

식품에서의 LAMP 시험법을 이용한 *bceT* 유전자 함유 장독소 바실러스균 검출

홍준배^{1,2*}

¹국방대 국가안전보장문제연구소 국방과학연구소 및 안보과정

²한국소비자원 소비자안전센터 안전감시국

Detection of Enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* carrying *BceT* Gene using Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) in Foods

Joonbae Hong^{1,2*}

¹Korea National Defense University, Research Institute for National Security Affairs, Center for Military Science, Nonsan, Korea

²Department of consumer safety surveillance, Consumer Safety Center, Korea Consumer Agency, Eumseong, Korea

(Received August 8, 2024/Revised September 9, 2024/Accepted September 23, 2024)

ABSTRACT - Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a novel molecular detection method that is faster and simpler than polymerase chain reaction (PCR). A LAMP method for rapidly detecting enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* in food was developed and evaluated. Four primers, including outer and inner primers, were specifically designed to recognize the *bceT* gene of *B. cereus* and *B. thuringiensis*. The specificity and limit of detection (LOD) of the LAMP assay were 100% and 10 CFU/reaction, respectively. The developed assay was used to analyze enterotoxigenic (*bceT*) *B. cereus* strains in various artificially inoculated food samples. All 20 foods, including Sunsik and combat rations, contaminated with enterotoxigenic *B. cereus* strains were identified as positive. In conclusion, the proposed enterotoxigenic *B. cereus*-and *B. thuringiensis*-specific LAMP assays provide robust, innovative, and powerful molecular diagnostic methods that can be used in food safety testing services and by public health authorities.

Keywords: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, LAMP, Enterotoxin *bceT* gene, Food, Combat ration

Bacillus cereus 그룹은 그람 양성 및 포자 형성 세균으로 다양한 자연환경 및 식품에 존재한다. 포자 형성으로 장기간 생존이 가능하며, 열에 대한 저항성이 강하고 산소 조건에서 잘 증식하는 호기성세균으로 7-49°C에서 자란다. 주로 6개의 종으로 나뉘며, 식중독을 일으키는 *B. cereus*와 동물 및 인간에게 병원성이 있는 *B. anthracis*, 가근성 콜로니를 형성하는 *B. mycoides* 및 *B. pseudomycoides* 가 있으며, 살충

특성을 지닌 곤충독소단백질을 생성하는 *B. thuringiensis* 및 저온에서도 자랄 수 있는 *B. weihenstephanensis* 등이 있다¹⁾.

*B. cereus*는 식중독을 유발시키는 독소형 식중독균 중의 하나이며, 설사형 또는 구토형 식중독을 일으킨다²⁾. 설사형 식중독은 소장에서 *B. cereus*의 영양 성장 중에 생성되는 장독소에 의해 발생하며, 증상은 복통, 설사 등이 있고 일반적으로 오염된 음식을 섭취한 다음 8-16시간 후에 나타난다^{3,4)}. 구토형 식중독은 오심, 구토 등 복통을 일으키고 잠복기간이 1-6시간이다. *B. cereus*가 생산하는 장독소 중에서 haemolysinBL (*hbl*), non-haemolytic enterotoxin (*NHE*), enterotoxin FM (*entFM*) 및 cytotoxin K (*cytK*)는 분자 수준에서 비교적 잘 특성화되어 있다⁵⁻⁸⁾. 또한 *bceT* 유전자는 *bceT* (41 kDa)를 발현하는 것으로 보고되었으며, 이는 Vero 세포 세포독성을 나타내고 설사 증후군에도 연관되어 있다⁷⁾. *B. thuringiensis*는 곤충독소 단백질을 생성

*Correspondence to: Joonbae Hong, Department of consumer safety surveillance, Consumer Safety Center, Korea Consumer Agency, Eumseong, 27738, Korea
Tel:+82-43-880-5830, Fax:+82-43-880-0823
E-mail:jbhong@kca.go.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.

하며⁹⁾, 일부 *B. thuringiensis*는 식중독을 일으키는 장독소를 생성할 수 있다^{10,11)}.

Lee 등¹²⁾에 따르면 *B. cereus*의 *bceT*, *hbl* 및 *cytK* 유전자가 검출되는 비율은 각각 87.1%, 48.7% 및 66.7%였으며, 또 다른 연구에서는 *bceT* 유전자가 *B. thuringiensis* (95%)와 *B. cereus* 그룹(88%)에서 자주 검출된다고 보고했다¹³⁾. Agata 등¹⁴⁾은 *bceT* 유전자가 식중독을 일으키는 것을 확인하였으며, 이를 이용하여 *B. cereus* 그룹에서 장독소 유전자 함유 *Bacillus* spp.를 확인하는데 중요한 유전자라 볼 수 있다. 식품에서 장독소 유전자 함유 *B. cereus*를 검출하기 위해 특정 DNA 서열을 검출하는 PCR, real-time PCR 등의 방법이 사용되었다¹⁵⁾. 더욱이 *entT*, *entFM*, *HCD*, *NHE* 및 *cytK* 유전자를 검출하는 다중 PCR 검출 방법이 개발되었다¹⁶⁾.

식품의약품안전처의 식품안전나라 통계자료¹⁷⁾에는 2020년-2023년 동안 *B. cereus*로 인한 식중독의 발생 건수는 30건이었으며, 374명의 환자가 발생하였다. 토양세균의 일종으로 주로 토양, 먼지, 하수 등 자연계에 널리 분포하여 주로 벼, 곡류 등의 식물에 오염되어 있으며, 교차오염으로 식품에 오염되어 식중독을 일으킨다. 특히 볶음밥, 비빔밥, 잡곡밥, 덮밥, 김밥 등 쌀(밥류)과 김치, 샐러드, 된장무침 등 다양한 식품에 오염되어 있는데 주로 식물기반인 쌀(밥류)과 향신료, 육류, 유가공품, 알가공품 등에서 오염되어 식중독을 발생시키고 있다¹⁸⁾. 최근 언론보도에 따르면 볶음밥에 오염된 *B. cereus*으로 식중독 사망사고가 발생하여 사회적 문제가 대두되고 있어¹⁹⁾ 쌀(밥류)에 대한 *B. cereus* 안전관리가 필요하다.

등산캠핑·낚시 등 야외활동이 크게 늘면서 간편하게 조리하여 섭취하는 즉석조리식품과 더불어 줄만 당기면 금세 데워지는 전투식량이 캠핑식품으로 소비자의 인기를 끌고 있다. 전투식량은 원래 목적대로 군인에게 훈련과 전쟁시에 식사 대응으로 제공되며 주로 쌀류인 비빔밥이나 기타가공품으로 구성되어 있다. 한국소비자원의 전투식량 연구결과, 15개 제품 중 5개 제품이 *B. cereus*가 검출되었으나 식품기준(1,000 colony-forming units (CFU)/g) 이하로 기준에 적합하였다(unpublished data). 호주의 Tracey 등의 연구²⁰⁾에서도 5개의 전투식량 제품에서 호주의 식품 기준(100 CFU/g) 이내로 *B. cereus*가 검출되기도 하였다. 하지만 부주의한 위생 및 보관 등으로 세균증식이 되어질 조건이 되면 식중독이 발생할 우려가 있다.

식중독을 일으킬 수 있는 장독소 유전자 함유 *B. cereus* 그룹의 신속 검출은 예방적 식중독 안전관리에 있어서 필요하다. *B. cereus*를 검출하기 위하여 MYP (Mannitol Egg Yolk Polymyxin) agar (Oxoid, Basingstoke, UK)를 선택배지로 사용하였고, 생화학적 분석을 하였다. Nutrient agar (Oxoid, Basingstoke, UK)에서 30°C, 24시간 배양한 다음 상온에서 2-3일 추가 배양한 후 염색하여 현미경(×1000배)

으로 관찰하였다. 그리고 곤충독소단백질이 확인된 경우 *B. thuringiensis* 으로 동정하였다²¹⁾. 이러한 시험과정은 노동집약적이면서도 약 10일의 장시간이 소요되고 현미경으로 균을 관찰하여 균의 형태학적 특성으로 고려하여 동정하기 때문에 전문성이 요구된다.

장독소 유전자 함유 *B. cereus* 그룹을 검출하려면 PCR, real-time PCR 및 등온 증폭(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)과 같은 분자생물학적인 방법이 유용하다. LAMP는 DNA 증폭을 기반으로 하는 PCR의 대체 방법이며²²⁾, PCR과 real-time PCR 등의 분자생물학적 방법처럼 유전자를 검출하기 때문에 특이성이 뛰어나고 효율적이며, 등온(60-65°C)에서 DNA를 증폭으로 반응완결이 신속하기에 빠른 시간내에 검출할 수 있는 특징이 있다. 4개의 primer와 Bst DNA 중합효소를 사용하여 표적 유전자의 stem-loop DNA 구조의 생성물을 형성하며, 한 시간 내에 10⁹개의 타겟 DNA를 생성하여 신속하게 판별할 수 있고, PCR 또는 real-time PCR처럼 고가의 시험기기가 아닌 등온 반응에 필요한 상대적으로 저가인 항온수조만으로도 실험이 가능하다. LAMP는 *Salmonella* spp.²³⁾, *Escherichia coli*²⁴⁾를 검출하기 위해 개발되었으며, *Vibrio parahaemolyticus*²⁵⁾, *Vibrio vulnificus*²⁶⁾, *Campylobacter jejuni* 및 *C. coli*²⁷⁾, *Clostridium perfringens*²⁸⁾ 등 다양한 세균에서도 적용되고 있다.

본 연구에서는 *bceT* 유전자를 기반으로 장독소 유전자 함유 *B. cereus* 그룹인 *B. cereus*, *B. thuringiensis* 검출을 위한 LAMP 방법을 개발하고, 기존 PCR 및 real-time PCR과 비교하였으며, 다양한 식품뿐만 아니라 전투식량을 포함한 즉석조리식품에도 적용하고자 하였다.

Materials and Methods

특이성 및 검출한계 확인을 위한 균주 및 DNA 추출

LAMP의 특이성을 확인하기 위하여 47개의 표준 균주를 사용하였다(Table 1). LAMP의 검출한계를 위해 배양된 *B. cereus* ATCC 13061 (또는 *B. thuringiensis* ATCC 700872)을 10 mL의 0.1% 완충 펩톤수에 현탁시키고 1.0×10⁶-1.0×10¹ CFU/mL으로 10배 연속 희석하였다. 배양 희석액의 포함된 *B. cereus* (또는 *B. thuringiensis*)의 수는 37°C에서 24시간 배양한 nutrient agar (Oxoid)의 집락수로 측정했다.

Template DNA를 추출하기 위해서 특이성 단계에서는 각각의 균주를 밤새 배양한 콜로니를 준비하였으며, 검출한계 단계에서는 각각의 균들을 1.0×10⁶-1.0×10¹ CFU/mL되도록 튜브에 넣어 준비하였다. 다양한 그람 양성균과 그람 음성균에서 DNA를 추출하도록 설계된 제품인 dynabeads DNA direct™ universal 키트(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 DNA를 추출하였다.

Table 1. Bacterial strains (n=47) used to test the specificity of the LAMP assay

Species	Strain (s)	LAMP results
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC ¹⁾ 13061, KACC ²⁾ 10001, KACC 10004, KACC 10097, KACC 11240, KACC 13066, KACC 13074, KACC 13752	+
<i>B. thuringiensis</i>	ATCC 700872, KACC 10169, KACC 10170, KACC 10173, KACC 10175, KACC 12061, KACC 12078, KACC 12087, KACC 12089,	+
<i>B. weihenstephanensis</i>	KACC 13051	-
<i>B. licheniformis</i>	KACC 10476	-
<i>B. mycoides</i>	KACC 12063	-
<i>B. amyloliquefaiens</i>	KACC 10116	-
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6051, KACC 12680	-
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 3629	-
<i>C. puniceum</i>	KACC 13160	-
<i>C. acetobylicum</i>	KACC 13413	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922, ATCC 9873	-
<i>E. coli O157:H7</i>	ATCC 43888, ATCC 43890	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313, ATCC 15311	-
<i>L. ivanovii</i>	ATCC 19119	-
<i>L. innocua</i>	ATCC 33090	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	-
<i>Lactobacillus plantarium</i>	ATCC 8014	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560	-
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	-
<i>S. paratyphi</i>	ATCC 11511	-
<i>S. typhimurium</i>	ATCC 13311	-
<i>S. newport</i>	ATCC 6962	-
<i>S. london</i>	ATCC 8389	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 13313	-
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12026	-
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 6750	-
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 25933	-

¹⁾ATCC: american type culture collection.

²⁾KACC: Korean agricultural culture collections.

Primer 디자인 및 LAMP, PCR, Real-time PCR 조건

연구에 사용된 LAMP primer는 *bceT* 유전자(GenBank access number, D17312)에 존재하는 서열에 따라 PrimerExplorer V4 소프트웨어 프로그램(<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>)에 의해 설계되었다. LAMP에 사용된 최적의

primer는 F3, 5'-GTAACAAAGAAAAAGAGATAGAGAG-3'; B3, 5'-TGAATTCGAGTTACTCCAAAT-3'; FIP, 5'-GCGCTGT TGAAACTAACTCTTTCAT GAGATTAACAAATGAATTCGC G-3'; BIP, 5'-GTATCGGTCGTTCACTCGGGGA TCATCTACA ACACCACTCAA-3' 이다. 30 pmol의 primer FIP 및 BIP, 4 pmol의 primer F3 및 B3, 2.5 µL의 10x reaction buffer, 12 mmol/L MgSO₄, 1.0 M betaine, 1.0 mmol/L의 dNTPs, 100 ng의 template DNA, 8 U의 Bst DNA 중합효소(New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)를 사용하였다. LAMP 반응은 혼합물을 항온수조(Jeiotech, Daejeon, Korea)에서 65°C, 60분 동안 반응시킨 다음 80°C에서 4분 동안 반응시켰다.

LAMP 반응후 전기영동을 하기 위해 마이크로칩 전기영동 시스템인 MultiNa (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하였고, DNA 2500 키트(Shimadzu)를 사용하였다. LAMP 반응 생성물을 MultiNa® 기기에 넣어 전기영동 반응 후 MultiNa Viewer 소프트웨어²⁹⁾를 사용하여 분석하였다. LAMP 반응 생성물이 들어있는 튜브에 2 µL SYBR green (Takara, Kusatsu, Japan)를 첨가한 후 형광색 변화를 시각적으로 확인하였다³⁰⁾.

PCR은 100 pmol의 primer(5'-CGT ATC GGT CGT TCA CTC GG-3', 5'-GTT GAT TTT CCG TAG CCT GGG-3'), 10x reaction buffer, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 1 U의 Taq DNA 중합효소(iNtRON, Seongnam, Korea) 및 1.0 µL의 template DNA가 포함된 0.2 mL 튜브에서 최종 부피 50 µL로 수행되었다³¹⁾. PCR 조건은 94°C에서 2분간의 초기 변성시킨 다음, 94°C 1분, 58°C 1분, 72°C 2분으로 35 cycle로 하였으며, 최종 72°C에서 5분간 반응한 다음 각 PCR 산물을 MultiNa®로 분석했다.

Real-time PCR은 12.5 µL TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)와 primer(5'-GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC-3'(2.5 µL, 300 nM), 5'-CTC AGG TCG GCT ACG CAT CG-3'(2.5 µL, 300 nM) 및 TaqMan probe (5'-FAM-TCG AGC GAA TGG ATT AAG AC TTG C-BHQ-3', 2.5 µL, 250 nM) 및 Template DNA를 첨가하여 반응시켰다. 반응은 QuantStudio real-time PCR (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)를 사용하여 50°C에서 2분, 95°C에서 10분 반응한 다음 95°C에서 15초, 60°C에서 60초 동안 40회 반복하였다³²⁾.

시료 준비 및 미생물 접종

개발된 LAMP의 실효성을 검증하기 위해서 분유, 고춧가루, 간장, 굴소스, 고추장, 된장, 쉐러드드레싱, 양념장, 배추김치, 무김치, 선식 2종, 즉석조리식품 8종 [Home Meal Replacement (HMR) 소고기 미역국 1종, HMR 사골곰탕 1종, 밀키트 2종, 전투식량 2종, 냉동볶음밥 2종] 총 20가지 식품을 준비하여 인위적으로 *B. cereus* 를 접종하였다.

식품 샘플은 오프라인 및 온라인에서 구입하고 운송 및 냉장 보관하여 당일 또는 도착 다음날 분석을 시작하였다. Kim 등³³⁾의 식품에 인위적으로 접종한 실험방법에 따라서 각각 식품을 10 g씩 멸균 비닐백(whirl-pak, 19×30 cm; Nasco, Fort Atkinson, WI, USA)에 넣고 *B. cereus* ATCC 13061 를 10^2 cfu/g 이하, 10^2 - 10^4 cfu/g과 10^4 cfu/g 이상의 3 종류의 농도로 접종하여 실험하였다. 각 샘플의 균질액 1 mL를 3,000 ×g에서 30초 동안 4°C에서 원심분리하고 상층액 위 부분의 유지부분과 침전물을 제거하고 가운데 부분을 조심스럽게 취하여 13,000 ×g에서 5분간 4°C에서 원심분리하고 침전물을 1 mL Tris-EDTA 완충액(pH 8.0)으로 2회 세척하였다³⁴⁾. dynabeads DNA direct[™] universal 키트(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 DNA를 추출하였다.

Results and Discussion

LAMP 특이성 분석

LAMP 생성물은 *B. cereus* 및 *B. thuringiensis* 의 17개 표준균주 모두에서 검출되었다. *B. amylofaciens*, *B. weihenstephanensis*를 포함한 30개 표준균주에는 LAMP에서 반응이 나타나지 않았다(Table 1). 이러한 결과는 PCR 및 real-time PCR로 얻은 결과와 일치했으며, 위양성 증폭은 관찰되지 않았으며 높은 특이성이 나타났다(Data not shown).

Table 2. The limits of detection by LAMP, PCR and Real-time PCR

Strains	LAMP ¹⁾ (CFU)	PCR ²⁾ (CFU)	Real-time PCR (CFU)
<i>B. cereus</i> ATCC 13061	10	100	10
<i>B. thuringiensis</i> ATCC 700872	10	100	10

¹⁾LAMP: loop-mediated isothermal amplification.

²⁾PCR: polymerase chain reaction.

LAMP 방법의 검출한계 분석

B. cereus ATCC 13061 및 *B. thuringiensis* ATCC 700872의 게놈 DNA를 연속 희석하여 LAMP, PCR 및 real-time PCR의 검출한계를 분석하였으며, 이는 *B. cereus* 및 *B. thuringiensis*의 최소 검출 가능 CFU를 확인하여 결정하였다(Table 2). LAMP의 검출한계는 10(CFU/반응)으로 나타났다. PCR과 real-time PCR의 검출한계는 각각 100(CFU/반응)과 10(CFU/반응)이었다(Fig. 2). 따라서 LAMP의 검출한계는 기존 PCR보다 최소 10배 더 높았으며 이전 연구의 실시간 PCR 분석의 검출한계와 동일하였다³⁵⁾.

LAMP의 생성물은 전기영동의 겔 분석과 육안으로 확인되었으며, 두 방법의 결과는 일치하였다(Fig. 1). PCR과 real-time PCR은 각각 4시간과 2시간 이상 소요된 반면, LAMP는 *bceT* 유전자 증폭에 1시간밖에 걸리지 않았다.

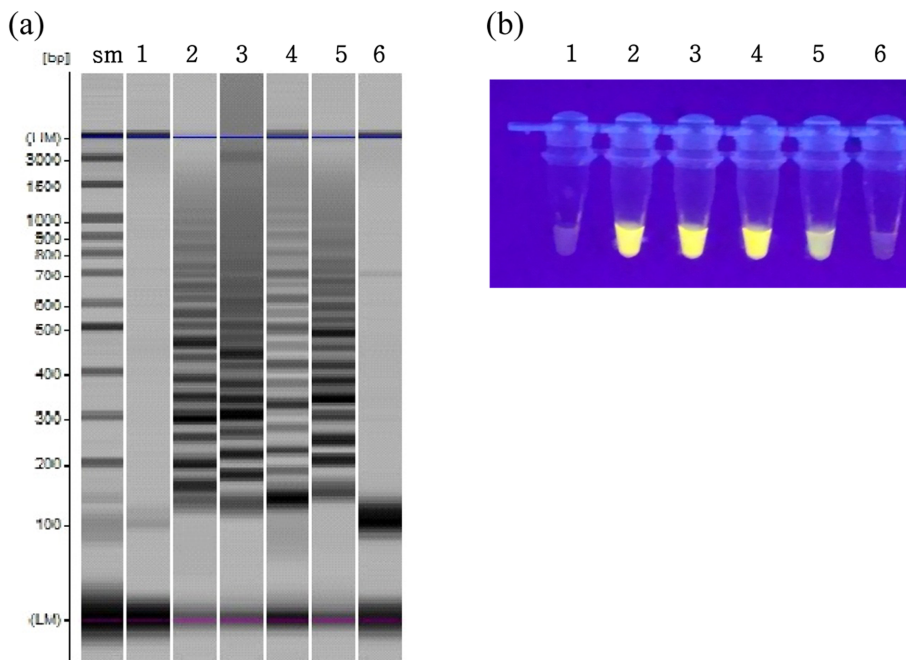


Fig. 1. LAMP assay reactions. (a) Electrophoresis of LAMP products, (b) Visual detection of LAMP products from the nucleic acid of serially diluted pure *B. cereus* ATCC 13061; water was used as a negative control. The detection limit was 10^1 CFU/mL. 1: negative control, 2: 1×10^4 CFU, 3: 1×10^3 CFU, 4: 1×10^2 CFU, 5: 1×10^1 CFU, 6: 1×10^0 CFU

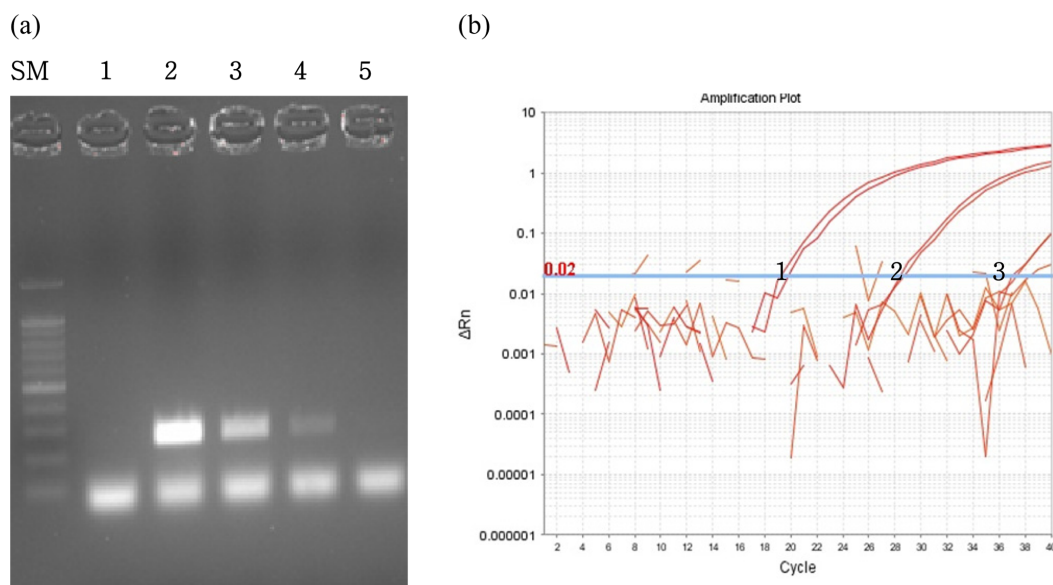


Fig. 2. Results of PCR and real-time PCR reactions. (a) Electrophoresis of PCR products; PCR results from the viable cell counts of serially diluted pure *B. cereus* ATCC 13061; water was used as a negative control. The limit of detection was 10^2 CFU/mL. SM: Size marker, 1: negative control, 2 : 1×10^4 CFU, 3 : 1×10^3 CFU, 4 : 1×10^2 CFU, 5 : 1×10^1 CFU, (b) Results of real-time PCR; The limit of detection was 10^1 CFU/mL. 1 : 1×10^5 CFU, 2 : 1×10^3 CFU, 3 : 1×10^1 CFU

LAMP 반응 생성물의 전기영동 결과, 다중 밴드의 특징적인 사다리 패턴이 나타났다(Fig. 1a). 이 사다리 패턴은 LAMP 증폭의 특징이며 표적 유전자의 Stem-loop 구조를 지닌 DNA가 생성되었음을 의미한다. 육안으로 확인하기 위해서 LAMP 반응 생성물에 반응물질을 SYBR Green I 을 사용하였으며, DNA 생성물은 SYBR Green I이 있는 경우 형광색으로 변화하기 때문에 LAMP 반응물질의 존재를 알 수 있다(Fig. 1b).

인위적으로 접종시킨 식품에서의 LAMP 분석

일반식품 12종, 전투식량이 포함된 즉석조리식품 8종 총 20개 식품에 독소 유전자 함유 *B. cereus* ATCC 13061 를 인위적으로 오염시켜 LAMP 분석하였다(Table 3). 인위적으로 오염시킨 모든 식품 시료에서 모두 LAMP 양성 반응이 나타났다. 검출한계는 고춧가루, 배추김치, 깍뚜기, 선식 및 전투식량은 간장, 굴소스, 선식, 밀키트, 전투식량, 냉동볶음밥의 경우 10^2 CFU/g 이었으며, 분유, 고추장, 된장 샐러드 드레싱 밀키트 제품은 10^2 CFU/g - 10^4 CFU/g 사이에서 검출되었고, 그 외는 간장 굴소스, 마리네이드, 소고기미역국, 곰탕에서는 10^4 CFU/g 이상이였다. 특히 동물성 유지 및 나트륨, 설탕 등의 식품 매트릭스를 함유한 소고기미역국, 곰탕, 고추장, 된장 등의 식품에는 LAMP 반응에 저해가 있는 것으로 보였다. 유지가 들어있지 않은 식품(고춧가루, 선식 등)보다 민감성이 떨어지는 것으로 나타나 LAMP 반응에 영향이 있는 것으로 판단된다.

B. cereus 는 독소형 세균이므로 감염형 세균과 달리 정량기준이 설정되어 있다. 식품 기준 및 규격에는 *B. cereus*

Table 3. Detection of enterotoxigenic *B. cereus* in experimentally inoculated foods by using LAMP

Food category	Foods	LAMP results
General processed foods	Milk powder	++
	Pepper powder	+
	Soy sauce	+++
	Oyster sauce	+++
	Pepper paste	++
	Soy paste	++
	Salad dressing	++
	Marinade	+++
	Cabbage Kimchi	+
	Raddish Kimchi	+
Instant cooked foods	Sunsik 1	+
	Sunsik 2	+
	Beef seaweeds soop	+++
	Meat boiled soup	+++
	meal kit set 1	++
	meal kit set 2	++
	Combat ration 1	+
	Combat ration 2	+
Frozen mixed rice	Frozen mixed rice 1	++
	Frozen mixed rice 2	++

-: Not detected, +: Detected less than 10^2 CFU/g, ++: Detected between 10^2 CFU/g and 10^4 CFU/g, +++: Detected more than 10^4 CFU/g.

경우 장류(메주 제외) 및 소스, 복합조미식품, 김치류, 젓갈류, 절임류, 조림류에 한하여 10,000(CFU 이하/g)이며, 식육(제조, 가공용원료는 제외한다), 살균 또는 멸균처리하였거나 더 이상의 가공, 가열조리를 하지 않고 그대로 섭취하는 가공식품에는 1,000(CFU 이하/g) 이하가 된다²²⁾.

아침식사 대응으로 섭취되고 있는 선식은 곡류 가공식품으로 가열하지 않고 분쇄 등의 물리적인 방법으로 제조되기 때문에 위생관리가 되지 않으면 *B. cereus*가 오염될 수 있다. 실제로 일부의 선식에서 *B. cereus*가 1,000(CFU/g) 이상 검출되어 식품기준 및 규격에 부적합한 경우도 발생한 사례가 있기 때문에 식품안전관리에 주의가 필요한 식품이기도 하다¹²⁾. 또한 전투식량의 경우 Tracey 연구²⁰⁾ 및 한국소비자원 결과를 보듯이 모두 정량기준 이하로 문제는 없었으나 보관, 유통, 사용자의 부주의 등으로 식중독 등이 발생할 수도 있으며, Heini 등³⁶⁾의 연구에서도 스위스군 급식시설에서 제공된 식품 중 바실러스 독소유전자가 검출된 사례가 있다. Fröhlich 등³⁷⁾은 독일군인에게 제공되는 식품을 통해 식중독이 발생한 사례를 조사한 결과, 발생한 식중독 원인균의 42.2%가 *B. cereus*로 가장 많은 식중독을 일으켰으며, 이를 예방하기 위하여 새롭게 안전관리기준을 설정하여 적용함으로써 식중독을 감소시키기도 하였다. 이처럼 식중독 예방을 위해서는 맞는 기준설정 및 위해요소를 제거하는 노력 등의 섬세한 안전관리가 필요하다. 이와 더불어 현재 우리나라 군인에게 제공된 식품에서 *B. cereus* 관련 식중독이 발생된 사례도 없고 전투식량에서도 정량기준이하로 문제가 없으나 보관, 유통, 부주의한 사용 등은 균의 증식과 더불어 식중독으로 직결될 수도 있으며, 이는 전투력 상실과 연관되므로 예방적인 차원에서 식품안전관리를 지속적으로 추진해야 할 필요성이 있다.

통계청에서 제공하는 국가통계포털(수록기간은 2019년-2021년까지이며, 자료갱신일은 2023.09.12.)에 따르면, 식료품 제조업체수가 31,659개이며, 소공상인업체수는 30,611개로 전체의 96.6%로 매우 높다³⁸⁾. 특히 식품산업에서는 식품 안전과 품질 관리가 매우 중요하지만, 소규모 사업자는 대기업에 비해 예산이 부족하여, 고가의 병원성 세균 검출 장비를 구입하거나 전문 인력을 고용하고 유지하기 어렵다. LAMP는 식품 매개 병원체 검출을 위한 신속하고 구체적이며 민감하고 비용적으로 효율적이며 PCR 방법의 대체 분석법이라 할 수 있다. LAMP 반응과 결과 분석까지의 총 소요시간이 한 시간인 반면, PCR 방법은 증폭 반응과 전기영동 등 최종 확인에까지 3-4 시간이 필요하다. 또한 등온으로 반응하기에 DNA 변성이나 손상이 없어 DNA 증폭의 효율이 높다^{39,40)}. LAMP 방식은 heat block이나 항온수조 등 저렴한 장비로도 실험할 수 있어 현장 테스트에 활용할 수 있다. 실험실 환경이 아닌 현장에서 손쉽게 사용 가능한 LAMP 방법은 소규모 기업에 도움이 될 것으로 판단된다.

이 연구에서 표준균주 47종에 대한 특이성을 조사하였으며, 17개의 장독소 유전자 함유 *B. cereus* 및 *B. thuringiensis*에는 LAMP로 분석한 결과 모두 양성이었으며 나머지 다른 균주에서 음성으로 나타났다. LAMP의 검출한계는 10(CFU/반응)으로 PCR의 검출한계보다 10배 더 민감하지만, real-time PCR과는 유사하게 나타났다. 인위적으로 접종된 식품에 적용했을 때 검출한계가 10² CFU 으로 현장에서 사용하기에 적합한 방법이라고 볼 수 있다. 다만 식품의 매트릭스에 따라서 유지 등이 첨가된 제품의 경우, LAMP 반응을 억제할 수 있기에 유지 등을 제거할 필요가 있다⁴¹⁾.

결론적으로 LAMP는 장독소 유전자 함유 *B. cereus* 그룹의 신속하고 구체적인 검출을 위한 유용하고 강력한 도구이다. 이 기술은 특히 전문인력 및 자원이 제한된 소규모 회사의 실험실에서 수행될 수 있기에 신속하면서도 정확한 진단을 하게 되어 소규모 기업의 식품안전 경쟁력을 상승시킬 수 있다. 기존 PCR 및 real-time PCR과 달리 LAMP는 엄격한 반응 조건이 필요하지 않으며 식품 미생물 전문 지식이나 특수 장비가 필요하지 않다. LAMP의 간단한 플랫폼은 식품 산업 및 규제 기관이 고위험 식품 소비와 관련된 장독소성 *B. cereus* 과 뿐만 아니라 다양한 병원성 세균 및 바이러스에도 손쉽게 잘 제어할 수 있는 안전관리가 될 수 있을 것으로 기대한다.

Acknowledgement

기술지원을 해 주신 최민정님과 조연진님께 감사드리며, 본 논문이 완성될 수 있도록 지도해주신 국방대 안준형 교수님과 국가안전보장문제연구소 국방과학연구센터 문오석 교수님께 감사드립니다. 본 연구는 식품의약품안전처(가축11084)의 지원을 받아 수행되었다.

국문요약

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)는 PCR보다 빠르고 간편한 새로운 분자 검출 방법이다. 본 연구에서는 식품에서 오염된 *Bacillus cereus* 그룹 중 식중독을 유발할 수 있는 bceT 유전자를 가진 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*를 신속하게 검출하기 위한 LAMP 방법을 개발하고 평가하였다. LAMP 방법은 외부 프라이머와 내부 프라이머를 포함한 4개의 프라이머를 사용하기 때문에 다른 검사 방법보다 특이성이 높다. 시험결과, LAMP의 특이도는 100%였으며, 검출한계는 10(CFU/반응)이었다. 이 분석은 다양한 식품에서 인위적으로 접종하여 장독소 유전자 함유 *B. cereus* 그룹을 분석하는 데 사용하였다. 일반가공식품 뿐만 아니라 즉석조리식품 중 전투식량, 냉동볶음밥 등 포함한 20개의 모든 식품에서 적용하여 검출하였

다. 결론적으로, 장독소 유전자 함유 *B. cereus* 와 *B. thuringiensis* 특이적 LAMP는 소상공인 제조업체뿐만 아니라 식품 관련 기관 등에서도 진단방법으로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Joonbae Hong <https://orcid.org/0000-0002-0981-7637>

References

- Vilas-Boas, G.T., Peruca, A.P., Arantes, O.M., Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.*, **53**, 673-687 (2007).
- Drobniewski, F.A., *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.*, **6**, 324-338 (1993).
- Granum, P.E., Brynestad, S., Kramer, J.M., Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int. J. Food Microbiol.*, **17**, 269-279 (1993).
- Koneman, E., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, Jr W.C., 1997. The aerobic Gram-positive bacilli. Color atlas and textbook of diagnostic Microbiology, 5th Ed, Lippincott, New York. pp. 651-708.
- Lund, T., Debuyser, M.L., Granum, P.E., A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.*, **38**, 254-261 (2000).
- Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I., Isobe, M., A novel, Dodecadesepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, **121**, 31-34 (1994).
- Agata, N., Ohta, M., Arakawa, Y., Mori, M., The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. *Microbiol.*, **141**, 983-988 (1995).
- Asano, S.I., Nukumizu, Y., Bando, H., Iizuka, T., Yamamoto, T., Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *App. Environ. Microbiol.*, **63**, 1054-1057 (1997).
- Jackson, S.G., Goodbrand, R.B., Ahmed, R., Kasatiya, S., *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Lett. Appl. Microbiol.*, **21**, 103-105 (1995).
- Perani, M., Bishop, A.H., Vaid, A., Prevalence of β -exotoxin, diarrhoeal toxin and specific δ -endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **160**, 55-60 (1998).
- Damgaard, P.H., Larsen, H.D., Hansen, B.M., Bresciani, J., Jørgensen, K., Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Lett. Appl. Microbiol.*, **23**, 146-150 (1996).
- Lee, N., Sun, J.M., Kwon, K.Y., Kim, H.J., Koo, M., Chun, H.S., Genetic diversity, antimicrobial resistance, and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* strains isolated from sunsik. *J. Food Prot.*, **75**, 225-230 (2012).
- Kim, M.J., Han, J.K., Park, J.S., Lee, J.S., Lee, S.H., Cho, J.I., Kim, K.S., Various enterotoxin and other virulence factor genes widespread among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *J. Microbiol. biotechnol.*, **25**, 872-879 (2015).
- Agata, N., Ohta, M., Arakawa, Y., Mori, M., The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. *Microbiol.*, **4**, 983-988 (1995).
- Martínez-Blanch, J.F., Sánchez, G., Garay, E., Aznar, R., Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. *Int. J. Food Microbiol.*, **135**, 15-21 (2009).
- Wehrle, E., Moravek, A.D.M., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Detection of *Bacillus cereus* with enteropathogenic potential by multiplex real-time PCR based on SYBR green I. *Mol. Cell. Probes.*, **24**, 124-130 (2010).
- Ministry of Food and Drug Safety. (2024, July 25). The statistics of the foodborne disease in Korea. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.do?menu_no=4425&menu_grp=MENU_NEW02
- The Ministry of Food and Drug Safety. 2023. Food poisoning standard work guidelines, pp. 59.
- SBS, (2024, July 25). Sudden death 10 hours after eating... What is the scary 'fried rice syndrome'?. Retrieved from https://news.sbs.co.kr/news/endPage.do?news_id=N1007409672&plink=COPYPASTE&cooper=SBSNEWSSEND
- Tracey, L., De Diana, J., (2024, September 19). Quality assurance of current combat ration pack components, Australian government department of defense, DST-group-TR-3427. Retrieved from <https://www.dst.defence.gov.au/publication/quality-assurance-current-combat-ration-pack-components-2009/10-submission>
- Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2022. Standards and specifications for food, Notice No. 2022-84, Cheongju, Korea
- Mori, Y., Notomi, T., Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) a rapid accurate and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chem.*, **15**, 62-69 (2009).
- Hara-Kudo, Y., Yoshino, M., Kojima, T., Ikedo, M., Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **253**, 155-161 (2005).
- Hara-Kudo, Y., Nemoto, J., Ohtsuka, K., Segawa, Y., Taka-tori, K., Kojima, T., Ikedo, M., Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing *Escherichia coli* using loop-mediated isothermal amplification. *J. Medical Microbiol.*, **56**, 398-406 (2007).

25. Nemoto, J., Sugawara, C., Akahane, K., Hashimoto, K., Kojima, T., Ikedo, M., Konuma, H., Hara-Kudo, Y., Rapid and specific detection of the thermostable direct hemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* by loop-mediated isothermal amplification. *J. Food Prot.*, **72**, 748-754 (2009).
26. Han, F., Ge, B., Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Vibrio vulnificus* in raw oysters. *Foodborne Pathog. Dis.*, **5**, 311-320 (2008).
27. Yamazaki, W., Taguchi, M., Ishibashi, M., Kitazato, M., Misawa, N., Inoue, K., Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Med. Microbiol.*, **57**, 444-451 (2008).
28. Hong, J., Development and application of the loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in food, *J. food Saf.*, **37**, e12362 (2017).
29. Bekaert, B., Coomans, M., Knaepen, K., Larno, L., Thijs, N., 2009. Validation of a microchip electrophoresis system as a DNA amplification control. Forensic Science International Genetics Supplement Series 2. pp. 119-120.
30. Tomlinson, J.A., Barker, I., Boonham, M., Faster simpler more-specific methods for improved molecular detection of *Phytophthora ramorum* in the field. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4040-4047 (2007).
31. Guinebretiere, M.H., Broussoll, V., Nguyen-The, C., Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3053-3056 (2002).
32. Fernández-No, I.C., Guarddon, M., Böhme, K., Cepeda, A., Calo-Mata, P., Barros-Velázquez, J., Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR. *Food Microbiol.*, **47**, 605-610 (2011).
33. Kim J., Oh, S., Comparison of loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR for the rapid detection of *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and *Cronobacter sakazakii* artificially inoculated in foods. *J. Food Hyg. Saf.*, **34**, 135-139 (2019).
34. Hong, J., Kim, J.M., Jung, W.K., Kim, S.H., Bae, W., Koo, H.C., Gil, J., Kim, M., Ser, J., Park, Y.H., Prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. isolated from chicken meat pork and beef in Korea from 2001 to 2006. *J. Food Prot.*, **70**, 860-866 (2007).
35. Martínez-Blanch, J.F., Sánchez, G., Garay, E., Aznar, R., Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. *Int. J. Food Microbiol.*, **135**, 15-21 (2009).
36. Heini, N., Stephan R., Johler, S., Toxin genes and cytotoxicity levels detected in *Bacillus cereus* isolates collected from cooked food products delivered by Swiss Army catering facilities. *Italian J. Food Safe*, **7**, 7323.
37. Fröhlich, C., Lauck, S., Dorn-In, Guldimann, C., Impact of the revision of european food hygiene legislation and the introduction of convenience-based food on food safety in the German Military, *J. Food Prot.*, **86**, 100073 (2023).
38. KOSIS (Korean statistical Information Service), (2024, July 25). Korean manufacturing statistics, Retrieved from https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=142&tblId=DT_BR_A003&vw_cd=MT_OTITLE&list_id=142_002_005_001&scrId=&seqNo=&lang_mode=ko&obj_var_id=&itm_id=&conn_path=K2&path=%252Fcommon%252Fmeta_onedepth.jsp
39. Kiatpathomchai, W., Jareonram, W., Jitrapakdee, S., Flegel, T.W., Rapid and sensitive detection of Taura syndrome virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods*, **146**, 125-128 (2007).
40. Aoi, Y., Hosogai, M., Tsuneda, S., Real-time quantitative LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria. *J. Biotechnol.*, **125**, 484-491 (2006).
41. Alarcon, B., Vicedo, B., Aznar, R., PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *J. Applied Microbiol.*, **100**, 352-364 (2006).