pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 34, No. 6, pp. 542~550 (2019)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2019.34.6.542

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

IoT 적용 대장균 검출기 개발과 농식품 및 생산환경에 적용

응웬바오훙[1†] · 추현진[1†] · 김원일[1] · 황인준[1] · 김현주[2] · 김황용[1] · 류경열[1] · 김세리[1*]
[1]농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 유해생물팀
[2]농촌진흥청 국립식량과학원 기초기반과

Development of an IoT Device for Detecting *Escherichia coli* from Various Agri-Foods and Production Environments

Nguyen Bao Hung[1†], Hyeonjin Chu[1†], Won-Il Kim[1], Injun Hwang[1], Hyun-Ju Kim[2], Hwangyong Kim[1], Kyoungyul Ryu[1], Se-Ri Kim[1*]
[1]*Microbial Safety Team, Agro-Food Safety and Crop Protection Department, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju, Korea*
[2]*Crop Foundation Division, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Wanju, Korea*

(Received September 18, 2019/Revised October 9, 2019/Accepted November 19, 2019)

ABSTRACT - To detect *Escherichia coli* from agri-food and production environments, a device based on IoT (internet of things) technology that can check test results in real time on a mobile phone has been developed. The efficiency of the developed device, which combines an incubator equipped with a UV lamp, a high-resolution camera and software to detect *E. coli* in the field, was evaluated by measuring the device's temperature, detection limit, and detection time. The device showed a difference between its programmed temperature setting and actual temperature of about 1.0°C. In a detection limit test performed with a single-colony inoculation, a color change to yellow and a florescent signal were detected after 12 and 15 h incubations, respectively. The incubation time also decreased along with increasing bacteria levels. When applying the developed method and device to various samples, including utensils, gloves, irrigation water, seeds, and vegetables, detection rates of *E. coli* using the device were higher than those of the Korean Food Code method. These results show that the developed protocol and device can efficiently detect *E. coli* from agri-food production environments and vegetables.

Key words : IoT, *Escherichia coli*, Agri-food

최근 5년간(2014~2018) 발생한 국내 식중독 사고는 1,777건, 식중독 환자 수는 37,762명에 달하고 있다[1]. 식중독사고가 지속적으로 발생하는 이유는 급식과 외식 비율 증가, 비가열 신선편의 식품의 소비 증가 때문이다[2]. 또한 기후변화로 인한 이상고온, 폭염 등 환경적 요인도 식중독사고의 지속적 발생과 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다[3]. 식중독사고를 예방하기 위해서는 농식품 생산, 가공단계의 위생수준을 지속적으로 모니터링하고 관리하는 것이 필요하다.

†These authors contributed equally to this work.
*Correspondence to: Se-Ri Kim, Microbial Safety Team, Agro-Food Safety & Crop Protection Department, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, 166 Nongsaengmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do 55365, Korea
Tel: 82-63-238-3395, Fax: 82-63-238-3840
E-mail : seri81@korea.kr

하지만 식품 중 모든 식중독세균에 대한 검사를 일일이 실시하는 것은 경제적으로 시간적으로 매우 어렵기 때문에 위생지표세균을 위생수준 평가에 많이 활용되고 있다. 위생지표세균은 식품 전반에 대한 위생수준을 나타내는 지표로 통상적으로 병원성을 나타내지는 않는 세균수, 대장균군 및 대장균 등이 이에 해당되며 식품별 오염도, 주원료, 제조공정, 보존 및 유통환경 등을 고려하여 식품 기준·규격으로 설정되어 있다[4].

특히, 대장균은 사람과 동물 장내에만 존재하는 균으로 분변을 통해 환경으로 배출되기 때문에 분변오염 지표세균으로 활용되며, 살균이나 가열공정이 없으나 위생관리가 필요한 식품에 주로 설정되어 있다[5]. 일반적으로 대장균 검사는 증균하여 선택배지에서 분리하고 indole-methyl red-Voges-Proskauer-citrate(IMViC) 테스트 등 다양한 생화학적 방법으로 최종 확정하는 3 단계 과정을 거쳐 검출 여부를

판정 한다[6]. 하지만 이 방법은 적어도 4일 이상의 분석시간이 소요되며 비전문가가 수행하기에는 어려움이 따른다. 이러한 전통적인 분석법의 단점을 보완하기 위해, 미생물 효소 프로필에 기초한 방법이 대안으로 사용되어왔다[7]. 대장균은 β-galactosidase를 생산하며, 이 효소에 의해 배지 내에 기질로 포함된 O-nitrophenyl-D-galactopyranoside(ONPG)를 가수 분해하여 황색으로 배지 색이 변하게 된다. 또한 대장균은 β-glucuronidase도 분비하게 되는데 이 효소에 의해 배지 내의 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide(MUG)를 가수 분해하여 자외선(UV) 램프 아래에서 감지 할 수 있는 형광 화합물(4-methyl-umbelliferone)을 형성시킨다[7]. 이러한 기질의 조합으로 18 시간 내에 대장균을 검출 할 수 있으며, 이 신속하고 간단한 방법은 미국 환경 보호청(Environmental Protection Agency)[8]과 한국 환경부(Ministry of Environment)[9]의 수질공정시험법에 채택되었다. 이 방법은 수질 외에도 생고기, 신선 편의 식품 등 다른 매트릭스에서 검증 되었고, 많은 연구자들은 효소 반응에 근거한 대장균 분석이 매우 쉽고 효율적이라고 보고하였다[10-15].

하지만 이 방법으로 대장균을 분석하기 위해서는 인큐베이터, 자외선램프와 같은 장비가 필요하다. 그러나 이들 장치는 비싸고 설치 공간이 많이 필요로 할 뿐만 아니라 검사 결과를 실시간으로 확인할 수 없기 때문에 농장, 식품회사, 급식소에서 활용하기가 어려웠다. 따라서 본 연구에서는 농식품 생산 가공현장에서 대장균을 쉽고 빠르게 검출할 수 있는 IoT (Internet of things) 기술 적용 대장균 검출 장치를 개발하였고 다양한 농산물, 식품, 농업용수, 작업도구, 조리도구에 적용하여 현장 적용 가능성을 평가하였다.

Materials and Methods

IoT 적용 대장균 검출 장치 개발

본 연구에서는 IoT 적용 대장균 검출기는 크기가 45 × 30 × 30 cm인 이 장비의 내부에는 시료를 배양하기 위하여 온도컨트롤 기능과 형광을 검출하기 위한 365 nm UV LED 램프가 장착되어 있다. 또한 실시간으로 검출기 내에 있는 카메라가 촬영하여 그 결과를 핸드폰으로 전송하도록 하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 대장균 검출여부를 백색광과 UV로 비추면서 카메라로 2번 촬영하는데 동시에 5개(100 mL용) 내지 10개(10 mL)의 시료를 촬영하도록 설계되어 있다. 대장균은 백색광을 비추었을 때 노란색, UV에 노출시키면 형광을 띄는데 이것을 카메라로 촬영 후 검사부에서 색깔을 판독하고 검출여부를 판단한다. 이 후 판독 결과를 무선데이터 전송시스템을 통하여 핸드폰으로 전송하도록 설계되어 있다(Fig. 2). 이 장치의 온도 컨트롤 기능을 측정하기 위하여 35°C와 44°C를 설정하고 로그가 부착된 온도계(μ10000 Recorder; Yokogawa, Chongqing, China)를 삽입하여 18시간동안 기기 내 5개 지점에서 온도를 측정하였다.

대장균 접종 농도에 따른 IoT 적용 대장균 검출기의 분석소요시간 및 민감도 확인

분석소요시간

유해미생물 검출장치의 성능평가에 사용된 균주는 대장균 ATCC 25922, *Pseudomonas aeroginosa* KACC 10185(음성대조구)였다. Trypticase soy agar (TSA; Oxoid Ltd., Basingstoke, UK)에 배양된 대장균을 1 colony 취하여 10 mL trypticase soy broth (TSB; Oxoid Ltd., Basingstoke, UK)에 접종하고 37°C에서 18시간 진탕 배양하였다. 4°C, 4000 rpm, 10분간 원심분리하고 phosphate-buffered saline (PBS; Oxoid Ltd., Basingstoke, UK)로 두 번 세척한 후 $O.D._{600\ nm}$ 1로 맞추었다. 균액 1 mL을 취한 후 9 mL 0.1% peptone water (PW; Oxoid Ltd., Basingstoke, UK)에 혼합하고 이후 단계 희석하여 최종농도 10^1이하, 10^1, 10^2, 10^3 CFU/mL로 조정하였다. 효소발색용액(Colilert-18; IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) 9 mL, 99 mL에 희석된 균액(10^1이하, 10^1, 10^2, 10^3 CFU/mL)을 각각 1 mL씩 접종하고 대장균 검출 장치에 넣고 휴대폰 앱(Microbe app., im-healthcare, Gangwon, Korea)에서 실시간으로 결과를 확인하였다.

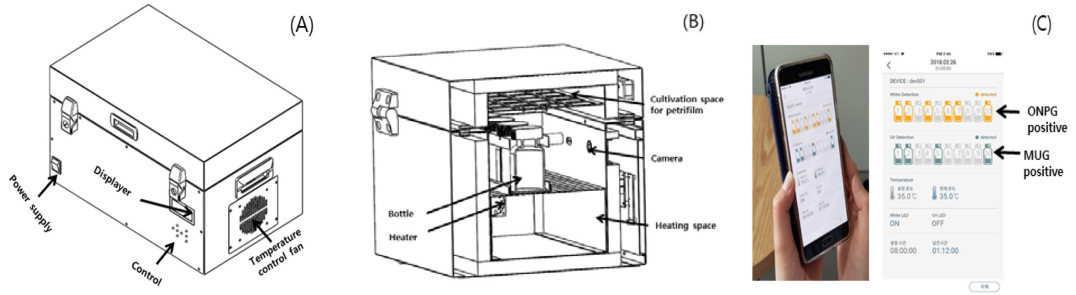

Fig. 1. Schematic diagram of the developed device.
(A) : Exterior of the device, (B) Interior of the device, (C) Mobile application of smart phone

민감도

TSA에 배양된 *E. coli*를 1 colony 취하여 10 mL TSB에 접종하고 37°C에서 18시간 진탕 배양하였다. 4°C, 4000 rpm, 10분간 원심분리하고 PBS로 두 번 세척한 후 $O.D._{600\ nm}$ 1로 맞추었다. 균액 1 mL을 취한 후 9 mL 0.1% peptone water에 혼합하고 이후 단계 희석하여 최종농도 10^4, 10^5, 10^6 CFU/mL로 조정하였다. 효소발색용액 9 mL, 9 mL에 균액을 농도별로 각각 1 mL씩 접종하고 유해 미생물검출 장치에 넣고 휴대폰 앱에서 실시간으로 결과를 확인하였다. 유해 미생물 검출 장치에서 양성 반응결과가 나타나는 시점에서 세균의 농도를 측정하였다.

세균의 농도 측정을 위하여 각 시료에서 1 mL을 취하여 10배 단계 희석하고 각 희석단계별로 1 mL씩 취하여 세균수 측정용 petrifim (3M, St. Paul, MN, USA)에 접종하고 37°C 24시간 배양하였다.

농식품 생산환경 및 농식품의 위생상태 점검을 위한 대장균 검출기 적용

시료 채취

대장균검출기의 성능을 평가하고자 2018년 11월부터 2019년 3월에 농작업도구 30점(세척기 내부 8점, 세척기 외부 8점, 수확용기 4점, 건조기 내부 3점, 건조하우스 바닥 7점), 조리도구 26점(도마 6점, 장갑 6점, 행주 6점, 칼 8점), 농업용수 56점(하천수 30점, 지하수 20점, 고추 세척수 3점, 고추세척 후 용수 3점)과 농산물 39점(홍고추 5점, 건고추 5점, 고춧가루 5점, 부추 3점, 깻잎 3점, 땅콩 3점, 상추 3점, 어린잎채소 3점, 방울토마토 3점, 팽이버섯 3점, 풋고추 3점), 가공식품 48점(뽕잎가루 3점, 연근가루 3점, 김 3점, 가래떡 3점, 냉면육수 3점, 만두 3점, 김밥 3점, 샌드위치 3점, 사과주스 3점, 오렌지주스 3점, 포도주스 3점, 간장 3점, 김치 3점, 우유 3점, 치즈 3점, 호상요쿠르트 3점) 총 199점의 시료를 수집하였다. 수집방법은 농작업도구의 경우 태안지역 고추 생산농가 2곳에서 swab kit (3M pippet swab plus, Korea 3M, Seoul, Korea)를 이용하여 100 cm^2표면을 문질러서 채취하였다. 농업용수는 전북지역 하천수 30점, 지하수20점, 태안지역 고추생산농가에서 고추 세척에 사용되는 지하수 3점, 고추 세척 후 물 3점을 1 L멸균된 플라스틱 비커를 이용하여 채취한 후 2 L 무균 채수병에 담았다. 홍고추는 태안의 고추 생산농가에서 하우스에 재배중인 것을 채취하였고 건고추와 고춧가루, 농산물 및 가공식품은 전북 전주시에 위치한 마켓에서 구매하여 사용하였다. 또한 조리도구는 전북 전주시에 위치한 급식소에서 swab kit를 이용하여 100 cm^2 표면을 문질러서 채취하였다.

시료 적용

시료 적용시험은 대장균을 접종하지 않은 시료와 대장균을 접종한 시료를 사용하여 대장균검출기의 활용가능성을 평가하였다. 첫 번째 실험은 앞서 언급한 시료를 대상으로 대장균을 접종하지 않고 수질공전과 식품공전에 기반을 둔 전통분석법, 건조필름법, 효소발색법에 기초한 대장균검출기를 이용하여 분석하고 그 결과를 비교하였다. 두 번째 실험은 위에서 채취한 시료 중 대장균이 검출되지 않은 시료에 대장균을 접종하고 앞서 언급한 세가지 방법(식품공전법, 건조필름법, 효소발색법에 기초한 대장균검출기)을 적용하고 그 결과를 비교하는 연구도 동시에 수행하였다. 각 시료별 실험 방법은 아래와 같다.

농업용수

농업용수 실험은 수질공전 시험법 중 전통적인 분석방법인 막여과법[9]을 대조군으로 사용하였으며 이를 위하여 농업용수는 membrane filter (pore size: 0.45 μm, diameter 47 mm; Millipore, Bedford, MA, USA)를 이용하여 100 mL을 여과하고 미생물이 포집된 membrane filter는 100 mL 멸균병에 담았다. 이후 EC broth(Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) 100 mL을 가하고 37°C에서 18시간 배양하였다. 실험구로는 농업용수 100 mL을 멸균병에 담은 후 100 mL용 효소발색시약(Colilert-18)을 넣고 시약이 녹을 때까지 흔들어 준 후 배양기에서 35°C에서 18시간 배양하였다. 배양 후 유해 미생물 검출장치에 넣고 대장균 검출여부를 확인하였다. colilert 18에서 양성반응을 보인 시료와 막여과법을 적용한 시료에서 원인균을 분리하여 colilert 18의 정확성을 평가하였다. 이를 위하여 EC, colilert 18에서 배양된 액 100 μL를 취하여 가스포집관이 든 10 mL의 EC broth에 재접종하고 44°C, 24-48시간 배양하였다. 배양 후 10 μL loop를 이용하여 배양액을 취한 후 EMB (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) 배지에 도말하고 37°C, 24시간 배양하였다. 이후 EMB배지에서 금속광택이 있는 집락을 취하여 TSA에 계대하고 37°C, 24시간 배양하고 VITEK (VITEK-2 compact, GN test kit, Biomerieux, l'Etoil, France)장비를 이용하여 최종 대장균임을 동정하였다. 또한 농업용수를 1 mL 취하여 대장균 검출용 건조필름에 접종하고 37°C에서 24시간 배양하고 전형적인 집락을 계수하였다.

농작업 도구 및 조리 도구

채취된 시료를 30초간 혼합 한 후 5 mL을 취하여 각각 5 mL의 2×EC 배지와 10 mL용 효소발색시약(Colilert MPN; IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA)효소발색시약에 넣었다. 효소발색시약에는 멸균 증류수 5 mL을 가하고 시약이 잘 녹을 수 있도록 약 1분간 흔들어 주었다. 35°C 배양기에서 18시간 배양하였으며 배양 후 대장균 검출장치에 넣고 대장균 검출여부를 확인하였다. 효소발색시약에서 양성반응을 보인 시료와 EC에서 증균한 시료에서 원인균을 분리하여 효소발색시약의 정확성을 평가하였다. 이를 위하여

EC, 효소발색시약에서 배양된 액 100 μL를 취하여 가스포집관이 든 10 mL의 EC broth에 재접종하고 44°C, 24-48시간 배양하였다. 배양 후 10 μL loop를 이용하여 배양액을 취한 후 EMB배지에 도말하고 37°C, 24시간 배양하였다. 이 후 EMB 배지에서 금속광택이 있는 집락을 취하여 TSA에 계대하고 37°C, 24시간 배양하고 VITEK장비(VITEK-2 compact, GN test kit, Biomerieux, l'Etoil, France)를 이용하여 최종 대장균임을 동정하였다. 또한 시료를 1 mL 취하여 대장균 검출용 건조필름에 접종하고 35°C에서 24시간 배양하였다.

또한 조리도구의 경우 10 mL의 생리식염수가 든 swab kit를 이용하여 표면을 채취한 다음 각 swab kit에 대장균 10^1 CFU/mL, 10^2 CFU/mL 수준을 각각 1 mL씩 접종하였다. 이후의 과정은 앞에서 언급한 바와 같이 5 mL 씩 colilert 배지와 EC broth에 접종하고, 1 mL은 건조필름에 접종하였으며 이후의 과정은 앞서 언급한 바와 같다.

농산물 및 식품

농산물과 가공식품을 각각 25 g 취하여 멸균백(3M, 3M Korea, Seoul, Korea)에 넣고 225 mL의 멸균증류수를 가한 후 2분 동안 손으로 흔들어 균질화 시켰다. 이 중 1 mL을 취하여 9 mL의 EC배지와 10 mL용 효소발색시약에 각각 넣은 다음 시약이 잘 녹을 수 있도록 약 1분간 흔들어 주었다. 이후 효소발색시약은 35°C로 설정된 대장균 검출기에서 EC 배지는 배양기에서 24시간 배양하였다. 효소발색시약에서 양성반응을 보인 시료와 식품공전법으로 분석한 시료에서 원인균을 분리하고 확정하여 정확성을 비교평가하였다. 이를 위하여 EC, 효소발색시약에서 배양된 액 100 μL를 취하여 가스포집관이 든 10 mL의 EC broth에 재접종하고 44°C, 24-48시간 배양하였다. 배양 후 10 μL loop를 이용하여 배양액을 취한 후 EMB배지에 도말하고 37°C, 24시간 배양하였다. 이후 EMB 배지에서 금속광택이 있는 집락을 취하여 TSA에 계대하고 37°C, 24시간 배양하고 VITEK 장비(VITEK-2 compact, GN test kit, Biomerieux, l'Etoil, France)를 이용하여 최종 대장균임을 동정하였다. 또한 앞서 전처리 된 농식품과 가공식품을 1 mL 취하여 대장균 검출용 건조필름에 접종하고 35°C에서 24시간 배양하였다.

또한 농산물과 가공식품에 대장균을 접종하여 대장균검출기의 성능을 추가적으로 평가하였다. 농산물과 가공식품을 각각 25 g에 대장균 10^1 CFU/g, 10^2 CFU/g으로 접종하였다. 이후의 과정은 앞에서 언급한 바와 같이 전처리한 후 1 mL 씩 colilert, EC 배지, 건조필름에 접종하였으며 이후의 과정은 앞서 언급한 바와 같다.

Results and Discussion

IoT 적용 대장균 검출장치 개발

본 연구에서는 IoT 적용 대장균검출기를 개발하였다. 개발된 기술은 시료에 효소발색시약을 첨가한 후 대장균 검출장치에 넣으면 기기에 무선데이터전송장치가 장착되어 있어 대장균 검출 결과를 실시간 휴대폰으로 결과를 확인할 수 있는 특징을 가진 장치이다. 그동안 효소발색법을 사용하여 대장균을 검출하는 장치를 개발 한 연구결과는 몇 차례 보고된 바 있다. Yeom[16]이 개발 한 장치는 자외선램프, 컬러 센서 및 데이터 분석기로 구성되며, 그들이 개발한 방법은 대장균을 배양 후 색의 정도에 따라 대장균의 수를 추정하기 위해 개발되었다. 또한 Lee[17]가 개발한 장치는 물 샘플을 장치가 들어있는 용기에 자동 펌프로 분배 한 후 UV 검출기로 배양하여 대장균의 존재를 확인하는 장치이다. 하지만 Yeom[16]이 개발한 장치는 별도의 배양 후에 기기에 적용을 해야 하는 단점이 있고, Lee[17]가 개발한 장치는 수질을 분석에만 적용 할 수 있어 작업도구, 농산물과 가공식품 등 다양한 시료에 적용이 어렵다는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 개발된 장치는 이들 장치의 단점을 보완하여 사용자의 편의성을 높인 장치라 할 수 있다. 개발된 장치는 30°C-55°C로 온도를 설정할 수 있는데 장치의 온도 제어기능을 평가하기 위하여 대장균검출에 사용되는 35°C, 44°C를 설정하고 로그가 부착된 온도계를 삽입하여 18시간동안 온도를 측정하였다. 그 결과 3시간 이후에 설정온도에 도달하고 설정온도에 도달된 후에는 온도의 큰 변화 없이 안정적으로 유지되는 것을 확인하였으며 설정온도와 실제온도 차이는 1°C정도였다(data not shown).

IoT 적용 대장균 검출기의 평가

대장균 검출장치의 성능을 확인하고자 용수 분석에 활용되는 100 mL용 효소발색시약(colilert 18)과 작업도구 및 농식품의 분석에 활용되는 10 mL용 효소발색시약(colilert MPN)를 대상으로 대장균 농도별 검출시간과 검출감도를 분석하였다. 대장균 농도별 검출시간을 조사한 결과(Table 1), 100 mL 당 1, 10, 100, 1000마리가 오염되었을 때 대장균이 β-galactosidase를 분비하여 노란색 반응을 보이는 시점은 각각 13-14, 11, 10, 9시간째였다. 또한 β-glucuronidase를 분비하여 형광색 반응을 보이는 시점은 노란색 반응이 나타난 시점으로부터 1시간 이후였다.

또한 10 mL 당 1, 10, 100, 1,000마리가 오염되었을 때 ONPG양성 반응을 보이는 시점은 각각 15, 13, 12, 11시간째였다. MUG에 양성반응을 보이는 시점은 노란색 반응이 나타난 시점으로부터 2시간 이전이었다. 100 mL과 10 mL에서의 반응시간에 차이를 보이는 이유는 100 mL의 경우 colilert 18이라는 제품이고 10 mL의 경우는 colilert MPN라는 제품인데 두 제품의 일부 구성성분의 차이 때문으로 판단된다. 두 제품의 차이는 colilert 18은 18시간 내에 대장균을 분석할 수 있는 제품이고 colilert MPN 제품은 24시간 내에 대장균을 검출할 수 있는 제품이다.

Table 1. Detection time according to inoculation levels of *E. coli* in the developed device based on IoT technology

Innoculation level of *E. coli*	per 10mL		per 100mL	
	ONPG reaction (h)	MUG reaction (h)	ONPG reaction (h)	MUG reaction (h)
1×10^0	15	12	13-14	14-15
1×10^1	13	11	11	12
1×10^2	12	10	10	11
1×10^3	11	8	9	10
1×10^4	9	7	8	9
1×10^5	7	5	7	8
1×10^6	6	3-4	5	6

Colilert 18은 colilert MPN 제품에 세균의 증식 속도를 높일 수 있도록 일부 구성성분을 차별화 시킨 제품으로 mL당 증식 속도로 볼 때는 colilert 18 제품이 colilert MPN보다는 우수하기 때문에 용량을 10배 증가 시켜도 검출시간에는 차이가 없었다.

또한 대장균 검출감도를 측정한 결과, 100 mL용에서는 약 7.0 log CFU/mL일 때 MUG 양성반응을 보이며 약 6 log CFU/mL이상일 때 ONPG 양성 반응을 나타내었다. 한편 10 mL용에서는 약 6.5 log CFU/mL일 때 MUG 양성반응이 나타났고, 약 7.0 log CFU/mL일 때 ONPG 양성반응 나타내었다. 따라서 약 7.0 log CFU/mL이상이 될 때 두 반응이 동시에 나타나기 때문에 대장균 검출한계는 7.0 log CFU/mL이고, 대장균 검출에 소요되는 시간은 용량에 관계없이 15시간으로 확인되었다.

농식품 생산환경 및 농식품의 위생상태 점검을 위한 대장균 검출기 평가

대장균 검출기를 이용하여 농산물과 식품 생산현장에서 위생관리 모니터링 수단으로 활용가능성을 평가하기 위하여 농작업도구 및 건조 환경, 조리도구, 농업용수와 농산물 및 가공식품을 대상으로 대장균검출기, 막여과법 혹은 식품공전법, 건조필름법에 각각 적용하였다. 그 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 지하수에서는 대장균검출기와 막여과법으로 분석했을 때 각각 5.0%의 시료에서 양성 반응을 보였다. 한편 건조필름에서는 검출되지 않았다. 또한 하천수의 경우 막여과법으로 분석하였을 때 80%의 시료가 양성인데 반해 대장균 검출기에서는 모든 시료에서 양성 반응을 보였고 양성반응을 보인 시료를 선택배지에서 분리하고 최종 동정한 결과 이중 93.3%의 시료에서 양성을 보였다. 하지만 건조필름법으로 분석하였을 때는 36.7%의 시료에만 양성을 나타내었다. 건조필름에서 타 분석법보다 양성비율이 낮은 이유는 대장균검출기와 막여과법에 적용하는 시료량은 각각 100 mL인데 반해 건조필름은 1 mL이기 때문에 용량차이에 의한 것으로 판단된다. 또한 대장균검출기에서 위양성을 보인 시료는 6.7%였지만 최종 양성을 확인된 시료는 93.3%로 가장 높은 검출율을 보였다. 대장균 검출기에서 일부 위양성 결과를 보인 이유는 대장균 검출기에 사용된 시약 colilert의 특이성과 관계가 깊은 것으로 생각되는데 *Aeromonas* spp, 일부 *Salmonella* spp., *Shigella* spp.와 *Flavobacterium* spp.는 colilert에서 위양성 결과를 보인다고 알려져 있다[18-21]. 하지만 최종 양성으로 나타난 시료의 수는 막여과법 보다 높아 막여과법의 위음성 결과를 극복할 수 있는 장점이 있었다. 또한 효소발색법은 수질공전시험법에 등재된 표준방법이기 때문에 효소발색법과 연

Table 2. Validation of a combination of Colilert and the developed device for detection of *E. coli* in water and food not inoculated with *E. coli*

	Developed device		Standard method	Petrifilm
	Signal	Confirmed		
Underground water	1/20 (5.0%)	1/20 (5.0%)	1/20 (5.0%)	0/20 (0%)
Stream water	30/30 (100%)	28/30 (93.3%)	24/30 (80.0%)	11/30 (36.7%)
Mulberry leaves powder	2/3 (66.7%)	2/3 (66.7%)	1/3 (33.3%)	1/3 (33.3%)
Lotus root powder	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/3 (66.7%)	0/3 (0%)

계한 대장균검출기는 농업용수에서 대장균을 오염여부를 신속하게 검사하는 데는 활용가능 한 기술로 판단된다.

가공식품의 경우에는 뽕잎가루와 연근가루에서만 대장균이 검출되었는데 뽕잎가루의 경우는 대장균검출기, 식품공전법과 건조필름법으로 분석했을 때 각각 66.7%, 33.3%, 33.3%의 시료에서 대장균이 검출되었다. 연근가루의 경우는 대장균검출기, 식품공전법, 건조필름법을 적용하였을 때 각각 100%, 66.7%, 0%의 시료에서 양성반응을 보였다.

대장균 검출기에 활용되는 효소발색시약을 이용한 용수, 식품, 기구에서 대장균을 분석한 사례들이 있으며 특히 Yun 등[22]이 수행한 농산물 생산환경과 농산물에서 대장균의 검출을 위한 방법 개발 연구의 결과와 유사하다. Yun 등[22]의 연구에서는 기구, 장갑, 관개 수, 종자 및 채소 등 다양한 샘플에서 효소발색시약과 식품공전법으로 대장균을 검출하였다. 그들의 결과에 따르면 두 식품공전법과 효소발색법 간 대장균의 검출율에는 차이가 없었다. 또한 Julian 등[23]은 효소발색시약을 사용하여 손, 토양 및 분변 시료에서 대장균을 분석하였고 효소발색시약을 이용하여 분석한 방법에서 양성시료에서 대장균을 분리하였으며 그 결과 98.9%가 최종적으로 대장균으로 확인되었다. Kawasaki 등[13]은 효소발색시약을 DOX 시스템과 연계하여 채소에서 대장균 검출이 가능하다고 보고하였고 Venkateswaran 등[7]도 효소발색법과 미국 FDA의 BAM법을 적용했을 때 대장균 검출수준이 각각 83%, 87%로 유사하다고 하였다.

한편 본 연구에 사용한 연근가루는 대장균검출기로 검출하는 것은 부적합하다고 판단되는데 그 이유는 연근가루 자체가 자외선 하에서 형광을 나타내며, 시료의 색이 노란색이기 때문에 대장균 오염에 관계없이 양성으로 판단되기 때문이다. 본 연구에 사용된 시료는 세가지 방법에서 양성으로 나타난 것은 이 시료가 대장균에 오염되었기 때문이다.

그 외 다른 시료의 경우는 세 가지 방법을 적용하였을 때 모두 검출되지 않았다. 전반적으로 대장균검출기를 이용한 대장균검출율과 식품공전법을 이용한 대장균 검출율에 큰 차이가 없어 연근가루를 제외하고는 현장에서 손쉽게 대장균을 검출하는데 활용이 가능할 것으로 판단된다.

대장균을 접종한 작업도구, 농산물 및 식품에서 대장균검출기 성능 평가

농업용수를 제외한 작업도구, 농산물 및 식품에서 대장균이 검출되지 않아 이들 시료에서 대장균검출기의 활용가능성을 평가하는 데는 한계가 있었다. 대장균을 비롯한 식중독세균 분석법은 시료에 오염된 미생물의 종류와 성분에 영향을 받을 수 있기 때문에 대장균을 인위로 오염시켰을 때 정확하게 검출되는지를 여부를 평가할 필요가 있다. 따라서 대장균이 검출되지 않은 조리도구, 농산물, 식품에 대장균을 접종하여 대장균검출기, 식품공전법, 건조필름법으로 분석하여 대장균검출기의 물외의 시료에도 확대 적용 가능성을 평가하였다.

Table 3에서 보는 바와 같이 조리도구, 농산물에서는 세 가지 방법 모두 낮은 농도에서도 쉽게 검출될 수 있었다. 하지만 식품의 경우는 식품의 종류와 방법에 따라 대장균의 검출율에 차이를 보였다. 김, 김밥, 주스, 간장, 김치, 호상 요쿠르트에서 저농도(약 1 log CFU/g)로 오염되어 있을 때 대장균의 검출율이 낮게 나타났다. 방법별로는 대장균검출기, 식품공전법, 건조필름법으로 분석했을 때 각각 68.5%, 60.4%, 45.8%의 시료에서 양성을 보였다. 저농도에서 대장균검출율이 낮은 이유는 전처리과정에서 시료로부터 대장균이 탈리되지 못한 경우, 증균과정에 경쟁미생물에 의한 저해, 시료 성분의 영향으로 판단된다. 특히 김의 경우는 건조식품으로 균액을 접종하는 순간 시료가 균액을 흡수하는 성질이 있다. 이 경우 시료를 균질화하는 동안 시료에 부착된 대장균이 시료로부터 충분히 탈리되지 않아 전처리용액 속으로 부유되지 않은 것으로 판단된다. 또한 주스의 경우 pH가 낮은 식품으로 낮은 pH에 대장균이 노출되면 산에 대한 스트레스를 받고[24] 증균배지인 EC broth에 함유된 bile salt와 같은 항생물질에 의해 이차적 스트레스에 노출 되어 생육이 억제되는 것으로

Table 3. Validation of a combination of Colilert and the developed device for detection of *E. coli* in kitchen utensils, vegetables, and processed foods inoculated with *E. coli*

Group	Sample	1~2 log CFU/10 mL, g			2~3 log CFU/10 mL, g		
		Developed device	Standard method	Petriflim	Developed device	Standard method	Petriflim
Kitchen utensils	Cutting board	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
	Gloves	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	Knives	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
	Dishcloth	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Total		11/11 (100%)	11/11 (100%)	11/11 (100%)	11/11 (100%)	11/11 (100%)	11/11 (100%)

Table 3. (Continued) Validation of a combination of Colilert and the developed device for detection of *E. coli* in kitchen utensils, vegetables, and processed foods inoculated with *E. coli*

Group	Sample	1~2 log CFU/10 mL, g			2~3 log CFU/10 mL, g		
		Developed device	Standard method	Petriflim	Developed device	Standard method	Petriflim
Vegetables	Chives	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	Perilla leaves	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	Peanut	3/3	3/3	1/3	3/3	3/3	3/3
	Lettuce	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	Baby leafy vegetable	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	Cherry tomato	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	Enoki mushroom	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	Green pepper	2/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Total		23/24 (95.8%)	22/24 (91.7%)	23/24 (95.8%)	24/24 (100%)	24/24 (100%)	24/24 (100%)
Processed foods	Dried laver	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3
	Bar rice cake	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	Meat broth	2/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3
	Dumpling	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3
	Gimbap	1/3	3/3	1/3	3/3	3/3	3/3
	Sandwich	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	Apple juice	1/3	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3
	Orange juice	2/3	0/3	0/3	3/3	1/3	0/3
	Grape juice	1/3	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3
	Soy sauce	2/3	2/3	0/3	3/3	3/3	0/3
	Kimchi	3/3	3/3	1/3	3/3	3/3	3/3
	Milk	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	Cheese	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	3/3
	Plain yogurt	0/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Total		33/48 (68.5%)	29/48 (60.4%)	22/48 (45.8%)	46/48 (95.8%)	32/48 (66.7%)	29/48 (60.4%)

되는 것으로 보인다[25]. 호상요쿠르트의 경우는 pH의 영향과 시료내에 존재하는 유산균이 대장균의 생존에 영향을 미친 것으로 판단된다[26]. 특히 건조필름에서 가장 검출율이 낮은 이유는 손상된 세포를 회복시킬 수 있고 세균수를 증가시킬 수 있는 증균과정이 수반되지 않기 때문이다. 하지만 접종 농도를 10배 증가시키면 대장균검출기, 식품공전법, 건조필름법에서 검출률이 각각 27.3%, 6.3%, 14.6%가 증가되었다.

이상의 결과로 볼 때 본 연구에서 개발 된 장치는 다양한 시료에 적용이 가능하고 배양과 분석을 동시에 수행할 수 있을 뿐만 아니라 매시간 결과를 휴대폰으로 전송해 주기 때문에 기기와 먼거리에서도 실시간으로 결과 확인이 가능하여 농산물과 가공식품 생산현장에서 위생 상태를 확인하는데 편리하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다. 하지만 김, 주스, 김밥, 간장, 호상 요쿠르트와 같은 시료를 대상으로 대장균을 분석할 때 대장균의 검출율을 개선할 수 있는 기술이 필요하다.

국문 요약

농식품과 생산환경에서 대장균 오염여부를 휴대 전화에서 실시간으로 결과를 확인할 수 있는 IoT 기반 스마트 대장균 검출 장치를 개발하였다. 개발된 대장균 검출기는 온도 조절부, UV 램프, 고해상도 카메라 및 검출 여부를 판단할 수 있는 소프트웨어로 구성된 장치이다. 검출기의 성능을 평가하기 위하여 온도, 대장균 검출 시간 및 검출

한계를 측정하였는데, 개발 된 장치의 설정 온도와 실제 온도의 차이는 약 1.0°C 이내 였다. 또한 검출시간은 1 CFU / 100 mL일 때 15 시간이었고, 대장균 오염농도가 증가할수록 검출시간이 감소하였다. 개발된 스마트 대장균 검출기를 기구, 장갑, 관개 수, 종자 및 채소를 포함한 다양한 시료에 적용했을 때, 대장균의 검출율은 식품공전법으로 분석하였을 때보다 높았다. 따라서 개발된 대장균 검출기술은 농식품 및 생산환경에서 대장균을 효율적으로 검출할 수 있을 것으로 판단된다.

Acknowledgement

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ01267602)의 지원에 의해 이루어진 것임

References

1. Ministry of food and drug safety, (2019, September 5). Statistics of food borne outbreaks. Retrieved from: http://foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat
2. Kim, S.J., Sun, S.H., Min, K.J., Yoon, K.S., Microbiological Hazard Analysis and Verification of Critical Control Point (CCP) in a Fresh-Cut Produce Processing Plant. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* **21**, 392-400 (2011).
3. Manfreda, G., Cesare, A.D., Novel food trends and climate changes: impact on emerging food-borne bacterial pathogens. *Curr. Opin. Food Sci.* **8**, 99-103 (2016).
4. Metza, M., Sheehana, J., Feng, P.C.H., Use of indicator bacteria for monitoring sanitary quality of raw milk cheeses - A literature review. *Food Microbiol.* **85**, 103283 (2020).
5. Ministry of food and drug safety, (2018, March 20). Chapter 5. Food Standards and Specifications, Korean Food code. Retrieved from: http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/
6. Ministry of food and drug safety, (2018, March 20). 4.8. Method for detection of *Escherichia coli,* Korean Food code. Retrieved from: http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/
7. Venkateswaran, K., Murakoshi, A., Satake, M., Comparison of commercially available kits with standard methods for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2236-2243 (1996).
8. Carner, N., Carroll, Z.S., Long, S.C., A comparison of rapid bacterial methods to U.S. EPA-approved methods for biosolids. *Water Environ. Res.* **85**, 643-9 (2013).
9. Ministry of environment, 2017, *Escherichia*-Enzyme substrate method, Water pollution test criteria. Sejong-si, pp. 1160-1163.
10. Berger, S., Ability of the colilert method to recover oxidant-stressed *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* **13**, 247-250 (1991).
11. Covert, T.C., Rice, E.W., Johnson, S.A., Berman, D., Johnson, C.H., Mason, P.J., Comparing defined-substrate coliform tests for the detection of *Escherichia coli* in water. *J. Am. Water Works Assoc.* **84**, 98-104 (1992).
12. Frampton, E., Restaino, L., Methods for *Escherichia coli* identification in food, water and clinical samples based on beta-glucuronidase detection. *J. Appl. Bacteriol.* **74,** 223-233 (1993).
13. Kawasaki, S., Nazuka, E., Bari, M.L., Amano, Y., Yoshida, M., Isshiki, K., Comparison of traditional culture method with DOX system for detecting coliform and *Escherichia coli* from vegetables. *Food Sci. Technol. Res.* **9**, 304-308 (2003).
14. Eccles, J., Searle, R., Holt, D., Dennis, P., A comparison of methods used to enumerate *Escherichia coli* in conventionally treated sewage sludge. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 375-383 (2004).
15. Muirhead, R., Littlejohn, R., Bremer, P., Evaluation of the effectiveness of a commercially available defined substrate medium and enumeration system for measuring *Escherichia coli* numbers in faeces and soil samples. *Lett. Appl. Microbiol.* **39**, 383-387 (2004).
16. Yeom, S.C., Sample analysis system using enzyme coloring method. *Korea Patent.* 10-2015-0068755 (2015).
17. Lee, O.J., *Eschericha coli* continuous culture detection system in water sample. *Korea Patent.* 10-2014-1465900 (2014).
18. Kilian, M., Bulow P., Rapid identification of Enterobacteriaceae. II. Use of β-glucuronidase detecting agar medium (PGUA) for the identification of *E. coli* in primary cultures of urine samples. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B.* **87**, 271-276 (1979).
19. Landre, J.P., Gavriel, A.A., Lamb, A.J., False-positive coliform reaction mediated by *Aeromonas* in the Colilert defined substrate technology system. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**, 352--354 (1998).
20. Petzel, J.P., Hartman, P.A., A note on starch hydrolysis and β-glucuronidase activity among flavobacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **61**, 421-426 (1986).
21. Ralovich, B., Ibrahim, G.A. M., Fabian, A., Herpay, M., What is the diagnostic value of β-D-glucuronidase (BDG) activity of bacteria using fluorocult ECD agar for their cultivation. *Acta Microbiol. Hung.* **38**, 147-154 (1991).
22. Yun, B.H., An, H.M., Shim, W.B., Kim, W.I., Hung, N.B., Han, S.H., Kim, H.J., Lee, S.D., Kim, S.R., Development of a screening method and device for the detection of *Escherichia coli* from agri-food production environments and fresh produce. *J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 2145-2154 (2017).
23. Julian, T.R., Islam, M.A., Pickering, A.J., Roy, S., Fuhrmeister, E.R., Ercumen, A., Harris, A., Bishai, J., Schwab, K.J., Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from feces, hands, and soils in rural Bangladesh via the Colilert Quanti-Tray system. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 1735-1743 (2015).

24. Conner, D.E., Kotrola, J.S., Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Appl. Environ. Microbiol*. **61**, 382-385 (1995).
25. Park, S.H., Ryu, S.R., Kang, D.H., Improved selective and differential medium for isolation of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 405-408 (2011).
26. Bachrouri, M., Quinto, E.J., Mora, M.T., Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during storage of yogurt at different temperatures. *J. Food Sci.* **67**, 1899-1903 (2002).