

리스테리아 식중독균 검출을 위한 광학식 바이오센서 개발

김기영 최규홍

Development of a Fiber-Optic Biosensor for the Detection of *Listeria monocytogenes*

G. Kim K. H. Choi

Abstract

Frequent outbreaks of foodborne illness demand the need for rapid and sensitive methods for detection of these pathogens. Recent development of biosensor technology has a great potential to meet the need for rapid and sensitive pathogens detection from foods. An antibody-based fiber-optic biosensor and an automated reagents supply system to detect *Listeria monocytogenes* were developed. The biosensor for detection of *Listeria monocytogenes* in PBS and bacteria spiked food samples was evaluated. The automated reagents supply system eliminated cumbersome sample and detection antibody injection procedures that had been done manually. The biosensor could detect 10^4 cfu/ml of *Listeria monocytogenes* in PBS. By using the fiber-optic biosensor, 2×10^8 cfu/ml of *Listeria monocytogenes* in the food samples were detectable.

Keywords : Fiber-optic biosensor, *Listeria monocytogenes*, Food safety

1. 서 론

리스테리아 모노사이토제니스(*Listeria monocytogenes*)는 주요 식중독균의 하나로서 치사율이 높아 주의 깊은 관리와 예방이 요구되고 있다. 리스테리아 모노사이토제니스는 그람 양성의 세포내 기생세균으로 막대모양이며, 1~44°C에서 성장하는 저온세균으로서 감염형 식중독을 일으킨다. 이 균은 건강한 사람의 경우에 증상이 없거나 가벼운 열, 복통, 설사, 구토, 두통 등을 일으키지만, 면역력이 약한 노약자나 임신부의 경우 폐혈증, 뇌수막염 또는 유산을 일으킬 수도 있다. 이 식중독균은 토양, 목초, 동물의 분변, 사일리지, 물 등 자연계에 흔히 존재하며, 식중독 원인식품은 주로 치즈, 우유등과 관련된 낙농제품과 아이스크림, 생선, 육류 등 다양하다. 이 균은 최근 들어 미국에서 발생한 대규모 식중독 사건들에 의해 대중들의 관심을 받게 되었고, 더 이상 요리를 하지 않고 먹는 간편조리 식품의 소비가 늘어나면서 이 균으로 인한 식중독 발생 위험성이 더 커지게 되었다(CDC, 2002).

리스테리아 모노사이토제니스로 인한 식중독 발생 위험을 감소시키기 위해서는 이 식중독균의 신속한 검출이 필수적이지만, 표준평판법을 비롯한 기존의 검출 방법은 오랜 시간이 소요되는 몇 차례의 배양단계가 필요하다. 검출시간을 단축 시킬 수 있는 Elisa 키트를 비롯한 몇 가지 면역학적 방법들이 개발되었지만, 이 방법들 역시 18~48 시간이 소요되는 배양단계를 필요로 한다.

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

This study was conducted by the international research fund supported by Rural Development Administration (RDA). The article was submitted for publication in March 2006, reviewed and approved for publication by the editorial board of KSAM in April 2006. The authors are Giyoung Kim, KSAM member, junior researcher, Kyu Hong Choi, senior researcher, National Institute of Agricultural Engineering, RDA. The corresponding author is Giyoung Kim, junior researcher, National Institute of Agricultural Engineering, RDA, Suwon, Korea 441-100; E-mail : <giyoung@rda.go.kr>

있다.

광섬유 바이오센서는 빛이 투과할 수 있고 끝 쪽으로 가늘어 지는 광섬유를 통해 여기레이저광을 보내고, 센서 표면의 형광염료가 부착된 향체가 일으키는 형광을 받아들인다. 레이저에 의해 생성된 에버네슨트파(evanescent wave)에 의해 발생된 형광은 광섬유 표면에 가까이 붙어있는 형광표지자의 양과 관련이 있다(Marazuela 등, 2002).

이와 같은 검출원리에 의해 Donaldson 등(2004)은 생물학적 테러 위협을 조기에 발견하기 위해 천연두를 일으키는 백시니아(Vaccinia) 바이러스를 광섬유 바이오센서를 이용하여 2.5×10^5 pfu/ml의 농도까지 검출할 수 있었으며, Anderson 등(1999)은 무인헬기에 설치된 세균 포집장치와 광섬유 바이오센서를 이용하여 공기 중의 바실리아(Bacillus globigii) 균을 검출하였다.

식품안전성과 관련이 있는 식중독균을 검출하는 연구로는 DeMarco 등(1999)이 인체에 치명적인 *Escherichia coli* O157:H7 균을 광섬유 바이오센서를 이용하여 검출하였으며, Tims와 Lim(2003)도 같은 형태의 바이오센서를 이용해서 *Escherichia coli* O157:H7 균을 검출한 뒤 PCR 방법의 결과와 비교하여 균의 검출 가능성을 보여주었다. 또한, 식중독 사고 발생빈도가 높은 *Listeria monocytogenes*와 *Salmonella enteritidis* 도 Bhunia 등(2004)이 광섬유 바이오센서를 이용하여 검출할 수 있었다. Tims 등(2001)은 광섬유 바이오센서를 이용하여 리스테리아 균 검출을 위한 연구를 수행한 바 있으나 향체의 성능 때문에 만족할 만한 검출 결과를 얻을 수 없었다.

이와 같이 광섬유 바이오센서를 이용하여 몇 종류의 식중독균 검출에 관한 연구가 수행된 바 있으나 아직 시작단계에 있으며, 발생빈도는 많지 않지만 피해의 심각성이 큰 리스테리아 균의 검출을 위한 연구는 거의 찾아볼 수 없다. 농산물의 안전성을 높이기 위해서는 유해 식중독균인 리스테리아균을 신속히 검출할 수 있는 측정방법이 요구되며, 따라서 이 연구는 리스테리아 모노사이토젠 식중독균을 신속하게 측정할 수 있는 광섬유 바이오센서를 개발하기 위하여 수행되었다.

2. 재료 및 방법

가. 광섬유 바이오센서 설계

광섬유 바이오센서의 측정원리는 그림 1과 같다. 센서 좌측의 렌즈를 통하여 635 nm의 레이저 광이 광섬유 내부로 보내지면, 광을 가두어두는 클래딩(cladding)이 제거된 센서 표면을 통하여 일정 높이까지 에버네슨트파가 도달하게 된다. 이 에버네슨트파는 센서 표면에 부착된 형광물질에 에너지를 전

달하여 형광을 일으킨다. 발생된 형광은 다시 광섬유 내부로 들어와 센서 렌즈부에 맞닿아 있는 광검출기로 전달되어 전기적 신호를 발생시킨다.

실험에 사용된 광섬유는 길이 4 cm, 직경 0.8 mm의 폴리스티렌(polystyrene) 재질로서 Research International사(Monroe, WA, USA)로부터 구입하여 사용하였다(그림 2). 광섬유 바이오센서를 만들기 위해 우선 준비된 광섬유의 렌즈 반대쪽 끝을 스크린프린터용 검정색 잉크를 칠하여 입사된 다량의 레이저광이 광섬유 밖으로 빠져나가 산란을 일으키는 것을 방지하였다. 잉크를 칠한 다음 24시간이 경과하여 잉크가 충분히 마른 후, 광섬유 표면을 깨끗하게 만들기 위하여 50%의 이소프로파놀(Isopropanol) 용액에 광섬유를 담가 초음파 세척기로 세척한 다음 클린벤치에서 24시간 동안 건조시켰다.

광섬유의 표면에 리스테리아균을 검출할 수 있는 분자식별 부를 형성시킴으로써 바이오센서가 만들어지게 되는데, 그림 3은 바이오센서의 완성과정을 나타낸다. 첫 번째 단계로서, 리스테리아균 포획용 1차항체를 광섬유의 표면에 고정시키기 위해 100 µg/ml의 스트렙트아비딘이 용해된 PBS (phosphate buffered saline) 용액에 광섬유를 4°C에서 18~24시간 담가두는 방법으로 스트렙트아비딘층을 형성시켰다. 다음 단계의 항체고정화 작업전에 불필요한 스트렙트아비딘을 PBS-Triton(0.05% Triton X-100을 함유한 0.02 M PBS) 세척액을 이용하여 3회 씻어 내었다. 이 후 각 고정화 단계 사이에 마찬가지 방법으로 불필요한 물질들을 세척하였다. 두 번째 단계에선 스트렙트아비딘이 부착되지 않은 광섬유 표면의 빈 공간을 메우기

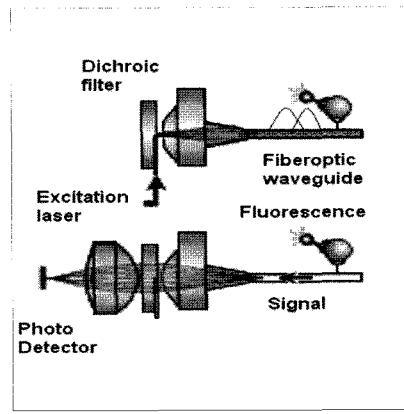


Fig. 1 Principle of fiberoptic biosensor.



Fig. 2 Fiberoptic

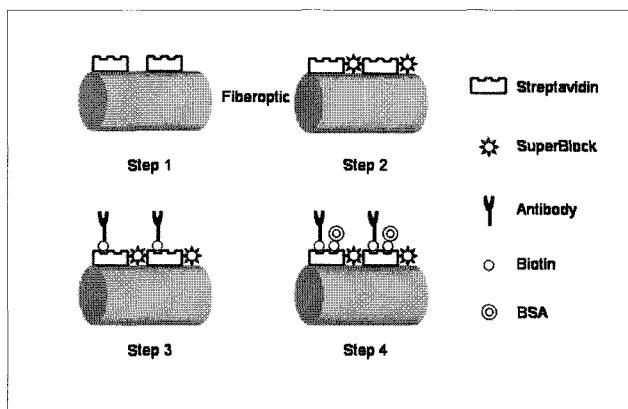


Fig. 3 Capture antibody immobilization process.

위하여 SuperBlock(Pierce, Rockford, USA) 용액에 광섬유를 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 세 번째 단계에선, 바이오텐(biotin)이 부착된 1차항체의 농도가 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 PBS용액에 광섬유를 상온에서 1시간 동안 담가두어 리스테리아균을 포획할 수 있는 바이오텐이 부착된 1차항체를 스트렙트아비딘에 부착시켰다. 스트렙트아비딘의 비어있는 반응영역에 원하지 않는 표지물질이 부착되어있는 것을 방지하기 위하여 네 번째 단계에서 광섬유를 1 mg/ml 의 bBSA(biotinylated bovine serum albumen) 용액에 상온에서 1시간 동안 담가두어 광섬유 바이오센서를 완성하였다. 바이오센서 제작에 필요한 이소프로파놀, 스트렙트아비딘, PBS, Triton X-100, 바이오텐 등의 시약은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

나. 검출항체 주입 자동화장치

리스테리아균 검출실험을 위해선 완성된 광섬유 바이오센서는 그림 4와 같이 빛이 통과하지 않는 센서홀더에 설치하고, 시료와 형광표지물질이 부착된 검출용 2차항체를 순차적으로 센서홀더에 일정부피만큼 주입시켜준다. 또한, 시료 주입과 검출항체 주입사이, 그리고 검출항체 주입 후에 PBS 용액을 이용하여 바이오센서를 세척하여 준다. 이러한 일련의 과정에서 검출항체의 주입량에 따른 신호변위를 줄이고, 반복적인 주입작업으로 인한 시간과 노동력을 줄이기 위하여 본 연구에서는 검출항체를 일정량만큼 자동으로 주입시켜주는 장치를 개발하여 사용하였다. 주입 자동화장치는 그림 5처럼 마이크로펌프(120SP, Bio-chem valve, New Jersey, USA)를 이용하여 검출항체 저장용기로부터 200 μl 의 검출항체를 센서홀더로 주입하였다. 자동화장치의 동작은 펌프제어기(Solenoid controller, Cole Parmer, USA)와 제어용 퍼스널컴퓨터에 의해 이루어지며, 자동화장치의 제어 프로그램은 Labview 6 소

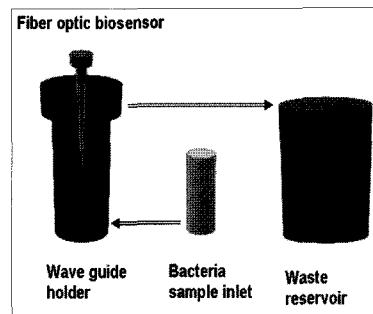


Fig. 4 Fiberoptic biosensor module

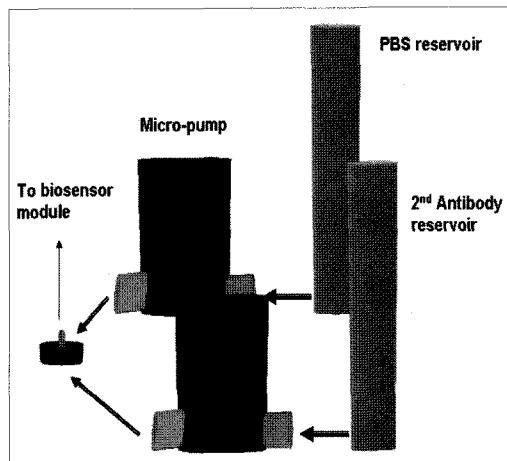


Fig. 5 Detection antibody immobilization automation device

프트웨어(National Instrument, USA)를 이용하여 작성하였다.

다. 실험방법

리스테리아균 검출 실험은 분자식별부 고정화 공정을 통해 완성된 바이오센서를 이용하여 샌드위치 측정방법으로 수행하였다. 실험을 위하여 광섬유 바이오센서를 검출항체 주입 자동화장치의 센서홀더에 설치하고 PBS 용액으로 1회 세척한 다음 여기레이저광을 조사하여 센서만의 신호를 측정하였다. 레이저광의 발생과 검출에는 635 nm의 여기레이저를 발생시키고 650~680 nm의 형광을 측정할 수 있는 상용 레이저 발생 및 검출기(Aalyte 2000, Reserach International, USA)를 이용하였다.

그 다음 바이오센서의 기준신호를 측정하기 위하여, 형광 표지자가 붙은 검출항체 200 μl 를 센서홀더에 넣고 상온에서 5분이 지난 후 PBS 버퍼로 3회 세척하였다. 센서를 세척한 다음 레이저광을 가하면서, 항원(리스테리아균)이 없는 상태에서 센서에 부착된 검출항체의 형광표지자가 발생하는 형광을 10초 동안 측정하여, 그 평균값을 센서의 기준신호로 정하였다.

센서의 기준신호를 얻고 나서, 시료를 센서홀더에 주입하고 포획용 1차항체와 시료에 들어있는 항원이 결합할 수 있도록 10분 동안 상온에서 배양하였다. 항원-항체 반응이 끝나면 PBS 용액으로 3회 세척하여 포획항체에 결합되지 않고 남아있는 항원을 모두 배출시켰다.

샌드위치 측정방법의 마지막 단계로서, 형광표지자가 부착된 검출용 2차항체를 센서홀더에 주입하고 5분간 상온에서 배양하여, 센서에 부착된 항원과 2차항체가 결합할 수 있도록 하였다. 검출용 2차항체가 센서에 부착된 다음, 레이저광을 가하여 발생하는 형광신호로부터 얻어진 전기적인 신호를 측정하였다. 최종적으로, 마지막 단계에서 측정된 전기적인 신

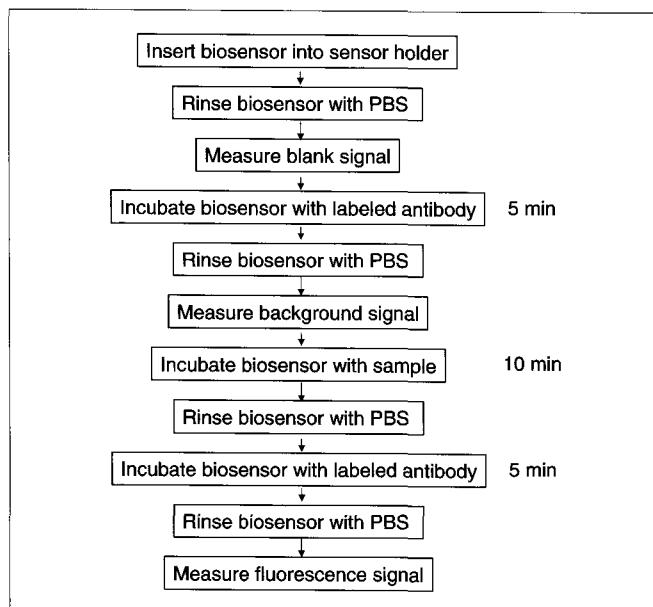


Fig. 6 Flowchart of fiber-optic biosensor sandwich assay.



Fig. 7 Fiber-optic biosensor measurement system (from left, control computer, Analyte 2000, reagents immobilization automation block, pump controller).

호에서 기준신호를 뺀 값을 리스트리아균 검출실험 분석에 이용하였다. 그림 6과 7에 실험의 순서도와 실험장치를 나타내었다.

4. 박테리아와 배지

광섬유 바이오센서를 이용한 리스트리아 검출 실험은 각각 다른 농도의 리스트리아균에 대한 광섬유 바이오센서의 신호를 분석하는 방식으로 수행하였다. 실험에 사용된 세균은 우유에서 분리된 *Listeria monocytogenes* strain V7(Purdue Uni., IN, USA)을 이용하였다. 장기간의 보관을 위하여 BHI(Brain heart infusion) 배지에 든 상태로 25°C에서 보관중인 리스트리아균을 실험을 위해 37°C에서 16시간 배양하여 활성화 시킨 다음 이후 실험에 이용하였다. 리스트리아균의 농도는 분광광도계(DU-640, Beckman-Coulter, USA)를 이용하여 약 10^9 cfu/ml로 조정한 다음, PBS 용액에 10배씩 희석하여 실험에 이용하였다.

실제 식품시료 속에 오염된 리스트리아 식중독균의 검출성능 시험은 시중에서 구입한 구운 쇠고기(Roasted beef) 및 볼로나(Bologna)를 대상으로 수행하였다. 식품시료는 페두대에서 개발한 식품시료 신속전처리기로 식품잔유물이 여과된 추출물을 얻고 나서 이 추출물에 리스트리아균을 인위적으로 접종하는 방법으로 준비하였다.

5. 항체와 형광표지자

포획용 1차항체는 보다 많은 리스트리아균을 바이오센서 표면에 부착시키기 위해서 토끼에서 채취한 다클론항체인 LiteriaPAb(Purdue university, IN, USA)를 사용하였다. 형광물질을 부착하여 검출에 사용되는 2차항체는 높은 선택성으로 *Listeria monocytogenes*에만 결합되도록 쥐세포에서 채취한 단클론항체인 C11E9(Purdue university, IN, USA)를 사용하였다. 실험에 사용하기 전에 다클론항체는 단백질 A 칼럼, 다클론항체는 단백질 G 칼럼을 이용하여(ActaPrime; Pharmacia-Amersham, Sweden) 정제한 뒤 농도를 2 mg/ml로 조정하였다. 바이오센서를 이용한 리스트리아균 검출실험을 하기 전에, 1차항체와 항원 그리고 항원과 항체가 제대로 반응하는지를 96홀 폴리스티렌 플레이트를 이용한 효소면역 측정법으로 확인하였다. 또한 연속된 농도별로 희석된 항체의 반응 실험을 통하여 항체의 적정농도를 결정하였다.

리스트리아균의 유무를 알려주는 형광표지자로는 Cy-5 염료(Amersham Biosciences, USA)를 사용하였고, 염료 제조사에서 제공한 다음과 같은 방법에 따라 2차항체에 부착하였다(Tims와 Lim, 2003).

1차항체의 바이오틴은 NHS-LC-Biotin(Pierce, USA)를 이용하여 다음과 같은 과정을 통하여 부착하였다. 첫 번째 단계로 1mg의 바이오틴을 1 ml의 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해시킨 다음, 이중 75 μ l를 취하여 1 mg의 1차항체가 들어 있는 1ml의 카보네이트-바이카보네이트 버퍼에 첨가하였다. 두 번째 단계에서 이 용액을 얼음용기에 2시간동안 담가두어 바이오틴을 1차항체에 부착시켰다. 마지막 단계에선 부착되지 않은 바이오틴을 컬럼크로마토그래피(PD-10, Amersham biosciences, USA)를 이용하여 제거하였다.

비. 원자힘 현미경(AFM, AFM) 분석

광섬유 바이오센서의 분자식별부가 제대로 기능을 하는지 확인하기 위하여 원자힘 현미경(MFP-3D, Asylum Research, USA)을 이용하여 센서의 표면을 분석하였다. AFM 측정은 생물시료 분석용 텁인 Bio-Lever 캘릴래버를 이용하여 AC 모드에서 70 kHz의 주파수로 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 적정 항체농도 결정

항체를 낭비하지 않으면서도 바이오센서의 높은 반응신호를 얻기 위하여 1차항체와 2차항체의 적정농도를 구한 결과를 그림 8과 9에 나타내었다. 그림 8은 폴리스티렌 재질의 바이오센서 표면에 고정되어 리스테리아균을 포획하는 1차항체를 스트렙트아비단이 코팅된 폴리스티렌 재질의 96 well 플레이트에 부착시키고, 10^9 cfu/ml의 리스테리아균을 배양 및 세척한 다음 부착된 세균으로 인한 흡광도 변화를 측정한 결

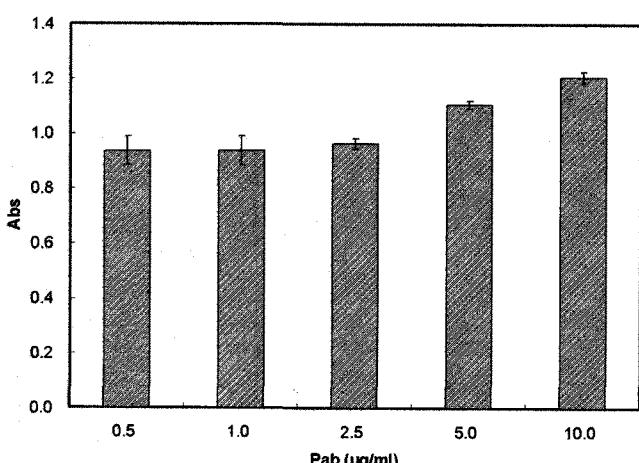


Fig. 8 Determination of an optimum concentration of polyclonal antibody to capture *Listeria monocytogenes*.

과이다. 그림 8에서 보듯이 10 μ g/ml의 농도에서 가장 많은 세균을 포획하는 것으로 나타나, 이 농도를 이후 바이오센서 분자식별부 제작에 사용하였다.

그림 9는 폴리스티렌 재질의 플레이트에 리스테리아균을 부착시키고, 형광표지자가 결합된 2차항체를 반응시킨 다음 흡광도를 측정한 결과로서 5 μ g/ml의 농도에서 가장 많은 검출항체가 세균에 부착되는 것으로 나타났다. 경제성과 검출 신호 향상을 위하여 이 농도의 검출항체를 이후 바이오센서를 이용한 세균 검출 실험에 이용하였다.

나. PBS 버퍼에서의 리스테리아균 검출

PBS버퍼에 접종된 순차적으로 증가하는 농도의 리스테리아균에 대한 광섬유 바이오센서의 반응을 그림 10에 나타내었다. 리스테리아균의 농도가 높아질수록 바이오센서 표면에 포획되는 리스테리아균의 수가 증가하고, 그에 따른 센서표면의 형광물질 증가로 인하여 바이오센서의 신호가 증가하였다. 리스테리아균이 접종되지 않은 시료의 신호를 세 번 연속으로 측정한 다음, 이 값들의 표준편차를 세 배하여 계산하는 방식으로 구한 검출한계는 123.4 pA였다. 검출한계보다 큰 신호를 발생시키는 리스테리아균의 농도는 10^4 cfu/ml로서, 광섬유 바이오센서를 이용하여 PBS 용액에 들어있는 10^4 cfu/ml 이상의 리스테리아균을 검출할 수 있는 것으로 나타났다. 실험은 네 개의 바이오센서에 낮은 농도에서 높은 농도로 준비된 시료를 순차적으로 주입하면서 신호를 측정하였으며, 3반복 실험에 대한 표준오차를 오차막대로 그림에 나타내었다.

시료 속의 리스테리아균이 증가하면서 바이오센서에서 얻어진 신호도 따라서 증가하는 것이 non-specific binding에 의한 신호의 증가가 아니라, 리스테리아균에 의한 반응이 맞는지를 확인하기 위하여 10^7 및 10^9 cfu/ml의 두 가지 농도의

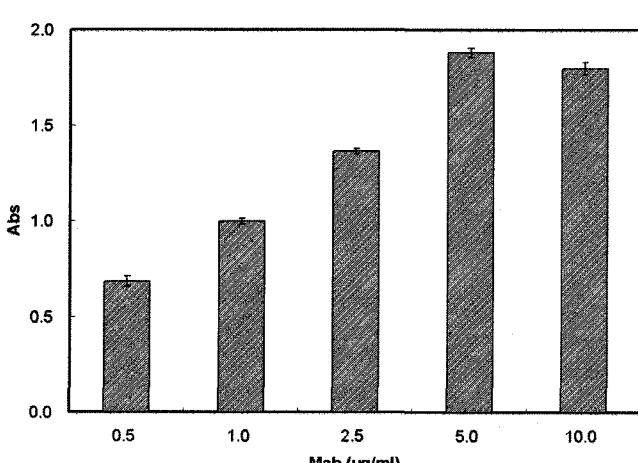


Fig. 9 Determination of an optimum concentration of monoclonal antibody to bind *Listeria monocytogenes*.

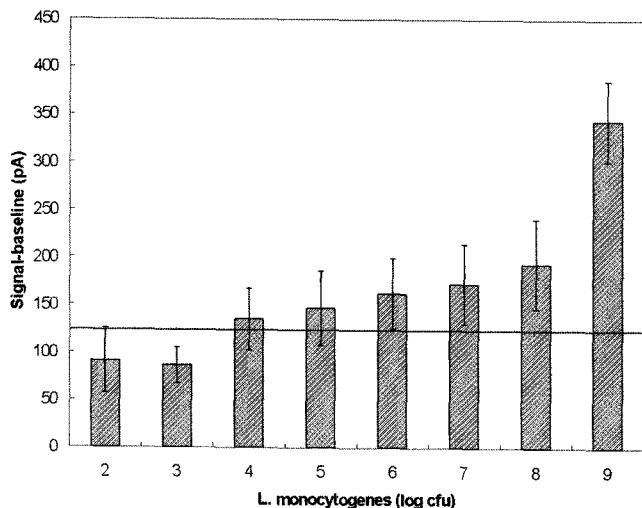


Fig. 10 Response of biosensor for different concentrations of *L. monocytogenes*. The line shows detection limit (123.4 pA).

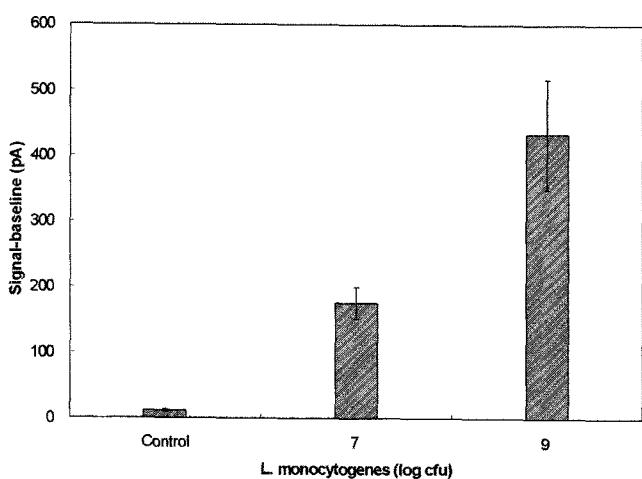


Fig. 11 Detection of *L. monocytogenes* in PBS buffer.

시료를 이용하여 또 다른 실험을 수행하였다. 두 실험에서 얻어진 10^7 cfu/ml 시료에 대한 반응이 172.3 및 175.9 pA, 10^9 cfu/ml 시료에 대한 반응이 343.4 및 433.6 pA로 나타나 이 같은 신호증가가 리스테리아균의 농도변화에 기인한 것임을 확인할 수 있었다(그림 11).

다. 오염된 식품시료에서의 리스테리아균 검출

실제 식품시료 속에 오염된 리스테리아 식중독균의 검출성능 실험결과, 구운 쇠고기와 볼로냐의 추출물에 접종된 2.4×10^8 cfu/ml 의 리스테리아균을 검출할 수 있었다(그림 12). 각 시료별로 3개의 바이오센서를 이용한 검출실험 결과 3개 바이오센서의 평균값으로 리스테리아균의 오염여부를 검출할 수 있었지만, 구운 쇠고기의 경우 하나의 센서에서 검출오류가 발생하였으며, 각 센서의 반응신호가 균일하게 나타나지 않

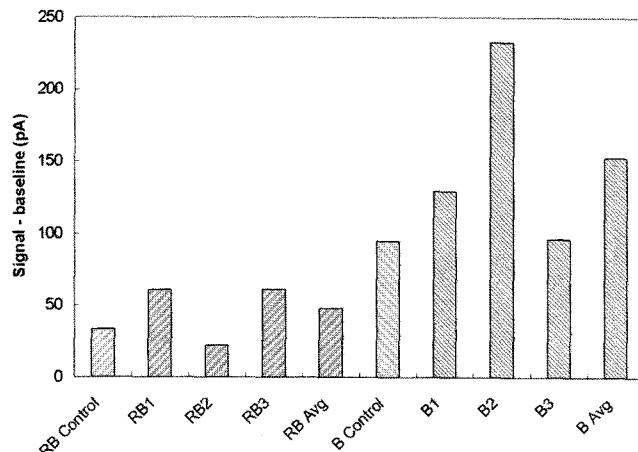


Fig. 12 Detection of *L. monocytogenes* (2×10^8 cfu/ml) in roast beef (RB) and bologna (B) matrix.

았다.

이러한 센서간 신호차이는 광섬유 제조과정에서 생기는 센서 표면의 금침, 요철, 결함 등의 물리적 요인과 항체에 결합되는 바이오판이나 Cy-5 형광표지자의 양이 균일하지 못한 생화학적 요인 때문인 것으로 알려져 있다(Bhunia 등, 2004). 보다 균일한 센서반응을 얻기 위해서는 센서 제조공정 및 여러 가지 항체고정화 관련 물질들의 부착 공정에 대한 표준화 연구가 필요할 것으로 판단된다.

라. AFM 영상

바이오센서를 이용하여 식중독균이 들어있는 시료를 진단한 다음 원자힘현미경을 이용하여 바이오센서의 표면을 분석 한 결과, 높은 측정신호를 발생시킨 식중독균 농도가 높은 시료로 실험을 한 바이오센서의 표면에 식중독균이 부착되어 있음을 확인할 수 있었다(그림 13, 그림 14). Bhunia 등 (2004)의 주사전자현미경 분석결과에 따르면 표면에 부착되어 검출되는 세균의 수는 바이오센서가 담긴 배양용기 내에 들어있는 세균수의 대략 10%인 것으로 알려져 있으며, 부착된 세균과 결합된 형광표지자의 형광신호를 크게 할 수 있으면 보다 적은수의 세균도 검출할 수 있을 것으로 기대된다.

광학식 바이오센서를 이용하여 리스테리아 식중독균을 신속하게 검출하기 위하여 수행된 본 연구에서, PBS 용액에 들어있는 10^4 cfu/ml 이상의 리스테리아균을 검출할 수 있는 것으로 조사되었다. 이는 대략 12시간 정도의 배양으로 얻을 수 있는 농도로서, 기존 식중독균 검사 방법에 소요되는 3~5일 보다 훨씬 짧은 시간 내에 리스테리아균 오염을 검출할 수 있는 결과이다. 하지만 실제 식품시료를 이용한 검출 실험결과, 높은 농도의 리스테리아균이 있어야지만 검출이 가능하였는

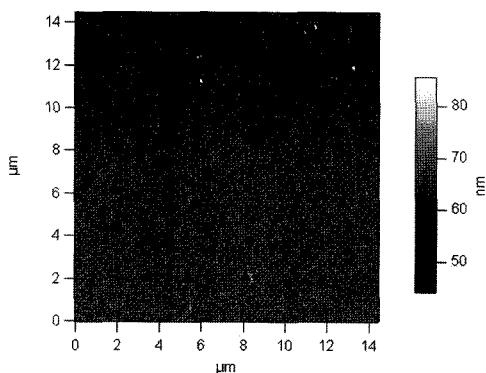


Fig. 13 AFM image of an unused fiber-optic biosensor. Small particles in the image are immobilized antibodies and BSA.

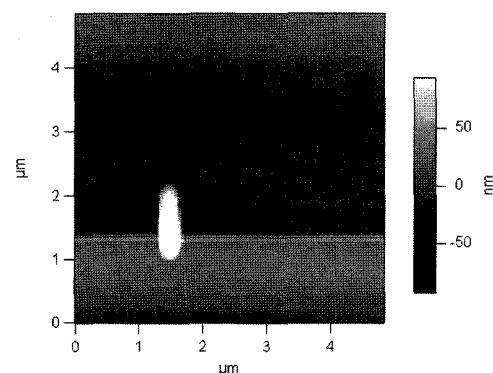


Fig. 14 AFM analysis of fiber-optic biosensor with a captured *L. monocytogenes* cell. A *L. monocytogenes* cell was observed on the surface of the used fiber-optic biosensor.

데 이는 식품시료에 들어있는 여러 가지 식품내용물과 다른 미생물들이 바이오센서의 항원·항체 반응을 방해하기 때문인 것으로 판단되었다.

4. 요약 및 결론

리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*)는 주요 식중독균의 하나로서 치사율이 높아 주의 깊은 관리와 예방이 요구되고 있다. 리스테리아균으로 인한 식중독 사고 발생 위험을 감소시키기 위해서는 이 식중독균의 신속한 검출이 필수적이지만, 기존의 검출 방법은 오랜 시간이 소요되는 몇 차례의 배양단계가 필요하다. 본 연구는 최근 들어 여러 분야에서 높은 활용 가능성을 보여주는 광섬유 바이오센서를 이용하여 리스테리아 식중독균을 검출하는 기술을 개발하기 위하여 수행되었다. 광섬유 바이오센서는 광섬유를 통해 조사된 레이저광에 의해 발생한 센서 표면의 형광표지자의 형광신호를 이용하여 대상물질을 검출하는 기술로서, 형광신호는 광섬유 표면에 가까이 붙어있는 항체와 결합된 형광표지자의 양과 관련이 있다. 본 연구에서는 리스테리아균을 포획할 수 있는 1차항체와 리스테리아균에 부착되어 신호를 발생시키는 2차 항체를 이용하여 바이오센서를 개발하였으며, 형광표지자로서는 Cy-5를 사용하였다. 개발된 광섬유 바이오센서를 이용하여 PBS 용액에 들어있는리스테리아균을 검출한 결과 10^4 cfu/ml 이상의 리스테리아균을 검출할 수 있는 것으로 조사되었으며, 실제 식품시료 속에 오염된 리스테리아 식중독균은 구운 쇠고기와 볼로냐 모두 2.4×10^8 cfu/ml 의 농도를 검출할 수 있었다. 개발된 바이오센서는 기존 식중독균 검사 방법보다 훨씬 짧은 시간 내에 리스테리아균 오염을 검출할 수 있는 것으로 나타났으나, 실제 식품시료의 오염환경에 적용하기 위

해서는 센서제작공정의 개선을 통한 센서신호의 표준화 및 보다 성능이 좋은 항체의 개발 등을 통한 바이오센서 성능향상을 위한 연구가 계속되어야 할 것으로 판단된다.

참 고 문 献

- Anderson, G.P., K.D. King, D.S. Cuttino, J.P. Whelan, F.S. Ligler, J.F. MacKrell, C.S. Bovais, D.K. Indyke, R.J. Foch. 1999. Biological agent detection with the use of an airborne biosensor. Field Analytical Chemistry and Technology 3(4-5): 307-314.
- Bhunia, A.K., T. Geng, A. Lathrop, A. Valadez, M.T. Morgan. 2004. Optical immunosensors for detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* from food. Proceedings of SPIE 5271: 1-6.
- CDC. 2002. Listeriosis outbreak investigation, CDC Press Release.
- DeMarco, D.R., E.W. Saaski, D.A. McCrae, D.V. Lim. 1999. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using a fiber-optic biosensor. Journal of Food Protection 62(7): 711-716.
- Donaldson, K.A., M.F. Kramer, and D.V. Lim. 2004. A rapid detection method for *Vaccinia* virus, the surrogate for smallpox virus. Biosensors and Bioelectronics 20: 322-327.
- Marazuela, M.D. and M.C. Moreno-Bondi. 2002. Fiber-optic biosensors-an overview. Anal. Bioanal. Chem. 372: 664-682.
- Tims, T.B. and D.V. Lim. 2003. Confirmation of viable *E. coli* O157:H7 by enrichment and PCR after rapid biosensor detection. Journal of Microbiological Methods 55: 141-147.
- Tims, T.B., S.S. Dickey, D.R. Demarco, D.V. Lim. 2001. Detection of low levels of *Listeria monocytogenes* within 20 hours using an evanescent wave biosensor. American Clinical Laboratory. Sep.: 28-29.