

PCR을 이용한 우유 및 유제품 내 식중독균 검출

PCR-based pathogen detection for dairy products

채 창훈(Changhoon Chai)

강원대학교 동물생명과학대학 동물응용과학부

Division of Applied Animal Science, Kangwon National University

서론

우유 및 유제품의 소비가 최근 5년간 꾸준히 증가하여, 2015년 연유, 버터, 치즈 및 발효유의 연간 소비량이 2010년 대비 평균 1.22배에 다다르고 있다(국가통계포털). 우유 및 유제품은 그 자체로 섭취되기도 하나, 다른 식품의 주요 성분으로 적용되기 때문에 유제품의 안전성은 식품업계 전반의 위생에 영향을 미친다. 따라서 식품의약품안전처는 우유 및 유제품의 안전성을 위해 화학적, 물리적, 생물학적 위해 요소에 대한 엄격한 기준을 제시하고 있다(한국 식품의약품 안전처, 2015). 특히 식중독 발생 시의 파급효과에 따라 식중독균에 대한 정부, 산업계, 학계의 관심이 높은 실정이다.

축산물의 가공기준 및 성분규격과 식품공전 내 식품일반의 기준 및 규격에 의하면 우유 및 유제품 내 살모넬라, 황색포도상구균, 장염비브리오균, 리스테리아 모노사이토제네스, 장출혈성 대장균, 캄필로박터 제주니/콜리, 여시니아 엔테로콜리리카 등의 식중독균 불검출 기준으로 규정되어 있으며, 영·유아 섭취를 목적으로 하는 조제유의 경우 위의 기준과 함께 엔테로박터 사카자기의 불검출 기준이 추가적으로 포함되어 있다(한국 식품의약품 안전처, 2015). 우유 및 유제품을 포함한 식품 내 식중독균 존재여부는 전통적으로 배지배양법에 의해 수행되어 왔다. 배지배양법을 기초로 한 식중독균 검출법은 체계적으로 정리되어 있으며, 현재 식품공전 및 축산물의 가공기준 내 미생물 시험법의 기준방법으로 사용되고 있다. 배지배양법을 이용한 식중독균 검출법은 고도로 훈련된 인력이 필요함은 물론 2~3일 이상의 분석시간을 요구한다. 따라서 배지배양분석법 및 원료저장에 관련된 비용은 식품가공업체의 경제적 부담으로 인식된다(Forsythe, 2010). 더욱이 식중독균이 식품에 극소량 존재할 경우 식중독균이 배양과정 중 원활히 증균되지 않을 수 있고, 식중독균의 존재에도 불구하고 위음성(false-negative)결과를 나타낼 수 있다(Yeni, Acar, Polat, Soyer, & Alpas, 2014). 따라서 경제적이고 신속하게 식중독균을 검출할 수 있는 기법 개발에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 최근까지 면역학적 기법 또는 분자생물학적 기법을 기반으로 하는 식중독균 검출기법에서 괄목할 만한 발전이 있었으며(Law, Ab Mutalib, Chan, & Lee, 2015), 그 중 분석에 대한 신속도, 정확도, 재현성, 자동화 가능성 등을 고려할 때 분자생물학적 기법을 기반으로 하는 식중독균 검출기법의 발전 가능성이 높은 것으로 판단된다.

다양한 분자생물학적 기법 중 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction: PCR)은 생명과학분야를 비롯하여 식품안전분야의 발전에 크게 이바지 한 바 있다. PCR은 목표하는 DNA의 특정 서열을 증폭하는 기법으로 현재 질병, 돌연변이, 식중독균 등의 진단에 널리 적용되고 있다. 더욱이 배지배양법에 의한 식중독균 검출이 2~3일 이상의 배양 시간을 요구하는 반면,

PCR 기법을 식중독균 검출에 적용할 경우 최소 2~3시간 이내에 분석이 완료될 수 있음은 물론 최근 식품 내 식중독균 DNA 추출과 PCR 분석에 대한 자동화 기기 개발에 따라 경제적이고 효율적인 식품안전관리 체계를 구축할 수 있다 (Mortari & Lorenzelli, 2014). 본 기고문에서는 PCR 기법에 대한 과정 및 PCR에 포함되는 요소들의 특성에 대하여 기술하고 설명하고자 하며, 이를 통해 우유 및 유제품 생산현장에서 PCR을 이용한 품질관리 기법에 대한 관심 유발과 함께 PCR 기반의 식중독균 검출기법의 효율적 적용을 도모하고자 한다.

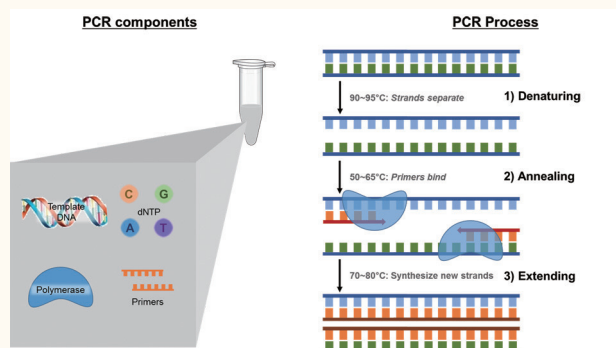
본론

PCR의 구성 요소 및 DNA 증폭

중합효소연쇄반응(PCR)은 DNA 중합효소(polymerase)의 연쇄반응을 이용하여 DNA 증폭하고 복제하는 분자생물학적 기법으로써, PCR 반응을 유기하는 DNA 중합효소(*Taq* polymerase), 증폭하고자 하는 주형 DNA (template DNA), DNA 증폭 개시 지점을 제공하는 시발체(primers), DNA 증폭·복제에 사용되는 deoxynucleotides (dNTP), *Taq* polymerase의 조효소로 작용하는 $MgCl_2$ 간의 상호작용에 의해 목표하는 DNA를 증폭한다(그림 1).

PCR은 template DNA에서 증폭을 목표하는 부분 중 증폭 시작 지점의 DNA 서열과 상보적 서열을 나타내는 primer간 부착과 *Taq* polymerase의 primer 부착부분 인식에 의해 개시된다. Template DNA는 두 개의 DNA 단일가닥이 수소결합에 의해 안정화된 이중가닥으로 존재한다. 따라서 상온 조건에서 primer가 template DNA 상의 증폭개시지점에 부착할 수 없으나 일정 수준 이상으로 온도를 상승시킬 경우 이중가닥의 DNA 안정화에 기여하는 수소결합이 깨지고 두 개의 DNA 단일가닥으로 분리된다. DNA 이중가닥은 약 80°C 이상에서 분리되기 시작하며, 약 90~96°C에서 완전히 분리되는 것으로 알려져 있다(Innis & Gelfand, 1999). 특히 열에 의한 DNA 분리반응은 가역반응으로써 온도를 낮출 경우 두 개의 DNA 단일가닥이 수소결합에 의해 이중

그림 1. PCR 구성 요소 및 PCR에 의한 DNA 증폭과정



가닥으로 결합한다. 따라서 template DNA와 primers를 혼합한 후 온도를 90~96°C로 상승시킨 후 온도를 하강 시킬 경우 primers를 DNA 단일가닥의 증폭개시지점 부착을 유기할 수 있다. 다만 온도를 90°C 또는 그 이상으로 상승시키기 때문에 열에 안정한 polymerase 사용이 필수적이다. 온천에서 동정한 *Thermus aquaticus*로부터 열에 안정한 polymerase의 발견과(Chien, Edgar, & Trela, 1976) gene engineering을 이용한 *Taq* polymerase 연속생산(Lawyer et al., 1989)은 PCR에 의한 실험실 내 DNA 증폭을 가능하게 한 사건으로 인식된다. *Taq* polymerase는 primer가 부착된 증폭개시지점을 인식한 후 DNA 서열에 상보적인 서열의 DNA를 합성함으로써 증폭·복제한다. PCR에 의한 template DNA 증폭·복제 과정은 1) DNA 이중가닥을 단일가닥으로 분리하는 DNA denaturation step (90~96°C for 15 sec-9 min), 2) primers의 template DNA에 부착을 유도하는 annealing step (50~65°C for 15-60 sec), 3) *Taq* polymerase에 의해 template DNA 상 특정 서열을 증폭하는 extension step (70~80°C for 30-60 sec), 4) 잔여 DNA 단일가닥 상 PCR 반응을 마지막으로 유도하는 final elongation step (70~74°C for 5-15 min)으로 구성되며, 1)~3) steps를 20~40번 반복하여 DNA 증폭을 유도한다(그림 1). PCR에 의한 DNA 증폭·복제는 *Taq* polymerase의 종류, primers와 증폭개시지점간 결합 특이성, $MgCl_2$ 농도, PCR step의 온도·시간 조건 및 분석 시료 내 PCR inhibitors 존재 여부에 의해 큰 영향을 받는다. 다음은 효율적이며 특이적 PCR 반응을 유기하기 위한 각 요소의 조건을 설명하고자 한다.

Taq polymerase의 선정

다양한 종류의 Taq polymerase가 현재 생산되어 판매되고 있다. 각 Taq polymerase는 열안정성, 증폭속도, 증폭신뢰성, 최장증폭길이에 다른 특성을 나타내며, PCR 목적에 따라 다른 Taq polymerase 선택·사용이 요구된다. 그러나 우유 및 유제품 내 식중독균 검출에 적용되는 PCR 기법의 경우 일반적으로 1 kbp 이하의 짧은 DNA 서열의 신속한 증폭을 목적으로 하는 바 증폭신뢰성 및 최장증폭길이 보다 열안정성 및 증폭속도 등을 고려하여 Taq polymerase를 선택하는 것이 바람직하다. 우유 및 유제품을 포함하는 식품 내 식중독균 검출에 주로 적용되는 Taq polymerase는 일반적인 Taq polymerase와 DNA denaturation 과정 중 활성화되는 hot-start Taq polymerase로 구분될 수 있다. Taq polymerase는 일반적으로 72~74°C에서 높은 활력을 나타내지만 상온에서 효소활성을 나타내며, 상온의 조건에서 PCR 시료를 장시간 처리할 경우 Taq polymerase의 비특이적 효소반응에 따른 비특이적 DNA 증폭산물이 생산된다. PCR 반응 이전 비특이적 DNA 증폭산물 생산은 목표하는 template DNA 증폭을 방해함에 따라 지양되어야 한다. Hot-start Taq polymerase은 화학물질 또는 항체를 Taq polymerase에 부착하여 상온에서 효소활성을 억제한 Taq polymerase으로써, 약 94~95°C의 DNA denaturation 과정 중 부착된 화학물질 및 항체가 변성되며, 이후 Taq polymerase이 활성화된다. Hot-start Taq polymerase는 상온에서 다량의 시료를 상온에서 처리하여 PCR 분석에 적용할 경우 적합하다. 다만 일반적인 Taq polymerase에 비해 경제성이 떨어지는 단점을 가지고 있다.

식중독균 DNA의 PCR 증폭에 사용되는 Taq polymerase는 25 µL PCR 용액에 1.25 U 수준으로 첨가되어 PCR 증폭에 적용되는 것이 일반적이나, Taq polymerase 농도를 1.25 U/25 µL 수준 이상으로 증가시켰을 경우 증폭 효율이 향상될 수 있다. 그러나 Taq polymerase 농도 증가는 분석 비용 상승을 초래하기 때문에 목표 DNA를 원활하게 증폭할 수 있는 농도인 1.25 U/25 µL 수준의 첨가가 일반적이다. 극 소량의 DNA 증폭을 목적으로 할 경우 Taq poly-

merase 농도 증가를 통해 PCR 증폭 효율 향상을 꾀할 수도 있다.

Primers 설계 및 PCR 적용

PCR을 이용한 식중독균 검출을 위한 PCR primers는 1) 종 특이적 gene을 선택하고 2) 증폭·복제를 목적으로 하는 gene 서열의 5' 시작 부분과 상보적인 forward primer 서열 및 3' 끝 부분과 동일서열의 reverse primer 서열을 결정에 의해 설계된다. 특히 primers와 증폭개시지점간의 특이적 부착성이 PCR 민감도를 결정함에 따라 주의 깊은 설계가 요구된다. 15~30 bp의 primers 설계가 적당하며, 일반적으로 식중독균 검출에 사용되는 Taq polymerase을 이용할 경우 증폭을 목표하는 서열의 최장길이를 1 kbp 이하로 제한하는 것이 바람직하다. 또한 primers와 증폭개시지점간의 특이적 부착성을 고려할 때 primers 내 GC 함량을 50% 수준으로 조정하는 것이 좋다. 특히 두 primers의 melting temperatures (T_m ; primers의 증폭개시지점 부착과 1 cycle의 PCR 증폭 후 다음 cycle의 PCR 부착을 위해 각 primer가 증폭개시지점에서 떨어지는 온도)를 근접하도록 설계하여야 한다. 식중독균 검출을 위한 PCR에 적용되는 primers는 각 forward primer와 reverse primer 당 0.2~1.0 µM 수준으로 첨가되어 PCR 증폭반응을 유도할 수 있다. 비록 PCR 조건에 따라 primers 최적농도 조정이 바람직하나 일반적으로 각 primer 당 0.4~0.5 µM 수준을 첨가하여 PCR을 수행하였을 때 식중독균 DNA가 원활히 증폭되는 것으로 알려져 있다.

식중독균 검출을 위한 PCR primers 설계에 사용되는 주요 식품 식중독균 genes는 표 1에 기술된 바와 같다(Azlin Mustapha 2006). Primers 설계를 위하여 목표하는 gene의 서열정보가 필요하며, 각 gene의 서열정보는 NCBI, GenBank 등 공개되어 있는 박테리아 염기서열 database에서 검색할 수 있다. 목표하는 gene의 PCR 증폭을 위한 primers 서열은 primer 설계를 위해 제작되어 대중에 공개된 Primer3 및 Primer-BLAST 등의 프로그램에 gene 서열 정보를 입력하여 획득할 수 있다(Koressaar & Remm, 2007; Untergasser et al., 2012; Ye et al., 2012). 특히 primer 소프트웨어를 이용하여 primer

표 1. 식중독균 검출을 위한 PCR 검출기법의 primers 설계 중 사용될 수 있는유전자

식중독균	Primer 설계에 사용되는 gene
<i>Salmonella</i> spp	<i>oriC, ompC, invA, 16S rRNA, rfbS, sefA, orf6e</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>sea, seb, sec, sed, tst, eta, etb, 23S rRNA, entC</i>
<i>Vibrio</i> spp	<i>tdh, vvhA, toxR, hlyA, tdh, trh, tlh</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>iap, hlyA, iap, hlyA, inlAB, actA, hlyA</i>
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>stx1, stx2, uidA, eaeA, stx1, stx2, fliCh7, hlyAO15</i>
<i>Campylobacter</i> spp	<i>fla, ask, mapA, ceuE, ccoN, omp50</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>yadA, ail, yst</i>

의 길이, 증폭을 목표하는 서열의 길이, GC 함량 및 T_m 등 목표하는 특성에 따라 primers를 설계하고 선정할 수 있다. 참고적으로 각 식중독균의 PCR 검출에 사용될 수 있는 primers 서열정보를 표 2에 정리하여 기술하였다.

MgCl₂ 및 dNTP 농도 결정

Taq polymerase는 2가 양이온과 결합할 경우 원활한 DNA 합성능력을 나타낸다. 또한 PCR 반응 중 DNA 합성은 template DNA에 상보적 dNTP의 결합에 의해 이루어지며, 과정 중 dNTP는 분자구조에 존재하는 phosphate 이온을 상실한 dNDP 형태를 나타내며 polymer chain를 구성한다. 따

라서 PCR에 의해 DNA 합성의 정도가 증가 할수록 phosphate 이온의 양이 증가하기 때문에 PCR 용액 내 물리화학적 환경이 변화한다. 따라서 MgCl₂는 1) *Taq* polymerase 분자에 Mg²⁺를 제공함에 따른 *Taq* polymerase 활성화와 함께 2) DNA 합성과정 중 생산된 phosphate 이온을 중화시키는 두 역할을 도모하고자 PCR 용액에 첨가된다. MgCl₂은 PCR 용액에 1.0-2.0 mM 수준으로 첨가될 수 있으며, 상용화되어 시판되는 PCR mix 용액의 경우 약 1.5 mM 수준의 MgCl₂가 포함되어 있는 것으로 알려져 있다.

dNTP의 경우 PCR의 목적에 따라 농도 조정이 요구된다. 식중독균 검출을 위한 PCR 반응 수행은 일반적으로 1 kbp 이하의 DNA 증폭을 목적으로 하기 때문에 50-200 μM 수준으로 PCR 용액에 첨가되며, PCR 용액 내 200 μM의 dNTP 첨가가 일반적이다. 그러나 1 kbp을 초과하는 DNA 증폭을 목적으로 할 경우 200 μM 이상의 dNTP 첨가가 요구될 수 있다.

Thermal cycle 조건 설정

앞서 기술한 바와 같이 PCR 반응은 1) DNA denaturation step, 2) annealing step, 3) extension step, 4) final elongation step으로 구성되며, 1)~3) steps를 20~40번 반복하여 DNA 증폭을 유도한다. 1)~3) steps의 반복은 최대 40 cycle을 넘

표 2. PCR을 이용한 식중독균 검출에 이용되는 primers 서열

식중독균	Target gene	Primer 서열	참고문헌
<i>Salmonella</i> spp	<i>invA</i>	F: CGGTGGTTTTAAGCGTACTCTT R: CGAATATGCTCCACAAGGTTA	(Fratamico, Bagi, & Pepe, 2000)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>sea</i>	F: CCTTTGGAACGGTTAAAACG R: TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC	(Becker, Roth, & Peters, 1998)
<i>Vibrio</i> spp	<i>tdh</i>	F: TTTTCATGATTATTCAGTTT R: TTTGTTGGATATACACAT	(Karunasagar, Sugumar, Karunasagar, & Reilly, 1996)
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hlyA</i>	F: TTGCCAGGAATGACTAATCAAG R: ATTCACTGTAAGCCATTTTCGTC	(Amagliani et al., 2004)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>stx1</i>	F: CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG R: CACCAGACAATGTAACCGCTG	(Cebula, Payne, & Feng, 1995)
<i>Campylobacter</i> spp	<i>flaA/B</i>	F: CCAAATCGGTTCAAGTTCAAATCAAAC R: CCACTACCTACTGAAAATCCCGAACC	(Rasmussen, Olsen, Jørgensen, & Rasmussen, 1996)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>yst</i>	F: AATGCTGTCTTCATTTGGAGC R: ATCCAATCACTACTGACTTC	(Vishnubhatla et al., 2001)

지 않는 것이 일반적이는데 그 이유는 thermal cycle을 38 이상 반복할 경우 비특이적 PCR 반응에 의한 원치 않는 DNA 증폭의 생산량이 증가하기 때문이다. 식중독균 검출을 위한 PCR 기법의 경우 일반적으로 35 또는 38 thermal cycle을 적용하고 있다. 1)~4) step 이전 PCR 용액 내 template DNA의 denaturation을 확실하게 수행하기 위해 initial denaturation step이 포함될 수 있으며, 특히 hot-start *Taq* polymerase을 이용할 경우 효소 활성화를 위한 initial denaturation step을 필수적으로 포함하여야 한다. Initial denaturation은 15 sec-3 min 동안 94-98°C 열처리에 의해 이루어 질 수 있으나, *Taq* polymerase의 종류에 따라 상이하다. Initial denaturation 처리 조건은 *Taq* polymerase 제조사에서 제공하는 권장조건을 따르는 것이 바람직하다. DNA denaturation step의 경우 90-98°C에서 15 sec-2 min 동안 수행될 수 있으나, 최소 20 cycle 이상 반복되기 때문에 반복적 열처리에 따른 *Taq* polymerase 효소활력 손실을 고려하여 수행하여야 한다. 일반적으로 15-60 sec 동안의 94 또는 95°C 열처리가 DNA denaturation step에 적용된다. 특히 PCR 증폭 후반부의 효소활성이 요구될 경우 온도는 낮게 시간을 짧게 적용하는 것이 바람직하며, PCR 증폭 초반의 효소활성이 중요할 경우 그 반대로 적용하는 것이 좋다. 또한 *Taq* polymerase의 경우 제조사별로 상이한 열안정성을 나타냄에 따라 제조사의 권장조건을 따르거나, 최적 조건에 대한 사전분석이 요구된다. Annealing step은 primers이 template DNA의 증폭개시지점 부착을 유도하는 step으로써 PCR 반응의 특이성과 효율성에 큰 영향을 미친다. Annealing 온도 결정은 primers의 T_m 에 의해 결정되어야 한다. T_m 은 첫번째 PCR cycle 이후 template DNA에 부착된 primers 중 50%가 떨어지는 온도으로써, annealing 온도를 T_m 보다 낮게 설정할 경우 primers가 증폭개시지점이 아닌 다른 서열에 부착될 가능성이 높아지는 반면 annealing 온도를 T_m 보다 높게 설정할 경우 template DNA에 부착된 primers 수가 50% 이하 수준으로 존재하게 됨에 따라 PCR 반응 효율이 저하 될 수 있다. T_m 보다 5°C 이상 낮은 annealing 온도 설정은 비특이적 DNA 증폭산물 생성에 따라 바람직하지 않다. 일반적으로 annealing 온도는 T_m 보다

2°C 높게 설정하는 것이 일반적이다. 그러나 annealing 온도를 T_m 보다 2°C 높게 설정하였음에도 불구하고 비특이적 DNA 증폭산물이 생성될 경우 T_m 보다 3-4°C 높게 annealing 온도를 설정하여 PCR에 의한 DNA 증폭을 유도할 수 있다. 다만 T_m 보다 3-4°C 높게 annealing 온도를 설정할 경우 template DNA 증폭 효율 또한 감소하게 됨을 반드시 고려하여야 한다. Annealing step의 시간 역시 온도와 마찬가지로 PCR 반응의 효율 및 속도에 큰 영향을 미친다. 15 sec에서 1 min까지 다양한 시간조건이 annealing step에 적용될 수 있으나 필자의 경험에 의하면 소량 존재하는 template DNA 증폭을 목적으로 할 경우 15 sec 수준의 annealing step 적용은 좋지 않은 DNA 증폭효율을 관찰한 바 있다. 또한 필요이상으로 긴 시간의 annealing 처리는 총 PCR 반응 시간을 증가시키는 바 바람직하지 않은 것으로 판단된다. 식중독균 검출을 위한 PCR 반응에 적용을 위한 annealing step 시간을 20-40 sec 수준으로 설정하는 것이 바람직하다. PCR에 의한 template DNA 증폭은 extension 과정 중 *Taq* polymerase의 효소작용에 의해 이루어진다. *Taq* polymerase는 일반적으로 74°C에서 가장 좋은 활력을 나타내는 것으로 알려져 있다. 다만 DNA 복제 서열의 신로도 향상을 꾀할 경우 *Taq* polymerase의 최적 활성 온도인 74°C보다 2°C 낮은 72°C를 extension step에 적용하기도 한다. Extension step 처리 시간은 15 sec에서 60 sec까지 다양하게 적용할 수 있으나, 30-40 sec 동안 처리하는 것이 보편적이다. Final elongation step은 PCR에 의한 DNA 증폭 효율 및 정확성에 적은 영향을 미치는 것으로 판단된다. Final elongation step은 extension 온도 조건에서 약 2-5 min 동안 처리하는 것이 일반적이다.

우유 및 유제품 내 식중독균 회수와 식중독균 DNA 추출

앞서 기술된 PCR의 과정, PCR 요소 및 반응 조건은 우유 및 유제품 내 식중독균 검출을 위한 PCR 분석기법을 포함하는 모든 PCR 분석기법에 유사하게 적용된다. 그러나 우유 및 유제품 내 식중독균을 회수하고 그 DNA를 추출하는 과

정은 생체 시료 또는 채소와 같은 농산물 내 미생물 DNA를 추출하는 과정과 상당한 차이를 나타낼 수 있다. 왜냐하면 유제품은 복잡한 구조의 식품 매트릭스구조를 이루고 있으며, 유제품에 오염되어 존재하는 식중독균은 지방 또는 단백질 콜로이드에 감싼 형태로 존재할 가능성이 높고 이 경우 식중독균 회수가 어렵기 때문이다. 또한 식중독균 DNA를 유제품에서 회수한 식중독균으로부터 추출한 시료에 유단백질 및 유지방이 포함되어 PCR 용액에 첨가될 경우 유단백질 및 유지방에 의해 PCR 반응이 저하될 수 있음에 따라 우유 및 유제품에서 식중독균을 분리하고 DNA를 추출하는 과정 중 유단백질 및 유지방을 제거하는 것이 바람직하다.

유단백질을 pronase와 같은 단백질 분해효소를 이용하여 분해 시킨 후 원심분리하여 침전물을 회수하면 유단백질을 배제하고 식중독균을 회수할 수 있다(Flórez & Mayo, 2006; Furet, Quéneé, & Tailliez, 2004; Ogier et al., 2004). 또한 치즈와 같은 유제품을 sodium citrate에서 교반할 경우 유단백질의 용액 내 용해도가 증가한다. 따라서 sodium citrate에 분산된 유제품을 원심분리하면 유단백질을 배제한 조건에서 식중독균을 회수할 수 있다(Hebert, De Giori, & Raya, 2001). 버터 및 치즈는 그 어떤 식품보다 많은 양의 지방을 함유하고 있으며, 앞서 언급한 바와 같이 유지방은 식중독균 회수 및 식중독균 DNA 추출을 방해함은 물론 PCR 반응을 저해하는 주요 요소로 알려져 있다(Mortari & Lorenzelli, 2014). 유지방은 유기용매에 의해 제거될 수 있다. 식중독균 회수 및 DNA 추출효율 향상을 위해 유기용매가 사용될 수 있으나(Khare et al., 2004), 유기용매는 사용이 용이하지 않음에 따라 보편적으로 이용되지 않는 실정이다. 대신 유지방을 식중독균으로부터 분획할 수 있는 유화기법이 우유 및 유제품 내 식중독균 회수 및 그 DNA 추출에 빈번하게 사용되고 있다. 보고에 의하면, Tween 20과 같은 유화제가 포함된 Tris-HCl에 치즈를 분산시킬 경우 치즈로부터 유래되는 지방이 유화됨에 따라 식중독균을 유지방에서 효과적으로 분리하여 회수할 수 있으며(Serpe, Gallo, Fidanza, Scaramuzzo, & Fenizia, 1999), Triton X-100과 복합하여 사용할 경우 회수율을 더욱 향상할 수 있는 것으로 알려져 있다(Baruzzi, Matarante, Caputo, & Morea, 2005).

식중독균 DNA는 세포막 내부에 존재하고 DNA는 세포막을 파괴한 후 침전 또는 정제과정을 통해 추출될 수 있다. 전통적으로 미생물 DNA는 boiling 방법에 의해 추출되어 왔다. 미생물의 세포막은 95°C 이상의 열 공급에 의해 느슨해지고 절편화되어 붕괴된다. 따라서 용액에 미생물을 첨가하고 95°C에서 약 15분간 열처리하면 미생물 DNA를 세포로부터 분리할 수 있다. 이후 원심분리하여 침전된 이물질을 제거하면 DNA를 획득할 수 있다. 그러나 유제품 내 식중독균 DNA 추출을 위해 boiling 방법을 이용할 경우 다량의 유단백질이 함유될 수 있기 때문에 boiling 방법은 유제품 내 식중독균 DNA 추출에 적합한 방법이라 할 수 없다.

DNA는 실리카 표면에 흡착하는 물리화학적 특성을 가지고 있다. 이 특성을 이용하면 추출용액에서 단백질을 배제하고 DNA를 효율적으로 정제할 수 있으며, 현재 실리카를 이용한 DNA 추출·정제 방법이 보편적으로 사용되고 있다. DNA 정제를 위한 실리카는 컬럼의 형태 또는 마그네틱 비드의 형태로 DNA 추출·정제에 적용되고 있으며, 실리카 컬럼 및 실리카-마그네틱 비드를 이용하면 우유 및 유제품 내 식중독균 DNA 추출과정 중 유단백질을 효율적으로 분리하여 DNA의 정제도 향상을 꾀할 수 있다(Quigley et al., 2012). 실리카가 적용된 미생물 DNA 추출방법은 키트화 되어 시판되고 있다. 국내 및 해외의 대부분의 유명 바이오텍 업체에서 우유 및 유제품 내 식중독균 DNA 추출을 위한 키트를 개발하여 시장에 판매중이며, DNA 시료 내 지방 및 단백질 함입을 방지하기 위해 알코올 및 다양한 유화제가 함유된 시약과 함께 실리카 컬럼 또는 실리카-마그네틱 비드가 키트에 포함되어 있다(Quigley et al., 2012). 각 실험자의 목적 및 실험실의 설비에 따라 적합한 키트를 선정하여 우유 및 유제품 내 식중독균 검출에 적용하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

결론

PCR을 이용한 식중독균 검출기법은 전통적인 배지배양법보다 빠르고 정확함에 따라 식품안전관리 분야에서 더욱 보편적으로 사용될 것으로 전망된다. 본 기고문은 우유 및 유제품 내 식중독균 검출을 위한 PCR 검출기법의 보편화에도

음을 주고자 PCR에 대한 기초적 내용과 PCR 구성요소의 특성 및 요소 선정에 대해 중점적으로 서술하고 있다. 비록 본 기고문은 conventional PCR을 기초로 그 내용이 서술되었으나, PCR 요소의 특성 및 선정은 real-time PCR, emulsion

PCR 및 digital PCR 등에 공통적으로 적용될 수 있음에 따라 향후 PCR 기반의 식중독균 검출 기법의 발전 및 보편화에 기여할 수 있기를 기대한다.

참고문헌

1. Amagliani, G., Brandi, G., Omiccioli, E., Casiere, A., Bruce, I. J., & Magnani, M. (2004). Direct detection of *Listeria monocytogenes* from milk by magnetic based DNA isolation and PCR, *Food Microbiology*, 21(5), 597–603. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.008>
2. Azlin Mustapha, Y. L. (2006). Molecular detection of foodborne bacterial pathogens. In J. Maurer (Ed.), *PCR methods in foods* (pp. 69–90). New York: Springer.
3. Baruzzi, F., Matarante, A., Caputo, L., & Morea, M. (2005). Development of a culture-independent polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Lactobacilli* in stretched cheese. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 13(3), 177–192. doi: 10.1111/j.1745-4581.2005.00018.x
4. Becker, K., Roth, R., & Peters, G. (1998). Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9): 2548–2553
5. Cebula, T. A., Payne, W. L., & Feng, P. (1995). Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(1): 248–250
6. Chien, A., Edgar, D. B., & Trela, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 127(3): 1550–1557
7. Flórez, A. B., & Mayo, B. (2006). Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology*, 110(2): 165–171. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.016>
8. Forsythe, S. J. (2010). *The microbiology of safe food* (2nd ed.). Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
9. Fratamico, P. M., Bagi, L. K., & Pepe, T. (2000). A multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 in foods and bovine feces. *Journal of Food Protection*, 63(8): 1032–1037
10. Furet, J.-P., Quénee, P., & Tailliez, P. (2004). Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 97(2): 197–207. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.020>
11. Hebert, E. M., De Giori, G. S., & Raya, R. R. (2001). Isolation and characterization of a slowly milk-coagulating variant of *Lactobacillus helveticus* deficient in purine biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4): 1846–1850. doi: 10.1128/aem.67.4.1846-1850.2001
12. Innis, M., & Gelfand, D. (1999). 1 – Optimization of PCR: Conversations between Michael and David *PCR Applications* (pp. 3–22). San Diego: Academic Press.
13. Karunasagar, I., Sugumar, G., Karunasagar, I., & Reilly, P. J. A. (1996). Rapid polymerase chain reaction method for detection of Kanagawa positive *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, 31(1): 317–323. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00974-9](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(96)00974-9)
14. Khare, S., Ficht, T. A., Santos, R. L., Romano, J., Ficht, A. R., Zhang, S., . . . Adams, L. G. (2004). Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3): 1075–1081. doi: 10.1128/jcm.42.3.1075-1081.2004
15. Koressaar, T., & Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10): 1289–1291. doi:

10.1093/bioinformatics/btm091

16. Law, J. W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 5(770). doi: 10.3389/fmicb.2014.00770
17. Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Myambo, K., Drummond, R., & Gelfand, D. H. (1989). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *Journal of Biological Chemistry*, 264(11): 6427–6437
18. Mortari, A., & Lorenzelli, L. (2014). Recent sensing technologies for pathogen detection in milk: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 60: 8–21. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.03.063>
19. Ogier, J.-C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., . . . Delacroix-Buchet, A. (2004). Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9): 5628–5643. doi: 10.1128/aem.70.9.5628–5643.2004
20. Quigley, L., O’Sullivan, O., Beresford, T. P., Paul Ross, R., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2012). A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 113(1): 96–105. doi: 10.1111/j.1365–2672.2012.05294.x
21. Rasmussen, H. N., Olsen, J. E., Jørgensen, K., & Rasmussen, O. F. (1996). Detection of *Campylobacter jejuni* and *Camp. coli* in chicken faecal samples by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 23(5): 363–366. doi: 10.1111/j.1472–765X.1996.tb00209.x
22. Serpe, L., Gallo, P., Fidanza, N., Scaramuzza, A., & Fenizia, D. (1999). Single-step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Research*, 66(2): 313–317
23. Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115. doi: 10.1093/nar/gks596
24. Vishnubhatla, A., Oberst, R. D., Fung, D. Y. C., Wonglumsom, W., Hays, M. P., & Nagaraja, T. G. (2001). Evaluation of a 5-nuclease (TaqMan) assay for the detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica* in raw meat and tofu samples. *Journal of Food Protection*, 64(3): 355–360
25. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. [journal article]. *BMC Bioinformatics*, 13(1): 1–11. doi: 10.1186/1471–2105–13–134
26. Yeni, F., Acar, S., Polat, Ö. G., Soyer, Y., & Alpas, H. (2014). Rapid and standardized methods for detection of foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce. *Food Control*, 40: 359–367. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.020>
27. 국가통계포털. 우유 및 유제품 생산 소비상황. <http://kosis.kr/>, Accessed: Sep. 19 2016.
28. 한국 식품의약품 안전처. 식품공전, 제 2 식품일반에 대한 공통기준 및 규격. <https://www.foodsafetykorea.go.kr/>, Accessed: Sep. 19 2016.
29. 한국 식품의약품 안전처. (2015). 축산물의 가공기준 및 성분규격. 식품의약품안전처고시 제2015–55호.

채 창 훈

2015. 9 ~ 현재, 조교수, 강원대학교 동물생명과학대학 동물응용과학부
 2013. 3 ~ 2015. 8, 연구교수, 국민대학교 식품영양학과
 2012. 1 ~ 2013. 2, 선임연구원, CJ제일제당 식품품질안전센터