

## 국내외 기술정보

# ATP bioluminescence를 이용한 hygiene monitoring

이 정 민 · 오 세 옥

수산물산업화연구부

### 1. 서론

모든 식품 생산자들에게는 제품의 품질과 안전성을 보증해야 하는 직접적인 책임이 부여 되어있다. 따라서, 식품제조에 있어 위생에 대한 결과를 신속하게 얻는 것은 위생측정 프로그램을 효율적으로 운영하여 제품의 품질과 안전성을 확보하는데 있어 가장 중요할 것이다. ATP bioluminescence를 이용하는 측정방법은 전통적인 미생물 검사 방법과 비교하여 신뢰할 수 있으며 무엇보다도 빠르게 결과를 얻을 수 있어 그 중요성이 강조되고 있다. ATP bioluminescence는 적절한 측정방법으로 시행된다면 monitoring시 가장 정확한 정보를 제공할 수 있다. 이것은 제조과정에 대한 철저한 위생관리를 통하여 소비자들의 recall campaign이나 불매운동 등을 예방할 수 있어 판매 및 수익 저하를 근본적으로 막을 수 있는 강력한 방어장치로 작용할 수 있다.

최근 HACCP는 위생적으로 안전하며 양질의 제품을 생산하기 위한 자율적 위생관리 방법으로 세계적인 주목을 받고 있는데, 이는 결코 새로운 발상은 아니다. Pillsbury사의 H. Bauman 박사와 항공우주국(NASA), 미 육군 Natick 연구소가

공동으로 개발한 것으로서, 1971년 미국식품보호 위원회에 의하여 그 구상이 처음 공표됨으로써 거기가 되었다. 여기에서는 제품 생산이 완료된 후에나 결과가 측정되는 미생물 측정 방법 보다는 제품 생산과 동시에 측정할 수 있는 보다 적극적인 측정 방법이 필요함을 제시하였다.

HACCP philosophy는 특정 hazard의 확인 및 그 예방을 위한 필요한 방법 모두를 포함하고 있다. 여기에서 hazard란 비정상적인 생물학적, 화학적, 물리적 오염을 의미한다. 이것은 최초의 제품 생산자와 마지막의 제품 소비자에게까지 이르는 모든 단계(critical control point)에 적용할 수 있으며 hazard의 발생 방지 및 조절에 주안점을 두고 있다. HACCP는 세계적으로 인정되고 있으며 체계적인 적용 수단으로 사용되고 있는데 이는 total management system 또는 ISO 9000 system에서 구체화 될 수 있다. Critical limits 와 monitoring procedure는 critical control point에서 그 안전성을 최대한 확보할 수 있는 수준으로 확립되어 있다. 이와같은 규제 이외에도 위생에 대한 강력한 규격 제정에 대한 소비자로부터의 압력이 증가되고 있으며 저장기간이 짧은 식품에 대해서는 더욱 더 강력한 수준의 압력이 증가되

고 있는 실정이다. 더우기 생산공장의 규모가 증가됨에 따라 오염물질의 혼입 등이 발생할 경우 생산된 대량의 제품의 소비가 불가하므로 엄청난 재정적 손실을 볼 수도 있다. 이 밖에도 세계적으로 보고되는 식중독 관련사례와 더불어 hygiene monitoring의 전통적 방법으로 수행되고 있는 경향분석(trend analysis)에 대한 쇠퇴는 가속화되고 있다. 이것은 공장위생측정이 실험실에서 보다는 제품 제조 현장에서 신속하게 측정될 수 있는 새로운 기술이 강력하게 요구되고 있기 때문이다.

## 2. 전통적인 방법 및 ATP bioluminescence

식품 생산에 관계된 기계나 식품과 접촉하는 부위(food-production surfaces)의 위생정도는 고품질이면서 안전한 식품생산에 중요한 요인이다. Surface의 cleaning은 clean in place (CIP) system이나 사람에 의하여 행하여지게 된다. Cleaning은 잔여물질을 제거하기 위한 deterging stage와 미생물을 사멸시키는 sanitising stage의 두 단계로 구성되어 있다. 적절하지 못한 cleaning은 잔여물질과 미생물을 제거하지 못하므로 다음 batch에 진행되는 식품의 안전성을 떨어뜨릴 수 있다. 잔여물질이 존재하는 경우 초기 낮은 수로 존재하는 미생물에게는 충분한 영양소가 될 수 있으며 surface의 cleaning과 재사용 사이의 시간동안 충분히 성장할 수 있는 가능성이 있다. Cleaning 효율을 측정하는 전통적인 방법은 cotton-tipped swab으로 sampling 하여 선택배지나, 비선택배지를 사용하여 균수를 계수하는 agar plate technique이다. 그러나, 이 방법은 surface 미생물에 대한 회기적 경향 분석(retrospective trend analysis)에 매우 좋은 수단이 되지만 microscopical colony가 macroscopical colony로 분할 하여 미생물 계수가 가능할 때 까지 보통 1~7일 정도의 긴 시간이 요구된다. 따라서 이러한 방법은 surface에 대한 미생물 존재 경향

만을 분석할 뿐이지 잔여물질에 대한 어떠한 자료도 제공하지 못하며 오염된 surface의 재사용을 방지할 수 있을 만큼 빠르지 못하다는 것이 최대의 결점이다.

전통적으로 사용되어온 swabbing과 plate count procedure는 단지 식품이 닿은 surface의 미생물 오염만 검출할 뿐 surface의 위생정도가 적합한지 여부를 신속하게 알려주지는 못한다. 그러나 ATP bioluminescence는 측정하고자 하는 대상의 전반적인 hygiene condition을 제공하며 결과도 수분내에 알 수 있다. 예로서, Seeger와 Griffiths가 meat slicers에 대한 실험에서 살펴본다면 meat slicer blades와 food tray를 swab한 후 plate count와 ATP bioluminescence를 이용해 실험한 결과 세척이 충분이 이루어진 후에는 두 가지 방법 모두 낮은 수치를 나타내었다. 그러나 meat slicer blades 사용후 다시 측정된 결과 plate count는 여전히 동일한 수치를 나타내었지만 ATP bioluminescence는 현저히 상승한 수치를 나타내어 위생상태가 청결하지 않음을 알 수 있었다. 실험결과들이 신속하게 나오지 않는다면 오염된 surface의 재사용을 막을 수 없다. 따라서 이러한 전통적인 기술은 정밀성과 간편성이라는 장점에도 불구하고 최근에는 신속한 결과에 대한 요구가 훨씬 가치 있게 여겨진다.

## 3. ATP bioluminescence

ATP bioluminescence는 미국 북부에 서식하는 반딧불이, *Photinus pyralis*에서 자연적으로 발생하는 decarboxylation 반응에 기반을 두고 있다(그림 1). Bioluminescence reaction은 1940년 처음 소개 되었으며 luciferin-luciferase system을 이용한 ATP 함량의 측정방법은 1949년에 발표되었다. 그 후 ATP의 양을 측정하는 매우 정밀한 방법 등이 계속적으로 발전하고 있다. ATP assay는 매우 다양한 종류의 방법으로 널리 사용되어 왔다.

ATP assay의 최초 이용은 1960년대에 NASA

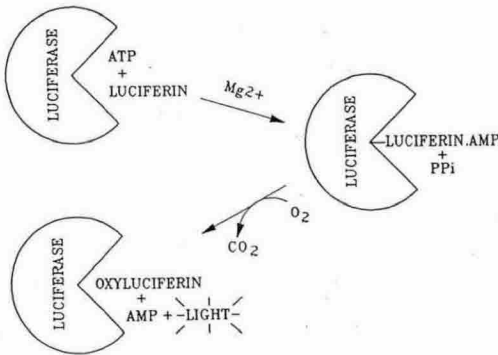


그림1. ATP bioluminescence 반응 기작

에서 다른 행성의 생물체 존재를 확인하기 위하여 사용하였으며 또한 음용수의 미생물 안전성을 측정하는 방법으로 신속 검출에 이용된 것이다. 이러한 새로운 기술을 빠르게 적용한 분야는 유제품 산업으로서 원유에 대한 검사기준 및 공장내의 생산 line에 대한 검사체계를 설정하여 생산 유제품 및 우유의 shelf-life 설정에 이용하고 있다. ATP bioluminescence의 식품공장에서의 적용은 많은 연구자들에 의해 연구되고 있으며 hygiene monitoring 이외에도 미생물이 존재하거나 관여하고 있는 sample(fermented liquor, activated sludge, starter culture)의 미생물 측정 등 다양한 분야에서 사용되고 있다.

이것은 모든 살아있는 세포가 대사작용에 이용되는 에너지의 근원인 ATP를 가지고 있으며 식품의 경우도 오염된 미생물에 존재하는 ATP와 non-microbial ATP(free ATP)로서 존재하므로 측정 가능하다. 특히, 반딧불이의 꼬리에 존재하는 enzyme-substrate complex인 luciferin-luciferase는 화학 에너지를 빛에너지로 전환 시키며(그림 1) 따라서 발광된 빛의 양은 ATP의 농도와 비례하므로 세포내 ATP의 양은 biomass를 산출하기 위한 좋은 지표가 될 수 있다. 비록 살아있는 세포내의 ATP양은 환경조건에 따라 약간의 차이는 있지만 cell내의 ATP pool은 일반적으로 일정하기 때문에(Stanley, 1989) cellular ATP를

측정하는 것은 biomass의 좋은 indicator가 된다.

반딧불이의 luciferase는 세포내 거의 모든 ATP를 이용할 수 있으며 또한 ATP 이외의 다른 핵산과는 거의 반응하지 않으므로 ATP의 선택측정에 좋은 방법이 될 수 있다. 이때의 최적 반응 조건은 pH는 7.75이며 온도는 20~22℃이다. 한 분자의 ATP는 한 개의 photon을 생산하며 미생물에 존재하는 ATP는 일정하므로 발산된 빛의 양을 측정함으로써 미생물의 존재 및 그 수를 측정할 수 있다. 이때 발산되는 빛(Light output)은 relative light units(RLUS)로 측정되는데 이 단위는 ATP 또는 colony-forming units present의 실제양을 계산하기 보다는 상대적인 비교에 사용된다. 빛 output은 luminometer로 측정하는데 이 기기는 photomultiplier, recorder, 그리고 recorder에 연결된 amplifier로 구성되어 있으며 이 recorder는 direct current chart recorder 또는 pulse counter 두가지가 있고 이것은 luminometer가 direct current mode 또는 photon-counting mode 중 작동 되는 방법에 따라 선택할 수 있다. 상업적으로 이용가능한 luminometer와 imaging 장치는 적은 양의 빛을 측정하는데 사용된다. 측정된 결과들은 process environment의 real-time control을 허용하는 수분 내에 얻을수 있다.

### 3.1 ATP bioluminescence applications in modern food hygiene

ATP bioluminescence 기술은 일반적으로 측정하고자 하는 대상 surface를 swabbing한 후 swab을 그림 2의 방법에 따라 측정한다. 이러한 측정시스템은 여러 회사에서 생산되고 있으며 크게 3가지 형태(cuvette-based, pen-based, swab-based system)로 생산된다. 물론, 이 세가지 system의 원리는 동일하지만 운영 protocol에 약간의 차이가 있다.

ATP bioluminescence를 hygiene monitoring에 사용하려면 먼저 surface의 cleaning 전후의

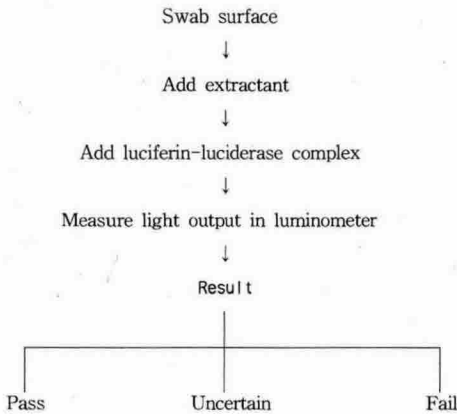


그림2. ATP bioluminescence technique

ATP 량을 측정하여 그 범위를 산출하는것이 효과적이다. 예로서 milk tank와 reception tanks(silos)의 cleaning efficiency를 알기 위하여 cleaned, rinsed vessel에 대하여 750 번 이상의 assay를 시행하여 기준을 정하였다(표 1). 결과 해석을 위하여 plate count를 동시에 실시한 결과 plate count에서 검출되지 못한 부적절한 cleaned surface가 ATP bioluminescence에서는 62 경우가 더 검출되었으며 그 반대의 경우는 27건에 해당하였다.

적합 또는 부적합 판정을 내리기 위해 다양한 sample site로 부터 측정한 이 결과들을 확보하여

표 1. ATP bioluminescence criteria for assessing cleaning efficiency of mik tankers and reception tanks.

Criteria	ATP assay (PLU per assay)
Efficient clean	<5
Moderate clean	5-15
Poor clean	16-69
Unclean	>70

Swabbing area 10 cm: Kyriakides(unpublished data)

운영프로그램화 하는데는 수주 이상이 소요된다. 이러한 시간동안 contact time, solution temperature, detergent의 농도 등을 최적화한다면 sanitation program은 최적의 위생상태를 보장하기 위해 monitor 될 수 있을 것이다. HACCP 견지에서 보면 sampling site는 random environmental sample 뿐만 아니라 critical control point가 될 수 있는 모든 장치를 포함한다. Cleaned surface의 ATP level은 surface의 종류가 stainless steel, polypropylene 등 재질에 따라 유동적이며 또한 사용되는 disinfection chemical 종류에 따라 유동적으로 변할 수 있다. ATP level에 대한 기준을 확립하는 과정에서 발생하는 이러한 변수들은 clean surface의 허용치를 정할 때 반드시 고려해야 한다. System을 선택할 때는 이외에도 고려해야 할 변수가 많이 있다. 분석할 sample 수에 따라 one-shot 기능을 가진 휴대형 luminometer가 적합한지 혹은 다양한 조작이 가능한 laboratory-top luminometer가 적합한지를 결정하여야 한다. 또한, data handling system에서 data의 전송과 저장능력은 부분적으로나마 분석결과에 중요한 영향을 준다. 분석장비 및 소모성인 ATP bioluminescence system의 가격도 제품 선택에 중요한 고려사항이 되어야 한다. 다양한 system중 숙달된 또는 숙달되지 않은 사람도 분석이 가능한지, 분석 장소는 실험실인지 공장인지 등 사용자의 목적에 적합한 system을 선택하는 것이 중요하다.

### 3.2 ATP bioluminescence for raw material testing

고품질의 제품을 생산하고자 한다면 본질적으로 질 좋은 원료를 사용하여야 한다. 전통적인 plate count 방법에 의하여 미생물의 안전성을 분석할 경우 원료의 구입, 가공, 최종 제품 생산 및 유통이 종료되어 제품이 소비자에게 섭취된 후에 그 결과가 나올 수 있다. Pasteurised 우유를 그 좋은 예로서 들 수 있는데 제품 생산 및 유통에 고차

1~2일이 소요된다. 따라서 이러한 경우 ATP bioluminescence를 이용하는 것이 매우 유용하다.

### 3.2.1 Raw milk quality

우유의 미생물 측정을 위한 방법으로 resazurin test가 있다. 이는 우유에 존재하는 미생물에 의해 resazurin이 reduction 되어 발생하는 색깔 변화로 미생물 수를 측정하는 방법이다. 그러나 우유의 저장 및 수급과정이 모두 저온에서 이루어지므로 우유에 존재하는 부패균은 Gram-positive, fermentative bacteria에서 Gram-negative, psychrotrophic bacteria로 변화되므로 resazurin과의 반응이 적절히 일어나지 않아 이제 더 이상 의미없는 방법이 되었다. 그 대안으로서 ATP bioluminescence를 이용할 수 있다. 우유에는 non-microbial ATP가 매우 높은 농도로 존재하므로 변형없이 바로 우유에 존재하는 미생물 측정에 이용하기는 어렵다. ATP는 free ATP, casein micelles과 존재, somatic cell 내 등 다양한 형태로 존재하여 미생물 ATP 만을 측정하기란 매우 어려운 일이다. 그러나 이것은 2단계의 detergent를 사용함으로써 해결할 수 있다. 먼저 weak detergent를 사용하여 somatic cell만 선택적으로 파괴되게 한다. 그 후, pyrase를 사용하여 유리된 free ATP를 분해한 후 strong detergent를 첨가하여 microbial cell을 파괴한 후 luciferin/luciferase enzyme을 이용하여 ATP를 측정하면 우유내의 미생물 수를 측정할 수 있다. Bossuyt(1981)은 목장에서 생산된 직후의 우유(209 sample)와 bulk milk tanker(48 sample)에 있는 미생물을 ATP assay로 측정하였을 경우 plate count assay에 비하여 0.93의 coefficient가 있다고 보고하였다. 20분 정도 소요되는 이 방법은  $10^5$  cfu/ml 정도의 sensitivity가 있다고 하였는데 이는 후에 5분 정도 소요되는 ATP platform test로 발전되었다. Filtration은 미생물을 농축할 수 있으며 반응방해물질(quenching factor) 및 non-microbial ATP를

제거할 수 있으므로 우유분석시 필요한 과정이다. Waes 등., (1989)은 filtration step를 도입함으로써 plate count assay와 비교하여 유의적인 ( $r=0.865$ ,  $n=247$ ) 결과를 얻을 수 있었으며 최소 측정 미생물수는  $2 \times 10^4$  cfu/ml이라고 보고하였다. 현재 널리 사용되고 있는 방법은 Griffiths 등 (1991)에 의하여 개발되었는데 소형의 nylon(13 mm) filter를 이용하는 방법이다. 또한 Filtration을 하지 않으면서 우유의 미생물수를 측정할 수 있는 방법이 Promega사에서 개발되었다. 소위, Enliten test로 명명되는 이 방법은 12,000g에서 원심분리하여 미생물만을 선택적으로 분리하여 ATP를 측정하는 방법이다. Martin(1991)에 의하면 이 방법의 측정가능 범위는  $10^4$  cfu/ml이라고 하였지만 현재 많은 연구가 진행되고 있지는 않는 것 같다.

### 3.2.2 Enzyme detection

원유에는 내냉성균주가 대다수 존재하며 이들의 50% 정도는 *Pseudomonas*에 속한다고 알려져 있다 (Bramley and McKinnon, 1990). 이 균주는 protease와 lipase를 포함한 다양한 효소를 생산하는데 열에 대한 안정성이 vegetable cell 보다 강하다고 알려져 있다. Pasteurisation과 ultra-high temperature(UHT) 처리를 할 경우 vegetable cell은 사멸하지만 이러한 효소는 완전히 사멸되지 않는다고 한다. High-temperature short-time(HTST) pasteurization을 하였을 경우에도 protease의 경우 66%, lipase의 경우 59%의 효소활성이 잔존한다고 알려져 있으며 UHT 처리를 하였을 경우에도 29%와 40%의 활성이 잔존한다고 알려져 있다(Griffiths et al., 1981). 이러한 효소의 작용에 의하여 상온에서 장기간 유통되는 UHT 우유의 경우 gelation, bitterness가 발생된다고 하며(Gilmour and Eowe, 1990) 치즈의 생산수율이 저하된다고 한다(Hicks et al., 1986). ATP bioluminescence를 이용하여 잔존하고 있는 protease 활성을 측정

하는 방법이 Rowe et al., (1991)에 의해 개발되었다.

이는 protease에 의한 luciferase의 분해에 그 원리를 두고 있다.

즉, luciferase가 분해되면 발산되는 빛의 양이 감소하게 된다. 따라서 protease 농도와 발산되는 빛 사이의 standard curve를 이용하면 protease의 활성을 측정할 수 있어 shelf-life 설정 등에 이용할 수 있다.

이러한 protease kit는 Biotrace Ltd에서 상업화하여 시판하고 있다.

### 3.2.3 Raw meat and fish

Meat와 fish의 경우 다른 식품과 마찬가지로 non-microbial ATP를 다량 함유하고 있다. 따라서 직접적인 방법 보다는 일단 non-microbial ATP를 제거하는 과정이 필요하다.

Stannard와 Wood(1983)는 원심분리, ion-exchange, filtration의 연속적인 과정에 의해 bacteria 만을 분리하는 방법을 발표하였다.

균질화된 meat는 먼저 2000g에서 10초간 원심분리하여 debris를 제거한 후 상등액을 cation exchange resin에 통과시켜 단백질 및 반응저해 물질을 제거한 후 filtration하여 ATP를 측정할 수 있다고 하였으며 20~25분 정도 소요된다고 하였다.

이때 resin의 pH에 따라서 미생물의 흡착정도가 결정되므로 pH를 세밀하게 조정하여야 한다.

Solid ion-exchanger를 이용하지 않는 다른 방법으로는 soluble한 cation exchange polymer인 Cat-floc 243을 이용하는 방법으로서 non-microbial ATP는 polymer에 흡착되지만 미생물은 흡착되지 않아 원심분리하여 미생물만을 분리하여 측정할 수 있다(Patel, 1984).

소고기와 양고기에서 측정된 ATP level은 plate counts와 비교할 때 미생물수가  $\log 4 \sim \log 9$  cfu/g 범위에 속해있을 때 높은 상관관계를 나타내었다고 하였다( $r=0.98$  and  $0.99$ , respectively).

## 3.3 Other applications

### 3.3.1 Starter culture activity

Starter culture activity는 여러 종류의 발효 식품을 생산하는데 매우 중요하다. 우유의 경우소에서 유래한 항생물질에 의하여 starter culture 성장이 억제되어 cheese나 yoghurts 제조시 품질 저하를 가져올 수 있으므로 우유에 대한 항생물질의 존재여부를 확인하는 것이 필요하다. 이것은 미생물(starter culture)과 nutrient medium(milk)을 혼합하여 보통 2.5시간 이상 규정된 온도에서 incubation하면서 pH와 산도변화를 계속적으로 측정함으로써 미생물 활성을 측정할 수 있다. 만일 항생물질이나 bacteriophage가 존재한다면 pH와 산도의 변화 속도에 영향을 미치므로 그 여부를 파악할 수 있다. pH/산도를 측정하는 것 대신에 ATP bioluminescence assay를 이용함으로써 미생물에 대한 항생물질이나 bacteriophage의 저해 효과의 유무를 알 수 있다. 이는 이러한 물질에 의해 미생물 성장이 저해되면 세포내의 ATP의 증가 속도도 감소하므로 저해물질이 존재 함에 대한 정보를 제공한다. Hawronskyj (1993) 등은 Biotrace Milk Microbial ATP kit(Biotrace Ltd)를 이용하여 1.5시간내에 우유에 존재하는 몇 종류의 항생물질을 검출할 수 있다고 보고하였다. *Streptococcus thermophilus*는 여러 종류의 항생물질에 대한 감수성이 예민한 미생물로서 이를 우유와 M17 broth을 혼합한 후 접종하여 1.5시간 배양후 ATP bioluminescence assay를 실시하여 결과를 얻고, 이것을 항생물질이 포함되지 않은 우유에 대한 대조결과와 비교함으로써 항생물질의 존재여부를 알 수 있었으며 1ml당 0.0048IU 정도로 낮은 penicillin농도로도 검출 가능하였다고 한다.

### 3.3.2 Microbial mass

Biomass assay는 아마도 ATP bioluminescence assay 중 가장 간단한 방법일 것이다. 이는 non-microbial ATP가 존재하지 않으므로 filtration

등의 조작 없이 직접 assay가 가능하다. Miller 등 (1978)은 brewery fermenter pitching에서 yeast를 정량하는 방법에 대하여 보고하였다. Yeast sample은 acetone으로 처리하여 세포내 ATP를 유리시켜 바로 luciferase를 첨가함으로써 간단히 측정할 수 있다고 하였다. ATP assay를 이용한 biomass 측정은 미생물의 순수배양이나 미생물 발효시 monitor로 사용 가능하며 (Stannard, 1989) 외계 생명체의 존재여부 파악에도 사용가능할 것이라고 보고되기도 하였다 (MacLeod 등., 1969)

#### 4. Bacteriophage bioluminescence

ATP bioluminescence에서 이용되는 반딧불이와 같이 빛을 발광할 수 있는 미생물도 있다. 이러한 미생물은 주로 *Vibrio*, *Photobacterium*, *Xenorhabdus*와 *Alteromonas*에 속하는데 bacterial luciferase 유전자를 가지고 있으며 long-chain fatty acid reductase complex를 가지고 있다. Bacterial bioluminescence는 reduced flavin mononucleotide(FMNH<sub>2</sub>)를 에너지로 이용하여 long-chain aldehyde(do- or tetraecanal)를 bacterial luciferase에 의해 산화시킴으로서 빛을 발산하게 된다(그림 3). Bacterial luciferase는 FMNH<sub>2</sub>에 대하여 높은 특이성을 가지는데 환원된 flavin mononucleotide는 electron transport chain(Hastings 등., 1985)에 의해 세포내에서 급속히 만들어진다. Fatty acid reductase는

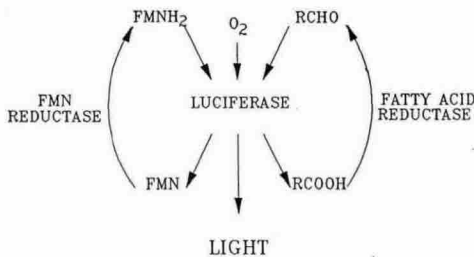


그림 3. Schematic drawing of bacterial bioluminescence

long-chain aldehyde를 만들어 반응을 진행시킨다. Bacterial bioluminescence에 관계하는 유전자들에 대한 연구는 활발하게 진행되었는데 (Meighen, 1991) 일반적으로 총체적으로 lux gene으로 알려져 있다. 해양세균인 *Vibrio fischeri* 경우 luciferase의 luciferase 구조유전자는 lux A와 lux B이며 aldehyde biosynthesis에 관계하는 구조 유전자는 lux C, lux D와 lux E이다. 또한 이들의 생합성에 관계된 발현조절은 lux I와 lux R이 담당하며 lux F, lux G와 lux H도 특정의 역할을 담당하고 있다. 최근의 유전자 조작 기술의 발달로 미생물 측정 방법이 계속해서 발달하고 있다.

#### 4.1 Detection of pathogen and indicator microorganism.

Bacteriophage는 target에 대하여 높은 특이성을 가지고 있는 bacterial virus이다. 특이성은 넓은 host range(several bacterial species)이거나 매우 좁은 host range(singel species or sub-species)로 구별된다. 따라서 기존의 알려져 있는 specificity가 좁은 bacteriophage에 luciferase 유전자를 cloning 하여 target microorganism으로 transduction 시킨다면 host cell 내에서 bioluminescence가 발생하게 되어 target microorganisms의 존재 여부를 파악할 수 있다. 예로서 bioluminescence에 관여된 유전자가 cloning 된 phage p22를 이용한다면 *Salmonella syphimurium* LT2의 존재여부를 알 수 있다(Meighen, 1991). 유전조작된 phage는 target bacterium내로 빠르게 infection 되어 lux gene의 발현이 진행되어 host cell에 bioluminescence를 가지게 한다. 이런 조작은 약 1시간 정도 소모되는데 매우 신속한 미생물 검출 방법이라고 할 수 있다. 이러한 특정 미생물 검출 방법의 가장 중요한 점은 목적으로 하고 있는 미생물에 대한 검출 실패(false-negative reactions)나 목적으로 하지 않는 미생물에 대한 반응(false-positive reactions)을 최소화 하는 것이다(Baker



등, 1992). 또한 *lux* 유전자를 bacteriophage내로 insertion하는 작업은 bacteriophage 유전자의 deletion 및 *lux* 유전자의 insertion을 요구하는 까다로운 작업이기도 하다. 흥미롭게도 bioluminescence에 관여하는 모든 유전자를 insertion 하지 않고 luciferase만 coding하고 있는 유전자만 cloning 하여도 bioluminescence에 영향이 없다고 하였는데(Meighen, 1991) 이는 long-chain aldehyde는 bioluminescence assay시 첨가하여도 전체적인 결과에는 영향을 미치지 않는다고 하였다. Stewart 등(1989)은 *lux* 유전자를 매우 좁은 host range를 가지는 bacteriophage(p22)에 cloning하여 *Salmonella syphimurium* LT2를 1시간 내에 검출할 수 있었다고 하였는데 100 cell 까지 가능하였다고 하였다. Turpin 등 (1993)은 most probable number 기법을 이용하여 soil, water, sewage sludge에서 *Salmonella syphimurium*을 검출하는 방법에 대하여 보고하였다. 그들은 24시간 배양하여 enrichment 함으로서 100ml 당 1 cell 수준까지 검출이 가능하였다고 하였다. 사용하는 bacteriophage의 specificity에 따라 측정되는 bacteria가 상이하므로 이러한 측정방법은 *Listeria monocytogenes*나 *Enterobacteriaceae* 측정 등에도 이용될 수 있다.

#### 4. 2 Detection of inhibitory substances

Bacterial bioluminescence는 항생물질, bacteriophage, 항균물질 등의 성장 저해물질에 대한 존재여부를 파악할 수 있다. *Lactobacillus* spp.나 *Streptococcus* spp. 등에 plasmid를 이용하여 *lux* 유전자를 형질전환 하면 cell 내에서 luciferase가 생산되며 대사에 관계되어 있는 FMNH<sub>2</sub>에 의해 bacteria는 bioluminescence를 가지게 되며 따라서 형질전환된 cell의 light output을 측정함으로써 cell의 사멸여부를 파악할 수 있다고 하였다(Stewart, 1990; Meighen, 1991). Stewart 등 (1989)은 *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus*

*casei*, *Lactobacillus plantarum*에 대한 plasmid vector(pSB 154)를 개발하였다고 하였으며 실제로 사용되고 있는 culture에 대하여 형질전환이 가능하므로 culture에 존재하는 성장저해물질의 존재여부를 파악하는데 이용할 수 있을 것이라고 하였다. Ahmad와 Stewart (1991)은 형질전환된 *Lactobacillus casei*와 *Lactobacillus lactis*를 이용하여 tetracycline(0.2 µg/ml)과 penicillin G(0.05 units/ml)을 30~60분에 측정할 수 있었다고 보고 하였으며 다른 9종에 대해서도 이러한 측정이 가능하였다고 하였다. 그들은 또한 형질전환된 *Lactobacillus lactis* subsp. *diacetylactis*를 이용하여 bacteriophage infection을 검출할 수 있었는데 ml당 10<sup>7</sup>이 존재할 경우 50분이 소요되었으며 10<sup>6</sup>이 존재할 경우 100분이 소요되었다고 하였다. 이 밖에도 형질전환된 bacteria는 biocide의 항균력을 신속하게 측정하는데 이용될 수 있다고 하였다. Biocide를 serial dilution한 후 형질전환된 bacteria와 반응시킴으로서 유효농도를 신속하게 측정할 수 있었다고 하였는데 이와 같은 방법이 *Listeria monocytogenes* (Walker 등., 1992)와 *Escherichia coli*(Stewart 등., 1991)에 적용한 예가 보고 되고 있다.

## 5. Recent developments in ATP bioluminescence

### 5.1 Amplification of signal

식품의 위생을 보장하기 위해서는 적은수의 미생물도 검출할 수 있는 방법이 필요하다. 소수의 미생물이 존재할 때는 적은양의 ATP가 존재하므로 bioluminescence 반응을 증폭시킬 필요성이 존재한다. 낮은수의 ATP를 검출하기 위해서 enzyme cocktail을 사용하는 방법이 있다. Amplification system은 luciferin, luciferase, phosphoenolpyruvate(PEP), adenosinmonophosphate(AMP), myokinase, pyruvate kinase등으로 구성되어 있으며 이는 AMP를 모두



ATP로 전환시켜 검출이 용이하도록 되어 있다. 이 system을 사용하였을 경우 26pM 수준의 낮은 ATP 함량도 검출할 수 있다. 이 system은 enzyme cocktail 혼합시 발생하는 최대의 light output은 결과로 사용하지 않으며 대신에 최대 light output의 절반( $t_{1/2}$ )에 해당하는 반응시간에 측정되어 결과를 도출한다. 이는 log ATP concentration이며 cleanliness의 정도를 파악할 수 있다. Enzyme cocktail에 사용하는 구성물을 조절함으로써 여러 가지 반응이 일어날 수 있다. 따라서, 다양한 기능이 있는 luminometry system을 이용하기 보다는 cocktail의 조성 변화 및 실험 design을 설정함으로써 측정 감도를 증가시킬 수 있다. Adenylate kinase를 이용하는 amplification system은 chemical and biological defence Establishment에서 발전되었다.

이 원리는 모든 박테리아에 존재하는 세포내 효소인 adenylate kinase가 ADP를 ATP로 전환하여 luciferin과 luciferase에 의해 빛을 발광하는 것에 기인한다. 이러한 amplification system은 bacteria의 level을 정량할 뿐만 아니라 낮은 수준의 ATP를 검출하는데도 효과적이다. 이것은 최근 Celsis Contect Programm의 한부분으로 발전 되었다.

## 5.2 Automation and other luminescence techniques

1980년대 말 Foss Electric(Hill-erod, Denmark)는 식품의 microbiological analysis를 측정하기 위해 반자동화된 system을 개발했다. BactoFoss라 불리는 이 system은 체세포를 lysis한 후 여과하여 microbial ATP 만을 선택적으로 농축할 수 있게 되어 있으며, 그 후 luciferin-luciferase 반응은 자동적으로 실행되며 이러한 조작은 5분 이내에 완료 된다. 생우유, 쇠고기, 돼지고기를 대상으로 실시한 결과 plate count와 높은 상관관계가 있는 것으로 측정되었다. Bioluminescence와는 달리 chemiluminescence를 이

용한 분석기술도 개발되고 있는데 menadione 존재시 light output을 측정하여 미생물의 electron transport system에 의해 방출된 hydrogen peroxide의 양을 측정하는 *peroxychemiluminescence* 방법이 보고되고 있으며 luminol의 산화를 촉매시키는 bacterial ferric protoporphyrin IX가 기저상태로 돌아갈 때 발생하는 빛을 이용하는 방법도 보고 되고 있다. 이러한 두 가지 방법은 ATP bioluminescence에 버금가는 감도를 가지고 있으나 실행하기는 어려운 것으로 알려져 있다.

## 5.3 Future trends

ATP bioluminescence assay가 성공적으로 이용되고 있는 예로는 assay 방법이 자동화 되어 있는 분야(UHT sterility testing)나 assay 방법이 단순화된 분야(hygeine monitoring) 등이 있다. 따라서 향후 숙련도가 필요하지 않는 단순화된 측정 kit나 저가의 자동화 장비로의 지속적인 개발이 요구되고 있다. 검출전의 enrichment broth의 조성 결정이나 방해물질의 제거를 위해 미생물을 분리, 농축하는 정밀 측정 기술 개발에 많은 노력이 요구되고 있다.

*Salmonella*와 food-spoilage yeast에 대한 immunomagnetic assay 방법이 보고되고 있으며 *Salmonella*와 *Listeria*에 대한 상업적 kit도 판매되고 있는 실정이다. 이외에도 solid, liquid phase ion exchanger로 미생물을 신속하게 분리, 농축하려는 연구가 진행되고 있다. Bioluminescence와 chemiluminescence를 기반으로 하는 immunoassay는 매우 민감한 검출시스템 제조에 응용할 수 있으며 분석시간도 대폭으로 단축될 수 있을 것이다. 분석하고자 하는 sample의 단순처리법 개발 및 고도의 민감성을 가지는 측정시스템의 접합으로 신뢰성 있는 강력한 분석방법이 개발될 수 있을 것이다. 향후의 가장 중요한 일은 여러 가지 첨단 기술의 접합(combining advances)으로서 더욱더 신속하고 정밀한 기술을 개발하는 것이라고 할 수 있다.

## 참고문헌

1. Hawronskyj, J. M. and John, H. 1997. ATP: A universal hygiene monitor. *Trend in Food Science & Technology*, 8, 79~84.2.
2. Griffiths, M. W. 1996. The role of ATP

bioluminescence in the food industry: New light on the old problems. *Food technology*, 62~73.3. 3. Patel, R. D. 1995. Rapid analysis techniques in food microbiology. BLACKIE ACADEMIC & PROFESSIONAL. 196~231.

