J. Fd Hyg. Safety 18(3), 101-106 (2003)

비표지 면역센서에 의한 냉장유통 식품 중 *Pseudomonas aeruginosa*의 간이검출

김남수† · 박인선 · 김동경
한국식품개발연구원

Detection of *Pseudomonas aeruginosa* with a Label-free Immunosensor from Various Cold Storage Foods

Namsoo Kim†, In-Seon Park, and Dong-Kyung Kim
Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea

ABSTRACT – The aim of this study is to develop a label-free immunosensor for microbial detection and to evaluate its applicability to *Pseudomonas aeruginosa* detection in various food samples. The antibodies used were a polyclonal antiserum from rabbit (polyvalent type) and a monoclonal antibody raised against the flagella of *P. aeruginosa*. Antibody immobilization was done by a thiolated antibody chemisorption onto one gold electrode of a piezoelectric quartz crystal with a thiol-cleavable, heterobifunctional cross-linker, sulfosuccinimidyl 6-[3-(2-pyridyldithio)propionamido]hexanoate. To the Stomacher-treated samples from various raw and processed foods under cold storage, comprising sirloin, cod and pettitoes, spiking and enrichment culture were done to prepare the model samples, followed by the measurements of the frequency shifts after sample injections. The frequency shifts obtained by the sample matrices themselves were in the range of 52~89 Hz. The injections of the spiked samples caused the frequency shifts of 108~200 Hz, whereas the enriched samples decreased the steady-state resonant frequencies by 162~222 Hz. All sample measurements including baseline stabilization, sample injection and acquisition of the steady-state response were accomplished within 30 min.

Key words: label-free immunosensor, thiolated antibody chemisorption, *Pseudomonas aeruginosa* detection, cold storage foods

저온균(혹은 호냉균, psychrophylic bacteria)은 0°C와 같은 저온에서 생육가능하거나 생육적온이 낮은 균으로서 *Pseudomonas* spp., *Micrococcus* spp., *Xanthomonas pharmicola*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* 등이 이에 속하며 이들 중 상당부분은 식품학적 측면에서의 유해세균이다. 이 가운데 *Pseudomonas* spp.는 Pseudomonadaceae과에 속하며 Gram 음성의 호기성 간균으로 포자를 형성하지 않고 냉장온도에서 잘 생육하며 이의 대표적 미생물인 *P. aeruginosa*는 육류 및 우유의 부패와 밀접한 관계가 있는 변패세균(spoilage bacteria)이다.[1] 이들은 식품의 품질수명을 연장시키는 기술이 발달되지 않았던 과거에는 식품위생학적 측면에서의 중요성이 크지 않았으나 cold chain화가 진척되어 식품의 품질수명이 급격히 증가하고 그 결과 식품소비의 경제성이 높아진 현대에는 점점 그 중요성이 높아가고 있다. 즉, 도시의 대규모 양판점 등에서 축산물의 냉장유통물량이 점차 증가하고 있는 현실을 감안해 볼 때 냉장식품의 신선도 유지에 필요한 품질지표로서의 *P. aeruginosa*에 대한 신속검출기술의 개발이 국내에서도 시급히 이루어져야 할 것으로 사료된다.

현재까지 문헌에 보고되고 있는 *Pseudomonas* spp.의 신속검출용 검사 kit 및 장비개발과 관련된 연구로는, 선택배지로서 CN(cetrimide/nalidixic acid) agar와 CFC(cetrimide/fucidin/cephaloridin) agar를 사용하는 방법,[2] *P. aeruginosa*의 23S rDNA를 oligonucleotide primer로 하는 중합효소 연쇄반응법(polymerase chain reaction) 및 phage amplification assay,[3,4] *Pseudomonas* spp.의 세포막 공통항원 및 대사분비물인 proteinase에 대한 효소면역분석법,[5,6] ATP-luciferin-luciferase 반응에 의한 생물발광을 고감도 TV camera로 측정하는 방법,[7] ^{14}C으로 표지된 기질을 사용하였을 때 대사과정에서 생성되는 $^{14}CO_2$를 측정하는 방법,[8] 흡착 filter에 의한 분리 및 impedance 측정법[9]과 *Pseudomonas*의 대사산물이 농축될 때 발생하는 전기전도도의 변화를 측정하는 방

†Author to whom correspondence should be addressed.

법[10] 등이 보고되고 있다. 이들 방법들은 나름대로의 장점을 지니고 있으나 여전히 검사시간이 오래 걸리고 표지효소나 동위원소를 사용하는 등의 번거로움이 있어 이를 개선하여 신속성, 편의성 및 선택성이 제고된, *Pseudomonas* spp.에 대한 새로운 검출법의 개발이 요구되어지고 있다.

압전류적 바이오센서(piezoelectric biosensor)는 얇은 wafer상의 압전결정(piezoelectric crystal)에 생물요소를 고정화하고 여기에 analyte가 결합할 때에 나타나는 질량증가에 따른 진동수변화를 측정하는 친화성센서(affinity sensor)의 하나이며 계측과정에 동위원소나 발색단을 사용하지 않는 비표지기법(label-free technique)으로서,[11] 사용이 간편하고 분석비용이 높지 않으며 아울러 각종 착색물질에 의한 계측저해현상을 잘 받지 않는 장점이 있으므로 식품위생학적으로 중요한 미생물의 존재여부를 최소전처리 후 1~2시간 내에 신속하게 판별하는데 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 그러므로, 본 연구에서는 *P. aeruginosa*에 대한 항체를 고정화하여 압전류적 항체센서 시스템을 구성한 후 냉장식품의 전처리물에 균 첨가 및 증균을 행하여 모델시료를 제조하고 이를 반응시스템에 주입하였을 때 나타나는 진동수변화를 측정하여 *P. aeruginosa*에 대한 간이검출을 행하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

항체 및 실험균주

수정결정전극으로의 고정화에 사용한 생물요소는 토끼 항혈청에서 분리한, *P. aeruginosa*에 대한 다클론항체(polyvalent type)와 *P. aeruginosa*의 flagella와 반응하는 단클론항체(murine IgG2a immunoglobulin type) 두 종류였다. 실험에 공시된 *P. aeruginosa* 균주는 한국생명공학연구원에서 구입한 KCTC 1636, 2004, 2450, 2513, 2742의 5종으로서, 이들은 액체배지로의 훈양과정을 거치고 Nutrient Broth(Difco Laboratories, MI, USA)에서 37°C, 48시간 배양하고 급속동결처리한 후 바이오센서 계측실험에 사용하였다.

바이오센서 시스템 구성

*P. aeruginosa*에 대한 압전류적 비표지 면역센서의 변환기(transducer)로 사용한 AT-cut 수정결정(Ti 층 위에 Au 전극이 증착된 것)은 가로 8 mm, 세로 8 mm, 두께 0.18 mm의 크기(전극면적 0.2 cm^2)로서 Seiko EG&G 사(Japan)의 것이었다. 반응시스템으로서, batch형의 dip holder와 well holder 시스템 및 flow형 시스템을 비교하였으며, 이 중 flow형 시스템의 구성은 아래와 같다. 먼저 자체제작한 flow cell의 반응부피는 약 100 μl 정도로서 여기에 수정결정을 끼워 고정하고 고정된 수정결정을 발진모듈(QCA 917-11, Seiko EG&G)과 진동수측정기(QCA 917-15, Seiko EG &G)를 통하여 potentiostat(model 283, EG&G, NJ, USA)에 연결한 후 Echem software(version 4.3)에 의하여 컴퓨터에 센서신호를 입력하였다. 반응완충용액의 흐름과 시료주입을 위하여 flow cell 앞에 peristaltic pump(Minipuls 3, Gilson, France)와 injector(Rheodyne 7225i, Cottati, USA)를 달고 capillary tubing에 의하여 연결하였으며, 본 시스템은 0.1 Hz의 낮은 진동수변화까지 측정할 수 있었다.[12] Flow형 시스템의 작동은 항체가 고정화된 센서 chip을 사용하여 stopped-flow 방식에 의하여 행하였으며, 완충용액 용출, 시료주입 후 완충용액의 흐름 중단, 정상상태(steady-state)까지의 항원·항체반응, 완충용액의 흐름 재개 및 센서 chip의 재생(regeneration), 완충용액에 의한 시스템 세척을 한 주기로 하였다.[12]

센서 chip으로의 항체 고정화

수정결정으로의 항체 고정화는 Park과 Kim의 방법[13]에 의하여 티올화 항체를 먼저 제조하고 이를 수정결정의 금전극 표면에 화학흡착(chemisorption)하여 다음과 같이 행하였다. 먼저 수정결정의 금전극표면을 활성화하기 위하여 수정결정을 1.2 M NaOH 용액에 5분간 담근 후 증류수로 충분히 씻어주고 1.2 M HCl 용액에 5분간 담근 후 증류수로 세척하였다. 이 후 20 μl의 c-HCl을 수정결정상의 금전극에 도포하고 1분간 처리한 후 증류수로 씻어주고 20분간 건조하였다. 항체 용액(3 μl, 20 mM sodium potassium phosphate buffer, pH 7.5에 용해)과 티올화 가교화제(thiolation cross-linker)인 sulfosuccinimidyl 6-[3-(2-pyridyldithio)propionamido] hexanoate, sulfo-LC-SPDP, Pierce, IL, USA) 용액을 동량 가하여 한시간 반응시킨 후 환원제로서 dithiothreitol(0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.5에 용해) 용액 2 μl를 가하고 30분간 반응시켜 티올화 항체를 제조하였다. 티올화 항체를 수정결정의 금전극 표면에 엷게 바른 후 1시간 동안 건조하고 0.2 M sodium potassium phosphate buffer(pH 7.2)와 증류수로 씻어준 후 다시 건조하였다.

시료분석

본 실험에 사용된 시료는 냉장유통되는 식품원료나 그 가공품 중에서 쇠고기 2종, 돼지고기, 닭고기, 대구, 새우, 오징어, 조갯살, 굴, 족발을 대상으로 하였으며, 각각의 시료 5 g을 칭량하여 Stomacher bag에 넣고 시료중량의 10배에 해당하는 멸균 식염수를 부어 2분간 진탕하고 이를 정치한 상징액을 취하여 분석용 검체로 하였다. 분석용 검체에 대하여 계수용 고체배지인 Pseudomonas Isolation Agar(Difco

Laboratories)를 사용하여 *Pseudomonas* spp.를 계수하였을 때, 모든 시료에서 생균수가 아주 낮게 나왔으므로 센서계측에 필요한 최소균수에 도달하도록 임의농도인 1.2×10^7 CFU/ml의 *P. aeruginosa*를 분석용 검체에 첨가하거나(spiking), 분석용 검체에 4.0×10^2 CFU/ml의 저 농도로 *P. aeruginosa*를 첨가한 후 Nutrient Broth에서 증균(enrichment culture)하여 모델시료를 제조한 후 센서계측에 사용하였다.

결과 및 고찰

바이오센서 시스템별 반응시간 비교

*P. aeruginosa*의 식품 중에서의 신속검출을 위하여 본 연구에서 구성한 batch 및 flow형 바이오센서 시스템별로 정상상태에 이르는 반응시간을, 생물요소로서 *P. aeruginosa*에 대한 다클론항체를 사용하고 analyte로 1.2×10^7 CFU/ml의 *P. aeruginosa* KCTC 2513을 반응시스템에 주입하여 얻은 반응곡선으로부터 구하여 비교하였다(Table 1). 이 때, 실험에 사용한 균주 배양액은 액체질소에 급속동결한 후 -70°C에서 최대 1개월 이내로 보관한 것으로 이 조건에서는 배양직후와 생균수에 있어 거의 차이가 나타나지 않았다. Table 1에서 볼 수 있는 것처럼 시스템 세척, 항원·항체반응, baseline 안정화를 포함하는 전체 반응시간은 flow형 바이오센서 시스템의 경우 30분 이내로서 가장 짧은 반면 batch형의 dip holder 시스템의 경우는 최대 60분이 소요되었다. 아울러, flow형 반응시스템의 경우 항체가 고정화된 수정결정 전극과의 반응에 필요한 전체 반응부피가 100 μl 정도로서 가장 작은 반면 시스템의 반응감응도는 아주 우수한 편이었다. 이와 같은 결과로부터 이 후의 실험에서는 flow형 반응시스템을 사용하였으며, 이 때 시간에 따른 공명진동수 변화가 가장 안정적으로 나타나는 0.155 ml/min의 유속에서 계측실험을 행하였다.

항체 종류에 따른 바이오센서의 감응특성

5종의 *P. aeruginosa* 균주인 KCTC 1636, 2004, 2450, 2513, 2742를 analyte로 하여 본 실험에 사용된 *P. aeruginosa*에 대한 다클론 및 단클론항체와의 반응성을 비교하였다

Table 1. Comparison of the total response time including washing, reaction and baseline stabilization among various biosensor systems for *P. aeruginosa*

Biosensor system	Total response time (min)	Total reaction volume
Dip holder system (batch type)	≤ 60	15 ml
Well holder system (batch type)	≤ 40	500 μl
Flow system	≤ 30	100 μl

Table 2. Comparison of the biosensor responses according to antibody types

Antibody type	Frequency shift (Hz)				
	P. aeruginosa strain (KCTC)				
	1636	2004	2450	2513	2742
Polyclonal	132±1.8[a]	124±0.8	137±1.2	134±0.7	120±3.2
Monoclonal	166±3.9	235±6.1	195±9.0	249±5.2	201±8.5

[a]Mean±SD(n=3).

(Table 2). Table 2에 나타난 것처럼 동일농도의 개별 균주가 다클론 및 단클론항체와 반응하였을 때 모든 경우에 있어 단클론항체와의 반응성이 높아 정상상태에서의 진동수변화가 다클론항체를 생물요소로 사용한 경우보다 크게 나타났다. 또한, 단클론항체만에 대한 센서반응을 비교해 보면 거의 비슷한 농도로 개별 균주가 주입되었으므로 반응성이 같을 경우 진동수변화가 비슷하게 나와야 하나 Table 2에서 알 수 있는 것처럼 감응성이 가장 높은 균주는 *P. aeruginosa* KCTC 2513이었다. 따라서, 이 후의 시료분석 실험에는 단클론항체와 *P. aeruginosa* KCTC 2513을 사용하였다.

냉장유통시료를 대상으로 한 *P. aeruginosa* 간이검출

본 연구의 면역센서 시스템은 표지효소나 형광발색단을 사용하지 않으므로 계측공정이 간편하고 분석비용이 상대적으로 저렴하며, 특히 주요한 특징으로 면역반응결과 발생하는 센서 chip에서의 질량증가를 측정하므로 발색물질의 존재에 의한 계측저해를 덜 받는다.[13,14] 따라서, 시료의 clean-up과정을 상당부분 생략할 수 있는 장점을 지니고 있어 *P. aeruginosa*의 간이검출에 적합할 것으로 사료되었다.

Fig. 1은 반응완충용액인 0.2 M sodium potassium phosphate buffer(pH 7.2), 분석용 검체, 균 첨가시료 및 증균시료를 반응시스템에 주입하였을 때 나타나는 시간에 따른 진동수변화를 보여준다. Fig. 1에서와 같이 반응완충용액을 가하였을 때 진동수변화가 10~20 Hz 정도 발생하나 baseline이 곧 안정되었고 분석용 검체만을 가한 경우에도 진동수변화가 50 Hz 안팎으로 발생하므로 시료자체에 의한 매트릭스 효과가 존재함을 알 수 있었다.[15] 그러나, 균 첨가시료 및 증균시료를 가한 경우에는 진동수변화가 보다 현저하여, 이들을 가할 때 얻어지는 정상상태의 진동수변화에서 시료자체를 주입할 때 얻어지는 진동수변화를 뺀 값의 크기로부터 *P. aeruginosa*의 존재여부를 확인할 수 있을 것으로 사료되었다.

냉장어패류 및 가공식품 10종으로부터 제조한 분석용 검체에 *P. aeruginosa* KCTC 2513을 1.2×10^7 CFU/ml 농도로 첨가하여 모델시료를 제조한 후 flow형 반응시스템에 주

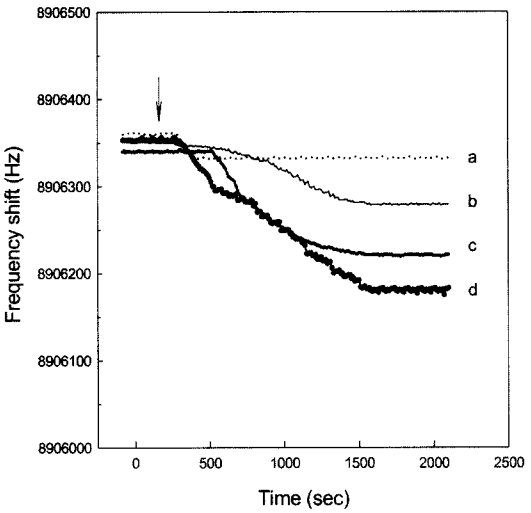

Fig. 1. Typical frequency response profiles obtained after injecting the reaction buffer (a), the sample itself (b), and the samples spiked (c) and enriched (d) with the viable *P. aeruginosa* cells.
The arrow indicates the point of injection.

입하였다(Table 3). 분석용 검체만을 가하였을 경우 나타나는 진동수변화는 시료에 따라 차이가 있으나 52~89 Hz 범위인 반면 균 첨가한 모델시료를 가하면 108~200 Hz의 정상상태에서의 진동수변화가 나타났으며, 그 차이값은 56~111 Hz 범위에 존재하였고, 차이값이 가장 큰 시료와 작은 시료는 각각 조갯살과 오징어였다. 본 시스템의 정밀성을 고려해 볼 때,[12] 차이값이 20 Hz 이상 나타나면 대체적으로 *P. aeruginosa*가 존재한다고 판단할 수 있을 것으로 사료되며, 이러한 기준으로 볼 때 Table 3의 균 첨가시료를 본 연구의 바이오센서로 측정한 결과는 모두 *P. aeruginosa*가 존재함을 시사하고 있다.

Table 3. Detection of *P. aeruginosa* in the spiked model samples

Spiked sample	Added *P. aeruginosa* (CFU/m*l*)	Frequency shift(Hz)		
		Not added	Added	Difference
Sirloin	1.2×10^7	63±0.8[a]	122±0.6	59
Beef flank	1.2×10^7	84±3.3	164±1.1	80
Pork	1.2×10^7	60±1.1	128±0.8	68
Chicken	1.2×10^7	87±1.8	169±4.4	82
Cod	1.2×10^7	89±6.7	200±1.7	111
Shrimp	1.2×10^7	67±0.6	138±0.6	71
Squid	1.2×10^7	52±1.4	108±2.5	56
Shellfish	1.2×10^7	55±1.4	154±0.8	99
Oyster	1.2×10^7	58±5.6	130±4.6	72
Pettitoes	1.2×10^7	59±0.9	139±2.1	80

[a]Mean±SD(n=3).

Table 4. Detection of *P. aeruginosa* in the enriched model samples

Enriched sample	Enriched *P. aeruginosa* (CFU/m*l*)	Frequency shift(Hz)		
		Not enriched	Enriched	Difference
Sirloin	2.4×10^7	63±0.8[a]	204±0.6	141
Beef flank	1.5×10^7	84±3.3	186±1.6	102
Pork	1.7×10^7	60±1.1	201±0.6	141
Chicken	1.7×10^7	87±1.8	214±1.3	127
Cod	1.8×10^7	89±6.7	222±2.2	133
Shrimp	1.2×10^7	67±0.6	190±0.9	123
Squid	1.8×10^7	52±1.4	183±2.9	131
Shellfish	1.4×10^7	55±1.4	205±0.8	150
Oyster	1.1×10^7	58±5.6	162±1.1	104
Pettitoes	1.3×10^7	59±0.9	183±0.9	124

[a]Mean±SD(n=3).

Table 4에는 위의 공시료로부터 제조한 분석용 검체에 *P. aeruginosa* KCTC 2513을 4.0×10^2 CFU/m*l*의 저농도로 가하고 Nutrient Broth에서 증균한 후 flow형 바이오센서 시스템으로 계측한 결과가 표시되어 있다. 이 때, 증균한 시료액에서의 *Pseudomonas* 농도는 $1.1\sim2.4\times10^7$ CFU/m*l*이었으며, 증균한 모델시료를 가하면 162~222 Hz의 정상상태에서의 진동수변화가 나타났고 여기에서 분석용 검체만을 주입하였을 경우 나타나는 진동수변화를 빼면 그 차이값은 102~150 Hz였다. Table 3에서와 같이 증균시료에 대한 측정결과도 모두 *P. aeruginosa*의 존재를 나타냄을 알 수 있었다.

P. aeruginosa KCTC 2513을 배양한 표준시료를 3.0×10^5

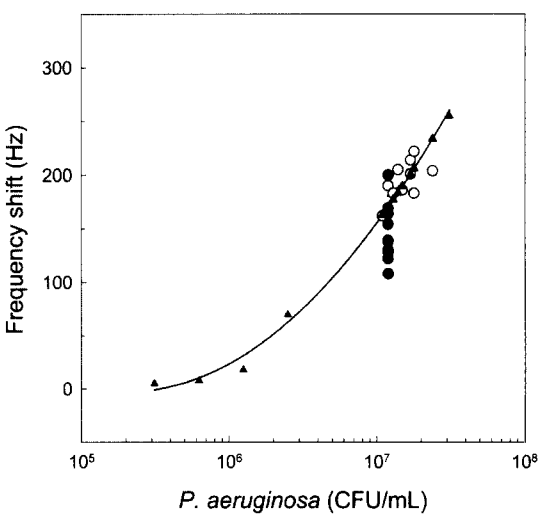

Fig. 2. Fitting of the results obtained by the model sample analyses to the calibration curve of the standard samples.
The frequency shifts were determined for the standard samples (▲), spiked samples (●) and enriched samples (○).

~3.0×10^7 CFU/m*l*의 농도범위로 flow형 반응시스템에 주입하였을 때 나타난 진동수변화와 균 농도와의 관계를 반대수좌표(semi-logarithmic scale)에 도시한 결과는 Fig. 2와 같다. 예상한 바대로 일차반응곡선 형태의 검량선을 얻을 수 있었고,[13,14] *Pseudomonas* 농도가 1.2~2.4×10^7 CFU/m*l*인 균 첨가 및 증균한 모델시료를 주입하였을 때의 진동수변화량은 상당부분 표준시료로부터 얻은 검량선에 근접하게 분포하였다. 이 결과는 첨가되거나 증균된 *P. aeruginosa* 농도가 실제로 계측되었음을 의미하며, 부수적으로 본 연구의 비표지 면역센서 시스템을 사용하여 간편하게 진동수변화를 측정함에 의하여 배양 중인 특정미생물의 생균수를 측정할 수 있는 가능성도 확인하였다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(00-PJ1-PG3-21800-0004).

국문요약

냉장식품의 주요한 변패원인균으로서 저온세균인 *Pseudomonas aeruginosa*를 최소 전처리한 후 신속히 검출할 수 있는 비표지 면역센서 시스템을 개발하였다. 수정결정전극상으로의 생물요소인 항체의 고정화는 이형이기능성 가교화제인 sulfosuccinimidyl 6-[3-(2-pyridyldithio)propionamido]hexanoate를 사용하여 항체를 티올화시킨 후 티올화된 항체를 화학흡착하여 행하였고, *P. aeruginosa* flagella에 대한 단클론항체를 사용하였을 때 다클론항체를 사용한 경우보다 센서감응이 우수한 것으로 나타났다. 항체가 고정화된 센서 chip과 flow형 quartz crystal microbalance 계측시스템을 이용하여 균 첨가 및 증균을 행한 10종의 모델시료에 대한 계측을 행하였다. 이 때, 시료자체에 의한 진동수변화가 52~89 Hz 범위인 반면 균 첨가 시에 나타난 진동수변화는 108~200 Hz이었고 증균시료에 의한 진동수변화는 162~222 Hz 범위로 나타났다. 시스템 안정화, 시료주입 및 정상상태의 센서반응 획득, 시스템 세척으로 이루어지는 한 주기의 센서계측에 소요된 시간은 모든 시료에 있어 30분 이내였다.

참고문헌

1. Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L. and Painter, P.R.: Chapter 8. Effect of the environment on microbial growth. In *The Microbial World*, Fifth Ed. Prentice-Hall, New Jersey, pp. 196-212 (1986).
2. Kristiansen, K.: Evaluation of two selective media for rapid isolation of *Pseudomonas* strains. *Dansk Veterinaertidsskrift*, **66,** 83-91 (1983).
3. Venkitanarayanan, K., Khan, M.I., Faustman, C. and Berry, B.W.: Detection of meat spoilage bacteria by a single polymerase chain reaction(PCR) and DNA probe. *IFT Annual Meeting*, p. 36 (1995).
4. Stewart, G.S.A.B., Jassim, S.A.A., Denyer, S.P., Newby, P., Ninley, K. and Dhir, V.K.: The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within 4 h using bacteriophage amplification. *J. Appl. Microbiol.*, **84,** 777-783 (1998).
5. Labadie, J. and Desnier, I.: Selection of cell wall antigens for the rapid detection of bacteria by immunological methods. *J. Appl. Bacteriol.*, **72,** 220-226 (1992).
6. Jabbar, H. and Joishy, K.N. Rapid detection of *Pseudomonas* in seafoods using protease indicator. *J. Food Sci.*, **64,** 547-549 (1999).
7. Tanaka, H., Shinji, T., Sawada, K., Monji, Y., Seto, S., Yajima, M. and Yagi, O.: Development and application of a bioluminescent ATP assay method for rapid detection of coliform bacteria. *Water Res.*, **31,** 1913-1918 (1997).
8. Rowley, D.B. and Previte, J.J.: Radiometry, a rapid screening technique for estimating the level of foodborne bacteria. *Activities Report*, **27,** 114-121 (1975).
9. Byrne, R.D.: Capture filtration for concentration and detection of selected microorganisms in milk. *Dissertation Abstracts Intl. B,* **55,** 1240 (1994).
10. Weaver, J.C., Williams, G.B., Klibanov, A. and Demain, A.L.: Gel microdroplets, rapid detection and enumeration of individual microorganisms by their metabolic activity. *Bio/Technology*, **6,** 1084-1089 (1988).
11. Sauerbrey, G.: Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Z. Phys.*, 155, 206-222 (1959).
12. Kim, N. and Park, I.-S.: Application of a flow-type antibody sensor to the detection of *Escherichia coli* in various foods.

Biosens. Bioelectron., **18**, 1101-1107 (2003).
13. Park, I.-S. and Kim, N.: Thiolated *Salmonella* antibody immobilization onto the gold surface of piezoelectric quartz crystal. *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 1091-1097 (1998).
14. Park, I.-S., Kim, W.-Y., and Kim, N.: Operational characteristics of an antibody-immobilized QCM system detecting *Salmonella* spp. *Biosens. Bioelectron.*, **15**, 167-172 (2000).
15. Shana, Z.A., Zong, H., Josse, F. and Jeutter, D.C.: Analysis of electrical equivalent circuit of quartz crystal resonator loaded with viscous conductive liquids. *J. Electroanal. Chem.*, **379**, 21-33 (1994).