

고등어 표피의 미생물 오염도 신속측정을 위한 ATP Bioluminescence assay

오세욱 · 조진호 · 이남혁
한국식품개발연구원

Application of ATP Bioluminescence Assay for a Rapid Estimation of Microbial Levels in Mackerel(*Scomber japonicus*)

Se-Wook Oh, Jin-ho Jo and Nam-Hyouck Lee
Korea Food Research Institute

Abstracts

The utility of a bioluminescence adenosine triphosphate(ATP) assay method for estimating bacterial levels in mackerel(*Scomber japonicus*) was investigated. Mackerel was stored at 1°C throughout 10 days and its RLU(relative light unit) and APC(aerobic plate count) was determined. The ATP bioluminescence assay was validated during the storage of 32 samples, resulting in an agreement between the ATP assay and standard plate count methods of over 90% credibility. Therefore, ATP bioluminescence assay was considered as a rapid and near real-time means in estimating the microbial load on mackerel skin.

key words : ATP bioluminescence assay, rapid method

서 론

ATP bioluminescence assay는 식품공장에서 신속한 hygiene monitoring 수단으로 널리 이용되고 있으며 이외에도 미생물이 존재하거나 관여하고 있는 sample (fermented liquor, activated sludge, starter culture)에 있어 미생물의 측정 등 다양한 분야에서 사용되고 있다⁽¹⁻⁷⁾. ATP bioluminescence는 north american firefly (*Photinus pyralis*)에서 자연적으로 발생하는 decarboxylation 반응에 기반을 두고 있다.

Luciferin + Luciferase + ATP → (Luciferin-Luciferase-AMP) + pyrophosphate →

Oxyluciferin + Luciferase + CO₂ + AMP + Light

Firefly luciferase는 세포내 거의 모든 ATP를 이용할 수 있으며 또한 ATP 이외의 다른 핵산과는 거의 반응하지 않으므로 ATP의 선택측정에 좋은 방법이 될 수 있다. 한 분자의 ATP는 한 개의 photon을 생산하므로 발산된 빛의 양을 측정함으로써 ATP 함량을 측정할

수 있다.

모든 살아있는 세포는 대사작용에 이용되는 에너지의 근원인 ATP를 가지고 있으며 식품저장중 저장기간이 경과함에 따라 오염된 미생물수가 증가하며 이에 따라 상대적으로 ATP 함량도 증가하므로 ATP 함량을 측정함으로써 오염미생물의 수를 측정할 수 있다. 이는 비록 살아있는 세포내의 ATP 양은 환경조건에 따라 약간의 차이는 있지만 세포내의 ATP pool은 일반적으로 일정하기 때문에⁽⁸⁾, 세포의 ATP를 측정하는 것은 biomass 측정에 좋은 indicator가 된다.

ATP bioluminescence assay를 이용한 돈육, 우육의 미생물 품질검사에 관한 연구⁽⁹⁻¹²⁾가 다수 보고되고 있으며 이외에도 우유^(13,14), 무균포장된 주스⁽¹⁵⁾, soft drink⁽¹⁶⁾ 등 식품 산업 전반에 걸쳐 그 이용도가 증대되고 있다^(17,18).

본 연구에서는 어육의 미생물적 품질을 파악하여 신선도를 측정할 목적으로서 ATP bioluminescence assay를 이용하고자 하였으며, 대상시료로서는 고등어를 사용하였다. 고등어를 1°C에 저장하면서 저장기간에 따른 총균수의 변화 및 오염미생물에 의해 발생하는 light(RLU, relative light unit)를 측정하여 어육의 신선도 저하에 따른 오염미생물의 신속측정 가능성을 타진하

Corresponding author : Se-Wook Oh, Korea Food Research Institute, San 46-1 Baekhyun-dong, Bundang-gu, Kyonggi-do 463-420, Korea

고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

고등어(mackerel, *Scomber japonicus*)는 99년 4월 부산 공동어시장에서 구매하여 충분한 양의 새빙을 가하여 실험실로 신속히 운반한 후 실험에 공시하였다. 체장은 34~38 cm이었으며 체중은 360~385 g이었다. 고등어의 수분함량은 69.1%, 조단백질은 19.7%, 조지방은 9.9%이었으며 휘발성염기질소(Volatile basic nitrogen, VBN) 함량은 6.40 mg% 이었으며 swabbing 방법에 의해 측정된 총미생물수는 8.8×10^3 (colony/cm²)으로 비교적 선도가 우수하였다.

ATP bioluminescence assay

Sampling sponge(Promega, USA)를 사용하여 고등어 표면을 swabbing 하였다. Swabbing 용액[0.085% NaCl(wt/vol) + 0.05%(vol/vol) Tween 20, pH 7.8]을 사용하였으며 이후 Stomacher bag에 넣어 2분간 균질화 하였다. 여기서 50 μ l의 sample을 취하였고 somatic ATP extraction reagent인 NRSTM(nucleotide-releasing agent for somatic cells; Lumac B.V., Netherlands)를 80 μ l와 somase를 첨가한 후 vortexing을 실시한 후 5분간 상온에 방치하였다. 여기에 100 μ l의 microbial ATP extraction reagent인 NRBTM(nucleotide-releasing agent for bacterial cells)를 첨가하여 luminometer(TD-20/20 Luminometer, TURNER DESIGNS, USA)에서 RLU를 측정하였다. Luminometer는 반응 1초 후부터 10초간의 integration time을 설정하여 실시하였다.

ATP calibration curves

ATP standard 용액(10^{-7} M, promega, USA)을 연속적으로 희석하여 ATP bioluminescence assay를 실시하였으며 luminometer를 이용하여 RLU 값을 측정하여 작성하였다.

APC(aerobic plate count)

Swabbing 후 용액을 10진 희석하여 Tryptic soy agar (TSA, Difco Laboratories)를 사용하여 계수하였다. 배양조건은 25°C에서 48시간으로 하였다.

통계처리

Least square regression test와 student's test를 이용하여 standard curve equation을 분석하였다⁽¹⁹⁾.

결과 및 고찰

ATP 함량에 따른 RLU의 변화

ATP standard solution(10^{-7} M, promega)의 제조를 위하여 ATP free water(promega)를 사용하여 연속희석한 후 ATP bioluminescence kit를 이용하여 RLU를 측정하여 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. ATP 함량이 10^{-12} M 이하의 농도에서는 RLU가 측정되지 않는 것으로 나타나 ATP 함량이 10^{-12} 이상의 농도에서 ATP bioluminescence assay가 가능함을 알 수 있었으며 10^{-9} 이상의 농도에서는 발광되는 빛의 양이 너무 많아 본 실험에 사용한 TURNER luminometer로 측정되지 않음을 알 수 있었다. 10^{-12} ~ 10^{-9} 까지의 ATP 농도

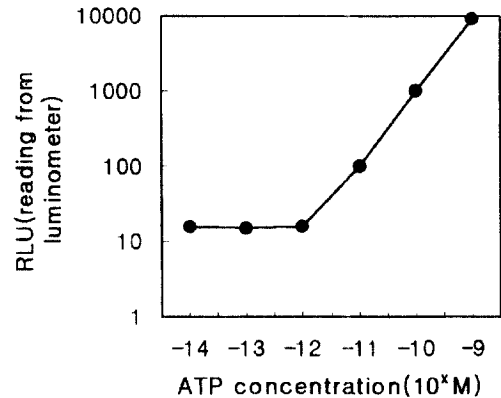


Fig. 1. RLU changes according to ATP concentration. ATP standard solution was serially diluted and ATP bioluminescence assay was conducted. The result was measured by TD-20/20 Luminometer(TURNER DESIGNS)

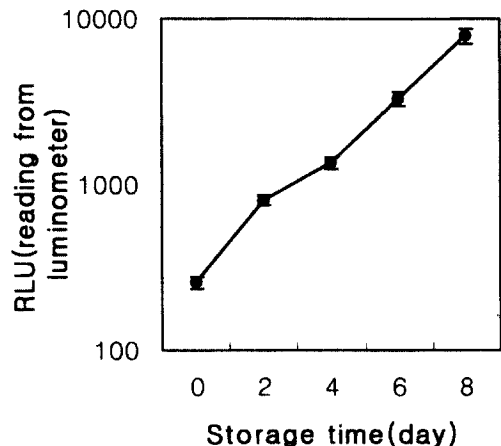


Fig. 2. RLU changes of mackerel skin measured by ATP bioluminescence assay during storage at 1°C for 10 days.

에서는 RLU 값을 log graph로 표시하였을 경우 일직선을 나타내 검출가능 범위를 알 수 있었다.

고등어의 저장기간에 따른 RLU의 변화

신선한 상태의 고등어를 구입하여 1°C에 저장하면서 2일 간격으로 시료를 취하여 ATP bioluminescence assay를 이용하여 RLU를 측정하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 저장 직후의 RLU는 257±23으로 측정되었으며 저장 2일경에는 812±64, 저장 4일경에는 1,354±112, 저장 6일경에는 3,270±295로 측정되었으며 저장 8일 경에는 7,823±814로 측정되어 저장기간이 경과함에 따라 RLU가 급속히 증가함을 알 수 있었다. 판능검사 결과(테이타는 제시하지 않음) 저장 6일 경의 시료에서부터 부패취가 느껴지기 시작하였으므로 RLU로 판단할 경우 1,300~3,200 정도의 RLU를 나타내는 동안에 초기부패가 진행되는 것으로 생각되었다.

ATP bioluminescence assay에 사용되는 고등어 표면을 swabbing한 용액을 이용, 10진 희석하여 Tryptic Soy Agar에서 총균수를 측정하여 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 저장 초기의 총균수는 8.8×10³(colony/cm²)으로 측정되었으며 2일 경에는 9.3×10⁴으로, 4일경에는 8.8×10⁵으로 측정되었으며 6일경에는 6.1×10⁶으로 나타나 저장 4일~6일 사이의 시점에서 관능적인 초기부패가 진행되었음을 알 수 있었다.

고등어 표면의 총균수와 RLU의 상관관계

고등어의 1°C 저장중 초기부패 단계라고 생각되는 저장 6일째의 고등어를 대상으로 ATP bioluminescence assay를 실시하였으며 그 결과 측정된 RLU 값을 Fig.

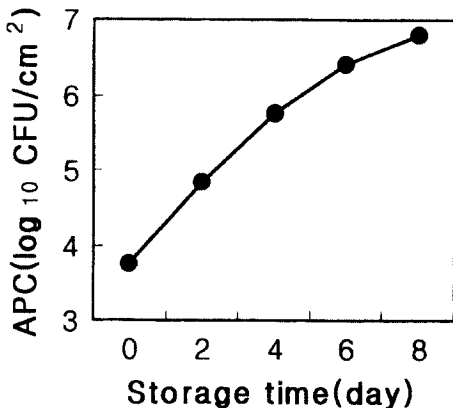


Fig. 3. Total microbial count of mackerel during storage at 1°C for 10 day. Swab solution was serially diluted and poured with Tryptic soy agar, incubated at 25°C for 48 hr.

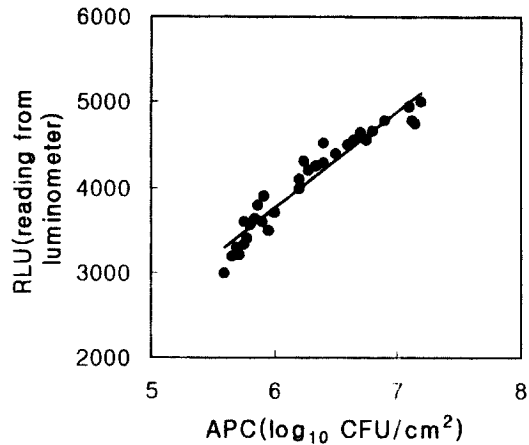


Fig. 4. Scatterplot of ATP bioluminescence assay values and aerobic plate counts for 32 mackerels. The solid line is the regression including all data points. Sample were stored at 1°C for 4 days.

4에 나타내었다. 대상 시료는 동일한 온도조건에서 저장된 고등어 32마리로 하였다.

APC는 4.0×10⁵~2.0×10⁷까지 분포되어 있었으며 RLU는 3,000~5,000 사이에서 측정됨을 알 수 있었다. 각각의 시료에 대한 scattergram에서 regression equation은 y = 1129x-3021의 1차식으로 표시할 수 있었으며 이때의 regression coefficient는 0.92로 측정되어 비교적 높은 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

APC와 ATP bioluminescence assay에 의한 총균수와의 상관관계

고등어 표면의 총균수를 swabbing 방법으로 측정된 실제의 측정치와 ATP bioluminescence assay를 실시하여 측정된 RLU를 총균수로 전환(Predicted plate count = 0.0008(RLU)+3.1583)하여 산출된 총균수를 구하여 두 가지 결과에 대한 상관관계를 파악하기 위하여 동일한 그래프에 나타내었다(Fig. 5). 대상 시료는 1°C 온도 조건에서 6일간 저장한 고등어 32마리로 하였다. 이 결과의 regression equation을 구하였을 때 y = 0.9451x+0.3382로 나타낼 수 있었으며 이때의 regression coefficient는 0.91로 나타나 미생물 측정을 위한 두 가지 방법간의 높은 유의적 관계가 있음을 알 수 있었다. 따라서 보편적으로 사용되고 있는 APC 방법을 대신하여 ATP bioluminescence assay에 의한 총균수 측정 방법이 유효하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

결론적으로 기존의 APC 방법을 이용할 경우 48시간 정도 소요되는 것에 비하여 ATP bioluminescence

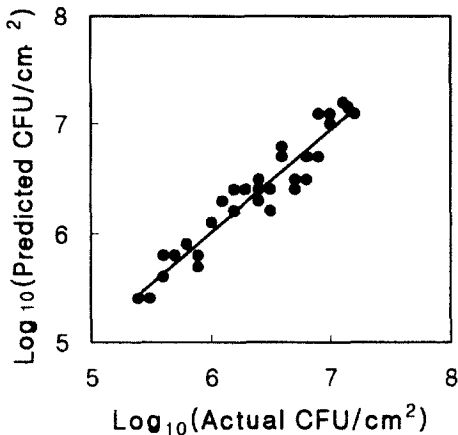


Fig. 5. Linear relationship between predicted CFUs and conventional CFUs for 32 mackerels. The solid line is the regression including all data points. Sample were stored at 1°C for 4 days.

assay를 사용하게 되면 30분 이내(전처리 포함)에 측정할 수 있으므로 신속한 미생물 측정 방법으로서의 의미가 큰 것으로 판단되었다.

요 약

고등어의 저장중 표피 오염 미생물 수를 신속하게 측정하여 신선도 판정을 위한 자료로 활용하고자 ATP bioluminescence assay에 의한 측정가능성을 파악하고자 하였다. 고등어를 1°C에 저장하면서 표피를 swabbing 방법에 의해 미생물을 분리하여 총균수의 변화와 ATP bioluminescence assay에 의한 RLU 값을 측정하여 상관관계를 측정하여 본 결과 0.90 이상의 regression coefficient를 나타내어 유의적인 관계가 있음을 알 수 있었다. 따라서 ATP bioluminescence assay는 고등어 표피 오염 미생물의 신속 측정 방법으로 적합함을 알 수 있었으며 이 방법을 사용하였을 경우 기존의 48시간 이상 소요되는 전통적인 plate count 방법에 비하여 전처리를 포함하여 30분 이내에 결과를 알 수 있는 매우 신속하고 정확한 측정방법임을 알 수 있었다.

문 헌

1. Patel, P.D. Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology, p. 5. Blackie Academic & Professional Press, London, England (1983)
2. Blasco, R., Murphy, M.J., Sanders, M.F. and Squirrel, D.J. Specific assays for bacteria using phage mediated

- release of adenylate kinase. *J. Appl. Microbiol.* 84: 661-666 (1998)
3. Bell, C., Stallard, P.A., Brown, S.E. and Standley, J.T.E. ATP bioluminescence techniques for assessing the hygienic condition of milk transport tankers. *Int. Dairy J.* 4: 629-640 (1994)
4. Murphy, S.C., Kozlowski, S.M., Bandler, D.K. and Boor, K.J. Evaluation of adenosine triphosphate-bioluminescence hygienic monitoring for trouble-shooting fluid milk shelf-life problems. *J. Dairy Sci.* 81: 817-820 (1998)
5. Gruenewaelder, T. and Laaff, R. Rapid test methods on the basis of ATP bioluminescence. Active hygiene management in the brewing and beverages industry. *Brauwelt* 138: 314-317 (1998)
6. Griffiths, M.W. Rapid microbiological methods with hazard analysis critical control point. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 80: 1143-1150 (1997)
7. Ehrenfeld, E.E. ATP bioluminescence: real time testing of cleaning effectiveness. *Food Technol. in Eur.* 2: 151-153 (1995)
8. Stanley, P.E. Rapid measurements of bacteria by ATP assay. *Lab Equipment Digest*, February: 62-67 (1982)
9. Werlein, H.D. and Fricke, R. Applicability of the swab sampling technique in order to determine the microbial quality of poultry by means of ATP bioluminescence. *Archiv fuer Lebensmittelhygiene* 48: 14-16 (1997)
10. Siragusa, G.R., Cutter, C.N., Dorsa, W.J. and Koochma-raie, M. Use of a rapid microbial ATP bioluminescence assay to detect contamination on beef and pork carcasses. *J. Food Prot.* 58: 770-775 (1995)
11. Batista, D.A., Vaillancourt, J.P., Clarke, R.A., Renwick, S. and Griffiths, M.W. Rapid assessment of the microbiological quality of poultry carcasses. *J. Food Prot.* 58: 551-554 (1995)
12. Cutter, C.N., Dorsa, W.J. and Siragusa, S.R. A rapid microbial ATP bioluminescence assay for meat carcasses. *Dairy, Food Environ. Sanitation.* 16: 726-736 (1996)
13. Bell, C., Bowles, C.D., Toszeghy, M.J.K. and Neves, P. Development of a hygiene standard for raw milk based on the Lumac ATP bioluminescence method. *Int. Dairy J.* 6: 709-713 (1996)
14. Kearns, J. A practical approach to milk testing. *Int. Food Hygiene.* 6: 5-7 (1995)
15. Ryan, R.A. Bioluminescence testing of aseptically packaged fruit juice. *Milk Ind. Int.* 98: 13-15 (1996)
16. Blackwell, A. ATP bioluminescence and soft drinks. *Int. Food Hygiene* 7: 5-9 (1996)
17. Turantas, F. ATP bioluminescence method and applications in food microbiology. *Gida.* 21: 331-335 (1996)
18. Griffiths, M.W. The role of ATP bioluminescence in the food industry: new light on old problems. *Food Technol.* 50: 62-71 (1996)
19. Snedcor, G.W. and Cochran, W.G. *Statistical Methods.* 7th ed. Iowa State University Press, Ames, USA (1980)