



# 리포솜을 이용한 분유 내 크로노박터 신속검출기술

Rapid Detection of *Cronobacter* Species in Infant Formula Powder using Liposomes

이기백<sup>1</sup>, 슈리티 슈클라, 송신지에, 박선현<sup>2</sup>, 오영숙, 김명희\*

Gibaek Lee<sup>1</sup>, Shruti Shukla, Xinjie Song, Sunhyun Park<sup>2</sup>, Youngsook Oh, Myunghee Kim\*

<sup>1</sup>서울우유 생산1팀, <sup>2</sup>한국식품연구원 식품표준연구센터, 영남대학교 식품공학과

<sup>1</sup>Production 1 Team, Seoul Dairy Cooperative

<sup>2</sup>Food Standard Research Center, Korea Food Research Institute

Department of Food Science and Technology, Yeungnam University

## I. 서론

식품은 인간의 기본 욕구를 해결하기 위한 중요한 자원이며 동시에 인간의 삶을 영위하는데 필요한 기본 자원이다. 국민 소득이 증가하고 삶의 질이 향상되면서 건강 및 보건에 대한 국민의 관심이 점점 증가하고 있다. 최근에는 분석기술이 발달하여서 극미량의 식품 유해물질 검출도 가능하게 되었고 동시에 새로운 식중독 원인 물질이 출현하면서 식품안전에 대한 정부, 산업체, 국민의 관심이 더욱 커지고 있다.

*Cronobacter* 속 세균들은 자연에 널리 분포하고 있는 세균의 일종으로서 다양한 식품에 존재하며 특히, 유아용 조제분유를 통해 영유아에게 감염되어 괴사성 장염, 뇌수막염, 패혈증 등 심각한 증상을 야기 할 수 있다는 사실이 알려지면서 국

내외적으로 큰 관심을 받고 있다(Iversen *et al.*, 2003; Muytjens *et al.*, 1983; Jung and Lee, 2010; Kim *et al.*, 2008). *Cronobacter sakazakii* (*C. sakazakii*)는 *Enterobacteriaceae*에 속하는 그람음성 간균이며, 포자를 형성하지 않는 통성혐기성 균으로 1980년 *Enterobacter sakazakii* 라고 명명되었으나, 2008년에 *Cronobacter* species로 재분류되면서 *C. sakazakii*로 학명이 변경되었다(Friedemann, 2007; Iversen *et al.*, 2008). *C. sakazakii*는 1958년 수막염에 걸린 신생아 환자에서 최초로 보고되었으며, 모든 연령대에서 질환을 일으킬수 있으나, 특히 영유아에게 수막염, 패혈증, 신생아 괴사성 장염과 같은 증상을 일으키는 매우 위험한 기회감염균이다(FAO/WHO, 2008; Muytjens and Kollee, 1990). 신생아는 분유 이외의 식품에 대한 선택의 폭이 극히 제한되어 있으며, 실제로도 *Cronobacter* 속

\* Corresponding author: Myunghee Kim  
Department of Food Science and Technology, Yeungnam University  
280 Daehak-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do 712-749, Republic of Korea  
Tel: +82-53-810-2950  
Fax: +82-53-810-4662  
E-mail: foodtech@ynu.ac.kr

세균이 분유에서 검출된 사례가 국외에서 많이 보고되어(Choi *et al.*, 2008), 한국을 비롯한 각국에서는 유아용 식품에 대한 엄격한 기준을 정하고 있다(Commission Regulation, 2007). 신생아 및 유아의 *C. sakazakii* 감염은 치사율이 40-80%에 도달할 만큼 매우 치명적이며, 지난 10여 년 동안 *C. sakazakii*에 의한 감염사례가 세계적으로 증가하는 추세이다(Derzelle *et al.*, 2007).

*C. sakazakii*의 검출은 세균 배양, 생화학적 검사, 혈청학적 분석, 유전자 분석을 통하여 수행되는데 이러한 방법들은 시간이 많이 소요되고 정확하지 않다는 문제점이 있다(FDA, 2002). Polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR 방법은 세균 배양법에 비하여 민감도와 특이도가 좋은 반면 DNA를 증폭 확인하기 위한 분자생물학적 실험과 전문적인 기술을 필요로 하기 때문에 보편적으로 사용하기 어려운 단점이 있다(Olandi and Lampel, 2000). 이를 보완하기 위해서는 기존 분석 방법의 단점들을 보완할 수 있는 식중독균 검출기술의 개발이 시급하다.

항원과 항체의 특이 반응을 이용한 진단방법은 과거 수십년 동안 세균의 동정 및 subtyping에 이용되어 왔다(Kim *et al.*, 2003). 형광물질과 결합한 항체를 이용하여 세균을 분석하는데 이용할 수 있다는 보고 이후, 면역형광기술은 특히 식품에서의 식중독균 검출에 이용되어 왔다(Coons *et al.*, 1942; Haglund *et al.*, 1964; Swamunathan *et al.*, 1978; Thomason 1981). 면역형광기술은 PCR과 같은 유전자 증폭기술과는 달리 고가의 장비가 필요하지 않으며 숙련된 인력이 요구되지 않고, 다량의 시료를 처리할 수 있는 민감성 등 다양한 장점을 가지고 있다(Leem, 2012).

리포솜은 수용액상에서 자발적으로 형성되는 인지질 이중층의 소포로서(Bangham *et al.*, 1965) 내부 공간에 형광물질, 효소, 약물을 포집할 수 있으므로 *Escherichia coli*(*E. coli*) O157:H7, *Salmonella* spp. 와 같은 식중독 세균의 진단시약으로서 개발되고 있다(Park and Kim, 2008; Shukla *et al.*, 2011). 최근에는 시료에서 세균의 분리 효율을 높

이기 위한 방법으로서 면역자성분리법 등이 분석에 활용되고 있다(Shukla *et al.*, 2016).

따라서 본 연구실에서 수행하고 있는 고감도, 신속성, 재현성을 갖춘 *Cronobacter* 검출 기술의 예로써 나노자성입자와 항체, 리포솜을 이용하여 개발한 신속, 간편 검출법을 *Cronobacter mytjensii* (*C. mytjensii*)와 *C. sakazakii* 중심으로 정리하고자 한다. 한편, 서론에서 언급한 내용과 이하 방법 및 결과, 결론은 Park 등(2012), Song 등(2015), Shukla 등(2016)의 연구논문에서 발췌한 것임을 밝혀둔다.

## II. 재료 및 방법

### 1) 면역원의 준비

*C. mytjensii*와 *C. sakazakii*를 배양 후 cell을 얻고 여기에 formalin을 처리한 후(formalin-killed cell: FKCs), 토끼의 면역에 이용하였다(Park *et al.*, 2012).

### 2) 면역

New Zealand산 흰색 암컷토끼를 이용하여 Canadian Council on Animal Care의 표준과 규격에 따라 면역을 실시하였다(Canadian Council on Animal Care, 2002). FKCs에 Freund's incomplete adjuvant를 1:1의 비율로 혼합한 후 토끼에 접종하였다(Park *et al.*, 2012).

### 3) 면역글로블린 G(IgG)의 정제

면역기간 동안 채취한 혈액 시료는 면역혈청을 분리하기 위하여 4°C에서 30분 동안 원심분리(10,000 × g)하였다(Song and Kim, 2013). 원심분리 후 얻어진 상등액에 caprylic acid와 ammonium sulfate 침전을 이용하여 토끼 혈액에서 분리한 혈청에서 IgG 항체를 정제하였다(McKinney and Parkinson, 1987). 정제된 항체의 역가를 측정하기 위하여 indirect noncompetitive enzyme-linked immu-



nosorbent assay(INC-ELISA: 간접비경합효소면역 분석법)를 실시하였다(Song and Kim, 2013).

#### 4) 리포솜의 제조

리포솜은 Shukla 등(2011)의 방법에 따라 1, 2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE, 7.2  $\mu$ mol), 1, 2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC, 14.3  $\mu$ mol), 1, 2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] (DPPG, 40.3  $\mu$ mol), cholesterol (40.9  $\mu$ mol), 그리고 100 mM sulforhodamine B(SRB)를 이용하여 제조하였다.

#### 5) 면역리포솜의 제조

SH-tagged 리포솜과 maleimide-derivatized IgG를 섞고 하루 동안 반응시킨 용액에 100 mM의 ethylmaleimide를 포함하는 0.02 M TBS buffer (0.15 M NaCl, 0.01% NaN<sub>3</sub> 포함, pH 7.0)를 DPPE-ATA 1 mol 당 ethylmaleimide 10 mol의 비율로 가한 후 실온의 암실에서 70 rpm으로 30분 반응시켰다. Sepharose CL-4B column에 통과시켜 면역리포솜 분획을 얻은 후 4°C 암실에서 하루 동안 투석하였다.

#### 6) 리포솜의 특성

리포솜의 크기는 Malvern Nano-Zs particle size analyzer (Malvern, Worcestershire, UK)을 이용하여 측정하였다.

#### 7) *C. mytjensii* 분석

*C. mytjensii* 배양액을 96-well microtiter plate에 분주 하여 37°C에서 2시간 코팅시켰다. 코팅이 끝난 후 0.01 M PBS buffer를 이용하여 세척 후, 5% skim milk를 포함하는 0.01 M PBS buffer를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 blocking 시키고 다시 0.01 M PBS buffer로 세척하였다. 그 후 anti-*C.*

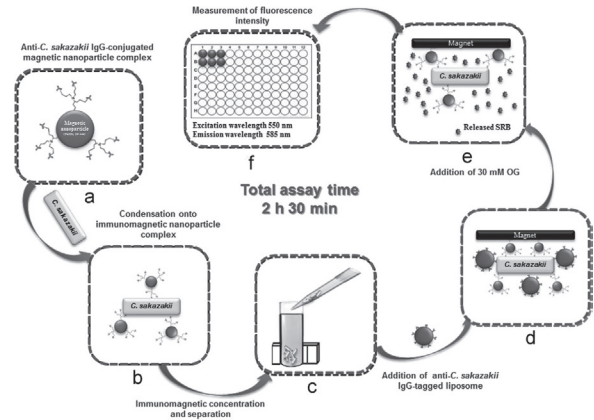


Fig. 1. Concept of immunoliposome based immunomagnetic concentration and separation assay.

*mytjensii* IgG-tagged 리포솜을 96-well microtiter plate에 분주 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 한번 5% skim milk를 포함하는 0.01 M PBS buffer를 이용하여 각각의 well을 2회씩 세척하여 결합되지 않은 면역리포솜을 제거하였다. 다음, 계면활성제의 일종인 30 mM octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (OG) 280  $\mu$ L를 넣고 리포솜을 파괴시켰다. 방출된 SRB는 흡수파장 550 nm, 여기파장 585 nm로 형광도를 측정하였다.

#### 8) 나노자성입자를 이용한 *C. sakazakii* 분석

Borosilicate tube에 *C. sakazakii* 배양 희석액을 농도별로 1  $\mu$ L씩 가한 후 각각의 tube에 20  $\mu$ L의 면역나노자성입자를 주입하여 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 0.01 M PBS buffer로 세척하고, 4% skim milk를 포함하는 0.02 M TBS buffer로 다시 세척하여 결합되지 않은 *C. sakazakii*를 제거하였다. 형성된 면역나노자성입자-*C. sakazakii* 복합체에 20배 희석한 면역리포솜 용액을 70  $\mu$ L 씩 tube에 주입 후 1시간 동안 반응시켜 면역리포솜-면역나노자성입자-*C. sakazakii* 복합체를 형성시켰다. 이 복합체를 0.02 M TBS buffer로 세척한 다음 계면활성제의 일종인 30 mM OG 280  $\mu$ L를 넣고 리포솜에 포집된 SRB들을 방출시켰다.

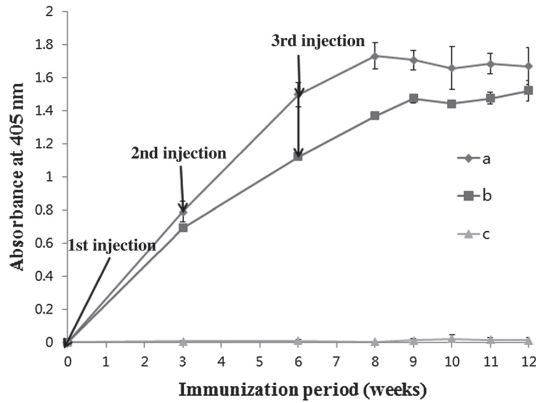


Fig. 2. Titer of developed rabbit anti-*C. mytjensii* IgG during immunization period. Each arrow indicates immunogen injection time. a and b: antibody titer from two independent immunization experiments; c: antibody titer from non-immunized rabbit as a control.

방출된 SRB를 흡수파장 550 nm, 여기파장 585 nm에서 형광도를 측정하였다(Fig. 1).

### 9) INC-ELISA와의 비교

나노자성입자를 이용한 *C. sakazakii* 분석 결과를 INC-ELISA assay와 비교하였다(Song and Kim, 2013).

### 10) 교차반응 시험

교차반응 시험은 *Cronobacter* spp. 6종(*C. sakazakii*, *C. dublinensis*, *C. malonaticus*, *C. universalis*, *C. condiment*, *C. mytjensii*)과 주요 병원균인 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, *E. coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, 그리고 *C. freundii*와의 교차반응성을 측정하였다.

### 11) 분유적용 시험

유아용 조제분유를 식품시료 적용시험을 위한 sample matrix로 이용하였다(Cho and Irudayaraj, 2013).

Table 1. Characterization of SRB-encapsulated liposomes

Mean diameter (nm)	206
Inner volume (entrapped) of liposomes (μL)	$4.06 \times 10^{-12}$
SRB concentration (mM)	100
Amount of SRB/liposome (μmol)	$4.06 \times 10^{-13}$
Concentration of liposomes (particles/mL)	$5.74 \times 10^{11}$

## III. 결과

### 1. 항체의 역가

*C. mytjensii*, *C. sakazakii*에 대한 항원을 면역한 후 12주까지 항혈청의 역가를 INC-ELISA로 측정 한 결과, 면역기간에 따른 항혈청 역가는 두 균종 모두 면역 8-9주까지 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

Fig. 2에 나타난 *C. mytjensii* 항원에 대한 항혈청 역가 추이를 보면 anti-*C. mytjensii* IgG는 1차 면역 후 증가하는 양상을 보였다. 2차, 3차 면역은 1차 접종 후 3주 간격으로 수행되었다. 일반적으로 2차, 3차 면역은 항체 역가의 정체 또는 감소를 방지한다고 보고되므로(Leenaars and Hendriksen, 2005) 1차 면역 이후 3주 간격의 추가 면역으로 고역가 항체 생산을 유도하였다.

### 2. SRB 포집 리포솜의 특성

실험에 사용한 리포솜은 Table 1에서 보는 바와 같이 206 nm의 직경을, 리포솜을 이루는 이중 지질막 안쪽의 부피는  $4.06 \times 10^{-12}$  μL, 리포솜 입자 1개당  $4.06 \times 10^{-13}$  μmol의 SRB를 포집하는 것으로 나타났다.

또한 생산한 리포솜 용액 1 mL 당  $5.74 \times 10^{11}$  개의 리포솜 입자가 분포하는 것으로 계산되었다. 유사 연구로써 Ho 등(2008)이 개발한 리포솜은  $3.65 \times 10^{12}$  개의 입자와 236 nm의 크기를 가지며 methyl blue를 포집하였고 *Salmonella* 신속 검출을 위한 시약으로 사용되었다. Shukla 등(2014)은 223 nm 크기의 SRB 포집 리포솜을 *Salmonella* 검출을

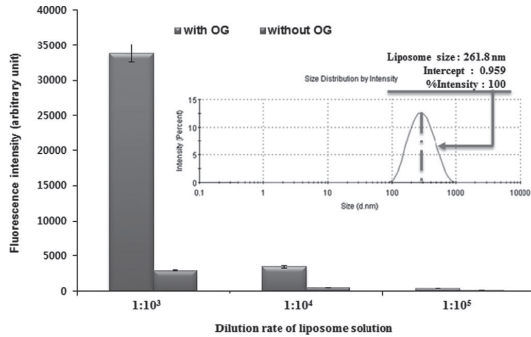


Fig. 3. Size distribution and integrity measurement of SRB-tagged liposomes. Values are the mean of three measurements. Error bars represent  $\pm$ S.D. The coefficient of variation(% CV) for fluorescence intensity(n=6) is below 15%.

위한 면역크로마토그래피 분석에 응용하였다.

### 3. 리포솜 integrity 측정

리포솜을 이용한 식중독 세균의 검출의 원리는 리포솜에 포집되어 있는 형광물질의 세기를 측정하여 목표세균을 정량적으로 분석하는 것이다. 따라서 리포솜에 형광물질이 온전하게 포집되었는지 확인하는 것이 필요한데, 이를 위하여 리포솜 희석액에 계면 활성제의 일종인 OG를 넣기 전과 후의 형광도를 측정하였다(Fig. 3). 측정 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 1:10<sup>3</sup>으로 희석한 리포솜 용액에서 OG를 넣기 전과 후에 10배 정도의 형광도 차이가 있는 것으로 나타났다. 리포솜 내부에 높은 농도로 포집되어 있는 SRB가 quenching effect로 인해 낮은 형광도를 보이다가 OG 첨가 후 리포솜이 깨지면서 포집되었던 SRB가 수용액 상에 분산되어 높은 형광도를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

### 4. *C. mytjensii* 분석

Anti-*C. mytjensii* IgG-tagged 리포솜을 이용하여 순수배양에서 *C. mytjensii*를 검출한 결과, 검출감도가 6.3 × 10<sup>4</sup> CFU/mL로 나타났다(Fig. 4).

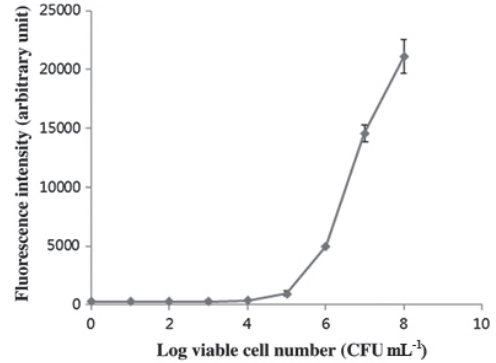


Fig. 4. Standard curve for detection of *C. mytjensii*. All experiments were conducted three times. Data represent mean  $\pm$  SD.

*C. mytjensii* 검출에 필요한 시간은 13시간으로 sandwich ELISA와 비교하여 더 빠르고 간단하게 검출되는 것을 알 수 있었다. 하룻밤 동안의 코팅, 6시간의 분석시간으로 0.4-14.4 × 10<sup>5</sup> CFU/mL의 검출한계를 나타낸 Hochel과 Skvor(2009)의 간접경합효소면역분석법과 비교해 볼 때, 여기에서 개발한 분석법은 민감도와 시간에서 더 향상된 결과를 보였다. 이 결과는 *Cronobacter* spp.를 검출하기 위해 리포솜을 이용한 최초의 연구로써 *C. mytjensii*를 신속, 간편, 민감하게 검출하는데 있어서 리포솜의 이용 가능성을 보여주고 있다.

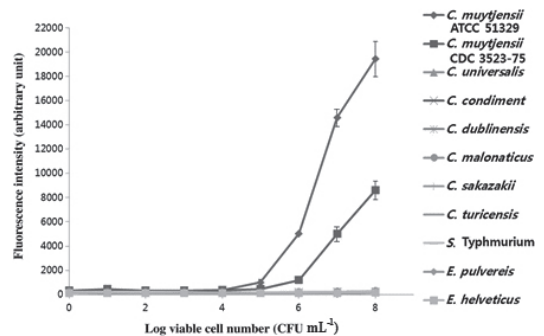


Fig. 5. Specificity of developed fluorescence-based liposome immunoassay. All experiments were conducted three times. Data represent mean  $\pm$  SD.

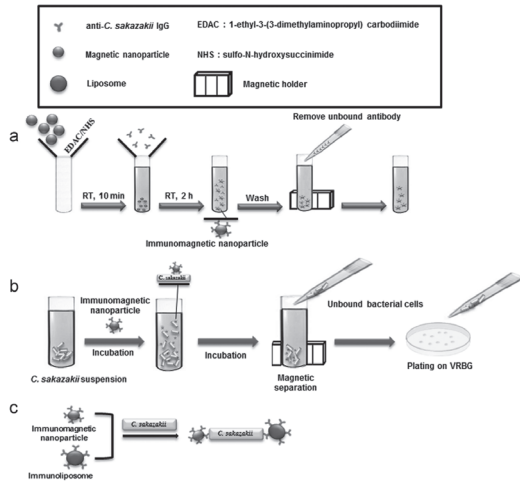


Fig. 6. Detailed schematics of the procedure for (a) conjugation of magnetic nanoparticles with anti-*C. sakazakii* IgG; (b) reaction of immunomagnetic nanoparticles with *C. sakazakii* cells; (c) formation of immunoliposome-*C. sakazakii*-immunomagnetic nanoparticle complex.

개발된 anti-*C. mytjensii* IgG는 *C. mytjensii* ATCC 51329와 *C. mytjensii* CDC 3523-75에 높은 반응성을 나타내었다(Fig. 5). 즉, *C. mytjensii* 이외의 균들에 대한 교차반응 없이 *C. mytjensii* 만을 검출하는 높은 효율성을 나타내었다.

### 5. 나노자성입자와 항체의 conjugation 확인

Fig. 6(a)는 anti-*C. sakazakii* IgG가 나노자성입자에 conjugation 되는 과정을 나타낸 모식도이다. 자성입자와 항체 간의 결합유무를 파악하기 위하여 Bradford assay를 이용하여 각각의 과정마다 항체 농도를 측정 하였다. 이 실험에서 반응에 사용한 항체 농도는  $8.35 \pm 0.01$  mg/mL 이었다. 1시간 반응 후 자성입자와 항체가 결합하여 만들어진 면역자성 입자를 확인한 결과 반응에 참여하지 않은 항체는 1.15 mg/mL 임을 알 수 있었다. 초기 항체농도에서 결합하지 않고 남은 항체의 농도를 빼준 결과, 나노자성입자와 결합한 항체의 농도는  $7.20 \pm 0.01$  mg/mL 이었으며, 결합률은  $86.23 \pm 0.59\%$  임을 알 수 있었다(Table 2).

Table 2. Binding efficiency of rabbit anti-*C. sakazakii* IgG onto magnetic nanoparticle

Initial antibody (mg/mL)	$8.35 \pm 0.01$
Free antibody (mg/mL)	$1.15 \pm 0.01$
Bound antibody (mg/mL)	$7.20 \pm 0.01$
Bounding efficiency (%)	$86.23 \pm 0.01$

Bounding efficiency (%) = Bound (initial-free) antibody/Initial antibody  $\times$  100

### 6. *C. sakazakii* 분석

개발된 검출법을 이용하여 *C. sakazakii* 배양액을 0,  $10^1$ - $10^8$  CFU/mL의 농도로 조절하여 실험을 수행하였다. 농도별로 희석된 *C. sakazakii* 1 mL에 20  $\mu$ L의 면역자성나노입자를 분주한 후 1시간 동안 반응시켜 면역 자성 나노입자에 *C. sakazakii*를 선택적으로 결합하게 하였다. 여기에 면역리포솜을 가하여 *C. sakazakii* 양과 상관관계를 보이는 형광도를 측정하였다. 그 결과,  $10^3$  CFU/mL부터 시그널을 확인할 수 있었고, 검출한계는  $3.3 \times 10^3$  CFU/mL(Fig. 7)인 것을 확인할 수 있었다.

나노자성입자를 이용하여 개발된 분석법과 기존에 사용되고 있는 검출법의 성능을 비교하기 위해 신속검출법으로 알려진 INC-ELISA와의 검출감도를 비교한 결과, 순수한 배지에서의 검출시 INC-ELISA는  $6.2 \times 10^5$  CFU/mL에서부터 signal이 나타났고(Fig. 7), 새롭게 개발된 면역 리포솜 기반의 면역자성분리법은  $3.3 \times 10^3$  CFU/mL의 검출한계를 보여 100배 정도 민감한 것을 확인하였다. 이때 검출한계는 음성대조군의 형광도 평균값으로부터 3배의 표준편차에 해당하는 세균수로 결정하였다(Hochel and Skvor, 2009). Kelley와 DeSilva(2007)는 분석의 재현성과 정확성을 입증하기 위한 %CV는 15-20%보다 낮아야 한다고 보고하였는데, 이 연구의 결과 %CV 15% 미만으로 만족스런 결과를 보였다. 개발된 측정법의 검출한계는  $3.3 \times 10^3$  CFU/mL 이고, *C. sakazakii*를 2시간 30분 만에 검출할 수 있었으며 적정 검출범위는  $10^3$ - $10^7$  CFU/mL로 나타났다. 반면 INC-

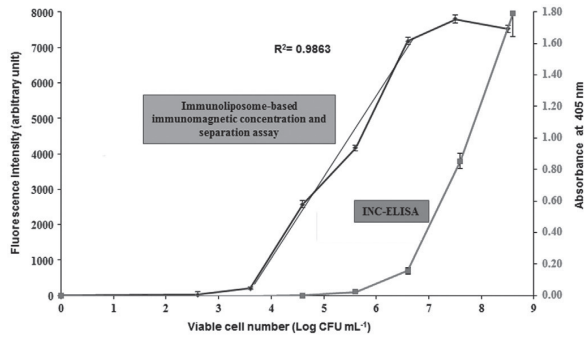


Fig. 7. Detection sensitivities of developed immunoliposome-based immunomagnetic concentration and separation assay and INC-ELISA in the detection of *C. sakazakii*. All experiments were conducted three times, and the data represent the mean  $\pm$  S.D. The coefficient of variation (%CV) for fluorescence intensity (n=6) is below 15%.

ELISA의 검출한계는  $6.2 \times 10^5$  CFU/mL, 분석시간을 제외하고도 증균배양 시간으로 17시간을 요구한다. 이러한 결과는 기존의 검출법과 비교하여 면역자성나노입자의 적용으로 검출시간과 검출감도를 향상시킬 수 있다는 것을 시사한다 (Shukla *et al.*, 2016).

개발된 검출법의 교차반응성을 평가하기 위하여 *C. sakazakii*와 다른 병원성 균들 간의 교차반응을 진행하였다. 결과에서도 *C. sakazakii* 제외한 6종 모두  $10^7$ – $10^8$  CFU/mL의 높은 농도에서도 blank의 시그널과 거의 유사한 시그널을 나타냈고, *C. sakazakii*에서만 높은 시그널이 나타났다 (Fig. 7). 즉, *C. sakazakii*에만 특이적으로 반응하는 특이성을 확인할 수 있었다.

### 7. 분유 적용시험

나노자성입자를 이용한 검출법을 식품 시료에 적용하기 위하여 10% 조제분유를 준비하여 *C. sakazakii* 검사를 실시한 결과, 분유 시료 안에서 *C. sakazakii* 검출한계는  $3.5 \times 10^3$  CFU/mL 인 것을 확인할 수 있었다. 기존의 다른 검출법의 검출한계가  $1 \times 10^5$  CFU/mL 인 점을 감안한다면 새롭게 개발된 면역리포솜 기반의 면역자성 분리법

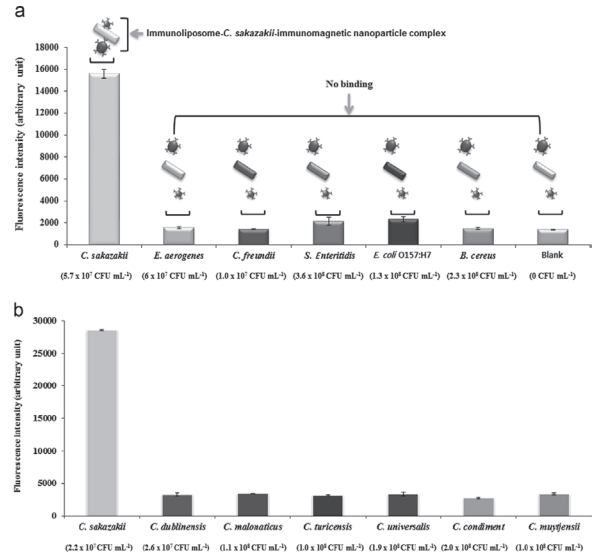


Fig. 8. (a) Cross-reactivity of the developed immunoliposome-based immunomagnetic concentration and separation assay with other genera of foodborne pathogens. (b) Cross-reactivity with *Cronobacter* strains. All experiments were conducted three times, and the data represent the mean + S.D. The coefficient of variation (%CV) for fluorescence intensity (n=6) is below 15%.

은 분유 시료 내의 경쟁물질에 영향을 받지 않고 *C. sakazakii*를 특이적으로 검출할 수 있다는 것을 증명할 수 있었다(Fig. 8).

## IV. 결론

### 1. 리포솜을 이용한 *C. mytjensii* 분석

이 연구는 리포솜, anti-*C. mytjensii* IgG을 이용하여 *C. mytjensii*를 검출하는데 있어서 간편성, 신속성, 고감도 검출 방법에 초점을 두었다. 개발된 방법은 순수배양액에서  $6.3 \times 10^4$  CFU/mL의 검출한계를 가지며 *C. mytjensii*에 대하여 높은 특이성을 나타내었다. 다른 배지배양법(2-5일 필요)과 비교하였을 때 상대적으로 짧은 시간(13 시간) 안에 *C. mytjensii*를 검출할 수 있다. 즉, VRBG agar, *Enterobacter sakazakii* isolation agar와 Druggan-Forsythe-Iversen agar를 이용한 배지배양

방법은 24시간의 증균 배양 후 선택배양을 통한 균의 분리, 의심균의 생화학적 test, 혈청학적 test, 또는 real-time PCR 같은 분자생물학적 방법을 이용한 확인이 필요하다. 그러나, 현재의 개발된 방법은 간단하고 *C. mytjensii*를 항원-항체 반응의 원리를 이용하여 검출함으로써 간편성과 신속성을 향상시킨 것이다.

## 2. 리포솜과 나노자성비드를 이용한 *C. sakazakii* 분석

이 분석법은 면역자성비드로 *C. sakazakii*를 선택적 분리 후 면역리포솜을 이용하여 시그널을 얻는 방법으로, 조제분유에서 *C. sakazakii*의 정확한 검출을 위한 고감도, 재현성, 신속, 특이성을 보유한다는 것을 확인하였다. 이 방법은 순수배지와 조제분유에서 약  $10^3$  CFU/mL의 검출한계를 나타내었다. 개발된 방법은 다른 검출법과 비교하였을 때 고가의 장비 없이 실험이 가능하며, 실험이 빠르고 간단하다는 장점이 있다. 따라서 이 기술을 산업화에 응용한다면 식품의 모니터링 단계에서 오염이 의심되는 시료를 빠르게 제거함으로써 신속한 위기 대처가 가능해질 것이며, 모니터링 이후의 분석단계를 거치는 시료의 수를 현저하게 감소시킬 수 있으므로 분석에 소요되는 경비와 노동력을 절감할 수 있을 것으로 기대된다.

## 사사

이 논문은 2014년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2014R1A2A1A11053211).

## V. 참고문헌

- Bangham A. D., Standish M., and Watkis J. C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamella of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**(1), 238-252.
- Choi J. W., Kim Y. J., Lee J. K., Kim Y. H., Kwon K. S., Hwang I., and Oh S. W. (2008) Multiple confirmation and RAPD-genotyping of *Enterobacter sakazakii* isolated from Sunsik. *Korean J. Food Sci. Technol.* **40**, 101-105.
- Cho I. H., Irudayaraj J. (2013) Lateral-flow enzyme immuno-concentration for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 3319-3324.
- Commission Regulation (EC) (2007) Official Journal of European Union **322**, 12-29.
- Coons A. H., Creech H. J., Jones R. N., and Berliner E. (1942) The demonstration of pneumococcal antigen in tissue by the use of fluorescent antibody, *J. Immunol.* **45**, 159-170.
- Derzelle S., Dilasser F., Malden V., Soudrie N., Leclercq A., Lombard B., and Lafarge V. (2007) Comparison of three chromogenic media and evaluation of two molecular-based identification systems for the detection of *Enterobacter sakazakii* from environmental samples from infant formulae factories. *J. Food Prot.* **70**, 1678-1684.
- FAO/WHO(Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization) (2008) *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. Microbiological Risk Assessment Series No. 15. Rome, Italy.
- FDA (2002) Available from(<http://www.cfsan.fda.gov/comm/mmesakaz.html>).
- Friedemann M. (2007) *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *Int. J. Food Microbiol.* **116**, 1-10.
- Haglund J. R., Ayres J. C., Paton A. M., Kraft A. A., and Quinn L. Y. (1964) Detection of *Salmonella* in eggs and egg products with fluorescent antibody. *Appl. Microbiol.* **12**(5), 447-450.
- Hochel I., and Skvor J. (2009) Characterisation of antibodies for the immunochemical detection of *Enterobacter sakazakii*. *Czech. J. Food Sci.* **27**(2), 66-74.
- Ho J. A., Zeng S. C., Tseng W. H., Lin Y. J., and Chen C. H. (2008) Liposome based immunostrip for the rapid detection of *Salmonella*. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 479-485.
- Iversen C., and Forsythe S. J. (2003) Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula, *J. Trends Food Sci. Technol.* **11**, 443-454.
- Iversen C., Mullane N., McCardell B., Tall B. D., Lehner A., Fanning S., Stephan R., and Joosten H. (2008) *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov. comb. nov., *C. malonicus* sp. nov., *C. turicensis* sp. nov., *C. mytjensii* sp. nov., *C. dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genospecies 1, and of three subspecies, *C. dublinensis* sp. nov. subsp. dublinensis subsp. nov., *C. dublinensis* sp. nov. subsp. lausannensis subsp. nov., and *C. dublinensis* sp. nov. subsp. lactaridi subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micro.* **58**, 1442-1447.
- Jung J. H., and Lee S. Y. (2010) Microbial growth in dry grain food (Sunsik) beverages prepared with water, milk, soymilk, or honey-water. *J. Food Sci.* **75**, 239-242.





16. Kelley M., and DeSilva B. (2007) Key elements of bioanalytical method validation for macromolecules. *AAPS J.* **9**, 156-163.
17. Kim K. S., Jang S. S., Kim S. K., Park J. H., Heu S. G., and Ryu S. Y. (2008) Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods. *Int. J. Food Microbiol.* **29**, 196-203.
18. Kim M., Kim W. J., Shin W. S., Shon D. H., and Cha S. K. (2003) Feasibility study on the use of liposomes for detection of food-borne pathogenic bacteria. *Korean. J. Food Sci. Ani. Resour.* **23(3)**, 278-283.
19. Leem H. (2012) Liposome based immunochromatographic detection of *Salmonella* Typhimurium. Master's Thesis, Yeungnam University.
20. Leenaars M., and Hendriksen C. F. M. (2005) Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR J.* **46(3)**, 269-279.
21. McKinney M. M., and Parkinson A. (1987) A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J. Immunol. Methods* **96**, 71-78.
22. Muytjens H. L., Kollee L. and A. A. (1990) *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates: causative role of formula. *Pediatr. Infect. Dis.* **9**, 372-373.
23. Muytjens H. L., Zanen H. C., Sonderkamp H. J., Kollee L. A., Wachsmuth L. K., and Farmer J. J. (1983) Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 115-120.
24. Orlandi P. A., and Lampel K. L. (2000) Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2271-2276.
25. Park S., and Kim M. (2008) Physical property and stability of liposome prepared from egg yolk phospholipids at various storage conditions. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **28(5)**, 549-554.
26. Park S., Shukla S., Kim Y., Oh S., Kim S. H., and Kim M. (2012) Development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Cronobacter muytjensii* (formerly called *Enterobacter sakazakii*). *Microbiol. Immunol.* **56**, 472-479.
27. Shukla S., Leem H., and Kim M. (2011) Development of a liposome based immunochromatographic strip assay for the detection of *Salmonella*. *Anal. Bioanal. Chem.* **401**, 581-590.
28. Shukla S., Leem H., Lee J., and Kim M. (2014) Immunochromatographic strip assay for the rapid and sensitive detection of *Salmonella typhimurium* in artificially contaminated tomato samples. *Can. J. Microbiol.* **60(6)**, 399-406.
29. Shukla S., Lee K., Song X., Park S., and Kim M. (2016) Immunomagnetic concentration and separation assay for rapid detection of *Cronobacter sakazakii*. *Biosens. Bioelectron.* **77**, 986-994.
30. Song X., and Kim M. (2013) Development of an indirect non-competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Cronobacter muytjensii* in infant formula powder. *Korean J. Food Nutr.* **26**, 936-944.
31. Song X., Shukla S., Oh S., Kim Y., and Kim M. (2015) Development of fluorescence-based liposome immunoassay for detection of *Cronobacter muytjensii* in pure culture. *Curr. Microbiol.* **70**, 246-252.
32. Swamunathan B., Ayres J. C., and Williams J. E. (1978) Control of non-specific staining in the fluorescent antibody technique for the detection of *Salmonellae* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **35(5)**, 911-919.
33. The Canadian Council on Animal Care (2002) CCAC guideline: antibody production. The Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Canada.
34. Thomason B. M. (1981) Current status of immunofluorescent methodology for *Salmonella*. *J. Food Prot.* **44**, 381-384.