



광바이오센서를 이용한 우유 및 유제품의 식중독균 신속검출법

최은영 · 장진희 · 홍성욱 · 김소영 · 배효주 · 박범영 · 오미화*

농촌진흥청 국립축산과학원

Rapid Detection Methods for Food-Borne Pathogens in Milk and Dairy Products using an Optical Biosensor

Eun-Young Choi, Jin Hee Chang, Sung Wook Hong, So-Young Kim, Hyo Ju Bae, Beom Young Park and Mi-Hwa Oh*

National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

Abstract

Milk and dairy products are not only excellent foods for humans, providing plentiful varied nutrients, but are also a good medium for detrimental food-borne pathogens. Although the food safety field has stabilized due to standardization of food processing, such as the hazard analysis critical control point (HACCP), outbreaks and cases caused by food-borne pathogens still occur at high rates. In approximately 30% of cases, the disease-causing pathogenic organism is undetermined. Recently, a biosensor was developed that has a simple and fast response and overcomes the problems of conventional methods such as cultivation, immuno-assay, polymerase chain reaction, and microarray. Due to the high selectivity and sensitivity of optical biosensors, it is a suitable method for the immediate detection of food-borne pathogens in milk and dairy products.

Keywords: Rapid detection, food-borne pathogen, optical biosensor

서 론

광바이오센서는 분석물질과 인식분자 사이의 특정한 상호작용을 광학적인 신호로 유도한 후, 이를 전기적인 신호로 변화시켜 검출을 가능하게 하는 장치이다(Turner, 2000). 광바이오센서는 저분자 펩타이드 분자에서부터 미생물에 이르기까지 다양한 타겟물질을 검출할 수 있다(Baeumner *et al.*, 2003). 전통적인 검출방법과 비교하여, 바이오센서는 특히 숙련된 기술노동력을 필요하지 않고, 높은 민감성과 선택성이 있으므로 식품산업체에서 손쉽게 적용이 가능한 장점이 있다.

우유와 유제품은 생산과정 중에 다양한 식중독균에 오염될 수 있으며(Table 1), 미생물이 증식하기에 필요한 영양

성분으로 구성되어 있어 위생학적 주의가 필요하다. 또한 우유내 미생물의 오염은 축사 규모와 위생상태, 착유 방법과 계절에 따라 달라져 예측하기가 어려우며, 우유를 저온 살균(pasteurization)한 후에도 *Listeria monocytogenes*와 같은 미생물이 잔류하여 최종제품에 검출이 된 보고가 있다(Wong, 1998).

세계보건기구(World Health Organization, WHO)는 식중독을 “식품 또는 물의 섭취에 의해 발생되었거나, 발생된 것으로 생각되는 감염성 또는 독소형 질환”으로 규정 및 관리하고 있다. 식중독은 식품의 안전성 확보를 위한 시스템이 운영되고 있음에도 여전히 인간에게 가장 높은 빈도로 발생하는 위해 요인이다. 식중독 사건이 발생하였을 때, 그 원인 병원체를 찾지 못하는 경우가 발생건수의 상당비율(약 30%)을 차지하고 있다(Table 2). 이에 따라 신속하고 정확한 역학조사와 원인 병원체 검출기술의 개발에 힘쓸 필요가 있다(권과 이, 2007).

* Corresponding author: Mi-Hwa Oh, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-350, Korea. Tel: +82-31-290-1689, Fax: +82-31-290-1697, E-mail: moh@korea.kr

Table 1. Surveys on the isolation of *Campylobacter jejuni*, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. from bulk tank milk

Foodborne pathogens	Isolation rate (%)	Reference
<i>Campylobacter jejuni</i>	12.3	Rohrbach <i>et al.</i> (1992)
	0.5	Steele <i>et al.</i> (1997)
	9.2	Jayarao and Henning (2001)
Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i>	0.9	Steele <i>et al.</i> (1997)
	3.8	Jayarao and Henning (2001)
	0.8	Murinda <i>et al.</i> (2002b)
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.6	Jayarao and Henning (2001)
	12.6	Hassan <i>et al.</i> (2000)
	1.0	Waak <i>et al.</i> (2002)
	6.5	Van Kessel <i>et al.</i> (2004)
<i>Salmonella</i> spp.	6.1	Jayarao and Henning (2001)
	1.5	Hassan <i>et al.</i> (2000)
	2.6	Van Kessel <i>et al.</i> (2004)

Note: Oliver *et al.* (2005)

이에 본 총설에서 우유 및 유제품에서 식중독균 신속검출에 적용이 가능한 바이오센서에 대해 전반적으로 살펴보고자 한다.

본 론

1. 바이오센서

바이오센서는 적절한 변환장치를 가지고 생물학적으로 항체, 파지, 압타머, 단일가닥 DNA와 같은 인지(derived molecular recognition) 분자를 통합하는 분석장치이다. 일반적인 바이오센서는 검출영역, 변환영역, 해독영역의 세 부분으로 구성되어 있다(Fig. 1). 검출영역은 인지분자와 타겟물질과의 상호작용으로 신호를 발생시키는 부분이며, 보통 항체가 사용된다. 변환영역은 일반적으로 광학적, 전기화학적, 온도적, 자성적 등의 방법으로 이루어지며, 분석물질과 인식 분자 사이의 특정한 상호작용에 대한 적절한 전기적 또는 광학적인 신호를 만드는 부분에 해당된다(Iqbal *et al.*, 2000, Turner, 2000). 마지막으로 해독영역은 그 반응을 기록하게 된다. 즉, 바이오센서는 생물학적 상호작용을 쉽게 측정되

Table 2. Recent food-borne disease outbreaks and cases in Korea according to cause of occurrence

Food-borne pathogens	2003		2004		2005		2006	
	Outbreaks	Cases	Outbreaks	Cases	Outbreaks	Cases	Outbreaks	Cases
Total	135	7,909	165	10,388	109	5,711	259	10,833
Subtotal	70	4,112	92	6,040	73	4,406	126	6,156
	51.8%		55.7%		69.9%		48.6%	
<i>Salmonella</i>	17	416	23	839	22	753	22	576
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	908	11	763	16	863	32	1,924
<i>Vivrio parahaemolyticus</i>	2	732	15	300	17	663	25	547
Bacteria <i>Bacillus cereus</i>	3	198	2	84	1	24	5	59
<i>Clostridium perfringens</i>	1	12	4	680			2	160
<i>Clostridium botulinum</i>	1	3						
<i>Campylobacter jejuni</i>	1	215	3	175	1	175	1	53
Pathogenic <i>E. coli</i>	6	1,502	21	2,043	15	1,883	38	2,832
The other bacteria	6	226	13	1,156	1	45	1	5
Subtotal	16	1,606	18	1,407	8	744	54	3,338
	11.8%		10.9%		7.3%		20.8%	
Virus Norovirus	14	1,442	13	922	6	719	51	3,338
The other virus	2	164	5	485	2	25	3	33
Chemical					1	8	1	14
Natural toxin	2	11	3	15	1	3	1	4
Not detected	47	2,180	52	2,926	26	550	77	1,288
	34.8%		31.5%		23.8%		29.7%	

Note: KFDA, http://www.mfda.go.kr/open_content/foodpoison

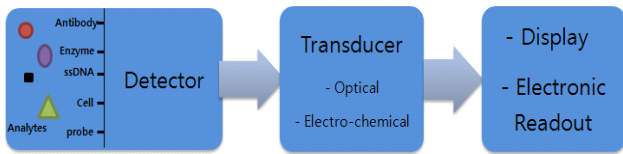


Fig. 1. Schematic of a biosensor. The three main parts of the biosensors are : (1) detector that has the recognition molecules and interacts with the target antigen to produce a signal, (2) transducer that converts the signal received from the detector to a useful electronic output and (3) the display or readout system to record the response (Harsh and Raj, 2013).

고 기록할 수 있는 전기적인 신호로 변화시키는 장치이다.

2. 바이오센서를 이용한 식중독균 검출

식중독균 검출을 위한 전통적인 방법들은 매우 민감하고 값이 저렴하지만, 노동력과 변이가 가능한 박테리아의 특성에 의존한다(Biswas, 2005). 또한 결과에 대한 혈청학적 확인뿐만 아니라, 동시에 전배양, 선택배양, 생화학적 스크리닝 중 하나는 추가로 더 진행할 필요가 있다(Vunrczant and Pllustoesser, 1987). 반면, 바이오센서는 검출대상이 다양하므로(Stroot *et al.*, 2012; Bae *et al.*, 2004) 식중독균의 현장분석 및 동시분석을 가능하게 한다. 식중독균 확인을 위한 바이오센서 검출 가능 대상을 살펴보면 균의 특정 염기서열, 대사물질 변화, 균과 진핵세포와의 상호작용 분석 등이 있다(Fig. 2). 이로 인해 착유에서부터 제품제조와 소비자에게로의 유통시간이 짧은 유제품의 경우, 바이오센서를 적용시 완제품뿐만 아니라, 원재료에 존재 가능한 식중독균에 대해 검출할 수 있는 장점이 있다.

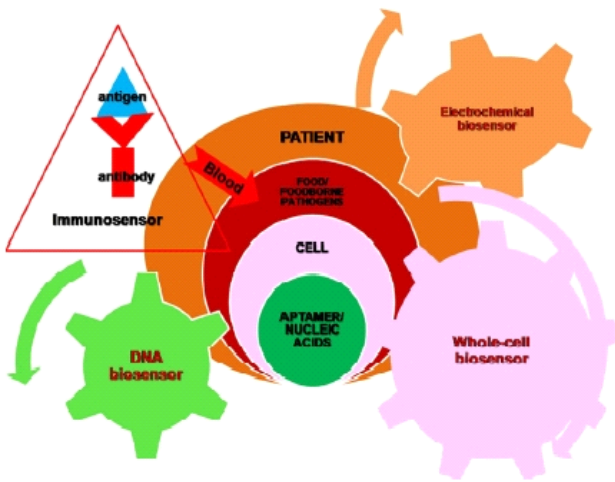


Fig. 2. Multiple biosensor configurations for pathogen detection (Arora *et al.*, 2011).

3. 광바이오센서

바이오센서 중 광바이오센서는 선택성과 민감도 때문에 산업에 가장 많이 적용되고 있다. 특히 섬유광학 바이오센서는 가장 먼저 상용되었으며, 기본원리는 병원성균 또는 독소가 센서 표면에 부착하면 특정 레이저에 의해 자극(excitation)되어 광신호가 발생하고, 이를 감지하게 되는 것이다(Bhunia, 2008; Taitt *et al.*, 2005).

오염물질(Willardson *et al.*, 1998; Tschmelak *et al.*, 2004), 독소(Bae *et al.*, 2004), 그리고 병원성 세균(Baemner *et al.*, 2003)을 빠르게 검출하는 광바이오센서 연구는 항체에 붙은 형광물질 연구와 변환기 개발 연구가 주로 진행되고 있다. 광바이오센서에서 항체에 붙은 형광물질은 병원성 세균을 검출하는데 도움을 주는데, 일반적으로 사용하는 형광 마커는 fluorescein isothiocyanate(FITC)이며, 란타나이드(lanthanide) 등이 있다(Selvin, 2002). 이 형광물질은 다른 검출반응 PCR, ELISA에도 적용이 가능하다. 형광물질이 다양한 항체와 결합된 섬유광학 바이오센서가 botulinum toxin, Staphylococcal enterotoxin, *E. coli* O157:H7, *Listeria*, *Salmonella* 등을 검출하기 위해 개발되고 있다. 또한 광변환기(Optical transducer)는 직접적 또는 간접적인 병원성 세균과 독소 검출에 적용 가능하다. 광변환기는 목표하는 분석물질이 변환기 표면에 고정화된 수용기에 붙었을 때 나타나는 굴절률이나 두께 같은 분광광도 기준으로 미세한 변화를 감지할 수 있다(Li *et al.*, 2004). 광바이오센서는 형광과 표면 플라즈몬 공명으로 분류된다(Fig. 3).

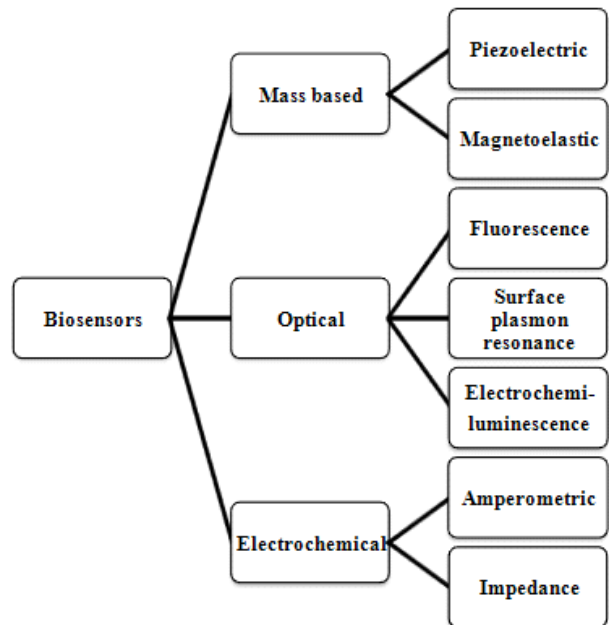


Fig. 3. Classification of biosensors.

4. 형광 기반 광바이오센서

형광은 형광발색단(fluorophore)이 빛이나 전자기 방사선(electro-magnetic radiation)을 흡수하고, 가시범위에서 빛을 내보내는 방출현상이다. 때때로, 방출된 방사선은 들뜬 상태의 방사선보다 짧은 파장 또는 같은 파장에 있기도 한다. 여기에서 후자를 공명형광(resonance fluorescence)이라고 한다. 이것은 방사 에너지의 손실과 함께 일어나기 때문에, 형광의 빛은 항상 흡수되는 빛보다 더 긴 파장에 존재하며, 이때의 에너지 차이를 ‘stokes shift’라 한다(Velusamy *et al.*, 2010; Lazcka *et al.*, 2007). 형광 샌드위치 측정법을 이용하여 *Listeria species*가 생산한 내독소(endotoxin)를 10 ng/mL 까지 검출하였고(Leung *et al.*, 2007; James *et al.*, 1996), *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus*가 혼합되어 있는 상태에서는 동시에 10² CFU/mL까지도 검출능을 나타내었다(Xeu *et al.*, 2009). 프레넬 반사 분광기(fresnel reflection spectroscopy)에 결합한 형광으로 200 cells/mL 정도로 낮은 수준의 *Legionella pneumolhilia*를 검출하였다(Li *et al.*, 2013). 더 즉각적인 검출로는 포획항체 표적 검출(capture antibody targeted detection, CAT-FISH)을 통해 *E. coli* O157:H7과 *S. aureus*를 각각 검출하였다(Strout *et al.*, 2012). 화학발광(achemi-luminiscence)기반 방법으로 0.017~1.6 EU/mL의 내독소를 검출(Romaschin *et al.*, 1998)하였고, 이후 2004년 *Hafnial alvei* PCM 1186 균주를 검출하였다고 보고하였다(Hreniak *et al.*, 2002). 녹색 형광성의 단백질(enhanced green fluorescent protein, EGFP)을 이용하여 세균성의 내독소를 검출하는 바이오센서도 등장하였다(Goh *et al.*, 2002). 내독소 농도 0.0005 EU/mL까지 검출 가능한 새로운 발광센서는 돌연변이 루시페라아제(luciferase) 효소를 이용하였으며(Noda *et al.*, 2002), 전체적으로 새로운 비색적 형광센서는

색 변화를 통해 육안으로 270 pM까지 검출 가능하다고 보고하였다(Lan *et al.*, 2012).

5. 표면 플라즈몬 공명 기반 광바이오센서

표면 플라즈몬 공명(SPR)에 기반을 둔 변환은 얇은 필름 금속 표면 부근에서 구조적인 변화로 인한 굴절률에 따른 측정 가능한 변화를 감지하는 표면민감성방법(surface sensitive method)이다. 프리즘 인터페이스에서, 높은 굴절률로부터 나온 빛이 임계각보다 더 큰 각도의 낮은 굴절률에 있는 인터페이스와 만났을 때, 전반사(total internal reflection, TIR)가 일어난다. 빛의 전반사는 표면장파가 새어나감으로 인해 점점 커지는 플라즈몬 파장을 끌어낸다(Lotierzo *et al.*, 2004). 표면 플라즈몬 공명을 이용한 바이오센서는 살모넬라를 검출하는 것으로 이용되어져 왔다(Barlen *et al.*, 2007). *Chlamydia trachomatis* 병원성균 진단을 위하여 금 나노막대를 기반으로 한 광학 DNA 바이오센서가 보고되었다(Parab *et al.*, 2010). 바이오 리셉터로서 박테리오파지를 이용한 표면 플라즈몬 공명은 *E. coli* O157:H7과 항생제 내성 황색포도상구균(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)을 진단하는데 성공적으로 사용되었다(Tawil *et al.*, 2012). 자성의 나노입자 분석법(magnetic nanoparticle assay, MNP)과 결합한 long-range surface plasmons(LRSPs)로 불리는 일반적인 표면 플라즈몬 공명의 변형은 50 CFU/mL 정도의 *E. coli* O157:H7의 검출이 가능하였다(Wang *et al.*, 2012). *E. coli* K-12 균주와 포자 및 단백질 등을 포함한 다양한 박테리아의 부산물, 그리고 바이러스들의 실시간 모니터링도 성공적으로 보고되었다(Zibaii *et al.*, 2010; Bhatta *et al.*, 2010). 표면 플라즈몬 공명 바이오센서는 독점적으로 *Bacillus thuringiensis*의 δ-내독소의 스크리닝에 이용된다(Okumura *et al.*, 2001).

Table 3. Comparison in terms of general advantages and disadvantages of optical individual biosensor

Sensor	Classification	Advantage	Disadvantage	References
Optical	Surface plasmon resonance	▶ Numerous spectroscopic properties can be exploited	▶ Subjected to light interference	Wang <i>et al.</i> (2012) Parab <i>et al.</i> (2010)
		▶ Multiplex capability	▶ Path length instability due to matrix swelling	Okumura <i>et al.</i> (2001)
Fluorescence	Fluorescence	▶ Free from electromagnetic interferences	▶ Reagent photo ability and photobleaching	
		▶ Less chance of lectrical safety hazards		
		▶ No need for an exogenous enzyme substrates	▶ Fluorophore toxicity	Li <i>et al.</i> (2013) Bateman <i>et al.</i> (2007)
		▶ Spontaneous process	▶ Interference with normal biological processes	Goh <i>et al.</i> (2002)
		▶ Multi-photon excitation		

Note: Das *et al.* (2014)

결 론

식중독균 및 독소를 검출하는 전통적인 방법은 정확하지 만, 병원성 미생물 오염 시 증균 속도가 빠르고, 가식기간 이 짧은 유제품을 대상으로 하기에는 부족하다. 현재 민감 도와 선택성 개선 필요성에도 불구하고, 경제성, 휴대성 뿐 아니라 사전진단을 가능하게 하는 광바이오센서가 대안이 될 수 있을 것으로 보인다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ009329) 의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

참고문헌

- Arora, P., Sindhu, A., Dilbaghi, N. and Chaudjry, A. 2011. Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. *Biosens. Bioelectron.* 28:1-12.
- Bae, Y. M., Oh, B. K., Lee, W., Lee, W. H. and Choi, J. W. 2004. Detection of insulin-antibody binding on a solid surface using imaging ellipsometry. *Biosens. Bioelectron.* 20:895-902.
- Baeumner, A. J., Cohen, R. N., Miksic, V. and Min, J. 2003. RNA biosensor for the rapid detection of viable *Escherichia coli* in drinking water. *Biosens. Bioelectron.* 18:405-413.
- Barlen, B., Mazumdar, S. D., Lezrich, O., Kampfer, P. and Keusgen, M. 2007. Detection of *Salmonella* by surface plasmon resonance. *Sensors* 7:1427-1446.
- Bhunja, A. K. 2008. Biosensors and bio-based methods for the separation and detection of foodborne pathogens. *Adv. Food Nutr. Res.* 54:1-44.
- Biswas, A. K. 2005. Evaluation of export Buffalo meat for some chemical residues and microbial contaminants. Ph.D. thesis. Indian Research Institute, Izatnagar, Bareilly.
- Das, A. P., Kumar, P. S. and Swain, S. 2014. Recent advances in biosensor based endotoxin detection. *Biosens. Bioelectron.* 51:62-75.
- Elaine, S., Robert, M. H., Frederick, J. A., Robert, V. T., Marc-Alain, W., Sharon, L. R., Jeffery, L. J. and Patricia, M. G. 2011. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17:7-15.
- Goh, Y. Y., Freer, V., Ho, B. and Ding, J. L. 2002. Rational desing of green fluorescent protein mutants as biosensor for bacterial endotoxin. *Protein Eng. Des. Sel.* 15:493-502.
- Hreniak, A., Maruszewski, K., Rybka, J., Galmian, A. and Czyewski, J. 2004. A luminescence endotoxin biosensor prepared by the sol-gel method. *Optical Materials* 26: 141-144.
- Iqbal, S. S., Mayo, M. W., Bruno, J. G., Bronk, B. V., Batt, C. A. and Chambers, J. P. 2000. A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents. *Biosens. Bioelectron.* 15:549-578.
- James, E. A., Schmeltzer, K. and Ligler, F. S. 1996. Detection of endotoxin using an evanescent wave fiber-optic biosensor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 60:189-202.
- KFDA(http://www.kfda.go.kr/open_content/foodpoison/)
- Lazcka, O., Campo, F. J. D. and Munoz, F. X. 2007. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 22:1205-1217.
- Leung, A., Shankar, P. M. and Mutharasan, R. 2007. A review of fiber-optic biosensors. *Sens. Actuators B. Chem.* 125:688-703.
- Li, Y., Dick, W. A. and Tuovinen, O. H. 2004. Fluorescence microscopy for visualization of soil microorganisms-a review. *Biol. Fert. Soils* 39:301-311.
- Lotierzo, M., Henry, O. Y. F., Piletsky, S., Tothill, I., Cullen, D., Kania, M., Hock, B. and Turner, A. P. F. 2004. Surface plasmon resonance sensor for domoic acid based on grafted imprinted polymer. *Biosens. Bioelectron.* 20:145-152.
- Lu, L., Chee, G., Yamada, K. and Jun, S. 2013. Microfluidic characterization of specific membrane capacitance and cytoplasm conductivity of single cells. *Biosens. Bioelectron.* 42:492-495.
- Noda, K., Goto, H., Murakami, Y., Ahmed, A. B. F. and Kuroda, A. 2010. Endotoxin assay by bioluminescence using mutant firefly luciferase. *Anal. Biochem.* 397:152-155.
- Okumura, S., Akao, T., Mizuki, E., Ohba, M. and Inouye, K. 2001. Screening of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin on the artificial phospholipid monolayer incorporated with brush border membrane vesicles of *Plutella xylostella* by optical biosensor technology. *Methods* 47:177-188.
- Parab, H. J., Jung, C., Lee, J. H. and Park, H. G. 2010. A gold nanorod-based optical DNA biosensor for the

- diagnosis of pathogens. *Biosens. Bioelectron.* 26:667-673.
22. Selvin, P. R. 2002. Principles and biophysical applications of lanthanide-based probes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31:275-302.
23. Stroot, J. M., Leach, K. M., Stroot, P. G. and Lim, D. V. 2012. Capture antibody targeted fluorescence *in situ* hybridization (CAT-FISH): Dual labeling allows for increased specificity in complex samples. *J. Microbiol. Methods* 88:275-284.
24. Taitt, C. R., Anderson, G. P. and Ligler, E. S. 2005. Evanescent wave fluorescence biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 20:2470-2487.
25. Tawil, N., Sacher, E., Mandeville, R. and Meunier, M. 2012. Surface plasmon resonance detection of *E. coli* and methicillin-resistant *S. aureus* using bacteriophages. *Biosens. Bioelectron.* 37:24-29.
26. Turner, A. P. F. 2000. Biosensors - sense and sensitivity. *Science.* 290:1315-1317.
27. Vunrczant, C. and Pllustoesser, D. F. 1987. Compendium of methods for microbial examination of food, third ed. American Public Health Association, New York.
28. Wang, J. 2002. Electrochemical nucleic acid biosensors. *Anal. Chim. Acta.* 469:63-71.
29. Wang, Y., Knoll, W. and Dostalek, J. 2012. Long range surface plasmon resonance biosensors for magnetic nanoparticle - Enhanced detection of bacterial pathogens. *Anal. Chem.* 84:8345-8350.
30. Willardson, B. M., Wilkins, J. F., Rand, T. A., Schupp, J. M., Hill, K. K., Keim, P. and Jackson, P. J. 1998. Development and testing of a bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1006-1012.
31. Wong, A. C. 1998. Biofilms in food processing environments. *J. Dairy Sci.* 81:2765-2770.
32. Xue, X., Pan, J., Xie, H., Wang, J. and Zhang, S. 2009. Fluorescence detection of total count of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* on water-soluble cdse quantum dots coupled with bacteria. *Talanta.* 77:1808-1813.
33. Zibaii, M. I., Kazemi, A., Latifi, H., Azar, M. K., Hosseini, S. M. and Ghezelaigh, M. H. 2010. Measuring bacterial growth by refractive index tapered fiber optic biosensor. *J. Photochem. Photobiol. B.* 101:313-320.
34. 권준욱, 이철현. 2007 최근 우리나라 식중독 발생 현황 고찰. *대한의사협회지.* 50:573-581.

(Received: November 5, 2013 / Accepted: November 25, 2013)