Tannic acid, Chlorogenic acid, Catechin 순으로 저감화 효과가 높음. 특히 Catechin 0.5% 첨가했을 시 최대 60%에 가까운 벤젠 저감화율을 보임

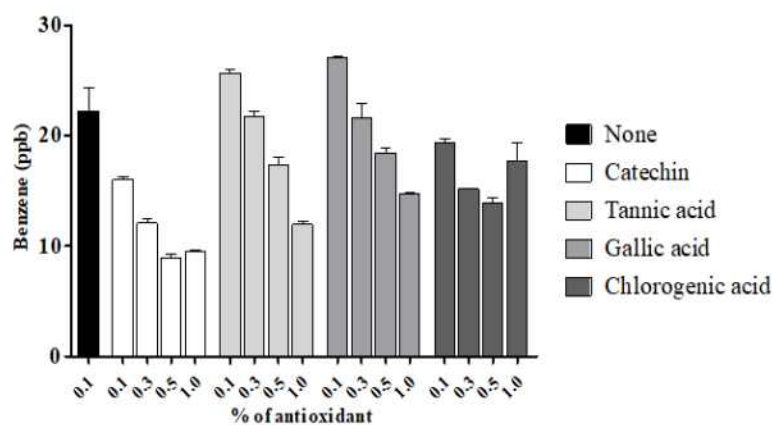


Fig 30. 항산화제 첨가 샘플의 벤젠 함량 결과 그래프

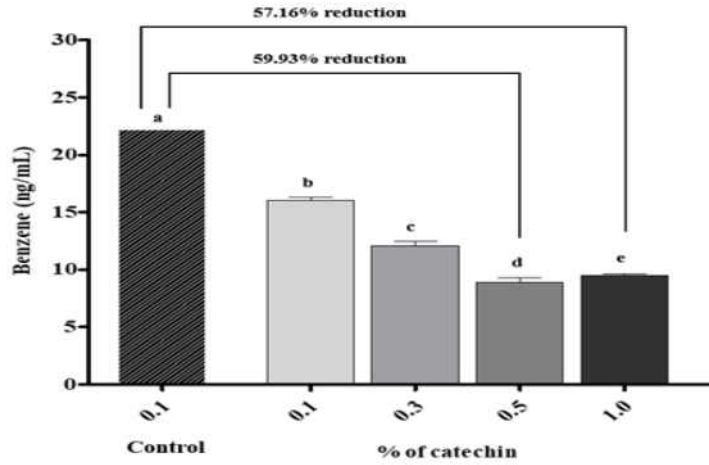


Fig 31. Catechin 첨가 샘플의 벤젠 함량 결과 그래프

- 당 종류에 따른 벤젠 함량 분석결과, Sucrose, Xylose, Fructose, Glucose 순으로 환원당일수록 저감화 효과가 높게 나타남. 이는 당이 환원제로 작용하여, 산화로 발생하는 연쇄적인 벤젠 생성을 차단한 것으로 예상됨

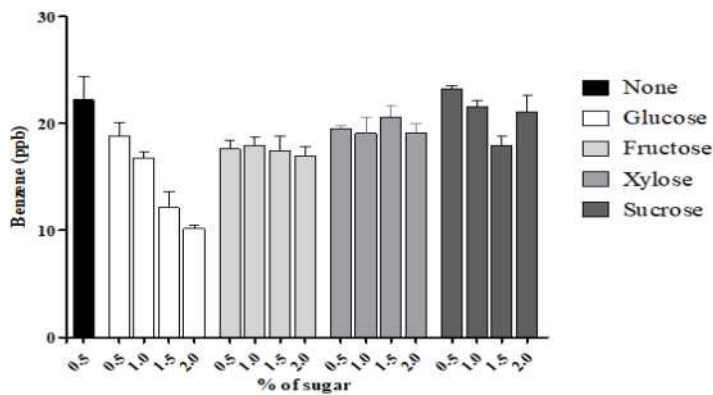


Fig 32. 당 첨가 샘플의 벤젠 함량 결과 그래프

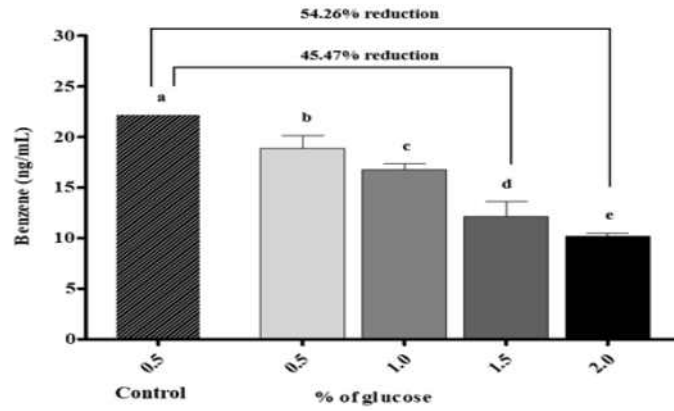


Fig 33. Glucose 첨가 샘플의 벤젠 함량 결과 그래프

- 가장 저감화 효과가 좋았던 항산화제인 Catechin과 당인 Glucose를 선정하여 농도별로 샘플을 제조하여 벤젠 함량을 분석함. 대조군에 비해 크게 저감화되는 것을 확인함

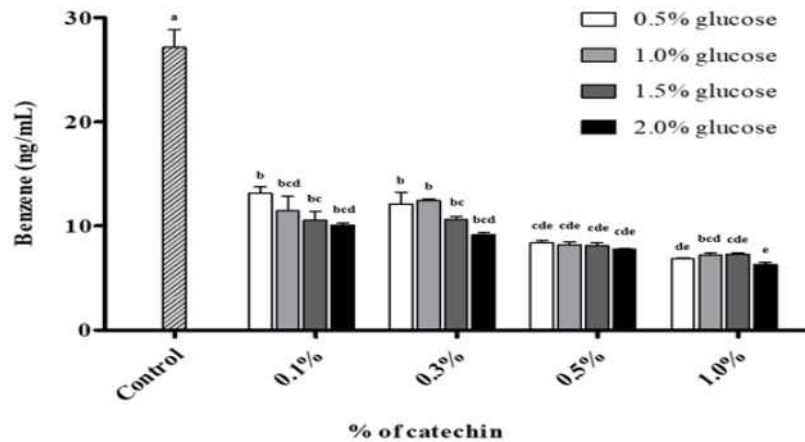


Fig 34. Catechin과 Glucose 농도별 샘플의 벤젠함량 결과

- 가장 효과적인 저감화 방안으로 Catechin 1.0% + Glucose 2.0%와 Catechin 1.0% + Glucose 1.5%를 채택하여 실제 크랜베리 주스에 적용하였음. 생수 300 mL에 크랜베리 60 g을 넣고 15분간 가열한 후 여과하는 방식으로 주스를 제조함

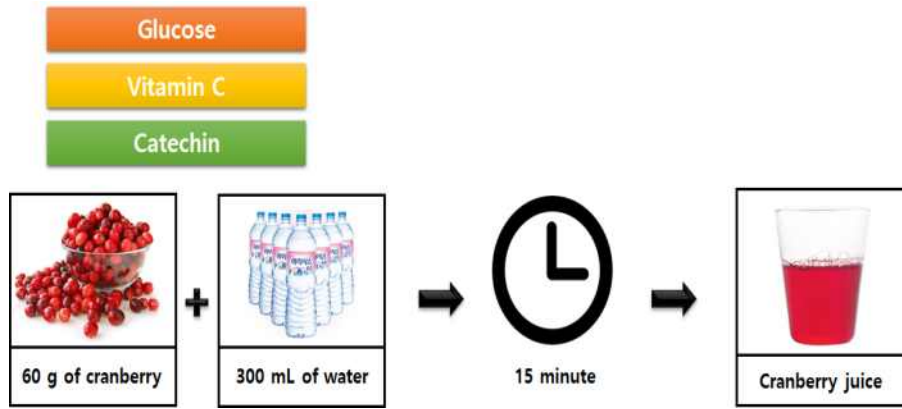


Fig 35. 크랜베리 주스 제조방법

- 4 °C 에서 보관했을 시 10일차까지 벤젠 함량에 유의적인 차이는 보이지 않았음. 그러나 보관 온도가 증가할수록 벤젠 생성량은 25 °C 에서 대조군대비 35.89%, 40 °C 에서 대조군대비 48.86%, 60°C 에서 대조군대비 54.23%까지 저감화 되었음을 확인함

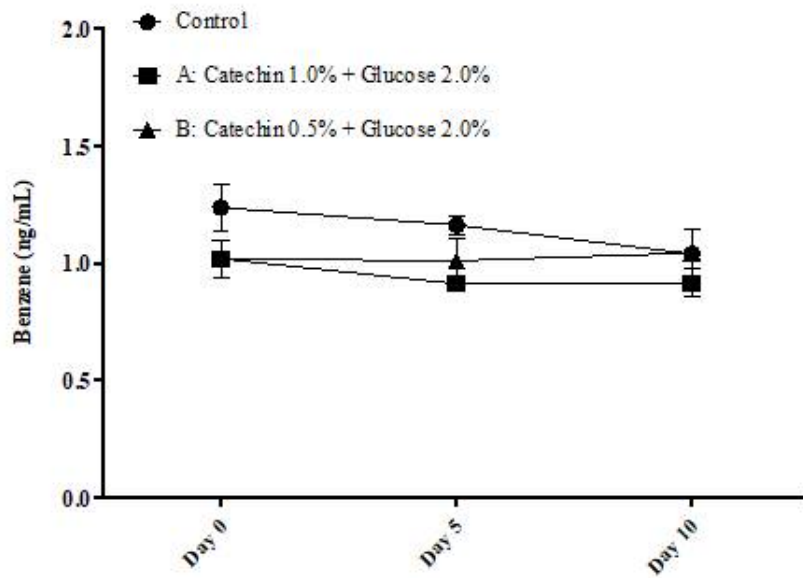


Fig 36. 보관온도 4 °C 에서 크랜베리 주스의 벤젠 함량

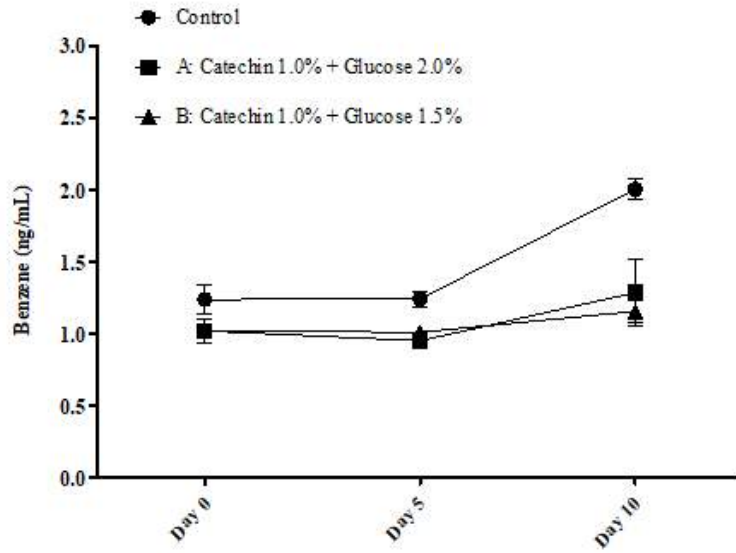


Fig 37. 보관온도 25 °C에서 크랜베리 주스의 벤젠 함량

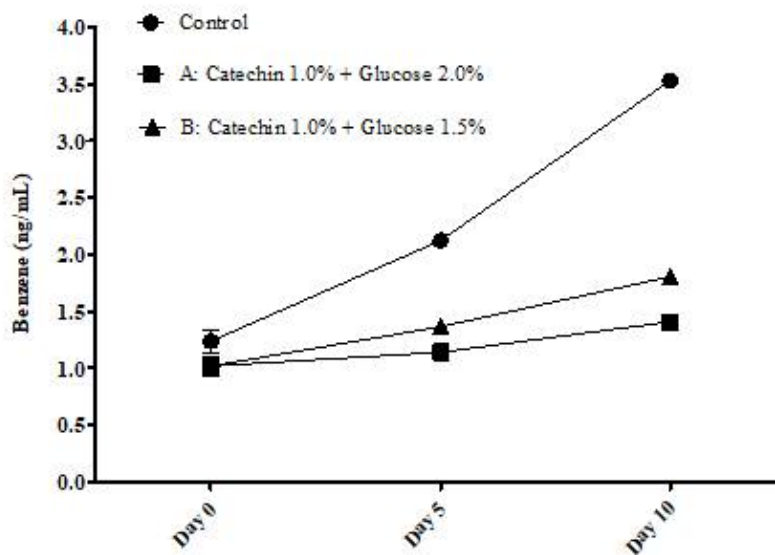


Fig 38. 보관온도 40 °C에서 크랜베리 주스의 벤젠 함량

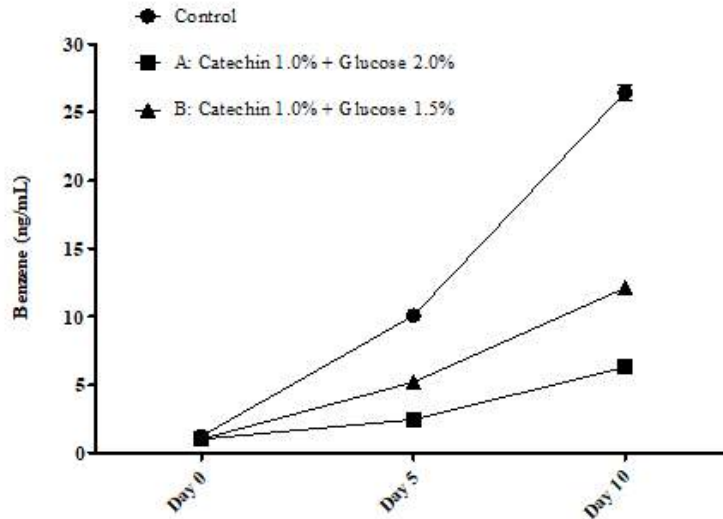


Fig 39. 보관온도 60 °C에서 크랜베리 주스의 벤젠 함량

- 본 연구를 통해 실제 음료 제조 공정을 기반으로 한 음료 식품 모델시스템을 구축하였으며 첨가물과 보관 온도 및 기간을 달리하여 벤젠 저감화 방안을 도출하였음

서울대 상세 내용

㉞ Radio Frequency heating과 UV 조합 처리를 통한 식중독균 제어 및 저감 메커니즘 규명

- RF 가열은 전자기파와 식품의 직접적인 상호작용으로 인한 마찰열을 이용하기 때문에 기존 가열 기술 보다 빠르고 균일한 가열이 가능하다. 특히 열전달이 어려운 분말 식품에서 효과적인 식중독균 제어가 가능하지만 RF 가열 단독 처리 시 높은 온도에 의해서 식품의 품질이 변질될 가능성이 있다. 그러므로 식품의 품질 변화를 일으키지 않는 UV 기술과 조합처리를 통해 처리 시간을 단축할 수 있다면, 식품의 기능성 물질을 잘 보존하면서 안전성이 높은 식품 가공이 가능하다.
- 조제분유에 *Cronobacter sakazakii*를 접종한 뒤 UV와 RF 가열을 조합 처리한 결과, 각 기술의 처리 순서와 상관없이 단독 처리보다 조합 처리에서 미생물 제어에 시너지 효과를 보였다. 특히, 주사전자현미경을 통해 미생물 제어 메커니즘을 확인한 결과 세포막의 파괴를 확인할 수 있었고, 이로 인해 세포 내부 단백질 및 유전물질의 용출되었다. 추가적인 식품 품질 측정 실험에서는 RF-UV 조합 처리로 인한 색도 및 수분함량 변화는 측정되지 않았다. 이러한 연구를 통해서 RF 가열과 UV 조합 처리 시스템을 구축하였고 효과적인 미생물 제어를 적용할 수 있는 기반을 마련하였다.

㉔ RF 가열 장치

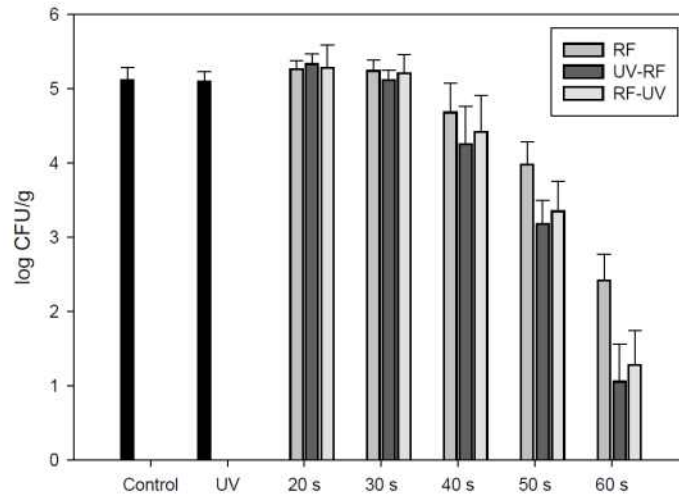


Fig 40. Survival (Log CFU/g) of *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula during RF heating, UV radiation, and combined application of both technologies. The results are means from three experiments, and error bars indicate standard deviations.

- Fig. 40은 RF 가열과 UV 조합처리에서의 *Cronobacter sakazakii* 제어 효과이다. 먼저 UV 단독처리로는 미생물 저감화가 발생하지 않은 것을 확인할 수 있다. RF 가열 단독 처리로 60 초 가열하였을 경우 약 2.5 log reduction이 발생하였고, RF 가열 및 UV 조합 처리로는 같은 처리 시간에서 약 4 log reduction 이상을 달성할 수 있었다. 이를 통해 약 1.5 log reduction 이상의 시너지 효과를 확인할 수 있었다.

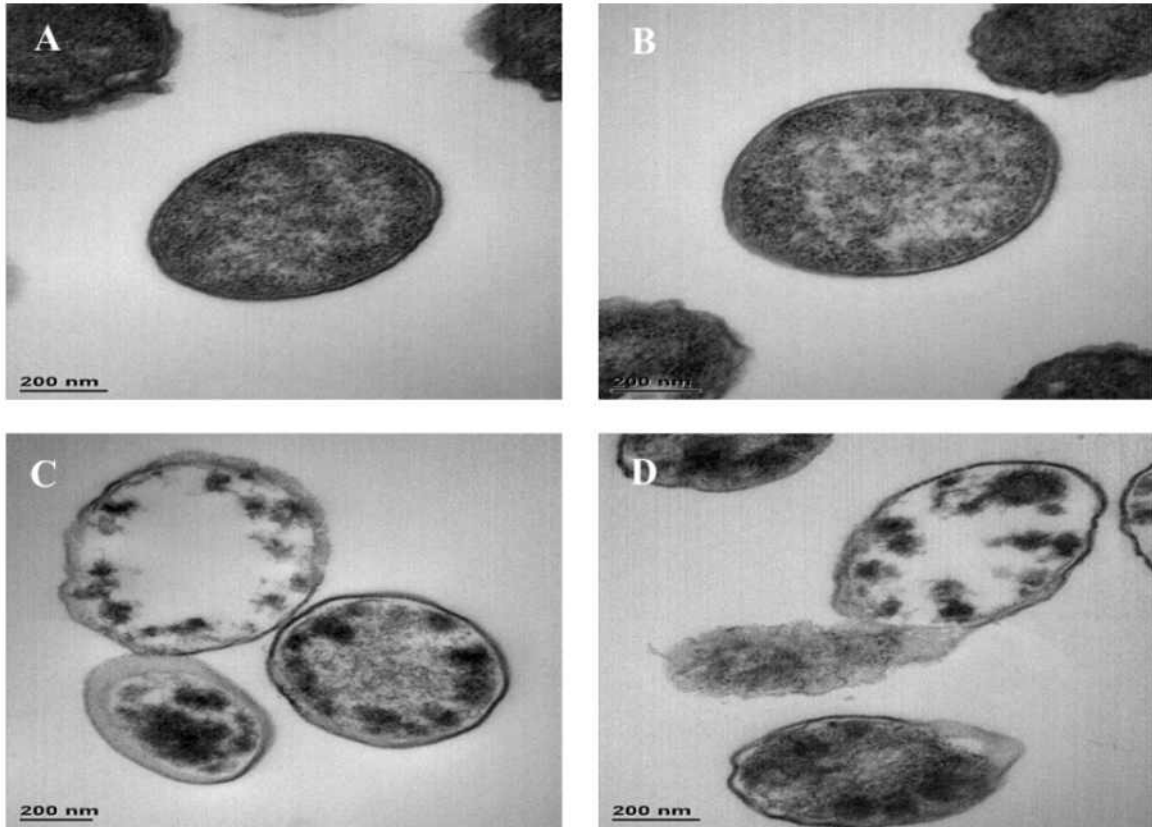


Fig 41. Comparison of damage induced by UV radiation, RF heating, and their combination in *Cronobacter sakazakii* cells, observed by TEM. (A) Control sample; (B) UV-treated sample; (C) RF-treated sample; (D) UV-RF-treated sample.

- Fig 41은 UV 단독처리, RF 단독처리 및 UV-RF 조합 처리 후 세포의 현상을 주사전자현미경으로 살펴본 사진이다. Control(A)과 UV 단독처리(B)는 비교적 온전한 형태의 세포를 관찰할 수 있었고, RF 단독처리(C)에서는 내부에서부터 발생한 열 때문에 세포 안쪽의 파괴를 확인할 수 있었다. UV-RF 조합 처리(D)에서는 세포 내부의 파괴뿐만 아니라 세포막의 파괴로 인해 내부 물질이 용출되는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 조합 처리에서 발생한 미생물 제어의 시너지 효과는 세포막 파괴에 의한 것으로 판단할 수 있었다.

Treatment	Absorbance ^b		PI uptake value ^c
	260 nm	280 nm	
Control	0.052 ± 0.012 a	0.229 ± 0.008 a	0.00 ± 0.00 a
UV	0.048 ± 0.009 a	0.257 ± 0.013 a	0.44 ± 0.09 a
RF	0.128 ± 0.010 b	0.891 ± 0.011 b	13.97 ± 1.22 b
UV-RF	0.262 ± 0.018 c	1.749 ± 0.069 c	29.00 ± 2.15 c

Table 20. Levels of membrane damage of UV, RF, and UV-RF sequentially treated cells obtained from the leakage of intracellular UV-absorbing materials and propidium iodine (PI) uptake test

- Table 20은 RF 단독처리, UV 단독 처리 및 UV-RF 조합 처리 후 발생한 세포막 손상을 정량적으로 측정된 결과이다. 260/280 nm 흡광을 기준으로 UV 단독 처리에서는 세포막 손상으로 인한 내부 물질 용출이 일어나지 않았고 Control과 비교하여 유의적으로 차이가 없었다 ($P > 0.05$). RF 단독처리에서는 약간의 세포막 손상을 통해 세포 내부 물질이 용출되는 것을 확인할 수 있었고 ($P < 0.05$), UV-RF 조합처리에서 각각의 단독처리의 합보다 높은 수준의 흡광이 관찰되었기 때문에 세포막 손상으로 인한 세포 내부 물질의 용출 또한 시너지 효과를 나타냈다. Propidium Iodine 측정을 통해서 UV-RF 조합 처리가 각 처리의 합산보다 더욱 큰 세포막 손상을 유발하였다고 정량적으로 판단할 수 있었다.

Treatment	Color ^b		
	L*	a*	b*
Control	92.99 ± 0.49 a	-4.23 ± 0.33 a	22.13 ± 0.35 a
UV	93.36 ± 0.34 a	-4.29 ± 0.10 a	22.21 ± 0.31 a
RF	93.45 ± 0.38 a	-4.36 ± 0.13 a	22.01 ± 0.54 a
UV-RF	93.22 ± 0.62 a	-4.22 ± 0.23 a	21.94 ± 0.32 a

Table 21. Color values of UV, RF, and UV-RF sequentially treated infant formula powder

Treatment	Moisture content (%, db) ^b	Reactive sulfhydryl ($\mu\text{mol/L}$)
Control	1.82 \pm 0.28 a	38.36 \pm 5.29 a
UV	1.91 \pm 0.13 a	39.69 \pm 5.19 a
RF	1.80 \pm 0.26 a	37.88 \pm 4.09 a
UV-RF	1.78 \pm 0.21 a	35.57 \pm 4.73 a

Table 22. Moisture content and sulfhydryl activity of powdered infant formula following RF, UV, and UV-RF combined treatment

- Table 21은 각 처리 후 조제분유의 색도를 측정된 결과이다. 모든 처리에서 Control과 유의적으로 차이를 보이지 않았다 ($P > 0.05$). Table 22는 수분함량과 조제분유의 β -lactoglobulin과 κ -casein의 활성을 측정할 수 있는 sulfhydryl activity를 측정된 결과이다. 모든 처리에서 control과 유의적인 차이를 보이지 않아 ($P > 0.05$), UV-RF 조합 처리는 미생물을 효과적으로 제어하면서도 조제분유의 품질을 유지할 수 있었다.

㉔ Superheated steam과 Lactic acid 조합 처리를 통한 식중독균 제어 및 저감 메커니즘 규명

- Superheated steam (SHS)은 기존 steam에 추가적인 열을 주어 포화 증기보다 높은 온도를 가진 steam을 의미한다. 그러므로 기존 saturated steam보다 높은 열전달이 가능하여 식품 표면, 식품과 접촉하는 기구 표면에서 효과적인 미생물 제어 효과를 기대할 수 있다. 하지만 처리 온도가 높아질수록 식품 표면의 품질 손상을 야기하기 때문에 lactic acid와 SHS의 조합 처리를 통해 보다 mild한 조건에서 효과적인 미생물 제어연구가 필요하다.
- 표면이 거친 멜론 surface에 병원성 미생물 *E. coli* O157:H7를 접종하여 saturated steam 또는 SHS와 lactic acid의 조합처리를 진행한 결과, saturated steam (100°C)에서는 lactic acid 조합처리의 추가적인 효과는 발견되지 않았다. 반면 150°C, 200°C SHS와 lactic acid 조합처리에서는 SHS 단독처리보다 약 0.5~1 log reduction의 추가적인 미생물 제어 효과를 확인할 수 있었다. 또한 간편한 조합 처리를 위해 lactic acid 처리 방법을 immerse에서 spray로 바꾸었을 때 두 처리 방법에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 일주일간 저장 중 식품의 색도 및 텍스처 변화가 없는 것을 확인하였다. 이를 통해 SHS와 lactic acid 조합처리는 짧은 처리 시간에도 효과적인 미생물 제어 효과를 보였으며 식품의 품질변화를 일으키기 않는 것으로 판단할 수 있었다.

라) SHS 가열 장치

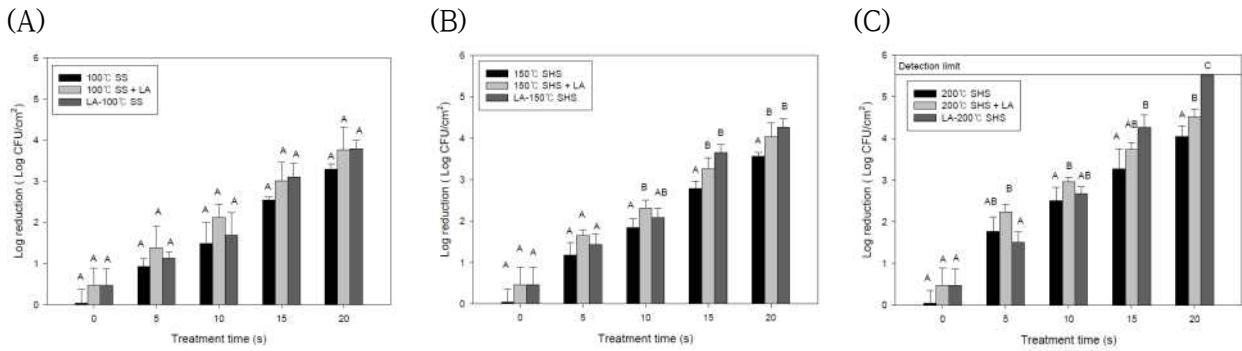


Fig 42. Log reduction (Log CFU/cm²) of *E. coli* O157:H7 on cantaloupes treated with combination of lactic acid (2%) and (A) 100°C (SS), (B) 150°C (SHS), or (C) 200°C (SHS). The error bars indicate standard deviation calculated from triplicates.

- Fig 42는 멜론 표면에 saturated steam (100°C)과 SHS (150°C, 200°C)와 lactic acid 조합처리의 살균력을 나타낸 그림이다. Saturated steam은 lactic acid와의 조합 처리에서 유의적인 차이를 보이지 않아 조합처리의 장점을 살리지 못했다. 반면 SHS에서는 lactic acid와 조합처리에서 약 0.5~1 log의 추가적인 저감화 효과를 보여 20초 조합처리에서 4 log reduction을 달성할 수 있었다.

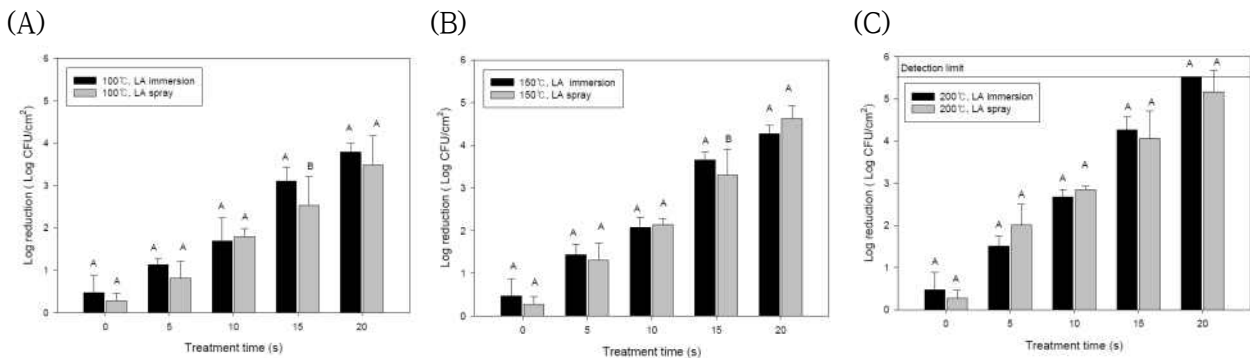


Fig 43. Log reduction (Log CFU/cm²) of *E. coli* O157:H7 on cantaloupes treated with combination of lactic acid (2%) and saturated steam (SS) or superheated steam (SHS). The error bars indicate standard deviation calculated from triplicates.

- Fig 43은 lactic acid 처리 방법에 따른 saturated steam 또는 SHS 조합처리의 미생물 저감화 정도를 비교한 결과이다. Lactic acid immerse 및 spray와 saturated steam과 SHS 조합 처리에서 모두 유의적인 차이를 보이지 않았다. SHS/lactic acid 조합처리는 immerse 방법의 batch type 시스템뿐만 아니라 spraying 방법의 continuous type 시스템으로 처리하여도 효과적인 미생물 제어 효과를 보이기 때문에 산업으로의 적용 가능성이 매우 높다고 판단할 수 있다.

(A)

Treatment	Storage time (days) at 4°C		
	0	3	7
Control	65.24±2.11Aa	64.82±1.37Aa	63.95±1.56Aa
DW immersion	65.49±1.73Aa	64.15±1.21Aa	64.62±1.16Aa
LA immersion	63.74±3.44Aa	64.41±1.21Aa	63.61±2.64Aa
LA spray	65.05±2.02Aa	64.02±1.55Aa	63.45±1.51Aa
DW-100°C, 30 sec	65.42±3.84Aa	64.05±1.49Aa	64.16±2.43Aa
LA immersion-100°C, 30 sec	62.15±0.98Aa	64.52±1.03Aa	63.35±1.61Aa
LA spray-100°C, 30 sec	64.13±1.24Aa	64.19±2.20Aa	63.77±1.41Aa
DW-150°C, 30 sec	65.58±2.16Aa	65.08±0.72Aa	64.53±2.00Aa
LA immersion-150°C, 30 sec	63.89±1.71Aa	64.95±2.05Aa	63.88±1.45Aa
LA spray-150°C, 30 sec	64.34±0.69Aa	64.12±2.42Aa	63.48±2.12Aa
DW-200°C, 30 sec	65.04±1.67Aa	64.30±0.89Aa	64.73±1.33Aa
LA immersion-200°C, 30 sec	63.32±0.17Aa	64.23±1.21Aa	63.49±1.80Aa
LA spray-200°C, 30 sec	64.09±0.99Aa	64.78±0.44Aa	63.97±0.48Aa

(B)

Treatment	Storage time (days) at 4°C		
	0	3	7
Control	-0.24±0.66Aa	-0.35±0.92Aa	-0.38±0.56Aa
DW immersion	0.07±0.75Aa	-0.27±0.39Aa	-0.29±0.43Aa
LA immersion	-0.12±0.51Aa	-0.35±0.86Aa	-0.24±0.47Aa
LA spray	-0.65±0.51Aa	-0.53±1.33Aa	-0.24±0.54Aa
DW-100°C, 30 sec	-0.60±1.80Aa	-0.17±1.42Aa	-0.43±0.32Aa
LA immersion-100°C, 30 sec	-0.19±0.57Aa	-0.04±0.63Aa	-0.36±0.33Aa
LA spray-100°C, 30 sec	-0.34±0.62Aa	-0.36±1.27Aa	-0.46±0.81Aa
DW-150°C, 30 sec	-0.15±0.88Aa	-0.10±1.20Aa	-0.14±0.89Aa
LA immersion-150°C, 30 sec	-0.14±0.10Aa	-0.27±1.14Aa	-0.17±0.73Aa
LA spray-150°C, 30 sec	-0.77±0.79Aa	-0.46±1.02Aa	-0.28±0.51Aa
DW-200°C, 30 sec	0.04±0.63Aa	-0.64±0.56Aa	-0.33±0.68Aa
LA immersion-200°C, 30 sec	0.02±0.41Aa	-0.12±1.15Aa	-0.27±0.36Aa
LA spray-200°C, 30 sec	-0.58±1.58Aa	-0.16±0.72Aa	-0.20±0.59Aa

(C)

Treatment	Storage time (days) at 4°C		
	0	3	7
Control	21.55±1.12Aa	21.60±1.24Aa	22.11±1.08Aa
DW immersion	22.40±1.35Aa	21.43±0.94Aa	22.36±1.42Aa
LA immersion	21.99±1.86Aa	22.12±1.18Aa	21.42±1.15Aa
LA spray	21.19±1.44Aa	21.43±1.39Aa	21.53±0.93Aa
DW-100°C, 30 sec	21.42±0.68Aa	22.50±1.46Aa	21.42±0.68Aa
LA immersion-100°C, 30 sec	20.65±0.39Aa	21.65±0.69Aa	21.33±1.23Aa
LA spray-100°C, 30 sec	21.16±0.71Aa	21.94±1.52Aa	21.32±0.78Aa
DW-150°C, 30 sec	21.38±1.02Aa	21.59±1.31Aa	21.38±1.02Aa
LA immersion-150°C, 30 sec	21.46±1.19Aa	21.88±0.61Aa	21.29±0.91Aa
LA spray-150°C, 30 sec	21.44±1.03Aa	21.83±1.53Aa	21.96±0.83Aa
DW-200°C, 30 sec	22.75±2.15Aa	22.55±0.86Aa	22.75±2.15Aa
LA immersion-200°C, 30 sec	21.92±0.39Aa	22.07±2.64Aa	21.09±1.33Aa
LA spray-200°C, 30 sec	21.16±1.86Aa	21.93±1.74Aa	21.31±1.17Aa

(D)

Treatment	Storage time (days) at 4°C		
	0	3	7
Control	211.59±18.54Aa	212.01±10.01Aa	213.82±
DW immersion	213.08±12.46Aa	213.07±8.19Aa	214.50±
LA immersion	214.51±11.92Aa	213.12±5.36Aa	216.08±
LA spray	217.02±19.30Aa	215.03±15.23Aa	212.32±
DW-100°C, 30 sec	216.76±18.35Aa	212.26±12.43Aa	214.28±
LA immersion-100°C, 30 sec	214.85±22.11Aa	210.07±7.10Aa	211.20±
LA spray-100°C, 30 sec	213.25±20.83Aa	215.17±13.87Aa	215.32±
DW-150°C, 30 sec	212.15±16.33Aa	217.81±15.22Aa	212.47±
LA immersion-150°C, 30 sec	217.24±21.84Aa	216.52±10.59Aa	212.32±
LA spray-150°C, 30 sec	217.05±21.83Aa	215.48±15.77Aa	212.99±
DW-200°C, 30 sec	209.46±20.25Aa	216.00±16.94Aa	215.13±
LA immersion-200°C, 30 sec	215.07±19.02Aa	217.56±15.12Aa	216.52±
LA spray-200°C, 30 sec	210.76±16.50Aa	214.65±16.16Aa	214.85±

Table 23. Change of color value and texture of cantaloup treated with combination of LA and steam for 20 sec during storage. - (A) Color L* value, (B) Color a* value, (C) Color b* value, and (D) texture value.

- Table 22은 lactic acid/steam 조합처리 후 일주일 저장 중 멜론의 품질변화를 정량적으로 측정한 결과이다. 모든 처리 군에서 멜론의 색도 및 텍스처에 변화가 없었다 (P > 0.05). 그러므로 SHS/lactic acid 조합처리는 효과적으로 미생물을 제어하면서도 식품의 품질변화에 영향을 주지 않는 기술로 판단된다.
- 앞선 두 신규 가열 기술을 통해 기존의 방법으로 제어하기 힘든 분말 식품 및 거친 표면에서의 병원성 미생물을 효과적으로 제어할 수 있었다. 특히 자외선, 유기산의 조합처리를 통해 식품의 품질을 유지하면서도 mild한 조건에서 병원성 식중독 균을 제어함으로써 식품에서의 안전성을 확보하기 위한 다방면의 연구를 진행하여 산업에서의 적용을 위한 구체적인 조건을 확립하였다.

㉔ 3차년도 요약

- 2-1 협동: 식품 내 생물학적, 화학적 위해인자 저감화 기술 현장적용 및 산업화 동국대 세부 연구목표: 식품모델시스템을 활용한 식품의 가공, 저장 중 유해물질 저감화

㉕ 식품모델시스템(라면류)을 활용한 조리 및 가공 공정 중 푸란 저감화

- 인스턴트 라면 중 푸란 분석법 확립 및 유효성을 검증함.
- 라면 모델시스템에서의 푸란 생성량을 분석 및 저감화 연구를 진행함.

㉖ 잠재적 위해요소 함유 식품(후추, 고춧가루, 김)의 조리 및 가공 공정 중 생성 유해물질(푸란, 바이오제닉아민) 분석

- 유해물질 별 분석법 확립 및 유효성을 검증함.

- 후추의 조리 및 가공 공정 중 바이오제닉 아민 함량 분석 연구를 진행함.
- 김 열처리시스템모델에서의 Kinetics 연구를 수행함.
- 고춧가루 열처리시스템모델에서의 Kinetics 연구를 수행함.

㉔ **식품첨가물을 활용한 캐러멜 색소 개발을 통한 유해물질(4-MI) 저감화**

- 4-Methylimidazole (4-MI) 분석법 확립 및 유효성을 검증함.
- 4종의 무기염 및 2종의 유기산을 첨가한 제 III형 캐러멜색소 모델시스템을 개발함.
- 제 III형 캐러멜색소 모델시스템에서의 색소 안정성 분석을 진행함.

서울대 세부 연구목표: 시뮬레이션 예측 모델 개발을 통한 신기술의 산업화 적용 기반 확립

㉕ **Ohmic heating, RF, SHS 시뮬레이션 예측 모델 개발**

- 신규 가열 시스템에 적용하는 chamber의 도면 구성 및 주요 factor 도출하였음
- Governing equation을 통해 boundary condition을 결정함
- 각 chamber의 도면을 mesh로 세분화하여 미분방정식의 최적 solution을 구할 수 있도록 최적화를 진행함
- 온도 상승 예측값과 실제 측정값을 비교하여 정합성을 평가함
- 각 시스템별 병원성 미생물 사멸 예측 패턴과 실제 정량적 미생물 제어 효과를 비교하여 시뮬레이션 예측 모델의 정확도를 검증함

㉖ **3차년도 상세 내용**

• 2-1 협동

동국대 상세 내용

㉗ **식품모델시스템(라면류)을 활용한 조리 및 가공 공정 중 퓨란 저감화**

- 라면은 국내 다소비 식품 중 하나로 2018년 기준 전체 매출액 2조 475억원 규모의 시장을 형성하고 있음.
- 1인당 연간 라면 소비량은 2017년 73.7개, 2018년 74.6개로 베트남 53.5개에 비해 높은 수준을 보이고 있으나 라면에 대한 소비자의 인식은 여전히 부정적이며 벤조피렌 등과 같은 발암물질에 대한 이슈가 사회적으로 문제가 됨에 따라 지속적인 라면의 위해성 검토가 필요함.
- 퓨란은 식품의 열처리 과정에서 탄수화물 또는 아미노산의 열 변성 및 지질의 가열에 의해 생성되는 유해물질임. 라면의 유당 면은 탄수화물을 주원료로 하여 열처리 과정을 거쳐 제조되고, 스프 역시 다양한 원재료가 혼합되어 열처리 과정을 통해 가공되기 때문에 제조 과정 중 퓨란 생성의 가능성이 있음. 이에 본 연구에서는 라면의 퓨란 분석법을 확립하고 이에 대한 유효성 검증을 진행함. 확립된 분석법을 이용하여 시판 라면의 유형별, 조리법별 퓨란 함유량의 실태를 조사하였음.

1) 라면 중 퓨란 분석법 확립 및 유효성 검증

A. 퓨란 분석법 확립

- 본 연구에서는 휘발성 유기물질인 퓨란의 추출방법 중 하나인 SPME와 GC-MS를 이용한 휘발성 유기물질 분석법을 기반으로 고체 식품에서 퓨란을 분석함.

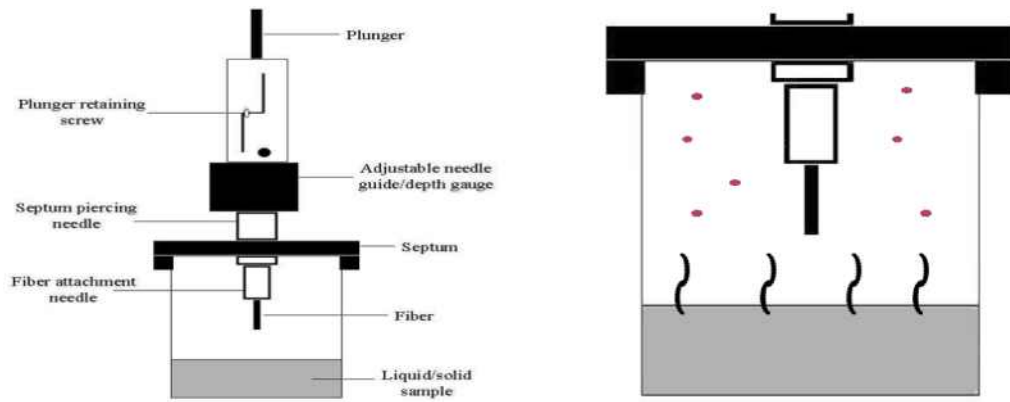


Fig 44. SPME 장치의 모식도

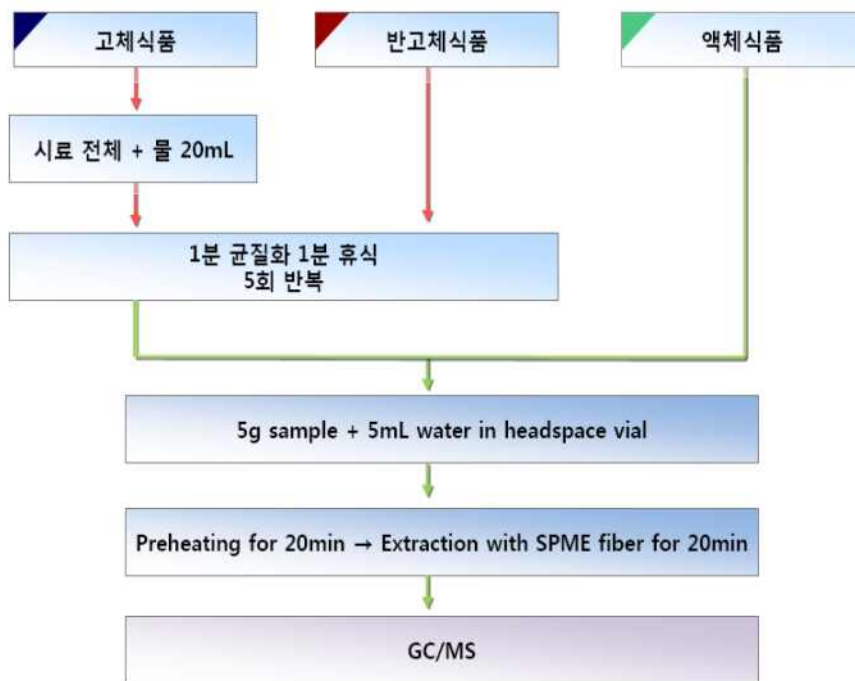


Fig 45. 퓨란 분석 단계

- 퓨란의 정확한 정량분석을 위하여 내부표준물질(internal standard)로 d4-퓨란을 선정함.
- 퓨란의 분석은 SIM 모드를 통해 표적이온을 39, 42, 68, 72m/z로 하여 진행하였음. 퓨란 정성 분석을 위한 이온은 39와 42 m/z를 이용하였고 d4-퓨란 정성분석을 위한 이온은 68과 72 m/z를 이용하였음. 퓨란과 d4-퓨란 정량을 위한 이온 비율은 39와 68 m/z를 이용함.
- 분석용 컬럼은 HP Plot-Q (15 m, 0.32 mm I.D. 20 μ m film)을 사용하였고, SPME fiber는 Supelco사의 Carboxen/Poludimethylsiloxane (CAR/PDMS)를 사용함. 균질기는 독일 IKAR-WERKE 사의 ULTRA-TURRAXR T25basic 모델을 사용하며, vial은 미국 Aglient 사의 20 mL headspace vial을 사용함. GC 기기 조건은 다음과 같음.

SPME	
SPME fiber	75 μ m Carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS)
GC	
Instrument	Agilent Technologies 7820A
Carrier gas	1.5 mL/min Helium (constant flow)
Column	HP-PLOT Q (15 m x 0.32 mm, 20 μ m film, J & W Scientific, Folsom, CA)
Inlet temperature	250 $^{\circ}$ C
Purge flow rate	50 mL/min for 1 min
Oven temperature Gradient	50 $^{\circ}$ C for 5 min, 25 $^{\circ}$ C/min to 230 $^{\circ}$ C held for 2 min
Injection mode	Splitless mode
MS	
Instrument	Agilent Technologies 5977E
Fragmentation Mode	Electron impact at 70eV
SIM	m/z 39, 68, 42, 72

Table 24. 퓨란 분석 기기 조건

B. 유효성 검증

- 확립된 분석방법의 신뢰성을 검증하기 위해 미국 FDA (Food and Drug Administration) 및 AOAC 에서 제시한 가이드라인 방법에 따라 직선성(Linearity), 정밀도[Precision: 일내정밀도 (Inter-day precision), 일간정밀도(Intra-day precision)], 회수율(Recovery), 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ) 등을 확인하여 검증함(AOAC International, 2007, Codex Alimentarius, 2003, Food and Drug Administration, 1997).

a) 직선성(Linearity)

- 직선성이란 일정한 범위 내에 있는 시료 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻을 수 있는 능력으로서 데이터를 간단히 그래프로 나타내면 Response와 농도의 관계에 대한 특징을 쉽게 알아볼 수 있음. 장비의 Response와 농도의 관계식을 직선모델 $y=ax+b$ 로 만들 때, 고전적인 최소 제곱 회귀법이 사용됨. 검량곡선의 상관계수(R^2)를 구하여 직선성을 확인함.

b) 검량곡선 작성(Calibration Curve)

- 검량곡선에서 얻어진 표준물질과 내부표준물질의 정량이온 피크에 대한 면적비(표준물질/내부표준물질)를 구하여 Y축으로 하고 표준물질의 농도를 X축으로 하여 검량곡선을 작성하여 정량함.

c) 정밀도(Precision)

- 일내정밀도(Intra-day precision; repeatability)
: 동일한 조건하에 하루 동안 반복적인 작업 시행하여 일내정밀도를 구함.

- 일간정밀도(Inter-day precision; intermediate precision)
: 동일한 조건하에 동일한 장비를 사용하여 실험날짜를 달리하여 시행하여 일간정밀도를 구함.

- 각 표준물질의 농도를 최소 3개 포인트, 최소 5회 반복 측정하여 precision을 구함.
- 각 농도의 coefficient of variation (CV)가 15%를 초과하지 않아야 함.

d) 회수율(Recovery)

- Blank sample 또는 시료에 표준물질을 첨가하여 분석. 그 결과 값의 회수율을 구함.

$$\text{회수율(Total Recovery, \%)} = (A-B)/C \times 100$$

A: 공시료(또는 시료)에 표준물질을 첨가한 후 농도

B: 공시료(또는 시료) 용액의 농도

C : 첨가한 표준물질의 농도

e) 정확도(Accuracy)

- 매질 인증표준물질(Certified reference material, CRM)을 Food and Environment Research Agency (FAPAS, UK) 등에서 구입하여 분석 후 측정된 농도를 인증 값으로 나눈 비율로 분석회수율을 계산함.

- 최소 3-10번 반복 결과의 % error 값을 사용함.

- CRM이 없는 경우, 표준품을 3농도 level로 spiking 하여 회수율을 계산함.

⑥ 검출한계(Limit of Detection, LOD), 정량한계(Limit of Quantification, LOQ) 확인

- 검출한계(Limit of Detection, LOD)

: LOD는 기기 상 peak로 인정할 수 있는 한계를 의미함.

: 분석 크로마토그램 상에서 signal to noise (S/N)의 3배 이하의 값으로 계산함.

- 정성한계(Limit of Quantification, LOQ)

: LOQ는 기기 상으로 신뢰성 있게 정량할 수 있는 한계를 의미함.

: 각 표준물질을 최소농도로 5-10회 반복 측정하여 구함.

: LOQ는 S/N의 10배 이하의 값으로 계산함.

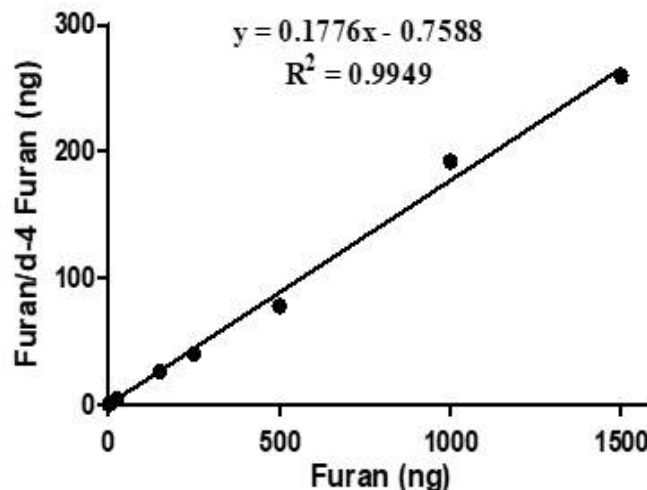


Fig 46. 퓨란 검량 곡선

- 위의 Fig 46와 같이 7가지 농도 조건을 이용하여 검량곡선을 작성함. 퓨란 (표준물질) d-4 퓨란 (내부표준물질)의 정량이온의 면적값에 대한 면적비를 y축으로 설정하고 표준물질인 퓨란의 농도를 x축으로 설정하여 검량곡선을 작성함. 최소 제곱회귀분석법으로 최종적인 구한 검량곡선식은 아래와 같음.

$$y = 0.1776x - 0.7588$$

$$r^2=0.9949$$

- 정밀도와 회수율을 구하고자 표준물질을 3가지 농도(1, 50, 100 ng/mL)에서 5반복으로 실험하였음. 그 결과는 아래 Table 26와 같음.

Equation	Linearity		LOD	LOQ
	Correlation Coefficient (r ²)		(ppb)	(ppb)
y = 0.1776x - 0.7588	0.9949		0.13	0.39

Table 25. 직선성 확인 및 검출한계, 정량한계

Concentration (ng/mL)	Precision (% RSD)		Recovery (%)
	Intraday	Interday	
1	4.26	2.28	101.82
50	1.06	1.24	103.03
100	0.72	0.67	95.30

Table 26. 정밀도 및 회수율

2) 결과 분석

A. 인스턴트 라면 선정 및 실험 샘플 분류

- 본 연구에서는 국내 인스턴트 라면의 유형별 퓨란 함량을 조사하고자 최근 5년간 매출 순위를 토대로 매출 상위 제품 30종(봉지라면 15종, 용기라면 15종)을 선정함(Table 4).
- 실험 샘플의 분류는 포장 유형(봉지, 컵), 소스 유형(국물, 짜장, 비빔) 및 샘플 유형(면, 소스)으로 구분함. 아래 Table 27과 같이 총 132건의 퓨란 분석을 시행함.

봉지라면			용기라면		
구분	Company	Sample name	구분	Company	Sample name
국물	A	N_Bag_001	국물	A	N_Cup_001
	A	N_Bag_002		A	N_Cup_002
	A	N_Bag_003		A	N_Cup_003
	A	N_Bag_004		B	S_Cup_001
	B	S_Bag_001		C	O_Cup_001
	C	O_Bag_001		C	O_Cup_002
짜장	A	N_Bag_005	짜장	A	N_Cup_004
	A	N_Bag_006		A	N_Cup_005
	B	S_Bag_002		C	O_Cup_003
	C	O_Bag_002		C	O_Cup_004
	C	O_Bag_003		B	S_Cup_002
	D	P_Bag_001		D	P_Cup_001
비빔	A	N_Bag_007	비빔	A	N_Cup_006
	B	S_Bag_003		B	S_Cup_003
	D	P_Bag_002		D	P_Cup_002

Table 27. 시판 인스턴트라면의 실험 샘플 선정 현황

포장형태	라면종류	조리	샘플유형	샘플 수
봉지	국물라면 (6종)	조리 전	- 면 / 스프	12
		조리 후	- 기존 조리법 ¹⁾ : 면 / 국물	12
			- 변형 조리법 ²⁾ : 면 / 국물	12
	짜장라면 (6종)	조리 전	- 면 / 소스	12
		조리 후	- 면 / 면+소스	12
		비빔라면 (3종)	조리 전	- 면 / 소스
조리 후	- 면 / 면+소스		6	
용기	국물라면 (6종)	조리 전	- 면 / 스프	12
		조리 후	- 면 / 국물	12
		짜장라면 (6종)	조리 전	- 면 / 소스
	조리 후		- 면 / 면+소스	12
	비빔라면 (3종)	조리 전	- 면 / 소스	6
		조리 후	- 면 / 면+소스	6
Total				132

1) : 기존 조리법(제조사 제공) - 물이 끓으면 스프와 면 넣기
 2) : 변형 조리법 - 물과 스프를 동시에 넣고 끓인 후 면 넣기

Table 28. 인스턴트라면 실험 샘플 분류

B. 퓨란 분석을 위한 인스턴트 라면 샘플 준비

- 인스턴트 라면의 분석용 샘플은 아래 Fig 47과 같이 유형별로 준비함. 조리 전 면은 길이 약

1cm 내외로 부순 후, 1g을 20mL SPME vial에 담고 물 9g을 추가함. 이와 동일하게 조리 전 소스 1g을 20mL SPME vial에 담고 물(HPLC grade) 9g을 추가하였음.

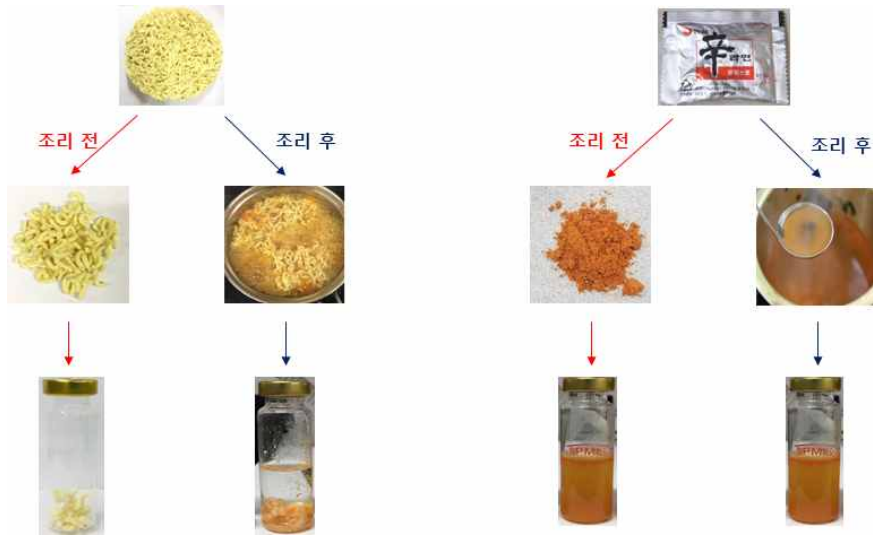


Fig 47. 인스턴트라면의 샘플 준비과정

C. 시판 라면의 유형에 따른 퓨란 함량 분석 결과

a) 봉지면

- 봉지면은 국물라면 6종, 짜장 라면 6종, 비빔라면 3종으로 총 15종의 라면에서의 조리 전, 후 면과 스프에서의 퓨란 함량을 분석하였음.
- 조리법의 경우 제조사가 제공하는 기존 조리법과 물과 스프를 동시에 넣고 끓인 후 면을 넣어 가열하는 변형 조리법으로 나누어 퓨란 함량 차이를 비교하였음.
- 봉지면 중 국물라면 면의 조리 전, 후 퓨란 함량 및 증감률은 아래 Table 29와 같음. 조리 전 면의 퓨란 함량은 4.24 ± 0.09 - 5.35 ± 0.13 ng/g으로 다소 낮은 값을 보였음. 유탕면제조시 유탕온도 150°C에서 1~3분간 짧은 시간동안 진행되기 때문에 퓨란 생성량이 적은 것으로 판단됨.
- 기존조리법으로 조리된 면은 2.75 ± 0.08 - 3.83 ± 0.44 ng/g을 나타냈으며, 변형조리법으로 조리된 면은 2.98 ± 0.58 - 5.13 ± 1.17 로 나타남. 기존 조리법으로 조리했을 때 조리 전의 결과 값과 유의차를 보였으나 변형 조리법에서 일부 값은 유의차가 없었음 ($p < 0.05$).
- 퓨란 함량의 증감률의 경우 2개 샘플에서 조리 후 퓨란 함량이 증가하는 경향을 보였으나 결과 값의 큰 상승폭은 보이지 않았음. 조리법을 달리하였을 때 면의 퓨란 함량에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 예측할 수 있음.

Sample	면				
	조리 전 면	조리 후 면			변형조리법 ²⁾
		기존 조리법 ¹⁾			
Furan (ng/g)	Furan (ng/g)	Reduction (%)	Furan (ng/g)	Reduction (%)	
N_Bag_001	4.24±0.09 ^{ab}	2.81±0.41 ^{aA}	▼ 33.80	2.98±0.58 ^{aA}	▼ 29.68
N_Bag_002	4.34±0.21 ^{abB}	2.93±0.37 ^{aA}	▼ 35.58	4.52±0.33 ^{bcB}	▲ 4.18
N_Bag_003	5.35±0.13 ^{cB}	3.68±0.03 ^{bA}	▼ 31.30	3.66±0.72 ^{abA}	▼ 31.65
N_Bag_004	4.63±0.24 ^{bB}	2.75±0.08 ^{aA}	▼ 40.67	5.13±1.17 ^{cB}	▲ 10.82
S_Bag_001	4.59±0.05 ^{bB}	3.83±0.44 ^{bAB}	▼ 16.63	3.34±0.61 ^{abA}	▼ 27.28
O_Bag_001	4.39±0.14 ^{abB}	2.87±0.48 ^{aA}	▼ 34.50	3.14±0.40 ^{aA}	▼ 28.30

- 1) 기존 조리법(제조사 제공) : 물이 끓으면 스프와 면 넣기
- 2) 변형 조리법 : 물과 스프를 동시에 넣고 끓인 후 면 넣기
- 3) All values are shown as mean ± S.D. (standard deviation) (n=3)
- 4) Different letters indicate significant mean differences according to Duncan's test between each samples (p<0.05)

Table 29. 봉지면 중 국물 라면 면의 조리 전·후 Furan 함량 및 증감률

- 봉지면 중 국물라면 스프의 조리 전, 후 퓨란 함량 및 증감률은 아래 Table 30과 같음.
- 면보다 스프에서 퓨란 함량이 높게 나타났으며 이는 스프의 제조공정이 200℃ 이상에서 이루어지기 때문으로 예상됨.
- 퓨란 함량의 감소율은 83.76 - 93.68%로 높은 값을 나타내는데, 끓는점이 31.4℃로 낮은 퓨란이 조리과정중에 대부분 휘발되는 것으로 볼 수 있음.

Sample	스프				
	조리전 스프	조리 후 스프			변형조리법 ²⁾
		기존 조리법 ¹⁾			
Furan (ng/g)	Furan (ng/g)	Reduction (%)	Furan (ng/g)	Reduction (%)	
N_Bag_001	14.80±0.62 ^{bcB}	1.02±0.11 ^{aA}	▼ 93.14	0.94±0.09 ^{aA}	▼ 93.68
N_Bag_002	16.36±0.32 ^{cB}	1.90±0.07 ^{bA}	▼ 88.38	2.14±0.17 ^{dA}	▼ 86.90
N_Bag_003	13.81±0.36 ^{abB}	1.17±0.17 ^{aA}	▼ 91.50	1.25±0.05 ^{bA}	▼ 90.97
N_Bag_004	12.18±0.44 ^{ab}	1.98±0.07 ^{bcA}	▼ 83.76	1.78±0.10 ^{cA}	▼ 85.37
S_Bag_001	20.52±2.96 ^{dB}	2.45±0.05 ^{dA}	▼ 88.06	2.97±0.10 ^{fA}	▼ 85.53
O_Bag_001	34.05±0.30 ^{cC}	2.15±0.11 ^{cA}	▼ 93.68	2.68±0.03 ^{eB}	▼ 92.12

- 1) 기존 조리법(제조사 제공) : 물이 끓으면 스프와 면 넣기
- 2) 변형 조리법 : 물과 스프를 동시에 넣고 끓인 후 면 넣기
- 3) All values are shown as mean ± S.D. (standard deviation) (n=3)
- 4) Different letters indicate significant mean differences according to Duncan's test between each samples (p<0.05)

Table 30. 봉지면 중 국물 라면 스프의 조리 전·후 Furan 함량 및 증감률

- 봉지면 중 짜장라면 면, 스프의 조리 전 · 후 퓨란 함량 및 증감률은 아래 Table 31과 같음.
- 조리 전 스프의 퓨란 함량은 38.32±1.91 - 217.54±7.35 ng/g으로 라면 종류에 따라 큰 차이를 보였으며 이는 스프의 원재료 차이로 인한 것으로 예상됨.
- 함량이 높게 나타난 스프의 주원료는 춘장이었으며, 가장 낮게 나타난 샘플의 주원료는 백설당이었음. 따라서 춘장함량이 짜장라면 스프의 퓨란 함량에 영향을 미치는 것으로 생각됨.
- 스프의 조리 이후 퓨란 함량은 70% 이상의 높은 감소율을 보임.

Sample	면			스프		
	조리 전 Furan (ng/g)	조리 후 Furan (ng/g)	Reduction (%)	조리 전 Furan (ng/g)	조리 후 Furan (ng/g)	Reduction (%)
N_Bag_005	4.66±0.32 ^{aB}	3.36±0.63 ^{cA}	▼ 27.87	44.68±6.57 ^{abB}	2.50±0.26 ^{aA}	▼ 94.41
N_Bag_006	5.39±0.67 ^{bB}	1.90±0.11 ^{aA}	▼ 64.82	38.32±1.91 ^{aB}	2.55±0.35 ^{aA}	▼ 93.35
S_Bag_002	4.94±0.22 ^{abB}	2.86±0.09 ^{bcA}	▼ 42.13	53.77±6.87 ^{bB}	4.72±0.48 ^{aA}	▼ 91.22
O_Bag_002	4.44±0.04 ^{aB}	2.45±0.14 ^{abA}	▼ 44.86	54.52±0.35 ^{bB}	2.73±0.12 ^{aA}	▼ 94.99
O_Bag_003	4.63±0.21 ^{aB}	1.95±0.02 ^{aA}	▼ 57.90	217.54±7.35 ^{bB}	12.12±1.05 ^{bA}	▼ 94.43
P_Bag_001	4.89±0.26 ^{abB}	2.60±0.50 ^{bA}	▼ 46.78	106.44±10.35 ^{cB}	31.30±3.93 ^{cA}	▼ 70.59

1) All values are shown as mean ± S.D. (standard deviation) (n=3)
 2) Different letters indicate significant mean differences according to Duncan's test between each samples (p<0.05)

Table 31. 봉지면 중 짜장라면 면·스프의 조리 전·후 Furan 함량 및 증감률

- 봉지면 중 비빔라면 면, 스프의 조리 전 · 후 퓨란 함량 및 증감률은 아래 Table 32와 같음.
- 비빔라면의 퓨란 함량은 면보다 스프에서 감소율이 크게 나타남.
- 소스(스프)의 조리 전 퓨란 함량은 8.27±0.30 - 126.19±2.01 ng/g 으로 라면 종류에 따라 큰 차이를 보임. 이는 원재료 종류에 따른 차이로 예상됨. 퓨란 함량이 가장 높게 나타난 라면의 주원료는 간장과 백설탕이며 퓨란 함량이 가장 낮게 나타난 라면의 주원료는 설탕과 고추장임. 이를 통해 간장의 양이 비빔라면 스프의 퓨란 함량에 영향을 주는 것 판단할 수 있음. 간장을 주베이스로 한 스프(소스)의 제조공정에서 고온의 열처리가 퓨란 생성량에 영향을 주는 것으로 예상됨.

Sample	면			스프		
	조리 전 Furan (ng/g)	조리 후 Furan (ng/g)	Reduction (%)	조리 전 Furan (ng/g)	조리 후 Furan (ng/g)	Reduction (%)
N_Bag_007	5.28±0.08 ^{aB}	2.33±0.32 ^{aA}	▼ 55.99	12.29±0.45 ^{bB}	1.61±0.33 ^{aA}	▼ 86.89
S_Bag_003	10.02±0.35 ^{bB}	2.77±0.06 ^{aA}	▼ 72.33	126.19±2.01 ^{cB}	3.00±0.20 ^{bA}	▼ 97.62
P_Bag_002	5.85±0.17 ^{aB}	2.98±0.69 ^{aA}	▼ 49.10	8.47±0.30 ^{aB}	3.13±0.60 ^{bA}	▼ 62.99

1) All values are shown as mean ± S.D. (standard deviation) (n=3)
 2) Different letters indicate significant mean differences according to Duncan's test between each samples (p<0.05)

Table 32. 봉지면 중 비빔라면 면·스프의 조리 전·후 Furan 함량 및 증감률

b) 용기면

- 용기면의 조리법은 끓는 물을 용기에 직접 추가하고 일정시간(4분 이내) 이후 섭취하는 방식임.
- 용기면 중 국물라면 면, 스프의 조리 전 · 후 퓨란 함량 및 증감률은 아래 Table 33과 같음.
- 조리 전 면의 퓨란 함량은 5.33±0.21 - 13.27±0.81 ng/g으로 봉지면에 비해 다소 높은 값을 보였음. 조리 후 면의 퓨란 함량은 3.77±0.37 - 7.38±0.34 ng/g으로 나타남. 감소율은 17.69 - 55.90%로 라면 종류에 따라 차이를 보였음.
- 스프의 경우 조리 전 퓨란 함량이 7.82±0.15 - 24.54±0.17 ng/g 으로 라면 종류에 따라 차

이를 보이며 이는 원재료 차이로 인한 것으로 예상됨.

Sample	면			스프		
	조리 전 Furan (ng/g)	조리 후 Furan (ng/g)	Reduction (%)	조리 전 Furan (ng/g)	조리 후 Furan (ng/g)	Reduction (%)
N_Cup_001	5.58±0.08 ^{ab}	4.35±0.20 ^{abA}	▼ 22.12	24.54±0.17 ^{eB}	1.67±0.18 ^{aA}	▼ 93.20
N_Cup_002	13.27±0.81 ^{dB}	7.38±0.34 ^{dA}	▼ 44.37	16.70±1.36 ^{dB}	3.99±0.14 ^{dA}	▼ 76.08
N_Cup_003	5.93±0.19 ^{ab}	4.88±0.21 ^{bcA}	▼ 17.69	16.53±0.30 ^{dB}	1.85±0.04 ^{aA}	▼ 88.78
S_Cup_001	11.35±0.65 ^{cB}	7.35±0.34 ^{dA}	▼ 35.21	7.82±0.15 ^{ab}	2.54±0.19 ^{cA}	▼ 67.58
O_Cup_001	8.77±0.12 ^{bb}	3.87±0.22 ^{aA}	▼ 55.90	10.87±0.32 ^{cB}	2.15±0.09 ^{bA}	▼ 80.23
O_Cup_002	5.33±0.21 ^{ab}	3.77±0.37 ^{aA}	▼ 29.24	8.91±0.24 ^{bb}	2.40±0.01 ^{cA}	▼ 73.10

- 1) All values are shown as mean ± S.D. (standard deviation) (n=3)
 2) Different letters indicate significant mean differences according to Duncan's test between each samples (p<0.05)

Table 33. 용기면 중 국물라면 면·스프의 조리 전·후 Furan 함량 및 증감률

- 용기면 중 짜장라면 면, 스프의 조리 전 · 후 퓨란 함량 및 증감률은 아래 Table 34와 같음.
- 조리 전 면의 퓨란 함량은 5.53±0.08 - 7.60±0.56 ng/g, 조리 후 면의 퓨란 함량은 2.08±0.04 - 8.14±1.19 ng/g으로 나타남. 용기면 중 짜장 라면의 면의 퓨란 함량은 봉지면과 유사한 값을 보임.
- 봉지면과 마찬가지로 스프의 원재료 종류에 따라서 조리전 퓨란 함량이 22.93±1.69 - 143.19±26.71 ng/g 으로 5배 이상 차이 남.
- 가장 낮은 퓨란 함량을 보인 라면의 스프 주재료는 정백당, 분말짜장이며 가장 높은 퓨란 함량을 보인 라면의 스프 주재료는 볶음짜장소스(춘장 외), 올리고당임. 이와 같이 스프의 주재료가 춘장일 경우 포장유형(봉지, 용기)에 상관없이 높은 퓨란 함량을 보였음. 이를 통해 춘장이 짜장 라면의 퓨란 함량에 영향을 미치는 것으로 예상할 수 있음.

Sample	면			스프		
	조리 전 Furan (ng/g)	조리 후 Furan (ng/g)	Reduction (%)	조리 전 Furan (ng/g)	조리 후 Furan (ng/g)	Reduction (%)
N_Cup_004	5.52±0.08 ^{ab}	2.08±0.04 ^{aA}	▼ 62.31	26.99±0.49 ^{ab}	2.36±0.23 ^{aA}	▼ 91.25
N_Cup_005	6.73±0.54 ^{cB}	5.43±0.91 ^{cA}	▼ 19.25	22.93±1.69 ^{ab}	3.75±0.16 ^{aA}	▼ 83.65
O_Cup_003	7.60±0.56 ^{dB}	8.14±1.19 ^{dB}	▲ 7.14	49.89±0.88 ^{bb}	4.64±0.13 ^{aA}	▼ 90.69
O_Cup_004	6.24±0.14 ^{bcB}	3.14±0.10 ^{abA}	▼ 49.60	143.19±26.71 ^{dB}	6.39±0.98 ^{aA}	▼ 95.54
S_Cup_002	6.02±0.38 ^{abB}	3.95±0.72 ^{bA}	▼ 34.37	43.33±1.39 ^{abB}	4.42±0.19 ^{aA}	▼ 89.80
P_Cup_001	6.10±0.05 ^{abcB}	3.96±0.26 ^{bA}	▼ 34.99	86.26±5.88 ^{cB}	40.35±7.98 ^{bA}	▼ 53.20

- 1) All values are shown as mean ± S.D. (standard deviation) (n=3)
 2) Different letters indicate significant mean differences according to Duncan's test between each samples (p<0.05)

Table 34. 용기면 중 짜장라면 면·스프의 조리 전·후 Furan 함량 및 증감률

- 용기면 중 비빔라면 면, 스프의 조리 전, 후 퓨란 함량 및 증감률은 아래 Table 35와 같음.
- 스프의 경우 봉지면과 용기면의 퓨란 함량 결과가 유사하게 나타났으며 이는 스프의 주재료 종류 차이에 따른 결과로 예상됨. 퓨란 함량이 가장 높은 라면의 스프 주재료는 정제수, 간장이며 퓨란 함량이 가장 낮은 라면의 스프 주재료는 정제염, 해물채소분말임. 이는 봉지면과 유사하게 간장 유무에 따라 비빔라면의 퓨란 함량에 영향을 주는 것으로 판단됨.
- 면의 경우 용기면과 봉지면의 퓨란 증감률에서 큰 차이를 보였음. 농심 볶음 너구리는 조리 이후 면의 퓨란 함량이 40% 이상 감소하였지만 이외 2종의 샘플은 근소한 차이로 감소하거나 오히려 10% 증가하였음. 그러나 통계처리결과 유의차는 보이지 않았음 (p<0.05). 이를 통해 뜨거운 물을 용기에 직접 부어 면을 조리하는 방법은 면의 퓨란 감소에 효과적이지 않은 것으로 예상됨.

Sample	면			스프		
	조리 전 Furan (ng/g)	조리 후 Furan (ng/g)	Reduction (%)	조리 전 Furan (ng/g)	조리 후 Furan (ng/g)	Reduction (%)
N_Cup_006	5.15±0.11 ^{a,B}	3.00±0.20 ^{a,A}	▼ 41.86	10.81±0.40 ^{a,B}	2.83±0.19 ^{a,A}	▼ 73.85
S_Cup_003	5.48±0.58 ^{a,B}	6.06±0.65 ^{b,B}	▲ 10.71	74.52±8.76 ^{b,B}	5.09±0.86 ^{b,A}	▼ 93.17
P_Cup_002	7.65±0.38 ^{b,B}	7.59±0.35 ^{c,B}	▼ 0.77	21.27±2.56 ^{a,B}	7.03±0.11 ^{c,A}	▼ 66.93

1) All values are shown as mean ± S.D. (standard deviation) (n=3)

2) Different letters indicate significant mean differences according to Duncan's test between each samples (p<0.05)

Table 35. 용기면 중 비빔라면 면 · 스프의 조리 전·후 Furan 함량 및 증감률

㉔ 잠재적 위해요소 함유 식품(후추, 고춧가루, 김)의 조리 및 가공 공정 중 생성 유해물질(퓨란, 바이오제닉아민) 분석

1) 후추

- 바이오제닉아민(Biogenic amines)은 원재료의 효소작용과 미생물의 아미노산 탈탄산 작용으로 생성되는 방향족 및 헤테로고리구조 질소화합물이며 과량 섭취 시 신경계 및 혈관계를 자극하여 독성을 유발함.
- 2016년 식품의약품안전처에서 발표한 “바이오제닉아민 위해평가-총식이조사” 에서 조리법에 따라 조미료류(후추)에서 높은 함량의 바이오제닉아민이 생성되었다는 연구 보고가 있음.
- 식품의 제조 · 가공 · 조리과정 중에 생성되어 잔류되는 유해물질은 미량이라 할지라도 식품을 통해 일생동안 섭취하기 때문에 안전성에 따라 위해성 검토가 필요함.
- 본 연구에서는 후추의 바이오제닉아민 분석법을 확립하고 이에 대한 유효성 검증을 진행하였고, 확립된 분석법을 이용하여 후추 조리법 조건에 따른 바이오제닉아민 생성량을 분석함.

A. 후추 중 바이오제닉아민 분석법 확립 및 유효성 검증

a) 바이오제닉아민 분석법 확립

- 본 연구에서는 후추 중 바이오제닉아민 (Tryptamine, Putrescine, Histamine, Tyramine, B-Phenylethylamine, Spermidine) 분석을 위해 High Performance Liquid Chromatography-Ultra Violet (HPLC-UV)를 이용함.

- 바이오제닉아민의 정확한 정량분석을 위하여 내부표준물질(Internal standard)로 1,7-diaminopheptane을 선정하고 덴질염화물로 유도체 후 HPLC-UV로 분석함.
- 분석용 컬럼은 C18 (3.9 mm × 150 mm I.D × 4 μm)을 사용하였으며, 시간대 별로 이동상 0.1 M 아세트산암모늄, 100% 아세토니트릴을 혼합하여 UV wave length 254nm에서 분석하였음. HPLC-UV 기기 조건은 다음과 같음.

HPLC	HPLC system
컬럼	3.9 × 150 mm, 4μm
이동상	A : 0.1 M 아세트산암모늄 B : 100 % 아세토니트릴
선형농도구배 (Linear gradient)	0 min : A 50 % 19 min : A 10 % 20 min : A 50 % 25 min : A 50 %
흐름 속도	1 ml/min
컬럼 온도	25 °C
주입량	20 μl
자외선 파장	254 nm

Table 36. 바이오제닉아민류 분석을 위한 HPLC-UV 기기 조건

b) 유효성 검증

- 분석법의 신뢰성 검증을 위해 미국 FDA (Food and Drug Administration) 및 AOAC에서 제시한 가이드라인에 따라 직선성(Linearity), 정밀도[Precision: 일내정밀도(Intra-day precision), 일간정밀도(Inter-day precision)], 회수율(Recovery), 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ)를 확인하였음(AOAC International, 2007, Codex Alimentarius, 2003, Food and Drug Administration, 1997).

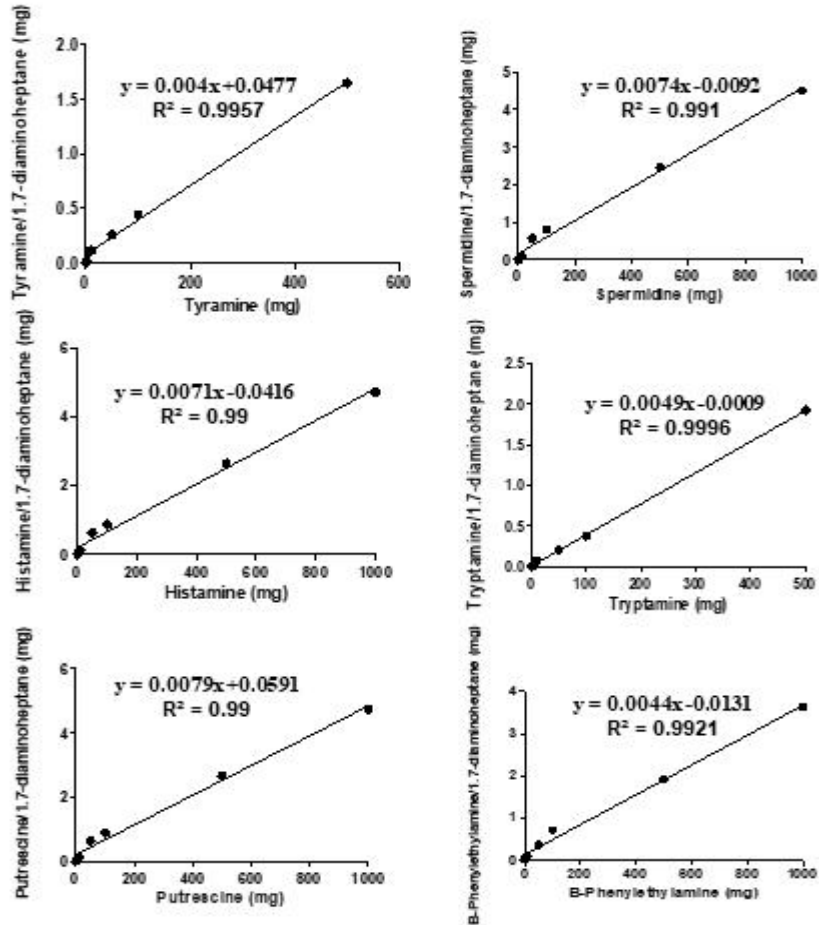


Fig 48. 바이오제닉아민류 검량 곡선

- 위의 Fig 48과 같이 6가지 농도 조건을 이용하여 검량 곡선을 작성함. 바이오제닉아민 표준물질(Tyramine, Spermidine, Histamine, Tryptamine, Putrescine, B-Phenylethylamine) 내부 표준물질 1,7-diaminopheptane의 정량한 면적값에 대한 면적비를 y축으로 설정하고 표준물질 바이오제닉아민 농도를 x축으로 설정하여 검량곡선을 작성함. 최소 제곱회귀분석법으로, 최종적으로 구한 검량 곡선식은 아래와 같음.

Tyramine: $y = 0.004x + 0.0477$
 $r^2=0.9957$

Spermidine: $y = 0.0074x - 0.0092$
 $r^2=0.991$

Histamine: $y = 0.0071x - 0.0416$
 $r^2=0.99$

Tryptamine: $y = 0.0049x - 0.0009$
 $r^2=0.9996$

Putrescine: $y = 0.0079x - 0.0591$
 $r^2=0.99$

B-phenylethylamine: $y = 0.0044x - 0.0131$
 $r^2=0.9921$

- 정밀도와 회수율을 구하고자 표준물질을 3가지 농도(1, 10, 100 mg/L)에서 실험을 진행하였으며, 각 농도별 실험 샘플 수는 5샘플로 진행하였음. 일간 정밀도는 5일간 진행하였음. 그

결과는 아래 Table 40과 같음.

Biogenic Amines	Equation	Linearity	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
		Correlation Coefficient (r ²)		
Tryptamine	y = 0.0049x -0.0009	0.9996	0.37	1.12
B-Phenylethylamine	y = 0.0044x -0.0131	0.9921	0.83	2.79
Histamine	y = 0.0071x -0.0416	0.99	0.64	1.93
Tyramine	y = 0.004x +0.0477	0.9957	1.21	3.67
Spermidine	y = 0.0074x -0.0092	0.991	0.50	1.52
Putrescine	y = 0.0079x +0.0591	0.992	1.28	4.29

Table 37. 직선성 확인 및 검출한계, 정량한계

B. 시판 가공 후추 중 바이오제닉아민 분석

a) 시판 가공 후추 선정 및 실험 샘플 분류

- 본 연구에서는 국내 시중에 유통되는 가공 후추의 유형별 바이오제닉아민 함량을 조사하고자 하였음. 이에 유형별 가공 후추 제품 6종(통후추 3종, 분말후추 3종)을 선정함(Table 38).

Sample type	Sample name	Company	Biogenic Amines (ppm)	
후추 (Whole)	W001	A	Tryptamine	117.09 ± 4.66
			B-phenylethylamine	32.85 ± 1.83
			Histamine	63.21 ± 1.28
			Tyramine	80.56 ± 1.81
			Spermidine	12.18 ± 1.13
			Putrescine	231.21 ± 2.31
	W002	B	Tryptamine	89.14 ± 3.49
			B-phenylethylamine	21.19 ± 3.66
			Histamine	52.85 ± 3.13
W003	B	Tyramine	71.11 ± 2.21	
		Spermidine	11.26 ± 2.11	
		Putrescine	151.21 ± 4.43	
후추 (Grinded)	G001	A	Tryptamine	60.19 ± 2.81
			B-phenylethylamine	22.85 ± 2.14
			Histamine	50.11 ± 1.12
			Tyramine	62.16 ± 1.75
			Spermidine	15.28 ± 2.14
			Putrescine	141.43 ± 1.91
	G001	A	Tryptamine	386.44 ± 3.44
			B-phenylethylamine	57.61 ± 3.77
			Histamine	118.81 ± 1.24
			Tyramine	132.86 ± 3.77
			Spermidine	32.85 ± 1.83

	G002	B	Putrescine	513.18 ± 6.64
			Tryptamine	177.95 ± 10.24
			B-phenylethylamine	37.21 ± 1.87
			Histamine	90.46 ± 2.23
			Tyramine	110.86 ± 3.12
			Spermidine	28.15 ± 2.23
			Putrescine	421.29 ± 5.54
	G003	B	Tryptamine	147.75 ± 11.24
			B-phenylethylamine	41.11 ± 1.34
			Histamine	80.56 ± 3.15
			Tyramine	109.91 ± 5.28
			Spermidine	30.11 ± 3.44
			Putrescine	389.29 ± 4.43

Table 38. 시중에 유통되는 가공 후추 중 바이오제닉아민 분석

C. 가공 후추 조리 과정 중 유해물질 바이오제닉아민 생성량 분석

- Grinded 후추(G001, A company)를 이용하여 실험 진행함.
- 실험 샘플의 조리법 분류는 4가지의 조리 방법[굽기, 볶기, 끓이기(건더기), 끓이기(국물)]로 나누어 아래 Table 39와 같이 온도와 시간을 설정하여 진행함.

조리방법	조리방법	온도 (°C)	시간 (min)
굽기 (Roasting)	2 Tbsp (약 16g)	80 (75~85)	3 / 5 / 10 / 15
	2 Tbsp (약 16g)	140 (135~145)	3 / 5 / 10 / 15
볶기 (Stirring)	1Tbsp (약 8g)+옥수수유 3ml	160 (155~165)	3 / 5 / 10 / 15
	1Tbsp (약 8g)+옥수수유 3ml	200 (195~205)	3 / 5 / 10 / 15
끓이기 (Boiling) 건더기	2Tbsp (약 16g)+300ml DW	80 (75~85)	5 / 15 / 30
	2Tbsp (약 16g)+300ml DW	120 (115~125)	5 / 15 / 30
끓이기 (Boiling) 국물	2Tbsp (약 16g)+300ml DW	80 (75~85)	5 / 15 / 30
	2Tbsp (약 16g)+300ml DW	120 (115~125)	5 / 15 / 30

Table 39. 조리 방법 별 온도, 시간 조건 설정

a) 굽기(Roasting)

온도 (°C)	시간 (min)	Tryptamine (ppm)	Putrescine (ppm)	Histamine (ppm)	Tyramine (ppm)	B-Phenylethylamine (ppm)	Spermidine (ppm)
80	Control	386.44±3.44 ^a	513.18±6.64 ^a	118.81±1.24 ^{a, b}	132.86±3.77 ^a	57.61±3.77 ^a	32.85±1.83 ^a
	3	396.66±4.24 ^a	570.66±6.24 ^b	112.65±3.34 ^a	155.18±6.44 ^{b, c}	63.20±2.44 ^b	41.12±3.44 ^b
	5	397.60±5.14 ^a	758.64±9.12 ^c	120.41±7.24 ^b	151.31±1.62 ^b	63.89±2.63 ^b	46.68±1.17 ^c
	10	493.24±6.36 ^b	838.32±5.32 ^d	128.18±2.01 ^c	163.79±4.01 ^c	65.64±2.21 ^b	48.94±1.41 ^{c, d}
	15	638.23±10.52 ^c	1044.74±10.52 ^e	154.80±3.52 ^d	200.51±7.07 ^d	78.76±1.27 ^c	51.05±1.38 ^d
140	Control	386.44±3.44 ^a	513.18±6.64 ^a	118.81±1.24 ^a	132.86±3.77 ^a	57.61±3.77 ^a	32.85±1.83 ^a
	3	399.23±3.14 ^a	620.66±9.24 ^b	126.12±6.24 ^c	160.18±2.74 ^b	63.44±1.23 ^a	41.91±2.03 ^b
	5	578.90±10.40 ^b	782.86±9.40 ^c	124.43±1.70 ^{a, b}	163.79±2.74 ^b	74.49±1.74 ^b	50.48±1.55 ^c
	10	599.34±7.24 ^c	944.42±10.24 ^d	144.53±1.66 ^d	199.70±7.82 ^d	75.30±4.82 ^b	52.76±1.88 ^c
	15	670.23±8.32 ^d	977.30±22.85 ^e	146.20±4.43 ^d	199.31±2.44 ^c	81.22±7.44 ^b	51.88±1.44 ^c

1) All values are shown as mean ± S.D. (standard deviation) (n=3).
 2) Lowercase letters (series "a-e") indicate significant (p < 0.05) differences at same experimental temperature with different heating time.

Table 40. 후추(굽기)에서의 바이오제닉아민 함량 결과

- 굽기의 경우 Tryptamine (386.44±3.44 - 638.23±10.52 μg/g), Putrescine (513.18±6.64 - 977.30±22.85 μg/g), Histamine (118.81±1.24 - 146.20±4.43 μg/g), Tyramine (132.86±3.77 - 199.31±2.44 μg/g), B-phenylethylamine (57.61±3.77 - 81.22±7.44 μg/g), Spermidine (32.85±1.83 - 51.88±1.44 μg/g) 검출됨.
- 80°C 와 140°C 모두 바이오제닉아민 함량이 조리 굽기 시간의 따라 증가함.

b) 볶기(Stirring)

온도 (°C)	시간 (min)	Tryptamine (ppm)	Putrescine (ppm)	Histamine (ppm)	Tyramine (ppm)	B-Phenylethylamine (ppm)	Spermidine (ppm)
160	Control	386.44±3.44 ^a	513.18±6.64 ^a	118.81±1.24 ^a	132.86±3.77 ^a	57.61±3.77 ^a	32.85±1.83 ^a
	3	394.92±8.24 ^{a, b}	580.32±9.17 ^b	142.65±3.66 ^b	141.63±3.84 ^b	59.67±6.04 ^a	43.34±1.23 ^b
	5	401.23±4.24 ^b	638.24±7.12 ^c	151.11±2.24 ^c	141.21±1.62 ^b	58.89±1.61 ^a	46.68±1.17 ^b
	10	492.14±3.34 ^c	699.12±3.31 ^d	163.12±1.51 ^d	154.19±2.02 ^c	64.13±6.11 ^a	50.24±2.31 ^c
	15	514.21±8.32 ^d	714.74±8.12 ^e	167.84±3.42 ^e	171.52±3.57 ^d	74.23±2.23 ^b	53.15±2.38 ^c

Control	386.44±3.44 ^a	513.18±6.64 ^a	118.81±1.24 ^a	132.86±3.77 ^a	57.61±3.77 ^a	32.85±1.83 ^a	
3	411.21±3.04 ^b	608.14±1.13 ^b	150.21±1.23 ^b	145.11±2.32 ^b	59.18±2.63 ^a	49.18±2.13 ^b	
200	5	431.23±1.24 ^c	780.11±2.31 ^c	152.11±2.34 ^b	161.29±3.17 ^c	67.11±3.22 ^b	54.55±4.52 ^b
	10	581.34±5.21 ^d	848.32±9.24 ^d	162.13±2.68 ^c	181.12±7.93 ^d	71.21±1.33 ^{b,c}	53.66±5.18 ^b
	15	631.92±10.11 ^e	891.12±10.45 ^e	159.20±1.42 ^d	211.12±3.41 ^e	75.22±3.44 ^c	61.78±2.52 ^c

1) All values are shown as mean ± S.D. (standard deviation) (n=3).
 2) Lowercase letters (series "a-e") indicate significant (p < 0.05) differences at same experimental temperature with different heating time.

Table 41. 후추(볶기)에서의 바이오제닉아민 함량 결과

- 볶기의 경우 Tryptamine (386.44±3.44 - 631.92±10.11 μg/g), Putrescine (513.18±6.64 - 891.12±10.45 μg/g), Histamine (118.81±1.24 - 159.20±1.42 μg/g), Tyramine (132.86±3.77 - 211.12±3.41 μg/g), B-phenylethylamine (57.61±3.77 - 75.22±3.44 μg/g), Spermidine (32.85±1.83 - 61.78±2.52 μg/g) 검출됨.
- 160°C 와 200°C 모두 바이오제닉아민 함량이 조리 볶기 시간의 따라 증가함.

c) 끓이기(Boiling)

㉠ 건더기

온도 (°C)	시간 (min)	Tryptamine (ppm)	Putrescine (ppm)	Histamine (ppm)	Tyramine (ppm)	B-Phenylethylamine (ppm)	Spermidine (ppm)
80	Control	386.44±3.44 ^c	513.18±6.64 ^b	118.81±1.24 ^c	132.86±3.77 ^b	57.61±3.77 ^b	32.85±1.83 ^b
	5	48.81±1.74 ^a	39.45±3.24 ^a	20.72±1.54 ^a	8.45±1.54 ^a	12.22±1.64 ^a	15.94±1.21 ^a
	15	46.64±3.34 ^a	45.65±3.88 ^a	21.75±2.74 ^a	5.45±2.24 ^a	12.78±1.66 ^a	14.45±1.47 ^a
	30	59.42±1.80 ^b	46.58±2.32 ^a	28.01±3.01 ^b	ND	16.92±2.21 ^a	13.71±2.42 ^a
120	Control	386.44±3.44 ^c	513.18±6.64 ^c	118.81±1.24 ^a	132.86±3.77	57.61±3.77 ^c	32.85±1.83 ^c
	5	51.22±2.25 ^a	47.83±5.13 ^a	25.58±6.34 ^a	3.98±2.44	10.34±1.44 ^a	25.85±1.81 ^b
	15	73.29±1.54 ^b	55.94±4.12 ^a	32.16±3.16 ^a	ND	22.20±6.71 ^b	24.44±2.41 ^b
	30	77.47±2.06 ^b	68.95±1.72 ^b	39.24±2.01 ^a	ND	23.54±8.05 ^b	14.42±1.30 ^a

1) All values are shown as mean ± S.D. (standard deviation) (n=3).
 2) Lowercase letters (series "a-e") indicate significant (p < 0.05) differences at same experimental temperature with different heating time.

Table 42. 후추(끓이기) 건더기에서의 바이오제닉아민 함량 결과

㉡ 국물

온도 (°C)	시간 (min)	Tryptamine (ppm)	Putrescine (ppm)	Histamine (ppm)	Tyramine (ppm)	B-Phenylethylamine (ppm)	Spermidine (ppm)
80	Control	386.44±3.44 ^c	513.18±6.64 ^c	118.81±1.24 ^c	132.86±3.77	57.61±3.77 ^c	32.85±1.83 ^b
	5	30.89±1.10 ^a	27.69±2.34 ^a	20.68±1.44 ^a	ND	9.29±1.34 ^a	9.69±2.23 ^a
	15	31.54±2.24 ^a	29.89±1.78 ^a	18.17±1.54 ^a	ND	11.31±1.16 ^a	8.58±2.43 ^a

	30	55.23±3.55 ^b	46.16±1.39 ^b	30.46±2.06 ^b	ND	19.54±5.31 ^b	8.11±3.12 ^a
	Control	386.44±3.44 ^d	513.18±6.64 ^c	118.81±1.24 ^c	132.86±3.77	57.61±3.77 ^b	32.85±1.83 ^d
120	5	39.29±3.55 ^a	33.34±2.77 ^a	28.68±1.43 ^a	ND	16.37±1.21 ^a	13.84±2.31 ^c
	15	47.33±1.22 ^b	42.81±3.42 ^b	33.35±4.26 ^a	ND	14.89±4.31 ^a	9.88±1.41 ^b
	30	61.12±3.02 ^c	47.88±1.41 ^b	40.24±1.96 ^b	ND	21.14±3.22 ^a	5.54±1.20 ^a

1) All values are shown as mean ± S.D. (standard deviation) (n=3)

2) Lowercase letters (series "a-e") indicate significant ($p < 0.05$) differences at same experimental temperature with different heating time

Table 43. 후추(끓이기) 국물에서의 바이오제닉아민 함량 결과

- 끓이기(건더기/국물)의 경우 Tryptamine (30.89 ± 1.10 - $386.44 \pm 3.44 \mu\text{g/g}$) Putrescine (27.69 ± 2.34 - $513.18 \pm 6.64 \mu\text{g/g}$), Histamine (18.17 ± 1.54 - $118.81 \pm 1.24 \mu\text{g/g}$), Tyramine (ND - $132.86 \pm 3.77 \mu\text{g/g}$), B-phenylethylamine (9.29 ± 1.34 - $57.61 \pm 3.77 \mu\text{g/g}$), Spermidine (5.54 ± 1.20 - $32.85 \pm 1.83 \mu\text{g/g}$) 검출됨.
- 80°C 와 120°C 모두 끓이기(건더기/국물)에서 바이오제닉아민 함량이 감소함. 이는 수분과 함께 증발 되어진 것으로 예상됨.

2) 고춧가루

- 한국인의 연간 고추 소비량은 약 4kg으로 매운맛을 선호하는 고추에 대한 수요가 증가하고 있으나 고추 및 고춧가루의 조리 과정 중 열에 의한 식품 안전 연구는 미비한 실정임.
- 퓨란은 식품의 열처리 과정에서 탄수화물, 아미노산, 지방산 그리고 비타민 등에 의해 생성되는 유해물질로 International Agency for Research Cancer (IARC)에서 Group 2B로 지정되어 있음.
- 고춧가루는 끓이기, 굽기, 볶기 등 대부분 열처리 된 조리법에 의해 소비되므로 조리 과정 중 퓨란 생성의 가능성이 있음. 이에 본 연구에서는 고춧가루의 퓨란 분석법을 확립하고 이를 이용하여 조리법에 따른 퓨란 함유량, 열용량 변화에 따른 퓨란 생성량을 분석하고자 함.

A. 고춧가루 중 퓨란 분석법 확립 및 유효성 검증

a) 퓨란 분석법 확립

- 본 연구에서는 휘발성 유기물질인 퓨란의 추출방법 중 하나인 SPME와 GC-MS를 이용한 휘발성 유기물질 분석법을 기반으로 고체 식품에서 퓨란을 분석함.
- 퓨란의 정확한 정량분석을 위하여 내부표준물질(internal standard)로 d4-퓨란을 선정함.
- 퓨란의 분석은 SIM 모드를 통해 표적이온을 39, 42, 68, 72m/z로 하여 진행하였음. 퓨란 정성 분석을 위한 이온은 39와 42 m/z를 이용하였고 d4-퓨란 정성분석을 위한 이온은 68과 72 m/z를 이용하였음. 퓨란과 d4-퓨란 정량을 위한 이온 비율은 39와 68 m/z를 이용함.
- 분석용 컬럼은 HP Plot-Q (15 m, 0.32 mm I.D. 20 μm film)을 사용하였고, SPME fiber는 Supelco사의 Carboxen/Poludimethylsiloxane (CAR/PDMS)를 사용함. 균질기는 독일

IKAR-WERKE 사의 ULTRA-TURRAXR T25basic 모델을 사용하며, vial은 미국 Aglient 사의 20 mL headspace vial을 사용함. GC 기기 조건은 다음과 같음.

SPME	
SPME fiber	75 μ m Carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS)
GC	
Instrument	Agilent Technologies 7820A
Carrier gas	1.5 mL/min Helium (constant flow)
Column	HP-PLOT Q (15 m x 0.32 mm, 20 μ m film, J & W Scientific, Folsom, CA)
Inlet temperature	250 $^{\circ}$ C
Purge flow rate	50 mL/min for 1 min
Oven temperature Gradient	50 $^{\circ}$ C for 5 min, 25 $^{\circ}$ C/min to 230 $^{\circ}$ C held for 2 min
Injection mode	Splitless mode
MS	
Instrument	Agilent Technologies 5977E
Fragmentation Mode	Electron impact at 70eV
SIM	m/z 39, 68, 42, 72

Table 44. 퓨란 분석 기기 조건

b) 유효성 검증

- 확립된 분석방법의 신뢰성을 검증하기 위해 미국 FDA (Food and Drug Administration) 및 AOAC 에서 제시한 가이드라인 방법에 따라 직선성(Linearity), 정밀도[Precision: 일내정밀도 (Inter-day precision), 일간정밀도(Intra-day precision)], 회수율(Recovery), 검 출한계(LOD), 정량한계(LOQ) 등을 확인하여 검증함(AOAC International, 2007, Codex Alimentarius, 2003, Food and Drug Administration, 1997).

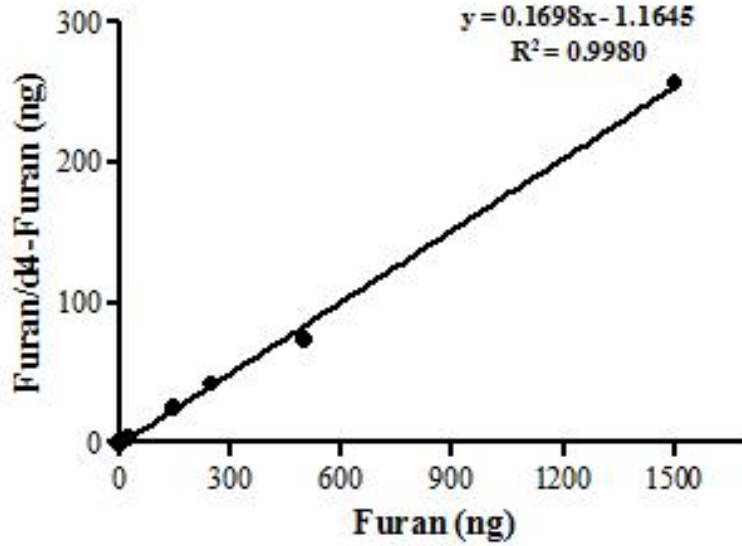


Fig 49. 퓨란의 검량곡선

Equation	Linearity Correlation Coefficient (r^2)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
$y = 0.1698x - 1.1645$	0.9980	0.12	0.35

Table 45. 직선성 확인 및 검출한계, 정량한계

Concentration (ng/mL)	Precision (% RSD)		Recovery (%)
	Intraday	Interday	
1	2.01	2.69	115.8
50	7.79	2.35	98.5
100	2.20	0.98	101.0

Table 46. 정밀도 및 회수율

- 퓨란 정량을 위해 6가지 농도조건을 이용하여 검량 곡선을 작성하였음, 검량곡선에서 얻어진 표준물질인 퓨란과 내부표준물질인 d4-furan의 정량이온 피크에 대한 면적비를 구하여 y축으로 하고 표준물질의 농도를 x축으로 하여 검량 곡선을 작성함. 최소 제곱 회귀분석법을 이용하여 최종적으로 구한 검량 곡선은 다음과 같음.

$$y = 0.1698x - 1.1645$$

$$r^2 = 0.9980$$

- 정밀도와 회수율을 구하기 위하여 동일한 조건하에 동일한 장비를 사용하여 3가지 농도(1, 50, 100 ng/mL)에서 실험을 진행하였으며, 각 농도별 실험 샘플 수는 5샘플로 진행하였음. 일간 정밀도는 5일간 진행하였음.

B. 고춧가루 조리 공정 중 퓨란 함량 분석

a) 퓨란 분석을 위한 고춧가루 샘플 준비

- 끓이기(국물, 건더기), 굽기, 볶기(고추기름, 건더기)로 나누어 아래 Table 47과 같이 온도와 시간 설정.

조리법	Sample type	온도 (°C)	시간 (min)						
끓이기	건더기	80	control(<20s)	5	10	15	20	25	30
		100	control(<20s)	5	10	15	20	25	30
	국물	80	control(<20s)	5	10	15	20	25	30
		100	control(<20s)	5	10	15	20	25	30
볶기	건더기	80	control(<20s)	5	10	15	20	-	-
		100	control(<20s)	5	10	15	20	-	-
		130	control(<20s)	5	10	15	20	-	-
		170	control(<20s)	5	10	15	20	-	-
	고추기름	80	control(<20s)	5	10	15	20	-	-
		100	control(<20s)	5	10	15	20	-	-
		130	control(<20s)	5	10	15	20	-	-
		170	control(<20s)	5	10	15	20	-	-
굽기	-	60	1	3	5	10	15	20	-
		80	1	3	5	10	15	20	-
		100	1	3	5	10	15	20	-
		120	1	3	5	10	15	20	-
		150	1	3	5	10	15	20	-
		180	1	3	5	10	15	20	-

Table 47. 고춧가루 실험 샘플 분류

b) 조리 공정 중 퓨란 함량 분석 결과

㉠ 끓이기

건더기			국물		
온도 (°C)	시간 (min)	Furan (ng/g)	온도 (°C)	시간 (min)	Furan (ng/mL)
80	control	3.42 ± 0.14 ^a	80	control	0.58 ± 0.04 ^a
	5	3.63 ± 0.17 ^a		5	0.76 ± 0.03 ^a
	10	3.62 ± 0.10 ^a		10	1.00 ± 0.02 ^b
	15	3.82 ± 0.18 ^a		15	1.02 ± 0.02 ^b
	20	3.65 ± 0.14 ^a		20	1.14 ± 0.00 ^b
	25	3.58 ± 0.10 ^a		25	1.17 ± 0.04 ^{b,c}
	30	3.95 ± 0.16 ^a		30	1.40 ± 0.02 ^c
100	control	8.24 ± 0.80 ^b	100	control	1.18 ± 0.07 ^{b,c}
	5	10.44 ± 0.62 ^c		5	1.70 ± 0.06 ^d
	10	12.38 ± 1.11 ^d		10	1.86 ± 0.08 ^d
	15	9.91 ± 0.91 ^c		15	2.64 ± 0.23 ^e
	20	14.00 ± 0.73 ^e		20	3.47 ± 0.30 ^f
	25	15.50 ± 1.02 ^f		25	3.14 ± 0.13 ^g
	30	21.36 ± 1.29 ^g		30	3.48 ± 0.29 ^g

1) All values are shown as mean ± S.D. (standard deviation) (n=3)
 2) Lowercase letters (series "a-g") indicate significant (p < 0.05) differences during boiling dried red pepper powder.

Table 48. 고춧가루(끓이기)에서의 퓨란 함량 결과

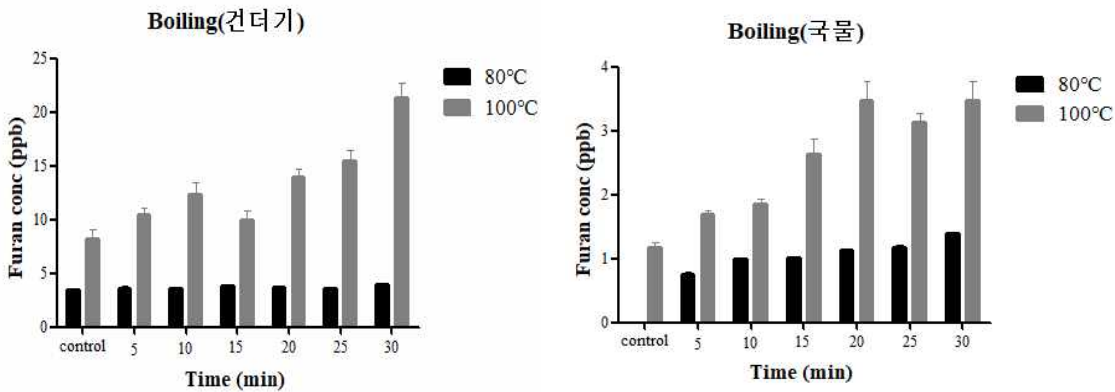


Fig 50. 고춧가루(끓이기)에서의 퓨란 함량 결과

- 끓이기의 경우 건더기에서 3.42±0.14 - 21.36±1.29 ng/g의 퓨란 함량이 검출되었고, 국물에서 0.58±0.04 - 3.48±0.29 ng/mL가 검출됨.
- 80°C 와 100°C 모두 다소 낮은 함량의 퓨란이 검출되었고 시간에 따른 증감을 역시 미미함.
- 국물이 건더기보다 더 낮은 값을 나타내는데 이는 끓는점이 31.4°C로 낮은 퓨란이 조리 중 휘발된 것으로 보임.

㉠ 볶기

건더기			고추기름		
온도 (°C)	시간 (min)	Furan (ng/g)	온도 (°C)	시간 (min)	Furan (ng/mL)
80	control	4.88 ± 0.12 ^{a,A}	80	control	3.64 ± 0.05 ^{d,A}
	5	7.41 ± 0.16 ^{a,A}		5	4.01 ± 0.01 ^{b,A}
	10	7.46 ± 0.27 ^{a,A}		10	4.00 ± 0.06 ^{b,A}
	15	7.11 ± 0.12 ^{a,A}		15	4.28 ± 0.10 ^{c,A}
	20	12.69 ± 0.67 ^{a,A}		20	8.29 ± 0.03 ^{d,A}
100	control	5.50 ± 0.07 ^{a,B}	100	control	3.73 ± 0.10 ^{a,A}
	5	14.14 ± 1.17 ^{b,B}		5	5.98 ± 0.17 ^{b,B}
	10	19.14 ± 0.96 ^{c,B}		10	9.38 ± 0.11 ^{c,B}
	15	20.78 ± 0.35 ^{d,B}		15	12.92 ± 0.27 ^{d,B}
	20	20.79 ± 0.80 ^{d,A}		20	17.70 ± 0.74 ^{e,B}
130	control	8.12 ± 0.39 ^{a,C}	130	control	4.92 ± 0.04 ^{a,B}
	5	47.64 ± 3.00 ^{b,C}		5	22.46 ± 0.66 ^{b,C}
	10	57.86 ± 3.24 ^{d,C}		10	33.85 ± 0.75 ^{c,C}
	15	56.94 ± 1.73 ^{c,d,C}		15	41.85 ± 1.55 ^{d,C}
	20	53.62 ± 0.95 ^{c,B}		20	42.41 ± 0.89 ^{d,C}
170	control	15.20 ± 0.25 ^{a,D}	170	control	22.38 ± 0.84 ^{a,C}
	5	103.48 ± 4.69 ^{b,D}		5	60.58 ± 0.70 ^{b,D}
	10	134.89 ± 11.27 ^{c,D}		10	100.57 ± 2.57 ^{c,D}
	15	168.18 ± 3.91 ^{d,D}		15	121.31 ± 2.33 ^{d,D}
	20	234.52 ± 15.09 ^{e,C}		20	125.73 ± 0.55 ^{e,D}

- 1) All values are shown as mean ± S.D. (standard deviation) (n=3)
- 2) Lowercase letters (series "a-e") indicate significant (p < 0.05) differences at same experimental temperature with different heating time.
- 3) Uppercase letters (series "A-D") indicate significant (p < 0.05) differences at same heating time with different experimental temperature.

Table 49. 고춧가루(볶기)에서의 퓨란 함량 결과

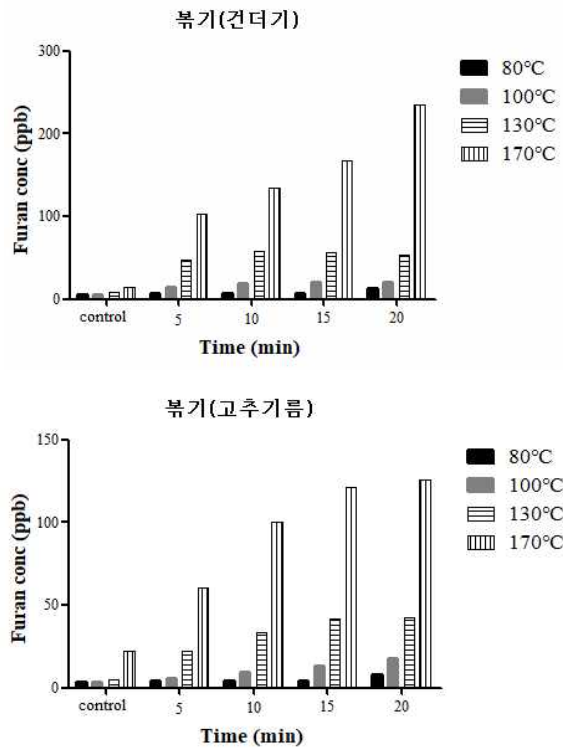


Fig 51. 고춧가루(볶기)에서의 퓨란 함량 결과

- 볶기의 경우 건더기에서 4.88±0.12 - 234.52±15.09 ng/g의 퓨란 함량이 검출되었고, 고추기름에서 3.64±0.05 - 125.73±0.55 ng/mL가 검출됨.
- 끓이기예 비해 온도와 시간에 따른 증감률이 큰 것을 확인 할 수 있고, 고추기름에서보다 건

더기에서 더 많은 함량이 검출된 것을 확인함.

- 같은 온도에서 끓이기와 비교했을 때, 모든 시간대에서 볶기의 퓨란 함량이 높은 것을 통해 물의 영향보다 기름의 영향이 크다는 것을 알 수 있음.

㉔ 굵기

온도 (°C)	시간 (min)	Furan (ng/g)	온도 (°C)	시간 (min)	Furan (ng/g)
60	1	6.95 ± 0.07 ^{a,A,B}	120	1	7.41 ± 0.04 ^{a,B,C}
	3	7.30 ± 0.14 ^{c,A,B}		3	7.65 ± 0.20 ^{a,B}
	5	7.33 ± 0.15 ^{c,A,B}		5	8.50 ± 0.18 ^{a,B}
	10	7.19 ± 0.19 ^{b,c,A}		10	13.89 ± 0.89 ^{b,A}
	15	7.61 ± 0.09 ^{d,A}		15	33.05 ± 3.10 ^{c,B}
	20	7.04 ± 0.04 ^{a,b,A}		20	66.45 ± 2.55 ^{d,B}
80	1	6.66 ± 0.30 ^{a,A}	150	1	8.86 ± 0.80 ^{a,D}
	3	6.79 ± 0.15 ^{a,b,A}		3	10.22 ± 0.57 ^{a,C}
	5	7.10 ± 0.09 ^{c,A}		5	17.44 ± 0.19 ^{a,C}
	10	7.01 ± 0.04 ^{b,c,A}		10	121.29 ± 8.04 ^{b,B}
	15	7.67 ± 0.13 ^{d,A}		15	238.23 ± 15.72 ^{c,C}
	20	8.08 ± 0.02 ^{e,A}		20	493.09 ± 53.55 ^{d,C}
100	1	7.45 ± 0.23 ^{a,B,C}	180	1	7.75 ± 0.18 ^{a,C}
	3	7.52 ± 0.31 ^{a,B}		3	9.94 ± 0.56 ^{a,C}
	5	7.84 ± 0.12 ^{a,A,B}		5	20.19 ± 1.02 ^{a,D}
	10	10.32 ± 1.70 ^{b,A}		10	131.88 ± 15.09 ^{b,B}
	15	11.30 ± 0.52 ^{b,A}		15	619.90 ± 11.75 ^{c,D}
	20	13.11 ± 0.48 ^{c,A}		20	761.37 ± 24.60 ^{d,D}

1) All values are shown as mean ± S.D. (standard deviation) (n=3)
 2) Lowercase letters (series "a-d") indicate significant (p < 0.05) differences at same experimental temperature with different heating time.
 3) Uppercase letters (series "A-D") indicate significant (p < 0.05) differences at same heating time with different experimental temperature.

Table 50. 고춧가루(굵기)에서의 퓨란 함량 결과

- 굵기의 경우 6.66±0.30 - 761.37 ± 24.60 ng/g의 퓨란 함량이 검출되었고, 세 가지 조리 방법 중 가장 큰 증감률을 보임.
- 조리법 간의 온도 범위가 다양하기 때문에 정확한 비교가 어려운 실정이므로 굵기를 열처리 모델 시스템으로 선정하여 열용량에 따른 퓨란 생성 Kinetics 연구를 수행함.

C. 고춧가루의 열처리 모델시스템(굵기)을 활용한 Kinetics 연구

- 열처리 모델시스템에 따라서 6가지 온도(60, 80, 100, 120, 150, 180°C)와 6가지 시간(1, 3, 5, 10, 15, 20 min) 조건에서 실험을 수행함. 결과 데이터를 회기분석하여 각 온도 조건에 해당

하는 기울기 값을 구함. 기울기 값은 퓨란 Kinetics 연구에 사용함.

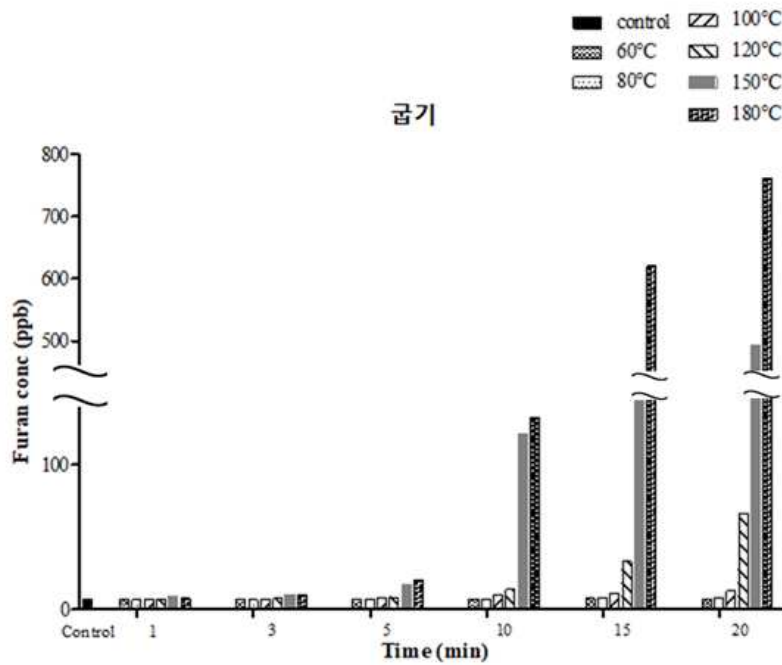


Fig 52. 고춧가루(굽기)에서의 퓨란 함량 결과

- 대부분의 식품의 경우 온도조건에 대하여 0차 혹은 1차 반응을 따름. 고춧가루의 경우 1차 반응 조건을 만족함. 이를 바탕으로 퓨란 Kinetics 연구를 위하여 온도조건에 의존적인 속도 상수를 구하고자 아레니우스 방정식을 활용하여 활성화 에너지를 구함.

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad \ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right)$$

k = Rate constant
A = Pre-exponential factor
E_a = Activation energy
R = Gas constant
T = Absolute temperature, K

Fig 53. 아레니우스 속도 방정식

- 아레니우스 방정식을 통하여 활성화 에너지를 구하기 위해서는 각 온도조건에서 시간의 변화에 따른 1차 함수식을 구함. 그 함수식의 기울기 값(k)를 이용하여 아레니우스 식에 적용하여 활성화 에너지를 구함. 결과는 아래 Table 51과 같음.

℃	T	1/T	k	lnk
60	333	0.003003	0.0455	-3.09004
80	353	0.002833	0.5795	-0.54559
100	373	0.002681	1.7609	0.56583
120	393	0.002545	7.2257	1.97764

150	423	0.002364	13.799	2.62460
180	453	0.002208	16.264	2.78895

Table 51. 회기분석을 이용하여 구한 결과 값

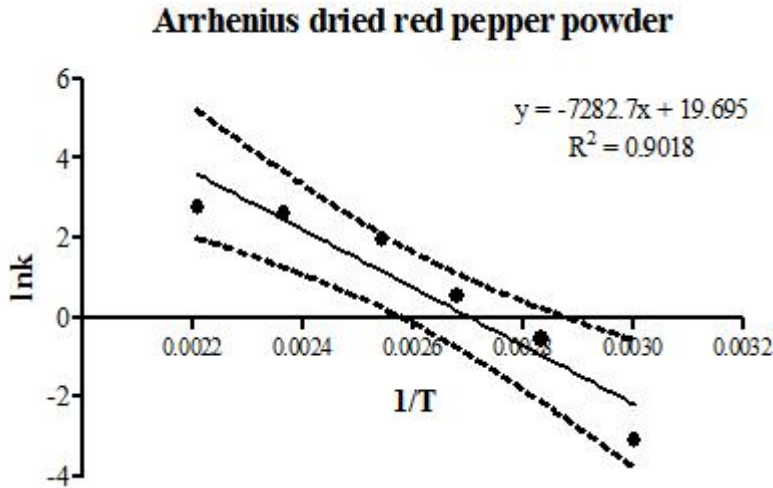


Fig 54. 회기분석을 이용하여 구한 k값을 활용하여 구한 아레니우스 식

- 회기분석을 통해 구한 기울기 값을 이용하여 아레니우스 식에 적용하여 구한 식은 다음과 같음.

$$y = -7282.7x + 19.695$$

$$R^2 = 0.9018$$

$$\text{활성화에너지}(E_a) = 60.548 \text{ kJ/mol}$$

- Kinetic parameter인 활성화 에너지를 이용하면 퓨란 생성 기작의 이해를 도울 수 있음. 퓨란 생성 기작에는 다양한 경로가 존재함. 이 중 한 가지 경로만을 설정하여 분석 시 반응경로를 정확히 예측하기 어려움. 그러나 본 실험에서 구한 kinetic parameter인 활성화 에너지를 통해 퓨란 생성량을 예측할 수 있는 기준으로 사용 가능함.

3) 김

- 우리나라는 전 세계 김 생산량의 절반 이상을 생산하는 중주국으로 최근 들어 건강식품으로써 각광받으며 전 세계적인 수요 확대와 함께 수산물 수출의 주요 품목으로 성장함.
- 퓨란은 식품의 열처리 과정에서 탄수화물, 아미노산, 지방산 그리고 비타민 등에 의해 생성되는 유해물질로 International Agency for Research Cancer (IARC)에서 Group 2B로 지정되어 있음.
- 김의 경우 대부분 가공 과정에서 열처리를 거치기 때문에 퓨란 생성의 위험이 존재하며 가정에서 조리하여 소비하는 경우에도 가열로 인한 퓨란 생성의 가능성이 있으나 이에 대한 연구가 미비한 실정임.
- 이에 본 연구에서는 시판 가공 김 중 퓨란 함량을 모니터링하고, 조리 과정(끓기, 볶기, 튀

기기)에서 퓨란 생성량의 변화를 분석하고자 함. 또한 이를 바탕으로 열처리 모델시스템을 이용한 Kinetics 연구를 수행하고자 함.

A. 김 중 퓨란 분석법 확립 및 유효성 검증

a) 퓨란 분석법 확립

- 본 연구에서는 휘발성 유기물질인 퓨란의 추출방법 중 하나인 SPME와 GC-MS를 이용한 휘발성 유기물질 분석법을 기반으로 고체 식품에서 퓨란을 분석함.
- 퓨란의 정확한 정량분석을 위하여 내부표준물질(internal standard)로 d4-퓨란을 선정함.
- 퓨란의 분석은 SIM 모드를 통해 표적이온을 39, 42, 68, 72m/z로 하여 진행하였음. 퓨란 정성분석을 위한 이온은 39와 42 m/z를 이용하였고 d4-퓨란 정성분석을 위한 이온은 68과 72 m/z를 이용하였음. 퓨란과 d4-퓨란 정량을 위한 이온 비율은 39와 68 m/z를 이용함.
- 분석용 컬럼은 HP Plot-Q (15 m, 0.32 mm I.D. 20 μm film)을 사용하였고, SPME fiber는 Supelco사의 Carboxen/Poludimethylsiloxane (CAR/PDMS)를 사용함. 균질기는 독일 IKAR-WERKE 사의 ULTRA-TURRAXR T25basic 모델을 사용하며, vial은 미국 Aglient 사의 20 mL headspace vial을 사용함. GC 기기 조건은 다음과 같음.

SPME	
SPME fiber	75 μm Carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS)
GC	
Instrument	Agilent Technologies 7820A
Carrier gas	1.5 mL/min Helium (constant flow)
Column	HP-PLOT Q (15 m x 0.32 mm, 20 μm film, J & W Scientific, Folsom, CA)
Inlet temperature	250 °C
Purge flow rate	50 mL/min for 1 min
Oven temperature Gradient	50 °C for 5 min, 25 °C/min to 230 °C held for 2 min
Injection mode	Splitless mode
MS	
Instrument	Agilent Technologies 5977E
Fragmentation Mode	Electron impact at 70eV
SIM	m/z 39, 68, 42, 72

Table 52. 퓨란 분석 기기 조건

b) 유효성 검증

- 확립된 분석방법의 신뢰성을 검증하기 위해 미국 FDA (Food and Drug Administration) 및 AOAC 에서 제시한 가이드라인 방법에 따라 직선성(Linearity), 정밀도[Precision: 일 내정밀

도(Inter-day precision), 일간정밀도(Intra-day precision)], 회수율(Recovery), 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ) 등을 확인하여 검증함(AOAC International, 2007, Codex Alimentarius, 2003, Food and Drug Administration, 1997).

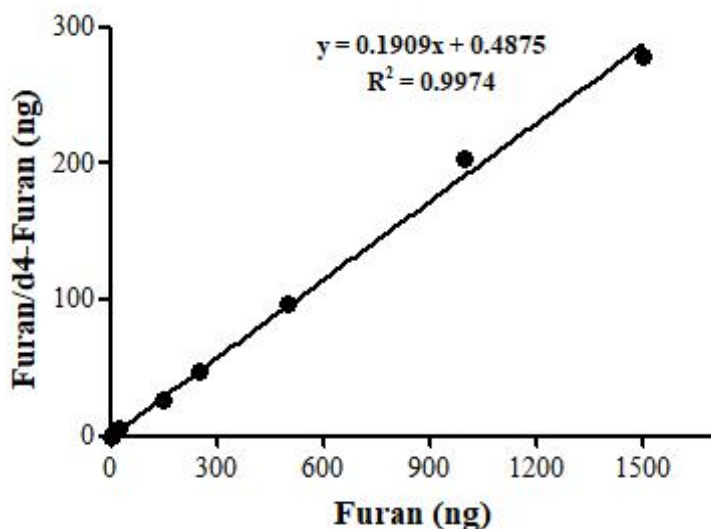


Fig 55. 퓨란의 검량곡선

- 퓨란 정량을 위해 6가지 농도조건을 이용하여 검량 곡선을 작성하였음, 검량곡선에서 얻어진 표준물질인 퓨란과 내부표준물질인 d4-furan의 정량이온 피크에 대한 면적비를 구하여 y축으로 하고 표준물질의 농도를 x축으로 하여 검량 곡선을 작성함. 최소 제곱 회귀분석법을 이용하여 최종적으로 구한 검량 곡선은 다음과 같음.

$$y = 0.1909x + 0.4875$$

$$r^2 = 0.9974$$

- 정밀도와 회수율을 구하기 위하여 동일한 조건하에 동일한 장비를 사용하여 3가지 농도(1, 50, 100 ng/mL)에서 실험을 진행하였으며, 각 농도별 실험 샘플 수는 5샘플로 진행하였음. 일간 정밀도는 5일간 진행하였음.

Equation	Linearity	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
	Correlation Coefficient (r ²)		
y = 0.1909x + 0.4875	0.9974	0.22	0.66

Table 53. 직선성 확인 및 검출한계, 정량한계

Concentration (ng/mL)	Precision (% RSD)		Recovery (%)
	Intraday	Interday	
1	5.43	3.43	117.78
50	3.44	6.72	101.35
100	2.64	2.41	89.30

Table 53. 정밀도 및 회수율

B. 시판 가공 김 중 퓨란 분석

- 시중에 유통되는 가공 김 중 총 20종의 퓨란 함량을 분석함.

Sample type	Sample name	Company	Furan (ng/g)
생김	R001	A	18.89 ± 1.59 ^g
	R002	B	9.03 ± 2.63 ^{a,b}
	R003	B	10.03 ± 2.58 ^{a,b,c}
김밥김	G001	C	11.54 ± 1.06 ^{b,c,d}
	G002	B	15.41 ± 1.52 ^{e,f}
조미김	S001	D	1.074 ± 0.78 ^{a,b,c}
	S002	D	12.51 ± 0.40 ^{c,d}
	S003	E	18.11 ± 1.23 ^{f,g}
	S004	E	17.38 ± 1.12 ^{f,g}
	S005	F	13.63 ± 1.33 ^{d,e}
	S006	F	24.23 ± 2.05 ^h
	S007	B	22.57 ± 3.10 ^h
	S008	G	19.34 ± 1.24 ^g
	S009	G	19.19 ± 1.24 ^g
	S010	B	11.63 ± 0.41 ^{b,c,d}
	S011	G	9.29 ± 0.33 ^{a,b}
	S012	F	7.96 ± 1.39 ^a
	S013	H	17.49 ± 1.57 ^{f,g}
김자반	J001	B	15.73 ± 0.32 ^{e,f}
김부각	B001	I	24.21 ± 0.85 ^h

Table 54. 시판 가공 김 중 퓨란 함량

C. 조리법에 따른 김 중 퓨란 함량 분석

- 생김(R001, A company)을 이용하여 실험 진행함.
- 총 3가지 조리법(굽기, 볶기, 튀기기)으로 분류하여 퓨란 함량을 분석함.
- 굽기의 경우 4개 온도 범위에서 앞면, 뒷면을 10초간 조리하여 샘플을 준비함.
- 볶기의 경우 4개 온도 범위에서 샘플 4g 당 기름 9mL를 첨가하여 3분간 조리하여 준비함.
- 튀기기의 경우 3개 온도 범위에서 샘플 24g 당 기름 450mL를 첨가하여 20초간 조리하여 준비함.

샘플유형	시료명	온도 (°C)	Furan (ng/g)
control	control	-	22.10 ± 2.25 ^{a,b}
굽기	G1	162	20.38 ± 2.84 ^{a,A}
	G2	203	22.81 ± 2.77 ^{a,b,A}
	G3	257	49.54 ± 4.82 ^{c,B}
	G4	325	487.31 ± 27.28 ^{f,C}
볶기	B1	162	20.47 ± 2.67 ^{a,A}
	B2	207	38.03 ± 2.77 ^{b,c,B}

	B3	260	77.03 ± 1.54 ^{d,C}
	B4	310	659.18 ± 13.92 ^{g,D}
튀기기	T1	185	67.69 ± 1.58 ^{d,A}
	T2	210	80.02 ± 3.83 ^{d,B}
	T3	247	123.73 ± 6.02 ^{e,C}

Table 55. 김의 조리법에 따른 퓨란 함량

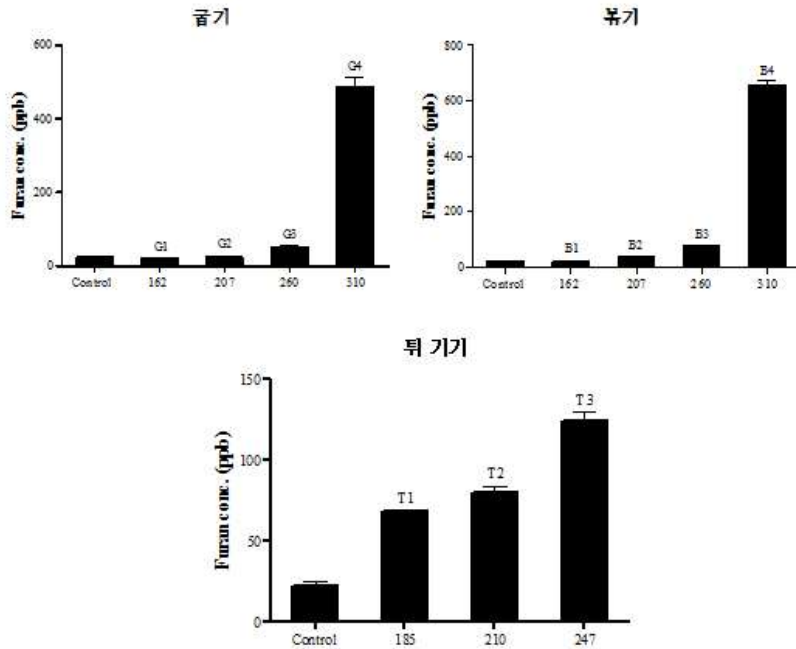


Fig 56. 김의 조리법에 따른 퓨란 함량

- 세 가지 조리법에 따라 20.98 ± 2.84 - 659.18 ± 13.92 ng/g의 퓨란 함량이 검출됨.
- 온도가 증가함에 따라 세 조리법 모두 퓨란 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 복기에서의 증감률이 가장 큰 것을 확인하였음.
- 유사한 온도에서 기름의 첨가 유무에 따라 끓기와 복기로 나누어 비교한 결과 기름이 첨가되었을 때 퓨란 함량이 더 크고 증감률 역시 더 큰 것을 통해 기름이 퓨란 생성에 영향을 미쳤을 것이라 예상됨.
- 조리법 간의 온도 범위가 다양하기 때문에 정확한 비교가 어려운 실정이므로 끓기를 열처리 모델 시스템으로 선정하여 열용량에 따른 퓨란 생성 Kinetics 연구를 수행함.

D. 김의 열처리 모델시스템(끓기)을 활용한 Kinetics 연구

온도 (°C)	시간 (s)						
160	10	20	30	40	50	60	
170	10	20	30	40	50	60	
180	10	20	30	40	50	60	
190	10	20	30	40	50	60	
200	10	20	30	40	50	60	

Table 56. 김(굽기) 열처리 모델시스템의 온도, 시간 조건

- 열처리 모델시스템에 따라서 위와 같이 6가지 온도와 6가지 시간 조건에서 실험을 진행함.
- 온도 범위와 시간 범위가 밀집되어 있기 때문에 신뢰성 있는 결과를 얻기 위하여 열원으로 오븐을 이용하여 실험을 수행함.

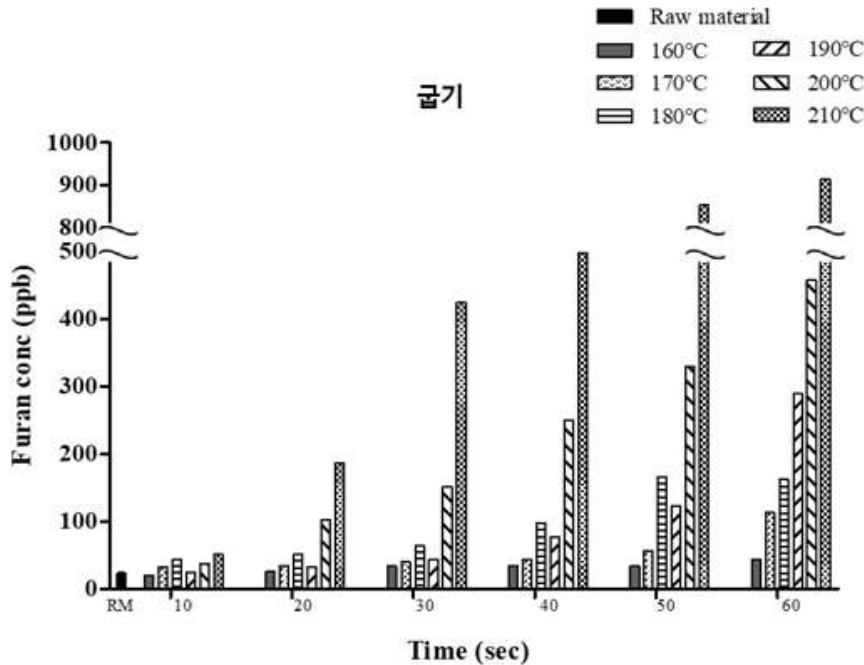


Fig 57. 열처리 모델시스템에 따른 퓨란 함량

- 결과 데이터를 회기분석하여 각 온도 조건에 해당하는 기울기 값을 구함. 기울기 값은 퓨란 Kinetics 연구에 사용함.
- 대부분의 식품의 경우 온도조건에 대하여 0차 혹은 1차 반응을 따름. 김의 경우 1차 반응 조건을 만족함. 이를 바탕으로 퓨란 Kinetics 연구를 위하여 온도조건에 의존적인 속도상수를 구하고자 아레니우스 방정식을 활용하여 활성화 에너지를 구함.

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad \ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right)$$

k = Rate constant
 A = Pre-exponential factor
 E_a = Activation energy
 R = Gas constant
 T = Absolute temperature, K

Fig 58. 아레니우스 속도 방정식

- 아레니우스 방정식을 통하여 활성화 에너지를 구하기 위해서는 각 온도조건에서 시간의 변화에 따른 1차 함수식을 구함. 그 함수식의 기울기 값(k)를 이용하여 아레니우스 식에 적용하여 활성화 에너지를 구함. 결과는 아래 Table 57과 같음.

℃	T	1/T	k	lnk
170	433	0.002309469	50.485	3.921676262
180	443	0.002257336	82.001	4.406731442
190	453	0.002207506	107.93	4.681482869
200	463	0.002159827	174.61	5.162554916
210	473	0.002114165	171.13	5.142423502
220	483	0.002070393	197.79	5.325932534

Table 57. 회기분석을 이용하여 구한 결과 값

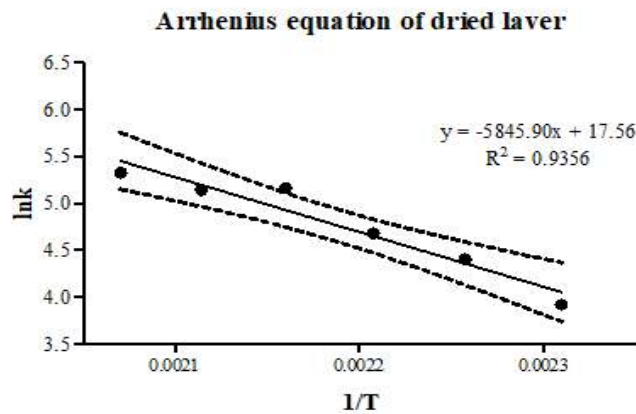


Fig 59. 회기분석을 이용하여 구한 k값을 활용하여 구한 아레니우스 식

- 회기분석을 통해 구한 기울기 값을 이용하여 아레니우스 식에 적용하여 구한 식은 다음과 같음.

$$y = -5845.9x + 17.56$$

$$R^2 = 0.9356$$

$$\text{활성화에너지}(E_a) = 48.603 \text{ kJ/mol}$$

- Kinetic parameter인 활성화 에너지를 이용하면 푸란 생성 기작의 이해를 도울 수 있음. 푸란 생성 기작에는 다양한 경로가 존재함. 이 중 한 가지 경로만을 설정하여 분석 시 반응경로를 정확히 예측하기 어려움. 그러나 본 실험에서 구한 kinetic parameter인 활성화 에너지를 통해 푸란 생성량을 예측할 수 있는 기준으로 사용 가능함.

㉔ 식품첨가물을 활용한 캐러멜 색소 개발을 통한 유해물질(4-MI) 저감화

- 식품의 열처리를 수반한 제조과정 중 메일라드 반응을 통해 생성된다고 알려진 4-MI는 캐러멜 색소가 첨가되는 식품군(커피, 간장, 흑맥주, 청량음료 등)에서 다량 검출됨. 캐러멜 반응 수준에서의 저감화, 간장과 같은 식품에서의 저감화 등 다양한 저감화 연구가 선행되었으나 식품 중 4-MI의 주요원인이 되는 캐러멜 색소에 적용된 연구사례는 미비함.

- 제조 공정 중 암모늄 이온이 첨가되는 캐러멜 색소 제 III, IV형의 경우 매우 높은 농도의 4-MI가 검출된 선행 연구 자료를 바탕으로 본 연구에서는 제 III형 캐러멜 색소에 여러 첨가물들을 가하여 4-MI 저감화 정도 및 색소안정성을 분석함.

1) 식품(캐러멜 색소) 중 4-MI (4-methylimidazole) 분석법 확립 및 유효성 검증

A. 4-MI 분석법 확립

- 본 연구에서는 캐러멜 색소 중 4-MI 분석을 위해 Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) 이용.

GC	
Instrument	Agilent Technologies 7820A
Carrier gas	1.0 mL/min Helium (constant flow)
Column	HP-5ms UI (30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m film, J & W Scientific, Folsom, CA)
Inlet temperature	270 $^{\circ}$ C
Oven temperature	80 $^{\circ}$ C for 1 min, 30 $^{\circ}$ C/min to 280 $^{\circ}$ C held for 2 min
Gradient	
Injection mode	Splitless mode
MS	
Instrument	Agilent Technologies 5977E
Fragmentation Mode	Electron impact at 70eV
SIM	m/z 82, 109, 182 for 4-MI m/z 95, 123, 196 for 2-EI

Table 58. 4-MI 분석 기기 조건

B. 유효성 검증

- 확립된 분석방법의 신뢰성을 검증하기 위해 미국 FDA (Food and Drug Administration) 및 AOAC 에서 제시한 가이드라인 방법에 따라 직선성(Linearity), 정밀도[Precision: 일 내정밀도(Inter-day precision), 일간정밀도(Intra-day precision)], 회수율(Recovery), 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ) 등을 확인하여 검증함(AOAC International, 2007, Codex Alimentarius, 2003, Food and Drug Administration, 1997).

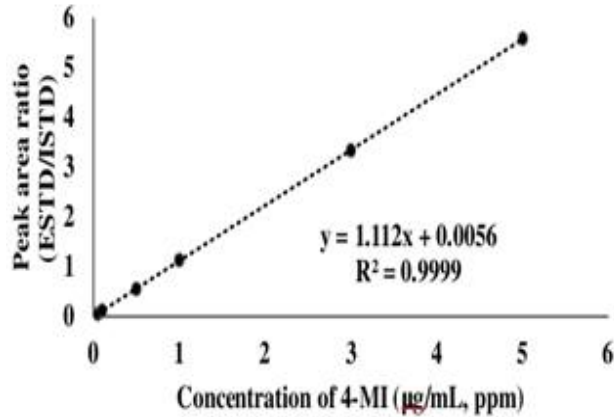


Fig 60. 4-MI의 검량곡선

Equation	Linearity Correlation Coefficient (r ²)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
y = 1.1120x + 0.0056	0.9999	14.56	44.11

Table 59. 직선성 확인 및 검출한계, 정량한계

Concentration (ppm)	Precision (% RSD)		Recovery (%)
	Intraday	Interday	
0.05	7.94	5.10	117.78
0.1	8.48	4.82	101.35
1.0	4.66	5.32	89.30

Table 60. 정밀도 및 회수율

- 캐러멜 색소 중 4-MI의 정확한 정량분석을 위하여 내부표준물질(internal standard)로 2-EI (2-ethylimidazole)를 선정함
- 4-MI 정량을 위해 6가지 농도조건(0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 µg/mL)을 이용하여 검량 곡선을 작성하였음. 검량곡선에서 얻어진 표준물질인 4-MI과 내부표준물질인 2-EI의 정량이온 피크에 대한 면적비를 구하여 y축으로 하고 표준물질의 농도를 x축으로 하여 검량 곡선을 작성함. 최소 제곱 회귀분석법을 이용하여 최종적으로 구한 검량 곡선은 다음과 같음.

$$y = 1.1120x + 0.0056$$

$$r^2 = 0.9999$$

- 정밀도와 회수율을 구하기 위하여 동일한 조건하에 동일한 장비를 사용하여 3가지 농도 (0.05, 0.1, 1.0 µg/mL)에서 실험을 진행하였으며, 각 농도별 실험 샘플 수는 5샘플로 진행하였음. 일간 정밀도는 5일간 진행하였음.

2) 실험결과

A. 제 III형 캐러멜 색소 모델시스템 구축

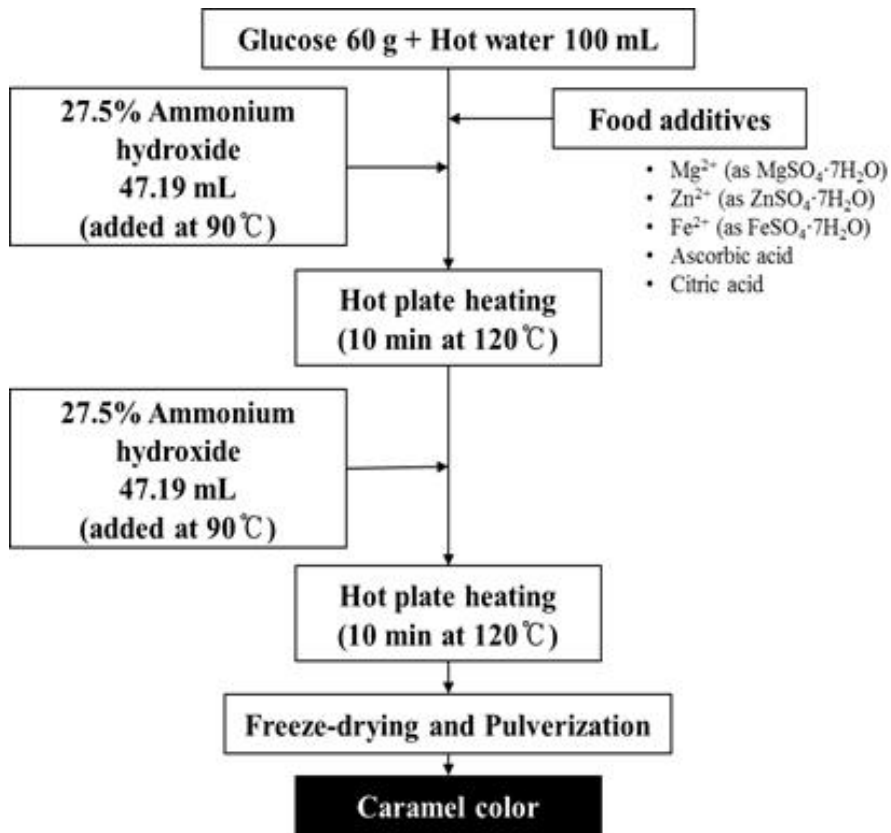


Fig 61. 캐러멜 색소 모델시스템

- 식용 포도당과 암모늄이온을 물 비율 1:2로 혼합, 가열하여 캐러멜 색소를 제조함.
- 시판 캐러멜 색소와 유사한 성상 및 color intensity를 나타내는지 비교 분석함(상업적으로 사용되는 캐러멜 색소의 경우 color intensity : 0.08-0.36, Hue index : 5.1-5.5 의 범위를 가짐).
- 만들어진 모델시스템에 기존 특허 논문에서 다뤄진 4-MI 저감화 첨가물로 알려진 금속이온 3종(Mg²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺)과 유기산 2종(Ascorbic acid, Citric acid)을 첨가하여 총 15개의 모델시스템을 구축함.

Model system		Molar ratio	사용량 (g)
Basic materials	Glucose	1	60.0
	Ammonium hydroxide	2	94.38 mL
Additives	Mg ²⁺ (as MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.01	0.82
		0.05	4.11
		0.1	8.22
	Zn ²⁺ (as ZnSO ₄ · 7H ₂ O)	0.01	0.96
		0.05	4.79
		0.1	9.59
	Fe ²⁺ (as FeSO ₄ · 7H ₂ O)	0.01	0.93
		0.05	4.63
		0.1	9.27
	Ascorbic acid	0.01	0.59
		0.05	2.94
		0.1	5.87
	Citric acid	0.01	0.64
		0.05	3.20
		0.1	6.40

Table 61. 캐러멜 색소 모델시스템

B. 제 III형 캐러멜 색소 모델시스템의 Color intensity & Hue index 평가

Model system		Molar ratio	Color intensity*	Hue index**
Basic materials	Glucose	1	-	-
	Ammonium hydroxide	1 X 2	-	-
Additives	Control	0	0.251 ^l	5.44 ^e
	Mg ²⁺ (as MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.01	0.282 ⁿ	5.32 ^d
		0.05	0.249 ^k	5.49 ^f
		0.1	0.178 ^e	5.66 ⁱ
	Zn ²⁺ (as ZnSO ₄ · 7H ₂ O)	0.01	0.127 ^a	5.98 ^m
		0.05	0.178 ^e	5.79 ^k
		0.1	0.168 ^d	5.67 ⁱ
	Fe ²⁺ (as FeSO ₄ · 7H ₂ O)	0.01	0.183 ^f	5.60 ^g
		0.05	0.232 ⁱ	5.17 ^b
		0.1	0.201 ^h	4.98 ^a
	Ascorbic acid	0.01	0.189 ^g	5.64 ^h
		0.05	0.152 ^c	5.75 ^j
		0.1	0.132 ^b	5.88 ^l
	Citric acid	0.01	0.133 ^b	5.88 ^l
		0.05	0.255 ^m	5.33 ^d
0.1		0.245 ^j	5.19 ^c	

1) All values are shown as mean ± S.D. (standard deviation) (n=3)

2) Lowercase letters in a given column (series "a-m") indicate significant (p < 0.05) differences.

* Commercially available caramel colors usually have a color intensity of 0.08-0.36.

** Commercially available caramel colors usually have a hue index range of 3.5-7.5

Table 62. Color intensity 및 Hue index

C. 캐러멜 색소 모델시스템에서의 4-MI 분석

- 총 15개의 모델시스템에서의 4-MI 분석 결과 311.43-4727.42 $\mu\text{g/g}$ 으로 최대 67.7%의 저감화 능력을 확인함.
- Mg^{2+} 와 ascorbic acid의 경우 농도에 관계없이 4-MI 저감화 능력이 있음을 확인함.
- Fe^{2+} 와 citric acid의 경우 첨가물의 농도가 높아짐에 따라 4-MI 저감화 능력이 증가함을 확인함.
- Zn^{2+} 의 경우 캐러멜 색소 내의 4-MI 생성량이 증가되었음을 확인함.

Model system		Molar ratio	Level of 4-MI ($\mu\text{g/g}$)	Reduction (%)
Basic materials	Glucose	1	-	-
	Ammonium hydroxide	1 X 2	-	-
Additives	Control	0	963.10 \pm 119.78 ^d	-
	Mg^{2+} (as $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01	697.01 \pm 97.16 ^{b,c,d}	27.6
		0.05	634.81 \pm 59.33 ^{a,b,c,d}	34.1
		0.1	703.09 \pm 98.49 ^{b,c,d}	27.0
	Zn^{2+} (as $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01	2694.28 \pm 186.34 ^g	-179.8
		0.05	2192.41 \pm 389.69 ^f	-127.9
		0.1	4727.47 \pm 575.49 ^h	-390.9
	Fe^{2+} (as $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01	1325.47 \pm 204.19 ^e	-37.6
		0.05	675.37 \pm 91.82 ^{b,c,d}	29.9
		0.1	464.41 \pm 25.05 ^{a,b,c}	51.8
	Ascorbic acid	0.01	842.53 \pm 106.40 ^d	12.5
		0.05	671.70 \pm 39.27 ^{b,c,d}	30.3
		0.1	745.52 \pm 81.07 ^{c,d}	22.6
	Citric acid	0.01	1352.49 \pm 181.14 ^e	-40.4
		0.05	349.59 \pm 50.56 ^{a,b}	63.7
0.1		311.43 \pm 20.47 ^a	67.7	

1) All values are shown as mean \pm S.D. (standard deviation) (n=3)

2) Lowercase letters in a given column (series "a-h") indicate significant ($p < 0.05$) differences.

Table 63. 모델시스템에서의 4-MI 생성량

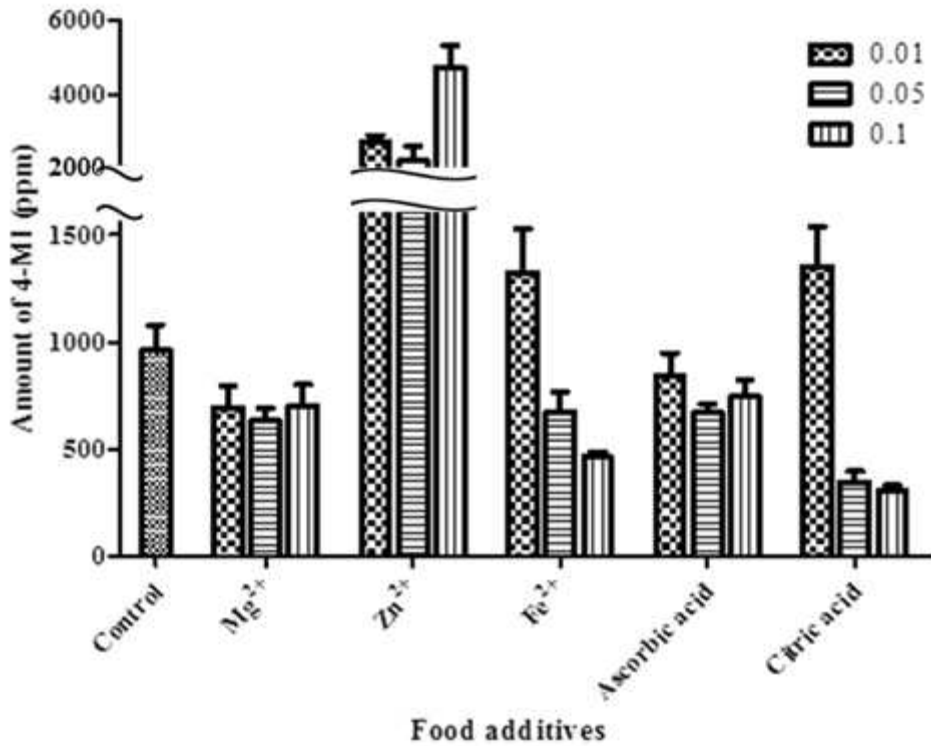


Fig 62. 모델시스템에서의 4-MI 생성량

D. 캐러멜 색소 모델시스템에서의 색소 안정성 평가

- 모델시스템의 색소 안정성을 평가하기 위해 다음과 같은 조건으로 실험을 진행함.

색소 안정성 시험 조건	
pH x Storage	각각 pH (2.0, 4.0, 7.0)에서 72시간 동안 저장
pH x Heating	각각 pH (2.0, 4.0, 7.0)에서 20분 동안 80°C로 가열
Alcohol x Storage	50% Alcohol 용액에서 28일 동안 저장

Table 64. 색소 안정성 시험 조건

- 4-MI 저감화 첨가물 중 Mg²⁺ 및 ascorbic acid를 첨가한 경우, 대부분의 pH 및 온도 조건, alcohol 조건에서 색소 안정성이 향상됨.

Additives	Reduction of 4-MI (%)	Color stability (ΔE variation)						
		pH-storage (72 h)			pH-80°C heat (20 min)			50% alcohol (28 day)
		pH 2	pH 4	pH 7	pH 2	pH 4	pH 7	

Control	-		(-1.589) ^{f,g}	(-0.507) ^{e,f}	(0.511) ^g	(-0.426) ^e	(-1.003) ^d	(-0.600) ^e	(1.403) ^g
Mg ²⁺	0.01	27.6	-	-	+	-	-	+	+
			(-2.297) ^d	(-1.173) ^c	(0.073) ^{e,f}	(-0.880) ^c	(-1.353) ^c	(-0.593) ^e	(0.310) ^{c,d}
	0.05	34.1	-	-	-	-	-	+	+
			(-1.910) ^e	(-0.803) ^d	(1.083) ^h	(-0.680) ^d	(-1.143) ^d	(-0.523) ^f	(0.747) ^e
	0.1	27.0	+	-	+	+	+	+	+
			(-1.483) ^g	(-0.833) ^d	(-0.100) ^{d,e}	(-0.167) ^f	(-0.747) ^f	(-0.573) ^e	(0.430) ^d
Zn ²⁺	0.01	-179.8	+	+	+	+	+	+	+
			(-1.173) ^h	(-0.383) ^f	(-0.383) ^{b,c}	(-0.063) ^{f,g}	(-0.740) ^f	(-0.440) ^g	(-0.157) ^a
	0.05	-127.6	-	-	-	-	-	-	+
			(-2.537) ^c	(-1.187) ^c	(-0.547) ^b	(-0.747) ^{c,d}	(-1.620) ^b	(-0.863) ^c	(0.133) ^{b,c}
	0.1	-390.9	-	-	-	-	-	-	+
			(-2.517) ^c	(-1.890) ^a	(-1.023) ^a	(-1.280) ^b	(-1.880) ^a	(-1.083) ^b	(-0.213) ^a
Fe ²⁺	0.01	-37.6	-	+	+	+	+	-	+
			(-1.687) ^f	(-0.473) ^{e,f}	(0.010) ^{d,e}	(-0.393) ^e	(-0.790) ^{e,f}	(-0.670) ^d	(0.117) ^{b,c}
	0.05	29.9	-	-	+	-	-	-	~
			(-3.763) ^a	(-1.527) ^b	(0.093) ^{e,f}	(-1.587) ^a	(-1.633) ^b	(-1.427) ^a	(-6.733~ 1.050)
	0.1	51.8	-	-	-	-	-	-	~
			(-3.007) ^b	(-1.787) ^a	(0.850) ^h	(-1.557) ^a	(-1.633) ^b	(-1.427) ^a	(-4.350~ 4.927)
AA [*]	0.01	12.5	+	+	+	+	+	+	+
			(-1.283) ^h	(-0.387) ^f	(0.297) ^{f,g}	(0.027) ^{g,h}	(-0.643) ^f	(-0.217) ⁱ	(0.783) ^e
	0.05	30.3	+	-	+	+	+	+	+
			(-0.627) ^j	(-0.567) ^e	(0.297) ^{f,g}	(0.167) ^h	(-0.380) ^g	(-0.320) ^h	(0.203) ^{b,c,d}
	0.1	22.6	+	-	+	+	+	+	+
			(-0.913) ^j	(-0.743) ^d	(-0.220) ^{c,d}	(0.023) ^{g,h}	(-0.963) ^{d,e}	(-0.570) ^e	(-0.010) ^{a,b}
CA ^{**}	0.01	-40.4	+	+	+	+	+	+	+
			(-0.460) ^j	(-0.350) ^f	(0.023) ^{d,e}	(0.357) ⁱ	(-0.440) ^g	(-0.230) ⁱ	(-0.040) ^{a,b}
	0.05	63.7	-	-	+	-	-	+	-
			(-2.090) ^e	(-1.197) ^c	(-0.070) ^{d,e}	(-0.780) ^{c,d}	(-1.580) ^b	(-0.193) ⁱ	(2.790) ^h
	0.1	67.7	-	-	-	-	-	-	+
			(-2.357) ^{c,d}	(-1.517) ^b	(-1.023) ^a	(-0.730) ^{c,d}	(-1.573) ^b	(1.197) ^j	(0.967) ^{e,f}

1) All values were measured in triplicate and shown as average. (n=3)
2) Lowercase letters in a given column (series "a-j") indicate significant (p < 0.05) differences.
3) Compared to the control : + (more stable, closer to 0), - (more unstable, farther from 0), ~ (widely fluctuating)
* Ascorbic acid
** Citric acid

Table 65. 색소안정성 시험 결과

- 첨가제로써 Mg²⁺ 및 ascorbic acid를 사용한 경우 4-MI 저감화 능력과 함께 대부분의 pH 및 온도, alcohol 조건에서 색소 안정성이 향상된 것을 확인함.
- 본 연구결과는 캐러멜 색소의 4-MI 분석연구와 첨가물을 활용하여 개발된 캐러멜 색소 모델 시스템이 상업적으로 활용될 수 있을 것으로 판단됨.

서울대 상세 내용

㉔ 시뮬레이션 예측 모델 개발을 통한 신기술의 산업화 적용 기반 확립

- 시뮬레이션 예측 모델 개발을 위해 다음과 같은 흐름으로 진행함

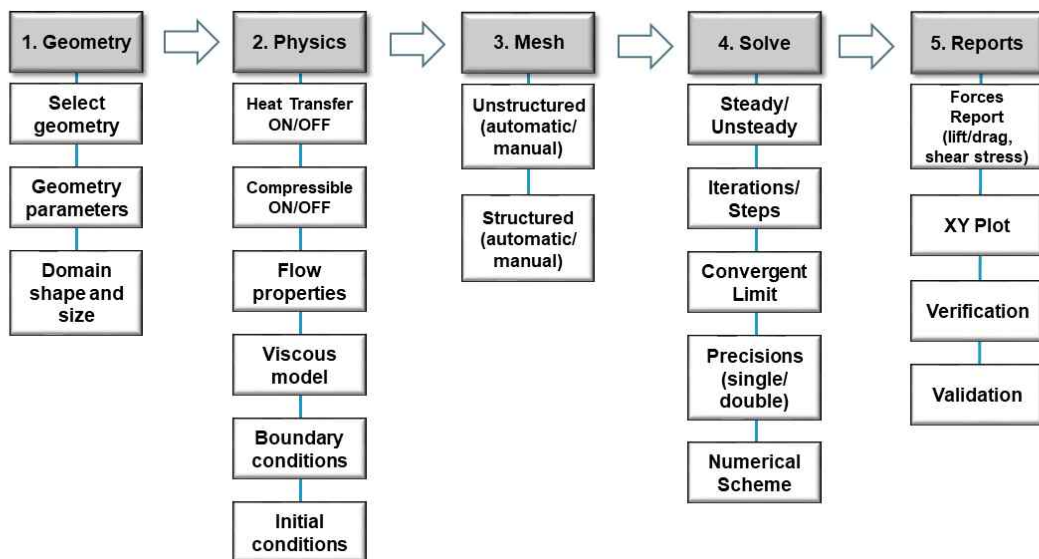
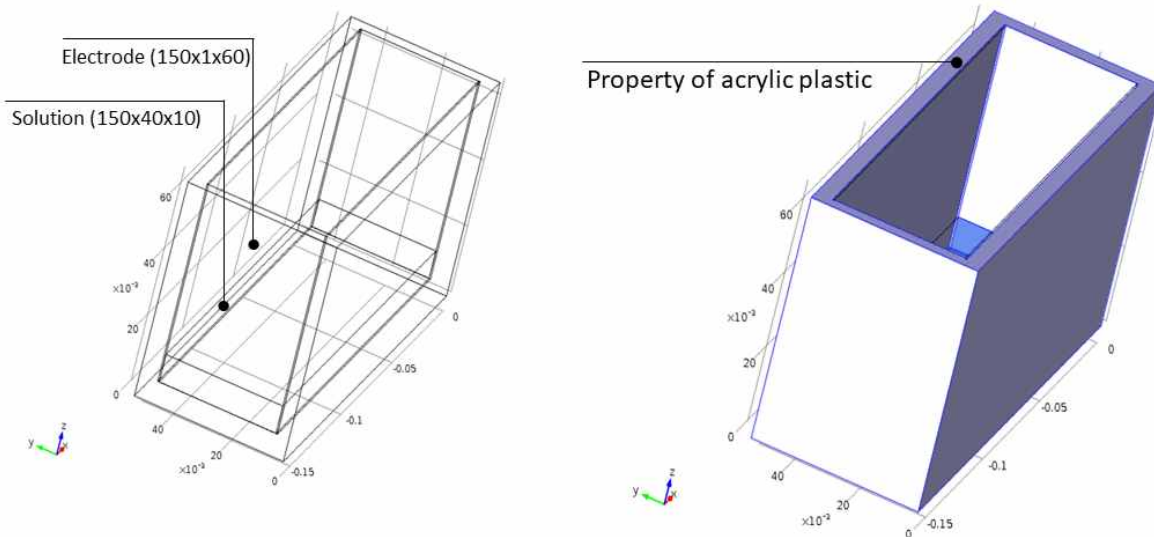


Fig 63. Comsol physics flow chart

- Ohmic heating



Ohmic heating 적용 chamber를 도식 후 각 부분에 대해서 소재의 종류를 입력하고 소재에 따른 특성 값을 대입한다.

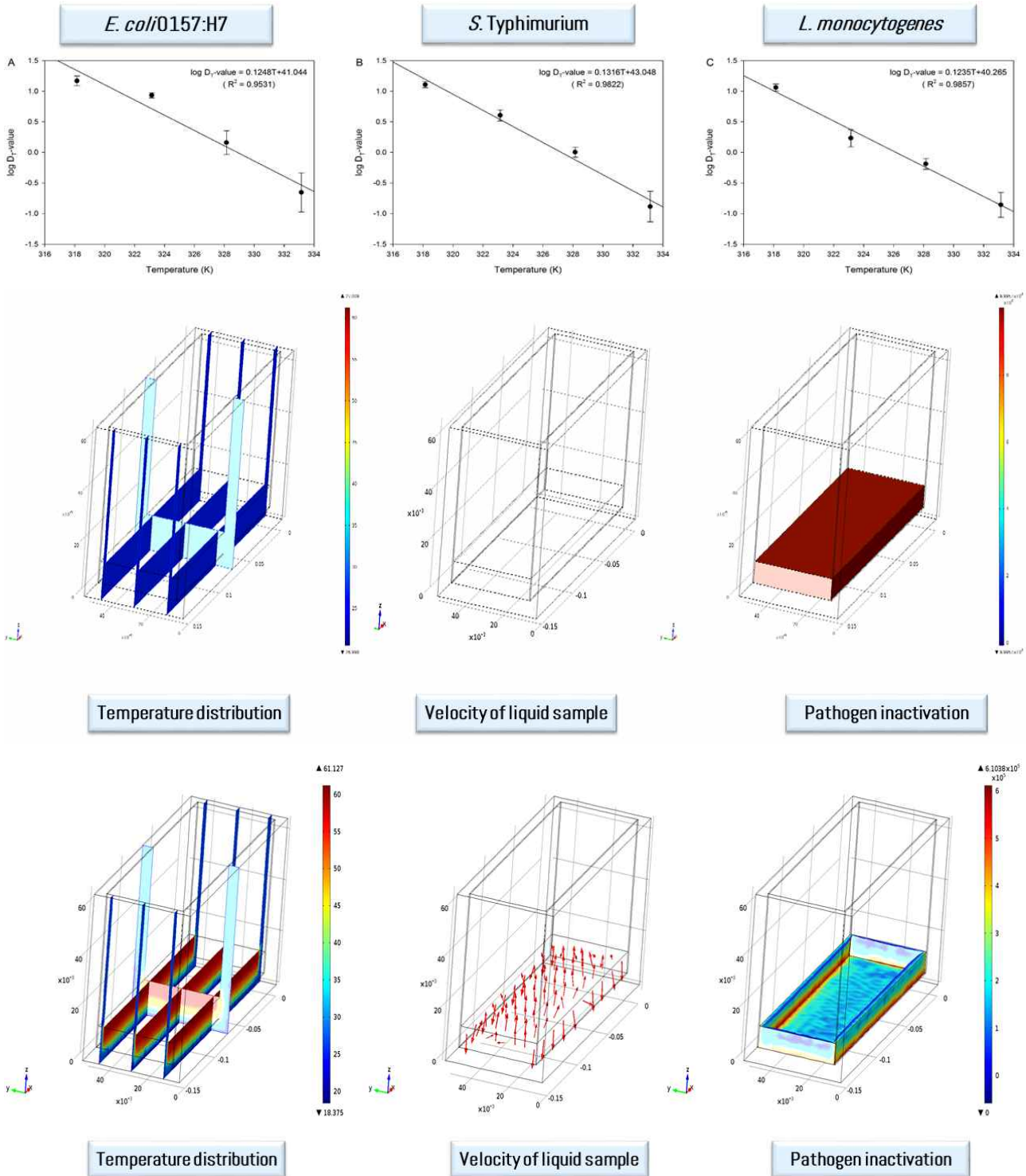
Material properties	Unit	Tomato juice	Titanium	Acrylic plastic
Density (ρ)	kg/m ³	-0.0003T ² -0.0337T+1061.8	4,940	1,760
Thermal conductivity (k)	W/(m·K)	-0.000006T ² +0.0017T+0.5428	7.5	0.1
Specific heat (c_p)	J/(kg·K)	0.0042T ² +0.1359T+3882.9	710	1,000
Electrical conductivity (σ)	S/m	-0.00003T ² +0.0068T+0.1417	74,070	0

Table 66. Chamber의 특성 값

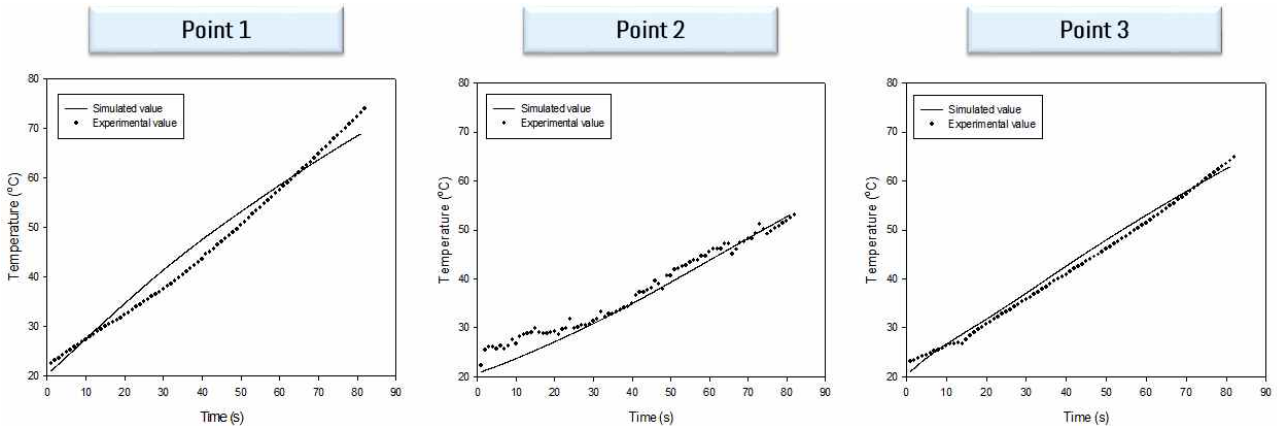
Ohmic heating에 대한 각 미생물의 D-value, Z-value를 계산하고 해당 값을 통해 미생물 제어 효과를 예측한다.

Bacterium	D-value (min)				z-value (°C)
	45	50	55	60	
E ¹	14.90 ± 2.58	8.60 ± 0.83	1.55 ± 0.75	0.26 ± 0.16	8.13 ± 1.21
S	12.87 ± 1.47	4.09 ± 0.87	1.02 ± 0.19	0.14 ± 0.07	7.68 ± 0.91
L	11.56 ± 1.54	1.78 ± 0.61	0.60 ± 0.11	0.15 ± 0.06	8.13 ± 0.50

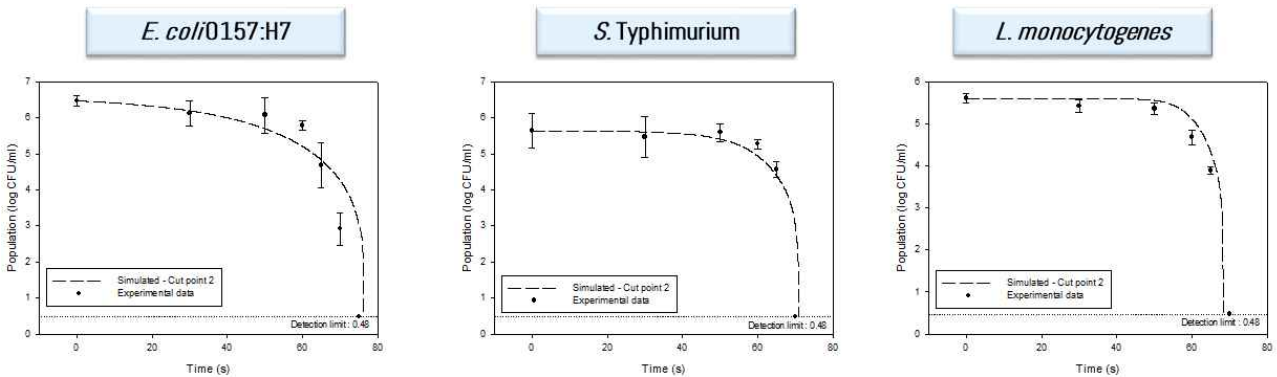
Table 67. 미생물 D-value, Z-value



- 시뮬레이션 예측 모델링을 통해 위와 같이 시스템을 구성하였고 다양한 위치에서의 온도 상승곡선의 예측값과 실제값을 비교하여 검증한다.

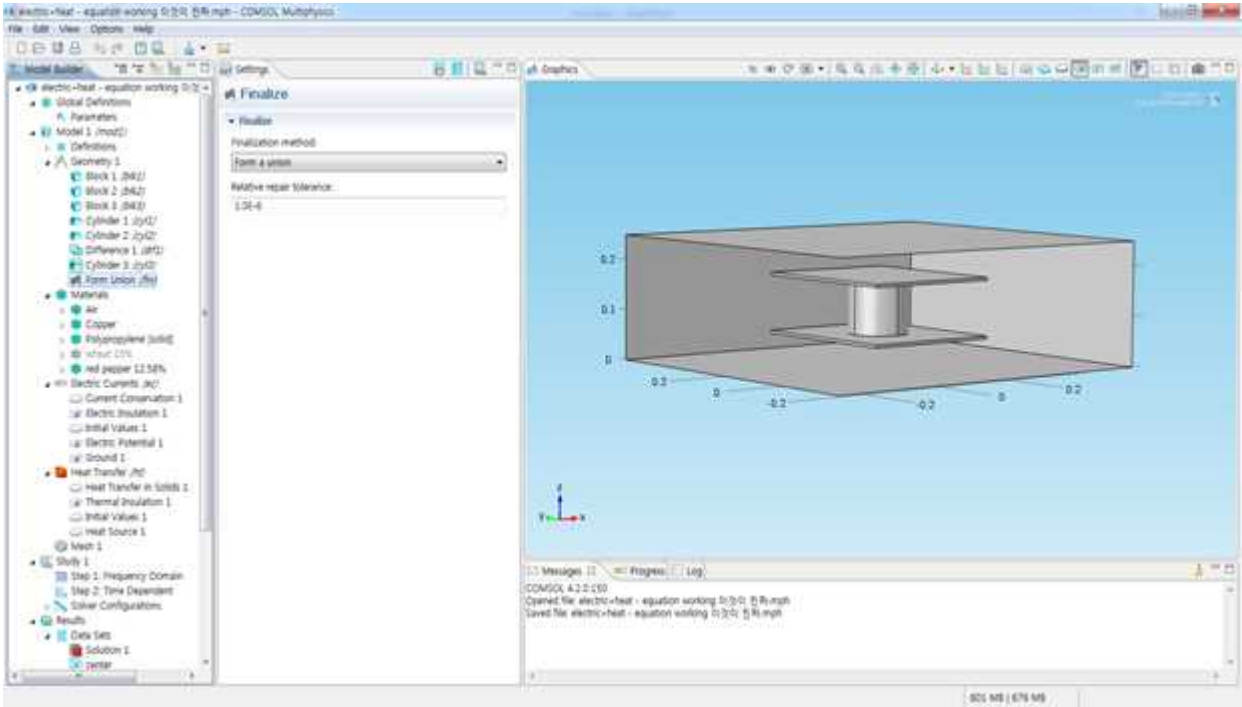


- 여러 위치에서 온도 상승 예측값과 실제값이 유사하여 시뮬레이션 예측 모델링이 잘 이루어졌음을 알 수 있다.
- 또한, 앞서 구축한 D-value, Z-value를 기반으로 ohmic heating에서의 미생물 사멸 예측값과 실제값을 비교하면 다음과 같다.



- Radio-frequency (RF)

- Comsol multiphysic를 이용하여 Radio-frequency 처리 chamber를 구성한다.



- 다양한 governing equation 식을 통해 boundary condition을 설정하고 mesh를 만들어 solver의 영역을 설정한다.

1) Maxwell's equation

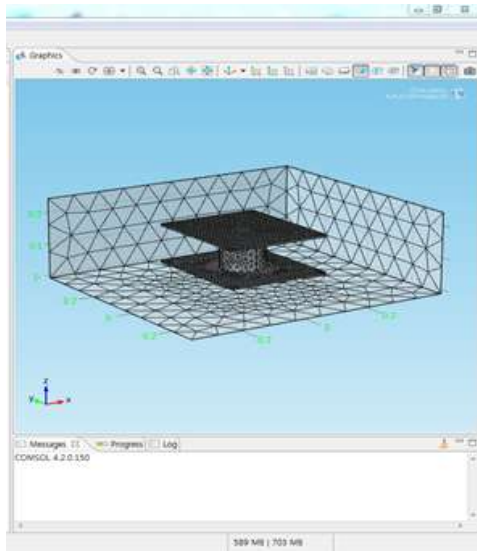
$$-\nabla \cdot ((\sigma + j2\pi f \epsilon_0 \epsilon') \nabla V) = 0$$
 σ : electric conductivity of sample (S/m)
 j : $(-1)^{0.5}$ f : frequency (Hz)
 ϵ_0 : permittivity of electromagnetic wave in free space (8.854×10^{-12} F/m)
 ϵ' : dielectric constant of sample
 V : electric potential between the two electrodes (V)

2) RF power conversion equation

$$Q = 2\pi f \epsilon_0 \epsilon'' |E|^2$$
 Q : power conversion to thermal energy in sample (W/m³)
 ϵ'' : loss factor of sample
 E : electric field intensity in sample (V/m)

3) Heat transfer equation

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \nabla \alpha \nabla T + \frac{Q}{\rho C_p}$$
 $\partial t / \partial T$: heating rate in sample (°C/s)
 α : thermal diffusivity (m²/s)
 ρ : density (kg/m³) C_p : heat capacity (J/kg·K)



- 전기적, 열역학적 factor를 설정하여 위 governing equation에 적용하여 heat treatment의 양상을 시뮬레이션 한다.

Table Electrical and thermo-physical properties of materials used for computer simulation

Material properties	Red pepper powder	Air ^a	Polypropylene ^a
Density (ρ , kg m ⁻³)	759.6	1.2	900
Thermal conductivity (k , W m ⁻¹ K ⁻¹)	$0.0002T^2 + 0.0004T + 0.1125$	0.025	0.26
Heat capacity (C_p , J Kg ⁻¹ K ⁻¹)	$-0.00001T^3 + 0.0017T^2 - 0.00437T + 2.5802$	1200	1800
Dielectric constant (ϵ')	$0.00004T^3 - 0.0058T^2 + 0.3657T - 1.974$	1	2.0
Dielectric loss factor (ϵ'')	$0.00003T^3 - 0.0039T^2 + 0.1939T - 2.578$	0	0.0023

^a COMSOL material library, V4.2.

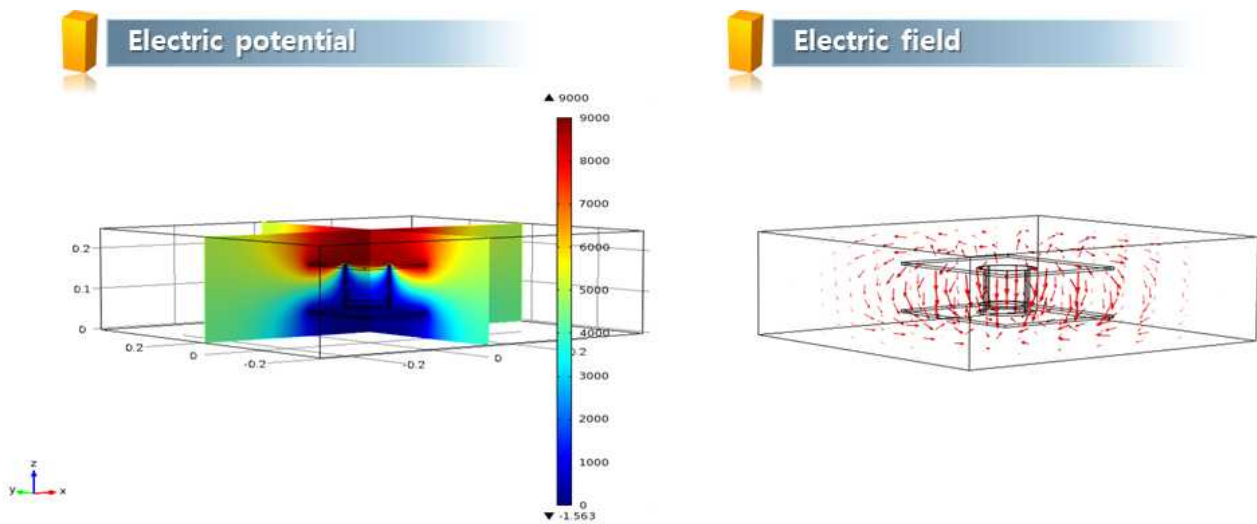


Fig. Simulated electric potential (V) and electric field distribution of red pepper powder sample after 50 s RF heating with an electrode gap of 12 cm.

- 처리 샘플의 위치별 온도 distribution을 살펴보면 다음과 같이 예측되었다.

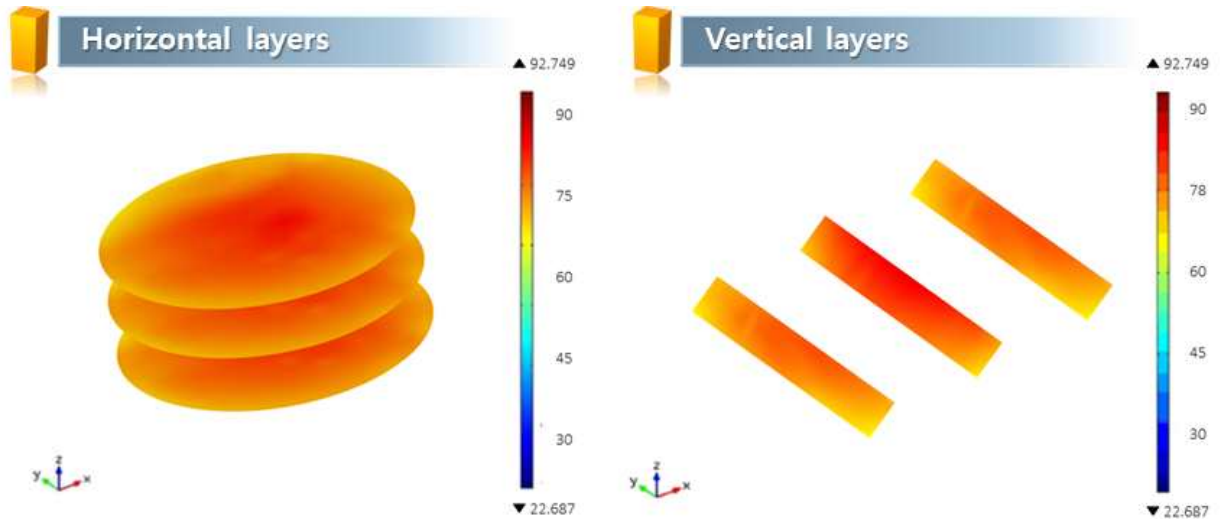
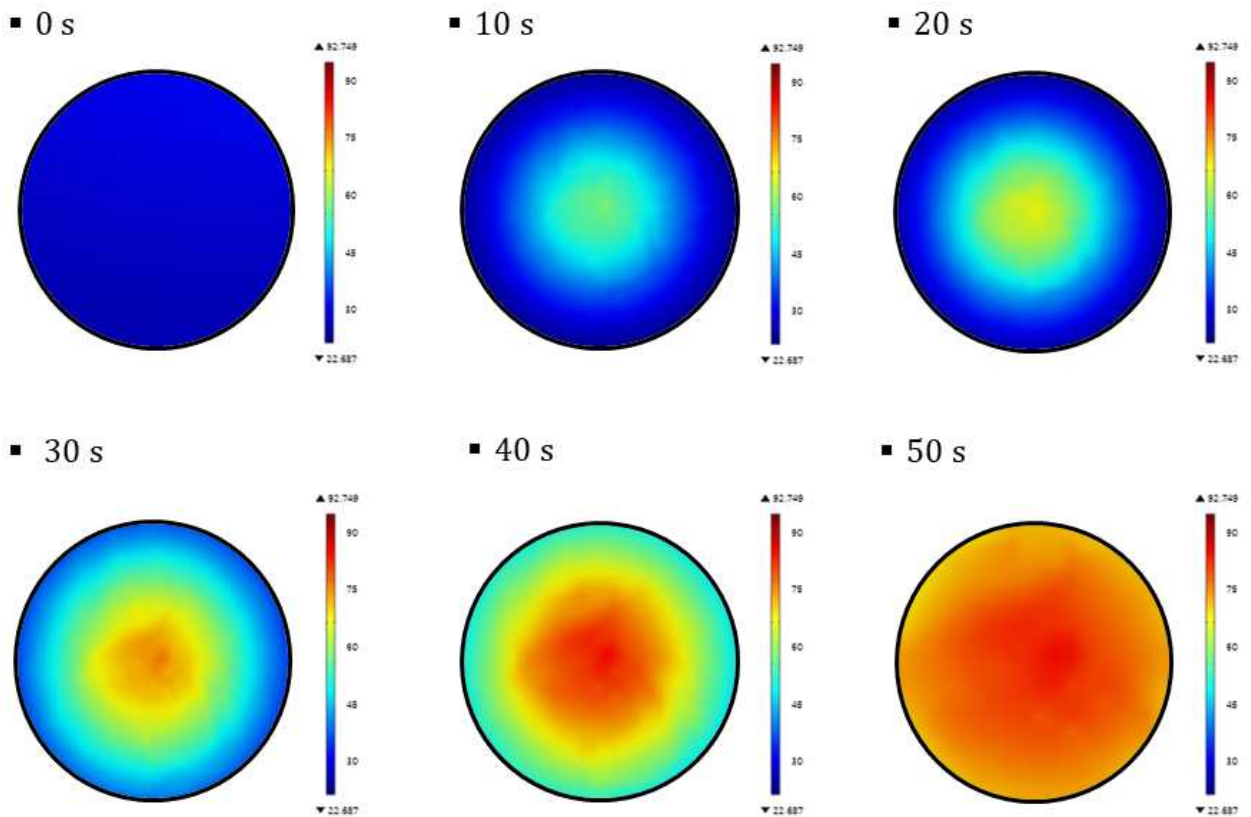


Fig. Simulated temperature ($^{\circ}\text{C}$) profiles of red pepper powder sample at three different horizontal layers from the bottom and three different vertical layers from the vertical center plane of sample after 50 s RF heating with an electrode gap of 12 cm.



- 위 그림을 통해 Radio-Frequency는 샘플 내부에서부터 열을 올리는 방식이라는 것을 확인할 수 있다.
- 온도 상승 곡선을 시뮬레이션한 값과 실제 측정 값을 비교하면 다음과 같이 높은 correlation을 볼 수 있다.

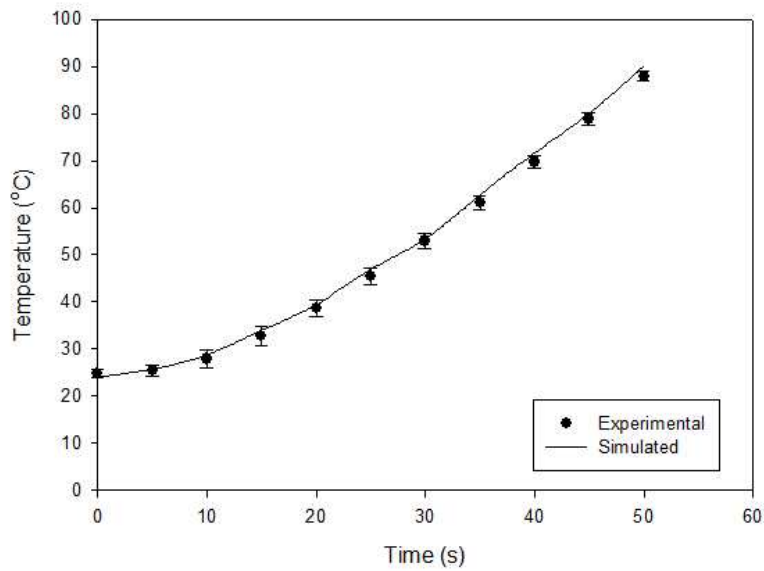
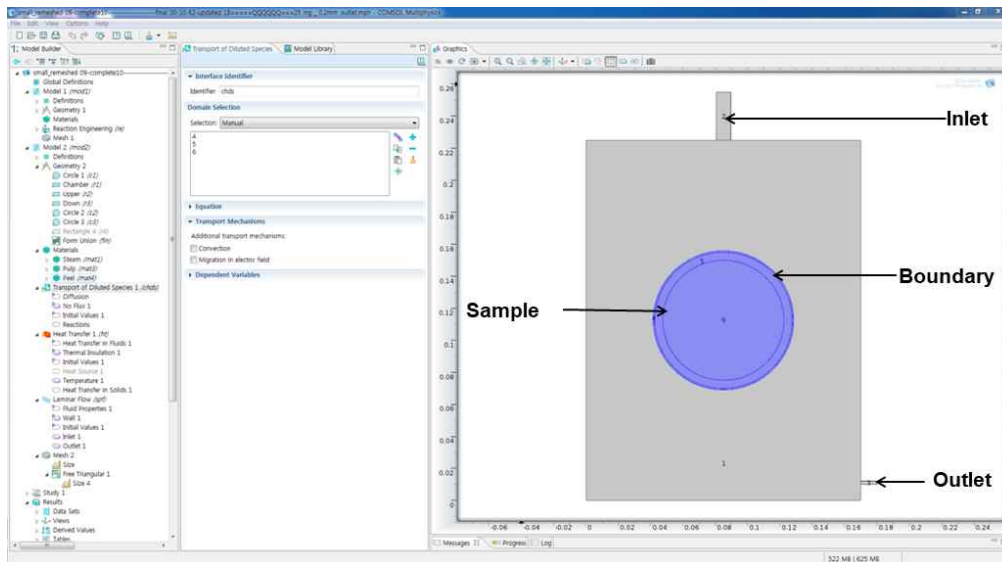


Fig. Experimental and simulated temperature-time histories of red pepper powder at the center, placed in a polypropylene container on the grounded electrode during 50 s RF heating with an electrode gap of 12 cm.

- Superheated steam (SHS)

- Comsol multiphysic를 이용하여 Superheated steam (SHS) 처리 chamber를 구성한다.



- 다음의 governing equation을 이용하여 boundary condition을 결정하고 grid를 나누어 각 mesh에서의 최적 결정값을 도출하도록 chamber 특성을 구성한다.

1) Heat transfer equation

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla \cdot (k \nabla T) - \rho C_p u \nabla T$$

Boundary condition: insulated $-n \cdot (-k \nabla T) = 0$

2) Navier-Stokes equation

$$\rho \frac{\partial u}{\partial t} + \rho(u \cdot \nabla)u = \nabla \cdot \left[\sigma - \frac{2}{3} \mu(\nabla \cdot u)I \right]$$

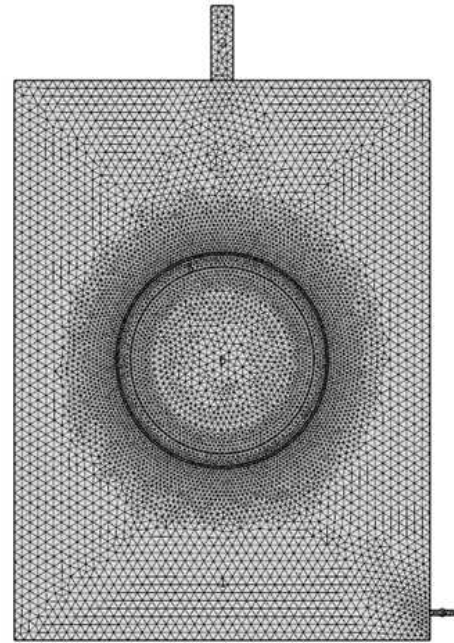
$$\sigma = -pI + \mu[\nabla u + (\nabla u)^T]$$

3) Continuity equation

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho u) = 0$$

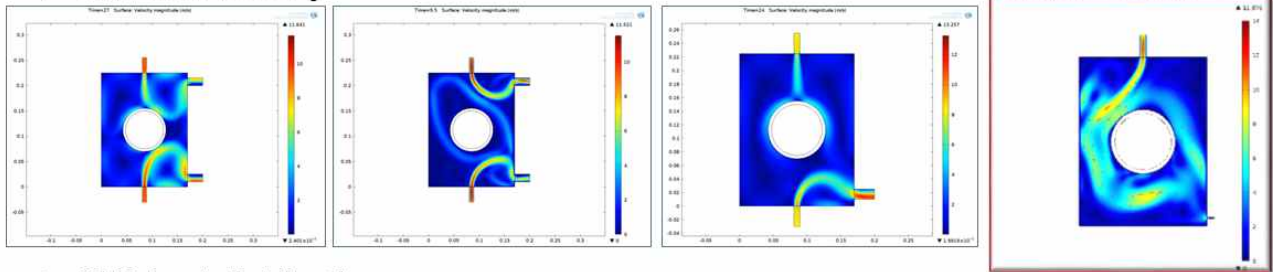
T : temperature (K)
 t : time (s)
 u : velocity (m/s)
 ρ : density (kg/m³)
 k : thermal conductivity (W/m·K)
 C_p : specific heat (J/kg·K)

t : time (s)
 u : velocity vector (m/s)
 σ : total stress tensor (N/m²)
 μ : dynamic viscosity (pa·s)
 I : identity tensor
 p : pressure (Pa)
 T : transpose of a matrix.



- 앞서 설정한 governing equation 식과 Heat distribution analysis를 통해 SHS nozzle 및 outlet 최적 위치를 설정한다.

➤ SHS flow velocity



➤ SHS heat distribution

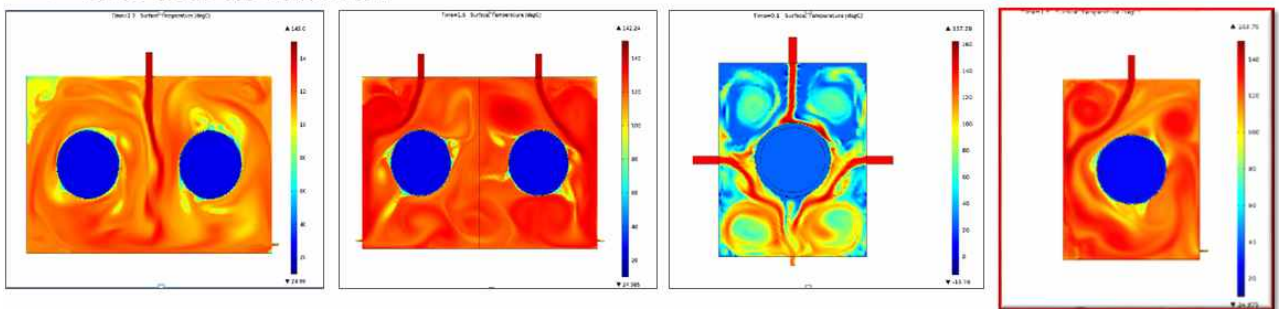
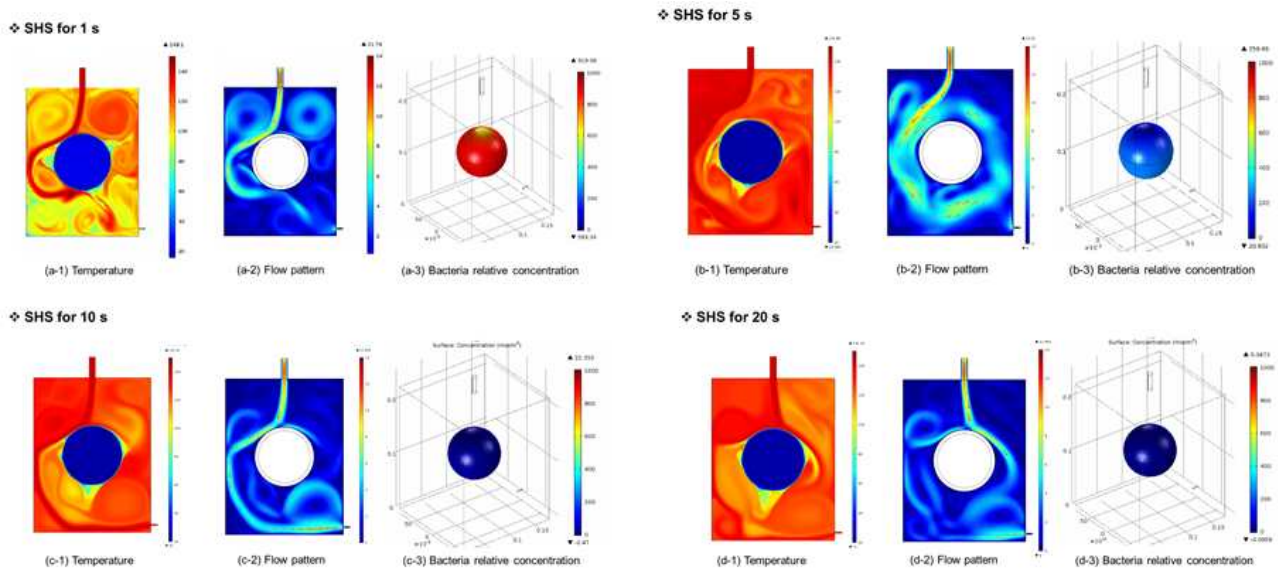
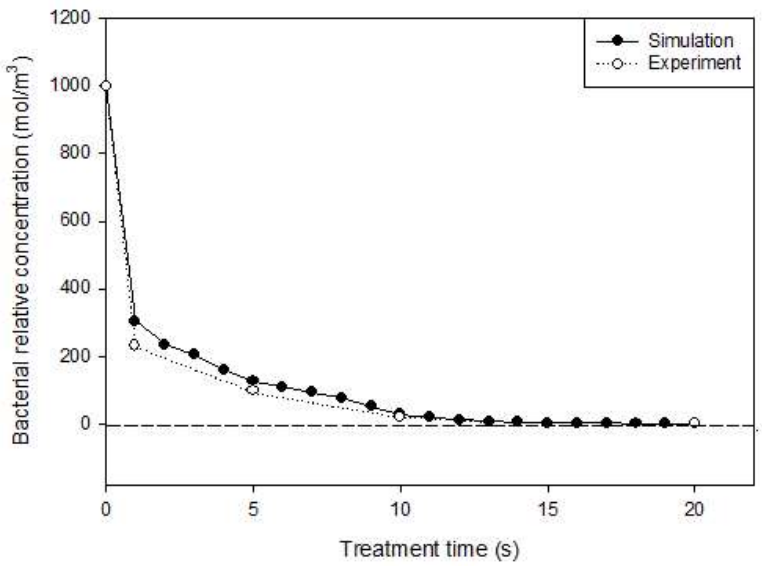


Fig. Simulations of superheated steam in the treatment chamber at different design.

- 최적의 system 구성을 결정 후 chamber 내부의 샘플 온도, SHS의 flow pattern, 미생물 사멸 정도를 시뮬레이션하면 다음과 같다.



- 이 중 미생물 사멸 패턴을 시뮬레이션 한 결과와 정량적 평가한 결과를 비교하면 다음과 같다.



(5) 제 3-1세부 (인트론 손지수) : 식중독균 제어를 위한 유용소재의 대량 생산 공정 구축 및 제제화

(가) 정량적 성과

성과지표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			인력양성			정책활용·홍보		기타
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표	석사	박사	취업인력	정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		명	명	명			
가중치																				
최종목표																				
후속 1차	목표	1							2											
	실적	4							3											
후속 2차	목표	2		1					1											
	실적	2		1	1.6	52			1											
후속 3차	목표	2	1			3	100		1											
	실적	4	5			3	718		1											
3단계	목표	5	1	1		3	100		4											
	실적	10	5	1	1.6	52	3	718	5											

① 논문게재 성과

연번	게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
			주저자	교신저자	공동저자				

② 특허 성과

연번	출원된 특허					등록된 특허				
	출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
1	2018	신규한 살모넬라 하이델베르그 박테리오파지 Sal-HEP-1 및 이의 살모넬라	(주)인트론바이오테크놀로지	한국	10-2018-0020495	2019	신규한 살모넬라 하이델베르그 박테리오파지 Sal-HEP-1 및 이의 살모넬라	(주)인트론바이오테크놀로지	한국	KR10-2041109

		하이델 베르그 균 증식 억제 용도					하이델 베르그 균 증식 억제 용도			
2	2018	신규한 스트렙 토코커 스 수이스 박테리 오파지 Str-SUP -1 및 이의 스트렙 토코커 스 수이스 균 증식 억제 용도	(주)인트 론바이 오테크 놀로지	한국	10-2018 -006406 2	2020	신규한 스트렙 토코커 스 수이스 박테리 오파지 Str-SUP -1 및 이의 스트렙 토코커 스 수이스 균 증식 억제 용도	(주)인트 론바이 오테크 놀로지	한국	KR10-2 073086
3	2018	신규한 스트렙 토코커 스 수이스 박테리 오파지 Str-SUP -2 및 이의 스트렙 토코커 스 수이스 균 증식 억제 용도	(주)인트 론바이 오테크 놀로지	한국	10-2018 -006406 4	2020	신규한 스트렙 토코커 스 수이스 박테리 오파지 Str-SUP -2 및 이의 스트렙 토코커 스 수이스 균 증식 억제 용도	(주)인트 론바이 오테크 놀로지	한국	KR10-2 073088
4	2018	신규한 스트렙 토코커 스 수이스 박테리 오파지 Str-SUP -3 및 이의 스트렙 토코커	(주)인트 론바이 오테크 놀로지	한국	10-2018 -006406 5	2020	신규한 스트렙 토코커 스 수이스 박테리 오파지 Str-SUP -3 및 이의 스트렙 토코커	(주)인트 론바이 오테크 놀로지	한국	KR10-2 073094

		스 수이스 균 증식 억제 용도					스 수이스 균 증식 억제 용도			
5	2018	대장균 박테리 오파지 Esc-CO P-14 및 이의 병원성 대장균 증식 억제 용도	(주)인트 론바이 오테크 놀로지	한국	10-2018 -008028 4	2020	대장균 박테리 오파지 Esc-CO P-14 및 이의 병원성 대장균 증식 억제 용도	(주)인트 론바이 오테크 놀로지	한국	KR10-2 073095
6	2019	신규한 살모넬 라 하이텔 베르그 박테리 오파지 Sal-HEP -1 및 이의 살모넬 라 하이텔 베르그 균 증식 억제 용도	(주)인트 론바이 오테크 놀로지	PCT	PCT/KR 2019/00 1896					
7	2019	신규한 스트렙 토코커 스 수이스 박테리 오파지 Str-SUP -1 및 이의 스트렙 토코커 스 수이스 균 증식 억제 용도	(주)인트 론바이 오테크 놀로지	PCT	PCT/KR 2019/00 6558					
8	2019	신규한 스트렙	(주)인트 론바이	PCT	PCT/KR 2019/00					

		토코커스 수이스 박테리 오파지 Str-SUP -2 및 이의 스트렙 토코커 스 수이스 균 증식 억제 용도	오테크 놀로지		6562					
9	2019	신규한 스트렙 토코커 스 수이스 박테리 오파지 Str-SUP -3 및 이의 스트렙 토코커 스 수이스 균 증식 억제 용도	(주)인트 론바이 오테크 놀로지	PCT	PCT/KR 2019/00 6566					
10	2019	대장균 박테리 오파지 Esc-CO P-14 및 이의 병원성 대장균 증식 억제 용도	(주)인트 론바이 오테크 놀로지	PCT	PCT/KR 2019/00 6903					

③ 기술료징수 현황

기 징수액	당해연도 징수액	향후 징수액	합계
1,652,000원			1,652,000원

- 기술이전 및 기술지도 내용

※ 명칭, 관련업체명, 지도내용 등

N O	기술이전유형	기술실시 계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료
1	직접실시	식중독균에 제어력을 갖는 박테리오파지 및 파지 유래 단백질의 개발 기술	(주)인트론바이오테크놀로지	2019.04.09	1,652,000원
합계					1,652,000원

④ 사업화 성과 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(백만원)				
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내			
국외					
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

항목	세부항목		성 과		
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	7.1 억원	
			향후 3년간 매출	30 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	억원	
			향후 3년간 매출	억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 7.1 억원 국외 : -	
			향후 3년간 매출	국내 : 15 억원 국외 : 15 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
			세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위	1위
			3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위	1위	

(6) 제 3-1협동 (서울대 유상열) : 다양한 제형의 박테리오 파지 및 파지 유래 단백질 개발

(가) 정량적 성과

성과지표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권		기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		인력양성			정책활용·홍보		기타		
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문		학술발표	석사	박사	취업인력		정책활용	홍보전시
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건		명	명	명				
가중치																				
최종목표																				
후속 1차	목표													1		1				
	실적		3											1	2	2				
후속 2차	목표										2		1	1	2	2				
	실적	1									3		3	4	2	4				
후속 3차	목표		1		1						2		1	1	1	1				
	실적	2	1		3	130					3		17	3	2	3				
3단계	목표		1								4		2	3	3	4				
	실적	3	4		3	130					6		21	9	4	9				

① 논문게재 성과

연번	게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외구분	SCI구분
			주저자	교신저자	공동저자				
1	2018	Clostridium perfringens Virulent Bacteriophage CPS2 and Its Thermostable Endolysin LysCPS2	Eunsu Ha, Bokyung Son	Ryu S		Viruses	10(5)	국외	SCI
2	2018	The Auxiliary Role of the	Bokyung Son, Minsuk Kong	Ryu S		Viruses	10(6)	국외	SCI

		Amidas e Domai n in Cell Wall Binding and Exolyti c Activit y of Staphyl ococcal Phage Endoly sins							
3	2019	LysPB C2, a novel endolys in harbori ng a Bacillu s cereus spore binding domain	Minsuk Kong	Ryu S		Applied and Envrionm ental Microbiol og	85(5):e02 462-18	국외	SCi
4	2019	Mutation of a <i>Staphylo coccus aureus</i> temperat e bacteriop hage to a virulent one and evaluatio n of its applicati on	Yoonjee Chang	Ryu S	Jaewoo Bai, Ju-Hoon Lee	Food Microbiol ogy	82: 523-532	국외	SCi
5	2019	Effective removal of staphyloc occal biofilms	Yoyeon Cha	Ryu S	Bokyung Son	Food Microbiol ogy	84: 103245	국외	SCi

		on various food contact surfaces by <i>Staphylococcus aureus</i> phage endolysin LysCSA13							
6	2019	Capsular Polysaccharide Is a Receptor of a Clostridium perfringens Bacteriophage CPS1	Eunsu Ha	Ryu S	Jihwan Chun, Minsik Kim	Viruses	11(11)	국외	SCI

② 특허 성과

출원된 특허						등록된 특허				
연번	출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
1						2017	새로운 호스트 바인딩 도메인을 갖는 포도상구균 박테리오파지 SA11 유래의 신규 엔도라이신 LysSA11 및 이를 포함하는 세균 사멸용 조성물	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-1796279
2						2018	클로스트리디움	서울대학교	대한민국	10-1818498

							퍼프린젠스 세포벽 결합 폴리펩타이드 및 클로스트리 디움 퍼프린젠스 검출용 매개체	산학협력 단		
3						2018	포도상구균 박테리오파 지 유래 신규 엔도라이신 LysSA97과 에센셜 오일 성분을 함유하는 세균 사멸용 조성물	서울대학 교 산학협력 단	대한 민국	10-1818 499
4	2019	클로스트리 디움 퍼프린젠스 용해능을 가진 내열성 엔도라이신 LysCPD2	서울 대학 교 산학협 력단	대한 민국	10-2019 -001300 5	2019	클로스트리 디움 퍼프린젠스 용해능을 가진 내열성 엔도라이신 LysCPD2	서울대학 교 산학협 력단	대한 민국	10-2035 283
5	2020	내열성 박테리오파 지 TS3, TS6, TS13 및 이를 포함하는 살모넬라 억제용 조성물	서울 대학 교 산학협 력단	대한 민국	10-2020 -006181 4					
6	2020	황색포도상 구균 유래 점박박테리 오파지 그 유래의 엔도라이 신 LysPALS21과 LysPALS22	서울 대학 교 산학협 력단	대한 민국	10-2020 -006041 8					

③ 기술료징수 현황

기 징수액	당해연도 징수액	향후 징수액	합계
	80,000,000원		80,000,000원
	25,000,000원		25,000,000원
	25,000,000원		25,000,000원

- 기술이전 및 기술지도 내용

※ 명칭, 관련업체명, 지도내용 등

N O	기술이전유형	기술실시 계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료
1	기술이전	펩티다아제 활성이 있는 엔돌라이신 LysB4, 이를 포함하는 식품 및 사료 조성물	(주)인트론바이오테크놀로지	2020.03.19	80,000,000원
2	기술이전	클로스트리디움 퍼프린젠스 박테리오파지 CPD2 및 이의 증식용 숙주	(주)인트론바이오테크놀로지	2020.03.19	25,000,000원
3	기술이전	클로스트리디움 퍼프린젠스 박테리오파지 CPD4 및 이의 증식용 숙주	(주)인트론바이오테크놀로지	2020.03.19	25,000,000원
합계					130,000,000

④ 사업화 성과 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)			
	소요예산(백만원)			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후
		단위(%)	현재까지	3년후
	시장 점유율	국내		
	국외			
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)			
	수 출			

항목	세부항목		성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지 향후 3년간 매출
		관련제품	개발후 현재까지
			7.1 억원 30 억원 억원

항목	세부항목			성 과
	시장 점유율	개발제품	향후 3년간 매출	억원
			개발후 현재까지	국내 7.1 억원 국외 : -
			향후 3년간 매출	국내 : 15 억원 국외 : 15 억원
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
		세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위	
	3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		1위	

(나) 정성적 성과

구분	연구목표	주요 연구 성과	
1 단계	1차년도	<ul style="list-style-type: none"> 목표균에 특이적인 박테리오파지 분리 SE 및 ST 특이 phage를 선별 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Bacillus cereus</i>-targeting phage 및 <i>Staphylococcus aureus</i>-targeting phage를 분리하여 특성 규명함 선별된 유용 endolysin candidate를 cloning 하여 순수 분리한 후, 대량 발현 방법 수립 분리한 endolysin의 숙주 용해능 분석 분리한 endolysin의 효과적인 항균 활성 조건 Endolysin의 항균 활성 범위 확인 분리한 phage의 receptor 분석
	2차년도	<ul style="list-style-type: none"> 목표균에 작용하는 endolysin 분리 	<ul style="list-style-type: none"> Phage whole genome sequencing을 실시하여 endolysin을 탐색한 후, 획득하여 용균활성 및 특성 규명
	3차년도	<ul style="list-style-type: none"> Endolysin 유전자의 확보 및 목표 미생물에 대한 효과 확인 	<ul style="list-style-type: none"> <i>B. cereus</i>-targeting phage의 특성파악 및 whole genome sequencing 결과 endolysin을 확보, 획득하여 특성 분석을 실시하고, 우수한 특성의 <i>S. aureus</i> phages의 유전체 분석을 통해 endolysin candidate 확보함
2 단계	4차년도	<ul style="list-style-type: none"> 유용 endolysin의 분리 및 특성분석과 식품에서의 적용 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 신규 phage 추가 확보 및 특성분석 완료 유전체 분석을 통한 endolysin gene cloning 및 순수 단백질 정제 Phage receptor 분석을 통한 bacteriophage감염 기작 이해 Endolysin의 식중독균 제어를 위한 식품첨가제 및 살균제로써의 가능성 확인

	5차년도	<ul style="list-style-type: none"> 유용 endolysin의 대량 생산, 특성 분석 및 식품에의 적용 연구를 통한 산업화 방향 제시 	<ul style="list-style-type: none"> Endolysin candidate의 cloning, 순수 분리 및 대량 발현 방법 수립 확보한 유용 endolysin의 조리도구 및 식품 적용 방법 개발
	6차년도	<ul style="list-style-type: none"> 산업화 시스템 구축을 위한 식중독균 제어 신기술 적용 기반마련 및 항산화, 항균 및 건강기능성을 가진 차별화된 천연물 식품 보존료 소재 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 유용 endolysin의 식품 모델에 적용 방법 최적화 Endolysin의 병원균 검출용도 개발 가능성 연구 Bacteriophage 개량을 통한 식품에 적용 가능성 검토 항산화 및 건강기능성을 가진 소재 후보 선별 및 추출 조건 설정 소재 별 항산화능 및 항균 효능 평가 항산화능 및 항균 효능이 뛰어난 천연물 소재 선정 및 추출조건 확립
	7차년도	<ul style="list-style-type: none"> 산업화 시스템 구축을 위한 식중독균 제어 신기술 적용 기반 마련 및 항산화, 항균 및 건강기능성을 가진 차별화된 천연물 유래 식품 보존료 소재 개발 	<ul style="list-style-type: none"> Bacteriophage의 다양한 적용 방법 및 endolysin을 통한 식중독균 제어 신기술 개발 항산화, 항균 및 건강기능성을 가진 차별화된 천연물 유래 식품 보존료 소재 및 시제품 개발
3 단 계	후속 1차년도	<ul style="list-style-type: none"> 생물학적 항균 소재 생산을 위한 박테리오파지 선정 및 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 산업화용 신규 박테리오파지 분리 및 선별 선별한 박테리오파지의 숙주 용해능 분석 선별한 박테리오파지의 염기서열 분석
	후속 2차년도	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 제형의 박테리오파지 및 파지 유래 단백질 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 박테리오파지 염기서열 정보 기반 항균 단백질 (endolysin) 후보 선정 선정된 항균 단백질 후보의 cloning, 순수 분리 및 대량 발현 체계 구축 분리된 항균 단백질의 숙주 용해능의 분석 분리된 항균 단백질의 산업 환경 적용 조건 확립 박테리오파지 및 항균 단백질 기반 항균제의 최적 제형 선정
	후속 3차년도	<ul style="list-style-type: none"> 생물학적 항균 소재 생산 조건 최적화 및 현장 적용 	<ul style="list-style-type: none"> 개발된 새로운 제형의 박테리오파지 및 항균 단백질 기반 항균제의 적용 개발된 새로운 제형의 박테리오파지 및 항균 단백질 기반 항균제의 생산 조건 확립 생산된 제품의 유효성 평가

(다) 기타 주요연구 성과 (자유 기술)

• 3-1세부 (식중독균 제어를 위한 생물학적 안전 소재의 개발 및 산업화)

- 제 3핵심은 1개의 세부과제와 1개의 협동과제로 구성되어 있으며, 3-1세부과제는 식중독균 제어의 유용 소재로 활용될 수 있는 박테리오파지 및 박테리오파지 유래 단백질 (endolysin)의 산업적 제조 공정의 scale-up, 제조 공정 개발을 통해 대량 생산 공정 구축 및 제제화하는 것을 최종 목표로 연구를 수행하여 박테리오파지 및 박테리오파지 유래 단백질에 적합한 제제화 기술을 확립하였음. 3-1협동과제는 산업적 활용 가치가 높은 박테리오파지 및 박테리오파지 유래 단백질 후보군을 선발하고 이들의 특성 규명 연구를 수행하였음. 아울러 유용 후보군에 대하여 생산 관련한 기본적인 조건을 확립하고, 대상 모델 및 현장에서 제품 적용과 이에 대한 유효성 평가를 수행하였음. 제 3핵심의 두 기관은 연구 기간 동안 서로 긴밀히 협업하여 설정한 최종 목표를 달성하였음.

① 1-3차년도 전체 요약

㉠ 후속 1년차 연구목표 : 유용 박테리오파지의 증식 및 정제 공정 개발

- 박테리오파지의 소규모 증식 공정 개발 완료 → 증식액 (working volume 50 ml, 1 L) 기준 증식 공정 구축
- 박테리오파지의 소규모 정제 공정 개발 완료 → Column chromatography에 기반한 정제 공정 구축 (순도 80% 이상)
- 박테리오파지의 고상, 액상 적합 제형 개발 완료 → 부형제 및 버퍼 조성에 따른 적합 고상, 액상 제형 조건 확립
- 박테리오파지의 장기보관 안정성 조사 완료 → 개별, 혼합 박테리오파지 제제의 안정성 확인

㉡ 후속 2년차 연구목표 : 유용 파지 유래 단백질의 소규모 제조 시스템 개발 (생산/분리/정제)

- 파지 유래 단백질의 소규모 발현 공정 개발 완료 → 생산액 (working volume 500 mL~1 L) 기준 발현 공정 구축
- 파지 유래 단백질의 소규모 정제 공정 개발 완료 → Column chromatography에 기반한 정제 공정 구축 (순도 80% 이상)
- 파지 유래 단백질 기반의 고상, 액상 적합 제형 개발 완료 → 다양한 버퍼 조성에 따른 적합 고상, 액상 제형 조건 확립
- 파지 유래 단백질의 단기 보관 안정성 조사 완료 → 다양한 제형 조건에서 제조한 파지 유래 단백질 제제의 안정성 확인

㉢ 후속 3년차 연구목표 : 박테리오파지, 파지 유래 단백질의 산업적 제조 공정 scale-up 및 원료의 산업적 제조 공정 개발

- 박테리오파지의 대규모 증식 공정 개발 완료 → 증식액 (working volume 50 L) 기준 증식 공정 구축
- 박테리오파지의 대규모 정제 공정 개발 완료 → Column chromatography에 기반한 정제 공정 구축 (순도 90% 이상)

- 박테리오파지 기반 사료첨가제 시제품 제조법 완성 및 시제품 생산 완료 → 확립된 제형 조건 및 제제화 기술을 활용하여 시제품 제작
- 파지 유래 단백질의 대규모 발현 및 정제 공정 개발 완료 → 생산액 (working volume 10 L) 기준 발현 공정 구축 및 column chromatography에 기반한 정제 공정 구축 (순도 90% 이상)
- 현장 평가용 시료 제조 → 3-1협동기관의 유효성 평가 시험에 필요한 시료 제조 및 공급

② 1차년도 요약

연구목표 : 유용 박테리오파지의 증식 및 정제 공정 개발

- 박테리오파지의 소규모 증식 공정 개발 완료 → 증식액 (working volume 50 ml, 1 L) 기준 증식 공정 구축
- 박테리오파지의 소규모 정제 공정 개발 완료 → Column chromatography에 기반한 정제 공정 구축 (순도 80% 이상)
- 박테리오파지의 고상, 액상 적합 제형 개발 완료 → 부형제 및 버퍼 조성에 따른 적합 고상, 액상 제형 조건 확립
- 박테리오파지의 장기보관 안정성 조사 완료 → 개별, 혼합 박테리오파지 제제의 안정성 확인
- 3-1세부기관은 후속 1차년도 연구 수행을 통해 본 핵심과제의 최종 목표인 식중독균 제어를 위한 유용 소재인 박테리오파지의 대량 생산 공정 구축 및 제제화를 위한 기반 기술을 확립 하였음.

③ 1차년도 상세 내용

- 3-1 세부 (식중독균 제어를 위한 유용 소재의 대량 생산 공정 구축 및 제제화)

연구 목표: 유용 박테리오파지의 증식 및 정제 공정 개발

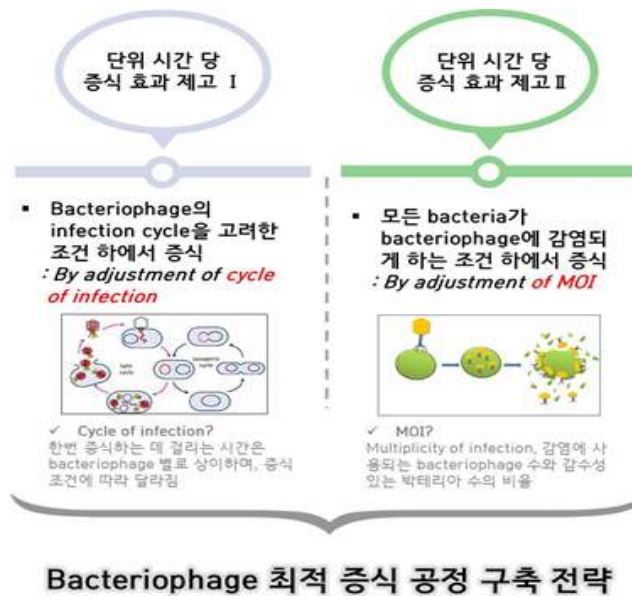
㉞ 박테리오파지의 소규모 증식 공정 개발

- 1) 소규모 증식 공정 개발의 대상이 되는 박테리오파지는 3-2협동기관에서 선별한 살모넬라 박테리오파지 3종과 황색포도상구균 박테리오파지 2종임. 대상 박테리오파지들은 모두 용균 (lytic) 박테리오파지이고 전체 유전체 서열 분석 (whole genome sequence analysis)이 되어 있으며, 항균력 조사 시험을 통해 비교적 넓은 숙주 범위를 갖는 특징을 갖고 있음.
- 2) 박테리오파지의 산업적 활용을 위해서는 대용량으로 생산할 수 있는 공정 구축이 필수적임. 이에 앞서 당해연도에는 박테리오파지의 소규모 증식 공정 개발을 먼저 수행하여, 추후 산업적 활용 가능성이 있는지를 파악하고자 하였음. 박테리오파지의 소규모 증식 공정 개발은 아래 그림과 같이 증식 공정 개발 전략과 과정에 따라 개별 박테리오파지의 특성을 고려하여 최적 증식 공정을 구축하였음.



<Figure 1. 박테리오파지의 소규모 증식 공정 개발 모식도>

3) 기본적으로 박테리오파지 생산 공정 구축에 있어서 증식에 이용되는 박테리아 자체의 배양 조건, 박테리오파지와 박테리아의 초기 상대적 양 (MOI; Multiplicity of Infection)이 매우 중요하다. 이러한 사항도 증식 공정 개발에서 고려하였음.



<Figure 2. 박테리오파지의 공정 조건 증식 전략>

4) 박테리오파지의 소규모 증식은 250 ml flask에 50 ml working volume으로 수행하였으며, 1차 scale-up은 2 L flask에 500 ml working volume으로 실시하였음. flask 수준에서 박테리오파지 titer가 안정적임이 확인된 이후에는 5 L jar fermentor에 1 L working volume으로 2차 scale-up을 실시하였음.

5) 개별 박테리오파지의 증식 공정 최적화를 통하여 1 L working volume에서 아래와 같이 최종 박테리오파지 titer를 확보할 수 있는 증식 공정을 구축함. 최종 박테리오파지 titer는 3회 반복 수행하여 얻어진 결과의 평균치임. 관련 상세 결과를 하기에 제시함.

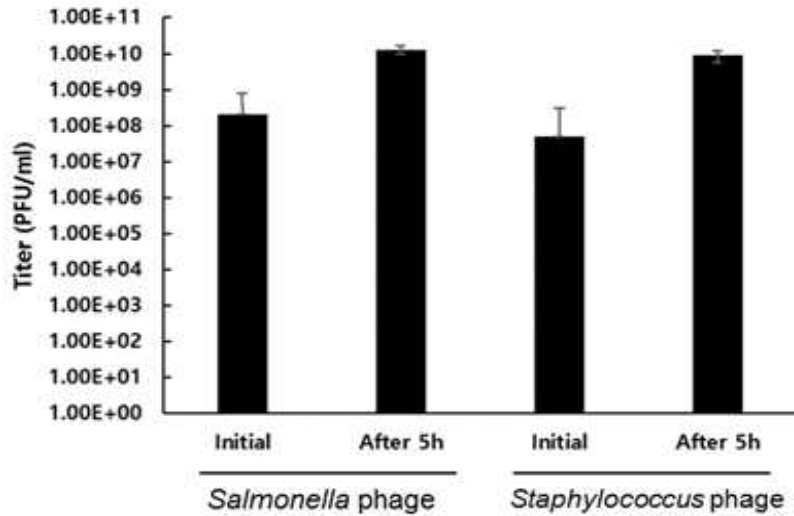
박테리오파지	최종 박테리오파지 titer (pfu/ml)	주요 공정 변수			
		증식온도 (°C)	적합 host OD ₆₀₀	증식시간 (hr)	배양방식
SalP-1	1.4 × 10 ¹⁰	37	1.0	5	Shaking
		적합배지	MOI	배양방식	TSB
		0.1			
		Salts			
SalP-2	2.1 × 10 ¹⁰	37	0.5	5	Shaking
		적합배지	MOI	배양방식	TSB
		0.1			
		Salts			
SalP-3	9.1 × 10 ⁹	37	0.5	5	Shaking
		적합배지	MOI	배양방식	TSB
		1			
		Salts			

<Table 1. *Salmonella* 박테리오파지의 소규모 증식 공정 구축 결과>

박테리오파지	최종 박테리오파지 titer (pfu/ml)	주요 공정 변수			
		증식온도 (°C)	적합 host OD ₆₀₀	증식시간 (hr)	배양방식
StaP-1	8.2 × 10 ⁹	37	0.5	5	Shaking
		적합배지	MOI	배양방식	TSB
		1			
		Salts			
StaP-2	1.2 × 10 ¹⁰	37	0.5	5	Shaking
		적합배지	MOI	배양방식	TSB
		1			
		Salts			

<Table 2. *Staphylococcus aureus* 박테리오파지의 소규모 증식 공정 구축 결과>

6) 소규모 증식 공정 개발을 통해 얻어진 박테리오파지의 titer는 초기 titer (≒10⁸ pfu/ml) 대비 약 2 log 수준 (≥10¹⁰ pfu/ml)으로 titer가 개선됨을 확인할 수 있었음. 각 균종별 박테리오파지의 증식 공정 개발 전, 후의 titer 값과 top agar assay 결과의 대표 사진을 하기와 같이 제시함.



<Figure 3. 증식 공정 개발 전, 후의 bacteriophage의 titer 비교>



<Figure 4. 증식 공정 개발 관련한 bacteriophage titration 결과>

㉔ 박테리오파지의 소규모 정제 공정 개발

1) 박테리오파지의 증식 공정 개발 후에 후속 공정 개발로 소규모 정제 공정을 개발하였음. 통상적으로 박테리오파지 정제에는 초원심분리법 (Ultracentrifugation), chromatography법 등이 이용될 수 있으나 본 연구에서는 5종의 박테리오파지들을 대상으로 다양한 산업적 활용에 적합한 순도를 갖는 박테리오파지 정제 공정 구축을 위해 chromatography법에 기반한 정제 공정 (ion exchange chromatography 기반의 정제 공정)을 개발하였음.

2) Column은 CIM[®] QA monolithic column을 사용하여 수행하였음. 일차적으로 CIM[®] QA monolithic disk column을 이용하여 FPLC (fast protein liquid chromatography) 정제를 실시하여 타당성을 조사하였으며, 그 후 large scale column인 CIM[®] QA-8f tube monolithic column을 사용하여 FPLC 정제를 실시하였음.

3) 각 세부 조건은 개별 박테리오파지마다 조금씩 다르나 (binding 조건, washing 조건, elution 조건) 큰 틀에서는 유사한 공정을 적용하였음. 결과적으로 모든 박테리오파지가 80% 이상의 순도로 정제가 되었음. 정제 공정 구축과 관련한 대표적 예로 살모넬라 박테리오파지 SalP-1

과 황색포도상구균 박테리오파지 StaP-1의 정제 공정 조건을 하기에 제시하였음.

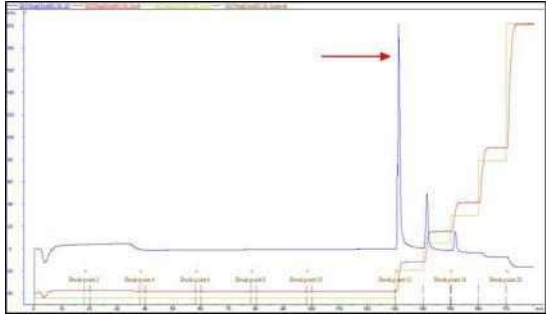
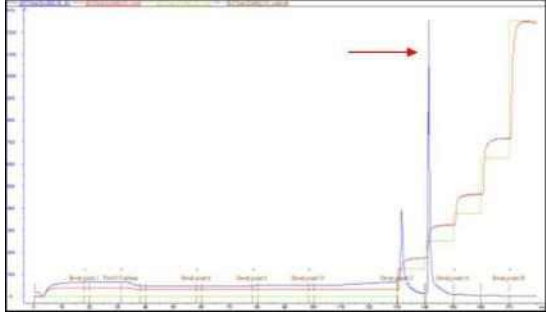
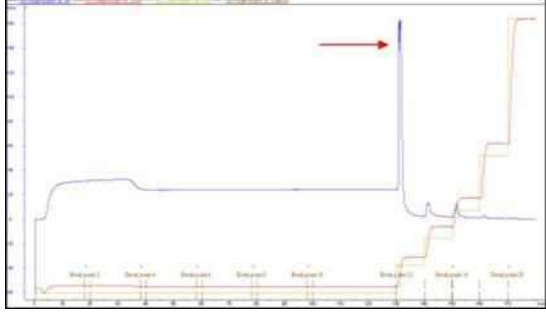


정제 과정		Chromatography 조건		
No.	수행 내용	필요한 시료 및 agent	수행 목적	시료의 양
1	박테리오파지 증식액의 여과액 500 ml에 equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) 1,000 ml을 첨가한 후 5분 정도 방치	Sample	Sampling loading	1,500 ml
		Equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0)	Equilibration	400 ml
		Equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0)	Unbound washing	500 ml
2	CIM [®] QA-8f tube monolithic column을 이용하여 정제를 실시	Elution buffer (50 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, pH 8.0)	Elution	200 ml

<Table 3. 박테리오파지 SalP-1의 정제 공정 조건>

정제 과정		Chromatography 조건		
No.	수행 내용	필요한 시료 및 agent	수행 목적	시료의 양
1	박테리오파지 증식액의 여과액 500 ml에 equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) 500 ml을 첨가한 후 5분 정도 방치	Sample	Sampling loading	1,000 ml
		Equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0)	Equilibration	400 ml
2	CIM [®] QA-8f tube monolithic column을 이용하여 정제를 실시	Equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0)	Unbound washing	600 ml
		Elution buffer (50 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, pH 8.0)	Elution	200 ml

<Table 4. 박테리오파지 StaP-1의 정제 공정 조건>

4) 정제 공정 개발 연구를 통해 설정된 chromatography 조건 하에 개별 박테리오파지들을 정제한 결과, 박테리오파지가 column에 흡착되어 있다가 NaCl gradient를 줌으로써 용출됨을 확인할 수 있었음. 개별 박테리오파지의 정제 결과를 제시하면 아래와 같음.

구분	박테리오파지명	정제 결과
살모넬라 박테리오파지	SalP-1	
	SalP-2	
	SalP-3	
황색포도상구균 박테리오파지	StaP-1	
	StaP-2	

<Table 5. 박테리오파지의 정제 결과>

5) 또한, chromatography 정제를 통해 얻어진 elution fraction에서의 박테리오파지 titer는 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ pfu/ml 수준이었음. 일부 박테리오파지 경우, 증식액의 여과액에서의 박테리오파지 titer 보다 높은 titer의 elution fraction이 얻어졌으며, 이로부터 일부 경우에는 chromatography 정제가 박테리오파지의 농축 효과도 줄 수 있다는 것을 확인 할 수 있었음.

6) 용출된 peak fraction은 일반적으로 박테리오파지 연구에 사용되는 SM buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 0.01% gelatin]에 대하여 dialysis를 실시하여 최종 박테리오파지 액으로 사용할 수 있음.

㉔ 박테리오파지 기반의 적합 제형 개발 및 장기 보관 안정성 조사

박테리오파지의 최적 액상 제형 개발 및 장기 보관 안정성 조사

1) 증식 및 정제 공정 개발을 통해 확보된 최종 박테리오파지 액을 이용하여 적합 액상 제형 개발을 수행하였음. 하기와 같이 3종류의 formulation candidate (phosphate-buffered saline, sodium chloride solution, TMG buffer)를 선정한 후 각 formulation candidate에 대한 적합성을 조사하여 적합 액상 제형을 선정하였음. 적합성 여부는 적용한 버퍼 조건에서 박테리오파지의 안정성 측면을 평가하여 최적 formulation을 결정하였음.

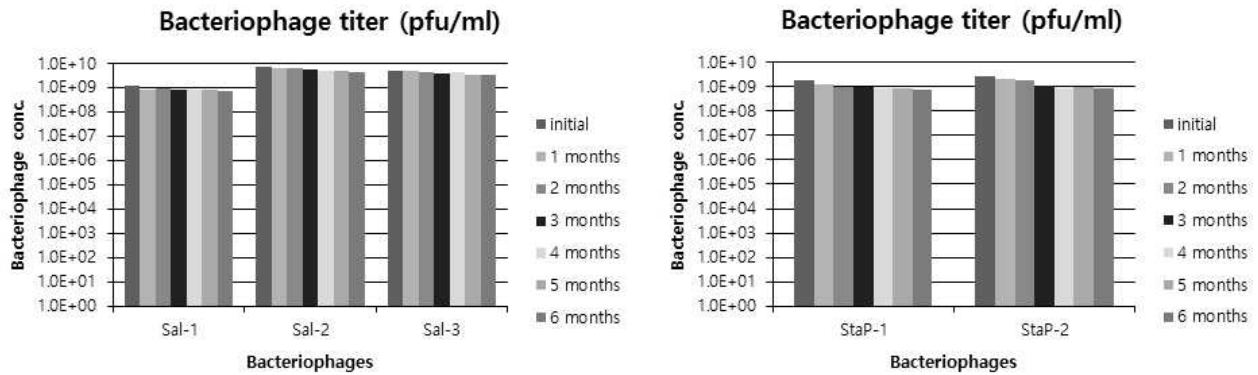
Formulation Candidate	Composition
Phosphate-buffered Saline	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄
Sodium chloride solution	100 mM Sodium chloride
TMG buffer	10 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO ₄ , 0.1% Gelatin, pH 7.5

<Table 6. Formulation candidate 및 이의 조성>

2) 실험적으로 최종 박테리오파지 액을 formulation candidate로 buffer exchange를 실시한 후에 이를 장기 보관 (통상 6~12개월) 하면서 박테리오파지 titer 변화 양상을 조사하는 방식으로 수행하여 박테리오파지 안정성을 평가하였음. 박테리오파지의 titer는 앞에 제시했던 top agar assay 방법으로 조사하였음. 보관 온도는 4°C와 30°C로 하였음.

3) 실험 결과, 3종류의 액상 formulation candidate에서의 박테리오파지 안정성은 유사하였음. 하지만, 보관 온도 조건 (4°C, 30°C)에 대해서는 차이가 있었음. 4°C 조건에 6개월 간 보관한 경우에는 박테리오파지의 titer가 크게 감소하지 않고 비교적 안정적이었으나, 30°C 조건에서는 1개월이 지난 시점부터 일부 박테리오파지들의 titer가 점차적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었음. 따라서 액상 박테리오파지의 적정 보관 온도는 4°C로 결정하였음. 최종적으로 냉장 보관 조건에서 3종류의 액상 제형 모두 유사한 성능을 제공할 수 있으리라 판단하였으며, 향후 산업적 활용에서는 용도에 맞게 3종의 액상 제형 모두를 적절히 사용하면 될 것으로 결론을 내렸음. 박테리오파지에 따라 차이는 있을 수 있지만, 일반적으로 박테리오파지 기반 액상 시료 혹은 제품은 냉장 보관 시 1년 이상 안정적임. TMG buffer formulation에서 개별 박

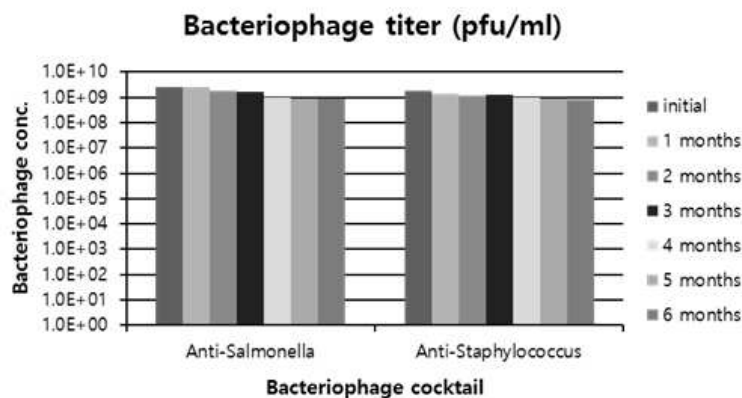
테리오파지의 4°C 에서 6개월 간 실시한 안정성 시험 결과를 대표적으로 하기에 제시함.



<Figure 5. TMG buffer formulation에서 개별 박테리오파지의 안정성 시험 결과>

4) 후속 실험으로 액상 박테리오파지 각테일에 대한 안정성 여부를 조사하기 위해, 3종류의 액상 제형으로 제조된 개별 박테리오파지들을 2가지 박테리오파지 각테일로 제조 (살모넬라 박테리오파지 혼합액과 황색포도상구균 박테리오파지 혼합액) 하여 상기 제시했던 액상 제형에서의 개별 박테리오파지 안정성 조사 시험과 동일한 조건하에 시험을 수행하였음. 혼합 시료 준비 시에는 개별 박테리오파지의 titer가 거의 동일한 수준이 되도록 조정하여 제조하였음.

5) 실험 결과, 3종류의 액상 제형별로 구분하여 제조한 박테리오파지 각테일의 보관 안정성은 개별 박테리오파지 액상 시료에 대한 보관 안정성과 비교 시 유사한 수준이었음. TMG buffer 기반의 박테리오파지 각테일의 4°C 에서 6개월 간 실시한 안정성 시험 결과를 대표적으로 하기에 제시함.



<Figure 6. 박테리오파지의 장기 보관 안정성>

박테리오파지의 최적 고상 제형 개발 및 장기 보관 안정성 조사

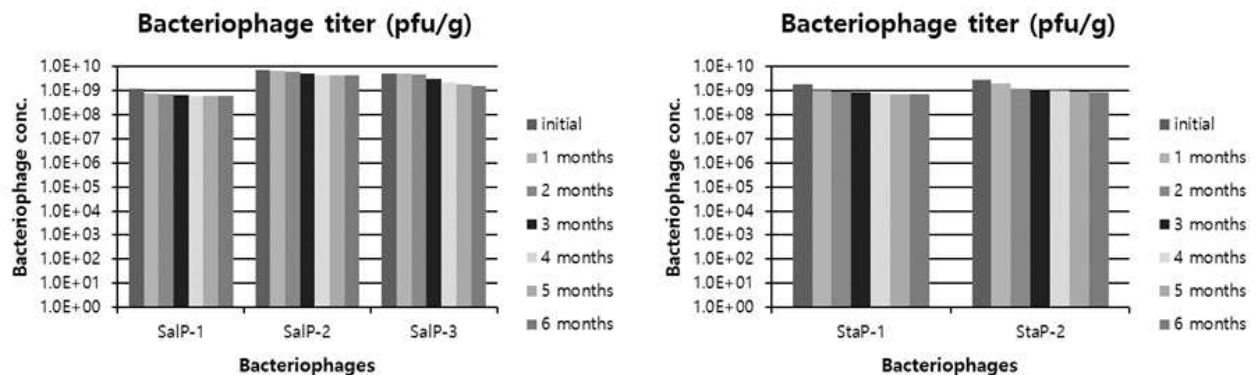
1) 정제된 최종 박테리오파지 액을 이용하여 적합 고상 제형을 개발하였음. 최종 박테리오파지

액에 부형제와 안정화제를 다양한 조성으로 첨가한 다음에 이를 동결건조하여 고상 시료를 제조하는 전략으로 적합 고상 제형을 개발하였음.

2) 개발 대상이 된 부형제는 첨가제로 널리 사용되는 물질인 skim milk, sucrose, maltodextrin 이었으며 (30-40% 적용), 안정화제 역시 널리 사용되는 물질인 trehalose, mannitol, sorbitol이 있음 (10-20% 적용). 다양한 조성으로 고상 시료들을 제조한 후 시료 내 초기 박테리오파지 titer와 6개월 간 4°C에 보관했을 때의 안정성을 평가 요소로 설정하여 고상 제형 개발을 수행하였음. 박테리오파지의 titer는 앞에 제시했던 top agar assay 방법으로 조사하였음.

3) 시험 결과, 실험한 모든 조건에서의 동결건조 후 얻어진 고상 시료 내의 초기 박테리오파지 titer는 유사한 수준이었음. 한편, 이들을 6개월 간 4°C에 보관했을 때의 안정성도 유사하였음. 그러나 부형제로 maltodextrin (40%)을, 안정화제로 trehalose (10%)를 사용한 경우가 가장 우수한 4°C 보관능을 나타내었음. 이에 따라 maltodextrin (40%)/trehalose (10%)를 적합 고상 제형으로 선정하였음.

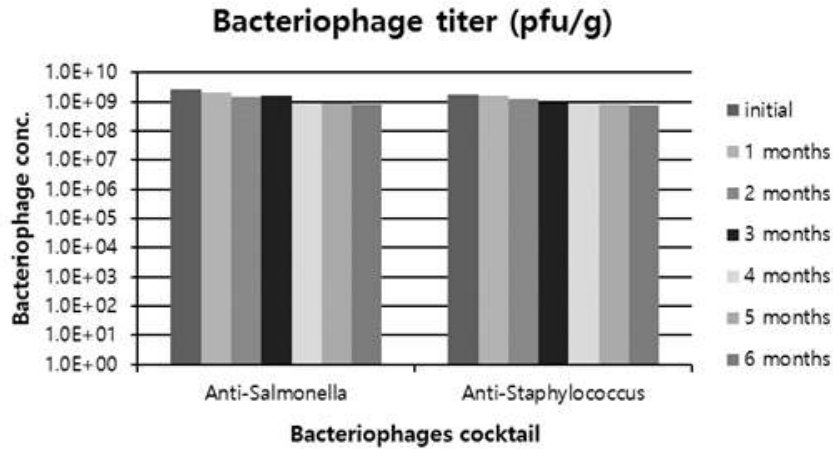
4) Maltodextrin (40%)/trehalose (10%) 제형으로 제조한 개별 박테리오파지들의 고상 시료를 4°C에서 6개월 간 보관했을 때의 안정성 시험 결과를 하기에 제시함.



<Figure 7. Maltodextrin (40%)/trehalose (10%) 제형의 개별 박테리오파지 안정성 시험 결과>

5) 고상 박테리오파지 각테일의 보관 안정성 시험은 maltodextrin (40%)/trehalose (10%) 제형으로 일괄 제조된 박테리오파지 고상 시료를 2가지 박테리오파지 각테일 형태로 혼합 (살모넬라 박테리오파지 혼합제와 황색포도상구균 박테리오파지 혼합제) 하여 개별 박테리오파지 안정성 조사 시험과 동일한 조건하에 시험을 수행하였음. 시료 준비 시에는 개별 박테리오파지의 titer가 거의 동일한 수준이 되도록 비율을 조정하여 혼합하였음.

6) 실험 결과, 고상 박테리오파지 각테일의 보관 안정성은 개별 박테리오파지 고상 시료에 대한 보관 안정성과 비교 시 유사한 수준이었음. 고상 박테리오파지 각테일의 4°C에서 6개월 간 실시한 안정성 시험 결과를 하기에 제시함.



<Figure 8. 고상 박테리오파지 콕테일 제제의 안정성 시험 결과>

㉔ 추가 연구

Salmonella Heidelberg에 감염능을 갖는 신규 박테리오파지 Sal-HEP-1의 확보

1) *Salmonella* Heidelberg는 닭, 칠면조 등의 가금류 고기에서 주로 발견되는 종으로, 미국 농무부 식품안전검역청 (United States Department of Agriculture’s Food Safety and Inspection Service, USDA-FSIS)에서 정한 리콜 단계 중 Class I 단계에 해당하는 균임. Class I 리콜 단계는 어떤 제품이 사용자의 건강에 심각하고 유해한 결과나 또는 사망을 초래할 수 있다는 충분한 개연성이 있을 때 발령됨. 실제 미국 Cargill社 및 로티세리社의 닭, 칠면조 고기에서 *S. Heidelberg* 균종이 발견되어 전량 리콜된 사례도 있음.



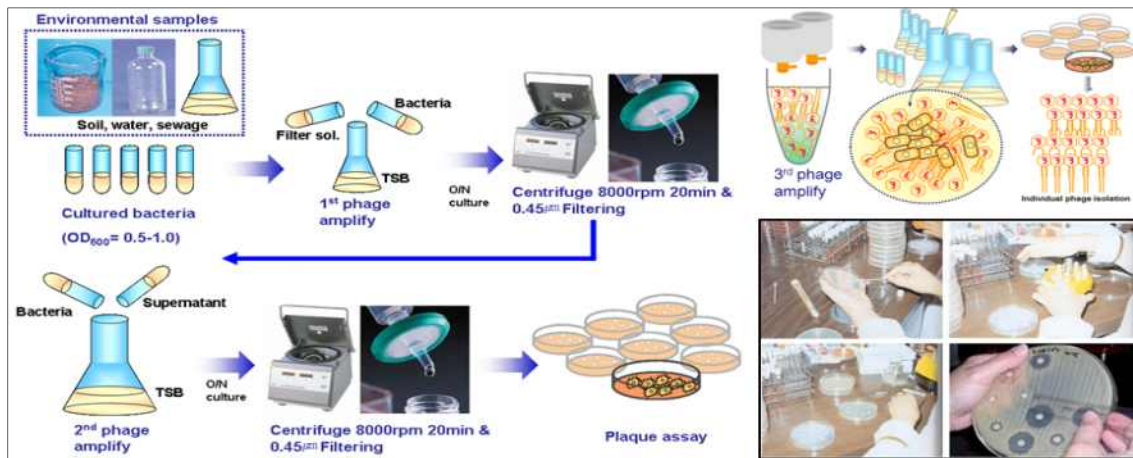
<Figure 9. 가금류 유래 살모넬라 식중독 유발 분석>

2) 또한 *S. Heidelberg*는 ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, tetracycline 등의 항생제에 대한 내성 문제가 심각하기 때문에 유용 박테리오파지 확보 시에는 향후 다양한 방면에서 활용도가 높을 것이라 판단됨. 최근 중남미 (브라질, 멕시코, 콜롬비아 등)에서 *S. Heidelberg*에 의한 양계 농장 피해 사례가 많이 보고되고 있어, *S. Heidelberg*에 감염능을 갖는 박테리오파지의 확보는 살모넬라 대응 박테리오파지 기반 제품의 업그레이드 및 신제품 출시 등과 같이 해외 시장으로의 판로 확장 측면에서 큰 의의를 지닌다 할 수 있겠음.

3) *S. Heidelberg*에 감염능을 갖는 신규 박테리오파지를 확보하기 위하여 다양한 환경시료들 (경기 소재 하수종말처리장의 하수 시료, 양계 농가 분변, 오폐수 시료, 강, 하천 시료 등의 약 50점)을 채취하여 아래와 같이 전처리를 실시하였음.

- ① 채취된 시료들을 pooling한 후 한밤 상온에 정치
- ② 시료 상층액을 회수하여 8,000 rpm에서 20분간 원심분리
- ③ 상층액을 회수하여 0.45 μm filter를 이용하여 여과

4) 상기와 같이 처리하여 얻어진 시료를 이용하여 신규 박테리오파지 스크리닝은 아래 그림과 같이 수행하였으며, 그 결과 *S. Heidelberg*에 감염능을 갖는 신규 박테리오파지를 확보할 수 있었음.



<Figure 10. 박테리오파지 스크리닝 과정을 보여주는 개략도>

5) 통상, 환경 시료로부터 박테리오파지를 분리할 경우 다수의 박테리오파지가 혼재된 mixture 상태로 분리되므로, 추가적인 순수분리 과정을 거쳐야만 단일 종의 순수 박테리오파지가 확보될 수 있음. 이에 single plaque isolation에 기반한 증식 및 top agar assay를 통해 plaque size의 단일 형태 유무를 파악한 후, 최종 투과전자현미경 조사를 통한 형태학적 특성을 분석하여 최종적으로 *S. Heidelberg*에 감염능을 갖는 신규 박테리오파지를 확보할 수 있었음.

*Salmonella Heidelberg*에 감염능을 갖는 박테리오파지 Sal-HEP-1의 소규모 증식 공정 개발

1) 금번 확보한 박테리오파지의 추후 산업적 활용 가능성을 고려하여, 앞서 수행하였던 살모넬라 및 황색포도상구균 박테리오파지들의 소규모 증식 공정 개발 시 이용하였던 전략과 방법 및 과정에 따라 최적 적합 증식 공정을 개발하였음.

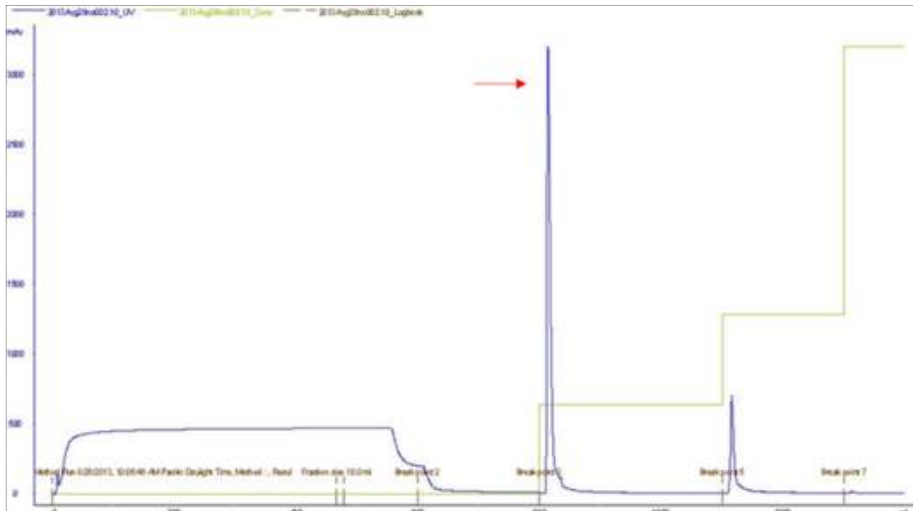
2) 박테리오파지 Sal-HEP-1의 소규모 증식 공정 개발 결과를 요약 제시하면 아래와 같음. 최종 박테리오파지 titer 관점에서 산업적으로 활용하기에 양호한 수준이었음.

박테리오파지	최종 박테리오파지 titer (pfu/ml)	주요 공정 변수			
		증식온도 (°C)	37	적합배지	TSB
Sal-HEP-1	8 × 10 ¹⁰	적합 host OD ₆₀₀	1.0	MOI	0.01
		증식시간 (hr)	4	배양방식	Shaking
		Salts	20 mM MgCl ₂		

<Table 7. 박테리오파지 증식 공정 변수>

Salmonella Heidelberg에 감염능을 갖는 박테리오파지 Sal-HEP-1의 적합 정제 공정 개발

1) 박테리오파지 Sal-HEP-1의 증식 공정 개발 후에 후속 공정 개발로 소규모 정제 공정을 개발하였음. 앞서 수행하였던 살모넬라 및 황색포도상구균 박테리오파지들의 정제 공정 개발 시 이용하였던 시험 방법으로 수행하여 최적 적합 정제 공정을 개발하였음. 박테리오파지 Sal-HEP-1의 정제 결과는 아래와 같음.



<Figure 11. 박테리오파지 Sal-HEP-1의 chromatography 정제 결과>

④ 2차년도 요약

연구목표 : 유용 파지 유래 단백질의 소규모 제조 시스템 개발 (생산/분리/정제)

- 후속 2차년도에는 3-2협동기관 보유 박테리오파지 유래 단백질들 중 유용 단백질을 선별한 후 제품화를 위한 제형 선별, 단백질 발현 조건 탐색 등의 연구를 수행하였음. 3-1세부기관에서는 3-2협동기관의 기본 데이터를 바탕으로 소규모 제조 시스템 개발 및 단기 보관 안정성 평가 시험 등을 수행하여 유효 데이터를 확보하였음.
- 추가연구로 3-1협동과제에서 신규하게 확보한 내열성이 우수한 살모넬라 박테리오파지의 소규모 증식 공정을 개발하였고, 유효성 평가용 시료를 제조하여 3-1협동과제에 공급하였음. 아울러 추후 산업적 활용을 고려하여 3-1협동과제 보유 유용 박테리오파지 및 파지 유래 단백질에 대한 항균력 조사 및 내열성 조사 시험도 수행하였음.
- 본 연구과제의 후속 2차년도 연구를 성공적으로 수행하여 연구지반지표, 사업화지표, 인력 양성지표 모두 목표 대비 실적을 달성하였음.

⑤ 2차년도 상세 내용

- 3-1 세부 (식중독균 제어를 위한 유용 소재의 대량 생산 공정 구축 및 제제화)

연구 목표: 유용 파지 유래 단백질의 소규모 제조 시스템 개발 (생산/분리/정제)

㉞ 파지 유래 단백질의 소규모 제조 시스템 개발

- 1) 소규모 제조 시스템 개발의 대상이 되는 파지 유래 단백질은 3-1협동기관 보유 황색포도상구균 박테리오파지 유래 항균 단백질 (endolysin) 3종임.
- 2) 향후 파지 유래 단백질의 산업적 활용을 고려하여, 당해연도에는 소규모 제조 시스템 및 적합 제형 개발 연구를 수행하였음. 또한, 단기 보관 안정성 조사 시험을 통해 파지 유래 단백질의 보관 조건을 설정하였음.
- 3) 파지 유래 단백질 3종의 소규모 발현 조건은 3-1협동기관의 flask 상의 발현 조건 (100 ml working volume)을 참조하여 2 L flask에 500 ml working volume으로 단백질 발현 시험을 실시하였음. 발현 관련 세부 조건을 제시하면 아래와 같음.

파지 유래 단백질	발현 세부 조건			
	LysSA11	온도 (°C)	18	배지
host		BL21(DE3)	induction OD ₆₀₀	0.5
배양시간 (hr)		16	배양방식	Shaking (180 rpm)
inducer 농도		IPTG 0.5 mM		
LysSA12	온도 (°C)	18	배지	LB + ampicillin (100 μ g/ml)
	host	BL21(DE3)	induction OD ₆₀₀	0.5
	배양시간 (hr)	16	배양방식	Shaking (180 rpm)
	inducer 농도	IPTG 0.5 mM		
LysPAL21c	온도 (°C)	18	배지	LB + kanamycin (50 μ g/ml)
	host	BL21(DE3)	induction OD ₆₀₀	0.5
	배양시간 (hr)	20	배양방식	Shaking (180 rpm)
	inducer 농도	IPTG 0.5 mM		

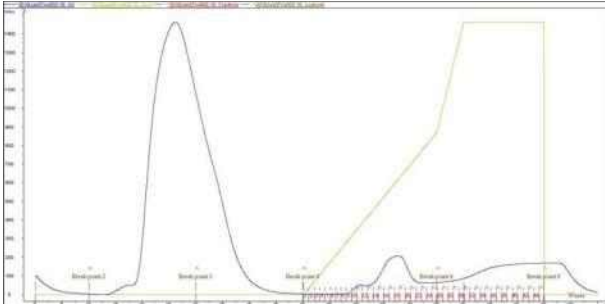
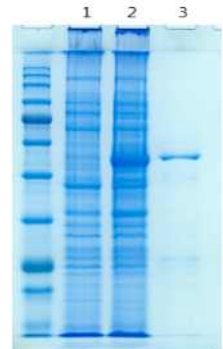
<Table 8. 파지 유래 단백질의 발현 세부 조건>

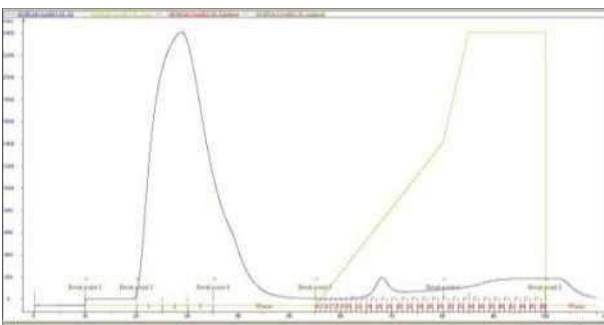
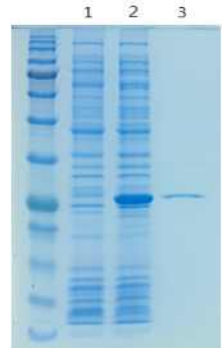
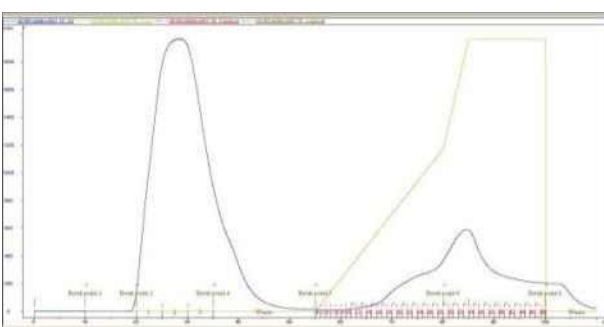
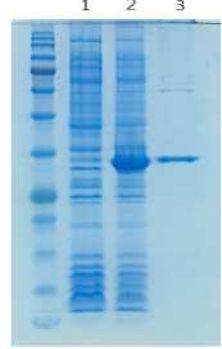
- 4) 파지 유래 단백질의 발현 유도 후에는 원심분리 (6,000 rpm; SUPRA 22K; rotor No. 11; 10 min; 4°C)를 통해 세포를 회수한 후, resuspension buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.5)로 세포를 잘 부유시킨 다음 초음파 파쇄 (3 s pulse, 3 s chase of 30% amplify for 15 min)를 통해 세포를 파쇄하였음. 원심분리 후 상등액을 회수하여 단백질 정제 시험에 이용하였음.

5) 파지 유래 단백질의 정제 공정은 기본적으로 chromatography 법을 기반으로 구축하였으며, 여러 번의 최적화 과정을 통하여 구축하였음. 구축된 파지 유래 단백질의 정제 공정을 제시하면 다음과 같음.

<p>1) Buffer 조성</p> <p>A buffer: 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.5</p> <p>B buffer: 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, pH 7.5</p> <p>2) 정제 조건</p> <p>Column type: Histrap HP</p> <p>Column size: 0.7×2.5 cm</p> <p>Bed volume: 1 ml</p> <p>Sample volume: 3 ml</p> <p>Flow rate: 1 ml/min</p> <p>Wash step: 10 CV in A buffer</p> <p>Elution step: Gradient 10 CV in 0-100% B buffer</p>
--

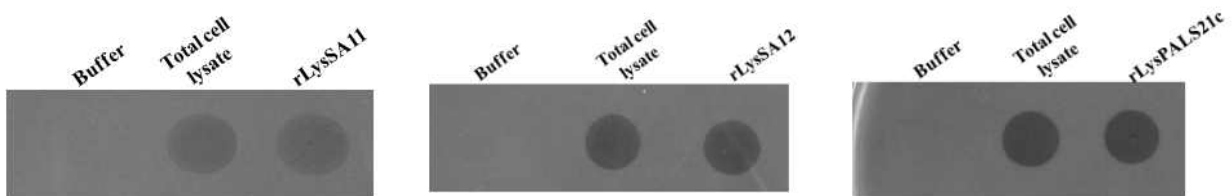
6) 파지 유래 단백질의 정제 공정 관련한 시험 결과는 아래와 같았음. 3종의 단백질 모두 목표 순도 이상의 정제 단백질을 확보할 수 있었음.

LysSA11 단백질	
<p>1) 정제 histogram</p> 	<p>2) 정제 결과 (SDS-PAGE)</p>  <p>(lane1: LysSA11 induction하지 않은 시료, lane2: LysSA11 induction한 시료, lane3: LysSA11 정제 시료)</p>
LysSA12 단백질	
1) 정제 histogram	2) 정제 결과 (SDS-PAGE)

	 <p>(lane1: LysSA12 induction하지 않은 시료, lane2: LysSA12 induction한 시료, lane3: LysSA12 정제 시료)</p>
LysPAL21c 단백질	
<p>1) 정제 histogram</p> 	<p>2) 정제 결과 (SDS-PAGE)</p>  <p>(lane1: LysPAL21c induction하지 않은 시료, lane2: LysPAL21c induction한 시료, lane3: LysPAL21c 정제 시료)</p>

<Table 9. 파지 유래 단백질의 정제 및 SDS-gel 결과>

7) 발현 및 정제된 파지 유래 단백질의 항균 활성 조사는 spot on lawn assay 법으로 시험을 실시하였고, 정제 단백질은 basal buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5)로 buffer exchange한 시료를 사용하였고, 대상 균종은 황색포도상구균이었음. 시험 결과 3종의 단백질 모두 황색포도상구균에 대한 항균 활성이 있음을 확인할 수 있었음. 또한, 황색포도상구균 이외의 *Staphylococcus* genus에 속하는 *Staphylococcus epidermidis* 균종에 대한 항균 활성도 있음을 확인할 수 있었으나 다른 균종에 대해서는 항균 활성이 없음을 확인하였음.



<Figure 12. 신규 항균 단백질 LysSA11의 Spotting assay>

시험대상 박테리아		파지 유래 단백질	LysSA11	LysSA12	LysPAL21c
<i>S. aureus</i>	ATCC 33591		+	+	+
	ATCC 35556		+	+	+
	KCOM 1455		+	+	+
	KCOM 1492		+	+	+
	CCARM 0080		+	+	+
	CCARM 0027		+	+	+
	CCARM 3708		+	+	+
	CCARM 3A815		+	+	+
	CCARM 3089		+	+	+
	CCARM 3366		+	+	+
	MW2 ¹⁾		+	+	+
	SA1 ²⁾		+	+	+
	SA2 ²⁾		+	+	+
	SA3 ²⁾		+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	KCOM 1547		+	+	+
	KCOM 1468		+	+	+
	CCARM 3737		+	+	+
	CCARM 3751		+	+	+
	CCARM 3752		+	+	+
<i>Lactobacillus brevis</i>	KCTC 3102		-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	KCTC 3103		-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCARM 5169		-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	CCARM 5192		-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739		-	-	-
* ATCC: American Type Culture Collection, KCOM: Korean Collection for Oral Microbiology, CCARM: Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes, 1) Community acquired methicillin resistant <i>S. aureus</i> strain, 2) Bovine mastitis clinical isolate. KCTC: Korean Collection for Type Cultures					
※ +: clear lytic activity, -: no lytic activity					

<Table 10. 파지 유래 단백질의 항균 효과 범위>

- 8) 후속 시험으로 개별 정제 단백질을 단계 희석한 시료를 준비하여 spot on lawn assay를 실시하여, 최소 항균 활성을 나타내는 유효 농도를 확인해 보았음. 시험 결과 LysSA11과 LysSA12의 경우, 유사한 농도 수준까지의 항균 활성을 가지는 것으로 확인 (유효 농도: 5 μ g) 되었으며 LysPAL21c는 나머지 두 단백질 보다 더 낮은 농도에서도 항균 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었음.



<Figure 13. 신규 항균 단백질 LysSA11과 LysSA12의 최소 항균 활성 평가>

9) 추가 항균 활성 조사 시험으로 turbidity reduction assay를 실시하여 TOD_{50} 값을 조사하였음. 시험 방법은 아래와 같음.

<1일차>

[균주 준비]

- ① Clean bench 내에서 50 ml conical tube에 TSB 배지 20 ml을 분주
- ② 황색포도상구균 glycerol stock 20 μ l를 첨가
- ③ 37°C shaking incubator에서 200 rpm으로 overnight 배양

<2일차>

[균주 준비]

- ① Clean bench 내에서 50 ml flask에 TSB 배지 20 ml을 분주
- ② Overnight 배양액 200 μ l를 첨가
- ③ 37°C shaking incubator에서 200 rpm으로 OD_{600} 이 0.5가 될 때까지 배양
- ④ 배양이 끝나면 4°C 5,000 rpm으로 10분간 원심 분리
- ⑤ 원심 분리 후 상층액을 버리고 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 20 ml을 첨가
- ⑥ 균주를 완전히 풀어준 후 다시 원심 분리하며 (washing) 이를 2회 반복
- ⑦ Washing을 마친 균주의 최종 흡광도 값이 1.0 ± 0.05 가 되도록 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)로 희석
- ⑧ 준비한 균주 부유액은 분석 전까지 ice 상태로 보관

[단백질 시료 준비]

- ① 정제 단백질 (2 mg/ml)을 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)를 사용하여 50, 100 μ g/ml로 희석한 후 ice 상태로 보관

[Turbidity reduction assay]

◇ 분석 조건

- 파장 : 600 nm
- 큐벳 : MICRO CELL 0.9 ml, 4 mm × 10 mm
- 측정간격 : 2 cycle/min
- 균체량 : 0.9 ml (OD_{600} : 1.0 ± 0.05)
- 시료량 : 100 μ l
- 분석시간 : 30 min

◇ 분석 방법

- ① 준비된 균주를 큐벳에 0.9 ml 첨가
- ② 준비된 단백질 시료 100 μ l를 큐벳에 첨가
- ③ 큐벳을 spectrophotometer에 넣고 분석 조건에 따라 분석 실시

10) 시험 결과, LysSA11과 LysSA12의 TOD_{50} 값은 유사한 수준임을 확인할 수 있었고, LysPAL21c가 다른 단백질에 비해 항균 활성이 우수함을 확인할 수 있었음.

구분	단백질 농도	TOD ₅₀ (min)
LysSA11	5 μ g/ml	19.7
	10 μ g/ml	14.6
LysSA12	5 μ g/ml	19.5
	10 μ g/ml	13.8
LysPAL21c	5 μ g/ml	15.2
	10 μ g/ml	9.4

<Table 11. 신규 항균 단백질 LysSA11, LysSA12, LysPAL21c의 항균 활성 비교>

④ 파지 유래 단백질 기반의 적합 제형 개발

1) 파지 유래 단백질 3종 중 가장 항균 활성이 우수하였던 LysPAL21c를 대상으로 적합 제형을 확보하기 위한 시험을 수행하였음. 적합 제형 도출을 위해 preformulation matrix screening 기법을 사용하였음. 사용한 preformulation matrix는 식품, 의약품 산업에서 흔히 사용되는 제형을 바탕으로 아래와 같이 basal buffer, pH, additive를 달리하여 구성하였음.

Preformulation matrix			
① Basal buffer	② pH	③ Additive	
		Type	Formulation effect
20 mM Tris-HCl	8.0	L-Cysteine (0.1%)	Stabilizer, Anti-oxidant
		Sorbitol (5%)	
10 mM Sodium phosphate	7.5	Sucrose (1%)	Stabilizer, Cryoprotectant
		Mannitol (5%)	
		NaCl (140 mM)	Tonicity

<Table 12. 신규 항균 단백질 LysSA11, LysSA12, LysPAL21c의 제형 구성>

2) 제형에 대한 적합성 평가는 정제 단백질을 matrix에 설정된 각 조성으로 buffer exchange를 실시한 후에, 설정한 stress 조건을 가한 후 그 영향을 평가하는 방식으로 실시하였음. 설정된 stress type은 agitation (2500 rpm, 2 hrs), freezing & thawing (3회)이었으며, 해당 stress를 각각 가한 후 흡광도 측정을 통해 단백질의 aggregation 정도를 조사하였음. 이러한 방식으로 안정성이 우수한 후보 제형을 선정하였음. 설정한 stress의 세부 시험 조건은 아래와 같았음.

* Stress 적용에 따른 파지 유래 단백질 LysPAL21c의 stability 측정

(1) 1st stress : Agitation

① 상기 제형으로 buffer exchange가 완료된 단백질 LysPAL21c 시료들을 1.5 ml tube에 450 μ l 씩 분주

② Agitation으로 인한 시료 유실을 막기 위해 parafilm을 이용하여 1.5 ml tube 입구를 막음

③ Vortexer (WiseMix®, VM-10)를 이용하여 2,500 rpm, 2 hr 동안 vortexing 실시

④ Vortexing 완료 후 시료를 96 well plate에 250 μ l 씩 분주

- ⑤ ELISA reader (Molecular Device Corp, VERSAmax UV Microplate Reader)를 사용하여 OD₆₀₀ 측정
- (2) 2rd stress : Freezing & Thawing
- ① 상기 제형으로 buffer exchange가 완료된 단백질 LysPAL21c 시료들을 1.5 ml tube에 300 μ l 씩 분주
 - ② -80 $^{\circ}$ C deep freezer를 이용하여 첫 냉동 시간은 적어도 24시간 이상, 이후 냉동 시간은 12시간 이상을 기준으로 하여 3회 냉/해동 반복 실시
 - ③ 냉/해동 완료 후 반응액을 96 well plate에 250 μ l 씩 분주
 - ④ ELISA reader를 사용하여 OD₆₀₀ 측정

3) 파지 유래 단백질 LysPAL21c를 대상으로 한 preformulation 시험을 통해, 4종류의 후보 적합 제형을 정리하여 제시하면 아래와 같음.

No.	Preformulation matrix
1	20 mM Tris-HCl, 0.1% L-Cysteine, pH 8
2	20 mM Tris-HCl, 1% Sucrose, pH 8
3	10 mM Sodium phosphate, 5% Mannitol, pH 7.5
4	10 mM Sodium phosphate, 1% Sucrose, pH 7.5

<Table 13. 신규 항균 단백질 LysPAL21c의 후보 적합 제형 구성>

4) 선정된 제형에서 LysPAL21c의 biological activity 조사 시험을 후속으로 실시하였음. 이는 선정된 후보 제형이 LysPAL21c의 항균 활성 저해 효과를 줄 수 있는 제형일 경우, 이를 배제하기 위한 목적으로 수행하였음. Biological activity 상세 시험 방법은 아래와 같음.

- <1일차>
 [균주 배양]
 ① Clean bench 내에서 50 ml conical tube에 TSB 배지 20 ml을 분주
 ② 황색포도상구균 stock 20 μ l를 첨가
 ③ 37 $^{\circ}$ C shaking incubator에서 200 rpm으로 overnight 배양
- <2일차>
 [균주 시료 준비]
 ① Clean bench 내에서 50 ml conical tube에 TSB 배지 20 ml을 분주
 ② Overnight 배양액 200 μ l를 첨가
 ③ 37 $^{\circ}$ C shaking incubator에서 200 rpm으로 OD₆₀₀이 0.5가 될 때까지 배양
 ④ 배양이 끝나면 4 $^{\circ}$ C 5,000 rpm으로 10 분간 원심 분리
 ⑤ 원심 분리 후 상층액을 버리고 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 20 ml을 첨가
 ⑥ 균주를 완전히 풀어준 후 다시 원심분리하며 (washing) 이를 2회 반복
 ⑦ Washing을 마친 균주의 최종 흡광도 값이 1.5 \pm 0.05가 되도록 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)로 희석
 ⑧ 분석 전까지 ice 상태로 보관
- [단백질 시료 준비]
 ① 4가지 제형 조건의 시료와 buffer exchange를 하지 않은 단백질을 50 μ g/ml로 희석한 후 ice 상태로 보관
- [Turbidity reduction assay]
 ◇ 분석 조건
 - 파장: 600 nm
 - 큐벳: MICRO CELL 0.9 ml, 4 mm \times 10 mm
 - 측정간격: 2 cycle/min
 - 균체량: 0.9 ml (OD₆₀₀: 1.5 \pm 0.05)
 - 시료량: 100 μ l

- 분석시간: 20 min

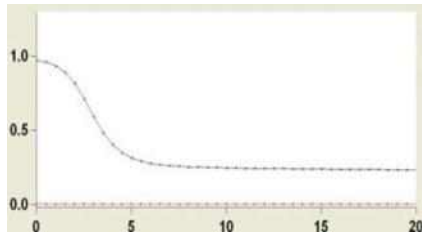
◇ 분석 방법

① 준비된 균주를 큐벳에 0.9 ml 첨가

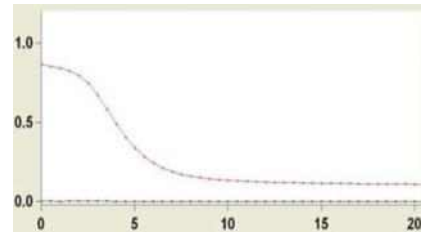
② 준비된 시료 100 μ l를 큐벳에 첨가

③ 큐벳을 spectrophotometer에 넣고 분석 조건에 따라 분석

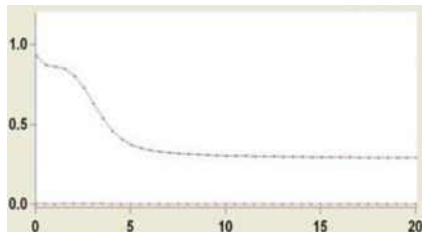
5) 파지 유래 단백질 LysPAL21c의 biological activity 조사 결과를 제시하면 아래와 같음.



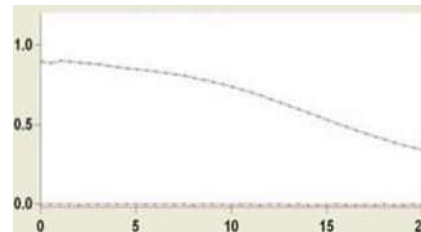
Basal buffer (control)



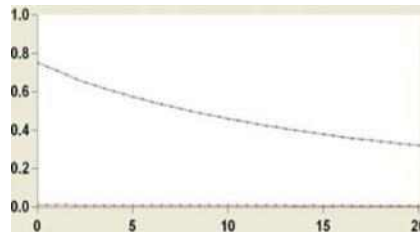
20 mM Tris-HCl, 0.1% L-Cysteine, pH 8



20 mM Tris-HCl, 1% Sucrose, pH 8



10 mM Sodium phosphate, 5% Mannitol, pH 7.5



10 mM Sodium phosphate, 1% Sucrose, pH 7.5

<Figure 14. 신규 항균 단백질 LysPAL21c의 biological activity 조사 결과>

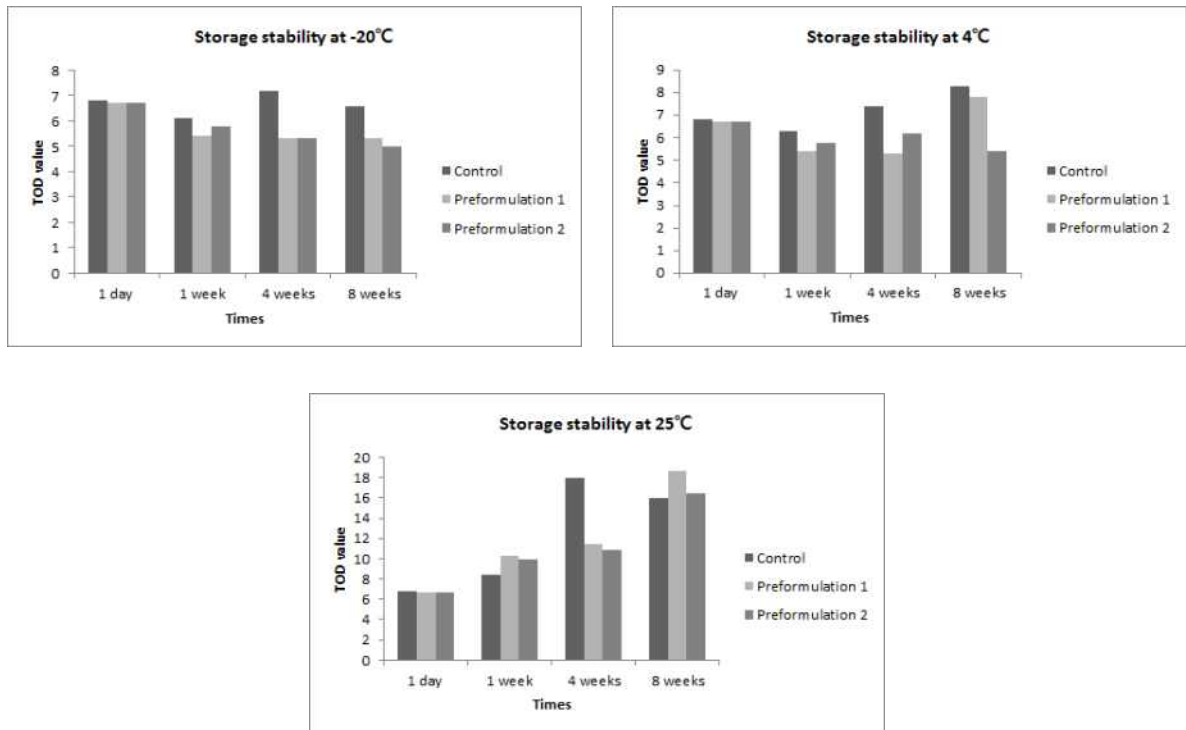
6) 후보 제형에서의 biological activity 조사를 통해 두 가지 제형 (20 mM Tris-HCl, 0.1% L-Cysteine, pH 8/ 20 mM Tris-HCl, 1% Sucrose, pH 8)을 적합 제형으로 선정하였음.

㉠ 단기 보관 안정성 조사

1) 확보된 후보 적합 제형을 바탕으로 2개월 단기 안정성 시험을 수행하였음. -20 $^{\circ}$ C, 4 $^{\circ}$ C, 및 25 $^{\circ}$ C 보관 조건 하에 시험을 수행하였으며, 사용된 파지 유래 단백질 LysPAL21c의 농도는 1 mg/ml 로 설정하였음. 안정성 평가는 turbidity reduction assay를 통해 수행하였음.

2) 시험 결과, -20 $^{\circ}$ C 온도 조건에서는 control buffer 시료를 제외한 두 가지 후보 제형 시료의 경우 모두 안정함을 확인하였음. 4 $^{\circ}$ C 온도 조건에서는 control buffer 시료는 4주차부터 활성이 감소하였고, 후보 제형 1 (20 mM Tris-HCl, 0.1% L-Cysteine, pH 8)의 경우 6주차부터 활성이 감소하였으며, 후보 제형 2 (20 mM Tris-HCl, 1% Sucrose, pH 8)의 경우 8주 동안 활성의 감소 없이 안정하였음. 그러나 25 $^{\circ}$ C 온도 조건에서는 두 가지 후보 제형 모두 1

주차부터 활성이 급격히 감소함을 확인하였음.



<Figure 15. 신규 항균 단백질의 단기 보관 안정성>

㉔ 추가 연구

살모넬라 박테리오파지 AP4의 소규모 증식 공정 개발

- 제3-1협동기관에서 신규 확보한 살모넬라 박테리오파지 AP4의 산업적 활용 가능성을 고려하여, 선행 연구를 통해 확립된 살모넬라 및 황색포도상구균 박테리오파지의 소규모 증식 공정 개발 시 이용하였던 전략과 방법을 참조하여 최적 적합 증식 공정을 개발하였음.
- 박테리오파지 AP4의 소규모 증식 공정 개발 결과를 요약 제시하면 아래와 같음. 추후 산업적 활용에 충분한 역할을 나타내었음.

박테리오파지	최종 박테리오파지 titer (pfu/ml)	주요 공정 변수			
		증식온도 (°C)	37	적합배지	TSB
AP4	5 × 10 ¹⁰	적합 host OD ₆₀₀	1.0	MOI	0.1
		증식시간 (hr)	4	배양방식	Shaking
		Salts			-

<Table 14. 박테리오파지 AP4의 소규모 증식 공정 개발 결과>

유효성 평가용 시료의 제조

- 현재까지의 연구 결과를 토대로 제3-1협동기관에서 수행할 유효성 평가의 대상이 되는 후

보 박테리오파지 및 파지 유래 단백질을 각 1종씩 선정하였음. 선정된 박테리오파지 AP4는 선행 연구를 통해 확립된 제형 개발 방법에 기반하여 고상 시제품을 제조하였음. 파지 유래 단백질 LysPAL21c의 경우, 고상 및 액상 제형의 시제품을 제조하여 제3-1협동기관에 제공하였음.

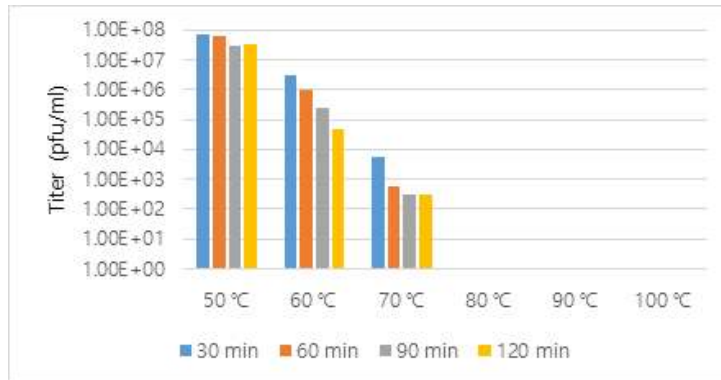
기술 도입 관련 validation 시험

- 1) 제3-1협동기관 보유 박테리오파지 및 파지 유래 단백질들 중에서 향후 산업화 가능성이 높다고 생각되는 후보 물질들을 선별하기 위해 개별 후보들의 기본 정보 (숙주 범위, 형태학적 특징, 유전체 및 단백질 크기 등)를 제3-1협동기관으로부터 제공받았음. 후보 물질들은 제3-1협동기관과의 물질이전계약을 통해 전달받았으며, 각 후보들의 특성에 기반한 validation 시험 (항균력 및 내열성 조사)을 수행하였음.
- 2) 클로스트리디움 퍼프린젠스에 항균력을 갖는 3종의 박테리오파지 (CPD2, CPD4, CPD7) 및 3종의 파지 유래 단백질 (C1, C2, C3)을 대상으로 당사 보유 클로스트리디움 퍼프린젠스 35주에 대한 항균 활성 조사 시험을 실시하였음. 시험 결과, 3종의 박테리오파지 중 CPD4가 넓은 항균력을 가짐을 확인할 수 있었으며 파지 유래 단백질 C2의 경우 모든 클로스트리디움 퍼프린젠스에 항균 활성을 보임을 확인하여 우수한 항균 활성을 가지는 후보 물질인 것으로 판단되었음.

No.	Test strains		박테리오파지			파지 유래 단백질		
	Strain	Strain name	CPD2	CPD4	CPD7	C1	C2	C3
1	<i>C. perfringens</i>	INT-CP-1	-	-	-	-	+	-
2		INT-CP-2	-	-	-	-	+	-
3		INT-CP-3	-	-	-	+	+	+
4		INT-CP-4	-	-	-	-	+	-
5		INT-CP-5	-	-	-	-	+	-
6		INT-CP-6	-	-	-	-	+	-
7		INT-CP-7	-	-	-	-	+	+
8		INT-CP-8	-	-	-	+	+	-
9		INT-CP-9	-	-	-	-	+	-
10		INT-CP-10	-	-	-	+	+	+
11		INT-CP-11	-	-	-	+	+	+
12		INT-CP-12	-	-	-	+	+	+
13		INT-CP-13	-	-	-	+	+	+
14		INT-CP-14	-	-	-	+	+	+
15		INT-CP-15	-	-	-	-	+	+
16		INT-CP-16	-	-	-	-	+	-
17		INT-CP-17	-	-	-	+	+	-
18		INT-CP-18	-	-	-	+	+	+
19		INT-CP-19	-	+	-	+	+	+
20		INT-CP-20	+	+	+	+	+	+
21		INT-CP-21	-	+	-	+	+	-
22		INT-CP-22	-	+	-	+	+	-
23		INT-CP-23	+	+	+	-	+	+
24		INT-CP-24	-	+	-	+	+	-
25		INT-CP-25	-	-	-	-	+	-
26		INT-CP-26	-	-	-	+	+	+
27		INT-CP-27	-	-	-	-	+	-
28		INT-CP-28	-	-	-	-	+	-
29		INT-CP-29	-	-	-	+	+	-
30		INT-CP-30	-	-	-	-	+	-
31		INT-CP-R-1	-	+	-	+	+	-
32		INT-CP-R-2	-	+	-	+	+	+
33		INT-CP-R-3	-	-	-	-	+	-
34		INT-CP-R-4	-	+	-	+	+	+
35		INT-CP-R-5	-	-	-	+	+	-

<Table 15. 박테리오파지 (CPD2, CPD4, CPD7) 및 3종의 파지 유래 단백질 (C1, C2, C3)의 항균 활성 조사 시험>

3) 후속 시험으로 클로스트리디움 퍼프린젠스 박테리오파지 CPD2의 내열성 조사 시험을 수행 하였음. 본 박테리오파지의 내열성 정보는 3-1협동기관으로부터 제공 받았으며, 3-1협동기 관에서 수행하였던 시험 조건과 유사한 방식으로 시험을 수행하였음. 시험 결과 70℃의 고 온 조건 하에 노출되었을 때 역가 감소는 있었지만 박테리오파지가 생존해 있음을 확인할 수 있었음.



<Figure 16. 신규 항균 단백질 CPD2의 온도 안정성>

4) 또한, 황색포도상구균에 항균력을 갖는 1종의 박테리오파지 (CSA13)를 대상으로 파지 유래 단백질을 이용한 항균력 조사 시험의 대상 균주였던 *S. aureus* 14주 및 *S. epidermidis* 5주에 대한 항균력 조사 시험을 실시하였음. 시험 결과, *S. epidermidis*에는 항균력이 없었고 4주의 *S. aureus*에만 항균력이 있음이 확인되었음.

박테리오파지		CSA13
시험대상 박테리아		
<i>S. aureus</i>	ATCC 33591	-
	ATCC 35556	+
	KCOM 1455	-
	KCOM 1492	-
	CCARM 0080	-
	CCARM 0027	++
	CCARM 3708	-
	CCARM 3A815	-
	CCARM 3089	-
	CCARM 3366	-
	MW2 ¹⁾	++
	SA1 ²⁾	++
	SA2 ²⁾	-
	SA3 ²⁾	-
<i>S. epidermidis</i>	KCOM 1547	-
	KCOM 1468	-
	CCARM 3737	-
	CCARM 3751	-
	CCARM 3752	-

* ATCC: American Type Culture Collection, KCOM: Korean Collection for Oral

Microbiology, CCARM: Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes, 1) Community acquired methicillin resistant *S. aureus* strain, 2) Bovine mastitis clinical isolate.

※ ++: clear plaque formation, +: turbid plaque formation, -: no plaque formation

<Table 16. 파지 유래 단백질 CSA13의 항균 활성 조사 시험>

⑥ 3차년도 요약

후속 3년차 연구목표 : 박테리오파지, 파지 유래 단백질의 산업적 제조 공정 scale-up 및 원료의 산업적 제조 공정 개발

- 후속 3차년도에는 후속 1, 2차년도의 연구 결과를 기반으로 산업적 제조 공정 scale-up 연구를 통해 제조 시스템을 확립하였고 박테리오파지 및 파지 유래 단백질 제제의 시제품을 도출하였음.
- 추가연구로 박테리오파지의 pellet 사료 표면 코팅 기술 개발을 통해 사료첨가제 및 사료 시장에서 박테리오파지의 활용 범위를 더욱 넓힐 수 있는 기반 데이터를 마련하였음.
- 본 연구과제의 후속 3차년도 연구를 통해 기술이전 및 매출시현 등의 사업화지표를 목표 대비 초과 달성하여 성공적인 사업화 실적으로 도출하였음.

⑦ 3차년도 상세 내용

- 3-1 세부 (식중독균 제어를 위한 유용 소재의 대량 생산 공정 구축 및 제제화)

연구 목표: 박테리오파지, 파지 유래 단백질의 산업적 제조 공정 scale-up 및 원료의 산업적 제조 공정 개발

㉠ 박테리오파지의 대규모 증식 및 정제 공정 개발

시제품 도출을 위한 산업적 제조 공정 scale-up

- 박테리오파지의 산업적 제조 공정 설정을 위해 선행연구를 통해 확립된 박테리오파지 소규모 증식 및 정제 공정에 기반하여 working volume 50 L 수준으로 scale-up된 박테리오파지 증식 및 정제 공정을 개발하였음. 대상 박테리오파지는 5종의 살모넬라 박테리오파지 (SFP10, BSP22, iEPS5, AP4, Sal-HEP-1), 3종의 황색포도상구균 박테리오파지 (CSA13, ASP-1, ASP-2), 2종의 클로스트리디움 퍼프린젠스 박테리오파지 (CPD2, CPD4)이며, 관련 시험 방법 및 결과를 제시하면 아래와 같음.

1) 살모넬라 박테리오파지의 대규모 증식 및 정제 공정 구축

A) 살모넬라 박테리오파지의 대규모 증식 공정 구축

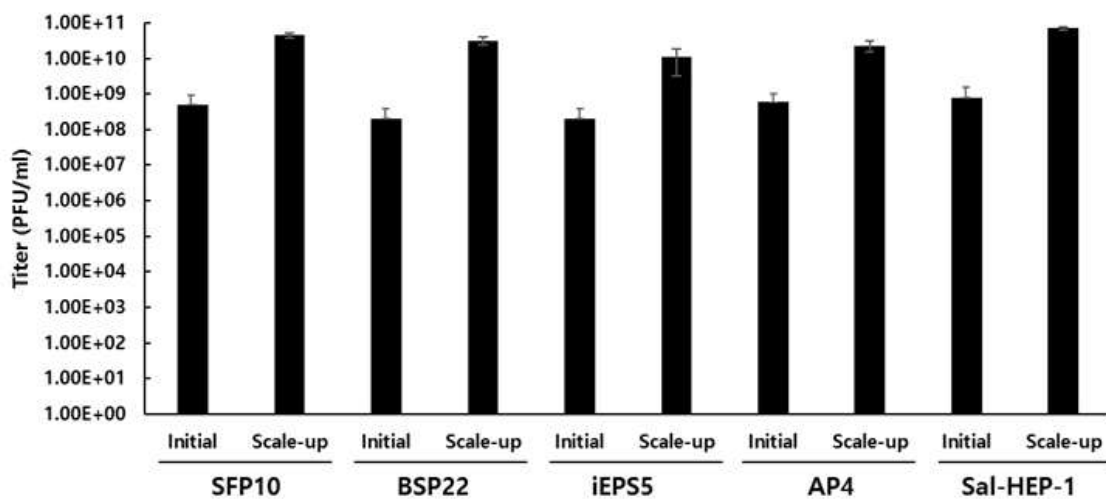
살모넬라 박테리오파지를 대상으로 개발된 증식 공정을 통해 증식할 경우, 박테리오파지 별로 큰 차이 없이 약 10^{10} pfu/ml 이상 수준의 박테리오파지 증식액을 확보할 수 있었음. 개별 박테리오파지의 대규모 증식 공정은 숙주 세포밀도 (OD_{600}) 및 증식시간의 미세조율을 통해 구축되었고, 세부 결과는 다음과 같음.

박테리오파지	최종 박테리오파지 titer (pfu/ml)	주요 공정 변수			
		증식온도 (°C)	적합 배지	적합 host OD ₆₀₀	배양방식
SFP10 (SalP-1)*	4.5 × 10 ¹⁰	증식온도 (°C)	37	적합배지	TSB
		적합 host OD ₆₀₀	1.5	MOI	0.1
		증식시간 (hr)	4	배양방식	Shaking
		Salts	-		
BSP22 (SalP-2)*	3.2 × 10 ¹⁰	증식온도 (°C)	37	적합배지	TSB
		적합 host OD ₆₀₀	1.0	MOI	0.1
		증식시간 (hr)	4	배양방식	Shaking
		Salts	MgCl ₂ 10 mM		
iEPS5 (SalP-3)*	1.1 × 10 ¹⁰	증식온도 (°C)	37	적합배지	TSB
		적합 host OD ₆₀₀	1.0	MOI	1
		증식시간 (hr)	4	배양방식	Shaking
		Salts	-		
AP4	2.3 × 10 ¹⁰	증식온도 (°C)	37	적합배지	TSB
		적합 host OD ₆₀₀	0.5	MOI	0.1
		증식시간 (hr)	5	배양방식	Shaking
		Salts	-		
Sal-HEP-1	7.1 × 10 ¹⁰	증식온도 (°C)	37	적합배지	TSB
		적합 host OD ₆₀₀	0.5	MOI	0.01
		증식시간 (hr)	5	배양방식	Shaking
		Salts	MgCl ₂ 20 mM		

* 괄호 안은 명칭 변경 전 박테리오파지를 의미함.

<Table 17. *Salmonella* 박테리오파지의 대규모 증식 공정 구축 결과>

B) Scale-up 증식 공정 개발을 통해 얻어진 박테리오파지의 titer는 초기 titer (≒10⁸ pfu/ml) 대비 약 2 log 수준 (≥10¹⁰ pfu/ml)으로 titer가 개선됨을 확인할 수 있었음.



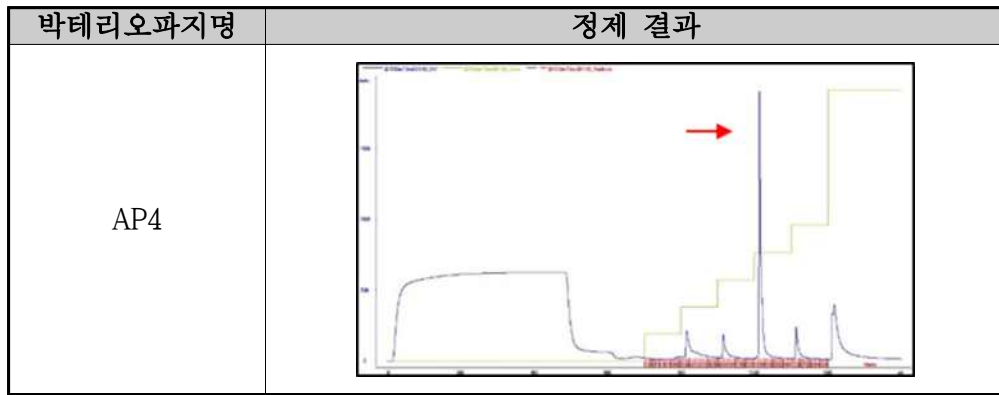
<Figure 17. 증식 공정 개발 전과 scale-up 증식 공정 개발 후의 살모넬라 박테리오파지 titer 비교>

2) 살모넬라 박테리오파지의 대규모 정제 공정 구축

A) 살모넬라 박테리오파지의 대규모 정제 공정은 ion exchange chromatography에 기반한 정제 공정을 개발하였음. 정제에 사용한 column은 CIM[®] QA-8f tube monolithic column이며 FPLC 기기를 이용하여 정제를 실시하였으며, 정제 공정 세부 조건은 선행연구를 통해 확립된 소규모 정제 공정과 유사한 조건으로 정제를 실시하였음. 그 결과 최종 확보된 개별 박테리오파지의 순도는 모두 90% 이상이었고, 목표 순도를 달성하였음. 정제 공정 구축과 관련한 대표적인 예로 박테리오파지 AP4의 정제 공정 조건 및 정제 결과를 하기에 제시하였음.

No.	정제 과정 수행 내용	Chromatography 조건		
		필요한 시료 및 agent	수행 목적	시료의 양
1	박테리오파지 증식액의 여과액 1,500 ml에 equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) 500 ml을 첨가한 후 5분 정도 방치	Sample	Sampling loading	2,000 ml
		Equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0)	Equilibration	500 ml
		Equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0)	Unbound washing	500 ml
2	CIM [®] QA-8f tube monolithic column을 이용하여 정제를 실시	Elution buffer (50 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, pH 8.0)	Elution	200 ml

<Table 18. 박테리오파지 AP4의 정제 공정 조건>



<Figure 18. 박테리오파지 AP4의 정제 결과>

3) 황색포도상구균 박테리오파지의 대규모 증식 및 정제 공정 구축

황색포도상구균 박테리오파지의 대규모 증식 공정 구축

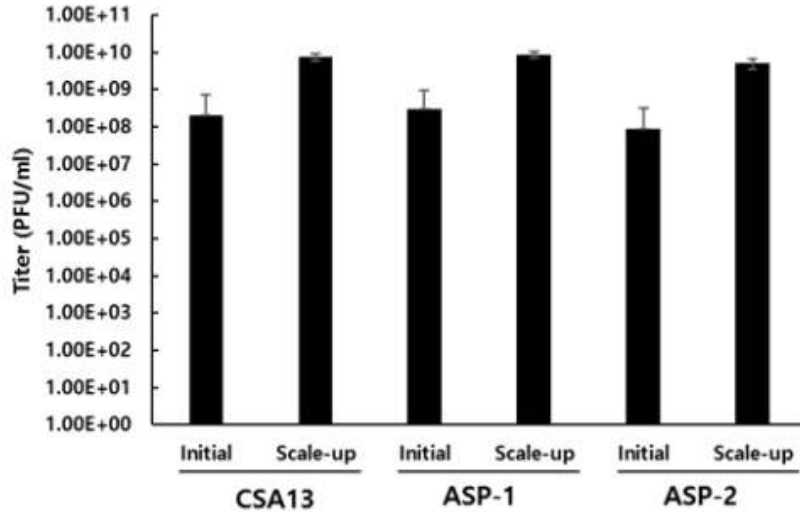
A) 황색포도상구균 박테리오파지를 대상으로 개발된 증식 공정을 통해 증식할 경우, 박테리오파지 별로 큰 차이 없이 약 10^9 pfu/ml 이상 수준의 박테리오파지 증식액을 확보할 수 있었음. 개별 박테리오파지의 대규모 증식 공정은 숙주 세포밀도 (OD_{600}) 및 증식시간의 미세조율을 통해 구축되었고, 세부 결과는 다음과 같음.

박테리오파지	최종 박테리오파지 titer (pfu/ml)	주요 공정 변수			
		증식온도 (°C)	적합 host OD_{600}	증식시간 (hr)	배양방식
CSA13 (StaP-1)*	7.5×10^9	37	1.0	5	Shaking
		적합배지	MOI	배양방식	TSB
		1	1	TSB	1
		-	-	-	-
ASP-1 (StaP-2)*	8.8×10^9	37	1.5	4	Shaking
		적합배지	MOI	배양방식	TSB
		1	1	TSB	1
		-	-	-	-
ASP-2	5.2×10^9	37	1.5	4	Shaking
		적합배지	MOI	배양방식	TSB
		1	1	TSB	1
		-	-	-	-

* 괄호 안은 명칭 변경 전 박테리오파지를 의미함.

<Table 19. *Staphylococcus aureus* 박테리오파지의 소규모 증식 공정 구축 결과>

B) Scale-up 증식 공정 개발을 통해 얻어진 박테리오파지의 titer는 초기 titer ($\approx 10^8$ pfu/ml) 대비 약 1 log 수준 ($\geq 10^9$ pfu/ml)으로 titer가 개선됨을 확인할 수 있었음.



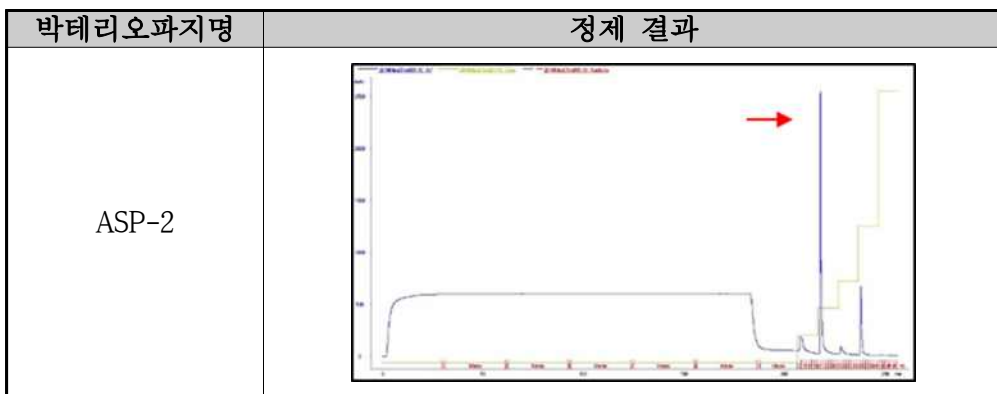
<Figure 19. 증식 공정 개발 전과 scale-up 증식 공정 개발 후의 황색포도상구균 박테리오파지 titer 비교>

4) 황색포도상구균 박테리오파지의 대규모 정제 공정 구축

A) 황색포도상구균 박테리오파지의 대규모 정제 공정은 상기의 살모넬라 박테리오파지 대규모 정제 공정 구축에 이용하였던 column chromatography 기반 정제 공정을 활용하였음. 마찬가지로 정제 공정 세부 조건은 선행연구를 통해 확립된 소규모 정제 공정과 유사한 조건으로 정제를 실시하였음. 그 결과 최종 확보된 개별 박테리오파지의 순도는 모두 90% 이상 이었고, 목표 순도를 달성하였음. 정제 공정 구축과 관련한 대표적인 예로 박테리오파지 ASP-2의 정제 공정 조건 및 정제 결과를 하기에 제시하였음.

정제 과정		Chromatography 조건		
No.	수행 내용	필요한 시료 및 agent	수행 목적	시료의 양
1	박테리오파지 증식액의 여과액 1,000 ml에 equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) 1,000 ml을 첨가한 후 5분 정도 방치	Sample	Sampling loading	2,000 ml
		Equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0)	Equilibration	600 ml
2	CIM [®] QA-8f tube monolithic column을 이용하여 정제를 실시	Equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0)	Unbound washing	800 ml
		Elution buffer (50 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, pH 8.0)	Elution	200 ml

<Table 20. 박테리오파지 ASP-2의 정제 공정 조건>



<Figure 20. 박테리오파지 ASP-2의 정제 결과>

5) 클로스트리디움 퍼프린젠스 박테리오파지의 대규모 증식 및 정제 공정 구축

클로스트리디움 퍼프린젠스 박테리오파지의 대규모 증식 공정 구축

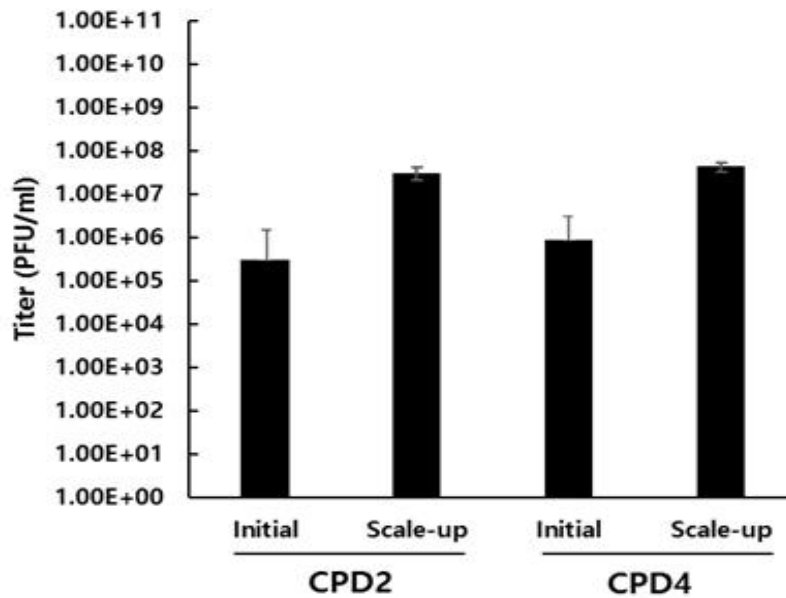
A) 클로스트리디움 퍼프린젠스 박테리오파지를 대상으로 적합 소규모 증식 공정을 500 ml scale로 구축하였으며, 향후 산업적 활용을 고려하여 개별 박테리오파지에 적합한 대규모 증식 공정은 소규모 증식 공정을 통해 설정된 조건을 기반으로 50 L scale로 구축하였음. 증식은 발효조에 혼합가스 주입함으로서 혐기상태를 유지시킨 다음 발효조 내에 박테리아와 박테리오파지를 접종한 후 37°C 조건하에 배양하는 방식으로 실시하였음. 그 결과 약 10⁷ pfu/ml 이상 수준의 박테리오파지 증식액을 확보할 수 있었음. 세부 결과를 제시하면

다음과 같음.

박테리오파지	최종 박테리오파지 titer (pfu/ml)	주요 공정 변수			
		증식온도 (°C)	37	적합배지	TSB
CPD2	5.1×10^7	적합 host OD ₆₀₀	0.5	MOI	0.1
		증식시간 (hr)	4	배양방식	헝기 Shaking
		Salts	-		
		증식온도 (°C)	37	적합배지	TSB
CPD4	6.3×10^7	적합 host OD ₆₀₀	0.5	MOI	0.01
		증식시간 (hr)	4	배양방식	헝기 Shaking
		Salts	-		
		증식온도 (°C)	37	적합배지	TSB

<Table 21. Clostridium perfringens 박테리오파지의 대규모 증식 공정 구축 결과>

B) Scale-up 증식 공정 개발을 통해 얻어진 박테리오파지의 titer는 초기 titer ($\approx 10^5$ pfu/ml) 대비 약 2 log 수준 ($\geq 10^7$ pfu/ml)으로 titer가 개선됨을 확인할 수 있었음.



<Figure 21. 증식 공정 개발 전과 scale-up 증식 공정 개발 후의 클로스트리디움 퍼프린젠스 박테리오파지 titer 비교>

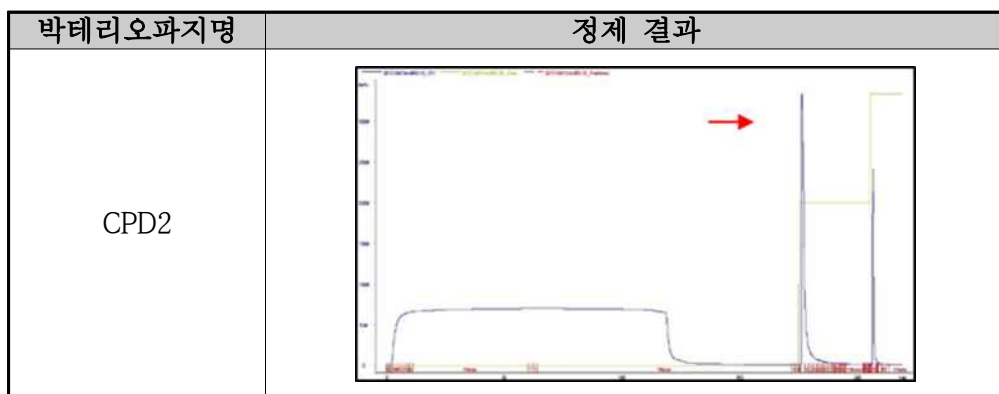
6) 클로스트리디움 퍼프린젠스 박테리오파지의 대규모 정제 공정 구축

A) 클로스트리디움 퍼프린젠스 박테리오파지의 대규모 정제 공정은 column chromatography 기반 정제 공정을 활용하였음. 클로스트리디움 퍼프린젠스 박테리오파지의 경우, 박테리오파지 증식액을 1차적으로 PEG 침전을 실시한 다음 이렇게 하여 부피를 줄인 것을

chromatography에 적용하는 방식으로 정제 공정을 구축하였음. 본 정제 공정을 적용하여 최종 확보된 개별 박테리오파지의 순도는 목표한 순도인 90% 이상이었음. 정제 공정 구축과 관련한 대표적인 예로 박테리오파지 CPD2의 정제 공정 조건 및 정제 결과를 하기에 제시하였음.

No.	정제 과정 수행 내용	Chromatography 조건		
		필요한 시료 및 agent	수행 목적	시료의 양
1	박테리오파지 농축 여과액 1,000 ml에 equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) 500 ml을 첨가한 후 5분 정도 방치	Sample	Sampling loading	1,500 ml
		Equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0)	Equilibration	500 ml
2	CIM [®] QA-8f tube monolithic column을 이용하여 정제를 실시	Equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0)	Unbound washing	800 ml
		Elution buffer (50 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, pH 8.0)	Elution	200 ml

<Table 22. 박테리오파지 CPD2의 정제 공정 조건>



<Figure 22. 박테리오파지 CPD2의 정제 결과>

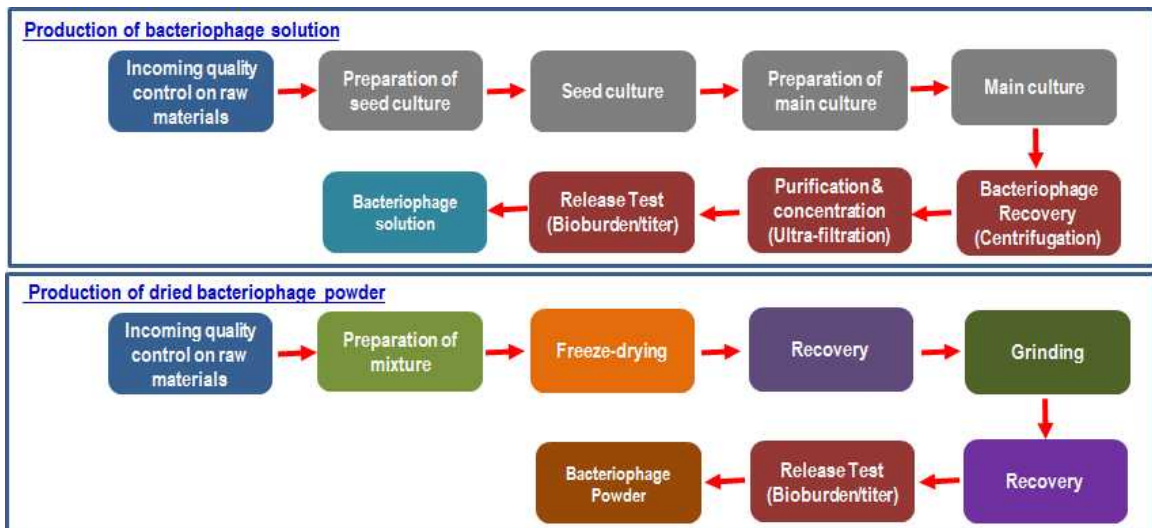
B) 대규모 증식 및 정제 공정 개발 연구는 3회 반복 수행되었고, 확보된 박테리오파지 증식액의 titer를 비교해 본 결과 batch 별 titer의 차이가 거의 없음을 확인할 수 있었음. 따라

서, 개별 박테리오파지는 추후 Anti-Salmonella, Anti-Staphylococcus, Anti-Clostridium 시제품으로 충분히 활용될 수 있을 것으로 판단되었음.

④ 사료첨가제 시제품의 제조법 완성 및 시제품 생산

1) 박테리오파지 기반 동물용 사료첨가제 시제품 제조 관련하여서는 확립된 박테리오파지 증식 및 정제 공정과 적합 제형 개발 결과를 바탕으로 아래와 같은 제조 공정 순서로 제조하였음.

- ① 박테리오파지 증식, ② 박테리오파지 증식액 회수, ③ 박테리오파지 증식액 여과, ④ 박테리오파지 농축, ⑤ 건조 원말 제조 (동결건조 및 건조 원말 파쇄), ⑥ 부형제와 원말의 혼합, ⑦ Titration 및 함량 조정 (개별 박테리오파지 원말 제조), ⑧ 최종 박테리오파지 건조 원제 제조 (개별 박테리오파지 원말 및 부형제 혼합), ⑨ Release test (QC) 및 packaging



<Figure 23. 박테리오파지 기반 사료첨가제 제조 공정 순서도>

2) 상기 제조 공정에 대해서 각 단계별 표준화 과정을 거쳐 표준작업서 (standard operating procedure, SOP)를 마련하였으며, 이를 통해 박테리오파지 기반 제제의 산업화를 위한 제조 공정을 확립하였다고 할 수 있겠음. 대표적인 SOP를 예시로 제시하면 아래와 같음.

Standard Operating Procedure		
	Prep./Revision Date : 2019.Nov.08	Document No. : INIRON-Unit-12-001
Title : Bacteriophage Initial Enrichment		

Bacteriophage Initial Enrichment

PROCEDURE

- Clean bench 내에서 박테리오파지 plaque이 형성되어 있는 agar plate로부터 박테리오파지 single plaque를 잘라냄 (white tip이나 yellow tip으로 plaque 주변을 조심스럽게 오려냄)
- 적합배지 (TSB 등; salt 첨가 하지 않음) 1 ml이 들어 있는 15 ml conical tube에 잘라낸 plaque를 포함한 agar 조각을 첨가 (tip으로 들어 올려 옮기 줌)
- Conical tube의 뚜껑을 닫은 다음 37°C incubator에서 3시간 동안 방치하여 (shaking 없이 그대로 방치) 박테리오파지를 agar로부터 유리시킴
- 4,500 rpm으로 10분간 원심분리 (4°C)
- 상등액을 조심스럽게 회수하여 4개의 microcentrifuge tube에 각 200 µl씩 옮김
- Fresh culture (OD₆₀₀ = 1에 도달한 culture 사용. ±0.2는 허용). 기본배지 및 salt solution을 이용하여 다음과 같이 "배지/균 혼합액"을 준비한다.

	배지/균 혼합액 1	배지/균 혼합액 2	배지/균 혼합액 3	배지/균 혼합액 4
Fresh culture	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
기본배지	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
1 M CaCl ₂	-	2 µl	-	2 µl
1 M MgCl ₂	-	-	2 µl	2 µl

- 6행에서 준비한 "배지/균 혼합액"을 5행에서 준비한 4개의 microcentrifuge tube에 각각 40 µl씩 첨가
- 37°C incubator에서 O/N 동안 shaking incubation (형기성 세균의 경우는 shaking은 해주지 않음)
- 다음날 4,500 rpm으로 10분간 원심분리 (4°C)
- Cell pellet이 떨어지지 않게 상등액을 조심스럽게 회수한 다음 새 microcentrifuge tube로 옮김 (회수할 수 있는 최대량 회수)
- 6행에서 준비한 "배지/균 혼합액" 40 µl씩을 첨가
- 37°C incubator에서 O/N 동안 shaking incubation (형기성 세균의 경우는 shaking은 해주지 않음)
- 다음날 4,500 rpm으로 10분간 원심분리 (4°C)
- Step 10부터 Step 13을 3회 반복
- Top agar로 활성 확인 (Plaque assay)
- Plaque assay에서도 활성이 확인되고 1 × 10¹⁰ pfu/ml 이상이 될 경우에는 후속 단계인 small-scale enrichment로 들어가고, ther가 부족할 경우 상기 과정을 2-3 round 반복

Standard Operating Procedure		
	Prep./Revision Date : 2019. Dec. 13	Document No. : INIRON-Phage-QC-12-001
Title : Top Agar Assay of Solid Samples (ST specific bacteriophage)		

Top Agar Assay of Solid Samples (ST specific bacteriophage)

PROCEDURE

<1일차: Bacterial Seed Culture>

[사전준비]

- Clean bench의 fan을 가동시키고 1 시간 동안 UV-lamp를 켜 둔다.
- UV-lamp를 끄고 난 다음 다음의 작업을 진행한다.

[박테리아 배양]

- 50 ml conical tube에 TSB (+ 50 µg/ml kanamycin) 배지 10 ml를 첨가한다 (오후 5시 전후에 시작).

→ TSB 배지 제조 방법

조성: Bacto™ Tryptic Soy Broth (BD Cat # 211825) 30 g/L

제조법: ① 700 ml 정도의 물을 1 L bottle에 넣은 후 상기 성분을 첨가하고 잘 섞어 준다. 물을 1 L가 되게 채워준다.

② Autoclave

③ Autoclave 후에 식힌 후 상온에 두고 사용

- 1행에서 준비한 것에 bacterial glycerol stock (5T-84-Km) 10 µl를 첨가한다 (bacterial glycerol stock은 충분한 개수를 준비해 두고 사용하며, 3회까지만 freezing/thawing 허용).

→ Bacterial glycerol stock 제조 시에는 타 균의 오염 및 박테리오파지의 오염에 주의해야 함. Bacterial glycerol stock 제조 후에는 배양을 실시한 후에 배양액을 여음한 ① Rambagh plating을 통한 살오셀라 확인, ② Overlay assay를 통한 박테리오파지에 대한 감수성 확인, ③ Top agar assay를 통한 박테리오파지 오염 조사, ④ Mytomycin C 처리 및 top agar assay를 통한 박테리오파지 오염 재검정을 실시하여야 함.

- 37°C에서 200 rpm으로 O/N shaking culture

<2일차: Plaque Assay>

[사전준비]

- Clean bench의 fan을 가동시키고 1 시간 동안 UV-lamp를 켜 둔다.

<Figure 24. 표준작업서 예시>

3) 제조 단계별 SOP에 기반하여 개별 박테리오파지 건조원제를 반복 제조하여 박테리오파지 원료 제조 공정의 안정성과 재현성을 평가하였음. 제조가 완료된 최종 박테리오파지 건조 원제에 대해 QC 시험을 실시한 결과를 제시하면 아래와 같으며, 제조 배치별로 박테리오파지 건조원제의 titer가 거의 변화가 없음을 확인할 수 있었음. 따라서 박테리오파지 기반 사료첨가제 제조 공정이 재현성이 높고 안정화 및 표준화된 공정이라고 결론지을 수 있었음.

<박테리오파지 건조원제의 제조 후 QC 결과>

구분	박테리오파지	박테리오파지 titer (pfu/g)		
		Batch 1	Batch 2	Batch 3
Anti- <i>Salmonella</i> bacteriophages	SFP10	2 × 10 ¹⁰	1 × 10 ¹⁰	2 × 10 ¹⁰
	BSP22	3 × 10 ¹⁰	4 × 10 ¹⁰	4 × 10 ¹⁰
	iEPS5	2 × 10 ¹¹	2 × 10 ¹¹	3 × 10 ¹¹
	AP4	4 × 10 ¹⁰	5 × 10 ¹⁰	5 × 10 ¹⁰
	Sal-HEP-1	3 × 10 ¹⁰	2 × 10 ¹⁰	2 × 10 ¹⁰
Anti- <i>Staphylococcus aureus</i> bacteriophages	CSA13	4 × 10 ⁹	4 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹
	ASP-1	1 × 10 ¹⁰	2 × 10 ¹⁰	1 × 10 ¹⁰
	ASP-2	5 × 10 ⁹	4 × 10 ⁹	6 × 10 ⁹
Anti- <i>Clostridium perfringens</i> bacteriophages	CPD2	2 × 10 ⁸	1 × 10 ⁸	1 × 10 ⁸
	CPD4	1 × 10 ⁸	2 × 10 ⁸	1 × 10 ⁸

<Table 23. 박테리오파지 건조원제의 제조 후 QC 결과>

4) 확립된 제조 공정을 통해 박테리오파지 기반 사료첨가제 시제품을 제작하였음. 식품 유해 세균에 대한 제어력 및 유효성 평가용 박테리오파지 기반 시제품을 제3-1협동기관에 제공하였음. 또한, 본 연구를 통해 확보된 박테리오파지들은 동물용 사료첨가제 제품으로 유용하게 활용될 것이라고 생각되며, 일부 박테리오파지는 사료첨가제 제품 사양에 포함되어 제품화되었고 매출 시현으로 이어지게 되었음.

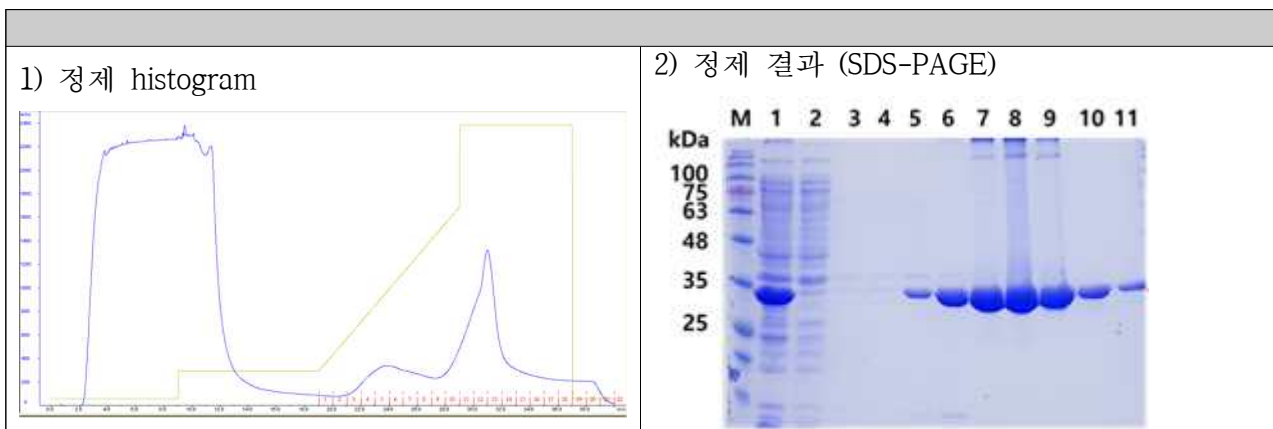


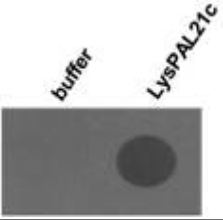
<Figure 25. 박테리오파지 건조원제 시제품>

㉔ 파지 유래 단백질의 대규모 발현 및 정제 공정 개발

1) 산업적 제조 공정 scale-up

- A) 대규모 발현 및 정제 공정 개발 대상이 되는 파지 유래 단백질은 선행연구를 통해 항균 활성이 가장 우수하였던 LysPAL21c임.
- B) 소규모 제조 시스템 개발 시의 조건과 결과를 참조하여 파지 유래 단백질 LysPAL21c의 대규모 발현 및 정제 공정을 개발하였음. 생산액 기준 10 L scale 수준으로 파지 유래 단백질 LysPAL21c에 대한 발현 시험을 실시하였으며, 발현 및 정제 관련 세부 조건은 소규모 제조 시스템 개발 시에 적용하였던 조건과 동일하게 수행하였음. 총 5회 반복 제조를 통해 리터 당 평균 약 10~15 mg 수준의 정제 단백질 LysPAL21c를 확보할 수 있었고, 정제 순도는 95% 이상이었음.
- C) 확보 정제 단백질 LysPAL21c를 이용하여 통상의 spot on lawn assay 법으로 항균 활성을 조사해 본 결과, 대상 세균인 황색포도상구균에 대해 항균 활성을 나타냄을 확인할 수 있었음.



	(lane1: LysPAL21c induction lysate, lane2: flow through, lane3~11: elution fractions)
3) 항균 활성 결과	

<Figure 26. LysPAL21c 단백질 발현, 정제 및 항균 활성 조사 결과>

2) 현장 평가용 시료 제조

A) 확립된 파지 유래 단백질 대규모 발현 및 정제 공정과 선행연구를 통해 적합 제형으로 선정된 버퍼 조건을 적용하여 제3-1협동기관에서 수행할 식품 유해 세균에 대한 유효성 평가용 시제품을 제작하여 제공하였음. 본 연구를 통해 확보된 파지 유래 단백질은 농축산식품 분야 뿐 아니라 부가가치가 큰 인체 및 동물용 의약품으로의 후보 물질로도 활용될 수 있을 것임.



<Figure 27. 파지 유래 단백질 시제품>

㉔ 추가연구

1) 박테리오파지의 pellet 사료 표면 코팅 기술 개발

A) 동물용 사료첨가제 분야에서의 박테리오파지 활용 범위 확장 및 관련 시장에서의 경쟁력 강화를 목적으로 가공 pellet 사료 (육계 후기) 표면에 박테리오파지 액을 분사한 후 건조시키는 방식의 after coating 기술을 적용하는 표면 코팅 기술을 개발하였음.

B) 세부 실험 방법을 요약 제시하면 아래와 같음.

① 식품용 식용 색소인 치자청색소를 박테리오파지 액에 최종 농도 0.1, 0.5% 수준이 되도록 첨가



② Coating 기기의 작동 조건을 다음과 같이 설정하여 가동

시험에 사용된 pellet 양	300 g
치자청색소/박테리오파지 혼합액 사용 농도	0.1, 0.5%
치자청색소/박테리오파지 혼합액 분사량	Pellet 사료 질량의 25% 수준이 되도록 분사
대상 박테리오파지	살모넬라 박테리오파지 AP4
After coating 시 적용 온도	40, 50, 60°C
After coating 소요 시간	1시간

<Table 24. coating 기기 작동 조건>

③ 통상의 top agar assay로 titration 실시

C) 실험 결과, coating 시 적용 온도가 40~50°C 일 경우에 박테리오파지 titer에 영향을 주지 않는 것으로 확인되나 60°C 에서는 약 1 log 수준으로 감소됨을 확인할 수 있었음. 따라서 40~50°C 조건 하에서 박테리오파지의 pellet coating을 수행하면 안정하게 표면 코팅이 가능할 것이라 판단되었음.

No.	치자청색소/박테리오파지 혼합액 농도 (%)	After coating 시 적용 온도 (°C)	After coating 완료된 pellet	제조 용량 (g)	Titer (pfu/g)
1	0	미적용		-	-
2	0.1	40		300	6.6×10^7
3		50		300	2.3×10^7
4		60		300	2.2×10^6
5	0.5	40		300	6.8×10^7
6		50		300	2.7×10^7
7		60		300	3.2×10^6

<Table 25. 박테리오파지의 pellet coating 조건 확립>

• 3-1 협동 식중독균에 대한 항생제 대체 생물학적 제어 기술 현장 적용 및 산업화)

연구목표 : 생물학적 항균 소재 생산을 위한 박테리오파지 선정 및 특성 분석

① 1-3차년도 전체 요약

㉓ 후속 1년차 연구목표 : 생물학적 항균 소재 생산을 위한 박테리오파지 선정 및 특성 분석

- 1, 2단계에서 분리된 박테리오파지 중 건조한 환경 및 고온 환경에서 식중독균에 대한 우수한 사멸능을 갖는 후보균 선정
- 건조 및 고온 조건에서 식중독균에 대한 우수한 사멸능을 갖는 신규 박테리오파지 분리
- 신규 분리된 박테리오파지의 용해능 및 용균 활성 범위등의 특성 분석
- NGS 기법을 활용한 분리된 박테리오파지의 염기서열 분석

㉔ 후속 2년차 연구목표 : 다양한 제형의 박테리오파지 및 파지 유래 단백질 개발

- 확보된 박테리오파지의 염기서열 정보에 기반하여 기존 항균 단백질과 상동성을 갖는 후보균 선정
- 선정된 항균 단백질 발현 및 용균 특성 분석
- 박테리오파지 및 항균 단백질의 실제 산업 조건 적용을 위한 최적의 제형 선정
- 선정된 제형에 대한 박테리오파지 및 항균 단백질 적용과 용균 특성 분석

㉕ 후속 3년차 연구목표 : 식품 처리용 항균제 생산 조건 최적화 및 현장 적용

- 신규 개발 산업용 항균 제제의 다양한 대상 모델에서의 식중독균 사멸능 확인
- 다양한 처리 조건을 기반으로 최적의 용균 효과를 보이는 적용 방법 선정
- 3-1 세부가 보유한 기기 및 기술을 바탕으로 박테리오파지 및 항균 단백질 제제의 lab scale 및 pilot scale 생산 조건 구축
- 실제 현장 적용을 위한 제품 평가

② 1차년도 요약

연구목표 : 생물학적 항균 소재 생산을 위한 박테리오파지 선정 및 특성 분석

- 1, 2단계에서 분리된 박테리오파지 중 건조한 환경 및 고온 환경에서 식중독균에 대한 우수한 사멸능을 갖는 후보균 선정
- 건조 및 고온 조건에서 식중독균에 대한 우수한 사멸능을 갖는 신규 박테리오파지 분리
- 신규 분리된 박테리오파지의 용해능 및 용균 활성 범위등의 특성 분석
- NGS 기법을 활용한 분리된 박테리오파지의 염기서열 분석
- 3-1세부기관은 후속 1차년도 연구 수행을 통해 본 핵심과제의 최종 목표인 식중독균 제어를 위한 유용 소재인 박테리오파지의 대량 생산 공정 구축 및 제제화를 위한 기반 기술을 확립 하였음.

③ 1차년도 상세 내용

연구 목표 : 생물학적 항균 소재 생산을 위한 박테리오파지 선정 및 특성 분석

㉞ Selection of bacteriophages for industrialization

1) Host range of phages

다양한 *Salmonella* 종을 저감화하기 위해서는 넓은 숙주 범위를 갖는 bacteriophage 및 서로 다른 숙주 범위를 갖는 bacteriophage를 섞는 것이 필요하다. 본 연구에서는 이미 분리된 *Salmonella* bacteriophage 중 산업화에 적합한 bacteriophage를 선정하기 위해 우선 bacteriophage의 host range를 측정하였다.

Host range를 측정하기 위해 다수의 *Salmonella* 종 균주들에 대해 spotting assay를 수행하였다. 그 결과, *S. Typhimurium*을 비롯한 다양한 균주에 대해 투명한 plaque를 형성하였으며, 그 중 iEPS5, BSP22, SFP10 bacteriophage의 host range를 합했을 때 실험한 모든 *S. Typhimurium*을 감염시킴을 알 수 있었다. 또한 SFP10의 경우 병원성 *E. coli* 또한 감염할 수 있는 것으로 확인되었다.

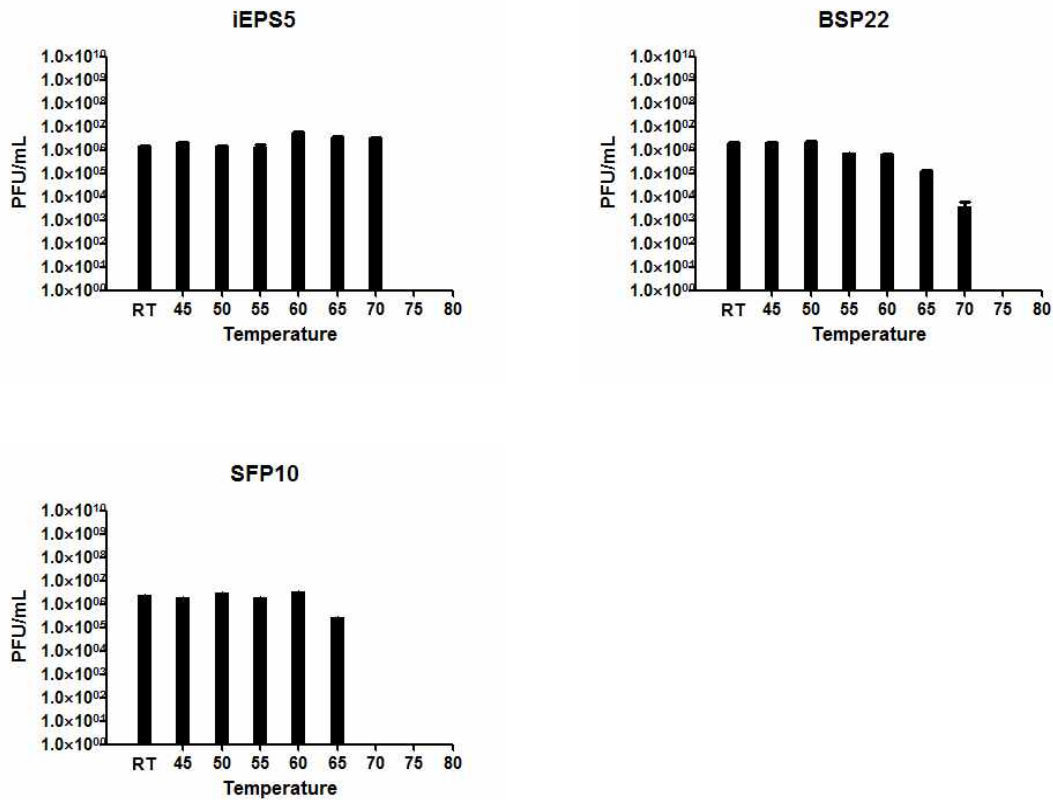
Bacterial host	iEPS5	BSP22	SFP10
<i>S. Typhimurium</i> SL1344	C	C	C
<i>S. Typhimurium</i> LT2	C	C	C
<i>S. Typhimurium</i> UK1	C	C	C
<i>S. Typhimurium</i> DT104	C	C	C
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028s	I	C	C
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 19586	C	C	-
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 43147	C	C	-
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13076	-	C	C
<i>S. Typhimurium</i> NCTC 12023	-	-	C
<i>S. Typhimurium</i> NCTC 1425	-	-	C
<i>S. Typhi</i> Ty2-b	-	C	-
<i>S. Paratyphi</i> A IB 211	C	C	C
<i>S. Paratyphi</i> B IB 231	-	C	C
<i>S. Paratyphi</i> C 216	-	C	-
<i>E. k-12</i> MG1655	-	C	-
<i>E. O157:H7</i> ATCC 35150	-	-	C
<i>E. O157:H7</i> ATCC 43890	-	-	C
<i>E. O157:NM</i> 3204-92	-	-	C
<i>E. O157:NM</i> H-0482	-	-	C

C, clear plaque; I, inhibition zone; -, no infection

<Table 26. Host spectrum of *Salmonella* bacteriophage iEPS5, BSP22 and SFP10>

2) Thermostability of phages

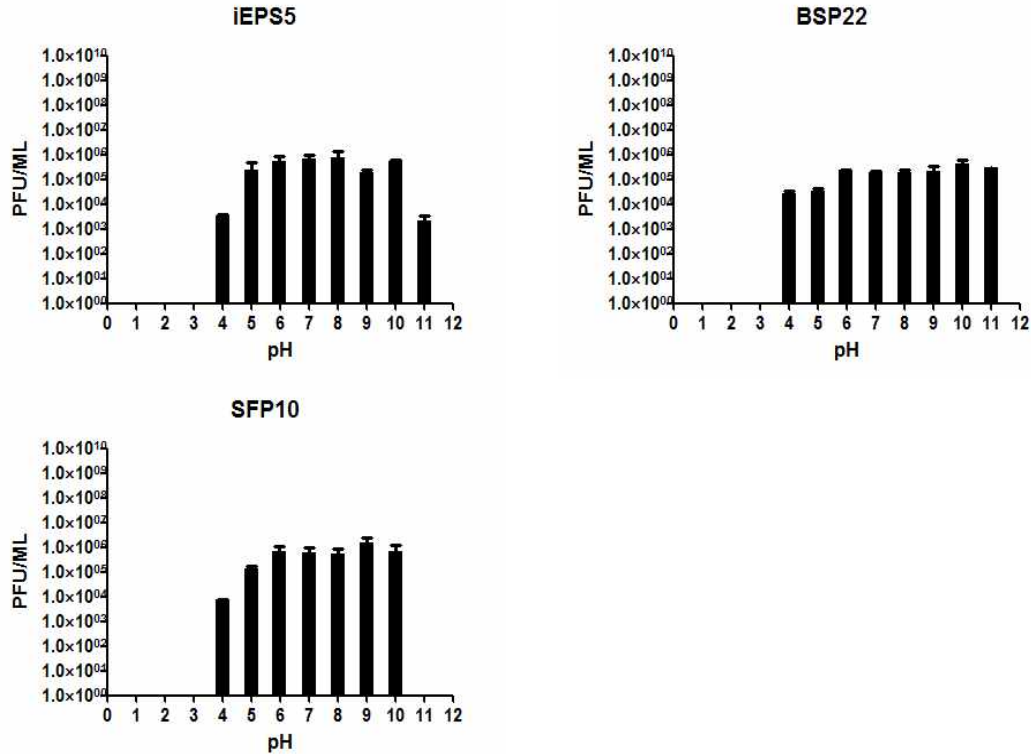
선정한 bacteriophage들의 열 안정성을 알아보기 위해서 bacteriophage를 45-80°C의 다양한 조건에서 10⁶ pfu/mL를 1시간 incubation 한 후, 숙주에 대한 spotting assay를 수행하였다. 그 결과, iEPS5와 BSP22의 경우 70°C까지 안정함을 보였으나 그 이상에서는 활성을 보이지 않았다. SFP10의 경우 65°C까지 안정함을 보였으나 70°C 이상에서는 bacteriophage가 급격히 감소하는 것을 확인하였다.



<Figure 28. Thermostability of *Samonella* bacteriophages iEPS5, BSP22 and SFP10>

3) pH stability of phages

선정한 bacteriophage들의 pH stability를 알아보기 위해서 universal buffer 완충용액 5M NaOH와 5M HCl을 이용하여 pH 3-12까지 맞춰주었다. 각 조건의 buffer에 bacteriophage 10⁶ pfu/mL을 2시간 동안 상온에서 incubation 한 후, 숙주에 대한 spotting assay를 진행하였다. 그 결과 iEPS5의 경우 pH 5-10 조건에서 안정적이거나 pH 4, pH 11에서 bacteriophage 수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. BSP22는 pH 4-11 조건에서 안정적이거나 pH 3, pH 11에서 급격히 감소하는 것을 확인하였다. SFP10의 경우 pH 6-10 조건에서 안정적이거나 pH가 낮아질수록 감소하는 것을 확인하였고 pH 11에서는 급격히 감소하는 것을 확인하였다.



<Figure 29. pH stability of *Samonella* bacteriophages iEPS5, BSP22 and SFP10>

Ⓢ Isolation of new bacteriophage for industrialization

1) New bacteriophage isolation

제품공정 상, 실제 농가에 유통된 뒤 축사에서 발생하는 열에 의해 bacteriophage 제품은 역가가 낮아질 수 있다. 따라서 본 연구에서는 내열성이 우수한 bacteriophage를 분리하는 방법을 구축하고, 실제로 열에 강한 bacteriophage를 분리하기로 하였다. 내열성이 우수한 bacteriophage를 분리하기 위해 우선 70°C water bath에서 환경 sample을 1시간동안 가열하였다. 이후 sample을 상온 조건 하에 LB broth에서 1차로 증식시켰다. 1차로 증식시킨 sample을 원심분리 (15,000 x g, 10 min)하여 상층액을 2차로 LB broth에서 목표 병원균인 *S. Typhimurium* LT2(c)와 함께 증식시켰다. 그 후 2차 증식한 sample을 다시 원심분리 (15,000 x g, 10 min) 하여 상층액을 filtration (0.2- μ m in pore size) 한 후, double layer plate에 dotting assay하여 plaque 형성을 통해 bacteriophage의 존재를 확인하였다. Single plaque purification을 3~4회 이상 진행하여 phage를 순수하게 분리하였다. 이와 같은 실험 과정을 통해 1 종의 phage를 분리하였으며, host 균주에 투명한 plaque을 형성함을 확인하였다.



<Figure 30. Plaque morphology of *S. Typhimurium* phage AP3>

㊦ Isolation and characterization of *S. aureus* bacteriophages

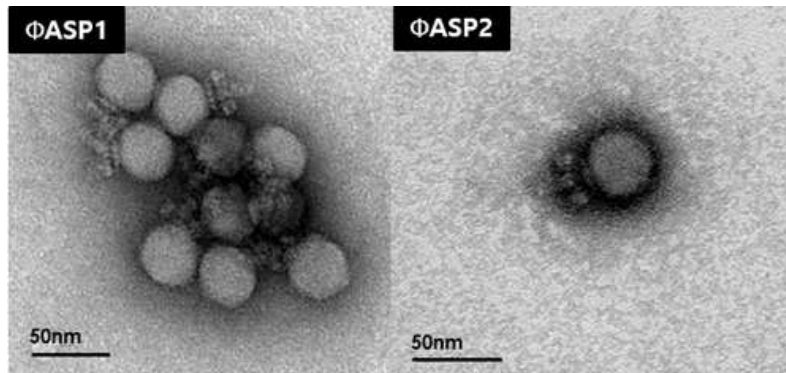
1) New bacteriophage isolation and classification

Staphylococcus aureus 균을 특이적으로 제어하는 bacteriophage를 분리하기 위해 사람 분변 샘플을 채취한 후, bag mixer를 이용해서 SM 완충용액과 섞어 잘게 부순 후, tryptic soy broth에서 1차로 증식시켰다. 1차로 증식시킨 sample을 원심분리 (15,000 x g, 10 min)하여 상층액을 2차로 LB broth에서 목표 병원균인 *S. aureus* 와 함께 증식시켰다. 그 후 2차 증식한 sample을 다시 원심분리 (15,000 x g, 10 min) 하여 상층액을 filtration (0.2- μ m in pore size) 한 후, double layer plate에 dotting assay로 plaque가 형성됨을 확인함으로써 phage의 존재를 파악했다. Single plaque purification을 3~4회 이상 진행하여 bacteriophage를 순수하게 분리하였다. 이와 같은 실험 과정을 통해 2 종의 bacteriophage를 분리하였으며, 이는 host 균주에 대해 투명한 plaque를 형성하였다.

Phage designation	Source	Host strain
ASP1	사람 분변	<i>S. aureus</i> 입들깨 isolate 37
ASP2	사람 분변	<i>S. aureus</i> 찜채소 isolate 1

<Table 27. *S. aureus* bacteriophage isolation>

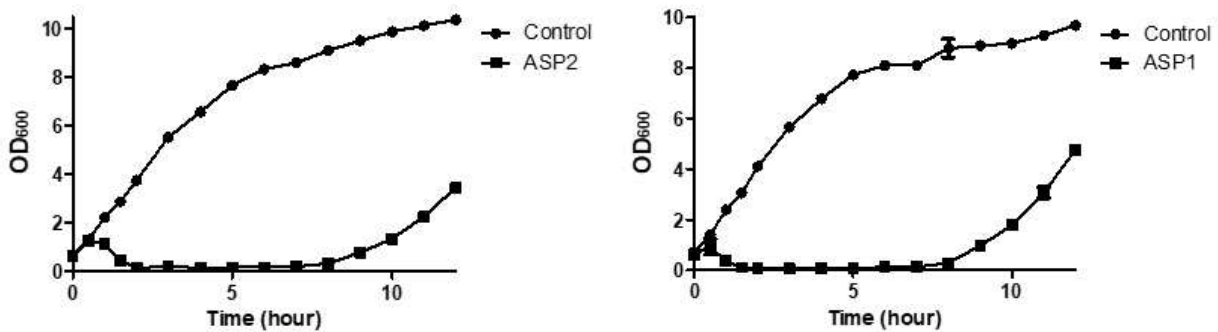
TEM analysis를 위해 10^{10} pfu/mL 농도의 bacteriophage stock을 carbon-coated grid에 aqueous uranyl acetate로 negative staining하여 준비하였다. 전자현미경은 Jeol model JEM1010을 사용하였고, 80 kV의 조건에서 분석하여 50,000x~200,000x 배율로 전자현미경 사진을 얻었다. 10종 bacteriophage의 형태학적 결과를 바탕으로 International Committee of Taxonomy of Viruses에서 제시한 기준에 따라 bacteriophage head의 크기, tail의 길이, 외피의 유무 등을 확인하여 bacteriophage를 분류한 결과, 이 bacteriophage들은 공통적으로 짧은 비수축성 꼬리를 지니는 *Podoviridae* family에 속하는 파지로 확인되었다.



<Figure 31. Transmission electron micrograph and morphology of bacteriophages ASP1 and ASP2>

2) Bacterial growth inhibition test of bacteriophages

*S. aureus*를 특이적으로 용해하는 bacteriophage의 용해능을 확인하기 위해 bacteriophage를 분리할 때 숙주로 사용했던 *S. aureus* 입들께 isolate 37과 *S. aureus* 싹채소 isolate 1을 이용하여 inhibition test를 수행하였다. TSB 에 균 접종 후, 37° C의 교반 조건에서 배양하였으며, MOI값은 1.0로 하여 bacteriophage를 host에 처리했을 때 host culture의 OD₆₀₀ 값의 감소를 monitoring함으로써 bacteriophage의 용해능을 측정하였다. 결과 초기에는 host culture의 OD₆₀₀ 값이 증가하는 경향을 보였으나 infection 후 2시간 이내에 균 성장 저해능을 보였으며, 두 bacteriophage 모두 그 활성이 7시간 이상 지속됨을 확인하였다.



<Figure 32. Lytic activity of *S. aureus* bacteriophages ASP1 and ASP2>

3) Host range of phages

분리된 bacteriophage들의 host range를 알아보기 위해서 다수의 *S. aureus* 표준 균주와 기타 속의 staphylococcal 균주들에 대해 spotting assay를 수행하였다. 그 결과, ASP1와 ASP2는 동일한 수의 균주에 대해 투명한 plaque를 형성하였으며, 각각 용해능을 보이는 균에는 차이가 존재했다. 두 bacteriophage 모두 시험한 2종의 MRSA를 포함한 11종의 *S. aureus* 균주 중 5개의 균주와, 시험한 4종의 staphylococcal 균주 중 1개의 균주에 감염하여 투명한 plaque를 형성하였다.

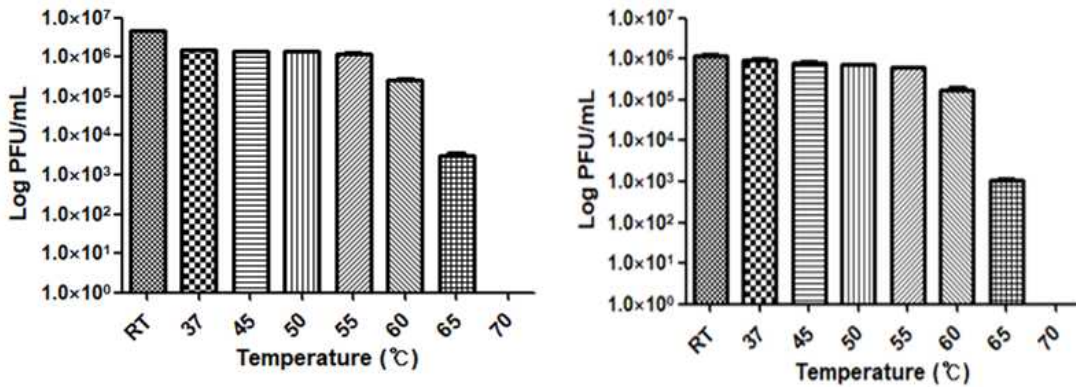
Bacterial host	ASP1	ASP2
<i>S. aureus</i> RN4220	C	T
<i>S. aureus</i> Newman	T	I
<i>S. aureus</i> ATCC 13301	I	I
<i>S. aureus</i> ATCC 23235	T	T
<i>S. aureus</i> ATCC 33586	I	C
<i>S. aureus</i> ATCC 33593	C	-
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	C	C
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	C	C
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	T	C
MRSA CCARM 3793	C	C
MRSA CCARM 3090	I	I
<i>S. haemolyticus</i> ATCC 29970	-	T
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35983	I	T
<i>S. hominis</i> ATCC 37844	C	C
<i>S. warneri</i> ATCC 10209	I	-

C, clear plaque; T, turbid plaque; I, inhibition zone; -, no infection

<Table 28. *S. aureus* bacteriophage host spectrum>

4) Thermostability of bacteriophages

분리된 bacteriophage들의 thermostability를 알아보기 위해서 분리한 파지를 25-70°C의 다양한 조건에서 phage를 30분간 incubation 한 후, 숙주에 대한 spotting assay를 수행하였다. 그 결과, ASP1과 ASP2는 25°C에서 가장 높은 용해능을 보였으며, 60°C까지 유지됨을 확인하였다. 65°C에서는 절반 정도의 용해능이 나타났으며, 70°C에서는 파지의 활성이 완전히 제거되었다.



<Figure 33. Thermostability of *S. aureus* bacteriophages ASP1 and ASP2>

㉔ Bioinformatics analysis of *S. aureus* bacteriophage

1) Bacteriophage DNA purification

S. aureus bacteriophage ASP1과 ASP2의 전체 genome sequence를 분석하기 위해 해당 bacteriophage의 DNA 추출 과정이 선행되었다. 순수하게 농축시킨 bacteriophage lysate은 박테리아 DNA와 RNA를 제거하기 위하여 DNase와 RNase를 각각 처리하여 37° C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 후, bacteriophage lysate은 1%의 sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5 mol/L의 EDTA와 10 mg/mL의 proteinase K를 처리한 후 56° C에서 2시간 반응시켰다. Bacteriophage DNA는 페놀과 클로로포름을 이용한 추출법으로 획득하였으며, 앞선 과정으로 불순물이 제거된 bacteriophage lysate에 동량의 페놀을 각각 가한 후 1.5 mL tube를 위 아래로 부드럽게 흔들어 섞은 후 상온, 5000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하였다. 이 후, 상등액만 분

리하여 클로로포름으로 동일한 과정을 반복하여 상등액을 깨끗한 1.5 mL tube에 옮겨 담았다. 이후, 100% 에탄올을 이용해 DNA를 농축하여 침전시켰는데, 우선 샘플의 두 배 부피의 100% 에탄올을 1.5 mL tube에 담고 30분 이상 -80°C 의 냉동고에 넣은 후, 원심분리(15,000 g, 4°C , 10 min)하여 DNA를 침전시킨 후 70% 에탄올로 동일한 과정을 반복하였다. 1.5 mL tube에 pellet만 남으면 15분 이상 상온에서 건조시켜 에탄올을 모두 증발시키고 50 μL 이상의 DW로 pellet을 풀어서 bacteriophage DNA를 얻었다.

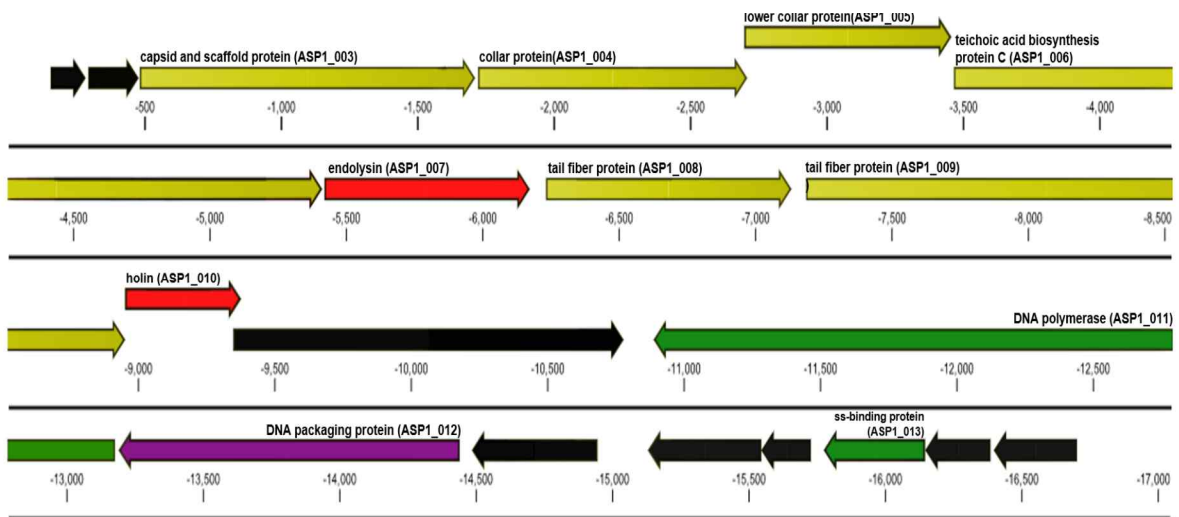
2) Bioinformatics analysis of phage genome

A) Full-genome sequencing of the bacteriophage ASP1

ASP1 bacteriophage의 DNA를 추출하여 준비한 뒤 Genome Sequencer FLX titanium sequencer (Roche, Mannheim, Germany)로 sequence를 분석하고, GS de novo assembler software (Roche)로 assemble 하였다. 이후, CLC genomics Workbench 3를 통해 ASP1 bacteriophage의 sequence를 분석한 결과, bacteriophage의 길이는 총 17,043 bp이고, 19개의 ORF로 구성되어 있었다.

B) ORF prediction of the phage ASP1

Open reading frame (ORF) 분석은 GeneMark.hmm, Glimmer v3.02에 전체 genome sequence의 fasta file을 입력하여 각각 분석한 후, 두 가지 분석 결과를 취합하여 RBS finder 프로그램을 통한 분석을 수행하였다. 또한 BLASTP 와 InterProScan 프로그램을 통해 homology searching을 하여 ORF annotation을 완료하였다. 그 결과, ASP1 bacteriophage는 총 19개의 ORF로 구성돼 있으며, tRNAs를 포함하고 있지 않음을 확인하였다. ASP1 bacteriophage는 구조 형성, regulation, replication, 세포 용해 및 기타 기능을 하는 ORF들로 구성되어 있었고, ORF 기능 분석 후, GeneScene program 및 Mobyale portal site를 활용하여 ASP1 bacteriophage의 유전자 지도를 완성하였다.



Each arrow indicates the locations of predicted ORFs with different colors: Black, hypothetical; yellow, bacteriophage structure; red, host lysis; green, DNA manipulation; purple, DNA packaging.

<Figure 34. Genome map of ASP1 bacteriophage>

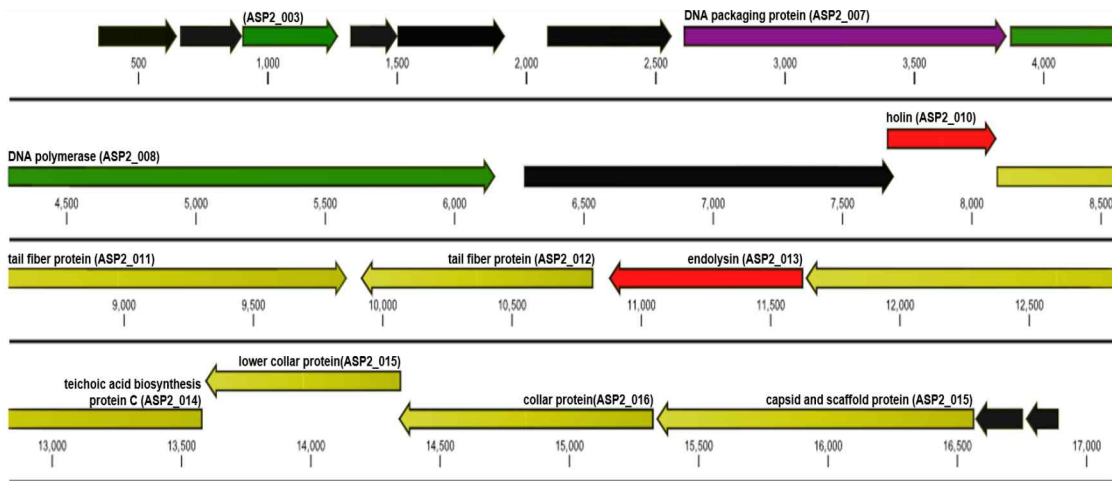
C) Full-genome sequencing of the bacteriophage ASP2

ASP2 bacteriophage의 DNA를 추출하여 준비한 뒤 Genome Sequencer FLX titanium sequencer (Roche,

Mannheim, Germany)로 sequence를 분석하고, GS de novo assembler software (Roche)로 assemble 하였다. 이후, CLC genomics Workbench 3를 통해 ASP2 bacteriophage의 sequence를 분석한 결과, phage의 길이는 총 17,099 bp이고, 19개의 ORF로 구성되어 있었다.

D) ORF prediction of the phage ASP1

Open reading frame (ORF) 분석은 GeneMark.hmm, Glimmer v3.02에 전체 genome sequence의 fasta file을 입력하여 각각 분석한 후, 두 가지 분석 결과를 취합하여 RBS finder 프로그램을 통한 분석을 수행하였다. 또한 BLASTP 와 InterProScan 프로그램을 통해 homology searching을 하여 ORF annotation을 완료하였다. 그 결과, ASP2 bacteriophage는 총 19개의 ORF로 구성돼 있으며, tRNAs를 포함하고 있지 않음을 확인하였다. ASP2 bacteriophage는 구조 형성, regulation, replication, 세포 용해 및 기타 기능을 하는 ORF들로 구성되어 있었고, ORF 기능 분석 후, GeneScene program 및 Mobylye portal site를 활용하여 ASP2 bacteriophage의 유전자 지도를 완성하였다.



Each arrow indicates the locations of predicted ORFs with different colors: Black, hypothetical; yellow, bacteriophage structure; red, host lysis; green, DNA manipulation; purple, DNA packaging.

<Figure 35. Genome map of ASP2 bacteriophage>

④ 2차년도 요약

연구목표 : 다양한 제형의 박테리오파지 및 파지 유래 단백질 개발

- 확보된 박테리오파지의 염기서열 정보에 기반하여 기존 항균 단백질과 상동성을 갖는 후보군 선정
- 선정된 항균 단백질 발현 및 용균 특성 분석
- 박테리오파지 및 항균 단백질의 실제 산업 조건 적용을 위한 최적의 제형 선정
- 선정된 제형에 대한 박테리오파지 및 항균 단백질 적용과 용균 특성 분석

⑤ 2차년도 상세 내용

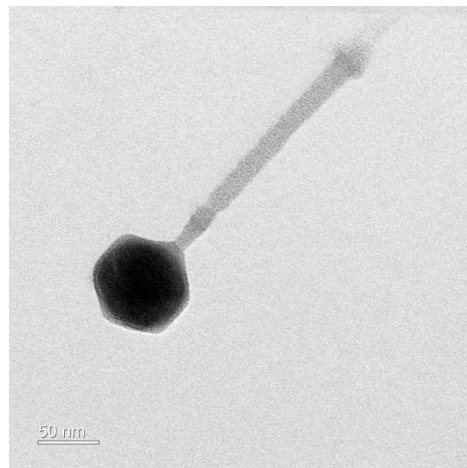
연구 목표: 다양한 제형의 박테리오파지 및 파지 유래 단백질 개발

㉞ Characterization of *S. aureus* bacteriophage endolysin for industrialization

1) New bacteriophage isolation and classification

Staphylococcus aureus 균을 특이적으로 제어하는 bacteriophage를 분리하기 위해 조류 분변 샘플을 채취하였다. Bag mixer를 이용해서 SM 완충용액과 섞어 잘게 부순 후, 원심분리 (10,000 x g, 5 min) 하여 상층액을 filtration (0.2- μ m in pore size) 하였고, 이후 tryptic soy broth에서 목표 병원균인 *S. aureus* 와 함께 증식시켰다. 실험의 목적인 열에 안정한 endolysin 을 찾기 위해 먼저 열에 안정한 파지를 분리하기로 하였다. 이를 위해 각 sample을 1.5ml tube 2개에 1ml씩 분주하여 원심분리 (21,130 x g, 5 min) 하여 상층액을 filtration (0.2- μ m in pore size) 하였고, sample이 담긴 1.5ml tube 하나는 상온에, 다른 하나는 70°C 에서 30분간 열처리하였다. Double layer plate에 dotting assay로 plaque가 형성됨을 확인함으로써 thermostable한 phage의 존재를 파악했다. Single plaque purification을 3~4회 이상 진행하여 bacteriophage를 순수하게 분리하였다. 이와 같은 실험 과정을 통해 1 종의 bacteriophage를 분리하였으며, 이는 host 균주인 *S. aureus* human isolate 93에 대해 투명한 plaque를 형성하였다. 이 파지는 PALS2 라고 명명하였다.

TEM analysis를 위해 10^{10} pfu/mL 농도의 bacteriophage stock을 carbon-coated grid에 aqueous uranyl acetate로 negative staining하여 준비하였다. 전자현미경은 Jeol model JEM1010을 사용하였고, 80 kV의 조건에서 분석하여 50,000x~200,000x 배율로 전자현미경 사진을 얻었다 (Figure 35). bacteriophage의 형태학적 결과를 바탕으로 International Committee of Taxonomy of Viruses에서 제시한 기준에 따라 bacteriophage head의 크기, tail의 길이, 외피의 유무 등을 확인하여 bacteriophage를 분류한 결과, 이 bacteriophage들은 공통적으로 긴 수축성 꼬리를 지니는 *Myoviridae* family에 속하는 파지로 확인되었다.



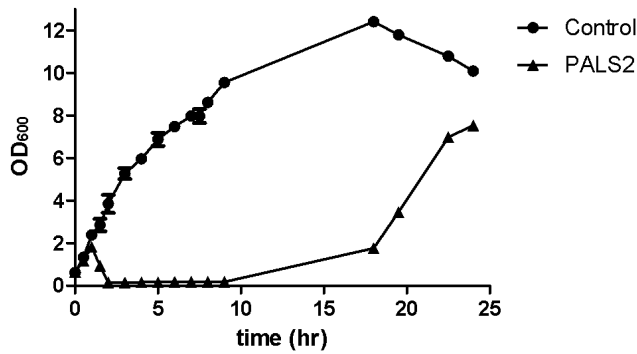
<Figure 36. Transmission electron micrograph and morphology of bacteriophage classified as *Myoviridae* family>

2) Bacterial growth inhibition test of bacteriophages

*S. aureus*를 특이적으로 용해하는 bacteriophage의 용해능을 확인하기 위해 bacteriophage를 분리할 때

숙주로 사용했던 *S. aureus* human isolate 93를 이용하여 inhibition test를 수행하였다. TSB 에 균 접종 후, 37° C의 교반 조건에서 배양하였으며, MOI값은 1.0로 하여 bacteriophage를 host에 처리했을 때 host culture의 OD₆₀₀ 값의 감소를 monitoring함으로써 bacteriophage의 용해능을 측정하였다.

그 결과 초기에는 host culture의 OD₆₀₀ 값이 증가하는 경향을 보였으나 infection 후 2시간 이내에 균 생장 저해능을 보였으며, 그 활성이 8시간 정도 지속됨을 확인하였다.



<Figure 37. Lytic activity of *S. aureus* bacteriophage PALS2>

3) Host range of phages

분리된 bacteriophage들의 host range를 알아보기 위해서 다수의 *S. aureus* 표준 균주와 기타 속의 staphylococcal 균주들에 대해 spotting assay를 수행하였다. 그 결과, PALS2는 시험한 3종의 MRSA를 포함한 12종의 *S. aureus* 균주 중 10개의 균주와, 시험한 4종의 staphylococcal 균주 중 3개의 균주에 감염하여 투명한 plaque를 형성하였다.

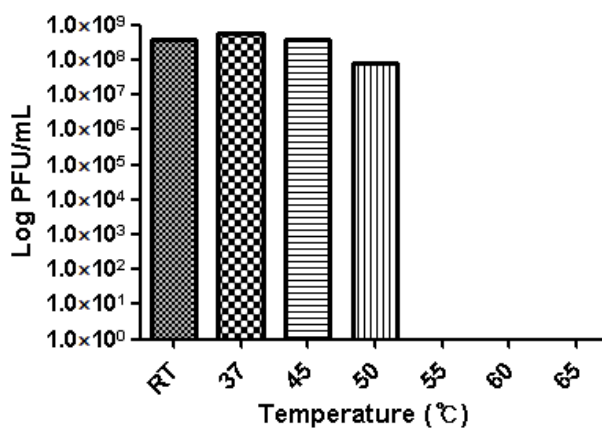
Bacterial host	PALS2
<i>S. aureus</i> RN4220	C
<i>S. aureus</i> Newman	C
<i>S. aureus</i> ATCC 13301	T
<i>S. aureus</i> ATCC 23235	C
<i>S. aureus</i> ATCC 33586	C
<i>S. aureus</i> ATCC 33593	C
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	C
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	C
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	C
MRSA CCARM 3793	C
MRSA CCARM 3089	C
MRSA CCARM 3090	T
<i>S. haemolyticus</i> ATCC 29970	C
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35983	T
<i>S. hominis</i> ATCC 37844	C
<i>S. warneri</i> ATCC 10209	C

T, turbid plaque; I, inhibition zone; -, no infection

<Table 29. *S. aureus* bacteriophage host spectrum. C, clear plaque>

4) Thermostability of bacteriophages

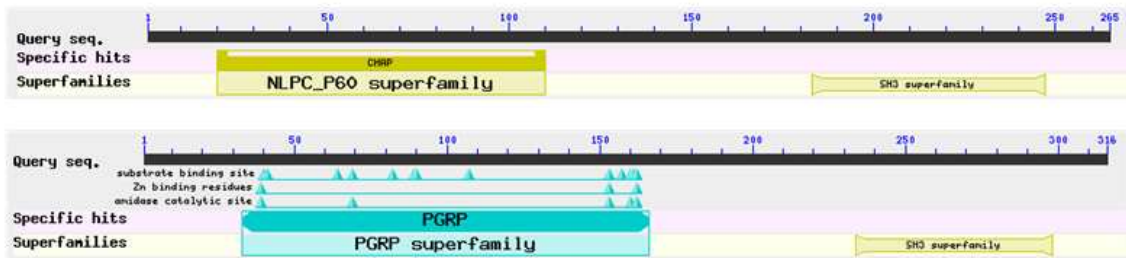
분리된 bacteriophage의 thermostability를 알아보기 위해서 분리한 파지를 25-65°C의 다양한 조건에서 phage를 30분간 incubation 한 후, 숙주에 대한 spotting assay를 수행하였다. 그 결과, PALS2는 37°C에서 가장 높은 용해능을 보였으며, 50°C까지 유지됨을 확인하였다. 55°C에서는 파지의 활성이 완전히 사라지는 것을 관찰하였다.



<Figure 38. Thermostability of *S. aureus* bacteriophage PALS2>

5) Prediction of endolysin candidate gene of bacteriophages PALS2

Bacteriophage PALS2의 경우, 분석된 278개 ORF 중, BLASTP analysis를 통하여 기존에 보고된 endolysin 과 similarity를 보이는 ORF 2개를 선정하였다. 이를 기존의 protein domain database와 비교하기 위하여 InterProScan program을 사용하여 domain analysis를 진행하였다. 비교 분석 결과, 두 개의 endolysin은 각각 N-terminal에 amidase 활성을 가진 것으로 알려진 CHAP domain 과 C-terminal에 cell wall binding domain으로 알려진 SH3 domain, N-terminal에 amidase domain 과 C-terminal에 SH3 domain이 각각 유사 성 높은 domain으로 확인되었다 (Figure 38). 이는 기존에 Gram-positive bacteria에 specific한 endolysin이 catalytic domain과 binding domain으로 구성되는 예가 많으므로, LysPALS21, LysPALS22 또한 특이성을 가지는 endolysin일 가능성이 높음을 말해준다. 이와 더불어 Bacteriophage PALS2의 높은 균 제어능을 고려할 때, LysPALS21, LysPALS22는 후속 연구에 좋은 후보임을 보여주었다.

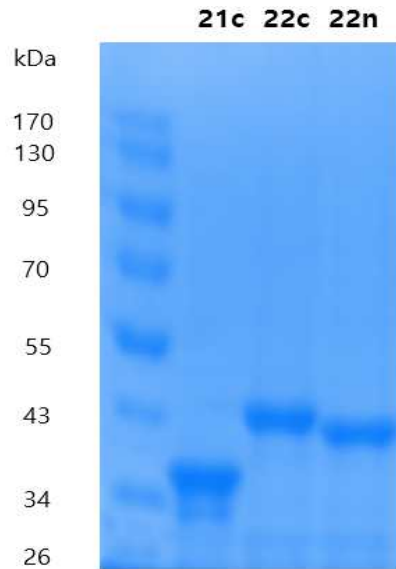


CHAP; cysteine, histidine-dependent aminohydrolase/peptidase shows amidase activity. PGRP; amidase catalytic domain, SH3; cell wall binding domain.

<Figure 39. Sequence analysis of LysPALS2. Domain structure of LysPALS2>

6) 선별된 endolysin candidate의 cloning, purification and checking lytic activities

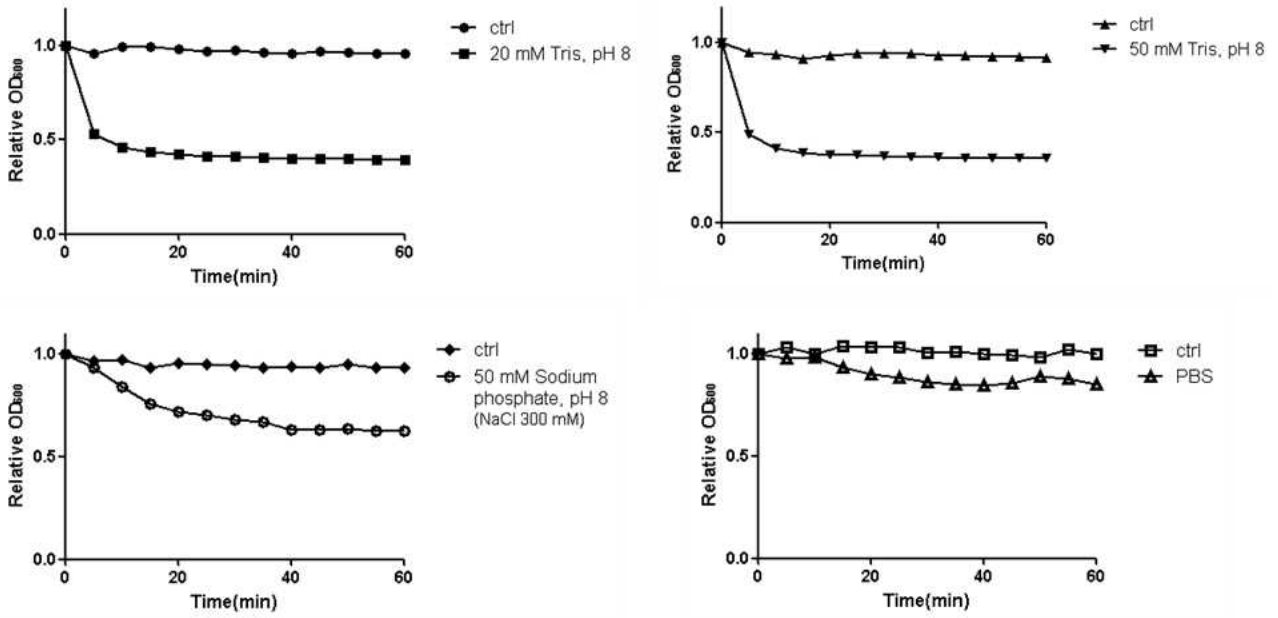
S. aureus-targeting phage PALS2의 전체 sequence 분석 결과, 2개의 endolysin 유전자가 확인되었고(lysPALS21, lysPALS22), phage로부터 이 부분을 얻어낼 수 있도록 양 끝에 두 가지 primer를 design하여 PCR을 하여 endolysin product를 얻었다. 그 후 histidine tag를 endolysin의 n-terminal, c-terminal에 각각 달기 위해 pET28a와 pET29b 벡터에 각각 클로닝 하여, *E. coli* BL21에 형질전환하여 재조합 균주를 완성하였다. 완성된 pET29b-lysPALS21, pET29b-lysPALS22, pET28a-lysPALS22 는 IPTG의 첨가에 의해 발현이 유도되며 (2시간 동안 재조합 균주를 키운 후 0.5 mM IPTG를 첨가하여 18°C, 180rpm에서 20 시간 발현시킴) 그 후, 균주의 세포벽을 제거하고 원심분리를 한 뒤 상등액을 Ni-NTA Superflow 컬럼에 통과시켜 순수한 endolysin LysPALS21 (histidine tag at c-terminal) 과 LysPALS22 (histidine tag at c and n-terminal)를 얻었다.



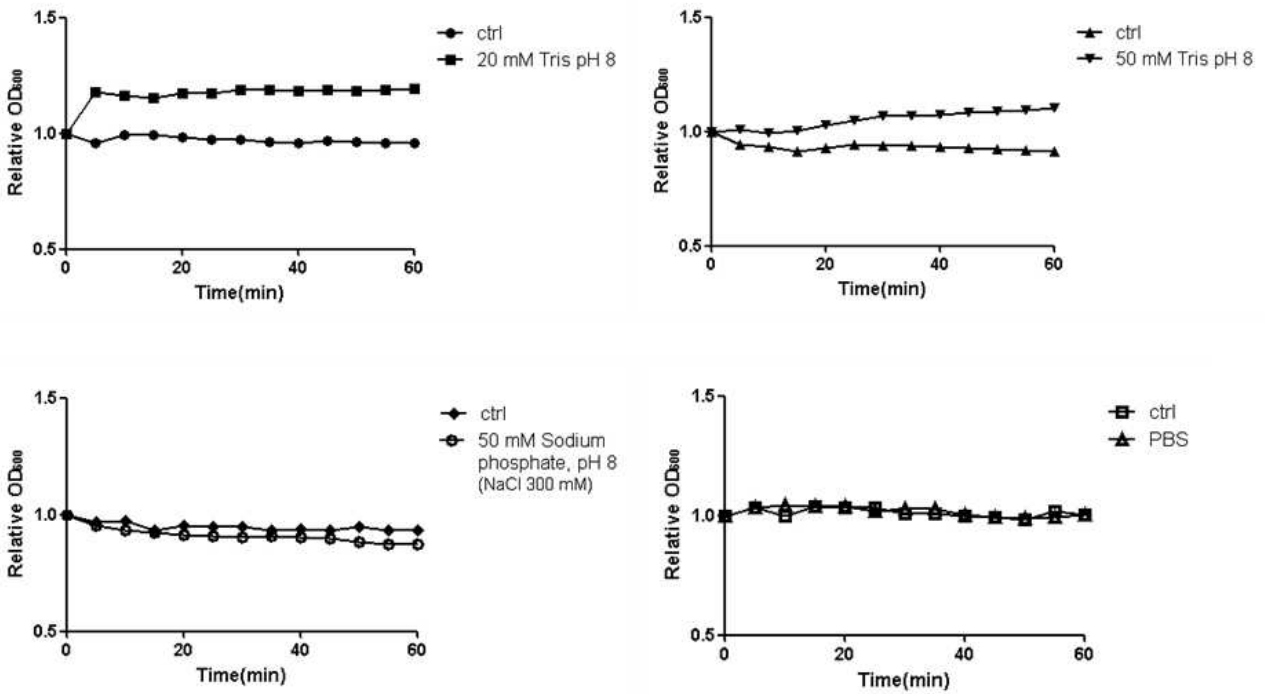
<Figure 40. Purification and SDS-PAGE gel of LysPALS21 (histidine tag at c-terminal) and LysPALS22 (histidine tag at c and n-terminal respectively)>

7) LysPALS21과 LysPALS22의 숙주용해능 분석

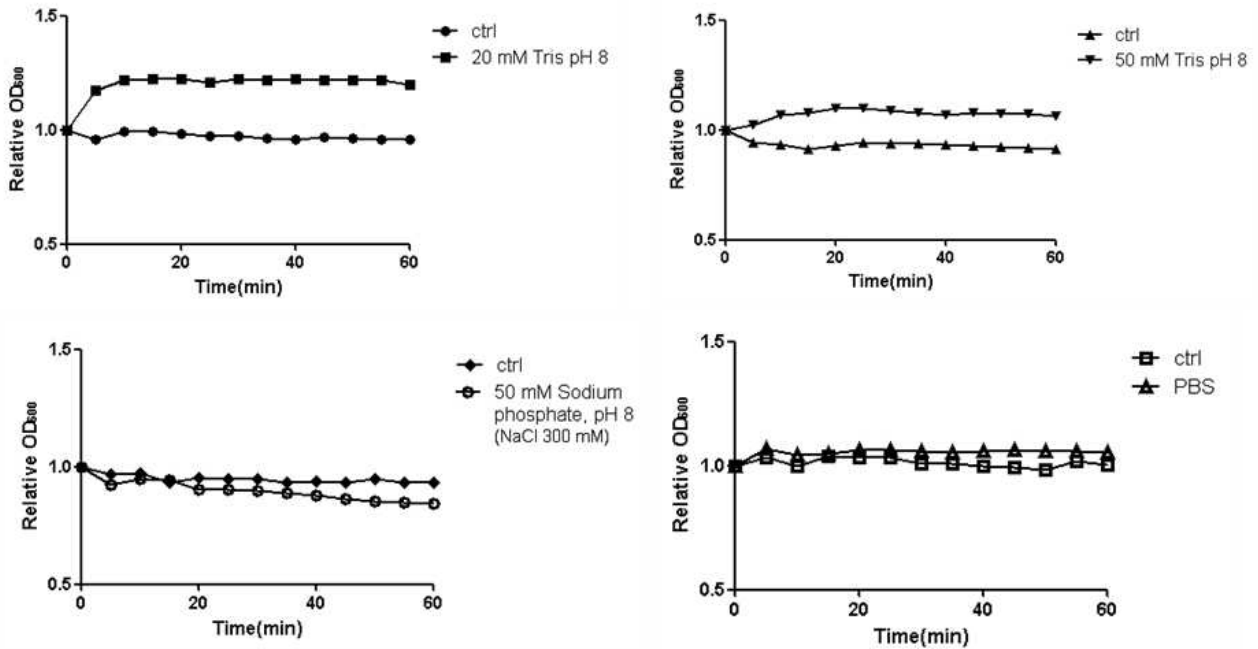
Endolysin의 숙주 용해능을 확인하기 위해 exponential stage의 *S. aureus* RN4220 배양액에 분리한 endolysin LysPALS21 (histidine tag at c-terminal) 과 LysPALS22 (histidine tag at c and n-terminal respectively)을 처리하였는데, 이때 endolysin을 첨가한 실험구가 buffer만 첨가한 대조군에 비해 흡광도가 어느 정도 감소하는지 O.D.₆₀₀ 값의 변화를 통해 파악하였고, 이를 통해 분리된 endolysin 처리량과 host cell의 사멸 능력을 판단하였다. 그 결과, endolysin을 300nM 첨가하였을 때 균 사멸효과를 확인할 수 있었다. LysPALS21 (histidine tag at c-terminal)는 20mM 과 50mM Tris buffer, pH8에서 가장 효과가 좋았고 50mM sodium phosphate, NaCl 300mM, pH8과 PBS buffer에선 상대적으로 효과가 작았다 (Figure 40). LysPALS22 (histidine tag at c and n-terminal respectively)의 경우 네 가지 buffer 모두에서 효과가 없었다.



<Figure 41. Lytic activity of LysPALS21 (histidine tag at c-terminal)>



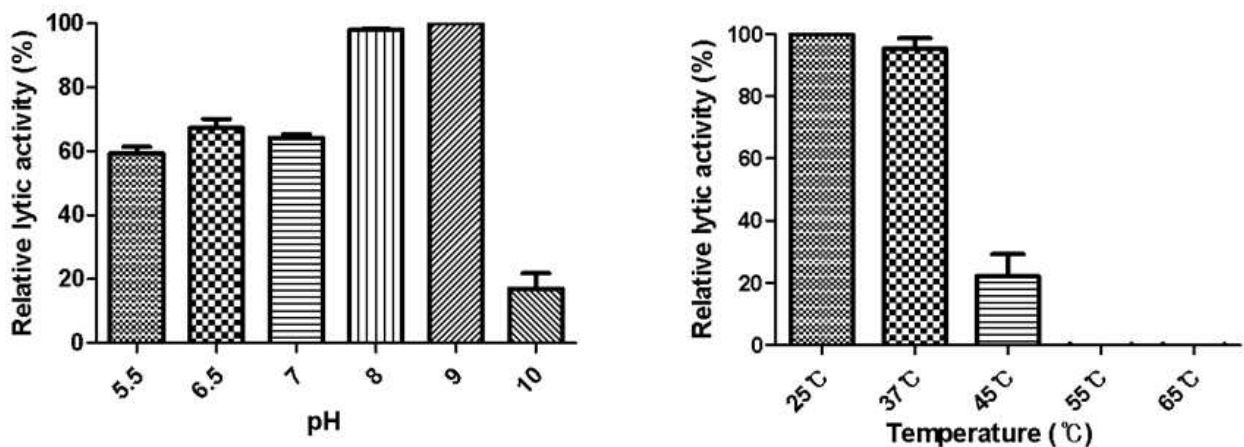
<Figure 42. Lytic activity of LysPALS22 (histidine tag at c-terminal).>

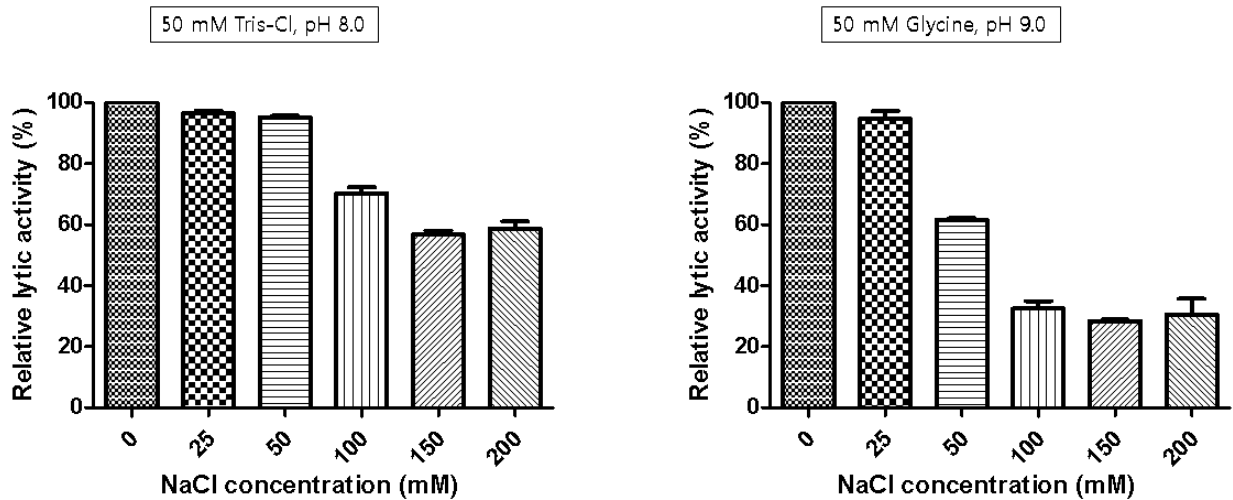


<Figure 43. Lytic activity of LysPALS22 (histidine tag at n-terminal)>

8) The effect of pH, temperature, and NaCl on the lytic activity of LysPALS21

활성을 보인 endolysin LysPALS21의 pH, 온도 및 염농도에 따른 항균활성을 비교하는 실험을 수행하였다. Endolysin을 exponential phase까지 배양한 *S. aureus* 배양액에 처리하였다. 이 때, 다양한 pH의 buffer 조건에서 실험을 수행하였는데, pH 5.5 (50 mM Sodium acetate), pH 6.5-8.5 (50 mM Tris-Cl), pH 9.0-9.5 (50 mM Glycine), pH 10.0-10.5 (50 mM Sodium carbonate-bicarbonate)의 조건에서 용해능을 비교하였다. 온도에 따른 항균 활성을 비교하기 위하여 25-65°C의 다양한 조건에서 endolysin을 가한 후 용해능을 비교하였다. 그 결과, pH 9.0의 buffer 조건에서 최대한의 항균활성을 보였고, pH 8.0에서도 높은 항균활성을 보였다. 25°C에서 가장 우수한 활성을 띄었고, NaCl 농도는 pH 9.0과 8.0의 buffer 조건 모두에서 0 mM일 때 최대한의 활성을 보였다. 25 mM에서도 비교적 높은 활성을 보였지만 pH 9.0 buffer에서의 경우 NaCl 100 mM 이상의 조건에서는 활성이 절반 이하로 떨어지는 현상을 보였다. 반면, pH 8.0 buffer의 경우 NaCl 200 mM까지도 endolysin의 활성이 절반 이상을 유지하였다.





<Figure 44. The effect of pH, temperature and NaCl concentration on the lytic activities of LysPALS21>

④ Characterization of bacteriophage for industrialization

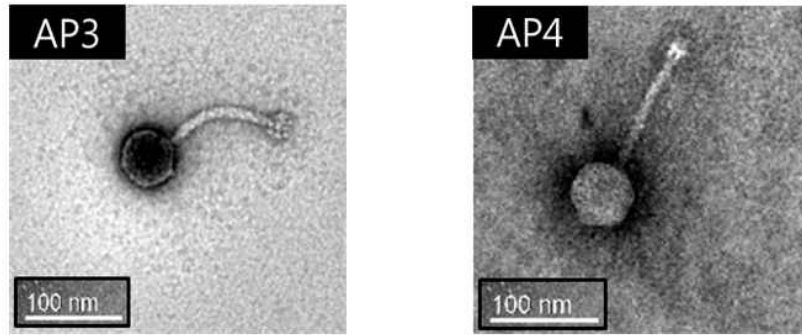
1) New bacteriophage isolation and classification

가축 사료의 항생제 처리가 금지됨에 따라 가축에서 식중독을 일으키는 *Salmonella* stain을 제어하기 위해 새롭게 bacteriophage를 분리하였다. 현재 농가에서 사용되는 powder stock의 공정은 70° C heat shock을 가하게 되는데 도중 phage titer 소실이 많을 것으로 예상됨에 따라 위의 방법에서 sample을 70° C water bath에서 1시간동안 가열한 후 isolation을 진행하였다. 위와 같은 실험 방법을 통해 2종의 phage를 분리하였으며, 이는 host 균주에 대해 투명한 plaque을 형성하였다.

Phage designation	Source	Host strain
AP3	Duck#1	LT2(c)
AP4	Duck#2	LT2(c)

<Table 30. *Salmonella* Typhimurium phage isolation>

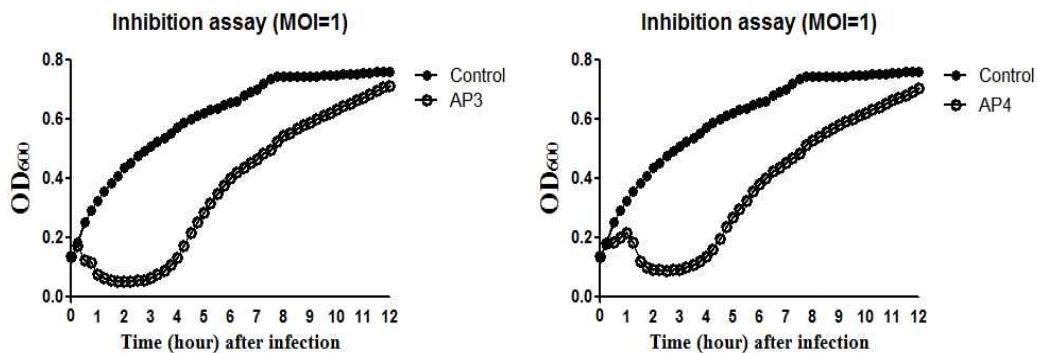
TEM analysis를 위해 10¹⁰ pfu/mL 농도의 phage stock을 carbon-coated grid에 aqueous uranyl acetate로 negative staining하여 준비하였다. 전자현미경은 Jeol model JEM1010을 사용하였고, 80 kV의 조건에서 분석하여 50,000x~200,000x 배율로 전자현미경 사진을 얻었다. 10종 bacteriophage의 형태학적 결과를 바탕으로 International Committee of Taxonomy of Viruses에서 제시한 기준에 따라 phage head의 크기, tail의 길이, 외피의 유무 등을 확인하여 phage를 분류한 결과, AP3와 AP4는 Sipoviridae의 형태를 갖는 것으로 확인되었다.



<Figure 45. Transmission electron micrograph and morphology of phages AP3, AP4>

2) Bacterial growth inhibition test of phages

*S. Typhimurium*을 특이적으로 용해하는 bacteriophage의 용해능을 확인하기 위해 각각 *S. Typhimurium* SL1344와 LT2(c)에 접종한 후 37° C의 교반 조건에서 배양하였으며, MOI값은 1.0로 하여 phage를 host에 처리했을 때 각각 host culture의 CFU/mL 값의 감소를 monitoring함으로써 bacteriophage의 용해능을 측정하였다. 그 결과 infection 후 2시간 이내에 균 성장 저해능을 보였으며, 두 phage 모두 그 활성이 4시간 지속됨을 확인하였다.



<Figure 46. Lytic activity of *S. Typhimurium* phages AP3 and AP4>

3) Host range of phages

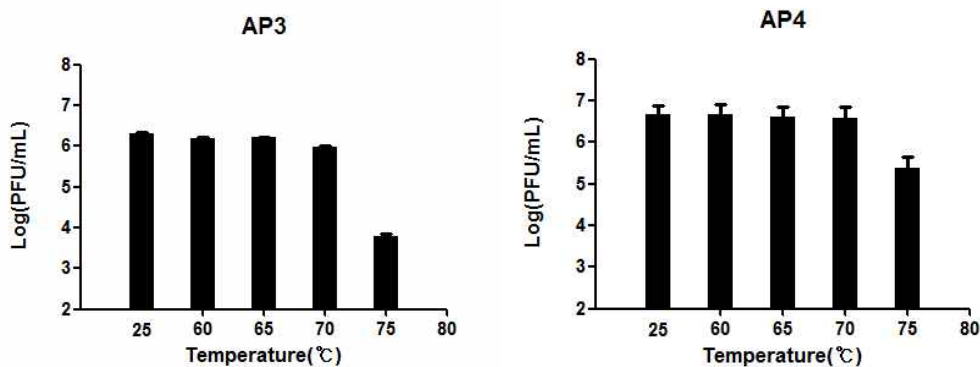
분리된 phage들의 host range를 알아보기 위해서 다수의 *Samonella* 종 균주들에 대해 spotting assay를 수행하였다. 그 결과, *S. Typhimurium*을 비롯한 다양한 균주에 대해 투명한 plaque를 형성하였으며, 각각 용해능을 보이는 균은 동일했다. 2개의 파지 모두 비교적 넓은 *Salmonella* subspecies에 대해 감염시킬 수 있었다.

Bacterial host	AP3	AP4
<i>S. Typhimurium</i> SL1344	-	-
<i>S. Typhimurium</i> LT2	C	C
<i>S. Typhimurium</i> UK1	C	C
<i>S. Typhimurium</i> DT104	-	-
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	C	C
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 19586	-	-
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 43147	-	-
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 12023	C	C
<i>S. Typhimurium</i> NCTC 12023	C	C
<i>S. Typhi</i> Ty2-b	-	-
<i>S. Paratyphi</i> A IB 211	-	-
<i>S. Paratyphi</i> B IB 231	C	C
<i>S. Paratyphi</i> C 216	C	C
<i>S. Entertidis</i> ATCC 13076	C	C

<Table 31. host spectrum of *S. Typhimurium* phages AP3 and AP4>

4) Thermostability of phages

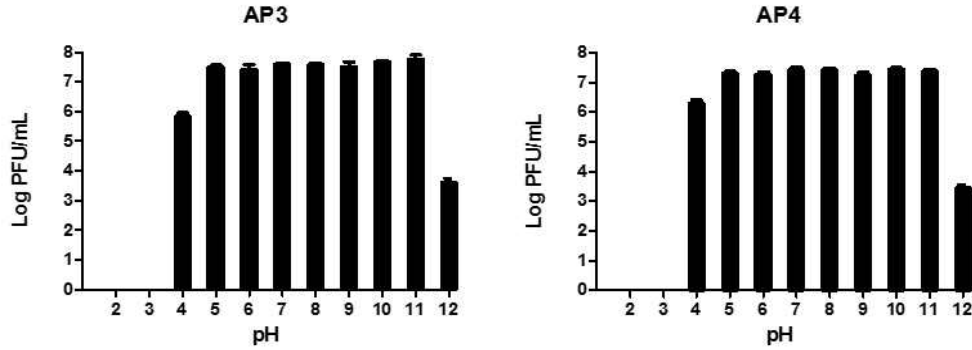
분리된 phage들의 thermostability를 알아보기 위해서 분리한 파지를 45-80°C의 다양한 조건에서 phage 10^6 pfu/mL 10를 1시간 incubation 한 후, 숙주에 대한 spotting assay를 수행하였다. 그 결과, AP3와 AP4는 70°C까지 안정함을 보였으며 75°C에서 급격히 그 수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.



<Figure 47. Thermostability of *S. Typhimurium* phages AP3 and AP4>

5) pH stability of phage

분리된 phage들의 pH stability를 알아보기 위해서 Universal buffer 완충용액 5M NaOH와 5M HCl을 이용하여 pH 2-12까지 맞춰주었다. 각 조건의 Buffer에 phage 10^6 pfu/mL을 2 시간 동안 상온에서 incubation 한 후, 숙주에 대한 spotting assay를 진행하였다. 그 결과 AP3와 AP4 모두 pH 5-10 조건에서 안정적이거나 pH 4, pH 11에서 phage가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.



<Figure 48. pH stability of *S. Typhimurium* phages AP3 and AP4>

6) phage receptor analysis

분리된 phage들의 receptor를 알아보기 위해 host *S. Typhimurium*의 receptor로 알려진 mutant 5 종 LPS, btuB, Flagella, ompC 유전자가 결여된 돌연변이에 spotting assay를 진행하여 infection에 의해 생겨나는 single plaque의 생성 유무를 관찰하였다. AP3와 AP4 두 종의 박테리오파지 모두 LPS 결여 돌연변이에서 single plaque을 형성하지 못했다. 따라서 AP3와 AP4 모두 *Salmonella*의 LPS를 receptor로 사용하는 것을 확인하였다.

⑥ 3차년도 요약

연구목표 : 식품 처리용 항균제 생산 조건 최적화 및 현장 적용

- 신규 개발 산업용 항균 제제의 다양한 대상 모델에서의 식중독균 사멸능 확인
- 다양한 처리 조건을 기반으로 최적의 용균 효과를 보이는 적용 방법 선정
- 3-1 세부가 보유한 기기 및 기술을 바탕으로 박테리오파지 및 항균 단백질 제제의 lab scale 및 pilot scale 생산 조건 구축
- 실제 현장 적용을 위한 제품 평가

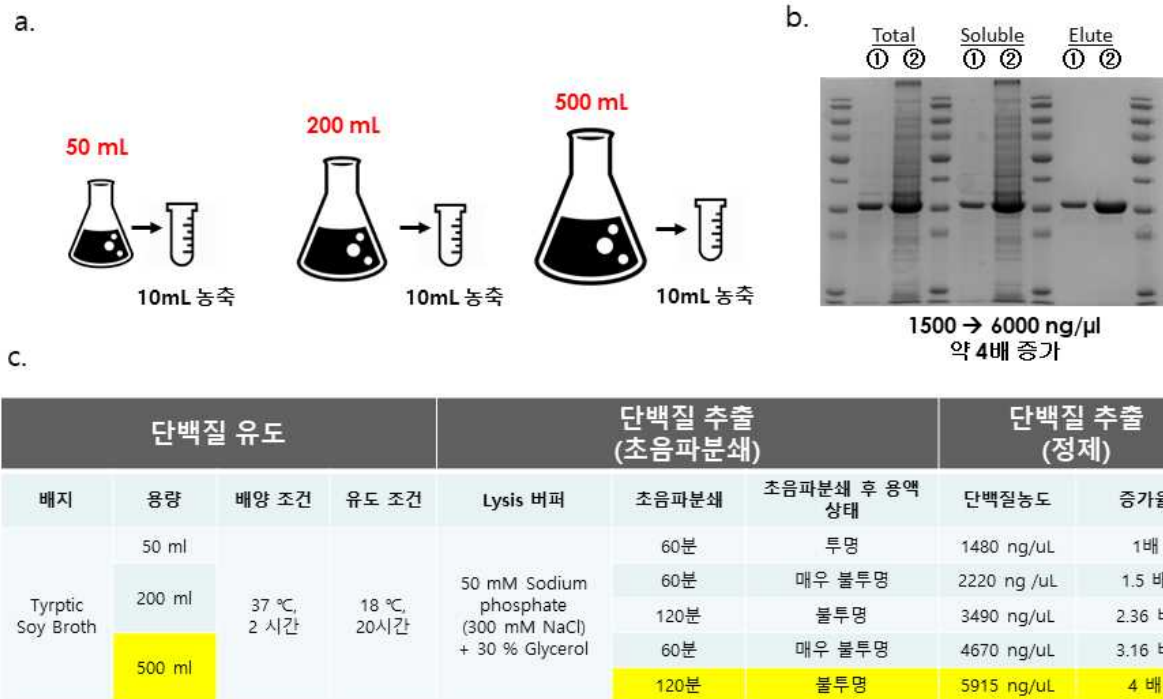
⑦ 3차년도 상세 내용

연구 목표: 식품 처리용 항균제 생산 조건 최적화 및 현장 적용

㉞ 항균 단백질 LysPALS21의 생산 조건 확립

선별된 항균 단백질 lysPALS21의 생산 조건을 확립하기 위해, 재조합 균주를 각각 50 mL, 200 mL, 500 mL의 scale-up된 volume에서 2시간 동안 배양하고, 0.5 mM IPTG를 첨가하여 18°C, 180rpm에서 20 시간 발현시켰다. 10 mL로 농축한 균을 초음파분쇄기를 통해 균주의 세포 벽을 제거하고 원심분리를 한 뒤, 상등액을 Ni-NTA Superflow 컬럼에 통과시켜 C-terminal에 histag이 달린 endolysin LysPALS21을 확보하였다.

다양한 조건에서 LysPALS21 항균 단백질을 발현·정제한 결과, 배양 volume(50ml, 200ml, 500ml)을 증가시킬수록 높은 농도의 단백질을 얻을 수 있었으며, SDS loading gel에서 total, soluble, elute 용액의 protein band의 size 비교를 통해 확인할 수 있다. 특히, 500 mL 배양,



<Figure 49. Scale-up production of lysPALS21 endolysin>

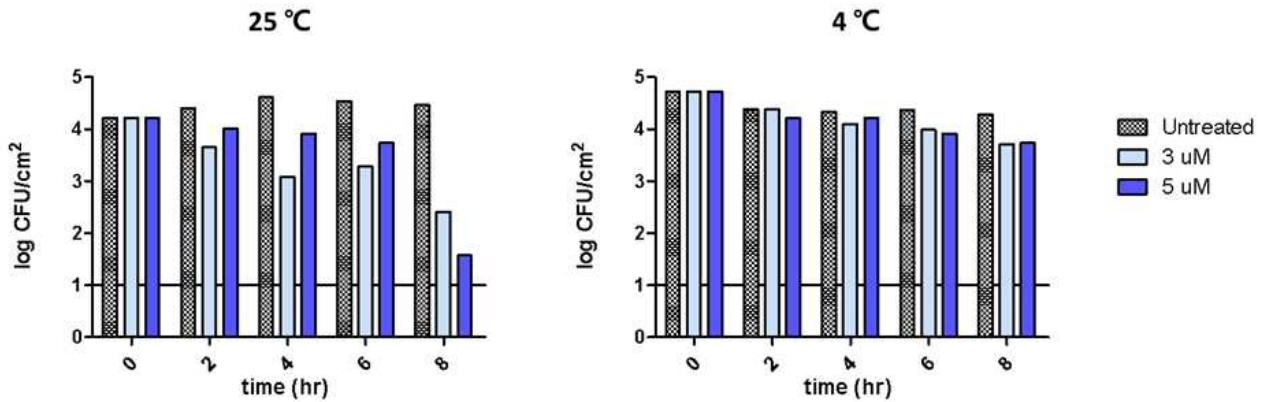
120간 초음파분쇄한 경우, 기존의 50 mL volume, 60 분 초음파분쇄 조건 보다 약 4배 정도의 증가된 단백질 농도 (1500 ng/μL→ 6000 ng/μL)를 얻을 수 있었다. 이를 3-1세부 (주)인트론 바이오테크놀로지와의 공동 연구를 통해 이를 분말 형태의 제형으로 생산하였다.

㉠ Model 식품에서의 항균 활성 확인

후속 2차년도에서 측정된 액체 제형의 항균력과 비교 평가하기 위해, 고체 분말의 제형의 LysPALS21 항균 단백질을 물에 희석하여 우유, 닭고기, 햄슬라이스 등 다양한 식품에서 그 항균력을 측정하였다. 또한 상온(25°C)과 저온(4°C)에서 실험을 진행하여 보관 온도에 따른 항균제의 유효성을 평가하고, 식품 안전성 향상을 확인하였다.

1) 햄슬라이스에서 항균 단백질 LysPALS1 powder의 항균 활성 확인

먼저, 햄슬라이스에 존재하는 세균을 제거하기 위해 전처리과정을 거쳤다. 햄을 1x1 cm²으로 자른 뒤, 70% 알코올에 overnight 침지하고, 각 면에 대하여 UV light를 30분씩 조사하였다. 이를 DPBS에 2분간 vortexing하고, 세균이 남아있는지 확인하여 model식품으로서 햄슬라이스를 확보하였다. 이후 약 10⁵ CFU/ml의 *S. aureus* RN4220을 처리한 뒤, 동일 버퍼에 녹인 동결건조 항균단백질을 처리하였다. 25°C와 4°C 두 set로 나누어 배양하였으며, 2시간마다 해당 시간 햄 샘플을 PBST 버퍼에 넣어 vortexing으로 잔여균을 탈리시켰다. Serial dilution을 거친 용액을 고체배지에 spotting assay 진행하여 CFU를 측정하고, 세균의 증감을 확인하였다.

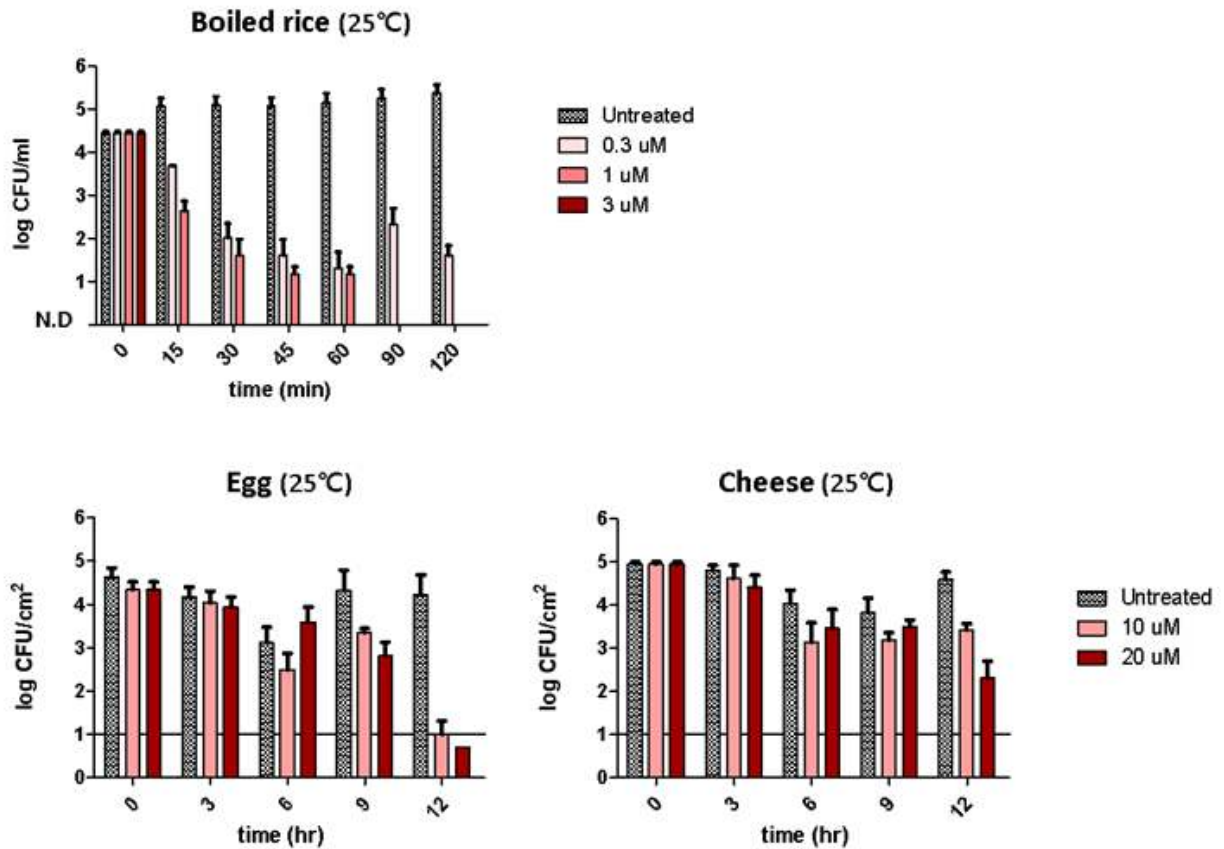


<Figure 50. Antimicrobial effect of endolysin LysPALS21 in ham slices>

25°C의 경우, infection 후 2시간 이내에 균 성장 저해능을 보였으며 그 활성이 8시간까지 지속됨을 확인하였다. 특히 접종 8시간대에 5 uM 샘플에서 3 Log 가까이 균을 제어할 수 있었다. 4°C의 경우, infection 후 약 6시간 이내에 균 성장 저해능을 보였으며 25°C에 비해서는 낮았으나, 그 활성이 8시간까지 지속되었다. 3 uM, 5 uM 샘플에서 비슷한 정도로 균이 제어되었으며, 접종 8시간대에 약 1 Log 균을 사멸시켜 그 activity를 확인할 수 있었다. 이를 통해 항균단백질 LysPALS21 분말 처리된 햄슬라이스는 상온(25°C)과 저온(4°C)에서 황색포도상구균으로부터 항균력이 있음을 증명하였다.

2) 밥, 계란, 치즈에서 항균 단백질 LysPALS1 powder의 항균 활성 확인

밥을 model 식품으로 적용하기 위해 멸균 즉석밥을 구입하고, 이를 표시된 조리조건에 맞추어 열을 가해주었다. 지어진 밥 5 g을 멸균수 20ml 과 섞어주어 충분히 homogenization 시킨 후 slurry상태의 샘플을 얻었다. 이를 고체배지에 배양하여 세균의 존재 여부를 확인하였다. 이후, 약 10^5 CFU/ml의 *S. aureus* RN4220을 처리한 뒤, 동일 버퍼에 녹인 동결건조 항균단백질을 처리하였다. 25°C에서 배양하였으며, 15분마다 배양액을 추출 후 serial dilution하여 고체배지에 spotting assay를 진행하였다. CFU를 측정하고, 숙주 세균의 증감을 측정하였다. 계란과 치즈의 경우, 상기 (a) 방법과 마찬가지로 멸균 전처리과정을 거친 후, 각각 DPBS에 2분간 vortexing, 세균이 남아있는지 확인하여 model식품으로서의 샘플을 확보하였다. 이후 약 10^5 CFU/ml의 *S. aureus* RN4220을 처리한 뒤, 동일 버퍼에 녹인 동결건조 항균단백질을 처리하였다. 25°C에서 배양하였으며, 3시간마다 해당시간 샘플을 PBST 버퍼에 넣어 vortexing으로 잔여균을 탈리시켰다. Serial dilution을 거친 용액을 고체배지에 spotting assay 진행하여 CFU를 측정하고, 세균의 증감을 확인하였다.

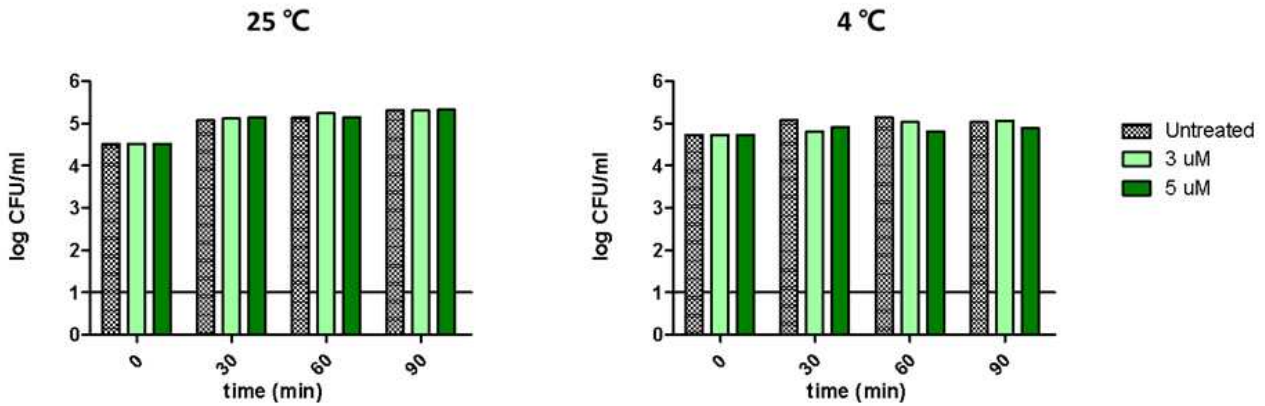


<Figure 51. Antimicrobial effect of endolysin LysPALS21 in boiled rice, egg, and cheese>

밥의 경우, infection 후 15분 이내에 균 성장 저해능을 보였으며 3 uM 처리군의 경우 15분 내에 균이 완전히 제거되었다. 1 uM 처리군의 경우 90분 내에 균이 완전히 사멸하였으며, 0.3 uM 처리군의 경우 접종 120시간대 기준 4 Log 가까이 균을 제어할 수 있었다. 계란의 경우, infection 후 6시간 이내에 균 성장 저해능을 보였으며 그 활성이 12시간까지 지속되었다. 특히 접종 12시간대에 10 uM, 20 uM 처리군 모두 3 Log 이상의 균을 사멸시킴을 확인하였다. 치즈의 경우, 마찬가지로 infection 후 6시간 이내에 균 성장 저해능을 보였으며 12시간대에 20 uM 처리군의 경우 2 Log 이상의 균을 사멸시켰다. 이를 통해 항균단백질 LysPALS21 분말 처리된 밥, 계란, 치즈는 상온(25°C)에서 황색포도상구균으로부터 항균력이 있음을 증명하였다.

3) 우유에서 항균 단백질 LysPALS1 powder의 항균 활성 확인

우유를 model 식품으로 적용하기 위해 멸균 우유를 구입하고, 이를 고체배지에 배양하여 세균의 존재 여부를 확인하였다. 이후, 약 10^5 CFU/ml의 *S. aureus* RN4220을 처리한 뒤, 동일 버퍼에 녹인 동결건조 항균단백질을 처리하였다. 25°C와 4°C 두 set로 나누어 배양하였으며, 30분마다 배양액을 추출하였다. Serial dilution한 용액을 고체배지에 spotting assay 진행하여 CFU를 측정하고, 숙주 세균의 증감을 측정하였다.

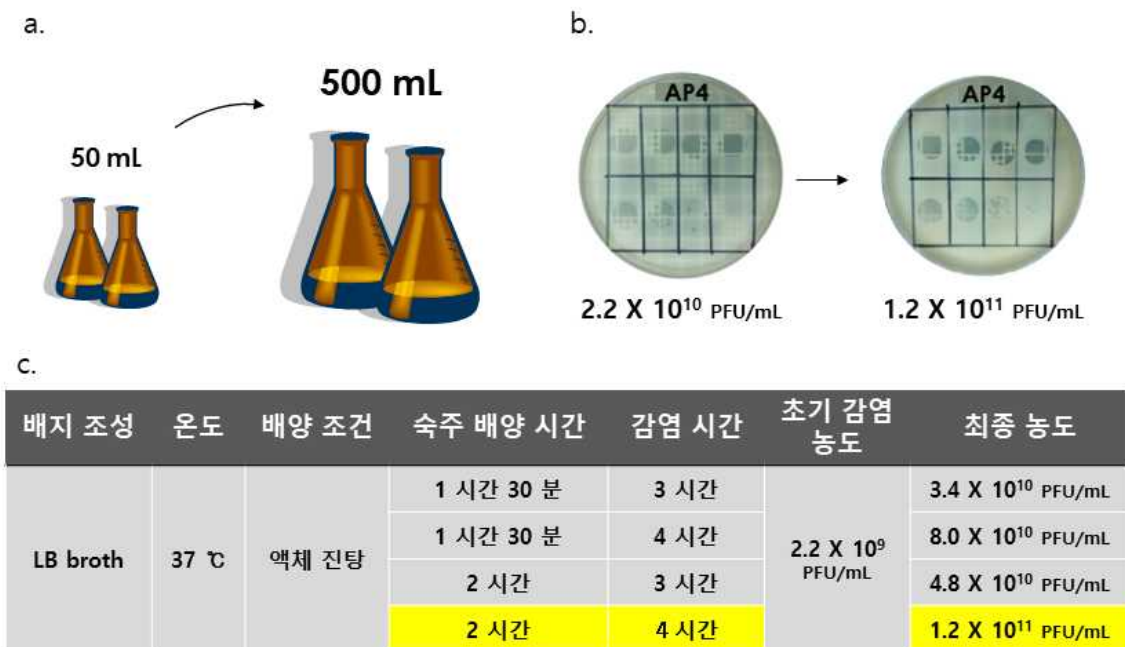


<Figure 52. Antimicrobial effect of endolysin LysPALS21 in milk>

항균단백질 LysPALS21은 우유 25°C와 4°C 모두에서 시간에 따른 균 성장 저해능을 보이지 않았다. 이를 통해 LysPALS21 분말 처리된 우유는 상온(25°C)과 저온(4°C)에서 황색포도상구균에 대한 항균력이 없다고 판단되었다. 결론적으로, LysPALS21은 고체 혹은 반고체식품에서 황색포도상구균에 대한 항균효과를 보였고, 액체식품에서는 효과를 보이지 않았다.

㊤ 박테리오파지 AP4의 생산 조건 확립

선별된 박테리오파지 AP4의 대량 생산 조건을 확립하기 위해, 숙주 배양시간과 파지 감염시간을 조정하여 최적의 증폭 조건을 확립하였다. 숙주 S. Typhimurium LT2(c)을 50 mL → 500 mL로 volume을 증가시켜 37°C에서 각각 1시간 30분, 2시간 동안 배양하였으며, 각각 파지를 접종하여 3시간, 4시간 동안 증폭하였다. 그 후, Spotting assay를 통해 증가된 파지의 PFU(Plaque forming unit)를 측정하였다.



<Figure 53. Scale-up production of AP4 Phage>

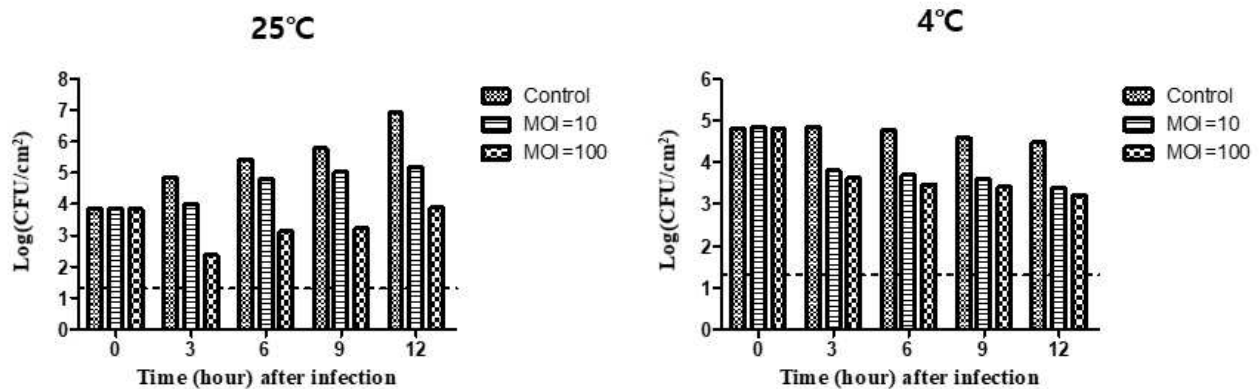
다양한 조건에서 AP4 박테리오파지 2.2×10^9 PFU/mL를 접종하여 증폭한 결과, 시험한 모든 조건에서 증가된 농도의 박테리오파지를 얻을 수 있었다. 특히, 숙주를 37°C에서 2시간 배양한 뒤, 4시간 동안 파지를 감염시켰을 때, 1.2×10^{11} PFU/mL의 농도로 확인되어 100배 가까이 PFU가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이를 통해, 공정 환경에 적합한 박테리오파지를 고농도로 scale-up 할 수 있는 조건을 확립하였으며, 3-1세부 (주)인트론바이오테크놀로지와의 공동 연구를 통해 이를 분말 형태의 제형으로 생산하였다.

㉔ Model 식품에서의 항균 활성 확인

후속 2차년도에서 측정된 액체 제형의 항균력과 비교 평가하기 위해, 고체 분말의 제형(10^8 PFU/g)을 물에 희석하여 우유, 닭고기, 햄슬라이스 등 다양한 식품에서 그 항균력을 측정하였다. 또한 상온(25°C)과 저온(4°C)에서 실험을 진행하여 보관 온도에 따른 항균제의 유효성을 평가하고, 식품 안전성 향상을 확인하였다.

1) 햄슬라이스에서 항균 단백질 AP4 Phage powder의 항균 활성 확인

먼저 햄슬라이스에 존재하는 세균을 제거하기 위해 전처리과정을 진행하였다. 햄을 1cm x 1cm로 자른 뒤, 70% 알코올에 overnight 동안 침지하고, 각면에 대하여 UV light를 30분씩 조사하였다. 이를 DPBS에 1분간 vortexing하고, 세균이 남아있는지 확인하여, model 식품으로서 햄슬라이스를 확보하였다. 이 후, 10^4 - 10^5 CFU/mL의 *S. Typhimurium* LT2(c)를 처리한 뒤, 시간 간격을 두고 파지 분말을 처리하였다. 각각 25°C와 4°C에 배양하였으며, 3시간마다 배양액을 추출하고, 원심분리하여 (10000 g, 10 min, 4°C) 파지가 제거된 숙주 세균을 분리하였다. Serial dilution한 용액을 고체배지에 spotting assay 진행하여 CFU를 측정하고, 숙주 세균의 증감을 측정하였다.

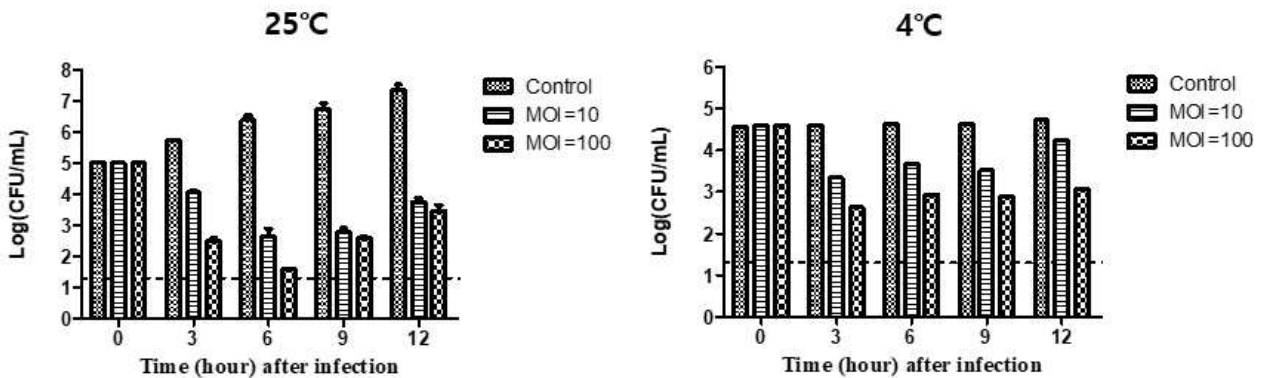


<Figure 54. Antimicrobial effect of AP4 phage in ham slices>

25°C의 경우, infection 후 3시간 이내에 균 성장 저해능을 보였으며 그 활성이 12시간까지 지속됨을 확인하였으며, 특히, MOI=100에서 매시간 3 Log 가까이 억제할 수 있었다. 마찬가지로 4°C의 경우, infection 후 3시간 이내에 균 성장 저해능을 보였으며 그 활성이 12시간까지 지속됨을 확인하였다. MOI=100에서 매시간 약 1.5 Log 억제하여 4°C에서도 activity를 확인할 수 있었다. 이를 통해 박테리오파지 AP4 분말 처리된 햄슬라이스는 상온(25°C)과 저온(4°C)에서 살모넬라로부터 항균력이 있음을 증명하였다.

2) 우유에서 항균 단백질 LysPALS1 powder의 항균 활성 확인

Model 식품으로서 우유에 적용하기 위해, 멸균 우유를 구입하고, 이를 고체배지에 배양하여 세균의 존재 여부를 확인하였다. 이후, 10^4 - 10^5 CFU/mL의 *S. Typhimurium* LT2(c)를 처리한 뒤, 시간 간격을 두고 파지 분말을 처리하였다. 각각 25°C와 4°C에 배양하였으며, 3시간마다 배양액을 추출하고, 원심분리하여 (10000 g, 10 min, 4°C) 파지가 제거된 숙주 세균을 분리하였다. Serial dilution한 용액을 고체배지에 spotting assay 진행하여 CFU를 측정하고, 숙주 세균의 증감을 측정하였다.

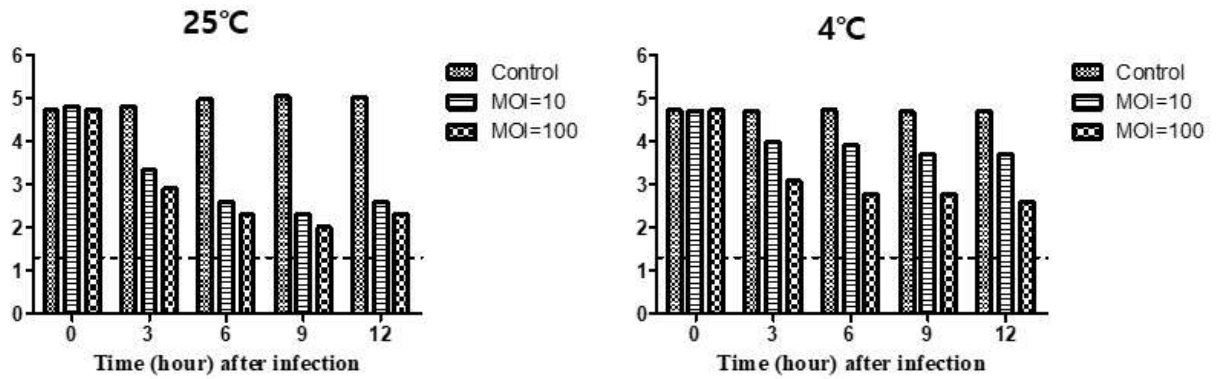


<Figure 55. Antimicrobial effect of AP4 phage in ham slices>

25°C의 경우, infection 후 3시간 이내에 균 성장 저해능을 보였으며 그 활성이 12시간까지 지속됨을 확인하였다. MOI=100의 경우, 매시간 4 Log 가까이 억제할 수 있었으며, 6시간째에는 최대 5 Log 가까이 저감화하는 것을 확인하였다. 4°C 조건에서도 infection 후 그 활성이 12시간까지 지속되었으며 MOI=100에서 매시간 약 2 Log 억제하여 4°C에서도 활성이 있음을 검증하였다. 이를 통해 박테리오파지 AP4 분말 처리된 우유는 상온(25°C)과 저온(4°C)에서 살모넬라로부터 항균력이 있음을 증명하였다.

3) 닭가슴살에서 항균 단백질 LysPALS1 powder의 항균 활성 확인

먼저 닭가슴살에 존재하는 세균을 제거하기 위해 전처리과정을 진행하였다. 햄을 2cm x 2cm x 2cm로 자른 뒤, 70% 알코올에 overnight 동안 침지하고, 각면에 대하여 UV light를 30분씩 조사하였다. 이를 DPBS에 1분간 vortexing하고, 세균이 남아있는지 확인하여, model 식품으로서 닭가슴살을 확보하였다. 이후, 10^4 - 10^5 CFU/mL의 *S. Typhimurium* LT2(c)를 처리한 뒤, 시간 간격을 두고 파지 분말을 처리하였다. 각각 25°C와 4°C에 배양하였으며, 3시간마다 배양액을 추출하고, 원심분리하여 (10000 g, 10 min, 4°C) 파지가 제거된 숙주 세균을 분리하였다. Serial dilution한 용액을 고체배지에 spotting assay 진행하여 CFU를 측정하고, 숙주 세균의 증감을 측정하였다.



〈Figure 56. Antimicrobial effect of AP4 phage in ham slices〉

다른 식품에서와 마찬가지로 25°C 배양 시, infection 후 3시간 이내에 균 성장 저해능을 보였으며 그 활성이 12시간까지 지속됨을 확인하였다. MOI=100의 경우, 매시간 3 Log 가까이 억제할 수 있었다. 4°C 조건에서도 infection 그 활성이 12시간까지 지속되었으며 MOI=100에서 매시간 약 2 Log 억제하여 4°C 에서도 활성이 있음을 검증하였다. 이를 통해 박테리오파지 AP4 분말 처리된 닭 가슴살은 상온(25°C)과 저온(4°C)에서 살모넬라로부터 항균력이 있음을 증명하였다.

4-2. 인력양성 및 활용성과

(1) 인력양성 주요 성과

○ 제 1핵심 : 식중독 미생물 제어 선도물질 최적화 및 안전식품 생산 적용

- 제 1-1세부 (서울대 최상호, 하남출)

3단계 연구를 통해 박사 5명, 석사 10명을 배출하였다. 박사의 경우 4명은 박사후 연구원으로 재직 중이며 1명은 고바이오랩에 취직하였다. 석사의 경우 4명은 박사과정 진학, 1명은 GPCR, 1명은 녹십자, 1명은 CJ 제일제당, 3명은 LG생활건강에 취직하였다.

- 제 1-2세부 (서울대 김도만, 우리두)

3단계 연구기간 동안 5명의 고급인력을 양성하였다. 5명의 대학원생이 석사 학위를 취득하였고, 학위를 취득한 대학원생은 식품 관련 대기업인 CJ와 농심에 취직하였다. 또한, 본 연구과제를 수행함으로써 실험 디자인 방법 및 실험 기법을 터득하여 전문성과 경쟁력을 강화하였음.

○ 제 2핵심 : 식중독 미생물 제어 선도물질 최적화 및 안전식품 생산 적용

- 제 2-1협동 (동국대 이광근, 서울대 강동현)

본 과제에 참여한 석/박사 인력 총 29명이 학위 과정을 통해 배출되었으며 석/박사 학위과정 중 이수한 식품 위생학, 미생물학, 공학 등의 커리큘럼을 기반으로 실제 연구에 충분히 활용하였다. 특히 배출된 인력은 조합 시스템의 구축에 크게 기여하였다. 또한, 본 연구 사업 기간 중 식품 맞춤형 천연 향균 소재 생산 최적화를 위한 식품 분석, 안전 및 기능성 연구의 기술의 습득 기회를 가질 수 있었고, 이 분야의 전문성과 경쟁력이 있는 연구자들과의 밀접한 협력 기회를 가졌다. 각종 학회참석 및 발표와 심포지엄, 학술강연회 등을 통해 습득한 지식을 바탕으로 실제 산업화 연구를 위한 소양을 가지게 되었다.

○ 제 3핵심 : 식중독 미생물 제어 선도물질 최적화 및 안전식품 생산 적용

- 제 3-1협동 (서울대 유상열)

수학생 선발, 상호교류, 협동연구수행 및 최신연구기술을 훈련시켜 경쟁력 갖춘 인력배출 (박사 5명, 석사 6명 배출)

학위취득 대학원생은 대기업, 중소기업 및 연구소 등 취업(10명)

본 연구를 수행하는 연구원들은 학위 과정 중 식품안전성, 식품위해요소중점관리학, 발효학 특강, 등의 강의를 수강함으로써 식품에 대한 전반적인 지식을 축적하였음. 또한 본 연구과제를 수행함으로써 실험 디자인 방법 및 실험 기법을 터득하여 전문성과 경쟁력을 강화하였음.

*취업 현황 : CJ 제일제당, LG 화학, 한국인삼연구원, NIH(미국국립보건원) 등

(2) 정량적 성과

○ 제 1핵심 : 식중독 미생물 제어 선도물질 최적화 및 안전식품 생산 적용

- 제 1-1세부 (서울대 최상호, 하남출)

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
15	5	10			5	10	12		3

구 분	목표 (' 10~' 20)	실 적										
		1차 년도	2차 년도	3차 년도	4차 년도	5차 년도	6차 년도	7차 년도	후속 1차	후속 2차	후속 3차	합계
우수 연구 인력	박사(명)		1	1	2	1	2	1		1	4	13
	석사(명)	2		2	1	1	3	1	3	3	4	20
	취업(명)	1	1	3	1		4	1	1	3	3	18

- 제 1-2세부 (서울대 김도만, 우리두)

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
5		5			3	2	5		

구 분	목표 (' 10~' 20)	실 적										
		1차 년도	2차 년도	3차 년도	4차 년도	5차 년도	6차 년도	7차 년도	후속 1차	후속 2차	후속 3차	합계
우수 연구 인력	박사(명)						1					1
	석사(명)						1	2	1	2	2	8
	취업(명)						1	2	1	1		5

○ 제 2핵심 : 식품 내 생물학적 위해인자 검출 및 제어기술의 현장적용 및 산업화

- 제 2-1협동 (동국대 이광근, 서울대 강동현)

[2-1협동(동국대 이광근)]

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
		12			4	8	12		

구분	목표 (' 10~' 20)	실적										
		1차 년도	2차 년도	3차 년도	4차 년도	5차 년도	6차 년도	7차 년도	후속 1차	후속 2차	후속 3차	합계
우수 연구 인력	박사(명)											
	석사(명)			4	4	1	3	5	1	7	4	29
	취업(명)			4	4	1	3	6	1	7	2	28

[2-1협동(서울대 강동현)]

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
12	4	8			8	4	12		

구분	목표 (' 10~' 20)	실적										
		1차 년도	2차 년도	3차 년도	4차 년도	5차 년도	6차 년도	7차 년도	후속 1차	후속 2차	후속 3차	합계
우수 연구 인력	박사(명)					2	1	1	1	1	2	8
	석사(명)	2	2	1	3	3	3	2	2	2	4	24
	취업(명)	2	1	1	2	4	2	1	1	1		15

○ 제 3핵심 : 식중독균 제어를 위한 생물학적 안전 소재의 개발 및 산업화

- 제 3-1협동 (서울대 유상열)

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
12	4	8			5	7	12		

구분	목표 (' 10~' 20)	실적										
		1차 년도	2차 년도	3차 년도	4차 년도	5차 년도	6차 년도	7차 년도	후속 1차	후속 2차	후속 3차	합계
우수 연구 인력	박사(명)	-	1	2	-	1	2	1	-	2	2	11
	석사(명)	-	-	2	3	2	2	1	2	4	2	18
	취업(명)	-	1	4	3	3	4	2	2	4	1	24

(3) 장·단기 인력양성 프로그램 활용성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

(4) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

- 산학강좌, 산업기술인력 양성실적 내용

※ 명칭, 관련기업명, 교육훈련대상, 훈련내용 및 방법, 소요경비부담, 협력조건 등

(5) 인력양성의 경제사회 파급효과(해당 시 작성)

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)			
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	기업 취업	기타	합계
	10		10		33		33

5. 목표달성도 및 관련분야 기여도

○ 제 1핵심 : 식중독 미생물 제어 선도물질 최적화 및 안전식품 생산 적용

- 제 1-1세부 (서울대 최상호, 하남출) : 독성인자 발현제어 선도물질 유래
신개념 식품안전소재 도출

연차	연구목표	주요 연구 수행내용	달성도 (%)
후속 1차년 도	독성인자 조절자 제어 선도물질의 효능 유전 체기반 검증	<ul style="list-style-type: none"> 독성인자 조절자 제어 선도물질 CM2660의 패혈증 비브리오균 독성 유전자 발현 및 독성 관련 표현형 억제 여부 확인 rtxHCA 및 rtxBDE operon을 marker 독성 유전자로 발굴, 발현 및 기능 특성 규명 	100
후속 2차년 도	독성인자 조절자 제어 선도물질 유도체들의 구조-활성 상관관계 분 석	<ul style="list-style-type: none"> HlyU marker 독성 유전자 rtxA-lux reporter strain 구축, 이를 이용하여 제어 선도물질과 유도체들의 효능 파악 최적 선도물질 CM2660 선발 및 HlyU 제어 분자기전 규명 	100
후속 3차년 도	독성인자 조절자 제어 선도물질 최적화 및 식 품안전 후보물질 도출	<ul style="list-style-type: none"> CM2660의 독성 억제 효능 적용 범위 확대 및 안전성 검증 모델식품 굴 접촉 시 CM2660의 패혈증 비브리오균 독성 유전자 발현억제 효능 확인 	100

- 제 1-2세부 (서울대 김도만, 우리두) : 식품 맞춤형 천연 항균 소재 생산
최적화 및 적용

연차	연구목표	주요 연구 수행내용	달성도 (%)
후속 1차년 도			
후속 2차년 도	생물전환기술 활용 항 균 신바이오틱스 식품 안전 항균 소재 생산 최적화 및 적용	<ul style="list-style-type: none"> 유산균 발효 및 발효액을 이용한 난소화성 항균 프리바이오틱스 및 신바이오틱스 화합물 생산 최적화 개발 식품 소재의 항균, 항산화 등 식품 내 물질 특성 연구 천연 및 발효 식음료 환경에 대한 적용 SCI 논문게재 3편, 특허등록 7건, 특허출원 10건과 인력양성 2인 실적 	100
후속 3차년 도	생물전환기술 활용 저 열량 항균 천연 식품 안전 항균 소재 생산 최적화 및 적용	<ul style="list-style-type: none"> 발효 배양액 생산 및 수용화 천연 항균 소재 생산 스테비오사이드 생물전환 산물들의 항균 및 기타 특성 확인 저열량 과실 음료(청 등) 제조를 위한 올리고당 합성 	100

		<ul style="list-style-type: none"> • 스테비올 올리고당 함유 (발효) 식음료의 기능성 확보 • SCI 논문게재 6편, 게재승인 1편, 특허등록 4건, 특허출원 5건과 인력양성 2인, 기술이전 3건 실적 	
--	--	--	--

○ 제 2핵심 : 식품 내 생물학적 위해인자 검출 및 제어기술의 현장적용 및 산업화
 - 제 2-1세부 (세니젠 박정웅) : 식중독균 검출 및 제어기술들의 제품화 및 상용화

연차	연구목표	주요 연구 수행내용	달성도 (%)
후속 1차년도	Super-heated steam과 HOCl 병합 살균시스템의 최적화 및 제품화	<ul style="list-style-type: none"> • Super-heated steam과 HOCl 병합처리를 통해 최적화 조건을 확립하였으며, 개발된 시작품을 활용하여 실제 식품 제조 공정 및 가공업체에 설치하여 설비 표면과 작업장 바닥을 대상으로 제어 효과를 검증함. 	100
후속 2차년도	식품품목별로 Multiplex Real-Time PCR kit 최적화 및 제품화	<ul style="list-style-type: none"> • 식품품목별 식중독균 조사를 통해 5 종 이상의 위해요인이 높은 식중독균을 그룹화 하였으며, 식품품목별 특이도 및 민감도 평가를 통해 Multiplex Real-Time PCR kit의 최적화 조건 확립 및 현장 검증을 진행함. 	100
후속 3차년도	유기산과 HOCl 병합 살균시스템의 최적화 및 제품화	<ul style="list-style-type: none"> • 유기산과 HOCl 복합처리 극대화를 위한 최적화 조건을 확립하였으며, 복합 살균시스템을 제작하여 식품원료에 있는 Bacillus subtilis spore의 제어효과를 검증함. 	100

- 제 2-1협동 (동국대 이광근, 서울대 강동현) : 식품 내 생물학적, 화학적 위해인자 저감화 기술 현장적용 및 산업화
 [2-1협동(서울대 김도만)]

연차	연구목표	주요 연구 수행내용	달성도 (%)
후속 1차년도	식품 맞춤형 천연 항균 소재 생산 최적화 및 생물학적 위해인자 저감화 기술현장 적용 및 산업화	<ul style="list-style-type: none"> • 생물전환기술 활용 난소화성 항균 프리바이오틱스 및 신바이오틱스 식품 안전 항균 소재 생산 최적화 및 적용함 • 발효 배양액 생산 및 수용화 천연 항균 소재 생산 조건을 최적화함 • 수용화 천연항균소재와 난소화성 올리고당 조합 생물전환 공정을 최적화함 • 개발 소재의 기능성 연구함 • 고함량 올리고당 함유 프로바이오틱스 소재 및 식음료의 기능성 확보함 	100

후속 2차년 도			
후속 3차년 도			

[2-1협동(동국대 이광근)]

연차	연구목표	주요 연구 수행내용	달성도 (%)
후속 1차년 도			
후속 2차년 도	식품 모델시스템을 활용한 식품의 가공·저장 중 유해물질 저감화	<ul style="list-style-type: none"> • 불포화 지방산 다량 함유 고체식품 중 푸란 분석법 확립 및 유효성을 검증 완료 • 음료류 중 벤젠 분석법 확립 및 유효성을 검증 완료 • 시중에 유통되는 음료류 중 벤젠 분석을 완료 • 음료 모델시스템을 활용한 벤젠 저감화 연구를 수행 	100
후속 3차년 도	식품 모델시스템을 활용한 식품의 가공, 저장 중 유해물질 저감화 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 인스턴트 라면 중 푸란 분석법 확립 및 유효성을 검증함 • 라면 모델시스템에서의 푸란 생성량을 분석 및 저감화 연구를 진행함 • 유해물질 별 분석법 확립 및 유효성을 검증함 • 잠재적 위해요소 함유 식품 3종에서의 2종의 유해물질 함량 분석을 진행함. • 김 열처리시스템모델에서의 Kinetics 연구를 수행함 • 고춧가루 열처리 시스템모델에서의 Kinetics 연구를 수행함 • 4-Methylimidazole (4-MI) 분석법 확립 및 유효성을 검증함 • 4종의 무기염 및 2종의 유기산을 첨가한 제 III형 캐러멜색소 모델시스템을 개발함. • 제 III형 캐러멜색소 모델시스템에서의 색소 안정성 분석을 진행함. 	100

[2-1협동(서울대 강동현)]

연차	연구목표	주요 연구 수행내용	달성도 (%)
후속 1차년	식품 맞춤형 천연 항균 소재 생산 최적화 및 생	<ul style="list-style-type: none"> • 신규 가열기술 기반 조합 시스템 구축 • Ohmic heating/essential oil 처리의 식중독균 저감 	100

도	물학적 위해 인자 저감 화 기술 현장적용 및 산업화	<ul style="list-style-type: none"> 화에 대한 시너지 효과 확인 PI, DiBAC4(3) 등 형광기반 분석 tool을 이용하여 식중독균 제어 메커니즘 규명 	
후속 2차년 도	신규 가열기술 기반 조합 시스템 구축 및 식중독균 저감 메커니즘 분석	<ul style="list-style-type: none"> RF-UV 조합처리를 통한 분유 내 식중독균 제어의 시너지 효과 확인 SHS-LA 조합처리를 통해 과채류 표면의 식중독균 제어 효과 확인 TEM 등 전자현미경 분석을 통해 식중독균 제어 메커니즘 확인 식품 품질에 영향을 미치지 않으면서 효과적인 미생물 제어를 위한 최적 조건 설정 및 검증 	100
후속 3차년 도	시뮬레이션 예측모델 개발을 통한 신 기술의 산업화 적용 기반 확립	<ul style="list-style-type: none"> Comsol multiphysics 프로그램을 활용한 3가지 신규 가열기술의 시뮬레이션 예측 모델 확립 다양한 factor를 설정하고 측정함으로써 정합성 높은 모델 도출 온도 상승 profile 분석을 통해 실제 구동과의 정합성 평가 검증 미생물 사멸 예측 패턴과 실제 정량적 미생물 제어 효과 비교를 통한 시뮬레이션 예측 모델의 정합성 검증 	100

○ 제 3핵심 : 식중독균에 대한 항생제 대체 생물학적 제어 기술 현장 적용 및 산업화
 - 제 3-1세부 (인트론 손지수) : 식중독균에 대한 항생제 대체 생물학적 제어 기술 현장 적용 및 산업화

연차	연구목표	주요 연구 수행내용	달성도 (%)
후속 1차년 도	유용 박테리오파지의 증식 및 정제 공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> 3-1 협동과제팀 보유 박테리오파지들 중 산업적으로 활용가치가 높은 박테리오파지 5종에 대해 소규모 증식 및 정제 공정 개발 (증식액 기준 500 mL ~1 L, 순도 80% 이상) 산업화에 적합한 박테리오파지 기반 제형 개발 개별 박테리오파지 및 박테리오파지 카테일 제제를 대상으로 장기 보관 안정성 조사 실시 	100
후속 2차년 도	유용 파지 유래 단백질의 소규모 제조 시스템 개발 (생산/분리/정제)	<ul style="list-style-type: none"> 3-1 협동과제팀 보유 파지 유래 단백질들 중 산업적으로 활용가치가 높은 파지 유래 단백질 3종에 대해 소규모 발현 및 정제 공정 개발 (생산액 기준 500 mL~1 L, 순도 80% 이상) 산업화에 적합한 파지 유래 단백질 기반 제형 개발 파지 유래 단백질의 단기 보관 안정성 조사 실시 	100
후속	박테리오파지 및 파지	<ul style="list-style-type: none"> 박테리오파지의 대규모 증식 및 정제 공정 개발 	100

3차년도	유래 단백질의 산업적 제조 공정 scale-up, 원료의 산업적 제조 공정 개발	(증식액 기준 50 L, 순도 90% 이상) <ul style="list-style-type: none"> 파지 유래 단백질의 대규모 발현 및 정제 공정 개발 (생산액 기준 10 L, 순도 90% 이상) 3-1 협동과제팀에서 실시될 유효성 평가 시험에 필요한 시료 제조 및 공급 	
------	--	--	--

- 제 3-1협동 (서울대 유상열) : 식중독균에 대한 항생제 대체 생물학적 제어 기술 현장 적용 및 산업화

연차	연구목표	주요 연구 수행내용	달성도 (%)
후속 1차년도	생물학적 항균 소재 생산을 위한 박테리오파지 선정 및 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> 산업화용 신규 박테리오파지 분리 및 선별 선별한 박테리오파지의 숙주 용해능 분석 선별한 박테리오파지의 염기서열 분석 	100
후속 2차년도	다양한 제형의 박테리오파지 및 파지 유래 단백질 개발	<ul style="list-style-type: none"> 박테리오파지 염기서열 정보 기반 항균 단백질 (endolysin) 후보 선정 선정된 항균 단백질 후보의 cloning, 순수 분리 및 대량 발현 체계 구축 분리된 항균 단백질의 숙주 용해능의 분석 분리된 항균 단백질의 산업 환경 적용 조건 확립 박테리오파지 및 항균 단백질 기반 항균제의 최적 제형 선정 	100
후속 3차년도	생물학적 항균 소재 생산 조건 최적화 및 현장 적용	<ul style="list-style-type: none"> 개발된 새로운 제형의 박테리오파지 및 항균 단백질 기반 항균제의 적용 개발된 새로운 제형의 박테리오파지 및 항균 단백질 기반 항균제의 생산 조건 확립 생산된 제품의 유효성 확인 	100

6. 연구성과의 활용계획

○ 제 1핵심 : 식중독 미생물 제어 선도물질 최적화 및 안전식품 생산 적용

- 제 1-1세부 (서울대 최상호, 하남철)

- 본 사업화 연구 결과로 도출된 독성인자 발현제어 선도물질 CM2660은 국내에서 가장 많은 사망자를 유발하는 모델 식중독균인 패혈증 비브리오균에 대한 특이적인 독성 제어 기전을 통해 식중독을 예방하고자 하였다.
- 현재 사용 중인 광범위 항균제는 비브리오 패혈증 감염증을 완전히 치료할 수 없으며 내성이 생길 수 있다는 문제점이 있다. 본 연구를 통해 도출한 독성인자 발현제어 선도물질 CM2660은 패혈증 비브리오균의 독성을 *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*에서 효과적으로 억제하였으며, 미생물의 생장을 저해하지 않기 때문에 내성을 유발할 가능성이 낮을 것으로 예상된다.
- 본 사업화 연구 결과는 국내외 식중독 미생물 제어 분야의 연구자들에게 독성인자 발현제어 선도물질의 효능과 표적 특이성(target specificity)을 분석하고 검증하는 방법을 제공할 것이다.
- 본 연구를 통해 도출한 독성인자 발현제어 선도물질 CM2660은 패혈증 비브리오균뿐만 아니라 염 비브리오균(*V. parahaemolyticus*), 비브리오 알기놀리티쿠스(*V. alginolyticus*), 비브리오 콜레라균(*V. cholerae*) 등 식중독과 감염증을 일으키는 여러 독성 비브리오균의 독성을 억제하였다. 이러한 결과는 CM2660이 독성 비브리오균에 대한 항미생물 식품안전소재로 개발될 수 있음을 제시한다.
- 본 연구에서는 독성인자 발현제어 선도물질 CM2660이 패혈증 비브리오균의 독성을 억제하는 제어 기전을 분자 수준에서 규명하였다. CM2660은 독성인자 조절자 HlyU에 공유 결합을 일으킴으로써 HlyU가 target promoter DNA에 결합하지 못하도록 저해하였다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 다른 식중독 미생물의 독성을 억제하는 제어 선도물질 발굴이 가능하다.
- 본 연구에서는 패혈증 비브리오균의 독성을 평가하기 위한 pilot scale의 모델식품을 개발하고자 하였다. 패혈증 비브리오균에 의한 오염 가능성이 있는 식품으로써 굴을 모델식품으로 선정하였으며, 패혈증 비브리오균의 굴 접촉 시 독성 유전자 발현이 증가함을 확인하였다. 이 연구 결과는 식중독 미생물 독성제어 선도물질의 효능을 평가하기 위한 모델식품 개발 연구의 기반이 될 수 있다.
- 본 사업화 연구 결과는 식중독 미생물 연구의 모델 system으로 활용될 수 있으며, 식중독 미생물 독성인자 발현 조절체계에 대한 이해를 증진시킬 수 있다.
- 본 사업화 연구 결과는 식중독 미생물 제어기술 개발의 모델로서 항미생물 식품안전소재 산업의 경쟁력을 향상시키는 원천기술로 활용될 수 있다.
- CM2660을 식품첨가물/포장재 등으로 사용할 수 있도록 세니젠에 CM2660에 대한 기술 이전을 추진하여, CM2660의 인체 안정성 검사 실험을 실시할 예정이다.

- 제 1-2세부 (서울대 김도만, 우리두)

- 난수용성 향염, 항산화 그리고 항균 소재들의 수용화 소재 제조하고, 소재들은 화장품의 생리활성이 향상된 활성 소재로 활용
- 천연가용제를 이용한 기능성 식품소재, 의약품소재, 화장품소재의 수용화로 제형다양화
- 안정성 강화를 통한 생체이용성 강화 및 확보된 소재 생산 및 활용
- 연구 기간 중 얻은 지식재산권은 산업적 활용을 위해서 기술이전 등을 적극 진행

○ 제 2핵심 : 식품 내 생물학적 위해인자 검출 및 제어기술의 현장적용 및 산업화

- 제 2-1세부 (세니젠 박정웅)

- Super-heated steam 및 HOCl 복합처리, 유기산 및 HOCl의 복합처리를 통해 식품 원료 및 식품제조시설과 작업장에 적용 가능한 미생물 살균 기술 및 제품을 확보를 통해 생물학적 안전성을 확보하는데 기여할 것이다.
- 기존 살균방법에 비하여 소독부산물을 발생시키지 않으며, 화학적 소독제가 아닌 식품첨가물 원료의 사용으로 추가 신규 기술 개발에 기초 정보로 활용될 수 있다.
- 식품품목에 대해 위해 요인이 큰 식중독균을 선별한 multiplex real-time PCR kit을 활용하여 단시간에 여러 식중독균을 확인을 통해 기존 식중독균 검출 방식에 비해 시간 및 비용을 절감가능할 것이다.
- 실제 산업 현장에 적용 가능한 식중독균 제어 기술을 습득한 인력 양성을 통해 식품 안전 분야의 발전에 공헌할 것이다.
- 식품제조공정에 최적화된 미생물 살균 시스템의 설계 및 장치 제작 인력 수요 증가할 것이다.
- 참여 기업에 대한 지속적인 식품 안전 교육을 통해 국내 식품 산업의 안전 의식 성장에 기여할 것이다.

- 제 2-1협동 (동국대 이광근, 서울대 강동현)

[2-1협동(서울대 김도만)]

- 난수용성 향염, 항산화 그리고 항균 소재들의 수용화 소재 제조하고, 소재들은 화장품의 생리활성이 향상된 활성 소재로 활용 가능하다.
- 천연가용제를 이용한 기능성 식품소재, 의약품소재, 화장품소재의 수용화로 다양한 제형을 구성할 수 있다.
- 안정성 강화를 통한 생체이용성 강화 및 확보된 소재 생산 및 활용할 수 있다.
- 연구 기간 중 얻은 지식재산권은 산업적 활용을 위해서 기술이전 등을 적극 진행 가능하다.

[2-1협동(동국대 이광근)]

- 잠재적 발암물질인 푸란, 바이오제닉 아민의 생성기작 연구를 통해 저감화 조건을 확립할 수 있고 최적화된 원부재료 정보를 산업계, 학계, 공공연구기관에 제공할 수 있다. 또한, 푸란에 대한 정확한 생성기작 연구는 향후 이 물질의 위해분석(Risk analysis)에 광범위한 자료를 제공할 수 있다.
- 국내 생산/유통되는 식품에서 푸란, 바이오제닉 아민에 대한 과학적 근거 자료 제공으로 향

후 식품 안전관리대책 마련 및 대국민 홍보에 활용될 수 있다.

- 국제적으로 본 연구팀이 푸란, 바이오제닉 아민 분석의 리딩그룹으로 자리매김할 수 있다. 또한 국내 식품 중 푸란, 바이오제닉 아민 분석법을 확립함으로써 향후 시험법 제정 또는 재개정이 가능하다.
- 우리나라 식품의 푸란, 바이오제닉 아민에 대한 분석법 개발로 향후 노출 수준 분석을 가능하게 한다. 이를 통해 위해성을 개량화하여 식품 기준규격등의 재개정에 기본 자료를 제공한다.

[2-1협동(서울대 강동현)]

- 본 사업화 연구결과 중 병합살균시스템은 식품제조업체에서 식품을 생산하는 공정에서 식품에 존재하는 위해 미생물에 대해서 제어하기 위한 기존 살균 방식을 보완 및 대체하여 식품원료, 식품제조시설 및 작업장에 존재할 수 있는 포자형성균 또는 식중독균이 처리되지 않아 발생할 수 있는 식품의 생물학적 안전성을 근본적으로 해결 가능한 기술이다.
- Ohmic, Radio-frequency, Superheated steam 등 최신 가열기술과 기존 비가열 기술과의 조합처리를 통해 식품에서 병원성 미생물을 효과적으로 제어할 수 있었고, 더불어 synergitic 효과를 확인할 수 있었다. 이는 기존의 가열 공정을 대체하여 신규 가열/비가열 조합처리 기술을 산업화하는데 중요한 이론적 근거로 사용할 수 있다.
- Ohmic heating 시스템을 최첨단 시뮬레이션을 통해 온도 상승 및 미생물 사멸 패턴을 예측하였다. 더욱 시뮬레이션을 위해 식품 샘플과 처리 chamber의 물리화학적 및 전기화학적 특성을 규명하였고, 다양한 조건에서의 미생물 저항성 관련 factor를 도출하였다. 다양한 인자를 통해 더욱 세밀하고 정확한 시뮬레이션 예측 시스템을 구축하였고, validation 실험을 통해 개발된 예측 시스템의 정합성을 평가하였다. 이는 Ohmic heating system이 실제 산업에 적용하기 위한 큰 도약을 의미하며 기초 데이터로 활용할 수 있을 것이다.
- RF system은 비가열 처리 중 자외선과의 조합처리를 통해 synergistic한 미생물 제어 효과를 확인할 수 있었다. 이는 가열 처리와 비가열 처리의 살균 메커니즘의 차이에 의한 것으로 병원성 미생물의 내부에서부터 빠른 cell damage를 확인할 수 있었다. 시뮬레이션 예측 시스템을 구축하기 위해 RF 처리 chamber의 에너지 밀도, 전자기파 velocity, 전극판 사이의 energy gap 등을 확인하였고, 처리 샘플인 고춧가루의 열전도도 및 dielectric property를 도출하여 예측 모델링 식에 대입하였다. 이를 통해 보다 정확한 전자기파 heating 효과를 확인할 수 있었고, 온도 profile 분석을 통해 정합성을 평가하였다.
- SHS는 organic acid인 lactic acid와의 조합처리를 통해 더욱 효과적인 미생물 제어를 확인할 수 있었다. 이는 liquid에 의한 열전도도와 더불어 유기산의 pH로 인해 높은 열전달로 인한 damage와 pH에 의한 효소, cell membrane 등 주요 단백질의 비가역적 damage를 동시에 전달함으로써 synergistic 미생물 사멸 효과를 확인할 수 있었다. SHS 또한 다양한 시뮬레이션 예측 시스템을 통해 최신 가열 시스템의 flow를 효율적으로 이용하기 위한 최적 구조를 예측하여 실제 chamber로 구현하였다. Chamber에 위치한 샘플 특성을 고려하여 온도 상승 profile을 시각적으로 도출하였고, 각 point에서 미생물 사멸 효과를 예측하였다.
- 예측 시스템 개발은 엔지니어와의 연구를 통해 식품안전분야가 융합학문으로서의 충분한 가능성을 보여준 연구 사례이다.

○ 제 3핵심 : 식중독균에 대한 항생제 대체 생물학적 제어 기술 현장 적용 및 산업화

- 제 3-1세부 (인트론 손지수)

- 본 과제를 통해 확보된 박테리오파지 및 파지 유래 단백질은 세균성 질환 예방 및 치료용 소재로 활용될 수 있음. 박테리오파지 기반 제제는 기본적으로 유해 세균에만 선택적으로 항균력을 발휘하며, 유익 또는 정상세균총에 영향을 주지 않기에 동물 건강 및 생산성 증진 효과를 줄 수 있음. 하지만, 예기치 못한 문제에 대한 대비를 위해 장내미생물 모니터링 연구를 지속적으로 수행해 나갈 계획임.
- 박테리오파지는 국내에서 보조사료 사용 가능 인정물질로 등록 및 고시되어 있기에 산업적 이용 및 사업화 추진이 가능함. 특히 다양한 박테리오파지는 각테일 제제로 하여 다양한 축종에 적용될 수 있으며 축종별 제품군 설정이 가능함. 또한, 박테리오파지 및 파지 유래 단백질은 효과적인 친환경 항생제 대체 소재로 이용 가능하며 기존 항생제와 병용 처치가 가능하기에 유효 농도 저감 효과가 기대됨.
- 본 과제를 통해 확립된 박테리오파지 및 파지 유래 단백질 제제화 기술은 표준 제조 공정 최적화에 활용될 것임.
- 한편, 원료 실온 보관 중에 발생될 수 있는 유해균 오염을 효과적으로 제어하기 위한 목적으로 박테리오파지 및 파지 유래 단백질 기반 제제가 환경 소독제로도 활용될 수 있으리라 생각됨.
- 아직까지 국내에서 박테리오파지를 인체 질환 처치 목적으로 적용 가능한 상황은 아니지만, 향후 인체 적용을 고려하여 유효성 데이터 및 안전성 입증 자료 확보를 위한 많은 연구개발 활동이 필요하다고 생각됨.

- 제 3-1협동 (서울대 유상열)

- 산업 환경을 고려하여 Bacteriophage 및 endolysin의 생산 조건을 확립하고, 다양한 제형에서의 제어능력을 입증하여 신규 항균제로서의 가능성을 증명하였다. 우선 관계 법령에 근거하여 박테리오파지 첨가 사료를 생산, 제품화 가능성 여부를 타진 중이며, 우유, 햄슬라이스, 육계 제품 등 다양한 식품에서도 유효성을 확인하여 식품 첨가물 및 살균제로써의 활용 가능성을 제시하였다. 또한 동물실험 등을 통해 그 효과를 확인하여 치료제로써의 활용 가능성도 제시할 수 있을 것이며 추후 산업화를 위한 전략을 마련한다면 식품산업 및 화장품 산업, 제약 산업 등에서 활용할 수 있을 것이라 기대한다.
- 참고로 본 연구를 통해 개발된 항균단백질은 생물학적 제제로서 통상의 식품 제조공정 중 살균 처리 과정 (고온, 고압 및 화학적 처치 등)에서 병용 처리하는 용도라기보다는 단독 제제로 활용되어야 할 것이라 생각한다. 내열성 개발의 주 목적은 여름철 고온 (37~40℃) 조건에서 항균단백질의 실활 여부를 확인해 보기 위함이었고, 연구결과 크게 문제되는 수준은 아니었다. 식품에 항균단백질 적용 시에 투여량 및 투여횟수 조정을 통해 실제 현장에서 유용하게 항균단백질이 활용될 수 있을 것이라 기대한다.
- 박테리오파지 및 파지 유래 단백질은 유해 세균 제어를 통한 식품의 품질 보존 및 안정성 향상을 기대할 수 있기에 식약처 가이드라인에 준하는 제반 자료를 준비하여 식품위생법 제7조에 의거한 식품첨가물 등록 절차를 추진할 계획이다.

7. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

○ 해당사항 없음

8. 연구개발결과의 보안등급

○ 해당사항 없음

9. 연구개발과제의 대표적 연구실적

연번	구분	논문특허명	소속기관	논문게재지/특허등록국가	Impact Factor	논문게재일/특허등록일	기타
1	논문	Small-molecule inhibitor of HlyU attenuates virulence of <i>Vibrio</i> species	서울대학교	Scientific Reports	4.011	2019.01	
2	논문	Structural basis for HOCl-recognition and regulation mechanisms of HypT, a hypochlorite-specific transcriptional regulator	서울대학교	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	9.580	2019.02.	
3	특허출원	RTX 독소 생성 저해제 및 이를 이용한 비브리오균 감염증 치료용 조성물	서울대학교	미국		2020.02	
4	특허등록	병원성 미생물 살균을 위한 과열수증기 발생장치	서울대학교	대한민국		2018.11	
5	특허등록	클로스트리디움 퍼프린젠스 용해능을 가진 내열성 엔도라이신 LysCPD2	서울대학교	대한민국		2019	

10. 기타사항

○ 해당사항 없음

11. 참고문헌

○ 제 1핵심

- Kim BS and Satchell KJF. 2016. MARTX effector cross kingdom activation by Golgi-associated ADP-ribosylation factors. *Cellular Microbiol* 18(8):1078-1093.
- Kwak JS, Jeong HG, and Satchell KJF. 2007. *Vibrio vulnificus* *rtxAI* gene recombination generates toxin variants with altered potency during intestinal infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(4):1645-1650.
- Shin SH, Shin DH, Ryu PY, Chung SS, and Rhee JH. 2002. Proinflammatory cytokine profile in *Vibrio vulnificus* septicemic patients' sera. *FEMS Immunol Med Mic* 33(2):133-138.
- Kumar H, Kawai T, and Akira S. 2011. Pathogen recognition by innate immune system. *Int Rev Immunol* 30(1):16-34.
- Akira S, Uematsu S, and Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4):783-801.
- Jang KK, Lee ZW, Kim B, Jung YH, Han HJ, Kim MH, Kim BS, and Choi SH. 2017. Identification and characterization of *Vibrio vulnificus* *plpA* encoding a phospholipase A₂ essential for pathogenesis. *J Biol Chem* 292(41):17129-17143.
- Liu M, Alice AF, Naka H, and Crosa JH. 2007. The HlyU protein is a positive regulator of *rtxAI*, a gene responsible for cytotoxicity and virulence in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* 75(7):3282-3289.
- Lee BC, Lee JH, Kim MW, Kim BS, Oh MH, Kim KS, Kim TS and Choi SH. 2008. *Vibrio vulnificus* *rtxE* is important for virulence, and its expression is induced by exposure to host cells. *Infect Immun* 76(4):1509-1517.
- Lee JH, Kim MW, Kim BS, Kim SM, Lee BC, Kim TS, and Choi SH. 2007. Identification and characterization of the *Vibrio vulnificus* *rtxA* essential for cytotoxicity *in vitro* and virulence in mice. *J Microbiol* 45(2):146-152.
- Li L, Rock JL, and Nelson DR. 2008. Identification and characterization of a repeat-in-toxin gene cluster in *Vibrio anguillarum*. *Infect Immun* 76(6):2620-2632.
- Lenz DH, Mok KC, Lilley BN, Kulkarni RV, Wingreen NS, and Bassler BL. 2004. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell* 118(1):69-82.
- Kim BS, Jang SY, Bang Y-J, Hwang J, Koo Y, Jang KK, Lim D, Kim MH, and Choi SH. 2018. QStatin, a selective inhibitor of quorum sensing in *Vibrio* species. *mBio* 9(1):1-15.
- Jang KK, Gil SY, Lim JG, and Choi SH. 2016. Regulatory characteristics of *Vibrio vulnificus* *gbpA* gene encoding a mucin-binding protein essential for pathogenesis. *J Biol Chem* 291:5774-5787.
- Lee DH, Jeong HS, Jeong, HG, Kim KM, Kim H, and Choi SH. A consensus sequence for binding of SmcR, a *Vibrio vulnificus* LuxR homologue, and genome-wide identification of the SmcR regulon. *J Biol Chem* 283(35):23610-23618.
- Lee Z-W, Kim BS, Jang KK, Bang Y-J, Kim S, Ha N-C, Jung YH, Lee HJ, Han HJ, Kim

- J-S, Kim J. Sahu PK, Jeong LS, Kim MH, Choi SH, 2019. Small-molecule inhibitor of HlyU attenuates virulence of *Vibrio* species. *Sci Rep.* 9:4346.
- Bang Y-J, Lee Z-W, Kim D, Jo I, Ha N-C, and Choi SH. 2016. OxyR2 functions as a three-state redox switch to tightly regulate production of Prx2, a peroxiredoxin of *Vibrio vulnificus*. *J Biol Chem* 291(31):16038-16047.
 - Jo I, Kim D, Bang Y-J, Ahn J, Choi SH, and Ha N-C. 2017. The hydrogen peroxide hypersensitivity of OxyR2 in *Vibrio vulnificus* depends on conformational constraints. *J Biol Chem* 292(17):7223-7232.
 - Lagoutte R, Patouret R, and Winssinger N. 2017. Covalent inhibitors: an opportunity for rational target selectivity. *Curr Opin Chem Biol* 39:54-63.
 - Getz LJ. and Thomas NA. 2019. The transcriptional regulator HlyU positively regulates exsA expression leading to type III secretion system-1 activation in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* 200(15):e00653-17.
 - Mukherjee D, Pal A, Chakravarty D, and Chakrabarti P. 2015. Identification of the target DNA sequence and characterization of DNA binding features of HlyU, and suggestion of a redox switch for *hlyA* expression in the human pathogen *Vibrio cholerae* from *in silico* studies. *Nucleic Acids Res* 43:1407-1417.
 - V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, *Pharmacogn. Rev.* 4 (2010) 118-126.
 - D. Kim, D.W. Kim, J.H. Lee, K.H. Park, L.M. Day, D.F. Day, Development of constitutive dextransucrase hyper-producing mutants of *Leuconostoc mesenteroides* using the synchrotron radiation in the 70-1000 eV region, *Biotechnol. Tech.* 11 (1997) 319-321.
 - E. Seo, S.H. Nam, H.K. Kang, J.Y. Cho, H.S. Lee, H.W. Ryu, D. Kim, Synthesis of thermo- and acid-stable novel oligosaccharides by using dextransucrase with high concentration of sucrose, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1117-1123.
 - G. Kim, H.K. Kang, E.S. Seo, S.H. Jung, J.S. Park, D.H. Kim, D.W. Kim, S.A. Ahn, C. Sunwoo, D. Kim, Glucosylation of the flavonoid, astragalin by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextransucrase acceptor reactions and characterization of the products, *Enzyme Microb. Technol.* 50 (2012) 50-56.
 - S. Nam, J.A. Ko, W. Jun, Y.J. Wee, M.K. Walsh, K.Y. Yang, J.H. Choi, J.B. Eun, J. Choi, Y.M. Kim, S. Han, T.T.H. Nguyen, D. Kim, Enzymatic synthesis of chlorogenic acid glucoside using dextransucrase and its physical and functional properties, *Enzyme Microb. Technol.* 107 (2017) 15-21.
 - H. Sunwoo, N. Gujral, A.C. Huebl, C.T. Kim, Application of high hydrostatic pressure and enzymatic hydrolysis for the extraction of ginsenosides from fresh ginseng root (*Panax ginseng* CA Myer), *Food Bioprocess. Tech.* 7 (2014) 1246-1254.
 - H. Real, A.J. Alfaia, A.R.T. Calado, M.H.L. Ribeiro, High pressure-temperature effects on enzymatic activity: Naringin bioconversion, *Food Chem.* 102 (2007) 565-570.
 - Y. Moon, J.-H. Lee, D.-Y. Jhon, W.-J. Jun, S.-S. Kang, J. Sim, H. Choi, J.-H. Moon, D. Kim, Synthesis and characterization of novel quercetin- α -d-glucopyranosides using

glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides*, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1124-1129.

- K. Schaich, X. Tian, J. Xie, Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays, *J. Funct. Foods* 14 (2015) 111-125.
- X. Li. Improved pyrogallol autoxidation method: a reliable and cheap superoxide-scavenging assay suitable for all antioxidants *J. Agric. Food Chem.*, 60 (2012), pp. 6418-6424
- C. Proenca, M. Freitas, D. Ribeiro, E.F.T. Oliveira, J.L.C. Sousa, S.M. Tome, M.J. Ramos, A.M.S. Silva, P.A. Fernandes, E. Fernandes. α -Glucosidase inhibition by flavonoids: an in vitro and in silico structure-activity relationship study *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 32 (2017), pp. 1216-1228
- J. Kim, Y.S. Yi, M.Y. Kim, J.Y. Cho. Role of ginsenosides, the main active components of *Panax ginseng*, in inflammatory responses and diseases. *J. Ginseng Res.*, 41 (2017), pp. 435-443
- J. Kim, T.T.H. Nguyen, N.M. Kim, Y.H. Moon, J.M. Ha, N. Park, D.G. Lee, K.H. Hwang, J.S. Park, D. Kim. Functional properties of novel epigallocatechin gallate glucosides synthesized by using dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1299CB4. *J. Agric. Food Chem.*, 64 (2016), pp. 9203-9213
- J. Ko, S.H. Nam, J.Y. Park, Y. Wee, D. Kim, W.S. Lee, Y.B. Ryu, Y.M. Kim. Synthesis and characterization of glucosyl stevioside using *Leuconostoc dextransucrase*. *Food Chem.*, 211 (2016), pp. 577-582
- T. Devlamynck, E.M. te Poele, K. Quataert, G.J. Gerwig, D. Van de Walle, K. Dewettinck, J.P. Kamerling, W. Soetaert, L. Dijkhuizen. Trans- α -glucosylation of stevioside by the mutant glucansucrase enzyme Gtf180-Delta N-Q1140E improves its taste profile. *Food Chem.*, 272 (2019), pp. 653-662
- D. Kim, D.F. Day. Isolation of a dextransucrase constitutive mutant of *Lipomyces starkeyi* and its use for the production of clinical size dextran. *Lett. Appl. Microbiol.*, 20 (1995), pp. 268-270
- T.T. Nguyen, J. Si, C. Kang, B. Chung, D. Chung, D. Kim. Facile preparation of water soluble curcuminoids extracted from turmeric (*Curcuma longa* L.) powder by using steviol glucosides. *Food Chem.*, 214 (2017), pp. 366-373
- J. Hur, T.T.H. Nguyen, N. Park, J. Kim, D. Kim. Characterization of quinoa (*Chenopodium quinoa*) fermented by *Rhizopus oligosporus* and its bioactive properties. *AMB Express*, 8 (2018), p. 143

○ 제 2핵심

- G. Y. Yeon., I. H. Cho. 2016. Comparison on Physico-Chemical and Affective Properties in Mackerel Cooked by Electric Pan and under Superheated Steam. *Korean J Food Cook Sci.* 2287-1780
- G. R. Kim., S. H. Lee. 2016. Effect of Superheated Steam Treatment on the Rancidity of Brown Rice. *Food Engineering Progress*. Vol. 20, No. 4. pp. 411-415.

- George. S., Anke S., Dilip Kumar Desai. 2010. Drying of Beef in Superheated Steam. *Drying Technology* 28(9):1072-1082.
- T. E. Moon., S. Y. Lee., K. W. Park. 2004. Microflora of Manufacturing Process and Final Products of Saengshik. *Korean Society of Food Science and Technology*. 36(3): 501 - 506.
- J. K. Park., E. S. Nam., S. I. Park. 2008. Changes in Physicochemical and Sensory Properties of Fruits as Affected by Chlorine Sterilization. *Korean J. Food & Nutr.* Vol. 21. No. 4, 499 - 509.
- H. O. Lee., Y. J. Lee., J. Y. Kim., K. H. Kwon. 2013. Changes in the quality of frozen vegetables during storage. *Korean J Food Preservation*. 20(3), 296-303
- Technological Commercialization Strategy based on Consumer Preference Analysis of Low-sodium Instant noodle Ramen, Oh, Sang Ho ; Leem, Choon Seong, *Journal of the Korean Society of Food Culture*, 2018, 33(6), p.523-530.
- Instant Noodles: Processing, Quality, and Nutritional Aspects Neelam Gulia , Vandana Dhaka, B. S. Khatkar, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 2014, 54(10), p.1386-1399.
- Microbial decontamination of dried laver using corona discharge plasma jet (CDPJ), Kim, Je-Wook, Pradeep Puligundla, and Chulkyoon Mok, *Journal of food engineering*, 2015, 161, p.24-32.
- Proximate composition, amino acid, mineral, and heavy metal content of dried laver, Hwang, Eun-Sun, Kyung-Nam Ki, and Ha-Yull Chung, *Preventive nutrition and food science*, 2013, 18(2), p.139.
- Piperine-A Major Principle of Black Pepper: A review of its bioactivity and studies, Stojanović-Radić, Zorica, et al, *Applied Sciences*, 9(20), 4270
- Biogenic amine formation during fermentation in functional sheep milk yogurts, Silva, V. L., Costa, M. P., Vieira, C. P., & Conte-Junior, C. A., *Journal of dairy science*, 2019, 102(10), p. 8704-8709.
- Effects of water activity on pigments in dried laver (*Porphyra*) during storage, Oh, Soojung, et al., *Food Science and Biotechnology*, 2013, 22(6), p.1523-1529.
- LC-MS/MS determination of acrylamide in instant noodles from supermarkets in the Hebei province of China, Li-xin Yang , Gui-xiang Zhang , 꺿꺿-xue Yang, Yan He, *Food Additives & Contaminants:partB*, 2012, 5(2), p.100-104.
- Effects of extraction and processing methods on antioxidant compound contents and radical scavenging activities of laver (*Porphyra tenera*), Hwang, Eun-Sun, and Nhuan Do Thi, *Preventive nutrition and food science*, 2014, 19(1), p.40.
- Comparison of the aroma properties of red pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars grown in Hungary, Csóka, M., et al, *Acta alimentaria*, 2013, 42(2), p.143-157.

○ 제 3핵심

- Cao F, Wang X, Fang Cao, Xitao Wang, Linhui Wang, Zhen Li, Jian Che, Lili Wang, Xiaoyu Li, Zhenhui Cao, Jiancheng Zhang, Liji Jin, and Yongping Xu (2015) Evaluation of the Efficacy of a Bacteriophage in the Treatment of Pneumonia Induced by Multidrug

Resistance *Klebsiella pneumoniae* in Mice. *Biomed Res Int* 2015;752930.

- Catherine S. McVay, Marisela Velásquez, Joe A. Fralick (2007) Phage Therapy of *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Mouse Burn Wound Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1934–1938.
- United States Food and Drug Administration. 2005. Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Bacteriophage Preparation.
- Elise L. Schnabel, Alan L. Jones. (2001) Isolation and Characterization of Five *Erwinia amylovora* Bacteriophages and Assessment of Phage Resistance in Strains of *Erwinia amylovora*. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:59–64.
- Fox, J. (2000) Phage treatments yield healthier tomato, pepper plants. *Asm News*, 66(8), 455–456.
- Rebecca Harrington. (2015) Every year, almost half a million people die from a seemingly harmless illness.
- Jae-Hoon Song. (2009) Current status and future strategies of antimicrobial resistance in Korea. *The Korean Journal of Medicine.* 2009;77:143–151.
- Diana Gutiérrez, Lorena Rodríguez-Rubio, Beatriz Martínez, Ana Rodríguez, and Pilar García. (2016) Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Front Microbiol.* 2016; 7: 825.

연구개발보고서 초록

연구센터	식품 안전성 및 독성 연구센터				
과제명	(국문) 안전식품 소재와 기술의 최적화 및 식품산업 활용				
	(영문) Optimization of safety food materials and technology and utilization of food industry				
주관연구기관	서울대학교		주관연구책임자	(소속)서울대학교	
참여기업	우리두, 세니젠, 인트론		책임자	(성명)최상호	
총연구개발비 (3,208,400천원)	계	3,208,400	총연구기간	2017.09.01. ~ 2020.08.31. (3년 0월)	
	정부출연 연구개발비	2,925,000	총 참 여 연구 원 수	총인원	각 차년도별 평균 80명
	기업부담금	283,400		내부인원	
	연구기관부담 금	(105,000)		외부인원	

1. 연구개발 목표 및 성과

- 가. 연구개발 최종 목표: 농수산물식품의 안전성을 저해하는 다양한 위해인자들을 포괄적으로 동정하여 그 특성을 분자수준에서 규명하고 각 위해인자들을 제어할 수 있는 새로운 기술을 개발함.
- 나. 연구 측면성과: 3단계 연구를 통해서 농·식품의 위해인자인 내성을 유발하지 않는 새로운 패러다임의 식중독 미생물 제어기술을 개발했으며 (1핵심), 위해인자의 분자특성을 고려하여 식품의 안전성 향상기술과 함께 효과적인 열처리 살균 기술을 개발했다 (2핵심). 박테리오파지를 기반으로 안전식품 소재와 신기술을 개발하여 상용화하였다. 연구논문은 3단계 3년 동안 77건을 발표했으며, 50건의 특허를 출원하였으며, 28건을 등록했다. 이를 바탕으로 10건의 기술을 산업계에 이전하였다.
- 다. 인력 양성 측면: 3단계 연구를 통해서 분자수준에서 식품 안전성의 향상과 독성 제어할 수 있는 연구 인력을 양성하고 심화 발전시켰다. 3단계 동안 박사 13명, 석사 43명의 식품안전성 분야 고급인력을 양성하여 기업 연구소, 정부출연연구소, 국가 산하기관, 대학교수 등으로 취업하여, 현재 식품 안전성 향상을 위해서 연구에 매진하고 있다.

2. 연구내용 및 결과

연구 내용	연구 결과
내성발생이 없는 독성인자 조절자 제어 선도물질 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 동물실험 등에서 효능을 검증한 패혈증 비브리오균의 독성인자 발현 조절자 HlyU의 활성을 제어하는 선도물질 CM2660을 개발함. - 분자 수준에서 선도물질 CM2660의 작동원리를 규명함. - 제어 선도물질 CM2660의 패혈증 비브리오균 이외에 여러 병원성 비브리오균에 대한 독성 억제 효능을 확인하여 모델 식품에서 내성 발생없이 식중독균을 제어하는 식품 안전 후보물질을 개발함.
식품 맞춤형 천연 항균 소재 생산 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 유산균 발효액을 이용한 수용성 커큐미노이드 및 폴리페놀 화합물 생산 최적화 - 개발 식품 안전 소재의 항균, 항산화 등 식품 안전 특성 연구

	<ul style="list-style-type: none"> - 합. - 유산균 발효액을 이용한 저열량 항균 천연 감미 화합물 생산 최적화 - 개발 식품 안전 소재의 항균, 항산화 등 식품 내 안전과 물질 특성 연구하여 효능을 입증함. - 천연 및 발효 식음료 환경에 대한 적용으로 식품 안전 특성 확보함.
식중독균 검출 및 제어 기술들의 제품화 및 상용화	<ul style="list-style-type: none"> - 현장검증된 Superheated steam 과 HOCl을 기반으로한 설비표면 및 작업장바닥용 맞춤형 살균시스템 개발 - 다양한 조합의 식중독균 multiplex realtime PCR kit 개발 - 식품품목별 검증된 5종 이상의 Multiplex Real-Time PCR kit 제품화 - 유기산과 HOCl 복합처리용 식품원료 살균시스템 개발 - 현장검증된 <i>Bacillus</i> 포자를 제어할 수 있는 식품원료 살균시스템 개발
신규 가열기술과 비가열 기술의 조합처리 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> - 식품의 특성을 고려하여 조합처리 후 식품의 색도, texture, 수분함량 등 주요 품질 변화를 측정하여 품질에 영향을 미치지 않으면서 효율적인 미생물 제어를 위한 최적 조건을 도출하여 이의 시스템을 구축함. - Ohmic-essential oil 조합처리를 통해 전기전도도 차이를 분석하고 효과적인 미생물 제어 효과를 검증하고 이의 제품화함. - RF-자외선 조합처리를 통해 분말 식품에서 synergistic 미생물 제어 효과를 확인하고 시제품을 제작함. - SHS-lactic acid 조합처리를 통해 식품 표면에서의 효과적인 미생물 사멸을 확인하고 이의 메커니즘을 규명하고 적용함. - Ohmic heating, RF, SHS 시스템의 시뮬레이션 예측 모델을 위한 chamber 도식화 및 chamber의 재질별 물리화학적, 전기화학적 특성 등 주요 factor를 도출함
식품 모델 시스템을 활용한 가공·저장 중 유해물질 저감화 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 라면 모델시스템에서의 퓨란 생성량을 분석 및 저감화 조건을 확립함. - 유해물질 별 분석법 확립 및 유효성을 검증고 이를 후추의 조리 및 가공 공정 중 바이오제닉 아민 함량 분석 연구를 진행함 - 4-Methylimidazole (4-MI) 분석법 확립 및 유효성을 검증함. - 4 종의 무기염 및 2종의 유기산을 첨가한 제 III형 캐러멜색소 모델 시스템을 개발함
식중독균 제어를 위한 유용 소재의 대량 생산 공정 구축 및 제제화	<ul style="list-style-type: none"> - 유용 박테리오파지의 증식 및 정제 공정 개발함 - 유용 파지 유래 단백질의 소규모 제조 시스템 개발함. - 박테리오파지의 대규모 증식 및 정제 공정 개발 (증식액 기준 50 L, 순도 90% 이상) - 파지 유래 단백질의 대규모 발현 및 정제 공정 개발 (생산액 기준 10 L, 순도 90% 이상)
식중독균에 대한 항생제 대체 생물학적 제어기술 현장적용 및 산업화	<ul style="list-style-type: none"> - 생물학적 항균 소재 생산을 위한 박테리오파지 선정 및 특성 분석함. - 다양한 제형의 박테리오파지 및 파지 유래 단백질 개발함. - 신규 개발 산업용 항균 제제의 다양한 대상 모델에서의 식중독균 사멸능 확인 - 다양한 처리 조건을 기반으로 최적의 용균 효과를 보이는 적용 방법 선정 - 3-1 세부가 보유한 기기 및 기술을 바탕으로 박테리오파지 및 항균 단백질 제제의 lab scale 및 pilot scale 생산 조건 구축

3. 연구성과 활용실적 및 계획

가. 내성발생이 없는 독성인자 조절자 제어 선도물질

- 1) 식품에 적용하여 패혈증비브리오균을 제어하는 식품안전소재로 개발함.
- 2) 이 결과는 식중독 미생물 연구의 모델 시스템으로 활용할 수 있으며, 식중독 미생물 독성인자 발현 조절체계에 대한 이해를 증진하는데 활용함.
- 3) 항미생물 식품안전소재 산업의 경쟁력을 향상시키는 원천기술로 활용한 계획임.

나. 식품 맞춤형 천연 항균소재

- 1) 화장품의 생리활성이 향상된 활성 소재로 활용함.
- 2) 천연가용제를 이용한 기능성 식품소재, 의약품소재, 화장품소재의 수용화로 제형다양화하여 활용 범위를 확장할 예정임.

다. 식품내 위해인자 검출 기술

- 1) 기존 살균방법에 비하여 소독부산물을 발생시키지 않으며, 화학적 소독제가 아닌 식품첨가물 원료의 사용으로 추가 신규 기술 개발에 기초 정보로 활용할 계획임.
- 2) 참여 기업에 대한 지속적인 식품 안전 교육을 통해 국내 식품 산업의 안전 의식 성장에 기여할 계획.
- 3) 신종바이러스나 신종식중독균을 단시간내에 개발할 수 있는 인재 양성에 활용

라. Super-heated steam 등 신규 식품 살균 기술

- 1) 식품제조공정에 최적화된 미생물 살균 시스템의 설계 및 장치 제작 인력 수요가 증가할 것이므로 이분야 인력양성에 활용
- 2) Super-heated steam 및 HOCl 복합처리, 유기산 및 HOCl의 복합처리를 통해 식품 원료 및 식품 제조시설과 작업장에 적용 가능한 미생물 살균 기술 및 제품을 확보를 통해 생물학적 안전성을 확보하는데 기여할 것이다.
- 3) 병합살균시스템은 식품제조업체에서 식품을 생산하는 공정에서 식품에 존재하는 위해 미생물에 대해서 제어하기 위한 기존 살균 방식을 보완 및 대체하여 식품원료, 식품제조시설 및 작업장에 존재할 수 있는 포자형성균 또는 식중독균이 처리되지 않아 발생할 수 있는 식품의 생물학적 안전성을 근본적으로 해결 분야에 활용할 계획임.
- 4) 식품내 위해인자 저감화 기술
- 5) 잠재적 발암물질에 대한 정보를 산업계, 학계, 공공연구기관에 제공하여 식품안전성 향상에 적용. 퓨란에 대한 정확한 생성기작 연구는 향후 이 물질의 위해분석(Risk analysis)에 광범위한 자료를 제공하여 퓨란 저감화에 활용.
- 6) 국내 생산/유통되는 식품에서 퓨란, 바이오제닉 아민에 대한 과학적 근거 자료 제공으로 향후 식품 안전관리대책 마련 및 대국민 홍보에 활용.
- 7) 국내 식품 중 퓨란, 바이오제닉 아민 분석법을 확립함으로써 향후 시험법 제정 또는 재개정에 활용할 계획
- 8) 우리나라 식품의 퓨란, 바이오제닉 아민에 대한 분석법 개발로 향후 노출 수준 분석하여 식품 기준규격등의 재개정에 기본 자료를 제공함.

마. 박테리오파지 및 파지 유래 단백질 기반 제제의 활용

- 1) 박테리오파지 및 파지 유래 단백질 제제화 기술은 표준 제조 공정 최적화에 활용될 것임.
- 2) 우선 관계 법령에 근거하여 박테리오파지 첨가 사료를 생산, 제품화 가능성 여부를 타진 중이며, 우유, 햄슬라이스, 육계 제품 등 다양한 식품에서도 유효성을 확인하여 식품 첨가물 및 살균제로써의 활용가능성을 제시함.
- 3) 동물실험 등을 통해 그 효과를 확인하여 치료제로써의 활용 가능성도 제시할 수 있을 것이며 추후 산업화를 위한 전략을 마련한다면 식품산업 및 화장품 산업, 제약 산업 등에서 활용할 수 있을 것이라 기대.

	<p>법을 연구하고 산물의 특성을 확인하였으며, 생물전환기술로 항균 식품안전 항균 소재를 제조하고, 생산 조건을 최적화하는 연구를 진행하였고, 저열량 감미소재로서 항균특성을 가지는 난소화성 스테비올 올리고당의 생산, 개발 소재를 활용한 다양한 발효식품, 음료 등을 제조함.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 개발 소재들의 항균특성과 난수용성 기능소재의 수용화 특성을 활용하여 차별화된 발효 음료 혹은 식품을 제조하고, 항산화, 항균특성과 더불어 기능성을 연구함. • 연구결과는 12편의 SCI급 논문게재와 1편의 게재승인, 2편의 북챗터, 특허출원 21건, 특허등록 14건, 그리고 5명의 인력양성과 3건의 기술이전 실적을 얻음.
<p>③식중독균 검출 및 제어기술들의 제품화 및 상용화</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 후속1차년도에 식품제조가공업체를 선정하여 SHS+HOCl 병합처리 시스템을 적용하여 미생물 살균을 위한 최적 조건을 확립함. • 후속2차년도에는 식품품목별 특이도, 민감도 평가를 통해 multiplex real-time PCR 최적화 조건을 확립하였음. • 후속3차년도에는 유기산+HOCl 복합처리를 통해 Bacillus 포자를 제어할 수 있는 살균 시스템을 개발 및 현장적용 완료하여 당초 연구목표 대비 충분한 연구 성과를 달성하였음
<p>④식품 내 생물학적 위해 인자 검출 및 제어 기술의 현장 적용 및 산업화</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 후속1차년도에 신규 가열 및 비가열 기술을 이용하여 다양한 조합처리를 구성하고 최적 조합처리 조건을 확립함. • 후속2차년도에는 형광분석 및 전자현미경 분석을 통해 미생물 사멸 메커니즘을 규명하였음. • 후속3차년도에 Comsol multiphysics를 이용하여 각 기술의 시뮬레이션 예측 모델을 개발하는 등 당초 연구목표를 충분히 달성하였음
<p>⑤식중독균 제어를 위한 유용 소재의 대량 생산 공정 구축 및 제제화</p>	<ul style="list-style-type: none"> • (1차년도) 3-1 협동과제팀 보유 박테리오파지들 중 산업적으로 활용가치가 높은 박테리오파지 5종에 대해 소규모 증식 및 정제 공정 개발과 산업화에 적합한 박테리오파

	<p>지 기반 제형을 개발하였으며, 장기 보관 안정성 조사를 진행함.</p> <ul style="list-style-type: none"> • (2차년도) 3-1 협동과제팀 보유 파지 유래 단백질들 중 산업적으로 활용가치가 높은 파지 유래 단백질 3종에 대해 소규모 발현 및 정제 공정을 개발하였으며, 산업화에 적합한 파지 유래 단백질 기반 제형을 개발하고, 파지 유래 단백질의 단기 보관 안정성 조사 실시함. • (3차년도) 박테리오파지와 파지 유래 단백질의 의 대규모 증식 및 정제 공정을 개발하고, 3-1 협동과제팀에서 실시될 유효성 평가 시험에 필요한 시료 제조 및 공급함.
<p>⑥식중독균에 대한 항생제 대체 생물학적 제어기술 현장적용 및 산업화</p>	<ul style="list-style-type: none"> • (1차년도) 본 연구에서는 산업화용 신규 박테리오파지를 분리 선별하였으며, 숙주 용해능 분석, 염기서열 분석 등 특성 분석 진행하였음. • (2차년도) 이를 바탕으로 살모넬라 특이 파지 AP4와 포도상구균 항균 단백질(LysPALS21)을 개발하였으며, 산업 환경 적용 조건을 확립하고, 이들을 제형화함. • (3차년도) 개발된 제형의 박테리오파지 및 항균 단백질 기반 항균제를 적용하여 닭고기, 우유, 햄슬라이스 등 다양한 식품에서 그 효과를 확인함.

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기본지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SCI	비 SCI						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	10	6		4		6	500		6			36		15	22	6	22			
연구기간 내 달성실적	50	28		10	160	11	1579		11			71	6	109	43	13	32		13	3
달성율(%)	500	466		40		183	315		183			197		726	195	216	145			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	독성인자 발현제어 선도물질 유래 신개념 식품안전소재 도출 기술
②	생물전환기술을 이용한 식품 맞춤형 천연 향균 소재 생산 기술
③	Super-heated steam과 HOCl 병합 살균시스템의 최적화 및 제품화
④	식품품목별로 Multiplex Real-Time PCR kit
⑤	식품모델시스템을 활용한 식품의 가공·저장 중 유해물질 저감화 기술 개발
⑥	박테리오파지, 파지 유래 단백질의 산업적 제조 공정 scale-up 및 원료의 산업적 제조 공정 개발
⑦	다양한 제형의 박테리오파지 및 파지 유래 단백질을 이용한 생물학적 향균 소재

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술	v					v	v			
②의 기술	v					v	v			
③의 기술	v					v	v			
④의 기술	v					v	v			
⑤의 기술	v					v			v	
⑥의 기술		v				v	v			
⑦의 기술		v				v	v			

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	식품 안전성 분야에서는 좀 더 신속하고 정확한 식품 안전성 및 독성의 진단 및 평가방법을 제공해줄 것임. 또한 규명된 식품위해 인자의 위해기전에 바탕을 둔 새로운 제어기술 및 이론을 발전시키며, 기능성 식품소재의 안전성과 독성의 과학적인 검증 기술을 제공해줄 것임.
②의 기술	기존 살균법에 비해 식품의 안전 뿐 아니라 품질까지 향상시키는 기술 개발을 통해 식품 안전성을 확립해 줄 것임. 식품 안전성 복합 식품첨가물 개발 및 유해물질 생성기작 연구를 통해 이 물질에 대한 위해 분석에 광범위한 자료를 제공할 수 있을 것임.
③의 기술	식품제조업체 작업장 및 식품제조기기 표면에서의 미생물 안전성을 확보하기 위해 상용화/실용화 가능할 것으로 판단함. 이를 통해 더욱 안전한 식품을 제조할 수 있어 국민 건강을 지키는 생활안전 강화를 달성할 수 있을 것임.
④의 기술	품목별 분석 빈도가 높은 식중독균 조사를 통해 제품 조합을 구성하여 보다 활용도 높은 PCR kit를 개발하였고, PCR 반응이 저해될 수 있는 식품 내 미생물 분석에서도 효과적인 검출 기능을 보였음. 이를 통해 대규모 식중독 사고가 발생할 수 있는 단체급식에서 보다 효과적이고 다양한 병원성 미생물을 검출 할 수 있을 것임.
⑤의 기술	다양한 식품에서 잠재적 발암물질의 생성기작 연구를 통해 저감화 조건을 확립하여 최적화된 원부재로 database를 산업계, 학계, 공공연구기관에서 활용할 수 있을 것임. 또한, 푸란, 바이오제닉 아민 분석법 확립으로 향후 시험법 재정 또는 재개정이 가능함.
⑥의 기술	3-2 세부가 개발한 신규 항균제를 대량 생산하기 위해 scale-up 조건을 확립하고, 제조 공정을 개발함. 그 결과, 높은 수율로 항균제를 분리 정제하였으며, 병원균에 대한 항균력이 우수함을 확인하였음. 본 기술은 확보된 항균제의 최적 제형 개발 및 대량 제조 시스템에 적용할 수 있으며, 이를 통한 제품화 및 사업화에 유용하게 활용될 수 있음. 본 기술은 박테리오파지 및 파지 유래 항균 단백질 기반 제제화에 활용될 수 있고, 실제 현장 요구에 부합할 수 있는 맞춤형 제품을 생산하기 위한 기반 기술이 될 수 있음. 특히, 살모넬라균과 황색포도상구균에 효과적인 항균 물질에 본 기술을 적용하여 다양한 산업 분야에 활용 및 제품화가 가능할 것으로 기대됨.
⑦의 기술	본 연구진은 신규 개발한 엔도라이신과 박테리오파지를 우유, 닭고기, 햄슬라이스 등 다양한 식품에 처리하여 병원균이 억제되는 것을 확인하였으며, lab-scale에서의 대량 생산 조건을 확립하였음. 또한, 제형화된 항균 물질을 제품에 처리하여 그 억제효과를 확인하였음. 따라서, 각 제품에 맞는 제형을 결정하고, (주)인트론바이오테크놀로지와의 기술 이전을 통해 제품화 및 사업화 추진 중임. 본 연구의 기술은 항생제 내성 문제를 해결할 수 있는 방안을 제시함과 동시에 현장 적용을 진행하여 항생제 대체제로서 높은 가능성을 제시함. 또한, 사업화를 통해 항생제 대체제 시장에 진출할 수 있을 것으로 예상되며, 높은 경제적 수익을 창출할 수 있을 것을 기대됨.

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표																			
종료 1차년도		1					900	500	1			2							
종료 2차년도							1000	500											
종료 3차년도							1100	500											
종료 4차년도							500	500											
종료 5차년도							500	500											

[별첨 3]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	710012-3		
사업구분	농식품기술융합창의인재양성(연구지원)사업				
연구분야			과제구분	단위	
사업명	농식품기술융합창의인재양성(연구지원)사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	안전식품 소재와 기술의 최적화 및 식품산업 활용		과제유형	개발	
연구기관	서울대학교		연구책임자	최상호	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2017.09.01. ~2018.06.30.	813,000	79,000	892,000
	2차년도	2018.07.01. ~2019.04.30.	813,000	79,000	892,000
	3차년도	2019.05.01. ~2020.08.31.	1,299,000	125,400	1,424,400
	계		2,925,000	283,400	3,208,400
참여기업	(주)우리두, (주)세니젠, (주)인트론바이오테크놀로지				
상대국		상대국연구기관			

2. 평가일 : 2020. 08. 31.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
서울대학교	교수	최상호

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 최상호

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

확약	
----	--

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

아주 우수: 식품 안전성 관련 새로운 소재와 기술을 포함하고 있음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수)

우수: 식품 산업 현장에서 사용할 수 있음. 관련 분야 인력을 양성하여 국가 전체의 식품 안전 분야 수준 향상

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수)

우수: 현재 시판을 준비 중에 있는 소재와 기술이 있음

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수)

우수: SCI 논문, 등록 특허, 기술 이전 실적이 우수함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지식소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수)

우수: 다수의 SCI 논문, 다수의 특허가 있음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
독성인자 발현제어 선도물질 유래 신개념 식품안전소재 도출	20	100	<p>독성인자 발현제어를 위한 선도물질로써 CM2660을 선발하였으며 HlyU 제어 분자기전을 규명하였음.</p> <p>CM2660의 독성 억제 효능 적용 범위 확대 및 안전성 검증, 모델식품 굴 접촉 시 CM2660의 폐혈증 비브리오팀 독성 유전자 발현억제 효능 확인하였음.</p> <p>천연물인 우르솔산을 이용하여 물을 이용한 CM2660의 제형 개선함</p>
식품 맞춤형 천연 항균 소재 생산 최적화 및 적용	20	100	<p>천연물질을 기반으로 생물전환 기술을 이용하여 식품 맞춤형 항균소재를 개발하고 생산 조건을 최적화함.</p> <p>저열량 감미소재로서 항균특성을 가지는 난소화성 스테비올 올리고당의 생산, 개발 소재를 활용한 다양한 발효식품, 음료 등을 제조함.</p>
식중독균 검출 및 제어기술들의 제품화 및 상용화	20	100	<p>식중독균 검출하는 검출키트를 개발하였으며, 현장에서 사용할 수 있는 민감도를 획득함.</p> <p>식중독균 포자를 제어할 수 있는 살균시스템을 개발하고 제품화함.</p>
식품 내 생물학적 위해 인자 검출 및 제어기술의 현장 적용 및 산업화	10	100	<p>식품 내 생물학적 위해인자를 검출하는 조건을 확립하고 이를 현장적용함.</p> <p>신규 가열 및 비가열 기술을 이용하여 다양한 조합처리를 구성하고 최적 조합처리 조건을 확립함.</p> <p>후속3차년도에 Comsol multiphysics를 이용하여 각 기술의 시뮬레이션 예측 모델을 개발하는 등 당초 연구목표를 충분히 달성하였음</p>
식중독균 제어를 위한 유용 소재의 대량 생산 공정 구축 및 제제화	20	100	<p>산업적으로 활용가치가 높은 파지 유래 단백질을 선별하여 산업화 기반 제형을 마련하고, 유효성을 평가 시험을 평가하고 제제화함.</p>

식중독균에 대한 항생제 대체 생물학적 제어기술 현장적용 및 산업화	10	100	산업화용 신규 박테리오파지를 분리 선별하여 특성분석함. 황색도상구균 항균 단백질(LysPALS21)을 개발하였으며, 산업 환경 적용 조건을 확립하고, 이들을 제형화함. 모델 식품에 항균력을 확인함.
합계	100		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

안전식품 소재와 기술의 최적화를 하고 이를 식품산업에 활용하는 목표로 후속 3단계 연구를 수행하였음.

후속 3단계에서는 1, 2 단계에서 도출된 소재와 기술을 산업화를 위해서 최적화하고, 식품산업에 직접적으로 활용하는 것이다. 1핵심과제는 내성이 발생하지 않는 신개념의 항균물질인 CM2660을 개발했으며 이의 특성을 확인하고 식품에 적용이 알맞은 형태로 만들었으며, 천연물 유래 물질을 생물전환 기술을 이용하여 다수의 제품을 생산했습니다. 2핵심과제는 새로운 식품 위해인자 검출과 제어하는 기술을 개발하는 것이다. 이를 위해서 PCR기반의 고신뢰성 검출키트를 상용화했으며, 위해인자 저감화 연구를 수행하여 당초 목표를 달성했습니다. 3핵심은 항생제 대체 생물학적 제어기술 개발을 위해서 박테리오파지와 이의 유래 단백질인 엔도라이신을 산업적 수준으로 생산하고 제형화 하였습니다. 이 연구 과제를 통해 도출된 물질과 기술은 특허출원과 기술이전을 통해서 참여기업과 공동의 목표를 위해 이룩했습니다. 이러한 장기 연구를 수행하면서 학교와 기업간의 서로의 경험을 나누고 서로의 장점을 융합하여 식품 안전성 향상 기술을 개발을 효율적으로 할 수 있었습니다. 이 3단계 연구를 통해서 산학협력을 통해서 현장에서 필요한 기술을 가진 인력을 양성할 수 있었으며, 이 인력이 나아가 한국의 경제성장의 고급인력으로 성장할 수 있을 것으로 기대됩니다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구단은 새로운 기술 개발을 위한 연구 중심 연구단으로 다수의 연구논문을 내는데 중점을 두었습니다. 이를 수행하면서 융합적 사고를 지닌 고급 인력을 교육 배출해 왔습니다. 대부분의 결과는 국내에서 실현이 가능한 국내 인프라를 활용하였기 때문에 기술의 자립화를 이룩했습니다. 3단계 연구에서는 연구결과의 산업화에 중점을 두고 국내 기업과 더불어 연구를 수행하여 여러 기술이전과 산업화 실적을 냈습니다. 신규 화합물일 경우에는 이를 상용화하기 위해서는 여러 규정을 따라야 하는 어려움이 있습니다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

식품바이오융합연구소 산하 기관으로 편입되어 연구 결과에 기반을 둔 특허를 서울대 산학협력단과 협의 하에 기술이전을 하여 지속적인 자립화 노력을 할 것이다.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자(센터장)의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

특별한 보안성 검토가 필요 없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품기술융합창의인재양성사업 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품기술융합창의인재양성사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.