



공학석사학위논문

식품 내 살모넬라균 오염여부를 실시간으로 감지하기 위한 냄새결합단백질 유래 펩타이드 기반의 바이오센서 개발

Development of Biosensor Using Odorant Binding Protein-derived Peptide for Real-time Detection of *Salmonella* Contamination in Food

2015년 2월

서울대학교 대학원 공과대학 화학생물공학부 강 진 경

요약 (국문초록)

살모넬라균은 식중독을 일으키는 주요 원인 중의 하나로 식품을 통해 사람에게 감염된다. 감염 시 발열, 구토, 설사 등의 증상이 나타나게 되 고, 심한 경우 사망에 이르게 된다. 이러한 살모넬라균에 오염된 식품을 감지하기 위해 다양한 방법이 사용되었으나 낮은 민감도로 인해 실효성 을 가지기 어려웠다.

본 연구에서는 높은 민감도와 선택도로 살모넬라균에 오염된 식품의 지시물질인 휘발성 유기 화합물 (volatile organic compound, VOC) 3-methyl-1-butanol을 실시간으로 감지할 수 있는 바이오센서를 개 발하였다. 지시물질의 선택적 감지를 위해 초파리(*Drosophila*)의 냄새결 합단백질(odorant binding protein) 중 알코올류에 특이적으로 결합한 다고 알려져 있는 LUSH 단백질의 결합부위를 구성하는 서열들을 최적 화하여 펩타이드를 합성하였다. 이 때, C-말단에 추가적으로 3개의 페 닐알라닌(phenylalanine, Phe)을 합성하여 π-π 상호작용으로 탄소나 노튜브(carbon nanotube)에 고정이 가능하도록 하였다. 합성된 펩타이 드를 단일벽 탄소나노튜브(single walled-carbon nanotube, SWNT) 기반의 전계 효과 트랜지스터(field-effect transistor, FET)에 기능화 하였다. 탄소나노튜브 채널에 펩타이드를 고정한 후 *p*-type 전계 효과 트랜지스터의 전기적 특성이 유지됨을 확인하였다. 제작된 센서로

- i -

3-methyl-1-butanol을 1 fM의 높은 민감도와 선택도로 실시간 감지 가 가능함을 확인할 수 있었다. 또한 이를 기반으로 돼지고기 가공 햄 슬라이스를 이용하여 실제 식품에서 살모넬라균 오염여부를 감지할 수 있음을 확인하였다.

따라서 본 연구는 냄새결합단백질 유래 펩타이드로 기능화 한 탄소나 노튜브 기반의 바이오센서가 식품오염 조기판별에 활용될 수 있는 가능 성을 제시하고 있다.

주요어: 3-methyl-1-butanol, 냄새결합단백질, 탄소나노튜브,

전계 효과 트랜지스터, 바이오센서

학 번: 2013-20954

목차

요약 i
목차 iii
그림목차 v
1. 서론 1
1.1. 살모넬라균 감지를 위한 선행 연구 1
1.2. 탄소나노튜브를 기반으로 한 바이오센서
1.3. 냄새결합단백질(odorant binding protein, OBP) 5
2. 실험 재료 및 방법 7
2.1. 펩타이드 합성 7
2.2. 냄새물질 준비 8
2.3. 살모넬라균에 인위적으로 오염시킨 식품 샘플 준비 9
2.3.1. 살모넬라균 9
2.3.2. 식품 샘플 준비 9
2.4. 단일벽 탄소나노튜브-전계 효과 트랜지스터 (single walled-
carbon nanotube - field-effect transistor, SWNT-FET)의
제작 및 펩타이드 고정 11
2.4.1. SWNT-FET의 제작 11
2.4.2. SWNT 채널 위 펩타이드 고정 12

25	저기시궁	츠저	1	5
<i>L</i> .J.	긴 긴 그 또	70	 T	υ

3. 결과 및 고찰 17

3.1. 단일벽 탄소나노튜브-전계 효과 트랜지스터 위 펩타이드 고정

	및 고정화	전후의	전기적	특성	확인			17
3.2.	냄새결합	단백질	유래 펩	타이드	트(OBPP)를	고정화한	단일벽	탄소

나노튜브-전계 효과 트랜지스터 센서의 실시간 신호 측정 23

3.3. 냄새결합단백질 유래 펩타이드(OBPP)를 고정화한 단일벽 탄소

- 나노튜브-전계 효과 트랜지스터 센서의 3-methyl-1-butanol에
- 대한 민감도와 선택도 확인 27
 - 3.3.1. 3-Methyl-1-butanol에 대한 민감도 확인 27
- 3.3.2. 3-Methyl-1-butanol에 대한 선택도 확인 29

3.4. 실제 살모넬라균 오염 식품에서 생성되는 3-methyl-1-butanol

4.	결론	35
5.	참고문헌	36
At	ostract	41

그림 목차

- Figure 1. 펩타이드 고정화 전후의 SWNT-FET 모식도 14 Figure 2. 전기신호 측정을 위한 장치 16 Figure 3. 냄새결합단백질 유래 펩타이드(Odorant binding proteinderived peptide, OBPP)의 서열 18 Figure 4. 펩타이드 고정화 전후의 SWNT 채널 비교 19 Figure 5. 펩타이드 고정화 전후의 SWNT 전류-전압 (I-V) 곡선 Figure 6. 펩타이드 고정화 전후의 SWNT-FET 전기적 특성 22 Figure 7. 다양한 농도의 3-methyl-1-butanol에 대한 OBPP-SWNT-FET의 실시간 반응 25 Figure 8. 다양한 농도의 1-hexanol에 대한 OBPP-SWNT-FET의 실시간 반응 26 Figure 9. 3-Methyl-1-butanol 농도에 따른 OBPP-SWNT-FET의 반응 28
- Figure 10. 3-Methyl-1-butanol에 대한 선택도 확인 30

Figure 11. OBPP-SWNT-FET의 실시간 반응으로 3-methyl-1-

butanol에 대한 선택도 확인 32

Figure 12. 살모넬라균이 오염된 돼지고기 가공 햄 슬라이스와 신선한

햄 샘플에 대한 OBPP-SWNT-FET의 실시간 반응 34

1. 서론

1.1. 살모넬라균 감지를 위한 선행 연구

살모넬라균은 식중독을 일으키는 주요 원인 중의 하나로 식품을 통해 사람에게 감염된다. 살모넬라균에 감염 시 발열, 구토, 설사 등의 증상이 나타나게 되고, 심한 경우 사망에 이르게 된다[1]. 이러한 살모넬라균을 감지하기 위해 enzyme immunoassay (EIA), antibody capture, DNA probes, PCR assay 등의 방법들이 사용되었다[2-5]. 그러나 이러한 방법들은 낮은 민감도를 가지기 때문에 살모넬라균의 조기 발견이 어렵 고, 시간이 많이 소요되어 실효성을 가지기 어려웠다.

이러한 문제를 해결하기 위해, 살모넬라균에 감염된 음식에서 발생하 는 냄새물질들을 기체 크로마토그래피(gas chromatography) 방법으로 분석하여 찾아내는 연구가 진행되었다[6]. 이를 통해 3-methyl-1butanol과 1-hexanol과 같은 알코올류의 휘발성 유기 화합물의 농도가 특이적으로 증가하는 것을 밝혀냈다. 그러나 기체 크로마토그래피-질량 분석법(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 방법은 전문적인 기술을 필요로 하기 때문에 이를 상업적으로 이용하기에는 한 계가 있었다. 이러한 배경에서, 밝혀낸 지시물질들에 반응하는 쉽고, 빠

- 1 -

른 센서를 개발하기 위한 연구가 많이 진행되었다[7, 8]. 그러나 이러한 개발된 장치들 또한 앞서 나열한 방법들과 마찬가지로 낮은 선택도와 민 감도로 인하여 실질적인 활용이 어렵다는 한계점이 있었다.

이러한 한계점들을 극복하기 위해 본 연구는 인간의 후각 시스템이 본 능적으로 냄새를 인지하고, 식품의 변질을 판별해낼 수 있다는 것에 착 안하여 시작하게 되었다. 앞서 언급한 낮은 선택도와 민감도에 관련된 문제를 해결하기 위해서, 기존에도 인간의 후각 시스템을 모사한 다양한 바이오센서들이 개발되어 왔고 그 성능을 증명해 왔다[9, 10]. 따라서 본 연구에서는, 살모넬라균이 감염된 음식을 찾아내는 연구에 인간의 후 각 시스템을 모사한 바이오센서를 적용하여 보고자 한다.

1.2. 탄소나노튜브를 기반으로 한 바이오센서

작은 크기, 가벼운 무게, 빠른 반응 등의 장점을 내세운 최첨단 나노 기술의 비약적인 발전으로 인해 나노튜브를 바탕으로 한 다양한 감지 장 비들이 개발되고 있다. 나노 기술은 1 나노미터(nm)에서 수 백 나노미 터 스케일까지의 장비구성을 일컫는다. 여기에 사용되는 나노 재료들로 는 일반적으로 전기화학적, 생물학적 검사 시 이용되는 센서들의 민감도 를 높여주고 있다. 이러한 특성을 바탕으로 탄소나노튜브를 활용한 다양 한 연구들이 진행 중에 있으며, 현재뿐만 아니라 미래에도 기대되는 응 용연구로 여겨진다.

본 연구에서는 초파리의 냄새결합단백질 중 LUSH 단백질의 특정 서 열 펩타이드를 단일벽 탄소나노튜브-전계 효과 트랜지스터(single walled-carbon nanotube - field-effect transistor, SWNT)에 기능 화하여 바이오센서를 개발하였다. 이는 1차 신호변환기와 2차 신호변환 기로 이루어져 있다. 펩타이드가 고정화된 1차 신호변환기는 지시물질을 1차적으로 인지하는 역할로 신호를 만들기 위한 시작점으로 작용한다. 그렇게 펩타이드와의 결합을 통해 1차 신호변환기에서 만들어진 신호는 2차 신호변환기인 단일벽 탄소나노튜브-전계 효과 트랜지스터를 통하여 우리가 감지할 수 있는 전기신호로 변환된다. 이러한 원리를 이용하여 살모넬라균 감지용 지시물질을 높은 민감도와 선택도로 감지해낼 수 있 었다.

최근에 질병 등과 관련한 다양한 검사에 후각 수용체 단백질을 이용한 바이오센서가 각광받아 왔다[11, 12]. 그러나 후각 수용체 단백질은 3 차원 구조를 이루기 위해 지질막을 필요로 했다[13, 14]. 이에 비해 냄 새결합단백질에서 일부를 합성한 펩타이드는 그러한 3차원 구조를 필요 로 하지 않기 때문에 지질막이 없는 상태에서도 단백질과 같은 작용을 할 수 있다. 그러한 이유로 본 연구에서는 냄새결합단백질에서 유래한 펩타이드와 단일벽 탄소나노튜브-전계 효과 트랜지스터를 이용하여 살 모넬라균에 오염된 식품에서 발생하는 냄새물질을 감지하는 데 최적화된 바이오센서의 개발이 가능하였다.

1.3. 냄새결합단백질(odorant binding protein, OBP)

냄새를 맡을 때는 다음과 같은 과정들이 수반된다. 냄새분자들이 코 안으로 유입되어 점액에 용해된 후 섬모 세포에 있는 수용체와 결합한 다. 후각 점액에 존재하는 냄새결합단백질이라고 불리는 단백질들은 냄 새분자들과 결합하여 점액의 수용액과 지질 환경에 용해된다. 이처럼 냄 새결합단백질들은 1차적으로 냄새분자들이 점액층을 지나서 수용체로 이동되는 것을 도와주는 역할을 한다. 또한 공기층에 비해 점액층 내에 서 냄새분자 물질의 농도를 증가시켜주는 역할도 수행한다. 이 뿐만 아 니라, 모두 사용된 냄새분자 물질이 분해되도록 끌고 가는 종결자 (terminator)로서의 다른 역할도 수행한다. 이로써 다른 냄새분자가 수 용체에 반응할 수 있도록 도와준다. 그리고 수용체의 보호자로서의 역할 을 수행함으로써 과량의 냄새분자들이 수용체에 도달하는 것을 방지해준 다[15, 16].

이러한 다양한 역할들을 수행하는 과정 중 냄새결합단백질들은 냄새분 자들과 복합체를 형성하여 수용체에 결합함으로써 수용체 전위를 발생시 킨다. 이는 뇌로 전달되는 활동전위 비율을 변화시키게 된다. 결과적으 로 뇌 내의 신호들을 통합함으로써 냄새를 인식하는 데 기여를 하게 된 다.

초파리 유래 냄새결합단백질들도 위와 같은 역할을 수행한다. 본 연구

에서 사용한 냄새결합단백질인 LUSH 단백질은 알코올, 페로몬 등에 결 합한다고 알려져 있다[17-19].

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 펩타이드 합성

펩트론(www.peptron.com, Republic of Korea)을 통해 90% 이상의 순도를 가진 냄새결합단백질 유래 펩타이드(odorant binding protein-derived peptide, OBPP)를 합성하였다. OBPP를 2차 증류수 를 이용하여 1 μg/mL 로 용해시켜 최종 농도 1 mM 을 만들었다. 펩 타이드는 -20 °C 에 보관하고, 사용하기 전에 바로 녹여서 사용하였 다.

2.2. 냄새물질 준비

본 연구에서는 3-methyl-1-butanol에 반응한 감지결과를 비교 및 분석하기 위해 구조는 유사하지만, 일부 작용기가 다른 물질들을 사용하 였다. 준비단계에서는 1 mM 의 3-methyl-1-butanol, 2-methylbutane, 3-methylbutanone, 3-methyl-1-butanethiol, isobutyl acetate, 3-methylbutanal, 3-methylbutanoic acid 각 용액을 2차 증 류수를 이용해 1/10 씩 희석시켜 주었다. 준비한 냄새물질들은 사용하 기 전까지 4 °C 냉장 보관하였다.

본 연구에서 사용한 3-methyl-1-butanol 포함 대상 물질들의 출처 는 다음과 같다.

- (1) 3-Methyl-1-butanol (Sigma Aldrich, USA)
- (2) 2-Mehtylbutane (Sigma Aldrich, USA)
- (3) 3-Methylbutanone (Tokyo Chemical Industry, Japan)
- (4) 3-Methyl-1-butanethiol (Tokyo Chemical Industry, Japan)
- (5) Isobutyl acetate (Tokyo Chemical Industry, Japan)
- (6) 3-Methylbutanal (Sigma Aldrich, USA)
- (7) 3-Methylbutanoic acid (Sigma Aldrich, USA)

2.3. 살모넬라균에 인위적으로 오염시킨 식품 샘플

준비

2.3.1. 살모넬라균

본 연구에서 사용한 살모넬라균은 *Salmonella typhimurium LT2* 균 주를 사용하였다. 흡광도(OD₆₀₀) 값이 0.5가 될 때까지 37 °C, 220 rpm 조건에서 배양하여 4 x 10⁷ CFU/mL 가량의 균 배양액을 얻었다 [20].

2.3.2. 식품 샘플 준비

시판 중인 돼지고기 가공 햄 슬라이스(Republic of Korea)를 구입하 여 살모넬라균에 인위적으로 오염시켰다. 햄의 신선도 유지를 위해 대조 군으로 사용되는 햄은 4 °C 냉장 보관을 하였고, 살모넬라균을 오염시 킨 햄은 25 °C 상온에서 각각 4일 동안 보관하였다. 이 때, 각 샘플은 15-mL Falcon tube에 넣어서 보관하였다. 4일 경과 후 각각의 샘플 2 mg에 2차 증류수 2 mL을 넣은 후 충분히 섞어주었다(voltexing). 이 후 원심분리를 통해 햄은 가라앉히고, 상층에 존재하는 액상의 물질들만 걷어내어 실험에 사용하였다.

2.4. 단일벽 탄소나노튜브-전계 효과 트랜지스터 (single walled-carbon nanotube - field-effect transistor, SWNT-FET) 의 제작 및 펩타이드 고정

2.4.1. SWNT-FET 의 제작

SiO₂ wafer 기관 위에 AZ5214 photoresist (PR) 를 이용하여 패터 닝을 하였다. Octadecyltrichlorosilane (OTS) solution (OTS : hexane = 1 : 500) 에 7분간 wafer를 담가 self-assembly monolayer (SAM) 를 형성하였다. Hexane, acetone, ethanol을 이용 하여 차례로 세척하여 PR층을 제거한 후, 탄소나노튜브 용액 (0.02 mg/mL in 1,2-dichlorobenzene)에 wafer를 30초간 담가 채널부분에 선택적으로 탄소나노튜브를 붙였다. PR을 이용하여 패터닝 한 후 Pd/Au (10/30 nm)를 증착하였다. Lift-off 과정을 통해 source, drain 부분의 전극을 형성한 후, PR을 이용하여 채널부분을 제외한 부 분을 부동화(passivation) 하였다[21-23]. 이러한 방법으로 완성된 소 자가 실험에 사용되었다.

2.4.2. SWNT 채널 위 펩타이드 고정

탄소나노튜브가 고정된 부분에 펩타이드 (1 mM) 1.5 μL를 물방울 형태로 4시간 동안 상온에 두었다. 이 시간 동안 OBPP들은 SWNT-FET 위에 코팅이 되었다(Figure 1). 기본 서열 외에 C-말단 에 추가적으로 합성한 3개의 페닐알라닌(phenylalanine, Phe, F)이 탄 소나노튜브와 페닐알라닌의 방향족 고리 사이의 π-π 상호작용을 가능 하게 하여 탄소나노튜브에 고정이 되었다. 4시간 경과 후 제대로 고정되 지 않은 펩타이드를 제거하기 위해 2차 증류수로 2-3번 씻어낸다. N₂ 가스를 이용하여 남아있는 2차 증류수를 말려주었다. 최종적으로 고정된 펩타이드만이 SWNT-FET 센서 채널 위에 남게 되었다[24].

또한 펩타이드 고정 여부를 확인하기 위해 atomic force microscopy (AFM) system (MFP-3D, Asylum Research, USA) 을 사용하였다. 2차 증류수를 이용해 용해시킨 펩타이드 고정화 전 주사속도(scan rate)는 0.2 Hz로 측정하였고, 고정화 후는 0.05 Hz로 측정하였다. 다 음과 같이, 주사속도 외에 다른 조건들은 고정화 전후 동일하게 측정하 였다.

- (1) Set point voltage : 560.97 mV
- (2) Scan size : 20 μ m

- (3) Scan angle : 90 $^{\circ}$
- (4) Scan point : 512 x 512 points



Figure 1. 펩타이드 고정화 전후의 SWNT-FET 모식도

2.5. 전기신호 측정

단일벽 탄소나노튜브-전계 효과 트랜지스터의 전기적 측정은 probe station (MS tech)과 Keityley 2636A sourcemeter (Keityley, USA)를 사용하여 진행되었다(Figure 2). 0.1 V의 전압을 source와 drain 전극 사이에 걸어주었다. 측정 시작 전 9 μL의 2차 증류수를 물 방울 형태로 채널 위에 떨어뜨려 기선(base line)을 형성하였다. 기선 형성 이후에 1 μL의 액상 분석물들을 차례로 떨어뜨렸다. 이로써 source와 drain 전극 사이의 전류 변화를 관찰하면서 결과를 분석하였 다.

전류의 변화는 ⊿G/G₀ = (G-G₀)/G₀ 이다. 여기서 G는 실시간으로 측정되는 전류 값이며, G₀는 초기 전류 값이다.



Figure 2. 전기신호 측정을 위한 장치. (a) Probe station, (b) 전기 절 연체 위 감지 소자(sensing chip)와 probe의 접촉, (c) 제작된 센서 이 미지

3. 결과 및 고찰

3.1. 단일벽 탄소나노튜브-전계 효과 트랜지스터 위 펩타이드 고정 및 고정화 전후의 전기적 특성 확인

합성한 냄새결합단백질 유래 펩타이드(odorant binding proteinderived peptide, OBPP)는 기본 서열 C-말단에 3개의 페닐알라닌 (phenylalanine, Phe, F)을 추가하여 합성하였다(Figure 3). 이로 인해 탄소나노튜브와 페닐알라닌의 방향족 고리 사이의 π-π 상호작용 원리 로 고정화가 가능하게 되었다. Atomic force microscopy (AFM) 이미 지 분석을 통해 제대로 고정이 되었는지 확인할 수 있었다. OBPP가 고 정되지 않은 상태보다 고정 후에 평균적으로 2-3 nm 정도 높이가 상 승한 것을 볼 수 있었다. 펩타이드의 17개 아미노산들이 단백질 구조 내에서 α-helix와 linker를 형성한다는 것을 감안했을 때, 대략 그 높 이는 2-3 nm로 예상해볼 수 있다. 결과적으로 OBPP들이 SWNT 위에 비교적 균일하게 고정되었음을 확인하였다(Figure 4).

TKCVSLMAGTVNKKGEFFFF

Figure 3. 냄새결합단백질 유래 펩타이드(Odorant binding protein-

derived peptide, OBPP)의 서열



Figure 4. 펩타이드 고정화 전후의 SWNT 채널 비교. (a) 고정화 전후 의 SWNT 채널 상의 AFM 이미지, (b) 특정 부분((a)의 빨간색 점선) 의 높이 분석

또한 OBPP 고정화 전후의 전기적 특성을 측정하였다. OBPP를 고정 시키기 전과 후의 SWNT의 전류-전압(I-V) 곡선을 보면, 고정 후 source와 drain 전극 사이의 저항 값이 증가하였다(Figure 5). 저항 값 의 변화에도 불구하고, OBPP들의 탄소나노튜브 채널 위 고정 후 *p*-type 전계 효과 트랜지스터의 특성은 그대로 유지됨을 확인하였다 (Figure 6). *p*-type은 게이트 전극(gate electrode)에 정의 전압 (positive voltage)을 걸어주었을 때, SWNT 채널의 운반체(carrier)인 정공(hole) 수가 줄어들어 전도도(conductance)가 낮아지게 되는 특성 을 가진다. 이와 같은 전기적 특성을 측정해봄으로써, OBPP들을 SWNT 채널 위에 고정화한 바이오센서가 센서로서의 기능을 성공적으 로 수행할 수 있음을 확인하였다.



Figure 5. 펩타이드 고정화 전후의 SWNT 전류-전압 (I-V) 곡선



(a)



Figure 6. 펩타이드 고정화 전(a), 후(b)의 SWNT-FET 전기적 특성

3.2. 냄새결합단백질 유래 펩타이드(OBPP)를 고정화

한 단일벽 탄소나노튜브-전계 효과 트랜지스터

센서의 실시간 신호 측정

선행 연구들에서는 기체 크로마토그래피(gas chromatography) 방법 을 통해 식품에 살모넬라균이 오염되었을 때 특이적으로 발생하는 물질 들을 분석하였다[6]. 이 때, 3-methyl-1-butanol과 1-hexanol과 같 은 알코올류의 냄새물질들이 농도가 특이적으로 증가하는 것이 확인되었 다. 따라서 이러한 냄새물질들을 민감하고 선택적으로 검출할 수 있다면 살모넬라균에 오염된 식품을 조기 검출하는 데 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 앞서 언급한 초파리 유래 냄새결합단백질 중 LUSH는 알코올류 에 특이적으로 결합한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 LUSH의 결합부 위를 구성하는 서열들을 최적화하여 보다 민감도와 선택도를 높일 수 있 도록 합성하였다.

우선, 본 연구에서는 OBPP를 SWNT-FET 센서에 고정화한 후 3-methyl-1-butanol과 1-hexanol에 실시간으로 어떤 반응을 보이는 지 확인하였다. 결과적으로 다양한 농도의 냄새물질을 주입했을 때 1 fM의 3-methyl-1-butanol과 100 fM의 1-hexanol 농도부터 모두 OBPP-SWNT-FET 전기 신호를 관찰할 수 있었다(Figure 7, 8). OBPP가 냄새물질과 결합하면서 구조가 바뀌게 되고, 그 과정에서 펩 타이드 서열 내의 양전하를 띄는 라이신(lysine, K)들이 SWNT 채널에 가까워지면서 정자장(positive field) 환경을 만들어주는 것으로 생각된 다. 이와 같은 효과가 정의 전압을 증가시켜 *p*-type의 SWNT-FET의 전도도가 감소한 것으로 판단된다. 본 연구에서는 이러한 실험 결과에 기초하여 검출한계(limit of detection, LOD) 측면에서 보다 유리한 3-methyl-1-butanol을 주 지시물질로 사용하였다.



Figure 7. 다양한 농도의 3-methyl-1-butanol에 대한

OBPP-SWNT-FET의 실시간 반응



Figure 8. 다양한 농도의 1-hexanol에 대한 OBPP-SWNT-FET의

실시간 반응

3.3. 냄새결합단백질 유래 폡타이드(OBPP)를 고정화 한 단일벽 탄소나노튜브-전계 효과 트랜지스터 센서의 3-methyl-1-butanol에 대한 민감도와 선택도 확인

3.3.1. 3-Methyl-1-butanol에 대한 민감도 확인

앞선 실험결과에서 3-methyl-1-butanol에 대한 OBPP-SWNT-FET의 실시간 반응을 확인한 바 있다(Figure 7). 여기서, 3-methyl-1-butanol 주입 후에 농도에 따른 반응을 확인하고자 실험을 진행하였 다. 펩타이드가 고정되지 않은 상태에서는 농도가 증가하여도 반응이 관 찰되지 않았다. 이에 비해 펩타이드가 고정된 SWNT-FET 채널에서는 3-methyl-1-butanol 농도가 증가함에 따라 S자 곡선(sigmoid curve)이 그려짐을 확인하였다(Figure 9). 실제로 실시간 반응을 관찰 했을 때 1 nM 수준에서부터 포화(saturation)되는 것을 관찰하였다.



Figure 9. 3-Methyl-1-butanol 농도에 따른 OBPP-SWNT-FET의

반응

3.3.2. 3-Methyl-1-butanol에 대한 선택도 확인

OBPP-SWNT-FET 센서 플랫폼의 선택도를 확인하고자 다양한 물 질들을 주입하여 그 반응을 조사하였다. 3-Methtyl-1-butanol과 구조 가 유사하지만 작용기가 다른 물질들을 비교 분석하였다. 높은 민감도를 보였던 3-methtyl-1-butanol은 1 pM 농도에서, 다른 물질들은 모두 1 nM 농도에서 비교하였다. 연구에 사용된 비교 물질들은 총 6가지이 며, 종류는 다음과 같다.

- (1) 2-Mehtylbutane
- (2) 3-Methylbutanone
- (3) 3-Methyl-1-butanethiol
- (4) Isobutyl acetate
- (5) 3-Methylbutanal
- (6) 3-Methylbutanoic acid

3-Methyl-1-butanol 을 1 pM 주입했을 때 전류 값의 변화량이 그 보다 10³ 배 높은 다른 물질들을 주입했을 때 값의 변화량과 비교하여 6배 이상 확연히 큰 것을 확인하였다(Figure 10).



Figure 10. 3-Methyl-1-butanol에 대한 선택도 확인. (a) 사용된 냄 새물질들의 화학구조, (b) 다양한 물질들을 주입했을 때 나타나는 OBPP-SWNT-FET의 3-methyl-1-butanol에 대한 선택도

(a)

또한 비교 냄새물질들과 3-methyl-1-butanol을 처리하였을 때 OBPP-SWNT-FET의 실시간 반응을 확인해보고자 실험을 진행하였 다. 여기서는 더욱 확실한 전류 값 변화를 보기 위해 모든 물질들을 동 일 농도(1 nM)에서 실험을 진행하였다. 다른 비교 물질들에서는 OBPP 를 고정화 하지 않은 채널 위 반응과 같이 기선 형성 뒤 전류 값의 차이 가 없었으나, 3-methyl-1-butanol을 처리하였을 때 전기신호가 발생 함을 확인하였다. 이러한 실시간 반응 또한 높은 선택도를 확인할 수 있 는 결과를 보여주고 있다(Figure 11).



Figure 11. OBPP-SWNT-FET의 실시간 반응으로 3-methyl-1butanol에 대한 선택도 확인. (a) 사용된 냄새물질들의 화학구조, (b) OBPP-SWNT-FET의 실시간 반응

3.4. 실제 살모넬라균 오염 식품에서 생성되는 3-methyl-1-butanol 감지 확인

LUSH의 결합부위(binding site) 일부 서열만을 인공적으로 합성하여 수정진동자저울(Quartz crystral microbalance, QCM) 칩 위에 고정화 하여 수행했던 기존의 연구가 있다[8]. 이러한 연구는 낮은 민감도로 인 해 살모넬라균이 오염된 실제 식품에서 생성되는 냄새를 검출하지는 못 했다는 한계점이 있었다. 본 연구에서는 이러한 한계점을 뛰어 넘어 실 제 식품인 돼지고기 가공 햄 슬라이스에 인위적으로 살모넬라균을 오염 시켜 OBPP-SWNT-FET의 신호가 나오는지 확인하였다(Figure 12). 살모넬라균이 오염되지 않은 신선한 상태의 슬라이스 햄에서는 신호가 나오지 않았지만, 살모넬라균이 오염된 햄에서는 전류 흐름의 변화로 인 한 신호 발생을 확인할 수 있었다.



Figure 12. 살모넬라균이 오염된 돼지고기 가공 햄 슬라이스와 신선한 햄 샘플에 대한 OBPP-SWNT-FET의 실시간 반응

4. 결론

본 연구에서는 3-mehtyl-1-butanol과 결합하는 냄새결합단백질 유 래 펩타이트(odorant binding protein-derived peptide, OBPP)와 SWNT-FET를 이용한 바이오센서를 개발하였다. 1차적으로 냄새물질 과 결합하는 펩타이드와 2차 신호변환기인 SWNT-FET 센서 플랫폼이 결합된 형태로 제작되었다. OBPP와 SWNT 간의 π-π 결합에 의해 보다 간단한 기능화가 가능하였다. 이렇게 제작된 센서는 1 fM 농도의 매우 높은 민감도로 3-methyl-1-butanol을 감지하였으며, 구조가 유 사한 다른 냄새물질들을 대조군으로 사용하였을 때 높은 선택도를 보이 는 것을 확인하였다. 또한 인위적으로 살모넬라균을 오염시킨 돼지고기 가공 햄 슬라이스 샘플에서도 신호 측정이 가능함을 확인하였다. 본 연 구를 통해 냄새결합단백질 유래 펩타이드와 SWNT-FET를 이용한 바 이오센서를 식품오염 조기진단에 사용할 수 있음을 확인하였다. 또한 나 아가 다양한 산업에서의 응용에 활용될 수 있을 것이라 생각된다.

5. 참고문헌

- Black, P.H., Kunz, L.J., and Swartz, M.N., Salmonellosis-a review of some unusual aspects. *New Engl. J. Med.* 262, 864-870 (1960)
- [2] Robison, B.J., Pretzman, C.I., and Mattingly, J.A., Enzyme immunoassay in which a myeloma protein is used for detection of salmonellae. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1816– 1821 (1983)
- [3] Ng, S.P., Tsui, C.O., Roberts, D., Chau, P.Y., and Ng, M.H., Detection and serogroup differentiation of Salmonella spp. in food within 30 hours by enrichment-immunoassay with a T6 monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2294-2302 (1996)
- [4] Knight, I.T., Shults, S., Kaspar, C.W., and Colwell, R.R.,
 Direct detection of Salmonella spp. in estuaries by using a
 DNA probe. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1059-1066 (1990)
- [5] Wang, L., Shi, L., Alam, M.J., Geng, Y., and Li, L., Specific and rapid detection of foodborne Salmonella by loopmediated isothermal amplification method. *Food Res. Int.* 41,

69-74 (2008)

- [6] Bhattacharjee P., Panigrahi S., Lin D., Logue, C.M., Sherwood, J.S., Doetkott, C., and Marchello, M., A comparative qualitative study of the profile of volatile organic compounds associated with Salmonella contamination of packaged aged and fresh beef by HS-SPME/GC-MS. *J. Food Sci. Technol.* 48, 1-13 (2011)
- [7] Sankaran, S., Panigrahi, S., and Mallik, S., Olfactory receptor based piezoelectric biosensors for detection of alcohols related to food safety applications. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 155, 8-18 (2011)
- [8] Sankaran, S., Panigrahi, S., and Mallik, S., Odorant binding protein based biomimetic sensors for detection of alcohols associated with Salmonella contamination in packaged beef. *Biosens. Bioelectron.* 26, 3103–3109 (2011)
- [9] Firestein, S., How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413, 211-218 (2001)
- [10] Park, S.J., Kwon, O.S., Lee, S.H., Song, H.S., Park, T.H., and Jang, J., Ultrasensitive flexible graphene based field-effect transistor (FET)-type bioelectronics nose. Nano

Lett. 12, 5082–5090 (2012)

- [11] Lee, S.H., Kwon, O.S., Song, H.S., Park, S.J., Sung, J.H., Jang, J., and Park, T.H., Mimicking the human smell sensing mechanism with an artificial nose platform. *Biomaterials* 33, 1722-1729 (2012)
- [12] Goldsmith, B.R., Mitala, J.J., Josue, J., Castro, A., Lerner, M.B., Bayburt, T.H., Khamis, S.M., Jones, R.A., Brand, J.G., Sligar, S.G., Luetje, C.W., Gelperin, A., Rhodes, P.A., Discher, B.M., and Johnson, A.T.C., Biomimetic chemical sensors using nanoelectronic readout of olfactory receptor proteins. *ACS Nano* 5, 5408-5416 (2011)
- [13] Lee, S.H., Jin, H.J., Song, H.S., Hong, S., and Park, T.H., Bioelectronic nose with high sensitivity and selectivity using chemically functionalized carbon nanotube combined with human olfactory receptor. *J. Biotechnol.* 157, 467-472 (2012)
- [14] Chen, R.J., Zhang, Y., Wang, D., and Dai, H., Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 3838-3839 (2001)

- [15] Walter, S.L., Odorant reception in insects: Roles of receptors, binding protein, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 373-391 (2012)
- [16] Vogt, R.G., Prestwich, G.D., and Lerner, M.R., Odorantbinding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *J. Neurobiol.* 22, 74-84 (1991)
- [17] Kruse, S.W., Zhao, R., Smith, D.P., and Jones, D.N.,
 Structure of a specific alcohol-binding site defined by the odorant binding protein LUSH from Drosophila melanogaster. *Nat. Struct. Biol.* 10, 694-700 (2003)
- [18] Laughlin, J.D., Ha, T.S., Jones, D.N., and Smith, D.P.,
 Activation of pheromone-sensitive neurons is mediated by conformational activation of pheromone-binding protein. *Cell* 133, 1255-1265 (2008)
- [19] Kim, M.S., and Smith, D.P., The invertebrate odorantbinding protein LUSH is required for normal olfactory behavior in Drosophila. *Chem. Senses* 26, 195-199 (2001)
- [20] Kim, S., Kim, M., and Ryu, S., Development of an engineered bioluminescent reporter phage for the sensitive

detection of viable Salmonella typhimurium. *Anal. Chem.* 86, 5858-5864 (2014)

- [21] Kim, T.H., Lee, S.H., Lee, J., Song, H.S., Oh, E.H., Park, T.H., and Hong, S., Single-Carbon-Atomic-Resolution Detection of Odorant Molecules using a Human Olfactory Receptor-based Bioelectronic Nose. *Adv. Mater.* 21, 91-94 (2009)
- [22] Lee, M., Im, J., Lee, B.Y., Myung, S., Kang, J., Huang, L., Kwon, Y.-K., and Hong, S., Linker-free directed assembly of high-performance integrated devices based on nanotubes and nanowires. *Nat. Nanotechnol.* 1, 66-71 (2006)
- [23] Park, J., Lim, J.H., Jin, H.J., Namgung, S., Lee, S.H., Park, T.H., and Hong, S., A bioelectronic sensor based on canine olfactory nanovesicle-carbon nanotube hybrid structures for the fast assessment of food quality. *Analyst* 137, 3249-3254 (2012)
- [24] Lim, J.H., Park, J., Ahn, J.H., Jin, H.J., Hong, S., and Park, T.H., A peptide receptor-based bioelectronics nose for the real-time determination of seafood quality. *Biosens. Bioelectron.* 39, 244-249 (2013)

Abstract

Development of Biosensor Using Odorant Binding Protein-derived Peptide for Real-time Detection of *Salmonella* Contamination in Food

Jinkyung Kang

School of Chemical and Biological Engineering The Graduate School Seoul National University

Salmonella contamination is one of the major causes of food poisoning, where the foodborne illnesses include fever, abdominal pain, diarrhea, and nausea. Various methods were applied to detect the *Salmonella*-contaminated food, low differentiation efficiency is the bottleneck due to low sensitivity. Thus, we developed a single walled-carbon nanotube (SWNT) - based field-effect transistor (FET) functionalized with odorant binding protein-derived peptide (OBPP) for the detection of Salmonella contamination with high effectiveness. For detection of 3-methyl-1-butanol, which is generated when Salmonella contamination occurs, a peptide was synthesized based on the sequence of Drosophila odorant binding protein; LUSH which has high binding affinity with the alcohol. The C-terminal of synthetic peptide was modified with phenylalanine cluster and then easily immobilized on SWNT channel using $\pi - \pi$ stacking interactions. After functionalization of the synthetic peptide on SWNT-FET, the p-type FET properties were clearly maintained in the biosensor. This biosensor detected 3-methyl-1-butanol concentration down to 1 fM with high sensitivity and selectivity real-time condition. Using those characteristics of in the biosensor, contamination of Salmonella in sliced ham was successfully Thus, the biosensor assessed. with the OBPP-functionalized SWNT exhibited a potential novel method in detecting food contamination at an early stage.

Keywords : 3-methyl-1-butanol, odorant binding protein, carbon nanotube, field-effect transistor, biosensor

Student Number: 2013-20954