Top-down 방식의 열분해질량분석 스펙트라 분석 및 Gram-type 세균 분류

Analysis of Pyrolysis MS Spectra in Top-down Approach and Differentiation of Gram-type Cells

김 주 현*

JuHyun Kim

Abstract

To apply TMAH-based Py-MS to a field biological detection system for real-time classification of cell-type, reproducible patterns of the TMAH-based Py-MS spectra was known as a critical factor for classification but was seriously disturbed by quantity of cells injected into pyro-tube. This factor is an exterior variable that could not be complemented by improving the performance of the TMAH-based Py-MS instrument. One of idea to solve the knotty problem has been flashed from “Top-down proteomics for identification of intact microorganisms”. That is, biomarker peaks are selected from complicate Py-MS spectra for intact microorganisms by tracing out their origins, based on Py-MS spectra for the featured components of different cell-types, in Top-down approach. This idea has been tested in classification of different Gram-type microorganisms. Through the analyses of spectra for the featured components - peptidoglycan and lipoteichoic acid for Gram-positive cells and lipopolysaccharide and lipid A for Gram-negative cells - with comparing to the spectra the corresponding Gram-type cells in the Top-down approach, biomarker peaks were selected to carry out PCA(Principal Component Analysis) in order to see classification of different Gram-types, resulting in significant improvement of their classification. Furthermore, weighting biomarker peaks on intact cell's spectra, based on the data for the featured components of the Gram-types, contributed to elevate classification performance.

Keywords : TMAH(tetramethylammonium hydroxide), Py-MS(열분해 질량분석법), Gram-positive Cell(그램양성세균), Gram-negative Cell(그램음성세균), Biomarker(생물표지), Principal Component Analysis(주성분 분석)

1. 서 론

† 2011년 4월 29일 접수~2011년 7월 8일 게재승인

* 국방과학연구소(ADD)

책임저자 : 김주현(kiminkma@yahoo.co.kr)

TMAH를 기반으로 하는 열분해 질량분석법(Py-MS : Pyrolysis Mass Spectrometry)을 실시간 탐지분류가 가능한 생물학작용제 탐지체계로 적용하기 위하여 다양한 조건하에서 열분해 질량분석 데이터를 분석하였다. 생물체 종류의 다양성과 열분해 질량분석기의 분

해능 및 스펙트럼의 재현성이 낮아 종을 식별하는 것은 제한되나 class 분류(세균, 포자, 독소)는 가능한 것으로 판단하였다. 그러나 실제 환경에서 경험할 수 있는 다양한 조건을 가정하여 열분해 질량분석 실험을 실시한 결과 스펙트럼 패턴의 재현성에 변화가 커서 class 분류가 제한될 것으로 판단되었다^[1]. 특히 수집 및 농축한 세포수(Cell Number)에 따라 스펙트럼 패턴이 현저하게 변화되었고, 생물학작용제 제조과정에서 생존성을 높이기 위하여 사용될 수 있는 안정제(4% Sucrose)에 의한 간섭효과가 큰 것으로 분석되었다.

야전에서 운용될 생물학작용제 탐지체계는 미지 생물학작용제 분석이 가능하여야 하므로 위에서 언급한 변화를 수용하여 탐지 및 분류가 가능하여야 한다. 하지만 이와 같은 요소들은 TMAH에 기반한 열분해 질량분석기의 특징과 결부된 외부적 영향요소로서 기기의 성능을 향상시키더라도 해결이 쉽지 않는 부분이다. 따라서 하드웨어의 성능을 개선하는데 집중하기 보다는 데이터베이스 및 알고리즘을 통해 보완하는 방법이 현실적인 것으로 사료된다.

Plamen A. Demire는 MALDI-TOF MS/MS를 이용하여 Top-down 방식으로 미생물을 신속하게 식별하는 방법을 발표한 바 있다^[2]. 기존의 방식과 비교하여 biomarker protein의 분리과정 없이 미생물의 전체 proteins 조각이온 스펙트럼(Fragment Ion Spectra)의 정보를 획득하고, 미리 구축된 biomarker protein의 데이터와 비교하여 미생물을 식별하는 방식으로 분석시간을 획기적으로 단축하면서도 신뢰성 있는 결과를 얻었다. 이와 같은 개념을 TMAH에 기반한 열분해 질량분석 data를 분석하는데 접목하는 방안을 강구하였다. 즉, Fig. 1과 같이 Top-down 방식으로 미생물에 대한 스펙트럼의 특징을 해당 class의 biomarker 성분 스펙트럼과의 비교를 통해 추출함으로써 복잡한 미생물 스펙트럼으로부터 고유의 특성을 분별할 수 있고, 이렇게 추출된 특징을 가공할 경우 분류 성능을 높일 수 있을 것으로 판단되었다.

미생물 그룹별 질량분석 biomarker 성분은 많은 연구를 통해 알려져 있다^[3~5]. Table 1에 각 그룹별 대표적 biomarkers를 기술하였다. 이전의 연구를 통해서 포자나 독소(단백질)는 시료의 농도에 따라 TMAH 기반 열분해 질량분석 스펙트럼의 변화가 크지 않았다. 반면, 세균의 경우 상당한 변화가 관찰되었다. 따라서 본 연구에서 Top-down 방식의 열분해 질량분석 스펙트럼 분석을 세균을 중심으로 적용하여 유용성을 판단하고자 한다.

Fig. 1. Top-down 방식 생물체 스펙트럼의 주요 피크 기원 분석 방법

Table 1. 대표적 Biomarkers

구 분		Biomarkers
포 자		Dipicolinic acid(DPA), Small Acid-Soluble Protein(SASP)
세 균	그램 양성	Peptidoglycan 층, Lipoteichoic acid, Peptidoglycan precursor peptide 등
	그램 음성	Lipopolysaccharide(LPS), Lipid A, 3-Hydroxy fatty acid
독 소		Diketopiperazine(DKP)

2. 실험방법 및 조건

가. 실험장비

TMAH에 기반한 열분해 질량분석기는 Varian-240 MS에 자체 제작한 열분해기를 연결하여 구성하였다. 세부적인 내용은 참고문헌 6에 기술되어 있다.

나. 생물시료

미생물 시료는 참고문헌 6에 기술한 바와 같이 준비하였다. 미생물의 각 그룹별 biomarkers인 peptidoglycan, lipoteichoic acid, lipopolysaccharide, lipid A 등은 Sigma사에서 구입하였다.

다. 군집 분석(Cluster Analysis)

Py-MS 스펙트럼을 정규화 하여 unsupervised analysis인 PCA(Principal Component Analysis)를 통해 군집을 분석하였다. PCA는 MATLAB R2007b의 PLS_Toolbox로 수행하였다.

3. Top-down 방식 Py-MS 스펙트럼 패턴 분석

가. 세포수에 따른 스펙트럼 패턴 변화시 PCA 결과
열분해 질량분석법(Py-MS)을 야전 생물학 탐지체계에 적용하기 위해 중요하게 고려해야 할 것은 수집된 세포수가 상이할 수 있으며, 이를 수용하여 탐지 분류가 되어야 한다는 것이다. 이와 관련하여 연구 결과가 일부 보고된 바 있다^[6]. 위 결과를 확대하여 세포수에 따른 그램양성균과 그램음성균 9종에 대한 Py-MS data를 획득하였다. 이들 data에 대한 PCA를 수행하여 분류 가능성을 확인하였다. Fig. 2는 25℃에서 배양한 그램양성균과 그램음성균에 대한 PCA scores plot으로, 2×10^5 cells과 그 보다 10배인 2×10^6 cells를 주입했을 때 획득한 Py-MS 스펙트럼 결과를 분석하여 각 그룹 내 또는 그룹간 특징이 되는 20개의 biomarkers를 기초로 분석한 것이다.

Fig. 2. 세포수에 따른 Py-MS 스펙트럼의 PCA scores plot. X-축 : PC1(42.4% total variance), Y-축 : PC2(20.1% total variance)

위 결과에서 보듯이 세포수가 상이할 경우 그램양성균과 그램음성균이 각각 군집화가 잘 이루어지지 않고 넓게 분포하여 그룹 간 구분이 곤란하였다. 이와 같은 분류 결과는 세포수에 따라 TMAH 기반 Py-MS 스펙트럼의 패턴이 현격히 변화되는 현상으로부터 예측된 것으로, 세포수라는 기기 외부적 요소에 의해 나타나는 현상이다. 따라서 기기 성능을 개선하기보다 세균 Py-MS 스펙트라의 특징 추출 방식을 제 1장 서론에서 언급한 바와 같은 Top-down 방식을 적용함으로써 분류 성능의 개선이 가능한지 실험할 필요가 있었다.

나. 그램양성균의 Biomarkers 분석

알려진 바와 같이 세포벽 구조 및 구성성분은 그램형태(Gram-types)는 물론, 생장균(Vegetative Cell)과 포자(Spore)를 구별할 수 있는 중요한 특징으로 알려져 있다. 그램양성균의 세포벽은 Fig. 3과 같이 두꺼운 peptidoglycan 층으로 이루어져 있으며, lipoteichoic acid는 다수의 peptidoglycan 층 결합을 지지하고 원형질막(Cytoplasmic Membrane)으로 연결하는 역할을 담당하고 있다.

Fig. 3. 그램양성균의 세포벽 구조 및 주요 구성성분 개략도

Peptidoglycan은 그램음성균의 세포벽을 구성하는 요소이기도 하나 두께가 2~5nm의 단일층으로 구성되어 있는 반면, 그램양성균에서는 20~80nm로 현저한 다층구조를 이루고 있어 그램양성균의 biomarker로 간주하고 있다^[7]. 한편 lipoteichoic acid는 그램양성균에만 존재하므로 해당 균의 biomarker로 선정하였다. 그램양성균의 열분해 질량분석 스펙트럼으로부터 biomarker 피크를 선정하기 위하여 해당 균의 biomarker인 peptidoglycan과 lipoteichoic acid의 스펙트럼을 비교 분석하였다(Fig. 4). Fig. 4의 a에서 보듯이 그램양성균인 *B. subtilis*의 Py-MS 스펙트럼에서 m/z 137, 141, 155, 196, 257, 271, 285, 299 등이 현저한 피크로 관찰되었다. 위 주요 피크들 중 m/z 137, 155, 257, 271, 285, 299 등은 그램양성균의 biomarker인 peptidoglycan(*B. subtilis*, Sigma사)에서도 주요 피크로 관찰되어 상관 관계가 있는 것으로 추정하였다. 특히 m/z 257, 271, 285, 299는 각각 지방산(Fatty Acids) 이온인 $C_{15}:0MeH^+$, $C_{16}:0MeH^+$, $C_{17}:0MeH^+$, $C_{18}:0MeH^+$ 에 해당하는 피크

로 보고된 바 있다^[8]. 위에서 언급한 주요 4개의 지방산과 관련하여 그람양성균의 경우 탄소수가 홀수인 지방산이 짝수인 지방산 보다 많은 것으로 보고된 바가 있다^[9]. 따라서 그람양성 세균(*B. subtilis*)의 Py-MS 스펙트럼에서 홀수 지방산에 해당하는 m/z 257과 285가 짝수에 해당하는 m/z 271과 299에 비교하여 상대적으로 세기가 큰 것으로 보아 피크의 주요 기원(Origin)이 지방산인 것으로 추정하였다. 한편, m/z 141은 세균에서는 주요소 피크(Base Peak)으로 관찰되었으나 peptidoglycan에서는 상당히 미미한 수준에 머물렀다. 반면, lipoteichoic acid(*B. subtilis*, Sigma사)에서 m/z 141이 주요소 피크로 관찰되어, 이 성분이 그람양성 세균의 m/z 141의 기원 중의 하나로 추정하였다. 이상의 분석 결과를 종합하여 그람양성균의 biomarker 피크로 m/z 137, 155, 141, 257, 271, 285, 299 등으로 선정하였다.

Fig 4. *Bacillus subtilis*(그람양성균) 및 주요 biomarkers의 Py-MS 스펙트럼 분석 결과 : a. *Bacillus subtilis* 스펙트럼, b. *Bacillus subtilis*에서 정제한 peptidoglycan의 스펙트럼, c. *Bacillus subtilis*에서 정제한 lipoteichoic acid의 스펙트럼

다. 그람음성균의 Biomarkers 분석

그람음성균의 구조적 특징은 lipopolysaccharide(LPS)

로 알려져 있다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 얇은 peptidoglycan 층이 원형질막(Cytoplasmic Membrane)을 감싸고 있고, peptidoglycan 층 위에는 LPS와 lipoproteins으로 구성된 세포벽이 존재한다. 이와 같은 LPS는 그람음성균에만 존재하므로 biomarker로 선정하였다. 한편, LPS는 O-antigen, outer core, inner core, 그리고 lipid A로 구성되어 있으며, lipid A는 LPS의 핵심적 부분으로 타 구성요소에 비하여 중별 구조적 변화가 크지 않아 그람음성균 군집을 구분하는 biomarker로 선정하였다.

Fig. 5. 그람음성균의 세포벽 구조 및 주요 구성성분 개략도

Fig. 6은 그람음성균인 *Salmonella enteritidis*(Fig. 6의 a), LPS(Fig. 6의 b, *Salmonella enterica*), 그리고 lipid A(Fig. 6의 c, *Salmonella enterica*)에 대한 열분해 질량 분석 스펙트럼이다.

Salmonella enteritidis 세균의 Py-MS 스펙트럼으로 m/z 137, 141, 155, 196, 237, 241, 243, 271, 299 등이 주요 피크로 관찰되었다. 이 와 비교하여 *Salmonella enterica*로부터 정제한 LPS와 lipid A의 스펙트럼을 분석해 볼 때 m/z 141, 155 등은 LPS에서는 주요 피크로 관찰되었으나 lipid A에서는 관찰되지 않아 이들의 기원이 LPS의 O-antigen이나 core part의 carbohydrates 성분으로 추정된다. 반면 지방산(Fatty Acids)로부터 유래된 것으로 알려진 m/z 215, 241, 243, 271, 299 등이 LPS와 lipid A에서 공통적으로 관찰되어 이들이 lipid A의 지방산(Fatty Acids)로부터 유래된 것으로 추정할 수 있다. 특히 m/z 241은 3-OH C14:0MeH⁻18에 해당하는 것으로 lipid A의 biomarker인 3-hydroxy fatty acids의 일부로 판단된다. 한편, m/z 141은 그람양성균

과 마찬가지로 그램음성균에서도 주요소 피크(Base Peak)로 LPS의 carbohydrates가 하나의 기원으로 추정되나 지방산과의 상대적 세기를 비교할 때 세균의 m/z 141은 다른 요소들로부터도 기원된 것으로 판단된다. 이상의 분석결과를 종합하여 그램음성균의 biomarkers는 m/z 141, 155, 241, 243, 271, 299 등으로 선정하였다.

Fig. 6. *Salmonella enteritidis*(그램음성균) 및 주요 biomarkers의 Py-MS 스펙트럼 분석 결과 : a. *Salmonella enteritidis* 스펙트럼, b. *Salmonella enterica*에서 정제한 LPS의 스펙트럼, c. *Salmonella enterica*에서 정제한 Lipid A의 스펙트럼

한편 위에서 선정한 그램양성균과 그램음성균의 biomarker 피크를 다른 종류의 그램양성 및 음성균의 Py-MS 스펙트럼 피크와 비교 분석 하였다. 그램양성균의 경우 선정한 7개의 biomarker 피크가 공통적으로 관찰이 되었다. 반면, 그램음성균의 경우 m/z 137은 biomarker인 LPS와 lipid A에서는 미미하였으나 세균 스펙트럼에서는 공통적으로 현저한 피크로 관찰되었다. 또한 lipid A의 특징인 m/z 241은 그램음성균의 각 종에서 세기가 미미하고 불규칙적으로 관찰되는 반면, m/z 237은 규칙적이며 유의성 있는 세기로 관찰되었다. 비록 m/z 237이 lipid A와 LPS에서 미미하지만 세포막의 타 지방산에 널리 분포하고 있는 것으로 추정

되어 그램음성균의 biomarker 피크로 재선정하였다. 이상의 결과를 Table 2에 정리하였다.

Table 2. 그램양성 및 음성균의 biomarker 피크

구 분	Biomarker 피크
그램양성	m/z 137, 141, 155, <u>257</u> , 271, <u>285</u> , 299
그램음성	m/z 137, 141, 155, <u>237</u> , <u>243</u> , 271, 299

위 Table 2의 biomarker 피크는 세포수에 따른 스펙트럼의 패턴이 변화되더라도 규칙적으로 관찰되는 요소로서 각 그룹의 군집을 형성하는데 중요한 요소로 작용할 것으로 판단하였다. 하지만 밑줄 친 굵은체로 표시한 각각의 2개 biomarker 피크를 제외한 나머지는 공통적 요소이므로 피크의 세기 차이만으로 그룹간 분류가 가능한지는 PCA를 통해 분석해 볼 필요가 있었다.

4. Top-down식 분석 biomarkers의 PCA 적용

가. PCA에 의한 분류

위 Table 2에서 제시한 biomarker 피크를 적용할 경우 그램양성균과 그램음성균의 분류 성능이 개선되는지 여부를 확인하기 위하여 PCA를 수행하였다. Fig. 7은 선정된 biomarker 피크 9개를 기준으로 하여 세포수(각각 2×10^5 cells 및 2×10^6 cells)에 따른 9종의 그램양성균과 그램음성균의 Py-MS 스펙트럼에 대한 PCA 결과이다. 각 세균의 PCA scores plot 상 위치는 9개 주성분(PCs : Principal Components)에 의해 결정되었으며, 이때 총 분산(Total Variance)은 99.1%였다. Fig. 7의 a에서 보듯이 PC1(55.3% Total Variance)과 PC2(13.4%)에 의한 PCA scores plot은 두 그룹의 군집이 넓게 분포하고 겹쳐서 분류 성능이 개선된 것을 확인할 수가 없었다. 하지만 Fig. 7의 b에서 보는 바와 같이 PC1(55.3% Total Variance)과 PC3(12.8% Total Variance)에 의한 PCA scores plot에서 Fig. 2와 비교하여 상당히 개선된 것임을 확인할 수 있었다.

Fig. 2와 Fig. 7을 비교할 때 얻을 수 있는 결론은 생물시료에 대한 Py-MS 스펙트럼 패턴의 특징 추출 방식이 생물 분류에 유의적으로 영향을 미칠 수 있다는 것이다. 즉, 본 연구의 서두에서 제시한 바와 같이

복잡한 세균 Py-MS 스펙트럼의 특징을 그룹별 특징적 구조체(전구체)의 Py-MS 스펙트럼으로부터 기원을 추적하여 추출하는 Top-down 방식의 biomarkers 분석이 유효하며, 효과적임을 의미한다. 하지만 분류 성능이 개선은 되었으나 여전히 두 그룹이 상당 부분 겹쳐 있어 분류의 오류가 심각하게 발생할 수 있다.

이와 같은 현상을 개선하기 위하여 각 biomarkers의 특징을 고려하여 가중치를 부여하는 방안을 실험해 보았다.

Fig. 7. Top-down식 biomarker 분석 및 선정에 기초한 PCA scores plot. a. X-축 : PC1(55.3% total variance), Y-축 : PC2(13.4% total variance), b. X-축 : PC1(55.3% total variance), Y-축 : PC3 (12.8% total variance)

나. Weighted-PCA에 의한 분류

Table 2에 제시된 biomarkers 9개 중 m/z 137과 141은 그램양성균과 그램음성균의 현저한 특징으로 공통적으로 관찰되었다. 이들 피크가 타 피크에 비해 현저히 높은 세기를 갖고 있기에 PCA 결과는 이들에 의해

상당한 영향을 받을 수 밖에 없다. 따라서 그룹 간 분류를 위해서 공통적 특징으로 작용하는 이들의 영향을 축소할 필요가 있었다. 반면, m/z 237 및 243, m/z 257 및 285 등은 각각 그램음성균과 그램양성균의 고유한 특징으로 관찰되었으나, 소량으로 m/z 137과 141에 비해 미약한 세기를 나타냈다. 이들 피크는 그룹간 구분에 중요한 영향을 미칠 수 있으므로 가중치를 부여하여 PCA에 적용하도록 하였다. Fig. 8은 가중치를 부여한 PCA 결과로, Fig. 8의 a는 PC1(53.8% Total Variance)와 PC2(16.8% Total Variance)에 대한 PCA scores plot이고, Fig. 8의 b는 PC1(53.8% Total Variance)와 PC3 (14.9% Total Variance)에 대한 PCA scores plot이다.

Fig. 8. Weighted-PCA 방법을 적용하여 분석한 PCA scores plot. a. X-축 : PC1(53.8% total variance), Y-축 : PC2(16.8% total variance), b. X-축 : PC1 (53.8% total variance), Y-축 : PC3(14.9% total variance)

위 결과와 Fig. 2 및 Fig. 7을 비교하여 볼 때 분류 성능 개선이 뚜렷함을 알 수가 있었다. 이와 같은 결과는 그룹 간 구별할 수 있는 특징을 갖는 biomarker 피크에 가중치를 부여할 때 분류 성능을 높일 수 있

다는 것을 입증하는 것으로, 지금까지 생물에 대한 질량분석 스펙트럼의 패턴 분류 관련한 연구에서 중요하게 다루지 않았던 부분이다.

5. 결론

본 연구에서는 TMAH에 기반한 열분해 질량분석법(Pyrolysis MS)을 생물학 탐지체계에 적용하는데 있어서 하드웨어가 갖는 제한점을 Top-down 방식의 스펙트럼 분석 방법으로 분류 성능을 개선할 수 있다는 새로운 시각을 제공하였다는데 의의가 있다.

야전환경에서 생물 물질을 수집 및 질량분석법으로 분석할 경우, 경험할 수 있는 다양한 영향요소들에 대한 연구가 부족한 상태에 있다. 본 실험실에서는 야전환경에서 경험할 수 있는 조건을 가정하여 TMAH 기반 Py-MS 스펙트럼을 분석하는 과정에서 세포수에 따른 패턴의 변화가 심대하여 그룹별 분류에 제한사항으로 작용할 수 있음을 발견하였다^[6]. 이와 같은 발견을 확대하여 9종의 그람양성균과 그람음성균을 이용하여 세포수에 따른 Py-MS 스펙트럼을 획득하여 분석하고, 단순 비교를 통해 추출한 20개 biomarker 피크로 PCA(Principal Components Analysis)를 수행한 결과 분류가 불가능함을 확인하였다(Fig. 2 참조). 이와 같은 결과는 세포수에 따라 변동이 큰 TMAH 기반 Py-MS data로부터 예측이 되었으며, 기기 성능의 개선으로부터 극복될 수 있는 요소가 아니라는 판단에 따라 새로운 특징 추출 방식을 도입하였다. 즉, 세균의 biomarker 피크의 기원을 각 그룹별 특징적 구조체 스펙트럼으로부터 추적하는 방식인 Top-down 방식으로 스펙트럼을 분석하였다. 이런 과정을 거쳐 9개 biomarker 피크를 재선정하였으며, PCA를 수행한 결과, 분류 성능이 개선됨을 확인하였다(Fig. 7 참조). 하지만 여전히 그룹간 겹치는 현상을 개선할 필요가 있어 Weighted-PCA를 적용하는 방안을 추가적으로 강구하였다. 즉, 그룹별 고유의 특징을 부각시키고, 공통적 요소의 영향이 감소되도록 가중치를 부여하여 PCA를 수행하였다. 이 결과 분류 성능이 획기적으로 개선됨을 확인할 수 있었다(Fig. 8 참조). 물론 가중치를 부여하는 방식은 자칫 분류 알고리즘에 편견을 초래할 수가 있어 객관성을 갖는 것이 매우 중요하다고 할 수 있다. 그런 측면에서 본 연구에서 제시한 Top-down 방식의 biomarker 분석은 객관적 가중치 부여에도 장

점이 있는 것으로 판단된다.

References

- [1] Ju Hyun Kim, Kyoung Won Yoon, and Sun Kyung Choi, "Real-time Classification of Unknown Bio-agents based on Pyrolysis Mass Spectrometry", 한국군사과학기술학회 2010년 종합학술대회, pp. 1025~1028.
- [2] Plamen A. Demirev, Andrew B. Feldman, Paul Kowalski, and Jeffrey S. Lin, "Top-Down Proteomics for Rapid Identification of Intact Microorganisms", Anal. Chem. Vol. 77, pp. 7455~7461, 2005.
- [3] Holst, O. and Brade, H., "Chemical Structure of the Core Region of Lipopolysaccharides in Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides", CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 135~170, 1992.
- [4] Otto Holst et al., "Biochemistry and Cell Biology of Bacterial Endotoxin", FEMS Immunology and Medical Microbiology Vol. 16, pp. 83~104, 1996.
- [5] Yuriy A. Knirel et al., "Cold Temperature-induced Modification to Composition and Structure of the Lipopolysaccharide of *Yersinia Pestis*", Carbohydrate research, Vol. 340, pp. 1625~1630, 2005.
- [6] JuHyun Kim, "Application of TMAH-based Pyrolysis Mass Spectrometry to a Biological Detection System", 한국군사과학기술학회지 제14권 제2호, pp. 289~298, 2011.
- [7] Jacek P. Dworzanski et al., "Novel Biomarkers for Gram-type Differentiation of Bacteria by Pyrolysis-gas Chromatography-mass Spectrometry", J. Anal. Appl. Pyrolysis Vol. 73, pp. 29~38, 2005.
- [8] Ming Xu et al., "Differentiation and Classification of User-specified Bacterial Groups by *in situ* Thermal Hydrolysis and Methylation of Whole Bacterial Cells with Tert-butyl Bromide Chemical Ionization Ion Trap Mass Spectrometry", Analytica Chimica Acta, Vol. 418, pp. 119~128, 2000.
- [9] Petra Miketova, Christy Abbas-Hawks, Kent J. Voorhees, and Ted L. Hadfield, "Microorganism Gram-type Differentiation of Whole Cells Based on Pyrolysis High-resolution Mass Spectrometry Data", J. Anal. Appl. Pyrolysis, Vol. 67, pp. 109~122, 2003.