

Review

해양 생물 유래 독소의 나노 기술 기반 신속 진단법 개발 동향

박찬영^{1†} · 권소연^{1†} · 문선희¹ · 김민우¹ · 하상도² · 박종필² · 박태정^{1*}

¹중앙대학교 화학과, ²중앙대학교 식품공학부

Trends in Rapid Detection Methods for Marine Organism-derived Toxins

Chan Yeong Park^{1†}, So Yeon Kweon^{1†}, Sunhee Moon¹, Min Woo Kim¹, Sang-Do Ha²,
Jong Pil Park², Tae Jung Park^{1*}

¹Department of Chemistry, Research Institute of Chem-Bio Diagnostic Technology,
Chung-Ang University, Seoul, Korea

²Department of Food Science and Biotechnology, School of Food Science and Technology,
Chung-Ang University, Anseong, Korea

(Received August 14, 2020/Revised August 17, 2020/Accepted August 20, 2020)

ABSTRACT - Marine organism-derived toxins have negative effects not only on human health but also in aquaculture, fisheries, and marine ecosystems. However, traditional analytical methods are insufficient in preventing this threat. In this paper, we reviewed new rapid methods of toxin detection, which have been improved by adopting diverse types of nanomaterials and technologies. Moreover, we herein describe the main strategies for toxin detection and their related sensing performance. Notably, to popularize and commercialize these newly developed technologies, simplifying the process of pre-treating real samples is very important. As part of these efforts, numerous studies have reported pretreatment methods based on the antibody-immobilized magnetic nanoparticles, and some cases have applied nanoparticles to enhance the sensing performance by utilizing the intrinsic catalytic activity. Furthermore, some reports have introduced fluorescent nanoparticles, such as quantum dots, to represent the lower detection limits of conventional enzyme-based colorimetric methods and lateral flow assays. Some studies using electrochemical measurements based on aptamer-nanoparticle complexes have also been announced. In addition, as the response to new toxins generated by changes in the marine environment is still lacking, further research on diagnostic and detection is also greatly needed for these kinds of marine toxins and their derivatives.

Key words : Marine toxins, Rapid diagnosis, Nanomaterials, Nanobiosensor, Electrochemical detection

음식의 섭취는 신체를 구성하고 유지하는 데 필요한 각종 탄수화물, 지방, 단백질, 미네랄 등과 같은 영양 성분을 공급하기 위한 수단으로, 생명체가 그 존재를 존속함에 있어 필수적인 행위이다. 특히, 해산물의 경우 칼슘과 인, 철분 등의 영양소가 많이 포함되어 있을 뿐만 아니라, 우리 몸에서 자체적으로 생성할 수 없는 해양 오메가3 지방산

과 같은 이로운 성분들을 섭취할 수 있다는 장점이 있다¹⁾. 최근 우리나라의 국민 소득 수준이 증대됨에 따라 건강에 대한 관심이 높아지게 되었고, 2011년 보고된 식품 외식 경제 유럽 위원회 공동 연구 센터의 보고에서 한국이 연간 인당 78.5 kg의 해산물을 소비해 전 세계에서 해산물 소비가 가장 많은 국가로 꼽히는 등, 우리나라의 해산물 수요도 역시 증가하는 추세이다²⁾.

하지만, 선호되는 해산물 중 일부는 스스로 독성 물질을 생성하거나, 유독 미세 조류를 섭취한 뒤 체내에 축적시키는 등 치명적인 독소를 방어 기제로써 사용한다. 이러한 해양 생물 유래 독소는 자연적으로 발생하는 독소 중 가장 치명적인 독소 중 하나로, 오염된 홍합, 굴, 가리비와 같은 어패류를 섭취할 경우 독소에 따른 중독 증상이 발병하며 치사량을 초과할 경우 생명을 앗아 갈 수 있

[†]These authors contributed equally to this work

*Correspondence to: Tae Jung Park, Department of Chemistry, Research Institute of Chem-Bio Diagnostic Technology, Chung-Ang University, Seoul 06974, Korea

Tel: +82-2-820-5220; Fax: +82-2-825-4736.

E-mail: tjpark@cau.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. The types, production, and distribution of marine toxins

Toxin group	Representative toxins	Producing marine organism	Distribution in Korea
Paralytic shellfish poisoning (PSP)	Saxitoxin, Gonyatoxin	<i>Alexandrium, Gymnodinium, Pyrodinium</i>	The southern coast
Diarrhetic shellfish poisoning (DSP)	Okadaic acid, Dinophysistoxin, Pectenotoxin, Yessotoxin	<i>Dinophysis, Prorocentrum</i>	The southern coast
Amnestic shellfish poisoning (ASP)	Domoic acid	<i>Pseudonitzschia, Nitzschia, Chondria armata</i>	The southern coast
Tetrodotoxin (TTX)	Tetrodotoxin	Microalgae, and present in tropical fish	All coast
Neurotoxin shellfish poisoning (NSP)	Brevetoxin	<i>Karenia brevis</i>	-
Azaspiracid (AZP)	Azaspiracid	Protopteridinium crassipes	The western coast
Ciguatoxin (CFP)	Ciguatoxin	<i>Gambierdiscus</i> , and present in tropical and subtropical fish	-

Table 2. The current regulation policy for marine toxins

Toxins	Korea	China	USA	Canada	Australia	EU ²⁾	CODEX ³⁾
PSP	400 MU ¹⁾ /100 g	400 MU/100 g	80 µg/100 g	0.8 mg/kg	0.8 mg PST/kg	80 mg STX/100 g	400 MU/100 g
DSP	160-200 ng/g	60 µg/100 g	160-200 ng/g	1 mg/kg	0.2 mg/kg	160-200 ng/g	0.16 µg/g
ASP	80 µg/100 g	20 mg/kg	80 µg/100 g	20 mg/kg	20 mg/kg	20 mg/kg	20 mg/kg
TTX	-	2000 µg/kg	-	-	-	-	-
NSP	-	-	20 MU/100 g	-	80 µg/100 g	-	80 µg/100 g
AZP	-	-	160 µg/kg	-	-	160 µg/kg	-
CFP	-	-	0.01 µg/kg	-	-	-	-

¹⁾MU: mouse unit.²⁾EU: European union.³⁾CODEX: Codex Alimentarius Commission.

다³⁾. 국내의 해양 독소에 대한 경각심은 1986년 마비성 패류 독소(paralytic shellfish poisoning, PSP)에 의한 사고 이후 공론화되었으며, 이 외에도 중독 증상이나 독소를 생산하는 조류의 종류, 독소의 구조적 특징에 따라 기억 상실성 패류 독소(amnestic shellfish poisoning, ASP), 설사성 패류 독소(diarrhetic shellfish poisoning, DSP), 신경성 패류 독소(neurotoxic shellfish poisoning, NSP) 등이 있다. Table 1은 해양 독소의 중독 증상 별 독소 종류 및 유래 생물과 한국 내 분포를 정리한 것이다⁴⁻⁶⁾.

이렇듯 해산물 섭취로 인해 얻을 수 있는 건강상의 이점이 있음에도 불구하고, 해양 독소 잔류로 인한 잠재적 위험성으로 인해 각국에서는 수산 식품의 안전성 확보, 국민 건강 보호, 양식 산업의 육성을 위해 대표적인 독소들을 강력하게 규제하며 상시적으로 감시하고 있다. 우리나라의 경우, 식품 의약품 안전처 주관하에 여러 지자체가 유통되는 패류, 피낭류 등에 대해 수거 검사를 실시 중이며, 재외국의 경우 미국 식품 의약국(Food and Drug Administration, FDA)의 국가 패류 위생 관리 프로그램

(national shellfish sanitation program)을 통해서 어패류(조개, 굴, 홍합, 전복 등)에 대한 관리 가이드라인(guide for the control of molluscan shellfish)을 제시하고 있다^{7,8)}. 이러한 지침에 따라 관리 기관과 생산업자들은 유통물들에 대한 해양 독소 수치를 지속적으로 관리하고 있으며, 허용 기준을 초과하는 경우 해당 수산물의 유통·판매 금지와 회수·폐기 등의 조치를 취하고 있다.

현재 우리나라를 비롯한 해외 많은 국가들이 해양 독소를 관리하기 위해 공식적으로 사용하는 방법은 국제 분석 화학회(Association of Official Analytical Chemists)의 권를 사용한 바이오어세이법(bioassay method)이며, 몇몇 국가에서는 액화 크로마토그래피-질량 분석기를 사용한 기기적 분석법들도 일부 독소에 한해 도입하고 있다⁹⁾. 각국에서는 해당 검사법을 통해 얻은 결과를 MU/g (mouse unit/g) 및 mg/g 등의 단위로 환산하여 검체 내의 해양 독소 함량을 평가하는 척도로 사용하고 있다. Table 2는 해당 기준에 따른 국가별 해양 독소별 규제 정책을 정리한 것이다. 바이오어세이법의 경우, 해산물 추출물을 실험용

동물에 투여하고 증상 및 사망 시간을 기록하여 진행하는 방식이나, 실험실 동물의 사용과 관련된 윤리적 우려 및 낮은 민감도와 높은 거짓 양성 및 거짓 음성 비율 등의 기술적 한계가 있다¹⁰⁾. 이 외에도 효소 결합 면역 흡착 검사법 등과 같은 생화학적 방법 및 다양한 검출기가 연결된 고성능 액체 크로마토그래피가 도입되고 있으나, 수입 및 수출되는 양을 전체적으로 감시하기에는 어려운 실정이다^{11,12)}.

본 연구에서는 이러한 한계를 극복하기 위해 생물을 사용하지 않고도 실제 검체내의 해양 독소 함량을 신속하게 판별하기 위해 고안된 검출 방식을 크게 종래의 분석 기법에 나노 물질을 도입함으로써 개선된 해양 독소의 검출 기법과 전기화학법, 그리고 신규로 고안된 검출 기법으로 나뉘 살펴보고 있으며, 각각의 대표적인 연구 결과에 대한 개요와 방법, 결과에 대해 고찰하였다.

나노 기술로 개선된 해양 독소 검출법

효소 결합 면역 흡착 검사법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

효소 결합 면역 흡착 검사법은 미지 시료 내 각종 표적 물질들의 정성 및 정량 평가를 위해 사용되는 실험 기법으로, 항원-항체 간 면역 반응을 검출의 근간으로 하며, 효소로 표지된 항원 또는 항체를 사용하여 효소 활성에 따라 나타나는 신호의 강도를 통해 존재 유무를 평가한다¹³⁾. ELISA 기법은 사용하는 항원, 항체의 종류 및 실험 순서에 따라 크게 네 가지로 분류하며, 각각 직접 ELISA (direct ELISA), 간접 ELISA (indirect ELISA), 샌드위치 ELISA (sandwich ELISA), 경쟁적 ELISA이다 (competitive ELISA) (Fig. 1). 직접 ELISA는 플레이트에 항원을 고정시킨 뒤, 표지 물질이 결합된 1차 항체를 직접 반응시키고 비결합된 1차 항체를 제거한 뒤, 플레이트에 남아 있는 표지 물

질의 활성도를 통해 항원의 존재 유무를 파악하는 원리로, 주로 항원의 활성도 및 양을 확인하고자 할 때 사용한다. 간접 ELISA의 경우 직접 ELISA와 실험 방법이 유사하나, 플레이트에 고정된 항원과 반응하는 1차 항체에는 표지 물질이 없고, 대신 1차 항체만과 선택적으로 결합하는 표지 물질이 결합된 포획 항체(capture antibody)를 사용해 반응시킨 뒤 나타나는 표지 물질의 활성도 양상을 통해 항원의 존재 유무를 파악한다. 샌드위치 ELISA는 위의 두 경우와는 달리, 항원의 종류에 따라 같은 혹은 다른 항원 결정 부위(epitope)를 갖는 두 종류의 특이적 항체 중 하나를 기관에 고정화시킨 뒤, 항원과 결합된 나머지 항체 순서대로 반응시켜 실험을 진행한다. 경쟁적 ELISA는 항원-항체 반응에서 동일 결합 부위에 대한 두 가지 항원 또는 두 가지 항체 간의 경쟁에 의해 이루어진다. 특정 항체에 대해 동일한 반응 부위를 갖는 저해제(inhibitor antigen)의 양이 증가할수록 검출되는 신호가 점점 낮아지는 원리다.

하지만 ELISA 기법을 통해 결과를 얻기 위해서는 위에서 기술한 바와 같이 여러 단계의 실험 과정을 거치기 때문에 대량으로 스크리닝하는 데 어려움이 있으며, 반응 시간 및 표지 물질의 활성도에 따라 검출 시간 및 감도가 달라질 수 있다¹⁴⁾. 대표적인 표지 물질로는 홍당무 과산화 효소(horseradish peroxidase, HRP)나 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase) 등이 있으나, 효소의 안정성 또한 실험 결과와 직결되므로 분석 환경이 제한된다는 단점이 있다¹⁵⁾. 또한 실제 검체 사용에 있어 전처리 과정이 까다롭고, 실험 도중 여러 번 진행되는 세척 과정으로 인해 항원 및 항체가 손실되는 경우가 있어 키트화 및 현장 진단 용으로 사용하기 어렵다는 문제가 있다¹⁶⁾. 게다가 ELISA의 경우 전문 인력을 비롯한 파이프렛, 흡광도 리더기와 같은 고가 장비가 필요하므로, 신속 진단에 활용하기 위해 보다 반응성이 높고 안정적인 표지 물질로써 다양한 나노

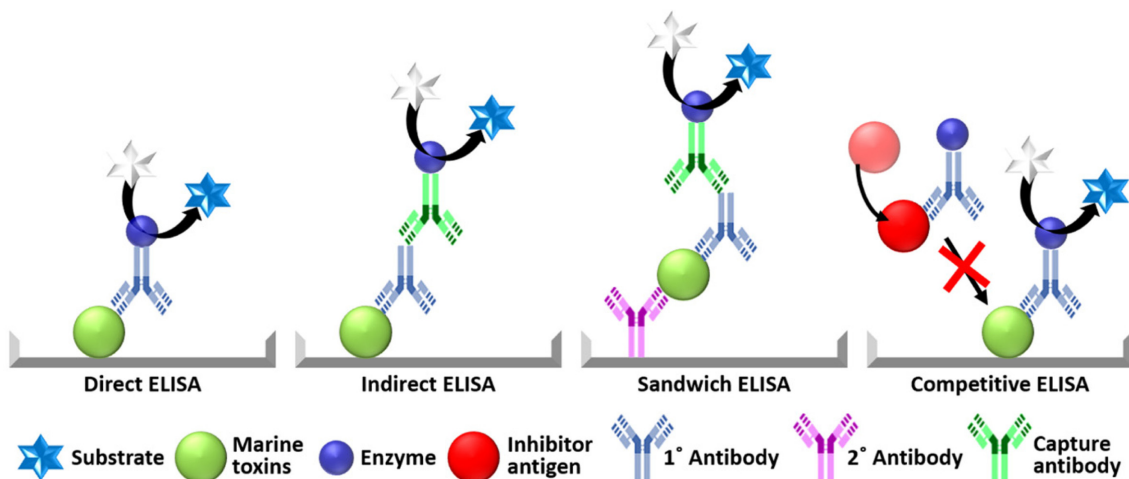


Fig. 1. Schematic illustration of different types of ELISA methods.

물질을 도입하고자 하는 시도들이 있었다.

Campàs 등¹⁷⁾은 굴이나 홍합과 같은 패류에서 테트로도톡신(tetrodotoxin, TTX)을 검출하기 위해 간접 ELISA와 유사한 자성 나노 입자(magnetic nanoparticle, MNP) 기반 비색 면역 측정법을 개발했다. 해당 방법에서는, 자성 나노 입자의 표면을 말레이미드(maleimide)로 활성화한 뒤 시스테인(cysteamine)을 처리하여 아민 작용기로 개질화하고 이를 패류로부터 추출한 테트로도톡신 검체와 반응시켜 고정화한 후, 테트로도톡신의 항체와 이를 인지하는 HRP로 표지된 포획 항체를 차례로 투여하여 최종적으로 H_2O_2 가 포함된 시판용 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine, TMB) 용액과 반응시켜 나타나는 발색 정도를 통해 확인했다. HRP의 경우 H_2O_2 를 환원시키는 과정에서 TMB를 산화시키는데, 그 결과 무색이었던 TMB의 흡수 파장이 바뀌어 발색하는 원리다. 즉, 검체 내의 테트로도톡신의 농도가 높을 경우, 자성 나노 입자 표면에 포획되는 양이 많아지고, 이후 테트로도톡신의 항체 및 이를 인지하는 HRP로 표지된 항체와 반응시킴에 따라 잔존하는 HRP의 농도가 올라가 TMB 투여시 발색되는 정도가 증강되는 방식이다. 해당 방식은, 자성 나노 입자와 테트로도톡신이 복합체를 형성함에 따라 안정성이 높아져 1.5시간 이내에 분석을 완료할 수 있었으며, 이는 유럽 식품 안전청 지침 임계치인 $44 \mu\text{g/kg}$ (44 ppb)보다 훨씬 낮은 수준에서 테트로도톡신을 함유한 패류 샘플을 신속하게 식별할 수 있었다.

Lai 등¹⁸⁾은 브레브톡신 B (brevetoxin B) 검출의 민감성을 높이기 위해 자성 나노 입자 및 금 나노 입자를 도입하여 경쟁적 ELISA와 유사한 비색 검출법을 개발했다. 이는 자성 나노 입자의 HRP 유사적 거동인 펜톤 반응을 기반으로 한 시각적 발색 시스템으로, 펜톤 반응은 자성 나노 입자가 H_2O_2 와 반응하며 'OH 라디칼을 생성하는 반응이다. 반응계 내의 생성된 'OH 라디칼의 정도는 H_2O_2 의 농도에 비례하며, 이 또한 TMB 기반의 발색 반응을 통해 파악할 수 있다¹⁹⁾. 이들은 포도당 산화 효소(glucose oxidase) 및 브레브톡신 B의 항체가 고정화된 금 나노 입자를 해당 독소가 포함된 검체와 반응시키고 이를 소 혈청 알부민(bovine serum albumin)이 결합된 브레브톡신 B로 처리된 자성 나노 입자와 반응시킨 뒤, 자석을 이용해 자성 나노 입자를 모으고 여기에 TMB와 포도당을 투여했을 때 나타나는 발색 정도를 통해 판단했다. 즉, 초기 금 나노 입자와 반응시키는 검체 내의 브레브톡신 B의 농도가 증가함에 따라 자성 나노 입자와 결합 가능한 금 나노 입자의 수가 줄어들게 되고, 그에 따라 자성 나노 입자 표면에 잔존하는 포도당 산화 효소의 양이 줄어, 최종 단계에서 포도당 및 TMB를 넣었을 때 발색되는 정도가 줄어드는 양상을 통해 검체 내의 브레브톡신 B의 양을 정량화할 수 있는 것이다. 해당 방법의 최저 검출 한계는 0.076

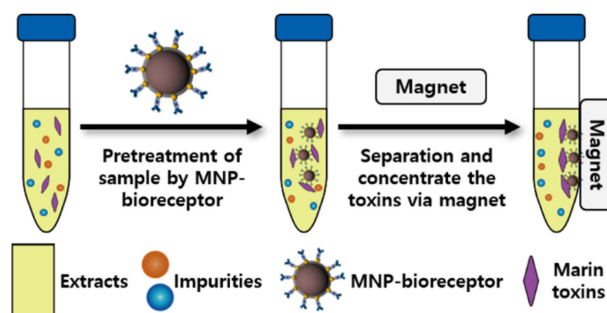


Fig. 2. Schematic illustration of real sample pretreatment procedure based on the antibody-modified magnetic nanoparticle.

ng/kg (0.076 ppt)였으며, 이는 기존에 상용화된 Abraxis사의 ELISA 키트보다 500배 낮은 결과였다. 특히, 위의 예시와 같이 자성 나노 입자를 시료의 전처리에 사용할 경우, 생체 내 단백질을 비롯한 각종 저해 요소로 인한 배경 신호를 낮출 수 있어 검사의 정확성을 더욱 높일 수 있다는 장점이 있다(Fig. 2).

측방 유동 면역 분석법(lateral flow assay, LFA)

측방 유동형 면역 분석법은 효소 면역 측정법과 측방 유동 분석법을 결합한 기술로, 측방 유동 면역 분석용 스트립의 구성은 시료 패드(sample pad), 접합 패드(conjugation pad), 검출 패드(detection pad), 흡수 패드(absorption pad)로 구성되어 있다 (Fig. 3)²⁰⁾. 여기서 시료 패드는 검체를 투여하는 장소이고, 접합 패드는 표적 물질과 선택적으로 인지할 수 있는 1차 생체 수용체(bioreceptor)로 처리된 표지 물질이 담지 되어 있다. 검출 패드에는 크게 두 종류의 생체 수용체가 선 형태로 고정화되어 있는데, 첫 번째는 표적 물질과 결합할 수 있는 2차 생체 수용체로 처리되어 표적 물질의 존재 유무를 파악할 수 있는 검출선(test line)이고, 그 이후에는 표적 물질과 반응하지 않아 검출선을 지나온 1차 생체 수용체를 선택적으로 인지하는 포획 항체로 처리된 대조선(control line)이 있다. 끝으로, 흡수 패드는 흡습력이 높은 물질을 사용함으로써 시료의 유동 속도를 높여 검출 시간을 단축시키는 역할을 한다. 즉, 분석하고자 하는 시료를 스트립에 투여하면 모세관 현상 및 확산에 의해 시료가 측면으로 유동하며, 항원-항체 간 특이적 면역 반응을 통해 표적 물질의 양에 따라 검출선에 표시되는 방식이다.

측방 유동 면역 분석법의 경우, 일회용으로 사용이 편리하고 휴대가 용이하며 전문 인력 또는 고가의 장비 없이 취급할 수 있다는 장점이 있어, B형 간염, 임신 진단, 혈당 측정 또는 식품에 포함된 독성 물질, 병원성 균, 잔류 농약을 검출하는 등 자가 진단이나 현장 진단용으로 다방면에서 상용화되어 있다²¹⁾. 그러나 해당 방식의 경우

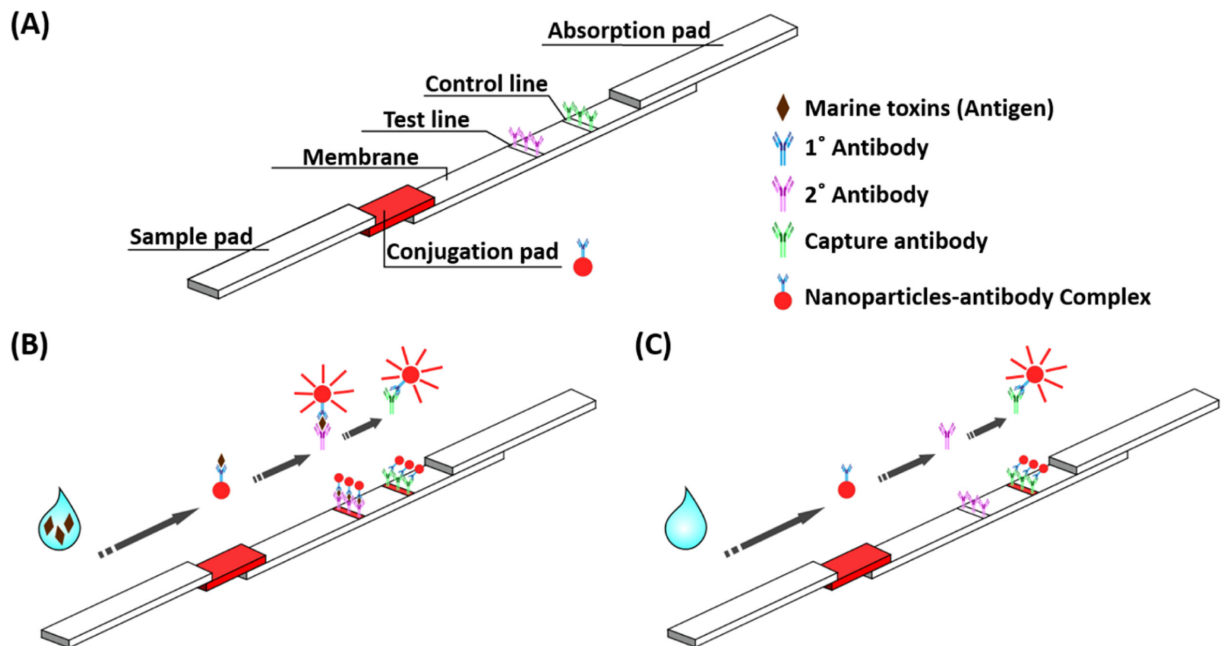


Fig. 3. The principal of LFA method. (A) The component description of LFA. (B) The propagation of the sample solution containing target toxins. (C) The propagation of the sample solution without target toxins.

상대적으로 민감도 및 특이도가 낮다는 단점이 있으며, 이는 해양 독소의 규제 기준인 실제 시료 내에서 수 ppm에서 수 ppb의 검출을 진행하기에는 부족하다는 문제가 있다²²⁾. 이를 개선하기 위해서, 일반적으로 표지 물질로 사용되는 금 나노 입자가 아닌 형광 나노 입자를 도입해 미량의 시료로도 고감도의 분석을 가능케 하는 연구가 진행되었다.

Shen 등²³⁾은 테트로도톡신의 신속하고 고감도의 검출을 위해 양자점 나노비드(quantum dot nanobeads)와 금 나노플라워(gold nanoflowers)를 결합한 경쟁적 측방 유동형 면역 크로마토그래피 스트립(competitive lateral flow immunochromatographic strips, C-LFICS)을 개발했다. C-LFICS는 일반적인 측방 유동 면역 분석법과 그 방식이나 구성이 유사하나 경쟁적 ELISA 방식과 같이 표적 물질과 검체 내의 표적 물질 간 경쟁 반응을 유도하여 정량화에 이용한다는 차이점이 있다. 해당 논문에서는 C-LFICS 스트립을 구현하기 위해 접합 패드에는 테트로도톡신 항체로 처리된 금 나노플라워를 위치시키고, 검출선에는 테트로도톡신을, 검출선과 대조선에 소 혈청 알부민으로 블로킹한 양자점 나노비드를 각각 처리했다. 여기서 양자점 나노비드와 금 나노플라워를 같이 사용한 이유는, 양자점 나노비드의 발광 파장이 금 나노플라워의 흡광 파장과 겹쳐 형광 공명 전이(fluorescence resonance energy transfer) 현상으로 인해 양자점 나노비드 주변에 금 나노플라워의 양이 많아질 경우 소광 현상(fluorescence quenching)이 발생하여 동일한 여기 파장하에서 양자점 나노비드의 발광량이 줄어들기 때

문이다. 즉, 시료 패드에 테트로도톡신이 있는 검체를 적재하면 측면으로 이동하며 접합 패드에 있는 테트로도톡신 항체로 처리된 금 나노플라워와 결합하게 되고, 검체 내의 테트로도톡신의 양에 따라 검출선에 잔류하는 금 나노플라워의 양이 줄어들어 대조선과 유사한 정도의 형광 값을 나타냄으로써 정량적 검출이 가능한 것이다. 이 방법은 8분 이내에 분석이 가능하며 검출 한계가 0.2 ng/mL (0.2 ppb)로 매우 낮았으며, 기존 방식과 비교해 신호 밝기가 우수하고 간섭 신호도 낮았다.

전기화학 기반의 해양 독소 검출법

전기화학 기반의 유해 물질 검출 센서는 전극 표면에 전기화학적 특성을 갖는 물질을 처리한 뒤, 반응 양상에 따라 나타나는 산화/환원 정도를 전자 이동의 결과로 발생하는 전류 값으로 읽어 들임으로써 관찰하고자 하는 대상의 성질을 분석하는 방법이다. 즉, 전극 표면에서 발생한 산화 또는 환원 반응으로 인해 외부로 전기 에너지가 공급되거나, 외부로부터 가해진 전기 에너지로 인해 반응계에 존재하는 물질들 간 화학 반응이 유발되고, 이를 통해 대상의 정성 및 정량적 평가를 할 수 있다²⁴⁾. 분석 목적에 따라 전극의 구성을 달리 할 수 있으나, 대부분의 전기화학 기반의 유해 물질 검출 센서는 주로 용액상에서 검출하는 데 사용되므로 3-전극계 시스템을 사용한다. 해당 실험에서 사용되는 전극은 각각 작업 전극(working electrode), 기준 전극(reference electrode), 상대 전극(counter electrode)

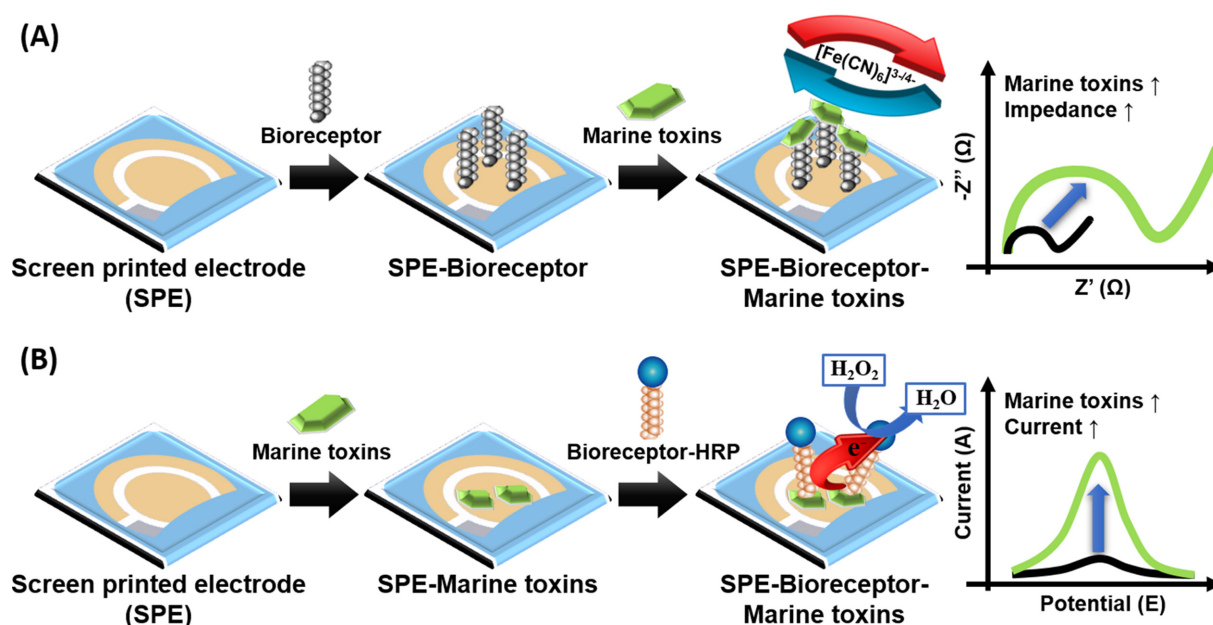


Fig. 4. Schematic illustration of electrochemical detection methods. (A) EIS method. (B) amperometric method.

이며, 이들은 모두 전위 가변기(potentiostat)에 연결되어 하나의 회로를 구성한다. 작업 전극은 전기화학적 거동을 관찰하고 싶은 물질을 처리한 뒤 전위 가변기를 통해 전극의 전기화학적 환경을 변화시킴에 따라 나타나는 전류 값을 읽어 들이는 전극이다. 기준 전극은 수용액과 같은 환경에서 작업 전극의 전압을 실험자가 설정한 값에 맞춰 반영되도록 보정해 주는 역할을 한다. 상대 전극은 작업 전극과는 반대 방향의 전압이 걸림으로써 반응계 내의 산화/환원 균형을 유지한다. 전기화학 센서의 경우, 각종 고분자나 나노 재료, 바이오 물질 등을 접목함으로써 검출능 및 신뢰성을 향상시킬 수 있으며, 특히 검출 시스템의 저비용, 소형화가 가능하고 반응에 따른 신호 대역이 빠르다는 이점이 있어 현장 진단에 적합한 분석 방법이다. 전기화학 기반의 검출법은 크게 두 가지 방식으로 나뉘는데, 각각 작업 전극의 임피던스를 측정함으로써 검출하는 전기화학 임피던스 분광학(electrochemical impedance spectroscopy, EIS) 센서와 작업 전극의 전류를 측정함으로써 판별하는 암페로메트릭(amperometric) 방식이다(Fig. 4). 특히 분석에 사용되는 전기화학적 특성을 갖는 표지 물질의 종류와 성능이 곧 센서의 검출 성능과 직결되므로, 각 방식에 적합한 표지 물질을 선정하여 검출 시스템을 구성하는 것이 매우 중요하다²⁵⁾.

전기화학 임피던스 분광학

임피던스란 교류 회로 내의 저항값으로, EIS법은 산화/환원 활성종이 존재할 때 교류 전압의 진동수를 변화시키며 얻은 정보를 통해 전극 표면의 상태를 대변한다. 해당 방식에서 특히 많이 사용되는 산화/환원종은 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$

(ferro/ferricyanide redox couple)이며, 전극 표면 근처에서 전자 전달이 일어나기 때문에 미세하게 변화한 전극의 상태 또한 즉각 반영할 수 있어 임피던스 기반의 바이오센서에서 많이 활용되고 있다. 괄목할 만한 점은 최근 발표된 임피던스 기반의 해양 독소 검출 관련 논문 중 다수가 생체 수용체로써 aptamer(아пта머)를 도입했다는 점이다. aptamer는 단일 가닥 올리고 핵산으로, 그 자체로 안정된 삼차 구조를 유지하여 항체와 유사하게 표적 물질을 선택적으로 인지하여 결합할 수 있다. aptamer 기반 임피던스 기법의 검출 기작은 작업 전극 표면에 고정화시킨 aptamer가 표적 물질과 결합함에 따라 구조가 변하게 되고, 그 영향으로 전극 주변의 환경이 변화한 정도를 임피던스 측정을 통해 파악함으로써 검출에 활용하는 것이다.

이러한 내용에 기반해 Eissa 등²⁶⁾은 임피던스 기반의 오카다산(okadaic acid, OA) 검출 센서를 구현하기 위해 이를 표적으로 하는 aptamer를 발굴한 뒤, 이들의 5' 말단에 티올(thiol) 작용기로 개질 후 Au-S 결합을 통해 금 전극에 고정화하여 오카다산 검출 센서를 개발했다. 해당 센서는 100 pg/mL에서 60 ng/mL 사이의 오카다산에 대해 선형적인 양상을 나타냈으며, 70 pg/mL (70 ppt)라는 낮은 검출 한계를 보였을 뿐만 아니라 디노피시스 독신-1과 2와 같은 오카다산 유사체에 대해 교차 반응성을 보이지 않았다. Zhao 등²⁷⁾은 티오닌-그래핀(TH-G) 나노 복합체를 도입하여 실린드로스퍼마핀(cylindrospermopsin) 검출용 aptamer 기반 임피던스 검출법을 발표했다. 해당 방법에서는, 글루타랄데하이드(glutaraldehyde)를 가교제로 사용해 aptamer를 TH-G로 처리된 유리 탄소 전극(glassy carbon electrode)에 고정화한 후, 일련의 과정을 통해 검출 조건을 최적화했

다. 해당 센서는 0.39 ng/mL에서 78.0 ng/mL의 광범위한 범위에서 실린드로스피라미신을 정량화할 수 있었으며, 해당 센서 역시 높은 선형성($R^2=0.9968$) 및 0.117 ng/mL (0.117 ppb)의 낮은 검출 한계를 보였다. 이를 통해 압타머 기반 임피던스법은 종래의 해양 독소 검출법 및 면역학적 방법의 유망한 대안이 될 수 있을 것으로 예상된다.

전류 측정법

전류 측정법의 경우 임피던스법과는 달리, 표적 물질을 인지하는 수용체에 더해 다양한 나노 입자 및 유기 물질 등을 전류 신호 증폭의 표지 물질로 도입하여 검체 내의 독소 양에 따라 나타나는 전류 신호를 측정함으로써 이를 판별한다.

Hou 등²⁸⁾은 전류 측정법 기반의 삭시톡신(saxitoxin, STX) 검출을 위해 표지 물질로 다중 벽 탄소 나노 튜브(multi-walled carbon nanotube)를 도입했으며, 산화/환원종으로 메틸렌 블루를 사용한 검출 기법을 개발했다. 금 전극 위에 카복실 작용기로 개질된 다중벽 탄소 나노튜브의 균일한 자기조립 분자 박막을 형성하기 위해 금 전극에 소수성인 옥타데칸티올(octadecanethiol) 처리를 한 뒤, 다중벽 탄소 나노튜브를 반응시켰다. 이후 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinimide (NHS) 커플링 반응을 통해 다중벽 탄소 나노튜브의 카복실 작용기를 활성화한 뒤, 삭시톡신에 특이적인 압타머를 전극에 고정화했다. 삭시톡신의 검출 평가는 해당 독소를 농도별로 위 전극과 반응시킨 뒤, 메틸렌 블루 존재하에 산화/환원 전류를 측정하여 나타나는 전류 값의 변화를 읽어 들임으로써 진행했다. 해당 연구의 경우 압타머가 삭시톡신과 결합함으로써 인해 변형된 구조가 전자 이동을 방해하는 요소로 작용해 삭시톡신의 농도에 따른 전류 값이 점차 감소하는 양상을 보였다. 해당 센서의 경우 0.9 nM에서 30 nM의 농도 범위의 삭시톡신을 검출할 수 있었으며, 0.38 nM의 검출 한계를 나타냈다.

Leonardo 등²⁹⁾은 홍합에서 아자스피라시드(azaspiracid, AZA)를 검출하기 위해 Protein G로 코팅된 자성 나노 입자에 아자스피라시드 항체를 고정시킨 나노 복합체 및 HRP로 표지된 아자스피라시드를 사용한 전기화학적 면역 센서를 발표했다. 해당 방법은 아자스피라시드 항체가 고정화된 나노 복합체와 표적 독소가 있는 검체를 먼저 반응시켜 아자스피라시드 항체 부위를 블로킹한 뒤, HRP로 표지된 아자스피라시드와 반응시킴으로써 검체와 반응하고 남은 결합 부위에 HRP가 남아 있게 된다. 즉, 검체 내의 독소 농도가 높을수록 자성 나노 입자 표면에 잔존하는 HRP의 양이 줄어들게 되고, 그 결과 TMB를 산화시키며 발생하는 전류 값이 낮아지게 되는 원리다. 해당 방법은 검출을 위한 단계가 적어 15분 이내의 짧은 분석 시간 내에 완료할 수 있다는 장점이 있으며, 유럽의 규제 허

용량인 160 µg/kg (160 ppb) 보다 낮은 63 µg/kg (63 ppb)의 검출 한계를 나타냈다. 또한 Leonardo 등³⁰⁾은 이와 유사한 방식을 도입하여 *Lagocephalus sceleratus*에서 테트로도톡신을 검출한 결과도 발표했다. 해당 실험의 측정 범위는 1.2 ng/mL에서 52.7 ng/mL로 매우 넓고, 검출 한계는 1.2 ng/mL (1.2 ppb)였다.

위에서 소개한 표지 방식의 방법들은 비록 검출의 감도가 높다는 장점이 있지만, 이를 나노 입자나 전극에 도입하기 위해서는 추가적인 실험 단계 및 검증 단계를 거쳐야 한다는 문제가 있다. 이러한 이유로 표지 물질을 사용하지 않고도 좋은 검출 성능을 발휘할 수 있는 비표지 방법들도 고안되었다. Pan 등³¹⁾은 오카다산의 비표지적 검출을 위해 분화된 금 미세 전극 사이에 소량의 금 나노 입자를 고정화 한 뒤, 이들의 자가 촉매 성장 현상을 오카다산 특이 압타머 및 오카다산으로 조절해 결과적으로 금 나노 입자 성장 정도에 따라 변화하는 금 미세 전극 간 흐르는 전류량을 파악함으로써 개발했다. 자세히는, 금 미세 전극 사이에 간극을 만들고 여기에 전류가 흐르지 못할 정도로 소량의 금 나노 입자를 고정화한 뒤, 오카다산 특이 압타머를 정전기적 인력으로 금 나노 입자 표면에 흡착시킨다. 이후 이 사이에 표적 독소가 들어있는 검체를 투여하여 흡착된 압타머를 제거하고, 여기에 금 나노 입자의 전구체인 HAuCl_4 와 포도당을 투여한 뒤 분화된 미세 전극 사이의 전도성 신호 증폭 정도를 통해 검체 내에 오카다산이 존재하는지 여부를 판단하는 것이다. 여기서 금 나노 입자의 자가 촉매 성장은 2단계를 거쳐 일어난다. 우선 금 나노 입자 표면에 있는 구연산의 카복실 작용기가 산소 존재하에 포도당을 글루콘산(gluconic acid)으로 산화시킴과 동시에 H_2O_2 를 생성한 뒤, 이는 HAuCl_4 를 금 나노 입자 표면에서 환원시킴으로써 입자의 크기가 성장되는 방식이다. 하지만 검체 내에 오카다산의 농도가 낮아 금 나노입자 표면에 정전기적 인력으로 상호 작용하고 있는 압타머가 떨어져 나가지 않을 경우 금 나노 입자의 촉매 효과가 줄어들어 간극을 메울 만큼 성장하지 못하게 되고, 그 결과 전류는 흐르지 않게 되는 것이다. 개발된 센서의 검출 성능 테스트 결과, 5 ppb에서 80 ppb까지의 오카다산의 농도를 검출할 수 있으며, 1 ppb라는 낮은 검출 한계를 보였다.

Eissa 등³²⁾은 마이크로시스틴-LR(microcystin-LR)을 그래핀으로 처리된 탄소 전극과 압타머를 사용해 비표지적으로 검출하는 내용을 발표했다. 그래핀의 경우 압타머와 $\pi-\pi$ 상호 작용을 통해 이를 물리적으로 흡착시키는 역할을 하며, 이를 마이크로시스틴-LR이 포함된 검체와 반응시킬 경우 그래핀 위의 압타머가 떨어지게 된다. 여기서는 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 가 포함된 용액에서 사각파 전압 전류법(square wave voltammetry, SWV)으로 전극을 분석했는데, 압타머의 경우 그 때대가 음이온의 특성을 갖는 인산기로

되어 있어 전극 위에 잔류하는 압타머의 농도가 높아짐에 따라 같은 음전하를 갖는 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ 에 대한 척력이 발생해 전류값이 낮아지는 것이다. 개발된 센서의 검출 성능 테스트 결과, 0.1 pM에서 1.0 nM이라는 광범위한 검출 범위의 표적 독소를 검출할 수 있으며, 1.9 pM이라는 낮은 검출 한계를 보였다.

기타 원리에 의한 해양 독소 검출 기법

자기조립 분자박막(self-assembly monolayer, SAM) 기반의 면역 측정

자기조립 분자박막은 고체 표면에 자발적으로 형성되는 유기 단분자막을 말한다. 유기막을 형성하는 데 사용되는 단량체 역할을 하는 분자 구조는 크게 세 부분으로 나뉘며, 알킬 그룹(alkyl group)으로 된 스페이서를 중심으로 양 말단 부위에는 각각 헤드 그룹과 작용기 그룹이 있다³³⁾. 헤드 그룹은 대상 기관 표면 위에 화학적으로 고정화되는 부분으로, 이를 통해 조밀한 단분자층이 형성된다. 이후 스페이서의 알킬 체인 간 반 데르 발스 상호 작용을 통해 정렬된 단분자막이 형성되며, 나머지 노출된 말단에 목적에 맞는 작용기 그룹을 도입함으로써 활용도를 높일 수 있다³⁴⁾. 즉, 자기조립 분자박막을 형성하는 구성 분자가 고체 표면에 흡착됨과 동시에 분자들 간의 상호 작용에 따른 초분자 조립체를 형성함으로써 만들어진다.

Leonardo 등³⁵⁾은 해당 기술을 활용하여 해수에서 오카다산을 검출하는 면역 측정법을 개발했다. 발표된 연구에 따르면, 헤드 그룹에 모노티올(monothiol) 내지는 디티올(dithiol) 그룹이 있으며 작용기는 1차 아민으로 구성된 단량체 분자를 말레이미드로 활성화된 플레이트에 처리하여 고정화를 시킨 뒤, 자기조립 분자박막을 형성하여 이를 오카다산 검출에 활용했다. 해당 독소의 경우 한쪽 말단에만 카복실 작용기가 있기 때문에, 분자 박막에 있는 아민 작용기와 EDC/NHS 커플링 반응을 통해 아마이드 결합(amide bond)을 형성함으로써 오카다산의 방향성을 조절할 수 있었고, 간접 ELISA 방식과 유사한 방식으로 오카다산 항체와 HRP로 표지된 이를 인지하는 항체를 사용해 비색 면역 측정법으로 해수에서 1.0 ng/mL (1.0 ppb)이라는 낮은 검출 한계를 보였다. 디티올을 사용해 자기 조립 분자막을 형성했을 경우 모노티올에 비해 면역종 간의 간격이 넓어지고 비특정 결합이 감소한 반면, 모노티올의 경우 시약의 단가가 낮아 검사 비용을 줄일 수 있다. 해당 자기조립 분자박막 기반 면역 측정법은 모든 실사성 패류 독소를 선택적으로 검출할 수 있었으며, 일종의 플랫폼 기술로써 수행이 용이하며 비용이 낮다는 장점이 있어 고속 대량 스크리닝(high-throughput screening)에 적합한 결과를 얻었다.

액적-디지털 중합 효소 연쇄 반응(droplet-digital polymerase chain reaction, ddPCR)

중합 효소 연쇄 반응은 대상 시료 내에 검출하고자 하는 유전 서열의 존재 유무를 파악하기 위해 사용하는 방법으로, 해당 유전 서열을 증폭시키기 위해 고안된 시발체(primer)와 DNA 중합 효소(DNA polymerase), dNTPs(deoxynucleotides) 등이 존재하는 환경을 조성 후 온도를 변경하며 원하는 서열을 증폭시킨 뒤 전기 영동법을 통해 정량화하는 방식이다³⁶⁾. 하지만 해당 기술의 초기 단계에선 대상 서열이 증폭되는지 유무만 판단하는 정성 분석만 가능하다는 단점이 있어, 이를 개선하고자 정량화가 가능한 정량 PCR(quantitative PCR) 및 고리 매개 등은 증폭법(loop-mediated isothermal amplification) 등이 고안되었다³⁷⁾. 하지만 이들 방법 역시 정량 분석을 위해서는 표준 물질의 농도에 따라 얻은 C_t (threshold cycle) 또는 C_q (cycle quantification) 값으로 얻은 표준 곡선이 필수적이며, 매 실험 때마다 발생 가능한 PCR 효율에 따른 오차로 결과값에 편차가 생길 수 있다는 단점이 있다³⁸⁾. 이러한 한계를 보완하고자 액적(droplet)을 반응계로 하는 디지털 PCR 기술이 신규 기술로써 크게 각광받고 있다. 디지털 PCR은 액적 샘플 양의 분률을 측정하기 때문에 시료 내 DNA의 초기 양에 대한 절대적인 정량이 측정 가능하다는 장점이 있어, 표준 물질을 사용한 검량곡선에 의존할 필요가 없고, 정밀도를 향상하는 것이 쉬우며 복잡한 혼합물도 분석할 수 있다³⁹⁾. 종래의 PCR에서 PCR 증폭 사이클 수는 개시 카피 수에 비례하나 디지털 PCR은 표본 핵산을 정량하기 위해 불확실한 지수 데이터에 의존하지 않으므로 유전자 발현에서 30% 미만의 차이를 검출할 수 있고 1-카피의 차이를 구별하고 0.1% 미만의 빈도에서 발생하는 대립 유전자의 동정이 가능하다⁴⁰⁾.

Lee 등⁴¹⁾은 독성 물질을 직접 검출했던 이제까지 방법과는 달리, 마비성 패류 독소를 생성하여 해양 생태계를 교란시키는 유해 해양 생물인 3종의 *Alexandrium* sp. (*A. affine*, *A. catenella*, *A. pacificum*)을 각각 구분하여 해수 검체로부터 상시 모니터링하기 위해 ddPCR 기반의 동정 체계를 확립했다. *Alexandrium* 3종의 구분이 필요한 이유는, 서로 외관이 비슷하여 광학 현미경으로는 구분이 안가 주된 패류 독화 원인종인 *A. catenella*와 독성이 없는 *A. affine*를 오관할 경우 해양 독소의 위험 정도를 정확히 파악할 수 없기 때문이다⁴²⁾. 하지만 이들 각자 유전 서열이 다르므로, 연구진들은 각 종을 대표하는 시발체(primer)를 고안하여 ddPCR로 중별 정량 분석을 진행했다. 분석에 앞서 시료의 전처리해 해수 시료에 세포파쇄용 버퍼 및 글라스 비드(glass bead)를 사용해 존재하는 유기체들을 파괴시킨 뒤 원심분리로 부유물을 제거하는 방식으로 진행했으며, 해당 시료와 PCR 믹스를 액적 발생기에 적용시킨 뒤 분석했다. 해당 방법을 실제 2017~2018년 대한

민국 남해 연안에 적용한 결과, 봄에는 유독성인 *A. catenella*가 지배적인 종이었고, 여름에는 무독성 *A. affine*가 주로 서식한다는 사실을 밝히는 데 기여했다.

형광 나노 입자 기반 검출 센서

형광 나노 입자 기반의 분석법은 분석하고자 하는 표적 물질의 존재 유무에 따른 나노 입자의 발광 양상의 변화를 감지하여 검출하는 기술로, 이는 대상 물질과 형광 나노 입자간 상호 작용으로 인해 발생한다⁴³⁾. 또한, 서로 다른 흡수·방출 파장을 갖는 입자 또는 형광 염료들의 조합을 통해 에너지 전이 특성을 극대화시키기도 한다⁴⁴⁾. 이러한 분석 방법은 기존의 질량 분석이나 원자 흡광 분석법에 비해 비교적 감도가 높고 신속하다는 특징이 있으며, 식품 속의 세균 또는 독소를 검출하는 환경 분야부터 바이오 분야까지 다방면에서 활용되고 있다⁴⁵⁾.

Sun 등⁴⁶⁾은 양자점 표면에 분자 각인된 실리카 층(molecular-imprinted silicon layer on the surface of quantum dots)을 형성하여 패류 시료에서 삭시톡신을 검출하는 형광 나노 센서를 개발했다. 양자점은 1~10 nm 크기의 나노 구조체이며, UV/Vis 영역에서 흡수 및 발광하는 특성을 가지고 있다. 특히, 양자점의 경우 유기 단분자 형광체와 비교했을 때 10~100배 높은 몰 흡광 계수를 갖고 있어 센서의 민감도를 높이는 데 큰 기여를 한다⁴⁷⁾. 분자 각인 기법은 인공적으로 항체와 유사한 구조를 고안하기 위한 한가지 방법으로, 본 연구에서는 역상 에멀션(reverse micro-emulsion) 기법을 통해 형성했다. 보다 자세하게는, 역상 에멀션 환경에서 양자점 표면에 Tetraethyl orthosilicate (TEOS)를 단시간 처리하여 얇은 실리카 층을 형성한 뒤, 표적 물질인 삭시톡신과 3-aminopropyl triethoxysilane를 처리하여 분자 각인을 진행했다. 분자 각인된 양자점의 성능을 평가하기 위해 표적 독소를 비롯한 다른 물질들과 반응시킨 뒤 형광 분석한 결과, 분자 각인의 결과로 형성된 공동이 삭시톡신의 구조와 일치함에 따라 해당 독소의 경우에서만 검체 내 독소 농도에 따른 형광 감소 현상이 나타났고, 패류 시료에서의 검출 한계는 0.3 µg/kg (0.3 ppb)이었다.

그래핀 기반의 흡착법

독성 환경 오염 물질을 제거하는 다른 방법 중 하나로 활성탄과 같은 탄소 성분의 다공성 물질을 활용한 흡착법이 있으며, 최근 나노 기술이 발전함에 따라 탄소 나노 튜브를 비롯한 그래핀과 같은 재료를 활용한 연구들이 많이 발표되고 있다⁴⁸⁾. 그래핀은 탄소 원자들이 sp^2 혼성 궤도의 탄소 원자들이 육각 구조로 연결된 층상 구조를 갖고 있으며, 특히 부피 대비 표면적 비가 크고 가격이 저렴하기 때문에 흡착제로서 좋은 조건들을 갖추고 있어, 염료, 금속 이온, 독성 유기 물질들의 제거에 적용되고 있다⁴⁹⁾.

해양 독소 검출과 관련하여 Hu 등⁵⁰⁾은 산화 그래핀(graphene oxide, GO) 표면에 마이크로시스틴-LR과 특이적으로 결합하는 RNA를 공유 결합을 통해 고정화 한 뒤 식수 속의 독소 검출에 활용했으며, 개발한 센서의 흡착능과 선택성에 대해 보고했다. 비록 RNA-그래핀 산화 나노 시트의 흡착력은 극한의 pH, 온도, 이온 강도, 자연 유기 물질에서 감소하는 양상을 보였으나, 음용수에 잔존 가능한 핵산 가수 분해 효소나 천연 유기 물질에 대한 뛰어난 내성을 보였다. RNA-GO에 대한 트레이서 펩타이드 독소의 특이적인 흡착을 확인한 결과 0.5-1 ng/L라는 낮은 검출 한계를 보이며 MC-LR의 95% 이상이 흡착되는 것을 확인했다. 해당 센서의 선택성을 파악하기 위해 다른 3가지 독소(마이크로시스틴-PP, 마이크로시스틴-LW, 노들라린)를 대조군으로 실험한 결과 12% 미만만 흡수되는 것을 확인했다. 이를 통해 RNA-GO 기반의 흡착 센서는 오염수 정화 및 시료 제조 과정에서 작은 분자와 생체 분자를 인지, 농축, 분리하는 데 잠재적으로 유용한 도구가 될 수 있다는 것을 규명했다.

요약 및 제언

해양 독소의 지속적인 감시는 비단 이를 섭취하는 소비자의 건강 뿐만 아니라, 양식, 어업, 해양 생태계 전반에 걸쳐 발생 가능한 부정적인 영향을 최소화하기 위해 필수적이다. 그 일환으로 해양 생물 유래 독소를 신속하게 검출하기 위해 다양한 나노 재료를 접목함으로써 기존의 방법들을 보완하고, 더 나아가 이들을 활용한 신규 검출 기술들이 개발되고 있다. Table 3은 본 논문에서 언급된 내용을 포함한 해양 독소별 신속 검출을 위해 고안되었던 일부 선행 연구의 검출 기법 및 검출능을 정리한 것이다. 해당 내용에 따르면, 해양 독소의 신속 검출에 도입된 방법은 크게 ELISA 및 전기화학 방식으로 나눌 수 있으며, 사용하는 나노 재료 및 측정 방법에 따른 차이만 있을 뿐, 독소를 선택적으로 인지하고 포획하는데 항체나 aptamer와 같은 생체 수용체와 독소간 면역 반응을 그 근간으로 했다. 하지만, 해양 독소의 경우 일반적인 바이러스나 세균과 같은 항원 물질과는 달리 단일 유기 분자라는 특수성 때문에 항원 결정 부위가 제한적일 수밖에 없어, 2개 이상의 생체 수용체를 활용한 진단법을 사용하기 어렵다는 문제가 있다. 따라서 독소 종류에 상관없이 주로 1개의 생체 수용체를 사용하는 임피던스법이나 경쟁적 ELISA 기반의 광학 검출 방식들이 대다수를 이뤘다. 경쟁적 ELISA 방식의 경우 독소 물질의 저해제화가 필요한 반면, 임피던스법의 경우 1개의 생체 수용체만으로도 전극에 처리해 센서의 개발이 용이하다는 장점이 있어 가장 많은 예시를 보였으며, 표적 독소에 맞는 생체 수용체를 도입함으로써 다양한 해양 독소 검출 센서 개발에 적용이 가능하다는 잠재성을 보였다.

Table 3. The previous studies for rapid detection of marine toxins

Toxins	Types of specimen	Detection method	Detection range	Detection limit	Detection time (min)	Ref.
Anatoxin	Cyanobacteria	Aptamer-based EIS	1-100 nM	0.5 nM	60	[56]
Brevetoxin	Spiked samples	CNT-based label-free electrochemical aptasensor	0.9-30 nM	0.38 nM	30	[28]
		Cardiomyocyte-based potential biosensor	6.25-1600 nM	1.73 nM	5	[51]
Brevetoxin-1	Spiked samples	Indirect competitive ELISA	14-263 ng/mL	14 ng/mL	30	[52]
Brevetoxin-2	Spiked shellfish samples	Fenton reaction-based colorimetric method	0.1-150 ng/kg	0.076 ng/kg	30	[18]
		EIS	0.01-2000 ng/mL	106 pg/mL	40	[25]
Ciguatoxin	Spiked fish samples	Online sandwich ELISA	0.6-150 ng/L	0.9 ng/L	15	[55]
Cyanotoxin	Spiked river water sample	Aptamer-based EIS	1.0-150 nM	0.374 nM	120	[27]
Microcystin	Spiked samples	Smart RNA sensor	50-2000 ng/L	0.5-1 ng/L	45	[50]
		Label-free electrochemical biosensor	0.1 pM-5 nM	1.9 pM	60	[32]
		Self-assembled monolayer-based immunoassay	1-17 ng/mL	Monothiol: 2.4±0.3 ng/mL Dithiol: 2.1±0.2 ng/mL	15	[35]
Okadaic acid	Spiked shellfish samples	Aptamer-based EIS	100 pg/mL -60 ng/mL	70 pg/mL	60	[51]
		Label-free gap-based electrical biosensor	5-80 ppb	1 ppb	50	[31]
		Graphene oxide-based electrochemical immunoassay	0.41-56.3 ng/L	2.17 ng/L	30	[54]
		Quantum dot-based fluorometric method	20.0-100.0 µg/L	0.3 ng/mL	15	[46]
Saxitoxin	Spiked seawater samples	Surface enhanced Raman spectroscopy	33-0.1 µM	160 ng/mL	few minutes or hours	[53]
		Magnetic nanoparticle-based colorimetric method	6.25-100 ng/mL	1 µg/kg	90	[17]
Tetrodotoxin	Spiked fish and shellfish samples	Quantum dot-based LFA	1.56-100 ng/mL	0.78 ng/mL	15	[23]
		LFA	1.2-52.7 ng/mL	1.2 ng/mL	10	[30]
Palytoxin	Spiked samples	Aptamer-based competitive biosensor	200-700 pg/mL	0.04 pg/mL	10	[10]
ω-conotoxin	<i>Conus magus</i>	Indirect competitive ELISA	0.20-7.22 µg/mL	0.14 ng/mL	10	[57]

비록 해당 방식들이 공통적으로 종래의 방법들에 비해 빠른 검출 시간과 낮은 검출 한계를 보이며 쥐와 같은 생물을 사용하지 않아도 된다는 장점들이 있지만, 최종적으로 이들을 현장 진단에 적용하기에는 아직 제약점이 남아 있다. 첫 번째는, 해양 생물 유래 독소를 분석하기 위해서는 실제 생물 시료를 전처리하여 검체를 얻어야 하는데, 이를 위해서는 여전히 복잡한 실험 단계가 요구된다는 것이다. 이를 간소화하기 위해 항체와 같은 생체 수용체를 처리한 자성 나노 입자 기반의 전처리 방식들도 고안되었

으나, 생물 시료를 균질화하기 위해서는 추가적인 장비가 필요하다는 문제가 있다. 두 번째로는, 검출에 있어 생체 수용체의 의존성이 높음에 따라 독소별 항체나 aptamer를 발굴하기 위해서는 많은 시간과 금액이 요구된다는 것이다. 게다가, 아직 발견되지 않은 해양 독소들의 이성질체들 및 신종 독소에 대한 대책이나 검출법 개발에는 지연이 발생할 수밖에 없다. 세 번째로는 센서를 구현하기 위해 사용되는 각종 나노 재료 및 생체 수용체의 대량 생산화가 어렵다는 것이다. 특히, 개발된 센서를 검증하기 위

해서는 실제 독소를 표준 물질로 하여 무수히 많은 실험을 통해 검량 곡선을 만들고 이를 대입해야 하나, 시중에 해양 독소를 판매하는 업체가 적을뿐더러 취급하는 양이 적고 값이 비싸기 때문에 키트화한다 해도 이들에 대한 품질 관리가 어렵다. 물론 분자 각인 기법을 사용해 인공적인 항체 유사 구조를 형성하여 삭시톡신 검출에 응용한 예가 있으나, 일정한 품질의 센서를 만들기 어렵고 분자 각인을 위해서는 독소를 직접 사용해야 하기 때문에 이 역시도 제한된다. 따라서, 아직은 실험실 단계인 신속 검출법들을 현장에 적용해 해양 독소로 인한 피해를 미리 인지하여 대응하기 위해서는 전처리법의 간소화와 aptamer 발굴 기술 및 파지디스플레이와 같은 생체 수용체 발굴 기술의 고도화가 필수적으로 요구된다.

Acknowledgement

본 연구는 2020년도 식품의약품안전처의 연구개발비(20163MFDS641)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

해양 생물 유래 독소는 그 치명적인 유독성으로 인해 비단 인류의 건강 뿐만 아니라 양식, 어업, 해양 생태계 전반에 걸쳐 경제적 손실을 비롯한 부정적인 영향을 미친다. 하지만, 종래에 사용되던 해양 독소 검출법만으로는 이를 다 파악하여 위협을 미연에 방지하기에는 아직 부족한 실정이다. 본 논문에서는 해산물의 해양 독소 잔존 여부를 판별하기 위해 종래에 사용되었던 시험법들의 한계를 개선하고자 각종 나노 재료 및 신규 기술들이 도입된 신속 검출법들에 대해 조사했으며, 대표적인 연구 결과들을 선정하여 사용한 나노 입자 및 전략에 대해 서술하였다. 특히 이러한 생물 유래 독소의 검출 기술을 대중화시키고 상용화하기 위해서는, 이를 생성하는 생물군으로부터 독소를 추출하는 전처리 과정을 간소화하는 것이 매우 중요하다. 해당 문제를 해결하고자 다양한 연구에서 표적 독소와 특이적으로 결합하는 항체를 고정화한 자성 나노 입자 기반의 전처리법을 보고했으며, 더 나아가 자성 나노 입자의 촉매 특성까지 활용해 검출 감도를 높이는 다양한 연구들도 발표되었다. 또한, 기존 효소 기반의 비색법의 검출 한계를 낮추고 검출 시스템의 안정성을 높이기 위해 양자점과 같은 형광 나노 입자를 도입하는 보고들도 있었다. 이 외에도 aptamer와 나노 입자 복합체 기반의 전기화학 측정법 및 신규 기술들을 사용하고자 하는 연구들도 보고되었다. 하지만 해양 환경의 변화에 따라 생성된 신종 독소에 대한 대처는 아직 미흡한 실정이므로, 해양 독소 유도체 또한 아울러 진단 가능한 검출 기술에 대한 후속 연구가 필요하다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Chan Yeong Park <https://orcid.org/0000-0002-5875-5364>
 So Yeon Kweon <https://orcid.org/0000-0002-5057-952X>
 Sunhee Moon <https://orcid.org/0000-0001-9145-8225>
 Min Woo Kim <https://orcid.org/0000-0002-3589-8928>
 Sang-Do Ha <https://orcid.org/0000-0002-6810-2092>
 Jong Pil Park <https://orcid.org/0000-0002-4119-1574>
 Tae Jung Park <https://orcid.org/0000-0001-8918-0957>

References

- Hosomi, R., Yoshida, M., Fukunaga, K., Seafood consumption and components for health, *Glob. J. Health Sci.*, **4**, 72-86 (2012).
- Guillen, J., Natale, F., Carvalho, N., Casey, J., Hofherr, J., Druon, J.N., Fiore, G., Gibin, M., Zanzi, A., Martinsohn, J.T., Global seafood consumption footprint, *Ambio*, **48**, 111-122 (2019).
- Wang, Q., Fang, J.R., Cao, D.X., Li, H.B., Su, K.Q., Hu, N., Wang, P., An improved functional assay for rapid detection of marine toxins, saxitoxin and brevetoxin using a portable cardiomyocyte-based potential biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, **72**, 10-17 (2015).
- Vilarino, N., Louzao, M.C., Vieytes, M.R., Botana, L.M., Biological methods for marine toxin detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, **397**, 1673-1681 (2010).
- Mok, J.S., Song, K.C., Lee, K.J., Kim, J.H., Variation and profile of paralytic shellfish poisoning toxins in Jinhae bay, Korea, *Fish. Aquat. Sci.*, **16**, 137-142 (2013).
- Baek, S.H., First report for appearance and distribution patterns of the epiphytic dinoflagellates in the Korean peninsula, *Korean J. Environ. Biol.*, **30**, 355-361 (2012).
- Ha, K.S., Shim, K.B., Yoo, H.D., Kim, J.H., Lee, T.S., Evaluation of the bacteriological safety for the shellfish growing area in Hansan-Geojeman, Korea, *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.*, **42**, 449-455 (2009).
- Yoo, H.D., Ha, K.S., Shim, K.B., Kang, J.Y., Lee, T.S., Kim, J.H., Microbiological quality of the shellfish-growing waters and mussels in Changseon, Namhae, Korea, *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.*, **43**, 298-306 (2010).
- Bodero, M., Gerssen, A., Portier, L., Klijnstra, M.D., Hoo-genboom, R.L., Guzmán, L., Hendriksen, P.J., Bovee, T.F., A strategy to replace the mouse bioassay for detecting and identifying lipophilic marine biotoxins by combining the Neuro-2a bioassay and LC-MS/MS analysis, *Mar. Drugs*, **16**, 501-515 (2018).
- Gao, S., Zheng, X., Hu, B., Sun, M., Wu, J., Jiao, B., Wang, L., Enzyme-linked, aptamer-based, competitive biolayer

- interferometry biosensor for palytoxin, *Biosens. Bioelectron.*, **89**, 952-958 (2017).
11. Rodriguez, I., Vieytes, M.R., Alfonso, A., Analytical challenges for regulated marine toxins. Detection methods, *Curr. Opin. Food Sci.*, **18**, 29-36 (2017).
 12. Kafa, N., Hani, Y., El Mhamedi, A., Sustainability performance measurement for green supply chain management, *IFAC Proceedings Volumes*, **46**, 71-78 (2013).
 13. Crowther, J.R., 2000. The ELISA guidebook, Humana Press, Totowa, NJ, USA, pp. 1-8.
 14. Waritani, T., Chang, J., McKinney, B., Terato, K., An ELISA protocol to improve the accuracy and reliability of serological antibody assays, *MethodsX*, **4**, 153-165 (2017).
 15. Labus, K., Wolanin, K., Radosiński, L., Comparative study on enzyme immobilization using natural hydrogel matrices—experimental studies supported by molecular models analysis, *Catalysts*, **10**, 489-512 (2020).
 16. Hosseini, S., Vázquez-Villegas, P., Rito-Palomares, M., Martinez-Chapa, S.O., 2018. Advantages, disadvantages and modifications of conventional ELISA, Springer, Singapore, pp. 67-115.
 17. Campas, M., Reverte, J., Rambla Alegre, M., Campbell, K., Gerssen, A., Diogene, J., A fast magnetic bead-based colorimetric immunoassay for the detection of tetrodotoxins in shellfish, *Food Chem. Toxicol.*, **140**, 111315 (2020).
 18. Lai, W., Wei, Q., Zhuang, J., Lu, M., Tang, D., Fenton reaction-based colorimetric immunoassay for sensitive detection of brevetoxin B, *Biosens. Bioelectron.*, **80**, 249-256 (2016).
 19. Tan, C., Gao, N., Deng, Y., Deng, J., Zhou, S., Li, J., Xin, X., Radical induced degradation of acetaminophen with Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as heterogeneous activator of peroxymonosulfate, *J. Hazard. Mater.*, **276**, 452-460 (2014).
 20. Tsai, T.T., Huang, T.H., Chen, C.A., Ho, N.Y.J., Chou, Y.J., Chen, C.F., Development a stacking pad design for enhancing the sensitivity of lateral flow immunoassay, *Sci. Rep.*, **8**, 1-10 (2018).
 21. Goux, H.J., Raja, B., Kourentzi, K., Trabuco, J.R., Vu, B.V., Paterson, A.S., Kirkpatrick, A., Townsend, B., Lee, M., Truong, V.T.T., Evaluation of a nanophosphor lateral-flow assay for self-testing for herpes simplex virus type 2 seropositivity, *PLoS One*, **14**, e0225365 (2019).
 22. Koczula, K.M., Gallotta, A., Lateral flow assays, *Essays Biochem.*, **60**, 111-120 (2016).
 23. Shen, H., Xu, F., Xiao, M., Fu, Q., Cheng, Z., Zhang, S., Huang, C., Tang, Y., A new lateral-flow immunochromatographic strip combined with quantum dot nanobeads and gold nanoflowers for rapid detection of tetrodotoxin, *Analyst*, **142**, 4393-4398 (2017).
 24. Ivase, T.J.P., Nyakuma, B.B., Oladokun, O., Abu, P.T., Hassan, M.N., Review of the principal mechanisms, prospects, and challenges of bioelectrochemical systems, *Environ. Prog. Sustain. Energy*, **39**, 13298-13306 (2020).
 25. Eissa, S., Siaj, M., Zourob, M., Aptamer-based competitive electrochemical biosensor for brevetoxin-2, *Biosens. Bioelectron.*, **69**, 148-154 (2015).
 26. Eissa, S., Ng, A., Siaj, M., Tavares, A.C., Zourob, M., Selection and identification of DNA aptamers against okadaic acid for biosensing application, *Anal. Chem.*, **85**, 11794-11801 (2013).
 27. Zhao, Z., Chen, H., Ma, L., Liu, D., Wang, Z., A label-free electrochemical impedance aptasensor for cylindrospermopsin detection based on thionine-graphene nanocomposites, *Analyst*, **140**, 5570-5577 (2015).
 28. Hou, L., Jiang, L., Song, Y., Ding, Y., Zhang, J., Wu, X., Tang, D., Amperometric aptasensor for saxitoxin using a gold electrode modified with carbon nanotubes on a self-assembled monolayer, and methylene blue as an electrochemical indicator probe, *Microchim. Acta.*, **183**, 1971-1980 (2016).
 29. Leonardo, S., Rambla Alegre, M., Samdal, I.A., Miles, C.O., Kilcoyne, J., Diogene, J., O'Sullivan, C.K., Campàs, M., Immunorecognition magnetic supports for the development of an electrochemical immunoassay for azaspiracid detection in mussels, *Biosens. Bioelectron.*, **92**, 200-206 (2017).
 30. Leonardo, S., Kiparissis, S., Rambla Alegre, M., Almarza, S., Roque, A., Andree, K.B., Christidis, A., Flores, C., Caixach, J., Campbell, K., Detection of tetrodotoxins in juvenile pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from the North Aegean Sea (Greece) by an electrochemical magnetic bead-based immunosensing tool, *Food Chem.*, **290**, 255-262 (2019).
 31. Pan, Y., Wan, Z., Zhong, L., Li, X., Wu, Q., Wang, J., Wang, P., Label-free okadaic acid detection using growth of gold nanoparticles in sensor gaps as a conductive tag, *Biomed. Microdevices*, **19**, 33-40 (2017).
 32. Eissa, S., Ng, A., Siaj, M., Zourob, M., Label-free voltammetric aptasensor for the sensitive detection of microcystin-LR using graphene-modified electrodes, *Anal. Chem.*, **86**, 7551-7557 (2014).
 33. Singh, M., Kaur, N., Comini, E., The role of self-assembled monolayers in electronic devices, *J. Mater. Chem. C*, **8**, 3938-3955 (2020).
 34. Nerngchamnong, N., Yuan, L., Qi, D.C., Li, J., Thompson, D., Nijhuis, C.A., The role of van der Waals forces in the performance of molecular diodes, *Nat. Nanotechnol.*, **8**, 113-118 (2013).
 35. Leonardo, S., Toldrà, A., Rambla Alegre, M., Fernández Tejedor, M., Andree, K.B., Ferreres, L., Campbell, K., Elliott, C.T., O'Sullivan, C.K., Pazos, Y., Self-assembled monolayer-based immunoassays for okadaic acid detection in seawater as monitoring tools, *Mar. Environ. Res.*, **133**, 6-14 (2018).
 36. Quan, P.L., Sauzade, M., Brouzes, E., dPCR: A technology review, *Sensors*, **18**, 1271-1298 (2018).
 37. Lim, D.R., Kim, H.R., Park, M.J., Chae, H.G., Ku, B.K., Nah, J.J., Ryoo, S.Y., Wee, S.H., Park, Y.R., Jeon, H.S., An improved reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and specific detection of serotype O foot-and-mouth disease virus, *J. Virol. Methods*, **260**, 6-13 (2018).

38. de Souza, D.F., da Silva, P.P.F., Fontenele, L.F.A., Barbosa, G.D., de Oliveira Jesus, M., Efficiency, quality, and environmental impacts: A comparative study of residential artificial lighting, *Energy Rep.*, **5**, 409-424 (2019).
39. Geng, T., Novak, R., Mathies, R.A., Single-cell forensic short tandem repeat typing within microfluidic droplets, *Anal. Chem.*, **86**, 703-712 (2014).
40. Wood Bouwens, C., Lau, B.T., Handy, C.M., Lee, H., Ji, H.P., Single-color digital PCR provides high-performance detection of cancer mutations from circulating DNA, *J. Mol. Diagn.*, **19**, 697-710 (2017).
41. Lee, H.G., Kim, H.M., Min, J., Park, C., Jeong, H.J., Lee, K., Kim, K.Y., Quantification of the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Alexandrium* species using a digital PCR, *Harmful Algae*, **92**, 101726 (2020).
42. Kim, J.S., Park, K.W., Youn, S.H., Lim, W.A., Yoo, Y.D., Seong, K.A., Yih, W.H., Species diversity of the dinoflagellate genus *Alexandrium* in the coastal waters of Korea during summer 2013, *The Sea*, **21**, 158-170 (2016).
43. Martin Gracia, B., Martin Barreiro, A., Cuestas Ayllon, C., Grazu, V., Line, A., Llorente, A., de la Fuente, J.M., Moros, M., Nanoparticle-based biosensors for detection of extracellular vesicles in liquid biopsies, *J. Mat. Chem. B*, **8**, 6710-6738 (2020).
44. Wu, X., Chen, G., Shen, J., Li, Z., Zhang, Y., Han, G., Upconversion nanoparticles: a versatile solution to multiscale biological imaging, *Bioconjugate Chem.*, **26**, 166-175 (2015).
45. Mocan, T., Matea, C.T., Pop, T., Mosteanu, O., Buzoianu, A.D., Puia, C., Iancu, C., Mocan, L., Development of nanoparticle-based optical sensors for pathogenic bacterial detection, *J. Nanobiotechnol.*, **15**, 25-39 (2017).
46. Sun, A.L., Chai, J.Y., Xiao, T.T., Shi, X.Z., Li, X.J., Zhao, Q.L., Li, D.X., Chen, J., Development of a selective fluorescence nanosensor based on molecularly imprinted-quantum dot optosensing materials for saxitoxin detection in shellfish samples, *Sens. Actuator B-Chem.*, **258**, 408-414 (2018).
47. Bera, D., Qian, L., Tseng, T.K., Holloway, P.H., Quantum dots and their multimodal applications: A review, *Materials*, **3**, 2260-2345 (2010).
48. Zhu, Y., Li, L., Zhang, C.G., Casillas, G., Sun, Z.Z., Yan, Z., Ruan, G.D., Peng, Z.W., Raji, A.R.O., Kittrell, C., Hauge, R.H., Tour, J.M., A seamless three-dimensional carbon nanotube graphene hybrid material, *Nat. Commun.*, **3**, 1-7 (2012).
49. Baig, N., Ihsanullah, Sajid, M., Saleh, T.A., Graphene-based adsorbents for the removal of toxic organic pollutants: A review, *J. Environ. Manage.*, **244**, 370-382 (2019).
50. Hu, X.G., Mu, L., Wen, J.P., Zhou, Q.X., Immobilized smart RNA on graphene oxide nanosheets to specifically recognize and adsorb trace peptide toxins in drinking water, *J. Hazard. Mater.*, **213**, 387-392 (2012).
51. Wang, Q., Fang, J.R., Cao, D.X., Li, H.B., Su, K.Q., Hu, N., Wang, P., An improved functional assay for rapid detection of marine toxins, saxitoxin and brevetoxin using a portable cardiomyocyte-based potential biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, **72**, 10-17 (2015).
52. Ling, S.M., Xiao, S.W., Xie, C.J., Wang, R.Z., Zeng, L.M., Wang, K., Zhang, D.P., Li, X.L., Wang, S.H., Preparation of monoclonal antibody for brevetoxin 1 and development of ic-elisa and colloidal gold strip to detect brevetoxin 1, *Toxins*, **10**, 75-85 (2018).
53. Cao, C.T., Li, P., Liao, H.M., Wang, J.P., Tang, X.H., Yang, L.B., Cys-functionalized AuNP substrates for improved sensing of the marine toxin STX by dynamic surface-enhanced Raman spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.*, **412**, 4609-4617 (2020).
54. Molinero Abad, B., Perez, L., Izquierdo, D., Escudero, I., Arcos-Martinez, M.J., Sensor system based on flexible screen-printed electrodes for electrochemical detection of okadaic acid in seawater, *Talanta*, **192**, 347-352 (2019).
55. Zhang, Z.X., Zhang, C.Y., Luan, W.X., Li, X.F., Liu, Y., Luo, X.L., Ultrasensitive and accelerated detection of ciguatoxin by capillary electrophoresis via on-line sandwich immunoassay with rotating magnetic field and nanoparticles signal enhancement, *Anal. Chim. Acta*, **888**, 27-35 (2015).
56. Elshafey, R., Siaj, M., Zourob, M., DNA aptamers selection and characterization for development of label-free impedimetric aptasensor for neurotoxin anatoxin-a, *Biosens. Bioelectron.*, **68**, 295-302 (2015).
57. Wang, R.Z., Zhong, Y.F., Wang, J.C., Yang, H., Yuan, J., Wang, S.H., Development of an ic-ELISA and immunochromatographic strip based on IgG antibody for detection of omega-conotoxin MVIIA, *J. Hazard. Mater.*, **378**, 120510 (2019).