

PCR-DGGE를 이용한 유기농 채소의 유해 미생물 신속 검지

권오연 · 손석민*

호서대학교 식품생물공학과

The Rapid Detection of Pathogens in Organically Grown Vegetables Using PCR-DGGE

Oh Yeoun Kwon and Seok Min Son*

Department of Food and Biotechnology, Hoseo University

Abstract

In this study the polymerase chain reaction (PCR) combined with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was evaluated as a method permitting the rapid detection of pathogens in fresh originally grown vegetables. A universal primer (341GCf/534r) was selected for its ability to amplify the V3 region of 16S-rRNA genes in their target pathogens (*Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*). The 194 bp fragments in PCR were successfully duplicated as expected. The amplified fragments of the same size from six different pathogens also showed good separation upon DGGE. The detection limit of PCR-DGGE for six pathogens in fresh-cut lettuces were over 10^5 CFU/g when sampled by stomaching. However, when the sampling method was changed from stomaching to shaking, the detection limit of six pathogens in organic vegetables was shown to increase by over 10^1 CFU/g, but only those of *B. cereus* were over 10^3 CFU/g. Therefore, PCR-DGGE was shown to be a reliable method for the detection of pathogens in fresh-cut vegetables.

Key words: PCR, DGGE, organic vegetables, pathogens, fresh-cut

서 론

국내 식품소비 측면에 있어서 생활수준의 향상과 의식의 변화로 인해 지금까지의 영양위주의 소비 패턴을 탈피하여 식품의 안전성이라는 측면을 중시하는 고품질의 건강 식품 위주로의 소비 대체가 일어나고 있는 상황이다. 그리고 빠르게 변화하고 있는 사회에서 편의 식품 또한 주위를 끌고 있다. 이러한 현실적 상황에서 채소 중에서는 화학 비료를 사용하지 않은 유기농 채소를 선호하고 이것을 최소 가공한 신선 샐러드 혼합제품의 수요와 공급이 확대되고 있다. 이러한 유기농 채소는 최소가공을 한 후에도 자체 내에 미생물 균총을 많이 지니고 있는데 이중 일부는 식품의 안전성에 민감한 문제를 일으키는 유해 미생물도 포함되어 있다(Francis et al., 1999; Dolye, 1990; Como-Sabetti et al., 1997). 대부분이 최소가공채소류는 재가열하지 않고 직접

소비자가 신선한 상태로 바로 섭취하기 때문에 만약 최소 가공한 유기농 채소류가 이러한 유해 미생물에 오염되어 있다면 이는 심각한 식품 안전성의 위협이 될 수 있다(Como-Sabetti et al., 1997). 이러한 유해미생물을 검지 방법으로 전통적인 방법인 1-3 일 이상 소요되는 선택 배지법(Olsen et al., 1995)과 목적하는 균을 신속하게 검출할 수 있는 PCR방법 등이 있다(Bennett et al., 1998). 최근에는 더 쉽고 빠르게 검지할 수 있는 분자생물학적 방법인 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) (Nachamkin et al., 1998), RAPD(Random amplification Polymorphic DNA) (Niderhause et al., 1994), SSCP (single-stranded conformation polymorphism) (Kagimoto, 1995), sequence analysis(Booyesen et al., 2002), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Nubel et al., 1999)을 사용하고 있다. 이러한 검지 방법 중 DGGE는 각각의 DNA 조각 염기서열이 가지는 용해점(T_m)의 차이에 의해 겔 내에 변성제의 농도구배에 따른 핵산의 이동 속도가 서로 다르기 때문에 동정할 수 있는 기법이다. 이것은 PCR로 증폭된 동일한 크기 산물들이 변성제의 농도구배에 따라서 DNA가 변성되면서 일부 이중나선이 벌어져 겔 내의 매트릭스에 걸려 이동이 늦어지거나 멈추게 되는 원리를 이용

*Corresponding author: Seok Min Son, Department of Food and Biotechnology, Hoseo University, Baebang-eup, Asan, 336-795, Korea
Tel: +82-41-540-5643; Fax: +82-41-532-5640
E-mail: sson@hoseo.edu

Received October 7, 2011; revised November 7, 2011; accepted November 7, 2011

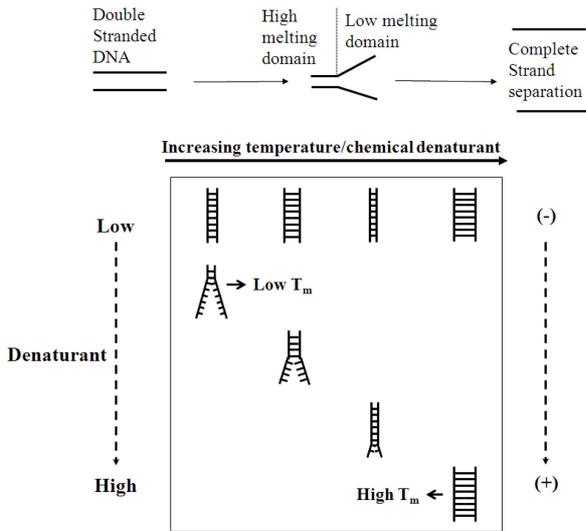


Fig. 1. A schematic diagram of DGGE.

하는 것이다. 각 DNA의 염기서열에 의해 결정되는 독특한 melting point를 갖기 때문에 동일한 크기의 DNA도 염기서열의 차이로 겔 내의 이동이 달라져서 분리할 수 있는 것이다(Fig. 1). 이미 해외에서는 PCR-DGGE를 이용하여 이탈리아인 소시지(Cocolin et al., 2001), 밀가루 반죽(Meroth et al., 2003), 주류(van Beek & Priest, 2002), 발효유(Fasoli et al., 2003), 과실류인 cassava(Ampe et al., 2001) 등의 식품 품질 향상 연구에 이용되어져 왔다. 따라서 본 연구에서는 유기농 채소에 오염될 수 있는 대표적인 병원성 미생물 6종을 선택하여 각각 미생물의 16S rRNA 영역을 PCR로 증폭시킨 후 DGGE로 분리하고자 한다. 이 PCR-DGGE 기법을 이용한 복합 균주 시스템(Fig. 2)에서 실제 채소류에서 병원성 미생물의 검지가 가능한지 알아보하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주

최근 국내외 채소류에서 식중독을 일으키는 원인이 되는 유해 미생물로 선정하였다. 그람음성 미생물인 *Salmonella typhimurium* KCTC 2057, *E. coli* ATCC 9633, *Pseudomonas fluorescens* KCTC 2344와 그람양성 미생물인 *Listeria monocytogenes* KCTC 3569, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 65389를 사용하였다.

샘플 준비

유기농 채소는 최소 가공된 혼합 샐러드 제품으로 대형 마트에서 구입하였다. 샐러드 25g에 멸균생리식염수 225mL을 혼합하고 각각 6종의 병원성미생물 배양액을 접종하였다. 균질화 방법은 균질기(실온, 3 min, Shimakyu

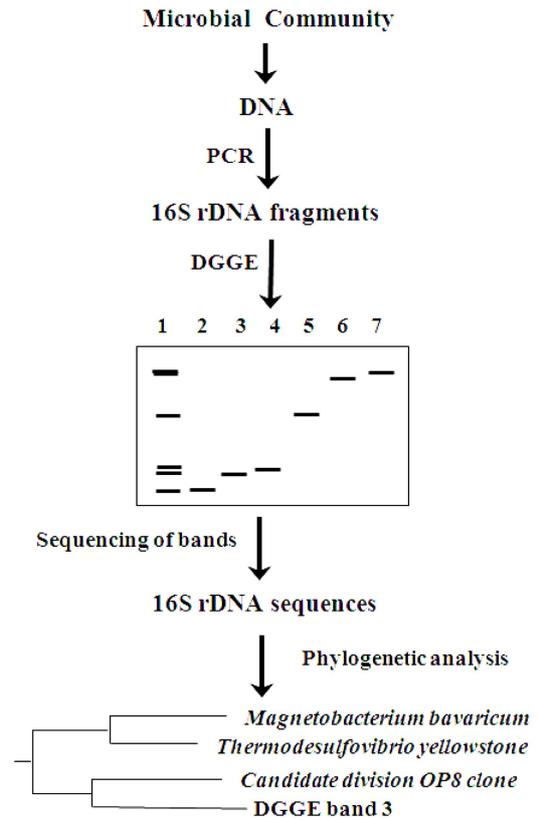


Fig. 2. Flow diagram of the different step in the analysis of microbial community by PCR-DGGE.

Food Tech., Osaka, Japan)와 진탕 배양기(200 rpm, 3 min, Vision Lab Science co., Incheon, Korea)를 이용하여 균질시킨 후 시료로 사용하였다.

균주의 관리 및 배양

Salmonella typhimurium, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*는 TSA(Tryptic Soy Agar, Difco, Maryland, U.S.A)에 30-35°C의 온도에서 배양하였고 *E. coli*는 PCA(Plate Counting Agar, Difco)에 35°C의 온도에서 배양하였다.

DNA 추출

인공마커를 제조하기 위하여 병원성 미생물 6종의 DNA를 rapid boiling 방법에 따라 추출하였다(Fig. 3(a)). 그리고 유기농 채소 제품에 있어서의 DNA 추출은 Genomic DNA extraction kit(K-3032, Bioneer co., Daejeon, Korea)를 이용하여 2 회 더 용출하였다(Fig. 3(b)).

PCR

용출시킨 DNA를 증폭시키기 위하여 PCR Premix (Bioneer co.)을 이용하여 1 µL의 DNA template와 25

pmole의 341fGC[CCTACGGGAGG CAGCAG]/534r [ATTACCGCGGCTGCTGG] 프라이머(Muyzer G et al., 1993)를 혼합한 후 유전자 증폭기(Gene Cyclor, Bio-Rad, Tokyo, Japan)를 이용하여 PCR을 수행한 다음 1.5% 아가로스 겔로 전기 영동하여 PCR 증폭 여부를 확인하였다.

DGGE

Dcode™ Universal Detection System(Bio-Rad, California, U.S.A)를 이용하여 100% 변성제(7 M urea, 40% formamide)가 각각 포함된 8%(w/v) 아크릴아마이드 용액(acrylamide-N,N'-methylene-bisacrylamide, 37.5 : 1)으로 35%에서 50% 범위 내의 농도구배를 가지는 8%(w/v) 폴리아크릴아마이드 겔로 DGGE를 수행하였다. 전기영동은 20 V에서 10 분 stacking한 후 3 시간 30 분 동안 200 V로 진행하였다.

DGGE 밴드의 염기서열 분석

Ethidium bromide로 겔을 염색한 후 UV transilluminator (SL-20, Seoulin Bioscience co., Seongnam, Korea)에서 촬영하였고 겔 상에서 서로 다른 위치에 있는 밴드를 추출하였다. 잘라낸 밴드를 20 µL의 멸균수를 넣고 동결과 해동을 5 회 이상 반복하여 DNA를 추출하였다. DNA 용출액

을 주형으로 하여 GC clamp가 달리지 않는 341f/534r 프라이머로 증폭하였다. 이 PCR 산물들은 1.5% 아가로스 겔에서 증폭여부를 확인한 후 염기서열 분석팀(Bionics, Korea)에게 의뢰하였다. 분석 결과는 database 입력용 염기서열과 피크 보정용 파일로 크로마스 프로그램 내 피크 보정 후 확보한 염기서열을 Gene Bank에 있는 데이터와 비교하여 유사도를 확인한 후 미생물의 동정 결과를 얻을 수 있었다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

결과 및 고찰

인공마커의 제조

6 종의 병원성 미생물(*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *P. fluorescens*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. typhimurium*)을 PCR로 증폭시켜 전기영동으로 194 bp 동일한 크기의 증폭산물들을 확인하였고(Fig. 3) 이 증폭산물들을 DGGE로 6 종 병원성 미생물의 인공마커를 제조하였다. 이는 6 종의 병원성 미생물에 대한 인공마커를 제조하기 전 바이오닉스에서 제공하는 Web program 안의 Oligo calculator를 이용하여 GC 함량과 T_m (melting temperature)값을 계산한 결과를 Table 1에 나타내었다. 이는 계산된 값들과 각각의 균주들이 DGGE 상에 검출된 위치들과 비교한 결과 예상대로 T_m 값이 높을수록 겔에 멀어지는 경향을 보였다. 이에 따라 *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. typhimurium* 순으로 밴드가 나타났고. *P. fluorescens*만이 *S. aureus*와 *B. cereus* 사이에 나타났(Fig. 4). 이와 같은 결과는 T_m 값과 GC 함량으로 보아 겔 상단에 위치할 것이라는 예측과 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

유해미생물과 식물 DNA간의 경쟁적 증폭 현상

유기농 채소에 병원성 미생물을 접종한 후 2 분간 스토마터를 이용하여 균질을 시킨 경우 식물 DNA가 추출되어 PCR에서 증폭됨을 확인할 수 있었다. 그래서 *E. coli*를 이용하여 유해 미생물의 DNA와 식물 DNA가 PCR 증폭 시 농도에 따른 경쟁적 관계가 있는지를 확인하기 위하여 Fig. 5에서와 같이 1, 2 번 레인은 10^1 , 10^2 CFU/g의 균주를 접종하였으며 3 번 레인에서는 10^5 CFU/g의 균을 접종

Table 1. T_m value and GC(Guanine & Cytosine) content of six pathogens.

Microorganism	Melting Temperature (T_m , °C)	GC content
<i>Salmonella typhimurium</i>	84	56
<i>E. coli</i>	84	55
<i>Listeria monocytogenes</i>	83	53
<i>Bacillus cereus</i>	83	52
<i>Staphylococcus aureus</i>	82	51
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	82	51

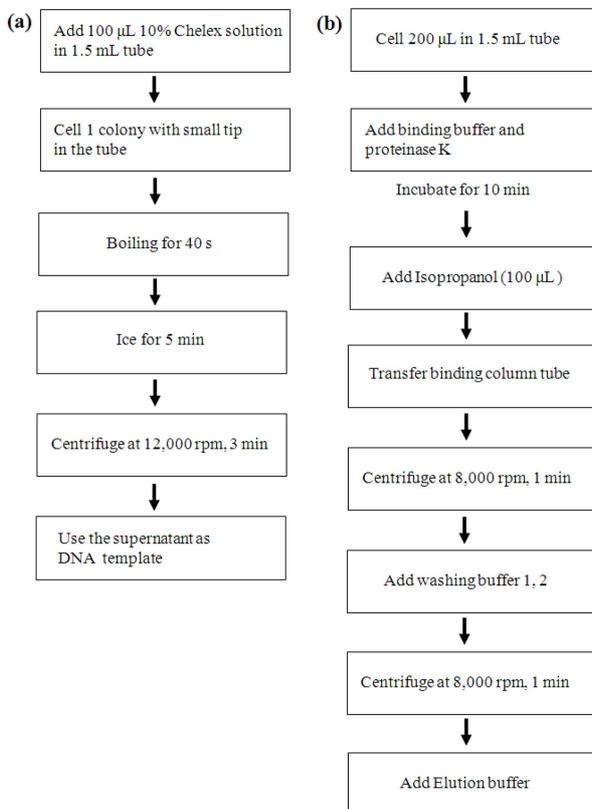


Fig. 3. Flow diagram of (a) boiling method and (b) genomic DNA extraction by using boiling method.

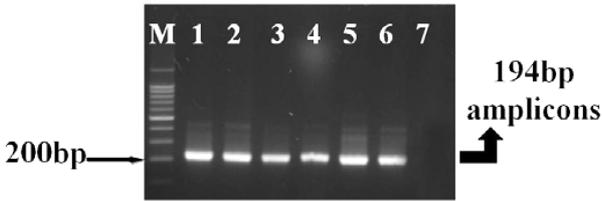


Fig. 4. Results of PCR amplification from bacterial 16S rDNA in 1.5% agarose gel. Lane M: 100 bp maker, Lane 1: *Salmonella typhimurium*, Lane 2: *E. coli*, Lane 3: *Listeria monocytogenes*, Lane 4: *Bacillus cereus*, Lane 5: *Staphylococcus aureus*, Lane 6: *Pseudomonas fluorescens*, Lane 7: negative control

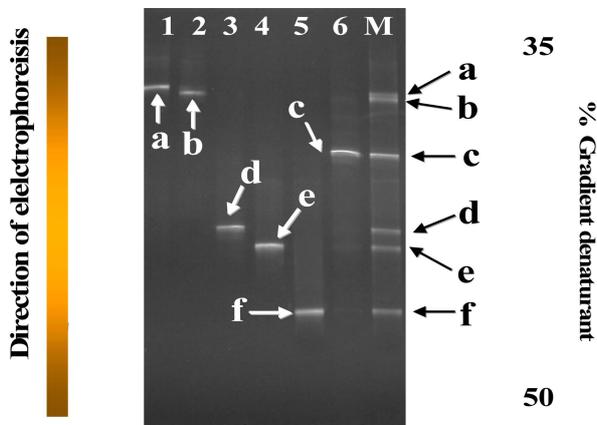


Fig. 5. DGGE analysis of the 16S rDNA amplicons generated by PCR. Lanes 1: *Listeria monocytogenes*, Lane 2: *Staphylococcus aureus*, Lane 3: *Bacillus cereus*, Lane 4: *E. coli*, Lane 5: *Salmonella typhimurium*, Lane 6: *Pseudomonas fluorescens*, Lane M: mixed template amplification products

하였고 4 번 라인 10^8 CFU/g이상의 균을 접종하였다. 그 결과 10^1 , 10^2 CFU/g의 균주에서는 증폭 시 경쟁적 우위를 갖는 것으로 보이는 식물 DNA의 밴드만 검출되었으며 10^5 CFU/g의 균주에서는 식물 DNA와 *E. coli* 밴드가 모두 검출되었다. 그러나 4 번 라인의 10^8 CFU/g이상의 균에서는 *E. coli* 균주의 밴드만 확인할 수 있었다. 그러므로 본 실험에서 사용한 프라이머를 이용하여 PCR 증폭 시 식물 DNA와 유해 균주의 DNA가 농도에 따른 경쟁적 증폭 현상이 있음을 확인할 수 있었다. 이 경쟁적 증폭 현상을 방지하기 위하여 균의 샘플링 방법을 달리하여 보았다.

기존의 균질기는 채소의 조직을 으깨어 균질을 하기 때문에 식물조직을 파쇄하지 않고 채소 겉 표면에 존재하는 미생물만을 용출시키기 위하여 진탕배양기를 이용하였다. 진탕배양기의 속도를 250 rpm으로 하여 5 분간 수행하여 시료를 채취한 다음, 동일한 방법으로 검출 감도를 확인한 결과 Fig. 6에서와 같이 *E. coli*를 10^1 - 10^8 CFU/g까지 인공 접종한 모든 8 라인에 밴드가 나타나는 것을 볼 수 있었



Fig. 6. Comparative amplification between *E.coli* and chloroplast for detecting inoculated *E. coli* in organic vegetables by stomaching method. Lane 1: *E. coli* of 10^1 CFU/g inoculated, Lane 2: *E. coli* of 10^2 CFU/g inoculated, Lane 3: *E. coli* of 10^5 CFU/g inoculated, Lane 4: *E. coli* of 10^8 CFU/g inoculated

다. 이는 채소의 식물 DNA가 용출되어 나오지 않아 경쟁적 증폭 현상이 일어나지 않음을 확인할 수 있었다.

DGGE에서의 유해미생물 최소 검출 농도 확인

PCR-DGGE를 이용하여 유기농 채소류에서 병원성 미생물들을 검출 동정할 수 있기 때문에 실질적인 적용에 있어서는 각 유해 미생물들의 최소 검출 농도를 확인할 필요가 있다고 판단되었다. Shin & Koo(1999)의 연구 결과, 식품 균의 종류에 따라 리스테리아를 인공 접종한 무배양 실험 균에서도 PCR 검출이 가능하다고 보고된바 있다. 이는 PCR을 이용한 검지는 미생물의 종류나 식품균의 종류에 따라서 다양한 검출감도를 나타내기 때문에 세부적으로 연구가 더 필요하였다. 그래서 6 종(*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *P. fluorescens*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. typhimurium*)의 병원성 미생물을 농도별(10^1 - 10^8 CFU/g)로 유기농 채소에 인공 접종한 후 검출 농도를 확인해보았다. Fig. 7에서와 같이 *B. cereus*를 제외한 *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *P. fluorescens*, *E. coli*, *S. typhimurium* 균주들은 10^1 CFU/g까지의 아주 민감한 감도를 확인할 수 있었고 가장 낮은 검출 감도를 나타낸 *B. cereus*는 10^3 CFU/g이상 존재해야지만 검지할 수 있었다.

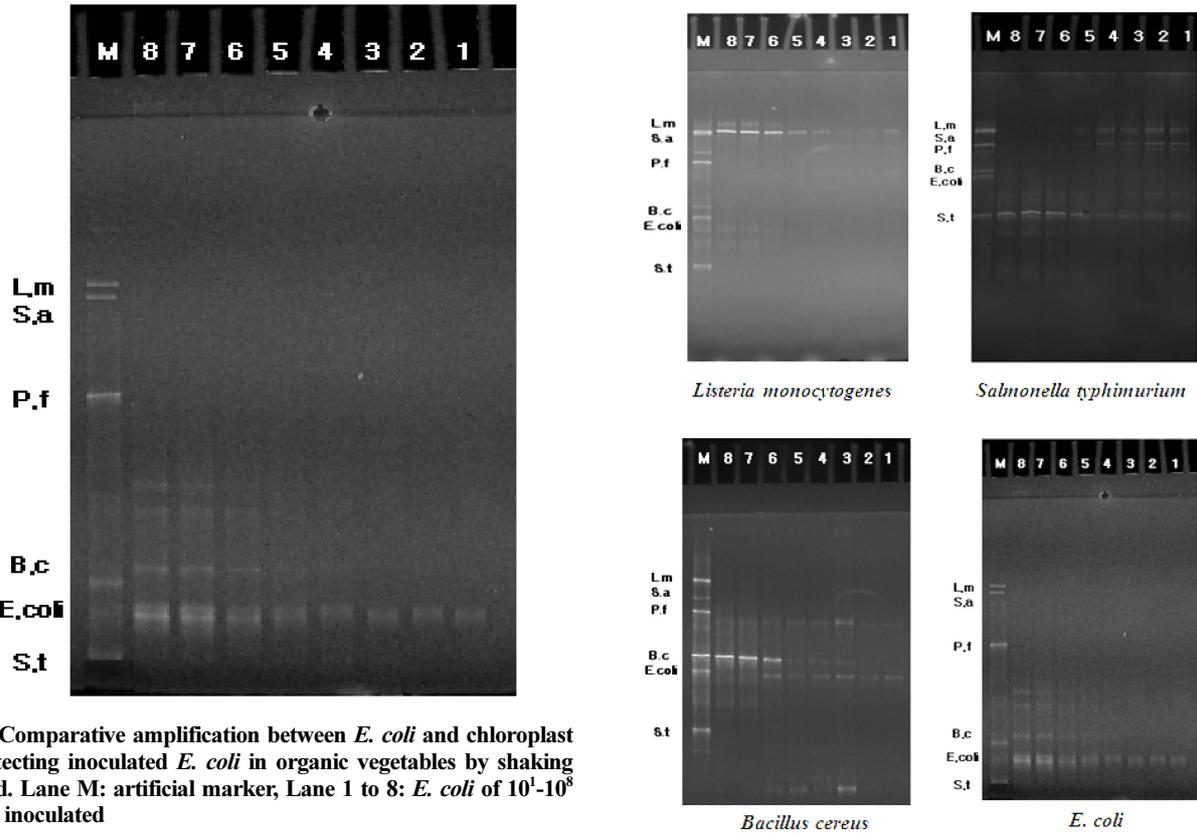


Fig. 7. Comparative amplification between *E. coli* and chloroplast for detecting inoculated *E. coli* in organic vegetables by shaking method. Lane M: artificial marker, Lane 1 to 8: *E. coli* of 10^1 - 10^8 CFU/g inoculated

요 약

현재 식중독 미생물의 검사에 전통적인 배지법이 다수를 차지하고 있으나 PCR이나 면역 분석법과 같은 신속 검출 방법들의 사용이 증가하는 추세이다. 그러나 대개 species-specific 프라이머를 이용한 PCR에 의한 DNA 증폭산물을 전기영동을 통해 확인하는 방법을 사용하고 있는데 이는 각종 균주에 대해 각기 다른 프라이머를 사용하여야하는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 본 연구에서는 여러 가지 균주를 동시에 신속하게 검지할 수 있도록 PCR-DGGE 기술을 연구하게 되었다. 그 결과 6종(*S. typhimurium*, *P. fluorescens*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*)의 유해 미생물을 선정하였고 DGGE 상에서 확실한 분리능을 보여 유해미생물의 인공마커로 사용할 수 있음을 보였다. 또한 실제 PCR-DGGE 기법을 사용하기 위하여 채소에서 유해미생물 검출 감도를 확인한 결과 *B. cereus*를 제외한 5종(*S. typhimurium*, *P. fluorescens*, *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*)의 균들은 모두 10^1 CFU/g까지 검출할 수 있었고 *B. cereus*는 10^3 CFU/g 이상 채소에 존재할 때 검출할 수 있었다. 또한 균질화 방법에 따라서 식물 DNA와 유해 미생물 간의 경쟁적 증폭현상이 일어남도 확인할 수 있었다. 이로써 본 연구에서는 유해 미생물

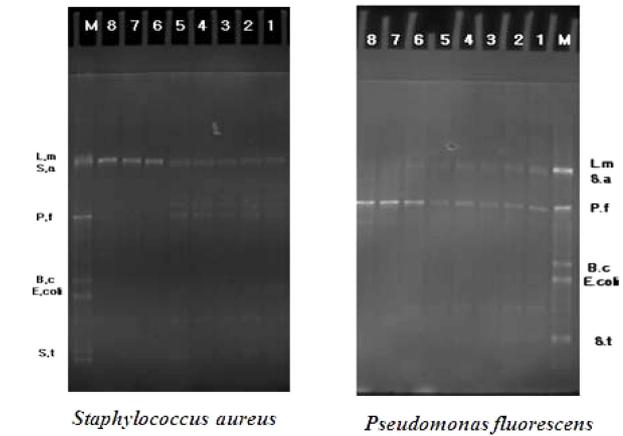


Fig. 8. DGGE profiles for the detection limit of six pathogens in organic vegetables. Lane M: artificial marker, Lane 1 to 8: artificially inoculated from 10^1 to 10^8 CFU/g in organic vegetables.

의 검지, 인공마커의 제조, 식물 DNA와 유해미생물간의 경쟁적 증폭 현상 방지책과 유해미생물의 검출 감도 확인 및 염기서열을 통한 동정을 통해 PCR-DGGE가 식품에서 유해 미생물의 신속 검지 방법으로써 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 향후 국내 식품소비 패턴이 유기농 채소의 수요와 공급이 날로 증대 되고 있기 때문에 PCR-DGGE 기법이 유기농 채소들의 식중독 균에 대한 database를 구

축하여 안전성을 확보하는데 기여할 수 있다고 생각된다.

참고문헌

- Ampe F, Sirvent A, Zakhia N. 2001. Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. *Int. J. Food Microbiol.* 65: 45-54.
- Bennett A.R, Greenwood D, Tennant C, Banks, Bets R.P. 1998. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in food by PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 437-441.
- Booyesen C, Dicks L.M, Melijering I, Ackermann A. 2002. Isolation, identification and changes in the composition of lactic acid bacteria during the malting of two different barely cultivars. *Int. J. Food Microbiol.* 76: 63-73.
- Cocolin L, Manzano M, Cantoni C, Comi G. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5113-21.
- Como-Sabetti K, Reagan S, Ritter K, Parrott C.M, Simonds S, Hraboxy S, Ritter B. 1997. Outbreaks of *E.coli* O157:H7 associated with eating alfalfa sprouts- Michigan and Virginia. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 46: 741-744.
- Dolye, M.P. 1990. Fruit and vegetable safety-microbiologicals. *Hortscience* 25: 1478-1481.
- Francis G.A, Thomas C, O'Berine D.O. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. *Int. J. Food Sci. Tech.* 34: 1-22.
- Fasoli S, Marzotto M, Rizotti L, Rossi F, Dellaglio F, Torriani S. 2003. Bacterial composition of commercial probiotics products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 82: 59-70.
- Kagimoto S. 1995. PCR-SSCP, direct sequencing. *Japanese J. Clin. Med.* 53: 310-315.
- Kobayashi K, Taguchi M, Seto K. 1994. Polymerase chain reaction (PCR) method for the detection of *Salmonella* by using Chelex resin after enrichment culture. *Kansenshogaku Zasshi.* 68: 1203-1210.
- Meroth C.B, Walter J, Hertel C, Brandt M.J, Hammes W.P. 2003. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 475-482.
- Muyzer G, EC de Waal, A Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations using denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified gene coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Nachamkin I, Bohachick K, Patton, C.M. 1993. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1531-1536.
- Niderhauser C, Hofelein C, Allmann M, Burkhalter P, Luthy J, Candrian, U. 1994. Random amplification of polymorphic bacterial DNA: Evaluation of 11 oligonucleotides and application to food contaminated with *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 574-582.
- Nubel U, Garcia-Pichel F, Kuhl M, Muyzer G. 1999. Quantifying microbial diversity morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 422-430.
- Olsen T.E, Aabo S, Hill W, Notermans S, Wernars K, Ganum P.E, Poporic T, Rasmussen H.N, Slavik O. 1995. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 1-78.
- Shin SY, Koo YJ. 1999. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods by a Polymerase Chain Reaction. *Korean J. Food Sci. Tech.* 6: 1628-1634.
- van Beek S, Priest F.G. 2002. Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 297-305.