

최 종  
연구보고서

임피던스 측정에 의한 축산물  
*Salmonella* 신속 정량 검출 기술

Development of Impedimetric Biosensor for the  
Detection of *Salmonella* spp. in Meat and Dairy  
Products

한양대학교 산학협력단  
농촌진흥청 농업공학연구소

농 립 부

최 종  
연구보고서

임피던스 측정에 의한 축산물  
*Salmonella* 신속 정량 검출 기술

Development of Impedimetric Biosensor for the  
Detection of *Salmonella* spp. in Meat and Dairy  
Products

한양대학교 산학협력단  
농촌진흥청 농업공학연구소

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “임피던스 측정에 의한 축산물 Salmonella 신속 정량 검출 기술” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2007 년 5 월 24 일

주관연구기관명 : 한 양 대 학 교  
식 품 영 양 학 과

총괄연구책임자 : 엄 애 선  
연 구 원 : 문 지 혜  
연 구 원 : 심 재 영  
연 구 원 : 신 현 아  
연 구 원 : 김 인 혜  
연 구 원 : 장 미 경  
연 구 원 : 유 현 주  
연 구 원 : 김 진 영  
연 구 원 : 이 현 주  
연 구 원 : 윤 혜 준

협동연구기관명 : 농 업 공 학 연 구 소  
농산물안전성판정연구실

협동연구책임자 : 김 기 영  
연 구 원 : 장 석 원  
연 구 원 : 노 대 현

위탁연구기관명 : 고 려 대 학 교  
생 명 자 원 연 구 소

위탁연구책임자 : 박 유 현

## 요 약 문

### I. 제 목

임피던스 측정에 의한 축산물 *Salmonella* 신속 정량 검출 기술

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 식품의 국제간 교류 확대에 의하여 농축산물 원료 및 가공식품의 수출입이 자유화되면서 수송속도가 빨라짐에 따라 식중독 세균의 전파 속도가 빨라지고 있다. 또한 식생활 패턴의 변화로 인하여 집단급식, 가공식품, 냉장 및 냉동식품, 즉석식품 등의 소비 증가로 다발적인 집단식중독 발생이 증가하고 있다. 특히 세균성 식중독은 우리나라는 물론 전 세계적으로 그 발생 빈도가 가장 높으며, 최근에는 증가 추세에 있다. 우리나라의 세균성 식중독사건은 살모넬라 (*Salmonella*), 장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*), 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 순서로 발생하고 있다.

이에 식품안전성을 향상시키기 위하여 정부는 위해요소중점관리기준(HACCP) 및 우수농산물(GAP) 인증 등의 제도를 시행, 권장함에 따라 세균성 식중독 균의 신속하고 정확한 사전 검사 요구가 증가하고 있다. 하지만 기존의 식중독 균 검사 방법은 3-7일의 장기간의 배양시간이 요구되므로 사전 검사로서의 기능을 충족할 수 없을 뿐만 아니라, 늘어나는 검사 수요를 감당할 수 없을 것으로 예상되고 있다. 기존의 배양방법의 시간적인 단점을 보완하기 위하여 PCR, chromatography, fluorescence spectroscopy, flow cytometer 등의 여러 가지 빠른 검사 방법들이 개발되었으나 소요 비용이 높고 복잡한 검사 방법은 숙련된 실험자를 필요로 하는 등의 단점으로 인하여 현장에서의 적용이 불가능하다는 문제점이 제기되고 있다. 따라서 사전검사를 통한 식품안전성을 향상시키기 위해서는 효율적이고 간편하게 세균성 식중독 균을 신속하게 검출할 수 있는 실용적인 검출 기술의 개발이 시급하다.

따라서 본 연구는 축산식품의 안전을 저해하는 요인 중 대표적인 세균성 식중독균인 *Salmonella* 균을 빠르게 검출하기 위하여 항원·항체 반응을 이용한 임피던스 바이오센서 검출기법을 개발하는 것이다. 본 임피던스 바이오센서는 *Salmonella* 정량·정성 검출 방법에서 평균적으로 3 - 7일의 검출시간이 소요되는 기존의 바이오센서에 비하여 검출시간이 7시간 이내로 단축시키는 것이 목적이었다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2004)	<p>식품의 <i>Salmonella</i> 신속 검출을 위한 사전처리 기술개발</p>	<p>-미생물 신속 검출을 위한 사전처리 기술개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 적정배지에서 물리·화학적 특성에 따른 임피던스 확인</li> <li>· 시료의 미생물 검출의 재현성 확보를 위한 시료의 사전처리 기술개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전기전도도의 최적화를 위한 시료의 화학적 특성 표준화 (pH, 식품의 농도)</li> <li>- 전기전도도의 최적화를 위한 시료의 물리적 특성 표준화 (점성, 온도)</li> </ul> </li> </ul> <p>-미생물 신속 검출을 위한 모델 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 미생물의 신속 검출을 위해 측정 조건 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 증균 조건 및 적정 시간의 측정</li> </ul> </li> </ul>
	<p>전기적인 방법을 이용한 미생물 검출 기술개발</p>	<p>-<i>Salmonella</i> 항체 반응물 대상 최적 array 설계</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 기 개발된 최적 array의 prototype의 전기특성 확인</li> </ul> <p>-<i>Salmonella</i> 항체 반응물 단독 임피던스 특성확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 항체 반응물의 전기특성 (주파수 분석)</li> </ul> <p>-항체 반응물의 array 혼재 임피던스 특성확인</p> <p>-임피던스 주파수 분석에 의한 병원성 미생물 검출 기술개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 주파수 분석을 통한 바이오센서의 전기적인 모델개발</li> </ul>
	<p>단일클론 항체 (항원인식부위)의 목적표면에의 방향성 고정화</p>	<p>-<i>Salmonella</i> 특이적 단일클론 항체 제조</p> <p>-항원인식 부위(Fab') 편집방법의 확립</p> <p>-Fab' 고정화 기술 확립</p> <p>-방향성 고정화 기술 확립</p> <p>-Fab' 정제물의 균일 고정방법 확립</p>

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2005)	<p style="text-align: center;">임피던스 측정형 미생물 검출모델 구축 및 센서성능시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 임피던스 주파수 계측용 미생물 표준시료 개발</li> <li>· 미생물의 농도에 따른 임피던스 변화 계측 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 적정배지에서 배양된 미생물 농도에 따른 임피던스의 변화 계측</li> <li>- 관련 식품에 집중하여 미생물 농도에 따른 임피던스의 변화 계측</li> </ul> </li> <li>· 농도와 임피던스 변화에 대한 표준화 작업</li> <li>- 소량의 미생물 감지를 위한 항원·항체 반응계 확립</li> <li>· 임피던스의 미생물 감지의 최저/최고 농도 확인</li> <li>· 미생물의 증폭조건 확립을 통한 소량의 미생물 감지 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존의 증폭 방법에 대한 조사</li> <li>- 기존의 증폭 방법에 대한 임피던스의 확인 실험</li> </ul> </li> <li>- 센서 정밀도 및 정확도 검증</li> <li>· 기존의 미생물 측정 방법과 센서 측정결과의 비교 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 센서 측정치와 SPC 비교</li> <li>- 센서 측정치와 분석 kit와의 결과 비교</li> <li>- 센서 측정치와 전자현미경을 통한 측정결과 비교</li> </ul> </li> <li>· 결과 비교에 따른 임피던스의 주파수 보정</li> </ul>
	<p style="text-align: center;">항원·항체 반응 측정을 위한 반도체 MEMS 센서의 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 전기적인 검출 감도를 증폭을 위한 센서 개발</li> <li>· 주파수 변환 시뮬레이션을 통한 미생물 센서의 최적 모델 개발</li> <li>· 항체 고정을 위한 최적의 센서 구조 설계</li> <li>· 주파수 분석을 통한 바이오센서의 전기적인 모델개발</li> <li>- 미세 신호 증폭 및 계측 시스템 개발</li> <li>· 전기적 등가 모델 시뮬레이션을 통한 단일 주파수 측정시스템 제작</li> </ul>

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2006)	<p style="text-align: center;"><b>임피던스의 실용화 구축을 위한 사전처리 모델 구축 및 항원·항체 센서의 보관기술개발</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 현장에서 발생하는 시료의 사전처리 모델 구축 및 분석</li> <li>· 식품 시료에 따른 전기 전도도의 최적화 조건 확인 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 식품 생산 현장에서 생산되는 다양한 물리적 형태의 시료의 사전처리</li> <li>- 식품 생산 현장에서 생산되는 다양한 화학적 형태의 시료의 사전처리</li> </ul> </li> <li>· 농도별로 임피던스의 표준화된 값에 적용 여부 확인</li> <li>- 항체 고정 센서 array 내구성 증진</li> <li>· 항원·항체 센서의 장기보관 기술 개발</li> <li>· 항원·항체 센서의 미생물 검출 기술개발</li> <li>· 보관한 센서와 새로운 센서의 사용 결과 비교·분석</li> </ul>
	<p style="text-align: center;"><b>MEMS 기술을 이용한 병원성 미생물의 신속 검출 시스템 개발</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 바이오센서 보관 기술 개발</li> <li>· 센서부 이용 안정성 증대를 위한 내구 방안 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 물리적 안정성 (내열성, 내마모성)</li> <li>- 화학적 안정성 (내산 내염기성, 내염성)</li> </ul> </li> <li>· 센서의 보관 방법 및 보관 후 사용방법 개발</li> <li>- MEMS 센서 제작을 위한 반도체 제작공정 설계 및 센서제작</li> <li>· 계측 시스템 구축을 위한 하드웨어 제작</li> <li>· MEMS 센서 회로 설계 및 시뮬레이션</li> <li>· MEMS 센서 제작공정 개발 및 제작</li> <li>- 센서 성능 평가 및 보완 제작</li> <li>· 기지 및 미지 샘플을 이용한 센서감도 평가</li> <li>- 시험 모델의 구성</li> </ul>

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 연구개발의 결과

본 연구는 우리나라 축산물의 *Salmonella* 신속 정량 검출 기술을 개발하여, 식품의 안전성 향상을 도모하고자 하였으며, 연구 개발은 다음과 같이 수행하였다.

식품안전성에 있어서 가장 큰 문제가 되는 살모넬라 식중독균을 신속하게 검출할 수 있는 임피던스 바이오센서 및 측정시스템을 개발하였고, 이를 이용하여 축산식품에서 *Salmonella*를 신속하게 검출할 수 있도록 살모넬라 항원·항체 반응형 검출 모델을 구축하고 시료의 사전처리 기술을 개발하였다. 이를 위하여 소량의 미생물 감지를 위한 센서 표면의 *Salmonella* 항원·항체 반응계를 확립하고, *Salmonella* 신속 검출을 위한 시료 전처리 기술을 개발하였으며, 센서의 내구성 증진을 위한 반복사용 기술을 개발하였다.

개발된 임피던스 바이오센서를 이용하여 여러 식품 시료에서 전처리 법을 다르게 하여 *Salmonella*를 농도별로 측정하여, 검출성능과 특이성을 관찰하였다. 또한 센서표면에 항체 고정화 방법에 차이를 두어 식품별 센서 고정화법에 따른 효율성을 관찰하였다.

임피던스 바이오센서를 이용하여 식품 시료에서 *Salmonella*를 측정할 경우, 식품 시료 내의 잔여물에 의하여 임피던스 신호가 증가하는 경향이 관찰되었다. 실험 결과 임피던스 바이오센서를 이용하여 식품 시료에서 *Salmonella*를 측정시 non-specific binding을 효율적으로 억제할 수 있는 blocker BSA 농도는 1.0% 이었다.

닭고기(닭가슴살)에서 *S. typhimurium*을 측정된 결과 Stomacher 방법 보다는 Swab method를 이용하여 전처리를 한 시료에서 농도별 임피던스 신호가 증가되는 경향이 관찰되었다. Biotin-avidin method를 이용하여 항체 고정화를 거친 임피던스 바이오센서에서의 닭가슴살의 검출 가능한 농도는  $10^6$  CFU/ml 이었으며, 검출 시간은 시료 전처리 시간을 포함하여 4시간 정도 소요되었다.

돼지고기에서 *S. typhimurium*을 측정된 결과, biotin-avidin method를 이용하여 항체를 고정화시킨 후 stomacher 전처리 방법으로 처리한 시료에서의 검출이 가능한 농도는  $10^3$  CFU/ml 이었다. Thiolation cross-linker를 이용하여 항체를 고정화시킨 후 Swab method를 이용하여 전처리한 시료에서의 검출이 가능한 농도는  $10^2$  CFU/ml 이었다.

임피던스 바이오센서를 이용하여 최근 *Salmonella* 오염으로 인하여 문제시 되었던 땅콩버터에서 *S. typhimurium*의 검출을 시도하였다. 검출 결과  $10^1 - 10^2$  CFU/ml 이후부터 검출이 가능하다는 매우 민감한 검출능력이 관찰되었다. 우유내 *Salmonella* spp.의 임피던스 신호를 측정된 결과, thiolation cross-linker를 이용하여 항체를 고정화시킨 센서에서의 검출 가능 농도는  $10^2$  CFU/ml 이었다.

임피던스 바이오센서를 이용하여 시금치에서 *S. typhimurium*을 측정하였으며, 측정 가능 농도는  $10^5$  CFU/ml 이었다. 따라서 이번 연구에서 적용된 임피던스 바이오센서를 이용한 *Salmonella* 검출방법이 축산 식품 이외의 채소류에서도 검출이 가능하다는 활용성을 제시하고 있다.



## 2. 활용에 관한 건의

본 연구에서는 식품안전성에 있어서 가장 큰 문제가 되는 *Salmonella* 식중독균을 신속하게 검출할 수 있는 임피던스 바이오센서 및 측정시스템을 개발하였다.

개발된 임피던스 바이오센서는 성능시험 결과로 양호한 검출성능을 보였고, 검출속도는 시료 공급에서부터 임피던스 신호를 얻는데 소요되는 시간을 포함하여 10분 이내로 줄일 수 있었다.

임피던스 바이오센서를 이용하여 축산 식품 위주의 식품에서 *Salmonella*를 검출한 결과, 기존의 검출법인 표준평관계수법에 비하여 **단시간내에 측정이 가능하다**는 장점이 부각되었다. 또한 동일한 식품 시료에서 임피던스 바이오센서와 Spectrophotometer를 이용하여 *Salmonella*를 농도별로 검출한 결과, 기존의 흡광도 측정법에 비하여 **임피던스 바이오센서의 검출성과 효율성에서 높은 경향**을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 개발한 임피던스 바이오센서를 이용한 축산 시료 검출 방법을 식품 현장에서 적용이 가능한 수준으로 보완하고 간편화할 경우, 식중독균 판별 검사에 직접적인 현장 적용이 가능한 간편하고 신속한 검출기와 검출 방법으로 제안된다.

## SUMMARY

### (영문 요약문)

Conventional methods for *Salmonella* detection and identification involve prolonged multiple enrichment steps. Some immunological rapid assays are available with sensitivity comparable to those of the conventional methods. One common rapid detection method is based on impedance characteristics of electrodes and a medium where bacteria are resides. Impedance measurement method analyzes both the resistive and capacitive properties of a medium or electrodes. Many researches have been conducted with conventional impedimetric method, which has been focused on the changes in electrical impedance of a medium resulting from the bacterial growth. Impedance changes of the medium are resulted from the release of ionic metabolites from live bacteria. Some researchers measured impedance changes of both the medium and electrodes. Even though the impedimetric method reduces the time for the detection of bacteria in food, it still requires hours of incubation time to detect bacteria.

Recently, biosensors have shown great potential for rapid detection of foodborne pathogens. They are capable of direct monitoring the receptor-analyte reactions in real time. Among the biosensors, impedimetric biosensors have been widely adapted as an analysis tool for the study of various biological binding reactions because of their high sensitivity and reagentless operation. The impedimetric biosensor, which was devised to increase the selectivity and the sensitivity by incorporating a biologically functionalized detection layer on the surface of the electrode, usually measures electrode or interface impedance. The impedimetric biosensor enables qualitative and quantitative monitoring of bacteria by measuring the changes in the electrical impedance.

In this study, an impedimetric biosensor was developed to detect *Salmonella* in food samples. The impedimetric biosensor was fabricated by immobilizing *Salmonella* antibodies onto the surface of an interdigitated microelectrode (IME) sensor. The IME sensor was designed based on simulation and fabricated by using micro-electro-mechanical systems (MEMS) technique. To increase sensitivity of the biosensor, different antibody immobilization methods were devised and tested. The first immobilization method used streptavidin-avidin reaction and the other method used self assembled monolayer (SAM) of thiol bonding. Developed impedimetric biosensor was evaluated by performing *Salmonella* detection in PBS and food samples.

The results of this study are as follows:

1. Simulation of electrical model for the impedimetric biosensor showed that the biosensor has the best sensitivity at 3  $\mu\text{m}$  of electrode gap space. The biosensor was designed to have 3  $\mu\text{m}$  of electrode gap space and 10  $\mu\text{m}$  of electrode width based on the simulation results.

2. An impedance analyzer was also developed in this study. The impedance analyzer produced the best sensitivity at 100 Hz of input frequency.
3. The impedance biosensor showed linear relationship between concentration of *Salmonella* and impedance signal.
4. Detection limits of the biotin-avidin based biosensor in phosphate buffered saline (PBS) solution were  $10^6$  CFU/ml and  $10^7$  CFU/ml for *S.entertidis* and *S.typhimurium*, respectively. Detection limit of the SAM based biosensor in PBS was  $10^2$  CFU/ml for *S.entertidis*.
5. The impedance biosensor showed high selectivity. The biosensor successfully detected *Salmonella* cells when *E. coli* was coexisted in the sample.
6. The impedance biosensor successfully detected  $10^6$  CFU/ml of *Salmonella* in chicken extract. Detection limits of the impedance biosensor in pork extract were  $10^2$  CFU/ml when swabbing was used as a sample preparation method.

CONTENTS  
(영 문 목 차)

Chapter 1	Introduction about development of impedimetric biosensor for the detection of <i>Salmonella</i> spp. ....	1
Chapter 2	Technical development of domestic and foreign perspectives.....	6
Chapter 3	Results and Discussion about development of impedimetric biosensor for the detection of <i>Salmonella</i> spp. ....	8
Chapter 4	Aim - Attainments and the coherences of relation field.....	67
Chapter 5	Application tool about the results of development of impedimetric biosensor for the detection of <i>Salmonella</i> spp. ....	72
Chapter 6	Overseas scientific and technical informations .....	73
Chapter 7	References.....	74

## 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	1
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	6
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	8
제1절	항원·항체 면역반응의 전기적인 측정을 위한 신호처리 기술 개발 .....	8
1.	<i>Salmonella</i> 항원·항체 반응에 따른 전기적 특성 변화를 이용한 미생물 검출 기술 개발 .....	8
2.	반도체 MEMS 기술을 이용한 <i>Salmonella</i> 검출용 임피던스 바이오센서 개발 .....	23
3.	MEMS 기술 바탕의 임피던스 바이오센서를 이용한 병원성 미생물 신속 검출 시스템 개발 .....	30
제2절	임피던스의 실용화 구축을 위한 사전처리 모델 구축 .....	41
1.	미생물 신속 검출을 위한 모델 구축 .....	41
2.	<i>Salmonella</i> 측정을 위한 대상 시료 및 사전 처리 기술 선정 .....	44
3.	Non-specific binding을 위한 식품시료(돼지고기)에서의 Blocker BSA 농도 결정 .....	45
4.	닭고기에서의 <i>Salmonella typhimurium</i> 에 대한 임피던스 신호 변화 계측 결과 분석.....	48
5.	돼지고기에서의 <i>Salmonella typhimurium</i> 에 대한 임피던스 신호 변화 계측 결과 분석 .....	52
6.	땅콩버터에서의 <i>Salmonella</i> 에 대한 임피던스 신호 변화 계측 결과 .....	55
7.	우유에서의 <i>Salmonella</i> 에 대한 임피던스 신호 변화 계측 결과 분석 .....	58
8.	시금치에서의 <i>Salmonella</i> 에 대한 임피던스 신호 변화 계측 결과 .....	61
제3절	요약 및 결론 .....	64
1.	<i>Salmonella</i> 항원·항체 반응에 따른 전기적인 특성변화를 이용한 미생물 검출 기술개발.....	64
2.	임피던스의 실용화 구축을 위한 사전처리 모델 구축 .....	65
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	67

제 5 장	연구개발결과의 활용 계획.....	72
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	73
제 7 장	참고문헌.....	74

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

최근 농수산물의 원료 및 가공 식품의 생산, 수입 및 수출량 증가에 따라 식중독의 발생빈도가 전 세계적으로 증가하고 있어 식중독 균에 대한 검사수요가 증가하고 있다. 현재 전 세계적으로 식중독 발생이 점차적으로 증가하고 있는 추세이며, 우리나라의 경우 육류와 난류 및 그 가공품과 같은 축산물 원료 식품에서의 식중독 발생이 급격하게 증가하고 있다 (식약청 집단식중독 발생현황, 2006).

표 1-1. 우리나라 연도별 식중독 발생 현황

연도	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
건수	119	174	104	93	78	135	165	109	259
환자수	4,577	7,764	7,269	6,406	2,980	7,909	10,388	5,711	10,833
환자수/건	38.5	44.6	69.9	68.9	38.2	58.6	63.0	52.4	41.8

우리나라의 경우 현재까지 *Salmonella*에 의한 식중독(Salmonellosis)이 다음 표 2와 같이 지속적으로 보고되고 있으며, EU의 경우에도 *Salmonella*에 의한 식중독 사건 발생이 지속적으로 발생되고 있다 (표 1-2, 1-3; 식약청 집단식중독 발생현황, 2006). 2004년 미국 질병관리본부(CDC)에서 발표한 자료에 의하면 *Salmonella*에 의한 식중독 발생건수는 1백만건 이상으로, 이로 인하여 매년 500명 이상이 사망하고 있다고 보고한 바 있다. 이처럼 *Salmonella*는 대표적인 식중독균으로 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로도 세균성 식중독의 주요 원인이 되고 있다(고성희, 김지영, 2004).

표 1-2. 우리나라 연도별 *Salmonella* 식중독 발생 현황

연도	2001	2002	2003	2004	2005	2006
건수	13	25	17	23	22	22
환자수	561	589	416	839	753	576

표 1-3. EU의 연도별 식중독 및 *Salmonella* 식중독 발생현황

연도	1999	2000	2001	2002	2003	2004
식중독 발생건수	298,436	309,179	323,235	306,184	292,393	396,524
Salmonellosis	164,696	161,672	151,415	143,736	140,020	192,703

*Salmonella* spp.는 Gram 음성 간균으로 대부분 편모가 존재하고, 운동성도 있으며, *Enterobacteriaceae* 에 속한다. 이 균은 species의 대부분이 식수나 식품 등을 통하여 인체에 질병을 유발시키는 대표적인 식중독균으로 널리 알려져 있다. 현재까지 *Salmonella*는 2,523개의 혈청형이 보고되고 있으며 (김성훈 등, 2005), 이 중 2,300여종 이상이 사람에게 식중독을 유발한다고 미국 식품의약품안전청에서 발표하였다 (2006).

*Salmonella*는 닭을 포함한 가금류에서는 추백리, 파라티푸스, 조류티푸스, 조류 아리조나 감염증을, 사람에게는 장티푸스, 파라티푸스 등의 salmonellosis를 유발하여 중요한 질병의 원인균으로 인식되고 있다. Salmonellosis를 유발하는 대표적인 균으로는 *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella heidelberg*, *Salmonella infantis* 및 *Salmonella hadar* 등이 Salmonellosis의 주요 원인균으로 알려져 있다. *S. enteritidis*와 *S. typhimurium*은 국내뿐 아니라 전 세계적으로 식중독 발생의 중요한 병원균으로 인식되고 있으며, *S. typhimurium*은 *Salmonella* spp. 중 가장 병원성이 강한 균으로 보고되었다. *Salmonella*는 돼지와 조류의 장관 내에 상존하므로 도축장 및 축산물가공장의 비위생적인 작업공정에서 도체를 오염시킬 수 있으며, 이를 원료로 한 축산식품 역시 오염될 수 있다. 실제로 도축장 및 축산물 가공 공장의 칼, 세척수, 장갑, 도마, 도체 및 분변 등에서 많은 *Salmonella*가 검출되었다고 보고된 바 있다 (이경환 등, 1999).

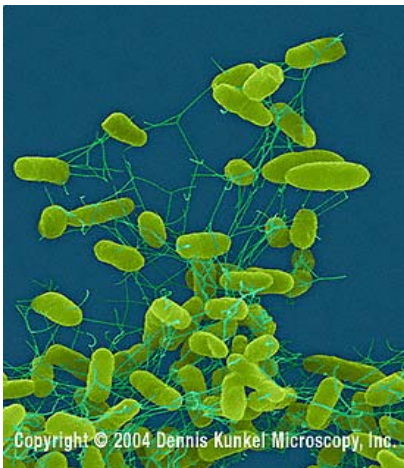


그림 1-1. *salmonella enteritidis*



그림 1-2. *salmonella typhimurium*

식품으로 인한 *Salmonella*의 감염은 주로 *S. enteritidis*, *S. typhimurium*에 의하여 발생되며  $10^{2-3}$  CFU/ml 정도의 적은 균량을 섭취한 경우에도 발병을 일으키며, 보통 12~36시간의 잠복기를 거쳐 메스꺼움, 구토, 복통, 설사 및 발열을 일으킨다. 2007년 식품의약품안전청에서 발표한 한국의 원인식품별 식중독 발생 현황에 따르면 육류 및 그 가공품이 가장 높은 식중독 유발식품으로 식중독 환자의 약 50%를 차지하고 있다. 특히 육류 중 돼지고기와 닭고기에서 *Salmonella*에 의한 식중독 발생율이 높은 점에서 위험 식품으로 분류되고 있다(고성희, 김지영, 2004).



인체에 *Salmonella* 식중독을 일으키는 주요 원인 식품으로는 축산품인 계란, 닭고기, 돼지고기, 쇠고기, 우유를 들 수 있다. 이들 식품은 *Salmonella*에 오염될 경우 빠르게 성장할 수 있는 풍부한 영양소를 함유하고 있기 때문에, 검역소, 식품 가공 공장 및 급식소 등에서 초기에 균을 검출할 수 있는 검출 기법이 요구되고 있다. 그러나 일반적으로 사용되고 있는 식품에서의 *Salmonella* 검출 방법(선택배지를 이용한 표준평판배양법)은 그 소요시간이 7일 정도라는 점에서 문제시 되고 있으며, 이를 보완하기 위한 신속한 미생물 검출 방법이 전 세계적으로 개발 중에 있다 (J. R. Patel 등, 2006; G. Genov 등, 2000).

미생물 검출은 건강과 안전을 위하여 중요시되는 연구 분야로서 주로 식품분야에서 가장 많은 미생물 검출법을 개발하고 있다. 최근 20년간 보고된 미생물 검출 방법은 *Salmonella*, *Escherichia coli* 및 *Listeria* 에 대한 검출법으로 3/4 정도를 차지하고 있다.

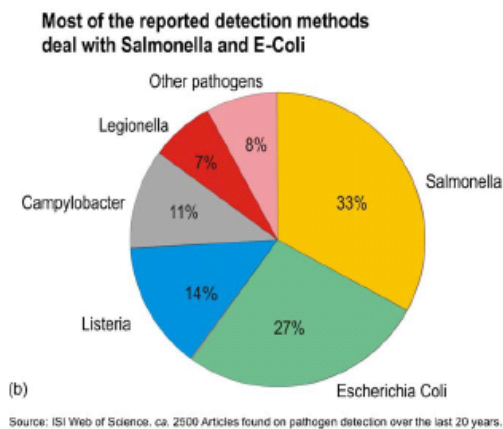


그림 1-3. 미생물 분야 검출 방법

Source : ISI Web of Science

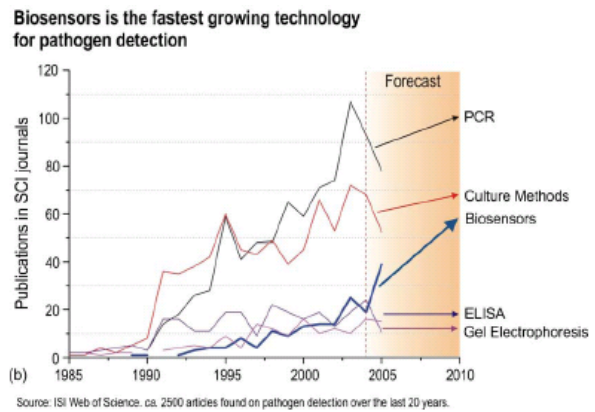


그림 1-4. 미생물 분야 검출 경향

Source : ISI Web of Science

현재 미생물 검출 분야에서는 신속하고 정확하게 검출하는 것을 주요 목표로 설정하고 있으며, 최근 바이오센서를 이용한 미생물 검출법이 각광을 받고 있다. 바이오센서는 소량의 시료를 이용하여 미생물을 단시간에 검출할 수 있다는 장점으로 주목을 받고 있다(그림 1-5).

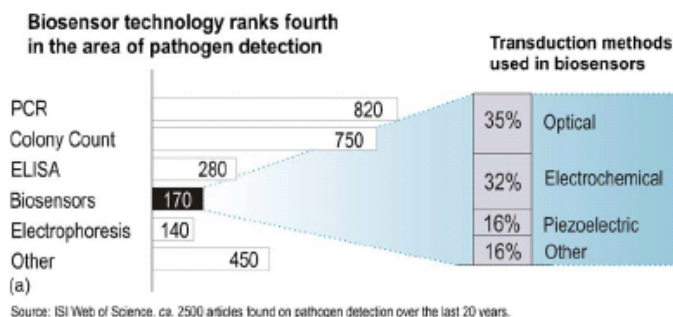


그림 1-5. 바이오센서를 이용한 미생물 검출 경향

Source : ISI Web of Science

바이오센서란 “측정 대상물로부터 정보를 얻을 때 생물학적 요소를 이용하거나, 측정 대상물이 생물체이거나 또는 생물학적 요소를 모방하는 것을 사용하여 색, 형광, 전기적 신호 등과 같이 인식 가능한 유용한 신호로 변환시켜주는 시스템”으로 정의된다. 현재 미생물 검출 개발에 이용되고 있는 바이오센서의 종류는 광학, 전자, 압전 등이 있다. 바이오센서를 이용한 미생물 검출 방법은 효소와 항체 및 핵산을 이용하여 생리화학적 반응을 측정하게 되는데, 주로 이용되는 방법은 효소를 이용한 효소면역측정법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)을 응용하여 측정하게 된다. 현재까지 개발된 바이오센서를 이용한 미생물 검출한계는 표 1-4와 같다.

표 1-4. 바이오센서를 이용한 미생물 검출 한계(O. Lazcka et al., 2006)

Pathogen	Detection Limit	Sample Type	Detection technique
<i>E. coli</i>	10 <sup>4</sup> CFU/ml	Culture	Impedimetric immunosensor
	10 <sup>2</sup> CFU/ml	Culture	SPR biosensor
	10 <sup>3</sup> CFU/ml	Ground beef	ELISA
<i>Salmonella</i>	10 <sup>3</sup> CFU/ml	Milk	PCR-ELISA
	10 <sup>4</sup> CFU/ml	Culture and water	Amperometric biosensor
<i>Listeria</i>	10 <sup>3</sup> CFU/ml	Beef	PCR
	10 <sup>4</sup> CFU/ml	Culture	Amperometric immunosensor

여러 가지 바이오센서 중에서 임피던스 센서는 재료의 정전용량과 저항을 함께 분석할 수 있는 도구로서 많은 분야에서 활용되어 왔다. 임피던스 센서의 장점은 폭넓은 교류 입력에 대한 측정 대상물의 임피던스 반응을 분석함으로써 재료의 특성을 다양하게 분석할 수 있다는 것이다. 또한 전기적인 모델링을 통한 센서의 반응을 이론적으로 해석할 수 있다는 장점도 지니고 있어 코팅재료, 연료 전지, 축전지, 전도성 폴리머, 반도체, 동식물 조직, 그 밖의 다양한 생물재료의 특성을 분석하는 연구에 활용되어 왔다. 이와 같은 장점 때문에 센서의 전극 표면에 생물분자의 검출 부를 형성하여 특정 생물재료의 반응을 조사하는 임피던스 바이오센서가 많은 분야의 연구에 이용되고 있다.

*Salmonella*는 적은 균수로도 발병을 일으키므로 이에 대한 보다 정밀한 검출방법이 요구되며, 이에 관한 여러 검출방법이 현재 전 세계적으로 연구되고 있다. *Salmonella*를 검출하기 위한 전통적인 방법은 증식배양, 선택배양 및 생화학 검사를 이용하여 분리하고 동정되는데 3~5일이 소요되어 조기에 검출하여 식중독을 차단하는 것이 불가능하다. 최근에는 분자생물학적인 방법을 이용하여 *Salmonella*를 검출하고자 하는 시도가 이루어지고 있다. 이러한 방법에는 polymerase chain reaction(PCR), real-time PCR, DNA hybridization 및 DNA microarray 등이 있으며 이 중에서 PCR 방법이 빠르고 검출한계가 뛰어난 점 등으로 인하여 많이 이용되고 있다. 하지만 PCR 방법은 primer의 사용과 여러 장비 사용으로 인하여 분석에 소요되는 비용과 노력이 많이 필요하다. 최근에는 기존 분석방법의 단점을 개선하고

자 바이오센서를 이용하여 식품의 병원성 미생물을 검출하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

*Salmonella* spp. 등의 식중독균을 검사하기 위해 현재 가장 널리 사용되고 있는 표준평판법은 식품 등에서 채취한 시료를 24시간 동안 1차 증균 후, 세균의 종류를 구별할 수 있는 선택배지에서 다시 24시간 동안 2차 배양하여 세균의 종류와 수를 측정하는 과정으로 이루어져 있다. 표준평판법은 식중독의 원인균을 찾아내는데 최소한 48시간 이상의 시간이 소요되며, 멸균 시설에서 전문 인력이 검사 작업을 수행해야 하는 단점이 있다.

체계적이고 효율적인 안전성 관리로 농·축산물 및 식품과 관련된 식중독 사고를 줄이기 위해서는 신속히 세균을 검출하는 기술이 필요하다. 기존의 식중독균 검출에 소요되는 분석시간을 줄이고 현장에서 신속한 안전성 검사를 하기 위한 효소면역반응법, 바이오센서 등 기술이 연구·개발되고 있다. 이러한 기술 중에서 바이오센서는 효소, 항체, DNA 등과 같이 신호를 감지할 수 있는 생물학적 분자식별부와 감지된 신호를 측정 가능한 신호로 변환시키는 신호변환기로 이루어진 물리화학적 측정 장치로서 빠른 응답성으로 인해 식품안전성 분야에서 많은 관심을 받고 있다. 바이오센서는 생물학적 분자식별부를 사용하기 때문에 선택성이 높아 측정 대상 물질과 유사한 물질을 잘 구분하며, 실시간 측정이 가능할 정도로 반응시간이 빠르고, 감지부와 신호변환기를 조합하여 작고 간편하게 만들 수 있으며, 측정 대상물에 영향을 주지 않고 연속적으로 측정이 가능한 장점을 지니고 있다. 센서의 감지부는 측정 대상체와의 화학적인 상호작용을 통하여 질량, 광학적 특성, 전기저항과 같은 물리화학적 변화를 감지하며, 감지된 물리화학적 변화는 신호변환기에 의하여 전기적인 신호로 변환되어 측정된다. 신호변환방법으로는 전기화학, 광학, 압전, 열 등 다양한 물리화학적 방법을 사용하고 있다.

특히, 항원·항체 결합을 이용한 임피던스 바이오센서는 전극 표면에 항원·항체 결합의 특이성과 강력한 결합력을 이용한 생물분자 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).

따라서 본 연구에서는 식품에서 *Salmonella*를 검출하는 데 있어 기존의 방법이 갖고 있는 시간상의 단점을 보완하고, 실제 산업체에서 활용 가능한 바이오센서의 개발에 중점을 두고자 하였다. 이를 위하여 축산물에서 *Salmonella*를 신속하게 검출할 수 있는 임피던스 바이오센서에서 *Salmonella*를 검출할 수 있는 시료의 전처리 기술을 개발하였다.

## 제 2 장 국내·외 기술개발 현황

- Science Daily지의 뉴스에 의하면, 최근 식품에서 *Salmonella*를 검출하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있음. 이는 기존 검출 방법의 소요 시간이 1주일 정도 소요되는데, 미생물의 경우 이 시간내에 급격하게 증가되기 때문에 식품의 위해를 방지하기 위하여 신속한 검출법이 요구되고 있기 때문임. 2002년 Laboratory Bromtologicos Araba 와 Leioa Technological center에서는 새롭고 신속한 *Salmonella* 검출법을 발표한 바 있음. 이는 DNA를 이용한 유전자 검출법으로 24시간 내에 검출이 가능하다는 장점을 가지고 있다고 보고하고 있음.
- Gabriela Jenov 등(2000)의 연구에 의하면, 식품 시료에서 *Salmonella*를 검출시 신속성과 선택성의 효율을 높이기 위하여 기존의 PCR 방법에 immunomagnetic seperation을 응용한 IMS-PCR 방법을 고안하였음. 계란, 다짐육, 치즈에서 *S. typhimurium*의 검출을 시도한 결과, 지방이 미함유된 식품내의 *S. typhimurium*의 검출 시간은 24시간, 검출한계는  $10^2$  CFU/ml 이었음.
- H. Peng & L. A. Shelef (2001)의 연구에서는 우유, 계란, 즉석조리식품 등에서 PCR 방법을 적용하여 *Salmonella*를 검출하는 방법을 개발하였음. 검출 한계는 10 - 50 CFU/25g (food sample) 이었으며, 검출 시간은 식품 전처리 시간까지 고려하여 24시간이 소요되었음.
- A. Agarwal 등 (2002)의 연구에서는 닭고기, 우유, 채소류에서 새로 고안한 PCR 방법을 적용하여 *Salmonella*의 신속 검출법을 개발하였음. 검출 한계는  $10^0$  CFU/g (food sample)로 매우 정확하였으며, 검출 시간은 10시간이었음.
- 정 등 (2003)의 연구에서는 햄, 달걀, 닭고기 등의 여러 종류의 식품에서 PCR을 이용하여 신속한 검출을 시행한 결과  $10^{3-4}$  CFU/g (food sample) 까지 검출이 가능하였음.
- 김 등 (2003)은 전통적인 식중독 원인균 탐색은 증균 후 선택적 배지를 이용한 isolation, 생화학 적 특징을 이용한 분석법이 있으나, 많은 시간이 소요된다는 단점이 있으므로 이를 보완하기 위하여 PCR을 수행하여 DNA microchip으로 확인하였음. 그러나 방법이 복잡하고 비용이 높다는 단점이 지적되었음.
- 박 등 (2003)은 기존의 효소를 고정하여 효소 반응의 결과로 발생하는 생화학 반응 물질을 간접 측정하는 대신 직접 측정 방법을 적용한 바이오센서를 개발·제작하였음. 그러나 실험의 재현성과 실용화에 대한 문제가 제기되었음.
- S. J. Favrin 등 (2003)의 연구에서는 식품시료내의 *Salmonella*를 검출하기 위하여 새로운 immunomagnetic separation (IMS)-bacteriophage assay를 이용하여 *Salmonella*를 검출하였음.

검출 한계는 3 CFU/25g (food sample)이었으며, 검출 시간은 약 20시간 이었음. 또한 *E.coli* 에 적용한 결과 검출 가능성이 제시되었음.

- 조 등 (2003)은 SPR 바이오센서를 이용하여 센서 표면을 thiolation cross-linker로 항체를 고정화 한 후, *E. coli*를 검출하는 연구를 실행하였음. 연구 결과 *E. coli*의 검출 한계는  $10^2$  CFU/ml 이었으며, 3회 반복 측정시까지 동일한 수준의 재현성을 나타내었다고 보고하였음.
- 김 등(2005)의 전자코-바이오센서를 이용한 *Salmonella* 검출에 관한 연구에 의하면, Selenite broth에서 배양된 *S. enteritidis*, *S. typhimurium*을 검출할 수 있는 전자코 - 바이오센서를 개발하였음. 검출 한계는  $10^6$  CFU/ml 이었으며, 검출 시간은 4.5 시간 내외 이었음.
- D. R. Shankaran 등 (2006)의 연구에 의하면, 최근 복잡한 물질을 분석하기 위하여, 특이성, 민감성 및 다중분석이 가능한 SPR 바이오센서가 개발중에 있으며, 센서의 성능과 효율성을 증가시키기 위하여 센서 표면의 항체 고정화방법을 달리하여 검출 효율성을 높이는 여러 방법이 개발 중에 있음.
- J. R. Patel 등 (2006)의 연구에 의하면, 식품 시료인 닭가슴살과 다짐육에서 *S. typhimurium*을 신속하게 검출하기 위하여 Real-time PCR 방법을 이용하여 검출을 시도하였음. 검출 시간은 18 시간이 소요되어 기존의 검출 시간인 3 - 8일에 비하여 신속한 검출 가능성을 제시하였음.
- L. C. Shriver-Lake 등 (2006)은 NRL array biosensor를 이용하여 PBS 완충액과 여러 식품시료에서 *E. coli* O157:H7의 신속한 검출 연구를 진행하였음. 검출 결과 PBS 완충액내에서의 *E. coli* O157:H7의 검출한계는  $10^3$  CFU/ml 이었음. 단, 다짐육, 닭고기 등의 식품시료내에서의 검출은 불가능하였음.
- 본 연구에서는 축산식품에서 *Salmonella* 를 정성·정량적으로 검출하기 위하여 전기적 주파수 측정방법을 응용한 임피던스 바이오센서를 개발하였음. 또한 개발된 바이오센서를 이용하여 축산 원료 및 가공식품인 돼지고기, 닭고기, 우유, 땅콩버터와 시금치에서 *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*을 검출하였음.
- 임피던스 바이오센서를 이용한 *Salmonella*의 검출 한계는 항체 고정화 방법에 따라 다르게 나타났으나, 가장 효율이 높은 thiolation cross-linker를 이용한 항체 고정화 방법의 경우 검출 한계는  $10^{2-5}$  CFU/ml 이었으며, 검출 시간은 항체 고정화 방법과 시료 전처리 방법을 고려하여 3 시간 내외이었음.

## 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

### 제1절 항원·항체 면역반응의 전기적인 측정을 위한 신호처리 기술 개발

#### 1. 살모넬라 항원·항체 반응에 따른 전기적 특성 변화를 이용한 미생물 검출 기술 개발

##### 가. 전기적 특성 변화 측정 감도 향상을 위한 임피던스 전극 센서 개발

###### 1) 주파수 분석을 통한 바이오센서의 전기적인 모델 개발

살모넬라 항원·항체 결합을 이용한 임피던스 바이오센서는 전극 표면에 항원·항체 결합의 특이성과 강력한 결합력을 이용한 생물분자 검출부를 형성하고, 이 검출부에 살모넬라 세균이 부착되었을 경우 변화하는 커패시턴스와 저항의 값을 측정하여 살모넬라균의 존재 여부를 판별하는 원리로 작동한다. 임피던스 바이오센서는 폭넓은 교류 입력에 대한 측정 대상물의 임피던스 반응을 분석함으로써 재료의 특성을 다양하게 분석할 수 있으며, 전기적인 모델링을 통한 센서의 반응을 이론적으로 해석할 수 있다.

##### 가) 임피던스

바이오센서의 검출부에 부착되는 살모넬라에 의해 변화되는 임피던스( $Z$ )는 교류 전류가 흐르는 회로 또는 전기소자에서의 전류를 방해하는 성분의 총합을 의미하며 임피던스의 단위로는 옴( $\Omega$ )을 사용한다. 그림 3.1-1과 같이 임피던스는 실수부와 허수부로 나타내어지며 벡터  $Z = R + jX$ 로 표시 된다. 이때 실수부  $R$ 은 저항(resistance)라 하고 허수부  $X$ 는 리액턴스(reactance)라 한다.

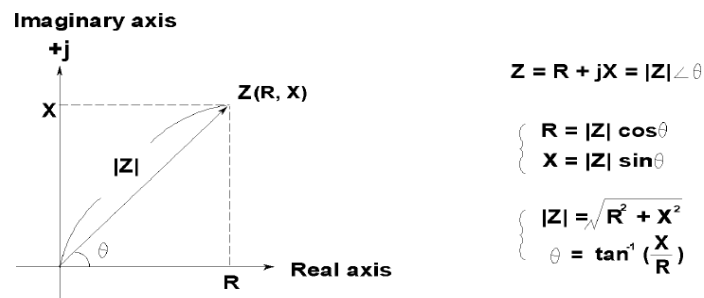


그림 3.1-1 Impedance( $z$ ) consists of real part( $R$ ) and imaginary part ( $X$ )

임피던스는 전기회로를 표시하는데 많이 사용되고 있으며, 특히 여러 소자가 직렬로 연결된 경우에 주로 사용한다. 임피던스를 구성하는 허수성분인 리액턴스는 2가지 형태로 나타난다. 리액턴스의 +형태인 인덕티브 리액턴스(inductive reactance  $X_L$ )와 -형태인 커패시턴스 리액턴스(capacitive reactance  $X_c$ )가 있다. 그림 3.1-2는 두 가지 형태의 리액턴스를 보여주고 있다.

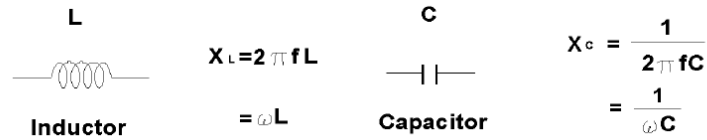


그림 3.1-2 Reactance in two forms

바이오센서의 임피던스를 알아내기 위해서는 임피던스의 실수부와 허수부를 측정해야한다. 이렇게 측정된 임피던스 값을 변환하여  $|Z|$ ,  $\theta$ ,  $|Y|$ ,  $R$ ,  $X$ ,  $G$ ,  $B$  들의 값을 구할 수 있다. 임피던스를 측정하는 가장 큰 원인은 실제 회로에 존재하는 모든 회로 소자들은 원하지 않는 저항, 커패시턴스와 인덕턴스 등의 기생 성분을 가지고 있기 때문이다. 그림 3.1-3은 커패시턴스에 기생하는 성분들을 표시하고, 커패시턴스의 실제 등가 모델을 보여주고 있다.

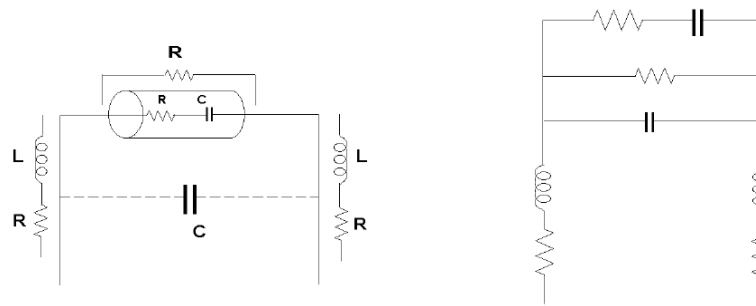


그림 3.1-3 Component(capacitor) with parasitics represented by an electrical equivalent circuit

그림 3.1-4는 콘덴서의 실제 측정에 있어서 측정되는 값과 측정값의 의미를 나타내고 있다. 그림 3.1-4의 (a)는 이상적인 콘덴서의 임피던스를 보여주고 있으며, (b)는 이상적인 콘덴서에 기생하는 저항과 인덕턴스 성분으로 인하여 변화된 임피던스를 보여주고 있다. 실제회로에서 콘덴서는 그림 3.1-4의 (b)와 같이 작용하므로 소자의 임피던스를 측정하는 목적은 정확한 실효 임피던스를 측정하고자 하는 것이다. 그림 3.1-4의 (c)는 소자의 임피던스 측정을 위하여 소자에 계측기를 연결하여 변화된 임피던스를 보여주고 있으며 계측기에서 오는 임피던스의 변화를 없애고 소자의 유효 값을 정확히 측정하기 위해서는 주의가 필요하다.

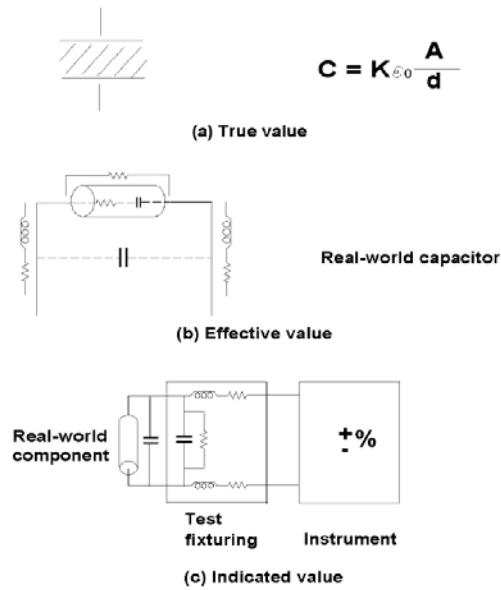


그림 3.1-4 True, effective, and indicated values of capacitance

정확한 소자의 임피던스 측정을 위해서는 임피던스 측정 전의 측정 장비의 교정 등이 필수적이며, 임피던스는 측정 조건도 소자의 특성에 알맞게 설정해 주어야 한다. 모든 소자 들은 주파수의 변화에 따른 임피던스의 영향을 받는데, 이것은 모든 소자가 기생성분이 있기 때문이다. 실제 측정에 있어서 주파수 대역에서의 파형을 보고 임피던스 측정 대상의 주된 임피던스의 형태(R, L, C)를 구별하여 측정 한다면 다른 기생성분의 영향을 줄이고, 정확한 임피던스 측정이 가능할 것이다. 또한, 측정대상의 전기적인 등가 모델을 찾아내는데 있어 주파수 대역에서의 임피던스 변화 그래프는 매우 중요하다.

그림 3.1-5는 저항에 기생하는 리액턴스 성분에 의한 주파수영역에서의 임피던스를 보여주고 있다. (a)는 저항과 기판사이에 존재하는 기생 커패시턴스에 의한 영향으로 주파수가 증가함에 따라 임피던스가 감소하였으며, (b)는 저항의 리드(lead)선에 의한 기생 인덕턴스의 영향으로 주파수가 증가함에 따라 임피던스가 증가하였다.



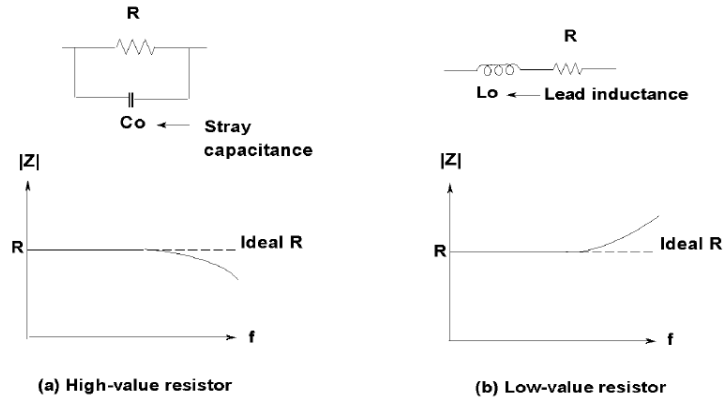


그림 3.1-5 Resistor frequency response

그림 3.1-6은 커패시턴스에 기생하는 성분의 영향으로 고주파 영역에서 커패시턴스 소자가 인덕턴스 소자로 동작하는 임피던스 특성을 보여주고 있다.

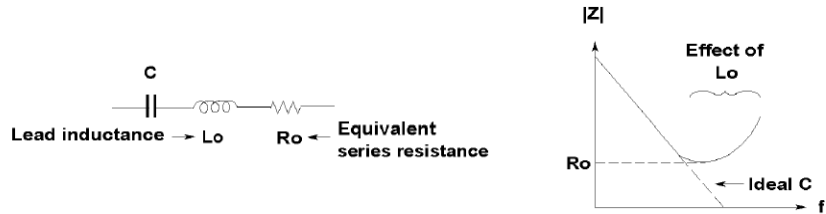


그림 3.1-6 Capacitor frequency response

그림 3.1-7은 인덕턴스에 기생하는 성분의 영향으로 고주파영역에서 인덕턴스 소자가 커패시턴스 소자로 동작하는 임피던스 특성을 보여주고 있다. 여기서 (a)와 같이 리드(lead)선에 의한 직렬성분의 기생저항이 존재할 경우 와 (b)와 같이 코일자체의 내부저항으로 인한 영향을 받는 경우가 다른 임피던스 패턴을 보여주는 것을 알 수 있다.

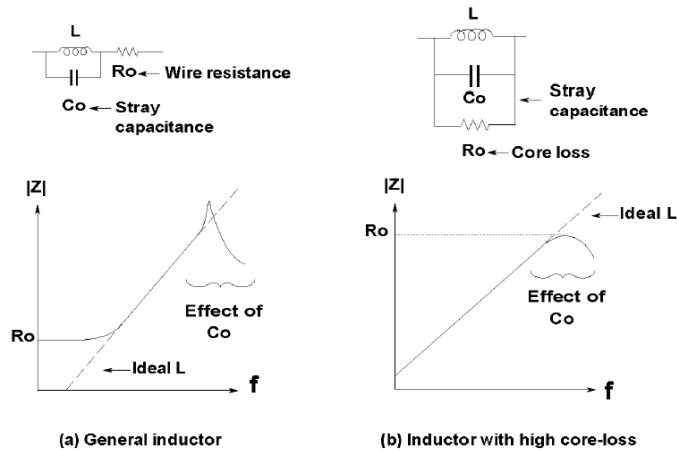


그림 3.1-7 Inductor frequency response

정확한 임피던스 측정을 위해서는 회로에 따라 적절한 임피던스 측정방법을 선정해야한다. 즉, 측정 주파수 대역, 회로의 임피던스범위 등을 고려하여야 한다. 임피던스를 측정하는 방법은 많이 있으나 임피던스를 정밀하게 측정하기 위해서는 주파수 대역에 따라 임피던스 측정법을 달리 선정해야한다. 바이오센서와 같이 생체계측에 적합한 수십 Hz에서 110MHz 사이의 주파수 대역에서 가장 정밀한 임피던스 측정방법으로는 Auto balancing 방법이 있다.

나) 바이오센서의 전기적인 모델

바이오센서에 고정된 살모넬라 항체와 살모넬라 항원과 결합에 의하여 변화하는 임피던스를 예측하고 그 결과 분석을 통하여 최적의 임피던스 전극을 설계하기 위하여 바이오센서의 전기적 모델링을 수행하였다.

Laureyn 등(2000)의 연구에서 항원항체 반응에 의한 면역 바이오센서의 기본이 되는 전기적 모델을 그림3.1-8과 같이 저항과 콘덴서가 복합적으로 결합된 모델로 표현하였다. 이 모델에서는 센서의 지지체(supporter)로 사용되는 실리콘웨이퍼와 실리콘산화층(SiO<sub>2</sub>)에 의한 정전용량(capacitance)과 항체를 고정시키기 위한 결합물질의 정전용량을 분리하여 모델링 하였다.

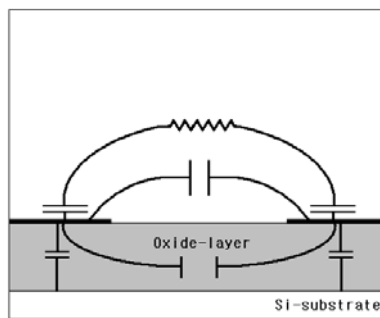


그림3.1-8 Electrical equivalent model

항원·항체 결합에 의하여 변화하는 유전율에 초점을 맞추어 위의 모델을 단순화하면 그림 3.1-9의 모델로 표현할 수 있다. 결국 공통되는 정전용량의 변화는 반응 전후의 차이를 뺀으로써 상쇄되어질 수 있기 때문이다.

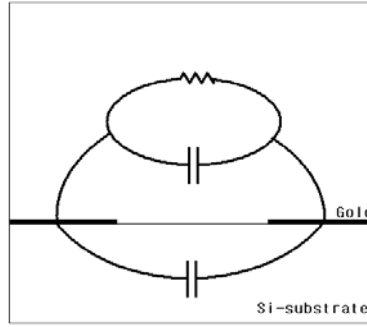


그림 3.1-9 Modified electric equivalent Model of impedimetric biosensor

이 단순모델을 이용하여 임피던스 측정시스템을 구현하였을 때 측정되는 임피던스는 그림 3.1-10과 같이 표현될 수 있다. 그림 3.1-10에서 센서의 외부에 기생하는 저항( $R_e$ )과 인덕턴스( $L_e$ )는 임피던스 측정시스템에서 비롯되는 것으로 센서의 임피던스와는 무관하지만 센서의 임피던스와 함께 측정된다. 본 연구에서는 그림 3.1-10의 전기 모델을 이용하여 면역 바이오센서의 항체가 살모넬라 항원과 결합하여 변화하는 면역 바이오센서의 임피던스 변화를 예측하고자 하였다.

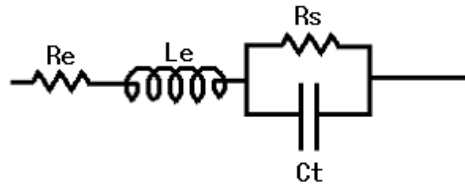


그림 3.1-10 Over all impedance

그림 3.1-10의 임피던스는 다음 식으로 구해진다.

$$Z = R_e + R_s \frac{1}{1 + (\omega R_s C_t)^2} + j \left( \omega L_e - \frac{1}{\omega C_t} \cdot \frac{(\omega R_s C_t)^2}{1 + (\omega R_s C_t)^2} \right) \quad \text{식(1)}$$

## 2) 시뮬레이션을 통한 임피던스 센서의 최적 구조 설계

### 가) 방법

살모넬라를 검출하기 위한 바이오센서의 개발을 위하여 반도체 전극센서의 표면에서 살모넬라와 살모넬라 항체의 결합에 의하여 변하는 반도체 전극센서의 임피던스 모델을 그림 3.1-10과 같이 개발하고, 살모넬라 항원의 농도에 따라 변하는 센서의 임피던스를 시뮬레이션 하였다. 시뮬레

이전을 위하여 임피던스 바이오센서를 그림 3.1-11의 평행판 커패시턴스 모델 형태로 변환하였다.

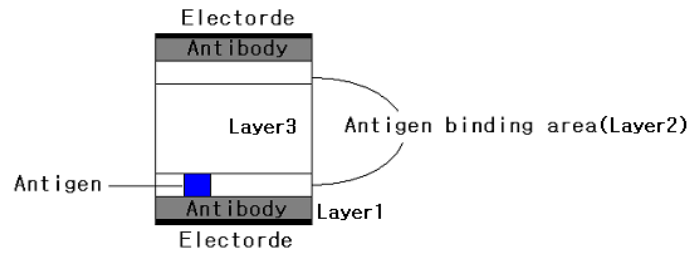


그림 3.1-11 Schematic diagram of a modified immuno-biosensor for simulation

항원-항체 반응에 의하여 변하는 정전용량의 모델링을 위하여 전극과 전극 사이의 공간을 3개의 층(layer)으로 나누어 모델링 하였다.

- Layer 1 : 전극의 표면에 항체(antibody)를 고정된 공간으로 살모넬라의 항체가 고르게 분포된 공간이다. 항체에 의한 정전용량의 변화가 생기는 공간으로 항체를 일정한 농도로 고정시킬 경우 정전용량을 상수로 볼 수 있다.
- Layer 2 : 항원이 항체와 결합하여 정전용량의 변화가 생기는 공간이다. 항원이 항체와 결합될 경우 항원에 의한 정전용량의 변화가 발생하고 그렇지 않은 경우에는 공기 또는 버퍼용액으로 채워지는 공간이다.
- Layer 3 : 항원-항체 반응에 관계하지 않는 영역으로 센서의 감도를 높이기 위해서는 이 공간이 적을수록 유리하다. 그러나 실질적으로 제작하고자 하는 센서의 형태는 전극이 평면에 배치되는 형태이므로 0이 될 수 없는 영역이다.

센서 전체의 정전용량( $C_t$ )은 Layer 1, Layer 2, Layer 3의 직렬결합으로 구해지므로 센서의 정전용량은 식 (2)와 같이 표시된다.

$$C_t = \frac{2 \times \xi_0 \times \xi_a \times S_s (n \times S_{ag} (\xi_a - 1) + S_s)}{(n \times S_{ag} \times (\xi_0 - 1) \times (dl + 3 \times \xi_a \times (ds - 3dl)) + dl \times S_s \times (1 - 4 \times \xi_a) + 2 \times \xi_a \times ds \times S_s} \quad \text{식(2)}$$

식 (2)에 전극의 면적과 전극간의 거리를 변화시켜 센서를 모델링 하였으며, 모델링된 센서와 반응한 항원의 수를 변화시키며 센서의 정전용량을 시뮬레이션 하였다. 시뮬레이션은 전극의 면적은  $25 \times 10^{-6} \text{m}^2$ ,  $10^{-6} \text{m}^2$ , 전극간 거리는  $3 \mu\text{m}$ ,  $4.5 \mu\text{m}$ ,  $6 \mu\text{m}$  세 가지 경우의 조합으로 시뮬레이션 하였다.

#### 나) 시뮬레이션 결과

본 연구에서는 전기회로 시뮬레이션 프로그램인 Pspice 9.0을 이용하여 바이오센서의 임피던스 변화를 측정하는 시스템을 시뮬레이션 하였다. 이 시뮬레이션에서는 살모넬라 항원의 농도에 따라 변화하는 바이오센서의 임피던스를 I-V method를 사용하여 임피던스 측정 회로의 전압과 전류를 측정하여 계산하였다. 시뮬레이션에서는 센서와 반응한 살모넬라 항원의 수를 변화시키며 센서의 정전용량 변화를 시뮬레이션 하였다. 그림 3.1-12은 바이오센서의 전기적 모델, 그림 3.1-13은 PSPICE 9.0을 이용한 반도체 전극센서의 시뮬레이션 모습이다.

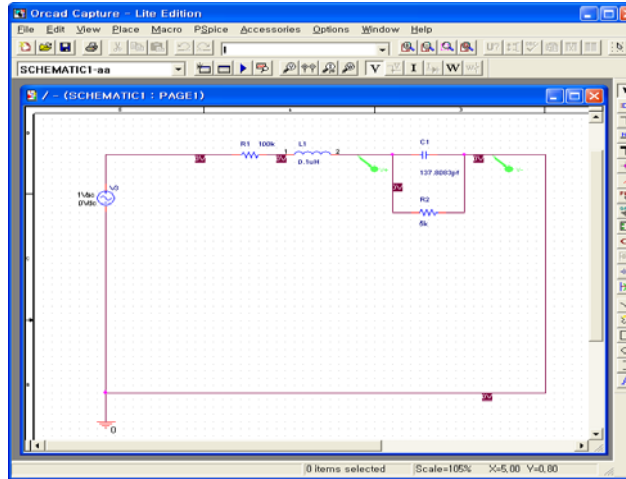


그림 3.1-12. Electrical model in Pspice 9.0

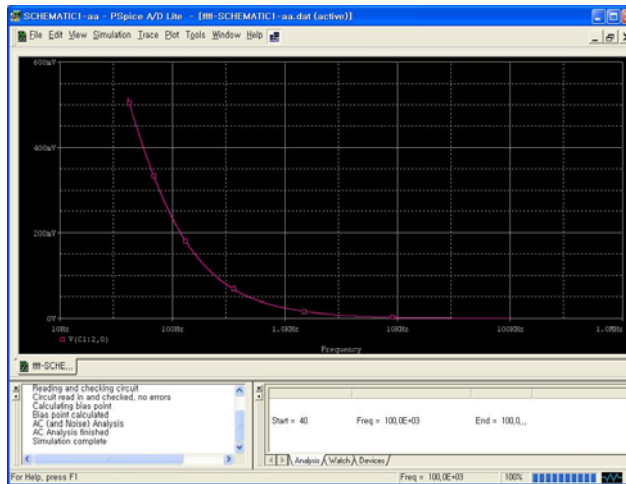


그림 3.1-13. Simulation result

시뮬레이션은 전극의 면적은  $25 \times 10^{-6} \text{m}^2$ ,  $10^{-6} \text{m}^2$ , 전극간 거리는  $3 \mu\text{m}$ ,  $4.5 \mu\text{m}$ ,  $6 \mu\text{m}$  세 가지 경우의 조합으로 시뮬레이션 하였으며 시뮬레이션 결과를 요약하면 표 3.1-1, 2와 같다.

표 3.1-1 Simulation results of total capacitance of an impedance biosensor

	$S_s = 25 \times 10^{-6} \text{m}^2$					
	ds = 6 $\mu\text{m}$		ds = 4.5 $\mu\text{m}$		ds = 3 $\mu\text{m}$	
Number of antigens(n) (CFU)	$C_t(n)$ (pF)	$\Delta C_t(n)$ (pF)	$C_t(n)$ (pF)	$\Delta C_t(n)$ (pF)	$C_t(n)$ (pF)	$\Delta C_t(n)$ (pF)
1	48.0582	-	71.2643	-	137.8086	-
10	48.0586	0.0004	71.2652	0.0009	137.8119	0.0033
100	48.0625	0.0043	71.2739	0.0087	137.8444	0.0357
1000	48.1019	0.0437	71.3603	0.0865	138.1648	0.3596
10000	48.4761	0.3742	72.1870	0.8267	141.3014	3.4928

표 3.1-2 Simulation results of total capacitance of an impedance biosensor (continued)

	$S_s = 10^{-6} \text{m}^2$					
	ds = 6 $\mu\text{m}$		ds = 4.5 $\mu\text{m}$		ds = 3 $\mu\text{m}$	
Number of antigens(n) (CFU)	$C_t(n)$ (pF)	$\Delta C_t(n)$ (pF)	$C_t(n)$ (pF)	$\Delta C_t(n)$ (pF)	$C_t(n)$ (pF)	$\Delta C_t(n)$ (pF)
1	1.9224	-	2.8507	-	5.5127	-
10	1.9228	0.0004	2.8515	0.0009	5.5159	0.0032
100	1.9267	0.0043	2.8601	0.0086	5.5481	0.0355
1000	1.9613	0.0389	2.9371	0.0770	5.8453	0.3326
10000	2.1154	0.1930	3.2967	0.3597	7.4663	1.9536

표에서 정전용량의 변화,  $\Delta C_t(n)$  값은 항원 1개가 반응했을 때의  $C_t(1)$  정전용량 값과  $C_t(n)$ 의 정전용량 값의 차이를 나타낸 것이다. 전극의 면적이  $25 \times 10^{-6} \text{m}^2$ 이며 전극간의 거리가 3 $\mu\text{m}$  경우 항원의 결합에 의한 정전용량의 변화는 결합된 항원의 수 100개 이하에서는 전극간 거리가 4.5 $\mu\text{m}$ 일 때의 4배 이상이었으며, 6 $\mu\text{m}$ 일 경우 보다는 8배 이상의  $\Delta C_t(n)$  값이 차이 나는 것을 볼 수 있었다. 전극의 면적이  $10^{-6} \text{m}^2$ 일 경우에도 전극간의 거리에 따라 유사한 결과가 나타났다. 그러나 센서와 결합하는 항원의 수가 1000개 이상에서는 항원의 수가 증가함에 따라 전극의 간의 거리에 따른 정전용량의 차이가 크게 나타났다.

그림 3.1-14는 살모넬라 항원의 결합에 따른 정전용량 변화의 시뮬레이션 결과를 표시한 그래프이다. 센서와 결합한 살모넬라 항원의 수가 증가함에 따라 센서의 정전용량도 증가하는 것을 볼 수 있으며, 살모넬라 항원의 수가  $10^4 \text{CFU/ml}$  이상에서는 살모넬라 수에 따른 정전용량의 변화가 커지는 것을 볼 수 있었다.

또한, 임피던스 센서에서 센서전극의 표면적이 넓고, 전극간의 거리가 가까운 센서가 정전용량이 크게 나타나지만, 센서의 전체 정전용량( $C_t$ )에 대한 항원과의 결합에 의한 정전용량( $C_{ag}$ )의 변화의 비율은 전극간의 거리가 3 $\mu\text{m}$  일 경우가 가장 좋은 결과를 나타냈다.

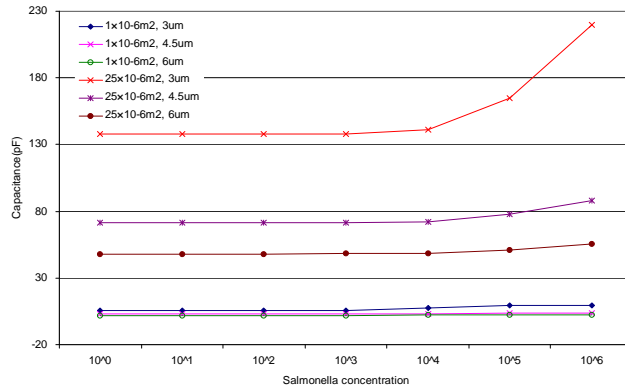


그림 3.1-14 Capacitance vs. salmonella concentration

임피던스 측정조건에 따라 센서에서 측정되는 전압은 변화 될 수 있으나 실제 센서의 임피던스 측정에서는 센서의 전체 임피던스와 항원과의 반응에 의하여 변하는 임피던스의 비율(ratio)이 중요하다. 전체 임피던스에 대한 센서의 변화 비율이 높을수록 실제 계측기를 이용한 측정에서 더 좋은 측정 결과를 얻을 수 있기 때문이다. 이와 같은 이유로 MEMS 기술을 적용한 초소형의 마이크로 전극을 이용하여 바이오센서를 제작할 경우 전극의 면적을 크게 하지 않아도 살모넬라 항원의 검출에 충분한 신호를 얻을 수 있을 것으로 판단되었다.

시뮬레이션 결과 임피던스 변화는 두 전극 사이의 거리가 가까울수록, 전극의 크기가 클수록 크며, 반응하는 항원의 유전율이 클수록, 항원의 수가 많을수록 임피던스 변화가 크게 나타났다. 살모넬라 항원과 항체의 결합에 의해 변하는 센서의 임피던스의 변화를 민감하게 측정하기 위해서는 위와 같은 조건을 고려하여 센서전극의 형상과 크기를 최적으로 설계하는 것이 필요하다.

#### 나. 살모넬라 항원 · 항체 반응 검출용 최적 임피던스 전극 어레이 설계

살모넬라는 2~4 $\mu\text{m}$  크기이며 폭은 1~2 $\mu\text{m}$  정도의 식중독을 일으키는 원인균으로 알려져 있다. 일반적으로 전기전인 성질이 극대화 되어 나타나기 위해서는 살모넬라균이 두 전극에 모두 접촉하는 것이 가장 바람직하다고 볼 수 있다. 그러므로 반도체 전극센서의 개발에서는 전기적인 특성이 잘 나타날 수 있는 전극의 크기와 형상을 설계하는 것도 매우 중요하다.

본 연구에서는 살모넬라 항원의 크기가 1~2 $\mu\text{m}$ 인 점을 고려하여 가능한 적은 수의 살모넬라 세균을 검출할 수 있도록 센서를 설계하였다. 본 연구의 시뮬레이션 결과 최소의 살모넬라균을 측정할 수 있는 조건은 두 전극사이의 거리가 3 $\mu\text{m}$ 이내 였기 때문에 작은 수의 살모넬라균의 부착에도 임피던스 값이 민감하게 변화할 수 있도록 전극 사이의 간격을 센서 제작상 가능한 최소의 값을 갖도록 하였으며, 작은 크기의 센서위에 보다 많은 반응부위를 갖도록 전극의 길이를 길게 설계하였다.

전극의 폭 결정에 있어서 실제 제작할 임피던스 센서는 그림 3.1-15와 같이 평면위에 전극이 배열되는 형상이므로 전극 사이에 형성되는 전기장의 경로가 평행판 축전기의 경우보다 멀어지게 된다. 전극의 폭(W)을 크게 하면 센서의 정전용량 변화는 커지게 되지만 전극간의 유효 거리가 멀어지게 되어 센서의 감도가 떨어지게 된다. 그러므로 실제 센서의 제작에 있어서는 전극의 폭을 넓게 만들 수 없는 문제가 있다. 임피던스 변화형 센서는 임피던스의 성분에 따라 임피던스의 허수 성분인 리액티브의 변화를 측정하는 센서와 실수 성분인 저항의 변화를 측정하는 센서로 나눌 수 있다. 일반적으로 임피던스 변화를 측정하는 센서는 임피던스의 크기를 측정함으로써 임피던스의 허수부와 실수부를 같이 측정하게 된다.

그림 3.1-15는 항원·항체 반응형 임피던스 바이오센서의 기본 개념도로서, 항원·항체 반응에 의하여 변화되는 전기적인 성질을 설명하고 있다. 임피던스는 그림 3.1-15의 (a)의 두 전극 사이에 존재하는 물질의 종류에 따라 두 전극 사이에 저장되는 전기에너지의 양과 두 전극 사이에 흐르는 전하의 양이 변화되어 전극의 임피던스가 변하게 된다. 그림 3.1-15의 (b)는 센서의 두 전극 사이에 항원이 결합함으로써 센서의 임피던스 변화를 일으키는 모습이다.

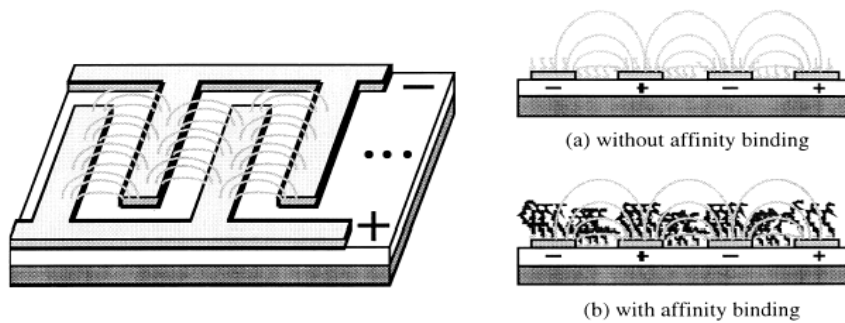
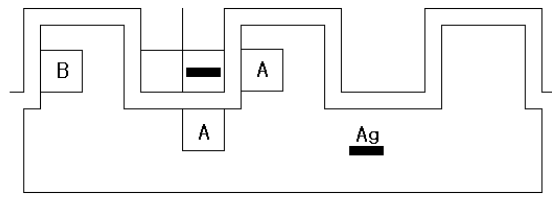


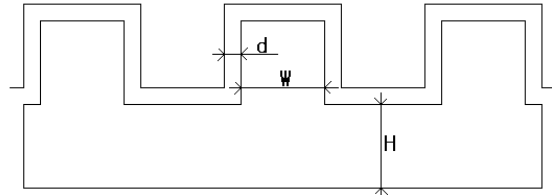
그림 3.1-15 Concept of impedance biosensor

평행판 축전기의 형상은 서로 마주보는 전극이고 실제 제작할 센서는 그림 3.1-15와 같이 평면위에 전극이 배열되는 형상이므로 전극 사이에 형성되는 전기장의 경로가 평행판 축전기의 경우보다 멀어지게 된다. 그림 3.1-16은 설계된 전극의 형상을 보여 주고 있다. 전극의 폭(W)이 커지게 되면 전극간의 유효 거리는 멀어지게 되어 센서의 감도가 떨어지게 된다. 그러므로 실제 센서의 제작에 있어서는 전극의 폭을 넓게 만들 수 없는 문제가 있었다.

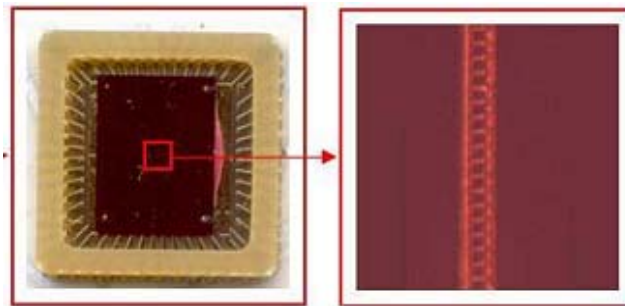




(a)



(b)



(c)

그림 3.1-16 Photo of Impedance Sensor

본 연구의 시뮬레이션 결과 살모넬라 항원을 검출하는 최적의 조건은 두 전극사이의 거리가  $4.5\mu\text{m}$ 이내였기 때문에 두 전극 사이의 거리  $2\mu\text{m}$ , 전극의 폭을  $10\mu\text{m}$ 로 설계 제작하였다. 센서는  $10\text{mm} \times 10\text{mm}$  크기의 실리콘 웨이퍼 위에 금 전극으로 제작되었으며, 항원·항체 반응이 일어나는 부분의 전극 길이는  $5\text{mm}$ 로 제작하였다. 전극의 끝부분은  $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 의 정사각형을 만들어 센서의 신호를 측정할 수 있는 탐침을 연결할 수 있도록 제작하였다.

#### 다. 임피던스 전극센서의 전기적 특성 분석

##### 1) 임피던스 측정장비

임피던스 바이오센서를 제작하여 실제 살모넬라균의 검출 연구를 수행하기 전에 임피던스 전극 센서의 전기적 특성을 분석하였다. 개발된 임피던스 전극센서의 임피던스 값은 그림 3.1-17의 네트워크 분석기(4294A, Agilent, USA)를 이용하여 수행하였다. Agilent사의 4294A는 측정 가능 주파수가  $40\text{Hz} \sim 110\text{MHz}$  범위로서  $3\text{m}\Omega \sim 500\text{M}\Omega$ 까지 임피던스를 측정할 수 있다.



그림 3.1-17 Photograph of Agilent 4294A precision impedance analyzer

2) 임피던스 전극센서의 전기적 특성

가) PBS용액의 pH 농도에 따른 전극 센서의 임피던스 반응

일반적으로 세균 검사시 세포가 자라는 조건과 유사한 인산완충용액(Phosphate Buffered Saline : PBS)에 세균을 희석하여 검사를 하게 되므로 정확한 임피던스 측정을 위하여 인산완충용액의 전기적인 특성을 분석하였다 (그림 3.1-18).



그림 3.1-18. Measuring impedance of the sensor in PBS buffer.

전극 센서에 물과 PBS용액을 각각 가했을 때의 시간에 따른 임피던스 값의 변화를 그림 3.1-19에 나타내었다. 센서에 물을 가했을 때는 경과 시간에 따라 센서의 임피던스 값이 크게 감소하였으나, 센서에 PBS용액을 가했을 때는 시간에 따른 센서의 임피던스 값의 변화가 거의 없었다.

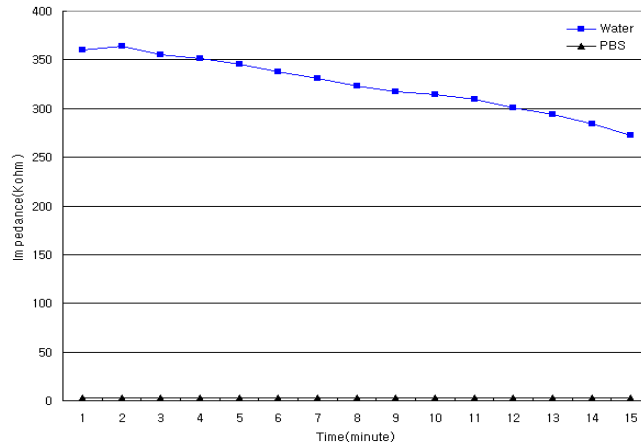


그림 3.1-19. Impedance response of a sensor in water or PBS

PBS용액의 pH 농도에 따른 전극 센서의 임피던스 반응은 그림 3.1-20과 같다. PBS용액의 pH를 6.6~7.6으로 변화 시키면서 전극 센서의 임피던스 값을 측정했을 때 pH 7.4 일때 시간에 따른 변화가 가장 적게 나타났다. pH 7.4의 인산완충용액은 측정을 시작한지 5분 만에 안정적인 임피던스를 보여주었으며, 5분 후 임피던스 평균은 7.9 kΩ, 평균에 대한 표준오차는 0.67%로 가장 작은 오차를 보여주었다.

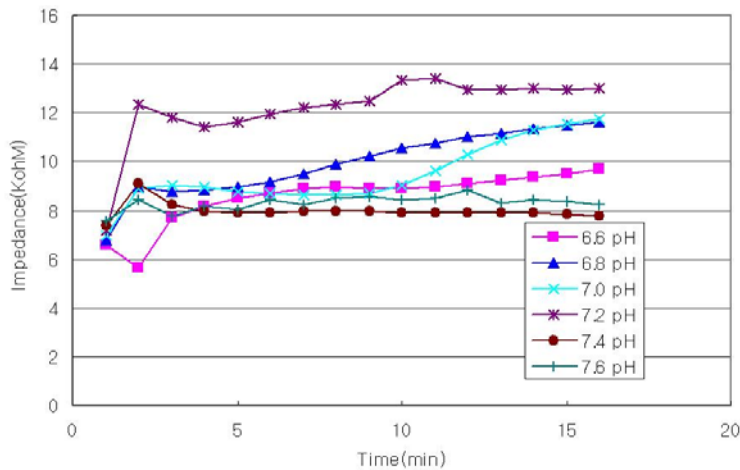


그림 3.1-20. Stability of a semiconductor sensor in various pH concentrations

나) PBS용액의 전기전도도 변화에 따른 임피던스 반응

PBS용액의 전기전도도에 따른 임피던스 변화를 알아보기 위하여 NaCl 용액의 농도 변화를 이용하여 전기전도도가 다른 3가지 시료를 준비하여 전기전도도에 따른 전극 센서의 반응을 조사하였다. PBS용액의 pH는 7.4로 고정하였으며, 용액의 전기전도도는 각각 6.71mS/m, 7.81mS/m, 20.7mS/m 이었다. 그림 3.1-21은 센서에 PBS용액을 가한 후 시간 경과에 따른 센서의 임피던스

변화를 측정 한 그래프이다.

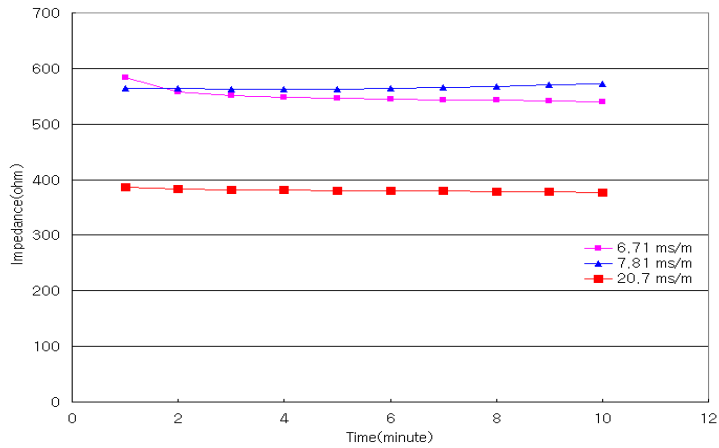


그림 3.1-21. Stability of a semiconductor sensor in various electrical conductivity

위 그래프에서 센서의 임피던스는 인산완충용액의 전기전도도가 증가할수록 센서의 임피던스는 작은 값을 보여주었다. 측정을 시작한지 5분 후의 임피던스 값의 평균에 대한 표준오차는 전기전도도가 6.71mS/m인 인산완충용액에 대한 0.62%, 7.81mS/m인 인산완충용액에 대하여 0.36%, 20.7mS/m인 인산완충용액에 대하여 0.33%의 오차를 각각 나타냈다. 즉, 전기전도도가 20.7mS/m인 인산완충용액이 가장 작은 오차를 보여 주었으며 전기전도도가 높을수록 임피던스 측정값은 안정된 결과를 보여주었다. 실험 결과 전극 센서는 전기전도도의 변화에 따라 빠른 응답을 나타내어 살모넬라균의 검출에 사용할 수 있음을 확인할 수 있었고, 시료 용액의 pH는 7.4 근처로 유지하는 것이 임피던스 측정에 가장 적합한 것으로 나타났다.

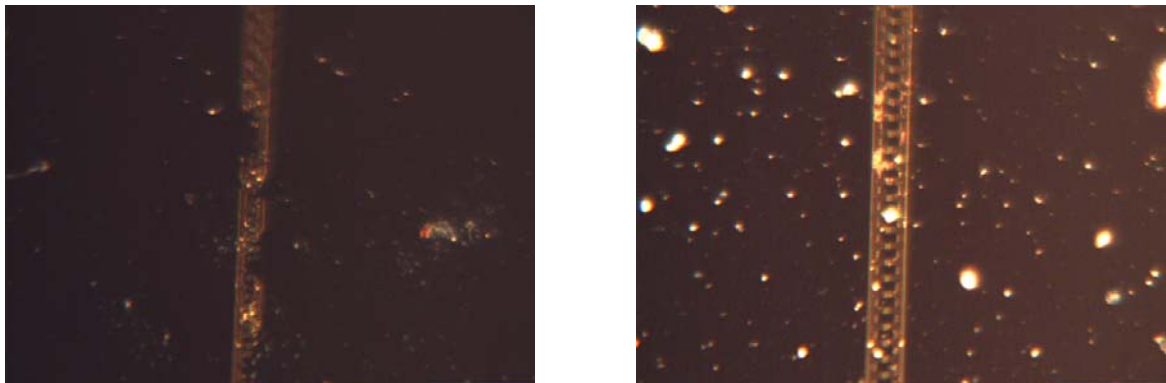
## 2. 반도체 MEMS 기술을 이용한 살모넬라 검출용 임피던스 바이오센서 개발

### 가. 전극 센서 제작을 위한 반도체 제작공정 설계 및 센서제작

#### 1) 1차 개발 전극 센서 어레이의 문제점 및 설계 보완

1차로 개발된 임피던스 전극 센서 어레이는 임피던스 바이오센서의 전기적 모델에 의한 시뮬레이션을 통하여 설계인자를 결정하고, 그 설계인자에 맞추어 제작되었다. 하지만 제작된 많은 센서들이 100KHz에서 100MHz 대역의 입력주파수에서 임피던스 값의 변화가 없이 저항과 같은 임피던스 특성을 나타내어 임피던스 센서로서 부적합한 것으로 조사되었다.

이러한 원인을 알아보기 위하여 현미경을 통하여 센서의 표면을 검사한 결과 그림 3.1-22와 같이 전극이 단락되었기 때문인 것으로 조사되었다. 이러한 원인은 전극 사이의 간격이 너무 좁게 설계되어 실제 제작 공정에서 기술적인 한계로 인하여 금속 입자 등과 같은 불순물이 전극 사이 간극을 채워 센서의 단락이 발생한 것으로 나타났다.



(a) defected sensor

(b) shorted sensor

그림 3.1-22. Impedance sensor image

그림 3.1-22는 제작된 전극 센서의 표면을 현미경으로 500배 확대한 사진으로서 그림 (a)는 전극이 끊어진 센서, 그림 (b)는 전극이 붙어 단락된 센서의 모습을 보여주고 있다. 이러한 문제점을 보완하기위해서 본 연구에서는 시뮬레이션을 통해 결정된 설계 조건과 MEMS 공정상 현실적으로 제작 가능한 전극규격을 고려하여 두 전극 사이의 거리  $5\mu\text{m}$ , 전극의 폭을  $10\mu\text{m}$ 로 결정하였다. 센서는  $7\text{mm}\times 10\text{mm}$  크기로 설계되었으며, 항원-항체 반응이 일어나는 전극의 길이는  $3\text{mm}$ 로 하였다. 미세 전극의 끝부분은  $1\text{mm}$  폭의 직사각형을 만들어 센서의 신호를 측정할 수 있는 탐침을 연결할 수 있도록 하였다 (그림 3.1-23).

#### 2) MEMS 기술을 이용한 반도체 제작 공정 설계 및 전극 센서 제작

임피던스 변화형 항원-항체 센서의 재질은 실리콘 웨이퍼 또는 유리 웨이퍼를 사용할 수 있는데, 본 연구에서는 유리 웨이퍼를 사용하였다. 전극의 재질은 생물체와 접촉하였을 경우 영향이 적고, 화학적으로 항체를 결합시키기 좋은 전극인 금(Au)을 선택하였다. 금은 실리콘웨이퍼와 유리에 모두 접착성이 좋지 않기 때문에 접착층(adhesion layer)으로 크롬(Cr)이나 티타늄(Ti)을 사용하였고, 본 연구에서는 센서의 제작을 위하여 티타늄을 접착 층으로 사용하여 금 전극을 제작하였다. 전극의 증착방법으로는 thermal evaporator를 사용하였다.

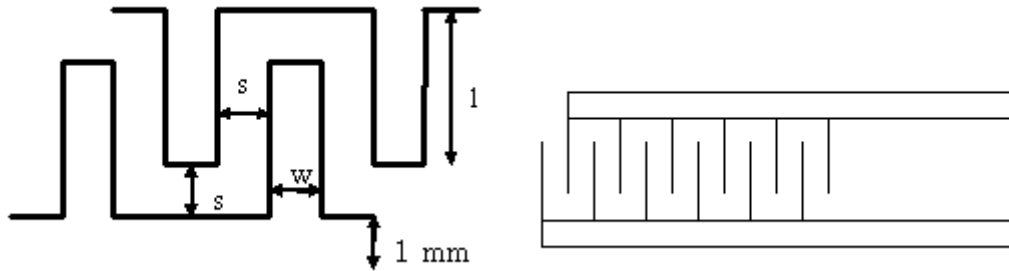


그림 3.1-23 Simplified schematic representation of the impedance biosensor

그림 3.1-23과 같이 센서의 패턴을 만들기 위하여 감광제(photo resist)를 이용하여 패턴이 없는 부분에 감광제가 남도록 한 후 그림 3.1-24(2)와 같이 티타늄(Ti)을 접착 층으로 증착한 후 금(Au)을 증착하였다. 이렇게 전극을 형성한 센서는 그림 3.1-24(3)과 같이 아세톤을 이용하여 실리콘 웨이퍼에 고정되지 않은 금과 티타늄을 제거하여 센서를 제작하였다. 본 연구에서 개발된 센서의 구체적인 제작 공정은 아래와 같다.

1. 실리콘 웨이퍼 위에 절연을 위해 2  $\mu\text{m}$ 의  $\text{SiO}_2$  층 형성
2. 금의 접착을 위해 5 nm의 Ti 또는 50 nm의 Cr 층을 evaporation deposit을 통해 형성
3. 50~150 nm의 Au 층을 형성 (deposit 또는 sputtering)
4. lift-off 공정을 통해 패턴 형성
1. Dicing - 폭 7 mm, 길이 10 mm로 절단
2. Die bonding - 제작된 센서 chip을 Lead Frame에 epoxy bonding을 통해 접착
3. Wire bonding- Chip의 접점과 Lead frame의 inner lead tip을 금(Au)세선으로 연결.

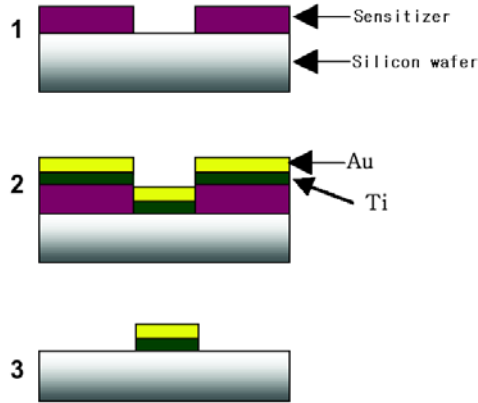


그림 3.1-24 Process of semiconductor sensor, (1) Photolithography, (2) Metal Evaporation, (3) Lift-off

나. 임피던스 바이오센서 검출부 제작을 위한 최적의 항체 고정화 방법

1) 항원·항체 면역반응 메카니즘

임피던스 바이오센서는 위에서 개발된 전극 센서의 전극 표면에 살모넬라균을 검출할 수 있는 분자식별부를 형성시킴으로써 제작된다. 분자식별부로는 살모넬라에 특이하게 반응하는 살모넬라 항체(antibody)를 사용하였다. 항체는 면역글로불린(immunoglobulin)이라고도 하며 생체의 면역계에서 혈액이나 림프 안에서 순환하면서 항원 침입에 반응하는 생체를 방어하는 물질이다. 항체에 의한 면역반응은 척추동물 이상의 고등동물에서만 발견되는데, 이는 외부 물질의 침입으로부터 스스로를 지키기 위해 개발한 방어 시스템 중 가장 정교한 기작 중 하나이다. 이때 외부의 침입 물질을 항원이라 하는데, 단백질이나 탄수화물 등의 생체 물질 외에 어떤 물질이라도 항원으로 작용할 수 있기에 항원의 종류는 매우 다양하다.

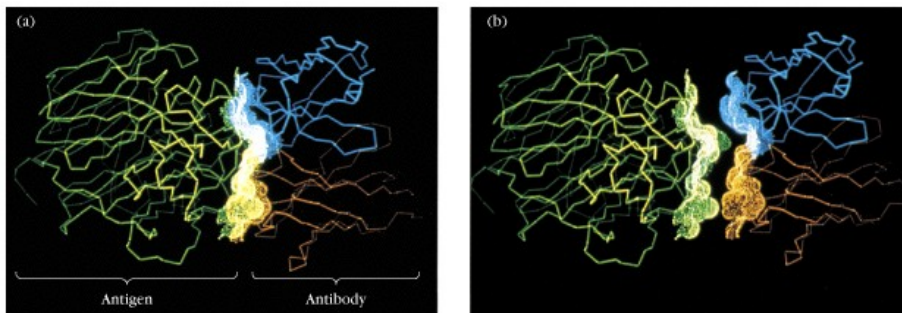


그림 3.1-25 Antigen and antibody

항원과 항체의 결합을 살펴보면, 항체는 항원과 상보적으로 결합하며, 또한 그 결합하는 부위의 크기는 항원 전체가 아니고 항원의 부위이다(그림 3.1-25). 이와 같이 항체가 결합하는 항원의 일부지역을 항원결합부위 (antigenic determinant) 또는 에피통(epitope)라고 부른다. 항체는 항원과 직접 결합하며, 항원의 입체구조를 있는 모양 그대로 인식한다.

그러므로, 항체의 경우 상보적 결합이라는 말은 항원과 항체의 결합부위의 입체구조가 서로 상보적이라는 것을 의미하며, 크기가 큰 항원들은 항체가 결합할 수 있는 지역이 여러 군데 있기 때문에, 한꺼번에 여러 가지의 항체와 결합할 수 있다. 또한 항체의 경우 이들 에피통의 구조는 항원 내에서 어떤 것은 연속적일 수도 있고 어떤 것은 서로 떨어진 부분이 입체적으로 모여서 이루어진 부분일 수도 있다. 그러나 분자의 크기가 작은 항원의 경우는 항원결정부위가 적기 때문에 하나 또는 소수의 항체와 결합할 수도 있다.

항체의 수용체 분자는 2쌍의 폴리펩티드 사슬로 이루어져 있는데, 사슬들은 아미노산들이 펩티드 결합으로 연결되어 있고 변하기 쉬운 Y자 모양을 하고 있다. 그림 3.1-26에서 항원이 결합하는 부위는 Y자의 가지에 위치하며, 이 부위의 원자구조는 대응하는 항원 결정소의 구조와 꼭 맞게 되어 있다.

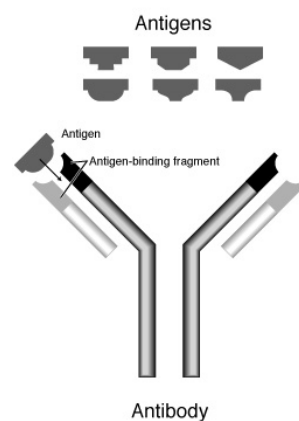


그림 3.1-26 Structure of antibody

각 수용체의 항원 결합부위는 단 1개의 항원 결정소와 결합할 수 있으므로 수많은 항체들은 각자가 특정 결정소를 가진 항원에 대한 특유의 면역성을 제공할 수 있는 모양을 갖추고 있다. 항체가 항원을 인식하고 상보적으로 결합하는 것은 반데르발스(Van der Waals)힘이 넓게 작용하기 때문이다. 이 반데르발스 힘은 단백질 대 단백질 결합에 있어서 상보적인 형태를 인식하는데 있어서 중요한 역할을 하는 힘이다. 항체의 에피통이 항원을 끄는 힘을 친화도(affinity)라 하며, 항원·항체 반응에 의한 친화도는  $10^6$  이상으로 매우 큰 결합력을 가지고 있다. 이와 같은 높은 친화도로 인하여 항원·항체 반응은 바이오센서의 수용체(receptor)로 사용하기에 매우 적합하다.



## 2) 항체 고정화

항체를 바이오센서의 검출부로 사용하기 위해서는 항체를 센서에 고정하여야 하는데 항체를 고정하는 방법은 항체의 결합 방법에 따라 다음과 같이 크게 다섯 가지로 나눌 수 있다.

Adsorption : 가장 간단하고 별다른 준비가 필요 없는 방법이다. 결합력이 약하고 결합이 오래 지속 되지 않으므로 실험실에서 사용할 수 있는 방법이고 센서의 수명은 하루 정도이다.

Micro-Encapsulation : 초기의 바이오센서 개발에 많이 사용되었던 방법으로 생체물질을 박막 속에 가두어 두는 방법이다. 이 방법은 효소에 의존하지 않고 오염을 차단하며, 온도, pH, 이온농도의 변화에 강한 특징이 있으나 가스 또는 전자 등과 같이 박막 투과가 가능한 물질만이 측정 가능하다. 센서의 수명은 1 주일 정도이다.

Entrapment : 생체물질을 monomer solution과 섞어 젤에 집착하는 방법으로, 물질이 확산되므로 반응이 느리고, 젤 속의 공극으로 인하여 생물반응 활성도가 떨어지게 된다. 센서의 수명은 3~4주 정도이다.

Cross-Linking : 젤 또는 고체에 화학적으로 고정시키는 방법이다. 이 방법은 확산에 한계가 있고 생체물질에 영향을 미칠 수 있다. 또한, 결합자체가 강하지 못하기 때문에 absorbed 생체물질의 안정화에 사용되는 유용한 방법이다.

Covalent bonding : 이 결합은 지지체(supporter)와 생체물질의 기능성 물질 사이의 공유결합을 위한 화학적인 설계가 필요하다. 예를 들면 생체물질 중 amino acids 안의 nucleophilic group은 효소 촉매작용에 사용되지 않으므로 결합에 사용하기에 적합하다. 즉, 생체물질의 amine group이 지지체의 carbodiimide와 결합하여 지지체와 효소 간에 amid 결합을 형성하는 것으로 센서의 수명은 4~14 개월 정도이다.

최근 발표되는 병원균 검출에 대한 바이오센서 관련 문헌(Lazcka 등, 2006)에 의하면 선택적이고 효율적인 항체 고정화 방법으로서 흡착법(Adsorption)과 더불어 위의 이론적인 방법들을 혼합한 biotin-avidin 방법, Self Assembled Monolayer (SAM) 방법 등의 세 가지 항체 고정화방법을 가장 많이 사용하고 있는 것으로 조사되었다.

본 연구에서는 흡착(Adsorption)법과 같이 사용이 간단하면서 공유결합(Covalent bonding)과 같이 높은 결합력을 지녀 현재 바이오센서 연구에 많이 사용되고 있는 avidin-biotin 결합 방법과 보다 비용이 많이 소요되지만 공유결합을 사용하여 결합력이 매우 강한 SAM 방법을 항체 고정화 방법으로 사용하고 그 결과를 흡착법과 비교하였다.

### 가) Avidin-biotin 결합을 이용한 항체 고정화

Avidin-biotin 결합을 이용한 분자식별부 제작은 EtOH과 멸균된 증류수로 세척한 센서 표면에 BSA를 50  $\mu$ l (1.0 mg/ml) 가하여 1시간 이상 반응시킨 후 다시 Streptavidin 50  $\mu$ l (1.0 mg/ml)를 가하여 반응시켰다. 여기에 biotinylated anti-Salmonella 항체를 50  $\mu$ l (100  $\mu$ g/ml) 가하여 20분간

반응시켜 Biotin-avidin 결합을 반응시켰다. 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. 그림 3.1-27은 항체 고정화 방법, 그림 3.1-28은 최종적으로 완성된 바이오센서를 보여주고 있다.

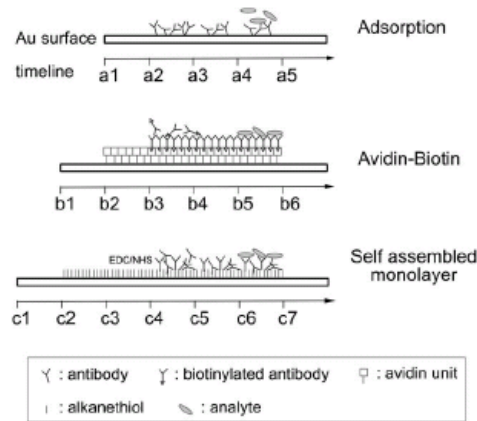


그림 3.1-27. Immobilization process of the biosensor



그림 3.1-28. Developed impedance biosensor

나) Self Assembled Monolayer (SAM) 방법을 이용한 항체 고정화

SAM 방법을 이용한 항체 고정화는 센서 표면에 고순도 용매를 사용하여 disulfide 또는 thiol group을 포함한 용매가 표면위에 자동적으로 균일하게 분포하도록 한다. 구체적인 고정화 방법은 NaOH와 멸균된 증류수로 세척한 센서 표면에 DSP/DMSO 50  $\mu\text{l}$  (4.0 mg/ml)를 가하여 1시간 반응시켜 표면을 Thiolation 하였다. Thiol group에 anti-Salmonella 항체를 50  $\mu\text{l}$  (1.0 mg/ml) 가하여 30분간 반응시켜 공유결합을 생성하였다.

3) 항체 고정화 방법 비교

그림 3.1-29, 30에 고정화 방법에 따른 임피던스 바이오센서의 *Salmonella enteritidis*와 *Salmonella typhimurium* 검출 성능을 나타내었다. 측정 결과 흡착 방법의 경우 *S. typhimurium*에 대한 농도별 신호 차이가 가장 적게 나타나 그 효율성이 가장 떨어지는 것으로 판단되었다.

biotin-avidin 방법과 SAM을 이용한 항체 고정화 방법은 살모넬라 항체를 센서의 표면에 효과적으로 고정화 시키는 것으로 나타났다. 두 방법 중 biotin-avidin 방법의 경우 저농도에서는 신호 변화 폭이 적은 편이지만, 고농도인  $10^9$  CFU/mL에서 신호가 급격하게 증가하는 경향을 나타내었다. Thiol group을 이용한 SAM 방법의 경우 저농도에서 신호가 지속적으로 증가하는 경향이 있는 반면에, 고농도에서 biotin-avidin 방법과 같은 급격한 신호차이는 발견되지 않았다. 이는 결합력의 세기가 biotin-avidin 방법에 비하여 공유결합을 이용하는 SAM 방법이 강하기 때문인 것으로 고려되며, 이는 바이오센서를 사용하여 *Salmonella typhimurium* 검출시 thiolation 방법이 보다 효과적이었다고 발표한 바 있는 박 등(1998)의 연구 결과와도 동일한 경향을 나타내었다.

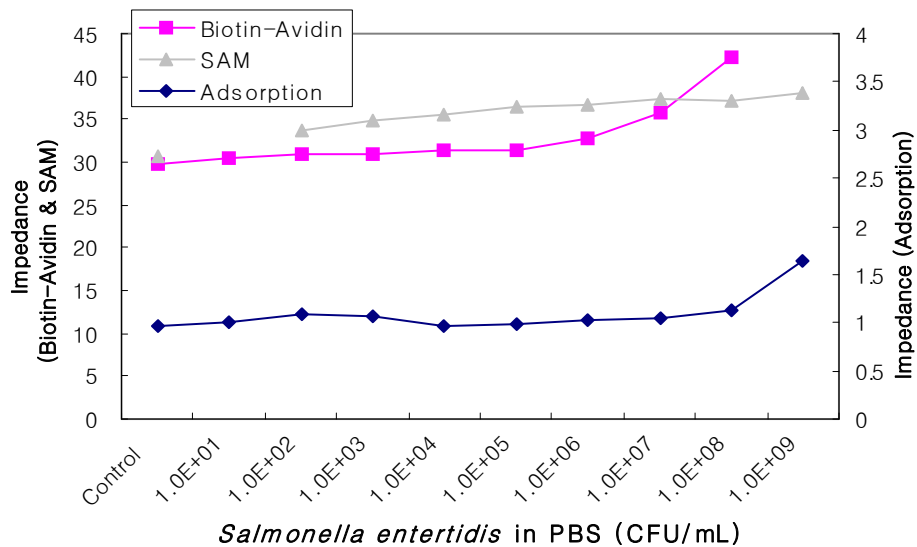


그림 3.1-29. Detection of *Salmonella enteritidis* in PBS with antibody immobilization by Biotin-Avidin method & Self Assembly Monolayer (kΩ, at 100Hz)

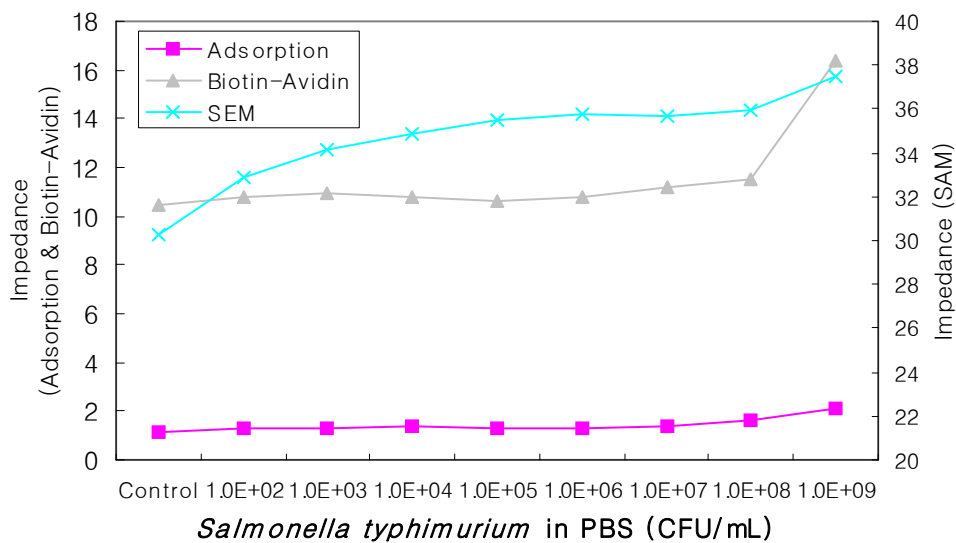


그림 3.1-30. Detection of *Salmonella typhimurium* in PBS with antibody immobilization by Biotin-Avidin method & Self Assembly Monolayer (kΩ, at 100Hz)

### 3. MEMS 기술 바탕의 임피던스 바이오센서를 이용한 병원성 미생물 신속 검출 시스템 개발

#### 가. 임피던스 신호 증폭 및 계측 시스템 개발

##### 1) 임피던스 신호 측정시스템

항원-항체 반응에 의해 임피던스 센서에서 발생하는 신호는 매우 미약하기 때문에, 이러한 미세 신호를 증폭하여 계측할 수 있는 특별한 측정시스템이 필요하다. 기존 바이오센서 연구에 사용되는 임피던스 측정시스템은 전자부품이나 전자회로의 분석을 위해 개발된 장비로서 고가이며 큰 부피를 지니고 있다. 회로 또는 소자의 임피던스 측정에 많이 사용되는 임피던스 측정법은 여러 가지가 있지만 미세 신호 측정을 위해서는 오토밸런싱 브릿지방식 (auto balancing bridge method)이 많이 사용되고 있다.

오토밸런싱 브릿지방식은 그림 3.1-31과 같이  $Z_x$ 를 통해서 흐르는 전류가 저항기  $R$ 을 통해서 흐른다. 전류-전압 변환 증폭기 작동에 의해  $R$ 을 통해 흐르는 전류는  $Z_x$  전류와 평형을 이루므로  $L$ 점에서 전압은 0(가상 그라운드)으로 유지된다.  $Z_x$ 의 높은 쪽 전압을 측정하고  $R$  양단의 전압을 측정하여  $Z_x$ 의 임피던스를 계산한다. 본 연구에서는 임피던스 측정을 위하여 오토밸런싱 브릿지방식을 채택한 임피던스 미세신호 증폭모듈을 이용하여 임피던스 바이오센서의 측정시스템을 개발하였다.

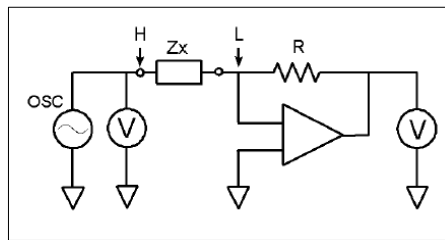


그림 3.1-31 Auto balancing bridge method

임피던스 측정시스템은 그림 3.1-32의 구성도와 같이 미세 임피던스 신호를 받아들여 증폭하는 입력부와 이를 디지털화 시키는 A/D 변환부, 그리고 변환된 신호를 USB통신 프로토콜을 이용하여 컴퓨터로 전송하는 신호 전송부로 이루어져 있다. 그림 3.1-33에 임피던스 미세신호 증폭모듈을 나타내었다.

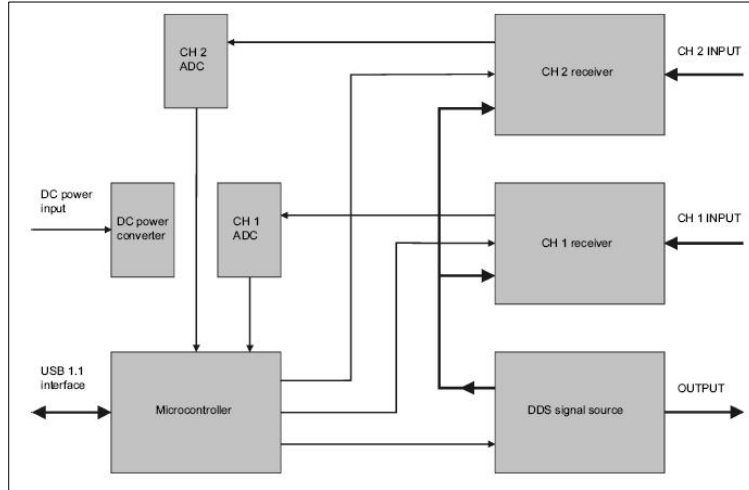


그림 3.1-32 Block diagram of impedance signal amplification module

임피던스 측정 방법은 측정하고자 하는 대상의 주파수대역과 임피던스 값의 범위에 따라 그 측정방법이 달라진다. 특히 바이오센서의 개발에서 사용되는 항원과 항체의 종류는 매우 많고 다양하기 때문에 측정해야할 임피던스의 범위도 매우 넓고 다양하다. 또한, 생체물질들의 반응 주파수는 수백 MHz의 고주파대역 보다는 100kHz이하의 저주파수 대역이기 때문에 본 연구에서 개발한 임피던스 측정시스템은 바이오센서의 신호를 정확히 측정할 수 있도록 저주파 대역의 임피던스 신호를 분석할 수 있도록 하였다.



그림 3.1-33. Impedance signal amplification module

나. 살모넬라 항원·항체 반응의 임피던스 특성 분석

살모넬라 항원과 반응하기 전의 바이오센서의 임피던스는 무한대에 가깝다. 하지만, 임피던스 바이오센서의 전극에 부착되는 살모넬라의 농도가 증가하면, 세포가 가지는 전하로 인하여 전기전도도가 증가하고 센서의 유전손실이 발생한다. 유전손실은 유전체에 외부로부터 교류전기장을 가해주었을 때 전기장에 의해 공급되는 전기에너지의 일부가 유전체 속에서 열에너지로 소비되는 것을 말하며, 이 유전손실은 가해주는 교류의 주파수에 따라 변화한다.

항원의 농도 증가에 의한 전기전도도의 증가로 유전체내부의 유전 손실이 증가하여 센서의 임피던스가 감소되는 현상을 설명하기 위하여 전향에서 개발된 정전용량 계산식(식 (2))에 유전 손실 항을 추가하여 모델을 수정한 다음 시뮬레이션을 수행한 결과를 그림 3.1-34, 35, 36에 나타내었다.

그림에서 살모넬라의 농도가 증가 할수록 센서의 두 전극 사이의 누설전류가 증가하여 손실각이 커지는 것을 알 수 있다. 그림 3.1-34는 1KHz, 그림 3.1-35는 10KHz, 그림 3.1-36은 100Hz에서의 센서의 손실각을 나타내고 있다. 1KHz와 10KHz에서 측정된 센서의 손실각은 살모넬라 항원의 농도에 따른 경향을 찾아보기 어려웠으나, 100Hz에서 측정된 센서의 손실각은 살모넬라 항원의 농도에 따른 경향을 나타내었다. 시뮬레이션 결과 살모넬라 농도에 따른 임피던스 변화 측정주파수는 100Hz 근방에서 측정하는 것이 효과적인 것으로 나타나 이 주파수 대역으로 측정시스템의 구동 주파수를 설정하였다.

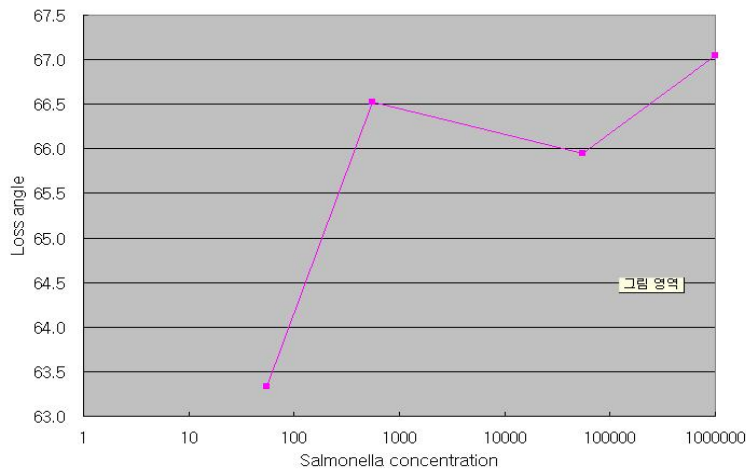


그림 3.1-34. Loss angle vs salmonella concentration in 1KHz

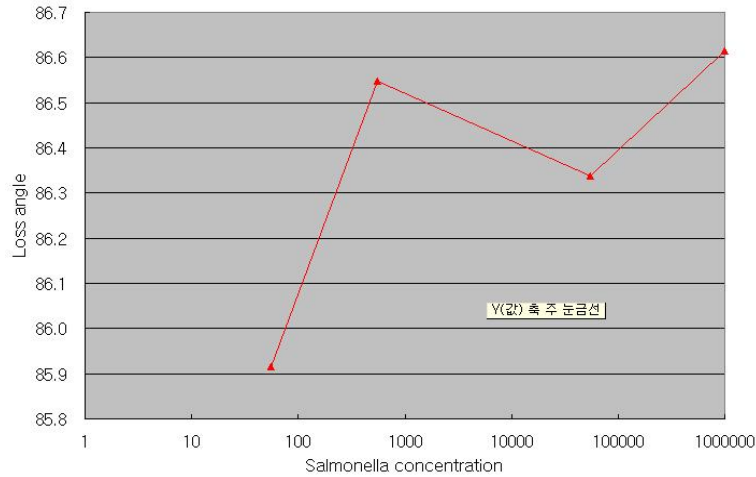


그림 3.1-35. Loss angle vs salmonella concentration in 10KHz

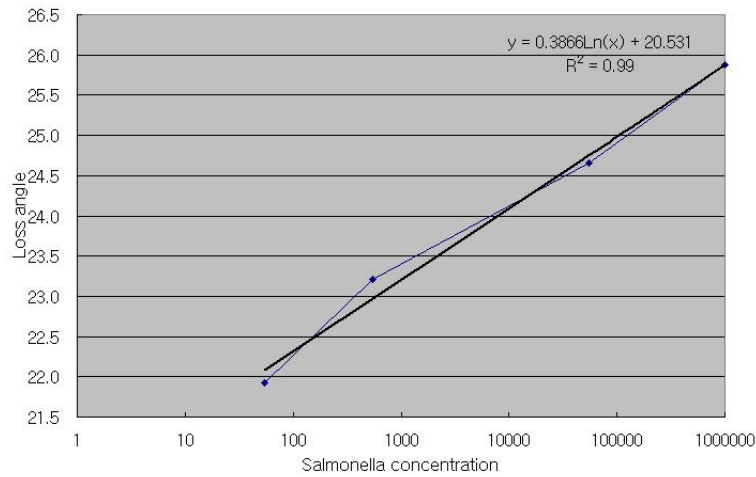


그림 3.1-36. Loss angle vs salmonella concentration in 100Hz

시뮬레이션에 의하여 결정된 임피던스형 바이오센서의 유효 측정주파수 대역을 확인하기 위하여 개발된 측정시스템과 임피던스 바이오센서를 이용하여 PBS 버퍼에 든 살모넬라균 검출 실험을 수행하였다. 실험은 PBS 버퍼에 든  $10^1 \sim 10^7$  cfu/ml 농도의 살모넬라 시료를 이용하여, 측정시스템의 주파수를 시뮬레이션에서 구명된 100Hz 근방의 10 Hz, 50 Hz, 100 Hz, 200 Hz, 300 Hz, 400 Hz로 가해주면서 측정되는 임피던스 반응을 분석하는 방법으로 수행하였다. 그림 3.1-37에 주파수별 세균수의 변화에 따른 임피던스 바이오센서의 반응을 나타내었다. 그림 3.1-37에서 수직축은 기준신호를 보상한 측정 임피던스 값과 그 값을 기준신호로 나눠 정규화한 값을 의미한다.

그림 3.1-37에서 보듯이 주파수가 10 Hz 일 때  $10^7$  cfu/ml의 세균수에서 가장 큰 신호를 얻을 수 있었으나, 그 이외의 농도에서는 세균수 증가에 따라 신호가 감소하는 등 불안정한 반응을 나타내었다. 그 이외의 주파수 대역에서는 세균수가 일정한 값 이상일 때 세균수 증가에 따라 임피던스가 증가하는 안정적인 반응을 나타내었으며, 주파수 50 Hz와 100 Hz에서 측정신호의 감도가 높게 나타났다.

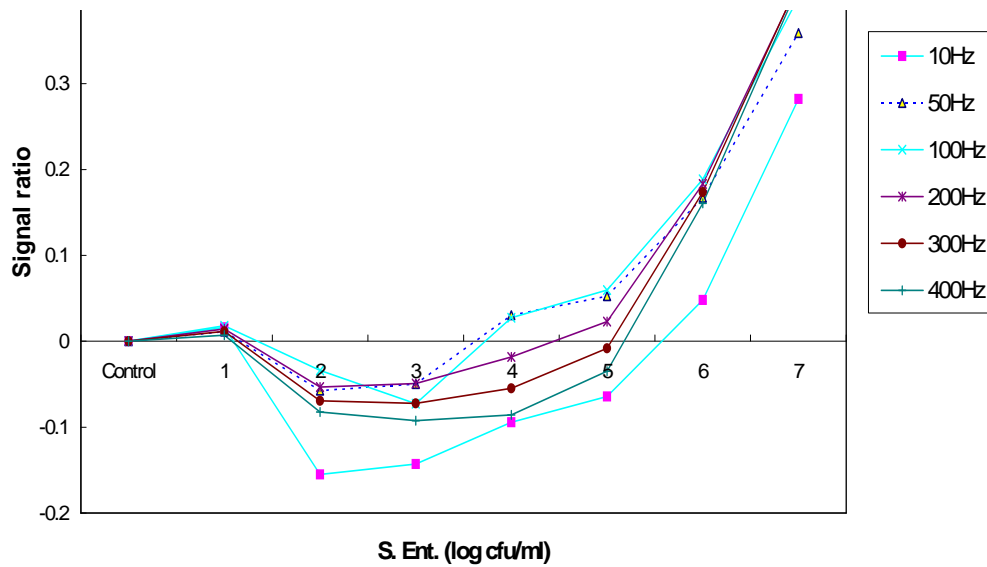


그림 3.1-37. Frequency characteristics of an impedance sensor (represented as signal ratio)

센서 신호를 초기 기준값의 크기로 정규화 했을 때, 주파수에 따라 임피던스 반응 특성은 모두 비슷한 유형으로 나타났으나, 그 중 50 Hz와 100 Hz의 두 주파수에서 센서의 감도가 가장 좋게 나타났다.

#### 다. 임피던스 바이오센서 성능 평가

##### 1) 임피던스 바이오센서 검출 감도 - 표준버퍼 내에 존재하는 단일 살모넬라 종 검출

개발된 임피던스 바이오센서의 살모넬라균 검출 성능을 조사하기 위하여 PBS 버퍼에 살모넬라 세균을 서로 다른 농도로 희석한 시료를 준비하고 이 시료를 이용하여 각각 다른 농도의 살모넬라균에 대한 임피던스 바이오센서의 신호를 분석하였다. 살모넬라균에 의한 임피던스 신호변화를 측정하기 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.

임피던스를 이용한 바이오센서의 신호 계측시 항체 고정화 방법을 서로 달리하여 PBS buffer 상에서의 Salmonella를 농도별로 검출하였다.

##### 가) Biotin-Avidin 고정화 방법

Biotin-avidin 고정화 방법을 이용하여 제작한 바이오센서를 이용하여 PBS 버퍼에 희석된 서로 다른 농도의 *S.entertifdis*와 *S.typhimurium*에 대한 임피던스 반응을 그림 3.1-38과 39에 나타



내었다. 두 균의 경우 모두 시료내의 세균 농도가 높아짐에 따라 임피던스의 값이 증가하여 임피던스 바이오센서 검출부의 항체가 살모넬라 균을 잘 포획함을 확인할 수 있었다. 임피던스 신호는 세균 농도 증가에 따라 선형적으로 증가하였으며  $10^9$  CFU/ml의 농도에서 그 크기가 급격하게 증가하였다. Biotin-avidin 고정화 방법을 사용하였을 때 임피던스 바이오센서를 이용하여 PBS 버퍼에 존재하는 세균 검출 성능은 *S.entertifdis*의 경우  $10^6$  CFU/ml, *S.typhimurium*의 경우  $10^7$  CFU/ml 이었다. S. Babacan 등(2002)의 연구에 의하면 Piezoelectric biosensor를 이용하여 PBS buffer 상에서 *S.typhimurium*을 검출한 결과 검출 한계가  $10^7$  CFU/ml 이었다고 발표한 바 있어 본 연구에서 개발한 임피던스 바이오센서를 이용한 PBS 버퍼에서의 *Salmonella* 검출 결과는 기존의 연구 결과와 유사하다고 볼 수 있다.

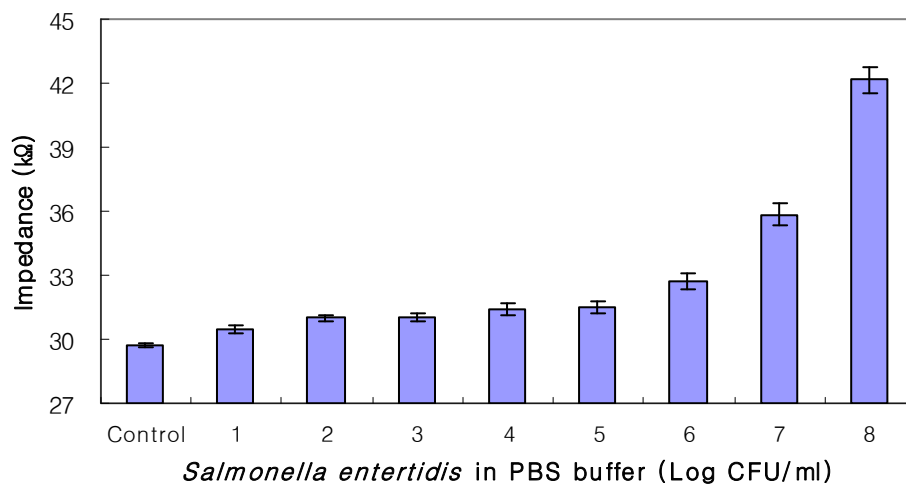


그림 3.1-38. Detection of *Salmonella enteritidis* in PBS with Antibody immobilization by biotin-avidin method. Error bars represent standard deviations.

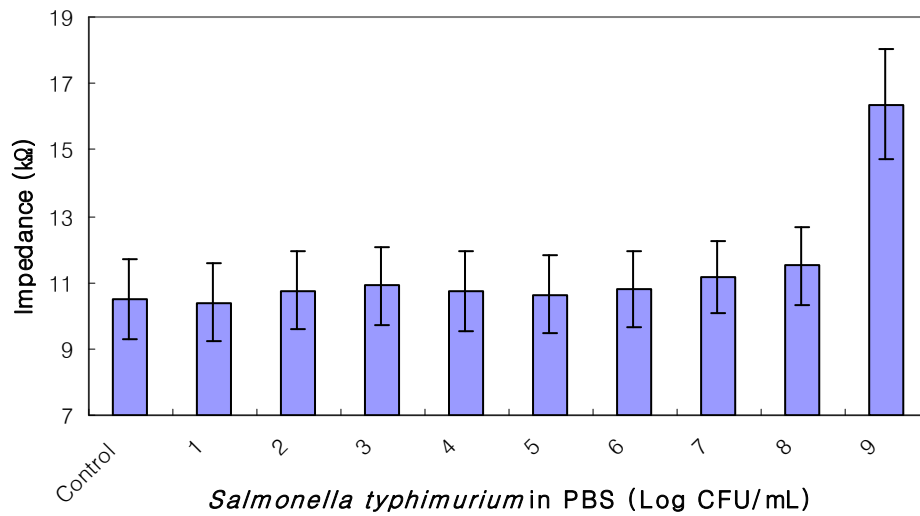


그림 3.1-39. Detection of *Salmonella typhimurium* in PBS with Antibody immobilization by biotin-avidin method. Error bars represent standard deviations.

따라서 biotin-avidin method를 이용한 임피던스 바이오센서의 경우 기존 바이오센서를 이용한 검출결과와 비슷한 효율성을 가지고 있었으므로, 센서의 검출성을 좀더 강화하기 위하여 Self Assembly Monolayer(SAM)를 이용한 Thiolation cross-linker method를 이용하여 센서 표면에 항체를 고정화 시킨 새로운 방법으로 *Salmonella*의 검출 한계를 측정하였다.

#### 나) SAM (Thiolation) 고정화 방법

그림 3.1-40과 41에 센서의 검출 성능을 향상시키기 위하여 SAM 고정화 방법으로 제작한 바이오센서를 이용하여 PBS 버퍼에 희석된 *S.entertidis*와 *S.typhimurium*에 대한 임피던스 반응을 측정된 결과를 나타내었다. Biotin-avidin 고정화 방법과 마찬가지로 세균의 농도가 증가함에 따라 임피던스의 값이 증가하여, 임피던스 바이오센서에 의한 살모넬라균의 검출이 가능함을 알 수 있었다. SAM 고정화 방법의 경우 biotin-avidin 고정화 방법에 비하여 낮은 농도( $10^2$  CFU/ml)의 세균이 존재하는 시료에서도 높은 임피던스 변화를 나타내었다.

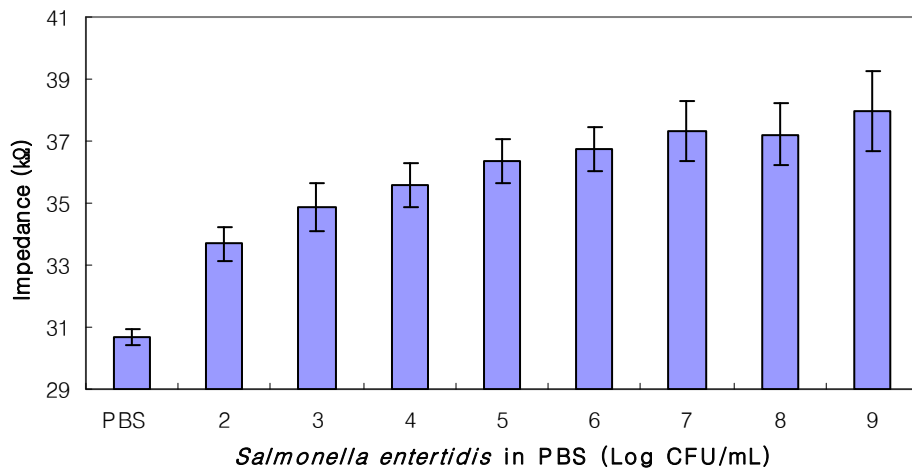


그림 3.1-40. Detection of *Salmonella enteritidis* in PBS with Antibody immobilization by thiol method. Error bars represent standard deviations.

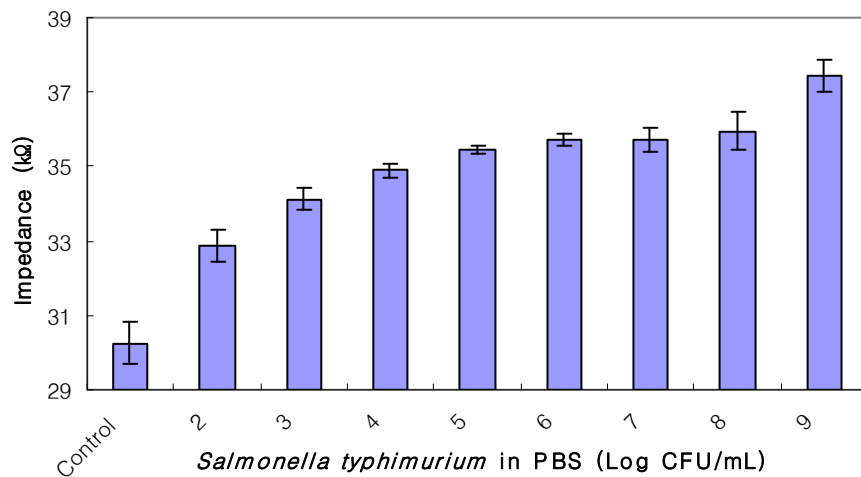


그림 3.1-41. Detection of *Salmonella typhimurium* in PBS with Antibody immobilization by thiol method (antibody 1.0 mg/ml). Error bars represent standard deviations.

SAM 고정화 방법은 PBS 버퍼에서 biotin-avidin 방법에 비하여 결합력이 강해 보다 우수한 검출 성능을 나타냈지만, 축산물 식품 시료에 들어있는 식품찌꺼기나 다른 세균에 의한 간섭 때문에 검출 성능이 달라질 수 있으므로 식품 시료에 대한 살모넬라 검출 성능 평가는 두 가지 고정화 방법 모두에 대하여 조사하였다.

## 2) 임피던스 바이오센서 선택성

살모넬라 검출용 임피던스 바이오센서가 살모넬라균에 대해서 특이적으로 검출성을 가지고 있는가를 검증하기 위하여 식중독 균 중에서 가장 발병율이 높은 *Escherichia coli*와 대표적인 저온성 식중독균인 *Listeria monocytogenes*를 선정하여 *Salmonella*균에 대한 임피던스 바이오센서의 선택성을 측정하였다.

### 가) Biotin-avidin 고정화 방법

*E. coli*가 일정한 농도( $10^8$  CFU/mL)로 들어 있는 PBS 버퍼에 서로 다른 농도( $10^8$ ,  $10^9$  CFU/mL)의 *Salmonella*균을 접종한 다음, 바이오센서를 이용하여 임피던스 변화를 측정하였다.

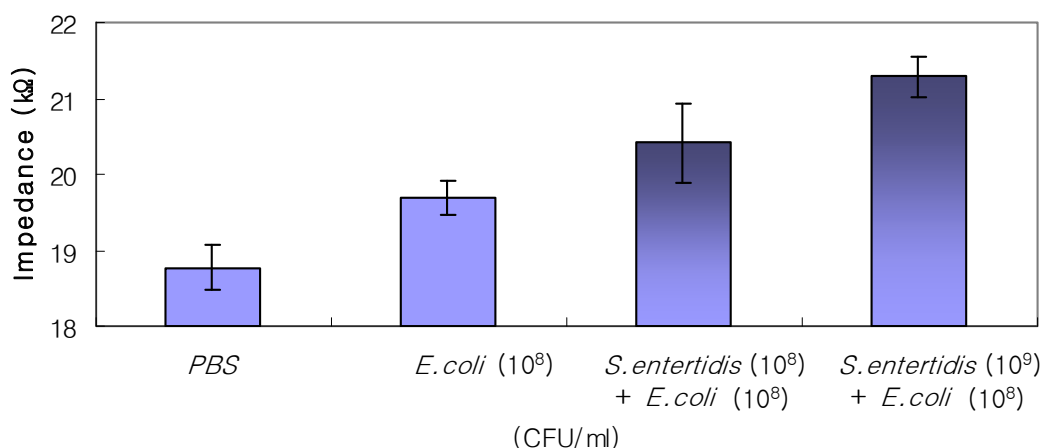


그림 3.1-42. Detection of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* in PBS buffer with antibody immobilization by biotin-avidin method. Error bars represent standard deviations.

Biotin-avidin 방법을 이용하여 항체를 고정시킨 살모넬라 검출용 바이오센서를 이용하여 *E. coli*만 들어있는 시료와 *E. coli* 및 *Salmonella*균을 혼합한 시료에서의 임피던스 변화를 측정된 결과, *E. coli*가 동일한 농도( $10^8$  CFU/mL)로 들어있는 시료에서 *Salmonella*균의 농도가 증가할수록 임피던스 바이오센서의 선택성이 증가하는 것으로 조사되었다 (그림 3.1-42; *E. coli*  $10^8$  CFU/mL 36.9%, *E. coli*  $10^8$  CFU/mL + *S. enteritidis*  $10^8$  CFU/mL 65.6%, *E. coli*  $10^8$  CFU/mL + *S. enteritidis*  $10^9$  CFU/mL 100.0%).

식중독균 검출을 위한 다른 연구에서도 바이오센서의 선택성을 확인하기 위하여 본 연구와 유사한 방법을 사용하였다. Olsen 등(2003)의 연구에서는 Magnetoelastic biosensor를 이용하여 *Salmonella*균을 선택적으로 측정하기 위하여 다클론 항체를 센서에 고정시킨 후 *S. typhimurium*을 검출하였다. 바이오센서의 선택성을 확인하기 위하여 *S. typhimurium*과 *E. coli* O157:H7을 농

도별로 각각 측정하였으며, Magnetoelastic biosensor는 *S. typhimurium*에 대하여 선택적이었다는 결과를 발표하였다. Zhang 등(2006)의 연구에서도 immuno-biosensor에 Salmonella 균 측정용 단클론항체와 다클론항체를 고정시킨 후 우유에서 *Salmonella*균을 검출하였다. 이때 immunosensor의 선택성을 확인하기 위하여 *S. typhimurium*과 *E. coli*를  $10^8$ CFU/mL 농도로 혼합하여 immuno-biosensor를 이용하여 검출하였다. 그 결과 *S. typhimurium*만을 검출한 측정값과 *S. typhimurium*과 *E. coli*를 혼합한 용액에서 검출한 측정값이 동일하였으므로 immuno-biosensor에서 *Salmonella*균을 선택적으로 검출할 수 있다는 가능성을 제시하였다고 보고하였다.

*Salmonella* 검출용 임피던스 센서를 이용하여 *E. coli*이외의 다른 병원성 균에 대한 검출 특이성을 확인하기 위하여, 저온성 식중독 균으로 문제시되고 있는 *L. monocytogenes*를 선정하여 특이성 검출 시험을 추가로 실시하였다. 실험은 PBS 버퍼에 *E. coli*, *L. monocytogenes* 및 *S. typhimurium*균을 각각  $10^9$  CFU/mL 농도로 접종한 다음 바이오센서를 이용하여 임피던스 변화를 측정하는 방법으로 실시하였다. *E. coli*의 농도가  $10^9$  CFU/mL로 조정된 PBS 버퍼에서의 임피던스 변화를 측정한 후, 동일한 농도의 *L. monocytogenes*와 *S. typhimurium*의 임피던스 변화를 각각 측정하였다.

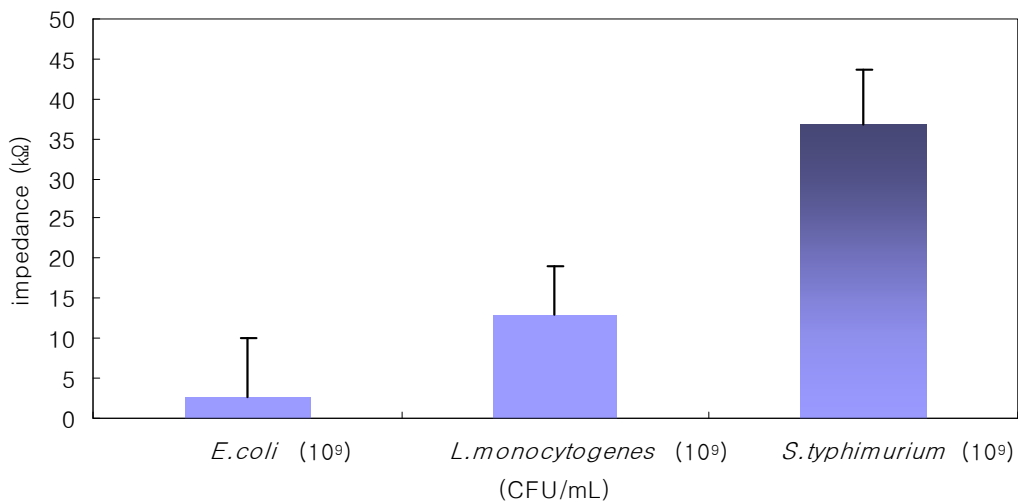


그림 3.1-43. Detection of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in PBS with antibody immobilization by biotin-avidin method. Error bars represent standard deviations.

실험 결과 각 균이 동일한  $10^9$  CFU/mL 농도에서 임피던스 바이오센서의 *S. typhimurium*에 대한 선택성이 *E. coli*와 *L. monocytogenes*보다 높은 것으로 나타났다 (*S. typhimurium* 100%, *L. monocytogenes* 35%, *E. coli* 7%). 따라서 여러 병원성 균이 존재하는 시료의 경우에도 임피던스 바이오센서가 높은 선택성을 가지고 살모넬라균을 검출할 수 있는 것으로 조사되었다 (그림 3.1-43).

나) SAM (Thiolation) 고정화 방법

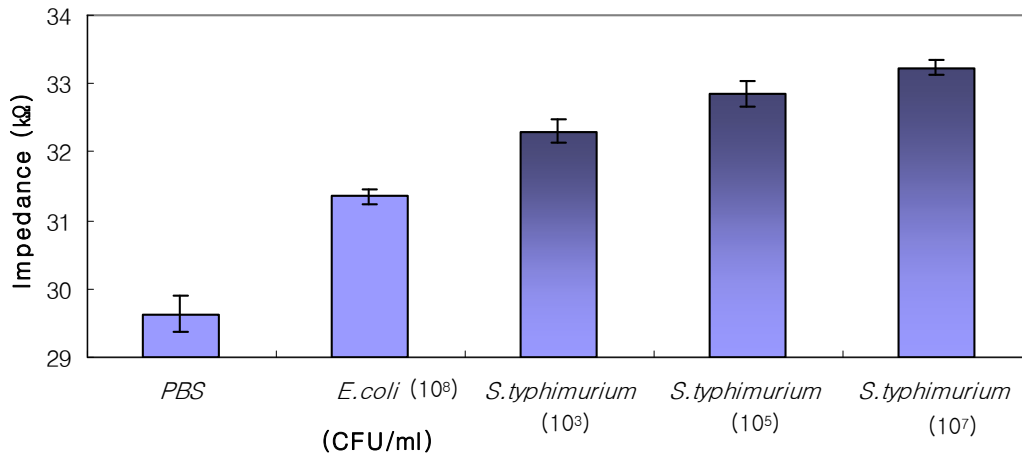


그림 3.1-44. Detection of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in PBS with antibody immobilization by thiol method. Error bars represent standard deviations.

SAM 고정화 방법을 이용하여 제작한 임피던스 바이오센서로 *E. coli*와 *S. typhimurium*이 혼합된 시료에서 *S. typhimurium*를 검출한 결과, biotin-avidin 방법에 비하여 낮은 농도의 살모넬라 세균을 선택적으로 검출하였다 (그림 3.1-44). 이러한 결과는 외부의 다양한 세균에 오염된 식품 시료의 경우에도 본 연구에서 개발된 임피던스 바이오센서를 이용하여 살모넬라균만을 선택적으로 검출 할 수 있다는 가능성을 제시해 주고 있다.

라. 임피던스 바이오센서 보관 및 재사용 기술 개발

항체를 고정화시켜 제작한 임피던스 바이오센서는 페트리디쉬에 넣어 센서 표면이 오염되지 않도록 보관하였다. 또한 *Salmonella*균 검출에 사용된 임피던스 바이오센서는 센서표면을 재생 버퍼를 이용하여 부착된 세균만을 제거한 후, 검출부를 재생시켜 *Salmonella*균 검출에 재사용할 수 있도록 하였다. 바이오센서 검출부 재생 버퍼는 100 mM glycine-HCl (pH 2.5)을 사용하였다. 이 재생 방법을 사용했을 경우 10여회 이상 바이오센서의 연속 사용이 가능하였다.

*Salmonella*균을 반복적으로 검출하여 감도가 저하된 센서는 표면의 고정화 물질들을 모두 제거한 후, 앞서 기술한 항체 고정화 방법으로 검출부를 제작하였다. 센서 표면의 유기물을 완전히 제거하기 위해서 piranha solution (30 vol.% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 70 vol.% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, v/v)으로 60℃에서 5분간 센서 표면을 세척한 후, 에탄올(ethanol)과 증류수(deionized water)로 수회 세척하였다. 세척된 센서는 질소 가스로 표면의 습기를 완전하게 제거한 다음 페트리디쉬에서 보관하였다.

## 제2절 임피던스의 실용화 구축을 위한 사전처리 모델 구축

본 연구는 제1세부과제에서 개발한 임피던스 바이오센서가 축산식품에서 *Salmonella* 균을 신속하게 검출할 수 있는지를 알아보기 위하여 실험을 수행하였다. 식품시료 별 효율적인 전처리를 위하여 식품시료 중 미생물 샘플링은 Swab 방법과 Stomacher 방법을 사용하였으며 미생물의 검출은 바이오센서의 임피던스 변화를 측정함으로써 이루어졌다. 따라서 시료 내 임피던스 센서의 검출 효율성을 검증하기 위하여, 기존의 미생물 검출 방법인 표준천평판배양법으로 *Salmonella* 균 표준 농도를 측정하고, Spectrophotometer를 이용하여 임피던스 바이오센서와의 측정 결과치를 비교하였다. 임피던스 측정결과는 재현성을 고려하여 동일한 조건에서 3반복 실험하여 평균값으로 나타내었다.

### 1. 미생물 신속 검출을 위한 모델 구축

#### 가. 실험 미생물의 배양

본 연구에 사용된 균주는 생명공학연구원 유전자은행 KCTC(Korea Collection for Type Cultures, 한국생물공학연구원 생물자원센터)에서 분양받은 *Salmonella enteritidis* KCTC 12400, *Salmonella typhimurium* KCTC 12401을 사용하였다. 분양된 균주는 모두 동결건조된 상태였으며, 균주에 PBS 완충액 1.0 ml를 첨가하여 Sodium Selenite Agar에 평판배양하여 적갈색의 colony를 확인하였다. 선택배지에서 균주를 확인한 후, colony를 Brain Heart Infusion (BHI) broth에 계대배양하여 이용하였다. 배양시 조건은 액체배양의 경우 37 °C에서 18 - 24시간동안 120 rpm에서 배양하였으며, 평판배양의 경우 37 °C에서 48시간 배양하였다.

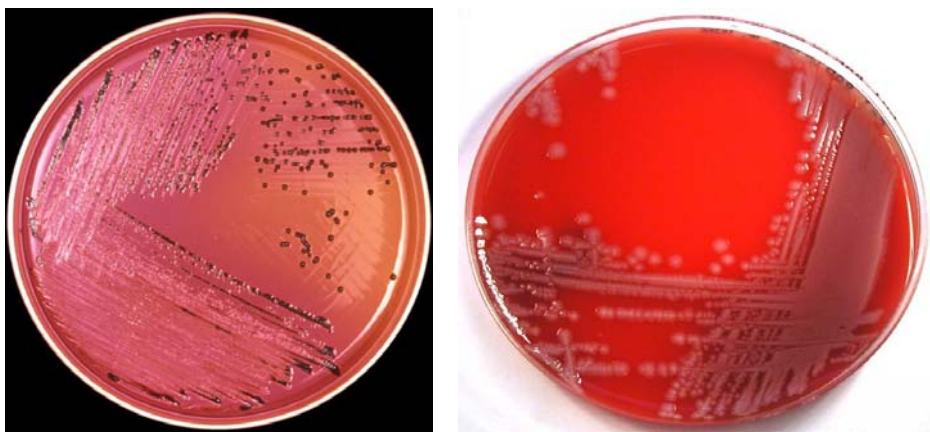


그림 3.2-1. *Salmonella* spp.

나. 실험 미생물(*S. typhimurium*, *S. enteritidis*)의 균수 측정

미생물의 균수는 기존의 미생물 측정법인 표준한천평판배양법을 이용하여 확인한 후 Spectrophotometer와 임피던스 바이오센서를 이용하여 균수를 측정하여 실험결과를 비교하였다.

1) 표준한천평판배양법 (Standard Counting Method)

*S. typhimurium*, *S. enteritidis*는 37°C 에서 24시간 배양한 후 표준한천평판배양법을 이용하여 생균수를 측정하였다. 표준한천평판배양법으로 측정한 *Salmonella* 균수는 Spectrophotometer 및 임피던스 바이오센서를 이용한 계측 결과표의 X 축으로 사용하였으며, 측정 범위는  $1.0 \pm 0.5 \times 10^{1-9}$  CFU/ml 이었다.

1. 동결 건조된 균에 PBS 완충액을 1.0ml 희석한 후, *Salmonella* 선택배지 (Selective Agar for detecting *Salmonella* spp.) 에 striking을 실시하여, 37 °C에서 48시간 배양하였다.
2. 적갈색 Colony를 확인한 후, 백금이를 이용하여 1백금이를 모집하여, BHI broth에 접종한 후 37 °C, 120~130 rpm에서 24시간 배양하였다.
3. 2차 계대 배양하여 활성화된 *Salmonella* 10 ml (in BHI broth)를 원심분리하여 cell down 시킨다. (3,000 rpm, 15min)
4. 상층액을 제거한 후, PBS 완충액으로 2회 세척하여 배지의 잔여물을 제거한다.
5. 농축된 *Salmonella*에 PBS 완충액을 첨가하여 colony count method를 실시한다.

표준한천평판배양법은 전세계적으로 가장 널리 이용되고 있는 것으로 일정한 배수로 희석된 시료를 배지에 접종하여 37°C에서 48시간 이상 배양한 후 집락형성단위(colony forming unit)를 계산함으로써 시료중의 생균수를 측정하는 방법이다. 본 연구에서 실행한 colony count method는 다음과 같다.

1. BHI broth에서 증균된 *Salmonella*를 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다.
2. 상층액(배지 잔여물)을 제거한 후, PBS 완충액으로 2회 washing 한다.
3. PBS 완충액을 동량 가하여 배양액을 만든다.
4. 10ml tube에 멸균된 PBS 완충액 9ml 씩 분주하여 준비한다.
5. 각 tube 에 1 ml을 첨가하여, vortexing 한 후 다시 1 ml 를 다음 tube에 분주한다. (10배 희석)
6. 농도별로 희석된 액을 *Salmonella* 선택배지에 100 µl씩 분주하여 도말한다.
7. 평판배지를 37 °C에서 48시간 배양 후, 집락수를 계산하여 균수를 측정한다.

단, 집락계산은 확산 집락이 없고 집락수가 30-300개의 집락을 형성한 3개의 plate 집락수를



계산하여 평균치를 구하고, 여기에 해당 되는 희석배수를 곱하여 시료 1 ml중의 세균수를 계산하였다.



1.  $10^3$  배 희석 후 배양된 미생물, 2.  $10^4$  배 희석 후 배양된 미생물, 3.  $10^5$  배 희석 후 배양된 미생물

그림 3.2-2. *Salmonella* in Agar by Plate Count Method

## 2) Spectrophotometer

모든 시료는 450 nm의 흡광도에서 측정하였으며 *Salmonella*를 농도별로 측정한 결과는 그림 3.2-3, 3.2-4 와 같다.

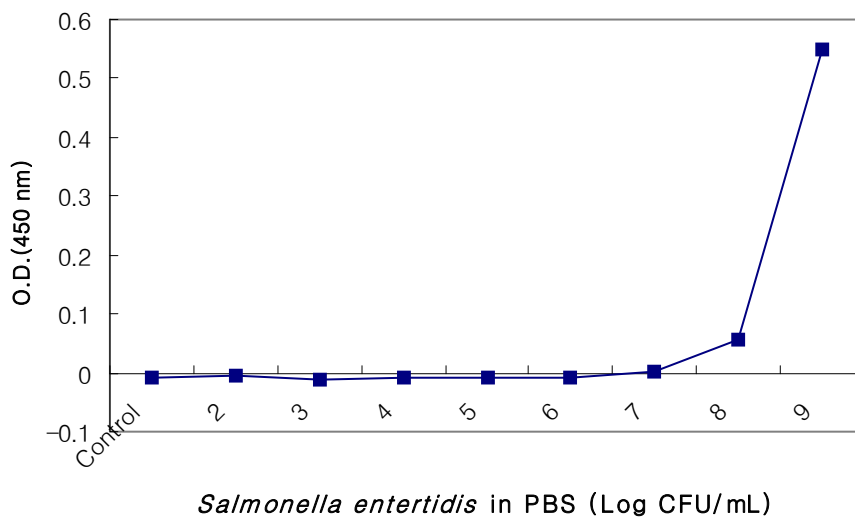


그림 3.2-3. Detection of *Salmonella enteritidis* in PBS by Spectrophotometer at 450 nm

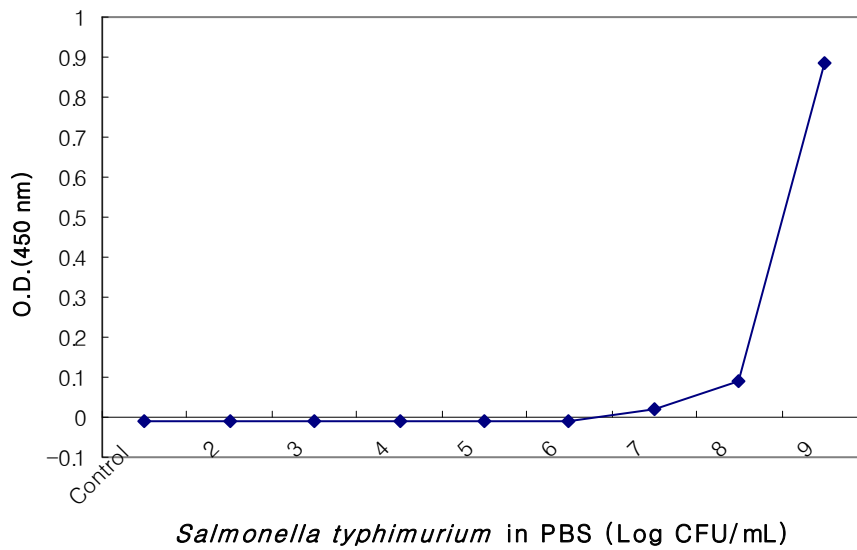


그림 3.2-4. Detection of *Salmonella typhimurium* in PBS by Spectrophotometer at 450 nm

PBS 완충액에서 *Salmonella*의 흡광도를 농도별로 측정된 결과,  $10^7$  CFU/ml부터 농도에 따라 흡광도가 증가하였다. 따라서 Spectrophotometer를 이용하여 *Salmonella*를 측정할 경우, 측정 가능한 검출 한계는 최소  $10^8$  CFU/ml 이상인 것으로 판단되었다.

## 2. *Salmonella* 측정을 위한 대상 시료 및 사전 처리 기술 선정

### 가. *Salmonella* 측정을 위한 대상 시료 선정

본 연구에서 임피던스 센서를 이용하여 *Salmonella*를 측정할 대상 식품 시료는 *Salmonella* 식중독의 주요 원인식품인 축산 식품과 2007년 식품의약품안전청에서 *Salmonella* 오염으로 인하여 긴급 폐기 조치된 바 있는 땅콩버터를 시료로 사용하였다. 식품 시료는 물성의 특성을 고려하여 고체시료(닭고기, 돼지고기), 액체시료(우유), 및 반고형시료(땅콩버터)를 선정하였다.

표 3.2-1. *Salmonella* 측정용 대상 식품 시료 및 전처리 과정

Food Sample	Method	Reference
Chicken	Sample 25 g → add peptone water 225 ml → stomaching	Crudjoe, K.S. & Krona, R. 1997. <i>Inter J. Food Microbiology</i>
	Sample 25 g → add peptone water 225 ml → Stomaching	Brunette, C.N. & Yoon, K.S. 2004. <i>Food Sci. Biotechnol.</i>
Pork	Pork* Sample 25 g	김묘영 등. 2006.

		→ add peptone water 225 ml → stomaching	한국식품과학회지
<b>Beef</b>	Ground Beef	Sample 25 g → add modified broth 225 ml → Mixing	Peng, H. & Shelef, S. A. 2001. <i>Inter J. Food Microbiology</i>
	Cheese	Sample 25 g → add Distilled water 100 ml → Stomaching	정상훈 등. 2003. <i>J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol</i>
<b>Milk product</b>	Butter*	Sample 25 g → add PBS buffer 225 ml → Stomaching	강지현등. 2001. 한국식품과학회지
	Infant Formula	Sample 10 g → add Peptone water 90 ml → Stomaching	A. Agarwat et al., 2002. <i>Molecular &amp; Cellular Probes</i>
		Sample 0.3 - 1.0 g → add water 40 - 1,000 ml → Sonication 15 min → Centrifuge 15,000 rpm, 10 min	Caselunghg, M. B & Lindeberg, J. 2000. <i>Food Chemistry</i>
<b>Egg</b>	Egg yolk Egg Shell	Sample 25g → add peptone water 100 ml → Centrifuge 15,000 rpm, 25 min	E. Thomas, 2006. <i>J. Immunol Methods</i>

\* 임피던스 측정 대상 시료

나. *Salmonella* 측정을 위한 대상 시료 전처리 방법

식품에 부착된 미생물을 측정하기 위하여 아래의 두가지 방법을 이용하여 전처리하였다,

#### 1) Stomacher method

식품 시료에 PBS 완충액(시료양의 9배)을 가한 후, Stomacher를 이용하여 3분간 mixing 한 후 시료를 filtering하여 10배씩 희석하여 농도별로 Colony counting을 실시하여 균수를 측정하였다.

#### 2) Swab method

멸균된 면봉으로 식품 표면에 붙은 미생물을 일정한 속도로 문지른 후 PBS 완충액에 넣어 10배씩 희석 후 농도별로 Colony counting을 실시하여 균수를 측정하였다.

#### 3. Non-specific binding을 제거하기 위한 방법

임피던스 바이오센서를 이용하여 식품시료내의 *Salmonella*를 측정할 경우, 센서의 표면에 *Salmonella*균과 specific-binding하는 대신 non-specific binding이 발생하여 신호가 저하되거나 blind 되는 현상이 쉽게 발생되었다. 이를 해결하기 위하여 non-specific binder와 경쟁하여 결합을 방해하는 Blocker BSA를 0.5%, 1.0 %, 2.0%씩 시료에 첨가한 후 임피던스 신호의 변화를 측

정하여 식품시료에 적합한 최적 농도를 결정하였다.

예시) 돼지고기에서의 Blocker BSA 첨가농도 결정

1) Detection in Pork ; Blocker BSA 0.5%

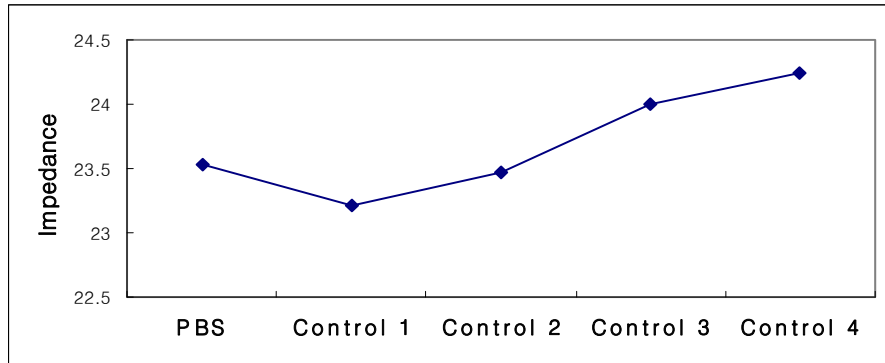


그림 3.2-5. Detection of impedance in Pork with antibody immobilization by biotin-avidin method : Blocker BSA concentration 0.5%

2) Detection in Pork ; Blocker BSA 1.0%

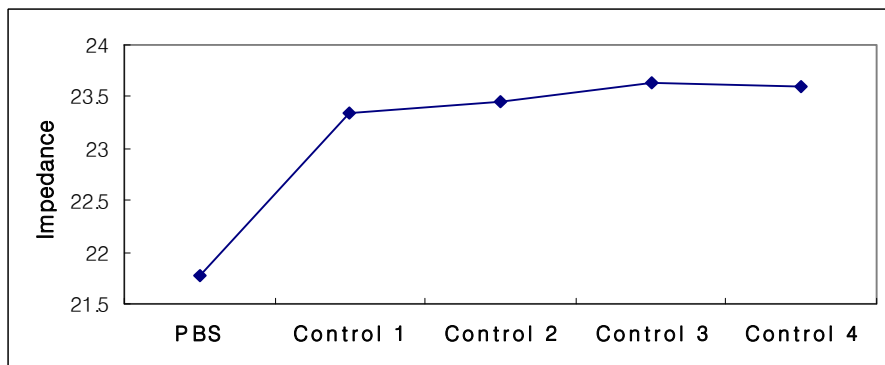


그림 3.2-6. Detection of impedance in Pork with antibody immobilization by biotin-avidin method : Blocker BSA concentration 1.0%

3) Detection in Pork ; Blocker BSA 2.0%

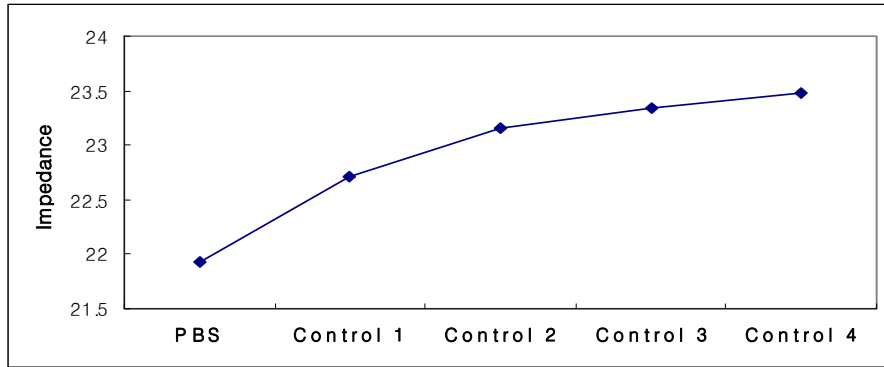


그림 3.2-7. Detection of impedance in Pork with antibody immobilization by biotin-avidin method : Blocker BSA concentration 2.0%

돼지고기 시료에서 Blocker BSA 첨가 농도에 따른 임피던스 신호의 변화를 측정된 결과, Blocker BSA를 0.5%와 2.0% 첨가하였을 때 임피던스의 신호 강도가 증가 (그림 3.2-5, 3.2-7) 하였으나 1.0%를 첨가하였을 때는 신호의 변화가 거의 없었다 (그림 3.2-6). 즉, 식품시료를 임피던스 신호 측정용으로 전처리한 후 non-specific binding을 제거하기 위하여 Blocker BSA를 1.0% 첨가 할 때 정확하고 안정된 임피던스 센서 신호를 나타냈으므로 본 연구에서는 모든 식품 시료 전처리 과정에 1.0%의 Blocker BSA를 첨가하였다.

#### 4. 닭고기에서의 *Salmonella typhimurium*에 대한 임피던스 신호 변화 계측 결과 분석

##### 가. 닭고기에서의 *Salmonella typhimurium*에 대한 임피던스 신호 측정

###### 1) *Salmonella typhimurium* in Chicken buffer by Swab method

Biotin-avidin method로 센서 표면을 고정화시킨 임피던스 바이오센서가 닭고기에서 *Salmonella*를 검출 가능한가의 여부를 판단하기 위하여, 유통 중인 닭고기 전문 업체의 개별 포장 닭가슴살을 구입하여 Swab 법으로 Sampling 하였다. 검체 시료를 500 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액에 *S. typhimurium* 을 농도별로 집중하여 검출을 시도하였다. 닭고기의 경우 *S. typhimurium* 는  $10^4$  CFU/ml 이상부터 검출이 되었으나, *S. typhimurium* 을 오염시키지 않은 대조군에서도 검출 신호가 baseline에 비하여 상당히 높게 나타났다 (그림 3.2-8). 이는 non-specific binding에 의한 영향으로, 센서표면에 *Salmonella* 이외의 의도하지 않은 물질들이 부착되는 현상을 의미한다. 이러한 현상을 해결하기 위하여 Immunochromatography 방법에서 사용되고 있는 non-specific binding 저해 물질을 닭고기 완충액에 첨가하여 재시험을 실시하였다.

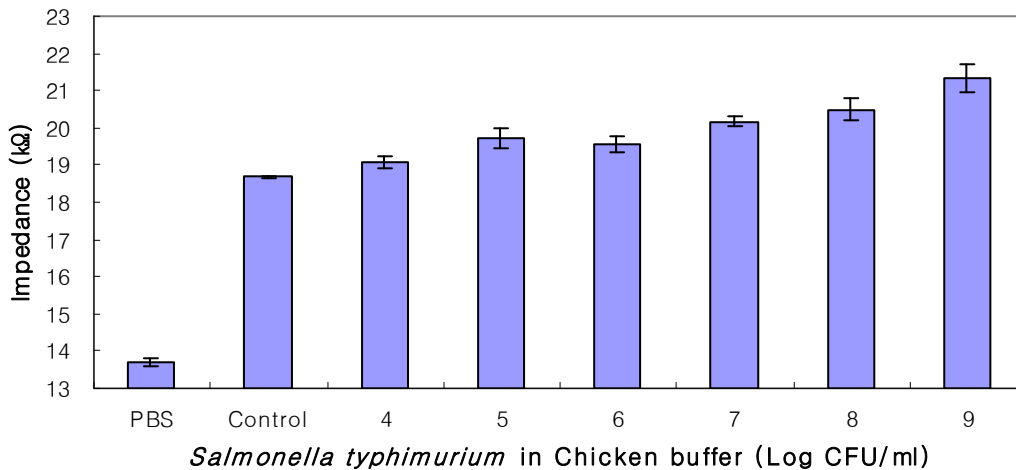


그림 3.2-8. Detection of *Salmonella typhimurium* in Chicken breast with Antibody immobilization by biotin-avidin method (Food Sampling method : Swab). Error bars represent standard deviations.

###### 2) *Salmonella typhimurium* in Chicken buffer by Swab & blocker BSA 1.0%

닭고기에서의 non-specific binding 문제를 해결하기 위하여 blocker BSA를 1.0% 첨가하여 *S. typhimurium*을 검출하였다. 이 방법에서는 닭가슴살 표면을 Swab 한 완충액에 blocker BSA 1.0%를 첨가한 후, *S. typhimurium* 을 오염시켜 임피던스 센서에서 신호의 세기를 측정하였다. 이후 닭고기에 오염된 *Salmonella spp.*를 원심분리로 인해 균이 손실될 수 있어 원심분리는 하지 않았다.

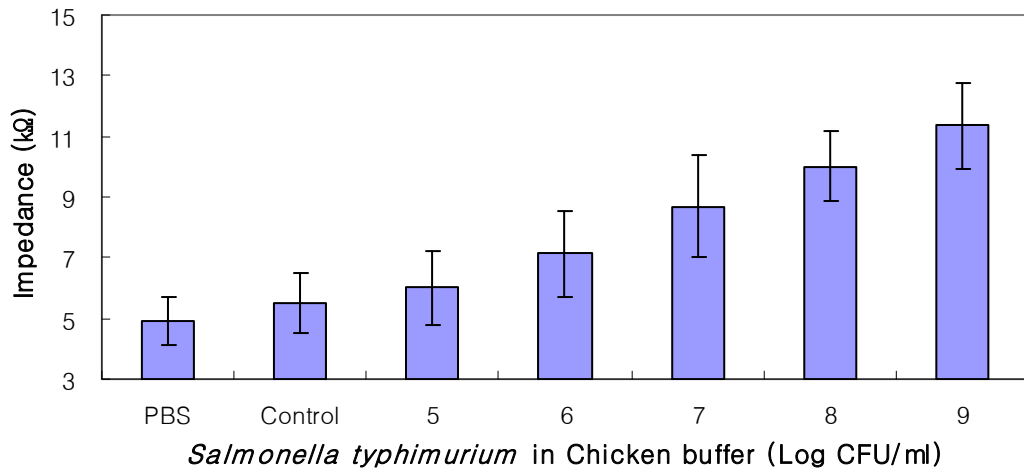


그림 3.2-9. Detection of *Salmonella typhimurium* in Chicken breast with Antibody immobilization by biotin-avidin method (Food Sampling method : Swab & blocker BSA). Error bars represent standard deviations.

Blocker BSA를 닭고기에 1% 첨가하여 *S. typhimurium* 농도별로 신호강도를 측정한 결과 baseline인 PBS에 비해 대조군인 닭고기 사이의 신호 강도 차이가 현저하게 감소하여 1%의 BSA를 첨가하여 실험하였다. 그 결과 *S. typhimurium* 의 농도가 증가할수록 신호강도가 지속적으로 증가하였다 (그림 3.2-9). 따라서 본 연구에서 개발된 임피던스 바이오센서의 닭고기 *Salmonella* 검출시 검출한계는  $10^4 - 10^5$  CFU/ml 였다.

3) *Salmonella typhimurium* in Chicken buffer by Filtering ( $0.2\mu\text{m}$ ) & blocker BSA 1.0%

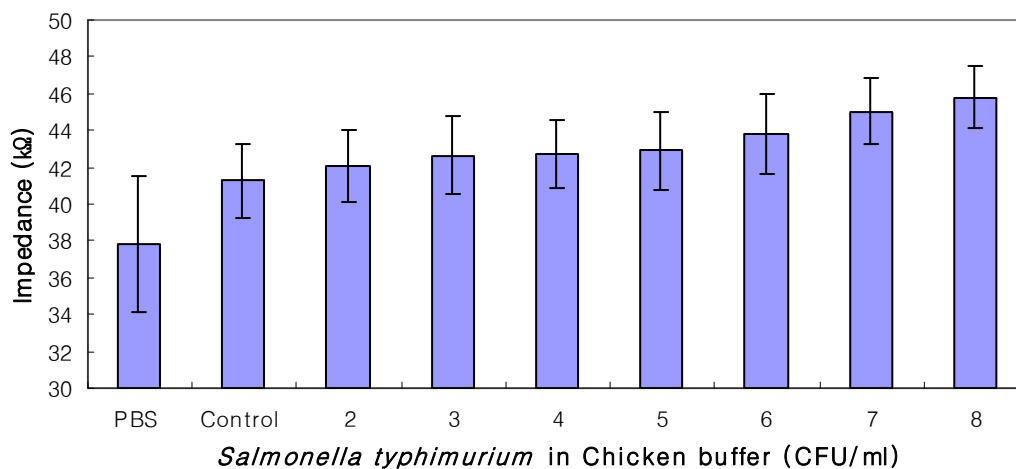


그림 3.2-10. Detection of *Salmonella typhimurium* in Chicken breast with Antibody immobilization by biotin-avidin method (Food Sampling method : Filtering  $0.2\mu\text{m}$  & blocker BSA). Error bars represent standard deviations.

닭고기에서 Swab 방법을 이용하여 *Salmonella*를 검출할 수 있는 가능성을 확인한 후, 또 다른 전처리법인 Stomacher 방법을 이용하여 임피던스 신호를 측정하였다. Sampling 한 닭가슴살에 10배의 PBS 를 첨가한 후 Stomacher 방법을 사용하였다. 균질화 과정을 거친 후 상층액만을 취할 경우 고체 시료로 인해 임피던스 바이오센서 신호에 저항을 줄 수 있어 여과과정( $0.2\mu\text{m}$ )을 거친 후, *S. typhimurium*을 오염시켜 센서의 신호를 측정하였다. 측정 결과 닭고기의 *S. typhimurium*의 검출 한계는  $10^6$  CFU/ml 이었으며 균수가 증가할수록 센서의 신호도 증가하였다 (그림 3.2-10).

기존 연구인 K. H. Seo 등(1999)의 연구에서는 광학바이오센서를 이용하여 닭고기내에서 *S. typhimurium*을 검출한 결과 검출 한계가 20 CFU/ml로 검출 감도가 매우 높았다고 발표한 바 있지만, 검출 시간이 12시간이었다. 그러나 본 연구에서는 실시간으로 닭고기내에서 *Salmonella* 수 준을 측정할 것으로 기존 센서에 비하여 매우 신속하다는 장점이 있다.



나. 기존 검출 방법을 이용한 닭고기에서의 *Salmonella typhimurium*에 대한 검출 결과

1) *Salmonella typhimurium* in Chicken buffer by Swab method

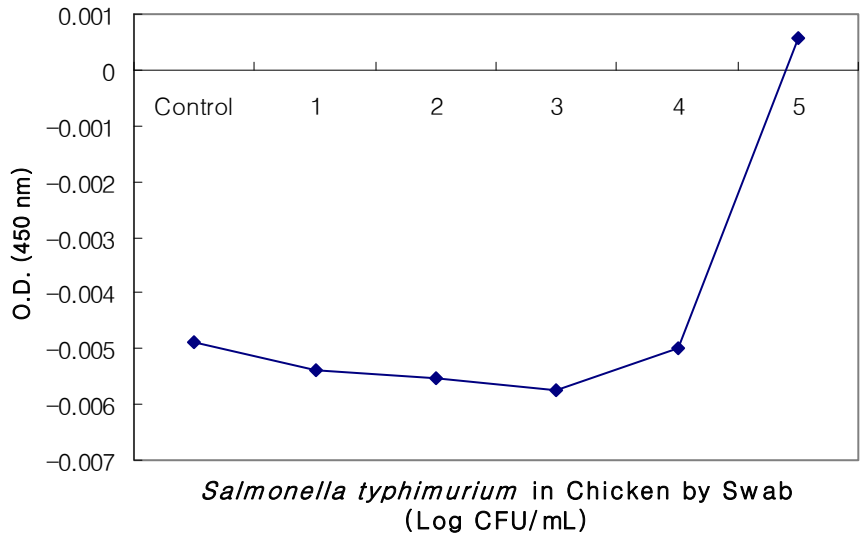


그림 3.2-11. Detection of *Salmonella typhimurium* in Chicken breast by Spectrophotometer at 450 nm (Food Sampling method : Swab)

Spectrophotometer를 이용하여 닭가슴살에서 *S. typhimurium*의 측정을 시도한 결과 Swab method를 이용하여 *Salmonella*를 측정시 검출한계는  $10^5$  CFU/ml 이었다 (그림 3.2-11). 또한 평균표준배양법을 이용시 선택배지를 이용할 경우에는 식품시료에서의 측정이 가능하였으나, 일반 배지에서는 *Salmonella* 이외의 닭고기에 함유된 일반세균으로 인하여 측정이 불가능하였다.

2) *Salmonella typhimurium* in Chicken buffer by Filtering

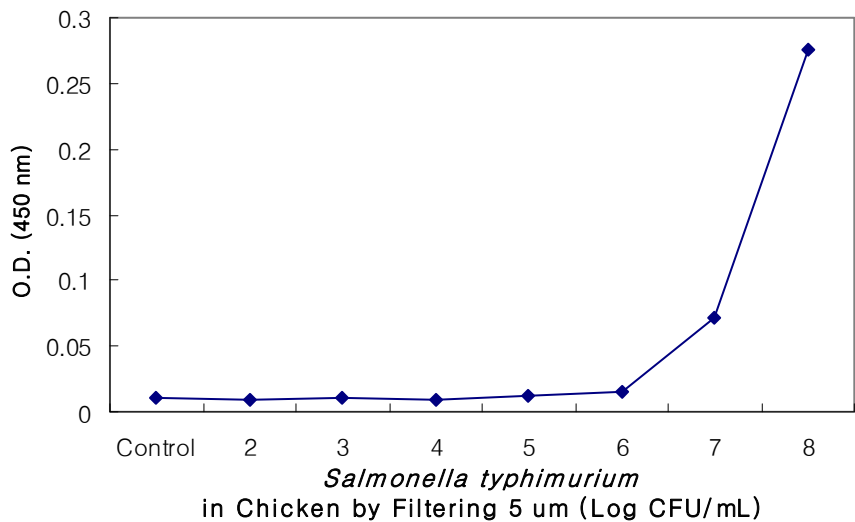


그림 3.2-12. Detection of *Salmonella typhimurium* in Chicken breast by spectrophotometer at 450  $\mu\text{m}$

닭고기에서 Stomacher 방법으로 전처리한 후 *S. typhimurium*을 농도별로 오염시킨 후 Spectrophotometer로 측정된 결과  $10^7$  CFU/ml 이상의 농도에서 흡광도가 증가하였다 (그림 3.2-12).

5. 돼지고기에서의 *Salmonella typhimurium*에 대한 임피던스 신호 변화 측정 결과 분석

가. 돼지고기에서의 *Salmonella typhimurium*에 대한 임피던스 신호 변화 측정 결과

돼지고기에서는 다양한 항체 고정화 방법을 이용하여 *S. typhimurium*의 검출 효율성을 측정하였다.

1) Biotin-avidin 고정화 방법

가) *Salmonella typhimurium* in Pork buffer by Filtering (0.2 $\mu\text{m}$  & Blocker BSA 1.0%)

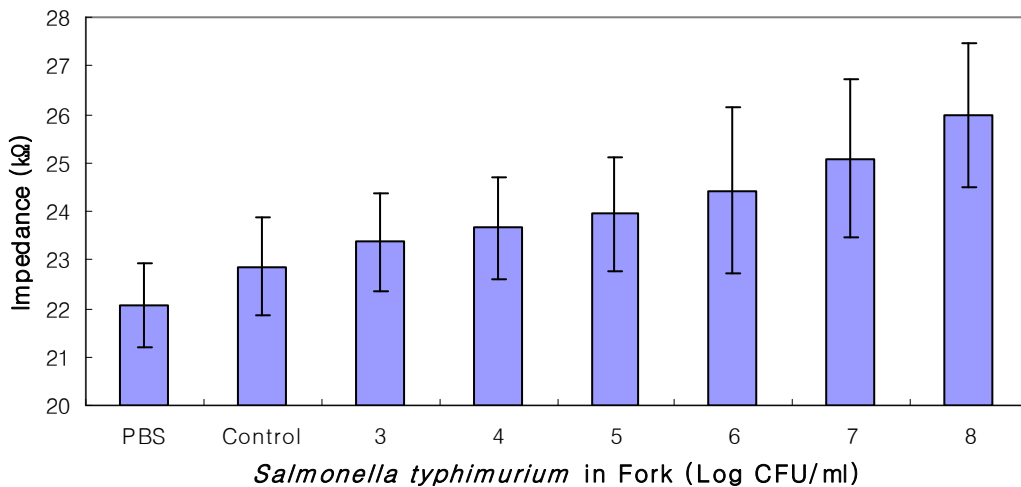


그림 3.2-13. Detection of *Salmonella typhimurium* in Pork with Antibody immobilization by biotin-avidin method (Food Sampling method : Filtering 0.2 $\mu\text{m}$  & blocker BSA). Error bars represent standard deviations.

돼지고기 목심에 10배의 PBS를 첨가하여 Stomacher method를 실시한 후, 0.2  $\mu\text{m}$ 에서 filtering 한 상층액에 *S. typhimurium*을 농도별로 첨가하여 임피던스 신호 강도를 측정하였다. 측정 결과 돼지고기에서 *S. typhimurium*의 검출한계는  $10^3$  CFU/ml 으로 닭고기에 비하여 검출 강도가 증가하였다 (그림 3.2-13).

## 2) SAM (Self Assembly Monolayer) 고정화 방법

### 가) *Salmonella typhimurium* in Pork buffer by Swab method

Biotin-avidin method를 이용하여 돼지고기 시료에서 *S. typhimurium*을 농도별로 검출한 후, 또 다른 항체 고정화 방법인 thiolation cross-linker를 이용한 SAM상태로 센서 표면을 고정화하여 돼지고기에서 *S. typhimurium*의 검출 농도를 측정하였다. Swab method로 전처리하였으며, Blocker BSA 농도는 1.0% 이었다. 닭고기의 전처리법과는 달리 돼지고기에 직접 *S. typhimurium*을 오염시켜 10분간 상온에 방치한 후, 표면을 Swab 하여 임피던스 신호를 측정하였다.

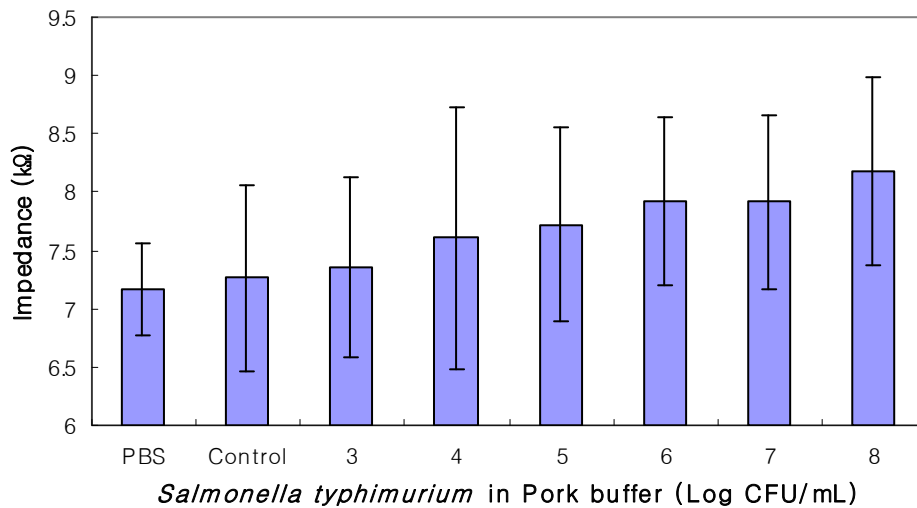


그림 3.2-14. Detection of *Salmonella typhimurium* in Pork with Antibody immobilization by thiol method (Food Sampling method : Swab & blocker BSA 1.0%). Error bars represent standard deviations.

실험 결과 biotin-avidin method에서는 *Salmonella* 농도가 증가할수록 신호 세기가 증가하였다. 그러나 thiol method의 경우  $10^2 - 10^4$  CFU/ml 사이에서 농도가 증가하나  $10^4$ 이상의 농도에서는 신호 변화가 없었다 (그림 3.2-14).

나. 기존 검출 방법을 이용한 돼지고기에서의 *Salmonella typhimurium*에 대한 검출 결과

### 1) *Salmonella typhimurium* in Pork buffer by Filtering

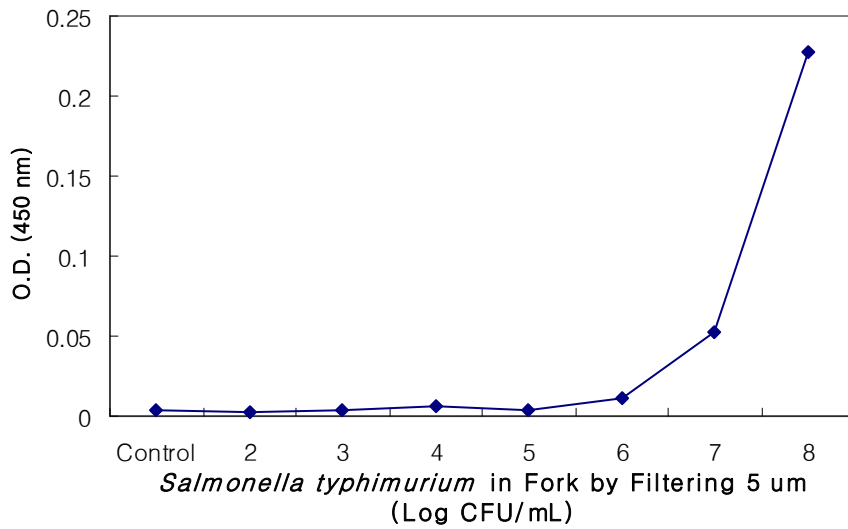


그림 3.2-15. Detection of *Salmonella typhimurium* in Pork by Spectrophotometer at 450 nm (Food Sampling method : Filtering)

흡광도 측정법을 이용하여 돼지고기에서 *S. typhimurium*을 검출한 결과 검출한계는  $10^7$  CFU/ml 이었다 (그림 3.2-15).

2) *Salmonella typhimurium* in Pork buffer by Swab method

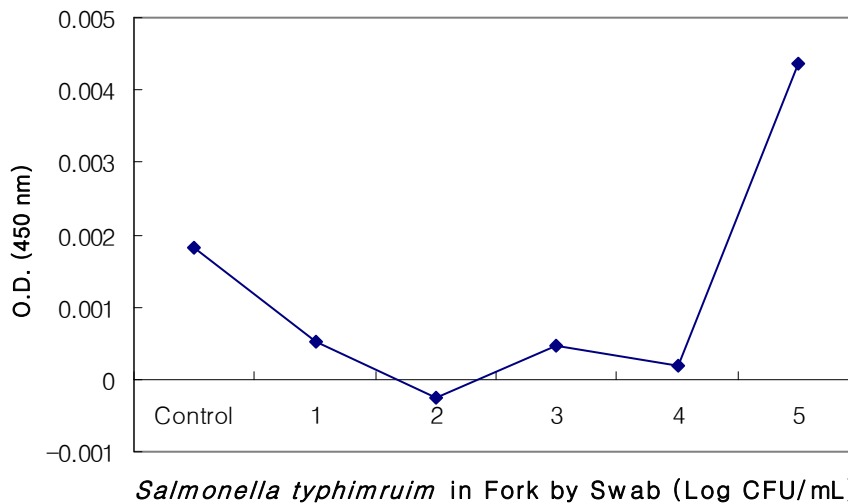


그림 3.2-16. Detection of *Salmonella typhimurium* in Pork by Spectrophotometer at 450 nm (Food Sampling method : Swab method)

Spectrophotometer를 이용하여 Swab 방법으로 돼지고기에서 *S. typhimurium*을 검출한 결과, 검출한계는  $10^5$  CFU/ml 이었다 (그림 3.2-16). 식품 시료에서 *S. typhimurium*을 검출하기 위해서

는  $10^5$  CFU/ml 이하에서 검출되어야 하므로 돼지고기에서 *S. typhimurium*을 검출할 경우 Swab method는 적절하지 않았다.

다. 돼지고기에서의 *Salmonella typhimurium*에 대한 계측 결과 분석

Spectrophotometer를 이용하여 닭고기와 돼지고기에서 *Salmonella*를 검출할 경우 Stomacher 방법을 사용시 검출 한계는  $10^7$  CFU/ml 이었으며, Swab 방법을 사용시는 검출이 불가능하였다. 임피던스 바이오센서를 이용하여 닭고기와 돼지고기에서 *Salmonella*를 검출할 경우 Swab 방법과 Stomacher 방법 모두 적합하였다. 따라서 돼지고기에서 *S. typhimurium*을 검출할 경우 Spectrophotometer에 비하여 임피던스 바이오센서의 검출 민감도와 효율성이 높았다.

즉, 임피던스 바이오센서를 이용한 검출 한계는 닭고기의 경우 *S. typhimurium*  $10^6$  CFU/ml, 돼지고기의 경우 biotin-avidin method를 이용하여 항체 고정화를 거친 센서는  $10^3$  CFU/ml, SAM 방법을 이용하여 항체 고정화를 거친 센서는  $10^2$  CFU/ml 이었으며, 기존의 미생물 검출법인 Spectrophotometer를 이용한 검출에 비하여 임피던스 바이오센서의 검출율이 높았다.

6. 땅콩버터에서의 *Salmonella* 에 대한 임피던스 신호 변화 계측 결과

가. 땅콩버터에서의 *Salmonella* 에 대한 임피던스 신호 변화

1) biotin-avidin 고정화 방법

가) *Salmonella typhimurium* in Peanut butter by Filtering ( $0.2 \mu\text{m}$ )

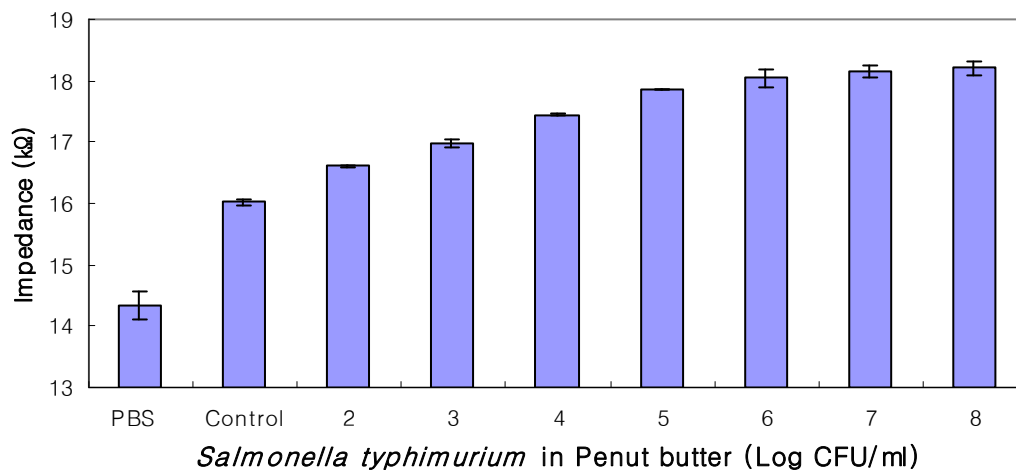


그림 3.2-17. Detection of *Salmonella typhimurium* in Peanut butter with antibody immobilization by biotin-avidin method (Food Sampling method :

Filtering 0.2 $\mu$ m & blocker BSA). Error bars represent standard deviations.

땅콩버터는 고체식품과 성상이 다르므로, PBS에 10배 희석 후 *Salmonella*를 농도별로 오염시켜 측정된 결과, 10<sup>2</sup> - 10<sup>6</sup> CFU/ml에서 농도에 따라 임피던스 신호강도가 증가하였다 (그림 3.2-17). 따라서 본 연구에서 개발된 임피던스 바이오센서는 축산물 외 가공식품의 *Salmonella* 검출에도 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 2) SAM 고정화 방법

### 가) *Salmonella enteritidis* in Peanut butter by Filtering (antibody 0.5 mg)

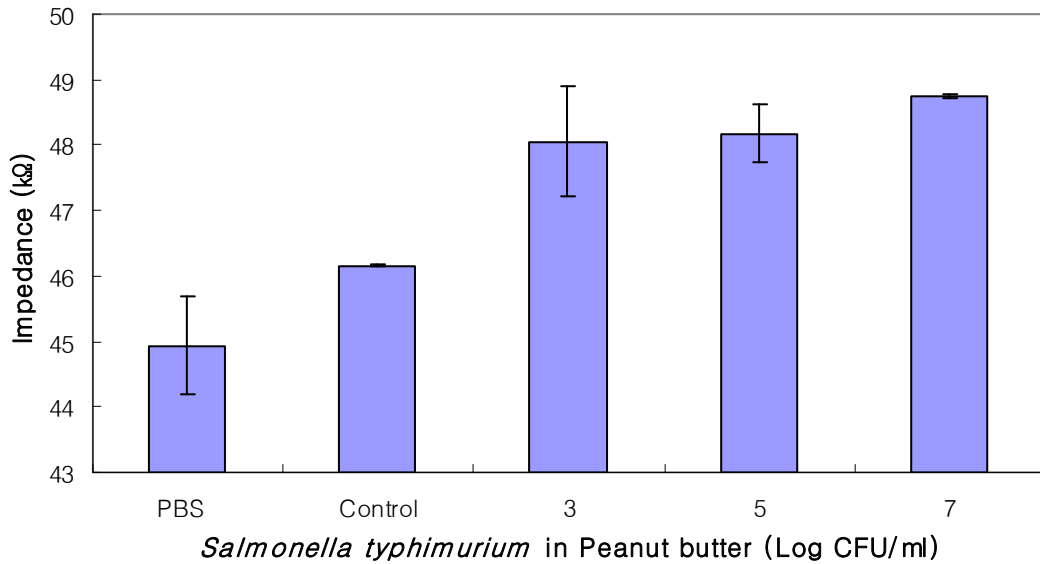


그림 3.2-18. Detection of *Salmonella typhimurium* in Peanut butter with antibody immobilization by thiol method (Food Sampling method : Filtering 0.2  $\mu$ m & blocker BSA): antibody concentration 0.5 mg/ml. Error bars represent standard deviations.

### 나) *Salmonella enteritidis* in Peanut butter by Filtering (antibody 0.1 mg)

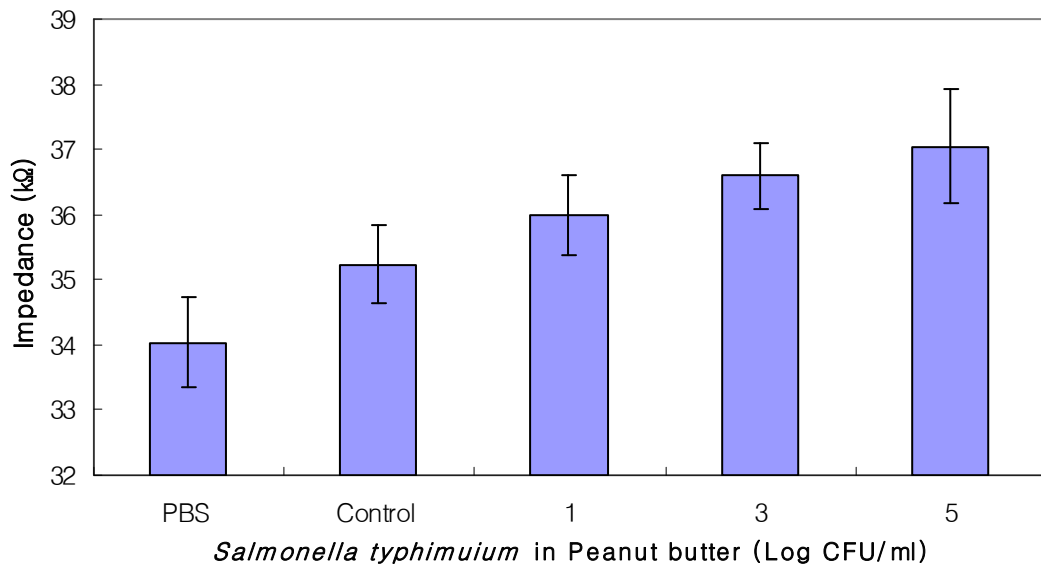


그림 3.2-19. Detection of *Salmonella typhimurium* in Peanut butter with antibody immobilization by thiol method (Food Sampling method : Filtering 0.2  $\mu\text{m}$  & blocker BSA): antibody concentration 0.1 mg/ml. Error bars represent standard deviations.

센서 표면을 SAM 고정화 방법을 이용하여 *Salmonella* 항체를 각각 0.5 mg/ml, 0.1 mg/ml 농도로 고정화 한 후 *S. enteritidis*에 오염된 땅콩버터를 측정하였다 (그림 3.2-18, 19). 일반적인 thiolation cross-linker 방법으로 항체를 고정화 할 경우 0.1 mg/ml 에서도 *S. enteritidis*가 검출되었다.

나. 기존 검출방법을 이용한 땅콩버터에서의 *Salmonella* 검출 결과

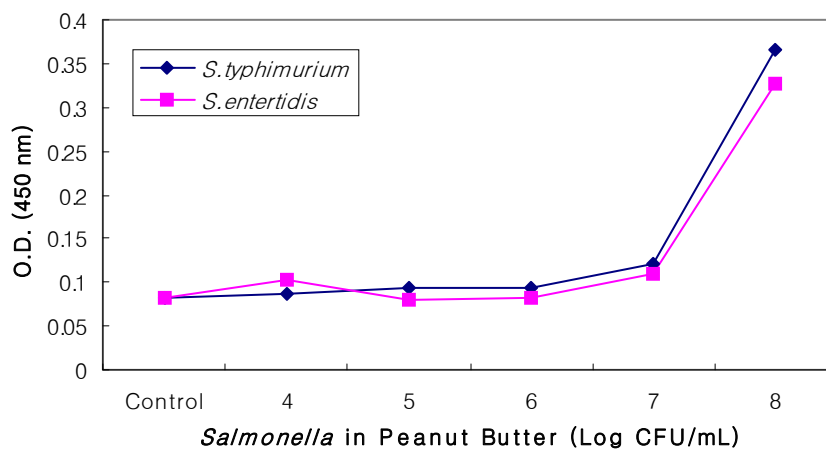


그림 3.2-20. Detection of *Salmonella* in Peanut butter by Spectrophotometer at 450 nm

Spectrophotometer를 이용하여 땅콩버터 내의 *Salmonella*를 검출한 결과 검출한계는  $10^8$  CFU/ml 이었다. 이 한계수준은 임피던스 바이오센서의 검출수준인  $10^1 - 10^2$  CFU/ml 에 비하여 매우 높은 수준이다 (그림 3.2-20). 따라서 땅콩버터에서 *Salmonella*를 검출할 경우, 검출 민감성 면에서 흡광도 측정법에 비해 임피던스 바이오센서 측정법이 더욱 효율적이라고 생각된다.

## 7. 우유에서의 *Salmonella* 에 대한 임피던스 신호 변화 계측 결과

### 가. 우유에서의 *Salmonella* 에 대한 임피던스 신호 변화

#### 1) biotin-BSA 고정화 방법

##### 가) *Salmonella enteritidis* in Raw Milk by Filtering ( $5.0 \mu\text{m}$ )

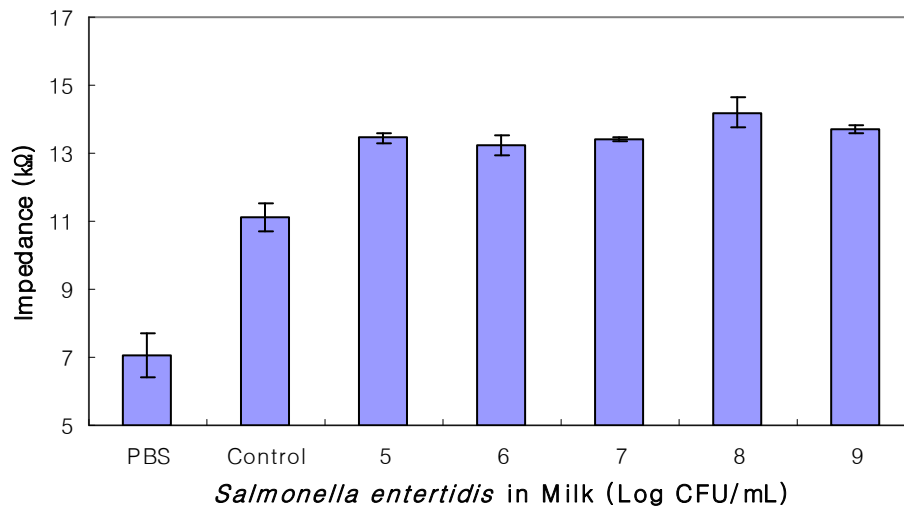


그림 3.2-21. Detection of *Salmonella enteritidis* in Raw Milk with antibody immobilization by biotin-avidin method (Food Sampling method : Filtering  $5.0 \mu\text{m}$  & blocker BSA). Error bars represent standard deviations.



나) *Salmonella typhimurium* in Raw Milk by Filtering (5.0  $\mu\text{m}$ )

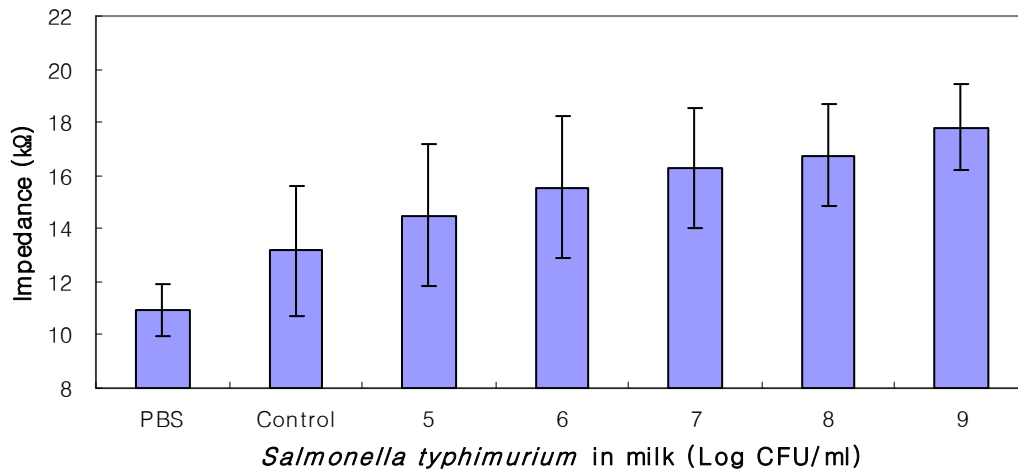


그림 3.2-22. Detection of *Salmonella typhimurium* in Raw Milk with antibody immobilization by biotin-avidin method Detection of *Salmonella typhimurium* in Raw Milk with antibody immobilization by biotin-avidin method (Food Sampling method : Filtering 5.0  $\mu\text{m}$  & blocker BSA). Error bars represent standard deviations.

Biotin-avidin method를 이용하여 *Salmonella* 항체를 고정화 시킨 경우, biotin이 들어있는 식품 시료에서 검출 민감도가 낮다는 단점이 있다. 우유의 경우 biotin이 풍부하게 들어있어 *Salmonella*를 검출하기에는 적합하지 않았다. 따라서 우유와 같은 biotin이 들어있는 식품 시료의 경우 thiolation cross-linker를 이용한 SAM 고정화 방법을 사용하였다.

2) SAM 고정화 방법

가) *Salmonella typhimurium* in Raw Milk by Filtering (0.2  $\mu\text{m}$ )

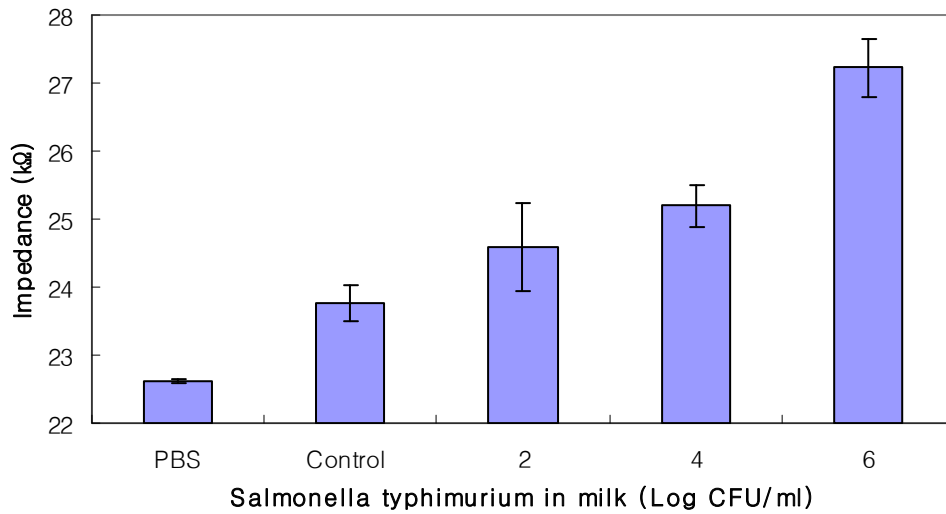


그림 3.2-23. Detection of *Salmonella typhimurium* in Raw Milk with antibody immobilization by thiol method (Food Sampling method : Filtering 5.0  $\mu\text{m}$  & blocker BSA): Antibody concentration 1.0 mg/ml. Error bars represent standard deviations.

SAM 고정화 방법을 이용하여 우유에서 *S. typhimurium*을 검출한 결과, 검출 한계는  $10^2$  CFU/ml 이었으며, 농도가 증가함에 따라 임피던스 신호강도가 증가하였다 (그림 3.2-23). 최근 발표된 R. S. Lakshmanan 등 (2007)과 R. Guntupalli 등 (2007)의 연구에 의하면, magnetoelastic 바이오센서를 이용하여 우유 시료에서 *S. typhimurium*을 농도별로 검출한 결과 검출 한계는  $10^3$  CFU/ml 이었으며, 최적 주파수는 159 Hz 이었다고 보고하였다. 본 연구에서 사용한 임피던스의 주파수는 100 Hz로 좀 더 낮은 파장에서 측정 가능하였으며, 검출 감도 역시 기존의 바이오센서와 비교했을 때 더 높거나 비슷한 수준이었다.

나. 기존 검출방법을 이용한 우유에서의 *Salmonella* 검출 결과

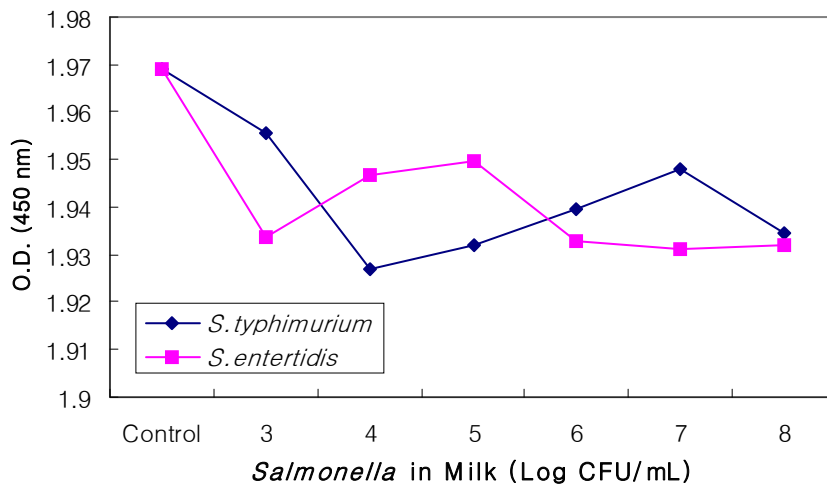


그림 3.2-24. Detection of *Salmonella* in Raw Milk by Spectrophotometer at 450 nm

Spectrophotometer를 이용하여 우유에서 *Salmonella*를 검출한 결과 특이적으로 *Salmonella*를 검출할 수 없었다 (그림 3.2-24).

Thiolation cross-linker를 응용한 SAM 고정화 방법으로 임피던스 바이오센서를 이용하여 우유 시료에서 *S. typhimurium*을 농도별로 검출한 결과, biotin-avidin method를 이용한 방법에 비하여 검출 감도가 증가되는 경향을 보였다. 따라서 우유시료에서 *Salmonella*를 검출할 경우, Spectrophotometer보다는 임피던스 바이오센서가 적합하며 센서 표면 처리법으로는 thiolation cross-linker를 이용한 SAM 방법이 효율적이라 생각된다. 또한 우유의 *Salmonella* 검출 시 SAM 방법을 이용하여 항체를 고정화시킨 임피던스 바이오센서는  $10^2$  CFU/ml부터 신호가 증가하였다.

8. 시금치에서의 *Salmonella* 에 대한 임피던스 신호 변화 계측 결과

2006년 7월 미국의 캘리포니아에서 냉장유통 중인 시금치에서 *Salmonella*가 검출되어 전량 회수된 사건이 발생하였다. 회수된 시금치는 샐러드용 재료로 사용되며, 이 제품은 미국 외의 캐나다 일본 등의 전 세계로도 유통되었던 상품이었다. 따라서 미국 식품의약품안전청에서는 관련 제품에 대한 전량 회수와 함께 대상 회사제품에 대해 정기적인 점검조치를 실시한 바 있다 (FDA, 2006). 이러한 사건을 토대로 본 연구에서는 임피던스 바이오센서를 이용하여 축산물 이외의 *Salmonella*에 의하여 쉽게 오염될 수 있는 식품으로 시금치를 선정하였다. 시금치의 조직은 육류와는 달리 매우 연한 편으로 Swab 방법을 이용하여 임피던스 바이오센서 검출용 전처리를 시도하였다. 임피

던스 바이오센서 검출 시 센서의 항체 고정화 방법은 모두 biotin-avidin method를 이용하였다.

가. *Salmonella enteritidis* in Spinach by Swab method

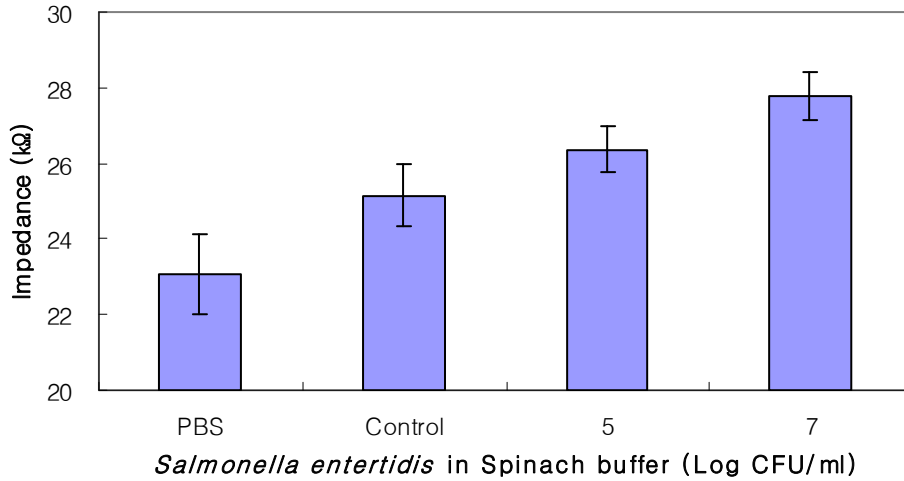


그림 3.2-25. Detection of *Salmonella enteritidis* in Spinach with Antibody immobilization by biotin-avidin method (Food sampling method : Swab & blocker BSA 1.0%). Error bars represent standard deviations.

나. *Salmonella typhimurium* in Spinach by Swab method

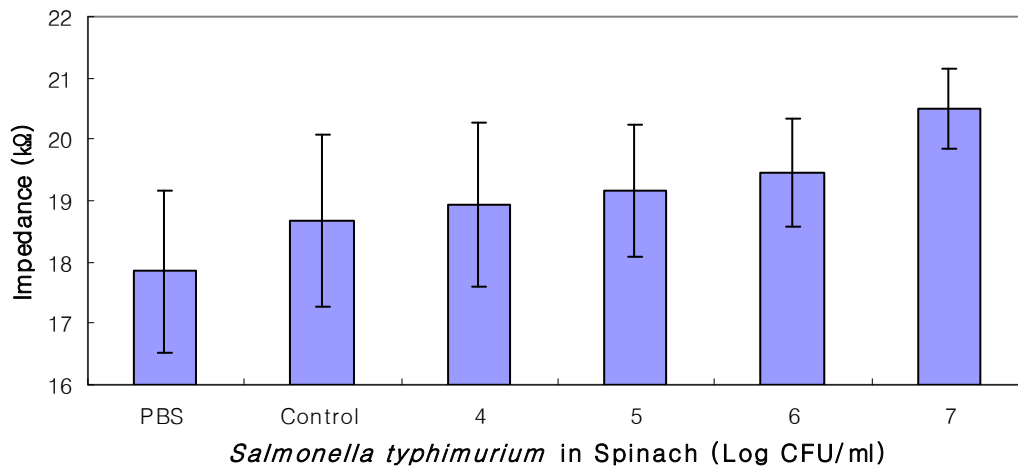


그림 3.2-26. Detection of *Salmonella typhimurium* in Spinach with Antibody immobilization by biotin-avidin method (Food sampling method : Swab & blocker BSA 1.0%). Error bars represent standard deviations.

임피던스 센서 표면에 biotin-avidin method를 이용하여 *Salmonella* 항체를 고정시킨 후,

*Salmonella*에 오염된 시금치 표면을 Swab method로 전처리한 시료의 임피던스 신호를 측정하였다. 두 종류의 *Salmonella*에서 농도별로 검출이 가능하였으며, 신호강도도 *Salmonella* 농도가 증가할수록 균일하게 증가하였다 (그림 3.2-25, 26). 따라서 본 연구에서 개발된 임피던스 바이오센서는 축산물 외 채소류의 *Salmonella* 검출에도 적용할 수 있을 것으로 생각된다(검출한계 :  $10^5$  CFU/ml).

## 제 3절 요약 및 결론

본 연구는 우리나라 축산물 *Salmonella* 신속 정량 검출 기술을 개발하여, 식품의 안전성 향상을 도모하고자 하였다.

식품안전성에 있어서 가장 큰 문제가 되는 *Salmonella* 식중독균을 신속하게 검출할 수 있는 임피던스 바이오센서 및 측정시스템을 개발하였다. 이를 이용하여 축산식품에서 *Salmonella* 균을 신속하게 검출할 수 있도록 *Salmonella* 항원·항체 반응형 검출 모델을 구축하고 시료의 사전처리 기술을 개발하였다. 이를 위하여 소량의 미생물 감지를 위한 센서 표면의 *Salmonella* 항원·항체 반응계를 확립하고, *Salmonella* 신속 검출을 위한 시료 사전처리 기술을 개발하였으며, 센서의 내구성 증진을 위한 반복사용 기술을 개발하였다. 개발된 임피던스 바이오센서는 검출성능은 양호하였으며 검출속도는 시료공급에서부터 임피던스 신호가 나타나기까지 소요되는 시간은 10 분 이내였다.

### 1. *Salmonella* 항원·항체 반응에 따른 전기적 특성 변화를 이용한 미생물 검출 기술개발

*Salmonella* 항원의 결합에 따른 정전용량 변화 시뮬레이션 결과, 임피던스 센서에서 센서 전극의 표면적이 넓고, 전극간의 거리가 가까운 센서가 정전용량이 크게 나타나지만, 센서의 전체 정전용량( $C_t$ )에 대한 항원과의 결합에 의한 정전용량( $C_{ag}$ )의 변화의 비율은 전극간의 거리가 3  $\mu\text{m}$ 일 경우가 가장 좋은 결과를 나타냈다.

시뮬레이션을 통해 결정된 설계 조건과 MEMS 공정상 현실적으로 제작 가능한 전극규격을 고려하여 두 전극 사이의 거리 5 $\mu\text{m}$ , 전극의 폭을 10 $\mu\text{m}$ 로 결정하였다. 센서는 7mm×10mm 크기로 설계되었으며, 항원-항체 반응이 일어나는 전극의 길이는 3mm로 하였다. 미세 전극의 끝부분은 1mm 폭의 직사각형을 만들어 센서의 신호를 측정할 수 있는 탐침을 연결할 수 있도록 하였다.

측정시스템의 주파수를 시뮬레이션에서 구명된 100Hz 근방의 10 Hz, 50 Hz, 100 Hz, 200 Hz, 300 Hz, 400 Hz로 가해지면서 측정되는 임피던스 반응을 분석하는 방법으로 수행한 결과, 50 Hz와 100 Hz에서 측정신호의 감도가 높게 나타났다.

Biotin-avidin 고정화 방법을 사용한 임피던스 바이오센서의 PBS 버퍼에 존재하는 세균 검출 성능은 *S.entertifdis*의 경우 10<sup>6</sup> CFU/ml, *S.typhimurium*의 경우 10<sup>7</sup> CFU/ml 이었다. Biotin-avidin 고정화 방법과 마찬가지로 세균의 농도가 증가함에 따라 임피던스의 값이 증가하여, 임피던스 바이오센서에 의한 *Salmonella* 균의 검출이 가능함을 알 수 있었다. SAM 고정화 방법의 경우 biotin-avidin 고정화 방법에 비하여 낮은 농도(10<sup>2</sup> CFU/ml)의 세균이 존재하는 시료에서도 높은 임피던스 변화를 나타내었다.

*Salmonella* 검출용 임피던스 바이오센서가 *Salmonella*균에 대해서 특이적인 검출성을 가지고 있는가를 검증하기 위하여, *E. coli*와 *L. monocytogenes*를 선정하여 *Salmonella*에 대한 임피던스 바이오센서의 선택성을 측정하였다. 일정한 농도의 *E. coli*와 농도를 다르게 한 *Salmonella*가 혼재한 시료들과 *E. coli*만 존재하는 시료에서 임피던스 변화를 측정한 결과, *E. coli*만을 검출했을 때 보다 *E. coli*가 존재하는 시료에서 *Salmonella*균을 검출했을 때의 임피던스 값이 더 크게 측정되었다. 또한 동일한 농도의 *E. coli*, *L. monocytogenes* 및 *S. typhimurium*이 존재하는 시료에서의 임피던스 변화를 측정한 결과 *S.typhimurium*의 임피던스 변화가 현저하게 높았다. 이외에도 SAM 고정화 방법을 이용하여 제작한 임피던스 바이오센서로 *E. coli*와 *S. typhimurium*이 혼합된 시료에서 *S. typhimurium*를 검출한 결과, biotin-avidin 방법에 비하여 낮은 농도의 *Salmonella* 세균을 검출하여 보다 높은 선택성을 지닌 것으로 나타났다.

## 2. 임피던스의 실용화 구축을 위한 사전처리 모델 구축

임피던스 바이오센서를 이용하여 식품시료에서 *Salmonella*를 측정할 경우, 식품 시료 내의 잔여물에 의하여 임피던스 신호가 증가하였다. 이는 non-specific binding 현상으로, 이 부분을 보완하기 위해 비특이적 결합 방어물질인 blocker BSA를 식품시료에 농도별로 첨가하여 임피던스 신호의 변화도를 관찰하였다. 실험 결과 임피던스 바이오센서를 이용하여 식품시료에서 *Salmonella*를 측정 시 non-specific binding을 효율적으로 억제할 수 있는 blocker BSA 농도는 1.0% 이었다.

닭고기(닭가슴살)에서 *S.typhimurium*을 측정한 결과 Stomacher method 보다는 Swab method를 이용하여 전처리를 한 시료에서 농도별 임피던스 신호가 증가되었다. Biotin-avidin method를 이용하여 항체 고정화를 거친 임피던스 바이오센서의 검출 가능한 농도는 닭고기의 경우  $10^6$  CFU/ml 이었으며, 검출 시간은 시료 전처리 시간을 포함하여 4시간 정도 소요되었다. 기존에 광학바이오센서를 이용하여 닭고기 내에서 *S.typhimurium*을 측정할 경우 측정 시간이 12시간이었다 (K.H. Seo 등, 1999). 따라서 본 연구 결과는 기존의 바이오센서에 비해 닭고기에서 *Salmonella*를 신속하게 검출할 수 있다.

돼지고기에서 *S. typhimurium*을 측정한 결과, biotin-avidin method를 이용하여 항체를 고정화시킨 후 stomacher method로 처리한 시료에서의 검출이 가능한 농도는  $10^3$  CFU/ml 이었다. Thiolation cross-linker를 이용하여 항체를 고정화시킨 후 Swab method를 이용하여 전처리한 시료에서의 검출이 가능한 농도는  $10^2$  CFU/ml 이었다. 기존의 미생물 측정 방법인 Spectrophotometer를 이용하여 시료를 측정할 결과  $10^7$  CFU/ml 이상에서 측정이 가능한 반면, 임피던스 센서는 돼지고기에서 *Salmonella*를 검출하는데 검출 민감도와 신속성에서 효율성이 높았다.

임피던스 바이오센서를 이용하여 최근 *Salmonella* 오염으로 인하여 문제가 되었던 땅콩버터에서 *S. typhimurium*를 검출하였다. 검출 결과  $10^1 - 10^2$  CFU/ml 이상에서 검출이 가능하여 매우 민감

한 검출능력이 관찰되었다(Spectrophotometer방법 검출한계  $10^7$  CFU/ml).

우유 내 *Salmonella* spp.의 임피던스 신호를 측정된 결과, thiolation cross-linker를 이용하여 항체를 고정화시킨 센서의 검출한계는  $10^2$  CFU/ml 이었다. Spectrophotometer를 이용하여 검출할 경우 흡광도 문제로 인해 측정이 불가능한데 임피던스 바이오센서로는 측정이 가능하다.

임피던스 바이오센서를 이용하여 시금치에서 *S. typhimurium*을 측정하였으며, 검출한계는  $10^5$  CFU/ml 이었다. 따라서 이번 연구에서 적용된 임피던스 바이오센서를 이용한 *Salmonella* 검출방법이 축산 식품 이외의 채소류에서도 검출이 가능하다.

임피던스 바이오센서를 이용하여 축산품에서 *Salmonella*를 검출한 결과, 기존의 검출법인 표준평판계수법에 비해 단시간 내에 측정이 가능하다는 장점이 있다. 또한 동일한 식품 시료에서 임피던스 바이오센서와 Spectrophotometer를 이용하여 *Salmonella*를 농도별로 검출한 결과, 기존의 흡광도 측정법에 비하여 임피던스 바이오센서의 검출성과 효율성이 높았다.



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

\* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도 등을 기술

### 1. 목표달성도

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2004)	식품의 Salmonella 신속 검출을 위한 사전처리 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>-미생물 신속 검출을 위한 사전처리 기술개발                             <ul style="list-style-type: none"> <li>· 적정배지에서 물리·화학적 특성에 따른 임피던스 확인</li> <li>· 시료의 미생물 검출의 재현성 확보를 위한 시료의 사전처리 기술개발                                     <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전기전도도의 최적화를 위한 시료의 화학적 특성 표준화 (pH, 식품의 농도)</li> <li>- 전기전도도의 최적화를 위한 시료의 물리적 특성 표준화 (점성, 온도)</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>-미생물 신속 검출을 위한 모델 구축                             <ul style="list-style-type: none"> <li>· 미생물의 신속 검출을 위해 측정 조건 확립                                     <ul style="list-style-type: none"> <li>- 증균 조건 및 적정 시간의 측정</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
	전기적인 방법을 이용한 미생물 검출 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Salmonella 항체 반응물 대상 최적 array 설계                             <ul style="list-style-type: none"> <li>· 기 개발된 최적 array의 prototype의 전기특성 확인</li> </ul> </li> <li>-Salmonella 항체 반응물 단독 임피던스 특성확인                             <ul style="list-style-type: none"> <li>· 항체 반응물의 전기특성 (주파수 분석)</li> </ul> </li> <li>-항체 반응물의 array 혼재 임피던스 특성확인</li> <li>-임피던스 주파수 분석에 의한 병원성 미생물 검출 기술개발                             <ul style="list-style-type: none"> <li>· 주파수 분석을 통한 바이오센서의 전기적인 모델개발</li> </ul> </li> </ul>
	단일클론 항체 (항원인식부위)의 목적표면에의 방향성 고정화	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Salmonella 특이적 단일클론 항체 제조</li> <li>-항원인식 부위(Fab') 편집방법의 확립</li> <li>-Fab' 고정화 기술 확립</li> <li>-방향성 고정화 기술 확립</li> <li>-Fab' 정제물의 균일 고정방법 확립</li> </ul>

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2005)	<p style="text-align: center;"> <b>임피던스 측정형 미생물 검출모델 구축 및 센서성능시험</b> </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 임피던스 주파수 계측용 미생물 표준시료 개발</li> <li>· 미생물의 농도에 따른 임피던스 변화 계측 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 적정배지에서 배양된 미생물 농도에 따른 임피던스의 변화 계측</li> <li>- 관련 식품에 집중하여 미생물 농도에 따른 임피던스의 변화 계측</li> </ul> </li> <li>· 농도와 임피던스 변화에 대한 표준화 작업</li> <li>- 소량의 미생물 감지를 위한 항원·항체 반응계 확립</li> <li>· 임피던스의 미생물 감지의 최저/최고 농도 확인</li> <li>· 미생물의 증폭조건 확립을 통한 소량의 미생물 감지 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존의 증폭 방법에 대한 조사</li> <li>- 기존의 증폭 방법에 대한 임피던스의 확인 실험</li> </ul> </li> <li>- 센서 정밀도 및 정확도 검증</li> <li>· 기존의 미생물 측정 방법과 센서 측정결과의 비교 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 센서 측정치와 SPC 비교</li> <li>- 센서 측정치와 분석 kit와의 결과 비교</li> <li>- 센서 측정치와 전자현미경을 통한 측정결과 비교</li> </ul> </li> <li>· 결과 비교에 따른 임피던스의 주파수 보정</li> </ul>
	<p style="text-align: center;"> <b>항원 항체 반응 측정을 위한 반도체 MEMS 센서의 개발</b> </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 전기적인 검출 감도를 증폭을 위한 센서 개발</li> <li>· 주파수 변환 시뮬레이션을 통한 미생물 센서의 최적 모델 개발</li> <li>· 항체 고정을 위한 최적의 센서 구조 설계</li> <li>· 주파수 분석을 통한 바이오센서의 전기적인 모델개발</li> <li>- 미세 신호 증폭 및 계측 시스템 개발</li> <li>· 전기적 등가 모델 시뮬레이션을 통한 단일 주파수 측정시스템 제작</li> </ul>

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2006)	<p style="text-align: center;"><b>임피던스의 실용화 구축을 위한 사전처리 모델 구축 및 항원항체 센서의 보관기술개발</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 현장에서 발생하는 시료의 사전처리 모델 구축 및 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>· 식품 시료에 따른 전기 전도도의 최적화 조건 확인                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 식품 생산 현장에서 생산되는 다양한 물리적 형태의 시료의 사전처리</li> <li>- 식품 생산 현장에서 생산되는 다양한 화학적 형태의 시료의 사전처리</li> </ul> </li> <li>· 농도별로 임피던스의 표준화된 값에 적용 여부 확인</li> </ul> </li> <li>- 항체 고정 센서 array 내구성 증진               <ul style="list-style-type: none"> <li>· 항원 항체센서의 장기보관 기술 개발</li> <li>· 항원 항체 센서의 미생물 검출 기술개발</li> <li>· 보관한 센서와 새로운 센서의 사용 결과 비교·분석</li> </ul> </li> </ul>
	<p style="text-align: center;"><b>MEMS 기술을 이용한 병원성 미생물의 신속 검출 시스템 개발</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 바이오센서 보관 기술 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>· 센서부 이용안정성 증대를 위한 내구 방안 확립                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 물리적 안정성 (내열성, 내마모성)</li> <li>- 화학적 안정성 (내산 내염기성, 내염성)</li> </ul> </li> <li>· 센서의 보관 방법 및 보관 후 사용방법 개발</li> </ul> </li> <li>- MEMS 센서 제작을 위한 반도체 제작공정 설계 및 센서제작               <ul style="list-style-type: none"> <li>· 계측 시스템 구축을 위한 하드웨어 제작</li> <li>· MEMS 센서 회로 설계 및 시뮬레이션</li> <li>· MEMS 센서 제작공정 개발 및 제작</li> </ul> </li> <li>- 센서 성능 평가 및 보완 제작               <ul style="list-style-type: none"> <li>· 기지 및 미지 샘플을 이용한 센서감도 평가</li> </ul> </li> <li>- 시험 모델의 구성</li> </ul>

2. 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	달성도(%)
1차년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식품의 미생물 신속 검출을 위한 사전처리 기술 개발 (35)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전처리 기술이 개발되었는가 (20)</li> <li>- 신속검출을 위한 기술이 개발되었는가 (15)</li> </ul> </li> <li>○ 전기적인 방법을 이용한 미생물 검출기술 개발 (35)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 센서의 고정기술이 개발되었는가 (15)</li> <li>- 미생물의 농도에 따른 임피던스 주파수 분석이 이루어졌는가 (20)</li> </ul> </li> <li>○ 단일 클론 항체가 목적 표면에 방향성 고정화의 기술이 확립되었는가 (30)</li> </ul>	100
2차년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 임피던스 측정형 미생물 검출 모델 구축 및 센서성능시험 (50)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 미생물 농도에 따른 임피던스의 변화를 표준화하였는가 (20)</li> <li>- 소량의 미생물을 검출하기 위한 방법이 개발되었는가 (15)</li> <li>- 센서의 정밀도를 확인하였는가 (15)</li> </ul> </li> <li>○ MEMS 기술을 이용한 미생물 검출센서 개발 (50)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전기적인 검출감도 증폭을 위한 센서구조설계가 이루어졌는가 (25)</li> <li>- 마이크로 시그널 증폭 및 계측 시스템이 개발되었는가 (25)</li> </ul> </li> </ul>	100
3차년도 (2006)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 임피던스의 실용화 구축 (25)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 실제적 식품시료를 측정하여 적용여부를 확인하였는가 (25)</li> </ul> </li> <li>○ MEMS 기술을 이용한 미생물 신속 검출 시스템 개발 (75)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 바이오센서 보관기술이 확립되었는가 (25)</li> <li>- MEMS 센서 회로가 설계·제작되었는가 (25)</li> <li>- MEMS 센서 제작공정이 확립되었는가 (25)</li> </ul> </li> </ul>	100
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 센서의 성능시험 (100)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기지 및 미지 샘플을 이용한 센서감도 평가 (100)</li> </ul> </li> </ul>	100

### 3. 관련분야에의 기여도

- 식품 산업에 있어 병원성 미생물의 신속 측정하는 기술을 개발함으로써 유통되는 식품의 안전성을 보장하는 기술을 확보함
- 식중독균 신속 검출을 위한 임피던스 바이오센서 개발
- 병원성 미생물 검출 기술의 자동화로 수출입 농산물의 신속한 검사로의 가능성 제시
- 식품의 원료가 되는 농·수·축산물의 생산 및 이동 경로 추적 체계 가동에 의한 안전한 원료 공급 체계 확립
- 임피던스 바이오센서의 표면화 기술 개발로 인한 의료 및 기타 분야에서의 진단 장비 및 진단 kit로의 적용 가능성 제시
- 유통중인 식품의 안전성 향상으로 생산물의 수익증대
- 식품공정에서 오염의 조기진단 및 확산방지를 통한 경제적 손실 감소
- 위생적이고 안전한 농산물의 보급으로 국민건강증진 및 안전한 먹거리의 안정 공급 및 소비 촉진
- 식품생산공정에서 병원성 미생물 감염의 조기진단 및 확산방지를 통한 경제적 손실을 감소하고, 유통중인 식품의 안전성 향상으로 소비자의 만족도를 높여 생산물의 수익을 증대
- 항원·항체 반응을 이용한 병원성 미생물 신속 측정기술 등의 특허권 취득 예정

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

\* 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술

\* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

### 1. 추가 연구의 필요성

- 단백질 원료 이외의 채소류(시금치)내의 Salmonella의 정성·정량 검출이 가능하였으므로, 이후의 연구에서는 미조리되어 소비자에게 공급되는 신선 편이 식품에 대한 Salmonella 검출 성능 평가 연구가 필요함.
- 바이오센서 검출 기술의 간편화를 위한 시료 전처리 기술의 자동화 연구가 요구됨.
- 식품내의 다른 식중독균 (황색포도상구균, 비브리오균, 대장균 등)의 빈번하게 식중독의 원인균으로 발생하는 세균에 대한 임피던스 바이오센서의 추가기술 개발이 기대됨.
- 현재 개발된 임피던스 센서의 효율성과 간편성, 휴대성을 증진시킬 수 있는 소형화 장비 개발.

### 2. 타 연구에의 응용

- Salmonella 검출을 위하여 임피던스 바이오센서의 표면에 항원·항체 반응을 확립함으로써, 기타 다른 미생물의 신속 측정 기술 등에 활용이 기대됨.
- 임피던스 바이오센서를 이용한 Ready-to-Eat Food / 신선편이식품에서의 *Escherichia coli* O157:H7 검출 기술 개발
- 임피던스 바이오센서를 이용한 Ready-to-Eat Food에서의 *Listeria monocytogenes* 검출 기술 개발
- 임피던스 바이오센서를 이용한 영·유아용 식품에서의 *Escherichia sakazakii* 검출 기술 개발

### 3. 기업화 추진방안

- 산업재산권 출원 : 2007년
- 기술이전 : 2007년
- 업체 실용화 및 현장보급 : 2008년

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- ▣ 임피던스 전극의 형태, 주요 구조
- ▣ 임피던스 전극 제조를 위한 반도체 공정
- ▣ 바이오센서 전극 표면 처리 방법
- ▣ 바이오센서 검출부의 항체 고정화 방법
- ▣ 검출부 항체의 적정 보관 및 버퍼 치환 방법
- ▣ 박테리아의 전기적 특성
- ▣ 바이오센서 센서 세척 방법
- ▣ 바이오센서 검출부의 재생 방법
- ▣ 전기적 잡음 최소화를 위한 임피던스 바이오센서 전극과 측정기의 연결 방법

## 제 7 장 참고문헌

1. M. C. Easter, D. M. Gibbson, 1985. Rapid and automated detection of Salmonella by electrical measurements, *J. Hygiene* **94**: 245-262.
2. D. Gibson. 1987. Some modification to the media for rapid automated detection of Salmonella by conductance measurement, *J. Appl. Bact.* **63**: 299-304.
3. L. Yang, C. Ruan, Y. Li, 2003. Detection of viable *Salmonella typhimurium* by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance. *Biosensors and Bioelectronics* **19**: 495-502.
4. L. Yang, Y. Li, C.L. Griffis, M.G. Johnson. 2004. Interdigitated microelectrode (IME) impedance sensor for the detection of viable *Salmonella typhimurium*, *Biosensors and Bioelectronics* **19**: 1139-1147.
5. J. G. Guan, Y. Q. Miao, Q. J. Zhang. 2004. Review: Impedimetric biosensors, *J. of Biosci. and Bioengr.* **97**:4, 219-226.
6. S. M. Radke, E. C. Alocilja. 2005. A high density microelectrode array biosensor for detection of *E. coli* O157:H7, *Biosensors and Bioelectronics* **20**: 1662-1667.
7. G. H. Kim, A. G. Rand, S. V. Letcher. 2003. Impedance characterization of a piezoelectric immunosensor part II: *Salmonella typhimurium* detection using magnetic enhancement. *Biosensors and Bioelectronics* **18**: 91-99.
8. V. Gerwen, P. Laureyn, W. Layreys, 1998. Nanoscale interdigitated electrode arrays for biochemical sensor. *Sensors and Actuators B.* **49**: 73-80.
9. R. Gomez, R. Bashir, A. K. Bhunia. 2002. Microscale electronic detection of bacterial metabolism. *Sensors and Actuators B* **86**: 198-208.
10. 강지현, 이영덕, 정기창, 박종현. 2001. 집단급식용 생계육에서 분리된 *Salmonella*의 항생제 내성과 위생 처리제의 영향. *한국식품영양과학회지* **33**:5, 582-588.
11. 김묘영, 이현승, 김윤지, 이종경, 오세욱, 송양훈. 2006. 조리시 가열시간, 온도 및 돈육 두께가 돈육에 오염된 미생물 수준에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*. **38**:3 456-459.
12. 김민성, 신규철, 이형구, 한명수, 민병례, 최영길. 2003. Reverse dot hybridization 방법과 16S rRNA gene(16S rDNA)을 이용한 식품에서 식중독균의 탐색. *Korean J. Food Sci. Technol* **35**:3, 470-474.
13. 박두현, 류혜정, 강혜선, 박형수, 김무훈, 2003. 질산염환원세균, 아질산염산화세균, 암모니움염산화세균으로부터 분리한 효소의 전기화학반응을 이용한 질산염, 아질산염, 암모니움염 측정용 바이오센서의 제작. *J. of the Korean Society for Environmental Anlysis* **6**:1, 35-40.
14. 정상훈, 김묘영, 김현중, 김태운, 유상렬, 김혜영. 2003. PCR을 이용한 식품내 *Salmonella* 균주의 신속 검출방법. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**:3, 225-228.
15. 조용진, 김남수. 2003. 티올화 항체고정형 SPR 바이오센서를 이용한 미생물 인식. *한국농업기계학회지*. **28**:2. 167-172.



16. A. Agarwal, A. Makker, S.K. Goel. 2002. Application of the PCR technique for a rapid, specific and sensitive detection of *Salmonella* spp. in foods. 2002. *Molecular and Cellular Probes*. **16**: 243-250.
17. B.M. Caselunghe, J. Lindeberg. 2000. Biosensor-based determination of folic acid in fortified food. *Food Chemistry*. **70**:4, 523-532.
18. C.N. Burnette, K.S. Yoon. 2004. Comparison of growth and survival kinetics of *Salmonella typhimurium* and *Campylobacter jejuni* on cooked chicken breast stored under aerobic conditions at various temperatures. *Food Science & Biotechnol.* **13**:6 796-800
19. D.R. Shankaran, K. V. Gobi, N. Miura. 2006. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. *Sensors and Actuators B*. XXX: XXX-XXX.
20. E. Thomas, A. Bouma, E. van Eerden, W.J. Landman, F. van Knapen, A. Stegeman, A.A. Bergwerff. 2006. Detection of egg yolk antibodies reflecting *Salmonella enteritidis* infections using a surface plasmon resonance biosensor. *J. Immunol Methods*. **31**:315, 68-74.
21. FDA. Recall - Firm Press Release. 2006. 7. 31.
22. G. Jenov, J. Pazlrov, K. Demnerov. 2000. Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. *International Microbiol.* **3**: 225-229.
23. G. Kim, M.W. Lee, K.J. Lee, C.H. Choi, K.M. Noh, S. Kang, Y.C. Chang. 2005. Identification of *Salmonella* pathogen using electronic nose. *J. of Biosystems. Eng.* **30**:2. 121-126.
24. H. Peng, L.A. Shelef. 2001. Automated simultaneous detection of low levels of listeriae and *Salmonellae* in foods. *International J. of Food Microbiology*. **63**: 225-233.
25. I.S. Park, N.S. Kim. 1999. Rapid Detection of *Salmonella* spp. by antibody immobilization with Gold-protein A complex. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**:1 1-6.
26. I.S. Park, W.Y. Kim, N.S. Kim. 1998. Rapid detection of *Salmonella* spp. by antibody-immobilized Piezoelectric crystal biosensor. *J. Fd Hyg. Safety* **13**:3 206-212.
27. J.R. Patel, A.A. Bhagwat, G.C. Sanglay, M. B. Solomon. 2006. Rapid detection of *Salmonella* from hydrodynamic pressure-treated poultry using molecular beacon real-time PCR. *Food microbiology*. **23**: 39-46.
28. K.H. Seo, R.E. Brackett, N.F. Hartman, D.P. Campbell. 1999. Development of a rapid response biosensor for detection of *Salmonella typhimurium*. *J. of Food Protection*. **62**:5 431-437
29. K.S. Cudjoe, R. Krona. 1997. Detection of *Salmonella* from raw food samples using Dynabeads(R) anti-*Salmonella* and a conventional reference method. *International J. Food Microbiology* **37**:1, 55-62.
30. O. Lazcka, F. Javier Del Campo, F. Xavier Munz. 2006. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. XXX: XXX-XXX.

31. R. Guntupalli, J. Hu, Ramji S. Lakshmanan, T.S. Huang, James M. Barbaree, Bryan A. Chin. 2007. Detection of *Salmonella typhimurium* in fat free milk using a phage immobilized magnetoelastic sensor. *Biosensors & Bioelectronics* **22**: 1474-1479
32. R. Guntupalli, R. S. Lakshmanan, M. L. Johnson, J. Hu, T.S. Huang, J. M. Barbaree. V.J. Vodyanoy, B.A. Chin. Magnetoelastic biosensor for the detection of *Salmonella typhimurium* in food products. 2007. *Sens. & Instrumen. Food. Qual.* **1**: 3-10.
33. S. Babacan, P. Pivarnik, S. Letcher, A. Rand. 2002. Piezoelectric flow injection analysis biosensor for the detection of *Salmonella typhimurium*. *J. of Food Science.* **67**:1. 314-320
34. Science Daily. Rapid detection of *Salmonella* from grocery Ready to Eat Foods. 2005. 7. 14.
35. Science Daily. Detection of *Salmonella* in 24 hours. 2007. 2. 9.
36. S.J. Favrin, S.A. Jassim, M.W. Griffiths. 2003. Application of a novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for the detection of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in food. *International J. of Food Microbiology.* **25**: 63-71.
37. L.C. Shriver-Lake, S.Turner, C.R. Taitt. 2006. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 spiked into food matrices. *Analytica Chimica Acta.* XXX: XXX-XXX.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.