

연구과제 연차실적 · 계획서

과 제 명	초분광영상을 이용한 병원성미생물 및 유해물질 신속검출법 개발 및 농산물의 안전성 확보를 위한 현장 적용 연구			
총연구기간	2014년 8월 ~ 2019년 8월	당해연도 연구기간	2017년 8월 ~ 2018년 8월	
수행부서/ 세부수행부서	시험연구소 안전성분석과 (공동)	연구 책임자	직위	성명
			팀장	조현정
		참여 연구원	직위	성명
			주무관	홍지화
			과장	김동호
			팀장	문지영
			주무관	김성연
참여부서	미국 농무부 농업연구청 환경미생물 및 식품안전 실험실			
사업구분	단년도 () 다년도 (✓)	총 (5)개년 중 (4)차 연도		
연구결과 요약	<div>○ 식중독 균 검출법 개발을 위한 휴대용 라만 장비(hardware) 및 운영 software와 세균 수 counting을 위한 colony counter 장비 및 운영 software 개발</div> <div>○ 라만 신속분석법 전처리법 개발을 위한 미생물별 라만 분석 농도 세팅</div> <div>○ Agar 배지 위의 병원성미생물을 직접 검출하기 위한 라만장비 검출 조건 확립</div> <div>○ SERS(Nanoparticle, Substrate)를 이용한 병원성미생물 전처리 방법 개발과 Agar 배지 및 SERS를 이용한 병원균별 라만 스펙트럼 분석</div> <div>○ 라만 스펙트럼을 얻기 위한 SERS 선발용, 형광 보정된 스펙트럼 비교용 자동화 프로그램 개발</div>			

초분광영상을 이용한 병원성미생물 및 유해물질 신속검출법 개발

및 농산물의 안전성 확보를 위한 현장 적용 연구

1. 연구배경 및 목표

가. 연구배경

- 「식품공전」의 병원성미생물 분석법(생물학적 검출법)은 분석시간(5~7일)이 장시간 소요되고, 분석에 따른 인력 소요가 많아 농산물 중 병원성미생물 오염 시 신속한 대처에 어려움이 있음
 - 병원성미생물 오염에 따른 식중독 사고를 사전 예방하고, 오염 시 선제적 대응을 위한 신속한 분석법 개발 필요
- 미국의 농업연구청(ARS)과 초분광형광영상 및 라만분광영상을 이용한 병원성 미생물 및 유해물질 신속분석법 공동연구를 통한 원천기술 확보 및 사전 예방적 관리능력 강화

나. 연구목표

- 초분광 영상 기술을 이용한 농산물 중 식중독 유발 병원성 미생물 및 대사 산물의 신속 검출법 개발
 - 생산 및 유통 현장 적용을 위한 포터블 센싱 개발
 - 검출 감도 향상을 위한 최적 조건 개발
- 개발된 신속 검출법의 국내 농산물 현장 적용 연구 및 기존 검출법과의 비교 검증 및 상관관계 분석
- 최적화된 신속검출법 검사 절차 매뉴얼 작성

2. 연구내용 및 방법

가. 연구내용

1) 4차년도 연구계획 검토 및 관련 연구 기반 구축

- 미국 실험실의 생물안전등급(BSL, Biosafety Level) 규정 준수

- 미국 ARS 실험실 폐기물 처리 표준운영절차 준수

- 식중독균 신속검출법 개발을 위한 분석 기술 및 장비 검토

2) 휴대가 가능한 point scan 라만 분광분석 장비 및 운영 software 개발

- Point scan 라만 장비 hardware 개발

- Point scan 라만 장비 운영 software 개발

3) 병원성미생물 라만 분석용 스펙트럼 검출 프로그램 개발

- 표면증강 라만산란(SERS, Surface-enhanced Raman scattering) 선정용 프로그램 개발

- 형광 보정된 스펙트럼 비교용 프로그램 개발

4) Point scan 라만 분석을 이용한 병원성미생물 신속 검출방법 연구

- 라만 신속분석법 전처리법 개발을 위한 미생물별 라만 분석 농도 세팅

- Agar 배지 위의 병원성미생물을 직접 검출하기 위한 검출 조건 확립

- 표면증강 라만 산란(SERS, Surface-enhanced Raman scattering)을 이용한 병원성미생물 전처리 방법 개발

- Agar 배지 및 SERS를 이용한 병원균별 라만 스펙트럼 분석

5) 세균 수 확인을 위한 colony counter 장비 및 운영 software 개발

3. 결과 및 고찰

가. 4차년도 연구계획 검토 및 관련 연구 기반 구축

- 미국 실험실의 생물안전등급(BSL, Biosafety Level) 규정 준수

- (기존) BSL-1 → (변경) BSL-2

- 미국 ARS 실험실 폐기물 처리 표준운영절차 준수

- 식중독균 신속검출법 개발을 위한 분석 기술 및 장비 검토

- (당초계획) 상용화된 마이크로 라만 장비를 이용한 미생물 검출법 개발 →

- (변경계획) 라만 분광기를 직접 개발하여 미생물 검출법 개발 + 현장 활용성을 높이기 위한 세균 수 확인용 colony counter 장비 추가 개발

나. 휴대가 가능한 point scan* 라만 분광분석 장비 및 운영 software 개발

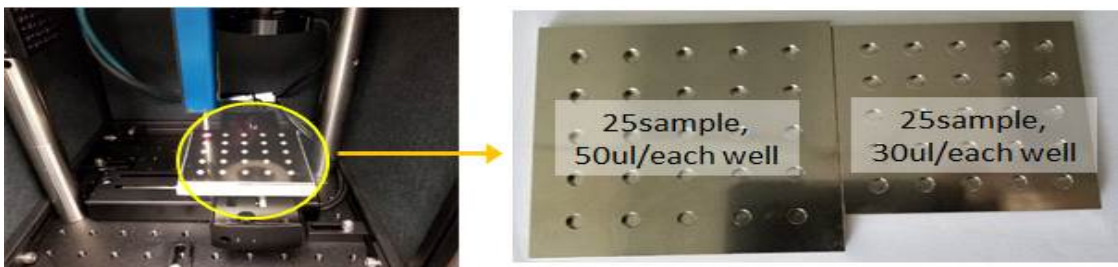
- * Single laser point로 샘플 표면에 single spot을 분석하는 방법으로 x와 y축에 의하여 scan이 이루어지며 pixel(pixel)단위로 스펙트럼을 얻는 방법

○ Point scan 라만 장비 hardware 개발

- 성인남성이 혼자 들고 옮길 수 있을 정도의 휴대성 높은 point scan 라만 장비를 개발(Dual-Band Spectroscopy & Imaging System)



- 휴대용 라만 장비의 샘플 자동분석(nickel plate well) 기반 구축



- 휴대용 point 라만 장비의 Calibration

○ Point scan 라만 장비 운영 software 개발

- Microsoft Windows 운영시스템에서 LabVIEW (National Instruments, Austin, TX, USA)를 기반으로 하여 라만 화상 분석을 위한 데이터 전송 기능을 갖춘 software를 개발
- 동기화, 카메라 조절, 데이터 획득, 샘플 이동 등의 기능을 수행

다. 병원성미생물 라만 분석용 스펙트럼 검출 프로그램 개발

○ 표면증강 라만산란(SERS, Surface-enhanced Raman scattering) 선정용 프로그램 개발

- MATLAB 상용 프로그램(MathWorks, R2012a)을 기반으로 라만 피크를 얻기

위한 수식 명령어를 미리 입력하여 라만 분석에 간편하고 쉽게 활용할 수 있는 프로그램임

○ 형광 보정된 스펙트럼 비교용 프로그램 개발

- SERS(Nanoparticle & Substrate)를 선별하기 위한 것이 아닌 라만 스펙트럼의 파장을 비교 분석하기 위한 프로그램

라. Point scan 라만 분석을 이용한 병원성미생물 신속 검출방법 연구

○ 라만 신속분석법 전처리법 개발을 위한 미생물별 라만 분석 농도 세팅

- 목적: 분석대상 세균의 농도를 일정하게 조정하고, 분석방법 상의 편의를 위하여 세균 7종* strain에 대한 농도별 회귀식 작성

* *Salmonella* spp. (CC5317), *Listeria monocytogenes* (CC9202), *E. coli* (CC9487, CC9490), *Staphylococcus aureus* (CC8923), *Bacillus cereus* (ATCC13061), *Bacillus thuringiensis* (ATCC33679)

- 방법: 탁도계와 세균의 실제 농도(평균 계수법을 통한 확인)와의 상관관계를 이용하여 농도 조정
- 결과: 농도별 회귀식 작성을 통하여 탁도계 수치를 조정하여 분석 방법의 편의성 제고

○ Agar 배지 위의 병원성미생물을 직접 검출하기 위한 검출 조건 확립

- 목적: 라만 분석을 이용한 agar 배지 균의 직접 검출법을 개발하기 위하여 배지에 자란 세균의 라만 검출 조건 확립
- 방법: 7종의 균을 선택배지에 도말하여 레이저 파장(785nm)의 파워 범위(400~1500 mW)를 조정하여 균별 적정 레이저 세기 및 레이저 노출 시간(exposure time) 설정
- 결과: 선택배지에 자란 균은 레이저 빛을 주었을 때 강한 빛에 의한 손상 등이 발생될 수 있어 레이저 세기 구간(400~1500 mW)을 조정하면서 시료가 타지 않고 안정적으로 분석 될 수 있는 조건 확립

○ 표면증강 라만산란(SERS, Surface-enhanced Raman scattering)을 이용한 병원성미생물 전처리 방법 개발

- 목적: Nanoparticle과 substrate를 이용하여 라만분석이 가능하도록 전처리 조건 확립
- 방법: SERS 전처리 세부 프로토콜 및 장비조건 설정
- 결과: 현탁액을 조제하여 SERS 시료를 준비한 경우에는 시료가 액체 상태 이므로 장비 조건 재설정 실시

○ Agar 배지 및 SERS를 이용한 병원균별 라만 스펙트럼 분석

〈Agar 배지 등 Non-SERS 라만 스펙트럼 분석〉

- Agar 배지에 자란 세균의 라만 스펙트럼 결과
 - 785nm 파장의 레이저를 이용하여 분석한 각 균의 라만 peak는 화학물질에 대한 라만 연구의 특이적인 라만 피크와 비교하였을 때 매우 약하게 나타났고 각 세균의 종류에 따른 특정 피크의 유무를 확인할 수 없었음
 - 니켈 plate 위의 세균의 라만 스펙트럼 결과
 - 니켈 플레이트로 옮겨서 균을 분석하는 방법은 시간이 오래 걸리고 일이 번거롭기에 전처리 방법으로 효과적이지 않은 것으로 사료됨
 - 세균 현탁액의 라만 스펙트럼 결과
 - 균별 농도가 약 1×10^8 로 높음에도 불구하고 세균의 라만 피크 intensity는 7종의 세균 간에 뚜렷한 강도 차이를 보이지 않았음
- ⇒ 병원균 자체 시료만으로 라만 분석을 수행하였을 때는 강도 높은 라만 피크를 얻기가 어려웠고 이를 통한 세균의 판별도 어려운 것으로 나타남

〈SERS 라만 스펙트럼 분석〉

- Nanoparticle 선발 결과
 - SERS 효과를 나타내는 nanoparticle을 선발하였지만 7가지 세균의 라만 shift 패턴에서 각 균별 특이적인 피크는 나타나지 않았음
 - 따라서 선발된 nanoparticle에 균별 특이적인 항체를 붙이는 기술을 개발하여 이를 통한 검출법 개발 연구가 지속적으로 수행되어야 할 것으로 판단되어 SERS-tags 제작 중에 있음

- Substrate 선발 결과

→ SERS 효과를 나타내는 substrate을 선발하였지만 7가지 세균의 라만 shift 패턴에서 각 균별 특이적인 피크는 나타나지 않았음.

→ 따라서 본 연구에 활용한 기관으로 7종 세균의 검출은 어려운 것으로 판단되며 신규 기관에 대한 추가 검토 실험을 현재 진행 중에 있음

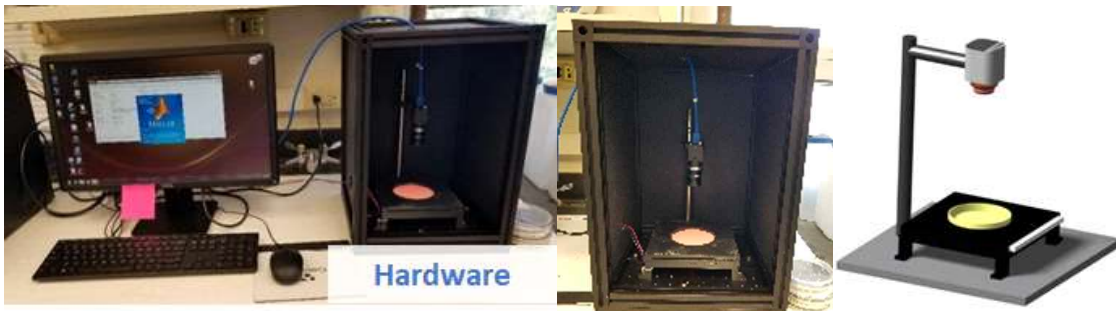
마. 세균 수 확인을 위한 colony counter 장비 및 운영 software 개발

○ 광원: LED 4 pannel (7×7 cm/1 pannel), Agar 전체를 커버함

○ 카메라: CCD 기반 디지털 카메라, 1200만 화소(pixel)

○ 소프트웨어: MATLAB 기반으로 colony 검출을 위한 알고리즘 개발

○ 차별성: 빛의 색과 밝기 선택 가능 → 선택배지 별로 LED 색상 설정 후 카운팅이 가능



4. 기대성과 및 활용방안

가. 기대성과

○ 병원성 미생물 및 오염물질 신속 검출 초분광 검출장비 개발 및 분석법 개발

○ 생산단계 및 유통단계 농산물 중 병원성미생물 및 유해물질 검출을 위한 신속 스크리닝 분석법으로 활용

- 농산물의 생산환경 및 유통단계에서 1차적으로 오염이 의심되는 농산물을 신속하게 현장에서 검출하고 유통을 차단함으로써 농산물 안전성 확보

- 농관원 안전성 조사 모니터링을 위한 시료채취 단계에 활용함으로써 불필요한

시료 채취를 줄여 분석에 소요되는 예산 및 노동력을 절감

- 농산물 단순처리가공업체, 식품가공업체, 학교급식 납품업체 등 미생물오염 차단이 신속히 필요한 현장에서 보급하여 활용

나. 활용방안

- 초분광 영상 분석기술 확보로 농산물 중 유해물질 분석, 품질관리, 원산지 식별 등에 활용 연구
- 최신 유해미생물 및 유해물질 검출기술 공동 개발로 원천기술 공동 특허
- 한·미 정부기관 간 “유해미생물·유해물질 최신검출기술” 공동개발로 원천기술 공동 특허 획득
- 개발된 기술 및 연구 결과는 해외 공동 논문 발표