

살모넬라균 검출을 위한 임피던스 바이오센서의 항체 고정화 방법 평가

김기영 문지혜 엄애선 양길모 모창연 강석원 조한근

Evaluation of Antibody Immobilization Methods for Detection of *Salmonella* using Impedimetric Biosensor

G. Y. Kim J. H. Moon A. S. Om G. M. Yang C. Y. Mo S. W. Kang H. K. Cho

Abstract

Conventional methods for pathogen detection and identification are labor-intensive and take several days to complete. Recently developed biosensors have shown potential for the rapid detection of foodborne pathogens. In this study, an impedimetric biosensor was developed for rapid detection of *Salmonella* typhimurium. To develop the biosensor, an interdigitated microelectrode (IME) was fabricated by using semiconductor fabrication process. Anti-*Salmonella* antibodies were immobilized based on either avidin-biotin binding or self assembled monolayer (SAM) on the surface of the IME to form an active sensing layer. To evaluate effect of antibody immobilization methods on sensitivity of the sensor, detection limit of the biosensor was analyzed with *Salmonella* samples inoculated in phosphate buffered saline (PBS) or food extract. The impedimetric biosensor based on SAM immobilization method produced better detection limit. The biosensor could detect 107 CFU/mL of *Salmonella* in pork meat extract. This method may provide a simple, rapid, and sensitive method to detect foodborne pathogens.

Keywords : Impedimetric biosensor, *Salmonella*, Interdigitated microelectrode

1. 서론

최근 국민소득 향상 및 건강에 관한 관심증대 등으로 소비자의 고품질·안전 농산물에 대한 요구가 크게 증가하고 있으나, 식생활 패턴의 변화로 인하여 집단급식, 가공식품, 냉장 및 냉동식품, 즉석식품 등의 소비 증가로 다발적인 집단식중독 발생이 증가하고 있다. 특히 세균성 식중독은 우리나라는 물론 전 세계적으로 그 발생 빈도가 높으며, 식중독 사고 발생 방지를 위한 많은 노력에도 불구하고 증가하는 추세에 있다. 식품안전성 향상을 위하여 위해요소중점관리기준(HACCP) 및 우수농산물(GAP) 인증 등의 제도가 시행, 권장됨에 따라

세균성 식중독균의 신속하고 정확한 사전 검사 요구가 증가하고 있다. 하지만 기존의 식중독균 검사 방법은 3-5일의 장기간의 배양시간이 요구되므로 사전 검사로서의 기능을 충족할 수 없을 뿐만 아니라, 늘어나는 검사 수요를 감당할 수 없을 것으로 예상되고 있다.

체계적이고 효율적인 안전성 관리로 농·축산물 및 식품과 관련된 식중독 사고를 줄이기 위해서는 세균을 신속히 검출하는 기술이 필요하다. 기존 식중독균 검출 방법에서 소요되던 배양 및 분석시간을 줄이고 현장에서 신속한 안전성 검사를 하기 위하여 효소면역반응법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction,

The article was submitted for publication on 2009-07-01, reviewed on 2009-07-25, and approved for publication by editorial board of KSAM on 2009-08-05. The authors are Gi Young Kim, KSAM Member, Senior Researcher, National Academy of Agricultural Science, RDA, Ji Hea Moon, PhD Student, Ae Son Om, Professor, Dept. of Food and Nutrition, Hanyang University, Gil Mo Yang, Junior Researcher, Chang Yeon Moh, Junior Researcher, Suk Won Kang, Junior Researcher, National Academy of Agricultural Science, RDA, and Han Keun Cho, Professor, Dept. of Biosystems Engineering, Chungbuk National University, Cheongju. Corresponding author: G. Y. Kim, senior researcher, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon, 441-100, Korea; Fax: +82-31-290-1900; E-mail: <giyoung@korea.kr>.

PCR), ATP(Adenosine Triphosphate) 생물발광법 등이 개발된 바 있다. 하지만, 이들 방법들은 시료의 전처리나 방해물질 제거, 여러 차례의 배양 등으로 인한 긴 분석시간, 분석을 위한 고가의 장비 및 전문인력 필요, 특정 세균에 대한 낮은 선택성 등의 문제점으로 인하여 현장에서 사용하기에 부적합하다.

이에 따라, 농식품 안전성 검사 결과를 빠르게 제공하여 소비자의 안전을 확보하기 위한 식중독균의 신속측정 기술 개발에 대한 요구가 갈수록 늘어나고 있다. 최근 다양한 분야에서 연구되고 있는 바이오센서는 효소, 항체, DNA 등과 같이 신호를 감지할 수 있는 생물학적 분자식별부와 감지된 신호를 측정 가능한 신호로 변환시키는 신호변환기로 이루어진 물리화학적인 측정 장치로서, 높은 감도와 빠른 응답성으로 인해 식품안전성 분야에서 많이 적용되고 있다(Kim and Choi, 2006; Kim et al., 2009). 바이오센서는 생물학적 분자식별부를 사용하기 때문에 선택성이 높아 방해물질로부터 측정 대상 물질을 잘 구분하며, 실시간 측정이 가능할 정도로 반응시간이 빠르고, 감지부와 신호변환기를 조합하여 작고 간편하게 만들 수 있으며, 측정 대상물에 영향을 주지 않고 연속적으로 측정이 가능한 장점을 지니고 있다.

특히, 항원·항체 결합을 이용한 임피던스 바이오센서는 전극 표면에 항원·항체 결합의 특이성과 강력한 결합력을 이용한 생물분자 검출부를 형성하여 특정 생물재료의 정전용량과 저항 변화를 함께 분석할 수 있는 도구로서 많은 분야에서 활용되어 왔다(Yang et al., 2003; Yang et al., 2004; Guan et al., 2004). 식품산업 분야에서도 임피던스 바이오센서는 식중독균을 빠르게 검출하기 위한 목적으로 연구가 활발히 수행되고 있다. Radke and Alocilja(2005)는 반도체 공정을 이용하여 제작한 미세 전극 기반의 임피던스 바이오센서를 이용하여 *E. coli* O157:H7균을 검출한 바 있다. 또한, Kim 등(2003)은 압전센서 기반의 바이오센서를 이용하여 *Salmonella typhimurium* 농도에 따른 임피던스 변화를 조사하였는데, 임피던스 변화와 식중독균 농도 사이에 높은 상관 관계가 있는 것으로 나타났다.

바이오센서의 검출 성능은 여러 가지 조건에 따라 영향을 받지만, 그 중에서도 항체의 성능 및 항체가 바이오센서의 표면에 고정된 정도에 따라 크게 영향을 받는다. 항체의 고정화 방법은 항체의 결합 방법에 따라 몇 가지로 나눌 수 있는데, Lazcka 등(2006)은 선택적이고 효율적인 항체 고정화 방법으로서 흡착법(Adsorption), 아비딘-바이오틴(Avidin-biotin) 방법, 공유결합 방법 등의 세 가지 항체 고정화방법을 가장 많이 사용하고 있다고 보고하였다. 다른 바이오센서와 달리 형광염료와 같은 별도의 표지물질을 사용하지 않는 장점 때문에 임피던스 바이오센서 개발에 관한 연구가 많이 수행되고 있지만, 임피던스 바이오센서 개발에 필수적인 항체 고정화 방법에 따른 바이오센서의 검출 성능 향상에 관한 연구는

거의 수행된 바 없어 이에 대한 연구가 시급한 실정이다.

본 연구는 농식품의 안전성을 저해하는 대표적인 위해요소인 식중독균을 신속하게 검출할 수 있는 바이오센서의 개발을 위한 항체 고정화방법을 구명하기 위하여 수행되었다. 임피던스 바이오센서의 검출부는 살모넬라 항체를 이용하여 제작하였으며, 항체의 고정화 방법에 따른 살모넬라균 검출 한계를 측정하는 방법으로 바이오센서의 검출 성능을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시약 및 박테리아

바이오센서 제작에 필요한 스트렙트아비딘, PBS, Triton X-100, DMSO, DSP 등의 시약은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 살모넬라 항체는 KPL(MD, USA), 바이오틴이 부착된 살모넬라 항체는 ViroStat사(Portland, ME, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

본 연구에 사용된 균주는 생명공학연구원 유전자은행 KCTC(Korea Collection for Type Cultures, Korea)에서 분양받은 *Salmonella typhimurium* KCTC 12401(*S. typhimurium*)을 사용하였다. 분양된 균주는 모두 동결 건조된 상태였으며, 균주에 PBS 원충액 1.0 mL를 첨가한 뒤 Sodium Selenite Agar에 평판 배양하여 적갈색의 균락을 확인하였다. 이와 같이 선택배지에서 균주를 확인한 후, 세균 균락을 Brain Heart Infusion(BHI) 배지에 계대 배양하여 이용하였다. 배양 시 조건은 액체배양의 경우 37°C에서 18~24시간 동안 120 rpm에서 배양하였으며, 평판배양의 경우 37°C에서 48시간 배양하였다.

실제 식품시료 속에 오염된 살모넬라 식중독균의 검출성능 시험은 시중에서 구입한 돼지고기를 대상으로 수행하였다. 식품시료는 시중에서 구입한 돼지고기 목심에 10배 농도의 PBS를 첨가하여 stomacher로 교반한 다음, 0.2 μm 필터로 여과한 추출물에 *S. typhimurium*을 인위적으로 접종하는 방법으로 준비하였다.

나. 미세전극 설계

살모넬라 식중독균 검출을 위한 임피던스형 바이오센서는 서로 맞물리는 형태로 이웃한 두 개의 전극 센서를 기반으로 제작하였다. 살모넬라균은 1~2 μm 정도로 크기가 매우 작기 때문에 전극 센서가 높은 검출 감도를 갖도록 MEMS 공정을 이용하여 마이크로 단위의 전극을 개발하였다. 개발된 전극은 폭 10 μm , 길이 990 μm , 그리고 감지부 면적 3 mm²이며, 200개의 맞물린 전극까지 쌍으로 이루어져 있다. 임피던스 센서의 재질은 유리 웨이퍼이며, 식각 공정을 이용하여 전극을 제작하였다. 전극의 재질은 생물체와 접촉하였을 경우 영향이

적고, 화학적으로 항체를 결합시키기 좋은 전극인 금(Au)을 사용하였다. 바이오센서의 바탕이 되는 전극 제작 과정은 다음과 같다. 우선 유리 웨이퍼 위에 감광물질(Photoresist)을 도포하고, 여기에 패턴 블(Mask)를 이용하여 미세전극의 모양을 제작하였다. 이어서 유리와 금 사이의 접착력 증가를 위해 50 nm 두께의 크롬(Cr) 층을 형성시킨 다음, 증착 공정을 이용하여 100 nm 두께의 금 층을 형성시켰다. 바이오센서의 감지부인 미세전극 부위를 제외한 전극의 나머지 영역은 에폭시를 도포하여 절연시켰다. 완성된 임피던스 바이오센서의 전극은 그림 1, 미세전극 영역의 확대된 전자현미경 사진은 그림 2와 같다.

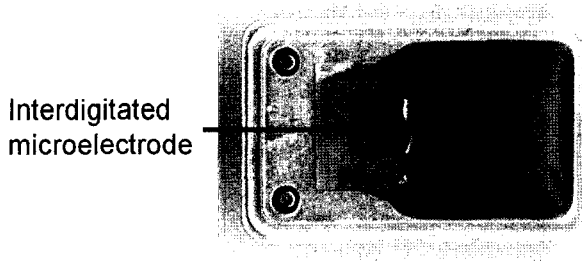


Fig. 1 Impedance sensor that has a large number of interdigitated electrode pairs.

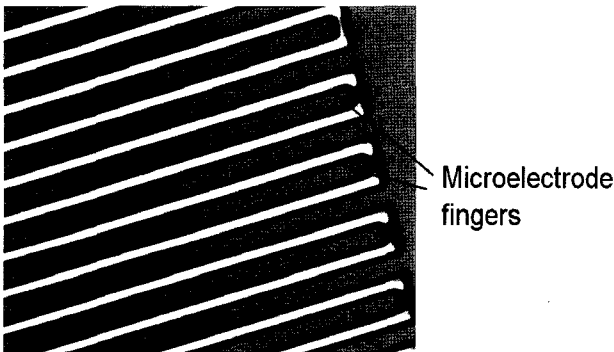


Fig. 2 Scanning electron microscopy (SEM) image of the interdigitated electrode pairs (500x).

다. 항체 고정화 방법

임피던스 바이오센서는 위의 임피던스 센서의 전극 표면에 살모넬라균을 검출할 수 있는 분자식별부를 형성시킴으로써 제작하였다. 바이오센서의 표면에 분자식별부를 형성시키기 위해서는 항체를 센서에 고정하여야 하는데 항체를 고정하는 방법은 항체의 결합 방법에 따라 몇 가지로 나눌 수 있다. 최근 발표되는 병원균 검출에 대한 바이오센서 관련 문헌(Lazcka et al., 2006)에 의하면 선택적이고 효율적인 항체 고정화 방법으로서 흡착법(Adsorption)과 더불어 높은 결합력을 지닌 아비딘-바이오틴(Avidin-biotin) 방법, 공유결합을 이용한 자기조립단분자막(Self Assembled Monolayer, SAM) 방법 등의 세 가지 항체 고정화방법을 가장 많이 사용하고 있는 것으로 조사되었다.

흡착법은 가장 간단한 방법이나, 결합력이 약하고 결합이 오래 지속 되지 않아 센서의 수명이 짧은 단점이 있다. 나머지 두 가지 고정화방법은 보다 복잡한 공정을 통하여 항체를 센서의 표면에 고정화시키지만, 항체의 고정화 효율이 높고 검출부의 수명이 긴 장점을 지니고 있다. 본 연구에서는 흡착법과 같이 사용이 간단하면서도 공유결합과 같이 높은 결합력을 지니는 현재 바이오센서 연구에 많이 사용되고 있는 아비딘-바이오틴 결합 방법과 공유결합을 사용하여 결합력이 매우 강한 SAM 방법을 항체 고정화 방법으로 사용하고 그 결과를 서로 비교하였다. 각각의 항체 고정화 방법은 그림 3과 같은 과정을 통하여 항체를 전극 표면에 부착하였으며, 각 방법의 자세한 설명은 다음과 같다.

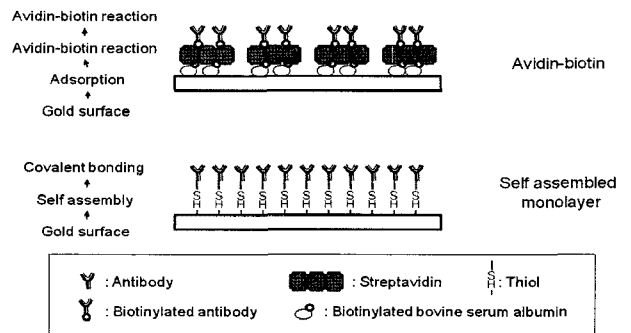


Fig. 3 Antibody immobilization processes of the biosensor.

아비딘-바이오틴 결합을 이용한 분자식별부 제작은 알코올과 멸균된 증류수로 세척한 센서 표면에 bBSA(Biotinylated bovine serum albumin)를 50 μL(1.0 mg/μL) 가하여 1시간 이상 반응시켜 bBSA를 흡착시켰다. 전극 표면에 흡착된 bBSA에 스트렙트아비딘 층을 형성시키기 위해 다시 스트렙트아비딘 50 μL(1.0 mg/μL)를 가하여 반응시켰다. 표준인산 버퍼(Phosphate buffered saline, PBS) 용액으로 센서 표면을 세척하여 표면에 부착되지 않은 스트렙트아비딘을 제거하였다. 여기에 바이오틴 부착 살모넬라 항체 50 μL(100 μg/μL)를 가하여 20분간 반응시켜 아비딘-바이오틴 결합을 반응시켰다. 이 과정에서 각 시약을 반응시키기 전후에 항상 PBS 용액을 이용하여 최종 형성에 관여하지 못한 시약들을 제거하였다.

SAM 방법을 이용한 항체 고정화는 고순도 용매를 사용하여 항체를 전극 표면위에 화학적인 자기 반응을 통하여 균일하게 분포시켰다. 구체적인 고정화 방법은 우선 NaOH와 멸균된 증류수로 세척한 센서 표면에 dithiobis-succinimide propionate(DSP)/dimethyl sulfoxide(DMSO) 50 μL를 가하여 1시간 반응시켜 센서 표면을 티올화 하였다. 센서 표면에 부착되지 않은 티올기는 DMSO를 이용하여 제거하였다. 그 다음 센서 표면에 형성된 티올 층에 살모넬라 항체 50 μL를 30분간 반응시켜 티올기와 항체사이의 공유결합을 통하여 항체 층을 형성시켰다.

라. 실험 방법

항원-항체 반응에 의해 바이오센서에서 발생하는 미약한 임피던스 신호는 휴대형 임피던스 미세신호 증폭모듈(Bode 100, Omicron Lab, USA)을 이용하여 측정하였다. 임피던스 미세신호 증폭모듈은 바이오센서로부터의 미세 임피던스 신호를 받아들여 증폭하는 입력부와 이를 디지털화 시키는 A/D 변환부, 그리고 변환된 신호를 USB통신 프로토콜을 이용하여 컴퓨터로 전송하는 신호전송부로 구성된다. PC로 전송된 신호는 수집 및 저장된 후 실험이 끝난 다음 분석하였다. 임피던스 바이오센서를 이용한 측정시스템은 그림 4와 같이 구성하였다.

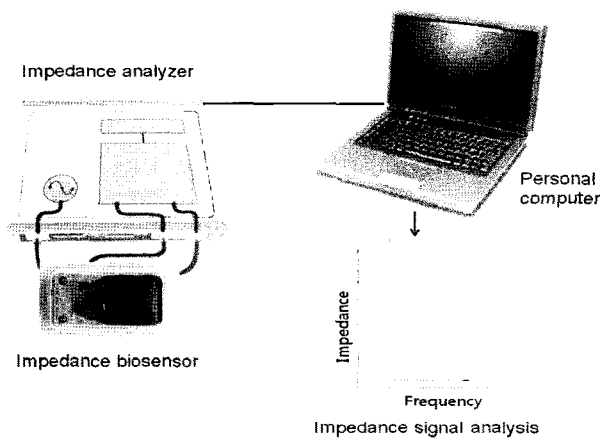


Fig. 4 Schematic diagram of impedance sensing system for *Salmonella* detection.

살모넬라균 검출 실험은 각각 다른 농도의 살모넬라균에 대한 임피던스 바이오센서의 신호를 분석하는 방식으로 수행하였다. 실험을 위하여 임피던스 바이오센서의 양 전극을 임피던스 측정시스템에 연결하고 PBS 용액으로 1회 세척한 다음 세균이 부착되지 않았을 때의 기준 신호를 측정하였다. 기준 신호 측정후 각각 다른 농도의 살모넬라균 시료를 임피던스 바이오센서에 5분간 반응시키고, 1% Triton-X 100 버퍼로 3회 세척한 다음 살모넬라 세균에 의한 임피던스 변화를 측정하였다.

일련의 농도($10^2 \sim 10^9$ CFU/mL)로 이루어진 한 세트의 살모넬라균 검출에 사용된 임피던스 바이오센서는 센서표면을 재생 버퍼를 이용하여 부착된 세균만을 제거한 후, 검출부를 재생시켜 살모넬라균 검출에 재사용 하였다. 바이오센서 검출부 재생 버퍼는 100 mM glycine-HCl(pH 2.5)을 사용하였다. 이러한 방법으로 $10^2 \sim 10^9$ CFU/mL의 농도에 대해 검출 실험을 3회 반복한 다음, 측정된 임피던스의 평균값을 분석에 이용하였다. 임피던스 바이오센서의 세균 검출 성능은 살모넬라균이 접종되지 않은 시료로 측정된 기준신호의 3 반복 측정값으로부터 표준오차(Standard error of the mean, SEM)를 구하고, 이 표준오차 값을 3배한 값과 기준신호 값을 더한 값

보다 큰 임피던스 신호값을 갖는 세균 농도를 검출한계로 정하였다.

임피던스 바이오센서 항체 고정화방법의 살모넬라균 검출 효과 검증은 각각의 고정화방법으로 제작된 바이오센서를 이용하여 $10^7 \sim 10^9$ CFU/mL의 살모넬라균을 검출한 다음, 바이오센서의 표면을 전자현미경으로 확대 촬영한 영상을 분석하는 방법으로 수행하였다. 전자현미경 분석을 위하여 각각 다른 농도의 살모넬라균 시료를 임피던스 바이오센서에 5분간 반응시키고, PBS 버퍼로 3회 세척하여 항체에 부착되지 않은 살모넬라 세균을 씻어 낸 다음, 센서를 건조하여 영상을 촬영하는 방법으로 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 전자현미경 분석을 통한 항체고정화 방법 검증

전자현미경(JSM-5500LV, JEOL, Japan) 영상 분석을 통해 조사한 바이오센서의 살모넬라 식중독균 검출 성능은 항체의 고정화방법에 따라 차이가 있었으나, 두 가지 고정화방법 모두 살모넬라균의 농도에 따라 센서 표면에 포획된 살모넬라균의 수가 비례적으로 변하여 바이오센서의 검출부가 제대로 작동하는 것을 확인할 수 있었다. 그림 5에 아비딘-바이오틴 고정화방법으로 제작된 바이오센서의 살모넬라균 농도에 따른 검출 실험 결과를 나타내었다.

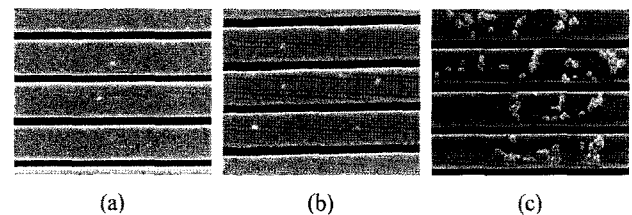


Fig. 5 Scanning electron microscope image of *Salmonella* detected impedance biosensor prepared by avidin-biotin immobilization method: (a) 107 CFU/mL (b) 108 CFU/mL (c) 109 CFU/mL.

나. PBS 버퍼에서의 살모넬라균 검출

임피던스 바이오센서의 살모넬라 식중독균 검출 성능은 PBS 버퍼에 살모넬라균을 $10^2 \sim 10^9$ CFU/mL로 희석하여 준비한 시료를 이용하여 수행하였다. 그림 6과 7에 아비딘-바이오틴 방법과 SAM 고정화방법에 따른 임피던스 바이오센서의 *S. typhimurium* 검출 성능을 나타내었다. 두 가지 고정화방법 모두 시료내의 세균 농도가 높아짐에 따라 임피던스의 값이 증가하여 임피던스 바이오센서 검출부의 항체가 살모넬라균을 잘 포획함을 확인할 수 있었다. 임피던스 신호는 세균 농도 증가에 따라 선형적으로 증가하였으며 10^9 CFU/mL의 농도에서 그 크기가 급격하게 증가하였다. 아비딘-바이오

틴 고정화 방법을 사용하여 제작한 임피던스 바이오센서의 검출한계는 10^7 CFU/mL 이었다. Babacan 등(2002)의 연구에 의하면 압전형 바이오센서를 이용하여 PBS 용액에 포함된 *S. typhimurium*을 검출한 결과 검출 한계가 10^7 CFU/mL 이었다고 발표한 바 있어 본 연구에서 개발한 임피던스 바이오센서를 이용한 PBS 버퍼에서의 살모넬라균 검출 결과는 기존의 연구 결과와 유사하다고 볼 수 있다.

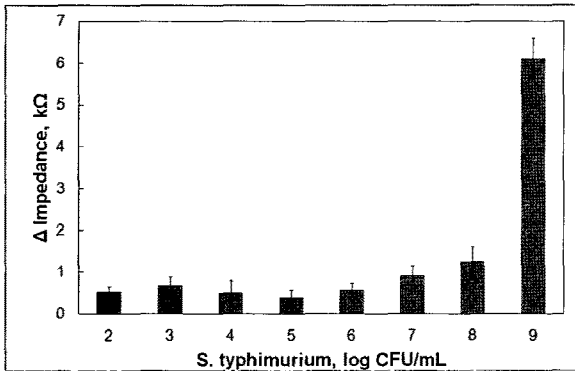


Fig. 6 Detection result of *S. typhimurium* in PBS with an impedimetric biosensor fabricated by avidin-biotin immobilization method. Error bars represent SEM.

티올기를 이용한 SAM 방법의 경우 저농도에서 신호가 지속적으로 증가하는 경향이 있는 반면에, 고농도에서 아비딘-바이오틴 방법과 같은 급격한 신호차이는 발견되지 않았다. 이에 따라, SAM 고정화 방법을 사용하여 제작한 임피던스 바이오센서의 검출한계는 10^3 CFU/mL 으로 아비딘-바이오틴 방법에 비해 저농도의 살모넬라균을 검출할 수 있는 것으로 조사되었다. 이는 결합력의 세기가 흡착력에 의한 아비딘-바이오틴 방법에 비하여 공유결합을 이용하는 SAM 방법이 강하기 때문인 것으로 고려되며, 바이오센서 제작시 전극표면의 검출물질 고정화 방법으로서 고정화 방법이 가장 적당하다는 Park 등(2003)의 주장과도 일치하는 결과이다.

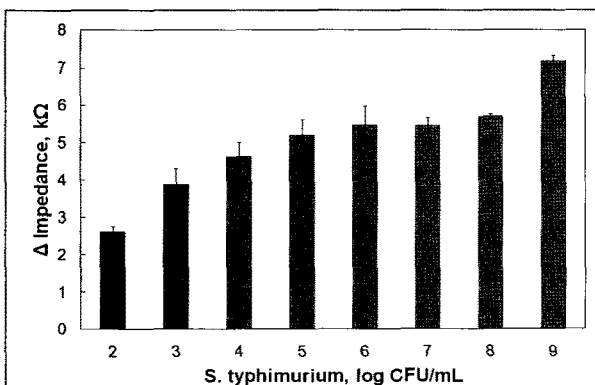


Fig. 7 Detection result of *S. typhimurium* in PBS with an impedimetric biosensor fabricated by SAM immobilization method. Error bars represent SEM.

다. 식품 시료에서의 살모넬라균 검출

임피던스 바이오센서를 이용하여 식품시료 내의 살모넬라균을 검출할 경우, 센서 표면에서 살모넬라균 이외의 간섭물질과 항체와의 비선택적 반응(Non-specific binding)이 존재한다. 이로 인하여 살모넬라균 검출이 방해 받거나, 살모넬라균이 없더라도 간섭물질의 부착으로 인한 임피던스 신호 증가 현상이 발생할 가능성이 크다. 이를 해결하기 위하여 비선택적 반응을 줄여주는 물질인 Blocker BSA(Pierce, USA)를 1.0 %씩 시료에 첨가하였고, 살모넬라균의 농도가 불규칙하게 증가하는 시료 세트(Control, 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^7 CFU/mL)를 이용하여 임피던스 신호의 변화를 측정하였다.

두 가지 고정화방법에 따른 임피던스 바이오센서의 식품시료에서의 *S. typhimurium* 검출 성능을 그림 8과 9에 나타내었다. 아비딘-바이오틴 항체 고정화방법으로 제작한 임피던스 바이오센서의 살모넬라균 검출 결과(Fig. 8)에서 보듯이, 살모넬라 농도에 따라 임피던스의 차이가 통계적으로 유의성이 있어 신호의 변화가 살모넬라균 검출로 인한 것임을 확인할 수 있었다. 아비딘-바이오틴 고정화 방법을 사용하여 제작한 임피던스 바이오센서의 검출한계는 10^8 CFU/mL 이었다.

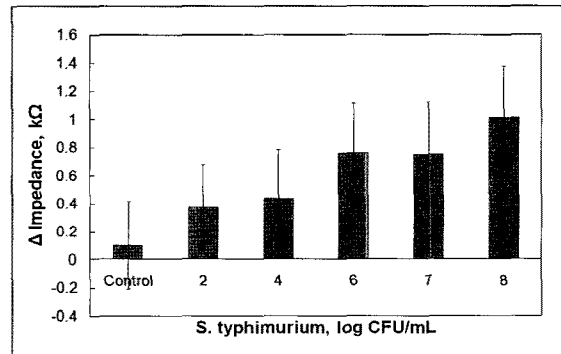


Fig. 8 Detection of *S. typhimurium* in pork extract with an impedimetric biosensor fabricated by avidin-biotin immobilization method. Error bars represent SEM.

SAM 항체 고정화 방법의 검출 결과(Fig. 9) 역시 시료내의 세균 농도가 높아짐에 따라 임피던스의 값이 증가하는 경향을 나타내었다. PBS 시료를 이용한 측정 실험과 마찬가지로 저농도의 살모넬라균 검출 성능은 공유결합으로 항체를 고정화시킨 SAM 항체 고정화 방법의 측정 감도가 더 좋아 살모넬라 농도 증가에 따른 바이오센서의 임피던스 값 증가가 더 큰 것으로 나타났다. 측정 결과 돼지고기 추출물에서 *S. typhimurium*의 검출한계는 10^7 CFU/mL 으로 PBS 시료의 검출 결과에 비하여 검출 한계가 증가하였다. 이는 식품시료에 들어있는 식품찌꺼기나 다른 세균에 의한 간섭 때문에 바이오센서 검출부의 살모넬라균에 대한 선택적인 포획 능력이 감소하였고, 그로 인해 반복 측정 간 변이가 증가하였기 때문인 것으로 판단된다.

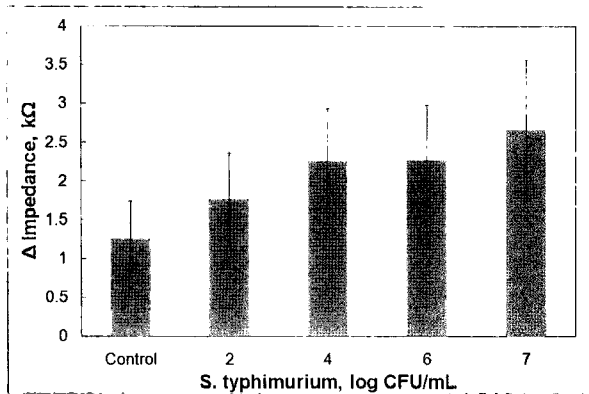


Fig. 9 Detection of *S. typhimurium* in pork extract with an impedimetric biosensor fabricated by SAM immobilization method. Error bars represent SEM.

4. 요약 및 결론

본 연구는 농식품의 안전성을 저해하는 대표적인 위해요소인 식중독균을 신속하게 검출할 수 있는 바이오센서의 개발을 위한 항체 고정화방법을 구명하기 위하여 수행되었다. 임피던스 바이오센서의 검출부는 살모넬라 항체를 이용하여 제작하였으며, 항체의 고정화 방법에 따른 살모넬라균 검출 한계를 측정하는 방법으로 바이오센서의 검출 성능을 평가하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

- (1) 아비딘-바이오틴 고정화 방법을 기반으로 한 임피던스 바이오센서의 PBS 시료에 대한 *S. typhimurium*균 검출 성능은 10^7 CFU/mL 이었다.
- (2) SAM 고정화 방법의 경우 아비딘-바이오틴 고정화 방법에 비하여 낮은 농도(10^3 CFU/mL)의 세균이 존재하는 시료에서도 높은 임피던스 변화를 나타내어, SAM 고정화 방법은 PBS 버퍼에서 아비딘-바이오틴 방법에 비하여 우수한 검출 성능을 보이는 것으로 조사되었다.
- (3) 식품시료에서의 *S. typhimurium* 검출 성능은 아비딘-바이오틴 항체 고정화방법으로 제작한 임피던스 바이오센서의 검출한계는 10^8 CFU/mL, SAM 항체 고정화방법으로 제작한 임피던스 바이오센서의 검출한계는 10^7 CFU/mL으로 PBS 시료 보다는 좋지 않았지만 두 경우 모두 SAM 항체 고정화방법으로 제작한 임피던스 바이오센서의 성능이 더 좋은 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Babacan, S., P. Pivarnik, S. Letcher and A. Rand. 2002. Piezoelectric flow injection analysis biosensor for the detection of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Science* 67(1):314-320.
2. Guan, J. G., Y. Q. Miao and Q. J. Zhang. 2004. Review: Impedimetric biosensors. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 97(4):219-226.
3. Kim, E. H., H. K. Cho, K. S. Kyung and G. Kim. 2009. Detection of the fungicide Iprovalicarb residues using a surface plasmon resonance biosensor. *Journal of Biosystems Engineering* 34(1):50-56. (In Korean)
4. Kim, G. and K. H. Choi. 2006. Development of a fiber-optic biosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Biosystems Engineering* 31(2):128-134. (In Korean)
5. Kim, G. H., A. G. Rand and S. V. Letcher. 2003. Impedance characterization of a piezoelectric immunosensor part II: *Salmonella typhimurium* detection using magnetic enhancement. *Biosensors and Bioelectronics* 18:91-99.
6. Lazcka, O., F. J. D. Campo and F. X. Munz. 2006. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 22(7):1205-1217.
7. Park, D. H., H. J. Ryu, H. S. Kang, H. S. Park and M. H. Kim. 2003. Construction of biosensor using electrochemical reaction of nitrate reductase, nitrite oxidase and ammonium oxidase isolated from nitrate reducer, nitrite oxidizer and ammonium oxidizer. *Journal of the Korean Society for Environmental Analysis* 6(1):35-40. (In Korean)
8. Radke, S. M. and E. C. Alocilja. 2005. A high density microelectrode array biosensor for detection of *E. coli* O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics* 20:1662-1667.
9. Yang, L., C. Ruan and Y. Li. 2003. Detection of viable *Salmonella typhimurium* by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance. *Biosensors and Bioelectronics* 19(5):495-502.
10. Yang, L., Y. Li, C. L. Griffis and M. G. Johnson. 2004. Interdigitated microelectrode (IME) impedance sensor for the detection of viable *Salmonella typhimurium*. *Biosensors and Bioelectronics* 19(10):1139-1147.