식중독 세균 신속검출 기술 동향

Recent rapid detection techniques for foodborne pathogens

장혜진, 채창훈, 오세욱*

Hye-Jin Jang, Changhoon Chai, Se-Wook Oh*

국민대학교 식품영양학과

Department of Food and Nutrition, Kookmin University

현대인이 누구나 추구하는 건강한 삶을 유지하기 위해서는 식중독세균이 없는 식품만을 섭취해 식중독을 원천적으로 차단하는 것도 좋은 방법이다. 샐러드와 같은 식품에 대한 식중독세균 신속검출 기술은 식중독을 사전에 예방할 수 있는 기술로서 건강한 사회구현을 위한 공공복지 기반기술이라고 할 수 있다.

식중독세균 검출은 선택배지로 판정하는 방법이 표준방법(gold standard)이지만 배양에 시간이 너무 많이 소요되어 예방차원의 식품안전 관리가 어렵다. 이에 대한 대안으로 식중독균 신속검출 기술이 개발되고 있는데 주로 양성으로 의심되는 균(presumptive colony)을 신속하게 선발(screening) 하게 되며 이후 양성으로 의심되는 균에 대해서만 생화학적 방법과 선택배지를 이용하여 확인, 판정한다.

식중독균 신속검출기술은 크게 생화학적 방법, 항체를 이용한 방법, 핵산을 이용한 방법으로 나눌 수 있다.

1. 생화학적 방법

미생물의 생화학적 특성을 이용하는 방법으로 1980년대부터 개발되기 시작하였다. 보통 18-24시간이 소요되며 90-99%의 정확도를 가지며 자동시스템으로 개발된 것이 많다. Fatty acid profile과 같이 구성성분이나 carbon oxidation profile과 같이 대사특성을 분석대상으로 한다. Biomerieux사의 API system, Vitek이 있으며 95종의 carbon source를 이용한 Biology system이 있으며 지방산 조성을 분석하는 MIDI system이 있다.

2. 항체를 이용하는 방법

1985년 영국과학자인 John R. North에 의해 바이오센서가 처음으로 개발된 이후 화학적/생물학적 위해물질 및 질병을 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 검출하는 기법에 대한 연구가 활발하다. 특히 항원-항체반응 즉 면역반응을 기

* Corresponding author: Se-Wook Oh
Department of Food and Nutrition, Kookmin University,
77 Jungneung-ro, Sungbuk-gu, Seoul, 136-702. Korea
Tel: +82-2-910-5778 e-mail: swoh@kookmin.ac.kr

반으로 하는 면역센서의 개발은 미생물, 생물학적 독소, 호르몬, 질병대사체 등 다양한 유기물의 검출을 가능하게 하였으며, 이에 따라 식품위생, 질병진단 및 관리를 용이하게 하였다.

면역센서는 센서표면에 존재하는 면역인지인자 (항체)와 분석대상간의 항원-항체반응을 광학적 또는 전기화학적 신호로 전환하여 대상물질을 검출한다. 신호전달의 방법에 따라 광학적, 전기화학적, 물리적 면역센서로 구분될 수 있으며, 광학적 면역센서의 일종인 lateral flow immunochromatographic assay는 임신진단 키트를 통해 대중에게 가장 널리 알려진 면역센서라 할 수 있다. 또한 다른 형태의 광학적 면역센서인 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)는 실험실 환경에서 다양하게 활용되어 바이오테크놀로지의 발전에 이바지 하였다.

식품 위해물질의 신속하고 정확한 검출은 오염식품 소비를 차단하는 궁극적 방법으로써 식품안전관리에서 가장 중요한 부분을 차지한다. 따라서 면역센서의 신속성과 정확성은 현재 면역센서 개발연구의 중심을 차지하고 있다. 또한 식품안전관리는 생산공정 중 품질관리에 한정되지 않고 식품의 유통 및 소매 과정을 포함함에 따라 분석의 용이성은 최근 면역센서 개발의 중요 요소로 판단되며, 연구되고 있다. Lateral flow immunochromatographic assay는 분석 용이성이 뛰어나 널리 보급된 반면 신속성과 정확성에 문제를 나타내고 있다. 그리고 ELISA 기법은 정확성이 우수하여 피코 또는 펨토 수준의 분석이 가능하지만 분석 용이성과 신속성이 떨어져 식품의 유통 및 소매 과정에 적용되지 못하는 실정이다.

최근 infrared spectroscopy 및 raman spectroscopy 등 진화된 분석기법을 면역센서에 적용하여 펨토 수준의 대상물질을 30 분 미만에 검출하는 연구가 보고되고 있으며, 또한 분석의 용이성을 위해 분석의 자동화, 소형화에 대한 연구가 활발하다. 특히 다양한 전기화학적 기법 및 마이크로채널 기법의 융합을 통해 전처리 없이 대상물질을 자동으로 검출할 수 있는 면역센서의 개발이 이루어지고 있다. 더불어 무선통신의 발전과 함께 식품의 유통 및 소비 단계에서 면역센서를 통한 식품위생 분석결과의 실시간 정보 공유와 결과취합을 통해 효율적이고 체계적인 식품위생관리가 가능해질 것으로 판단된다.

3. 핵산을 이용하는 방법

핵산을 이용하는 신속검출법은 먼저 RNA hybridization을 이용한 GeneQuence System이 있다. 이는 DNA 보다 copy 수가 1,000배 이상 많은 ribosomal RNA를 검출목표로 하고 있어 저농도의 균 검출이 가능하다는 장점이 있다. Capture probe는 목적하는 균의 rRNA와 결합하고 발색효소가 달린 detector probe가 다른 쪽과 결합하면 발색 정도에 차이가 나므로 이를 이용하여 목적하는 균을 검출할 수 있다. 다음으로는 최근 pathogen 검출기술로 가장 많이 사용되는 polymerase chain reaction(PCR)이 있다. PCR은 denaturing, annealing, polymerization의 과정을 거쳐서 수행된다. PCR은 검출한계(Detection limit)가 낮아 효율적인 검출기술이지만 증폭반응 후 agarose gel을 이용하여 분리, 검출하므로 검출시간이 오래 걸릴 수 있다. 이에 대한 대안으로 개발된 것이 real-time PCR이다. Real-time PCR은 PCR 반응초기에 specific한 probe에 의한 발광반응을 기반으로한 검출이 가능하므로 PCR 수행시간을 단축할 수 있으며 또한 증폭과 함께 검출이 가능하므로 agarose gel 없이 바로 검출할 수 있다. 현재 시중에 활발하게 개발되어 판매되고 있는 것은 등온증폭기술을 이용한 검출기술로서 loop-mediated isothermal amplification(LAMP)을 기반기술로 하며 단시간 내에 대폭적인 유전자 증폭이 가능한 기술이다.

4. 항체의 specificity 증진 기술

식중독 세균에 대한 높은 선택성(specificity)을 가지는 항체를 이용하면 신속검출 기술이 크게 개선될 수 있다. 선택성을 증진시키는 기술로서 aptamer를 이용한 방법과 *in vitro* evolution 항체 기술이 활발하게 개발되고 있다.

4-1. Aptamer

Aptamer는 "꼭 들어 맞다"는 라틴어에서 유래하였으며 크기가 매우 작은 저분자화합물로부터 단백질까지 여러 종류의 표적 리간드에 높은 친화성으로 특이적으로 결합할 수 있는 작은(보통 20-60 nucleotide) 단일가닥 핵산을 의미한다. Aptamer는 Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment(SELEX)에 의해 선별, 개발되는데, 현재 원천특허가 만료되어 이를 이용한 기술개발이 진행될 수 있다. Aptamer는 항체와는 다르게 화학적으로 합성할 수 있으며 다양한 변형도 가능하며 단백질이 아니기 때문에 열에 안정하다. 또한 크기 및 소수성(hydrophobicity) 조절에 의해 약물 동력학적 성질을 조절할 수 있다. Aptamer는 일반적으로 10^{14-15} 정도의 다양성을 가지는 library로부터 선발되기 때문에 선택성(specificity)을 증진시킬 수 있다.

4-2. Display 기술

*In vitro*에서 항체를 생산하는 기술로서 display 기술이 사용된다. Ribosome display와 mRNA display가 사용된다. Ribosome display는 stop codon을 제거한 mRNA를 제작하여 다양한 mRNA-protein-ribosome complex를 형성하여 library를 제작하고 이후 target ligand(pathogenic determinant)를 이용하여 선발한다. 이후 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하고 이 nucleotide를 이용하여 항체를 제작한다.

mRNA display는 tRNA analog인 antibiotics인 puromycin을 mRNA와 연결하여 translation을 정지시켜 다양한 mRNA-puromycin-protein complex를 형성하여 다양한 library를 제작한다. 이후 target 항원과 반응시켜 specificity가 높은 nucleotide를 선발하며 이후 cDNA로 제조하여 선택성(specificity)이 높은 항체를 선발한다. Ribosome display와 mRNA display의 가장 큰 장점은 항체선발에 사용되는 library가 10^{15} 정도로 매우 넓다는 점이며 *in vitro*에서 진행될 수 있다는 점이다. 이에 비해 phage와 bacterial display는 10^{10} 정도의 library size를 가지고 있어 ribosome display와 mRNA display에 비하여 다양성이 낮다. 또한 *in vitro* system 이므로 mutagenesis가 수월하다는 장점도 있다.

5. 등온증폭기술을 이용한 검출기술

PCR(Polymerase Chain Reaction)은 선택성이 우수하고 신속한 분석방법이지만 반응 동안에 주기적으로 온도를 변화 시켜 주어야 한다. 온도 변화 없이도 등온에서 DNA 증폭이 가능한 기술을 등온증폭기술이라고 한다. 등온증폭기술은 온도를 변화할 시간이 필요 없기 때문에 단시간 내에 대량의 DNA 증폭이 가능하여 식중독균 신속검출 기술로서 활용도가 높다. 대표적인 것이 loop-mediated isothermal amplification (LAMP)인데, LAMP는 4-6개의 primer를 이용하여 특정한 target sequence를 증폭하는 기술로서 magnesium pyrophosphate이나 SYBR green을 첨가하면 증폭 후 눈으로도 핵산 증폭 판정이 가능하기 때문에 향후 현장용 신속검출기술에 응용가능성이 매우 높다.

여러 가지 다양한 등온증폭기술이 개발되었는데, NASBA(Nucleic Acid-Sequence-Based Amplification), TMA(Transcription Mediated Amplification), SMART(Signal Mediated Amplification of Rna

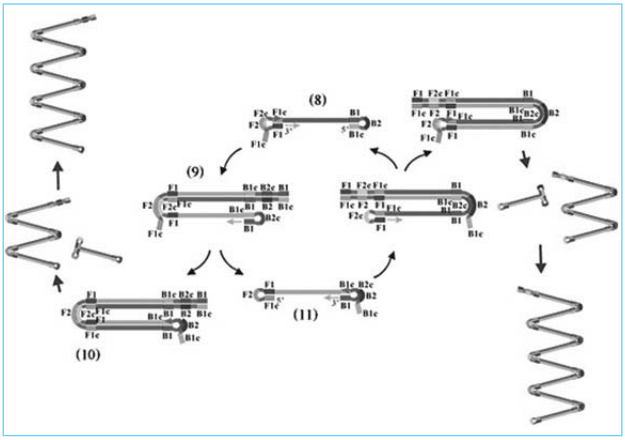

Fig. 1. 등온증폭 일종인 loop-mediated isothermal amplification (LAMP)에 의한 특정 sequence 증폭

Technology), SDA(Strand Displacement Amplification), RCA(Rolling Circle Amplification), LAMP(Loop-mediated isothermal amplification), IMDA(Isothermal Multiple Displacement Amplification), HDA (Helicase-Dependent Amplification), SPIA(Single Primer Isothermal Amplification), cHDA(circular Helicase-Dependent Amplification)이 있다.

NASBA와 TMA의 경우 RNA template을 사용하여 cDNA 합성 후 self-sustained에 의해 다시 RNA를 합성해내는 반응을 반복하여 증폭하는 방법이다. SMART의 경우 target에 의존하는 방법으로 온도 변화 없이 target DNA나 RNA를 증폭시켜 검출할 수 있는 방법이다. SDA의 경우 4개의 primer를 필요로 하며 제한효소를 사용, HincⅡ의 인지 염기서열(GTTGAC)을 응용한 방법이다. RCA는 Φ29 DNA polymerase가 순환적으로 primer를 연장하여 고분자의 원형 핵산을 결과적으로 긴 가닥으로 증폭시키는 방법이다. RCA는 단단하게 결합하여 다른 등온 증폭 기술 중 DNA 진단에서 중요한 기반기술로 사용된다(Fig. 2). 최근 주목 받고 있는 방법으로 현재 유전검사부터 면역분석법, sequencing, SNP scoring, 유전발현 분석 등에 사용되고 있다. IMDA는 double-stranded nucleic acid에 양쪽으로 primer가 달라붙어 그대로 신장하는 방법이다. HDA는 helicase를 사용하여 단일가닥으로 분리시킴으로써 denaturation time이 따로 필요치 않고 모든 반응을 한 온도에서 시킬 수 있는 방법이다. SPIA는 RNA에서 cDNA가 합성되고 RNaseH에 의해 RNA가 제거되면서 SPIA용 primer가 붙으며 DNA polymerase에 의해 증폭이 일어난다. SPIA primer와 polymerase의 지속적인 증폭 반응을 통해 한 가닥의 cDNA에서 여러 가닥이 생성되는 방법이다. cHDA는 DNA polymerase와 helicase를 함께 사용하는 기술로 한 온도에서 모든 반응을 시키는 방법이다.

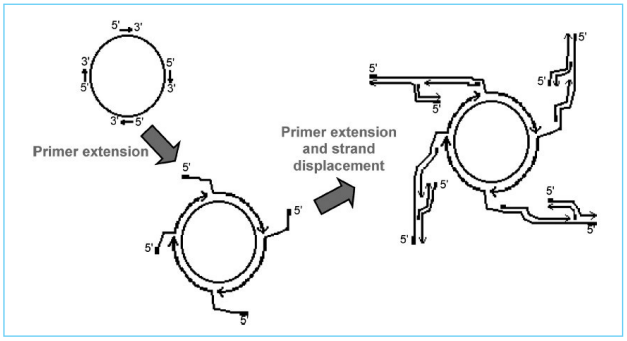

Fig. 2. RCA(Rolling Circle Amplification)

6. 정말 실질적인 신속검출 기술이라고 할 수 있을까?

현재, 시중에는 realtime PCR kit, 등온증폭방법을 이용한 kit(LAMP), 항체를 이용한 kit 등이 신속검출 kit로 판매되고 있다. 이러한 kit는 3시간 이내에 특정 식중독균의 존재 여부를 파악할 수 있다. 그러나 거의 모든 kit는 전배양된 미생물배양액(enriched culture)을 이용하여 검출한다. 바로 이러한 전배양액을 제조하는데 10시간 이상이 소요되기 때문에 실질적인 검출시간은 최소한 10시간 이상이 소요된다(Fig. 3).

증균과정이 반드시 필요한 이유는 식품에 존재하는 미생물의 농도가 매우 낮기 때문이다. 즉, 식품공전에 따른 양성, 음성 기준은 식품 시료 25g을 기준으로 전배양과정을 거친 후 판정하게 된다. 따라서 신속검출기술로 검출해야 할 농도, 즉 식품에 존재하는 식중독균의 최소농도는 1 cfu/25g이라고 할 수 있다. 이때 225 mL의 enrichment broth를

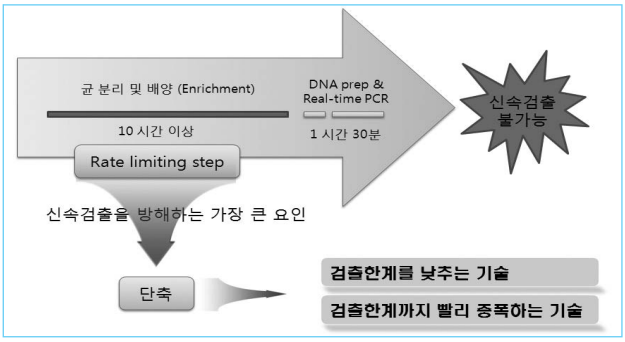

Fig. 3. 실질적인 신속검출 기술이 불가능한 이유 및 이를 극복할 수 있는 기술

넣고 균질화 하므로 식중독균 농도는 0.004 cfu/mL 수준이 되어 어떠한 검출기술로도 검출이 불가능하다. 바로 이러한 이유 때문에 반드시 증균과정이 필요하며 검출기술의 검출한계까지 배양하는데 보통 10시간 이상이 소요된다. 따라서 신속검출기술의 가장 큰 장애요인(rate-limiting step, committed step)이 되며 바로 이 시간을 단축하는 것이 신속검출의 핵심이라고 할 수 있다.

그러면 이러한 장애요인은 어떻게 극복할 수 있을까?

첫째는 검출한계를 현재보다 대폭적으로 낮춘 분석기술 개발이다. 이는 검출한계를 낮출 수 있다면 검출한계까지 증균시키는 시간을 대폭적으로 단축할 수 있기 때문에 신속검출이 가능하다. 현재까지는 알려져 있는 pathogen 신속검출 기술 중 가장 낮은 검출한계를 가지고 있는 기술은 PCR이다. Real-time PCR은 buffer나 물에서는 10^1-10^2 cfu/mL의 검출한계를 나타내며 식품에서는 10^2-10^4 cfu/mL 수준의 검출한계를 나타낸다. 따라서 PCR 기술보다 검출한계가 낮은 새로운 분석기술을 개발하는 것이 필요하다.

둘째는 식품에 극미량으로 존재하는 식중독균을 순수분리하거나 검출한계 이상까지 신속하게 증가시키는 농축기술 개발이라고 할 수 있다. 식중독균을 순수 분리하는 과정 자체가 많은 시간이 소요된다. 균을 식품과 분리하기 위해서 원심분리관에 density gradient를 만들어 균만을 식품과 분리하여 띄우거나 (buoyant density centrifugation), 바닥에 위치시키는 물리적 기술이 시도되고 있으나 상업적으로 이용하기에는 아직 많은 연구가 필요하다.

식중독균을 검출한계 이상까지 신속하게 증균하기 위해서는 새로운 배지의 개발이나 배양조건 확립이 필요하다. 한편, 미생물은 최대증식속도 한계가 있기 때문에 미생물 대신 핵산을 분리하여 핵산을 증폭시키는 방법(Whole genome amplification)도 시도되고 있다.

참고 문헌

1. Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies-A review. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2008. 27:3. 224-243

2. Karami A, Gill P, Motamedi MH, Saghafinia M. A review of the current isothermal amplification techniques: Applications, advantages and disadvantages. J Global Infect Dis. 2011. 3. 293-302.

3. Swaminathan B, Feng P. Rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. Annual Reviews in Microbiology. 1994. 48. 401-426.

4. Kong RYC, Lee SKY, Law TWF, Wu RSS. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. Water Research. 2002. 36. 2802-2812.

5. Yang L, Bashir R. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. Biotechnology Advances. 2008. 26. 135-150.