

**특집 : 급식산업과 위생**

**식품 안전성 연구를 위한 분자생물학적 기법의 응용:  
식품 유래 병원균의 신속한 검색, 정량 및 추적**

최상호

전남대학교 식품공학과

최근 여러 가지 식품유래 병원균(food-borne pathogen)에 의한 발병(outbreaks)은 식품과학자들을 포함한 학계, 식품산업계, 정부기관, 그리고 소비자들 모두에게 식품안전성에 대한 새로운 관심을 유발시키고 있다. 식품 안전성의 결여에 따른 식품 유래 병원균에 의한 발병은 국민 건강을 위협하여 직접적으로 보건 의료 분야에 많은 경비 부담을 유발시킬 뿐 아니라, 식품의 생산 공급체계에 부정적인 영향을 끼침으로써 국가경제 전체에 손실을 가져오기도 한다(1,8,35). 따라서 생산자와 소비자가 함께 신뢰할 수 있는 분석방법을 통한 각개 식품의 안전성에 대한 품질보증(quality assurance)은 소비자뿐만 아니라 식품산업계 자체로부터도 요구되고 있다. 이러한 시점에서 식품에 존재하는 병원성 균을 신속하게 검색하고, 정량하고 또 그들의 특성을 분류할 수 있는 방법을 고찰하는 것은 매우 의미 있는 작업이라 할 수 있겠다.

**식품에 존재하는 미생물의 검색을 위한 기존의 방법**

현재까지의 식품 등의 시료 내의 미생물공동체(microbial community)의 각 미생물 군집(population)을 정성 그리고 정량적으로 분석할 수 있는 대부분의 방법은 시료들로부터 미생물들을 분리한 후 분석하고자 하는 각각의 미생물들에게 특이한 배양 조건을 유지하여 줌으로써 각각의 미생물이 균총(colony)을 형성할 수 있게 하여 주는 plating 방법 혹은 MPN(most probable number) 방법에 그 기본을 두고 있다. 즉 각각의 개체군들을 그들의 생리적인 특징(phenotype)에 따라 정성적으로 분류하고 그들이 형성하는 colony의 숫자를 세는 방법(colony forming units)으로써 정량하였다. 하지만 위와 같은 방법에는 근본적으로 두 가지 결점을 안고 있다. 첫째는 이와 같은 방법은 인위적인 배양조건에서 생존할 수 있는 미생물만 셀 수 있다(viable count). 즉 시료의 준비 과정에서나 혹은 배양과정에서 조건이 맞지 않아 실제로 식품에는 존재하여 중요한 역할을 하는 미생물이 자라지 않고 죽어 버리는

경우가 생긴다. 이러한 배양 불가능(nonculturable)한 미생물들은 고등 생물과 기생 혹은 공생 관계에 있는 미생물들의 경우 자주 발견이 된다(27). 둘째는 그들이 설사 배양이 된다 하더라도 미생물의 각 균총의 생리적인 특징을 이용하여 분류하여 정성적으로 분석하는 방법은 하나의 미생물 세포가 균총을 형성할 때까지의 시간이 오래 걸리고 그 특이성(specificity)과 민감도(sensitivity)가 매우 낮아 아예 사용이 곤란한 경우도 생긴다(30,32). 즉 이렇게 배양 후 동정 또는 정량 하는 기존의 방법들은 다음과 같은 구체적인 문제점들을 갖고 있다.

**낮은 균총의 출현율 (low plating efficiency)**

1987년 Colwell 등은 자연시료에 존재하는 미생물을 실험실적인 조건에서 배양하고자할 때 그들 중 실제 배지 상에서 성장하여 균총을 생성하는 효율(plating efficiency)은 10% 미만이라고 보고하였다(27). 이러한 낮은 plating efficiency는 식품내의 미생물을 실험실에서 배양시킬 때도 적용이 될 것으로 생각된다. 예로 기존의 선택배지들이 대상 병원균들이 존재하는 식품 내의 물리적인 그리고 화학적인 환경을 그대로 재현시켜 줄 수 없다는 면에서 실제 식품에 존재하는 병원균을 모두 성장시킬 수는 없다. 더구나 선택배지의 경우 식품 내에 함께 존재하는 다른 여러 미생물의 성장을 억제하기 위한 여러 가지 화학제제(즉 항생제 등)를 포함하고 있다. 하지만 정도의 차이는 존재하지만 이러한 성장 억제제들은 검색하고자 하는 대상 미생물 자체의 성장도 억제시키기 때문에 일반적으로 plating efficiency는 10%선에 머물고 있다(20,21,26).

**살아있으나 성장이 불가능한 미생물 (nonculturable but viable cells)**

1980년대에 자연시료에 존재하는 *Vibrio cholerae*의 세포가 외부의 온도가 내려가는 등 성장환경이 변화되면 살아있지만 실험실의 배지 상에서 성장이 불가능한 noncul-

turable but viable(NCBV)상태의 세포로 전이됨이 관찰된 후 이러한 NCBV상태로의 전이가 많은 gram 음성 병원균의 경우 공통된 현상이 보고되고 있다(23). 이러한 NCBV상태의 병원균은 선택배지가 아닌 영양배지(enriched media)에서도 성장이 되지 않는 dormant stage(또는 resting stage)이다. 하지만 이들 NCBV상태의 미생물들이 아직 규명되지 않은 기작들에 의하여 재활성(resuscitation)되어 병을 일으킬 수 있다는 사실이 쥐를 이용한 동물실험을 통하여 증명되고 있다(24). 따라서 이러한 NCBV 상태의 병원균의 식품 내 존재는 여전히 식품안전성을 위협할 수 있으며, 기존의 배양방법에 의하여 병원균을 동정하는 방법은 이러한 NCBV상태의 병원균을 검출할 수 없다는 결정적인 단점을 갖고 있다.

정확성, 신속성, 및 민감도 (specificity, speed and sensitivity)

식품에 존재하는 미생물을 선택배지 상에 도말한 후 특정 대상 미생물만이 표현형인 생리적인 특성을 이용하여 성장하게 하거나, 또는 서로 구분이 가능한 colony를 형성하게 하는 방법은 보통 여러 환경 인자에 따라 미생물의 phenotype이 바뀔 수 있다는 점을 고려할 때 상당히 부정확한 방법일 수밖에 없다. 예로 비브리오 패혈증을 유발하는 *V. vulnificus*의 분리에 가장 자주 쓰이는 CPC(Colistin-Polymixin B-Cellobiose) 배지의 경우 어패류 식품에 자주 함께 존재하는 *V. parahemolyticus* 등을 구분하여 검출할 수 없다(26). 더구나 뒤에서 언급하겠지만 subspecies level에서의 각 병원균들의 특징은 매우 다르기도 하여, 배양 환경을 항상 동일하게 유지한다 하여도 같은 종 내의 특정 subgroup(특정 strain)은 특정 선택 배지에서 아예 성장이 되지 않아 검출이 되지 않기도 한다.

따라서 각 병원균의 최종 동정은 생화학적인 또는 면역학적인(serological) 검사를 통하여 이루어진다. 하지만 생화학적인 검사를 위하여서는 통계적으로 유의성 있는 결과를 얻기 위하여 많은 수의 각 분리군주들을 배양하여 다양한 생화학적인 특성을 조사하여야 한다(21,31). 단일 항체(monoclonal antibody)를 이용한 면역학적인 방법은 매우 특이적인 방법으로 보고되고 있다. 하지만 이 방법 역시 충분한 양의 특이적인 항원을 얻기 위하여 분리군주들의 배양 단계가 필요하다(7). 따라서 생화학적인 그리고 면역학적인 방법에 요구되는 많은 시간과 높은 경비는 이러한 기술의 실질적인 응용을 위하여서는 아직도 해결하여야 할 문제점으로 남아 있다. 예로 생화학적인 검사에

필요한 2-3일 정도의 시간은 발병되면 급속히 진행되어 인간을 치사시키는 비브리오 패혈증(2,13,25)과 같은 병을 유발하는 *V. vulnificus*를 검색하는데는 좋은 방법이 되지 못하고 있다.

식품에 존재하는 미생물공동체의 군집구조 (population structure in microbial community of foods)

일반적으로 식품 내 특히 원료 식품 내에 존재하는 미생물은 순수배양(pure culture)으로 존재하지 않고 여러 다른 진핵 또는 원핵 미생물들과 함께 혼합되어(mixed culture) 존재한다. 앞에서 언급하였듯이, 선택배지의 균 총 출현 효율이 낮기 때문에 기존의 검색 방법들은 식품 내 미생물을 일단 어느 정도 농화(enrichment)시킨 후 선택배지에 도말시킨다. 하지만 이러한 방법은 식품 내에 함께 존재하는 다른 미생물들의 성장을 촉진시킴으로써 원래 식품 내에 존재하는 미생물공동체의 군집구조(population structure)를 변화시킬 수 있으며, 그 결과 대상미생물의 군집 크기를 다른 미생물에 비하여 상대적으로 감소시킬 수 있다(32). 따라서 이렇게 농화배양 후 검출하는 방법으로는 실제 식품 내에 상당량 존재하여 식품 안전성 측면에서 중요한 역할을 하지만 검출이 되지 않아 버릴 수도 있다. 더구나 식품 내의 다른 미생물들 또는 그 식품자체와 공생 또는 기생적인 관계로 존재하는 병원균이라면 이들을 선택배지 상에서 독립 형태로 배양할 수 있는 효율은 더욱 낮을 것이다.

### 식품에 존재하는 미생물의 분자생물학적 기법을 이용한 검색

이러한 기본적인 인식 하에 최근의 분자생물학적인 기법을 이용하여 여러 식품에 존재하는 미생물들을 있는 그대로 정성 정량적으로 분석하는 방법에 대한 연구가 여러 연구팀에 의해서 시도되고 있다. 이중에서도 DNA hybridization 기술은 그 기술이 갖는 높은 민감도와 특이성 그리고 신속성 때문에 매우 각광을 받고있다(3,30,34). 이 DNA hybridization 방법은 분석하고자하는 미생물이 갖고있는 target DNA의 염기서열과 서로 상보적인 염기서열을 갖는 probe DNA를 사용하여 이 두 DNA가 서로 결합하는 힘을 이용하여 그 미생물을 검출하고 정량하는 방법이다. 이 방법은 고유 불변의 genotype에 의하여 미생물을 분류하고 정량하기 때문에 환경과 시간에 따라 변하는 phenotype에 의해 분류하는 기존의 방법들이 갖고있는

문제점들을 극복할 수 있다. 더구나 이들 검출방법은 식품 내 병원균들을 배양하여 colony를 형성시키는 단계를 포함하지 않기 때문에 신속할 뿐더러, dormant stage인 NCBV 상태의 병원균도 검출할 수 있어 매우 민감하다고 할 수 있다. 이러한 신속성과 민감도는 비브리오 패혈증처럼 그 병의 진행이 매우 빠를 경우 특히 유용하다. 즉 발병 시 신속한 역학조사와, 오염된 발병 원인식품의 규명을 가능하게 하여줌으로써 보건 의료 요원들의 정확하고 신속한 대처를 가능하게 하여 주고, 결과적으로 이러한 병의 2차, 3차 발병을 예방할 수 있게 하여 준다.

#### 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction)

중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 특정 DNA(deoxyribonucleic acid) 서열에 상보적인 한 쌍의 oligonucleotide primer를 이용하여 특정 DNA 부위를 시험관 내 (*in vitro*)에서 증폭시키는 방법이다(29). 이 방법은 대상 DNA가 존재하는 한 병원균이 viable 상태이던지, NCBV 상태이던지 구분하지 않고 증폭시킬 수 있다. 즉 검색하고자 하는 식품에 존재하는 모든 DNA를 추출한 후 이들 DNA를 template로 사용하여 병원균에 특이적인 DNA 부위를 증폭해 낸다. 이렇게 증폭된 DNA는 전기영동을 통하여 또는 digoxigenin에 의한 labeling 등을 통하여 분석되어지며 총 소요 시간은 4~5시간 정도가 소요된다.

PCR의 특이성은 사용되는 primer들과 hybridization 온도에 따라 결정된다. 따라서 design된 primer들의 염기서열에 따라 기존의 방법으로는 구분이 어려운, 계통학적으로 유사한 병원균들도 쉽게 구분하여 검색할 수 있다. 또한 이러한 PCR 검출 방법의 민감도는 primary PCR product를 2차 PCR 방법을 통하여 다시 증폭하는 nested PCR을 통하여 증진될 수 있다. 최근의 보고에 의하면 nested PCR 방법을 통하여 식품 내 단 한 개의 세포로 존재하는 *V. vulnificus*도 검출해 낼 수 있다(14,17) (Fig. 1). 하지만 template DNA를 추출해 내는 방법은 병원균이 존재하는 식품에 따라 상당히 달라질 수 있으며 종종 PCR 반응을 방해하는 inhibitory 물질이 포함될 수 있다(15,16). 따라서 이러한 방해물질을 제거하고 template DNA를 추출하는 방법은 어느 정도 식품별로 특이적이며, 각 분석 대상 식품에 따라 효과적인 template DNA 추출 방법은 각각의 경우 새로 찾아져야 한다.

#### Colony blot hybridization

앞에서 언급되었듯이 선택배지를 사용한 특정 병원균

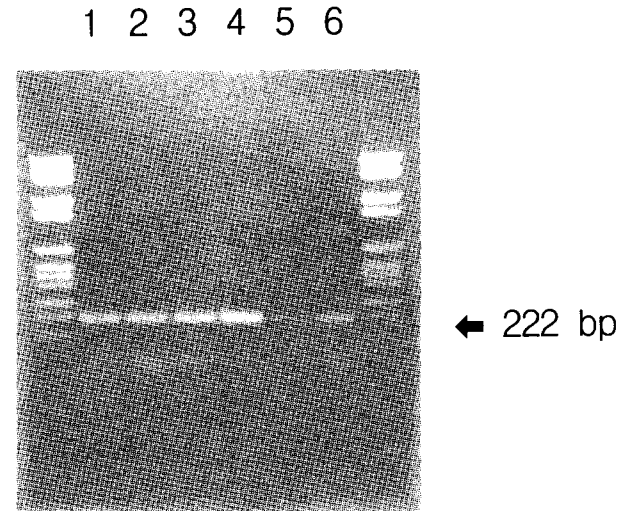


Fig. 1. General suitability of the two-stage nested PCR for detection of *V. vulnificus* in a variety of seafoods.

Each seafood was seeded with *V. vulnificus* at the level of 1 to 10 CFU/ml initially and the resulting mixtures were used without any enrichment step for extraction of template DNA. Lane 1; small octopus, Lane 2; oyster, Lane 3; arkshell, Lane 4; rockfish, Lane 5; conger, Lane 6; 100 ng of genomic DNA from *V. vulnificus* pure culture. The migrations of pBR328 DNA digested with *EgI* and *HinI* are indicated to the left and right as molecular size markers.

의 정량은 사용되는 선택배지의 균총 생성 효율이 낮다는 단점을 안고 있다. 따라서 선택성이 없으나 균총 생성 효율은 높은 비선택 영양배지 (nonselective nutritional media)를 이용하여 식품 내의 미생물이 가능한 많이 균총을 형성할 수 있게 한 후 일단 형성된 균총들을 특이적인 probe를 사용하여 특정 미생물만을 선별해낼 수 있다면 식품에 존재하는 병원균의 좀더 정확한 정량이 이루어질 수 있을 것이다.

즉, colony blot hybridization 방법은 비선택 영양배지 위에 균총을 형성하게 한 후 blotting을 통하여 nitrocellulose 등의 membrane filter에 이들 균총을 전달시킨다. 이렇게 전달된 세포를 lysis시키고 세포 내 DNA를 변형시켜 single strand로 노출시킨 후 membrane에 고정시킨 다음 이들 DNA 중 특정 균주의 DNA만 isotope 또는 digoxigenin 등으로 label된 oligonucleotide probe 또는 DNA probe로 검색해 낸다(34).

Fig. 2에서는 *V. vulnificus*의 hemolysin 유전자를 probe로 사용하여 어패류 식품에 존재하는 *V. vulnificus*만을 특이적으로 검출하는 예를 보여주고 있다. 이러한 방법은 *V. vulnificus*와 표현형적으로 또 생태학적으로 유사하여, 어패류 식품에 함께 존재하며 기존의 방법으로는 쉽게 구분이 되지 않는 *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. furnisii*,

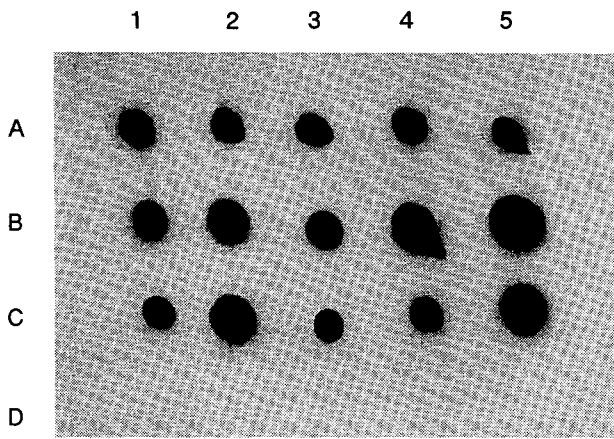


Fig. 2. Colony hybridization of *Vibrio* spp. with <sup>32</sup>p-labeled VVP probe.

For Lanes A, B and C, each blot represents a *V. vulnificus* type culture (Lane A), an environmental isolate (Lane B), and a clinical isolate (Lane C). For Lane D, *V. parahemolyticus* ATCC27519, *V. alginolyticus* ATCC17749, *V. cholerae* ATCC9459, *V. cholerae* ATCC14033, *V. furnisii* ATCC35016 (blots D1 to D5, respectively) were blotted as negative controls.

*V. parahaemolyticus* 등으로부터 *V. vulnificus*를 구분하여 특이적으로 검출할 수 있다.

#### In situ hybridization

현재까지 여러 병원성 미생물이 host(즉 raw seafood 등)에 생물학적으로 species-species level의 specific association 형태로 존재하는지 아니면 단순히 random association의 형태로 존재하는지 분명하게 밝혀져 있지 않다(27). 만약 병원성 미생물이 host와 특이적인 기생 또는 공생의 관계로 존재한다면, 그들의 대부분은 host내의 특정기관(organ) 또는 특정부위의 조직에 존재할 것이다. 그러나 만약 그들의 관계가 random association이라면 병원성 미생물들은 host 전체에 무작위로 존재할 것으로 생각된다. 따라서 식품 특히 자연 원료식품에 존재하는 미생물들의 생리적인 이해는 거기에 존재하는 미생물공동체의 구성 성분과 구조적 특징에 대한 이해와 각각 개체군들(individual population)간의 상호 관계를 이해하여야만 가능할 것이다. 더불어 이러한 이해를 바탕으로 식품에 존재하는 특정한 미생물 개체군들의 크기(population size) 또는 그들의 역가(population activity)의 조절기작을 이해할 수 있을 것이며 그들이 어떠한 방향으로 조절될 것이라는 것을 예측할 수도 있을 것이다(32). 이와 같은 궁극적인 목표를 달성하기 위하여서는 가장 먼저 공동체 내의 각 미생물들을 있는 그대로 동정(identification)하고 또 각 개

체군들의 동적인 변화(population dynamics)를 탐지하고 추적할 수 있는 방법이 정립되어야 할 것이다.

In situ hybridization은 colony blot hybridization과 그 원리는 비슷하나, hybridization이 식품 시료의 조직상에서 직접 이루어진다는 점에서 다르다. 즉 오염된 식품에 존재하는 병원균의 DNA를 식품 조직의 손상을 최소화시키는 방법으로 여러 효소학적, 또는 화학적인 방법에 의하여 노출시키고 single strand로 변성시킨다. Probe는 isotope, fluorescence 또는 reporter 효소 등으로 label된 후 hybridization반응에 사용된다. 따라서 이 방법은 식품조직상에 존재하는 병원균의 분포를 있는 그대로 검색할 수 있으므로 식품조직 또는 식품 내 다른 미생물과 특정관계로(associated form) 존재하여 독립형태(free form)로 존재할 수 없는 병원균도 검색할 수 있는 매우 유용한 방법이다. 또한 이러한 식품내의 병원성 미생물의 존재를 있는 그대로 분석할 수 있는 in situ hybridization 기술의 도입은 식품 내 존재하는 병원균들이 원료식품의 어느 부위에 어떠한 형태로 얼마나 분포하는 가를 이해하는데 매우 도움이 될 것이다. 이러한 이해는 궁극적으로 원료식품을 좀 더 안전하고 효과적으로 가공하는 방법을 제시할 것이다.

#### Luciferase reporter bacteriophage

1990년 Loessner 등은 여러 *Listeria* species를 infection시켜 lysis시키는 lytic phage A511을 발견 하였으며, 이러한 phage의 발견은 식품 내 존재하는 *Listeria* spp.들의 정성적인 그리고 정량적인 신속한 검색을 위한 reporter phage의 개발을 가능하게 하여 주었다(18). 즉, *V. harveyi*의 luciferase 유전자인 luxAB를 major capsid protein을 coding하는 cpc 유전자의 promoter의 down stream에 fusion시켜 A511:lucAB를 개발하였다(19). 이렇게 개발된 phage는 *Listeria* host를 infection시켜 luciferase를 생성하며, 여기에 luciferase의 substrate인 aldehyde를 넣어 주면 빛을 생성한다. 이렇게 생성된 빛의 양은 식품 내 존재하는 *Listeria*의 농도에 정량적으로 비례한다고 보고되었다(Fig. 3).

이러한 방법은 분석의 시작에서 끝까지 24시간 정도가 소요되는데, 이러한 신속성은 기존의 *Listeria*를 선택 배지에 배양한 후 생화학적인 방법을 통하여 동정하는 방법이 최소한 4일 정도 걸리는 것에 비하여 매우 효과적이다. 또한 좀더 제한된 host range를 갖는 phage를 이용한다면 식품 내의 병원균들을 species level에서 각각 특이적으로 검출할 수 있는 reporter phage의 개발이 가능할 것이다.

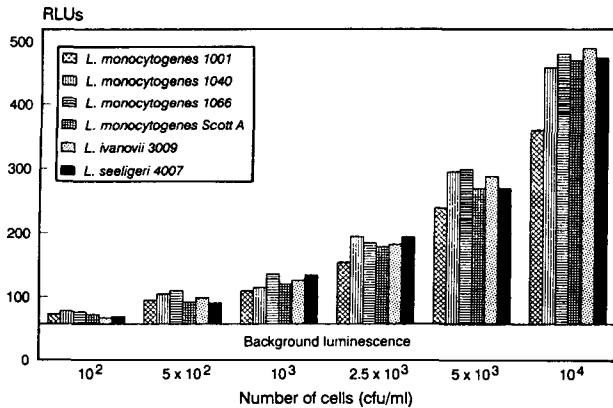


Fig. 3. Detection of *Listeria* spp. with the bioluminescent reporter phage A511::luxAB.

Cultures were diluted to the concentrations shown, infected with  $3 \times 10^8$  A511::luxAB phage  $\text{ml}^{-1}$ , incubated at  $20^\circ\text{C}$  for 130 min, and assayed for bioluminescence. Background luminescence (approximately 60 relative light units [RLU]/10s) is shown at the bottom of the graph.

### 식품 유래 병원균의 DNA fingerprinting 및 monitoring

병원성 미생물 특히 병원성 세균의 subspecies level로 분류는 각 subgroup들이 각기 다른 생리적인 특성, 특히 서로 다른 정도의 virulency를 갖고 있다는 점에서 많은 연구자들의 관심을 받아왔다(11,12,25). 즉 병원성 미생물들을 subspecies level의 specific strain으로 분류하여 추적할 수 있는 기술은 병원성 미생물에 오염된 식품의 섭취에 의한 발병의 병인론적인(etiological) 조사와 감염 원인식품의 규명, 감염경로 또 식품의 오염경로 규명 등의 연구를 가능하게 하여 주었다.

병원성 미생물들은 처음에는 그들이 감염(infection) 시키는 대상 host에 따라 여러 가지의 biotype으로 분류하였다. 하지만 이제까지의 병원성 세균들의 가장 일반적인 molecular typing은 그들을 면역화적인 특성에 따라 여러 가지의 serogroup으로 분류하는 것이었다(28). 하지만 이 방법은 기술적인 난이도 외에도 그렇게 분류된 subgroup의 구성원들간의 생리적인 특성들에 있어서 공통성이 매우 제한되어 있다는 단점을 안고 있다.

#### DNA Fingerprinting

1990년대 초에 들어와 병원성 세균들의 genomic DNA 또는 specific sequence의 DNA가 보여주는 gel electrophoresis의 pattern을 비교하여 이들을 분류하는 방법(fingerprinting)이 소개되었으며, 그 방법이 쉽고 재현성

이 높다는 측면에서 매우 실질적인 방법으로 평가되고 있다(33). 병원성 세균의 DNA fingerprinting을 이용한 분류 방법은 크게 세 가지 방법으로 나누어지는데 그 첫 번째는 polymerase chain reaction(PCR)으로 특정 DNA sequence를 증폭하여 증폭된 DNA fragment를 *Sau3A* 1 등의 4-base cut 제한 효소로 잘라 전기영동을 한 후 그 band의 RFLP(restriction fragment length polymorphism)를 분석하는 것이다(22,33). 이 방법은 기술적으로는 쉬우나 그 PCR target이 되는 유전자의 성격에 따라 진화적인 divergency의 정도가 다르므로 그 PCR target 유전자의 선택이 중요하다. 따라서 PCR로 증폭된 특정 DNA fragment가 보여주는 RFLP의 divergency를 확대 해석하여 병원성 세균 자체의 분류 기준으로 삼기에는 문제점이 있다.

따라서 이처럼 specific DNA sequence의 RFLP가 갖는 문제점을 극복하기 위하여 1990년대 초에 AP(arbitrary primer) PCR법에 의한 세균의 분류 기술이 개발되었다(36,37). 즉 arbitrary primer를 사용하여 PCR로 chromosomal DNA를 무작위로 증폭한 후 증폭된 DNA fragment들을 전기영동으로 분리하고, 이렇게 분리된 DNA band들의 pattern에 따라 그 세균을 subspecies level로 분류하는 방법이다. 이렇게 AP PCR 증폭에 의하여 생성되는 DNA fragment들을 RAPD(random amplified polymorphic DNA)라고 한다. 하지만 이 RAPD에 의한 typing 역시 그 arbitrary primer의 선택과 PCR의 조건에 따라 그 결과가 달라지는 등 기술적인 어려움을 아직 갖고 있다.

최근에 pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)를 이용한 genomic typing(또는 chromosomal typing) 방법에 의하여 병원성 세균을 각 subspecies level로 분류하려는 시도가 시작되고 있다. 즉 세균의 genomic DNA를 rare cut(8-base cut) 제한 효소로 digestion한 후 PFGE로 분리한 후, 그 band의 profile에 따라 그 세균을 subspecies level로 분류하는 방법이다. 이렇게 적당한 제한 효소로 처리 후 PFGE에 의해 분리된 genomic DNA band pattern을 REDP(restriction endonuclease digestion profile)라고 한다. 최근 REDP를 이용한 병원성 세균의 chromosomal DNA typing은 미국 Wisconsin대학교의 Dr. J. B. Luchansky에 의한 *Listeria monocytogenes*의 분류와 *E. coli* O157:H7의 분류 등을 시작으로 그 응용의 폭이 확대되었다(6,9,10). 한 예로 1994년 역시 미국 Wisconsin대학교의 Dr. C. W. Kaspar group은 다섯 개의 serogroup으로 나누어져 있는 *Yersinia enterocolitica*의 60 strain들의 chromosomal DNA를 *NotI* 등의 제한 효소로 digestion한 후 PFGE의 일종인 clamped homogenous electric field

(CHEF) gel electrophoresis에 의하여 분리한 후, 30여 종류의 REDP group으로 다시 분류하였다. 이들의 결과에 의하면 각각의 serogroup들은 각기 specific REDP를 보여 주며 각각의 REDP는 매우 reproducible하였다(4,5). Fig. 4에서는 국내 어패류 식품 등 자연시료와 비브리오 패혈증 환자로부터 분리한 54 종류의 *V. vulnificus* 분리주들을 *Sfi*I을 이용하여 분석한 REDP profile을 보여주고 있다.

병원균의 추적과 감시 (tracking and monitoring)

식품위생 측면에서 이들 병원균의 subspecies level로 분류기술은 발병을 일으킨 원인균을 역학적으로 추적하고 감시(tracking and monitoring)할 수 있는 수단을 제공하여 주고 있다. 즉 발병 원인균이 어느 특정 식품 또는 어느 특정 지역의 식품에서 유래하였는가를 거꾸로 추적(back tracking)하여 그 감염경로를 규명할 수 있게 하여 주고 있다.

한편 1997년 Tamplin 등은 굴(oyster)에는 subspecies level에서 서로 다른 수백 종류의 *V. vulnificus* strain들이 발견되었으나 그 굴을 먹고 사망한 환자의 시체로부터는 오직 한 종류의 virulent한 *V. vulnificus* strain이 검출되었음을 보고하였다(11). 이러한 보고는 굴 내에 존재하는 모든 *V. vulnificus* strain들이 pathogenic하지 않으며 그 중 오직 몇 strain만 이 발병에 직접 관여한다는 것을 제시하고 있다. 또한 이러한 보고는 이제까지 결정되어온 infection dose(LD<sub>50</sub>)가 virulency strain들만을 이용하여 다시 결정되어야 한다고 제시하였다.

이러한 일련의 보고들은 식품 내 특정 병원균의 존재보다는 특히 virulent strain들에 의한 오염정도가 식품의 안전성 측면에서 더 중요한 의미를 부여한다는 것을 의미하기도 한다.

식품 가공공정에서의 응용

이와 같이 병원균을 subspecies level로 분류할 수 있는 기술의 개발은, 기존의 연구와는 달리 병원균들을 각 strain 별로 구분하여 연구하는 것을 가능하게 하여 주었다. 즉 한 예로 서로 다른 식품에 오염된 병원성 미생물은 그들이 계통학적으로 같은 종으로 분류된다 하더라도 그들이 존재하는 각 식품의 종류에 따라 독성학적인 특성이나 열 또는 냉장온도에 대한 저항성 등이 서로 다를 수 있다. 심지어 동일한 식품 원에 존재하는 병원성 미생물일 지라도 그 원료 식품이 생산된 지역의 물리 화학적인 조건에 따라 여러 가지 생리적인 특성이 다를 것이다. 따라서 생산 또는 수확되는 원료식품에 존재하는 병원성 미생물의 분포를 specific strain으로 각기 분류하여 조사하고, 분류된 각각의 strain들의 virulency를 포함한 생리적인 특성을 구분하여 조사하는 것은 식품의 안전성 향상에 큰 기여를 할 수 있는 매우 중요한 정보를 제공할 것이다. 한 예로 식품 내 특정 strain들의 분포와 그들의 생리적 특성에 대한 정보는 그들의 효과적인 불활성화를 위한 최적의 가공 저장 유통 공정을 개발하기 위하여 유용하게 이용될 것이다.

결 론

이제까지 분자생물학적 기술 특히 nucleic acid hybridization원리를 이용하여 개발된 여러 기술들의 식품안전성 연구에의 응용을 고찰하여 보았다. 이러한 방법들은 오염된 식품에 존재하는 병원균들을 선택배지에 배양한 후 그들의 표현형에 따라 동정하고 또 정량하는 기존의 방법에 비하여 많은 장점을 갖고 있다. 즉 PCR 방법은 배양단계가 생략되었기 때문에 좀더 신속하고 NCBV 상태의 균까지도 검출할 수 있으며, colony blot hybridization 방법은 선택배지를 사용하지 않기 때문에 식품 내 미생물 공동체의 군집 구조를 변형시키지 않고 특정 병원균을 좀더 정확하게 정량적으로 분석할 수 있다. 더구나 *in situ* hybridization 방법은 병원균이 식품 내 어느 특정부위에 얼마나 어떠한 형태로 분포되어 있는가의 분석을 가능하게 하여 주었다. 또한 병원균에 특이적인 phage reporter를 이용한 특정 병원균의 검색은 실제적인 응용가능성이

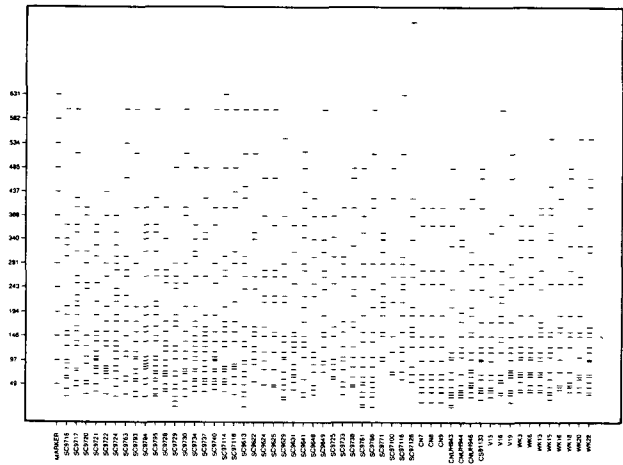


Fig. 4. Diagram of *Sfi* I REPDs of 54 *V. vulnificus* strains. PFGE band patterns of *Sfi* I digests of genomic DNA from each strain were recorded in binary scores. The migrations of  $\lambda$  DNA concatemers are indicated to the left in kb as molecular size standards.

매우 높다고 하겠다. 한편 DNA fingerprinting 기술을 이용한 특정 병원균들의 subspecies level로의 분류는 그 병원균의 감염경로를 추적하고, 원인균이 유래한 식품 source를 추적할 수 있는 방법을 제시하여 주었다.

### 참 고 문 헌

1. Bean, H. N. and Griffin, M. P. : Foodborne disease outbreaks in the United States 1973-1987: Pathogens, vehicles and trend. *J. Food. Protect.*, **53**, 711-728(1990)
2. Blake, P. A., Weaver, R. E. and Hollis, D. G. : Diseases of humans (other than cholera) caused by *Vibrios*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **34**, 341-367(1980)
3. Bsat, N., W., M., Czajka, J., B., F., Piani, M. and Batt, C. A. : Food safety applications of nucleic acid-based assays. *J. Food Technol.*, **6**, 142-145(1994)
4. Buchrieser, C. and Kaspar, C. W. : Clamped homogeneous electric fields(CHEF) gel-electrophoresis of DNA restriction fragments for comparing genome variations among strains of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia spp.* *Int. J. Med. Microbiol.*, **281**, 457-470(1994)
5. Buchrieser, C., Weagant, S. D. and Kaspar, C. W. : Molecular Characterization of *Yersinia enterocolitica* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Hybridization of DNA Fragments to *ail* and pYV Probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4371-4379(1994)
6. Buchrieser, C., Gangar, V. V., Tamplin, M. M. L. and Kaspar, C. W. : Multiple *Vibrio vulnificus* strains in oysters as demonstrated by clamped homogeneous electric field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1163-1168(1995)
7. Chen, D., Hanna, P. J., Altman, K., Smith, A., Moon, P. and Hammond, L. S. : Development of monoclonal antibodies that identify *Vibrio* species commonly isolated from infections of humans, fish, and shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3694-3700(1992)
8. Doyle, M. P. : Food safety in the 21st century. *Dairy Food Environ. Sanitation*, **13**, 490-493(1993)
9. Harsono, K. D., Kaspar, C. W. and Luchansky, J. B. : Comparison and genomic sizing of *Escherichia coli* O157:H7 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3141-3144(1993)
10. Howard, P. J., Harsono, K. D. and Luchansky, J. B. : Differentiation of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria seeligeri* by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 709-712(1992)
11. Jackson, J. K., Murphree, R. L. and Tamplin, M. L. : Evidence that mortality from *Vibrio vulnificus* infection results from single strains among heterogeneous population in shellfish. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 2098-2101(1997)
12. Kim, C. M., Jeong, K. C., Rhee, J. H. and Choi, S. H. : Thermal-death times of opaque and Translucent morphotypes of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3308-3310(1997)
13. Klontz, K. C., Lieb, S., Schreiber, M., Janowski, H. T., Baldy, S. M. and Gunn, R. A. : Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections: clinical and epidemiologic features in Florida cases, 1981-1987. *Ann. Intern. Med.*, **109**, 318-323(1988)
14. Lee, J. Y., Bang, Y. B., Rhee, J. H. and Choi, S. H. : Two-stage nested PCR effectiveness for direct detection of *Vibrio vulnificus* in natural samples. *J. Food Sci.*, **63**, in press(1998)
15. Lee, J. Y., Eun, J. B. and Choi, S. H. : Improving detection of *Vibrio vulnificus* in *Octopus variabilis* by PCR. *J. Food Science*, **62**, 179-182(1997)
16. Lee, J. Y. and Choi, S. H. : Rapid and direct detection of *Vibrio vulnificus* in Small octopus (*Octopus variabilis*) using polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **5**, 181-187(1995)
17. Lee, S. E., Kim, S. Y., Kim, S. J., Kim, H. S., Shin, J. H., Choi, S. H. and Rhee, J. H. : Direct identification of *Vibrio vulnificus* in clinical specimens by nested polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2887-2892(1998)
18. Loessner, M. J. and Busse, M. : Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1912-1918(1990)
19. Loessner, M. J., Rudolf, M. and Scherer, S. : Evaluation of luciferase reporter bacteriophage A511::luxAB for detection of *Listeria monocytogenes* in contaminated foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2961-2965(1997)
20. Massad, G. and Oliver, J. D. : New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2262-2264(1987)
21. Miceli, G. A., Watkins, W. D. and Rippey, S. R. : Direct plating procedure for enumerating *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3519-3524(1993)
22. Nei, M. and Li, W. H. : Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 5269-5273(1979)
23. Nilsson, L., Oliver, J. D. and Kjelleberg, S. : Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.*, **173**, 5054-5059(1991)
24. Oliver, J. D., Nilsson, L. and Kjelleberg, S. : Formation nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2640-2644(1991)
25. Oliver, J. D. and Kaper, J. B. : *Vibrio* species. In *Food microbiology fundamentals and frontiers*, Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T. J. (eds.), ASM Press,

- Washington, D.C., pp.228-264(1997)
26. Oliver, J. D., Guthrie, K., Preyer, J., Wright, A., Simpson, L. M., Siebeling, R. and Morris, J. G. Jr. : Use of colistin-polymyxin B-cellobiose agar for isolation of *Vibrio vulnificus* from the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 737-739(1992)
  27. Roszak, D. B. and Colwell, R. R. : Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.*, **51**, 365-379(1987)
  28. Sack, R. B. and Sack, D. A. Immunological methods for the diagnosis of infections by *Enterobacteriaceae* *Vibrionaceae*. In *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, Rose, N. R., de Macario, E. C., Fahey, J. L., Friedman, H. and Penn, G. M.(eds.), 4th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.(1992)
  29. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491(1988)
  30. Saylor, G. S. and Layton, A. C. : Environmental application of nucleic acid hybridization. *Ann. Rev. Microbiol.*, **44**, 625-648(1990)
  31. Smibert, R. M. and Krieg, N. R. : Phenotypic characterization. In *Methods for general and molecular bacteriology*. Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. and Krieg, N. R. (eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp.607-654(1994)
  32. Stahl, D. A. and Kane, M. D. : Methods of microbial identification, tracking and monitoring of function. *Curr. Opinion in Biotechnol.*, **3**, 244-252(1992)
  33. Swaminathan, B. and Matar, G. M. : Molecular typing methods. In *Diagnostic molecular microbiology*. Persing, D. H., Smith, T. F., Tenover, F. C. and White, T. J. (eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp.26-50(1993)
  34. Tenover, F. C. and Unger, E. R. : Nucleic acid probes for detection and identification of infectious agents. In *Diagnostic molecular microbiology*. Persing, D. H., Smith, T. F., Tenover, F. C. and White, T. J. (eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp.3-25(1993)
  35. Todd, C. D. E. : Preliminary estimates of cost of foodborne diseases in the United States. *J. Food Protect.*, **52**, 595-601 (1989)
  36. Welsh, J. and McClelland, M. : Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 7213-7218.37(1990)
  37. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livark, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6531-6535(1990)