pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 38, No. 6, pp. 449~456 (2023)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2023.38.6.449

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

미생물 생장 예측모델과 반응표면분석법을 이용한 *Vibrio parahaemolyticus*의 신속 증균배지 개발

서연희 · 이소영 · 김은지 · 오세욱*
국민대학교 식품영양학과

Development of a Rapid Enrichment Broth for *Vibrio parahaemolyticus* Using a Predictive Model of Microbial Growth with Response Surface Analysis

Yeon-Hee Seo, So-Young Lee, Unji Kim, Se-Wook Oh*
Department of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul, Korea

(Received September 8 2023/Revised October 27 2023/Accepted October 29, 2023)

ABSTRACT - In this study, we developed Rapid Enrichment Broth for *Vibrio parahaemolyticus* (REB-V), a broth capable enriching *V. parahaemolyticus* from 10^0 CFU/mL to 10^6 CFU/mL within 6 hours, which greatly facilitates the rapid detection of *V. parahaemolyticus*. Using a modified Gompertz model and response surface methodology, we optimized supplement sources to rapidly enrich *V. parahaemolyticus*. The addition of 0.003 g/10 mL of D-(+)-mannose, 0.002 g/10 mL of L-valine, and 0.002 g/10 mL of magnesium sulfate to 2% (w/v) NaCl BPW was the most effective combination of *V. parahaemolyticus* enrichment. Optimal *V. parahaemolyticus* culture conditions using REB-V were at pH 7.84 and 37°C. To confirm REB-V culture efficiency compared to 2% (w/v) NaCl BPW, we assessed the amount of enrichment achieved in 7 hours in each medium and extracted DNA samples from each culture every hour. Real-time PCR was performed using the extracted DNA to verify the applicability of this REB-V culture method to molecular diagnosis. *V. parahaemolyticus* was enriched to 5.452±0.151 Log CFU/mL in 2% (w/v) NaCl BPW in 7 hours, while in REB-V, it reached 7.831±0.323 Log CFU/mL. This confirmed that REB-V enriched *V. parahaemolyticus* to more than 10^6 CFU/mL within 6 hours. The enrichment rate of REB-V was faster than that of 2% (w/v) NaCl BPW, and the amount of enrichment within the same time was greater than that of 2% (w/v) NaCl BPW, indicating that REB-V exhibits excellent enrichment efficiency.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus,* Rapid enrichment, Enrichment broth, Development, Rapid detection

*V. parahaemolyticus*는 비브리오과(*Vibrionaceae*) 비브리오 속(genus *Vibrio*)에 속하는 그람 음성균이며, 직선 또는 곡선형 막대로 구성되어 액체 배지에서 단일 극성 편모에 의해 운동성이 있다[1]. 호염성균으로 식인성 병원균 13종을 포함하여 30종으로 구성된 *V. parahaemolyticus*는 내생포자나 소낭을 형성하지 않고 호흡 및 발효 대사를 모두 하는 통성 혐기성 미생물이다[1,2]. *V. parahaemolyticus*는 전 세계적으로 온대 및 열대 해양환경에 널리 존재하고 전파경로 또한 넓기 때문에 한국, 일본, 미국, 유럽 등 전 세계의 수산물 관련 식중독의 주요 원인균이 된다[3]. 굴, 가리비, 문어, 새우, 조개 등 다양한 해산물에서 발견되며[1], Ren 등[4]은 수산물 이외에도 가축, 가금육, 소금에 절인 채소, 계란 등에서도 *V. parahaemolyticus*의 오염이 발견되었다고 보고하였다. *V. parahaemolyticus*에 의한 식중독은 *V. parahaemolyticus*가 오염된 식품 또는 날 것, 덜 익은 해산물을 섭취했을 때 발생할 수 있으며, 일반적으로 1-2일 이내에 복통, 구토, 묽은 변, 설사, 미열 등의 증상을 나타내는 세균성 위장염, 위장장애를 일으킨다[4,5]. 식품의약품안전처의 식중독 통계에 따르면 2002년부터 2023년까지 조사한 5,890건의 식중독 중 *V. parahaemolyticus* 식중독은 265건 발생하였고, 5,056명의 환자가 발생하여 지속적

*Correspondence to: Se-Wook Oh, Department of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul Korea
Tel: +82-2-910-5778; Fax: +82-2-910-5249
E-mail address: swoh@kookmin.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

으로 문제가 되고 있다[6]. 한국의 경우, 접근성이 좋은 해양환경으로 인해 수산업이 잘 발달하여 해산물 섭취량이 많고, 날것의 해산물을 섭취하는 식문화 또한 전통적으로 발달하여 *V. parahaemolyticus* 식중독에 노출될 가능성이 크기 때문에 지속적인 모니터링과 안전관리가 필요하다[7].

우리나라 식품공전에 따르면 *V. parahaemolyticus*를 검출하기 위해서는 증균배양, 분리배양, 확인시험, 생화학적 시험의 단계를 거친다. 최종적으로 생화학적 시험에서 0% 및 10% NaCl 포함한 보통한천배지에서 배양 불가능, 6% NaCl을 포함한 배지에서는 배양 가능, arginine 비분해, o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG)는 비분해 시 양성으로 판단한다[8]. 이러한 생화학적 시험법으로 *V. parahaemolyticus*를 검출하는 과정은 감도가 낮고 노동집약적이며 최소 3일의 시간이 필요하다. 검출 시 시간이 오래 걸리기 때문에 오염 여부를 판단하기 전까지 판매가 보류되면 제품의 품질이 저하되어 판매자의 경제적 손실이 발생하고, 혹은 오염 여부 판단 전에 판매된 제품이 식중독을 유발해 소비자에게 건강상의 위해를 끼칠 수 있다[9,10]. 특히 *V. parahaemolyticus*가 빈번히 검출되는 패류는 빠르게 부패하는데, 여과섭이를 통해 영양분을 얻어 소화과정에서 미생물과 바이러스를 농축하는 특성이 있기 때문이다[11]. 최소 3일 이상이 걸리는 분리배양 기반의 검출 방법은 해산물 등의 신선 식품의 안전 모니터링과 신속 진단에는 적합하지 않다[12]. 따라서 분리배양 기반 검출 방법을 통해 *V. parahaemolyticus*를 신속하게 검출하기 위해서는 전배양 단계의 소요 시간을 단축하여 검출 시간을 최소화할 필요가 있다.

전배양 과정에서 증균배지에 *V. parahaemolyticus*의 성장에 도움을 줄 수 있는 성분을 첨가하는 방식으로 전배양에 걸리는 시간을 단축할 수 있다[13]. 미생물의 성장에 필수적인 요소인 탄소, 질소, 무기질원을 증균배지에 추가해서 배양한다면 성장 속도를 높일 수 있다[14]. 증균배지에 들어갈 성분은 균의 성장을 함수로 예측하는 데 가장 효과적인 기본 모델인 modified Gompertz model을 이용하여 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)으로 선정할 수 있다[15]. RSM은 반응의 변화가 이루어지는 반응 표면에 대한 통계학적 분석 방법으로 독립변수들의 최적화된 반응량을 예측하기 사용되기 때문에, modified Gompertz model로 특정 환경조건에서 미생물의 생육을 수학적으로 나타내어 미생물 성장곡선을 확인할 수 있을 것이다.[16,17]

Yamazaki 등[12]은 *V. parahaemolyticus*의 순수 균액에서의 PCR의 검출한계는 10^3 CFU/mL이라고 보고하였으며, Ward 등[3]은 *V. parahaemolyticus*의 순수 균액에서의 Real-time PCR의 검출 한계는 10^4 CFU/mL이라고 보고하였다. 하지만 본 연구에서는 보다 확실한 검출을 위하여 목표 증균농도를 10^6 CFU/mL로 설정하였다. 대부분 균을 퇴근 전 계대배양 후 밤새 15-18시간 이상 배양하여 450 nm 파장에서 흡광도가 0.2가 될 때, 즉 균의 농도가 10^6 CFU/mL가 될 때까지 성장시킨다[3]. 하지만 증균시간이 근무시간보다 길어지면 식품은 이미 배송 중이거나 소비된 후로 산업현장에서의 즉각적인 대응이 불가능하며 식중독균 검사의 의미가 퇴색된다. 때문에 산업현장에서 제어 가능 시간내에 실험 결과를 도출하여야 목적 식중독균 검출 시 산업체에서 대응이 가능하기 때문에 근무시간 내인 6시간 이내로 목표 증균시간을 설정하였다.

따라서 본 연구에서는 *V. parahaemolyticus*의 전배양시간을 단축할 수 있는 신속 증균배지(rapid enrichment broth for *V. parahaemolyticus*, REB-V)를 modified Gompertz model15)와 RSM을 사용하여 개발하고, 성장조건을 최적화함으로써 신속하게 *V. parahaemolyticus*를 6시간 이내에 100 CFU/mL에서 106 CFU/mL까지 증균하고자 하였다.

Materials and Methods

사용 균주

본 시험에 사용한 *V. parahaemolyticus* 균주(ATCC 33844, ATCC 17802, ATCC 43996)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받아 사용하였다. 사용 균주는 50% glycerol stock vial에 현탁 후 -80°C deep freezer에 냉동 보관하였다. 사용 시 2% (w/v) Sodium chloride (NaCl; Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany)로 염 농도를 조절한 Luria Broth (Taeshin Bio Science, Namyangju, Korea) 10 mL에 1차 접종하여 34°C에서 9시간 동안 1차 배양한 뒤, 16시간 동안 2차 배양하여 사용하였다. 배양액은 1 mL씩 혼합하여 8,000 ×g, 15분, 4°C의 조건에서 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤 2%(w/v) NaCl 용액으로 현탁하여 세척하였다. 동일 조건에서 한 번 더 원심분리 후 상층액을 제거한 뒤 saline 3 mL로 재현탁하여 균액을 준비하였다.

REB-V 첨가 성분 선정

Buffered peptone water (BPW, Oxoid, Basingstoke, UK)에 탄소원, 질소원, 무기질원을 추가로 첨가함으로써 REB-V를 개발하였다. BPW도 2% NaCl (w/v)로 염 농도를 맞추어 사용하였다(2%(w/v) NaCl BPW). 탄소원으로써 D-(+)-glucose, D-(-)-fructose, D-(+)-mannose, L-(-)-sorbose, D-(+)-galactose, D-(+)-melibiose를, 질소원으로써 L-threonine, L-proline, L-asparagine, L-serine, L-histidine, L-arginine, L-valine을, 무기질원으로써 magnesium sulfate, magnesium chloride, ammonium sulfate, ammonium chloride, potassium chloride를 선택하였다 (Table 1). 탄소원, 질소원, 및 무기질원을 각각 20 g/L의 농도로 2%(w/v) NaCl BPW에 첨가하였고, mixed cellulose ester (MCE) 필터(0.20 μm; Hyundai Micro Co., Ltd., Seoul, Korea)와

30 mL syringe (KOVAX-SYRINGE; Korea Vaccine, Seoul, Korea)를 이용하여 제균하였다. 제균된 REB-V를 이용하여 균액을 10^3 CFU/mL까지 희석한 뒤 성장곡선을 측정하였다. 성장곡선은 Multiskan SkyHigh microplate spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, USA)를 이용하여 34°C에서 7시간 동안 30분 간격으로 600 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

RSM을 이용한 REB-V 성분 농도 최적화

REB-V 성분으로 선정된 성분인 D-(+)-mannose, L-valine, magnesium sulfate의 농도를 최적화하기 위하여 Design-Expert® software (version 13.0, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 RSM을 실시하였다. 최적의 성장률을 보일 수 있는 농도 조합 20가지를 도출하였고, 농도의 범위는 0.2 g/L-20 g/L으로 설정하였다. RSM으로 도출한 20가지 농도 조합을 2%(w/v) NaCl BPW에 첨가하고, MCE 필터(0.20 μm; Hyundai Micro Co., Ltd.)와 30 mL syringe (KOVAX-SYRINGE; Korea Vaccine)로 제균한 각각의 용액을 이용하여 균액을 10^2 CFU/mL까지 희석한 뒤 Multiskan SkyHigh microplate spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 34°C에서 16시간 동안 30분 간격으로 600 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 성장곡선을 측정한 이후에 흡광도를 GraphPad Prism (version 9.0, GraphPad, Boston, MA, USA)의 modified Gompertz model에 대입하여 성장률을 분석하였다[15]. 분석된 성장률과 유도기 시간을 활용하여 가장 높은 성장률을 나타낼 것으로 기대되는 최적 농도 조합 9가지를 Design-Expert® software (version 13.0, Stat-Ease, Inc.)의 RSM을 통해 도출하였다. RSM으로 도출한 9가지 농도 조합을 2%(w/v) NaCl BPW에 첨가하고 위와 같은 조건으로 흡광도를 측정하고, modified Gompertz model에 성장곡선을 대입하여 성장률을 분석하였다.

REB-V의 배양조건 최적화

REB-V를 이용하여 *V. parahaemolyticus*를 배양하였을 때, 성장을 최대화할 수 있는 성장조건을 탐색하기 위하여 REB-V의 pH와 배양 온도를 최적화하였다. REB-V의 pH를 ±0.8 범위 내에서 조정하여 pH 6.27, pH 7.05, pH 7.84를 나타내도록 조절하였고, 배양온도는 34°C를 기준으로 ±3°C 범위에서 조절하여 31°C, 34°C, 37°C로 설정하였다. REB-V의 pH는 2 M HCl 용액(Duksan Pure Chemicals, Ansan, Korea)과 2 M NaOH 용액(Samchun Pure Chemical, Pyeongtaek, Korea)을 이용하여 조정하였으며, Accumet™ AB150 pH meter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 pH를 측정하였다. pH가 조정된 REB-V는 MCE 필터(0.20 μm; Hyundai Micro Co., Ltd.)와 30 mL syringe (KOVAX-SYRINGE; Korea Vaccine)로 제균하였다. pH가 각각 pH 6.27, pH 7.05, pH 7.84로 조정된 REB-V를 이용해 10^0 CFU/mL까지 십진 희석한 균액 10 mL을 31°C, 34°C, 37°C에서 각각 배양하였다. 배양액을 0, 6시간마다 1.5%(w/v) NaCl을 첨가한 Tryptic Soy Agar (2%(w/v) NaCl TSA; Oxoid)에 평판도말한 뒤 34°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 집락을 계수하여 REB-V의 성장조건에 따른 *V. parahaemolyticus*의 증균량을 통해 최적 성장조건을 확인하였다.

REB-V 증균 효율 확인

개발한 REB-V의 증균효과를 확인하기 위하여 2%(w/v) NaCl BPW 와 REB-V로 10^0 CFU/mL까지 십진희석한 균액 10 mL을 각각 34°C와 최적화된 온도인 37°C에서 7시간 증균하였다. 증균량을 확인하기 위해 0-7시간 동안 1시간마다 배양액을 2%(w/v) NaCl TSA에 평판도말한 뒤 34°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 집락을 계수하여 *V. parahaemolyticus*의 증균량을 측정하여 2% NaCl BPW와 비교한 REB-V의 증균 효율을 확인하였다. 또한 real-time PCR을 이용하여 증균 효율을 확인하기 위하여 1시간마다 배양액 1 mL을 PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다. Real-time PCR을 위한 반응물의 조성은 SensiFAST Probe Hi-ROX mix (Bioline, London, UK) 10 μL, 500 nM 정방향 및 역방향 primer, 250 nM probe, RT-PCR Grade Water (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 3 μL와 주형 DNA 5 μL로 구성하여 총 20 μL가 되도록 하였다. 추출한 DNA는 *V. parahaemolyticus*의 *tlh*를 표적 유전자로 하는 primer 5'-AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG-3' (*tlh*-F), 5'-GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC-3' (*tlh*-R), probe5'- FAM-AAG AAC TTC ATG TTG ATG ACA CT-TAMRA-3' (*tlh*-P) 염기서열을 사용하여 real-time PCR을 수행하였다[3]. Real-time PCR은 QuantStudio™ 5 real-time PCR system, 96-well, 0.1 mL (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)을 이용하여 50°C에서 2분, 95°C에서 10분을 반응시킨 후 95°C에서 20초, 56°C에서 20초, 72°C에서 30초를 1회로 총 40 cycles를 반응시켰다.

통계 분석

각 실험은 3회 반복하여 수행하였고, 모든 측정값은 평균(mean)±표준편차(standard deviation)로 나타내었다. 실험결과는 SPSS software (Statistical Package for Social Sciences, v.25.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하여 독립표본 T 검정(T-test)과 일원배치 분산분석(ANOVA)을 수행하였으며, ANOVA의 경우 사후검정으로 다중범위검정(Duncan's multiple range test)의 결과로 유의성(P<0.05)을 검증하였다.

Table 1. Supplements added to 2%(w/v) NaCl BPW to select carbon, nitrogen, and mineral sources to be added to REB-V

Source	Component
Carbon	D-(+)-Glucose
	D-(-)-Fructose
	D-(+)-Mannose
	L-(-)-Sorbose
	D-(+)-Galactose
	D-(+)-Melibiose
Nitrogen	L-Threonine
	L-Proline
	L-Asparagine
	L-Serine
	L-Histidine
	L-Arginine
	L-Valine
Mineral	Magnesium sulfate
	Magnesium chloride
	Ammonium sulfate
	Ammonium chloride
	Potassium chloride

Results and Discussion

REB-V의 성분 선정 및 성분 농도 최적화

2% NaCl BPW에 단일 성분(Table 1)을 각각 첨가하여 *V. parahaemolyticus*에 대한 7시간 동안의 성장곡선을 측정한 결과 가장 높은 흡광도(600 nm)를 보이는 성분으로 D-(+)-mannose, L-valine, magnesium sulfate를 채택하였다. D-(+)-mannose는 0.102±0.005, L-valine은 0.066±0.003, magnesium sulfate는 0.076±0.005의 흡광도를 나타내었고, 대조군인 2% NaCl BPW는 0.027±0.005의 흡광도를 나타내었다. 세 가지 성분은 2% NaCl BPW의 흡광도 대비 각각 3.732 배, 2.432 배, 2.799 배 높은 흡광도를 보여 REB-V에 첨가될 성분으로 선정되었다(Fig. 1). 20개의 농도 조합의 성장곡선을 modified Gompertz model에 대입하여 최적 농도 조합 9가지를 다시 도출하였다. 9가지 경우의 수를 이용하여 성장곡선을 측정하였고, modified Gompertz model을 이용하여 분석한 성장률은 Table 2에 나타나 있다. 그 결과, 가장 높은 성장률을 나타낸 조합인 D-(+)-mannose 0.3 g/L, L-valine 0.2 g/L, magnesium sulfate

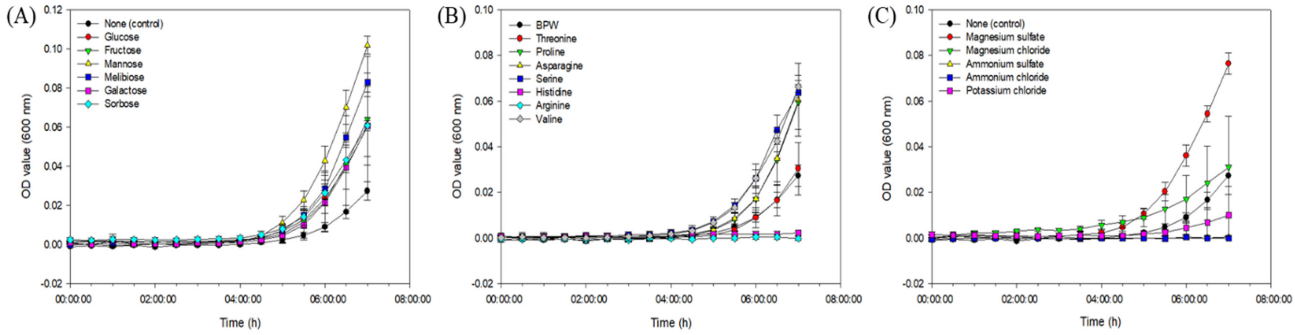

Fig. 1. Growth curves measured at 30 minutes intervals for 7 hours after being added to 2%(w/v) NaCl BPW to select supplements to be added to REB-V. (A) carbon sources, (B) nitrogen sources, (C) mineral sources

Table 2. The optimal concentration combination expected to produce the highest growth rate derived by RSM and the corresponding growth rate

Number	D-(+)-Mannose (g/10 mL)	L-Valine (g/10 mL)	Magnesium sulfate (g/10 mL)	Growth rate	R^2
2%(w/v) NaCl BPW	0.000	0.000	0.000	0.021	0.978
1	0.002	0.002	0.002	0.122	0.952
2	0.002	0.003	0.002	0.125	0.959
3	0.002	0.002	0.003	0.151	0.982
4	0.002	0.005	0.002	0.156	0.989
5	0.002	0.002	0.004	0.133	0.990
6	0.003	0.002	0.002	0.188	0.966
7	0.002	0.008	0.002	0.185	0.985
8	0.002	0.002	0.007	0.142	0.972
9	0.004	0.002	0.002	0.162	0.982

0.2 g/L은 성장률이 0.188이었던 반면, 대조군인 2% NaCl BPW에서 측정한 성장률은 0.021로 8.952배 높은 성장률을 보여주어 REB-V에 첨가될 성분의 최종 농도로 선정하였다. Williams 등[18]은 연구에서 *V. parahaemolyticus*가 성장에 활발히 사용할 수 있는 탄소원은 D-mannose, D-fructose, D-maltose, D-glucose-6-phosphate, D-fructose-6-phosphate라고 하였다. 또한 Whitaker 등[10] 과 Regmi 등[19]은 *V. parahaemolyticus*는 마우스의 장 내에서 잠 점액의 주요성분인 D-mannose 외 6개의 탄소원을 유일한 탄소원으로 활용하도록 적응하였다고 보고한 바 있다. 이처럼, D-mannose를 활발히 사용하는 특성으로 인해 2% NaCl BPW에 D-mannose를 첨가했을 때 가장 높은 성장률이 나타난 것으로 사료된다.

Magnesium은 대부분 단백질의 보조인자 및 리보솜, 세포막, 세포 구조 및 pH 균형 조절과 안정화 인자 역할을 하는 미생물에 필수적인 2가 양이온이면서 동시에 *V. parahaemolyticus*와 같은 해양환경에 서식하는 세균의 성장에 필수적인 무기질이다[20].

Tiruvayipati 등[21]의 연구에 따르면 *V. parahaemolyticus*는 철과 같은 다른 무기질이 제한된 상황에서도 magnesium이 존재하면 *V. parahaemolyticus*의 생존이 가능하다고 하였고, Ju 등[20]은 고농도의 magnesium 조건에서 독성으로 인해 생존능력이 떨어지는 다른 미생물과 다르게, *V. parahaemolyticus*는 생존이 가능하다고 보고하였다. 이러한 magnesium을 필수적으로 하며, 고농도 환경에도 적응한 *V. parahaemolyticus*의 특성으로 미루어 보아, 2% NaCl BPW에 magnesium sulfate가 첨가되었을 때 *V. parahaemolyticus*의 빠른 성장에 도움을 주었을 것으로 생각된다. 따라서 REB-V를 개발하기 위하여 2%(w/v) NaCl BPW에 첨가된 성분이 *V. parahaemolyticus*의 빠른 성장에 도움을 줄 수 있는 성분으로 작용하여 신속한 증균이 가능할 것으로 사료된다.

REB-V의 배양조건 최적화

REB-V의 증균 효과를 더욱 증대시킬 수 있는 성장조건을 탐색하기 위하여 REB-V의 pH와 배양 온도를 최적화하였다. Modified Gompertz model에 성장곡선을 대입하여 확인한 *V. parahaemolyticus*의 유도기 시간이 6시간 이내로 분석되어, 성장조건에 따른 REB-V에서 *V. parahaemolyticus*의 증균효과는 0시간과 6시간에서 확인하였다(Fig. 2) 1.574-1.903 Log CFU/mL의 *V. parahaemolyticus*를 pH 6.27, pH 7.05, pH 7.84와 31°C, 34°C, 37°C에서 6시간 동안 배양했을 때, pH 7.84와 37°C에서 REB-V의 효과가 가장 높은 것을 확인하였다. 대조군인 pH 7.05와 34°C에서 배양한 *V. parahaemolyticus*는 1.903±0.383 Log CFU/mL에서 5.335±0.383 Log CFU/mL 증가하여, 최종적으로 7.176±0.470 Log CFU/mL로 증가하였다. 그에 반해 가장 큰 효과를 나타낸 pH 7.84와 37°C에서 배양한 *V. parahaemolyticus*는 0시간 대비 1.628±0.286 Log CFU/mL에서 7.787±0.304 Log CFU/mL의 상당한 증가세를 보이며, 최종적으로는 9.300±0.187 Log CFU/mL에 도달하였다. 같은 시간 동안 증균했을 때 REB-V가 *V. parahaemolyticus*를 2.452 Log CFU/mL 더 증균시킨 것을 확인하여 REB-V의 최적화된 배양조건은 pH 7.84와 37°C임을 확인하였다. Yang 등[15]의 연구에 따르면 modified Gompertz model로 계산한 *V. parahaemolyticus*의 성장 속도는 온도가 증가함에 따라 0.021~0.91 $\log_{10}$/h로 증가하였고, 유도기는 배양온도가 16°C에서 35°C로 증가함에 따라 42.5시간에서 1.9시간으로 많이 감소하였다. 본 논문에서는, 31°C나 34°C에서 배양했을 때 보다 37°C에서 배양했을 때 배양온도가 높아져 *V. parahaemolyticus*의 성장 속도가 빨라지고, 유도기가 줄어들어 같은 시간 동안 배양했을 때 더 증균된 것으로 사료된다. Soto-Rodriguez 등[22]의 연구에서 *V. parahaemolyticus*는 pH 4 이하에서는 생육이 불가능했으며, pH 7보다 pH 8-9에서 더 잘 자랐다고 보고한 바 있다. 또한 Igbinosa 등[2]의 연구에서는 *Vibrio* 종은 중성 pH에서 pH 9.0까지의 알칼리성 배지에서 잘 자라며, 산성에 민감하기 때문에 선택배지와 증균배지의 pH 값은 일반적으로 8.0-8.8이라고 보고하였다. 본 논문에서, pH 조정 전의 REB-V는 pH가 pH 7.05로 *V. parahaemolyticus*의 생육 적정 pH보다 낮으나, 2M HCl 용액으로 pH를 7.85로 조정한 배지는 생육 적정 pH에 근접하여 *V. parahaemolyticus*의 성장에 적절한 환경을 제공하였기 때문에 6시간 이내에 10^7 CFU/mL까지 증균이 가능하였을 것으로 사료된다. 따라서 REB-V를 pH 7.85로 조정한 뒤 37°C에서 배양했을 때, 효과적으로 *V. parahaemolyticus*가 증균된 것으로 판단하였다.

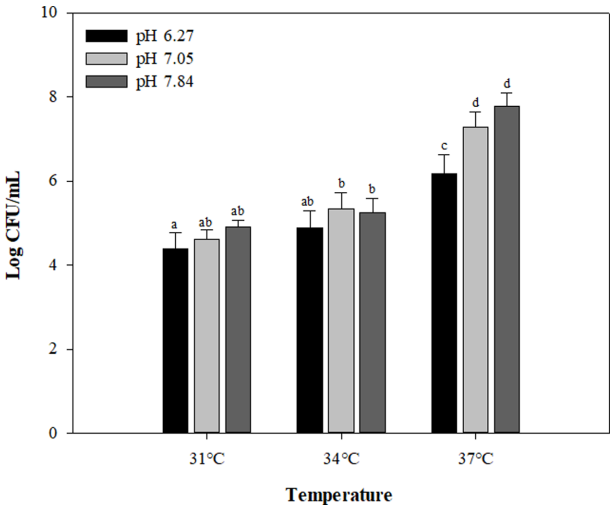

Fig. 2. Optimization of temperature and pH conditions to maximize the enrichment efficiency of REB-V. Different lower-case letters indicate significant differences (P<0.05) among temperature and pH conditions.

Table 3. Result of enrichment efficiency measured by plate counting while enriching *V. parahaemolyticus* for 7 hours using 2%(w/v) NaCl BPW and REB-V

Enrichment time (h)	Cell counts (Log CFU/mL)	
	BPW	REB-V
0	0.881±0.141[1)]	0.823±0.032
1	1.011±0.052	1.007±0.135
2	1.354±0.226	1.941±0.137[**2)]
3	2.418±0.363	2.782±0.361
4	3.301±0.419	4.060±0.194[***]
5	3.746±0.268	5.410±0.340[***]
6	4.599±0.367	6.057±0.192[***]
7	5.452±0.151	7.831 ±0.323[***]

[1)] Data are presented as mean±SD.
[2)] There was significance in the t-test between ** (P<0.05) and *** (P<0.001).

Table 4. Real-time PCR results using DNA of *V. parahaemolyticus* while enriching *V. parahaemolyticus* for 7 hours using 2%(w/v) NaCl BPW and REB-V

Enrichment time (h)	Mean Ct value ± SD	
	BPW	REB-V
0	N.D. [1,2)]	N.D.
1	N.D.	N.D.
2	N.D.	N.D.
3	37.467±0.454 (3/3)[3)]	36.440±0.402 (3/3)
4	35.097±0.374 (3/3)	32.613±0.294 (3/3)
5	31.973±0.167 (3/3)	29.070±0.297 (3/3)
6	29.170±0.380 (3/3)	25.080±0.698 (3/3)
7	25.440±0.291 (3/3)	21.557±0.459 (3/3)

[1)] Not detected.
[2)] Cycle threshold (Ct) values > 38 were considered undetectable.
[3)] Number of samples tested positive/total number of samples.

증균배지에 따른 배양시간 별 *V. parahaemolyticus*의 증균 효율

배양 조건이 최적화된 REB-V의 증균효율을 확인하기 위하여 증균 시간별 *V. parahaemolyticus*의 균 수를 비교하였다. 10^0 CFU/mL의 *V. parahaemolyticus*를 0시간부터 7시간까지 1시간 단위로 균 수를 측정한 결과는 Table 3에 나타나 있다. 2%(w/v) NaCl BPW로 배양했을 때 6시간 이내에 목표 농도인 10^6 CFU/mL의 도달하지 못하고 4.599±0.367 Log CFU/mL까지 증균되었지만 REB-V의 경우 최종 목표인 6시간 이내 6.057±0.192 Log CFU/mL CFU/mL까지 증균되었다. 최종적으로 7시간의 증균 결과, 2%(w/v) NaCl BPW에서 *V. parahaemolyticus*는 0.881±0.141 Log CFU/mL부터 5.452±0.151 Log CFU/mL까지 증균되었고, REB-V에서는 0.823±0.032 Log CFU/mL부터 7.831±0.323 Log CFU/mL까지 증균되었다. 같은 조건에서 증균하였을 때 7시간 후 REB-V가 2%(w/v) NaCl BPW보다 *V. parahaemolyticus*를 2.379 Log CFU/mL 더 증균시켜, REB-V는 2%(w/v) NaCl BPW 대비 28.102%의 증균 효율을 나타내었다. 같은 조건에서 증균하였을 때 증균배지의 종류에 따라서 증균량의 차이가 나타나는지 확인하기 위해 독립표본 T 검정을 실시한 결과, 4시간부터 2%(w/v) NaCl BPW (M=2.909, SD=0.545) 보다 REB-V (M=4.028, SD=0.2420)의 증균량이 유의미하게 증가하였다. t(4)= -3.250, (P<0.05). 결과적으로 2%(w/v) NaCl BPW와 REB-V의 4시간 이후 증균량은 유의미한 차이가 있으며(P<0.001), REB-V의 증균 효율이 더 높은 것으로 판단하였다. 또한 증균 시간별 추출한 DNA를 real-time PCR을 통해 증폭한 결과, 4시간부터 Ct 값의 유의적 차이가 나타남에 따라 REB-V의 증균 효율을 확인하고 개발한 REB-V가 분자 진단 기술에 적용할 수 있는 증균배지임을 확인하였다(Table 4). 하지만 본 연구의 한계점으로는 식품공전에서는 *V. parahaemolyticus*의 증균배지로는 Alkaline 펩톤수를 사용하는 반면, REB-V는 2%(w/v) NaCl BPW를 바탕으로 개발하여 식품공전을 반영하여 *V. parahaemolyticus*의 정성시험을 수행하는 산업현장에서는 적용에 어려움을 겪을 수 있다[8)]. 다만 일반 BPW가 아닌 Alkaline 펩톤수의 NaCl 농도와 동일하게 맞춘 2%(w/v) NaCl BPW를 사용하였기에 *V. parahaemolyticus*의 생육에 적합한 삼투압을 제공하여 증균배지로 사용이 가능하였다. 따라서 Alkaline 펩톤수와 REB-V의 증균 효율을 비교하는 추가연구를 진행하면 산업현장에서의 REB-V 적용성을 더욱 높일 수 있을 것으로 기대된다.

Conclusion

결론적으로 10^0 CFU/mL의 *V. parahaemolyticus*를 6시간 이내에 10^6 CFU/mL까지 증균하기 위하여 2%(w/v) NaCl BPW에 D-(+)-mannose 0.3 g/L, L-valine 0.2 g/L, magnesium sulfate 0.2 g/L을 첨가하여 REB-V를 개발하였다. REB-V가 6시간의 증균 동안 *V. parahaemolyticus*를 더 증균시켜 2%(w/v) NaCl BPW 대비 28.403±3.067%의 증균 효율을 나타내는 것으로 확인되었다. 또한 REB-V를 활용하여 *V. parahaemolyticus*를 증균했을 때, 3시간의 증균으로 real-time PCR를 이용한 검출이 가능하였다. 따라서 본 연구에서 개발한 REB-V를 식품공전에서 수산물이나 어패류에 오염된 *V. parahaemolyticus*를 검출할 때 사용하는 증균배지로 활용한다면, 기존 24시간 걸리던 증균 시간을 6시간으로 단축하여 신속하게 검출이 가능할 것으로 생각된다.

Acknowledgement

본 연구는 농림축산식품부 재원으로 농림식품기술기획평

가원의 “식중독균의 신속배양 배지 및 신속 배양기의 개발”의 연구개발비 지원에 의해 수행되었음(821056032SB010).

국문요약

본 논문은 적은 농도로 존재하는 *Vibrio parahaemolyticus*를 6시간이내에 10^6 CFU/mL까지 신속하게 배양가능한 배지인 Rapid Enrichment Broth for *V. parahaemolyticus* (REB-V)를 개발하여 *V. parahaemolyticus*를 신속하게 검출할 수 있도록 하였다. Modified Gompertz model과 RSM를 활용하여 *V. parahaemolyticus*를 신속하게 증균할 수 있도록 첨가 성분을 최적화하였다. 그 결과 2%(w/v) NaCl BPW에 D-(+)-mannose 0.3 g/L, L-valine 0.2 g/L, magnesium sulfate 0.2 g/L를 첨가하였을 때 *V. parahaemolyticus*의 증균량이 최대였다. REB-V의 배양조건을 pH 7.84와 37°C으로 최적화하였으며, 2%(w/v) NaCl BPW와 비교하여 REB-V의 증균 효율을 확인하기 위해 7시간 증균을 통해 증균량을 평가하였다. 또한 매시간마다 배양액에서 DNA를 추출하였고, 추출한 DNA로 real-time PCR을 수행하여 REB-V의 분자진단법 적용가능성을 확인하였다. 그 결과 7시간 동안 2%(w/v) NaCl BPW에서 *V. parahaemolyticus*는 5.452±0.151 Log CFU/mL까지 증균되었고, REB-V에서는 7.831±0.323 Log CFU/mL의 *V. parahaemolyticus*가 증균되었다. 최종적으로 REB-V에서 6시간 이내에 10^6 CFU/mL 이상으로 증균된 것을 확인하였고, REB-V의 증균속도가 2%(w/v) NaCl BPW보다 빠르고 같은 시간 내의 증균량이 2%(w/v) NaCl BPW보다 많았음을 통해 REB-V의 증균효율이 우수한 것으로 확인되었다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Yeon-Hee Seo https://orcid.org/0009-0004-6299-5346
So-Young Lee https://orcid.org/0000-0001-8825-0802
Unji Kim https://orcid.org/0009-0000-8157-7079
Se-Wook Oh https://orcid.org/0000-0002-8580-6032

References

1. Bisha, B., Simonson, J., Janes, M., Bauman, K., Goodridge, L. D., A review of the current status of cultural and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **47**, 885-899 (2012).
2. Igbinosa, E.O., Okoh, A.I., Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries. *Res. Microbiol*., **159**, 495-506 (2008).
3. Ward, L.N., Bej, A.K., Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes. *Appl. Environ. Microb*., **72**, 2031-2042 (2006).
4. Ren, Y., Cao, L., Zhang, X., Jiao, R., Ou, D., Wang, Y., Zhang, D., Ling, N., Ye, Y., A novel fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based paper sensor with smartphone for quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control.*, **145**, 109412 (2023).
5. Beshiru, A., Igbinosa, E.O., Surveillance of *Vibrio parahaemolyticus* pathogens recovered from ready-to-eat foods. *Sci. Rep-UK.*, **13**, 4186 (2023).
6. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), (2023, August 7). Statistic system. Retrieved from http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.do?menu_no=519&menu_grp=MENU_GRP02.
7. Seung, H.J., Kim, L.L., Park, J.E., Ryu, S.H., Jin, Y.H., Kim, O.H., Yun, E.S., Virulence genes and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from commercial marine products and aquarium waters. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **55**, 159-164 (2023).
8. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), (2023, August 16), Korean food standards codex. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_03.jsp?idx=382
9. Lee, J., Seo, Y., Yoon, Y., Improvement of the detection technique of sisteria monocytogenes through modification of the enrichment medium and DNA extraction buffer *J. Food Hyg. Saf.*, **35**, 334-340 (2020).
10. Whitaker, W.B., Richards, G.P., Boyd, E.F., Loss of sigma factor RpoN increases intestinal colonization of *Vibrio parahaemolyticus* in an adult mouse model. *Infect. Immun.*, **82**, 544-556 (2014).
11. Song, Y.J., Cho, K.J., Son, E.I., Jo, D.M., Kim, Y.M., Park, S.K., Detection of *Salmonella* spp. in seafood via desalinized DNA extraction method and preculture. *J. Food Hyg. Saf.*, **38**, 123-130 (2023).
12. Yamazaki, W., Ishibashi, M., Kawahara, R., Inoue, K., Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiol*., **8**, 163 (2008).
13. Otomo, Y., Hossain, F., Rabbi, F., Yakuwa, Y., Ahsan, C.R., Pre-enrichment of estuarine and fresh water environmental samples with sodium chloride yields in better recovery of *Vibrio parahaemolyticus*. *Adv. Microb*., **3**, 21-25 (2013).
14. Eom, T.K., Study on substrate removal and mechanism of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 under carbon- and nitrogen-limiting conditions. *J. Korean Soc. Environ. Eng*., **17**, 295-302 (1995).
15. Yang, Z.Q., Jiao, X.A., Li, P., Pan, Z.M., Huang, J.L., Gu, R.X., Fang, W.M., Chao, G.X., Predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* growth and survival on salmon meat as a function of temperature. *Food Microbiol.*, **26**, 606-614 (2009).

16. Kim, S.Y., Oh, D.H., Predictive modeling of *Bacillus cereus* on carrot treated with slightly acidic electrolyzed water and ultrasonication at various storage temperatures, *JKSFSN*., **43**, 1296-1303, (2014).
17. Kim, H.D., Han, S.J., Choi, J.I., Im, Y.K., Optimization of physical factor for amylase production by *Arthrobacter* sp. by response surface methodology. *Korean Chem. Eng. Res.*, **54**, 140-144 (2016).
18. Williams, S.L., Jensen, R.V., Kuhn, D.D., Stevens, A.M., Analyzing the metabolic capabilities of a *Vibrio parahaemolyticus* strain that causes early mortality syndrome in shrimp. *Aquaculture*., **476**, 44-48 (2017).
19. Regmi, A., Boyd, E.F., Carbohydrate metabolic systems present on genomic islands are lost and gained in *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiol*., **19**, 1-20 (2019).
20. Ju, C.H., Yeung, P.M., Oesterling, J., Seigerman, D.A., Boor, K.J., *Vibrio parahaemolyticus* growth under low-iron conditions and survival under high-magnesium conditions. *J. Food Prot*., **69**, 1040-1045 (2006).
21. Tiruvayipati, S., Bhassu, S., Host, pathogen and the environment: the case of *Macrobrachium rosenbergii*, *Vibrio parahaemolyticus* and magnesium. *GUT Pathog*., **8**, 1-8 (2016).
22. Soto-Rodriguez, S.A., Lozano-Olvera, R., Palacios-Gonzalez, D.A., Bolan-Mejia, C., Rendon-Aguilar, K.G., Characterization and growth conditions of *Vibrio parahaemolyticus* strains with different virulence degrees that cause acute hepatopancreatic necrosis disease in *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc*., **50**, 1002-1015 (2019).