

# 식품 & 음료 및 제약 산업을 위한 DNA 마이크로어레이 기반 신속 미생물 검사 시스템의 개발

Yuko Hirakawa<sup>\*1</sup> Chika Maemura<sup>\*1</sup> Tomoyuki Taguchi<sup>\*1</sup>

식품, 음료 및 의약품에 대한 미생물학적 검사는 일반적으로 배양법을 사용하여 수행합니다. 그러나 배양법은 검사 시간, 기술 및 방법론 측면에서 문제가 있어 기술적인 혁신이 필요합니다. 우리는 신속하고 간단한 미생물학적 검사 시스템을 구현하기 위한 원천 기술로써 신호 프로브 방법(탐침법)을 기초로 한 DNA 마이크로어레이를 개발하였습니다. 이 논문에서는 검사 시스템 성능 개선을 위한 새로운 DNA 추출 및 증폭 공정 기술을 소개하고, 오염된 세균을 분류하기 위해 DNA 마이크로어레이를 사용하는 방법을 제시합니다. 신속한 미생물학적 검사는 검사 결과를 신속하게 피드백 할 수 있는 기회를 제공할 수 있고, 이는 임상 실습의 다른 측면에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 기대됩니다. 또한 검사 과정과 작업을 단순화시킬 수 있다면, 특수한 전문 기술이나 다른 기술이 필요하지 않으면서 미생물을 신속하게 및 광범위하게 검사하는 방법을 사용할 수 있는 기회를 제공할 수 있을 것으로 기대되는 바입니다.

## 개요

식품, 음료 및 의약품은 우리 일상생활에서 핵심적인 역할을 하고 있고, 따라서 소비자의 안전과 건강을 보호하기 위해 이러한 제품은 제조된 직후부터 소비자에게 제공될 때까지 품질을 유지하는 것이 중요합니다. 다양한 관점에서 볼 때, 일본 제조 현장의 품질 관리의 전문 지식을 기반으로 하고 있으며, 많은 기업은 이러한 역량을 기업의 강점 중 하나로 언급하고 있습니다. 이러한 배경 가운데 미생물 오염이 발생할 경우 제품이 손상될 뿐 아니라, 미생물로부터 발생하는 독소가 체내로 흡수될 경우 건강에 위협이 될 수 있기 때문에 이는 품질 관리에 있어 핵심적인 문제로 부상하고 있습니다. 산업에 특화된 미생물 오염 관리 표준이 수립돼 있고, 여기에는 보건복지부의 의약품에 대한 GMP(Good Manufacturing Practice - 우수 의약품 제조·관리 기준) 조례 및 식품에 대한 HACCP(Hazard Analysis and

Critical Control Point - 위험요소 중점 관리 기준) 시스템이 포함됩니다. 이러한 표준은 필요에 따라 검토한 후 안전성을 향상시키는 데 사용됩니다. 특히 2021년 6월 HACCP의 의무적 시행이 시작되면서, 음식 및 음료 산업의 미생물 관리 관행은 점점 더 중요한 검토 대상이 되었습니다<sup>(1)</sup>.

현재 제조 시설에서 미생물 오염을 검사하는 가장 일반적인 접근 방식은 배양법입니다. 배양법은 미생물을 시각적으로 확인할 수 있을 정도로 번식시킨 후 오염 여부를 확인하고 오염된 종을 식별합니다<sup>(2)</sup>. 그러나 이 방법에는 몇 가지 문제가 있습니다. 예를 들어, 검사 결과를 얻는 데 며칠에서 몇 주가 걸립니다. 또한, 오염된 세균을 특정하기 위해서는 화학 및 생물학에 대한 특수한 지식이 필요하고, 무균 절차와 생장 조건을 고려해야 합니다. 배양법의 약점을 보완할 수 있는 빠르고 간단한 검사 방법을 실현할 수만 있다면 미생물 오염의 확산으로 인한 손실을 줄일 수 있을 뿐 아니라, 제품 출하 결정에 필요한 시간을 단축해 재고 비용을 절감할 수 있는데, 이러한 기술은 많은 기업이 속히 개발될 것을 매우 기대하고 있는 바입니다.

<sup>\*1</sup> Life Research & Development Department, Innovation Center, Marketing Headquarters

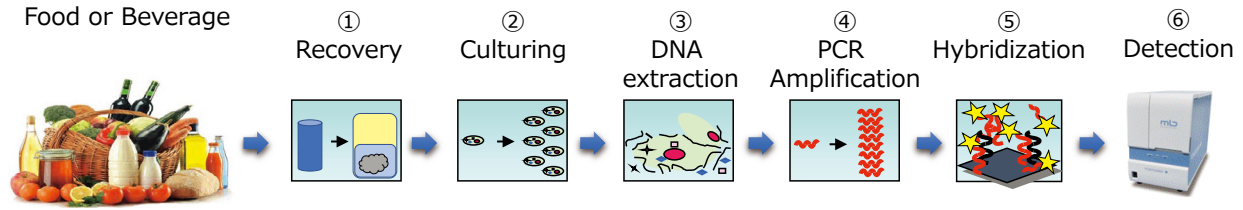


그림1 미생물 오염 검사 시스템의 탐지 과정

DNA 마이크로어레이 법은 빠른 미생물 검사법 중 하나입니다. 이 방법을 사용하여 다양한 샘플을 신속하게 분석할 수 있지만, 특정 DNA를 표지시키는 복잡한 작업 및 세척 과정 등이 포함됩니다<sup>(3)</sup>. 따라서 DNA 마이크로어레이를 사용한 미생물 검사법을 단순화시키기 위해 우리는 신호 DNA 프로브를 사용하고 복잡한 DNA 표지 또는 세척 작업이 필요하지 않은 감지 시스템을 개발하고 있습니다(그림 1)<sup>(4)(5)</sup>. 이 논문에서는 전체 검사 시스템을 단순화하기 위해 개발한 게놈 DNA 추출 기술과 PCR(polymerase chain reaction - 중합효소 연쇄반응) 기술 및 그 결과물, 그리고 테스트 결과의 유용성을 향상시키는 분류 설계에 대하여 보고합니다. 마지막으로 이 새로운 미생물 검사 방법의 잠재적인 산업 응용에 대하여 설명할 것입니다.

## 고온 가압 DNA 추출법

### 미생물로부터의 DNA 추출

우리가 개발 중인 미생물 검출 시스템은 PCR을 사용하여 오염된 샘플에 포함된 미생물의 타겟 DNA 서열을 증폭시켜 이를 감지할 수 있게 만들어 줍니다.

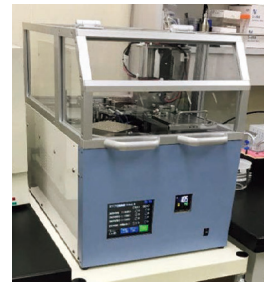
미생물의 게놈 DNA를 추출하기 위해서는 세포막 구조를 파괴해야 합니다. 미생물은 일반적으로 그람 음성 박테리아, 그람 양성 박테리아, 그리고 곰팡이와 같은 다양한 종류로 분류됩니다. 이들은 각각의 종류마다 다른 막 구조로 되어 있습니다. 세균 세포의 표면은 세포막과 세포벽으로 구성됩니다. 대장균과 같은 그람 음성 박테리아의 세포벽은 얇은(7-8 nm) peptidoglycan 층이 지질 이중 층에 인접한 구조인 반면 *Bacillus subtilis* 및 *Staphylococcus aureus*와 같은 그람 양성 박테리아는 높은 밀도의 두꺼운(20-80 nm) peptidoglycan 층을 가지고 있습니다. 곰팡이의 세포벽은 주로  $\beta$  글루칸 및 키틴으로 이루어져 있어 이와 같은 박테리아와는 매우 다른 특성을 가지고 있습니다. 따라서 효소나 다른 시약을 사용하여 세포 용해 작업을 진행할 때 대상 박테리아에 대한 복잡한 추출 프로토콜이 사용되며, 일관된 추출 조건에서 미생물 DNA를 추출하기는 어려운 작업입니다. 미생물 세포의 막 구조와 상관없이, 일관된 조건 하에서 수행할 수 있는 간단한 추출 방법이 필요합니다. 따라서 우리는 세포를 파괴하고 내용물을 추출하기 위해 물리적 기술인 고온과 고압을 사용하는 HTP(high-temperature pressurized-고온 가압) 추출법을 개발하였습니다(특허 등록 번호: 5624487).

### HTP 법을 사용한 DNA 추출

이 방법의 경우, 샘플을 관에 넣고 용해제를 첨가한 후 관을 140°C로 수십 초 동안 가열하고 나서 내용물을 추출합니다. 예전에

이와 같은 방법은 유리관의 뚜껑을 수동으로 하나씩 닫는 복잡하고 조심스러운 공정과, 고온 가열 블록에 관을 하나씩 넣는 공정이 필요했습니다. 그러나 우리는 이 공정을 자동화하기 위해 자동 HTP 기기와 내열 플라스틱 관을 개발하였습니다(그림 2).

### 자동화된 HTP 기기



### 내열 플라스틱 튜브

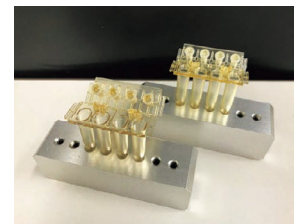


그림2 자동화된 HTP 기기 및 내열 플라스틱 튜브

DNA 추출을 위한 대상 미생물로 *S. aureus*를 배양하였으며, 이를 기존의 유리 시험관과 신규 개발된 수지 시험관에 넣었습니다. 열 블록과 자동 HTP 기기를 사용하여 유리 시험관과 수지 시험관을 각각 140°C에서 45-65초 동안 처리하였습니다. 추출된 DNA를 정량적으로 측정하기 위해, 세균 잔여물의 정제된 샘플을 실시간으로 중합효소연쇄반응(PCR)을 일으키게 한 후에, 원심분리기(20,000 × g, 10분)를 사용하여 세균 잔여물을 제거하였습니다.

양쪽 모두 밀도 높은 막 구조를 가진 그람 양성 세균인 *S. aureus*로부터 DNA를 추출할 수 있었습니다(그림 3). 더 얇은 막을 가진 그람 음성 박테리아로부터도 추출할 수 있다는 사실이 확인되어 우리의 방법이 다양한 미생물에 대하여 유용하게 사용될 수 있다는 사실을 확인할 수 있었습니다. 처리 시간이 연장됨에 따라 검출된 복사본 수가 감소하게 되었는데, 이는 시료가 고온에 장기간 노출됨으로 인한 DNA의 조각화에 기인한 것으로 추정되었으며, PCR 증폭에 영향을 줄 수 있는 것으로 판단되었습니다. 따라서 약 45초의 처리 시간이 고온 압력 처리에 적합하며, 개발된 방법을 통해 1분 이내에 배양된 박테리아로부터 DNA를 추출할 수 있다는 사실을 확인할 수 있었습니다.

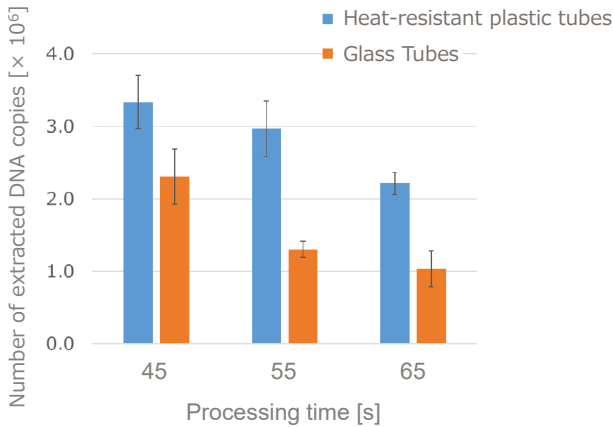


그림3 내열 플라스틱과 유리 시험관을 사용한 고온 압력 추출의 비교

## 비대칭 PCR 시스템의 구축

### 비대칭 PCR의 원리

DNA 마이크로어레이를 사용한 미생물 검출법은 오염된 미생물로부터 추출된 DNA를 템플릿으로 사용하고 대상 영역의 DNA 조각을 PCR로 증폭한 후 이를 DNA 마이크로어레이와 반응시켜 검출하는 과정입니다<sup>(3)</sup>.

이중 가닥 DNA로 처리하지 않는 경우, PCR 앰플리콘은 검출 효율이 낮습니다. 따라서 DNA 마이크로어레이의 대상으로 사용하기 위해 앰플리콘을 처리할 필요가 있습니다. 그러나 이 과정은 소량의 수용액을 처리해야 하므로 복잡하고, 값비싼 시약으로 인하여 시험 비용의 상승 요인이 됩니다. 우리는 비대칭 PCR(6)을 사용하여 이 문제를 해결하려 하였습니다. 비대칭 PCR은 프라이머 세트 중 하나의 프라이머의 양을 증가시켜 대상이 되는 단일 가닥 DNA를 먼저 증폭시키는 방법입니다(그림 4).

우리의 검출 시스템에 이 방법을 적용하는 경우, 단일 가닥 처리 과정을 생략할 수 있기 때문에 시약 비용을 절감할 수 있고 필요한 기술을 단순화할 수 있습니다.

### 비대칭 PCR 검출 시스템의 적용

우리의 검출 시스템에 비대칭 PCR법을 적용하기 위해 PCR의 프라이머 비율 조건을 조사했습니다. 우리는 1:1부터 1:20까지의 프라이머 비율로 PCR 작업을 수행하였습니다. 단일 가닥 처리 과정이 필요한 기존 프로토콜과 비교하기 위해 두 개의 반응 시험관을 준비하였고, 그중 하나에는 생물학적으로 표지된 F 프라이머를 사용하였습니다.

PCR 증폭 후 F 프라이머를 가지고 있는 샘플에 avidin - biotin 반응을 적용하여 단일 가닥 처리 작업을 수행하였습니다. 각 샘플은 혼합 용액(최종 농도 5 × SSC, 1% Triton X)을 사용하여 희석하였고, 60°C에서 5rpm으로 30분 동안 신호 전달 DNA 마이크로어레이와 반응시켰습니다. 각 스팟의 형광 강도는 형광 판독기(Yokogawa Electric Corp.)를 사용하여 측정하였습니다.

그 결과, 프라이머의 비율을 1:5 또는 1:10으로 설정하였을 때, 단일 가닥 샘플과 하이브리다이제이션의 형광 강도가 동등하였습니다(그림 5).

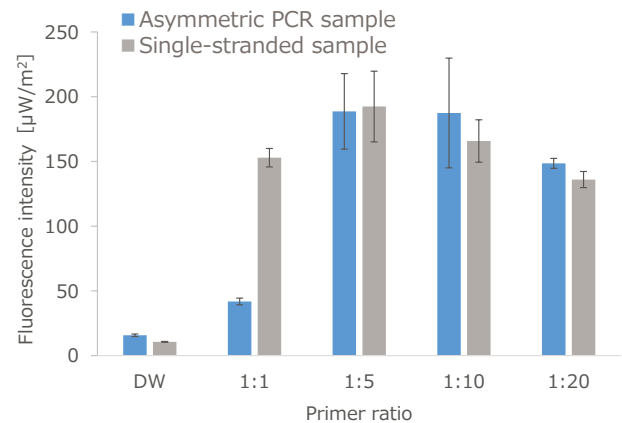


그림5 프라이머 비에 따라 검출된 형광 강도의 차이

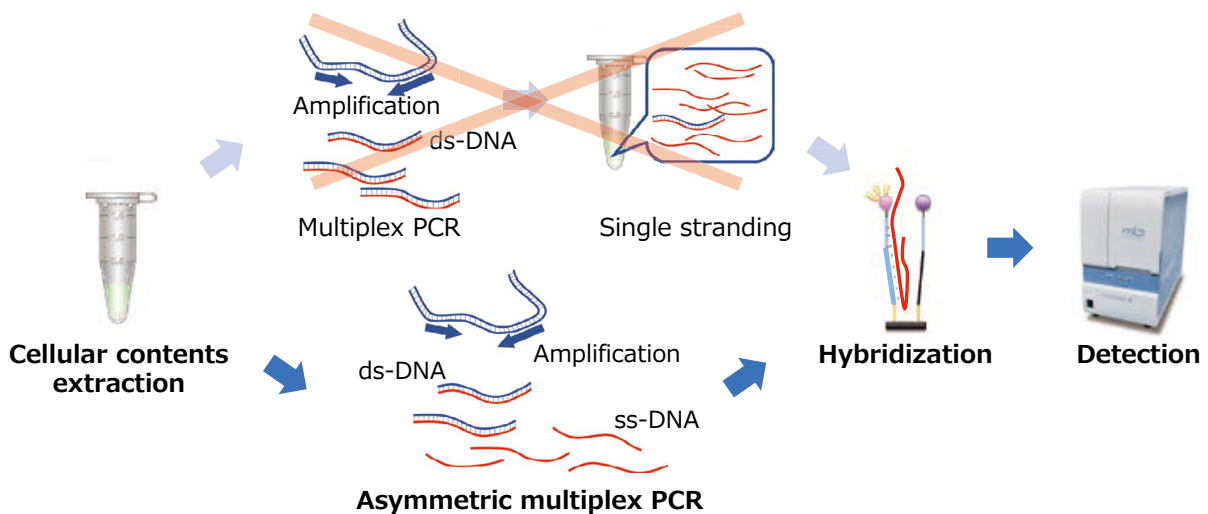


그림4 비대칭 다중 PCR의 원리

## 신호 마이크로어레이 프로브

### 신호 전달 DNA 마이크로어레이를 사용한 검출

DNA 마이크로어레이는 대상 DNA와 서로 상호 보완적인 서열을 가진 DNA 프로브들이 고체 기판 위에 배열된 형태로 고정된 분석 툴입니다. 일반적으로 DNA 마이크로어레이를 사용한 분석의 경우 형광성 분자를 사용하여 대상 핵산 분자에 표지를 달아야 하고, 마이크로어레이를 세척해야 하는 등의 복잡한 작업 때문에 전문적인 기술을 필요로 합니다. 우리는 이러한 요구를 충족시키기 위해 완전히 새로운 원리를 기반으로 한 DNA 마이크로어레이를 개발하였습니다<sup>(4)(5)</sup>.

### 신호 마이크로어레이 프로브

이 DNA 마이크로어레이의 신호 프로브의 경우, 우리는 5' 끝에 Cy3 형광 염료라고 표지된 프로브 쌍과 3' 끝에 블랙 쉐어 2가 있는 소거 프로브를 사용했습니다. 이는 고체상 표면에 고정되었습니다. 이 프로브의 서열은 매우 균질한 대상 핵산 분자와 하이브리다이제이션 작업 시 형광 되도록 설계하였습니다. 이러한 신호 프로브법은 대상 핵산의 형광 표지 및 마이크로어레이 세척과 같은 복잡한 과정이 필요하지 않기 때문에 DNA 마이크로어레이에서 요구되는 복잡한 절차를 생략할 수 있고, 따라서 실험 과정을 더 빠르고 간단하게 진행할 수 있습니다.

## 카테고리별 검출

### 미생물 오염의 원인

식품, 음료 및 의약품 제조 과정에서의 미생물 오염원은 다양한 유형으로 분류될 수 있습니다. 이는 작업자의 피부와 두피모와 같은 인체에 기인한 원인, 벽, 바닥 및 천장과 같은 환경에 기인한 원인, 물과 원자재 구성 요소와 같은 원자재에 기인한 원인, 그리고 장비의 내부, 작동 부품 및 기타 장비로부터의 오염 등이 포함됩니다.

또한 오염을 일으킬 수 있는 다양한 종류의 미생물도 존재합니다. Japanese Pharmacopoeia<sup>(7)</sup>은 원료 및 조제물이 규정된 미생물학적 품질을 충족하는지 여부를 결정하기 위해 *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus brasiliensis*, 및 *Candida albicans*를 테스트해야 할 종으로 명시하고 있습니다.

### 미생물 오염에 대한 대책

미생물 오염이 발생하는 경우, 생산 라인과 시설을 멸균해야 하는데, 이는 주로 물리적 또는 화학적 멸균으로 크게 분류할 수 있습니다.

물리적 멸균 방법으로는 뜨거운 물, 증기 및 자외선 조사가 포함됩니다. 화학적 멸균 방법은 크게 할로젠, 계면활성제 및 과산화물 기반 시스템으로 분류할 수 있습니다. 그러나 음식 및 음료 공장에서는 화학 물질 잔류의 위험을 최소화하기 위해 일반적으로 염소산나트륨 용액, 에탄올 또는 전기 분해수를 사용합니다<sup>(8)</sup>. 멸균 방식과 상관없이 일부 미생물은 다른 미생물보다 저항성이 높을 수 있기 때문에, 대상 미생물의 특성과 멸균제의 멸균 효과를 신중하게 고려한 후 적합한 방법을 선택하는 것이 필요합니다.

미생물 오염에 대한 가장 중요한 초기 대응은 오염의 원인을 파악하고 오염된 미생물에 대해 적절한 조치를 취하는 것입니다. 미생

물의 특성을 조기에 확인하면 할수록 더 용이하게 대응할 수 있고, 오염을 최대한 신속하게 통제할 수 있습니다. 그러나 제조 현장에서 미생물 오염 검사에 일반적으로 사용되는 배양법은 오랜 시간이 필요합니다. 배양 시 미생물을 아가에 배양하여 군사를 형성시킵니다. 분리된 군주를 배양한 후에는 DNA 서열 분석을 통해 정체성을 확인할 수 있습니다. 이런 방법은 미생물종을 신뢰성 있게 식별할 수 있지만, 테스트 결과를 얻는 데에만 1주일에서 10일이 소요될 수 있어, 대응이 지연될 수 있고, 다양한 리스크가 증가할 수 있습니다.

### BC 분류법에 따른 미생물 검출

우리는 미생물 특성에 대한 대략적인 식별만으로도 오염에 대한 초기 대응에 충분한 정보를 획득할 수 있을 것이라 판단하였습니다.

따라서, 우리는 빠른 대응을 고려하는 한편 Japanese Pharmacopoeia에 리스트 된 박테리아의 특성과 미생물 오염의 원인으로 제시된 박테리아의 특성을 제조 현장의 환경 및 오염 제거의 난이도 관점에서 분류하였습니다. 이를 통해 우리는 BC(Biological Contamination - 미생물학적 오염) 카테고리를 개발했습니다(특허 등록 번호 6919715)(표 1).

구체적으로 *Staphylococcus* spp.가 인체 피부 원주 박테리아로 정의되었으며, *Bacillus* spp.는 많은 종의 포자를 형성하고 열 및 화학 물질에 저항성이 있는 종으로 정의되어 포자 형성 박테리아로 분류되었습니다. 이 두 속은 그램 양성 박테리아 카테고리를 형성합니다. 한편 그램 음성 박테리아 카테고리에는 Japanese Pharmacopoeia에 리스트 된 *E. coli* 및 *P. aeruginosa*가 포함돼 있고, 저 영양성 박테리아 카테고리에는 낮은 영양 환경에서도 성장할 수 있는 *Methylobacterium* 속이 포함돼 있으며, 이는 물과 기타 물질을 오염시킬 수 있습니다. 우리는 위에서 언급한 카테고리를 모두 박테리아 카테고리로 정의하였고, 여기에 곰팡이 카테고리를 추가하여 총 일곱 개의 카테고리를 구성했습니다. 이 BC 분류법을 우리가 개발한 DNA 마이크로어레이 기반 신속 검출 시스템과 결합함으로써, 오염 초기 단계에서 오염 원인을 대략 판단하고, 빠르게 대응책을 마련하여 오염 미생물에 대한 대책을 즉각적으로 제공할 수 있게 되었습니다.

표 1 BC 분류법에 따른 미생물 종의 분류

| 카테고리 |               |                  | 약어 | 이름                                 |
|------|---------------|------------------|----|------------------------------------|
| 박테리아 | 그람 양성<br>박테리아 | 인체 피부 원주<br>박테리아 | Sa | <i>Staphylococcus aureus</i>       |
|      |               |                  | Sc | <i>Staphylococcus cohnii</i>       |
|      |               |                  | Se | <i>Staphylococcus epidermidis</i>  |
|      |               | 포자 형성<br>박테리아    | Ba | <i>Bacillus atrophaeus</i>         |
|      |               |                  | Bc | <i>Bacillus coagulans</i>          |
|      |               |                  | Bl | <i>Bacillus licheniformis</i>      |
|      |               |                  | Bp | <i>Bacillus pumilus</i>            |
|      |               |                  | Bs | <i>Bacillus subtilis</i>           |
|      |               |                  | Pc | <i>Paenibacillus chibensis</i>     |
|      | 그람 음성<br>박테리아 |                  | Ec | <i>Escherichia coli</i>            |
|      |               |                  | Pa | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>      |
|      |               |                  | Rp | <i>Ralstonia picketti</i>          |
|      |               | 저영양성             | Ma | <i>Methylobacterium aquaticum</i>  |
|      |               |                  | Me | <i>Methylobacterium extorquens</i> |
| 곰팡이  |               |                  | An | <i>Aspergillus niger</i>           |

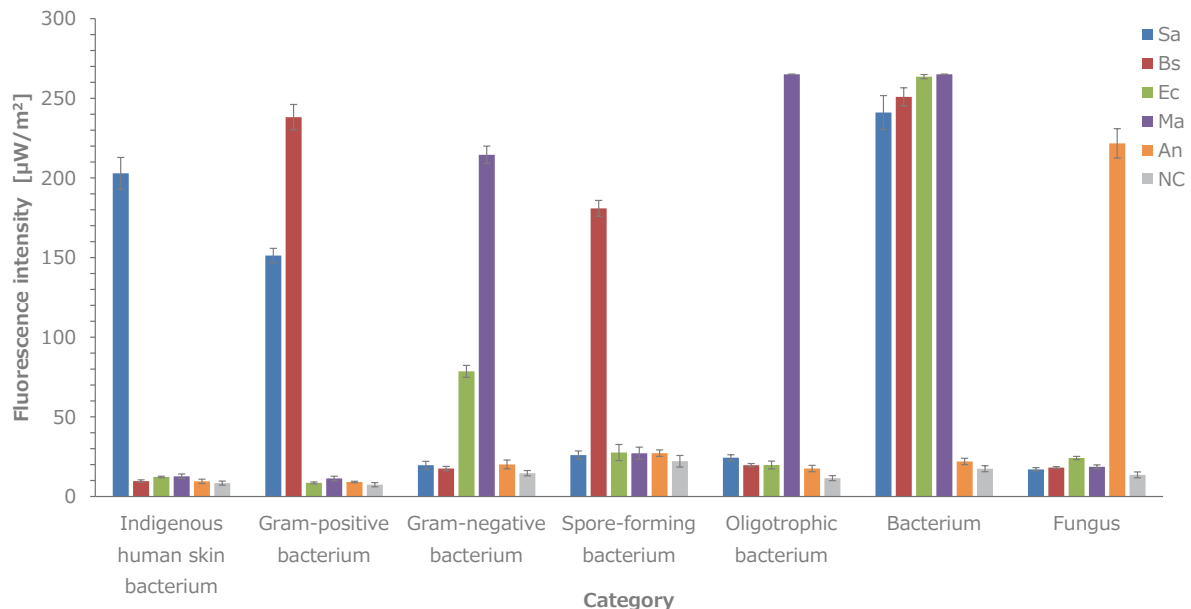


그림6 비대칭 다중 PCR법을 사용한 동시 다중 카테고리 검출 결과

NC: Negative Control - 음성 통제

## 일반적인 미생물의 검출

### 비대칭 다중 PCR법에 의한 다중 검출

앞 섹션에서 설명한 BC 카테고리의 미생물 종을 검출하기 위해 우리는 여러 유전자를 동시에 증폭시키는 프라이머 세트를 설계하였습니다. 각각의 프라이머 세트는 F 프라이머 대 R 프라이머 비율이 1:10이 되도록 준비하였으며 이들을 혼합하여 비대칭 다중 PCR 작업을 수행하였습니다. 이 과정을 통해 다중 카테고리 검출을 위한 대상 DNA 조각의 동시 증폭이 가능해집니다.

이 연구에서 우리는 다섯 가지의 미생물을 검출하려는 시도를 하였습니다. 즉, *S. aureus*는 인체 피부 원주 박테리아로, *B. subtilis*는 포자 형성 박테리아로, *E. coli*는 일반적인 그람 음성 박테리아로, *M. aquaticum*은 저영양성 박테리아로 및 *A. niger*는 곰팡이로 검출하려

고 시도하였습니다.

우리는 위 미생물들의 유전체 DNA를 템플릿으로 사용하여 비대칭 다중 PCR 작업을 수행하였습니다. PCR 증폭제는 하이브리다이제이션 버퍼 (최종 농도  $5 \times \text{SSC}$ , 1% Triton X)로 희석한 후  $60^\circ\text{C}$ 에서 5rpm으로 30분 동안 신호 마이크로어레이와 반응시켰습니다. 각 스팟의 형광 강도는 형광 판독기 (Yokogawa Electric Corp.)를 사용하여 측정하였습니다.

결과적으로, 우리는 표 1의 각 미생물 종에 대한 대상 카테고리의 스팟 형광을 검출하였습니다. 그림 6에서는 이 연구에서 고려한 대표적인 미생물의 하이브리다이제이션 결과를 확인할 수 있습니다. *S. aureus*(인체 피부 원주 박테리아로 그람 양성 박테리아)의 유전체 DNA를 템플릿으로 사용한 시료에서는 그람 양성 박테리아 및

인체 피부 원주 박테리아 카테고리에서 형광을 검출하였습니다. *B. subtilis*(포자를 형성하는 그람 양성 박테리아)의 유전체 DNA를 템플릿으로 사용한 시료에서는 그람 양성 및 포자 형성 박테리아 카테고리에서 형광을 검출하였습니다. 마찬가지로, *E. coli* 및 *M. aquaticum* 템플릿의 유전체 DNA 시료에서는 해당 카테고리에서 검출되어야 할 스팟에서 형광이 검출되었습니다. *A. niger*의 유전체 DNA를 템플릿으로 사용한 시료에서는 곰팡이 카테고리의 스팟에서만 형광이 관찰되었습니다. 이 결과는 양성 또는 음성 오류 없이 각 미생물의 동시 다중 검출이 가능하다는 사실을 의미하는 것입니다.

## 결론

우리는 형광을 수정하지 않은 상태로 DNA 샘플과의 하이브리다이제이션을 통해 형광을 발생시키는 신호 마이크로어레이 기술을 개발하였고, 또한 이를 통해 단순한 조작만으로도 미생물을 감지할 수 있는 DNA 마이크로어레이를 구현하였습니다. 이 성과는 높은 온도 및 압력 아래에서 추출하거나 비대칭 다중 PCR 증폭과 같은 복잡한 과정이 필요하지 않고, 숙련된 기술 없이도 간편하게 미생물을 검사할 수 있는 가능성이 있다는 사실을 보여주고 있습니다.

미생물 검사를 신속하게 수행할 수 있는 경우, 빠른 피드백을 통해 검사 결과를 빠르게 제공할 수 있게 됩니다. 이러한 발전된 기술을 활용하면 제조 효율의 개선뿐 아니라 제품 저장, 운송 및 회수 작업을 최적화할 수 있고, 생산 라인 작업 중 오염을 감지할 수 있어 제품 폐기 비용을 절감할 수 있는 등 다양한 파급 효과를 가져올 것으로 기대할 수 있습니다. 또한 검사 과정과 작업을 단순화하여, 전문 지식이나 특별한 기술이 필요하지 않으면서 누구나 신속하게 검사 작업을 수행할 수 있게 됩니다. 이로써 핵산 검출을 통한 미생물 신속 검사의 산업적 사용을 가시화할 수 있게 됩니다. 앞으로 우리는 이러한 기술을 활용하여 고객들의 제조 공정 개선의 가치를 검증할 계획입니다.

## REFERENCES

- (1) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, "Results of a Survey on the Status of Introducing Sanitation Management in Accordance with HACCP in the Food Manufacturing Industry in Fiscal 2021," 2022 (in Japanese), [https://www.maff.go.jp/j/tokei/kekka\\_gaiyou/syokuhin\\_doukou2/r3/index.html](https://www.maff.go.jp/j/tokei/kekka_gaiyou/syokuhin_doukou2/r3/index.html) (accessed January 12, 2023)
- (2) National Institute of Health Sciences Division of Biomedical Food Research, "Regarding the Committee for the Methods for the Microbiological Examination of Foods," The Methods for the Microbiological Examination of Foods (in Japanese), <http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/about.html> (accessed November 29, 2022)
- (3) S. F. Al-Khalidi, S. A. Martin, et al., "DNA Microarray Technology Used for Studying Foodborne Pathogens and Microbial Habitats: Minireview," *Journal of AOAC International*, Vol. 85, No. 4, 2002, pp. 906-910
- (4) T. Taguchi, M. Ishikawa, et al., "Amplification-free detection of bacterial genes using a signaling probe-based DNA microarray," *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 15, No. 194, 2021, pp. 113659-113666
- (5) T. Tadenuma and T. Taguchi, "Development of a Nucleic Acid Detection System for Rapid Microbial Tests," *Yokogawa Technical Report English Edition*, Vol. 60, No. 1, 2017, pp. 7-12
- (6) S. K. Poddar, "Symmetric vs asymmetric PCR and molecular beacon probe in the detection of a target gene of adenovirus," *Molecular and Cellular Probes*, Vol. 14, Issue 1, 2000, pp. 25-32
- (7) Ministry of Health, Labour and Welfare, Japanese Pharmacopoeia, Eighteenth Edition (June 7, 2021), Ministry of Health, Labour and Welfare Ministerial Notification No. 220), 2021 (in Japanese), <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000066530.html> (accessed January 12, 2023)
- (8) T. Matsuura, N. Nitta, et al., "Planning for infection prevention in facilities covered by long-term care insurance: A guidance manual for the prevention of infectious diseases in long-term care insurance facilities," 2006 (in Japanese), [http://www.phcd.jp/02/kenkyu/sonota/pdf/FK\\_2006\\_tmp00.pdf](http://www.phcd.jp/02/kenkyu/sonota/pdf/FK_2006_tmp00.pdf) (accessed January 12, 2023)

\* Cy is a registered trademark of GE HealthCare.

\* Black Hole Quencher is a registered trademark of LGC Biosearch Technologies.

\* All other company names, organization names, product names, service names, and logos that appear in this paper are either registered trademarks or trademarks of Yokogawa Electric Corporation or their respective holders.