

효소의 고정화를 이용한 요구르트의 유산균 측정 바이오센서 개발

Development of an Enzyme Biosensor for Lactic Acid Bacteria Measurement of Yogurt

조성인*	박두산*
정회원	정회원
S. I. Cho	T. S. Park

1. 서론

유산균은 소장과 대장에서 유해 미생물의 성장을 억제하여 설사 질환을 예방·치료하며, 유산균의 성장으로 장 내 pH 저하를 통해 장운동을 증가시켜 변비를 개선하고, 면역력을 높여주고, 혈청 콜레스테롤을 저하시키는 등의 긍정적인 보고가 있다(소명환, 1985).

유산균을 계측하기 위해 배지 내 유산균의 국부를 획득하여 육안이나, 현미경을 통해 사람이 직접 세는 미생물학적 방법을 사용한다. 이 방법은 시료에 대한 전처리가 필요하고 측정 결과를 얻기까지 오랜 시간(24~48시간)이 걸리며, 눈으로 직접 세어야 하는 단점이 있다. 유산균이 발효과정 중에 생성하는 유기산을 chromatography를 통해 정량하여 유산균의 양을 측정하는 방법은 장비가 고가이며 측정할 때마다 소요되는 경비가 문제되고 있다. 따라서 유산균의 수를 측정하는 여러 방법들이 연구, 개발되고 있다.

본 연구는 바이오센서 기술을 이용하여 빠르고 효율적으로 유산균을 측정할 수 있는 센서를 개발하고자 한다.

2. 재료 및 방법

가. 유산균 발효와 유기산 농도 측정

균주는 *Lactobacillus acidophilus* kctc 0404와 BD(Becton, Dickinson)사의 *Lactobacilli* MRS Broth와 Bacto peptone, 덕산 社의 Agar powder를 사용하였다.

그림 1과 같은 공정을 거친 시료를 발효가 일어나지 않는 0시간부터 30분 간격으로 8시간, 그 이후에는 1시간 간격으로 발효조에서 시료를 꺼내어 총 균수 측정법으로 유산균의 수(cfu/ml)를 측정하였다. 유산균 수와 유기산의 관계를 찾기 위해 발효과정에서 생성되는 유기산의 농도를 측정하고자 동일한 시간별로 유기산의 농도를 측정한다. 유기산의 변화량을

* 서울대학교 농업생명과학대학 바이오시스템공학전공

측정하기 위해 IC(ion chromatography)를 사용하였다.

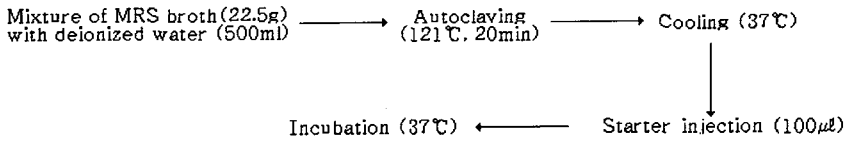


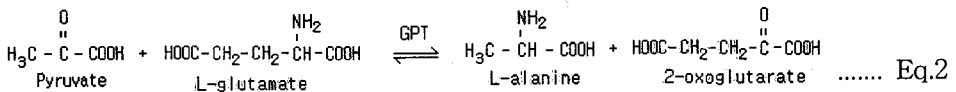
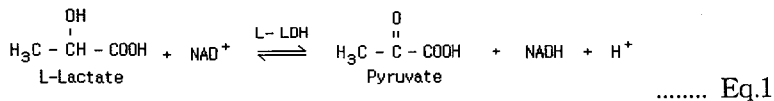
Fig. 1 Flow diagram of fermentation process of *Lactobacillus acidophilus*.

나. 유산균 농도 측정 가능성 분석

Zhang(2001)이 *Lactobacillus*를 이용한 발효에서 시간의 변화에 따른 유기산의 농도 변화에 대해 논의한 바와 같이 L-lactate는 유산균 대사과정의 최종 산물 중에 대표적인 물질이다. 따라서 L-lactate의 농도가 유산균 농도의 중요한 지표가 되며 L-lactate의 농도 측정을 통해 유산균의 농도를 측정할 수 있을 것으로 판단된다.

효소 반응을 통한 L-lactate 측정 가능성 실험을 수행하였고 사용한 시약은 다음과 같다.

L-lactate dehydrogenase (L-LDH, EC 1.1.1.27, Fluka, from rabbit muscle, 215 Units/mg), L(+)-Lactate (2-Hydroxypropionic Acid, Sigma), Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺, EC 2.7.1.23, Sigma type IV, from chicken liver, 10 Units/mg), Glutamic-Pyruvic Transaminase (GPT, EC 2.6.1.2, Sigma, from Porcine Heart, 90 Units/mg)를 정제과정 없이, L-glutamate를 사용하였다. 실험에 사용한 모든 용액은 증류수를 사용하여 제조하였고, 반응 실험에서 기초한 효소 반응식은 다음 식1,2이다.



위의 반응식을 이용하여 L-lactate 농도에 따라 H⁺ 농도를 충분히 얻을 수 있는지에 관한 실험을 하고자 한다. 이에 pH meter를 사용하였으며, L-lactate의 농도별 pH의 변화를 분석한다. 유산균 농도를 측정하기 위해 필요한 L-LDH의 양을 결정하기 위한 실험을 수행한다.

다. 센서의 구조

효소가 고정된 전극을 개발하기 위해 효소 포괄법을 사용하여 poly-acrylamide gel에 고정한다. 이를 위해 다음과 같은 시약을 사용하였다. Acrylamide electrophoresis reagent, N,N'-methylenebisacrylamide electrophoresis reagent(BIS), ammonium persulfate,

N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), L-LDH, NAD, GPT, sodium L-glutamate를 사용하였다. 효소와 시약을 고정시킬 전극 부에 일정 비율로 섞어 5분가량 상온에 보관하면 poly-acrylamide gel에 효소가 고정된 전극을 만들 수 있다.

3. 결과 및 고찰

가. 유산균 농도와 유기산 농도의 관계

발효과정에서 유산균의 수를 총 균수법으로 계수하여 그림 2에 도시하였으며, 유기산의 변화량을 ion chromatography를 통해 측정된 것이 그림 3이다.

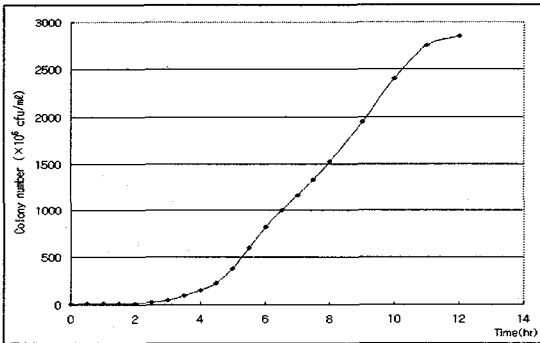


Fig. 2 Colony number of lactic acid bacteria during fermentation.

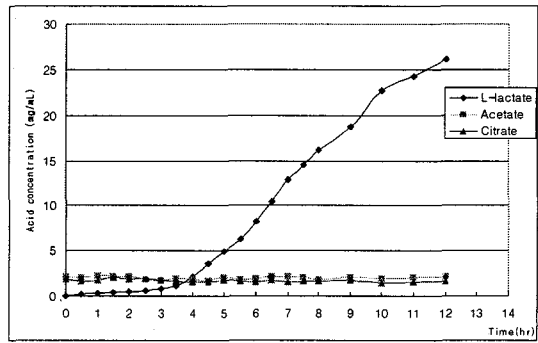


Fig. 3 Acid concentration variation during fermentation.

유산균 수를 계수한 자료와 유사한 변화를 보이는 L-lactate의 농도간의 상관관계를 구명하기 위한 선형 회귀분석 결과, $R^2=0.984$ 의 유의성이 있음을 알 수 있다. 관계식(식 3)을 통해 L-lactate의 측정으로 유산균 수를 측정할 수 있게 되었으며 표준오차는 1.14이다.

$$y = 108.82x - 87.437 \dots \dots \dots \text{Eq. 3}$$

여기서, x = L-lactate의 농도(mg/mL), y = 유산균 수(colony forming unit; $\times 10^6$ cfu/ml)

나. 유산균 농도 측정 가능성

그림 4는 각각의 농도에서 효소가 유산과 반응했을 때의 pH 변화를 나타낸다. 유산의 농도가 높을수록 pH 변화가 크므로 효소반응을 통해 L-lactate 측정과 유산균 농도 측정이 가능함을 알 수 있다. 그림 5는 효소 반응을 통해 L-lactate 농도를 측정하고자 할 때, 얼마만큼의 효소를 사용하는 것이 적당한지 알아보기 위해 수행된 실험의 결과이다.

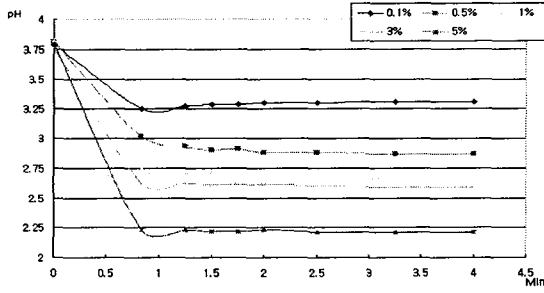


Fig. 4 Reaction curve on various concentration of L-lactate with L-LDH, NAD, L-glutamate, GPT.

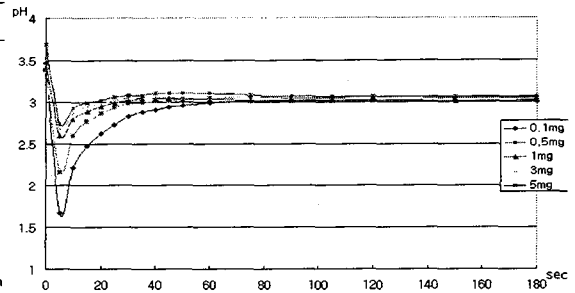


Fig. 5 pH changes trend with different enzyme concentrations on constant L-lactate concentration.

다. 센서의 캘리브레이션

발효과정에서 생성된 L-lactate의 농도는 0%에서 2.09%까지 지수 형태로 증가한다. 센서의 캘리브레이션을 하기 위해 그림 6과 같이 7단계 L-lactate 농도에서 측정된 전압 신호를 도시하였고, 그림 7과 같이 검증을 위해 임의의 농도를 측정하여 농도와 전압을 도시하였다.

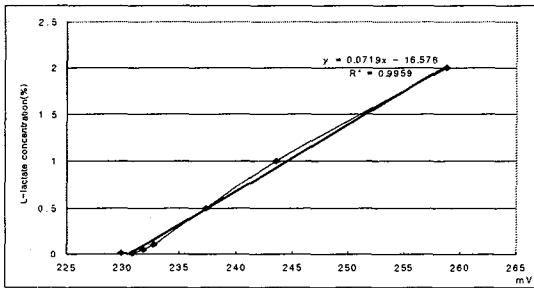


Fig. 6 Calibration curve on L-lactate concentration with output voltage(mV) from sensor.

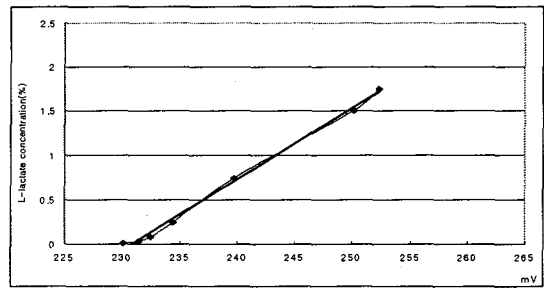


Fig. 7 Validation curve on L-lactate concentration with output voltage(mV) from sensor.

L-lactate의 농도가 증가할수록 출력 전압은 높아지며 관계식은 식 4와 같다. Calibration 결과의 상관관계는 $R^2=0.9959$, 검증에서 상관관계는 $R^2=0.9919$ 로서 높은 결과를 얻었다.

$$y = 0.0719x - 16.576 \dots \dots \dots \text{Eq. 4}$$

여기서, x = 센서로부터 측정된 값 (mV), y = L-lactate의 농도 (%)

4. 요약 및 결론

유산균의 농도를 측정하고자 하는 연구는 다양한 방법으로 진행되어 왔으나 실험적 방법이거나 고가의 장비가 필요한 방법들이다. 본 연구의 목적은 이와 같이 복잡한 장비를 사용

하지 않고 간편하게 유산균의 농도를 측정할 수 있는 센서를 개발하기 위해 수행되었다.

발효과정에서 L-lactate의 농도와 유산균의 농도의 상관관계는 $R^2=0.984$ 이며 관계식 $y=108.82x-87.437$ 을 통해 유산균의 수를 알 수 있다. L-LDH, NAD, GPT의 반응으로부터 L-lactate의 농도에 비례하는 수소이온의 농도 측정이 가능하여 L-lactate의 농도 측정이 가능함을 알 수 있다. Poly-acrylamide gel에 의해 고정된 효소들은 전극 끝에서 반응을 일으키도록 제작되었다. 이로서 제작된 센서로 L-lactate를 측정하여 얻은 출력 전압 값과 L-lactate의 농도의 캘리브레이션 결과, 관계식은 $y=0.0719x-16.576$ 이며 상관관계는 $R^2=0.9959$ 이다. 검증실험에서는 상관관계 $R^2=0.9919$ 로 나타났다. L-lactate를 측정하게 되는 본 센서는 유산균의 농도와 L-lactate의 농도와의 관계가 구명되었기 때문에 효소 반응을 통해 생성된 H^+ 농도로부터 발생된 전압 값은 유산균의 수에 대한 값으로 볼 수 있다.

효소 고정화 공정에서 효소의 활성을 최대한 유지할 수 있는 방법을 연구하여 센서의 반응성을 높이고, 정확도 혹은 정밀도가 높은 전극을 이용하여 성능이 뛰어난 센서의 개발이 가능할 것으로 판단된다. 따라서 효소 고정을 위한 다양한 기술적 시도가 필요하고 이에 따른 효소 활성 변화와 환경 변화에 따른 효소의 특성 변화에 대한 연구가 필요하다.

본 연구로 개발된 센서는 L-lactate의 농도를 측정하여 유산균의 농도를 얻는 원리를 갖기 때문에 의료용 L-lactate 측정 바이오센서로서의 활용도 가능하리라고 판단된다.

참고 문헌

1. 김정호, 이동희, 김태진, 노봉수. 1998. 포도당, 젖산 및 에탄올의 동시 측정용 바이오센서의 개발. 한국식품과학회지. 30(1):22-34.
2. 소명환. 1985. 국내 액상발효유에서 분리한 유산균의 동정 및 소화관액 내성조사. 한국식품과학회지. 17(3):192-196.
3. González-Sáiz, J. M. and C. Pizarro. 2001. Polyacrylamide gels as support for enzyme immobilization by entrapment. Effect of polyelectrolyte carrier, pH and temperature on enzyme action and kinetics parameters. European polymer journal. 37:435-444.
4. He, Y. N., H. Y. Chen. 1997. The kinetics-based electrochemical determination of serum glutamate pyruvate transaminase activity with a gold microelectrode. Analytica Chimica Acta. 353:319-323.
5. Mizutani, F., S. Yabuki, and Y. Hirata. 1995. Amperometric L-lactate-sensing electrode based on a polyion complex layer containing lactate oxidase. Application to serum and milk samples. Analytica Chimica Acta. 314:233-239.
6. Zhang, J., Y. Xie, X. Dai, W. Wei. 2001. Monitoring of *Lactobacillus* fermentation process by using ion chromatography with a series piezoelectric quartz crystal detector. J. Microbiological Methods. 44:105-111.