J. Fd Hyg. Safety
Vol. 25, No. 4, pp. 376~387 (2010)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

신기술 이용 식중독균 신속검출법 개발 동향 분석

김현주 · 김용수[1] · 정명섭[1] · 오덕환[2] · 박경진[3] · 전향숙[4] · 하상도*
중앙대학교, [1]한국보건산업진흥원, [2]강원대학교, [3]군산대학교, [4]한국식품연구원

Trends in Rapid Detection Methods for Food-borne pathogenic Microorganisms by Using New Technologies

Hyun-Joo Kim, Yong-Soo Kim[1], Myung-Sub Chung[1], Deog-Hwan Oh[2], Gyung-Jin Bahk[3], Hyang-Sook Chun[4], and Sang-Do Ha*
Department of Food Science & Technology, Chung-Ang University, [1]Korea Industry Health Development Institute, [2]Kangwon National University, [3]Kunsan National University, [4]Korea Food Research Institute
(Received July 1, 2010/Revised August 26, 2010/Accepted September 30, 2010)

ABSTRACT - Recently, speedy, convenient and easy detection technologies have been developed rapidly and on the contrary, studies on development of traditional detectors applying biochemical characteristics has gradually been decreased. This review examined trend in current studies on detection of food-borne pathogenic microorganisms in the fields of selective media, immuno-assay, Polymerase Chain Reaction (PCR), microarray, terahertz spectroscopy & imagination and so on. Most traditional methods to detect the organisms from food matrix rely on selective media and such a method have disadvantages like long time requirement and distinguishing one species only from each selective medium although they are highly economical. Various new convenient methods such as Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay (ELISA), paper-strip kit, fluoroimmunoassay etc. have been developed. The most ideal method for detecting food-borne pathogenic microorganisms in foods should be accurate, convenient, rapid and economical. Additionally, it is needed that capabilities of quantitative analysis and automation to be applied to industries.

Key words : food-borne pathogenic microorganisms, rapid detection, selective media, immuno-assay, microarray

식품의 안전성 확보는 인류의 공통과제로 전 세계적인 표준화의 방향으로 추진되고 있다. WTO 체제와 국가 보호주의의 영향으로 식품안전성 확보를 위한 시스템의 표준화는 식품무역의 무기로 작용할 수 있게 되어 선진국에서는 막대한 투자를 아끼지 않고 있다.

식품의 안전성을 위협하는 요인은 미생물학적, 화학적 및 물리적 인자로 분류할 수 있다. 이들 중 미생물이 대부분을 차지하고 있으며, 특히 식중독 유발 병원성 세균에 의한 영향이 가장 크다고 할 수 있다. 미생물 검출에 가장 관심을 가지고 있는 분야는 식품산업이며, 현장에서는 병원성 미생물로부터 식품의 안전성을 확보하기 위하여 HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) 등을 도입하고 있다. 이러한 추세에 따라 식중독세균에 대한 검출 기술이 수준이 눈부시게 발전하고 있다.

*Correspondence to: Sang-Do Ha, Department of Food Science and Technology, Chung-AngUniversity,Ansung456-756, Korea
Tel: 82-31-670-4831, Fax: 82-31-675-4853
E-mail: sangdoha@cau.ac.kr

최근 신속・간편・편리한 검출기법의 개발이 급속하게 증가하고 있는 반면 생화학적 특성을 활용한 전통적인 검출방법 개발에 대한 연구는 점차 감소되는 추세이다. 그러나 선택배지를 사용한 전통적인 검출방법이 현재까지 국제적으로 식품의 미생물 기준을 규정하는 공식적인 분석방법으로 채택되어 있다. 식중독 세균의 신속검출법(rapid method)으로는 직접형광항체법, ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) 등이 흔히 사용되고 있으며, 최근에는 DNA hybridization과 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 이용한 유전자 검출 방법이 활발히 응용되고 있다. 그 중 PCR이나 DNA probe 등은 식품 중 유해미생물의 유전자를 직접 검출하는 방법으로 보통 ELISA 보다 특이적이며 신뢰성이 높은 검색법으로 알려져 있지만 식품 중에 존재하는 여러 가지 inhibitor에 대한 문제를 해결해야 하며 숙련된 기술과 고가의 장비가 필수적이어서 작업 현장에서 직접 사용하는 데는 아직도 많은 어려움이 있다.

본 고에서는 현재까지의 식중독 원인미생물 진단기술의 연구동향을 선택배지법, 면역기법, PCR 기법, microarray 기

법, 테라헤르츠 분광/영상을 이용한 검출법, 기타 원리의 방법 등으로 나누어 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

선택배지 분리법

선택배지를 사용한 전통적인 검출방법은 현재까지 국제적으로 식품의 미생물 기준을 규정하는 정해진 분석방법이며, 국제표준기구(AOAC, CEN, AFNOR, DIN 등)에서도 식중독세균 검출을 위한 표준시험방법(gold standard)으로 채택되어 있다[1,2].

국제적으로 통용되는 표준시험방법들은 일부 정량적 분석이 필요한 식중독세균의 경우를 제외하고는 증균(enrichment), 선택(selection), 확인(confirmation)의 기본적인 3단계 절차로 구성되어있다. 식품으로부터 식중독세균을 검출하기 위해서는 시료채취계획(sampling plan)을 제외하고 중요한 것이 식품의 제조가공 및 주위 환경으로부터 다양한 종류의 스트레스를 받은 식중독세균을 소실 없이 검출할 수 있는 증균(enrichment)배양하는 방법과 분리 능력이 우수한 선택배지를 사용하는 것이다[3,4]. 이러한 조건에 만족할 수 있는 증균 및 선택배지 개발을 위하여 수많은 연구자들의 노력이 있었으며[5,6], 지금도 검출대상 식중독세균의 생화학적 특성을 감안한 검출방법 및 배지개발을 위한 연구가 진행되고 있다. 특히, 1990년 이후 식중독세균 검출방법에 fluorogenic 또는 chromogenic 기질을 함유한 배지를 개발하여 적용한 연구들이 진행되었고[7-9], 이 중 많은 배지들이 상업화되어 현재 판매되고 있다. 이들 선택배지들이 각광을 받고 있는 이유는 기존 분석방법의 틀 안으로 도입이 용이하고 이전에 사용된 선택배지들 보다 높은 성능을 보유하고 있기 때문이다. 또한 일부 배지들의 경우 국제적인 표준시험방법들에서 식중독세균 분리용 선택배지로서 사용이 권고되거나 지정되고 있다.

식품산업 분야에서 가장 관심 있는 검출 대상 미생물은 *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria* spp. 순이라고 한다[10].

신속동정 및 간이검사법

위해물질의 신속 검출법은 생산지, 공장, 검역소 등 현장에서 위해요소를 즉시에 검출할 수 있어야 빠른 식품 유통에 실질적으로 활용할 수 있어 그 가치가 인정된다. 특히, 이들 신속 검출법은 곰팡이독, 잔류농약, 잔류항생물질 등과 같은 화학물질이나 위해미생물을 검출해 내는 것이 주목적이다[11]. 화학적 위해요소를 확인하는 방법은 일반적으로 기기분석이 이용되는데, 이는 장비가 필요하고 속도감이 떨어지므로 현장에서 활용되는 신속한 방법은 주로 면역학적 방법이 이용되고 있다[12].

반면 미생물을 검출하기 위한 방법은 면역학적방법인 ELISA kit가 활용되고 있으며, 유전학적인 방법은 DNA hybridization, PCR, microarray 기법 등이 사용되고 있다[15]. 이들 미생물의 검출법을 Table 1에서 비교하였다[13].

Table 1. 식품위해미생물 검출법 비교

	선택배지법	PCR	면역기법	Microarray
속도 (Speed)	-	++	+++	+
감도 (Sensitivity)	+	++	+++	++
선택성 (Selectivity)	-	+++	+	+++
편리성 (Simplicity)	-	+	+++	+
비용 (Cost)	+++	++	+	-

+++ : 매우우수, ++ : 우수, + : 보통, - : 미흡.
자료 : 하 (2007)[13].

면역기법

그 동안 식중독균을 검출하기 위한 다양한 생화학적 신속검출 방법들이 개발되어 왔다. 그 중 주로 배지성분을 변형시켜 빠르게 증균시키는 방법 및 생화학적 특성을 증가시켜 선택성을 증가시키는 방법과 특정한 생화학적 특성을 증가시킴으로써 신속하게 검출하기 위한 방법 등이 대표적인 방법이라 볼 수 있다. 이와 같은 방법들은 상업적으로 개발되어져 식중독균을 신속검출하기 위한 다양한 검출 kit가 판매되고 있다[13]. Lee 등[14]의 연구결과에 따르면, 장내세균 동정을 위하여 외국 제품인 API 20E kit 및 VITEK System과 국내 제품인 Easy 24+와의 비교평가를 진행한 결과, 모두 98% 이상의 높은 동정률을 보였다고 발표하였다. 이와 병행하여 외국에서는 식중독균의 효율적 검색을 위하여 특정 식중독균에 대한 폴리클론항체, 단일클론항체, recombinant 항체 및 계란 항체를 만들어 이들을 이용한 다양한 면역검사시스템 개발 연구가 활발하게 진행되고 있다.

VIDAS (Vitek Immuno Diagnostic Assay System)는 ELFA (Enzyme-Linked Fluorescent Immuno Assay)를 이용하는 자동면역분석시스템으로 식품미생물 Lab에서 수행되고 있는 감염 질병을 테스트하기 위한 것이다. 이 기기의 원리를 살펴보면 분석하고자 하는 물질이나 항원이 solid phase에 부착되며 그 외의 물질은 다 씻어져 나간다(wash-out). 특유의 검색용 항체와 alkaline phosphatase 접합체들이 solid phase와 반응하여 부착되며, 이 경우에도 결합되지 않은 물질들을 다기 씻어져 나간다(wash-out). 기질로서 4-methyl-unbelliferone는 solid phase에 선택적으로 결합되어 남아 있는 효소들과 반응한다. 그 기질은 solid phase에 결합되어 있는 효소의 양과 비례하여 형광물질인 4-methyl-unbelliferone로 전환한다. VIDAS는 이러한 자동 혈청학적 assay과정을 Lab시스템으로 조화시킴으로써 얻을 수 있는 미생물의 자동화를 확대시킨

Table 2. 미생물 시험법 중 PCR 법을 인정한 ISO 문서

ISO 시험법	제정년월일	시험법 Title
ISO 22174	2005.02.15	Microbiology of food and animal feeding stuffs-Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens-General requirements and definitions-First Edition
ISO/TS 20836	2005.08.01	Microbiology of food and animal feeding stuffs-Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens-Performance testing for thermal cyclers-First Edition
ISO 20837	2006.04.01	Microbiology of food and animal feeding stuffs-Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens-Requirements for sample preparation for qualitative detection-First Edition
ISO 20838	2006.04.15	Microbiology of food and animal feeding stuffs-Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens-Requirements for amplification and detection for qualitative methods-First Edition

자료 : 식품의약품안전청 (2007)[23].

Table 3. 다양한 미생물 검출방법을 이용하여 식품 내 미생물 검출 사례

분류	검출방법	적용식품	인용문헌	Ref. No.
면역기법	API kit	아이스크림	- Jo *et al*. 2007. Food Control.	73
	VITEK	대구(생선)	- Rodrigues *et al*. 2003. Food Microbiol.	74
	VIDAS	육제품, 유제품	- Aminul Islam *et al*. 2006. Int. J. Food Microbiol. - Sewell *et al*. 2003. Int. J. Food Microbiol.	75 76
	Immunological Methods	무순, 분쇄우육, 굴	- Onoue *et al*. 1999. Int. J. Food Microbiol. - Harwood *et al*. 2004. Int. J. Food Microbiol.	20 21
PCR 기법	DGGE	축산가공식품, 대구(생선), 식초	- Hu *et al*. 2009. Food Control. - Handshur *et al*. 2005. Food Chem. Toxicol. - Reid *et al*. 2009. Aquaculture.	25 27 77
	T-RFLP	멸치, 육류, 참치	- Rea *et al*. 2009. Food Control. - Hsieh *et al*. 2007. Food Control. - Lin *et al*. 2007. Food Control.	32 33
	RAPD	청국장, 길거리 식품	- Haryani *et al*. 2007. Food Control. - Kwon *et al*. 2009. Int. J. Food Microbiol.	36 37
	AP-PCR	물, 육제품	- Emekdos *et al*. 2006. Int. J. Food Microbiol. - Saez *et al*. 2004. Meat Sci.	40 78
PFGE		가금육, 치즈, 야채	- Praakle-Amine *et al.* 2007. Int. J. Food Microbiol. - Kerouanton *et al*. 2007. Int. J. Food Microbiol. - Mora *et al*. 2007. Int. J. Food Microbiol.	52 53 54
기타	BIOLOG	가금육	- Graves *et al*. 2009. Microbiol. Res.	62
	MIDI	우유	- Lin *et al*. 1998. Int. J. Food Microbiol.	64
	DEFT	최소가공채소	- Araújo *et al*. 2009. Radiat. Phys. Chem.	68
	Flow Cytometry	분쇄육, 우유	- Seo *et al*. 1998. Int. J. Food Microbiol.	71

다. 이 기기는 *Listeria, Salmonella, E. coli*, *Staphylococcus* enterotoxin의 혈청분석을 수행하도록 디자인되어 있으며 다른 양의 batch size에도 수행이 가능하다. 이 기기는 정확한 시간 내에 불필요 노동력을 절약할 수 있고, 사용자에게 특별히 훈련된 기술을 필요로 하지 않으며 시약제조, labeling plates, 세척 및 분리 작업이나 불필요한 노동력을 필요로 하지 않기 때문에 경비도 절감하는 장점을 가지고 있다[15].

면역확산법(Immunodiffusion test)은 증균된 검체를 항체와 함께 gel matrix에 넣는 방법이다. 만약에 특정 항원이 존재한다면 visible line이 형성된다. 효소면역측정법(ELISA)은 식품 중 균을 검출하는 데 가장 많이 사용되는 항체시험법이다. 대개 "sandwich" assay로 설계되어 있어, 증균 배양된 항체를 검출하는데 solid matrix에 결합된 한 개의 항체가 사용되며 한 효소에 결합된 2차 항체를 검출한다. Microtiter plate의 well 벽에는 solid support가 가장 많이 사용된다. 그러나 ELISA는 dipstick, paddle, membrane, pippet tip이나 기타 solid matrix를 사용하도록 제작되어 있다[16].

또한 magnetic particle이나 bead에 결합된 항체를 사용하는 면역자기분리법(immunomagnetic separation, IMS)이 pre-enrichment media 중의 균을 검출하는데 사용된다. IMS는 선택 증균배양과 유사하지만 스트레스에 의한 손상을 유발하는 항생제나 유해 시약을 사용하는 대신 항원을 검출하

는데 항체를 사용하므로 더 안전한 대체방법이라 할 수 있다 검출된 항원은 plate되거나 다른 시험법을 사용하여 추후 시험된다[17].

면역침강법 (immunoprecipitation, IP)이나 면역크로마토그래피법 (immunochromatography, IC)은 항체시험법의 일종으로 home pregnancy test로 개발된 기술에 기초하여 개발되었다. 이 방법 역시 "sandwich" 방법이지만 효소 결합 대신 detection antibody를 라텍스입자나 colloidal gold에 결합하여 사용된다. 0.1 ml aliquot만 사용해도 증균 배양된 검체에서 결과를 얻기에 충분하다. 이러한 시험법들은 매우 단순하며 세척이나 복잡한 조작이 없고 증균 배양이 끝난 후 10분 내에 시험을 종료할 수 있다[18].

1990년대 초반까지는 면역학적 기법을 이용하여 미생물 검출을 주로 환경분야에서 이용하였지만[19], 1990년대 후반부터 다양한 면역학적 기법을 이용하여 식품 내 미생물을 검출하는 연구가 발표되기 시작하였다. Onoue 등[20]은 무순과 분쇄우육에 있는 *E. coli* O157:H7균을 면역학적 기법을 이용하여 검출조건을 확립하였다고 발표하였으며, Harwood 등[21]은 같은 방법을 이용하여 굴에 있는 *V. vulnificus* 균을 검출한 바 있다.

PCR 기법

일반적으로 원인미생물을 분리하지 않고 대상으로 하는 DNA의 일부만을 시험관 내에서 증폭시키는 PCR 방법은 식품에 오염된 식중독 세균을 확인하는 데에도 가장 우수한 방법으로 인정되고 있다[22]. 미국에서는 식품에 오염 가능성이 높은 *E. coli, E. coli*-ETEC, *E. coli* O157:H7, *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Yersinia enterocolitica, Y. pseudotuberculosis, V. cholerae, V. parahaemolyticus, V. vulnificus, L. monocytogenes, S. aureus, Bacillus cereus* 등 13종의 식중독 관련 세균을 검출 및 동정하는데 13개의 primer set를 이용하여 동일한 조건에서 동시에 PCR을 시행할 수 있는 방법도 개발된 바 있다[13].

ISO에서는 우리나라 식품공전과 마찬가지로 미생물학적 및 생화학적 방법으로 규정하고 있으나 2005년에 식중독균 검출 시 PCR법을 도입하였다. 이것은 식중독균을 검출하는 데 있어서 신속, 정확하며 특이적인 방법으로 소개하고 있다. 비록 상대적으로 역사가 짧은 시험법이기는 하지만, 식품분석 분야에서 PCR에 기반 한 방법을 적용하는 예가 증가되고 있다. 그러나 ISO 역시 PCR법을 정성분석으로 인정하고 있으며 이 방법에 의한 양성 결과 시, 우리나라와 마찬가지로 기존의 미생물학적 방법 등을 통해 확인하도록 규정하고 있다[23].

따라서 식품 중 식중독균의 동시진단 및 신속 검출을 위한 첨단 분자생물학적 방법은 오염원 추적 및 역학조사 등을 위하여 현 시점에서 바람직한 방향의 연구라 생각된다. 최근 PCR 기법을 이용한 새로운 진단법의 개발을 위하여 먼저 PCR 반응 후 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)에 의존하여 반응생성물을 분리하는 PCR 기법 (SNP-dependent PCR techniques) 그리고 PCR 반응 후 특이 반응생성물의 존재 유무에 의존하여 반응생성물을 분리하는 기법 (SNP-independent PCR techniques)을 단독 혹은 병행 사용하여 신속하고 정확하게 오염세균을 분리, 동정할 수 있는 최첨단 분자생물학적 기술이 개발되고 있는 중이다.

PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)/ Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE)

PCR-DGGE법은 원래 의학 분야에서 돌연변이 유전자의 검출을 위하여 사용되어 오던 방법이었으나, Muyzer 등[24]이 처음으로 16S rDNA의 V3 region (16S rDNA 가운데 미생물 종에 따라 가장 변이가 심한 부분)을 대상으로 미생물 생태분야에 적용하였다. DGGE 분석법은 5'말단에 GC-clamp(약 40개 정도의 G와 C로 구성된 DNA단편)를 붙여 놓은 primer를 사용하여 미생물 군집에서 추출한 전체 DNA로부터 16S rDNA를 PCR증폭 시킨 후, 증폭된 PCR 산물을 urea나 formamide와 같은 DNA변성제의 농도구배가 존재하는 gel 상에서 전기영동을 한다. 증폭된 16S rDNA는 군집 내의 박테리아 종에 따른 염기서열의 차이에 의해 단일가닥(한쪽 끝은 GC-clamp로 인해 묶여진 상태)으로 변성되는 정도가 달라지고, 이에 따라 gel 상에서의 이동거리가 달라지는 점을 이용한 방법이다. 결국, gel 상의 특정 위치에서 특정 16S rDNA 염기서열을 가진 DNA가 band 형태로 나타나게 된다. 따라서 샘플 내에 미생물의 개체수가 다양할수록 band의 수는 늘어나게 되고 동일한 염기서열의 DNA가 많을수록 나타나는 band의 선명도는 증가하게 된다(Fig. 1).

PCR-DGGE법은 많은 샘플에서의 전체적인 미생물 종의 수 그리고 양적 변화를 하나의 gel 상에서 관찰할 수 있다는 장점이 있다. 또한 중요도가 높은 band의 경우에는 band로부터 직접 DNA를 회수한 후, sequencing을 통해 종을 확인할 수 있기 때문에 cloning 분석법에 비해 시간, 노력 및

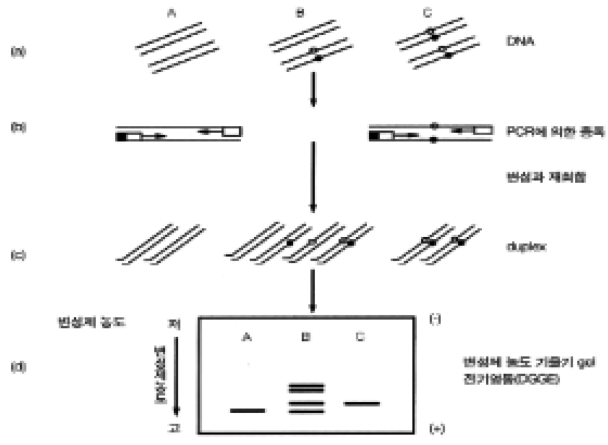

Fig. 1. DGGE 모식도 .

비용을 최소화할 수 있다. 그러나 gel의 제작과 최적 농도 구배의 범위를 설정하는 과정이 번거롭고, 샘플 내에 분포도가 낮은 종의 경우에는 증폭산물이 적어 검출되지 않을 수 있으며, band의 수가 너무 많이 발생하는 경우에는 군집의 변화를 해석하는데 어려움이 따른다. 게다가, 비교해야 할 샘플의 수가 많은 경우, 여러 장의 gel을 사용하여 전기영동을 실시해야 하며, 샘플의 조합을 달리하여 군집을 비교하고자 할 경우에는 추가적으로 전기영동을 실시해야 한다는 단점이 있다.

PCR-DGGE법을 이용하여 다양한 식품에 존재하는 미생물이 검출되었다는 보고가 많이 있다. Hu 등[25]은 PCR-DGGE법을 이용하여 진공 포장된 햄에 있는 *Leuconostoc* 종, *Lactobacillus* 종 등을 검출한 바 있고, Han 등[26] 역시 같은 방법을 이용하여 축산가공품에서 다양한 *Lactobacillus* 종을 검출하였다. 또한 Handshur 등[27]은 PCR-DGGE를 이용하여 가공 중인 샐러드에서 *Pseudomonas* 종, *Acinetobacter* 등 다양한 미생물을 검출한 바 있으며, Vero 등[28]은 식초에서 *Acetobacter* 종 등의 검출 조건을 확립하여 발표하였다.

PCR-DGGE법과 유사한 기법인 PCR-TGGE법은 gel에 변성제 농도구배를 대신하여 온도구배를 부여하고, 전기영동을 실시하여 군집을 해석하는 방법이다[29]. DGGE와 기본원리가 유사하기 때문에 DGGE와 TGGE가 동시에 수행되어져 있는 경우가 많고, 대부분 DGGE를 이용하는 연구가 많이 되고 있는 추세이다.

Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

T-RFLP법은 미생물의 DNA로부터 16S rDNA를 PCR 증폭시킨 후, 증폭된 PCR 산물을 제한효소(이중사슬 DNA의 특정부위를 절단하는 효소)로 절단하고, 전기영동을 실시하여 band 프로파일을 비교하는 RFLP법을 Liu 등[34]이 개량한 기법이다. 이 방법에서는 말단을 형광물질로 표지한 primer를 이용하여 16S rDNA를 PCR 증폭한 후, PCR산물을 제한 효소로 절단한다. 생성된 단편들 가운데에서 형광 표지된 DNA 절편들은 변성제를 함유하지 않은 polyacrylamide gel를 사용하여 전기영동하거나 capillary 전기영동을 수행하여 형광을 검출함으로써 군집 내 미생물 종 다양성을 반영하는 peak(또는 band) 프로파일로 나타나게 된다.

이론적으로 형광 표지된 DNA 절편의 길이에 따라 나타나는 각 peak는 특정 미생물 종을 의미하며, 각 peak의 면적은 그 미생물 종의 상대적인 분포비를 나타낸다. 따라서 T-RFLP는 PCR-DGGE와 유사하게 정성적 그리고 정량적으로 사용할 수 있다. 또한, 전기영동을 수행할 때 DNA의 size marker를 사용하여 형광 표지된 DNA 절편들의 길이를 측정할 수 있으며, 사용한 primer 및 제한효소의 종류에 근거하여 데이터베이스에서 각 단편의 길이에 해당하는 박테리아의 종을 찾아낼 수도 있다. 그러나 이론적으로는 하나의 미생물 종은 특정한 길이의 형광 표지 절편 하나만을 생성하지만, 서로 다른 미생물이라 하더라도 같은 길이에서 같은 제한효소 사이트를 가질 경우에는 여러 종이 똑같은 길이의 형광 표시 절편을 생성할 수도 있다. 이러한 경우에는 데이터베이스로부터 미생물 종을 결정하기 힘들다.

T-RFLP법은 서로 다른 미생물 군집의 종 다양성을 비교하거나 한 미생물 군집 내의 변화를 모니터링할 때 유용한 방법이다. 또한, 샘플의 조합을 달리하여 군집을 해석하고자 할 때에도 추가적인 실험 없이 기존의 peak 프로파일 데이터를 비교함으로써 간단히 수행할 수 있으며, 존재량이 적은 미생물 종까지 검출해 낼 수 있는 장점이 있다[31]. 그러나 단점으로, peak의 베이스라인이 안정되지 못 할 경우, peak가 아닌 것까지 모두 peak로 간주해 버림으로써 미생물 종 다양성을 과다하게 평가하는 오류를 범할 수 있으며, 사용한 primer와 제한효소의 종류에 따라 군집해석 결과가 달라질 수 있다. 따라서 T-RFLP법은 복잡한 군집구조를 가지는 시료의 해석에는 적합하지 않으며, 종 다양성이 크지 않은 미생물 군집의 해석에 적용하는 것이 바람직하다. 그동안 농업 및 환경분야에서는 이와 같은 방법을 이용한 미생물 분석법이 알려져 있었다[31]. 이에 반해, 식품분야에는 많이 적용되지는 않았지만 2000년대 후반부터 RFLP법을 이용하여 멸치, 육류 및 참치 통조림에서 다양한 종류의 미생물 검출 조건 확립사례가 보고되고 있다[32,33].

PCR-Random Amplified Polymorphic DNA (PCR-RAPD)

유전자 다형분석인 PCR-RAPD 방법은 실험조작이 간편하여 쉽게 DNA 다형성을 관찰할 수 있으며, 단 하나의 DNA 절편까지도 증폭되어 밴드로 나타날 수 있을 정도로 그 감응도가 높기 때문에 소량의 DNA만을 사용하여도 수행이 가능하므로 종 및 품종의 분자생물학적 분류 및 집단간 다양성 연구에 널리 이용되고 있다(Fig. 2)[34]. 그리고 이

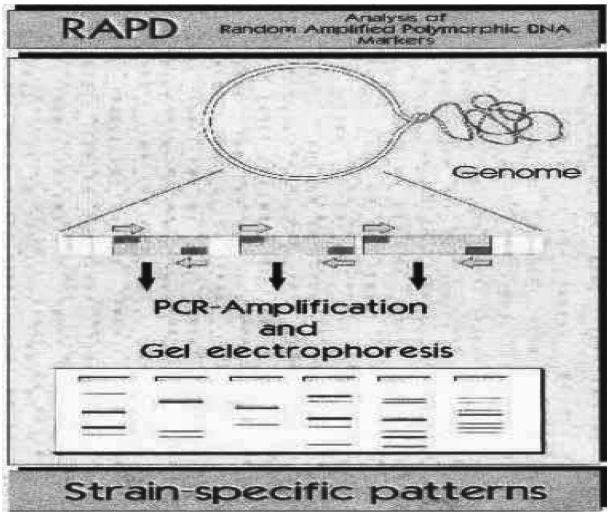

Fig. 2. PCR-RAPD 모식도 .

방법은 대상생물의 자세한 유전정보가 알려져 있지 않아도 arbitrary primer 등을 사용하여 특정 유전자 부분의 증폭 및 증폭된 DNA 절편을 비교함으로서 쉽게 종간 혹은 개체간의 유전적 유사도를 구할 수 있다[35]. 뿐만 아니라, 이 분석법을 이용하여 식품 내 잔존하는 미생물 검출하는 것으로도 이용되고 있다. Haryani 등[36]은 PCR-RAPD 분석법을 이용하여 말레이시아에서 판매하는 길거리 식품에서 *Klebsiella pneumonia*를 분리하였다고 발표한 바 있으며, 최근 국내에서 같은 방법으로 청국장 내에서 *Bacillus* 종을 검출하는 조건을 확립하였다고 보고하였다[37].

Arbitrarily Primed-PCR (AP-PCR)

AP-PCR은 검색 대상인 DNA 염기서열 정보가 필요 없이 DNA 해석에 이용될 수 있다. AP-PCR의 원리를 Fig. 3에 나타내었다[38]. 즉, 한 개의 primer를 이용하여 낮은 온도, 장시간의 annealing 조건에서 PCR하면 primer와 주형 DNA의 염기서열 간에 다소 mismatch가 존재하여도 annealing이 형성되어 DNA 합성이 시작된다. 이 조건에서 1~수 cycle의 PCR (low stringency PCR)을 한다. 이렇게 생성된 DNA단편을 주형으로 같은 primer를 사용하여 높은 온도, 단시간 annealing 조건에서 PCR (high stringency PCR)을 30~40 cycle한다. 이 결과 같은 primer 염기서열로 좁혀진 수 십개의 DNA 단편을 genome상의 다양한 위치에서 증폭할 수 있다. Coelbo 등[39]의 연구결과에 의하면 AP-PCR을 이용하여 병원성 세균인 *Vibrio cholerae*를 신속하게 검출할 수 있었다고 발표하였다. 최근 Emekdos 등[40]은 집, 병원 등에서 사용하는 물을 수거하여 AP-PCR을 이용하여 *Aeromonas* strain을 분리하는 조건을 확립하였다고 보고하였다.

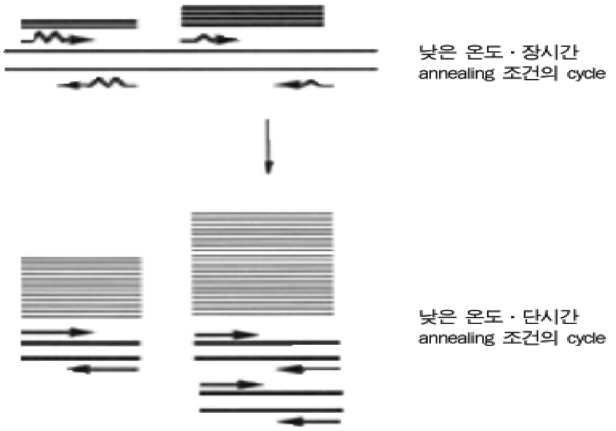

Fig. 3. AP-PCR 원리 .
자료 : Okano 등 (2002)[38].

Microarray 기법

DNA microarray 기법은 현재 최신 분석법 중 하나로 평가받고 있는데, 최근 미국의 대학을 중심으로 신속하게 5개 이상의 미생물을 검출하는 시스템이 개발되었다는 보고가 있으나, 특정 미생물에 대해 선택성이 높지 않으며 식품에 직접 적용한 상품화 단계는 아직도 요원한 것으로 평가된다. DNA microarray이 기술은 다양한 식중독균의 동시진단이 가능한 반면 시료 준비, 파쇄, 라벨링이 요구되며, 휴대용 및 저가의 기기가 아직 없으며, 전 배양(pre-culture)이 현실적으로 요구되는 점이 해결되어야 한다[13].

Microarray 기법은 결국 DNA-probe를 이용한 미생물 검출 진단법인데(Fig. 4), 시료 속에 함유된 미생물 특유의 유전인자 핵산을 직접 DNA-probe를 이용하여 측정하는 방법과 이 유전인자 핵산을 배양 또는 증폭시켜서 수가 증가된 핵산을 측정하는 방법이 있다. 후자의 경우 검사 결과는 전자보다

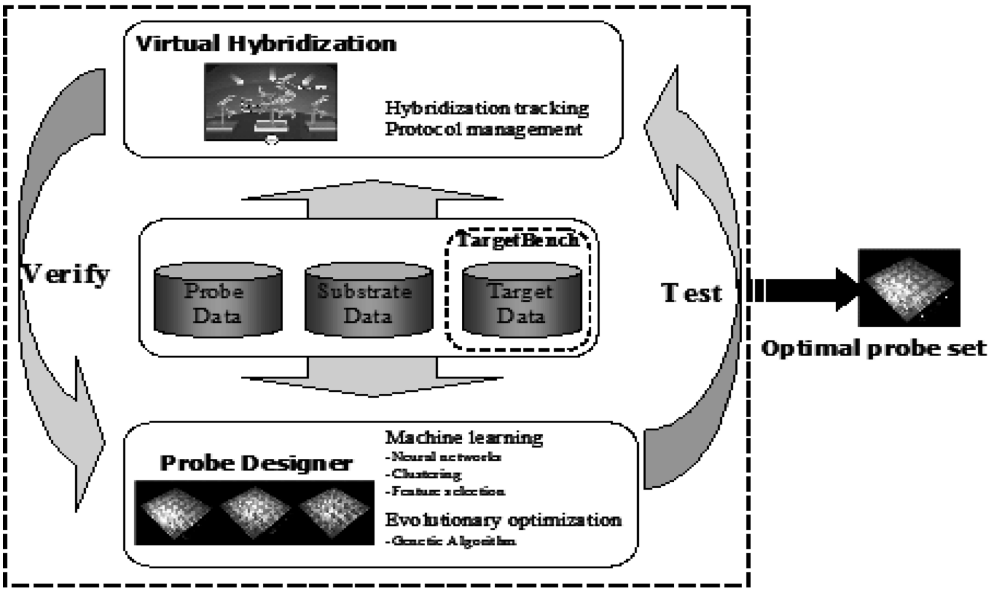

Fig. 4. DNA-probe 실험 설계 예시 .

현저하게 민감도가 높은 것이 특징이지만, 미생물 배양기간 또는 핵산 증폭과정을 거쳐야 함을 고려해야 한다. 현재, DNA-probe 미생물 검사 방법은 culture 또는 immunoassay 등과 같은 검사 방법의 정확성이 부족하거나, 검사 과정이 복잡하거나, 정확한 검사 방법이 없을 경우에 의료기관 또는 기업에서 적절히 개발되어 널리 사용되고 있다[41].

전염성 성병인 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*)나 나이세리아 고노리아(*Neisseria gonorrhoeae*)의 검출을 위한 enzyme immunoassay는 오래 전부터 존재했지만, 근래에 이들을 탐지하기 위해 개발된 DNA-probe 증폭 검사는 민감도와 특이성이 뛰어나서 불편하고, 분석하기 꺼리는 smear 시료 대신에 소변을 사용하여 대량 스크린도 가능하다는 연구결과도 발표된 바 있다[42].

최근 microarray를 이용하여 다양한 식품에서의 위해 미생물을 검출하는 연구논문이 많이 발표되고 있다. Liu-Stratton 등[43]은 식품 안전성평가를 위해 microarray 기술 적용 가능성을 연구하여 발표한 바 있고, Schmidt-Heydt 및 Geisen[44]은 식품에서 mycotoxin 생산 여부를 판가름하기 위해 같은 기술을 적용한 바 있다. 그러나 이 기술을 식품에 적용하여 검출한 연구 사례는 미진한 실정이다.

테라헤르츠 분광/영상을 이용한 검출

테라헤르츠파가 가진 고유한 특성 때문에 최근 테라헤르츠파에 대한 관심이 전 세계적으로 고조되고 있다. 테라헤르츠파를 이용한 분광 및 영상기술은 신물질, 의료, 바이오, 보안, 국방, 환경, 우주 및 통신 등과 같은 다양한 고부가가치 서비스 및 첨단산업 부문에서 관심을 갖고 있을 만큼 매력적인 연구분야로 성장하고 있다[45].

테라헤르츠 기술을 이용해 바이러스나 세균류의 검사가 가능하다는 보고는 이미 확인되었으며, 보통 이러한 검사에는 배양이나 전자 현미경법, 혹은 특수 장치에 의한 유전자 검출처럼 번잡하고 어려운 기술 조작이 많이 요구되는 방법을 사용하였다. 반면 테라헤르츠파를 이용했을 경우에 제안되는 검출법은 기본적으로는 Fig. 5처럼 바이러스나 세균류에서 테라헤르츠파가 어떤 식으로 흡수되는지 혹은 반사되는지를 계측하여 그 데이터를 데이터베이스와 비교하기만 하면 된다. 다시 말해 기존 방법과는 비교도 안 될 정도로 조작이 간편화 될 가능성이 있다는 것이다. 현재로서는 아직까지 연구 예가 적으므로, 앞으로 다양한 바이러스나 세균류에 테라헤르츠 기술을 적용해보고 테라헤르츠 파에 대한 바이러스나 세균류의 응답에 관한 데이터베이스를 구축할 필요가 있다. 현 시점에서는 겉으로 판별이 어려운 탄저균과 소맥분 등의 무해한 분말의 구별이 충분히 가능하다는 보고가 있다[45].

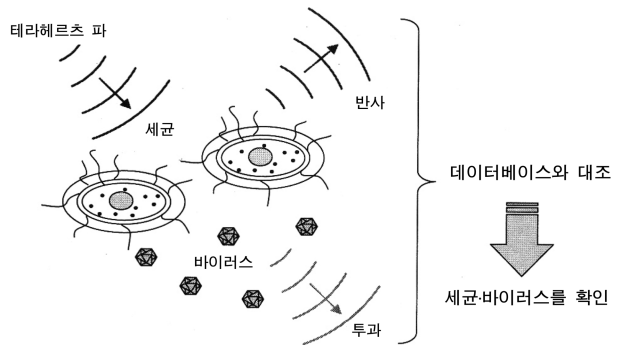

Fig. 5. 테라헤르츠 분광 / 영상의 세균 검사에의 응용 .
자료 : 전 등 (2009)[45].

1970년대 후반까지도 테라헤르츠(THz = 10^{12} Hz) 주파수 영역대는 신호원(source) 개발이 어려워 응용할 수 없는 미지의 세계로 인식되어 테라헤르츠 갭(gap)이라 칭하여 왔으나 최근 초고속레이저 관련 기술이 발전함에 따라 연속 조정이 가능한 테라헤르츠 전자기파 생산이 용이하게 되었다[45]. 테라헤르츠파의 발생은 광전도 방법(photoconductive method), 광정류 방법(optical rectification), 광혼합(photomixing) 방법 등 다소 차이가 있으나, 팸토초 레이저가 반도체 광전소자에 입사함으로써 테라헤르츠 전자기 펄스가 발생되고 공기 중에 전파되어 검출기에 도달한다. 최근 테라헤르츠 주파수대를 생물, 의료, 환경, 식품, 농업 등 여러 분야에 응용하려는 시도가 활발하게 이루어지고 있는데, 식품 위해요소의 검색에 활용되는 현황을 알아보겠다.

화학적 위해의 검출에 테라헤르츠 전자기파 분광법이 응용된 예로 테라헤르츠 시간영역 분광기술을 사용하여 2종류의 농약(imidacloprid와 Mancozeb)을 측정한 사례가 있다. 품질이 떨어지는 물질을 사용하여 소비자를 속이는 변조(adulteration) 행위가 문제시되고 있는 가짜참기름의 경우 테라헤르츠 분광을 이용하여 투사 또는 반사 방식으로 식물성 기름 시료의 테라헤르츠 펄스 파형을 측정함으로써 진위 여부를 효과적으로 감별해낼 수 있다는 보고가 있었다. 또한 밀가루를 감별하는데, 테라헤르츠파가 사용된 적이 있는데[46], 0.1~2.0 테라헤르츠 범위 내에서 각기 다른 수분 함유량(8, 12, 18%)을 측정하고 예측모델을 구축한 다음 소맥분의 수분함량을 측정함으로써 구분하였다.

생물학적 위해의 검출 예로 테라헤르츠 기술을 이용한 바이러스나 세균류의 검사가 가능하다고 한다. 보통 생물학적 검사에는 배양이나 전자현미경법, 혹은 유전자 검출 등 복잡하고 어려운 기술이 많이 요구된다. 그러나 테라헤르츠파를 이용할 경우 바이러스나 세균류에서 테라헤르츠파가 어떤 식으로 흡수되는지 혹은 반사되는지를 계측하여 그 데이터를 데이터베이스와 비교하기만 하면 되므로 매우 간단하다[45]. 현 시점에서는 육안으로 판별이 어려운 탄저균과 소맥분 등 분말의 구별을 시도한 Choi 등[47]의 연구가 있다. 10~300 GHz 범위 내에서 투과 및 반사의 측정 방식을 사용하여 설탕, 전분, *Bacillus*균체 분말의 반사계수와 굴절률 정보를 얻어 이들을 구분하였다.

물리적 위해의 검출 예를 들어보겠다. 현존하는 검출기

중 가장 우수한 것으로 평가받고 있는 X-ray 투시기의 경우 인체에 악영향을 주고, 일정 밀도(1 kg/cm^3 이상)와 크기(0.4 mm 이상) 이상의 물질만이 검출 가능하므로 벌레, 곰팡이 등 연질 이물질의 검출이 불가능한 단점이 있다. 밀리미터파와 적외선 사이에 있는 100 GHz에서 10 THz 범위의 테라헤르츠파는 세라믹이나 플라스틱 및 종이를 투과하고, 각종 물질의 분자상태에 따라 특이한 투과특성을 나타낸다. 특히 인체에 많이 포함된 물에는 강하게 흡수되고 금속에는 반사되는 특징이 있어 이를 이용하여 의복이나 구두, 봉투, 포장 내에 있는 화학물질이나 금속을 개봉하지 않고 비접촉으로 검출할 수 있다. 따라서 이러한 테라헤르츠파의 특성을 활용하면 포장된 상태에서 다양한 크기와 밀도를 가진 식품 이물의 검색이 가능하고, 물질 고유의 투과, 흡수, 반사 특성을 이용하여 검색된 식품 이물질의 성분 동정도 가능하다. Jördens과 Koch[48]는 초콜렛 속에 혼합되어 있는 직경 1 mm의 금속 나사, 유리 파편 등의 이물에 대해 테라헤르츠 분광과 영상분석을 실시하여 검출한 바 있다. 테라헤르츠파는 X-ray 투시기와 달리 인체 건강 및 식품에 무해하므로 식품 중 존재하는 이물질 탐지에 장점이 있는 기술이라 볼 수 있다.

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

PFGE는 특정의 제한 효소 처리된 DNA를 전기영동시켜 전기 파장을 다각도에서 전달하여 절단된 DNA 분절의 형태학적 양상을 비교하는 것이다. 이 방법은 보통의 전기영동에서는 분리할 수 없었던 큰 DNA 분절(40-1,000 kbp)을 분리해 낼 수 있으며, 여러 조건에 따라 다양한 DNA 분절 형태를 관찰하는 방법이다. 우수한 감별력과 재현성을 가지고 다양한 역학 자료와 높은 유전적 상관관계를 제시함으로써 여러 유전학적 molecular typing 방식 중 gold standard로 인식되고 있다[49]. 특히 이 기법은 전기영동에 의한 banding pattern을 분석함으로써 특정 식중독균에 의한 식중독 발생이 서로 다른 유래의 식품 분리주간 유전적 상관성을 확인하여 오염원을 파악하는 기초 자료로 활용될 수 있다. PFGE는 균주 간 유전적 상관성을 쉽게 알 수 있고 실험실 간에 재현성이 우수하다. 반면 분석에 많은 시간이 소요되며 gel로부터 DNA의 추출이 어려운 단점이 있다[50].

PFGE는 다양한 미생물 혈청형의 DNA fingerprinting에서 가장 훌륭한 marker로서 분자역학적 형별분석에 가장 신뢰성이 있으며 감별력과 재현성이 높은 유전형별 방법임이 인정되고 있다[51]. 최근 PFGE법을 활용하여 식품 내 다양한 미생물을 검출하는 연구가 이루어지고 있다. Praakle-Amin 등[52]은 Estonia에서 시판되는 가금육에서 *Campylobacter* 검출조건을 확립하였다고 발표하였고 프랑스 및 페루에서도 동일한 방법을 이용하여 치즈 및 야채에서 각각 *S. aureus* 및 *E. coli* O157:H7를 검출한 바 있다[53,54].

기타 원리에 의한 미생물 검출

자동평판도말장치 (Spiral plating system)

최근 미생물 분석에서 신속, 간편, 자동화의 목적으로 Spiral plating system이라 불리는 자동평판도말장치가 있다[55]. 이것은 미국 식품의약품안전국(Food & Drug Administration, FDA) Gilchrist 등에 의하여 고안된 장치로 배지 등 기구 사용량 절약, 개인차 감소에 따라서 재현성 향상 등의 이점 때문에 미국 Standard method for the examination of diary products에서도 우유 등 유제품 생균수 측정법으로 인정하고 있다. Omnispec이라는 방법도 미생물 성장을 배양액의 pH 및 산화환원전위 변화를 지시약의 색깔 변화로 감지하여 색도계로 측정하여 미생물 균수를 간접적으로 정량하는 방법이다[55]. 우유, 음료수 등 액체 시료에 주로 활용되고 있다. Bioluminescence는 살아 있는 생균의 ATP분해과정에서 방출되는 빛을 일컫는데, 균수에 따라 비례적으로 커지는 원리를 이용하여 간접적으로 생균을 정량하는 기법이다. 이를 측정하는 검출장비로는 LKB-Wallace, Tuner, Designs, Lumac, Luminometer, Bio Trace, New horizons (the SAMART), Neogen 등이 있다. 간편한 휴대용 검출장비로는 Cham Luminator-L, Cham IUL, MicroLuminometer, Plket Swab 등이 시판되고 있다[56].

자동배양기를 이용한 미생물 검출

혈액이나 감염조직으로부터 감염원을 검출하기 위하여 약 30년 전부터 자동배양시스템이 개발되어 왔다. 이러한 자동배양기의 기본원리는 미생물 증식에 의해 생성되는 CO_2로 인해 생기는 pH의 변화, 산화환원전위 변화 등을 감지하고 분석하여 미생물의 증식여부를 판단하는 것이다[57]. 가장 최근 도입된 BACTEC 460 (Becton Dickinson, USA)은 방사성 탄소의 분석 방식으로 방사능 배지의 취급이나 폐기에 주의가 필요하므로 이후 비방사성 분석방식의 BACTEC 660/730/860 (Becton Dickinson, USA), BioArgos (Diagnostics Pasteur, France) 등이 개발되었지만, 이들은 자동배양은 가능할지라도 연속적인 검출이 불가능하여 위 양성(false positive) 결과가 나타나기 쉬운 단점이 있다[57,58]. 이러한 단점을 보완하여 연속 모니터링이 가능한 색변화 검출방식의 Vital (BioMerieux vitek, France), BACTEC 9240 (Becton Dickinson, USA), 압력측정방식의 ESP (Difco, USA)등의 여러 배양기들이 개발되었다. 일부 보고에 따르면 자동배양법은 임상시료에서의 감염원 진단 뿐 아니라 생물의약품의 무균시험에 충분히 이용가능하다고 발표하였다[59].

BIOLOG를 이용한 미생물 검출

BIOLOG 시스템은 polymer, carbohydrates, methyl esters, amides 등 95가지의 탄소원을 96 well MicroPlate에서 단시간(4~24시간)에 시험하여 미생물을 동정하는 시스템이다.

이는 미생물의 탄소원을 이용하여 생육할 때의 산물에 의한 산성도의 변화를 indicator를 이용하여 실험하는 기존의 방법과는 다르며 single redox dye로 tetraxolium violet을 이용하여 미생물의 물질대사 과정에서 탄소원 이용성을 측정하는 특징을 가진다[60]. 일부 연구에 따르면 이와 같은 방법을 이용하여 식품 내에 잔존하는 *Enterobacteriaceae* 및 *Enterococci* 종을 검출하는 조건을 확립한 바 있다[61,62].

MIDI를 이용한 미생물 검출

MIDI는 미생물의 균체 지방산 조성에 의한 database를 가지고 있는 자동화된 Gas Chromatography (GC)이다. 이는 균체의 지방산 정량분석이 짧은 시간 내에 이루어짐에 따라 많은 균주의 분류학적 연구와 신속한 균주 동정에 효과적으로 이용되고 있다[63]. Lin 등[64]은 우유에 오염되어 있는 *B. cereus*를 검출하기 위해 MIDI를 이용한 최적 조건을 확립하였으며, Whittaker 등[65]은 *S. aureus* 및 *V. vulnificus* 등과 같은 식품위해미생물 14종을 이용한 GC 분석조건을 확립하여 발표한 바 있다. 또한, 최근 Guo 등[66]은 *L. monocytogenes*의 분석조건을 최종 확립하여 보고하였다.

DEFT (Direct Epifluorescent Filter Technique)를 이용한 미생물 검출

Fluorescent dye-labeled probe는 미생물을 직접적으로 검출하는 방법으로 이용된다. 이 방법은 우선 sampling한 것을 적절한 enzyme이나 surfactant와 섞어 일정 온도에서 일정시간 동안 배양한 다음 cellulose ester filter나 polycarbonate filter를 사용하여 미생물을 걸러주고, acidine orange 등의 fluorescent stain을 사용하여 staining하여 filter의 막에 걸러진 미생물을 epifluorescence 현미경으로 관찰하는 방법이다[67]. 그러나 이 방법은 시료 내에 존재하는 미생물의 정확한 동정은 불가능하다. Araújo 등[68]은 DEFT 기술을 이용하여 최소가공 채소 내 존재하는 미생물을 검출한 결과, 약 6 log 이상의 미생물을 검출할 수 있었다고 발표하였다.

Flow Cytometry를 이용한 미생물 검출

Flow cytometry 즉, 유세포 분석기는 488 nm (blue), 514 nm (green)의 두 가지 파장을 내는 Ar Ion laser를 이용하여 형광 염색소에 염색된 유액 상태의 시료가 감지지역(sensing point)를 통과할 때 주사함으로써 발생하는 굴절 laser와 형광을 각각의 detector에 의해 검출하여 컴퓨터로 분석하는 기술이다. 굴절 laser는 forward scatter (0.5~10°, 시료의 granularity 측정)의 두 가지 검출방법이 있고, 형광검출은 다양한 filter를 이용하여 각 파장대의 형광을 분리할 수 있어 이를 통하여 detector로 신속하게 검출할 수 있다. 이는 즉각적인 검출분석이 가능하기 때문에 시료가 감지지역을 통과하자마자 검출이 가능하다[69]. 또한, Molecular Probes의 Live/Dead Baclight Bacterial Viability probe (L-7007)는 SYTO 9과 propidium iodide로 구성되어 있다. SYTO 9는 세균의 plasma membrane을 손상시키지 않고 침투하여 DNA와 결합함으로써 적색의 형광을 나타내기 때문에 세균의 활성상태 및 불활성화 상태를 나타낼 수 있는 형광염색물질로 알려져 있다[70]. Seo 등[71]은 flow cytometry를 이용하여 분쇄육, 우유 등에 오염된 *E. coli* O157:H7균주를 검출하였다고 발표한 바 있으며, 국내에서 또한 같은 방법으로 계육 내에서 *Salmonella*균의 viability를 관찰하였다고 보고하였다[72].

요 약

식품으로부터 식중독세균을 검출하는 대부분의 전통적인 방법들은 분리하고자 하는 미생물에 적합한 선택배지에 의존할 수밖에 없다. 이러한 선택배지들은 높은 경제성에도 불구하고 오래 걸려 때를 놓치게 되는 소요 시간이 항상 걸림돌로 작용하고 있으며, 하나의 선택배지로 한의 균만을 선택적으로 분리해 내는 등의 단점이 있다. 이러한 단점을 최소화하기 위하여 IMS 등 면역학적 또는 분자생물학적 기법들을 접목시키고 있고, 증균에서 분리와 확인을 동시에 할 수 있는 package 형태의 제품들이 시판되고 있다. 또한 이러한 제품 중 일부는 국제표준기구로부터 인증을 받았고 대부분 chromogenic 기질을 함유한 선택배지들이 포함되어 있을 만큼 신뢰도가 높다고 할 수 있다. 그러나 선택배지 자체만은 이들 단점을 해결할 수 없어 항체를 활용한 신속, 간편하고 환경친화적인 ELISA법, 검출장비가 불필요하여 가장 신속, 간편하게 현장에서 사용하도록 기술을 향상시킨 paper-strip kit나 ELISA 분석 시 직면하는 시료의 matrix effect를 최소화할 수 있다는 장점을 지닌 형광면역분석법(fluoroimmunoassay)등 새로운 기술이 용도에 맞게 다양하게 개발되고 있다. 또한 동시진단 능력이 우수한 현장 진단형 시스템이 개발될 경우, 향후 신 시장 창출, 바이오칩 기술발전, 식중독균을 포함한 위해 미생물의 동시진단 및 역학조사 등에 지대한 기여를 할 것으로 판단된다. 식품에서 식품위해미생물 검출에 있어서 가장 이상적인 방법은 검출과정이 간단하고 경제적이며 정확하여야 한다는 것이다. 또한 정량적 결과 산출이 가능하여야 하고, 자동화된 방법으로 전환이 가능하여야 산업에 적용될 수 있다는 것인데, 이러한 이상적인 검출방법은 현재까지 존재하지 않는다. 다만, 여러 방법들이 각각의 장점을 갖고 있을 뿐이다. 즉, 현실적 대안은 현재까지 개발된 각각의 방법을 목적과 대상에 따라 시의적절하게 병용 사용하여야 한다는 것이다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 식품의약품안전청 용역연구개발과제의 연구개발비 지원(10162기후식995)에 의해 수행되었으며

이에 감사드립니다.

참고문헌

1. ISO: Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes,* Part 2: Enumeration. ISO 11290-2:1998 (1998).
2. ISO: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., ISO 6579:2002/Cor.1:2004 (2004).
3. de Boer, E.: Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods. *Int. J. Food Microbiol,* **45**, 43-53 (1998).
4. Clavero, M.R.S. and Beuchat, L.R.: Suitability of selective plating media for recovering heat- or freese-stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. *Appl. Environ. Microbiol,* **61**, 3268-3273 (1995).
5. Gasanov, U., Hughes, D. and Hansbro, P.M.: Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol. Rev,* **29**, 851-875 (2005).
6. Stephen, D.W. and Andrew, J.B.: Evaluation of techniques for enrichment and isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from artificially contaminated sprouts. *Int. J. Food Microbiol,* **71**, 87-92 (2001).
7. Becker, B., Schuler, S., Lohneis, M., Sabrowski, A., Curtis, G.D.E. and Holzapfel, W.H.: Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended. *Int. J. Food Microbiol,* **109**, 127-131 (2006).
8. Leclercq, A.: Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'L.mono and ALOA solid media. *J. Microbiol. Methods,* **57**, 251-258 (2004).
9. Reissbrodt, R.: New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp. - an overview. *Int. J. Food Microbiol,* **95**, 1-9 (2004).
10. 김용수, 하상도: 선택배지를 활용한 전통적 식중독세균 분리 기법. *Safe Food* **1(4)**, 5-15 (2006).
11. Benson, H.J.: Microbiology applications. 6th edition. Brown Publishers. London, UK (1994).
12. Atlas, R.M., Parks, L. and Brown, A.: Laboratory Manual of Experimental Microbiology. Mosby-Year Book, Mosby Publication, St. Louis, MO, USA (1995).
13. 하상도.: 식중독 미생물 검출기술 동향분석. 한국식품공업협회. 식품공업 (2007).
14. 이미애, 박향숙, 김선주, 김의종: 장내세균 동정을 위한 EASY 24 plus, API 20E 및 VITEK System의 비교 평가. 대한임상미생물학회지. **4(2)**, 96-101 (2001).
15. Robnison, A., McCarter, Y.S. and Tetreault, J.: Comparison of crystal enteric/nonfermenter system, API 20E system, and vitek automicrobic system for identification of gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol,* **33**, 364-370 (1995).
16. Candish, A.A.G.: Immunological methods in food microbiology. *Food Microbiol*, **8**, 1-14 (1991).
17. Olsvik, O., Popovic, T., Skjerve, E., Cudjoe, K.S., Hornes, E., Ugelstad, J. and Uhlen, M.: Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clin. Microbiol. Rev,* **7**, 43-54 (1994).
18. Feldsine P.T., Forgey, R.L., Falbo-Nelson, M.T. and Brunelle, S.: *Escherichia coli* O157:H7 Visual Immunoprecipitation assay: a comparative validation study. *J. AOAC,* **80**, 43-48 (1997).
19. Schloter, M., Abmus, B. and Hartmann, A.: The use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environment. *Biotech. Adv,* **13**, 75-90 (1995).
20. Onoue, Y., Konuma, H., Nakagawa, H., Hara-Kudo, Y., Fujita, T. and Kumagai, S.: Collaborative evaluation of detection methods for *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprouts and ground beef. *Int. J. Food Microbiol,* **46**, 27-36 (1999).
21. Harwood, V.J., Gandhi, J.P. and Wright, A.C.: Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review. *Int. J. Food Microbiol,* **59**, 301-316 (2004).
22. Ha, K.S., Park, S.J., Seo, S.J., Park, J.H. and Chung, D.H.: Incidence and polymerase chain reaction assay of *Listeria monocytogenes* from raw milk in Gyeongnam province of Korea. *J. Food Prot,* **1**, 111-115 (2002).
23. 식품의약품안전청 연구보고서: 식품공전 시험법의 현대화 방안 연구. (2007).
24. Muyzer, G., de Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol,* **59**, 695-700 (1993).
25. Hu, P., Zhou, G., Xu, X., Li, C. and Han, Y.: Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16S rDNA-DGGE. *Food Control,* **20**, 99-104 (2009).
26. Han, Y., Xu, X., Jiang, Y., Zhou, G., Sun, X. and Xu, B.: Inactivation of food spoilage bacteria by high pressure processing: Evaluation with conventional media and PCR-DGGE analysis. *Food Res. Int, In press* (2010).
27. Handschur, M., Pinar, G., Gallist, B., Lubitz, W. and Haslberger, A.G.: Culture free DGGE and cloning based monitoring of changes in bacterial communities of salad due to processing. *Food Chem. Toxicol,* **43**, 1595-1605 (2005).
28. Vero, L.D., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S. and Giudici, P.: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiol,* **23**, 809-813 (2006).
29. Manzano, M., Cocolin, L., Iacumin, L., Cantoni, C. and Comi, G.: A PCR-TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) technique to assess differentiation among enological *Saccharomyces cerevisae* strains. *Int. J. Food Microbiol,* **101**, 333-339 (2005).
30. Liu, W.T., March, T.L., Cheng, H. and Forney, L.: Characterization of microial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol,* **63**, 4516-4522 (1997).
31. 김훈수, 조주식, 박경량: 농법에 따른 메탄생성과 메탄생성세균의 T-RFLP 패턴. 대한미생물학회지. **45(1)**, 17-25 (2009).
32. Rea, S., Storani, G., Mascaro, N., Stocchi, R. and Loschi, A.R.:

Species identification in anchovy pastes from the market by PCR-RFLP technique. *Food Control,* **20**, 515-520 (2009).
33. Hsieh, H.S., Chai, T. and Hwang, D.F.: Using the PCR-RFLP method to identify the species of differenct processed products of billfish meats. *Food Control,* **18,** 369-374 (2007).
34. William, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafolski, J.A. and Tingey, S.V.: Genetics analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol,* **218**, 704-740 (1993).
35. 김우진, 김경길, 이정호, 박두원: Universal Rice Primer (URP)-RAPD 방법에 의한 어류 종 특이 marker의 동정. 한국수산학회지. **36(3)**, 317-320 (2003).
36. Haryani, Y., Noorzaleha, A.S., Farimah, A.B., Noojahan, B.A., Patrick, G.B., Shamsinar, A.T., Laila, R.A.S. and Son, R.: Incidence of *Klebsiella pneumonia* in street foods sold in Malaysia and their characterization by antibiotic resistance, plasmid profiling, and RAPD-PCR analysis. *Food Control,* **18**, 847-853 (2007).
37. Kwon, G.H., Lee, H.A., Park, J.Y., Km, J.S., Lim, J., Park, C.S., Kwon, D.Y., Kim, Y.S. and Kim, J.H.: Development of a RAPD-PCR method for identification of *Bacillus* species isolated from Cheonggukjang. *Int. J. Food Microbiol,* **129**, 282-287 (2009).
38. Okano, A. and Sekiya T.: PCR-SSCP법에 의한 암 유전자 해석. *Life Sci. Biotechnol,* 9-15 (2002).
39. Coelho, A., Vicente, A.C.P., Baptista, M.A.S., Momen, H., Santos, F.A.R.W. and Salles, C.A.: The distincion of pathogenic *Vibrio cholerae* groups using arbitrarily primed PCR fingerprints. *Res. Microbiol,* **146**, 671-683 (1995).
40. Emekdas, G., Aslan, G., Tezcan, S., Serin, M.S., Yildiz, C., Ozturhan, H. and Durmaz, R.: Detection of the frequency, antimicrobial suseptibility, and genotypic discrimination of *Aeromonas* strains isolated from municipally treated tap water samples by cultivation and AP-PCR. *Int. J. Food Microbiol,* **107**, 310-314 (2006).
41. 김영대: DNA-probe를 이용한 미생물 검출 진단 방법의 개발. 미생물과 산업. **25(2)**, 2-6 (1999).
42. Nolte, F.S.: Branched DNA signal amplification for direct quantification of nucleic acid sequences in clinical specimens. *Adv. Clin. Chem,* **33**, 201-235 (1998).
43. Liu-Stratton, Y., Roy, S. and Sen, C.K.: DNA microarray technology in nutraceutical and food safety. *Toxicol. Lett,* **150**, 29-42 (2004).
44. Schmidt-Heydt, M. and Geisen, R.: A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food. *Int. J. Food Microbiol,* **117**, 131-140 (2007).
45. 전향숙, 최성욱, 김현정: 테라헤르츠 분광/영상을 이용한 식품위해요소의 검출. *Safe Food* **4(4)**, 40-46 (2009).
46. Chua, H.S., Upadhya, P.C., Haigh, A.D., Obradovic, J., Gibson, A.A.P.: and Linfield, E.H.: Terahertz Time-Domain Spectroscopy of Wheat Grain, Infrared and Millimeter Waves, 2004 and 12th International Conference on Terahertz Electronics, Conference Digest of the 2004 Joint 29th International Conference, 399-400 (2004).
47. Choi M.K., Bettermann, A. and van der Weide, D.W.: Potential for detection of explosive and biological hazards with electronic terahertz systems. *Phil. Trans. R. Soc. Lond,* **362**, 337-349 (2004).
48. Jördens, C. and Koch, M.: Detection of foreign bodies in chocolate with pulsed terahertz spectroscopy. *Optical Engineering,* **47(3)**, 037003-1~5 (2008).
49. Olson, M.V.: Separation of large DNA molecules by pulsed-field gel electrophoresis. A review of the basic phenomenology. *J. Chromator,* **470(2)**, 377-383 (1989).
50. 박종석: Real-Time PCR과 Pulsed-Filed Gel Electrophoresis를 이용한 *Clostridium perfrigens*의 신속 검출 및 확인. 동국대학교 박사학위논문. (2006).
51. Hudson, C.R., Quist, C., Lee, M.D., Keyes, K., Dodson, S.V., Morales, C., Sanchez, S., White, D.G. and Maurer, J.J.: Genetic relatedness of *Salmonella* isolates from nondomestic birds in Southeastern United States. *J. Clin. Microbiol,* **38(5)**, 1318-1323 (2000).
52. Praakle-Amin, K., Roasto, M., Korkeala, H. and Hanninen, M.L.: PFGE genotyping and antimicrobial suseptibility of *Campylobacter* in retail poultry meat in Estonia. *Int. J. Food Microbiol,* **114**, 105-112 (2007).
53. Keroanton, A., Hennekinne, J.A., Letertre, C., Petit, L.., Chesneau, O., Brisabois, A. and De Buyser, M.L.: Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int. J. Food Microbiol,* **115**, 369-375 (2007).
54. Mora, A., Leon, S.L., Blanco, M., Blanco, J.E., Lopez, C., Dahbi, G., Echeita, A., Gonzalez, E.A. and Blanco, J.: Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Peru). *Int. J. Food Microbiol,* **114**, 204-210 (2007).
55. Jay, J.M.: Low-Temperature Food Preservation and Characteristics of Psychrotrophic Microorganisms. Modern Food Microbiology. 6th edition, pp. 323-338 (2008).
56. 장동석, 신동화, 정덕화, 김창민, 이인선: 자세히 쓴 식품위생학. 정문각. (2002).
57. Reimer, L.G., Wilson, M.L. and Weinstein, M.P.: Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin. Microbiol. Rev,* **10**, 444-465 (1997).
58. Wilson, M.L., Wesinstein, M.P., Reimer, L.G., Mirrett, S. and Reller, L.B.: Controlled comparison of the BacT/Alert and BACTEC 660/730 nonradiometric blood culture systems. *J. Clin. Microbiol,* **30**, 323-329 (1992).
59. 성혜란, 김일회, 김지연, 이종길, 정연복, 한상배, 송석길: 자동배양기를 이용한 미생물 검출. 대한미생물학회지. **44(2)**, 130-134 (2008).
60. Guckert, J.B., Carr, G.J., Johnson, T.D., Hamm, B.G., Davidson, D.H. and Kumagai, Y.: Community analysis by Biolog: curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats. *J. Microbiol. Methods,* **27**, 183-197 (1996).
61. Olsson, C., Ahrne, S., Petterson, B. and Molin, G.: DNA based classification of food associated *Enterobacteriaceae* previously identified by Biolog GN microplates. System. *Appl. Microbiol,* **27**, 219-228 (2004).
62. Graves, A., Weaver, R.W. and Entry, J.: Characterization of

enterococci populations in livestock manure using BIOLOG. *Microbiol. Res,* **164**, 260-266 (2009).
63. Nedoluha, P.C. and Westhoff, D.: Microbiology of striped bass grown in three aquaculture systems. *Food Microbiol,* **14**, 255-264 (1997).
64. Lin, S., Schraft, H., Odumeru, J.A. and Griffiths, M.W.: Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *Int. J. Food Microbiol,* **43**, 159-171 (1998).
65. Whittaker, P., Mossoba, M.M., Al-Khaldi, S., Fry, F.S., Dunkel, V.C., Tall, B.D. and Yurawecz, M.P.: Identification of food-borne bacteria by infrared spectroscopy using cellular fatty acid methyl esters. *J. Microbiol. Methods,* **55**, 709-716 (2003).
66. Guo, A., Liu, T.L., Xie, J., Wang, H., Yang, H., Zheng, H., Chen, T., Zhang, M. and Ma, M.: Tracing the food sources of isolated strains of *Listeria monocytogenes* through fatty acid profiles analysis. *Food Control,* **21**, 1092-1098 (2010).
67. Vanne, L., Karwoski, M., Karppinen, S. and Sjöberg, A. M.: HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control,* **7**, 263-276 (1996).
68. Araújo, M.M., Duarte, R.C., Silva, P.V., Marchioni, E. and Villavicencio, A.L.C.H.: Application of the microbiological method DEFT/APC to detect minimally processed vegetables treated with gamma radiation. *Radiat. Phys. Chem,* **78,** 691-693 (2009).
69. Weaver, J.L.: Estimation of cell viability by flow cytometry. In: Flow cytometry protocols. Jaroszski, M.J., Heller, R. Ed. Human Press, NJ, USA. pp. 77-83. (1998).
70. Haugland, R.P.: Chapter 16. Assays for cell viability, proliferation and function. In: Handbook of fluoresecent probe and research chemicals, 6th ed, Spence MTZ ed. Molecular Probes, OR, USA. pp. 365-398. (1996).
71. Seo, K.H., Brackett, R.E. and Frank, J.F.: Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immuno-magnetic flow cytometry in ground beef, apple juice, and milk. *Int. J. Food Microbiol,* **44,** 115-123 (1998).
72. 장금일, 정덕화, 하상도, 김근성, 이규호, 김민곤, 김철호, 김광엽: 공초점 현미경 및 유세포 분류기를 이용한 계육에서의 *Salmonella*균 불활성화 평가. 한국식품과학회지. **38(2)**, 290-294 (2006).
73. Jo, C., Kim, H.J., Kim, D.H., Lee, W.K., Ham, J.S. and Byun, M.W.: Radiation sensitivity of selected pathogens in ice cream. *Food Control,* **18**, 859-865 (2007).
74. Rodrigues, M.J., Ho, P., Lopez-Caballero, M.E., Vaz-Pires, P. and Nunes, M.L.: Characterization and identification of microflora from soaked cod and respective salted raw materials. *Food Microbiol,* **20**, 471-481 (2003).
75. Aminul Islam, M., Heuvelink, A.E., Talukder, K.A. and de Boer, E.: Immunoconcentration of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 from animal faces and raw meats by using Dynabeads anti-*E. coli* O157 and the VIDAS system. *Int. J. Food Microbiol,* **109**, 151-156 (2006).
76. Sewell, A.M., Warburton, D.W., Boville, A., Daley, E.F. and Mullen, K.: The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria* spp. from foods. *Int. J. Food Microbiol,* **81**, 123-129 (2003).
77. Reid, H.I., Treasurer, J.W., Adam, B. and Birkbeck, T.H.: Analysis of bacterial populations in the gut of developing cod larvae and identification of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus* as pathogens of cod larvae. *Aquaculture,* **288**, 36-43 (2009).
78. Saez, R., Sanz, Y. and Toldra.: PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat. Sci,* **66**, 659-665 (2004).