

Review

라만 분광법을 활용한 세균 검출 기술

노지현 · 이태권*

연세대학교 환경공학과

Rapid bacterial identification using Raman spectroscopy

Jee Hyun No and Tae Kwon Lee*

Department of Environment Engineering, Yonsei University, Wonju 26493, Republic of Korea

(Received June 2, 2017; Revised June 26, 2017; Accepted June 27, 2017)

Raman microspectroscopy is a promising tool for microbial analysis at single cell level since it can rapidly measure the cell materials including lipids, nucleic acids, and proteins by measuring the inelastic scattering of a molecule irradiated by monochromatic lights. Using Raman spectra provides high specificity and sensitivity in classification of bacteria at the strain level. In addition, a Raman approach coupled with stable isotope such as ^{13}C and ^2H is able to detect and quantify general metabolic activity at single cell level. After bacterial detection process by Raman microspectroscopy, interested unculturable cell sorting and single cell genomics can be accomplished by combination with optical tweezer and microfluidic devices. In this review, the characteristics and applications of Raman microspectroscopy were reviewed and summarized in order to provide a better understanding of microbial analysis using Raman spectroscopy.

Keywords: bacterial detection, cell sorting, Raman microspectroscopy, single cell, stable isotope

세균은 대기, 토양, 물 뿐만 아니라 식물과 동물을 포함한 거의 모든 환경에 군집(community)을 이루며 살아가며, 군집은 그 구조와 다양성에 따라 서로 다른 기능으로 나타나게 된다. 군집을 이루는 기본 단위는 세균 한 종(species)이며, 연구자들은 관심 있는 종을 분리 및 배양 연구를 통해 환경의 기능을 추

론한다. 최근 분자생물학적 분석 기술의 발달로 한 종의 기능도 구성 단위인 단세포(single cell)의 생리학적 기능에 따라 변화된다는 보고가 증가함에 따라, 군집의 기능을 단세포 수준에서 접근하려는 시도가 늘어나고 있다(Zengler, 2009). 하지만 종 수준의 분석과 달리 단세포 수준에서의 분석은 활용 가능한 분석 기술이 제한적이라 다양한 접근 방법을 시도하는 중이다.

전통적으로 세균 한 종의 생리학적 활성을 평가하기 위해서는 배양 의존방법을 활용하는데, 이는 환경시료 일부를 평판 배지에 도말하여 배양된 세균을 대상으로 실험한다. 하지만 배양 가능한 세균은 환경에 존재하는 전체 세균의 1% 미만이기 때문에 분석 범위가 제한적일 수 밖에 없다. 또한 연구실에서 사용하는 배지의 조성은 환경 조건과 상이하기 때문에 실험 결과를 환경에서의 실제 기능적 활성과 직접적으로 연결시키기 어렵다. 배지 제작과 미생물 배양 등의 실험 과정은 매우 노동 집약적이기 때문에 다수의 종을 동시에 분석하기 어려우며, 실험 특성상 단세포 수준으로 분석이 어렵다.

PCR (polymerase chain reaction) 기반의 분석기술은 환경시료에서 DNA와 RNA 같은 핵산을 추출하여 특정 유전자의 유무 및 정량 평가가 가능하다. 계통 분석이 가능한 16S rRNA 유전자와 다수의 기능성 유전자들을 분석함으로써 환경시료 내 미생물의 유전적 잠재력(genetic potential)을 조사할 수 있다. 최근 시퀀싱 기술이 발달함으로써 DNA 염기서열, 아미노산 배열, 단백질의 구조 등과 같은 생물학적 정보를 획득하여 컴퓨터로 분석하고 해석하는 meta-omics 방법을 통해 총체적인 미생물의 기능을 해석하는 분야도 폭발적으로 증가하는 추

*For correspondence. E-mail: tklee@yonsei.ac.kr;
Tel.: +82-33-760-2446; Fax: +82-33-760-5524

세이다(Segata *et al.*, 2013). 하지만 meta-omics 방법은 미생물 군집의 특성을 조사하는 것은 용이하나 대부분 시퀀스 결과들이 짧은 유전체(genome) 조각으로 구성되어 있어 단편적인 정보만 확인 가능하기 때문에 각각의 종 혹은 단세포의 기능을 분리해서 분석하기 어렵다(Tringe *et al.*, 2005).

환경시료에서 단세포를 분석하기 위하여 일반적으로 FISH (fluorescence *in situ* hybridization)와 NanoSIMS (Nano secondary ion mass spectrometry)를 활용한다. FISH는 핵산 추출 과정 없이 관심 세균의 DNA 일부를 형광물질로 표지 하여 단세포를 검출하는 방법이다(Amann and Fuchs, 2008). 형광물질의 높은 감도와 특이성 때문에 다양한 연구에서 활용되나, 전처리 과정(고정 및 소식자 보합; fixation and probe hybridization)에서 세균의 구조가 파괴되어 시료를 재이용할 수 없어 추가 실험을 할 수 없다. 또한 probe는 기지의 유전 정보를 활용하여 제작하므로 미지의 세균 검출은 제한적일 수밖에 없다. NanoSIMS는 시료에 레이저를 조사하였을 때 시료의 표면에서 발생하는 이차 이온의 질량을 분석하여 물질을 규명한다. 기존의 SIMS 분석과 같은 원리로 광선의 직경이 나노 수준인 경우 NanoSIMS라고 부른다(Hoppe *et al.*, 2013). 나노 수준으로 동위원소의 농도를 구분 가능하며, 동위원소로 표지된 기질로 배양된 미생물을 단세포 수준에서의 생리학적 활성을

정량적으로 측정할 수 있다. 하지만 NanoSIMS 분석은 고가의 장비 유지 및 분석 비용으로 연구실에서 규칙적으로 활용하기는 어렵다.

이 외에 FACS (fluorescence activated cell sorting)를 이용한 방법이 있다. FACS는 미생물 고유의 빛의 산란과 형광의 특징을 이용하여 관심 미생물을 추적하고 물방울에 전기적 신호를 통하여 추적된 미생물을 단세포 수준으로 분리하는 기술이다(Ibrahim and van den Engh, 2007). 분리된 단세포를 활용하여 추가 연구를 진행할 수 있다는 점에서 FISH나 NanoSIMS와 차별적이다. 하지만 노즐이 막힐 수 있고 분류 시 오염에 노출되어 있다는 한계가 있으며, 분리된 미생물의 기능을 추가적으로 연구를 하기 위해서는 배양 방법을 활용해야 한다는 한계가 있다(Stepanaukas and Sieracki, 2007).

기존 방법을 대체할 수 있는 대안으로써 최근 라만 분광법에 대한 관심이 증가하고 있다. 라만 분광법은 고고학, 재료학, 광물학 등 다양한 분야에 활용되어 왔지만, 최근 기술 발달로 측정 민감도와 특이성이 대폭 향상되어 미생물 생태 연구 분야에서도 높은 활용가치를 갖게 되었다(Eichorst *et al.*, 2015). 미생물 생태 연구자들은 환경에서 미생물의 기능적 역할을 분석하기 위하여 세균 검출(bacterial identification), 기능 분석(functional analysis), 지역 분포 정보(biogeography)에 대한

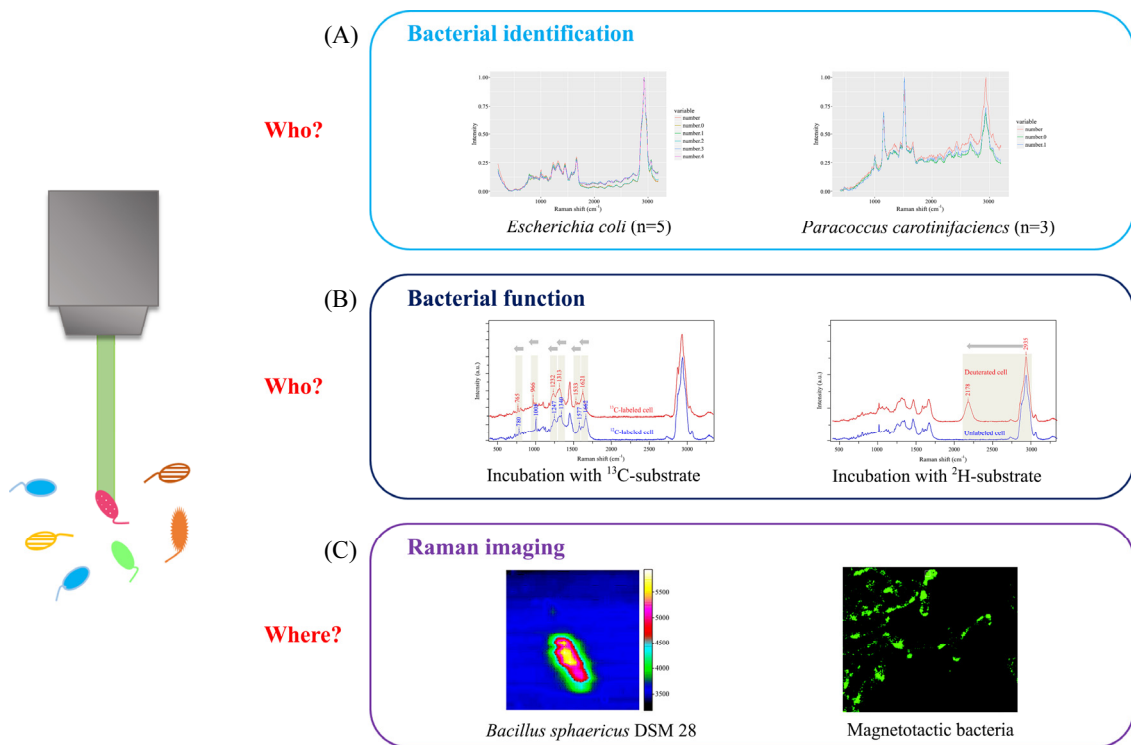


Fig. 1. Application of Raman microspectroscopy in microbial ecology (Rösch *et al.*, 2005; Eder *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016).

연구를 보완할 수 있을 것으로 예상된다. 라만 분광법을 활용하면 세균 고유의 라만 시그니처 분석(검측), 동위원소와 결합한 기질 특이성 분석(기능 분석) 등을 실시간 분석이 가능하므로 기존의 분석 방법들의 한계를 보완할 수 있을 것으로 예상된다(Fig. 1). 본 총설에서는 라만 분광법의 분석 원리, 방법, 미생물 생태학 분야에서 응용 방법에 대해 다루고자 한다.

본 론

라만 분광법의 전통적인 활용

라만 분광법은 라만 효과를 이용하여 분자의 화학적인 구성과 구조를 분석하는 방법이다. 인도 물리학자 라만이 1928년 발견한 라만 효과는 단일 파장을 갖는 강력한 빛을 물질에 조사하였을 때 대부분은 탄성 산란(Elastic scattering)을 하게 되지만 빛의 일부가 분자의 공명에 이용되어 다른 진동수를 가지고 산란하게 되는 비탄성산란(Inelastic scattering: 라만 산란) 현상을 말한다(Lewis and Edwards, 2001). 라만 산란 되었을 때 탄성 산란에 비해 시프트(shift)된 정도를 라만 시프트(Raman shift)라고 하며 이를 스펙트라(spectra)로 표현하여 매질의 특성을 표현하게 된다.

일반적으로 벽화에 사용된 색소나 도자기, 유리, 금속 등의 고고학적으로 의미가 있는 물질들을 라만 분광법을 활용하여 분석하거나 지구 내의 광물뿐만 아니라 화성(Mars) 내의 시료 또한 측정이 가능하여 지질학 분야에도 활용되고 있다(Smith and Clark, 2004; Edwards *et al.*, 2013). 하지만 라만 산란의 신호 세기가 약하기 때문에 미량의 물질 혹은 생물 조직을 측정하는 생물학 분야에서는 제한적으로 활용되어 왔다.

생물학 분야에서는 미약한 라만 산란 신호를 증폭하기 위한 전처리 과정이 필요하다. 대표적으로 SERS (surface enhanced raman spectroscopy) 기법이 알려져 있으며, 은이나 금 등의 금속 나노 입자의 표면에 조사된 빛이 물질 표면의 플라즈몬을 흥분시켜 라만 신호를 증폭시키는 원리를 이용한다(Sharma *et al.*, 2012). 이 외에도 UV 레이저(180~260 nm)로 라만 신호를 측정하는 UVR (UV resonance raman) 방법도 사용되는데 이 방법은 라만 신호를 10^3 ~ 10^5 배로 증폭시킬 수 있다(Ashton *et al.*, 2011).

위와 같은 증폭 기술을 활용하여 의학 분야에서도 라만 분광법으로 세포를 직접 조사하는 방법을 질병 진단 과정에 포함시켜 암 등의 질병 예방에 활용하고 있다(Kong *et al.*, 2015). 유방암 세포는 라만 시프트 1003 cm^{-1} 에서 정상세포보다 낮은 신호세기를 가졌으며, 알츠하이머 유전자를 이식한 쥐에서 추

출한 혈소판의 라만 시프트 740 cm^{-1} 와 1654 cm^{-1} 에서의 신호 세기는 정상 대조군과 비교하여 높다고 알려져 있다(Pichardo-Molina *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011). 이토록 높은 측정 민감도와 특이성으로 미세한 라만 산란 신호의 차이를 구분함으로써 질병 진단에 응용하고 있다.

최근 라만 분광법 기술 발달로 별도의 증폭 기술 없이도 생체 분자(biomolecule) 측정 민감도가 매우 향상되어 단세포 수준에서의 분석까지 응용범위가 확대 되었다. 기존 단세포 측정 기술과 달리 세균 고정, 배양, 포함 등 별도의 시료 전처리 과정이 없으며, 측정 시간(10~60초)이 짧아 실시간 수준의 분석이 가능하다(Stöckel *et al.*, 2016). 또한 측정 시 물에 의한 간섭이 적으므로 배양액 혹은 환경시료 추출액 등의 액상 시료 그대로 측정이 가능하며, 측정 이후에도 세포 파괴될 위험이 적어 검측된 단세포를 분리하여 배양 및 단세포(single cell) 유전체 분석에 응용할 수 있다(Berry *et al.*, 2015). 이러한 라만 분광법만의 장점들은 환경시료에 존재하는 세균의 특성을 단세포 수준에서 분석 가능하게 한다.

신속 세균 검측(Rapid bacterial identification)

라만 분광법은 세균의 단백질, 지질, 핵산 등의 세포 구성물질을 조사하며, 구성물질의 특성에 따라 라만 시프트 400 ~ 3200 cm^{-1} 구간에서 각각 다른 신호의 세기를 라만 스펙트라(spectra)로 결과값이 표현된다(Huang *et al.*, 2010). 이론적으로는 세균마다 고유의 라만 스펙트라로 나타나며, 일부 세균들은 종 수준으로 구분이 가능하다고 알려져 있다(Pahlow *et al.*, 2015). 뿐만 아니라 다양한 환경 조건에 따른 유전 형질 발현은 세포 구성에 영향을 미치며, 이는 라만 스펙트라의 변화로 나타나 같은 종 안에서 세포의 상태에 대한 정보를 확인할 수 있다(Ashton *et al.*, 2011). 일반적으로 단세포를 측정할 때 형광에 의한 배경 영향이 가장 적은 532 nm 레이저를 사용한다(Huang *et al.*, 2010). 532 nm 레이저에 공명(resonance)을 보이는 화학 결합 및 세포 구성물질의 라만 시프트 정보는 Table 1에 정리하였다(Deng *et al.*, 1999; Maquelin *et al.*, 2002). C-C, C-N와 같은 화학 결합과 DNA, 아미노산 등 다양한 구성물질의 특성을 확인할 수 있다(Fig. 1A). 특히 세균의 일반적인 라만 스펙트라에서 발견되는 아미노산 페닐알라닌은 라만 시프트 1004 cm^{-1} 에서 측정 가능하며, 세균의 라만 스펙트라 정확도를 판단하는 주요 인자로 활용된다.

의학 분야에서 라만 분광법은 감염 세균을 검측하여 세균 감염에 의한 질병 진단에 활용되고 있다. 요로감염증을 진단하기 위하여 임상시료로부터 염증의 주 원인 장내 세균인 *Escherichia coli*와 *Enterococcus faecalis*를 검출함으로써 진단

Table 1. Assignments of the Raman vibrational bands in bacterial cells

Frequency (cm ⁻¹)	Assignment	Reference
520-540	S-S str	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
540	COC glycosidic ring def	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
665	Guanine	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
720	Adenine	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
785	Cytosine, uracil (ring, str)	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
838	DNA	Deng <i>et al.</i> (1999)
858	CC str, COC 1,4 glycosidic link	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
897	COC str	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
1004	Phenylalanine	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
1061	C-N and C-C str	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
1085	C-O str	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
1102	>PO ₂ ⁻ str (sym)	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
1129	C-N and C-C str	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
1295	CH ₂ def	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
1440-1460	C-H ₂ def	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
1575	Guanine, adenine (ring stretching)	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
1606	Phenylalanine	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
1614	Tyrosine	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
1735	>C=O ester str	Maquelin <i>et al.</i> (2002)
2935	str CH ₂ Asymmetric	Williams and Edwards (1994)
3060	str CH Olefinic	Williams and Edwards (1994)

str, stretching; def, deformation; sym, symmetric; asym, antisymmetric

단할 수 있으며, 처방한 항생제의 효과 평가에도 적용 가능하다(Kloß *et al.*, 2013). 특히 *E. coli* 경우 ampicillin, ciprofloxacin, gentamicin, sulfamethoxazole 4개의 항생제에 대한 처리 효과를 직접 확인하기도 하였다(Münchberg *et al.*, 2014). 결핵의 주요 병원체로 알려져 있는 *Mycobacterium tuberculosis*에 대한 DB를 구축하여 결핵진단에 활용하려는 시도는 오래 전부터 진행 중이다(Buijtsels *et al.*, 2008). 이처럼 라만 분광법을 실시간 세균 검출 기술에 응용하여 질병 진단에 활용하는 연구는 가파르게 증가하고 있다.

의학분야 외에도 식품분야에서 활발히 라만 분광법을 활용하고 있다. 식품매개 질병(foodborne illness)을 일으키는 *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella spp.*, *Staphylococcus aureus* 등이 음식에 감염되었는지 여부를 신속하게 검출 할 수 있다. 현재 우유와 고기(닭, 다진 고기 등)에 포함되어 있는 감염균을 단세포 수준으로 검출이 가능하다고 알려져 있다(Meisel *et al.*, 2011, 2012). *Salmonella spp.* 검출 기술의 경우에는 다양한 식품에 따른 ISO 국제 표준안이 수립되었을 정도로 식품분야에서 라만 분광법의 활용은 다른 분야와 비교하여 보편화되

어 있다(Assaf *et al.*, 2014). 최근에는 수돗물과 시판되고 있는 물을 대상으로 *Pseudomonas aeruginosa*와 *Legionella spp.*를 검출하여 수질 보건 관리에 활용하는 사례도 나타나고 있다(van de Vossenbergh *et al.*, 2013; Silge *et al.*, 2014).

SIP-라만 기술을 이용한 생리학적 활성 분석

SIP (stable isotope probing) 기술은 탄소-13와 질소-15 등의 안정동위원소가 포함된 기질을 사용하는 세균을 분석하여 특정 기질에 대한 특이성을 연구하는 방법이다. 이때 핵산, 아미노산 등의 세포 구성물질이 안정동위원소로 표지되며, 표지된 구성물질은 기존의 라만 시프트 측정값과 다른 값을 갖게 되며 일반기질에 배양된 세균과 구분된다. 예를 들면, 탄소-12의 페닐알라닌 라만 시프트는 1004 cm⁻¹에서 관측되지만, 탄소-13으로 표지된 페닐알라닌의 라만 시프트는 967 cm⁻¹에서 라만 신호가 나타난다(Li *et al.*, 2012) (Fig. 1B). 페닐알라닌 외에도 동위원소 탄소-13, 질소-15, 수소-2로 세포 구성물질이 치환되었을 때 구분 가능한 라만 시프트 차이를 비교하여 세균의 생리 활성을 직접적으로 측정하는 것이 가능하다.

Huang 등(2009a)은 지하수에서 나프탈렌을 분해하는 세균

을 구분하기 위하여 탄소-13으로 표지된 나프탈렌을 탄소원으로 배양한 후, 세균 단세포들을 측정하였다. 측정 결과 나프탈렌을 분해하는 세균인 *Aicdovorax*의 페닐알라닌은 다른 세균 단세포와 달리 라만 시프트 967 cm^{-1} 에서 라만 신호가 나타났고, *Aicdovorax*가 나프탈렌을 탄소원으로 사용하는 세균이라는 것을 검증할 수 있었다(Huang *et al.*, 2009a). 또 다른 예로 환경시료에서 카로티노이드를 포함하는 cyanobacteria를 검출하기 위해 탄소-13의 중탄산나트륨을 주입하였을 경우, 표지된 cyanobacteria의 페닐알라닌의 라만 신호는 991 cm^{-1} 에서 나타났다(Stöckel *et al.*, 2016). 해당 실험을 통해 세포의 구성물질이 탄소-13으로 표지된 비율만큼 라만 시프트의 강도(Intensity)도 비례해서 변화하는 특성도 밝혀냈다. 이는 라만 시프트의 강도 정보를 이용하여 기질에 대한 세균 활성을 정량 분석하는 것이 가능하다는 것을 의미한다. 다만 탄소-13 기질의 표지 정도가 10% 미만일 경우에는 라만 분광법의 검출 한계로 인하여 탄소-12와 구분할 수 없기 때문에 높은 농도의 동위원소를 기질로 활용해야 한다(Huang *et al.*, 2007).

질소 동위원소를 사용할 경우 탄소 동위원소를 사용할 경우보다 라만 시프트의 변화가 상대적으로 적으며, 아미노산에서 차이를 보였던 탄소와 달리 주로 핵산의 라만 시프트 값에서 변화가 발생한다(Huang *et al.*, 2010). 이러한 변화조차도 다른 라만 시프트에 묻혀서 복잡한 시료에서는 구분하기가 매우 어렵기 때문에 질소 동위원소를 활용한 연구는 제한적으로 진행되었다. 질소-14의 염화암모늄과 질소-15의 염화암모늄의 비율이 다른 배지에 배양된 *E. coli*를 라만 분광법으로 측정 한 결과, 라만 시프트의 위치 변화는 확인 할 수 없었지만 신호 강도는 동위원소의 주입 농도와 비례해서 증가함을 확인하였다(Muhamadali *et al.*, 2015). 라만 시프트의 위치 변화를 동반하지 않은 강도 변화는 실험 방법의 차이(초점 조절, 세균 측정 위치 등)에 따라 변화가 가능하므로 세균의 생리학적 활성을 구분하는 것은 한계가 있다. 그러므로 질소 동위원소에 따른 변화를 보다 명확히 보기 위해서는 SERS와 같은 증폭 기술을 연계하여 진행해야 한다.

수소 동위원소인 수소-2(D; Deuterium)는 지질의 대사과정을 연구할 때 주로 사용하며, 수소-2로 표지된 세포 구성물질(C-D 결합)은 라만 시프트 $2000\sim 2300\text{ cm}^{-1}$ 에서 측정 가능하다(van Manen *et al.*, 2008). 동위원소를 사용하지 않았을 경우에는 $2000\sim 2300\text{ cm}^{-1}$ 라만 시프트 지역에 특별한 신호가 존재하지 않지만, C-D 결합이 존재할 경우 새로운 신호가 측정된다(Fig. 1B). 그리고 수소-2 동위원소가 지질이 아닌 다른 세포 구성물질로 충분히 표지될 경우, 탄소 동위원소 결과와 유사하게 페닐알라닌의 라만 시프트가 959 cm^{-1} 로 이동하는 현상

도 보고되고 있다(van Manen *et al.*, 2008). 세균 내에서도 지질을 포함하는 부분은 광범위 하기 때문에 단순 검출 외에도 이미징 기법을 이용하여 지질 대사 모니터링에 응용 가능하다(Xie *et al.*, 2006). 하지만 일반적인 기질의 수소를 수소-2 동위원소로 치환해서 실험을 하더라도 세포 구성 물질로 사용되는 수소의 양이 상대적으로 적기 때문에 변화하는 라만 시프트 값을 확인하기 어려운 한계가 있다. 예를 들어, 수소-2로 치환된 아세트산을 기질로 하여 배양된 *Geobacter metalireducens*에서 동위원소 사용에 따른 라만 신호의 변화는 관측하기 어려웠다(Kubryk *et al.*, 2015). Berry의 연구진은 검출력을 높이기 위해서 기질의 수소를 동위원소로 치환하지 않고, 배양액을 중수(D₂O)로 대체하여 생리적 활성 분석에 성공하였다(Berry *et al.*, 2015). 기질 활성을 보이는 세균들은 지질 생합성 시 배양액의 수소이온과 치환을 하는 특성을 이용해서 동위원소로 치환된 기질을 사용하지 않고서도 생리학적 활성이 있는 세균을 라만 시프트를 통해 분석 가능한 것이다. 환경시료에는 다양한 기질(사체에서 발생하는 유기물 포함)들이 포함되어 있어 중수를 활용한 실험이 어려울 수도 있지만, 탄소 혹은 질소의 동위원소를 포함한 중복 표지 기법을 이용한다면 미생물 군집 수준의 분석도 가능할 것으로 기대된다.

단세포 분리 기술(Single cell sorting)으로 응용

라만 분광법은 미생물 검출 뿐만 아니라 다른 기술과 융합하여 환경의 복잡한 미생물 군집으로부터 관심 있는 미생물을 선택적으로 분리하는데 이용할 수 있다. 광학 집게(optical tweezer)는 고초점의 레이저 빛을 사용하여 미생물을 선택적으로 분리해 내는데 이용되고 있다(Xie *et al.*, 2005). 광학 집게의 레이저는 시료의 굴절률에 따라 척력을 생산해 낼 수 있는데 이를 이용하여 비파괴적이고 비접촉적인 방식으로 시료의 오염 위험이 적은 상태로 미생물을 분리할 수 있다(Xie *et al.*, 2005). Huang 등(2009b)은 514.5 nm 파장의 광학 집계를 이용하여 효모와 세균의 혼합 배양액으로부터 효모균 단세포 70개와 세균의 단세포 58개를 측정하고 1064 nm 레이저로 분리시킬 수 있었다. 그러나 광학 집계를 이용한 기술은 실험자가 단세포를 각각 분리해야 하므로 다소 노동 집약적이다.

Raman activated cell ejection (RACE) 기술은 Laser induced forward transfer (LIFT) 현상을 유발하기 위해 펄스 레이저(Pulsed laser)를 투명한 기질에 조사하고 투명한 기질에 흡수된 레이저가 세포를 슬라이드에서 떨어뜨려 분리하는 원리이다(Wang *et al.*, 2013). 복잡한 미생물 군집에서도 원하는 미생물의 단세포를 신속하게($200\sim 300\text{ cells/day}$) 분리할 수 있으나, 티타늄과 같은 특수재질로 코팅된 슬라이드를 별도로 제

작해야 하며, 강력한 pulsed laser 노출 등의 실험 안전에 대한 제한사항이 존재한다.

또 다른 방법으로는 미세유체칩과 연계하여 활용하는 것이다. 마이크로 수준의 시스템에서는 유체는 대부분 유선형이며 다상류로 존재하여 표면장력이 관성보다 큰 영향을 보이는 특성을 보이는데 이를 단세포 분리에 응용할 수 있다. 미세유체칩의 설계 디자인에 따라 단세포 분리의 자동화가 가능하기 때문에 RACE 기술보다 더 높은 효율로 분리가 가능하다.

결론

본 총설에서는 라만 분광법의 원리와 미생물 분석에 응용할 수 있는 다양한 분야에 대해서 기존 연구 결과들을 바탕으로 정리하였다. 라만 분광법은 별도의 전처리 과정 없이 세포 구성물질을 실시간 수준으로 조사 가능하기 때문에 단세포 수준의 검출 기기로써 가치가 매우 높다. 또한 생리적 활성 평가 뿐만 아니라 형광 현미경, 미세유체칩 등의 다른 장치들과의 결합이 용이하기 때문에 다양한 미생물 분석에 응용될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 기기의 낮은 접근성 때문에 그동안 국내 미생물 연구자들의 활용이 제한적일 수 밖에 없었지만 단세포 수준의 연구가 점점 증가함에 따라 라만 분광법의 필요성이 점차 늘어날 것으로 예상된다. 따라서 국내에서도 세균의 라만 데이터베이스 구축, 실험 조건에 따른 라만 시프트 변화 실험 등의 기초적인 자료 수집부터 식품, 의료 등 다양한 산업 분야에 활용될 수 있는 응용 기술까지 체계적인 연구가 지속되어야 할 것이다.

적요

라만 분광법은 레이저가 분자의 공명에 의해 산란되는 특성을 이용하여 세포 내 지질, 핵산, 단백질 등의 구성물질을 신속하게 측정할 수 있어 단세포 수준의 세균 검출에 적합한 기술로 알려져 있다. 세포 구성물질에 대한 높은 특이성과 민감성 때문에 라만 스펙트럼(spectra)만으로 일부 종 수준의 세균 계통분석이 가능하다. 또한 탄소-13, 수소-2 등의 동위원소를 동시에 사용하였을 경우 단세포의 생리적 활성 변화에 대한 정량평가에 활용할 수 있다. 라만 분광법을 이용한 세균 검출 이후에도 광학핀셋과 미세유체칩과 연계하여 관심 있는 난배양성 세균을 선택적으로 분리하거나 단세포 유전체 연구에 이

용할 수 있을 정도로 응용 범위가 넓다. 본 총설에서는 라만 분광법을 활용한 미생물 분석 연구의 정확한 이해를 돕고자 기존의 연구를 중심으로 라만 분광법의 특성과 응용분야에 대해서 검토, 정리하였다.

감사의 말

이 논문은 2017년 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2017R1D1A3B03029787).

References

- Amann, R. and Fuchs, B.M.** 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 339-348.
- Ashton, L., Lau, K., Winder, C.L., and Goodacre, R.** 2011. Raman spectroscopy: Lighting up the future of microbial identification. *Future Microbiol.* **6**, 991-997.
- Assaf, A., Cordella, C.B., and Thouand, G.** 2014. Raman spectroscopy applied to the horizontal methods ISO 6579: 2002 to identify *Salmonella* spp. in the food industry. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 4899-4910.
- Berry, D., Mader, E., Lee, T.K., Woebken, D., Wang, Y., Zhu, D., Palatinszky, M., Schintlmeister, A., Schmid, M.C., Hanson, B. T., et al.** 2015. Tracking heavy water (D2O) incorporation for identifying and sorting active microbial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, E194-203.
- Buijtel, P.C., Willemse-Erix, H.F., Petit, P.L., Endtz, H.P., Puppels, G.J., Verbrugh, H.A., van Belkum, A., van Soolingen, D., and Maquelin, K.** 2008. Rapid identification of mycobacteria by Raman spectroscopy. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 961-965.
- Chen, P., Tian, Q., Baek, S., Shang, X., Park, A., Liu, Z., Yao, X., Wang, J., Wang, X., and Cheng, Y.** 2011. Laser Raman detection of platelet as a non-invasive approach for early and differential diagnosis of alzheimer's disease. *Laser Phys. Lett.* **8**, 547.
- Deng, H., Bloomfield, V.A., Benevides, J.M., and Thomas, G.J.** 1999. Dependence of the Raman signature of genomic B-DNA on nucleotide base sequence. *Biopolymers* **50**, 656-666.
- Eder, S.H., Gigler, A.M., Hanzlik, M., and Winkhofer, M.** 2014. Sub-micrometer-scale mapping of magnetite crystals and sulfur globules in magnetotactic bacteria using confocal Raman micro-spectrometry. *PLoS One* **9**, e107356.
- Edwards, H.G.M., Hutchinson, I.B., Ingley, R., Parnell, J., Vitek, P., and Jehlička, J.** 2013. Raman spectroscopic analysis of geological and biogeological specimens of relevance to the exomars mission. *Astrobiology* **13**, 543-549.
- Eichorst, S.A., Strasser, F., Woyke, T., Schintlmeister, A., Wagner,**

- M., and Wobken, D.** 2015. Advancements in the application of NanoSIMS and Raman microspectroscopy to investigate the activity of microbial cells in soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **91**, fiv106.
- Hoppe, P., Cohen, S., and Meibom, A.** 2013. Nanosims: Technical aspects and applications in cosmochemistry and biological geochemistry. *Geostand. Geoanal. Res.* **37**, 111–154.
- Huang, W.E., Ferguson, A., Singer, A.C., Lawson, K., Thompson, I.P., Kalin, R.M., Larkin, M.J., Bailey, M.J., and Whiteley, A.S.** 2009a. Resolving genetic functions within microbial populations: *in situ* analyses using rRNA and mRNA stable isotope probing coupled with single-cell Raman-fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 234–241.
- Huang, W.E., Li, M., Jarvis, R.M., Goodacre, R., and Banwart, S.A.** 2010. Shining light on the microbial world: The application of Raman microspectroscopy. *Adv. Appl. Microbiol.* **70**, 153–186.
- Huang, W.E., Stoecker, K., Griffiths, R., Newbold, L., Daims, H., Whiteley, A.S., and Wagner, M.** 2007. Raman-FISH: Combining stable-isotope Raman spectroscopy and fluorescence *in situ* hybridization for the single cell analysis of identity and function. *Environ. Microbiol.* **9**, 1878–1889.
- Huang, W.E., Ward, A.D., and Whiteley, A.S.** 2009b. Raman tweezers sorting of single microbial cells. *Environ. Microbiol. Rep.* **1**, 44–49.
- Ibrahim, S.F. and van den Engh, G.** 2007. Flow cytometry and cell sorting, pp. 19–39. Cell separation, Springer.
- Kloß, S., Kampe, B., Sachse, S., Rösch, P., Straube, E., Pfister, W., Kiehnopf, M., and Popp, J.** 2013. Culture independent Raman spectroscopic identification of urinary tract infection pathogens: A proof of principle study. *Anal. Chem.* **85**, 9610–9616.
- Kong, K., Kendall, C., Stone, N., and Notingher, I.** 2015. Raman spectroscopy for medical diagnostics — from *in-vitro* biofluid assays to *in-vivo* cancer detection. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **89**, 121–134.
- Kubryk, P., Kölschbach, J.S., Marozava, S., Lueders, T., Meckenstock, R.U., Niessner, R., and Ivleva, N.P.** 2015. Exploring the potential of stable isotope (resonance) Raman microspectroscopy and surface-enhanced Raman scattering for the analysis of microorganisms at single cell level. *Anal. Chem.* **87**, 6622–6630.
- Lewis, I.R. and Edwards, H.** 2001. Handbook of Raman spectroscopy: From the research laboratory to the process line, CRC Press.
- Li, M., Canniffe, D.P., Jackson, P.J., Davison, P.A., FitzGerald, S., Dickman, M.J., Burgess, J.G., Hunter, C.N., and Huang, W.E.** 2012. Rapid resonance Raman microspectroscopy to probe carbon dioxide fixation by single cells in microbial communities. *ISME J.* **6**, 875–885.
- Münchberg, U., Rösch, P., Bauer, M., and Popp, J.** 2014. Raman spectroscopic identification of single bacterial cells under antibiotic influence. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 3041–3050.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L.P., van den Braak, N., Endtz, H.P., Naumann, D., and Puppels, G.** 2002. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J. Microbiol. Methods* **51**, 255–271.
- Meisel, S., Stöckel, S., Elschner, M., Melzer, F., Rösch, P., and Popp, J.** 2012. Raman spectroscopy as a potential tool for detection of *Brucella* spp. in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5575–5583.
- Meisel, S., Stöckel, S., Elschner, M., Rösch, P., and Popp, J.** 2011. Assessment of two isolation techniques for bacteria in milk towards their compatibility with Raman spectroscopy. *Analyst.* **136**, 4997–5005.
- Muhamadali, H., Chisanga, M., Subaihi, A., and Goodacre, R.** 2015. Combining Raman and FT-IR spectroscopy with quantitative isotopic labeling for differentiation of *E. coli* cells at community and single cell levels. *Anal. Chem.* **87**, 4578–4586.
- Pahlow, S., Meisel, S., Cialla-May, D., Weber, K., Rösch, P., and Popp, J.** 2015. Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **89**, 105–120.
- Pichardo-Molina, J., Frausto-Reyes, C., Barbosa-García, O., Huerta-Franco, R., González-Trujillo, J., Ramírez-Alvarado, C., Gutiérrez-Juárez, G., and Medina-Gutiérrez, C.** 2007. Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients. *Lasers Med. Sci.* **22**, 229–236.
- Rösch, P., Harz, M., Schmitt, M., Peschke, K.D., Ronneberger, O., Burkhardt, H., Motzkus, H.W., Lankers, M., Hofer, S., and Thiele, H.** 2005. Chemotaxonomic identification of single bacteria by micro-Raman spectroscopy: Application to clean-room-relevant biological contaminations. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1626–1637.
- Segata, N., Boernigen, D., Tickle, T.L., Morgan, X.C., Garrett, W.S., and Huttenhower, C.** 2013. Computational meta'omics for microbial community studies. *Mol. Syst. Biol.* **9**, 666.
- Sharma, B., Frontiera, R.R., Henry, A.I., Ringe, E., and Van Duyn, R.P.** 2012. SERS: Materials, applications, and the future. *Mater. Today* **15**, 16–25.
- Silge, A., Schumacher, W., Rösch, P., Da Costa Filho, P.A., Gérard, C., and Popp, J.** 2014. Identification of water-conditioned *Pseudomonas aeruginosa* by Raman microspectroscopy on a single cell level. *Syst. Appl. Microbiol.* **37**, 360–367.
- Smith, G.D. and Clark, R.J.** 2004. Raman microscopy in archaeological science. *J. Archaeol. Sci.* **31**, 1137–1160.
- Stöckel, S., Kirchhoff, J., Neugebauer, U., Rösch, P., and Popp, J.** 2016. The application of Raman spectroscopy for the detection and identification of microorganisms. *J. Raman Spectrosc.* **47**, 89–109.
- Stepanuskas, R. and Sieracki, M.E.** 2007. Matching phylogeny and metabolism in the uncultured marine bacteria, one cell at a time. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 9052–9057.
- Tringe, S.G., Von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A.A., Chen, K., Chang, H.W., Podar, M., Short, J.M., Mathur, E.J., and Detter, J.C.** 2005. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science* **308**, 554–557.
- van de Vossenberg, J., Tervahauta, H., Maquelin, K., Blokker-Koopmans, C.H., Uytewaal-Aarts, M., van der Kooij, D., van Wezel, A.P., and van der Gaag, B.** 2013. Identification of bacteria in drinking

- water with Raman spectroscopy. *Anal. Methods* **5**, 2679–2687.
- van Manen, H.J., Lenferink, A., and Otto, C.** 2008. Noninvasive imaging of protein metabolic labeling in single human cells using stable isotopes and Raman microscopy. *Anal. Chem.* **80**, 9576–9582.
- Wang, Y., Huang, W.E., Cui, L., and Wagner, M.** 2016. Single cell stable isotope probing in microbiology using Raman microspectroscopy. *Curr. Opin. Biotechnol.* **41**, 34–42.
- Wang, Y., Ji, Y., Wharfe, E.S., Meadows, R.S., March, P., Goodacre, R., Xu, J., and Huang, W.E.** 2013. Raman activated cell ejection for isolation of single cells. *Anal. Chem.* **85**, 10697–10701.
- Williams, A.C. and Edwards, H.G.M.** 1994. Fourier transform raman spectroscopy of bacterial cell walls. *J. Raman Spectrosc.* **25**, 673–677.
- Xie, C., Mace, J., Dinno, M., Li, Y., Tang, W., Newton, R., and Gemperline, P.** 2005. Identification of single bacterial cells in aqueous solution using confocal laser tweezers Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* **77**, 4390–4397.
- Xie, X.S., Yu, J., and Yang, W.Y.** 2006. Living cells as test tubes. *Science* **312**, 228–230.
- Zengler, K.** 2009. Central role of the cell in microbial ecology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 712–729.