

## Gold-protein A Complex 항체 고정화법을 이용한 *Salmonella* spp.의 신속 검출

박인선 · 김남수  
한국식품개발연구원

### Rapid Detection of *Salmonella* spp. by Antibody Immobilization with Gold-protein A Complex

In-Seon Park and Namsoo Kim  
Korea Food Research Institute

#### Abstract

A piezoelectric (PZ) biosensor system detecting *Salmonella* spp. was developed. The system consisted of an oscillator, a frequency counter and an antibody-immobilized quartz crystal. An anti-*Salmonella* antibody was immobilized on one gold surface of the quartz crystal with protein A. *Salmonella* detection was made by measuring resonant frequency shift owing to a mass change by specific binding of microbial cells to the gold surface of the PZ crystal. The PZ antibody sensor was operated optimally at 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 and 35°C. The sensor was quite specific to *Salmonella* spp. The obtained frequency shift was correlated with the *Salmonella* concentration in the range of  $10^5$ - $10^6$  CFU/mL. The frequency shift increased further by addition of polystyrene beads. The *Salmonella* detection which is indicated by a steady-state microbial adsorption to the quartz crystal was accomplished within 50 min.

Key words: PZ biosensor, antibody immobilization, gold-protein A complex, *Salmonella* spp.

#### 서 론

식중독은 인류가 해결해야 할 가장 근본적이고 중요한 문제 중의 하나이다. 안전한 음용수의 공급, 확실한 위생기준의 설정 및 저온살균과 같은 기술의 응용에도 불구하고 수많은 산업국가에서 최근 식중독의 발생빈도가 증가하고 있다. 우리나라에서도 1997년에 수입 쇠고기 및 아이스크림에서 *Escherichia coli*, *Salmonella* 및 *Listeria*균이 발견된데 이어 1998년도 집단 급식과정에서 *S. typhimurium*이 발견되었다. WHO 보고<sup>(1)</sup>에 의하면 해마다 세계 인구의 5~10%가 식중독에 감염되는 것으로 나타나고 있으며 그 중에서도 원인물질별 식중독 양상을 보면 *Salmonella*균이 가장 문제시 되는 것으로 조사되고 있다<sup>(2,3)</sup>. 따라서, 식품가공시 안전성 증진을 위한 미생물관리의 필요성이 크게 제기되고 있으며, 병원균을 보다 효과적인 방법으로 신속하고 정확하게 검출함으로써 식중독을 미연에 방지하고, 검출방법의 발달로 효과적인 예방책

과 관리방법을 이끌어 내는 것이 필요하다. 식품 병원균을 검출할 수 있는 방법으로서 기존의 배양법은 신뢰성이 입증되고 있으나 검출시간이 오래 걸리는 단점이 있어 최근의 검사요구증가를 충족시키는데 한계가 있으므로 식중독균에 대한 신속하고 정확한 새로운 검출기술의 개발이 긴요한 실정이다.

바이오센서 기법에 의한 식품 병원균의 신속 검출 기술은 최근에 그 중요성이 인정되어 활발한 연구가 이루어지고 있는 분야이다<sup>(4)</sup>. 압전류적(piezoelectric, PZ) 바이오센서는 이와 같은 목적으로 활용될 수 있는데, 그 원리는 AT-cut 수정결정(예로 9 MHz의 고유진동수 보유)을 가공한 PZ 결정에 미생물, 항체 및 DNA probe 등과 같이 선택적 결합력이 우수한 생물요소를 고정화하고 여기에 식중독균 자체 혹은 추출 DNA 등이 결합하게 되면 수정결정의 질량이 변화하는데 이에 따른 진동수의 변화를 측정하는 방법이다<sup>(5)</sup>. 즉, 수정결정에 생물요소를 고정화하여 여기에 분석대상물질이 결합하면 해당물질의 농도에 비례하는 진동수 변화가 발생한다. PZ 바이오센서를 이용할 경우 동위원소나 발색단 등을 사용하는 것과 같은 번거롭

Corresponding author: Namsoo Kim, Korea Food Research Institute, Songnam 463-420, Korea

고 복잡한 전처리 과정이 필요없고 각종 착색물질에 의한 측정저해현상이 거의 없다. 따라서, 시료 처리과정이 간편하여 매우 신속하게 검출할 수 있을 뿐만 아니라 항체 및 DNA를 이용하므로 측정미생물에 대한 선택성이 뛰어난 장점이 있다<sup>6)</sup>.

본 연구에서는 *Salmonella*균을 보다 신속하게 측정할 수 있는 방법의 하나로서 protein A를 이용하여 항체를 고정화한 PZ 항체센서 시스템을 구성하였다. 또한, *Salmonella*균을 보다 효율적으로 검출하고자 이 항체센서 시스템의 최적조건 및 안정성을 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 항체 및 시약

PZ 센서의 수정결정(model QA 9RP-50)은 AT-cut 결정(Ti층 위에 Au 전극이 증착된 것)으로서 가로 8 mm, 세로 8 mm, 두께 0.18 mm의 크기(전극면적 0.2 cm<sup>2</sup>)인 것을 Seiko EG & G사(Chiba, Japan)에서 구입하여 변환기(transducer)로 사용하였다. 수정결정에 고정화하기 위해 *Salmonella* 구조항원(common structural antigen)에 대한 anti-*Salmonella* antibody (1.0 mg/mL)는 KPL (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., IL, USA)에서 구입하였으며 항체 고정화를 위하여 사용한 시약으로 protein A 및 2.5% glutaraldehyde는 Sigma사(MO, USA)에서 구입하였다. 식중독균으로서 *S. typhimurium* ATCC 14028, *L. monocytogenes* Scott A, *E. coli*는 tryptic soy broth (Difco Laboratories, MI, USA) 10 mL에 접종하여 37°C에서 18시간 2회 계대 배양한 것을 사용하였다.

### PZ 항체센서 시스템의 구성

수정결정 혹은 식중독균 항체가 고정화된 수정결정을 O-ring으로 고정하여 dip holder (model QA-CL3, EG & G)에 끼우고, 발진모듈(oscillator module, model QCA 917-11, Seiko EG & G)과 수정결정 진동측정기(quartz crystal analyzer, model QCA 917, Seiko EG & G)에 연결한 후 수정결정을 반응 cell내에 넣었다. 반응 cell내에는 일정한 전류가 가해지도록 potentiostat (model 283, EG & G, NJ, USA)와 연결하였다. 반응 cell을 완충용액으로 채우고, 순환 수욕조(Cole Parmer Inc., IL, USA)를 이용하여 항체반응의 최적온도로 항상 일정하게 유지하였다(Fig. 1). 수정결정 진동측정기에 나타나는 진동수(resonant frequency)의 변화량을 Echem 소프트웨어(version 4.3)에 의해 전송받아 분석하였다.

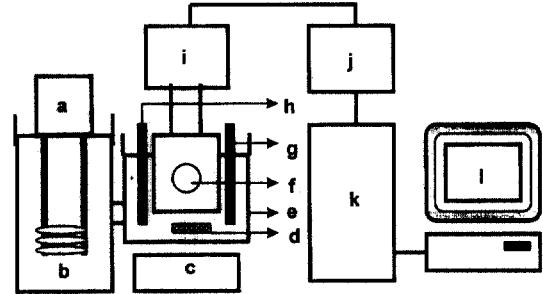


Fig. 1. Schematic diagram of the apparatus for an antibody-immobilized PZ sensor system. (a) circulator; (b) water bath; (c) stirrer; (d) magnetic bar; (e) reaction cell; (f) gold electrode (PZ crystal); (g) reference electrode; (h) counter electrode; (i) oscillator; (j) quartz crystal analyzer; (k) potentiostat; (l) PC.

### 항체의 고정화

수정결정을 1.2 M NaOH 용액에 20분간 담그고 증류수로 씻어낸 후 1.2 M HCl 용액에 5분간 담가 수정결정을 활성화시켰다. 진한 HCl 20  $\mu$ L를 수정결정의 중앙에 위치한 gold 표면에 가하고, 2분이 경과한 후 반대쪽 면에 다시 가하였다. 이것을 증류수와 95% ethanol로 씻어낸 후 100°C의 오븐에서 20분간 건조시켰다. 50 mM phosphate buffered saline (pH 7.0)에 용해된 protein A (1.0 mg/mL) 5  $\mu$ L를 수정결정 한쪽 면에 가하고 *Salmonella* 구조항원에 대한 항체(7.5 mg/mL)를 5  $\mu$ L 가한 후 실온에서 건조시켰다<sup>6)</sup>.

### PZ 항체센서의 감응도 측정

항체를 고정화한 수정결정을 0.1 M 인산 완충용액을 채운 반응 cell에 넣었다. 이 때, cell내의 완충용액의 부피는 25 mL로 일정하게 유지하였으며, 일정한 진동수를 나타내어 센서 시스템이 안정하게 유지되었는지를 확인한 후 임의의 농도를 갖는 2.5 mL의 *Salmonella*균을 반응 cell내에 가하여 고정화 항체와 식중독균간의 결합반응에 의하여 나타나는 진동수 감소량을 측정하였다. 또한, *Salmonella*균의 농도를 각각 달리하여 반응 cell내에 주입하여 각각의 농도에 따른 진동수 감소량을 측정 비교하였다.

### PZ 항체센서의 최적조건 확립

항체의 농도를 각각 달리하여 수정결정상에 고정화하고 항체농도에 따른 진동수 감소량을 측정하였다. PZ 항체센서가 온도, pH, 이온세기 등에 영향을 받는 지 알아보기 위하여 순환 수욕조에서 15~40°C까지 5°C 간격으로 온도를 조절하면서 적정온도를 조사하

였고, 인산 완충용액의 pH 및 이온세기를 각각 달리 하면서 항체센서의 감응도의 차이를 측정 비교하였다. 또한, polystyrene bead를 주입한 경우 항체센서의 감응도에 영향을 미치는지를 조사하였다.

다른 미생물에 대한 영향

*Salmonella* 구조항원에 대한 항체를 고정화한 PZ 항체센서가 *Salmonella*에 대하여 보여주는 선택적 특이성을 확인하였다. *L. monocytogenes*, *E. coli*와 dead *S. typhimurium*을 농도를 각각 달리하여 *S. typhimurium*과 함께 반응 cell에 주입하여 *Salmonella*균만을 주입하였을 때의 항체센서의 감응도와 비교하였다.

결과 및 고찰

수정결정에 항체를 고정화하는 기존의 방법으로는 polyethyleneimine에 의한 precoating, bovine serum albumin을 이용한 가교화, 3-aminopropyltriethoxysilane에 의한 실산화, protein A를 이용하는 고정화법 등이 보고되고 있다<sup>(8,11)</sup>. 이 중 protein A를 이용하는 고정화법에 의하여 제조한 항체센서의 경우 계속결과의 안정성과 재현성이 가장 우수한 것으로 나타났으므로 이 방법을 본 연구에서의 항체 고정화법으로 사용하였으며 이 때 protein A의 sulfhydryl기는 수정결정의 gold와 공유결합을 이루어 gold-protein A complex를 이루게 된다<sup>(10,11)</sup>.

항체가 고정화된 수정결정이 담겨 있는 반응 cell에 임의의 농도의 *Salmonella* 현탁액을 주입하게 되면 항체와 미생물사이의 결합반응이 일어나면서 진동수가 감소하게 되고 약 50분이 경과되면 진동수의 변화가 거의 없는 정지기에 도달하였다.

항체농도에 대한 영향

Gold-protein A 고정화법에 의하여 수정결정에 *Salmonella* 구조항원에 대한 항체의 농도를 각각 달리하여 고정화하였을 때 PZ 항체센서가 보여주는 감응도의 변화를 살펴 보았다. 항체농도를 증가하여 고정화함에 따라 감응도는 점차로 증가하였으나 7.5 mg/mL 이상의 항체농도에서는 감응도의 차이가 거의 없었다 (Fig. 2).

이온세기, pH, 온도에 대한 영향

수정결정의 진동수는 액체매질의 전도도, 점도, 밀도 및 이온세기에 복합적으로 영향을 받는다<sup>(10,12-14)</sup>. 그러므로, 반응 cell내의 완충용액의 이온세기는 실제 수

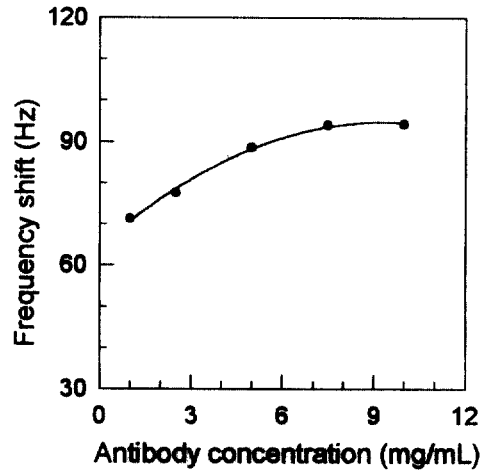


Fig. 2. Effect of antibody concentration for immobilization on the frequency shift of the antibody sensor.

정결정의 진동수에 상당한 영향을 미칠 것으로 생각된다. PZ 항체센서를 반응 cell에 담근 후 완충용액의 이온세기에 대한 영향을 살펴 본 결과, 인산 완충용액의 이온세기가 0.3까지는 진동수 변화량이 증가하다가 그 이후에는 감소하는 경향을 보여주었다(Fig. 3). 이온세기가 0.3인 경우에 반응 감응도가 가장 크게 나타난 것은 이 때의 이온세기에서 수정결정의 감응성이 가장 좋기 때문인 것으로 보여진다. 이온세기에 의한 영향은 항체-미생물 반응을 위한 생물학적인 최적 조건에 의한 것보다는 수정결정 자체가 액체매질의 이온세기에 영향을 받기 때문인 것으로 생각된다. 또한, *Salmonella* 항체센서에 온도와 pH가 미치는 영향을 살펴 본 결과, 반응 감응도가 가장 크게 나타난 것

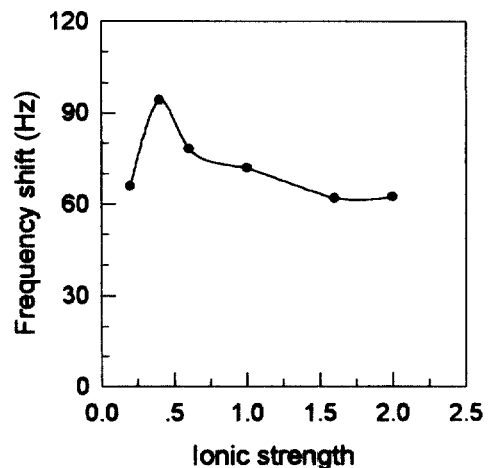


Fig. 3. Effect of ionic strength of buffer solution on the frequency shift of the antibody sensor.

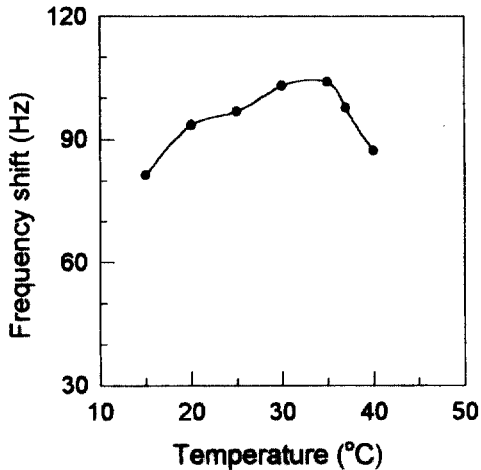


Fig. 4. Effect of temperature on the frequency shift of the antibody sensor.

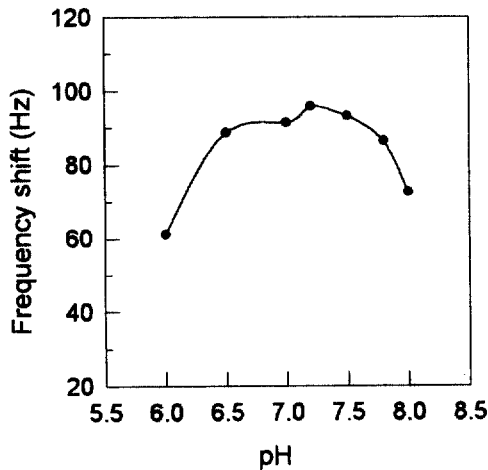


Fig. 5. Effect of pH on the frequency shift of the antibody sensor.

은 35°C에서 pH 7.2인 인산 완충용액으로서(Fig. 4, 5) 이 값들은 *Salmonella*의 최적 생육조건인 37°C, pH 7.0과 거의 일치하였다. 따라서 *Salmonella* 항체센서 작동시의 최적 온도인 35°C에서 pH 7.2, 0.1 M의 인산 완충용액을 선택하여 이 후의 모든 실험을 행하였다.

#### 다른 미생물에 대한 영향

수정결정을 완충용액으로 채워진 반응 cell에 담근 후 일정한 진동수가 유지되었을 때 완충용액을 주입하면, 주입하는 순간에 수정결정에 가해지는 진동에 의하여 약 10 Hz 정도의 진동수 변화가 나타났으나 이 후 곧 진동수가 안정되었다. 그러므로, *Salmonella* 현탁액을 주입하였을 경우 나타나는 진동수 감소량이

10 Hz 이상이 되면 이는 항체와 주입된 *Salmonella*와의 결합에 의한 진동수 변화임을 알 수 있었다.

*Salmonella* 항체센서가 *Salmonella*와의 선택적 특이성에 의한 반응을 하는지 확인하기 위하여 최근 가장 문제시 되는 식중독균의 하나로서 육류 및 육제품에서 식중독을 유발하는 *L. monocytogenes*와 공기나 식품 중에 흔히 존재하여 미생물에 의한 오염지표로 꼽히는 *E. coli*를 반응 cell내에 각각 1, 2, 3 mL씩 주입하고 진동수 변화를 측정하였다(Table 1). 이 때 주입된 미생물의 농도는 *L. monocytogenes*의 경우  $3.1 \times 10^7$  CFU/mL, *E. coli*의 경우  $2.7 \times 10^7$  CFU/mL이었다. 그 결과 진동수 변화는 12.9 Hz 이내로 나타났으며, 이는 동일한 부피의 완충용액을 주입하여 나타나는 진동수 변화와 거의 유사한 값이므로 본 연구의 항체센서가 *Salmonella*에 대하여 나타내는 선택성은 우수함을 알 수 있었다. 또한,  $1.8 \times 10^7$  CFU/mL 농도의 *S. typhimurium*과 함께 반응 cell내에 가하였을 경우 *L.*

Table 1. Specificity of the antibody sensor detecting *Salmonella* spp.

Microorganism	Addition amount (mL)	Frequency shift (Hz)	Difference (%)
<i>L. monocytogenes</i> <sup>1)</sup>	1.0	3.5±0.8	
	2.0	8.0±4.5	
	3.0	5.8±4.5	
<i>E. coli</i> <sup>2)</sup>	1.0	9.6±0.5	
	2.0	12.9±1.5	
	3.0	10.5±2.1	
Dead	1.0	3.1±0.7	
<i>S. typhimurium</i> <sup>3)</sup>	2.0	4.9±3.3	
	3.0	7.4±5.6	
	<i>S. typhimurium</i> <sup>4)</sup>	2.0	95.4±2.8
<i>L. monocytogenes</i> <sup>5)</sup>	1.0	98.0±2.5	-2.9
	2.0	98.4±5.3	+3.2
	3.0	107.9±3.8	+13.1
<i>E. coli</i> <sup>5)</sup>	1.0	98.3±0.9	+3.3
	2.0	96.2±2.6	+2.6
	3.0	101.3±3.3	+3.7
Dead	1.0	99.0±2.1	-3.7
<i>S. typhimurium</i> <sup>5)</sup>	2.0	97.8±2.8	+2.5
	3.0	99.2±3.0	+4.0

<sup>1)</sup>Added into the buffer solution in the concentration of  $3.1 \times 10^7$  CFU/mL.

<sup>2)</sup>Added into the buffer solution in the concentration of  $2.7 \times 10^7$  CFU/mL.

<sup>3)</sup>Heat-treated for 15 min at 121°C and added into the buffer solution.

<sup>4)</sup>Added into the buffer solution in the concentration of  $1.8 \times 10^7$  CFU/mL.

<sup>5)</sup>Added into the buffer solution with the *Salmonella* suspension.

*monocytogenes*, *E. coli*가 *Salmonella* 항체센서의 감응도에 미치는 영향은 13% 이내로 나타났는데(Table 1), 이는 *Salmonella*를 첨가하지 않고 완충용액만을 주입하였을 때 약 10 Hz 정도의 진동수 변화가 나타난 것을 고려해 보면 실제로 항체센서에 미치는 영향은 이보다 훨씬 적은 것임을 알 수 있었다.  $1.8 \times 10^7$  CFU/mL 농도의 *S. typhimurium*과 함께 반응 cell내에 주입하였을 경우 열처리에 의하여 사멸한 *Salmonella*가 항체센서와 결합반응에 관여하는지를 살펴 본 결과, 4% 이내의 감응도 차를 보여 주었다. 대체로 다른 미생물의 주입량이 증가할 때 진동수 변화량이 증가하였는데 동일한 관점에서 고찰해 보면 이러한 현상은 다른 미생물의 주입량이 증가함에 따른 것이지 항체센서의 선택성과는 무관한 것으로 사료된다.

**Polystyrene bead의 영향**

Polystyrene bead에 흡착된 미생물이 압전류적 항체센서에 결합되면 polystyrene bead의 중량에 의하여 진동수 변화량을 증가시켜 항체센서의 감응도를 증가시켜 준다고 보고되고 있다<sup>(15)</sup>. 본 연구에서도 첨가량을 달리하면서 반응 cell내에 polystyrene bead를 가하고 항체센서의 감응도 증진에 미치는 영향을 검토하였다.

먼저 polystyrene bead만을 주입한 경우 반응 cell에 완충용액을 주입한 경우와 마찬가지로 약 10 Hz 이내의 진동수 변화가 있을 뿐 이후에는 곧 진동수가 안정되어 수정결정상으로 polystyrene bead가 비선택적으로 흡착되지 않음을 보여주었다. 그러나, polystyrene bead의 농도를 각각 달리하여 인산 완충용액과 함께 섞은 후 *Salmonella*균의 주입 후에 나타나는 반응 감응도를 측정된 결과, polystyrene bead를 주입하지 않은 경우보다 진동수가 크게 감소하였는데, 이는 polystyrene bead에 흡착된 미생물이 고정화 항체와 결합하기 때 문인 것으로 생각된다. Table 2에서 볼 수 있는 것처럼 polystyrene bead 100  $\mu$ L를 주입한 경우 진동수 감소량이 62.2% 증가하였다. Muramatsu 등은 0.5  $\mu$ m의 polystyrene bead보다 1.0  $\mu$ m 크기의 bead를 사용했을

때 검출 효과가 더 컸으며, 1.0  $\mu$ m의 bead가  $3.0 \times 10^6$  CFU/mL 농도의 *E. coli*에 대하여 약 40 Hz의 진동수 증가를 가져왔음을 보고하였다<sup>(16)</sup>. 이로써 polystyrene bead를 첨가하면 미생물의 검출농도 한계를 낮출 수 있을 것으로 생각된다.

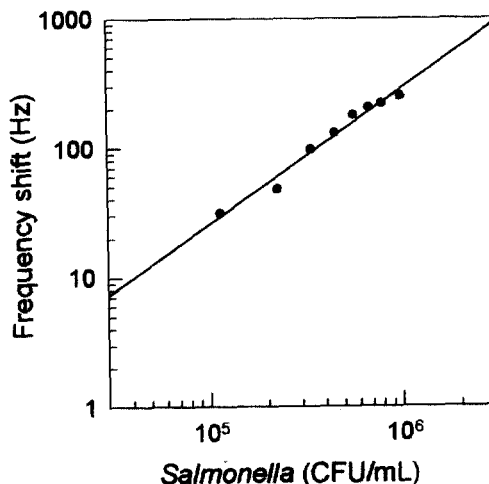
***Salmonella*균의 농도에 따른 표준곡선**

*Salmonella*균의 농도를 달리하면서 반응 cell내에 주입하였을 때 나타나는 진동수 감소량을 쌍대수좌표에 표시한 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같다. *Salmonella*균의 농도가  $10^5$ ~ $10^6$  CFU/mL 범위에서 직선상의 검량곡선( $r=0.974$ )을 구할 수 있었는데 이 결과는 *Salmonella*의 정량분석을 위한 농도범위가 제한적임을 보여주나 앞으로 수정결정에 항체를 고정화하는 방법을 개선함으로써 이러한 문제점을 해결할 수 있을 것으로 생각된다. 실제로 수정결정상의 금전극에 대하여 높은 반응성을 보이는 -SH기를 thiolation 기법에 의하여 항체에 도입한 후 -SH기가 도입된 항체를 수정결정에 고정화하면 진동수 감소량이 커지고 보다 넓은 농도 범위의 *Salmonella*균과 반응함을 알 수 있었다<sup>(16,17)</sup>.

살모넬라 중독(salmonellosis)을 유발하는 원인식품을 살펴보면 육류에 있어서는 돼지고기와 닭고기인 경우가 많고 계란 및 유제품도 이와 관련이 있는 것으로 나타나고 있다. 이 후 *Salmonella*균에 대한 검량선의 직선구간에 이르도록 식품에 존재하는 식중독균의 증균방법이나 최소 전처리 방법을 확립하여 PZ 항체센서를 이용한 식중독균의 실제 검출을 행하고자 한다.

**Table 2. Effect of polystyrene bead addition on the frequency shift of the antibody sensor**

Addition amount ( $\mu$ L)	Frequency shift (Hz)	Difference (%)
0	93.4 $\pm$ 3.4	
25	116.3 $\pm$ 5.7	+24.5
50	130.4 $\pm$ 0.3	+39.6
75	144.5 $\pm$ 1.5	+54.7
100	151.5 $\pm$ 6.8	+62.2



**Fig. 6. Relationship between *S. typhimurium* concentration and the frequency shift of the antibody sensor.**

## 감사의 글

본 연구는 '96년도 보건복지부 보건의료기술연구개발사업(HMP-96-F-1-1003)의 지원으로 수행했으며 지원에 감사드립니다. 아울러 실험용 균주를 제공하여 준 효성가톨릭대학교 이신호 교수께 감사드립니다.

## 요 약

*Salmonella* spp.의 신속한 검출을 위하여 발진모돌, 수정결정 진동측정기, 박막형태의 수정결정으로 이루어진 압전류적(piezoelectric, PZ) 항체센서 시스템을 구성하였다. 수정결정의 금전극 표면에 *Salmonella* 구조항원(common structural antigen)에 대한 항체를 protein A를 사용하여 고정화하고, 항체가 고정화된 수정결정과 미생물간의 결합반응에 의한 질량증가로 나타나는 진동수의 감소량을 측정하였다. PZ 항체센서는 35°C, pH 7.2의 0.1 M 인산 완충용액에서 *Salmonella*균에 대하여 가장 높은 감응도를 나타내었다. PZ 항체센서의 반응은 *Salmonella*균에 대하여 매우 선택적이었고 polystyrene bead 첨가시 센서의 감응도가 크게 증가하였다. *Salmonella*균의 농도가  $10^5 \sim 10^6$  CFU/mL의 범위 내에 있을 때 쌍대수좌표에서 직선구간의 검량선을 얻을 수 있었고, *Salmonella* 검출에 소요되는 시간은 50분이내 이었다.

## 문 헌

1. WHO: Prevention and control of Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) infections, pp.1-42 (1997)
2. Collins, J.E.: Impact of changing consumer lifestyles on the emergence-reemergence of foodborne pathogens. *EID*, **3**, 471-479 (1997)
3. Park, S.-K.: The current trends of microbiological foodborne disease, presented at Korean Society of the Food Hygiene and Safety, Yakurt Co., Seoul, May 22 (1998)
4. Guilbault, G.G. and Luong, J.H.T.: Piezoelectric immunosensors and their applications in food analysis. In *Food Biosensor Analysis*, ed., Wagner, G. and Guilbault, G.G., Marcel Dekker, New York, pp.151-172 (1994)
5. Guilbault, G.G., Hock, B. and Schmid, R.: A piezoelectric immunosensor for atrazine in drinking water. *Biosensors Bioelectronics*, **7**, 411-419 (1992)
6. Ngeh-Ngwainbi, J., Suleiman, A.A. and Guilbault, G.G.: Piezoelectric crystal biosensors. *Biosensors Bioelectronics*, **5**, 13-26 (1990)
7. Guilbault, G.G. and Jordan, J.M.: Analytical uses of piezoelectric crystals. A review. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, **19**, 1-28 (1988)
8. Plomer, M., Guilbault, G.G. and Hock, B.: Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of enterobacteria. *Enz. Microb. Technol.*, **14**, 230-235 (1992)
9. Prusak-Sochaczewski, E. and Luong, J.H.T.: Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of *Salmonella typhimurium*. *Enz. Microb. Technol.*, **12**, 173-177 (1990)
10. Muramatsu, H., Dicks, J.M., Tamiya, E. and Karube, I.: Piezoelectric crystal biosensor modified with protein A for determination of immunoglobulins. *Anal. Chem.*, **59**, 2760-2763 (1987)
11. Park, I.-S., Kim, W.Y. and Kim, N.: Rapid detection of *Salmonella* spp. by antibody-immobilized piezoelectric crystal biosensor. *J. Food Hygiene Safety*, **13**, 206-212 (1998)
12. Yao, S.-Z. and Zhou, T.-A.: Dependence of the oscillation frequency of a piezoelectric crystal on the physical parameters of liquids. *Anal. Chim. Acta*, **212**, 61-72 (1988)
13. Zhou, T., Nie, L. and Yao, S.: On equivalent circuits of piezoelectric quartz crystals in a liquid and liquid properties. Part 1. Theoretical derivation of the equivalent circuit and effects of density and viscosity of liquids. *J. Electroanal. Chem.*, **293**, 1-18 (1990)
14. Shana, Z.A., Zong, H., Josse, F. and Jeutter, D.C.: Analysis of electrical equivalent circuit of quartz crystal resonator loaded with viscous conductive liquids. *J. Electroanal. Chem.*, **379**, 21-33 (1994)
15. Muramatsu, H., Watanabe, Y., Hikuma, M., Ataka, T., Kubo, I., Tamiya, E. and Karube, I.: Piezoelectric crystal biosensor system for detection of *Escherichia coli*. *Anal. Letters*, **22**, 2155-2166 (1989)
16. Park, I.-S. and Kim, N.: Thiolated *Salmonella* antibody immobilization onto the gold surface of piezoelectric quartz crystal. *Biosensors Bioelectronics*, **13**, 1091-1097 (1998)
17. Nuzzo, R.G., Zegarski, B.R. and Dubois, L.H.: Fundamental studies of the chemisorption of organosulfur compounds on Au(III). Implications for molecular self-assembly on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 733-740 (1987)

(1998년 7월 20일 접수)