바이오시스템공학 (*J. of Biosystems Eng.*)
Vol. 30, No. 2, pp. 121~126 (2005)

전자코를 이용한 살모넬라 식중독균 판정

김기영 이민욱 이강진 최규홍 노광모 강석원 장영창

Identification of Salmonella Pathogen Using Electronic Nose

G. Kim M. W. Lee K. J. Lee C. H. Choi K. M. Noh S. Kang Y. C. Chang

Abstract

In this study, a commercial electronic nose system was used to detect contamination of Salmonella bacteria. Odors from growth media contaminated with *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, or *Escherichia coli* were collected and analyzed to evaluate a possibility of rapid detection of pathogen. Odor chromatograph showed that *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, and *E. coli* had 7, 6, and 9 main peaks, respectively. Retention time and intensity of the peaks were distinct for different bacteria species. Principal component analysis (PCA) were also performed to clarify odor differences. Analysis results showed that the odors for uncontaminated growth medium were differently grouped from the odors of contaminated one. The odor from the bacteria growth identified with two principal components, PC1 and PC2. In PCA figures, odor groups were moved from left to right of PC1 with elapse of the bacteria growth time. The electronic nose system could detect odors of *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *E. coli* when their concentration were 1.85×10^6 cfu/g, 2.25×10^6 cfu/g, and 1.8×10^5 cfu/g, respectively.

Keywords : Electronic nose, Salmonella detection, Pathogen odor

1. 서 론

국민소득의 증대와 함께 소비자의 고품질 농축산물에 대한 수요와 관심이 날로 증가하고 있다. 이에 따라 안전하며 고품질인 농축산물을 소비자에게 공급하기 위하여 고품질 농축산물의 생산, 신선도 유지를 위한 유통구조의 개혁, 품질 및 안전성 평가기술개발을 위한 노력이 보다 더 요구되고 있다. 소비자가 믿고 구매하기 위해서는 농축산물에 대한 품질보증이 필수적이며 이를 위해서는 신속하고 정확한 품질 및 유해물질의 판정기술 개발이 필요하다.

최근 식품산업분야에서 많은 관심을 끌고 있는 전자코는 여러 개의 가스센서를 배열하여 냄새를 구성하는 여러 가지 화학물질을 짧은 시간 내에 분석할 수 있고 반복성이 뛰어나, 농축산물의 객관적이며 신속한 품질판정을 수행할 수 있는 기술이다. Blixt와 Borch(1999)는 전자코를 이용하여 진공 포장된 쇠고기의 오염을 조사하였는데, 전자코를 이용하여 측정한 오염정도와 전문가들에 의한 오염정도 판별결과 사이에 큰 상관이 있었다. 또한 McEntegart 등(2000)은 식중독을 일으키는 여러 가지 병원균을 인위적으로 배양하고 이로부터 발생되는 냄새를 전자코로 분석하여 병원균의 종류를 판별할 수 있었다. 식품오염을 판정하기 위하여 병원균을 배양하고 군락을 세는 기존의 방법은 3일 이상 시간이 소요되었으나 전자코를 이용하여 병원균을 측정하는데 걸리는 시간은 수 시간에 불과하였다. 식품을 부패시키는 곰팡이에 의해 발생하는 독소와 휘발성 화

This study was conducted by the international research fund supported by Rural Development Administration (RDA). The article was submitted for publication in January 2005, reviewed and approved for publication by the editorial board of KSAM in April 2005. The authors are Giyoung Kim, KSAM Member, junior researcher, Min Wook Lee, KSAM Member, graduate student, Konkuk University, Kang Jin Lee, KSAM Member, senior researcher, Kyu Hong Choi, KSAM Member, senior researcher, Sukwon Kang, KSAM Member, junior researcher, National Institute of Agricultural Engineering, RDA, Kwang Mo Noh, KSAM Member, Professor, Youngchang Chang, KSAM Member, Professor, Konkuk University. The corresponding author is Giyoung Kim, junior researcher, National Institute of Agricultural Engineering, RDA, Suwon, 441-100, Republic of Korea; E-mail : <giyoung@rda.go.kr>

학물질을 Schnurer 등(1999)이 전자코를 이용하여 분석하였는데 이를 이용하여 곡물의 품질을 저하시키는 곰팡이와 독소의 발생여부를 판별할 수 있었다. Arnold와 Senter(1998)는 식품의 안전성에 영향을 미치는 박테리아의 냄새를 GC/MS(Gas Chromatography/Mass Spectrometry)로 분석하여 돈육가공공정에서 발생할 수 있는 오염 및 오염원의 구분 가능성을 제시하였으며, Keshi 등(1998)은 배양한 곰팡이들로부터 발생하는 냄새를 이용하여 6종의 곰팡이를 빠른 시간 내에 구분할 수 있었다.

전자코를 이용한 연구는 식품가공분야를 중심으로 시작단계에 있으나 농축산물을 대상으로 한 연구는 아직 미흡하여 이를 대상으로 한 연구가 절실히 요구되고 있다. 국내 식중독 발생현황 통계를 보면 살모넬라균, 자염비브리오로, 포도상구균 등이 우리나라 식중독 발생건수의 70% 이상으로 식중독의 발생의 주원인이 되고 있다(식약청, 2003).

이 연구에서는 전자코를 이용하여 쇠고기 안전성의 대표적인 위해요소인 살모넬라균 냄새 특성 분석과 오염여부를 신속히 판별할 수 있는 기술을 개발하기 위하여 수행되었다.

2. 재료 및 방법

가. 전자코 시스템

냄새 측정을 위해 실험에 사용한 장비는 SAW(surface acoustic wave) 센서를 이용한 전자코 시스템(zNose 7100, Electronic Sensor Technology, USA)이다. 이 시스템은 GC 기능과 SAW 센서를 이용한 것으로써 센서에 도달하는 화학물질의 종류와 양을 센서의 진동수 변화를 이용하여 측정한다. SAW 센서의 수정진동자에는 소형 펠티어(Peltier) 열펌프가 달려 있어 수정진동자의 온도를 정확하게 조절할 수 있다. 수정진동자 위의 마이크로 노즐로부터 유입된 냄새성분은 온도가 낮은 수정진동자의 표면에 흡착되어 진동수의 변화를 유발한다. 진동수 변화의 측정이 끝나면 짧은 순간에 다시 수정진동자의 온도를 상승시켜 표면의 화학물질을 탈착한 후 다시 온도를 내려 다음 화학물질을 흡착하고 측정하는 과정을 설정된 측정시간 동안 반복한다. 이와 같은 방법에 의하여 10초 정도의 짧은 시간에 GC에서와 같은 화학물질에 대한 크로마토그램을 얻을 수 있다.

GC/SAW 전자코의 냄새측정은 SAW 센서의 온도, 컬럼온도, 밸브온도, 흡입구온도와 측정시간, 컬럼온도 상승율에 따라서 달라지는데, 이 연구에서는 전자코 제작회사의 휘발성물질 권장 분석 조건에 따라 센서온도, 컬럼온도, 밸브온도, 흡입구온도를 각각 0, 40, 110, 130℃로 설정하였고, 시료 냄새의 흡입시간은 10초, 컬럼온도 상승율은 40-100℃까지 3℃/s로 설정하였다.

나. 세균시료

전자코를 이용하여 살모넬라균의 검출 가능성을 구명하기 위해서 다른 미생물에 오염되지 않은 순수한 살모넬라균 2개의 경우와 식중독균 중 발생 비중이 높은 대장균 1개 등 3개의 경우에 대해서 냄새를 분석하였다. 실험에서 사용한 식중독균들은 ATCC(American Type Culture Collection, USA)로부터 *Salmonella. typhimurium*(ATCC No. 13076)과 *Salmonella Entreritidis*(ATCC No. 14028), 그리고 대장균 *Escherichia coli*(ATCC No. 11303)를 분양 받아 증식한 후 실험에 사용하였다. ATCC로부터 분양 받은 동결건조 상태인 비활성 세균을 냄새 측정 실험에 사용하기 위하여 40 ㎖ 바이알(vial) 4개에 물 25 ㎖와 Selenite broth(MERCK, Germany) 0.58 g의 배양용액을 담은 다음 살모넬라균 *S. typhimurium*(ATCC No. 13076) 1 ㎖를 바이알에 넣어 Dri-bath에서 37℃로 24시간 동안 배양하였고, 동일한 방법으로 동일한 배지에 *S. enteritidis*(ATCC No. 14028)를 배양하였다.

대장균의 배양은 40 ㎖ 바이알에 물 25 ㎖와 배지인 mEC-broth(MERCK, Germany) 0.92 g을 넣고 대장균 *E. coli*(ATCC No. 11303) 1 ㎖를 각각의 바이알에 넣은 다음 Dri-bath(DB 17615, Barnstead International, USA)에서 37℃로 24시간동안 배양하였다.

다. 냄새 측정 및 세균 개체군수 측정

냄새 측정은 휘발성 화합물의 일정한 농도 유지를 위해 일정한 온도를 유지한 상태에서 일정 시간 동안 샘플을 가열하여 헤드스페이스(headspace)를 평형 시킨 후 분석을 수행하였다. 세균 냄새는 40 ㎖ 바이알에 10 ㎖의 Selenite broth 배양용액을 담아 세균이 자랄 수 있는 환경 조건을 만들어 준 다음 측정하였으며, 배지와 세균의 냄새를 구분하기 위하여 먼저 배지만의 냄새를 측정하였다. 이어서 각각의 바이알에 활성화된 *S. typhimurium, S. enteritidis, E. coli* 균 0.1 ㎖ 씩을 넣고 37℃로 설정된 Dri-bath에서 시료의 온도를 일정하게 유지시켰고, 냄새 측정 시에만 꺼내어 전자코의 냄새 흡입구에 연결하였다. 냄새측정은 세균별로 6개의 시료에 대하여 최초 30분부터 시작하여 이후 2시간 간격으로 6.5시간 동안 냄새를 측정하였다.

그림 1은 실험에 사용한 전자코 시스템과 시료의 온도 유지를 위한 온도조절 블록을 나타내었다.

세균수는 표준평판법을 사용하여 세균의 개체균수를 측정

(a) (b)

Fig. 1 Electronic nose system (a) and Temperature Controller (b).

하였다. 즉, 인산완충식염수(Phosphate Buffered Saline; PBS) 9 ㎖가 담긴 바이알에 증균 1 ㎖을 접종 후 흔들어 희석시킨 세균을 동일한 방법으로 여러 단계 배율에 따라 희석액을 만든 후 Agar plate에 1㎖ 접종하여 인큐베이터(Dx 7, HanYoung)에서 37℃로 48시간 배양한 다음 세균수를 육안으로 계수하였다. 살모넬라는 Salmonella Shigella Agar((주) 코메드) plate를 사용하였고, 대장균의 경우는 Sorbitol Mac Agar((주) 코메드) plate에서 각각 3개의 샘플을 채취하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 살모넬라균 및 대장균의 냄새 크로마토그래프

배지, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*와 *E. coli*의 냄새를 전자코 시스템으로 측정한 가스크로마토그래프를 그림 2, 3, 4, 5에 각각 나타내었다. 그림에서 *x*축은 GC의 Retention Time(RT)으로서 냄새를 구성하는 화합물의 종류에 따라 변화하며, *y*축은 SAW 센서의 주파수를 미분한 값으로 화합물의 양을 나타낸다. *S. typhimurium*의 냄새측정 결과 7개의 주

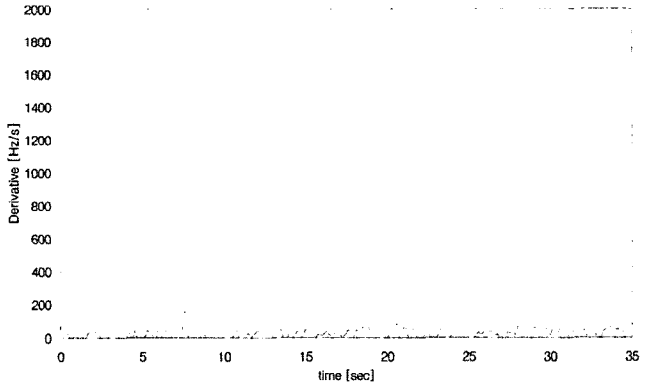

Fig. 2 Chromatogram of growth medium odor.

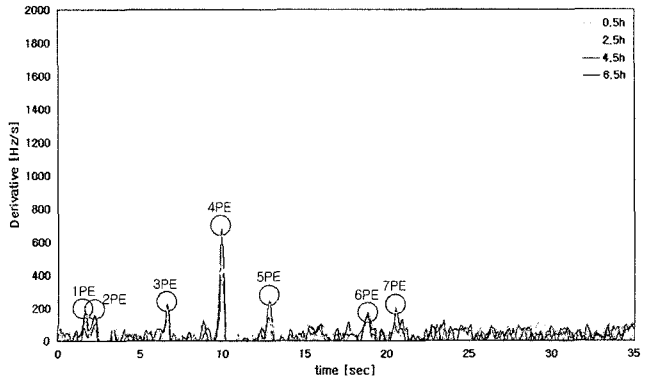

Fig. 3 Chromatogram of *S. typhimurium* odor.

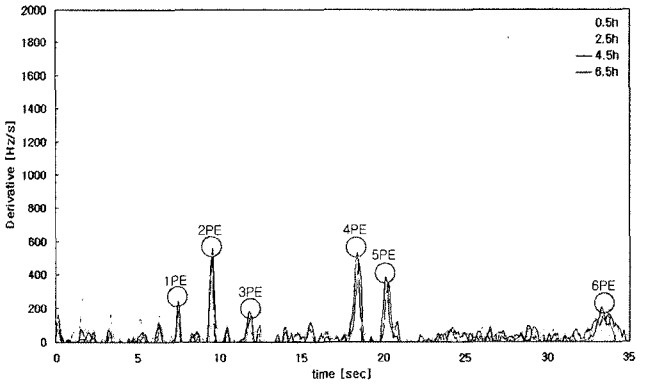

Fig. 4 Chromatogram of *S. enteritidis* odor.

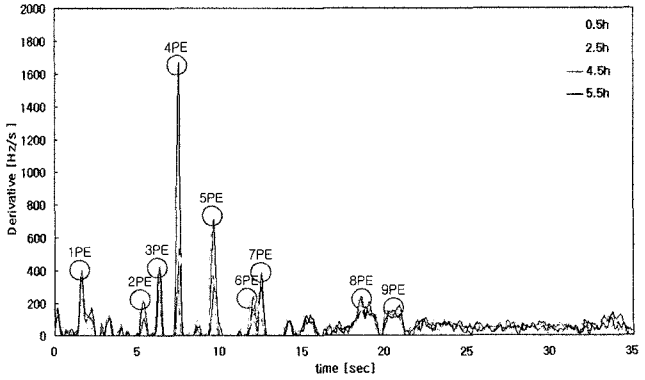

Fig. 5 Chromatogram of *E. coli* odor.

요 피크가 분석 프로그램에 의해 검출되었으며, 9.85~9.95초 사이의 피크가 가장 큰 값을 나타내었다. *S. enteritidis*의 냄새에서는 6개의 주요 피크가 검출되었고, 9.55~9.6초 사이의 피크가 가장 큰 값을 나타내었으며 이 피크에서 검출되는 화합물이 *S. enteritidis*의 증식으로 인하여 가장 많이 발생함을 알 수 있었다. 또한 E. coli의 냄새에서는 9개의 주요 피크가 검출되었고, 그 중에서 7.40~7.50초에서 검출된 피크가 가장 큰 값을 나타내었다. 전자코 시스템으로 측정된 *S. typhimurium*, *S. enteritidis*와 *E. coli*의 주요 피크 RT와 주파수 미분값의 최대·최소값을 표 1, 2, 3에 요약 정리하였다.

그림 2, 3, 4를 보면 *S. typhimurium*, *S. enteritidis*와 *E. coli*의 피크모양과 나타나는 RT가 모두 다름을 알 수 있는데, 이러한 피크의 형태의 차이는 세균이 성장(세포분열)하면서 동반하는 대사 작용으로 인해 배출되는 물질들이 서로 다르기 때문에 나타나는 특징으로, 이러한 특징들로 인해 *S. typhimurium*, *S. enteritidis*와 *E. coli*의 냄새를 구분할 수 있었다.

Table 1 Characteristics of main peaks of *S. typhimurium* odor.

Peak	Retention Time [sec]	Derivative [Hz/s]	
		Min	Max
1 PF	1.60 ~ 1.65	81.9	185.4
2 PF	2.15 ~ 2.30	85.1	160.2
3 PF	6.60	131.7	225.9
4 PF	9.85 ~ 9.95	356.9	679.5
5 PF	12.75 ~ 12.95	113.4	247.0
6 PF	18.75 ~ 18.85	151.4	172.1
7 PF	20.50 ~ 20.85	85.4	205.0

Table 2 Characteristics of main peaks of *S. enteritidis* odor.

Peak	Retention Time [sec]	Derivative [Hz/s]	
		Min	Max
1 PF	7.40 ~ 7.50	103.5	242.4
2 PF	9.50 ~ 9.60	200.7	557.5
3 PF	11.80 ~ 12.05	58.5	181.5
4 PF	18.40 ~ 18.50	111.5	529.4
5 PF	20.10 ~ 20.25	122.4	385.0
6 PF	33.30 ~ 33.90	101.3	243.6

Table 3 Characteristics of main peaks of *E. coli* odor.

Peak	Retention Time [sec]	Derivative [Hz/s]	
		Min	Max
1 PF	1.6	235.9	402.2
2 PF	5.25 ~ 5.40	105.5	220.1
3 PF	6.25 ~ 6.35	241.1	423.0
4 PF	7.40 ~ 7.50	279.1	1669.4
5 PF	9.45 ~ 9.60	293.7	712.1
6 PF	11.85 ~ 12.00	164.0	241.5
7 PF	12.40 ~ 12.50	152.7	386.7
8 PF	18.40 ~ 18.55	196.3	219.9
9 PF	20.55 ~ 20.85	135.1	198.5

나. 주성분 분석

전자코를 이용하여 측정한 냄새 특성의 보다 명확한 분석을 위하여 상용 다변량 분석 소프트웨어(Unscrambler 7.6, CAMO, USA)를 사용하여 주성분 분석을 수행하였다. 그림 6은 전자코에 의해 측정된 *S. typhimurium*, *S. enteritidis* 및 *E. coli*의 냄새 특성에 대한 데이터를 주성분 분석한 결과로써 주성분 값이 가장 큰 주성분 1(PC1)과 주성분 2(PC2)에 대하여 살모넬라균과 대장균 냄새의 분포를 나타내고 있다.

측정시간 전체에 걸친 모든 피크를 이용하여 주성분 분석을 실시하여 그림 6에 나타난 주성분 결과들을 보면 *S. typhimurium*, *S. enteritidis*와 *E. coli*를 각각 구별하기가 쉽지 않음을 알 수 있다. *S. typhimurium*, *S. enteritidis*와 *E. coli*의 좀 더 명확한 판별을 위하여 주성분 분석의 전처리 과정으로

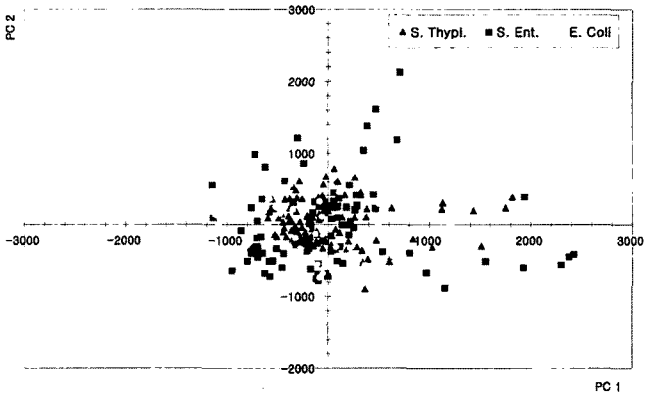

Fig. 6 PCA of S. typhimurium, *S. enteritidis* and *E. coli*.

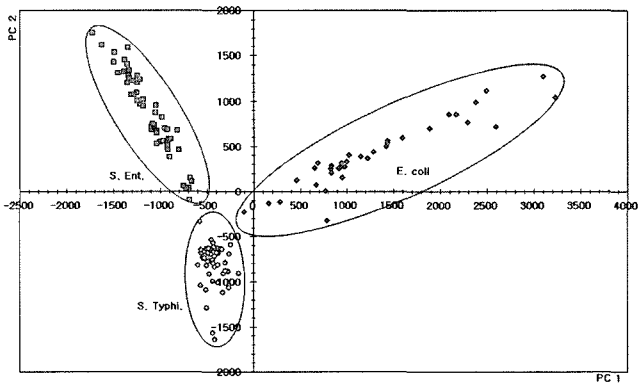

Fig. 7 PCA with main-peaks of *S. typhimurium*, *S. enteritidis* and *E. coli*.

그림 3, 4, 5와 표 1, 2, 3에서 보인 주요 피크만으로 주성분 분석을 다시 수행 하였으며 그 결과를 그림 7에 나타내었다.

그림 7에서 보듯이 주요 피크만을 이용하여 분석했을 때 살모넬라균과 대장균의 차이가 명확하게 구분되었으며, 기여율은 PC1 43%, PC2 25%를 나타내었다.

*S. typhimurium*은 PC1과 PC2 모두 음(-)의 값 영역에 위치하였고, *S. enteritidis*는 PC1은 음(-)의, PC2는 양(+)의 영역에 분포하였다. 또한, *E. coli*는 대부분 PC1과 PC2 모두 양(+)의 영역에서 나타났다.

그림 8은 세균 냄새를 PCA 분석한 loading plot으로, PC1, PC2 모두 큰 영향을 미치는(loading 값이 1에 가까운) 변수(RT)가 없이 각각의 RT값이 PC1과 PC2의 값을 결정하는데 기여하는 것으로 나타났다.

그림 9, 10, 11은 *S. typhimurium*, *S. enteritidis*와 *E. coli*의 증식하는 시간변화에 따른 식중독균의 특성 냄새를 주성분분석을 각각 수행한 것이다. 그림 9, 10, 11을 보면 배지(broth)와 식중독균의 시간에 따른 변화에 따라 주성분의 영역이 다르게 나타났는데, 순수 배지의 경우에는 가장 좌측에서 나타나 세균에 오염된 배지와 확연히 구분할 수 있었다. 세균 접종 후 0.5시간이 지난 경우는 순수배지와 차이가 있긴 하지만 세균의 증식이 많이 진행되지 않아 냄새차이가 크지 않았다. 또한 시간 경과에 따라 주성분 영역의 우측으로 데이터가 이동하였으며 그림 7에서 *S. typhimurium*, *S. enteritidis*와 *E. coli*의 각각의 피크가 가장 크게 나타난 6.5시간, 4.5시간, 4.5시간에서 데이터가 그림 9, 10, 11에서 가장 우측에 나타나 오염여부를 판별할 수 있었다.

또한, 살모넬라균과 대장균의 주성분 패턴을 서로 비교하였을 때 각 시간별로 주성분 패턴이 다르게 나타나, 전자코를 이용한 냄새분석을 통하여 살모넬라균의 오염 여부 및 정도를 예측하는 것이 가능하다고 판단된다.

S. typhimurium, *S. enteritidis*와 *E. coli* 각각의 균에 대하여 시간에 따른 냄새 특성의 변화를 그림 12에 나타내었다. 그림 12는 세균별로 피크값이 가장 큰 RT를 선택하여 전자코의 냄새 변화량을 측정 시간별로 나타낸 것이다.

살모넬라의 경우 값의 변화가 크지는 않지만 *S. typhimurium*은 6.5시간까지 꾸준히 증가하였으며, *S. enteritidis*는 처음 0.5시간에서 2.5시간까지 값이 크게 증가하였고, 4.5시간 이

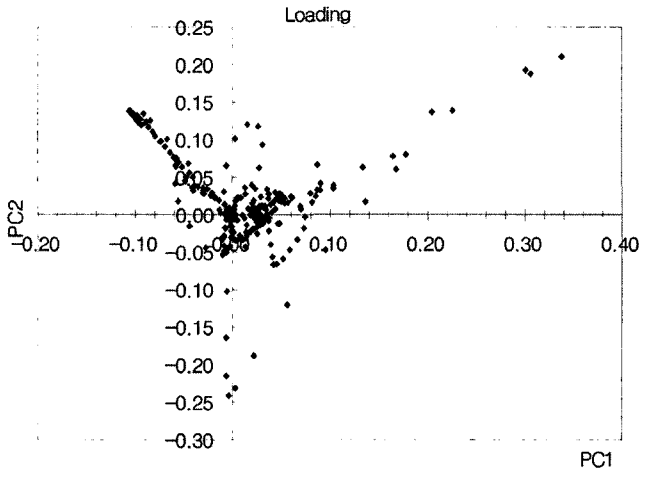

Fig. 8 PCA loading plot for main-peaks of *S. typhimurium*, *S. enteritidis* and *E. coli*.

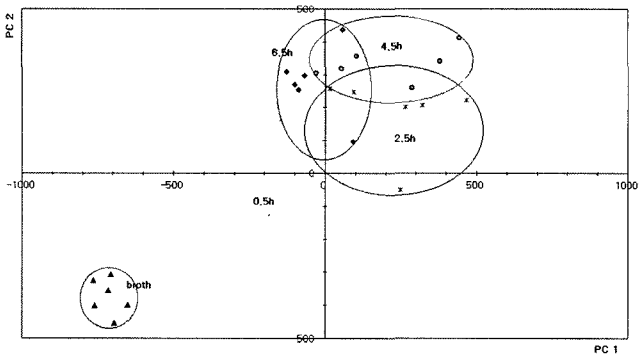

Fig. 10 *S. enteritidis* of principle component analysis by change with time.

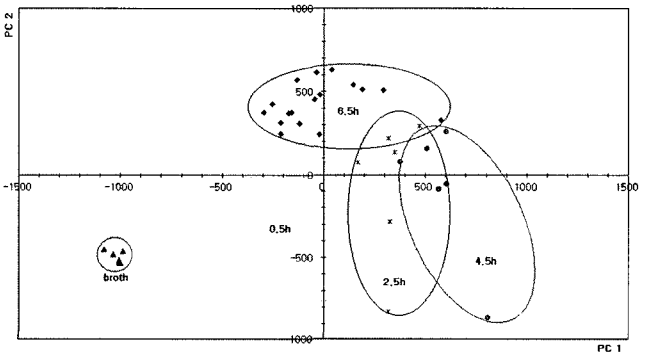

Fig. 9 *S. typhimurium* of principle component analysis by change with time.

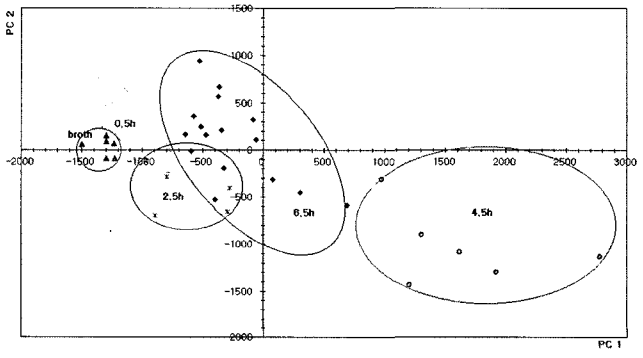

Fig. 11 *E. coli* of principle component analysis by change with time.

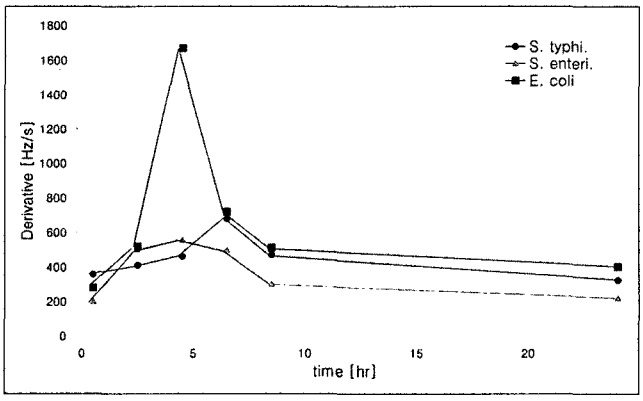

Fig. 12 Odor changes with growth time.

후에는 감소하는 추세를 보였다. 또한 *E. coli*는 4.5시간을 기준으로 두드러지게 변화함을 알 수 있었다. 세균 번식에 따른 이러한 냄새 특성 변화의 추세는 세균 번식의 특성을 연구한 다른 연구자들의 실험결과와 유사한 양상을 나타내는 것으로서 그 이유가 아직 명확하게 밝혀지지는 않았지만, 세균 번식의 초기에는 화학물질의 발생이 급격히 증가하다가 번식이 진행되면서 번식 환경이 열악해져 화학물질 발생량이 감소하는 것으로 추정되고 있다(Tahir와 Alocilja, 2003).

다. 개체균수

식품의 세균 오염상황을 알기 위하여 총균수나 일반세균수가 측정된다. 이 실험에서는 broth에서 1차 증균된 세균의 일반세균수를 표준평판법을 이용하여 측정하였으며, 그 값들을 3개 샘플의 평균값으로 나타내었다. 측정결과는 *S. typhimurium*, 1.85×10^6 cfu/g, *S. enteritidis*, 2.25×10^6 cfu/g, *E. coli*, 1.8×10^5 cfu/g로 각각 나타났으며, 이러한 값들은 이 실험에서 전자코를 이용하여 측정한 특성냄새에 대한 세균의 검출 농도를 나타내는 것이다.

4. 요약 및 결론

본 연구에서는 식품의 안전성을 신속하고 객관적으로 판정할 수 있는 기술을 개발하기 위하여 살모넬라균 및 대장균의 성장에 따라 발생하는 냄새를 SAW 센서를 바탕으로 한 전자코를 이용하여 조사 분석하였다. 발생 빈도가 가장 큰 살모넬라 식중독균 두 가지 종과 일반적인 대장균에 대한 냄새를 측정 및 분석한 결과 순수 배지와 세균에 오염된 배지의 냄새를 구별할 수 있었고, 이를 통해 살모넬라 식중독균과 대장균의 구별이 가능하였다. 또한 세균의 성장 시간에 따라서도 냄새의 차이가 있어 *S. typhimurium*, *S. enteritidis*와 *E. coli*의 화학물질 농도가 가장 높은 신호 피크가 각각 6.5시간, 4.5시간, 4.5시간에서 나타났으며, 주성분분석 결과 세균별로 시간에 따라 데이터 군락이 분리되었다.

참고문헌

1. Arnold, J. W. and S. D. Senter. 1998. Use of digital aroma technology and SPME GC-MS to compare volatile compounds produced by bacteria isolated from processed poultry. Journal of the Science of Food and Agriculture. 78(3):343-348.
2. Blixt, Y. and E. Borch. 1999. Using an electronic nose for determining the spoilage of vacuum-packaged beef. International Journal of Food Microbiology. 46:123-134.
3. Keshri, G., N. Magan and P. Voysey. 1998. Use of an electronic nose for early detection and differentiation between spoilage fungi, Letters in Applied Microbiology. 27(5):261-264.
4. McEntegart, C. M., W. R. Penrose, S. Strathmann and J. R. Stetter. 2000. Detection and discrimination of coliform bacteria with gas sensor arrays. Sensors and Actuators B. 70:170-176.
5. Schnurer, J., J. Olsson and T. Borjesson. 1999. Fungal volatiles as indicators of food and feeds spoilage. Fungal Genetics and Biology. 27:209-217.
6. Tahir, Z. M. and E. C. Alocilja. 2003. A conductometric biosensor for biosecurity. Biosensors and Bioelectronics. 18: 813-819.
7. 식품관리과. 2003. 식중독 발생현황 통계. 식품의약품안정청.