식중독균의 현장 자동화 검출을 위한 Sample-to-Answer 기술

Sample-to-answer technology for on-site automatic detection of food poisoning bacteria

임민철, 최성욱, 우민아*
Min-Cheol Lim, Sung-Wook Choi, Min-Ah Woo*

한국식품연구원 소비안전연구단
Research Group of Consumer Safety, Korea Food Research Institute

Ⅰ. 서론

식품을 통해 섭취되는 인체에 유해한 미생물인 식중독균에 의한 사고가 해마다 꾸준히 발생하고 있다. 특히 단체급식을 하는 학교나 외식업체 등에서 발생하는 집단 식중독 사고는 국민의 불안감을 야기시킬 뿐 아니라 사회경제적 피해를 가져온다. 통계적으로 지난 2015-2019년 기준 급식이 시작되는 개학철인 3월과 8월에 식중독 발생 건수와 환자수가 증가하였다 (최근 식약처 보도자료 (2020.7.28)에 의하면, 지난 2015~2019년 기준 식중독 발생 환자(6,893명)의 39%(2,697명)가 6~8월에 발생하였고, 학교급식소에서 가장 많은 환자가 발생하였다고 한다). 게다가 지구 온난화로 인한 기온상승으로 인해 여름철뿐 아니라 봄이나 가을철에도 식중독 사고가 소폭 증가하는 추세이다. 식중독균은 식품을 생산, 가공, 유통, 판매하는 과정에서 증식할 수 있고 조리도구나 식기를 통해 교차오염이 될 수도 있다. 따라서 다양한 식품산업 현장에서 식중독균을 빠르게 검사하여 감염 확산을 신속히 차단하는 예방기술은 매우 중요하다. 최근 식품안전 분야에 빅데이터, 사물인터넷, 블록체인 등 IT 기술의 접목으로 스마트유통, 스마트해썹과 같은 데이터 기반 안전관리 기술이 보급되고 있다. 하지만, 식품의 식중독균 정보를 얻기 위한 검사에는 여전히 전문가가 실험실에서 수작업으로 수행해야 하는 비효율적인 방법을 사용하고 있다. 본 논단에서는, 식중독균의 신속 검출을 위해 필요한 Sample-to-Cell, Cell-to-Detection 기술에 관한 최근 연구동향을 소개하고, 식품 전처리부터 검출을 자동으로 수행하여 데이터를 생성하는 Sample-to-Answer 기술에 관한 제언을 하고자 한다.

Ⅱ. 본론

1. Sample-to-Cell

식중독균 검사에 있어서 일정량의 식품 시료 채취 후

* Corresponding author: Min-Ah Woo
Research group of consumer safety, Korea Food Research Institute (KFRI),
Wanju-gun, Jeollabuk-do 55365, Republic of Korea,
Tel: +82-63-219-9374 Fax: +82-63-219-9876 E-mail: mawoo@kfri.re.kr

결과를 확인하기까지 필요한 총 소요시간은 식품에 오염된 초기 미생물 수를 인위적으로 증가시키는 증균배양 시간도 포함하여 결정된다. 일반적으로 활용되고 있는 식중독균 안전 검사방법인 배지법은 균에 따라 다르지만 대부분 1-2일 정도의 시간이 소요되며, 증균배양 단계가 총 소요시간 중 상당 부분을 차지하고 있다(Gracias and McKilip, 2004). 따라서, 식품 생산 및 유통 과정 중 식중독균 안전 검사 결과를 신속하게 확보하고 소비단계 전에 사전적으로 대응하기 위해서는 증균배양 단계를 최소화 또는 생략한 식품 시료 전처리 기술이 필요하다. 이를 통해 식품에서부터 오염된 식중독균을 분리 및 농축하고 식품 기질을 제거함으로써 매트릭스 효과(Matrix effects)를 최소화하여 최종 검출 민감도를 향상시킬 수 있다(Brandão et al., 2015).

식품의 매트릭스 효과는 식품을 이루고 있는 복잡 다양한 구성성분들로 인해 식중독균과 같은 위해요소 검출을 위한 핵산증폭 및 항원-항체 반응 저해 현상이 유발되기 때문에 실험조건에서 최적화된 검출법도 실제 식품에는 직접 활용할 수 없다(Da-Silva et al., 2018). 비록, 배지법을 이용한 전통적인 검사방법에서는 희석 및 증균배양을 통해 매트릭스 효과를 낮춘 상태에서 결과를 확인할 수 있으나, 시료 전처리를 거치지 않은 식품에서 식중독균을 직접 검출(핵산증폭 반응 등)하는 경우 매트릭스 효과에 의한 검출 신호 저해 현상이 다양한 식품에서 보고되고 있다(Scheu et al., 1998). 식중독균 안전 검사에서 시료 전처리 기술은 식품 시료의 균질화, 증균배양, 미생물 분리 및 농축 단계를 포함하지만, 본 논단에서는 식중독균 신속 검출을 위한 식품 시료 전처리 기술들을 살펴보고 현장 자동화 기술 적용성을 분석해보고자 한다.

먼저, 식중독균 안전 검사 자동화 및 신속 검출을 위한 식중독균 분리 및 농축하는 단계에 적용되고 있는 기술로는 여과법(Filtration), 원심분리법(Centrifugation) 및 면역자성분리법(IMS, immunomagnetic separation) 등이 알려져 있다〈그림 1〉. 그림 1에서 도식화된 기술 원리로 식중독균을 분리 및 농축할 수 있으나, 식품 기질을 제거할 수 있는 수준은 다르기 때문에 식품 성상 및 검출방법에 따른 전처리 기술 선정이 필요하다.

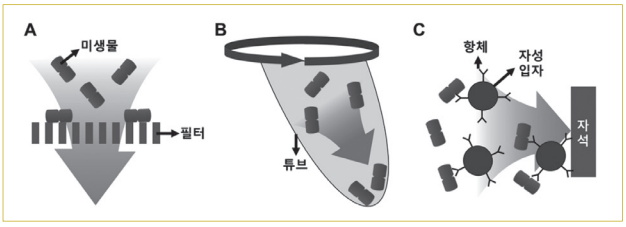

그림 1. 시료로부터 미생물을 분리 및 농축하기 위해 사용되는 전처리 방법 (A: 여과법, B: 원심분리법, C: 면역자성분리법)

앞서 소개한 식품 시료 전처리 세부 기술별 최근 동향과 자동화 시스템 적용 사례에 대해서 살펴보도록 하겠다. 먼저, 여과법 기반 시료 전처리 기술은 시료에 포함된 물질의 크기 차이에 따라 분리하는 물리적 방법으로 필터 크기 선정과 크기가 다른 필터의 순차적 사용을 통해 원하는 크기의 물질을 선별적으로 분리 및 농축할 수 있다. 구체적인 사례로, 대장균(*Escherichia coli*)을 PCR(Polymerase chain reaction)분석을 통해 신속하게 검출하기 위해서는 증균배양을 제외한 전처리 방법 적용이 필요하며 돼지고기, 쇠고기, 새싹채소에 여과법과 원심분리법을 적용하였을 때 여과법을 적용한 경우 PCR기반 검출 효율 증가가 보고되었다(Choi et al., 2017). 식중독균 검사 이슈 중 하나는 식품에 오염된 생균을 검출하는 것인데, 다양한 육류 제품에 오염된 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*)를 효소처리 및 필터를 이용한 여과 방법을 통해 사균은 제거하고 생균만을 회수하여 Real-Time PCR 검사를 통해 10 CFU/25 g 검출한계를 확보할 수 있었다(Garrido-Maestu et al., 2018).

단순여과처리 외에도, 면역자성분리를 통해 미생물에 결합된 자성나노입자의 비색 및 금환원 반응을 통한 신호 증강으로 검출하는 경우 미생물에 결합하지 않은 자성나노입자를 제거하기 위한 용도로 미세유체채널에 필터가 함입되어 활용된 사례가 보고된 바 있다(Jo et al., 2020). 또한, 면역자성입자 제작 단계에서 항체와 알칼린 포스파타아제(Alkaline phosphatase)를 고정화한 뒤 대장균

O157:H7 검출을 필터 기반 여과법을 통해 결합하지 않은 자성나노입자의 제거 및 기질-효소 반응으로 상추 시료로부터 비색검출한 결과가 보고되었다(Kim et al., 2018).

여과법을 이용한 식중독균 분리 및 농축 자동화 시스템 적용 사례로는, 접선방향 유동 여과(Tangential flow filtration)법으로 필터가 오염되거나 막히는 현상을 최소화할 수 있는 장점과 함께 세라믹 필터를 이용하여 물에 오염된 대장균을 500배 이상의 농축 효율과 90% 이상의 회수율로 전처리가 가능한 방법이 보고되었다(Zhang et al., 2018). 이를 위해서는 유체 이송 자동화를 위해서 연동 펌프(Peristaltic pump)를 사용하였다. 이와 같은 여과법 기반 자동화 시스템이 매트릭스 효과가 큰 식품에 적용되기 위해서는 다층 필터 적용 등을 통한 식품 기질과 식중독균분리 효율 개선 등에 대한 연구가 필요하다고 판단된다.

다음으로는 식품 시료와 미생물의 밀도 차이로 분리가 되는 물리적 처리 방법인 원심분리법에 대해 살펴보도록 하겠다. 먼저, 원심분리에 의한 식중독균 분리 및 농축은 유제품에 대표적으로 적용되고 있는데 살균 또는 균질화된 우유에서는 원심분리를 통해 98%이상 미생물이 회수된 반면 원유(Raw milk)에서는 7%이하의 미생물만 회수되었다(Brewster et al., 2016). 원유에 오염된 미생물을 고회수율로 분리하기 위해서는 원심분리과정에서 크림층으로 전이되는 미생물을 간단한 교반단계 추가를 통해 95%이상 회수할 수 있었다. 이처럼 원심분리법으로 미생물을 시료로부터 고효율로 회수할 수 있지만 실제 적용이 가능한 식품군으로는 음료 또는 액상 식품류로 다소 제한적이라고 할 수 있다.

원심분리법이 적용된 자동화 시스템은 매트릭스 효과가 큰 식품에서 미생물을 분리 및 농축하는 보다는 액상 시료 등에 우선적으로 적용되고 있으며, 구체적인 사례로는 "Lab-on-a-Disc" 플랫폼을 기반으로 미세유체채널 내에서 우유에 오염된 식중독균 핵산 정제 등의 연구가 보고되고 있다(Oh et al., 2016). 앞선 사례의 경우에서 확인할 수 있듯이 미세 공간 내에서 핵산 증폭에 의한 비색 검출까지 가능한 자동화 시스템이지만 전처리 가능한 시료의 무게 또는 부피에 한계가 있으며 고체 기질 함량이 높은 식품에 대한 적용이 제한적일 수 있다. 따라서, 원심분리기반 자동화 시스템 기술이 다양한 식품군에 적용을 위해서는 여과법 등의 전처리 방법과 병합 개발 연구가 필요하다고 판단된다(Chen et al., 2018).

마지막으로 소개할 면역자성분리 기반 식품 시료 전처리 기술은 물리적 분리방법인 여과법 및 원심분리법과 달리, 항원인 식중독균과 선택적으로 결합할 수 있는 항체를 자성입자에 고정화하여 항원-항체결합 기반으로 분리가 가능하기 때문에 식품에 오염된 식중독균을 선택적으로 분리할 수 있다. 면역자성분리법의 연구 동향은 자성입자 제작 방법, 항체 고정화 방법, 항체 등 수용체 개발 등을 중심으로 이뤄지고 있으며 이와 함께 자동화 시스템 개발 연구 사례도 함께 살펴보도록 하겠다. 자성입자 소재 및 제작 방법에 따라 만들어진 입자의 크기가 다양할 수 있으며 제작된 입자가 실제 식품에 오염된 식중독균을 분리 및 회수함에 있어서 얼마나 효과적인지 검증할 필요가 있다. 관련된 연구로 100, 500, 1000 nm의 면역자성입자를 사용하여 살모넬라(*Salmonella*) 및 대장균(*E. coli*)을

표 1. 식품 시료로부터 식중독균을 분리 및 농축하기 위해 사용되는 전처리 방법의 주요 특징

전처리 방법	여과법	원심분리법	면역자성분리법
전처리 원리	크기 차이에 따른 분리	밀도 차이에 분리	항원-항체결합 기반 분리
필요 장치	유체 이송부 등	고속회전부 등	유체 이송부 등
미생물 선택성	×	×	○
시료적용 검토 사항	기질의 크기 조성 등	기질의 밀도 조성 등	시료의 pH 및 염농도 등

분리하였을 때 100 nm가 가장 효과적이나, 실제 식품 매트릭스(계육 및 난백)에 처리하였을 때 회수 효율이 세 가지 입자에서 모두 낮아지며 자성입자의 저장 안정성이 크기가 작은 입자일수록 낮아지는 결과를 보였다(Chen and Park, 2018).

항체가 수용체로 사용되는 경우, 항체를 자성입자에 고정화하는 방법에 따라 항원 결합력에 영향을 미치기 때문에 항원과 결합하는 부분을 외부로 노출 시키며 고정화하기 위한 연구가 수행되고 있다. 대표적인 예로, 항체의 항원 결합 부분인 Fab(Fragment antigen binding)가 아닌 Fc(Fragment crystallizable) 부분에 선택적으로 결합하는 단백질 G 또는 A를 이용한 항체 고정화 방법이 있다. 관련 연구로는 아밀로스 자성입자(Amylose magnetic particle)에 항체를 고정화하기 위한 방법으로 말토오스 결합 단백질(Maltose binding protein)-단백질 G 융합을 통해 화학적 결합 반응 없이 생물학적 결합 방법을 통해 항체를 고정화하고, 우유에 오염된 대장균 O157:H7을 90% 이상의 수율로 회수 가능한 결과가 보고되었다(Lim et al., 2016). 항체 기반 선택적 면역자성 분리기술과 함께 범용성 수용체(Broad-spectrum caturing receptor)를 이용한 불특정 식중독균 분리 기술 개발 연구도 진행중이다. 예를 들어, 폴리라이신(ε-Polylysine)이 코팅된 자성입자를 이용하여 음료 및 우유에 오염된 대장균을 분리 및 농축하고 pH 조절을 통해 용출하는 기술이 보고되었으며 기존에 알려진 ConA(Concanavalin A) 대비 분리율이 증가되는 결과를 보여주었다(Wu et al., 2019). 이와 같이 식품에 오염된 식중독균 검사를 미리 선정하여 진행할 수 있지만 오염원을 정확하게 알 수 없기 때문에 범용성을 갖는 수용체 개발이 면역자성분리법의 적용 확대를 위해서는 필요하다고 판단된다.

면역자성분리법 기반 자동화 시스템 개발 연구 사례로는, 식품시료 25g 기준 총 250 mL 용액을 처리할 수 있는 방법으로 연동펌프를 이용한 시료 이송과 자성입자 분리 및 회수 모듈을 통해 표적 식중독균과 결합한 면역자성입자를 최종 회수용액 2 mL 수준으로 농축이 가능한 기술이 보고된 바 있다(Lim et al., 2017). 소개한 기술을 기반으로 우유, 분쇄육, 양배추에 오염된 대장균 O157:H7을 선택적으로 분리 농축하고 Real-Time PCR법을 통해 총 소요시간 3시간 이내에 10^2 CFU/g 까지 검출이 가능한 결과가 보고되었다(Park et al., 2020).

2. Cell-to-Detection

(1) DNA detection methods

1) Microfluidic chip

미세유체 칩은 미세유체 제어기술을 이용하여 소량의 유체샘플을 분석하는 칩을 말한다. 미세유체 칩을 이용한 소형 시스템은 일반 실험실에서 수행하는 반복적이고 복잡한 분석 절차를 하나의 단일 장치로 통합할 수 있게 한다. 이것은 칩 위의 작은 실험실(Lab on a chip) 이라고도 불리며, 분석 결과를 얻기까지 필요한 시간과 인력을 줄이고 시약의 소비를 최소화하는 역할을 한다. 또한 휴대가 가능하고 비용적인 면에서 경제적이기 때문에 현장 검사를 위한 효과적인 기술로써 주목을 받고 있다. 일반 PCR(Polymerase chain reaction) 장치의 경우 변동이 큰 온도 범위를 수십 cycle 작동하기 위한 가열/냉각 과정에 상당한 시간이 소요된다. 하지만 미세유체 칩에서 수행되는 PCR은 주로 등온에서 유전자를 증폭하고, 소량의 시약을 사용하여 PCR 조건을 정밀 제어하기 때문에 시간을 단축할 수 있다(Tsougeni et al., 2019). 그리고 일반적으로 식품 시료에서 식중독균을 검출하기 위해서는 약 12시간 정도 사전 배양을 해야 하지만, 최근에는 배양을 최소화하는 대신 자성입자를 이용하여 세포를 농축하는 방법을 많이 활용한다. 예를 들어, 살모넬라 균에 선택적인 항체가 결합된 자성입자를 이용하여 3시간 동안 최소 배양을 통해 균을 분리 및 농축하고, 이후 미세유체 칩에서 Cell lysis, DNA 등온 증폭, 검출을 수행한다(Papadakis et al., 2018). 이와 같은 방법은 총 4시간 이내에 1개의 균을 검출할 수 있는 신속성과 민감도를 보여주었다. 하지만 위와 같은 기술은 세포 농축과 검출을 따로 수행해

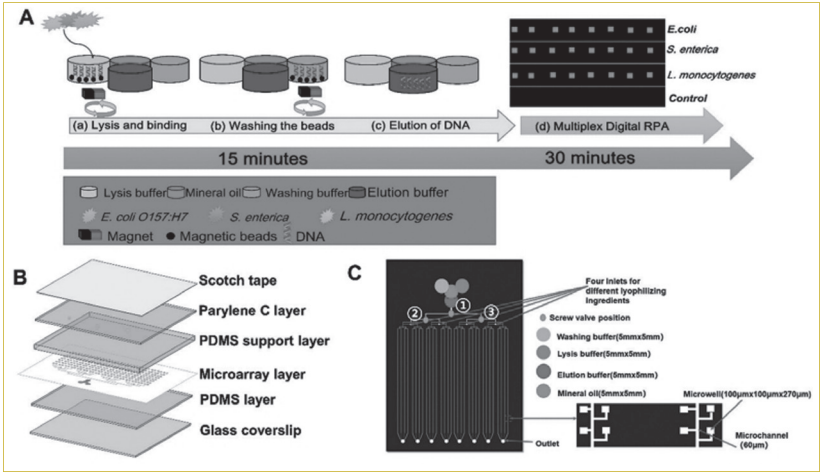

그림 2. (A) 식중독균 유전자 다중검출을 위한 Sample-in-multiplex-digital-answer-out 모식도, (B) 다층 구조의 미세유체 칩, (C) 소프트 리소그래피법으로 만든 미세유체 칩의 평면 구조 (가로X세로, 6X3 cm)

야 하는 단점이 존재한다. 최근에는 이러한 단점을 보완하는 'Sample-in-multiplex-digital-answer-out' 개념의 미세유체 칩이 개발되었다(Yin et al., 2020). 이 칩은 Lysis 챔버에 샘플 용액을 주입하면 세포에서 추출된 DNA가 자성입자에 흡착되고, 프로그램화 된 자기장을 따라 Elution 챔버로 자동 이동한다. 이후 스크류 밸브가 열려 DNA와 미네랄 오일이 포함된 용액이 미세유체 칩에 주입되어 등온증폭 반응이 일어난다〈그림 2〉. 이러한 방법을 통해 분석 시간이 단축되었고(45분 소요), 3종 식중독균을 동시에 세포 10개까지 검출할 수 있었다.

2) Lab-on-a-disc (LOD)

랩온어디스크(LOD)란 컴팩트 디스크 모양의 미세유체 칩으로써, 미세유체 분야에서 약 10년 전부터 혁신적인 기술로 급부상한 기술이다. LOD는 디스크의 회전 속도에 의해 액체의 분주, 수송, 혼합, 계량, 저장 등이 가능하여(Mark et al., 2010), 지금까지 다양한 설계와 작동 방식을 통해 면역분석, 혈액분석, 분자진단 등에 응용되어 왔다. 중국기업인 CapitalBio는 2010년대 초 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification)용 LOD칩과 칩의 구동 및 결과 측정을 위한 장치를 상용화하였다(CapitalBio RTisochip™). 이 시스템은 단 한번의 Pipetting으로 30분 이내에 10가지 세균을 동시에 검출할 수 있는 장점이 있으나, DNA 추출 단계는 상용 키트를 이용하여 사람이 직접 수행해야 하고, 형광 감지를 위한 값비싼 레이저 소스를 사용해야 하는 단점이 있다(Zhou et al., 2014). 반면 식품 시료에 에탄올과 Guanidine hydrochloride을 섞어주는 단순한 방법으로 세균을 용해시킨 이후 LOD를 이용하여 DNA 정제부터 검출을 수행하는 방법도 있다(Oh et al., 2016). 이 경우, 칩에 포함되어 있는 실리카 입자가 4종 식중독균(장출혈성 대장균, 살모넬라, 비브리오, 리스테리아)의 DNA를 정제하고, 이후 LAMP 반응 챔버로 용액이 이동하여 표적으로 하는 특정 유전자가 각 챔버 내에서 증폭된다. 그 결과 LAMP 반응의 지표물질의 색이 변화함에 따라 비색 신호를 기반으로 식중독균 농도를 분석할 수 있다. 이와는 다른 형태로써, Lateral flow strip이 LOD 내에 장착되어 있어서 색깔 띠를 육안으로 확인할 수 있는 시스템도 있다(Kim et al., 2014)〈그림 3A, B〉. 또는, 칩 구동장치 내에 UV 방출기와 광 다이오드가 포함되어 있어서 육안이나 사진 이미지에 의존하는 것보다 더 정확하고 객관적인 비색 측정이 가능한 LOD 시스템도 개발되었다(Sayad et al., 2018). 이 경우, 결과값을 휴대폰에 전송할 수 있는 소프트웨어가 장치에 포함되어 있어서 현장용 자동화 기술에 가장 근접하였다고 할 수 있다〈그림 3C, D〉.

3) Paper-based analytical device (PAD)

종이는 여과, 흡수, 보관 등의 다양한 기능을 수행할 수 있고 비교적 제작이 용이하고 저렴하다. 검출 분야에서 종이는 DNA를 추출하거나, 시약을 균일하게 분배 및 저장하여 휴대성을 높이고, 발색을 간편하게 확인하기 위한 도구로써 많이 활용되고 있다. 최근에는 종이의 쉽게 접

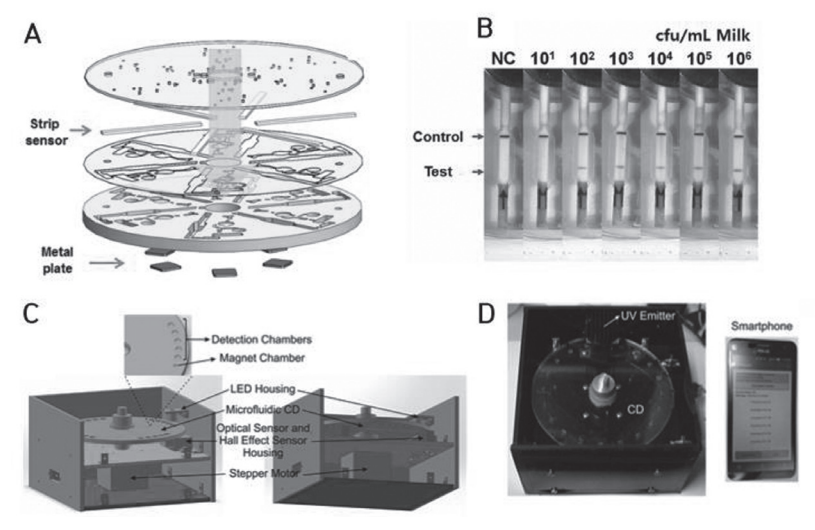

그림 3. (A) Lateral flow strip을 포함하는 LOD의 섹션 평면도, (B) LOD를 이용하여 우유에 오염된 살모넬라 균을 검출한 결과, (C) 자동 검출 시스템의 3D 모델 이미지, (D) 스마트폰 애플리케이션과 연결되는 검출 시스템 사진

을 수 있는 성질을 이용하여 식중독균 검출을 위한 다양한 Origami PAD 기술들이 개발되고 있는 추세이다. 예를 들어, 종이의 샘플 영역에 우유 샘플을 주입한 후 고온에서 DNA를 추출하고, 종이를 접어서 추출된 DNA를 LAMP 반응영역으로 옮긴다. 그리고 나서 다시 종이를 접어 증폭된 DNA를 검출영역으로 옮긴 후 발색 결과를 확인할 수 있다(Trinh, et al., 2019). 또 다른 방식은, Lysis buffer가 건조되어 있는 종이에 샘플 용액을 주입하여 세포를 용해시킨 후, 종이를 접어서 RNA-cleaving DNAzymes(RCD)이 결합되어 있는 영역으로 샘플이 옮겨지면 대장균에서 특이적으로 분비되는 단백질에 의해 RCD가 활성화된다. 이후 다시 종이를 접어서 등온증폭이 수행되고 그 결과로 인해 생성된 DNA와 기질과의 상호 작용에 의한 발색 결과를 얻을 수 있다(Sun et al., 2019). 위와 같은 Origami PAD 기술은 휴대하기 쉽고 분석방법이 간단하지만 모든 과정에 사람의 수작업을 필요로 한다. 따라서 최근에는 DNA 분리 및 증폭을 위한 자동화 장치가 종이 기반 칩과 결합되어 샘플 주입부터 검출까지 자동으로 수행되는 기술이 개발되었다(Fu et al., 2018)〈그림 4〉. 또는, 찢어지거나 구겨지기 쉬운 종이의 단점을 보완하기 위해 종이를 보호할 수 있고 내구성이 뛰어난 플라스틱 기판을 활용한 PAD가 개발되기도 하였다(Trinh, et al., 2019)

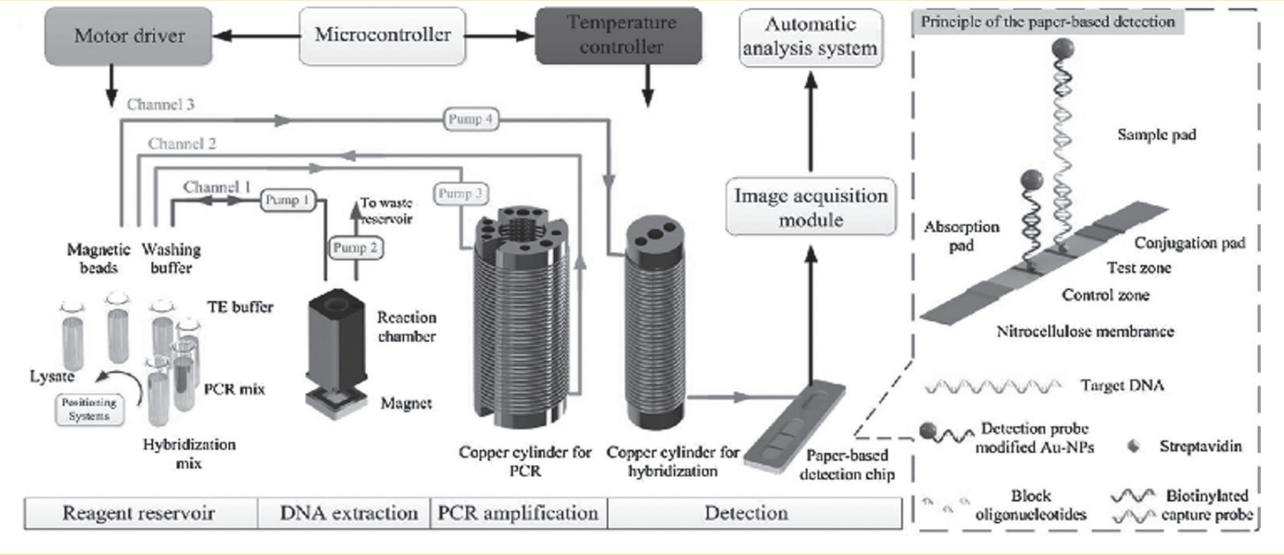

그림 4. 샘플 주입부터 검출까지 자동화된 식중독균 검출 플랫폼 모식도

(2) Whole-cell detection methods

1) Lateral flow assay (LFA)

면역 크로마토그래피 분석법(LFA)은 분석하고자 하는 액체 샘플이 Membrane에 흡수되어 이동하면서 발색 소재에 고정된 항체와 Membrane에 고정된 항체 사이에 표적 물질이 결합하여 색깔의 띠를 나타내는 방식이다. 최근에는 LFA의 발색 소재로 가장 많이 사용하는 금 나노입자 대신 그램 염색약인 Crystal violet을 사용하여 식중독균을 검출하는 LFA가 소개되었다(Bu et al., 2019). 이 경우, 세균을 Crystal violet으로 빠르게 염색한 후 Membrane에 고정된 항체에 의해 살모넬라의 선택적 검출이 가능하였다. 이 기술을 식품에 적용한 결과, 육안으로 확인 가능한 검출 한계는 물의 경우 80 CFU/mL, 토마토의 경우 10^2 CFU/mL, 돼지고기의 경우 10^3 CFU/mL로 나타났다. 또 다른 예로, 4종 식중독균을 동시에 검출하기 위한 수동 회전식 LFA 장치가 소개되었다(Shin et al., 2018). 이 경우에는 서로 다른 항체가 고정된 4개의 테스트 라인이 구성되어 있어서 식중독균이 각 항체에 선택적으로 결합한 후, 장치의 Top 모듈을 시계 반대방향으로 회전시킴으로써 금 나노입자가 테스트 라인으로 전달된다. 그리고 민감도 향상을 위해 금 신호증강 반응을 추가함으로써 양배추에 오염된 식중독균을 전배양 없이 약 10^4 cell 수준, 그리고 6시간 전배양 후 1개 세포 수준까지 검출할 수 있었다. LFA는 휴대하기 좋고 매우 간편한 방법인 반면, 색깔의 띠를 시각적으로 평가하는 전통적인 LFA 방식은 객관성과 신뢰성이 떨어지는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해, 최근에는 정량분석을 위한 LFA 전용 소형 광학 측정기나 결과 분석용 소프트웨어 등이 개발되는 추세이다(Urusov et al., 2019). 또한 LFA 칩과 스마트폰을 결합하기 위한 전용 커버, 홀더 등 소형 부품들을 3D 프린터로 맞춤 제작하여 비색 결과를 스마트폰 카메라로 측정하기도 한다(Cheng et al., 2017)〈그림 5A〉. 이러한 전략을 통해 전통적인 LFA에 비해 우수한 감도와 재현성이 보장되었고, 특히 스마트폰의 활용은 비용을 절감하고 현장 접근성과 사용자 친화도를 높이는 역할을 하였다.

2) Fluorescent sensor

Quantum dot(QD)은 Excitation 스펙트럼의 범위가 넓고 높은 양자 수율 및 낮은 Photo-bleaching 효과를 가진다. 특히 단일 광원을 이용하여 동시에 다양한 색상의 QD를 감지할 수 있기 때문에 다중 분석을 위한 효과적인 형광 물질로 활용되고 있다(Chen et al., 2012). 최근 QD와 자성입자에 각각 고정된 항체 사이에 표적 균이 결합을 하면 자성으로 분리한 균의 형광 값을 측정하는 대신, 반대로 균에 결합하지 않은 나머지 QD의 형광 값을 측정하는 방식의 QD-reverse assaying strategy(RAS)가 개발되었다(Yin et al., 2016). 제안된 RAS는 자성입자의 간섭을 최소화하고 형광 신호를 증가시키며 세척과정이 필요 없는 장점이 있다. 다른 한편으로는, 4가지 서로 다른 QD를 이용하여 4종 식중독균을 동시에 검출함으로써 QD의 다중 분석 효과를 극대화한 경우도 있다(Xu et al., 2015). 이 경우는 자성입자에는 항체를, QD에는 Aptamer를 고정하여 선택적 분리 및 검출이 가능하였다. 또한 신호 측정을 위해 소형 형광 측정기기를 제작 및 활용함으로써 휴대 가능한 형광 센서를 구현하였다. 또 한편으로는, Magnetic concentrator와 전용 카트리지, 그리고 계수 알고리즘이 내장된 형광 이미지 리더기를 이용하여 간소화된 작업으로 세포 분리부터 형광 검출까지 가능한 기술이 구현되기도 하였다(Lee et al., 2020). 이 기술을 식품에 적용하여 100 CFU/g 미만으로 허용되는 황색포도상구균에 대한 검출 민감도는 92.9%, 선택성은 100%로 나타났다. 또 다른 예로, 소형 레이저 다이오드 광 소스, 간섭 필터, 포커싱 렌즈를 포함하는 스마트폰 기반 형광 검출 시스템이 개발되었고, 결과적으로 요거트 및 계란의 장출혈성 대장균을 전배양 없이 2시간 이내에 10 CFU/mL까지 검출할 수 있었다(Zeinhom et al., 2018)〈그림 5B〉.

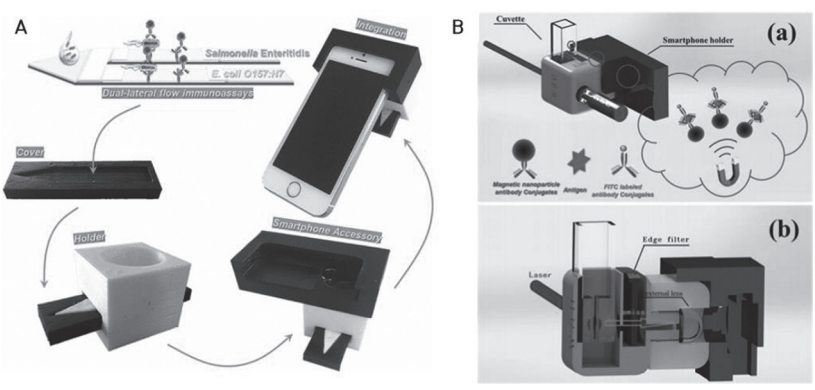

그림 5. (A) 식중독균 2종 동시 검출을 위한 smartphone-based LFA, (B) 장출혈성 대장균 검출을 위한 스마트폰 기반 형광 리더기 모식도

Ⅲ. 결론

식품 현장의 식중독균에 관한 신속하고 정확한 정보를 얻기 위해서는 사람의 노동력 없이 또는 그것을 최소화할 수 있는 자동화된 Sample-to-Answer 기술이 필요하다. 복잡 다양한 매트릭스로 이뤄진 식품에서 표적 세포만 분리하고 농축하는 전처리 과정(Sample-to-Cell)은 고감도 검출을 위한 중요한 사전 작업이다. 주로 연구되고 있는 여과법, 원심분리법, 면역자성분리법과 같은 전처리법은 최근 연구결과 높은 수율과 신속성을 보장하지만, 일부 식품에 한정하여 결과가 도출되었기 때문에 더욱 다양한 식품에 적용 가능한 최적의 프로토콜을 확보할 필요가 있다. 검출 과정(Cell-to-Detection)을 간소하고 자동화하기 위한 최근 연구에는 미세유체 칩, 랩온어디스크, 종이 기반 플랫폼, 면역 크로마토그래피법, 형광 센서 등 다양한 접근법이 제시되고 있다. 특히 유전자 추출부터 증폭 및 결과 분석을 자동화할 수 있는 시스템이나, 스마트폰을 활용하여 저렴하고 간편하면서도 정량 분석이 가능하도록 형광이나 비색을 측정하는 방법이 개발되고 있다. 하지만 이러한 신속하고 간편한 검출 기술의 이면에는 여전히 식품 전처리를 수작업으로 해야 하거나 원하는 검출 감도를 얻기 위해 증균배양을 해야 하는 한계가 있다. 식품 현장에 활용 가능한 Sample-to-Answer 기술이 되기 위해서는 Sample-to-Cell과 Cell-to-Detection 기술의 물리적 통합이 필요하다. 즉, 식품 기질에 영향을 받지 않으면서 표적 균의 고효율 농축이 가능한 전처리 기술과 신속 정확하고 재현성이 우수한 검출 기술을 하나로 연결하고 집약하는 것이 필요하다. 그리고 이러한 통합 시스템의 전 자동화를 위해 전자, 기계 등의 인터페이스 기술을 접목할 필요가 있다. 여기에 실시간 데이터 관리를 위한 IT 기술이 융합된다면 신속한 현장 정보 전달이 가능해짐으로써 식중독균에 의한 식중독 사고 예방에 큰 도움이 될 것으로 기대한다.

참고 문헌

1. Gracias, K. S., & McKillip, J. L. (2004). A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(11), 883-890.

2. Brandão, D., Liébana, S., Campoy, S., Alegret, S., & Pividori, M. I. (2015). Immunomagnetic separation of Salmonella with tailored magnetic micro and nanocarriers. A comparative study. *Talanta*, 143, 198-204.

3. Da-Silva, E., Baudart, J., & Barthelmebs, L. (2018). Biosensing platforms for Vibrio bacteria detection based on whole cell and nucleic acid analysis: A review. *Talanta*, 190, 410-422.

4. Scheu, P. M., Berghof, K., & Stahl, U. (1998). Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction. *Food Microbiology*, 15(1), 13-31.

5. Jo, Y., Park, J., & Park, J. K. (2020). Colorimetric detection of *Escherichia coli O157: H7* with signal enhancement ssing size-based filtration on a finger-

powered microfluidic device. *Sensors*, 20(8), 2267.

6. Choi, Y., Lee, H., Lee, S., Kim, S., Lee, J., Ha, J., Oh, H., & Yoon, Y. (2017). Comparison of upgraded methods for detecting pathogenic *Escherichia coli* in foods using centrifugation or filtration. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(6), 799.

7. Garrido-Maestu, A., Azinheiro, S., Carvalho, J., & Prado, M. (2018). Rapid and sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* in food products by a filtration-based protocol and qPCR. *Food Microbiology*, 73, 254-263.

8. Kim, S. U., Jo, E. J., Mun, H., Noh, Y., & Kim, M. G. (2018). Ultrasensitive detection of *Escherichia coli O157: H7* by immunomagnetic separation and selective filtration with nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate signal amplification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(19), 4941-4947.

9. Brewster, J. D., & Paul, M. (2016). Improved method for centrifugal recovery of bacteria from raw milk applied to sensitive real-time quantitative PCR detection of *Salmonella spp*. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3375-3379.

10. Oh, S. J., Park, B. H., Choi, G., Seo, J. H., Jung, J. H., Choi, J. S., & Seo, T. S. (2016). Fully automated and colorimetric foodborne pathogen detection on an integrated centrifugal microfluidic device. *Lab on a Chip*, 16(10), 1917-1926.

11. Chen, J., Xu, Y., Yan, H., Zhu, Y., Wang, L., Zhang, Y. & Xing, W. (2018). Sensitive and rapid detection of pathogenic bacteria from urine samples using multiplex recombinase polymerase amplification. *Lab on a Chip*, 18(16), 2441-2452.

12. Chen, J., & Park, B. (2018). Effect of immunomagnetic bead size on recovery of foodborne pathogenic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 267, 1-8.

13. Lim, M. C., Lee, G. H., Huynh, D. T. N., Hong, C. E., Park, S. Y., Jung, J. Y., Park, C. S., Ko, S., & Kim, Y. R. (2016). Biological preparation of highly effective immunomagnetic beads for the separation, concentration, and detection of pathogenic bacteria in milk. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, 854-861.

14. Wu, X., Lai, T., Jiang, J., Ma, Y., Tao, G., Liu, F., & Li, N. (2019). An on-site bacterial detection strategy based on broad-spectrum antibacterial ε-polylysine functionalized magnetic nanoparticles combined with a portable fluorometer. *Microchimica Acta*, 186(8), 526.

15. Lim, M. C., Park, J. Y., Park, K., Ok, G., Jang, H. J., & Choi, S. W. (2017). An automated system for separation and concentration of food-borne pathogens using immunomagnetic separation. *Food Control*, 73, 1541-1547.

16. Park, J. Y., Lim, M. C., Park, K., Ok, G., Chang, H. J., Lee, N., & Choi, S. W. (2020). Detection of *E. coli O157: H7* in food using automated immunomagnetic separation combined with real-time PCR. *Processes*, 8(8), 908.

17. Tsougeni, K., Kastania, A.S., Kaprou, G.D., Eck, M., Jobst, G., Petrou, P. S., & Tserepi, A. (2019). A modular integrated lab-on-a-chip platform for fast and highly efficient sample preparation for foodborne pathogen screening. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 288, 171 - 179.

18. Papadakis, G., Murasova, P., Hamiot, A., Tsougeni, K., Kaprou, G., Eck, M., Rabus, D., Bilkova, Z., Dupuy, B., Jobst, G., Tserepi, A., Gogolides, E., & Gizeli, E. (2018). Micro-nano-bio acoustic system for the detection of foodborne pathogens in real samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 111, 52 - 58.

19. Yin, J., Zou, Z., Hu, Z., Zhang, S., Zhang, F., Wang, B. & Mu, Y. (2020). A "sample-in-multiplex-digital-answer-out" chip for fast detection of pathogens. *Lab Chip*, 20, 979-986.

20. Mark, D., Haeberle, S., Roth, G., Von Stetten, F., & Zengerle, R. (2010). Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chem. Soc. Rev.*, 39, 1153-1182.

21. Zhou, Q. J., Wang, L., Chen, J., Wang, R. N., Shi, Y. H., Li, C. H., Zhang, D. M., Yan, X. J., & Zhang, Y. J. (2014). Development and evaluation of a real-time fluorogenic loop-mediated isothermal amplification assay integrated on a microfluidic disc chip (on-chip LAMP) for rapid and simultaneous detection of ten pathogenic bacteria in aquatic animals. *Journal of Microbiological Methods*, 104, 26 - 35.

22. Oh, S. J., Park, B. H., Choi, G., Seo, J. H., Jung,

J. H., Choi, J. S., Kim, D. H., & Seo, T. S. (2016). Fully automated and colorimetric foodborne pathogen detection on an integrated centrifugal microfluidic device. *Lab Chip*, 16, 1917-1926.

23. Kim, T. H., Park, J., Kim, C. J., & Cho, Y. K. (2014). Fully Integrated Lab-on-a-Disc for Nucleic Acid Analysis of FoodBorne Pathogens. *Anal. Chem.*, 86, 3841-3848.

24. Sayad, A., Ibrahim, F., Mukim Uddin, S., Cho, J., Madou, M., & Thong, K. L. (2018). A microdevice for rapid, monoplex and colorimetric detection of foodborne pathogens using a centrifugal microfluidic platform. *Biosensors and Bioelectronics*, 100, 96 - 104.

25. Amrita, T. S., Darlin, L., Akhil, M., Shainlee, T., Manjot, P., & Gulden, C. U. (2018). Paper-Based Sensors: Emerging Themes and Applications. *Sensors*, 18(9), 2838.

26. Trinh, T. N. D. & Lee, N. Y. (2019). A foldable isothermal amplification microdevice for fuchsin-based colorimetric detection of multiple foodborne pathogens. *Lab Chip*, 19, 1397-1405.

27. Sun, Y., Chang, Y., Zhang, Q., & Liu, M. (2019). An Origami Paper-Based Device Printed with DNAzyme-Containing DNA Superstructures for Escherichia coli Detection. *Micromachines*, 10(8), 531.

28. Fu, Y., Zho, X., & Xing, Da. (2018). Integrated paper-based detection chip with nucleic acid extraction and amplification for automatic and sensitive pathogen detection. *Sensors and Actuators B*, 261, 288 - 296.

29. Trinh, K. T. L., Trinh, T. N. D., & Lee, N. Y. (2019). Fully integrated and slidable paper-embedded plastic microdevice for point-of-care testing of multiple foodborne pathogens. *Biosensors and Bioelectronics*, 135, 120 - 128.

30. Bu, T., Huang, Q., Yan, L., Zhang, W., Dou, L., Huang, L., & Zhang, D. (2019). Applicability of biological dye tracer in strip biosensor for ultrasensitive detection of pathogenic bacteria. *Food Chemistry*, 274, 816 - 821.

31. Shin, J. H., Hong, J., Go, H., Park, J., Kong, M., Ryu, S., Kim, K. P., Roh, E., & Park, J. K. (2018). Multiplexed Detection of Foodborne Pathogens from Contaminated Lettuces Using a Handheld Multistep Lateral Flow Assay Device. *J. Agric. Food Chem.*, 66, 290-297.

32. Urusov, A. E., Zherdev, A. V., & Dzantiev, B. B. (2019). Towards Lateral Flow Quantitative Assays: Detection Approaches. *Biosensors*, 9, 89.

33. Cheng, N., Song, Y., Zeinhom, M. M. A., Chang, Y. C., Sheng, L., Li, H. & Lin, Y. (2017). Nanozyme-Mediated Dual Immunoassay Integrated with Smartphone for Use in Simultaneous Detection of Pathogens. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 9, 40671-40680.

34. Chen, L., Zhang, X., Zhou, G., Xiang, X., Ji, X., Zheng, Z. & Wang, H. (2012). Simultaneous Determination of Human Enterovirus 71 and Coxsackievirus B3 by Dual-Color Quantum Dots and Homogeneous Immunoassay. *Anal. Chem.*, 84, 7, 3200 - 3207.

35. Yin, B., Wang, Y., Dong, M., Wu, J., Ran, B., Xie, M. & Chen, Y. (2016). One-step multiplexed detection of foodborne pathogens: Combining a quantum dot-mediated reverse assaying strategy and magnetic separation. *Biosensors and Bioelectronics*, 86, 996 - 1002.

36. Xu, L., Callaway, Z. T., Wang, R., Wang, H., Slavik, M. F., Wang, A., & Li, Y. (2015). A Fluorescent Aptasensor Coupled with Nanobead-Based Immunomagnetic Separation for Simultaneous Detection of Four Foodborne Pathogenic Bacteria. *Transactions of the ASABE*, 58(3), 891-906.

37. Lee, W. I., Park, Y., Shrivastava, S., Jung, T., Meeseepong, M., Lee, J. & Lee, N. E. (2020). A fully integrated bacterial pathogen detection system based on count-on-a-cartridge platform for rapid, ultrasensitive, highly accurate and culture-free assay. *Biosensors and Bioelectronics*, 152, 112007.

38. Zeinhom, M. M. A., Wang, Y., Song, Y., Zhu, M. J., Lin, Y., & Du, D. (2018). A portable smart-phone device for rapid and sensitive detection of E. coli O157:H7 in Yoghurt and Egg. *Biosensors and Bioelectronics*, 99, 479 - 485.