수산물 및 수산현장에서의 식중독 미생물 분자진단을 위한 현장형 수산물 전처리 기술

The field-type seafood pretreatment technology for molecular diagnosis of foodborne pathogens in seafood and fishery on-site.

박슬기[1], 조경진[2], 강민균[2], 조두민[2], 김영목[2*]

Seul-Ki Park[1], Kyung-Jin Cho[2], Min-Gyun Kang[2], Du-Min Jo[2], Young-Mog Kim[2]

[1]부경대학교 식품연구소, [2]부경대학교 식품공학과

[1]Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 48513, Korea
[2]Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

서론

최근 국민 소득증가에 따라 삶의 질이 높아지면서 식품의 가치는 단순 영양분 섭취 뿐 아니라 건강증진 효과를 기대하게 되었으며 이에 따라 소비자의 수준 높은 식품 안전에 대한 니즈가 발생하여 사회적 관심도 증대되었다 (조승용[4]). 특히, 수산물의 경우 수분함량이 평균적으로 70~85%이며 수분활성(Aw)이 0.9~1.0으로 미생물이 생장하는데 적절한 환경으로 구성되어 있어 미생물에 대한 위생학적 취약점을 가지고 있다 (조신호 등[5]). 수산물은 어종, 어획시기, 연령 및 영양 상태에 따라 지질 함량의 차이가 있으나 대부분 축산물에 비해 포화지방산보다 EPA (Eicosapentaenoic acid) 및 DHA (Docosahexaenoic acid)와 같은 불포화지방산 함량이 높아 비교적 지방의 산패가 빠르게 일어날 수 있다 (조신호 등[5]). 또한 수산물은 개체의 크기가 작고 종류가 다양하며 수가 많아 위생관리에 어려움을 겪고 있으며 생산 및 유통과정이 위생적으로 열악하여 미생물학적 위해가 발생할 가능성이 높다 (Yoo et al.[16]). 수산물의 생산 및 유통과정 중 발생할 수 있는 미생물학적 위해요소들에 대해 다양한 분석 및 진단 방법이 개발되어 있지만, 현장에서 신속하게 오염도를 진단할 수 있는 방법은 제한적이다. 일반적으로 미생물학적 위해요소 분석을 위해 전통적인 배양에 기반한 방법을 주로 사용하였으나, 최근에는 분자진단 기술의 발달로 인해 유전자 분석을 활용한 기술이 다양하게 개발되고 있다 (Mortari et al.[13]). 특히, 특정 유전자 증폭기술을 기반으로 하는 PCR (Polymerase Chain Reaction)과 같은 기술은 분석 결과가 정확하지만 높은 비용의 장비와 시약을 필요로 하고, 전처리와 실험 수행에 많은 시간이 소요될 수 있으며, 관련 분야의 전문가가 실험 수행 및 결과를 분석해야 하는 단점을 갖는다.

최근에는 분자진단을 기반으로 하는 등온증폭법이 개발되었으며 이는 PCR과 같은 진단에 사용되는 Thermocycler 등 고가의 장비가 필요하지 않으며 하나의

* Corresponding author: Young-Mog Kim
Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea
Tel: +82-51-629-5832 Fax: +82-51-629-5824 E-mail: ymkim@pknu.ac.kr

온도조건에서 유전자 증폭이 가능해져 많은 분야에 적용되어 연구되고 있다(Lee et al.[11]). 또한 등온증폭법에 분자비콘을 접목하여 증폭 시 발색 정도에 따라 증폭여부를 판별할 수 있는 기술도 개발되었다. 따라서 본 연구에서는 등온비색법을 이용한 수산물 및 수산 환경 중의 미생물학적 위해요소 신속 검출 기술개발을 위한 전처리 기술의 제시와 연구 필요성에 대해서 기술하고자 한다.

본론

1. 국내 수산물의 생산현황

2015년부터 2019년까지 최근 5년간 우리나라의 어업별 수산물 총 생산량은 증가하는 추세이며, 2019년 기준 3,830 천톤으로 2015년 대비 약 14% 증가하였다 (표 1). 어업별 수산물 생산량은 최근 5년간 연근해어업이 약 -7%, 원양어업이 약 -4%로 전체 생산량 중 차지하는 비중이 감소하고 있으며 양식어업은 약 11%가 증가하여 총 수산물 생산량 중 차지하는 비중이 점차 증가하고 있다. 이는 소비자의 수산물 소비 및 요구량이 증가하여 전체 수산물 생산량이 증가하는 것으로 분석되며 그 중 가격이 안정적이며 위생적으로 관리 가능한 양식어업 수산물의 시장성이 높아지는 것으로 판단된다.

2. 국내 수산물 위생관리 기준 및 현황

국내 수산물 안전관리 현황은 출하 전 · 후로 나누어 관리하고 있으며, 출하 전 단계(생산 단계)에서는 해양수산부와 지방자치단체의 생산 담당부서가 안전성조사를 실시하고 있다. 출하 후 단계에서는 식품의약품안전처와 지방자치단체 위생 담당부서에서 유통 중인 수산물을 채취하여 수거검사를 수행하고 있다 (이주형[3]). 출하 전 · 후로 수산물 안전성을 관리하고 있지만, 유통단계 안전성 검사의 소요시간이 길어 부적합을 확인한 시점에는 소비되어 회수 및 폐기가 어려운 경우가 발생한다. 또한 수산물의 생산 및 유통업체 측에서도 안전성 검사 부적합에 따른 회수 및 폐기는 매출과 이익에 영향을 줄 수 있기 때문에 이를 대비하기 위해 산업현장에서 미생물학적 위생관리를 자체적으로 할 수 있는 신속 현장형 진단 시스템이 필요하다.

3. 국내 수산물 생산 단계의 제도적 관리 항목

생산단계 수산물 안전관리 대상은 연간 500톤 이상 다소비 품종으로 선정하여 관리하고 있으며, 생산단계 양식장 등의 해수면 양식수산물 (넙치 등 22종), 내수면 양식수산물 (뱀장어 등 10종)과 저장단계 창고 등의 원양어획물 (상어류 등 12종), 거래 전 단계 위 · 공판장 등의 연근해어획물 (고등어 등 33종) 및 비식용수산물 (가리비 패각)을 포함해 총 78개 품목을 관리하고 있다 (표 2).

4. 국내 수산물 출하 전 단계의 유해물질 조사

국내 수산물은 생산 · 출하 단계부터 안전성 조사를 실

표 1. 최근 5년간 어업별 수산물 생산량 현황

단위 : 천톤

연도	총 생산량		연근해어업		양식어업		원양어업		내수면어업	
	물량	비중	물량	비중	물량	비중	물량	비중	물량	비중
2015	3,337	100	1,058	31.7	1,668	50.0	578	17.3	33	1.0
2016	3,269	100	908	27.8	1,872	57.3	454	13.9	35	1.0
2017	3,725	100	927	24.9	2,316	62.2	446	12.0	36	0.9
2018	3,771	100	1,012	26.8	2,250	59.7	474	12.6	35	0.9
2019	3,830	100	915	23.9	2,372	61.9	508	13.3	35	0.9

참고문헌 : 통계청[6], 해양수산부[7]

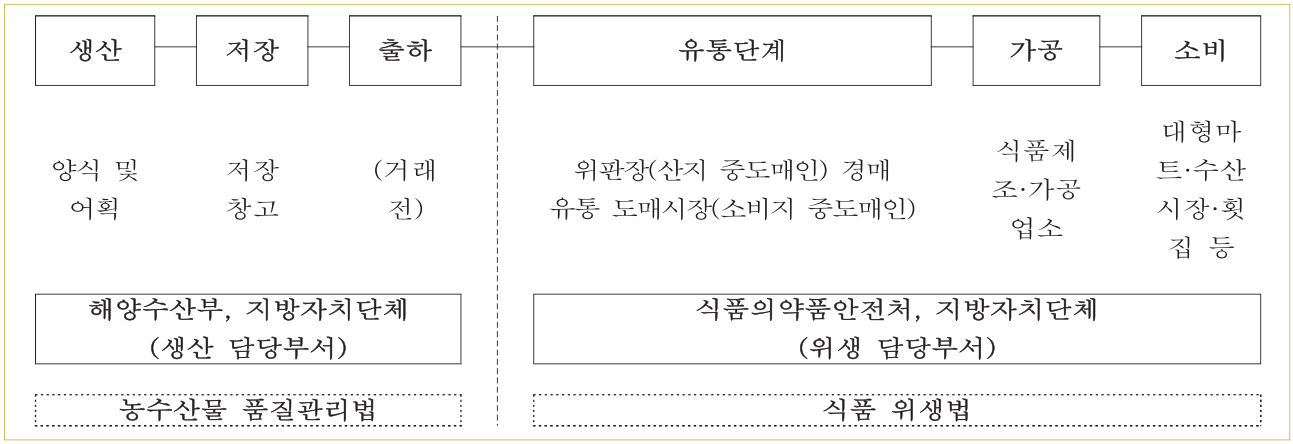


그림 1. 수산물의 안전관리체계

참고문헌 : 감사원[1]

표 2. 생산단계 수산물 안전관리 조사대상 품목 현황

조사단계	어업별 (개수)	품종	품목
생산단계	해수면양식 (22)	어류(7)	강도다리, 감성돔, 넙치, 농어, 숭어, 조피볼락, 참돔
		패류(6)	굴, 바지락, 전복, 피조개, 진주담치, 꼬막
		갑각류(1)	흰다리새우
		피낭류(3)	우렁쉥이, 미더덕, 오만둥이
		해조류(5)	김, 다시마, 미역, 톳, 파래
	내수면양식 (10)	어류(9)	가물치, 동자개, 메기, 미꾸라지, 뱀장어, 붕어, 송어, 잉어, 향어
	내수면양식 (10)	패류(1)	재첩
저장단계	원양어획 (12)	어류(11)	꽁치, 다랑어류(가다랑어 · 눈다랑어 · 황다랑어 등), 명태, 민어류, 상어류(귀상어 · 청상아리 · 청새리상어 · 흑기흉상어 · 환도상어 등)
		연체류(1)	오징어
거래 전 단계	해수면어획 (연근해, 33)	어류(14)	가자미류, 갈치, 고등어, 대구, 멸치, 방어, 붕장어, 삼치, 아귀, 옥돔, 전어, 전갱이, 참조기, 청어
		패류(4)	개조개, 홍합(자연산), 소라고둥류, 키조개
		연체류(7)	갑오징어, 낙지, 문어, 오징어, 주꾸미, 꼴뚜기, 화살오징어
		갑각류(4)	대게, 민꽃게, 붉은대게, 꽃게
		해조류(4)	다시마, 미역, 톳, 파래
	비식용(1)	–	가리비 패각
조사기관 공통			오염우려생산 해역(지역) 및 잠재적 위해요소 등으로 안전관리가 필요한 수산물

참고문헌 : 국립수산물품질관리원[2]

시함으로써 위생적인 수산물 생산체계를 구축하고 수산물의 사전 안전성을 확보하고자 출하 전 수산물 안전성 조사를 실시한다. 생산 단계의 국내 수산물은 국립수산물품질관리원에서 표 2와 같이 78개 품목에 대하여 식품의 기준 및 규격 등에 따라 총 97개 조사항목의 기준 적합 여부를 검사하고 있다 (표 3). 그 중 미생물 검사 항목은 6종으로

표 3. 출하 전 수산물 유해물질 조사항목

물질별 (개수)	조사항목(93개)
중금속(4)	총수은, 납, 카드뮴, 메틸수은
유기물질(4)	다이옥신, 벤조피렌, 다환방향족탄화수소, 유기성화합물
항생물질(49)	옥시테트라사이클린 등 동물용의약품
미생물(6)	대장균, 장염 비브리오균, 세균 수, 살모넬라, 황색포도상구균, 리스테리아 모노사이토제네스
독소(4)	마비성 · 설사성 · 기억상실증 패류독소, 아플라톡신B1
방사능(2)	요오드, 세슘
금지물질(6)	말라카이트그린, 클로람페니콜, 니트로푸란 대사물질 및 제제, 크리스탈바이올렛 등
잔류농약(4)	엔도설판, 디코폴, 델타메쓰린, 페노뷰카브
기타물질(14)	멜라민, 프라지콴텔, 비치오놀, 데하이드로콜산, 이소유게놀 등

참고문헌 : 국립수산물품질관리원[2]

대장균, 장염 비브리오균, 세균 수 및 병원성 미생물 3종(살모넬라, 황색포도상구균, 및 리스테리아 모노사이토제네스)에 대해 분석하고 있다. 출하 전 수산물의 대상 시료를 채취 · 분석하고 수산물 유해물질 검사 결과 부적합의 경우에 출하를 연기하여 안전성 재조사를 실시하며 재조사에도 부적합일 경우 용도 전환 및 폐기 과정을 수행한다.

5. 현장형 미생물학적 위해요소 검출 기술 개발 현황

현장에서 미생물학적 위해요소로부터 식품의 안전성을 확보하기 위하여 ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay), LFA (Lateral Flow Assay)와 같은 면역분석법과 PCR, 고리매개등온증폭법 (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)과 같은 분자진단법 등의 다양한 분석법이 개발되고 있다 (Law et al.[10]). 하지만 표 4와 같이 기존의 검출기술들은 일부 단점을 나타내고 있다. LFA의 경우 항원-항체 반응을 신속하게 측정하는 방법으로 단시간 내에 결과분석이 가능하지만 다른 분석방법에 비해 민감도가 낮아 현장에 적용이 어렵고 (Park et al.[14]), PCR의 경우 적은 양의 시료를 이용하여

표 4. 기존의 미생물 신속 검출 기술의 단점

신속검출 기술	단점	참고문헌
면역분석법 기반	특이적 항원 확보에 많은 시간이 소요됨	Zhang[18]
	항체의 안전성이 낮음	Park et al.[14]
	민감도가 낮음	Zhao et al.[17]
	시료 및 외부성분이 방해인자로 작용함	
분자진단법 기반	고가의 장비가 필요	Mandal et al.[12]
	반응 및 결과도출에 시간이 소요됨	Zhang[18]
	현장에서의 분석이 어려움	Park et al.[14]

고감도 분석이 가능하지만 고가의 장비가 요구되며, 반응 및 결과 해석에 전문인력이 필요하다 (Zhang[18]). 최근 등온증폭법을 응용한 등온비색 증폭법이 개발되었으며 이는 양성 반응과 음성 반응을 결과물의 색으로 구분할 수 있도록 개발된 방법이다 (Zhao et al.[17]). 본 방법은 등온증폭법과 같이 DNA 염기서열을 하나의 온도조건에서 증폭하기 때문에 고가의 Thermocycler가 요구되지 않는다. 또한 양성반응 시 분자비콘을 활용하여 비색반응이 나타나기 때문에 육안으로도 양성과 음성을 판정할 수 있다는 장점이 있다 (Zhao et al.[17]). 따라서 본 연구에서는 수산물 및 수산 환경 중 미생물학적 위해요소를 등온비색법을 이용하여 검출할 수 있는 현장형 신속진단 기술을 위한 전처리 기술을 제시하고자 한다.

6. 수산물의 분자진단 기술 적용을 위한 전처리 기술 개발

6-1. 시료 중 염 농도에 따른 위음성 결과의 가능성

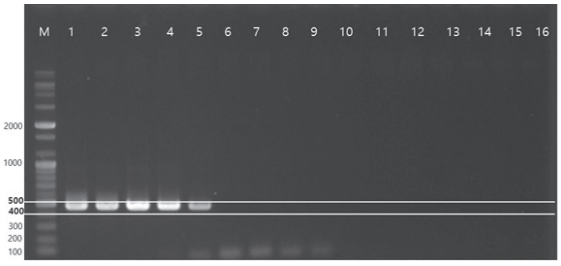
수산물은 시료 중 포함된 염 농도가 높아 분자생물학적 검출 시 유전자 증폭 효소 활성을 낮추고, 방해하는 요인으로 알려져 있다(Mandal et al.[12]). DNA 시료 중 잔류하는 염 농도가 PCR 결과에 미치는 영향을 분석하기 위해 비브리오 패혈증균을 DNA extraction Kit(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 DNA 추출한 후 염 농도

표 5. 비브리오 패혈증균 분석용 primer 및 PCR 조건

Target Organisms	Oligonucleotide sequence	PCR conditions		Size (bp)	소요시간 (h)
Vibiro vulnificus	CAGCCGGACGTCGTCCATTTTG	94℃ 5 min	1 cycles	484	1.37
	ATGAGTAAGCGTCCGACGCGT	94℃ 40 sec 60℃ 40 sec 72℃ 40 sec	30 cycles		
		72℃ 4 min	1 cycles		

표 6. 염도에 따른 비브리오 패혈증균의 PCR 증폭 결과 및 전기영동 사진

염도(%)	결과	염도(%)	결과
0.0		0.8	
0.1		0.9	
0.2	+	1.0	
0.3		1.1	
0.4		1.2	−
0.5		1.3	
0.6	−	1.4	
0.7		1.5	



를 0.0~1.5%(w/w)까지 설정하여 PCR을 수행하고 전기영동을 통해 전형적인 증폭 밴드를 확인하였다. PCR은 AccuPower® PCR Premix(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 수행하였으며 비브리오 패혈증균 분석을 위해 표 5의 조건으로 진행하였다 (Kim et al.[9]).

분석결과 염 농도 0.4%(w/w)까지는 PCR을 통하여 특이적 밴드가 증폭되는 것을 확인하였으며 0.5% 이상의 염 농도에서는 DNA polymerase의 활성이 저해되어 증폭되지 않는 위음성 결과가 도출되었다 (표 6). 이 결과는 시료 중 염 농도가 전처리 과정 이후 잔류할 경우 DNA 기반의 분자진단 기술에서 위음성 결과가 나타날 수 있음을 나타낸다. 또한 현장형 신속진단 기술을 위해서는 열악한 환경의 현장에서 신속하게 염을 제거하고 DNA 추출하는 과정이 필요하다고 판단된다.

6-2. 현장형 신속진단 기술 개발을 위한 DNA 추출 및 탈염 과정

수산물 및 수산현장의 미생물학적 위해요소의 현장형 신속진단을 위해 수산물 시료의 증균, 탈염 및 DNA 추출이 동시에 전처리 과정에 포함되어야 한다. 또한 전처리 이후 시료의 염 농도는 0.4% 이하로 탈염이 진행되어야 하며 등온비색법 검출에 있어 양성 반응이 나타나야 한다. 따라서 아래 그림 2와 같은 전처리 방법을 제안하여 모식도로 나타내었으며 모식도에 따라 탈염과 DNA 추출을 수행하였다. 또한 최종 추출된 DNA를 이용하여 분자진단법에 적용 가능성을 검증하기 위하여 conventional PCR을 이용하였다.

6-3. 현장형 전처리 기술을 적용한 시료의 염 농도 측정

동해권(포항) 및 남 · 동해권(부산, 통영) 지역의 전통시장에서 총 16개 패류 시료를 채취하였다. 채취한 패류 시료는 4℃ 이하로 보관하여 24시간 이내에 실험실로 운송하였다. 채취된 시료의 염 농도 측정 결과는 표 7과 같으며 종류에 따라 다양한 염 농도 결과를 나타내었고 측정된

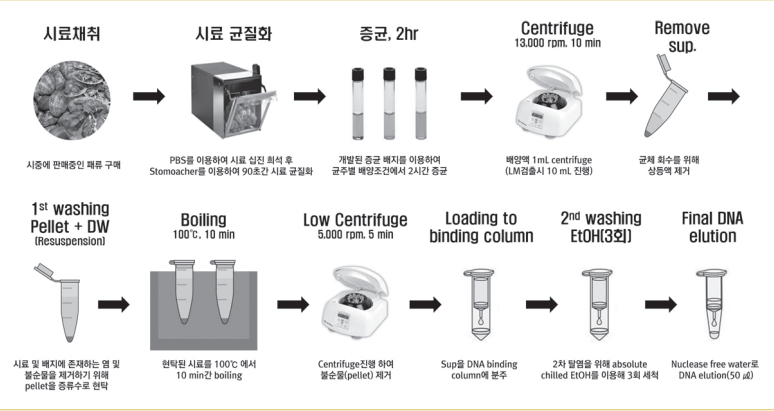


그림 2. 현장형 분자진단 기술의 적용을 위한 수산물 전처리 기술 개발

표 7. 수산물의 전처리 과정 진행 전, 후 염농도 측정 결과

지역	시료 명	초기 시료 염도(%)	추출된 DNA 염도(%)
부산	가리비	4.23 ± 0.02	0.00
	대합	4.25 ± 0.04	
	굴	3.47 ± 0.03	
	바지락	4.01 ± 0.01	
	홍합	6.62 ± 0.03	
포항	가리비	5.06 ± 0.01	
	굴	4.47 ± 0.01	
	웅피	5.03 ± 0.02	
	생합	3.89 ± 0.02	
	홍합	4.81 ± 0.05	
통영	가리비	4.16 ± 0.03	
	대합	5.08 ± 0.05	
	굴	3.94 ± 0.01	
	바지락	4.02 ± 0.01	
	홍합	7.27 ± 0.03	
	백합	4.13 ± 0.02	

염 농도의 범위는 약 3~7%로 나타났다. 그림 2에서 제시한 전처리 방법을 이용하여 시료의 탈염 및 DNA 추출을 진행하여 추출된 DNA의 염 농도를 측정한 결과는 표 7과 같이 모든 시료에서 0%로 측정되었다. 전처리 방법에 따라 수산물 중 염 농도는 모두 감소하는 것으로 확인되었으며, 분자생물학적 진단방법에 적용을 위한 *In-vitro* test를 진행하였다.

6-4. 현장형 전처리 기술로 추출한 DNA를 이용한 conventional PCR

분자생물학적 방법의 적용을 위해 conventional PCR에서 검출 여부를 시험 진행하였다. 채취된 패류시료에 병원성 비브리오 3종(*Vibrio vulnificus* ATCC 27562, *Vibrio cholerae* NCCP 14552, *Vibrio parahaemolyticus* NCTC 10903)을 최종농도 10^0, 10^1, 10^2 CFU/g 으로 접종하여 수산물 전처리 기술로 탈염 및 DNA 추출 과정을 수행하였다. 최종적으로 추출된 DNA를 이용하여 PCR을 수행하였으며 (표 8), 그 결과 10 CFU/g 수준의 식중독균 오염에서도 검출이 확인되었다 (표 9). 환경 중 오염되는 비브리오 균의 농도는 10^1~10^2 CFU/g의 범위로 나타난다고 보고된 바 있으며 (Kim et al.[8]) 이에 따라 현장에서 검출될 수 있는 균 농도인 10^0, 10^1, 10^2 CFU/g로 시료에 접종하여 인위적으로 비브리오 속에 오염된 시료를 제조하였다. 전처리 방법의 유의성 검토를 위해 PCR을 수행한 결과 모든 균 농도에서 양성으로 나타났으며, 음성대조구에서는 음성으로 나타났다 (표 9).

결론

본 연구는 수산물 중 다양한 종류의 패류를 이용하여 현장형 신속진단 기술의 적용을 위한 탈염과 DNA 추출을 포함하는 시료 전처리 기술을 제안하였으며, 분자생물학적 방법 중 가장 기초적인 conventional PCR을 이용하여 전처리 기술의 유의성을 검증하였다. 제안된 전처리 기술을 바탕으로 수산물에서 검출되는 미생물학적 위해요소의 현장형 신속 진단 시스템 개발의 기반을 마련하고자 하였다. 본 연구결과는 등온비색법을 이용한 수산물 및 수산환경 중 미생물학적 위해요소를 신속히 진단하고 검출하는데 적용될 수 있으며 복잡한 실험 과정과 결과 해석 등

표 8. 비브리오 속 3종 검출을 위한 primer 및 PCR 조건

Target Organisms	Oligonucleotide sequence	PCR conditions		Size (bp)	소요 시간 (h)	참고문헌
Vibiro vulnificus	CAGCCGGACGTCGTCCATTTTG	94℃ 5 min	1 cycle	200	1.4	Kim et al.[9]
	ATGAGTAAGCGTCCGACGCGT	94℃ 30 sec 60℃ 30 sec 72℃ 30 sec	50 cycles			
		72℃ 4 min	1 cycle			
Vibrio cholerae	CACCAAGAAGGTGACTTTATTGTG	94℃ 5 min	1 cycle	304	1.4	Nandi et al.[15]
	GGTTTGTCGAATTAGCTTCACC	94℃ 30 sec 64℃ 30 sec 72℃ 30 sec	50 cycles			
		72℃ 4 min	1 cycle			
Vibrio parahaemolyticus	CACCAGTAGCCGTCAATG	95℃ 5 min	1 cycle	484	2.09	Lee et al.[11]
	TAACTGCATTACTCCCGC	95℃ 30 sec 50℃ 30 sec 72℃ 40 sec	50 cycles			
		72℃ 4 min	1 cycle			

표 9. 비브리오 3종이 인위적으로 오염된 시료에서의 PCR 검출 결과

균주 명	시료에 오염된 최종 농도				
	NC[1]	PC[2]	10^0 CFU/g	10^1 CFU/g	10^2 CFU/g
Vibrio vulnificus ATCC 27562	−	+	+[3]	+	+
Vibrio cholerae NCCP 14552	−	+	+	+	+
Vibrio parahaemolyticus NCTC 10903	−	+	+	+	+

[1] NC, Negative control
[2] PC, Positive control
[3] +, positive

에 전문적 지식을 필요로 하는 경우를 가능한 배제하여 개발하였음으로 개발 기술의 현장적용이 용이할 것으로 판단된다. 이러한 현장적용형 전처리 기술은 기존 분자생물학적 기술의 한계를 보완할 수 있는 새로운 방법으로 제시될 수 있을 것으로 예상되며, 수산물뿐만 아니라 축산물 및 농산물에서도 적용이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2020년도 해양수산부의 '수산환경 및 수산물 중 미생물학적 위해요소 현장형 진단 시스템 개발(20200377)'의 지원으로 수행되었습니다.

참고 문헌

1. 감사원. 2018.「수산물 안전 및 품질 관리실태」
2. 국립수산물품질관리원. 2017.「2017년도 생산단계 수산물 안전성조사 업무 매뉴얼」
3. 이주형. 2019.「농 · 축 · 수산물의 생산단계 안전관리 제고를 위한 입법 · 정책과제」, 정책연구용역보고서, 국회입법조사처
4. 조승용. 2018.「식품안전문화 현황과 개선전략 연구」. 식품안전정보원
5. 조신호, 신성균, 박헌국, 송미란, 차윤환, 한명륜, 유경미, 2014, 식품화학, 교문사
6. 통계청. 2020.「어업생산동향조사」
7. 해양수산부. 2020.「해양수산 통계연보」
8. Kim, H.J., Lee, D.S., Lee, J.M., Kim, Y.M. and Shin, I.S. Bacteriological hazard analysis in minimally processed shellfish products purchased from Korean seafood retail outlets. *Korean J Fish Aquat Sci*, 51, 121–126 (2018).
9. Kim, H.J., Ryu, J.O., Lee, S.Y., Kim, E.S., Kim, H.Y. Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics. *BMC Microbiol*, 15, 1–11 (2015).
10. Law, J.W.F., Ab Mutalib, N.S., Chan, K.G., Lee, L.H. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front Microbiol*, 5, 770 (2015).
11. Lee, J.E., Mun, H., Kim, S.R., Kim, M.G., Chang, J.Y., Shim, W.B. A colorimetric Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay based on HRP-mimicking molecular beacon for the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biosens Bioelectron*, 151, 111968 (2020).
12. Mandal, P.K., Biswas, A.K., Choi, K., Pal, U.K. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. *Am. J. Food Technol*, 6, 87–102 (2011).
13. Mortari, A., Lorenzelli, L. Recent sensing technologies for pathogen detection in milk: A review. *Biosens Bioelectron*, 60, 8–21 (2014).
14. Park, S.H., Aydin, M., Khatiwara, A., Dolan, M.C., Gilmore, D.F., Bouldin, J.L., Ahn, S.H., Ricke, S.C. Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products. *Food Microbiol*, 38, 250–262 (2014).
15. Nandi, B., Nandy, R.K., Mukhopadhyay, S., Nair, G.B., Shimada, T., Ghose, A.C. Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein OmpW. *Journal of clinical microbiology*, 38, 4145–4151 (2000).
16. Yoo, M.Y., Kim, K.H., Lee, J.W., Yang, J.Y. Study on manufacture of enzyme biosensor for fishery freshness. *Food Indus Nutr*, 8, 28–33 (2003).
17. Zhao, X., Lin, C.W., Wang, J., Oh, D.H. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *J Microbiol Biotechnol*, 24, 297–312 (2014).
18. Zhang, G. Foodborne pathogenic bacteria detection: an evaluation of current and developing methods. *The Meducator*, 1 (2013).