

식중독균 검출용 임피던스형 바이오센서 개발

Development of Impedance Biosensor for Foodborne Pathogen Detection

김기영* 문지혜** 엄애선** 양길모* 조남홍*
G. Kim J.H. Mun A.S. Om G.M. Yang N.H. Cho

1. 서론

국민소득 향상 및 건강에 관한 관심증대 등으로 소비자의 고품질·안전 농산물에 대한 요구가 크게 증가하고 있으며, 수입 농산물의 빈번한 병원성 미생물, 독소, 기생충 알 등 각종 유해물질 파동으로 인하여 농산물 안전성에 대한 관심이 크게 높아지고 있다. 하지만, 기존의 농산물 및 농식품 안전성 분석은 실험실에 설치된 고가 정밀 장비에 의존하여 이루어져 온 관계로 분석에 따른 비용과 시간이 많이 소요되었고, 그 때문에 농산물 안전성을 짧은 시간 내에 판정하여 오염 농산물에 대한 신속한 조치를 취하는데 많은 어려움이 있었다.

최근 들어 생물학적 요소로 이루어진 감지물질을 이용한 바이오센서가 의료용을 포함한 여러 산업분야에서 높은 활용 가능성을 보여주고 있으며, 농식품 및 농산물 안전성 분야에서도 식중독균의 신속검출기술 개발을 가능케 할 기술로서 많은 기대를 받고 있다. 바이오센서는 감지물질로부터 얻어진 신호와 그 변환방법에 따라 광학식, 전기화학식, 압전식 등 여러 가지로 분류된다. 여러 종류의 바이오센서 중에서 광학식의 한 종류인 광섬유 바이오센서는 낮은 검출한계, 재사용 가능성, 그리고 광통신 관련 전자 및 광학 부품의 지속적인 발전에 따른 성능향상 등으로 많은 분야에 걸쳐 활용되고 있다.

여러 가지 바이오센서 중에서 임피던스 센서는 전극 표면에 생물분자의 검출부를 형성하여 특정 생물재료의 정전용량과 저항 변화를 함께 분석할 수 있는 도구로서 많은 분야에서 활용되어 왔다. 임피던스 바이오센서는 폭넓은 교류 입력에 대한 측정 대상물의 임피던스 반응을 분석함으로써 재료의 특성을 다양하게 분석할 수 있다는 것과 전기적인 모델링을 통한 센서의 반응을 이론적으로 해석할 수 있다는 장점 때문에 다양한 생물재료의 특성을 분석하는 연구에 활용되어 왔다(Felice 등, 1999).

농산물의 안전성을 위협하는 대표적인 위해요소는 식중독균이며, 그 중에서도 우리나라에서는 살모넬라(*Salmonella* spp.)에 의한 식중독 사고가 가장 많이 발생하고 있다. 살모넬라는 막대모양의 그람(Gram) 음성 간균으로 편모를 지녀 운동성이 있으며, 식수나 달걀 및 닭고기와 같은 식품 등을 통하여 인체에 질병을 유발시키는 대표적인 병원성 세균이다. 살모넬라균을 검출하기 위한 전통적인 방법은 증식배양, 선택배양 및 생화학검사를 포함한 3~5일의 분석시간이 소요되며, 이 때문에 식중독 사고 발생 이후 식중독 원인균을 분리·동정할 목적으로 사용될 뿐 조기에 세균을 검출하여 식중독을 차단하는 것은 불가능하다.

* 농업공학연구소 농산물안전성판정연구실

** 한양대학교 생활과학대학 식품영양학과

식생활 패턴의 변화에 기인한 대량급식 및 외식의 증가와 가공 농산물의 대규모 유통으로 인한 대형 식중독 사고의 방지와 오염 농산물의 회수에 따른 막대한 비용의 낭비를 막기 위해서는 기존 분석방법의 단점을 보완할 수 있는 신속한 식중독균 검출기술의 개발이 시급하다.

본 연구는 대표적인 식중독균인 살모넬라 세균을 신속하게 검출할 수 있는 임피던스 바이오센서를 개발하기 위하여 수행되었으며, 기존의 검출방법과 임피던스 바이오센서 검출결과와의 비교를 통하여 개발된 바이오센서의 성능을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

살모넬라 세균 검출을 위한 임피던스형 바이오센서는 그림 1과 같이 서로 맞물리는 형태로 이웃한 두 개의 전극에 살모넬라를 포획할 수 있는 살모넬라 다클론 항체를 고정화시키는 방법으로 개발하였다.

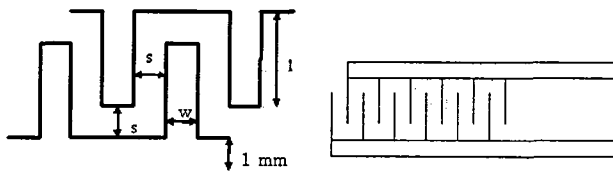


Fig. 1 Schematics of an impedance biosensor

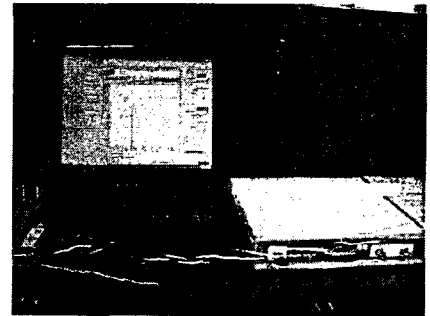


Fig. 2 Impedance measurement system

살모넬라 세균은 길이 2~4 μm , 폭 1~2 μm 정도의 크기를 가지며, 일반적으로 살모넬라균의 유무에 따른 임피던스 바이오센서의 전기적인 특성 변화가 극대화 되어 나타나기 위해서는 살모넬라균이 두 전극의 유전율이나 저항을 크게 변화시킬 수 있도록 두 전극이 가깝게 위치하는 것이 바람직하다. 본 연구에서는 가능한 높은 감도로 살모넬라 세균을 검출할 수 있도록 전극의 폭과 간격이 상용 임피던스 센서 중에서 최소인 것을 시중에서 구입하여 임피던스 바이오센서의 기본틀로 사용하였다. 바이오센서 개발에 사용된 임피던스 센서는 BAS 사 (Tokyo, Japan)의 제품으로서 전극의 폭은 10 μm , 간격은 5 μm 이며, 65개의 맞물린 핑거쌍을 지니고 있다. 임피던스 센서의 재질은 유리 웨이퍼이며, 전극의 재질은 생물체와 접촉하였을 경우 영향이 적고, 화학적으로 항체를 결합시키기 좋은 전극인 금(Au)을 선택하였다. 임피던스 바이오센서는 위의 임피던스 센서의 전극 표면에 살모넬라균을 검출할 수 있는 분자식별부를 형성시킴으로써 제작하였다. 분자식별부 제작의 첫 번째 단계로서, 살모넬라 포획용 항체를 전극의 표면에 고정시키기 위해 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 뉴트라아비딘이 용해된 PBS (phosphate buffered saline) 용액을 전극 표면에 200 μl 떨어뜨린 다음 상온에서 20분

동안 반응시켰다. 흡착에 의해 전극 표면에 뉴트라아비딘층이 형성된 다음, 남아있는 불필요한 뉴트라아비딘을 PBS-Triton (0.05% Triton X-100을 함유한 0.02 M PBS) 세척액을 이용하여 3회 씻어 내었다. 이 후 각 고정화 단계 사이에 마찬가지로 방법으로 불필요한 물질들을 세척하였다. 두 번째 단계로 바이오틴(biotin)이 부착된 항체의 농도가 100 μ g/ml인 PBS 용액을 전극위에 200 μ l 가한 다음 상온에서 10분간 반응시켜 살모넬라균을 포획할 수 있는 바이오틴이 부착된 항체를 뉴트라아비딘에 부착시켰다. 바이오센서 제작에 필요한 뉴트라아비딘, PBS, Triton X-100 등의 시약은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 바이오틴이 부착된 살모넬라 항체는 ViroStat (USA) 사로부터 구입하여 사용하였다.

항원-항체 반응에 의해 임피던스 센서에서 발생하는 신호는 매우 미약하기 때문에, 이러한 미세 신호를 증폭하여 측정할 수 있는 특별한 측정시스템이 필요하다. 기존 바이오센서 연구에 사용되는 임피던스 측정시스템은 전자부품이나 전자회로의 분석을 위해 개발된 장비로서 고가이며 큰 부피를 지니고 있다. 본 연구에서는 현장에서 임피던스 바이오센서의 신호를 측정하여 농산물의 식중독균 오염을 신속하게 검출할 수 있도록, 휴대형 임피던스 미세신호 증폭모듈 (Bode 100, Omicron Lab, USA)을 이용하여 임피던스 바이오센서의 측정시스템을 구성하였다 (그림 2). 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.

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, PBS 버퍼로 3회 세척한 다음 살모넬라 세균에 의한 임피던스 변화를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

임피던스 바이오센서의 유효 측정주파수 대역을 확인하기 위하여 PBS 버퍼에 든 10^7 cfu/ml 농도의 살모넬라균을 이용하여 검출 실험을 수행하였다. 측정시스템의 입력주파수를 100 Hz, 300 Hz, 400 Hz로 변화시켰을 때 가장 감도가 높은 주파수를 구명하였는데, 실험 결과 그림 3과 같이 입력주파수가 100 Hz 일 때 살모넬라균 검출에 따른 임피던스 바이오센서의 신호 감도가 가장 크게 나타났으며, 이 입력주파수를 이용하여 살모넬라 검출 실험을 수행하였다. PBS buffer에 살모넬라균을 $10^1 \sim 10^7$ cfu/ml로 희석하여 준비한 시료를 이용하여 수행한 임피던스 바이오센서의 검출성능 시험결과를 그림 4에 나타내었다. 입력 주파수 100Hz에서 측정된 바이오센서의 임피던스는 10^4 cfu/ml부터 대조군과 차이를 나타내었다.

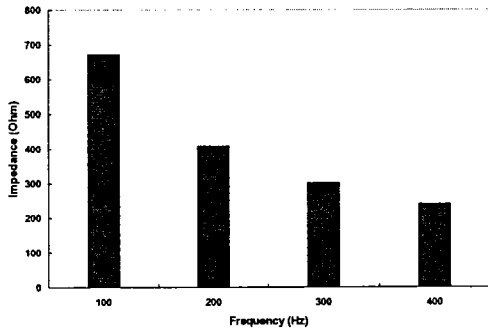


Fig. 3 Frequency characteristics of the impedance biosensor.

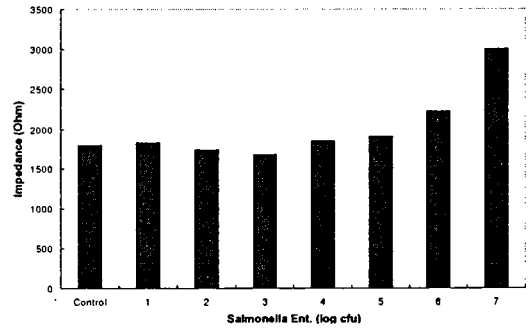


Fig. 4 Detection of *S. enteritidis* in PBS.

식품시료에 오염된 살모넬라균의 농도변화에 따른 바이오센서의 신호 변화를 알아보기 위하여 우유를 대상으로 바이오센서의 검출실험을 수행하였다. 살모넬라균을 우유 시료에 각각 $10^3 \sim 10^8$ cfu/ml로 희석하여 주파수 100Hz에서 임피던스를 측정하였으며, 식품 시료에 오염된 살모넬라균의 세균수와 임피던스 센서 반응 사이의 관계를 그림 5에 나타내었다.

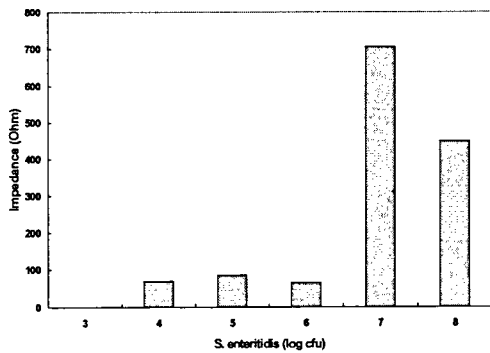


Fig. 5 Detection of *S. enteritidis* in milk.

4. 요약 및 결론

본 연구는 살모넬라 식중독균을 신속하게 검출할 수 있는 임피던스 바이오센서를 개발하기 위하여 수행되었으며, 기존의 표준평판 검출방법과 바이오센서 검출결과의 비교를 통하여 개발된 바이오센서의 성능을 조사하였다. 연구결과 표준인산용액에 오염된 살모넬라균의 경우 10^6 cfu/ml 우유에 오염된 살모넬라의 경우 10^7 cfu/ml 까지 검출이 가능하였다.

5. 참고문헌

Felice C.J., R.E. Madrid, J.M. Olivera, V.I. Rotger, M.E. Valentinuzzi. 1999. Impedance microbiology: quantification of bacterial content in milk by means of capacitance growth curves. *Journal of Microbiological Methods* 35:37-42