

식중독균의 유비쿼터스 검출을 위한 나노바이오센서

Nanobiosensors for a Ubiquitous Detection of Foodborne Pathogens

김아람, 고성호*

A-Ram Kim, Sungho Ko*

차의과학대학교 바이오공학과

Department of Applied Bioscience, CHA University

I. 서론

I. 식중독균 검출의 패러다임

식품 유해 세균으로 알려진 병원성 대장균 (*Escherichia coli* O157:H7), 리스테리아균 (*Listeria monocytogenes*), 살모넬라균 (*Salmonella typhimurium*), 황색 포도상구균 (*Staphylococcus aureus*) 등은 식중독을 유발시킬 수 있는 균으로서, CDC (Centers for Disease Control and Prevention)의 발표 자료에 따르면, 미국에서만 76백만명의 식중독 환자가 발생하고, 이 중 입원환자가 3만 명 이상이며, 사망자가 5,000명에 이른다 (1). 최근 식품 시장에서 리스테리아와 같은 식품 유해 균의 오염으로 인해 식품 반품에 드는 비용이 백만 달러에 육박하고 있다. 식중독을 유발하는 식품 유해 균은 제조 과정에서 식품으로 유입될 수 있으며, 유통 단계에서도 유입될 수 있다 (2). 따라서 제조 및 유통 단계에서 단시간 내에 민감도와 선택도가 높은 식중독균의 검출 시스템의 필요가 확산되고 있다 (3, 4).

일반적으로 박테리아의 검출 및 동정은 균의 배양 및 콜로니 (Colony) 카운팅 방법, PCR (Polymerase chain reaction), 면역학적 분석 방법 등이 사용되어져 왔다 (5-9). 이 중 배양 및 콜로니 카운팅 방법은 식중독 균의 검출 및 동정에 사용되어져 온 방식으로 식품 내에 존재하는 미생물을 배양하고 이 중 식중독 균을 분리한 뒤 생화학적 방식 및 혈청학적 테스트로 확인절차를 거치는데 일련의 과정이 5~7일 정도가 소요 된다 (10, 11). 비록 그 결과의 정확도가 높다는 장점은 있으나 실험실에서만 가능하며 장시간이 필요하기 때문에 제조 및 유통단계에서 실행하기에는 어려움이 있다. PCR 및 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)는 위와 같은 전통적인 방식보다는 식중독균 검출에 소비되는 시간을 30분에서 몇 시간 정도로 줄일 수 있었다 (12, 13). 뿐만 아니라 DNA와 항체-항원 반응은 매우 특이적인 반응으로서 실험의 선택도가 높다는 장점이 있다. 또한 PCR의 경우 식중독균의 대량 배양 필요 없이도 검출이 가능하다는 장점이 있다 (14). 그러나 죽은 세포와 살아있는 세포의 구별

*Corresponding author: Sungho Ko

Department of Applied Bioscience, CHA University, 222 Yatap-dong, Bundang-gu, Seongnam 463-836, Korea

Tel: +82-31-725-8369

Fax: +82-31-725-8350

E-mail: shko7@cha.ac.kr

이 어렵고, 자동화의 어려움이 있으며, 고비용, 고속련도가 필요하며, 단순성 및 정확도가 떨어진다는 단점이 있다. 따라서, 이와 같은 단점을 보완할 수 있는 새로운 효과적 검출 방법의 개발이 필요함에 따라, 기존의 식중독균 검출 방법을 대체하기 위한 바이오센서의 개발이 활발히 이루어지고 있다.

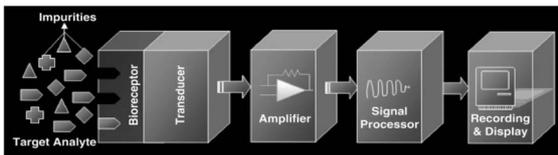


그림 1. 바이오센서의 구성 (16)

바이오센서란 생체 물질 (효소, 항체, 핵산, 미생물 등)의 특이적 인식 반응을 이용하여 특정 물질의 정량, 정성 분석 등이 가능한 분석기기를 말한다. 바이오센서의 구성은 그림 1에서 볼 수 있듯이 생체 물질과 분석대상이 되는 물질과의 반응을 전기적 신호로 바꾸어 주는 변환기, 전기적인 신호를 증폭, 처리, 분석하여 측정 가능한 신호로 출력하는 장치로 이루어져 있다 (15, 16). 바이오센서의 장점으로는 정확도, 짧은 분석 시간, 높은 민감도와 선택도, 재현성, 소형화, 높은 내구성, 사용자 친화적인 사용방법 등을 들 수 있다. 바이오센서는 신호 변환 방식에 따라 분류될 수 있으며, 본고에서는 광학적, 질량기반 (피에조 현상), 전기적 바이오센서로 구분하여 기술하고자 한다.

II. 검출 방법에 의한 바이오센서

1. 광학 기반 바이오센서

광학 바이오센서는 높은 민감도와 선택도 때문에 식중독균 검출 기기로서 관심의 대상이 되어왔다. 광학 바이오센서는 발생, 형광, 화학발광 및 표면플라즈몬 공명 (Surface plasmon resonance, SPR) 등으로 세분화되어질 수 있다. 이러한 광학 바이오센서들은 빛을 감지하는 광소자, 발색을 일으키는 광물질, 분석 물질의 분광화학적 속성을 인지하고 기록할 수 있는 적

절한 분광계를 필요로 한다. 대부분의 광학 검출 기술은 높은 민감도를 갖는 표면플라즈몬공명과 형광 검출 방식을 사용하며, 이 외에도 소형화가 가능한 광섬유 등이 박테리아 검출에 사용되어 진다. 본고에서는 광섬유, 표면플라즈몬공명, 라만 산란, 푸리에 변환 적외선 분광을 이용한 광학 바이오센서에 대해 서술하고자 한다.

1.1. Fiber optic

광섬유 센서의 장점 가운데 하나는 소형화가 가능하다는 것이다. 광섬유 센서는 빛의 내부 전반사 (Total internal reflection, TIR)에 의해 광섬유 내의 빛이 밖으로 나가지 못하고 손실 없이 전달되는 원리를 이용한다. 광섬유 센서는 레이저 광원에서 나온 빛이 발광 섬유를 통해 측정하려는 면에 부딪히고, 부딪힌 빛이 수광섬유, 포토다이오드 순으로 들어가 포토다이오드에 의해 빛의 세기를 전압의 형태로 변화시켜 변환된 값을 수치적으로 나타내게 된다. 광섬유 바이오센서는 고정화 기술을 이용하여 다양한 생체 물질을 고정화할 수 있어 극미량의 물질을 선택적으로 분석할 수 있을 뿐만 아니라 세포상호간의 감지가 가능하고, 전기 자기장 간섭, 자기장, 표면전위 (Surface potential)의 영향을 받지 않으므로 전기화학 바이오센서에서 발생하는 전기적 간섭 없이 성분의 측정이 가능하다는 장점을 갖는다. 광섬유 센서는 따라서 다양한 분야에 이용되어 질 수 있으며 식중독균 검출을 위한 여러 연구에서는 광섬유와 또 다른 광학적 기술을 조합하여 그 민감도를 증대시키는 연구도 진행되어져 왔다. 그 한 예로, Ko and Grant는 광섬유 바이오센서에 Fluorescence resonance energy transfer (FRET)의 이론을 도입하여 식중독균을 검출할 수 있는 센서를 개발하였다 (18). 이들은 광섬유 센서 표면에 항체의 Fc 부위에 특이적으로 결합하여 항체 배향성을 유지시키는 것으로 알려진 Protein G에 형광물질을 표지하여 고정 시킨 후 다른 형광물질이 표지된 항체를 Protein G에 결합시킴으로서 광섬유 바이오센서를 제작하였다. *S. typhimurium*이 센서 표면 항체와 결합할 때 항체의 3차원 구조가 변하여 항체와 Protein G에 표지되

어 있는 형광물질 사이의 거리가 10 nm 이하로 가까워짐으로서 이 둘 사이에 에너지 전달이 일어나게 된다. 결과적으로, 육고기 샘플로부터 *S. typhimurium*을 5분 이내에 10^5 CFU/g 까지 검출할 수 있었다.

최근에는 기기의 소형화 및 검출 방식 및 검출 과정의 단순화, 민감도의 향상을 위한 다양한 연구들이 이루어지고 있다. 인도 공과대학 봄베이의 Bharadwaj은 비표지 방식을 이용한 광섬유 센서를 제작하였는데, 이 기술은 280 nm에서 소산파 (Evanescent wave)의 흡광도를 측정함으로써 *E. coli* O157:H7을 검출하는 센서를 발표하였다 (19). 소산파는 빛을 광섬유에 조사하였을 때 적절한 조건하에서 빛이 내부에서 굴절될 때 빛의 일부가 전파되지 않고 광섬유표면상으로 진행하는 특징을 갖으며, 소산파의 강도는 섬유와 순환물질 사이의 접촉면으로부터 거리에 비례하여 점차 감소하게 된다. 이러한 특징을 이용한 소산파 광섬유 센서를 U 모양의 형태로 제작하게 되면 소산파의 침투 깊이가 증대되어 그 민감도를 높일 수 있게 된다. 뿐만 아니라 자외선 (Ultra violet, UV) 발광 다이오드를 사용함으로써 센서의 소형화를 가능하도록 한

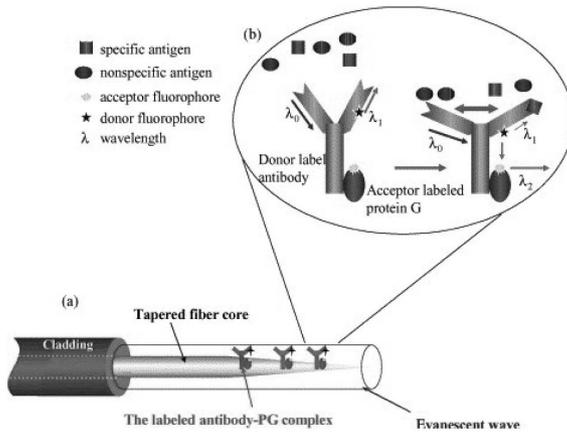


그림 2. 소멸파가 Fiber core의 표면을 따라 흐르게 되면 형광 표지된 항체-Protein G 복합체는 흥분상태가 된다. (a) 이로 인해 분석물질과 고정화된 복합체는 소멸파가 흐르는 부위에서 검출될 수 있다. (b) FRET 면역 센서의 개념 모식도. 항체와 항원간의 결합이 일어나면 항체의 3차원 구조가 변형되어지고 그 결과 형광 표지자 사이에 에너지 전달이 일어남 (18).

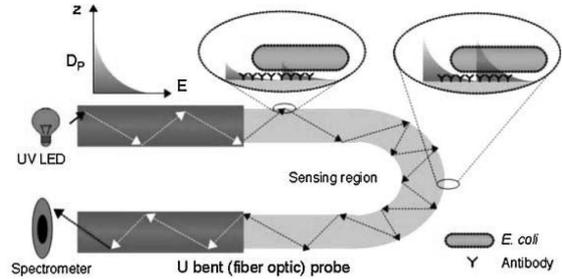


그림 3. U 모양의 광섬유에서의 소산파의 침투 깊이 증대에 따른 *E. coli* O157:H7의 검출 신호 증대 모식도 (19).

Bharadwaj에 의해 제작된 센서는 *E. coli* O157:H7을 10^3 CFU/mL까지 검출할 수 있었다.

1.2. 표면플라즈몬공명 (Surface plasmon resonance, SPR) 기반 바이오센서

금속 표면의 Optical illumination은 식품 내 식중독균 검출을 위한 하나의 검출 방법으로서 사용되어진다. SPR은 양자와 금속간의 상호작용의 결과에 의해 나타나는 독특한 현상이다. SPR은 음의 유전 함수를 갖는 금속과 이와 반대의 유전 함수를 갖는 매체의 계면을 따라 이동하는 전도대 전자들의 집단적인 진동 현상을 말하며, 전자기파의 상호작용의 결과 흥분되어 입사하는 빛보다 증강된 크기를 갖고 계면에서 수직 방향으로 멀어질수록 지속적으로 감소하는 소멸파의 성질과 형태를 갖게 된다. SPR은 음의 값으로 변화하는 반사각을 측정하여 검출하는데, 세포가 SPR 센서의 변환기 표면에 고정된 수용체에 결합하고, 반사되는 빛의 각도가 변하게 되며, 이는 유전체의 밀도 변화에 의해 실시간으로 나타나게 된다. 표지 없이 직접적으로 균의 검출이 가능한 것은 SPR의 최대 장점이라 하겠다. SPR은 그동안 많은 연구자들에 의해서 식중독 균을 검출하는데 사용되어 왔다. 여타의 바이오센서와 마찬가지로 SPR 센서 역시 검출 민감도를 높이기 위한 연구들이 활발히 진행되어 왔다. SPR 센서의 경우 나노입자를 이용하여 SPR 센서의 민감도를 높일 수 있는데, 금나노입자의 경우 플라즈몬 공명의 반사각 변화를 유도함으로써 Resonance unit (RU)

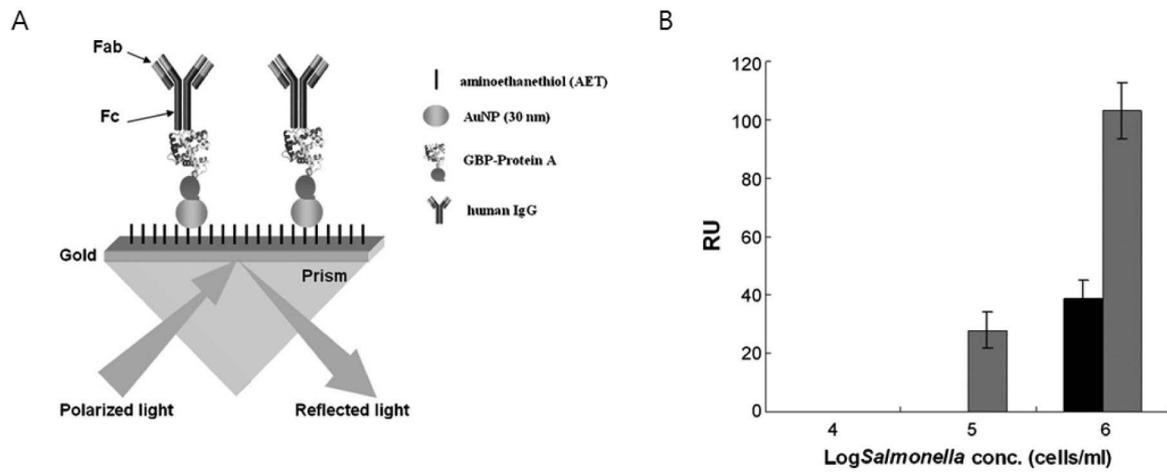


그림 4. A) GBP-ProA 융합 단백질과 금나노입자로 제작된 SPR 센서 칩의 모식도. B) 금 나노입자를 이용한 민감도 증가 실험; 검정색: 금 나노입자가 고정화되지 않은 경우, 주황색: 금 나노입자를 SPR 센서 칩에 고정화한 경우 (23).

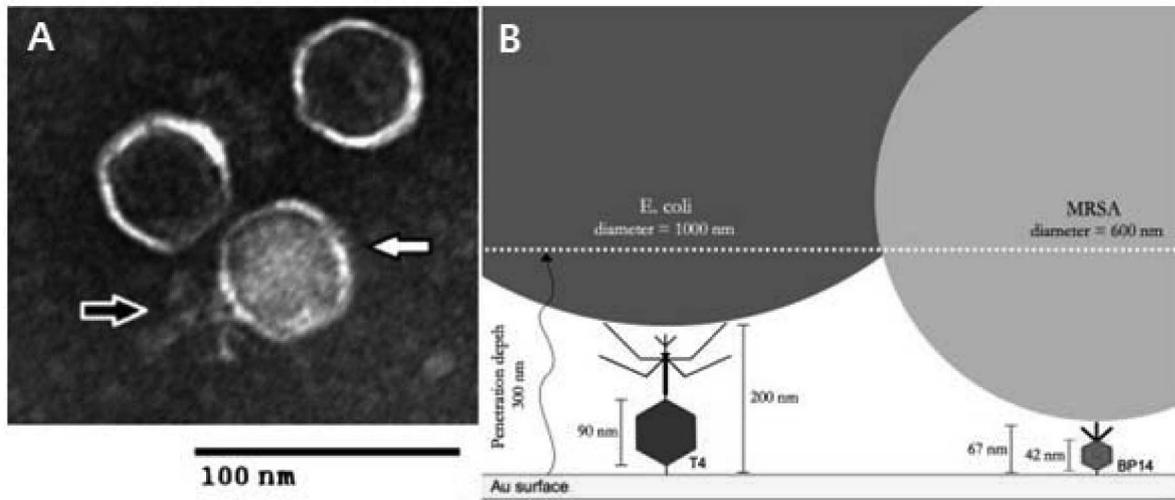


그림 5. (A) Bacteriophage BP14의 TEM 사진 Icosahedral head (white arrow), Non-contractile tail (black arrow). (B) T4와 BP14 박테리오파지의 SPR 칩 상에서의 박테리아와의 결합 모식도 (25).

값을 증대시킬 수 있다 (20). 차의과학대학교의 고성호 교수 그룹은 SPR 센서 칩 표면에 금나노입자를 부착시키고, 금과 특이적으로 결합하는 GBP (Gold binding polypeptide) (21)와 항체의 Fc 부위와 특이적으로 결합하는 것으로 알려진 Protein A(22)를 융합한 GBP-Protein A (GBP-ProA) 융합 단백질을 유

전자 재조합 방법으로 합성하고 이를 이용해 항체를 아무런 화학적 처리 없이 센서 칩 표면에 신속히 고정시킬 수 있었다 (23). 이러한 GBP-ProA 융합 단백질과 금나노입자로 제작된 SPR 센서 칩은 살모넬라 균 검출 민감도를 10배 정도 증대시킬 수 있었다.

어번 대학교의 Tawil은 박테리오파지를 이용하여 항원-항체 반응을 통한 식중독균의 검출 민감도를 높이고자 하였으며, 광원을 Superluminescent light-emitting diode (SLED)를 이용함으로써 기존의 SPR 보다 높은 민감도를 갖고자 하였다 (25). 항원-항체 반응을 위해 사용되어지는 다클론성 항체는 검출하고자 하는 균 외에 다른 유기체와도 반응할 수 있으며 (24), 상품화에 문제가 있고, 고비용의 검사가 될 수 있다는 단점이 있다 (25). 박테리오파지의 경우 호스트 세포와 그 특이도가 매우 높고, 살아있는 세포와 죽어있는 세포를 구별할 수 있으며, 만들어 내기 쉽고, 안정성이 높으며, 비용적으로도 항체에 비해 우수하여 이를 이용한 식중독균의 연구도 진행되고 있다. 그 한 예로, 박테리오파지와 SLED를 이용한 SPR을 통해 20분만에 10^3 CFU/mL의 민감도로 *E. coli* O157:H7과 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)의 검출이 가능하였다.

1.3. 라만 산란 (Raman scattering)과 푸리에 변환 적외선 분광 (Fourier transform infrared spectroscopy)

라만 산란과 푸리에 변환 적외선 분광학은 진동 진광 분석법 (Vibrational spectroscopies)으로서 물질 특유의 분광학적 스펙트럼 특징을 이용하여 물질의 분

자 구조 및 특성을 검출할 수 있다. 이러한 현상을 이용하여 식품내의 미생물을 검출하기 위해서는 식품내에 존재하는 다양한 유기물로부터 미생물을 분리 및 배양하는 과정이 선행되어야 한다.

라만 분광학 빛의 산란 현상을 기반으로 하는 광학 기술로서 식중독균의 빠른 검출이 가능하여 많은 연구가 진행되어왔다. 라만 산란 (Raman scattering)이란 단색광이 기체 또는 투명한 액체·고체를 통과할 때 빛의 파장을 변화시켜 빛의 일부가 산란되어 진행 방향에서 다른 방향으로 진행할 때 원래 빛의 에너지보다 적거나 많은 에너지를 얻으면서 산란되는 과정을 말한다. 라만 분광계는 산란된 빛의 세기를 주파수에 따른 분자의 진동 스펙트럼을 측정하여 정성, 정량 분석이 가능한 기기를 말한다. 식중독균의 현장 검사를 위해서는 라만 분광학에 의한 빠른 검출뿐만 아니라 식품 샘플로부터 식중독균을 빠르게 분리해 내는 것 또한 중요하다. 위와 같은 이유에서, 자성 비드의 자성을 이용한 식중독균의 면역학적 분리 방법은 최근 많은 연구자들에 의해 개발되어 왔다. 한 예로, 퍼듀 대학의 Wang과 그의 동료들은 식품내에 존재하는 다양한 미생물의 검출 및 분리를 자성 표면 증강 라만 산란 나노프로브 (Magnetic surface-enhanced Raman scattering nanoprobe, SERS nanoprobe)를 이용하여 빠르고 민감한 방식의 바이오센서를 개발하였다 (그림 6) (26). SERS는 나노구조의 금과 은 같은 귀

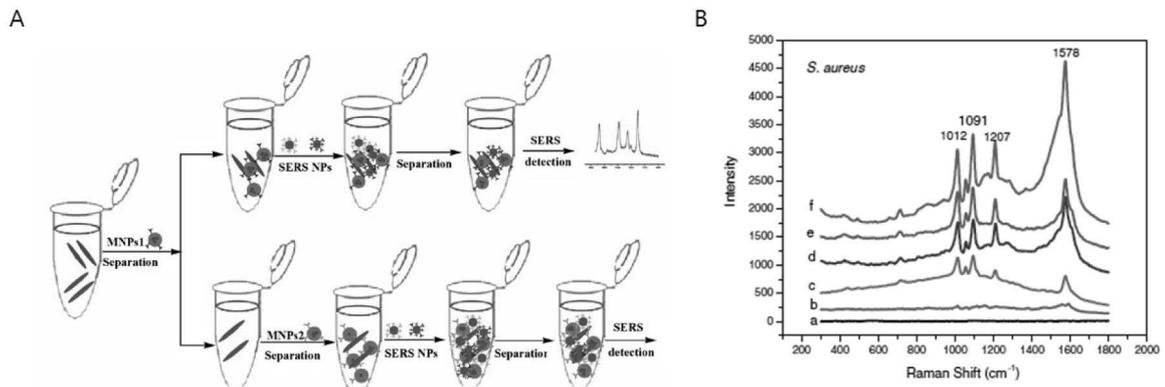


그림 6. A) SERS nanoprobe를 이용한 식중독균 검출 모식도 및 B) 이를 이용한 *S. aureus*의 검출 민감도 시험 결과 (a; PBS, b; *Salmonella enterica*, c-f; 10^3 - 10^6 CFU/mL *S. aureus*) (26).

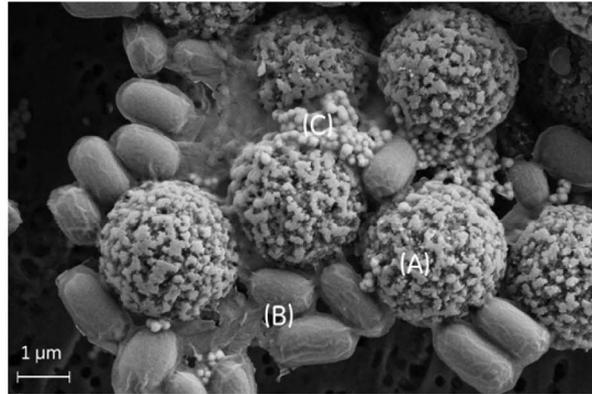
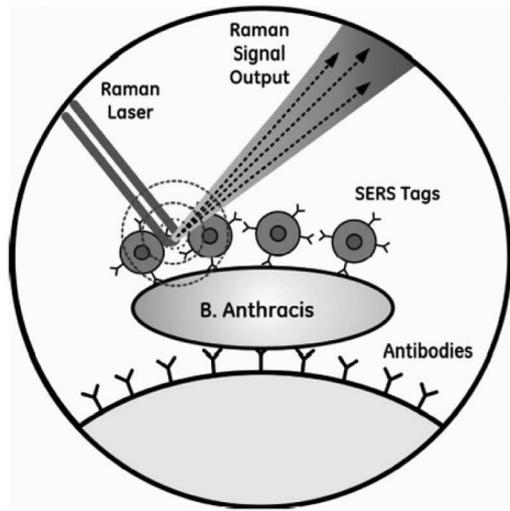


그림 7. SERS 현상을 이용한 식중독균 검출 모식도 및 SEM 사진 (A; 항체가 고정된 자성 비드, B; 포획된 대상 미생물, C; SERS tag) (28).

금속이나 주변부에 존재하는 분자 구조를 통해서 라만 산란이 향상되는 현상으로서 이를 통해 물질의 검출 민감도를 높여줄 수 있다 (27). 식품내에 존재하는 미생물을 분리하기 위해 항체가 코팅되어진 직경이 100 nm인 자성 나노비드를 처리하여 한 시간 동안 반응시킨 뒤 자석을 이용하여 균을 분리하였다. 이후 항체가 고정된 SERS 프로브를 샘플에 처리하여 자성 비드/항체-항원-SERS/항체 복합체를 형성되도록 하여 라만 분광계를 통해 식중독균을 검출하였다. 검출 한계는 103 CFU/mL이었으며, 식중독균의 분리 및 검출에 걸리는 시간이 기존의 배양 방식(24시간 이상) 보다 현저히 짧은 3시간 미만으로 현저히 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. GE Homeland Protection의 Lesaicherre와 그의 동료들은 SERS 현상을 이용한 소형화된 식중독균 검출 센서를 제작하였다 (28). Wang과 마찬가지로 자성 비드를 사용하여 식품내의 미생물을 분리 및 농축하였으며, 이와 동시에 SERS 현상이 일어날 수 있도록 제작한 프로브를 처리하여 식품내 존재하는 식중독균을 검출하였다. 검출에 필요한 시간은 8분 미만의 매우 짧은 시간만으로도 *E. coli* 를 25 CFU/test 라는 높은 민감도를 갖는 것을 확인하였다.

푸리에 변환 적외선 분광학은 비파괴적 분석 기술로

서 적외선 영역의 빛이 검출하고자 하는 물질에 의해 흡수되면 분자 진동이 발생하고, 이로 인해 분자 진동에 의한 특이적 스펙트럼이 나타나게 된다. 이러한 물질의 특이적 적외선 스펙트럼을 자세히 해석함으로써 물질의 정량 및 정성 분석이 가능해진다. 따라서 식품 내에 존재하는 식중독균들은 그 종마다 다른 적외선 스펙트럼을 나타나게 되어 균의 종 및 농도를 파악할 수 있게 된다. 사쓰리 대학의 Mura와 그의 동료들은 다공성 Titania 박막을 이용하여 *E. coli* O157:H7을 검출하는 센서를 제작하였다 (29). Titania 박막은 넓은 표면적, 높은 생물학적 안정성 및 재현성을 갖고, 유기 연결자(Crosslinker)를 사용함으로써 항체 및 미생물과의 결합이 용이할 뿐만 아니라, 보존 기간이 길다는 장점이 있어 10² CFU/mL의 높은 민감도로 30 분이라는 빠른 시간 안에 *E. coli* O157:H7의 검출이 가능하였다.

2. 질량 민감 센서 (피에조 현상 바이오센서, Piezoelectric biosensor)

질량 민감 바이오센서는 질량의 작은 변화를 감지하는 센서로서 검출 민감도가 높다는 장점이 있다. 일반적으로 질량 분석은 피에조 크리스탈 (Piezoelectric

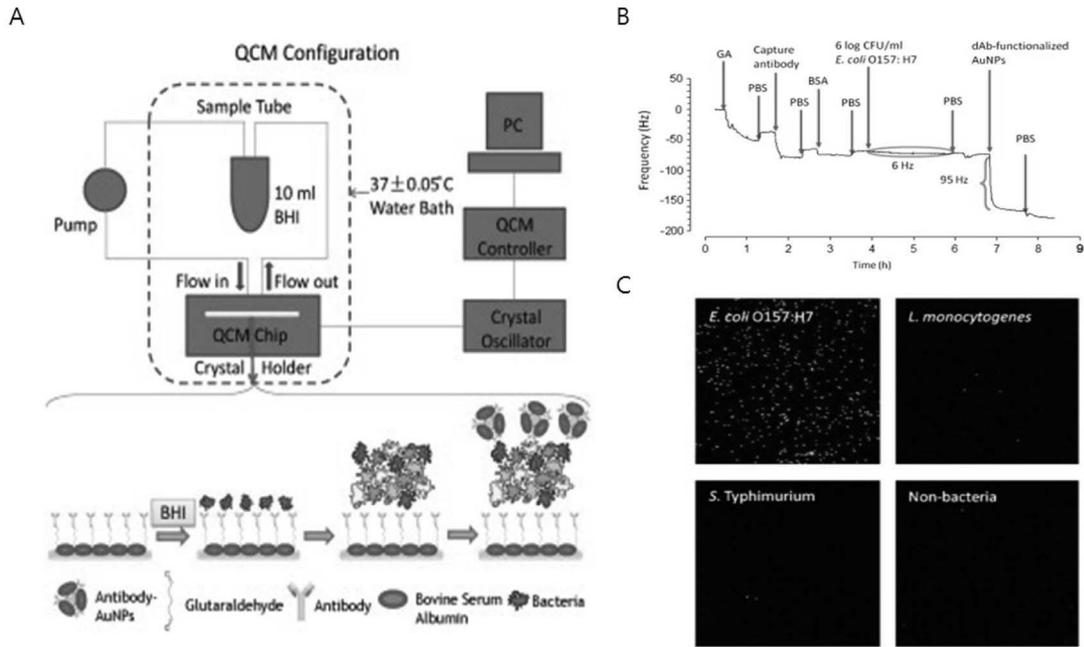


그림 8. A) Circulation 시스템과 금나노파티클을 이용한 QCM 센서의 구성 및 검출 모식도, B) 검출 항체가 고정된 금 나노파티클에 의한 QCM 센서의 검출 신호 증폭, C) 형광을 통한 선택도 확인 (32).

crystal)을 기반으로 발전되어 왔다. 피에조 바이오센서는 질량 센서로서 질량에 따른 진동 크리스탈에서의 음파의 이동 변화를 통해 식중독 균을 검출할 수 있다. 일반적으로 센서 표면에 항체와 같은 생체 물질이 코팅되어져 있어 샘플에 존재하는 박테리아가 센서 표면에서 포획되어지고 이로 인해 석영 크리스탈의 질량이 증가된다. 이 후, 질량의 증가와 비례하여 음파의 진동수가 감소되어지는 것을 통해 식품에 존재하는 미생물의 검출이 가능하게 된다. 피에조 현상 센서의 장점은 검출 방식이 단순하고 실시간으로 이루어 질 수 있다는데 있다.

런던 대학의 Yakovleva와 그의 동료들은 식중독균의 하나인 *Campylobacter jejuni*를 lectin이 고정화 되어져 있는 금 박막 피에조 바이오센서를 이용하여 여러 균주들이 속한 샘플에서 검출이 가능함을 보고하였다 (30). 중국 과학기술대학의 Wan은 피에조 현상 바이오센서의 민감도를 높이기 위해 자성을 갖는 나노 비드 표면에 반코마이신을 고정화 하여 *Desul-*

fotomaculum 속의 sulphate-reducing 박테리아와 30분간 반응시키고 자성을 이용하여 많은 양의 자성 비드와 박테리아 복합체가 금 전극에 위치하도록 유도 함으로서 1.8×10^4 에서 1.8×10^7 CFU/mL로 검출이 가능하였다 (31). 메인 대학의 Guo와 그의 동료들은 BHI (Brain heart infusion) 배지로부터 *E. coli* O157:H7을 배양, 농축함과 동시에 금나노파티클을 이용하여 검출 신호를 증폭시킴으로서 0-1 log CFU/mL 또는 CFU/g의 검출 민감도를 나타내었으며, *L. monocytogenes*과 *S. typhimurium*과 같은 식중독균과는 반응하지 않는 높은 선택도를 나타내었다 (그림 8) (32).

3. 전기 화학 바이오센서 (Electrochemical biosensors)

분석을 위한 바이오센서로서 가장 범용적으로 사용되는 것이 전기화학센서인데 이는 생체물질을 검출하



는데 있어 많은 장점을 가지고 있기 때문이다. 장점으로는 검출기기의 소형화가 가능하며, 민감도가 높고, 복잡한 샘플내의 특정 물질을 검출함에 있어 기기의 작동이 용이하다. 이들 특징은 또한 식품 샘플의 전처리 과정이 용이하고 샘플의 양이 적을 때도 검출이 용이하다는 장점이 있다. 특히 분석 방식의 단순화와 제작비용이 저렴하다는 것이 가장 큰 장점으로 작용하고 있다. 전기화학 센서는 사용되어지는 변환기 (Transducer)에 따라 전위 (Potentiometric), 전류 (Amperometric), 임피던스 (Impedimetric), 정전용량 (Conductometric) 센서로 분류되어 진다. 이러한 전기화학센서는 항원-항체 반응을 이용한 면역분석법, DNA를 이용한 핵산분석법을 조합하여 다양한 유기물이 존재하는 샘플내에서 높은 선택도 및 민감도로 식중독균의 실시간 검출을 용이하게 할 수 있다.

3.1. 전류 측정 바이오센서 (Amperometric Biosensor)

전류 측정 바이오센서는 오직 전기화학적 활성을 갖는 물질만 검출이 가능하고, 이 분석대상 물질은 전극상에서 산화 또는 환원이 용이하여야 한다. 전류 측정 바이오센는 효소로부터 촉매되어지는 전기적 산화 환원 반응에 의해 발생하는 전류를 측정하는 센서이다. 일반적으로 겨자나무과산화효소 (Horseradish peroxidase, HRP)와 알칼리성 인산가수 분해효소 (Alkaline phosphatase, AP)가 산화 환원 반응에 참여하는 효소로서 이용되어지고 있다. 발생한 전류의 측정은 작동 전극에서 이루어지며, 작동 전극 (Working electrode)의 전위는 기준 전극 (Reference electrode)을 기준으로 하여 평형상태를 유지하게 된다. 작동 전극은 전기적 특성을 갖는 폴리머나 흑연 (Graphite), 귀금속 (Noble metal) 등이 사용되어 진다. 전류 측정 바이오센서는 검출하고자 하는 물질의 농도 구배에 의존적인

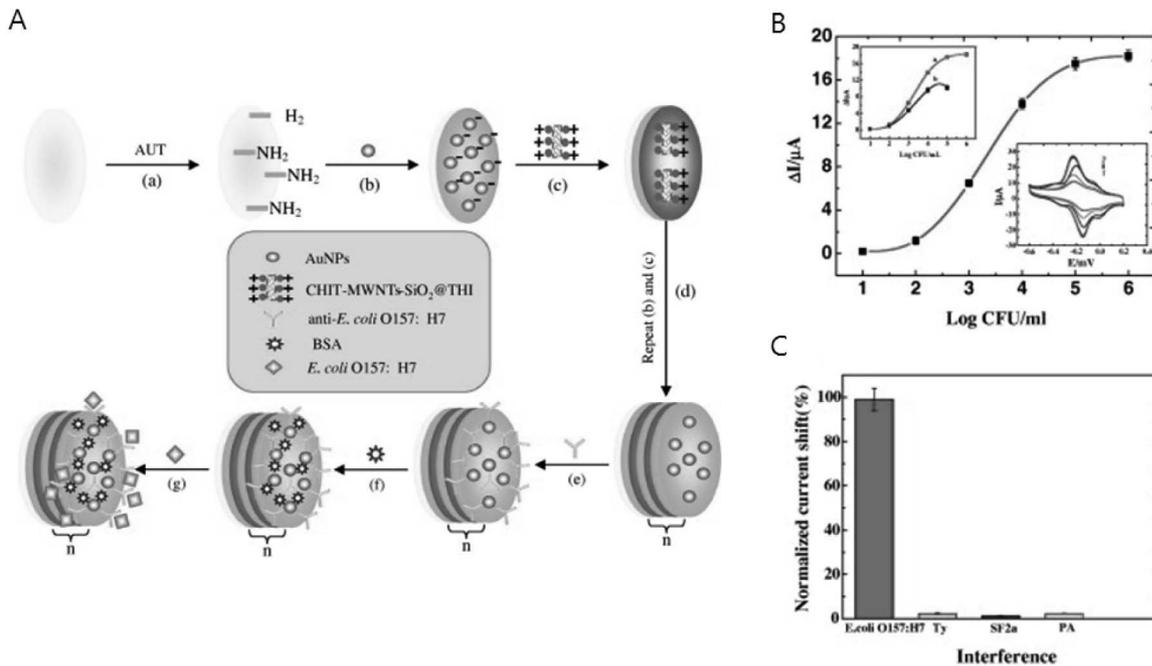


그림 9. A) 금 나노파티클과 Chitosan multiwalled carbon nanotubes-SiO₂/thionine 복합체가 Multilayer를 형성한 *E. coli* O157:H7 검출 센서 모식도, B) *E. coli* O157:H7 농도에 따른 검정 곡선, C) 특이도 검사, 10⁴ CFU/mL의 농도로 *E. coli* O157:H7, 장티푸스, *Shigella flexneri* 3a (SF2a), *Pseudomonas aeruginosa* (PA) 처리함 (35).

반응을 나타냄으로서 정량 측정이 가능하고, 이 때 대상물질을 포획하는 생체 물질에 의해 정성분석이 가능하다. 전류 측정 바이오센서는 기기의 소형화가 가능하며 검출에 소요되는 시간이 적고, 작동 방식 및 검출 방식이 여타의 센서에 비해 쉬울 뿐만 아니라 제조 단가 및 검출 비용이 경제적이며, 높은 민감도를 갖기 때문에 바이오센서 중 가장 범용화 되어 있으며, 연구 및 개발이 가장 활발히 이루어지고 있는 분야이다. 전류 측정 바이오센서의 취약점은 잠재적으로 전류 값을 감소시킬 수 있는 전기활성 물질이 샘플에 포함되어 있을 경우 검출 민감도를 낮출 수 있다는 것이다. 그러나 이러한 문제는 센서 전극에 선택적인 막을 형성함으로써 전류의 흐름을 방해하는 물질들이 전극감지 부위에 부착되는 것을 방지하여 해결할 수 있으며, 이와 관련된 연구들이 아직도 진행 중에 있다.

전기화학 면역 센서와 미세가공기술 (Micro-electro-mechanical systems, MEMS) 융합은 센서의 소형화, 높은 민감도, 전기회로망을 통한 자동화, 조작의 편리성을 획득할 수 있게 하였다 (33). MEMS 기술을 기반으로 하여 티안진 대학의 Sun과 그의 동료들은 *S. typhimurium*을 검출하기 위해 polypyrrole/Protein A 를 Pt 전극에 고정화 시켰다(34). 이 때 pyrrole은 작동 전극상에서 Cyclic voltammetry의 전류 신호를 증폭시켜 줄 수 있으며 이와 동시에 protein A가 *S. typhimurium* 포획 항체가 배향성을 유지하며 전극에 고정화 될 수 있도록 한다. 또한 이러한 반응은 10분이라는 짧은 시간동안 이루어지게 된다. *S. typhimurium*을 10^2 CFU/mL까지 검출이 가능하며 이 때 소비되는 시약의 양이 $10 \mu\text{L}$ 로 적고 빠르게 센서의 표면에 도포되어진다. 따라서 실시간으로 효율적인 비용으로 정확한 식중독균의 검출이 가능하였다. 이외에도 금 전극에 자가조립단일층 (Self assembled monolayers, SAMs)을 형성한 뒤, 금 나노파티클과 Chitosan-multiwalled carbon nanotubes-SiO₂/thionine 나노 구조물을 Layer-by-layer로 조립하여 다층 막을 구성함으로써 신호의 증폭을 유도하여 *E. coli* O157:H7을 $4.12 \times 10^2 \sim 4.12 \times 10^5$ CFU/mL의 농도로 45분 만에 검출이 가능하도록 한 연구도 발표된 바 있다 (그림 9) (35).

3.2. 전위차 바이오센서 (Potentiometric, FET and LAPS-based biosensors)

전위차측정 센서는 기준 전극에 대한 표면에서의 전위차를 상대적으로 측정하는 방식으로 센서 표면에서 흡수되는 이온의 산화/환원 전위를 측정하게 된다. 전위차측정 센서는 용액내에 존재하는 이온을 검출하는 센서로서 하나의 기준 전극과 하나의 작동 전극이 샘플과 접촉되어야 한다. 식중독균을 검출하기 위해 기본적으로 pH 또는 이온의 농도의 변화가 센서 내에서 발생되어야 한다. 일반적으로 전위차측정 센서의 민감도는 10^{-6} 에서 10^{-1} 몰당 리터의 매우 낮은 농도범위까지 검출할 수 있다. 전위차측정 센서는 in situ 모니터링이 가능하고, 소형화할 수 있으며 검출 비용이 저렴하다는 장점을 가지고 있다. 전위차측정 바이오센서는 크게 FET (Field effect transistor) (전계효과 트랜지스터)형과 LAPS (Light-addressable potentiometric sensor) (광지시형 전위차계 센서)로 나눌 수 있는데 FET는 높은 입력 임피던스와 낮은 출력 임피던스를 나타내는 반도체 장치로서 이온감지전극 (Ion-sensitive electrode, ISE)와 연결하여 전류의 이끌어냄 없이 ISE 상에 증가되는 전하를 모니터링 하고, 전극에서의 전류의 흐름을 배수 하게 된다. 이를 이용하여 만든 이온 감응형 전계효과 트랜지스터 (Ion sensitive field effect transistors, ISFETs)은 생물학적 물질을 검출하기 위한 하나의 접근 방식으로 사용되어질 수 있다. 그러나 이들 바이오센서는 검출 범위가 적고 ISFETs 제조 공정에 있어서 생체물질을 고정화 시키기에 부적합하여 사용에 제한이 있다. 식중독균 검출을 위한 새로운 기술로서 광학 검출 기법과 전위차 (Potentiometry) 검출 기법을 조합한 새로운 형태의 검출 방법인 LAPS는 공간 해상도 (Spatial resolution)를 포함하는 표면-전위차 센서 (Surface-potential sensor)이다. LED (Light emitting diode)와 같은 Intensity-modulating Light source로부터 유도된 순간 광전류의 결합이 p-n 접합 실리콘 전극을 가동 시키게 되고 광원에 대한 전류의 흐름을 통해 대상물질의 검출이 가능하다. LAPS는 ISFET에 비해 감지 표면이 평면이고, 금속 접합이 없어 측정용 챔버로서

의 사용이 가능하고, 생산이 간단하며 가격단가가 낮고, 사용수명이 상대적으로 길다. 미국 농무성의 Shu-I Tu와 그의 동료들은 자성 비드와 LAPS 기술을 조합하여 식중독균의 검출 민감도를 높였다 (36). 이 기술은 항체가 고정된 자성 비드를 사용하여 *E. coli* O157:H7을 포획하고 집적하여 Urease가 표지된 검출 항체를 결합시킨 뒤 필터링 함으로써 샘플로부터 식중독 균의 분리가 용이할 수 있도록 하였다. 다음으로 식중독균의 정량적 평가를 위해 Urease에 의해 Urea로부터 생산된 NH₃를 LAPS를 이용하여 검출하였다. 이 기술을 통해 *E. coli* O157:H7의 검출 한도를 햄버거 고기에서 1 CFU/g으로 높일 수 있었으며, 샘플링에서 검출까지 6시간 만에 검출할 수 있었다. 라퀼라 대학의 Ercole과 그의 동료들은 LAPS를 기반으로 하는 전위차 교류 바이오센싱 시스템을 이용하여 샐러드로부터 *E. coli* O157:H7의 검출이 가능함을 발표한다. LAPS는 신호 변환 장치로서 사용되어졌으며, Potentiometric alternating biosensing (PAB) 시스템과 전통적인 CFU 방법을 이용하여 액체상태의 샘플로부터 *E. coli* O157:H7를 검출하였다. 이들의 논문은 기존의 전통적인 CFU 방식보다 10~20배 빠른 1시간 반 만에 10 cells/mL의 검출 민감도를 나타내었다 (37).

3.3. 임피던스 바이오센서 (Impedance biosensor)와 전기전도 바이오센서 (Conductometric biosensor)

임피던스를 이용한 전기화학적 바이오센서는 식중독균의 검출에 있어서 빠르고 민감한 소형 센서의 실현이 가능하고 무엇보다 현장현시 검사를 가능하게 할 수 있다는 장점이 있다 (38-41). 임피던스 센서는 전도성 기판에 고정된 항체와 같은 바이오펜질에 검출 대상물질의 결합에 의해 계면의 임피던스 특성이 바뀌게 되고, 임피던스 분광기가 이러한 반응의 저항 또는 전기량 변화를 측정함으로써 대상물질의 정량, 정성 분석이 가능한 기기이다.

최근 5년간 임피던스 바이오센서는 나노재료, 미세유체 기술, 박테리오파지나 렉틴 같은 새로운 생체 물질들과의 조합을 통한 연구들이 새로운 경향으로 자리 잡았으며, 다양한 기술과의 융합은 임피던스 바이오센서의 민감도를 향상시킬 수 있었다. 그 예로 중국 과학원의 Wan과 그의 동료들은 전극 사이즈의 최소화를 위해 Macroporous (3D) 구조로 전극을 형성하여 박테리아의 포획이 좀 더 효율적으로 이루어질 수 있도록 하였다 (42). 개발된 3D-immunosensor는 3D 형태의 Ni 기질에 항체를 구조적으로 결합시켜 Sulfate-reducing bacteria를 포획하였으며, 그 검출 범위

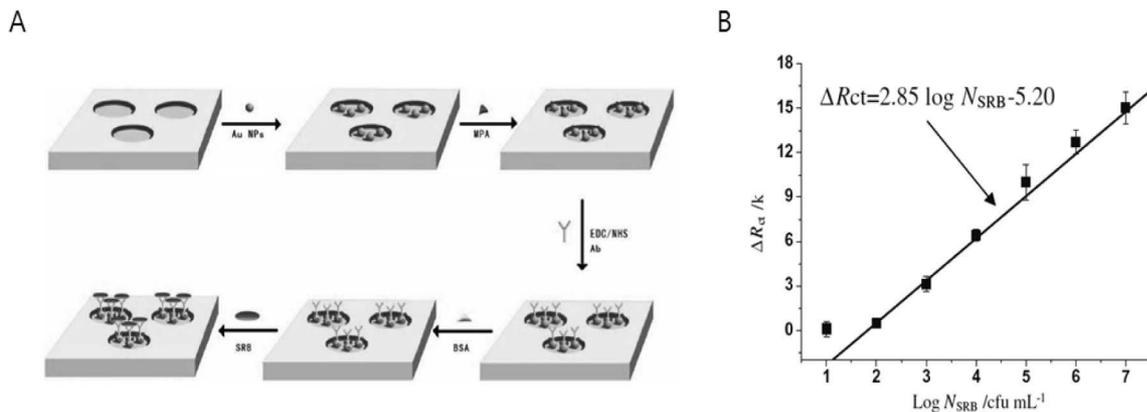


그림 10. A) Sulfate-reducing bacteria (SRB)의 검출을 위한 3D 형태의 임피던스 면역 센서 제조 과정 모식도, B) 3D 임피던스 센서의 민감도 (42).

가 $2.1 \times 10^1 \sim 2.1 \times 10^7$ CFU/mL로 발표된바 있다. 이 외에도 미세유체 채널을 이용하여 식중독균의 검출을 위해 사용되어지는 분석 시간과 시약의 소비를 줄일 수 있었으며, 신뢰도 및 민감도를 자동화 시스템을 통해 높일 수 있었다 (그림 10). 홍콩 폴리텍 대학의 Tan과 그의 동료들은 PDMS 미세유체 면역 센서를 통해 특정 항체를 Alumina nanoporous membrane을 사용하여 *E. coli* O157:H7과 *S. aureus*를 빠르게 검출 할 수 있었다 (43). 검출하고자 하는 박테리아가 항체가 고정화된 챔버로 주입되고 이로 인해 전해질 전류가 저해되어지며, 이러한 현상을 임피던스 스펙트럼을 통해 모니터링 하여 식중독 균을 검출할 수 있었다. 결과적으로 Nanoporous membrane 임피던스 스펙트럼을 이용한 미세유체 면역센서는 2시간 이내로 식중독 균을 10^2 CFU/mL로 민감하게 검출할 수 있었다.

전기전도 바이오센서는 전도도와 생체 인지 물질을 이용한 기술 사이의 관계를 근간으로 한다. 대부분 이온의 농도 변화를 포함하여 전기적인 전도도의 변화 또는 전류 흐름의 변화를 인지하게 된다. 일반적으로 전기전도도 바이오센서는 두 개의 금속 전극으로 이루어져 있으며 전류의 흐름은 이 2개의 전극을 통해 나타나게 된다. 생체 인지 물질의 이온 조성 변화와 금속 전극 사이의 전도도의 변화를 측정함으로써 물질의 검출이 가능하다. 최근 미시건 대학의 Pal과 그의 동료들은 식품내에 존재하는 *Bacillus cereus*를 검출하는 전기전도도 바이오센서를 제작하였다. 샌드위치 면역분석방법을 이용한 전기전도도 센서는 전도도를 갖는 폴리아닐린을 통해 전자의 전하 흐름이 형성되는 것을 조합하여 구성되었다. 검출 민감도는 35 ~ 88 CFU/mL이며 6분이라는 짧은 시간 안에 식중독 균의 검출이 가능하였다 (44).

III. 결론

식중독균은 수백만 개의 미생물 집단 내에 < 100 CFU/g의 적은 수로 존재하기 때문에 이를 검출하는 것은 상당히 어려운 일이다. 식중독균의 검출 기술은 높은 신뢰도, 고감도, 정확도를 필요로 하며, 빠르고

단순한 검출 방식을 갖추어야 한다. 기존의 선택 배양, PCR, ELISA와 같은 식중독균 검출 방식은 높은 민감도 및 선택도에도 불구하고, 여러 단계의 절차로 인한 상대적으로 긴 분석시간의 소요와, 고비용, 전문적 기술 및 고가의 장비가 요구된다는 단점을 가지고 있었다. 이러한 단점을 극복하는 하나의 방법으로서 바이오센서의 개발이 이루어져 왔으며 그 노력의 결과로 기존의 검출 방식에 비해 높은 민감도와 선택도를 갖고, 비용 및 시간의 소비를 줄인 다양한 센서들이 보고되어 왔다. 하지만 개발된 바이오센서는 아직도 극복해야 할 문제점들을 가지고 있다. 광학 센서의 경우 전기화학적 센서에 비해 높은 민감도를 나타내지만 고비용 및 검출 과정이 복잡하다는 단점이 있으며, 전기화학 센서의 경우 광학센서에 비해 조작 및 검출 방식이 단순하지만 그 민감도가 광학 센서에 비해 떨어진다는 단점이 있다. 또한 각각의 바이오센서들은 대용량의 식품으로부터 균을 분리하고 대용량의 버퍼로부터 균을 농축하는 샘플의 전처리 과정이 기존의 방법과 동일하고 복잡하다는 단점을 극복하는데 어려움이 있어왔다. 최근 몇 년간 바이오센서는 나노테크놀로지와 MEMS 기술을 융합하여 이러한 문제를 해결하여 왔다. 예를 들어 마그네틱 나노비드를 이용한 식품 샘플의 전처리 과정은 대량의 식품 샘플로부터 검출하고자 하는 균만 선택적으로 분리 농축하여 바이오센서의 민감도를 높이고 검출 방식의 단순화에 기여하였다. 이러한 연구 개발자들의 노력을 통해 바이오센서를 이용한 식중독균 검출기술은 지난 10년간 비약적 발전을 이루었으며, 이를 통해 향후 식중독균에 의한 질병을 예방하고, 오염된 식품의 반쯤에 드는 비용을 줄이는 등의 정치적, 경제적 이득을 가져올 것이라 예상된다.

참고문헌

1. Arora P, Sindhu A, Dilbaghi N, Chaudhury A. Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. *Biosens Bioelectron.* 28:1-12 (2011)
2. Invitski D, Abdel-Hamid I, Atanasov P, Wilkins E. Biosensors for the detection of pathogenic bacteria. *Biosens Bioelectron.* 14: 599-624 (1999)
3. Donnelly CW, *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge.



- NutrRev. 59: 183-194 (2001)
4. Schlech III WF. Food borne listeriosis. Clin Infect Dis. 31: 770-775 (2000)
 5. de Bore E, Beumer RR. Methodology for detection and typing of food borne microorganisms. Int. J. Food microbiol. 50: 119-130 (1999)
 6. Gracias KS, Mckillip JL. A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. Can. J. Microbiol. 50:883-890 (2004)
 7. Hall RH. Biosensor technologies for detecting microbiological food borne hazards. Microbes Infect. 4: 425-432 (2002)
 8. Lazcka O, Del Campo FJ, Munoz FX. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. Biosens. Bioelectron. 22: 1205-1217 (2007)
 9. Swaminathan B, Feng P. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. Annu Rev. Microbiol. 48: 401-426 (1994)
 10. De Boer E, Beumer RR. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. Int J Food Microbiol. 50:119-130 (1999)
 11. Artault S, Blind JL, Delaval J, Dureuil Y, Gaillard N. Detecting *Listeria monocytogenes* in food. Int Food Hyg. 12:23 (2001)
 12. Lazcka O, Del Campo FJ, Munoz FX. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. Biosens. Bioelectron. 22: 1205-1217 (2007)
 13. Sapsford KE, Bradburne C, Detehty JB, Medintz IL. Sensors for detecting biological agents. Mater. Today. 11: 38-49 (2008)
 14. Traore O, Arnal C, Mignotte B, Maul A, Laveran H, Billaudel S, Schwartzbrod L. Reverse transcriptase PCR detection of astrovirus, hepatitis A virus and poliovirus in experimentally contaminated mussels: comparison of several extraction and concentration methods. Appl Environ Microbiol. 64:3118-22 (1998)
 15. Invitski D, Abdel-Hamid I, Atanasov P, Wilkins E. Biosensors for the detection of pathogenic bacteria. Biosens Bioelectron. 14:599-624 (1999)
 16. Fitzpatrick J, Fanning L, Hearty S, Leonard P, Manning BM, Quinn JG, Quinn & Richard O' Kennedy. Applications and recent developments in the use of antibodies for analysis. Anal Lett. 33:263-2609 (2000)
 17. Velusamy V, Arshak K, Korostynska O, Iliwa K, Adley C. An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. 28:232-254 (2010)
 18. Ko S, Grant SA. A novel FRET-based optical fiber biosensor for rapid detection of *Salmonella typhimurium*. Biosens Bioelectron. 21:1283-1290 (2006)
 19. Bharadwaj R, Sai VV, Thakare K, Dhawangale A, Kunndu T, Titus S, Verma PK, Mukherji S. Evanescent wave absorbance based fiber optic biosensor for label-free detection of *E. coli* at 280 nm wavelength. Biosens Bioelectron 26:3367-3370 (2011)
 20. Taton TA, Mirkin CA, Letsinger RL. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. Science. 289:1757-1760 (2000)
 21. Soh N., Tokuta T, Watanabe T, Mishima K, Imato T, Masadome T, Asadome , Asano Y, Okutani S, Niwa O, Brown S. A surface plasmon resonance immunosensor for detecting a dioxin precursor using a gold binding polypeptide. Talanta. 60:733-745 (2003)
 22. Boyle MDP, Reis KJ. Bacterial Fc receptor. Biotechnology 5:697-703 (1987)
 23. Ko S, Park TJ, Kim SH, Kim JH, Cho YJ. Directed self-assembly of gold binding polypeptide-protein A fusion proteins for development of gold nanoparticle-based SPR immunosensors. Biosens Bioelectron. 24:2592-2597 (2009)
 24. Dover JE, Hwang GM, Mullen EH, Prorok BC, Suh SJ. Recent advances in peptide probe-based biosensors for detection of infectious agents, Journal of Microbiological Methods 78: 10-19 (2009)
 25. Tawil N, Sacher E, Mandeville R, Meunier M. Surface plasmon resonance detection of *E.coli* and methicillin-resistant *S.aureus* using bacteriophages. Biosens Bioelectron. 37:24-29 (2012)
 26. Wang Y, Ravindranath S, Irudayaraj J, Separation and detection of multiple pathogens in a food matrix by magnetic SERS nanoprobe, Anal. Bioanal Chem, 399:1271-1278 (2011)
 27. Stile PL, Dieringer JA, Shah NC, Van DRP, Surface-enhanced raman spectroscopy, Annu. Rev. anal. Chem, 1:601-626 (2008)
 28. Lesacherre ML, Paxon TL, Mondello FJ, Burrell MC, Linsebiger A, Portable raman instrument for rapid biological agent detection and identification, SPIE 7319:73190C-1-12 (2009)
 29. Mura S, Greppi G, Marongiu ML, Roggero PP, Ravindranath SP, Mauer LJ, Schibeci N, Perria F, Piccinini M, Innocenzi P, Irudayaraj J, FTIR nanobiosensors for *Escherichia coli* detection, Beilstein J. Nanotechnol., 3: 485-492 (2012)
 30. Yakovleva ME, Moran AP, Safina GR, Wadstrom T, and Danielsson B. Lectin typing of *Campylobacter jejuni* using a novel quartz crystal microbalance technique. Analytica Chimica Acta. 694:1-5 (2011)
 31. Wan Y, Zhang D, and Hou B. Determination of sulphate reducing bacteria based on vancomycin-functionalized magnetic nanoparticles using a monification-free quartz crystal microbalance, Biosens Bioelectron. 25:1847-1850 (2010)
 32. Guo X, Lin CS, Chen SH, Ye R, Wu VCH, A piezoelectric immunosensor for specific capture and enrichment of viacle

- pathogens by quartz crystal microbalance sensor, followed by detection with antibody-functionalized gold nanoparticles, *Biosens. Bioelectron.*, 38: 177-183 (2012)
33. Gau JJ, Lan EH, Dunn B, Ho CM, Woo JCS. A MEMS based amperometric detector for *E.Coli* bacteria using self-assembled monolayers', *Biosens Bioelectron.* 16:745-755 (2001)
 34. Sun J, Xia S, Bian C and Qu L. Micro amperometric immunosensor for the detection of *Salmonella typhimurium*. *Proc. SPIE* 7159, 71590A (2008)
 35. Li Y, Cheng P, Gong J, Fang L, Deng J, Liang W, Zheng J. Amperometric immunosensor for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food specimens, *Analytical Biochemistry*, 421:227-233 (2012)
 36. Tu SI, Uknalis J, Gehring A. Detection of immunomagnetic bead captured *Escherichia coli* O157:H7 by light addressable potentiometric sensor. *JJ Ind Microbiol Biotechnol.* 7:69-79 (1999)
 37. Ercole C, Del Gallo M, Mosiello L, Baccella S, Lepidi A. *Escherichia coli* detection in vegetable food by a potentiometric biosensor. *Sens Actuat B Chem.* 91:163-168 (2003)
 38. Katz E, Willner I. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-Sensors, and enzyme biosensors. *Electroanalysis* 15:913-947 (2003)
 39. Ivnitski D, Abdel-Hamid I, Atanasov P, Wilkins E. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosens. Bioelectron.* 14:599-624 (1999)
 40. Ivnitski D, Abdel-Hamid I, Atanasov P, Wilkins E, Stricker S. Application of electrochemical biosensors for detection of food pathogenic bacteria. *Electroanalysis* 12:317-325 (2000)
 41. K' Owino IO, Sadik OA. Impedance spectroscopy: A powerful tool for rapid biomolecular screening and cell culture monitoring. *Electroanalysis.* 17:2101-2113 (2005)
 42. Wan Y, Zhang D, Wang Y, Hou B. A 3D-imperimetric immunosensor based on foam Ni for detection of sulfate-reducing bacteria. *Electrochem. Commun.* 12:288-291 (2010)
 43. Ran F, Leung PHM, Liu ZB, Zhang Y, Xiao LD, Ye WW, Zhang X, Yi L, Yang M. A PDMS microfluidic impedance immunosensor for *E.coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* detection via antibody-immobilized nanoporous membrane. *Sens. Actuat. B* 159:328-335 (2011)
 44. Pal S, Ying W, Alocija EC, Downes FP, Sensitivity and specificity performance of a direct charge transfer biosensor for detecting *Bacillus cereus* in selected food matrices. *Biosys. Eng.*, 99: 461-468 (2008)