바이오시스템공학 (*J. of Biosystems Eng.*)
Vol. 35, No. 2, pp.116~123 (2010. 4)

표면플라즈몬공명 바이오센서를 이용한 살모넬라 검출

조한근 김기영 김운호 성민선

Detection of Pathogenic Salmonella Using a Surface Plasmon Resonance Biosensor

H. K. Cho G. Y. Kim W. H. Kim M. S. Sung

Abstract

Rapid detection of foodborne pathogens has been a major challenge for the food industry. *Salmonella* contamination is well known in all foods including pasteurised milk. The possibility of specific detection of *Salmonella* Enteritidis by surface plasmon resonance (SPR) biosensor was explored using a commercially available portable SPR sensor. Self assembly technique was adopted to immobilize anti-*Salmonella* antibodies on the gold sensing surface of the SPR sensor. The concentration of polyclonal antibody for use in the SPR biosensor was chosen to 1.0 mg/mL.

Experiments were conducted at near real-time with results obtained for one SPR biosensor assay within 1 hour. The limit of detection for *Salmonella* Enteritidis was determined to be 10^6 CFU/mL in both PBS buffer and milk samples. The assay sensitivity was not significantly affected by milk matrix. Our results showed that it would be possible for employing the SPR biosensor to detect *Salmonella* Enteritidis in near real-time.

Keywords : Biosensors, *Salmonella* Enteritidis, Foodborne pathogens, Food safety, Milk, Surface plasmon resonance (SPR).

1. 서 론

살모넬라(*Salmonella* spp.)는 식육, 가금류, 계란, 우유 등 각종 농산물과 식품에 오염되어 식중독을 발생시키는 대표적인 병원성 세균으로 Enterobacteriaceae family에 속하는 막대모양의 그람음성의 혐기성 세포내 기생세균이다. 살모넬라에 감염되면 설사, 발열 및 패혈증 등의 전신증상을 일으키며 대부분의 균 속이 인수공동 전염병의 원인세균으로 알려져 있다(Lee et al., 2009). 이 균들로 유발되는 인류의 질병은 1970년대 중반부터 시작하여 전 세계적으로 증가하고 있다. 우리나라의 경우 식중독 원인세균 중 가장 높은 분포를 나타내고 있고(Lee et al., 2009), 2007년에 발생한 식중독 환자 9,686명 중 살모넬라에 의한 환자는 1,497명으로 노로바이러스, 대장균과 함께 가장 많은 비중을 차지하고 있다(KFDA, 2007). 미국에서 발생하는 식중독의 약 30%를 차지하며 최근에는 살모넬라에 감염된 토마토, 자두 등에 의해 발생한 식중독 사고로 미국 전역에 토마토 공포가 확산되고 있다.

살모넬라의 전통적 검출방법은 분석 및 식별을 위한 다단계 배양을 포함하여 7~10일이 요구되어(Rose, 1998), 최근에는 살모넬라균을 신속하고 정확하게 분리하기 위하여 선택성이 높은 배지나 시약 등을 이용하기도 한다. 대량 시료에 대한 검출 필요성의 증가로 효소면역반응법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)과 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reacton, PCR) 등이 이용되는데 3~5 시간이 소요되어 시간 절약은 가능하지만 별도의 배양을 포함한 절차가 복잡하고 실험실용으로 설계되어 현장에서의 사용이 어려운 약점을 갖고 있다(Schneid et al., 2006). 교육기관의 단체급식과 외식증가에 따른 가공 농산물의 대규모 유통으로 인한 식중독 사고의 방지를 위해서는 기존 분석법의 문제를 해결할 수 있는 바이오센서와 같은 신속한 검출기술의 개발이 절

This work was supported by the research grant of the Chungbuk National University on 2008. The article was submitted for publication on 2010-03-02, reviewed on 2010-03-24, and approved for publication by editorial board of KSAM on 2010-04-14. The authors are Han Keun Cho, KSAM member, Professor, Chungbuk National University, Gi Young Kim, KSAM member, Senior Researcher, National Academy of Agricultural Science, RDA, Woon Ho Kim, Graduate Assistant, and Min Sun Sung, Undergraduate Student, Dept. of Biosystems Engineering, Chungbuk National University. Corresponding author: H. K. Cho, Professor, Dept. of Biosystems Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea; Fax: +82-43-271-4413; E-mail: <hkcho@cbu.ac.kr>.

실하다.

바이오센서는 휴대가 가능하며 실시간 혹은 준 실시간으로 측정 결과를 알려 줄 수 있어 위에 언급된 단점들을 최소화 할 수 있다. 바이오센서의 반응표면에 고정된 포착용 분자가 피측정물과 결합하게 되면 바로 옆에 있는 변환기가 측정 가능한 신호로 바꾸어준다. 포착용 분자로는 항체, 효소, 핵산, 세포 혹은 세포기관의 형태가 될 수 있다. 변환기는 전기화학, 광학, 열 혹은 압전장치, 트랜지스터(FET) 혹은 표면음향파 등에 기초를 두고 있다. 바이오센서로는 병원균을 몇 분 내에 검출할 수 있어 식품공장에서 병원균이 발생될 때 신속한 조치를 취할 수 있어 소비자는 의료비를 절약할 수 있고 생산품의 환불이나 소송 건수를 줄이게 된다.

표면플라즈몬공명(surface plasmon resonance, SPR) 바이오센서는 금속 박막의 표면에 광 에너지가 흡수될 때 일어나는 표면플라즈마파(surface plasma wave)의 공명현상을 이용하여 금속 박막에서 반응하는 항원 항체의 상호작용에 의한 전체 반사광의 변화를 검출한다. 표식물질 없이도 분석이 가능하며 실시간 내에 작업을 완료할 수 있다는 장점을 갖고 있다. SPR 원리를 이용한 많은 종류의 바이오센서가 시판되고 있으나 대부분 센서는 Liedberg 등(1983)에 소개된 기본 개념을 따르고 있다. 과거 20년 동안 SPR 바이오센서에 대한 지속적인 연구 개발로 감도가 높고 저가이며 재사용이 가능한 센서도 상용화되었다(Homola, 2003; Hoa et al., 2007). 최근엔 SPR 바이오센서를 이용하여 농산물에 잔류하는 미량의 농약을 측정하기 위한 연구가 수행되었고(Yang and Cho, 2005; Kim et al., 2009a), 살모넬라균과 대장균과 같은 박테리아를 검출하기 위한 연구가 보고되었다(Oh et al., 2004; Meeusen et al., 2005; Waswa et al., 2006; Mazumdar et al., 2007).

본 연구는 Spreeta® SPR 바이오센서(TSPR1A170100, Texas Instruments, USA)를 이용하여 버퍼와 우유시료를 대상으로, 살모넬라균(*Salmonella enterica* serotype Enteritidis)의 신속한 검출 가능성을 조사하기 위해 수행되었으며, 고정화될 항체의 적절한 농도를 결정하고, 살모넬라 검출절차를 개발하고, 살모넬라균 검출에 대한 측정감도를 평가하였다.

2. 재료 및 방법

가. SPR 바이오센서

표면플라즈몬공명(SPR)은 광학적 현상으로 금속과 액체의 경계면에 존재하는 내부 빛의 전 반사로 나타난다. 입사광 모멘텀의 소실광 성분은 박막필름에서의 표면플라즈몬(자유진동 전자)과 상호작용을 하게 된다. 표면플라즈몬의 공명이 발생하면 입사광 에너지는 금속막으로 유실되어 반사광의 강도가 급격히 감소된다. 공명현상은 특정의 입사각에서 발생되며 입사각은 금속표면에 인접한 매질의 굴절률(Refractive index, RI)에 따라 바뀐다. RI 변화는 매질의 질량과 구성에 비례한다. 금속면에 항체를 화학적으로 부착하면, SPR을 일으키는 입사각은 존재하는 항체-항원 기질의 양에 따른다. 관심 병원균에 특이적인 항체를 사용하여 굴절률 변화를 측정하면, 시료에 있는 병원균의 양을 측정할 수 있게 된다(Meeusen et al., 2005).

살모넬라균을 검출하기 위해 SPR 원리로 제작되어 소형이며 저가인 Spreeta® SPR 바이오센서를 사용하였다. 이 센서는 840 nm의 근적외선용 LED 광원, 편광기, 감지용 금막, 반사경 및 포토다이오드 배열 탐지기로 구성된다. 살모넬라균의 항체가 감지표면에 고정화된 상태에서 살모넬라균이 포함된 시료가 주입되면 시간에 따라 항체와 반응하여 RI 변화를 일으켜 측정이 가능해진다. 금막 위 액체의 RI에 따라 공명이 일어나는 각에서 반사광 강도는 최소가 된다. 이 최소값은 소프트웨어로 계산되어 시간에 대한 RI의 변화로 그려진다. 센서의 감지표면을 제외한 부분은 빛 차단을 위해 모두 불투명체로 덮여있다. Spreeta® SPR 센서로 측정되는 RI 값의 범위는 1.29~1.42이며, 각 시료의 RI는 4.8초 간격으로 컴퓨터에 기록된다. 센서로부터의 신호 측정은 본 연구진이 선행연구(Kim et al., 2009a)에서 구성한 Spreeta® SPR 바이오센서 측정시스템을 사용하여 수행하였다.

살모넬라 병원균이 포함된 시료는 항체가 고정화된 센서의 금막 표면에 flow cell을 부착하고 연동펌프로 유속을 조절하여 살모넬라 병원균 시료를 공급하였다. 주입된 시료는 센서의 금막 표면에서 항체와 결합반응을 하고 나머지는 배출되도록 하였다. 항원-항체 면역에 의한 결합반응으로 센서에서 발생되는 신호는 직렬통신(RS-232C)용 시리얼 케이블을 통하여 A/D 변환기에 전달되어 디지털 변환되며, 변환된 신호는 실험용 PC에 수집된 후, 후 처리를 위해 저장되도록 하였다. 저장된 데이터는 전용 소프트웨어(SPR EVM, ver. 6.45)를 이용한 신호처리를 통해 그래프로 표시된다. SPR 곡선의 1차 모멘트는 기준 값 0.85로 산출되었으며 순수를 기준으로 한 상대 굴절률로 SPR 측정신호를 나타냈다(Cho and Kim, 2003).

나. 시약 및 병원균

SPR 바이오센서의 감도 평가에 필요한 공시균주 *Salmonella* Entritidis(KCTC 12401)는 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 공급 받았다. 분양된 균주는 배양체 상태였으며 계대배양으로 평판 tryptic soy broth(TSB)에 넣어 37℃에서 16시간의 적응기간을 거쳐 생육배양을 실행하였다. 나머지는 종균 배양으로 -80℃에서 10% glycerol로 보관하였다.

살모넬라 항체는 KPL사(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., MD, USA)로부터 구입해서 사용하였으며, PBS, Triton

X-100, DMSO, DSP 등의 시약은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입해서 사용하였다.

금막 표면(gold surface)에 고정할 항체와 결합할 티올기(-SH)를 코팅하기 위해 티올화 가교제(thiolation cross-linker)로 DSP(3,3'-dithiodipropionic acid, Sigma, USA)를 사용하였으며, DSP는 용매 DMSO(dimethyl solfoxide, Cica, USA)에 4 mg/mL의 비율로 용해하여 사용하였다.

PBS 완충용액은 실험에 필요한 완충용액의 용매 또는 센서의 금막 표면을 세척하는 세척액으로 이용하였으며, 1 정제(tablet)의 PBS를 초순도 3차 증류수 200 mL에 용해하여 실온에서 보관하면서 사용하였다.

고정화된 항체를 포함한 센서 표면의 세척을 위하여 계면활성제인 Triton X-100(Fluka, Japan) 1%를 포함한 PBS-Triton 용액을 사용하였다. 고정된 항체의 비선택적 결합 억제를 위해 합성상태로 시판되는 Blocker™ BSA(10% in PBS, bovine serum albumin, Pierce, USA)를 구입하여 4℃ 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

병원균 시료의 주입을 위해 정격유속 0.03~1.00 mL/min을 갖는 저용량 변속 연동펌프(KH-73160-00, Cole-Parmer, USA)와 Viton 튜빙 재료를 사용하였다.

SPR 바이오센서의 검출성능 실험을 위해 PBS 버퍼에 살모넬라균을 10^1~10^9 CFU/mL로 희석한 시료와 시중에서 유통 중인 저지방 우유에 살모넬라균을 동일한 농도로 접종한 식품시료를 사용하였다.

다. 실험 방법

1) 살모넬라 성장곡선

SPR 바이오센서의 측정 결과를 이용하여 식품이 살모넬라에 오염된 후 경과한 시간을 예측하고자 살모넬라 성장곡선을 구하는 실험을 따로 수행하였다. 성장곡선을 위한 배양실험은 3 세트가 동시에 수행되었으며, 10^3 CFU/mL의 배양액 1 mL를 멸균수 100 mL에 희석하여 20개로 분주한 후, 30분 간격으로 10시간 동안 100 μL의 배양액을 순차적으로 희석하여 표준평판법을 이용하여 생균수를 측정하였다.

2) SPR 바이오센서의 초기화 및 항체 고정화

센서 초기화를 위해 분석용 프로그램을 실행한 후, 센서 헤드부, 신호변환기, RS-232C, 컴퓨터와의 연결 상태를 확인하였다. 조명강도는 7-medium을 적분시간(integration time)은 0.5 ms를 선택하였다. 유량 시스템을 가동하여, 공기 주입상태에서 센서를 초기화하고, 일정 시간동안 증류수를 센서에 공급하여 기준선을 정하였다.

항체고정화를 위해 티올화된 리간드를 금속 표면에 화학적으로 흡착시키는 방법을 사용하였다. 이 방법은 아비딘-바이오틴 결합 방법과 공유결합을 사용하여 결합력이 매우 강한 자기조립단분자막(Self Assembled Monolayer, SAM) 방법으로 널리 활용되는 고정화 방법으로 알려져 있다(Lazcka et al., 2007; Kim et al., 2009b).

항체고정화 과정을 간략히 설명하면, 우선 금막을 Triton X-100로 세척하고 실온에서 충분히 건조한 다음, 100 μL의 DSP/DMSO 용액(4 mg/mL)을 가하고 상온에서 30분간 배양하여 표면을 티올기화하였다. 다음 DMSO 용액으로 2~3분간 세척하여 미 부착된 티올기를 제거한 후 증류수로 2~3분간 세척하여 티올기의 활성도를 높였다. 항체(1~2 mg/mL)를 PBS 버퍼에 용해하여 150 μL 씩 40분 간격으로 3회 가해 상온에서 반응시켜 공유결합을 통해 항체 층을 형성시켰다. 마지막으로 PBS 버퍼로 1~2분 간 세척 후 10% Blocker™ BSA로 10분 간 비선택적 결합 억제 처리를 하였다.

3) 항체 농도의 결정

항체 고정화를 위하여 SAM 방법으로 DSP와 DMSO를 이용할 경우, 항체의 적절한 농도는 1~2 mg/mL로 권장되고 있다(Thermo Fisher Scientific Inc, 2008). 따라서 최적의 농도 결정을 위해 항체를 1.00, 1.25, 및 1.50 mg/mL의 농도로 준비하여 실험하였다. 항체의 농도 변화에 따른 SPR 바이오센서의 반응을 분석하기 위하여 살모넬라균의 최대농도인 10^9 CFU/mL 시료를 사용하였다. 항체 농도의 변화에 따른 SPR 바이오센서 응답의 유효한 차이를 확인하기 위해 실험결과를 생균수 측정값과 비교하였고, 생균수는 표준평판법으로 측정되었다.

4) SPR 바이오센서 준비, 항체고정화 및 측정

살모넬라균의 검출을 위한 금막 표면의 세척, 항체 고정화, 및 측정과정을 그림 1에 자세히 서술하였다. SPR 바이오센서의 출력은 표면플라즈몬공명이 발생할 때의 굴절률(RI)이며, 시료군의 RI 측정값과 대조군에 의한 RI 측정값의 차인 상대굴절률(ΔRI)을 구하였다.

5) 배경신호 설정 및 비선택적 결합 구명

(가) 항체를 고정화하지 않은 경우

바이오센서의 배경신호 설정과 바이오센서에 살모넬라균이 비선택적으로 결합하는지 조사하기 위해, 항체를 고정화하지 않은 센서에 살모넬라균 시료와 살모넬라균이 접종되지 않은 멸균 TSB 시료를 각각 반응시키는 실험을 하였다. 센서 준비는 고정화 단계에서 멸균 PBS를 항체 대신 사용하는 것을 제외하고는 그림 1에 나타낸 절차에 따랐다. 살모넬라균 시료는 TSB에서 배양된 10^9 CFU/mL 농도의 균을 멸균 PBS에 10배 씩 순차적으로 희석하여 10^1~10^9 CFU/mL를 준비하였다. 균이 접종되지 않은 멸균 TSB시료는 살모넬라균 시료

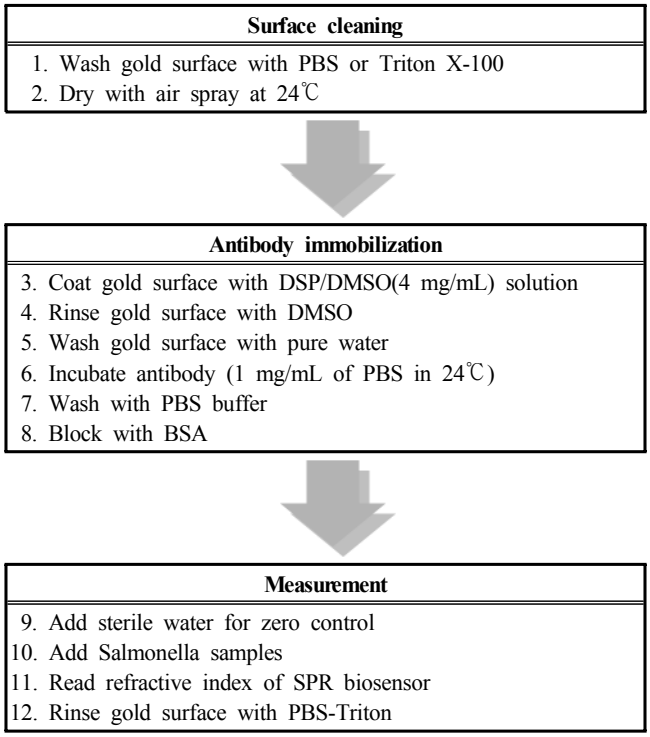

Fig. 1 Procedure of surface cleaning, antibody immobilization and measurement.

의 농도와 동등한 비율로 TSB를 멸균 PBS에 희석하여 준비하였다. 접종되지 않은 멸균 PBS 시료를 대조군으로 사용하여, 살모넬라균의 측정결과와 멸균배지의 측정결과 사이에 유효한 차이가 있는지를 분석하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 수행하였고, 살모넬라균의 농도는 순차 희석에 의한 표준평판법으로 확인하였다.

(나) 항체를 고정화한 경우

SPR 바이오센서로 측정할 때 시료에 포함된 TSB의 영향을 조사하기 위하여, 항체를 센서에 고정화한 상태에서 살모넬라균을 접종하지 않고 멸균 TSB를 순차 희석한 시료에 의한 배경신호를 3회 반복 측정하였다. 측정결과를 고정화된 항체 없이 측정된 배경신호와 비교하여 항체의 고정화에 따른 통계적 차이를 조사하였다. 그리고 이 결과를 음성 대조군으로 사용하여 항체를 고정화하고 살모넬라균의 접종 없이 멸균 TSB 시료와 반응하여 측정된 배경신호와 비교하였다.

6) 살모넬라균의 분쇄

살모넬라균의 비교적 큰 크기로 인하여 센서에 고정화된 항체와 결합반응이 쉽지 않은 문제가 있다. Son 등(2007)은 센서의 감도를 높이기 위해 살모넬라균을 반응시키기 전에 초음파를 이용하여 살모넬라 세포의 조각을 추출하였다. 본 실험에서는 적절한 분쇄요인을 조사하기 위해 초음파 분쇄에 따른 결합반응을 조사하였다. 살모넬라균의 분쇄를 위해 탁상형 초음파세정기(1505P, Kodo Kiyon, Korea)가 사용되었으며 강도는 low에 설정하고 사용하였다. 예비실험에서 2분 이내의 초음파 분쇄는 효과가 별로 없는 것으로 확인되어, 분쇄하지 않은 경우를 대조군으로 하고 3분과 5분 씩 분쇄한 경우와 비교하였다.

7) SPR 바이오센서의 감도 분석

SPR 바이오센서의 감도를 평가하기 위해, 항체를 고정화한 센서에 살모넬라균을 농도별(10^6~10^9 CFU/mL)로 희석하여 3회 반복 실험하였다. 실험에 사용된 시료는 TSB에서 배양된 살모넬라균을 PBS 버퍼에 희석하여 사용하였다. 식품에 오염된 살모넬라균의 검출실험을 위해 시중대형마트에서 저지방 우유를 구입하여 살모넬라균을 접종하여 사용하였다. 식품시료에 사용된 살모넬라균의 농도는 버퍼시료의 경우와 동일하게 준비하였다. 접종되지 않은 우유시료를 센서에 반응시켜 기준신호를 구하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 살모넬라균의 생장곡선

그림 2는 본 연구에서 사용된 살모넬라균의 생장곡선을 표준평판법으로 구한 예를 보여준다. 이 결과를 얻는데 소요된 시간은 준비 작업을 포함하여 최소 2일 정도가 되었다. 그림 2는 일반적인 미생물 배양에서와 같이 지체기(0~2시간), 대수기(2~8시간) 및 정체기(8~14시간)를 잘 나타내고 있으며 배양을 시작하고 5시간 30분 후에는 본 실험에서 사용된 SPR 바이오센서의 검출한계(10^6 CFU/mL)에 도달하였다. ELISA와 같은 분석방법을 사용하면, 이와 같은 결과를 얻기 위해 18~40시간 정도의 분석시간이 필요하다(Bioline Salmonella ELISA test kit, Bioline, Denmark).

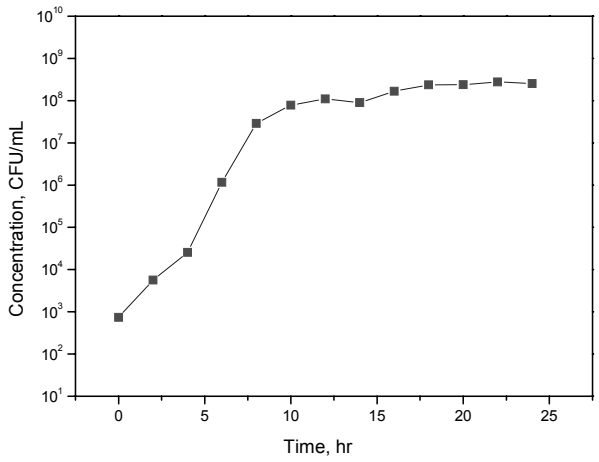

Fig. 2 Representative growth curve of *Salmonella*.

나. SPR 바이오센서 준비 및 항체고정화

SPR 바이오센서의 준비 과정과 항체고정화에 따른 굴절률의 변화를 그림 3에 나타냈다. SPR 바이오센서 제작 단계별 굴절률 변화를 살펴보면, 센서를 초기화하고 금막을 PBS-Triton으로 세척한 다음 실온에서 충분히 건조하여 측정한 굴절률은 1.3352(그림 3의 1~2), 금막을 PBS로 세척하면 굴절률은 1.3353(그림 3의 2~3), DSP/DMSO 용액을 가하여 티올기가 흡착되면 굴절률은 1.3365(그림 3의 4, 5)이 된다. 다음 DMSO 용액에 이어 증류수로 세척하면 굴절률은 1.3361이 된다(그림 3의 6). 이후 항체를 고정화하면 굴절률은 1.3380이 되며(그림 3의 7), PBS 버퍼로 세척 후 블로킹 처리하여 굴절률은 1.3381이 된다(그림 3의 끝). 그림에서 보는 바와 같이 항체고정화를 포함하여 센서를 준비하는데 1시간 정도가 소요되는 것으로 확인되었다.

다. 항체농도

최적의 항체 농도 결정을 위해 항체의 농도를 1.00, 1.25, 및 1.50 mg/mL로 하여 각각 제작된 바이오센서를 이용하여 PBS 버퍼에 접종된 10^9 CFU/mL의 살모넬라균 검출 실험을 수행하였다. 그림 4는 항체농도에 따른 굴절률 변화를 보여준다. ANOVA 및 Tukey 분석 결과, 5% 유의수준에서 실험에 사용된 3수준(1.00, 1.25, 1.50 mg/mL)의 항체 농도에 따른 굴절률 변화에는 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 이후 계속된 센서의 감도분석 실험에서는 항체소요량을 최소로 할 수 있는 1.00 mg/mL의 항체농도를 사용하였다.

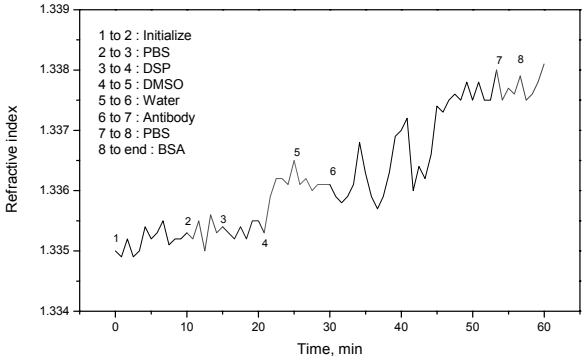

Fig. 3 Change of refractive index during each process in the preparation of the SPR biosensor.

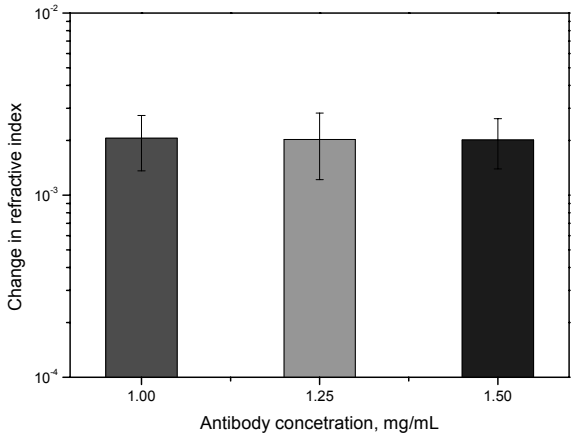

Fig. 4 Change in refractive index with standard error using three concentration of the antibody.

라. 배경신호

항체가 고정화되지 않은 경우 멸균 TSB와 살모넬라균에 의한 바이오센서의 측정값은 모든 농도에서 통계적으로 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 1의 1~6열). 살모넬라균의 농도와 TSB의 값에 상관없이 배경신호의 크기가 임의의 값으로 나타난 것은 항체가 없는 센서의 금막에 TSB는 물론

Table 1 Average response(ΔRI)of the SPR biosensor with and without attachment to sterile TSB and *Salmonella* inoculated TSB

Without antibody immobilized						With antibody immobilized		
Sterile TSB			TSB inoculated with Salmonella			Sterile TSB		
TSB dilution	Average ΔRI ($\times10^{-6}$)	CV %	Bacteria conc.	Average ΔRI ($\times10^{-6}$)	CV %	TSB dilution	Average ΔRI ($\times10^{-6}$)	CV %
10^{-9}	162.03	12.67	10^0	181.43	70.82	10^{-9}	123.32	41.28
10^{-8}	204.03	32.67	10^1	164.61	90.91	10^{-8}	86.73	53.20
10^{-7}	146.49	81.69	10^2	56.15	144.02	10^{-7}	382.79	23.49
10^{-6}	181.99	11.08	10^3	73.70	223.98	10^{-6}	105.97	226.88
10^{-5}	222.42	100.80	10^4	57.94	355.26	10^{-5}	96.12	98.21
10^{-4}	270.08	48.92	10^5	51.08	155.36	10^{-4}	93.56	1.47
10^{-3}	251.59	23.06	10^6	64.05	222.48	10^{-3}	322.80	37.66
10^{-2}	109.26	129.87	10^7	77.60	99.73	10^{-2}	68.98	131.91
10^{-1}	309.09	49.73	10^8	36.24	16.28	10^{-1}	793.77	37.23
10^0	2812.74	2.94	10^9	11.26	1215.36	10^0	2024.92	3.45

살모넬라균이 반응할 수 없기 때문인 것으로 추정된다.

항체가 고정화된 경우 배경신호는 모든 농도에서 통계적으로 차이가 없는 것으로 나타났는데(Table 1의 7~9열), 이는 항체는 있으나 멸균 TSB에는 반응할 항원이 존재하지 않아 서로 반응하지 못하였기 때문이다.

마. 살모넬라균의 분쇄효과

그림 5는 살모넬라균의 초음파 분쇄에 따른 항원-항체 결합 반응의 결과를 나타낸다. 실험에 사용된 살모넬라균의 농도는 10^9 CFU/mL 이고, 항체의 농도는 1 mg/mL 이었다. 분쇄를 하지 않은 경우에는 결합반응이 거의 발생하지 않았고, 분쇄를 한 경우에는 결합반응이 순조롭게 진행된 것으로 나타났다. 3분간의 분쇄가 5분간 분쇄한 경우보다 반응 감도를 증가시킨 것으로 나타났는데 5분의 경우 과도한 분쇄로 인해 항체와의 결합이 불충분한 것으로 판단된다. 이후 수행된 실험에서는 검출 전에 살모넬라균을 3분 간 분쇄하여 실험을 계속하였다.

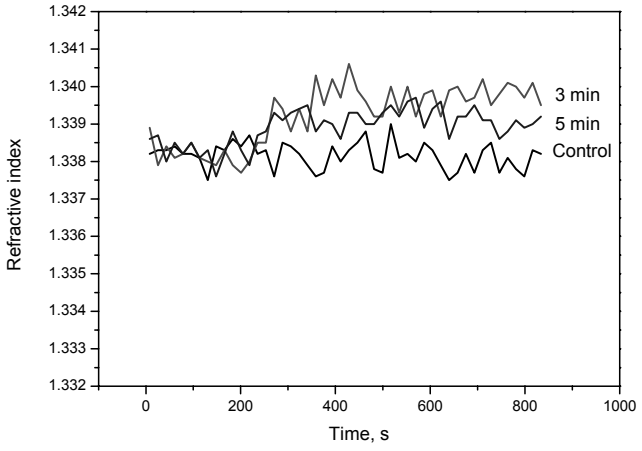

Fig. 5 Sonification effects of Salmonella cells on antibody-antigen bindings.

바. SPR 바이오센서의 검출성능

1) PBS 버퍼시료

SPR 바이오센서의 검출한계는 살모넬라균을 음의 대조군과 비교하여 통계적으로 유효한 변화가 있는 농도로 결정하였다. ANOVA 분석을 통해 SPR 바이오센서의 살모넬라균 검출한계는 버퍼의 경우 10^6 CFU/mL로 확인되었다. 10^5 CFU/mL 이하의 농도에서는 10^6 CFU/mL의 경우와 통계적 차이(5% 유의도 수준)를 보이지 않았다. 그림 6은 검출범위 내의 살모넬라균(농도 10^6~10^9 CFU/mL)의 버퍼시료에 대한 SPR 바이오센서의 상대굴절률을 보여준다. 가로축은 살모넬라균의 농도를, 세로축은 굴절률 차이 값을 각각 상용대수눈금으로 나타내고 있다. 상용대수값으로 나타낸 살모넬라균의 농도와 상대굴절률과의 선형관계식을 최소자승법으로 구한 결과 기울기와 절편은 각각 0.645와 -8.527로, 결정계수는 0.998로 확인되었다.

검출한계는 Son 등(2007)의 Spreeta®를 사용한 연구결과인 10^6 CFU/mL, Mazumdar 등(2007)의 Plasmonic®(HS System, Wallenfels, Germany)을 사용한 연구결과인 5×10^6 CFU/mL, Mazumdar 등(2007)의 Plasmonic® 에 의한 1.25×10^6 CFU/mL 및 Kim 등(2009b)의 임피던스 바이오센서의 10^7 CFU/mL 등과 유사하게 나타났다. SPR 원리를 바탕으로 한 다른 바이오센서들의 실험결과와 비교할 때 현재로서는 수용 가능한 검출한계로 판단된다.

본 연구의 선행 연구결과에 따르면 Spreeta® SPR 바이오센서의 재사용 능력은 5회 사용시 75%, 6회와 7회에 각각 55%, 27%로 감소되는 것으로 보고되었으나, 살모넬라와 같은 병원균에 사용할 때는 1회만 사용하는 것이 바람직할 것으로 판단된다(Kim et al., 2009).

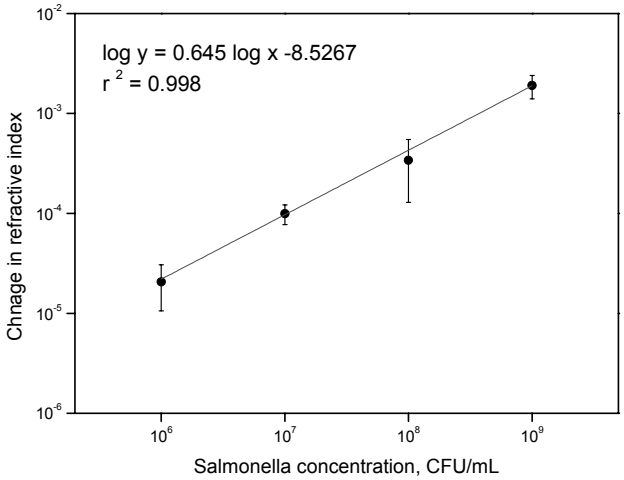

Fig. 6 Linear detection range of the SPR biosensor based assay for *Salmonella* in PBS buffer system.

2) 우유시료

검출결과의 ANOVA 분석을 통해 SPR 바이오센서의 살모넬라균 검출한계는 PBS 버퍼 시료의 경우 10^6 CFU/mL로 확인되었다. 우유시료의 경우에서도 PBS 버퍼 시료에서와 마찬가지로 10^5 CFU/mL 이하의 농도에서는 10^6 CFU/mL의 경우와 통계적 차이(5% 유의도 수준)를 보이지 않았다. 그림 7은 검출범위 내의 살모넬라균(농도 10^6~10^9 CFU/mL)이 접종된 우유시료에 대한 SPR 바이오센서의 상대굴절률을 보여준다. 가로축은 살모넬라균의 농도를, 세로축은 굴절률 차이 값을 각각 로그눈금으로 나타내고 있다. 저지방 우유에 접종된 살모넬라균 농도의 대수값과 상대굴절률과의 대수값 사이

에 최소자승법을 이용하여 선형관계식을 구한 결과 기울기와 절편은 각각 0.325와 -5.648로, 결정계수는 0.900으로 확인되었다.

PBS 버퍼 시료와 비교할 때 우유 매트릭스로 인해 검출감도에 특별히 부정적인 효과는 없지만 감도가 다소 낮아지는 것으로 확인되었다. 우유시료에 대한 검출한계는 Mazumdar 등(2007)의 Plasmonic® SPR 장치(HS System, Plasmonic Biosensoren AG, Germany)를 사용한 연구결과인 5×10^6 CFU /mL와 유사하게 나타났다. SPR 원리를 바탕으로 한 다른 바이오센서들의 실험결과와 비교할 때 센서의 가격 대비 성능에서 현재로서는 수용 가능한 검출한계로 판단된다.

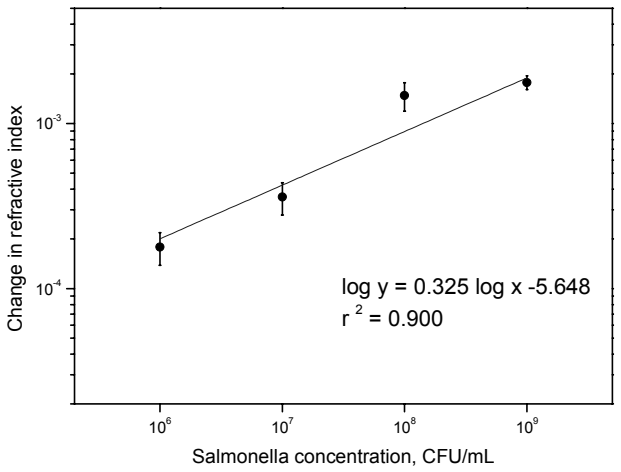

Fig. 7 Linear detection range of the SPR biosensor based assay for *Salmonella* in milk samples.

4. 요약 및 결론

본 연구에서는 식중독을 일으키는 대표적 병원균인 살모넬라(*Salmonella* spp.)를 신속하게 검출할 수 있는 SPR 바이오센서를 개발하고 버퍼시료와 식품시료를 이용하여 검출성능을 평가하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

(1) 소형이며 구매가 가능한 Spreeta® SPR 센서와 면역반응을 이용하여 살모넬라균을 검출하는 SPR 바이오센서 시스템을 구성하였다.
(2) 항체를 고정화하기 위해, 공유결합으로 결합력이 강한 SAM(자기조립단분자막)방법을 사용하였고, 항체의 농도는 1.0 mg/mL로 선택하였다.
(3) 살모넬라균과 항체의 면역반응을 향상시키기 위해 초음파로 균을 3분간 분쇄하였다..
(4) SPR 바이오센서의 살모넬라균 검출한계는 버퍼 및 우유시료에서 10^6 CFU/mL 이며, 검출에 필요한 시료의 양은 10 μl 이하이며, 검출에 소요된 시간은 준비시간을 포함하여 1시간 이내로 확인되었다.
(5) SPR 바이오센서는 추가 연구와 개선을 통해 식품의 안전과 관련된 분야에 널리 활용될 수 있으며, 검출하려는 균에 해당하는 항체로 다양한 목표균을 선택적으로 검출할 수 있는 다양성을 갖고 있다.
(6) Spreeta® 센서의 소형성, 저렴한 가격으로 현장에서 농식품의 안전관리에 충분히 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

사 사

본 연구는 충북대학교 농업생명과학대학 식품공학과 김광엽 교수와 식물의학과 차재순교수의 자문과 실험협조를 받아 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Cho, Y. J. and N. S. Kim. 2003. Recognition of microorganism using SPR biosensor immobilized with thiolated antibody. Jouranl of the Korean Society for Agricultural Machinery 28(2):167-172. (In Korean)
2. Hoa, X. D., A. G. Kirk and M. Tabrizian. 2007. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress. Biosensors and Bioelectronics 23:151-160
3. Homola, J. 2003. Present and future of surface plasmon resonance biosensors. Analytical Bioanalytical Chemisry 377:528 -539.
4. KFDA. 2007. Korea Food & Drug Administration. Available at: www.index.go.kr/egams/stts/jsp/potal/stts/PO_STTS_IdxMain.jsp?idx_cd=1437.
5. Kim, E. H., H. K. Cho, K. S. Kyung and G. Kim. 2009a. Detection of the fungicide iprovalicarb residues using a surface plasmon resonance biosensor. Journal of Biosystems Engineering 34(1):50-56. (In Korean)
6. Kim, G. Y., J. H. Moon, A. S. Om, G. M. Yang, C. Y. Mo, S. W. Kang and H. K. Cho. 2009b. Evaluation of antibody immobilization methods for detection of Salmonella using impedence biosensor. Journal of Biosystems Engineering 34(4): 254-259. (In Korean)
7. Lazcka, O. A., F. J D. Campob and F. X. Munoz. 2007. Review: Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. Biosensors and Bioelectronics 22:1205 -1217.
8. Lee, W. W, S. M. Lee, G. R. Lee, D. S. Lee and H. K. Park.

2009. Identification of *Salmonella* Enteritidis and *S.* Typhimurium by multiplex polymerase chain~reaction. Korean Journal of Veterinary Service 32(2):147-153. (In Korean)

9. Liedberg, B., C. Nylander and I. Lunstrom. 1983. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. Sensors and Actuators 4:299-304.
10. Mazumdar, S. D., M. Hartmann, P. Kämpfer and M. Keusgen. 2007. Rapid method for detection of Salmonella in milk by surface plasmon resonance (SPR). Biosensors and Bioelectronics 22:2040-2046.
11. Meeusen, C. A., E. C. Alocilja and W. N. Osburn. 2005. Detection of *E.coli* 0157:H7 using a miniatured surface plasmon resonance biosensor. Transactions of the American Society of Agricultural Engineers 48(6):2409-2416.
12. Oh, B. K., Y. K. Kim, K. W. Park, W. H. Lee and J. W. Choi. 2004. Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of Salmonella Typhimurium. Biosensors and Bioelectronics 19:1497-1504.
13. Rose, B. E. 1998. Isolation and identification of Salmonella from meat, poultry, and egg products, p. 4-1 - 4-14. In B. P. Dey and C. P. Lattuada (ed.), USDA Food Safety Inspection Service microbiology laboratory guidebook, 3rd ed. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C. 48
14. Schneid, A. D., K. L. Rodrigues, D. Chemello, E. C. Tondo, M. A. Z. Ayub and J. A. G. Aleixo. 2006. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of Salmonella in chicken meat. Brazillian Journal of Microbiology 37:350-355.
15. Son, J. R., G. Kim, A. Kothapalli, M. T. Morgan and D. Ess. 2007. Detection of *Salmonella* enteritidis using a mniature optical surface plasmon resonance biosensor. Journal of Physics: Conference Series 61:1086-1090.
16. Thermo Fisher Scientific Inc. 2008. Attach a protein onto a gold surface. Tech tip #2. Available at: www.piercenet.com/files/TR0002-Attach-to-gold.pdf. P. O. Box 117, Rockford, IL 61105, USA.
17. Waswa, J. W., C. Debroy and J. Irudayaraj. 2006. Rapid detection of Salmonella enteritidis and Escherichia coli using surface plasmon resonance biosensor. Journal of Food Process Engineering 29(4):373-385.
18. Yang, G. M. and N. H. Cho. 2005. Sensing of the insecticide carbofuran residues by surface plasmon resonance and immunoassay. Journal of Biosystems Engineering 30(6):333-339. (In Korean)