(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0081983
(43) 공개일자 2024년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/553 (2006.01) *G01N 21/31* (2006.01)
G01N 21/78 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
G01N 33/548 (2006.01) *G01N 33/569* (2017.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/553 (2013.01)
G01N 21/31 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0165815
(22) 출원일자 2022년12월01일
심사청구일자 2022년12월01일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김영록
경기도 수원시 영통구 반달로35번길 30, 1동 1938호(영통동, 영통역 아이파크)
박지원
경기도 김포시 풍무로68번길 39, 108동 1503호(풍무동, 한화유로메트로아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **TEMPO로 산화시킨 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자 및 이를 이용한 식중독균 검출 방법**

(57) 요 약

본 발명은 TEMPO(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl)로 산화시킨 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자 및 히알루론산 및 자기영동법을 사용하여 표적 식중독균을 정확하고, 효율적으로 검출하는 방법에 관한 것으로, 상기 산화철 나노입자가 기존에 표적 균주 검출에 사용되는 산화철 나노입자보다 표적 식중독을 더 효과적으로 검출할 수 있음을 확인함으로써, 식중독균 검출 방법으로서 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 21/78 (2013.01)
G01N 33/54346 (2013.01)
G01N 33/548 (2013.01)
G01N 33/56911 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
(72) 발명자
강동국
서울특별시 송파구 동남로 225, 102동 1102호(가락동, 래미안파크팰리스)
유상묵
경기도 수원시 팔달구 권광로 138, 1905호(인계동, 선경리빙프라자)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395072507
과제번호	PJ014238032022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	농축산물생산현장의안전관리기술개발
연구과제명	축산물 생산단계 중 위해요소 오염 저감기술 개발(3공동)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

TEMPO(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl)로 산화시킨 덱스트린(dextrin)이 코팅된 산화철 나노입자.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 나노입자는 과산화효소(peroxidase) 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 나노입자.

청구항 3

2가 또는 3가 철 이온 및 덱스트린(dextrin)을 녹인 수용액에 암모니아수를 처리하면서 초음파 처리하여 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자를 제조하는 단계(제1단계); 및

상기 제1단계의 산화철 나노입자를 TEMPO(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl) 및 차아염소산나트륨과 혼합하고, 초음파 처리하는 단계(제2단계)를 포함하는, TEMPO로 산화시킨 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자 제조 방법.

청구항 4

청구항 1의 TEMPO로 산화시킨 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자에 균에 특이적으로 결합하는 항체를 결합시키는 단계(제1단계);

대상체로부터 균을 획득하는 단계(제2단계);

상기 제1단계의 항체가 결합된 산화철 나노입자를 히알루론산과 혼합하고, 혼합한 용액에 상기 제2단계에서 획득한 균을 반응시켜 산화철 나노입자 및 균으로 구성된 복합체를 형성시키는 단계(제3단계);

자기영동법을 통해 상기 제3단계의 복합체를 분리하는 단계(제4단계); 및

상기 제4단계의 복합체에 과산화수소 및 TMB(3,3’,5,5’-Tetramethylbenzidine)를 혼합하고, 발색을 유도한 후, 흡광도를 측정하여 비색 반응을 확인하는 단계(제5단계)를 포함하는, 식중독균 검출 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 식중독균은 콜레라균(*Vibrio cholerae*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아균(*Listeria monocytogenes*), 세레우스균(*Bacillus cereus*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 대장균 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 식중독균 검출 방법.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 제5단계는 비색 반응을 정량 분석하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 식중독균 검출 방법.

청구항 7

청구항 4의 식중독균 검출 방법을 통해 식중독균을 검출하는 단계(제1단계); 및

대조군과 비교해서, 검출되는 식중독균이 많은 경우, 상기 식중독균에 의한 질환이 발생했거나, 발생할 가능성이 높다고 판단하는 단계(제2단계)를 포함하는, 식중독균에 의한 질환 진단 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 식중독균에 의한 질환은 피부감염, 식중독, 중이염, 방광염, 복막염, 요로감염, 유방염, 폐렴, 심내막염, 결막염, 관절염, 자궁내막염, 선역, 패혈증 및 여드름으로 이루어진 군에서 선택된 하나

이상인 것을 특징으로 하는 진단 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 TEMPO(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl)로 산화시킨 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자 및 이를 이용한 식중독균 검출 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 공중위생과 관련된 생물학적 위해요소 중 식중독균은 식품 제조공정 중 다양한 방법으로 살균 처리를 함에도 불구하고, 꾸준히 식중독과 질병을 야기하고 있다. 이에 식중독으로 인한 사회적 및 경제적 피해를 최소화하기 위해, 식품 내 존재하는 식중독균을 단시간 내에 현장에서 고감도로 진단하는 방법의 수요는 지속적으로 증가하는 추세이다. 현재 대표적으로 병원성 미생물을 검출하는 방법으로는 식품을 균질화 후 일정량을 취하여 표준한천평판배지에 분주 및 배양하여 생성된 집락수를 바탕으로 식품 오염도를 평가하는 방법이 있다. 하지만, 이는 배양 시간이 오래 걸리는 단점으로 인해 현장 식중독균 진단에는 제약이 있다. 이를 개선하기 위한 방안으로 자성분리법을 적용하여 균질화한 식품 용액 내 존재하는 박테리아를 분리 및 농축하여 면역검사법, 분광법, 전기화학법, 자기영동법 등을 복합 적용하여 검출을 시도하고 있지만, 균질화기, 원심분리기 등 장비 사용이 필수적이라 현장에서 비전문가가 간단하게 식중독균을 검출하는데 한계가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0003] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 제10-2022-0031255호(2022.03.11. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 TEMPO(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl)로 산화시킨 덱스트린(dextrin)이 코팅된 산화철 나노입자를 제공하는 것이다.

[0005] 본 발명의 다른 목적은 2가 또는 3가 철 이온 및 덱스트린(dextrin)을 녹인 수용액에 암모니아수를 처리하면서 초음파 처리하여 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자를 제조하는 단계(제1단계); 및 상기 제1단계의 산화철 나노입자를 TEMPO(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl) 및 차아염소산나트륨과 혼합하고, 초음파 처리하는 단계(제2단계)를 포함하는, TEMPO로 산화시킨 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자 제조방법을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 TEMPO(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl)로 산화시킨 덱스트린(dextrin)이 코팅된 산화철 나노입자에 균에 특이적으로 결합하는 항체를 결합시키는 단계(제1단계); 대상체로부터 균을 획득하는 단계(제2단계); 상기 제1단계의 항체가 결합된 산화철 나노입자를 히알루론산과 혼합하고, 혼합한 용액에 상기 제2단계에서 획득한 균을 반응시켜 산화철 나노입자 및 균으로 구성된 복합체를 형성시키는 단계(제3단계); 자기영동법을 통해 상기 제3단계의 복합체를 분리하는 단계(제4단계); 및 상기 제4단계의 복합체에 과산화수소 및 TMB(3,3’,5,5’-Tetramethylbenzidine)를 혼합하고, 발색을 유도한 후, 흡광도를 측정하여 비색 반응을 확인하는 단계(제5단계)를 포함하는, 식중독균 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 식중독균 검출 방법을 통해 식중독균을 검출하는 단계(제1단계); 및 대조군과 비교해서, 검출되는 식중독균이 많은 경우, 상기 식중독균에 의한 질환이 발생했거나, 발생할 가능성이 높다고 판단하는 단계(제2단계)를 포함하는, 식중독균에 의한 질환 진단 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 TEMPO(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl)로 산화시킨 덱스트린(dextrin)이 코팅된 산화철 나노입자를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 2가 또는 3가 철 이온 및 덱스트린(dextrin)을 녹인 수용액에 암모니아수를 처리하면서 초음파 처리하여 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자를 제조하는 단계(제1단계); 및 상기 제1단계의 산화철 나노입자를 TEMPO(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl) 및 차아염소산나트륨과 혼합하고, 초음파 처리하는 단계(제2단계)를 포함하는, TEMPO로 산화시킨 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자 제조방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 TEMPO(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl)로 산화시킨 덱스트린(dextrin)이 코팅된 산화철 나노입자에 균에 특이적으로 결합하는 항체를 결합시키는 단계(제1단계); 대상체로부터 균을 획득하는 단계(제2단계); 상기 제1단계의 항체가 결합된 산화철 나노입자를 히알루론산과 혼합하고, 혼합한 용액에 상기 제2단계에서 획득한 균을 반응시켜 산화철 나노입자 및 균으로 구성된 복합체를 형성시키는 단계(제3단계); 자기영동법을 통해 상기 제3단계의 복합체를 분리하는 단계(제4단계); 및 상기 제4단계의 복합체에 과산화수소 및 TMB(3,3’,5,5’-Tetramethylbenzidine)를 혼합하고, 발색을 유도한 후, 흡광도를 측정하여 비색 반응을 확인하는 단계(제5단계)를 포함하는, 식중독균 검출 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 식중독균 검출 방법을 통해 식중독균을 검출하는 단계(제1단계); 및 대조군과 비교해서, 검출되는 식중독균이 많은 경우, 상기 식중독균에 의한 질환이 발생했거나, 발생할 가능성이 높다고 판단하는 단계(제2단계)를 포함하는, 식중독균에 의한 질환 진단 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 TEMPO(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl)로 산화시킨 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자 및 히알루론산 및 자기영동법을 사용하여 표적 식중독균을 정확하고, 효율적으로 검출하는 방법에 관한 것으로, 상기 산화철 나노입자가 기존에 표적 균주 검출에 사용되는 산화철 나노입자보다 표적 식중독균을 더 효과적으로 검출할 수 있음을 확인함으로써, 식중독균 검출 방법으로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 식품 표면에서 식중독균 분리, 자기영동 및 발색 반응을 하나의 튜브에서 수행하고, 스마트폰 어플리케이션을 이용한 정량 분석에 대한 모식도이다.

도 2는 산화철 나노입자(Pristine IONPs), 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자(Dex@IONPs) 및 TEMPO로 산화시킨 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자(Ox-Dex@IONPs)의 제작 과정 및 Ox-Dex@IONPs의 특성을 분석한 결과를 나타낸다. 구체적으로, 도 2a는 상기 3종의 산화철 나노입자의 제작 모식도이고, 도 2b~2e는 각각 상기 3종의 산화철 나노입자의 표면 전하(zeta potential), 유체역학적 직경(hydrodynamic diameter), 다분산 지수(poly-diversity index, PDI) 및 수용액 속에서의 분산(침전) 정도 분석 결과를 나타낸다.

도 3은 균 획득 방법에 있어서, 스토마커 방식 및 면봉 방식의 균 회수율을 비교 및 분석한 결과를 나타낸다. 구체적으로, 도 3a는 식품 표면에서 면봉으로 획득한 균을 히알루론산 용액에서 탈리하는 과정을 나타내는 모식도이고, 도 3b는 스토마커 방식 및 면봉 방식을 통해 획득한 균의 균 회수율을 비교 및 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 산화철 나노입자(Pristine IONPs), 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자(Dex@IONPs) 및 TEMPO로 산화시킨 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자(Ox-Dex@IONPs)의 과산화효소 활성을 비교 및 분석한 결과이다. 구체적으로, 도 4a는 상기 3종의 산화철 나노입자에 의해 산화된 TMB 용액의 흡광도, 도 4b는 652nm에서의 흡광도 및 용액을 담고있는 튜브, 도 4c 및 4d는 Dex@IONPs 및 Ox-Dex@IONPs의 POD(peroxidase like activity) 효과를 각각 TMB 및 과산화수소(H_2O_2)에 대한 미카엘리스-멘텐식으로 비교 및 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 TEMPO로 산화시킨 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자(Ox-Dex@IONPs)를 이용하여 표적 식중독균 검출 과정을 나타낸다. 구체적으로, 히알루론산 용액에 면봉으로 획득한 균을 탈리 후, 산화철 나노입자를 넣어 표적균과 결합체를 형성하고(a), 자기영동법을 통해 표적균과 결합한 산화철 나노입자 복합체를 선택적으로 분리 및 상층액 제거를 통해 결합하지 않은 나머지 산화철 나노입자를 제거하고(b~c), TMB 용액을 추가하고 10분 동안 발색반응을 유도하고(d), 튜브를 뒤집어 뚜껑에 있는 페이퍼 디스크에 비색신호를 집약하였다(e~f).

도 6은 TEMPO로 산화시킨 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자(Ox-Dex@IONPs)를 이용한 표적 식중독균(*E.coli* O157:H7)에 대한 균 포집률을 분석한 결과이다. 구체적으로, 도 6a는 상기 표적 식중독균에 대한 농도별 포집률, 도 6b는 표적 식중독균 및 비표적 식중독균의 포집률을 비교 및 분석한 결과, 도 6c는 자기영동법 및 발색 반응을 통한 표적 식중독균을 정량분석한 결과, 도 6d는 표적 식중독균 및 비표적 식중독균의 비색 값을

비교 및 분석한 결과를 나타낸다.

도 7은 실제 식품(소시지)에서 TEMPO로 산화시킨 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자(Ox-Dex@IONPs)을 이용한 표적 식중독균 검출이 가능한지 확인한 결과를 나타낸다. 구체적으로, 도 7a는 소시지에 표적 식중독균(*E.coli* 0157:H7)을 인위적으로 접종한 후, 표적 식중독균 검출 결과, 도 7b는 비색 측정 스마트폰 어플리케이션을 이용한 정량분석 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0016] 본 발명은 TEMPO(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl)로 산화시킨 덱스트린(dextrin)이 코팅된 산화철 나노입자를 제공한다.

[0017] 상기 나노입자는 과산화효소(peroxidase) 활성을 나타낼 수 있다.

[0018] 본 발명에서 "나노입자"는 일반적으로 지름이 100nm 이하인 입자를 의미한다.

[0019] 또한, 본 발명은 2가 또는 3가 철 이온 및 덱스트린(dextrin)을 녹인 수용액에 암모니아수를 처리하면서 초음파 처리하여 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자를 제조하는 단계(제1단계); 및 상기 제1단계의 산화철 나노입자를 TEMPO(2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl) 및 차아염소산나트륨과 혼합하고, 초음파 처리하는 단계(제2단계)를 포함하는, TEMPO로 산화시킨 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자 제조방법을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 TEMPO로 산화시킨 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자에 균에 특이적으로 결합하는 항체를 결합시키는 단계(제1단계); 대상체로부터 균을 획득하는 단계(제2단계); 상기 제1단계의 항체가 결합된 산화철 나노입자를 히알루론산과 혼합하고, 혼합한 용액에 상기 제2단계에서 획득한 균을 반응시켜 산화철 나노입자 및 균으로 구성된 복합체를 형성시키는 단계(제3단계); 자기영동법을 통해 상기 제3단계의 복합체를 분리하는 단계(제4단계); 및 상기 제4단계의 복합체에 과산화수소 및 TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)를 혼합하고, 발색을 유도한 후, 흡광도를 측정하여 비색 반응을 확인하는 단계(제5단계)를 포함하는, 식중독균 검출 방법을 제공한다.

[0022] 상기 식중독균은 콜레라균(*Vibrio cholerae*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아균(*Listeria monocytogenes*), 세레우스균(*Bacillus cereus*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 대장균 0157:H7(*Escherichia coli* 0157:H7)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 상기 제5단계는 비색 반응을 정량 분석하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0024] 상기 히알루론산은 점도가 높고, 음전하를 띠기 때문에, 획득한 균을 효과적으로 탈리시켜 채취용 도구에 균이 재결합하는 것을 억제할 수 있고, 균과 결합한 산화철 나노입자와 균과 결합하지 않은 산화철 나노입자의 이동속도에 차이를 주는 환경을 조성하여 균-산화철 나노입자 복합체를 선택적으로 분리 및 농축할 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 식중독균 검출 방법을 통해 식중독균을 검출하는 단계(제1단계); 및 대조군과 비교해서, 검출되는 식중독균이 많은 경우, 상기 식중독균에 의한 질환이 발생했거나, 발생할 가능성이 높다고 판단하는 단계(제2단계)를 포함하는, 식중독균에 의한 질환 진단 방법을 제공한다.

[0027] 상기 식중독균에 의한 질환은 피부감염, 식중독, 중이염, 방광염, 복막염, 요로감염, 유방염, 폐렴, 심내막염, 결막염, 관절염, 자궁내막염, 선역, 패혈증 및 여드름으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명에서 상기 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 대상(subject)의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 대상이 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상의 예후(prognosis; 예컨대, 식중독균에 의한 질환 치료에 대한 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics; 예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다. 본 발명의 목적상, 상기 진단은 상기한 질환의 발병 여부 또는 발병 가능성(위험성)을 확인하는 것이다.

[0030] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0032] **[실험예 1] 나노입자 제조**

[0033] 1-1. 산화철 나노입자 제조

[0034] 철 이온(Fe^{2+} 40mM 및 Fe^{3+} 80mM)을 2차 증류수(double distilled water; 이하 DDW라 함) 20mL에 녹이고, 상기 용액을 초음파 프로브(ultrasound probe, Q500 초음파기)를 이용하여 20%의 진폭으로 1분 30초 동안 10초의 간격과 10초의 파쇄주기로 초음파 처리하는 동안, 70%(v/v) 암모니아수(Ammonium hydroxide) 1mL를 천천히 넣어주었다. 그 후, 90℃ 항온 수조(water bath)에 30분 동안 처리하고, 에탄올 및 DDW로 5번씩 세척(washing)하였다. 그 후, 초음파 프로브(ultrasound probe, Q500 초음파기)를 이용하여 20%의 진폭으로 1분 30초 동안 10초의 간격과 10초의 파쇄주기로 초음파 처리하여 산화철 나노입자(Pristine IONPs)를 제조하였다.

[0036] 1-2. 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자 제조

[0037] 철 이온(Fe^{2+} 40mM, Fe^{3+} 80mM) 및 덱스트린(dextrin) 150mg을 DDW 20mL에 녹이고, 초음파 프로브(ultrasound probe, Q500 초음파기)를 이용하여 20%의 진폭으로 1분 30초 동안 10초의 간격과 10초의 파쇄주기로 초음파 처리하는 동안, 70%(v/v) 암모니아수 1mL를 천천히 넣어주었다. 그 후, 90℃ 항온 수조(water bath)에 30분 동안 처리하고, 에탄올 및 DDW로 5번씩 세척(washing)하였다. 그 후, 초음파 프로브(ultrasound probe, Q500 초음파기)를 이용하여 20%의 진폭으로 1분 30초동안 10초의 간격과 10초의 파쇄주기로 초음파 처리하여 도 2a에 나타난 바와 같이, 덱스트린이 고정된 산화철 나노입자(이하 Dex@IONPs라 함)를 제조하였다.

[0039] 1-3. TEMPO로 산화시킨 덱스트린이 코팅된 산화철 나노입자 제조

[0040] 템포 0.1%, 차아염소산나트륨(NaClO) 1% 및 Dex@IONPs 10mg/mL를 혼합한 용액을 만들고, 로테이터(rotator)에 4℃에서 12시간 동안 반응시킨 후, DDW로 3번 세척하였다. 그 후, 초음파 프로브(ultrasound probe, Q500 초음파기)를 이용하여 20%의 진폭으로 1분 30초 동안 10초의 간격과 10초의 파쇄주기로 초음파 처리하여도 2a에 나타난 바와 같이, 템포(TEMPO; 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl)로 산화시킨 Dex@IONPs(이하 Ox-Dex@IONPs라 함)을 제조하였다.

[0042] **[실시예 1] 균 획득방법 분석**

[0043] 여러 가지 균 획득방법 중 가장 효율적인 획득방법을 확인하기 위해, 스토마커 방식 및 면봉 방식으로 획득한 균의 회수율을 비교하였다.

[0044] 스토마커 방식의 경우, 소시지 10g에 대장균 O157:H7(*E.coli* O157:H7) 일정량(1, 10 및 10^2 CFU/mL)을 인위적으로 접종하고, 스토마커 멸균백에 90mL의 PBS(Phosphate Buffer Saline, 1X)와 함께 넣어 균질화시켰다. 시험용액 100㎕를 대장균 O157:H7 판별용 배지에 분주하여 37℃에서 24시간 배양하고, 세균 집락수를 계산하였다.

[0045] 면봉 방식의 경우, 도 3a에 나타난 바와 같이, 소시지 10g에 대장균 O157:H7 일정량(1, 10 및 10^2 CFU/mL)을 인위적으로 접종하였다. 면봉으로 균을 채취하기 전, Tween 20 0.1% 용액을 100㎕ 분주하여 소시지 표면과 균 사이의 결합력을 감소시켜 탈리 효율을 증진시켰다. 그 후, 면봉으로 상하좌우 10회씩 소시지 표면을 쓸고, 히알루론산 용액 1mL에 면봉을 넣고, 위아래로 10회 흔들어 채취한 균을 면봉으로부터 탈리시켰다. 시험용액 100㎕를 대장균 O157:H7 판별용 배지에 분주하여 37℃에서 24시간 배양하고, 세균 집락수를 계산하였다.

[0046] 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이, 스토마커 방식은 식품에 10^2 CFU/mL 이하 저농도로 존재하는 균을 회수하

지 못한 반면, 면봉 방식은 10 ~ 10^2 CFU/mL 농도에서 모두 70% 이상의 회수율을 나타내는 것을 확인하였다.

[0048] **[실시예 2] Ox-Dex@IONPs의 특성 분석**

[0049] 상기 실험예 1에서 제조한 Ox-Dex@IONPs의 특성(표면 전하, 유체학적 직경, 다분산 지수 및 수용액 내에서 침전 정도)을 확인하기 위해, 상기 나노입자 0.1mg/mL을 동적 광산란(DLS, Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK)을 이용해서 상기 특성을 분석하였다.

[0050] 그 결과, 표면 전하의 경우, 도 2b에 나타난 바와 같이, Ox-Dex@IONPs는 덱스트린 내 6번 탄소에 치환된 카르복실기의 존재로 인해(하이드록실기->카르복실기로 치환), 강한 음전하(-33mV)를 나타냈고, 입체 안정성(steric stabilization) 및 정전기력 반발력(electrostatic repulsion)이 높아지는 것을 확인하였다. 또한, 도 2c에 나타난 바와 같이, Ox-Dex@IONPs의 분산성이 증진되어 유체역학적 직경은 220nm로 작아졌고, 도 2d에 나타난 바와 같이, 다분산지수도 낮아지는 것을 확인하였다(PDI<0.1). 분산성을 육안으로 확인하기 위해, 시간을 두고 나노입자용액을 관찰한 결과, 도 2e에 나타난 바와 같이, 분산성이 낮은 산화철 나노입자(Pristine IONPs=IONPs)는 쉽게 침전되는 반면, Ox-Dex@IONPs는 쉽게 침전되지 않고 잘 분산되어 있는 것을 확인하였다.

[0052] **[실시예 3] 과산화효소 활성 분석**

[0053] 상기 실험예 1에서 제조한 3종의 산화철 나노입자의 과산화효소 활성을 비교하기 위해, 비색 스펙트럼 및 나노입자 반응속도 분석을 수행하였다. 비색 스펙트럼 분석의 경우, 산화철 나노입자는 과산화효소와 같은 촉매 특성을 가지고 있어 과산화수소가 존재할 시, TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)를 산화시켜, 무색에서 청색을 띠게 하는 특성을 이용하였다. 나노입자 0.1mg에 500μL의 4M 과산화수소 및 500μL의 4mM TMB 용액을 섞어 10분 동안 발색을 일으킨 후, 96 웰 플레이트에 넣고 그 흡광도를 자외선-가시광선 분광광도계(ultraviolet-visible spectrophotometer; UV-vis)(Infinite 200PRO, Tecan, Switzerland)로 측정하였다.

[0054] 반응속도 분석의 경우, 나노입자 0.1mg을 100μL의 과산화수소(0~1.5M) 및 100μL의 TMB(0~1.5mM) 용액과 섞어 96 웰 플레이트에 넣고 10분 동안 발색 반응의 변화를 652nm에서 자외선-가시광선 분광광도계(Infinite 200PRO, Tecan, Switzerland)을 이용해서 확인한 후, 하기 수학식 1을 이용하여 나노입자 반응속도를 계산하였다. The steady-state reaction rates는 kinetics curve의 직선 범위에서 도출하였고, reaction rates는 미카엘리스-멘텐 식을 이용하여 계산하였다. 최대반응속도(V_{max}) 및 미카엘리스-멘텐상수(K_m)는 Line Weaver-Burk plot을 이용하여 계산하였다. 이 때, V_0는 초기 속도, [S]는 기질의 농도를 의미하고, K_m은 기질과의 결합 친화도를 나타내는 지수로, 값이 낮을수록 기질과의 친화성이 높음을 의미하며, V_{max}은 기질에 대한 반응속도를 나타내는 지수로, 값이 커질수록 기질과의 친화성이 높음을 의미한다.

[0055] **[수학식 1]**

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

[0056]

[0057] 그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이, TMB 용액에 상기 3종의 산화철 나노입자를 각각 넣었을 때의 흡광도는 Ox-Dex@IONPs, Dex@IONPs 및 Pristine IONPs 순으로 높았고, 도 4b에 나타난 바와 같이, 652nm에서 과산화효소 활성은 Ox-Dex@IONPs, Dex@IONPs 및 Pristine IONPs 순으로 우수한 것을 확인하였다. 또한, 표 1에 나타난 바와 같이, Ox-Dex@IONPs는 Dex@IONPs보다 과산화수소에 대한 K_m 값이 약 1.7배 낮고, V_{max} 값이 약 10배 높은 것을 확인하였다. 결과적으로, Ox-Dex@IONPs의 카르복실기가 과산화수소와의 결합 친화성이 더 높고, 이를 통해 과산화효소로서의 효과가 더 우수함을 확인하였다.

표 1

[0058]

나노입자	K_m(M)		Vmax(M/sec)	
	TMB	H_2O_2	TMB	H_2O_2

Dex@IONPs	1.37×10^{-4}	12.86×10^{-1}	4.17×10^{-6}	15.75×10^{-3}
Ox-Dex@IONPs	3.39×10^{-4}	7.5×10^{-1}	3.37×10^{-6}	153.0×10^{-3}

[0060] **[실시예 4] 식중독균 검출 분석**

[0061] Ox-Dex@IONPs를 통해 식중독균을 검출할 수 있는지 확인하기 위해, 균 포집률 실험 및 자기영동법을 통한 균 농도별 비색 반응 실험을 수행하였다. 균 포집률 실험의 경우, 나노입자 0.1mg과 히알루론산 1mL에 담긴 표적 식중독균(*E.coli* O157:H7)을 농도별로 반응시킨 후, 하기 수학식 2를 이용하여 포집률을 계산하였다. 이 때, N_{total}은 넣어주는 균의 수, $N_{unbound}$는 입자와 반응 후 포집되지 않은 균의 수를 의미한다. $N_{unbound}$는 자성입자와 균을 반응시킨 용액의 상층액을 상기 표적 식중독균(*E.coli* O157:H7) 판별용 배지에 도말하여 37℃에서 24시간 배양 후 세균 집락수를 계산하였다. 또한, 비표적 식중독균[콜레라균(*Vibrio cholerae*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아균(*Listeria monocytogenes*) 및 세레우스균(*Bacillus cereus*)] 10^5 CFU/mL와 나노입자 0.1mg을 반응시켜 포집률을 계산하였다.

[0062] **[수학식 2]**

$$\%CE = \frac{N_{total} - N_{unbound}}{N_{total}} \times 100$$

[0063]

[0064] 자기영동법을 통한 균 농도별 비색 반응 실험의 경우, 도 5에 나타난 바와 같이, 나노입자 0.1mg과 히알루론산 1mL에 담긴 표적균(*E.coli* O157:H7)을 0 CFU부터 10^0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 및 10^5 CFU까지를 반응시켜 복합체를 형성하였고, 자기영동법으로 표적균과 결합한 나노입자 복합체만을 분리하고 50㎕의 4M 과산화수소 및 50㎕의 4mM TMB 용액과 섞어 10분 동안 발색을 유도하였다. 발색 반응 직후 촉매반응을 멈추기 위해 50㎕의 황산용액(stop solution)을 넣어주고, 흡광도를 자외선-가시광선 분광광도계(Infinite 200PRO, Tecan, Switzerland)로 측정하였다. 마찬가지로 비표적 식중독균[콜레라균(*Vibrio cholerae*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아균(*Listeria monocytogenes*) 및 세레우스균(*Bacillus cereus*)] 10^5 CFU/mL를 대상으로 자기영동법 후 비색 반응을 분석하였다.

[0065] 그 결과, 도 6a 및 6b에 나타난 바와 같이, 표적 식중독균(*E.coli* O157:H7)에 대해서는 10^1~10^5 CFU까지 80% 이상의 포집률을 나타내는 반면, 상기 비표적 식중독균 4종에 대해서는 포집률이 10% 이하로 나타나는 것을 확인하였다. 또한, 표적 식중독균은 도 6c에 나타난 바와 같이, 그래프 상에서 균 농도별 비색 값이 높은 상관관계(R2=0.9789)를 가지는 것으로 나타났고, 도 6d에 나타난 바와 같이, 비색 값에 있어서 음성대조군과 유의미한 차이를 나타내는 반면, 비표적 식중독균 4종은 음성대조군 수준의 비색 값을 나타내는 것을 확인하였다. 결과적으로, Ox-Dex@IONPs가 대장균 O157:H7에 특이적인 균 포집능을 나타내고, 상기 자기영동법이 대장균 O157:H7를 정량 평가함에 있어 유효한 방법임을 확인하였다.

[0067] **[실시예 5] 식품에서 표적 식중독균 정량 검출 가능 여부 분석**

[0068] 상기 실시예 4에서 표적 식중독균 정량 평가에 있어 유효한 방법임을 확인한 자기영동법을 실제 식품에 적용이 가능한지 확인하기 위해, 소시지에서 표적 식중독균의 정량 검출을 수행하였다. 소시지 10g에 저농도(0~10^3 CFU)의 대장균 O157:H7을 인위적으로 접종시키고, Ox-Dex@IONPs를 이용한 자기영동법을 통해 정량 검출을 수행하였다. 전처리 방법은 실시예 1의 '면봉 방식'을 이용하였고, 획득한 균은 Ox-Dex@IONPs와 반응시켜 자기영동법으로 표적 식중독균과 결합한 Ox-Dex@IONPs 복합체만을 선택적으로 분리하였다. 그 후 50㎕의 4M 과산화수소 및 50㎕의 4mM TMB 용액과 섞어 10분 동안 발색을 유도하였다. 발색 반응 직후 촉매반응을 멈추기 위해 50㎕의 황산용액(stop solution)을 넣어주고 흡광도를 자외선-가시광선 분광광도계(Infinite 200PRO, Tecan, Switzerland)로 측정하였다.

[0069] 또한, 보다 구체적인 비색 신호의 정량적인 확인을 위해, 스마트폰 어플리케이션을 통한 비색 분석을 수행하였다. 실험 방법은 상기 소시지에서 자기영동법을 통한 정량 검출 분석과 동일하되, 발색 반응 후 페이퍼 디스크에 비색 신호를 집약시키고, 'Colorimetric Titrataion' 어플을 이용하여 비색 신호를 분석하였다. 이를 위해 균 농도별(10^1~10^5 CFU) 표준샘플을 이용하여 자기영동법 후 페이퍼 디스크 속 비색을 측정(blue dot)하고, 이를 이용하여 Calibration curve(red line)를 만들어주었다. 만들어준 Calibration curve을 기반으로 소시지에 접종된 저농도(0~10^3 CFU) 균을 정량 분석하여 정량적인 값(yellow dot)으로 나타내었다.

[0070] 그 결과, 도 7a에 나타난 바와 같이, 10 CFU/mL의 저농도까지 표적 식중독균의 정량 분석이 가능한 것을 확인하였다. 또한, 스마트폰 어플리케이션을 사용하여 비색 분석을 수행한 결과, 도 7b에 나타난 바와 같이, 10^1, 10^2 및 10^3 CFU 구간에서의 정량분석이 가능한 것을 확인하였다. 결과적으로 실제 식품에서도 Ox-Dex@IONPs을 사용하여 자기영동법을 통한 정량 평가가 가능하고, 스마트폰 어플리케이션을 통해 보다 정확한 정량 값 확인이 가능함을 확인하였다.

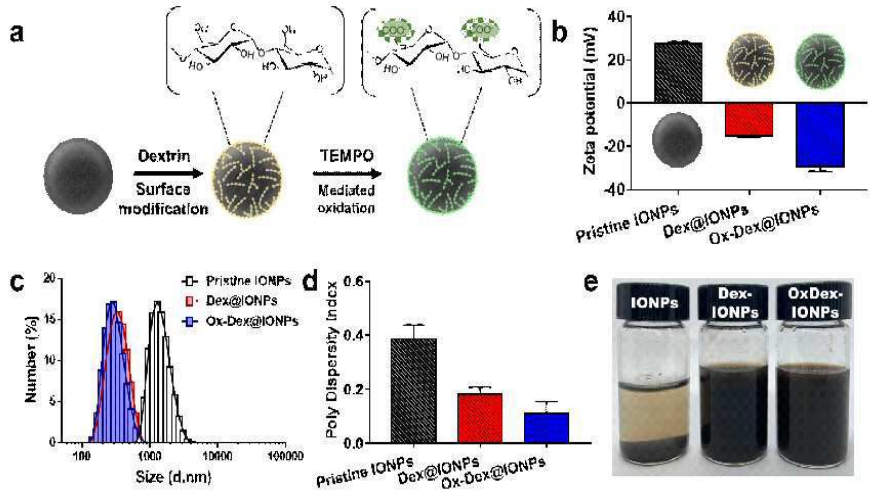
[0072] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

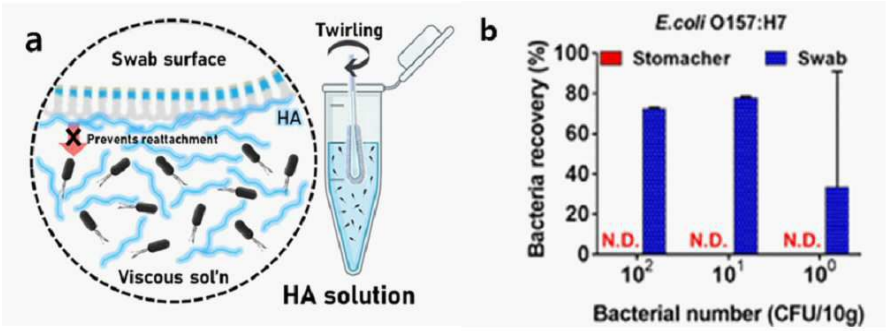
도면1



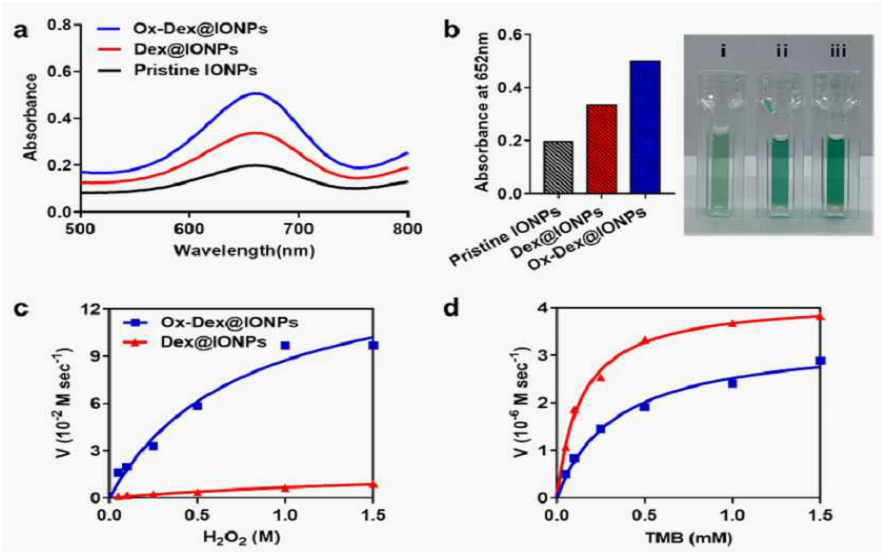
도면2


a
Dextrin
Surface modification
TEMPO
Mediated oxidation
b
Zeta potential (mV)
Pristine IONPs
Dex@IONPs
Ox-Dex@IONPs
c
Pristine IONPs
Dex@IONPs
Ox-Dex@IONPs
Number (%)
Size (d.nm)
d
Poly Dispersity Indcx
e
IONPs
Dex-IONPs
OxDex-IONPs

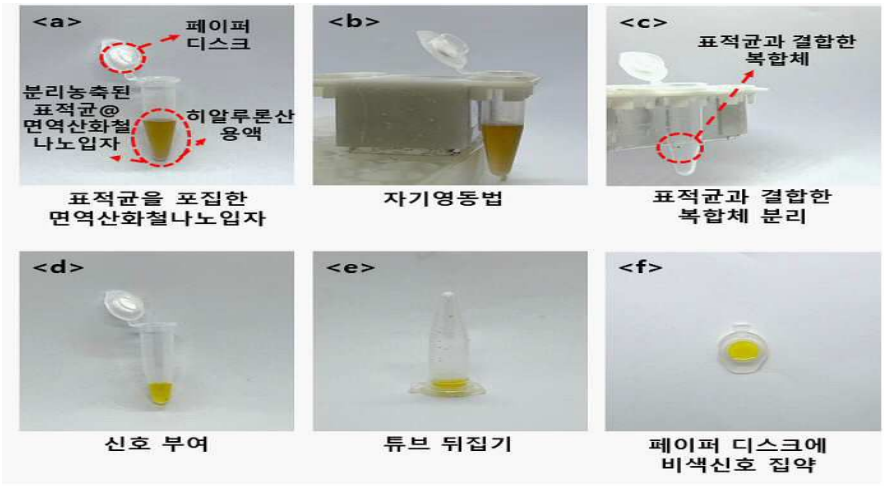
도면3


a
Swab surface
Twirling
HA
Prevents reattachment
Viscous sol'n
HA solution
b
E.coli O157:H7
Stomacher
Swab
Bacteria recovery (%)
N.D.
Bacterial number (CFU/10g)

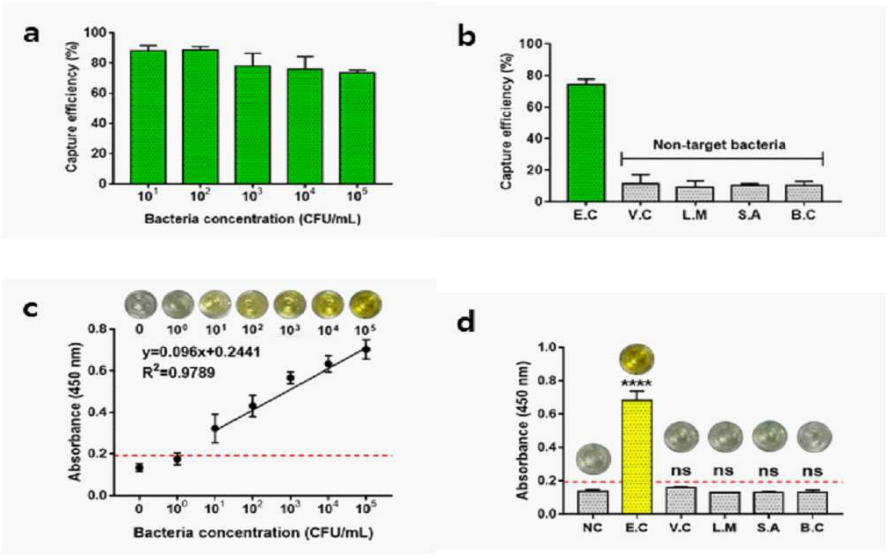
도면4


a
Ox-Dex@IONPs
Dex@IONPs
Pristine IONPs
Absorbance
Wavelength(nm)
b
Absorbance at 652nm
Pristine IONPs
Dex@IONPs
Ox-Dex@IONPs
i
ii
iii
c
Ox-Dex@IONPs
Dex@IONPs
V (10-2 M sec-1)
H2O2 (M)
d
V (10-6 M sec-1)
TMB (mM)

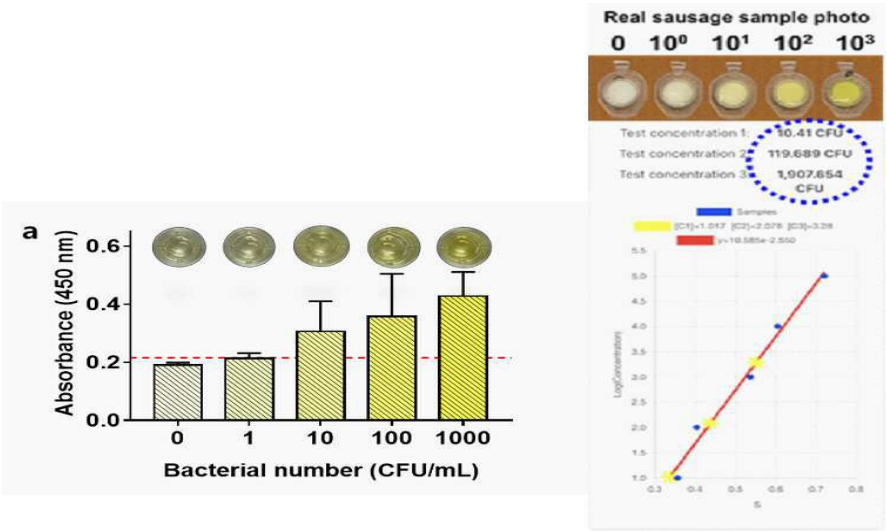
도면5


<a>
페이퍼 디스크
분리농축된 표적균@ 면역산화철 나노입자
히알루론산 용액
표적균을 포집한 면역산화철나노입자
<b>
자기영동법
<c>
표적균과 결합한 복합체
표적균과 결합한 복합체 분리
<d>
신호 부여
<e>
튜브 뒤집기
<f>
페이퍼 디스크에 비색신호 집약

도면6


a
Capture efficiency (%)
Bacteria concentration (CFU/mL)
b
Capture efficiency (%)
Non-target bacteria
E.C
V.C
L.M
S.A
B.C
c
y=0.096x+0.2441
R²=0.9789
Absorbance (450 nm)
Bacteria concentration (CFU/mL)
d
Absorbance (450 nm)
****
ns
NC
E.C
V.C
L.M
S.A
B.C

도면7


a
Absorbance (450 nm)
Bacterial number (CFU/mL)
Real sausage sample photo
Test concentration 1: 10.41 CFU
Test concentration 2: 119.689 CFU
Test concentration 3: 1,907.654 CFU