

Biosensor의 개념과 기술



이 명 호
(연세대 공대 전기공학과 부교수)

당초 바이오칩 소특집을 기획하여 국내 및 선진국의 현황과 전망을 게재할 예정이었으나 국내필진 선정의 어려움과 자료부족으로 당초예정에서 약간 수정, 바이오 센서의 개념과 기술에 대해 고찰하기로 하였다.
바이오 칩에 관해서는 다음기회를 기약하면서...

1. 서 론

생물환경반응권(생물과 환경이 상호작용하는 권 : biosphere)에는 전체 생명기관이나 따로 격리되어 있는 시스템이 갖고있는 건강상태나 행동등의 여러 상황에 영향을 미치고, 억제하며, 약화시키거나 자극을 가할 수 있는 많은 물질들이 있다. 그러므로 지난 수 십년 동안 인간이 생체현상의 감지범위나 센서기술의 개발능력을 향상시켜온 것은 결코 놀라운 일이 아니다. 이것은 궁극적으로는 생체현상의 규명과 그 자체를 조절할 목적으로 생체의 본질을 측정하고 감시하기 위한 수단이기도 하다. 최근 이 분야의 개발은 생체기술에 근거한 산업체의 등장과 함께 더욱 가속화되고 있다. 동시에 이러한 감지장치나 바이오센서(biosensor)가 건강보호(health care), 수의학, 농업, 석유화학약품 및 오염감시기능등을 포함한 분석적 생체기술(analytical biotechnology)의 여러 분야를 일대 개혁할 수 있는 중요한 생체재료의 출현을 예측하게 하였으며 나아가서는 실시간 처리분야의 연구를 가속화시키고 있다.

바이오센서 개발의 주요 원동력은 건강보호 기술의 빠른 진보로부터 비롯된다. 예를 들면, 현재 일반적으로 인정되는 방법으로 혈액의 양이온(blood cations), 기체(gas)나 대사산물(metabolites)과 같은 생화학적 변수를 자주 측정하는 일등은 환자보호를 효율적으로 하기위한 필수적 선행조건이 된다. 따라서 혈액이나, 타액(saliva) 및 오줌(urine) 등과 같은 생체조직액체로

부터 얻어낸 샘플에 관해 병동, 수술실, 가정, 외래환자(out patients) 및 실험실에서 중요한 대사산물(metabolites)을 감지하기 위한 저렴하고도 신뢰할 수 있는 체외용 센서(in vitro sensor)가 필요하다.

바이오센서에 의해 제공된 연속 신호는 신진대사적으로 불안한 환자를 생체내(invivo)에서 연속적으로 감지하는 대안적인 작용기전(modus operandi)을 밝히는데 이용될 수 있다. 이러한 체내용 센서(in vivo sensor)는 혈액 시스템내 또는 피부표면의 생화학적 변화에 관한 더욱 많은 정보를 제공할 수 있으며 신진대사물 농도의 동적(dynamic) 변화를 감지할 수 있다. 인체내에 이식할 수 있는 센서를 이용한 연속적 모니터링, 또는 충분한 실시간 데이터를 전자기계식의 약 분출기(drug dispenser)를 통해 직접적으로 약을 투여할 수도 있다. 그러므로 이는 인공췌장(artificial pancreas)과 같은 생체귀환 시스템(biofeedback system)으로 합쳐질 수 있다. 바이오 센서를 동작시키는 데는 두 가지의 방법이 있는데 그 첫째는 경피적(percutaneously)으로 이식되거나 삽입되는 체내용 센서(in vivo sensor)와 둘째는 피검자와 아무런 연결없이 분석적 실험장치에서 이산적으로 사용되는 체외용 센서(in vitro sensor)이다.

특수한 미생물(microorganisms)에 민감한 바이오센서는 혈액, 생체현상의 흐름, 세척, 냉각 또는 연료라인 시스템내에서의 오염을 감지하는 데 있어 더욱 유용하게 쓰일 수 있을 것이다. 표 1은 여러 종류의 바이오센서의 가능한 응용범위를 요약해 놓은 것이다.

표 1. Biosensor의 응용분야

Clinical diagnosis and biomedical
Agricultural, horticultural, veterinary analysis
Pollution, water, microbial contaminations
Fermentation analysis and control
Industrial gases, liquids
Mining and toxic gases
Explosives and military arena
Flavours, essences and pheromones

2. 재료성분

앞절에서 기술한 것처럼 바이오센서의 개발은 분석적 정보에 의존하여 동작하는 많은 분야에 큰 영향을 줄 것

이로 보인다. 그러나 바이오센서의 일반적 기술의 향상을 위해 노력하기 전에 어떤 재료를 어떤 농도에서 그리고 어떤 매질에서 그 재료의 특성을 찾을 수 있으며, 원하는 평가분석의 선택을 어떻게 수행할 것인가 하는 것을 먼저 고려해야 한다. 표 2는 적합한 특성(specif-

표 2. 공통 분석물

Respiratory gases	O, CO
Anaesthetic gases	NO, halothane
Toxic gases	HS, Cl, CO, NH
Flammable gases	CH
Ions	H, Li, K, Na, Ca, phosphate, heavy metal ions
Metabolites	Glucose, urea
Trace metabolites	Hormones, steroids, drugs
Toxic vapours	Benzene, toluene, toluene diisocyanate
Proteins, nucleic acids	Viruses, bacteria, parasites
Microorganisms	

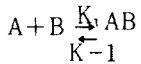
icity)과 감도(sensitivity)를 갖는 바이오센서의 개발을 위하여 고려할 수 있는 공통적인 재료성분을 나타낸다. 이러한 분석물의 주요 재료성분은 호흡가스(O₂, CO₂), 유독 가스(NH₃, Cl₂, CO, H₂S), 신경가스, 마취성 가스(N₂O, halothane)와 체액에 존재하는 가연성 가스(CH₄) 등이다. 이들 가스의 상당부분은 ppm 레벨의 영역에서 독성이며, 수 백, 수 천의 ppm 레벨의 다른 가스와 10-20,000 ppm 레벨에서의 증기를 더한 것과 관련이 된다. 그러므로 전위센서(potential sensor)는 변별비(discrimination ratio)가 높아야 하며 최악의 경우는 변별비가 10³-10⁵이 되도록 수증기를 감해야 되기도 한다.

유사한 판별력(discriminatory power)이 다른 생물학적 분석에 있어서도 필요하다. 예를 들면 혈청(blood serum)에 있어서 어떤 단백질의 농도는 약 70g/litre의 총단백질(protein) 농도에 비교하여 ug/litre 정도밖에 안되거나 더 낮을지도 모른다. 그러므로 특수한 단백질을 평가하기 위해서는 10⁷-10⁸의 판별비를 필요로 한다. 그러나 이온, 대사 산물, 극미량의 물질등을 포함하는 많은 다른 생화학물질이 단백질 매트릭스(protein matrix)에 추가되어 생물학적 샘플에서 나타남으로서 바이오 센서에 필요한 판별력을 증가시킬 수도 있다는 것을 알아야 한다. 특이성에 대한 비슷한 견해가 이온, 대사 산물, 극미량의 대사 산물, 치료약, 호

르문, 독소 유기 증기, 미생물 오염, 생물독, 오염물질 등에도 적용된다.

3. 생체측매

Biosensor는 생화학적인 신호를 전기적인 신호로 바꿀수 있는 트랜스듀서 시스템과 밀접하게 관련되어 있고 생물학적으로 매우 민감한 물질로 구성된다. 일반적으로 생물학적으로 민감한 물질은 효소(enzyme), 다효소계(multi-enzyme system), 항체(antibody), 막성분, 기능질(organelle), 박테리아 또는 포유류의 조각, 식물 세포등이 분석물(analyte)의 인식 즉 넓게 말해서 최종 기구의 특이성과 감응성에 관계된다. 생물분자는 가역적으로 상호작용한다.



여기에서 특별한 합성체의 분리상수(K_p)는 비례상수(K_1 / K^{-1})의 비율로 주어지며 상호작용시스템에 따라서 10^{-2} 에서 10^{-16} M 사이에 위치한다. 예를 들면, 효소-기질, 억제인자(inhibitor), 효과기(effector)나 조효소(효소를 활성화시키는 내열성 수용성 비단백질:coenzyme) 합성물도 대개 $10^{-2} - 10^{-6}$ M 범위 내에 있고 반면에 면역합성물(immunological complexes)은 $10^{-6} - 10^{-12}$ M 그리고 viotin-avidin 같은 합성물은 10^{-16} M 정도의 낮은 값을 갖는다. 생물상호작용 시스템은 재료 성분에 대한 분석평가상의 특이성과 감응성을 결정하나 이것은 생체시스템을 적당한 트랜스듀서로 정확하게 근사화하여 전기적인 신호로 변환시킬 수 있다. 일반적으로 생물 분자가 특이하게 또한 반대로 작용할 때 상호작용과 관련하여 하나 또는 그 이상의 물리 화학적인 변화가 일어나고 특히 상호작용이 효소나 organelles, 완전한 세포의 촉매작용에 의하여 수반될 때 더욱 그렇

다. 예를 들어 상호작용이나 생체촉매 반작용으로 양자 농도, 가스(O_2 , CO_2 , NH_4) 등의 방출과 흡수, 특정 이온(NH_4 , 1 개의 양이온, 음이온), 열, 광학밀도, 비특정 이온이나 전자전달에서 변화를 일으킬 수 있다. 그림 1은 바이오센서의 일반원리를 나타낸다. 생체계와 트랜스듀서 사이의 강렬한 접촉은 일반적으로 몇 가지 방법중의 하나로 디바이스 표면에서 생체촉매작용의 고정 에 의해 이루어진다. 첫째, 생체촉매를 생체촉매제와 불활성 단백질 사이에 내부 미립자 결합을 형성하기 위한 양이온의 시약을 가지는 불활성, 일반적으로 단백질류의 물질을 화학적으로 교차결합시킨다. 또하나의 일반적으로 사용되는 과정은 물리적으로 트랜스듀서 표면에서 생체촉매작용을 polyacrylamide나 agarose와 같은 종합체 모형으로 함정에 빠뜨리거나 cellphane, cellulose acetate/nitrate, polyvinyl-alcohol이나 polyurethane을 구성하는 종합체 막을 보유하여 억제시킨다. 끝으로, 몇몇 경우에 있어서 앞에서 언급한 과정은 생물학적 감응시스템을 직접 트랜스듀서 표면에 등가로 접촉시켜서 확산제한의 부담없이 긴밀히 접촉시키게 되는데 이것은 종종 막과 matrix로 함정에 빠진 시스템을 관찰하게 된다. 트랜스듀싱 시스템을 사용한 효소나 효소시스템의 촉매력을 커플링함으로써 생화학적, 임상적으로 중요한 요소의 plethora의 정량적 결정에 대해 특수하고 민감한 생체센서를 구제하는 것은 가능한 일이다. 그러나 어떤 경우에 있어서 부세포 조각(subcellular fraction), 즉 전체 박테리아, 동물, 식물세포 혹은 완벽한 조직조각등을 사용하는 것이 더 낫다. 왜냐하면 이와 같은 시스템은 복잡 다중 효소 대사 경로로 이루어져야 촉매작용의 격리와 안정상의 문제를 없애게 된다.

4. 바이오센서의 종류

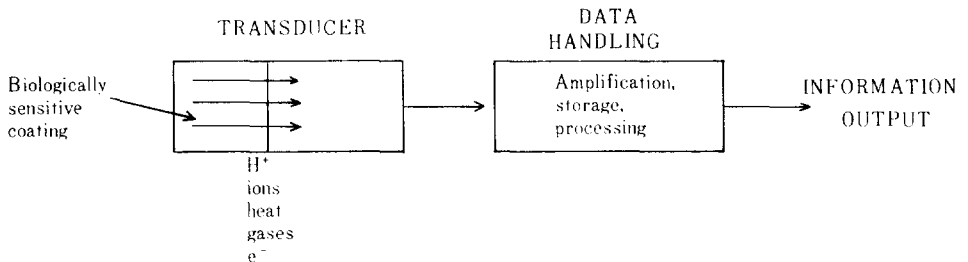


그림 1. 고정화 바이오 센서의 구조

표 3. 바이오센서의 분류

구 분		용 도
1. Bioaffinity Sensor $S + R \rightleftharpoons SR$ Receptor R 기질 S 색소 단백질 당결합성 단백질 다당류, 복합지질 apo 효소 보차분자족 항체 항원, 합텐 Receptor 홀몬, 신경전달물질 미각물질, 후각물질 수송체 기질		Transducer
2. 대사형 센서 $S + R \rightleftharpoons S \rightarrow P$ 기질 S Receptor R 생성물 P 효소 [특정기질 organelle 보조인자 미생물 효소저해물질 식물, 동물조직] [효소부활물질		전류, 전위차계측, 써미스터 전계효과형 반도체, 반도체 전극, 발광계측
3. 바이오미메틱 센서 $S + R \rightleftharpoons SR$ Receptor r 기질 인공효소 특정기질		

초기에 시도된 바이오센서는 고정화 효소막과 전기화학 디바이스를 조합한 효소전극이다. 여러가지 효소의 기질 및 반응특이성을 이용한 효소전극(enzyme electrode)이 고안되었다. 처음에는 단일 또는 복수의 효소가 분자식별로서 이용되었고 특정의 기질에 대한 계측법으로서 제창되었다. 계속하여 같은 유형으로 효소-조효소, 효소-억제물질, 항원-항체, 당결합성 단백질-다당류, 운송체-기질등과 같이 양자간에 특이적 친화성이 있는 물질로 확장되어 각각 독특한 전극이 구성되었다. 이들은 물질간의 특이적 친화성에 기초를 둔 것으로 일반적으로 bioaffinity sensor라 칭할 수 있다.

다음은 분자식별소로서 효소, 기능질(organelle), 미생물, 식물 및 동물조직등을 이용하여 기질의 소비나 생성물의 증가를 측정하는 형식의 이화작용에 의한 대사형 센서가 있다. 또한 효소 유사작용, 생리활성유사

작용을 나타내는 합성화합물을 이용하여 각각의 특이성 또는 변화등을 이용하는 생물기능모방형센서가 있다. 이와같이 반응형식에 의한 바이오센서의 분류를 표 3에 나타냈다.

일반적으로 사용하는 분자 식별소자의 종류에 의해 효소센서, 면역센서, 효소면역센서, organelle 센서, 미생물센서, 조직센서등으로 분류되어 각각 호칭된다. 또 사용하는 transducer에 의해서도 바이오센서는 표 4와 같이 분류된다.

이와 같이 transducer의 응용에 있어서 바이오센서로서의 간편성, 특수성, 미소화, 미량측정등의 특성을 발휘하고자 하는 의도에 불과하다. 이상과 같이 바이오센서를 분류할 수 있지만 바이오센서의 구성인자 및 구성방법에서도 연구의 흐름을 볼 수 있다. 당초 고안된 효소전극의 구성인자로 알 수 있듯이 효소를 막에 고정

표 4. Transducer에 의한 분류

Transducer	측 정 법	적 응 예
효소전극	전류, 전위	각종 특정기질, 항원 등
이온 선택성 전극	전위	각종 이온, 면역반응계
가스 전극	전위	각종 가스
써미스터	열변화	각종 특정기질, 효소저해물질 항생물질, 면역 반응계
전도계	도전율	각종 기질
Piezo 결정	전위	가스, 미생물
전계효과형 반도체	전위	이온, 면역 반응계
photo-electronics	광전류	각종 특정기질, 면역반응계
광섬유		

시킨 박막이 분자식별소자로서 이용된 것이다. 다음으로 효소작용, 생리활성작용을 나타내는 미생물, organella, 식물 및 동물조직등을 천연 또는 합성고분자에 포괄하든가, 결합하여 고정화 박막을 만들어 receptor로서 사용한 것으로 그 원리와 방법은 고정화 효소막에 관한 고찰과 비슷하다. 이 경우 즉 분자식별물질을 막중에 고정화한 경우, 기질 및 생성물의 확산, 분자식별물질의 외관의 효소활성의 저하, 고정화율, 막강도, 검출한계, 안정성과 같은 문제로부터, 분자식별물질을 전극등에 직접 결합시킨 일종의 생물활성수식전극의 제작을 지향하는 것은 당연한 전개이다. 다시 이 생각이 전계효과형 반도체의 gate상에 직접 또는 박막에 분자식별물질을 고정화하는 방식으로 진전되었다. 이것은 바이오센서의 미소화, 초미량화, 집적화를 기도한 것으로 현재 bioelectronics로서 널리 행해지고 있다. 또 optical biosensor의 연구도 전개되고 있다. 이와 같이 바이오센서는 생체기능 물질의 이용, 새로운 측정수단의 응용과 같은 적당한 목적을 조합하여 다양한 전개를 해왔다.

사용되는 transducer에 의해서도 바이오센서는 표 4와 같이 분류된다.

트랜스듀서는 생체촉매(효소) 작용의 산물에 대하여 반응하고 나아가 전자적으로 증폭, 저장, 표시의 형태로 반응하는 전기적인 디바이스이다. 가장 적절한 트랜스듀서의 형태는 어느정도 생체촉매 시스템과 탐지되는 2차적인 산물에 의존하지만 편의상 트랜스듀서의 요소는 4가지 주된 형태 즉, 전위차, 전류, 광학 그리고 기타 다른 소자로 나누어 볼 수 있다. 그러나 트랜스듀서 설계의 모든 경우에 있어서 아래의 특징을 만족해야만 한다.

- (1) 적절한 주요 영역에서의 관심사와 반응을 분석하기 위하여 매우 특수하게 설계되어야 한다.
- (2) 적당히 빠른 반응 시간(통상적으로 1-60s)을 가져야 한다.
- (3) 소형화할 수 있어야 하며, 온도의존성이나 드리프트등과 같은 불리한 환경적 영향에 대하여 이상적인 보상을 행할 수 있어야 하고, 실용에 있어서 신뢰성이 있고 적절하게 설계되어야 한다.

4.1 Potentiometric 바이오 센서

Potentiometric 기법의 디바이스는 평형상태 하에서 동작하며, 어떤 선택적 처리에 의해 발생하는 전극에서의 전하밀도의 적산을 측정한다. 가장 잘 알려진 potentiometric 디바이스는 이온감지전극(ion-sensitive electrode: ISE)이다. 용해상태의 이온은 선택적 이온을 감응막에 부착시킴으로써 발생하는 전극전위의 변화를 관찰하여 정량화할 수 있다. 일반적인 PH측정기에서 전극은 전형적인 양이온 변환기로 작용하는 H⁺ 감응 유리막(H⁺ sensitive glass membrane)으로 이루어지며 다음과 같은 식을 따른다.

$$E = \dot{E} + \frac{RT}{zF} \ln a$$

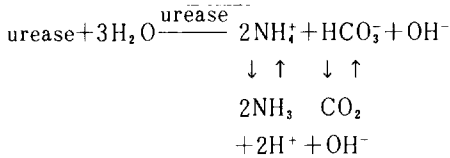
- 이때 E = 실험적으로 관찰된 전극 전위
- \dot{E} = 전극시스템에 대해 일정한 전위항
- R = 기체 상수
- T = 절대온도
- F = Faraday 상수
- z = 선택이온의 전하량

a = 선택이온의 활성도

그러므로 이온선택성 전극전위는 이온활성도의 log 함수이며 전극전위에서 59.2mV의 변화가 생기면 1가이온의 활성도에서는 10배의 변화가 생긴다.

지난 10여년간 전극설계와 제조에서 주요한 개선이 이루어졌으며 이제 ISE는 Na⁺, K⁺, Ca⁺, Li⁺, NH₄⁺와 더불어 여러 음이온, 약품 및 다른 물질등의 검출에 성공적으로 개선되고있다. 아마 전위차계 biosensor의 가장 좋은 예는 효소전극일 것이다. 일반적인 효소전극에는 고정화된 효소가 둘러싸여있다. 이것은 특히 전극 표면에서 생산되고 소비되는 기질이나 산물을 측정한다.

효소의 특성은 단일 광이성체에 한정시켰다. 예를 들면 포도당 산화물은 D-이성체(D-isomer) 산화물안에서만 촉매작용을 하는 데 반에 다른 효소들 즉 L-아미노산 산화물 같은 것들은 L-cysteine, L-leucine, L-tyrosine, L-tryptophan, L-phenylalanine, 및 L-methionine 등을 포함한 몇 가지 관련 물질에서 촉매작용을 한다. 전위차계 바이오센서와 관련된 최소의 활용은 내용과 속도, 정밀도, 편이성, 그리고 다른 방법에 비해 표본혼탁도 내지는 광학적 성분과 관련된 비의존성에서 몇 가지 장점을 갖는다. 유리 pH전극은 비록 다른 전극들이 부수적으로 사용될 지라도 산소를 생산하거나 소모하는 과정을 지니는 효소작용에 연관되어 사용되는 첫번째 ISE 이다. 예를 들어, 효소효소는 요소의 산화과정에서 촉매작용을 한다.



그리고 pH, NH₄⁺, HCO₃⁻, NH₃ 가스 또는 CO가 스전극둘레를 고정 시킴으로써 요소결정을 실행할 수도 있다. 다른 효소 또는 ISE결합도 확실히 관찰할 수 있다. 예를 들어 산소 소비측정과 연관된 전극은 지방산이나 hydroxy acids, sugars, amino acids, purines, pyrimidines, aldehydes, thiols, phenols, 그리고 steroids, 그 밖에 산소 소비와 관련된 모든 물질들에 대해 넓은 영역에서 작용하는 기질에 알려진 산화물이 적어도 50개 이상 존재한다는 사실로 인하여 효소전극에 쉽게 결합될 수 있음이 증명되었다. 이런 형태의 효소전극은 현재 비타민이나 항생물질, 조효소, 억제인자, 금속이온, 그리고 면역배위자 결합에 있어서, 또는 효

소면역전극등에 관련된 바이오센서개발에 까지 널리 확장되어 쓰이고 있다. 후자의 기구는 정교한 특성과 전형적인 효소전극작용의 단순화와 관련된 면역분석절차의 민감성을 결합하고 효소명칭이 붙은 항원을 결합한 항체표피전극을 포함하게 된다. 효소명칭이 포도당 산화물이나, 요소, peroxidase 또는 catalase 일 경우, 이 생산물은 적당한 (potentiometric) 또는 가스선택성 전극(gas-selective electrode)에 의해 감지할 수 있다. 이온 선택성 전극이나 효소전극 또는 효소면역전극상에서 얻어진 전위는 그림 2에 나타난 기준(reference) 전극 R의 전위에 비례하여 일반적으로 모니터링되며 E° 위에서 나타난다. 그림 2에 있는 ISE는 차폐된

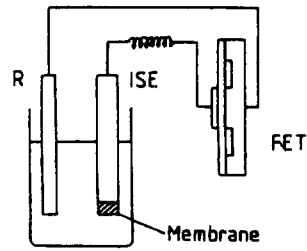


그림 2. 이온선택성 전극(ISE)의 구조

R : 기준전극

M : 전기활성막

FET : Field Effect Transistor

wire에 의해 pH 미터 또는 그와 등가인 장치내에서 전계효과 트랜지스터(FET)에 연결된다. FET는 높은 입력 임피던스와 낮은 출력 임피던스를 나타내는 반도체 장치로 전류의 이끌어냄 없이 ISE상에 전하가 증가됨을 모니터링할 수 있으며, 그로 인해 전극에서의 전류의 흐름을 배수(drain)하게 된다. 이 개념을 논리적으로 확장하면, 지금 거의 실현이 되있는 것으로 ISE와 FET의 이온 선택성 막을 통합하여 이온 선택성 전계효과 트랜지스터(ISFET : Ion Selective Field Effect Transistor)를 만들게 된다. ISFET는 IGFET(Insulated Gate Field Effect Transistor)의 일종으로 그림 3은 이의 세부적인 구조를 나타낸다.

본질에 있어서 IGFET는 p형 실리콘 기저와 거기에 확산된 두 negative(n형) 영역, p형 채널로 분리된 소스와 드레인 차례대로 이루어졌고 그 위에 금속화 게이트 전극으로 덮여있다. 정상적인 동작상태에서는, 전압

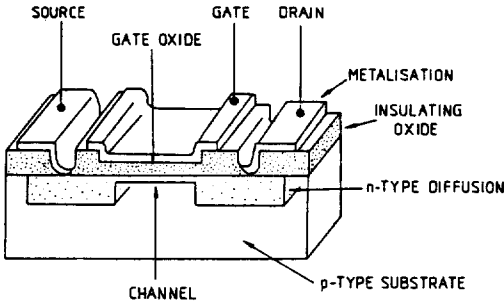
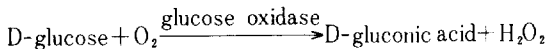


그림 3. IGFET 개략도

(V_G)가 게이트 바로 아래 장을 만들고 게이트 아래 기저표면 위의 전자를 당기거나 미는 반도체 기저와 게이트 사이에 공급된다. V_G 의 적당한 극성과 크기에서는 흡인된 전자의 누적에 의해 p형 기저표면은 n형으로 반전되고 소스와 드레인 사이에 도전채널을 이루고 따라서 전류 I_D 의 계속적인 통로가 생기게 된다. ISFET는 금속화 게이트를 적절한 이온 선택적 투과막으로 대체해 형성된다. 게이트의 접촉전하밀도를 직접 재는 독특한 능력의 FET는 화학적으로 민감한 FET장치를 개발하는데서 만들어졌다. 예를들어 pH, K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , NH_3 , H_2 , 효소기질과 면역배위자(착음이 형성될 때 중심의 금속양이온과 배위결합하여 착이온을 만드는 분자 또는 이온의 총칭 : ligand)에 민감한 장치들은 게이트 부분을 덮는 적당한 막으로 결합해서 만들어진다. 집적회로제조자 전자공학에 기반한 바이오센서는 다중게이트 장치와 확률적 계산 기술에 힘입은 '지능' 장치에 의해 소형화될 가능성이 충분히 있다.

4.2. Amperometric 바이오센서

황색단백질 효소 글루코즈 산화(flavoprotein enzyme glucose oxidase)에 의한 글루코즈의 산화는 수소과산화물의 식을 이끌어낸다.



수소과산화물(hydrogen peroxide)은 양전위에서 백금전극의 재산화전류(reoxidation current)에 의해 검출할 수 있다. 이런 전류 효소 전극(amperometric enzyme electrode)은 농축범위 $10^{-7} - 10^{-3}$ mol/liter의 글루코즈양을 측정하는 데 사용된다. 보통 효소는 전극주

위의 적당한 polymer matrix 막안에 갖거나 covalently 전극표면에 직접 붙어서 얇은 보호막안에 덮혀지게 된다. 전압효소전극(potentiometric enzyme electrode)일 경우와 마찬가지로, 전류전극의 응답시간은 막의 두께 여하에 달려 있지만 적당히 얇은 막으로는 정상상태에 도달하는데 필요한 시간을 약 25s 까지 감소시킬 수 있다.

4.3. 광 바이오센서

바이오센서 기술은 최근 발전을 거듭하고 있는 광학과 광전자공학의 응용분야로서도 각광을 받고 있다. 그 이유는 이들 장치가 안정성, 소형화, 저가격, 처분가능을 통하여 중요한 잇점을 제시할 뿐만 아니라 생물과학에서 잘 밝혀진 광학기술을 이용할 수 있기 때문이다.

예를 들어 반사장치에 대한 간단한 광섬유 기술의 사용, 작은 광섬유 탐침 끝에 반응 약품을 붙여 놓음으로써 바이오센서에 기초한 전달 혹은 형광이 설명되어 왔다. 그래서 pH의 결정은 pH에 민감한 염료가 섬유 끝에 붙어있는 미소한 탐침으로 가능해졌다. 그리고 유독 가스, pCO_2 , pO_2 그리고 금속 이온을 감지하는 작업이 요즈음 발달하고 있다.

미세한 광전자공학적 탐침과 광학적으로 투명한 도파관에서 pH에 민감한 염료의 흡수 변화를 개발하는 다른 광학장치도 설명되어 왔다. 항체는 광학적으로 투명한 도파관, 유리 혹은 플라스틱판, 혹은 섬유의 표면에 고정되었고 거기에서 그것의 보충적 항원(complementary antibody)은 도파관 안에서 오는 빛의 흡수에 의하여 감지된다. 장치의 민감도는 도자 안으로의 빛의 반사와 이후의 복구 사이에 광선, 항원-항체 합성물이 상호작용할 기회를 반복하여 줌에 따라 증진된다.

4.4. 미생물센서

최근 의료를 비롯한 여러 분야에서 화학물질을 측정하는 화학센서의 응용이 주목을 받아 그의 개발이 널리 행해지고 있다. 그중에서 혈액중의 당량과 같이 다성분계에서 목적하는 성분만을 선택적으로 측정하기 위해 생체재료를 분자식별소자로서 이용하는 바이오센서가 개발되었다. 최초로 보고된 것은 효소를 이용한 것이고 화학물질의 선택성이 아주 높은 것이 특징이고 효소센서

라 부른다. 효소는 이와 같이 우수한 특성을 갖고 있는 반면 단백질이기 때문에 항상 불안정하고 또 활성을 나타내기 위해서는 보호소등 많은 factor를 필요로 하는 경우가 많다. 한편 미생물은 복잡하나 우수한 기능을 가지며 복합효소계로 구성되어 있다. 그래서 효소대신에 미생물을 그대로 분자식별 소자로서 이용하는 경우를 고안했다. 미생물을 이용하는 경우 균체내의 단일 효소만이 아니라 복합효소계, 보호소, ATP의 재생계등 전생리기능을 이용할 수 있는데 이것을 미생물센서(microorganism sensor)라 한다. 이 미생물 센서는 경제성, 안정성면에서도 뛰어나기 때문에 응용이 주목되고 있다. 여기서는 미생물센서의 원리와 응용에 대하여 설명하고자 한다

4.4.1. 미생물센서의 원리

화학물질을 선택적으로 식별하기 위해서는 미생물에 의한 호흡기능 및 대사기능으로 이용하는 경우가 많다. 미생물센서는 다른 바이오센서와 같이 미생물고정화막과 전극으로 구성된다. 미생물을 그의 호흡활성등을 유지시킨채로 막중에 고정화하기 위해서는 미생물을 합성고분자 matrix중에 포괄 고정화하는 방법, 공유결합으로 막에 고정화하는 방법, 물리적으로 막에 흡착시키는 방법등이 고안되었다. 이와 같은 처리에 의해 이들의 기능은 안정화되어 장기간 반복사용이 가능하다. 미생물센서에는 고정화상태에서도 생존하고 있는 미생물을 이용하는 경우가 많고 센서에 관여하는 생화학반응은 일반적으로 복잡하다. 미생물기능중 호흡활성을 지표로 하는 형식의 센서를 호흡활성 측정용 미생물센서라 부른다.

그림 4는 이 원리를 나타낸다. 호기성의 미생물은 호흡에 의해 산소를 소비한다. 따라서 격막산소전극상에 미생물고정화막을 만들어 줌으로서 미생물의 호흡활성

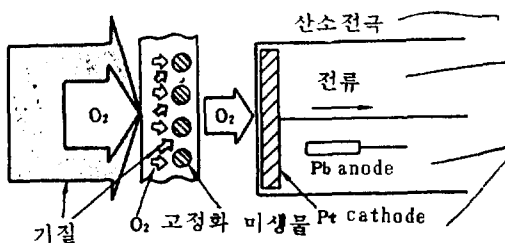


그림 4. 호흡활성 측정형 미생물센서

을 측정할 수 있다. 예를 들면 미생물의 호흡을 촉진하는 물질이 존재하는 시료액중에 이 미생물 전극을 넣으면 산소농도의 저하에 의한 전류량의 저하가 일어나고 이것을 지표로 하여 특정의 화학물질을 계측할 수 있다. 이것을 미생물센서라 부른다. 이 센서로 측정하기 위해서는 먼저 유기물을 포함하지 않은 산소포화상태의 수용액중에 미생물전극을 삽입하여 정상전류치를 얻는다. 이것은 용액중의 산소가 미생물막에 확산하여 미생물의 자가호흡으로 소비되고 나머지 산소가 테프론막을 통과하여 백금전극상에서 환원되기 때문이다. 다음으로 이 미생물센서를 포화상태로 보존되어 있는 시료액중에 삽입하면 미생물은 시료액중의 유기화합물을 균체내로 끌어들이어 분해하기 때문에 미생물의 호흡이 활발해진다. 따라서 전극에 확산된 산소량이 감소하고 전류치는 급속히 감소된다. 그러나 시료액내로부터 미생물막으로의 유기물의 확산이 정상으로 되기 때문에 미생물에 의한 산소 소비량도 정상으로 되어 전극의 출력도 정상전류치가 얻어진다.

이 정상전류치와 시료액중의 유기화합물농도와 사이에는 상관관계가 존재한다. 따라서 이 원리에 의해 각종의 유기화합물이나 가스등을 계측하는 것이 가능하다. 반면 미생물은 유기화합물을 섭취하고 이것을 대사함으로써 각종의 대사산물을 생성한다. 이 대사산물내에서 용이하게 전극과 반응하거나 또는 감응하는 물질(전극활물질)을 이용하는 형식의 미생물센서도 고안되었는데, 이것을 전극활물질측정형 미생물센서라 부른다. 그림 5는 이의 원리를 나타낸다.

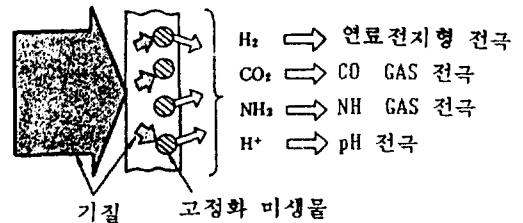


그림 5. 전극활물질측정형 미생물센서

전류미터에 전극으로 측정할 수 있는 대사산물로서는 수소, 개미산이나 각종의 환원형보효소(feedback coenzyme)등이 있다. 한편 potentiometric 기법에 의한 전극으로 측정할 수 있는 대사산물로서 이산화탄소, 유기산(수소이온)등이 있다. 따라서 측정대상물질이 미

생물에 의해 대사되고 이들이 전극활물질로 변환되는 경우에는 미생물막과 이들을 계측하는 전극을 조합시킴으로써 이 물질을 계측할 수 있다. 예를 들면 수소산생균고정화막을 연료전지형 전극의 anode표면에 설치하여 미생물센서를 제작한다. 여기서 연료전지형 전극이란 anode로서 백금전극, anode로서 과산화은전극, 전해액으로서 인산액, 이온교환막의 액을 갖는 것이고, anode에 수소가 반응하면 전류가 얻어지는 일종의 연료전지이다. 이 미생물센서를 유기물을 포함하는 시료액내에 투입하면, 유기물은 막으로 확산하고, 수소산생균에 의해 자화되어 수소가 생성된다. 생성된 수소는 anode표면으로 확산하여 산화되기 때문에 전류치는 천천히 증가한다. 그러나 수소산생균고정화막으로의 유기물의 확산이 정상으로 되면 균에 의한 수소생성속도도 정상으로 된다. 즉 용액으로부터의 유기물의 확산속도가 미생물에 의한 유기물의 분해속도간에 평형이 이루어진다. 그리고 전극표면으로 수소의 확산속도가 정상으로 되고 정상전류치가 얻어진다. 이 정상전류치와 시료액내의 유기물농도간에 직선관계가 확인되어 이 미생물센서를 이용하여 시료액내의 유기물을 측정할 수 있다.

4.4.2. 미생물센서의 응용

미생물센서는 효소센서등과 같은 다른 biosensor에 비하면 안정성이 뛰어나기 때문에 장기간의 연속사용등과 다한 사용에도 충분히 견딜 수 있다. 이것은 생존상태의 미생물을 이용하기 때문이며 고정화기술의 도입에 의해 미생물기능이 장기간 안정화되고 있음에 기인한다고 여겨진다. 이와 같은 특성을 활용하여 현재 미생물센서는 공업 process나 환경등의 계측분야로의 응용이 주로 행해지지만 의료분야에서는 생체의 물리적측정과 임상화학분석등으로의 응용이 고려되고 있다. 또 미생물의 호흡활성을 전극으로 측정함으로써 미생물의 자화성을 측정하는 것도 가능하다. 앞으로 미생물센서의 응용에 대해 구체적으로 설명하고자 한다.

1) 글루코즈 센서

*Pseudomonas*가 있는 균들은 글루코즈를 잘 자화시키고 다른 당류나 아민산은 그다지 자화시키지 않는다. 그래서 이것을 배양하고 콜라진 막중에 포괄 고정화한다. 이 미생물고정화막을 부막산소전극상에 장치하면 글루코즈 센서를 제작할 수 있다. 이 센서로 부터 얻어지는 전류치와 글루코즈 농도간에는 직선관계가 확인되어

이 관계를 이용하여 글루코즈 농도를 계측할 수 있다. 이 미생물센서는 효소센서와 거의 같은 정도의 감도를 갖고 있다. 이 센서의 선택성을 검사한 바 콜록토스, 갈락토스, 반노오스, 스쿠로이스에 약한 응답하지만 어느 것도 그 응답성은 글루코즈로의 응답성에 비하면 낮고 실제 측정에는 그다지 문제가 없다.

2) 알콜센서

발효공업에 있어서는 발효과정에 걸쳐 에틸알콜이나 메틸알콜의 on line 계측이 요망되고 있다. 그리고 알콜 자화균으로서 알려져 있는 효모의 일종인 *Trichosporon brassicae*를 이용하여 알콜센서를 제작한다. 이 효모를 다공성 아세틸 셀룰로이드막에 정착하여 이것을 다시 gas 투과성막으로 피복하여 센서를 제작한다. 이것을 프로셀내에 삽입하여 시스템을 구성했다. 이 센서시스템에 중성액을 연속적으로 이송하여 놓고 이것에 다른 함유시료액을 주입한다. 에탄올은 gas 투과성막을 통해 미생물막에 도달하여 거기서 미생물에 자화되기 때문에 호흡활성을 지표로 에탄올을 계측할 수 있다. 이 센서는 메탄올이나 유기산등에는 응답하지 않고 아주 선택성이 뛰어나다. 한편 메틸알콜 자화균을 이용하면 같은 모양의 device로 메틸알콜센서를 구성할 수 있다.

3) 유기산센서

이미 언급한 *T. brassicae*는 초산도 자화시킨다. 그리고 앞에서 언급한 알콜센서를 이용하여 초산을 계측할 수 있다. 단 수형액의 pH를 초산의 pKa보다 낮게 할 필요가 있다. 이것은 pKa 이상에서는 초산은 ion으로서 존재하기 때문이고 이것으로는 gas 투과성막을 통과할 수 없다. 그리고 pH3인 수형액을 센서시스템에 연속적으로 보내놓고 이것에 초산을 포함하는 시료액을 주입하면 극소전류치가 얻어진다. 이 전류감소량과 초산 농도간에는 직선관계가 있고 이 관계를 이용하여 초산 농도를 신속히 구할 수 있다. 한편 개미산센서는 *Citrobacter freundii*를 이용하여 제작된다. 개미산은 이 균의 하이드로게나제에 의해 수소으로 변환된다. 그리고 *C. freundii*를 우무(agar)등과 같은 고분자 gel matrix내에 포괄고정화하여 이것을 과산화은 cathode, 백금anode, 인산수형액, gas투과성 테프론 막으로 구성된 연료전지형수소전극상에 장착하여 이것을 다시 다공성 테프론 막으로 피복하여 개미산 센서를 제작한다. 이 센서는 개미산을 포함하는 시료액내에 삽입하면 대응하는 전류변화가 얻어진다. 이것은 개미산이 테프론막을

투과하고 *C. freundii*의 히드로게나제로 수소로 변환되고 이것이 연료전지형전극의 백금 anode에서 반응했기 때문이라고 여겨진다. 개미산농도와 얻어진 전류치간에는 직선관계가 있으며 이 관계를 이용하여 개미산을 고감도로 측정할 수 있음을 알아내었다.

4) 아미노산 센서

미생물센서로 각종 아미노산을 계측할 수 있다. 예를 들면 글루타민산을 계측하는 센서는 대장균고정화막과 이산화탄소전극으로 구성할 수 있다(그림 6). 대장균을

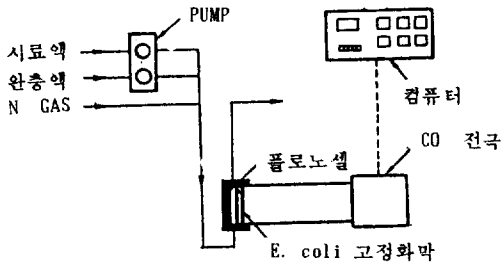


그림 6. 글루타민산 센서

글루타민산 데칼복시라제를 갖고 있으며 글루타민산을 탈탄산하여 낙산과 이산화탄소를 생성한다. 이것을 이산화탄소전극으로 측정한다고 하는 원리에 근거를 두고 있다. 실제로 센서시스템에 시료액을 주입하면 응답을 얻을 수 있고 이 응답량과 글루타민산농도의 대수간에는 직선관계가 있다. 따라서 이 센서시스템으로 글루타민산을 계측할 수 있음을 알아냈다. 또 미생물현탁액과 암모니아전극을 조합한 센서에 의한 L-세리온, L-알기닌, L-아스파라긴산, L-글루타민산등의 계측도 보고되고 있다.

5) 암모니아 센서

이미 암모니아를 계측할 목적으로 암모늄이온 전극이나 암모니아 가스전극이 실용화되고 있지만 potentiometry로 인한 각종 이온이나 휘발성 아민의 영향을 받는 문제가 있다. 그리고 amperometry에 근거를 둔 암모니아 센서의 개발이 행해졌다. 초화균은 암모니아를 초산으로 변화하는 미생물로서 알려져 있으며 이 반응에서 산소가 소비된다. 그리고 초화균고정화막과 탄소전극을 조합하면 amperometric적인 암모니아 센서를 제작할 수 있다. 이 센서의 원리를 그림 7에 나타냈다. 실제로 이 센서시스템에 암모니아를 포함하는 시료액을 주입하면 전류치의 감소가 관측되고 이것을 지표로 하

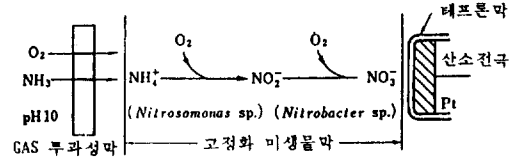


그림 7. 암모니아 센서의 원리

여 암모니아를 측정할 수 있었다. 이 암모니아와 효소를 조합하면 다시 이것의 응용범위가 넓어진다. 즉 기질을 분해하여 암모니아를 생성할 수 있는 효소가 있으면 이것과 암모니아 센서를 조합함으로써 기질을 amperometric적인 측정이 가능하게 된다. 예를 들면 우레아제 고정화막을 이 암모니아에 장착하면 요산을 amperometric로 측정할 수 있다. 즉 우레아제에 의해 요소가 암모니아로 분해되고 이것은 초화균고정화막을 이용한 암모니아 전극으로 측정할 수 있다. 이와같이하여 처음으로 요소를 amperometry로 측정할 수 있다. 마찬가지로 클레아티닌 디아미나제를 이용하면 간기능검사를 위해 중요한 클레아티닌의 측정이 가능해진다. 클레아티닌 디아미나제는 클레아티닌을 가수분해하고 N-메틸리단트인과 암모니아를 생성한다. 따라서 이 효소를 고정화한 막과 암모니아센서를 조합함으로써 클레아티닌의 amperometric계측이 가능해진다. 이와 같이 효소 고정화막과 초화균고정화막을 이용한 센서는 hybrid형 biosensor라 하고 의료분야에 응용이 기대되고 있다.

6) 발효물질센서

최근 여러가지 물질의 발효성이 문제가 되고 있다. 이들 발효물질의 1차 screening 방법으로 세균을 이용한 돌연변이 유발시험법이 개발되었지만 이 방법은 측정에 시간을 요하고 번잡한 조작을 필요로 하기 때문에 더욱 간편하고 신속한 발효물질의 1차screening방법이 요망되고 있다. 그리고 발효물질의 1차 screening에 미생물센서의 적용을 고려하게 되었다. Bacillus subtilis DNA 수복검손주 및 야생주를 생존상태대로 아세틸 셀룰로이드 필터에 흡착고정화하고 이것을 각각 2분의 산소전극의 테프론막상에 장착한다. 이 센서시스템을 그림 8에 나타냈다. 이 센서시스템에 AF 22-(2-furyl)-3-(5-nitrofuryl) acrylamide, 4 NQO(4-nitroguinoline-N-oxide) 마이트 마이신, 캅탄등의 변이 유기물질을 첨가하면 B. subtilis Rec 전극의 전류치가 변하지 않지만 Rec 전극의 전위치는 점차로 증가한다.

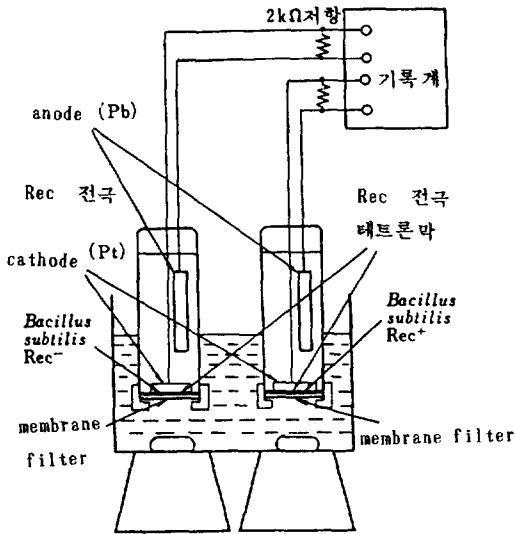


그림 8. 발효물질 센서

이것은 *B. subtilis*의 DNA가, 변이유기물질의 작용을 받아 Rec 균은 DNA의 수복능력이 없기 때문에 전류치가 증가한다고 생각할 수 있다. 이와같이 변이유기물

질의 작용이 있는 화학물질은 Rec 전극에서 1차적으로 screening 할 수 있다.

5. 결 론

바이오센서란 정확히 정의하기 어려운 용어이지만 현재까지는 아마도 생물적인 매개체로 요구되는 analyte의 현상을 전기적 신호로 변환하는 프로브, 장치 혹은 전극이라 생각된다. 일반적으로 바이오센서는 변환하는 적당한 트랜스듀서에 아주 근접한 상호작용 시스템의 고정된 한 부분으로 이루어졌다. 그러나 당황하리 만큼 바이오시스템 트랜스듀서 조합의 배열은 많고, 또 표 5는 그것들을 트랜스듀서, 측정형태, 잠재적 응용의 형태로 간략화, 이론화(rationalise)했다. 나열한 시스템에 따르면 어떤 형태의 바이오센서 장치가 미래에 대한 확실한 약속을 줄 수 있는지 결론짓기 어렵다. 이온 분리 전극이 특별히 효소와 면역학적 시스템, 화학적으로 민감한 전계효과 트랜지스터와 어울려 쓰일 때 그것은 현재의 극소 전자공학의 응용이 충분히 그런 장치들이 매혹적인 계획을 갖게하는 측정의 신뢰도를 증명한 다 해도, 민감하고 명확한 범주에 놓일 것이다.

표 5. 바이오센서 트랜스듀서의 동작모드 응용

Transducer system	Measurement mode	Typical applications
Ion-selective electrode(ISE)	Potentiometric	Ions in biological media; enzyme electrode; enzyme immunosensors
Gas-sensing electrodes	Potentiometric	Gases; enzyme, organelle, cell or tissue electrodes for substrates and inhibitors; enzyme immunoelectrodes
Field effect transistors (FET)	Potentiometric	Ions; gases; enzyme substrates and immunological analytes pH; enzyme substrates; immunological analytes
Optoelectronic, fibre optic and waveguide devices	Optical	Enzyme substrates; immunological analytes
Thermistors	Calorimetric	Enzyme, organelle, whole cell or tissue sensors for substrates, products and inhibitors; gases, pollutants, antibiotics, vitamins, etc.; immunological analytes
Enzyme electrodes	Amperometric	Enzyme substrates and immunological systems
Conductimeter	Conductance	Enzyme substrates
Piezoelectric crystals	Mass change	Volatile gases and vapours

전류측정계기는 최고의 검출과 명확성을 가지도록 설계될 수 있고 그리 멀지 않은 시기에 소형화될 것이다. 광학장치는 경제성, 신뢰성, 처분 가능성(disposability)에 있어서 유리하고, 또 단백질-단백질 작용을 직접 모니터링 할 수 있는 가능성을 준다. 그러나 개발된 시스템과 상관 없이 바이오센서를 사용하는 잇점이 낮은 감도와 선택성, 비정교함과 비안정성에 의해 위협받지 않는다는 것을 확실히 하는 것은 중요하다. 미래의 바이오센서 연구개발은 이런 문제들을 해결할 수 있을 것이고 완전히 직접화된 상업기기의 시대로 이끌게 될 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Adams, R.P.L.(1980). Cell counting procedures. In : Laboratory Techniques Biochemistry and Molecular Biology(Ed. T.S. Work and R.H. Burdon). Vol. 8, Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam, pp. 103-8.
- 2) Aldridge, C., Jones, P.W., Gibson, S., Lanham, J., Meyer, M., Vannest, R. & Charles, R.(1977). Automated microbial detection/identification system. *J. Clin. Microbiol.*, 6, 406-13.
- 3) Anon, (1981c). The impedance screen : An effective tool for the food microbiologist, *Detection Times (Bactomatic Inc.)*, 1(2).
- 4) Cady, P.(1975). Rapid automated bacterial identification by impedance measurements. IN : *New Approaches to the Identification of Microorganisms*(Ed. C.-G. Heden and T. Illeni), Willey Biomedical, New York, pp. 73-99.
- 5) Clarke, D.J., Kell, D.B., Morris, J.G. & Burns, A. (1982). The role of ion-selective electrodes in microbial process control, *Ion Selec. Elec. Rev.*, 4, 75-131.
- 6) Clarke, D.J., Calder, M.R., Carr, R.J.G., Blake-Coleman, B.C. & Moody, S.C. (1985). The development and application of biosensing devices for bioreactor monitoring and control, *Biosensors*(in press).
- 7) Basel, R., Richter, E. & Banwart, G. (1983). Monitoring microbial numbers in food by density centrifugation, *Appl. Env. Microbiol.*, 45, 1156-9.
- 8) Bohren, C.F. & Huffman, D.R.(1983). *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*, Wiley, Chichester.
- 9) Eden, G. & Eden, R.(1984). Enumeration of microorganisms by their dynamic ac conductance patterns, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 31, 193-8.
- 10) Geddes, L.A.(1972). *Electrodes and the Measurement of Bioelectric Events*. Wiley Interscience, New York.
- 11) Harris, C.M., Hitchens, G.D. & Kell, D.B.(1984). Dielectric spectroscopy of microbial membrane systems. In : *Charge and Field Effects in Biosystems* (Ed. M.J. Allen and P.N.R. Usherwood), Abacus Press, Tunbridge Wells, pp. 179-85.
- 12) Ishimori, Y., Karube, I. & Suzuki, S.(1981). Determination of microbial populations with piezoelectric membranes, *Appl. Env. Microbiol.*, 42, 632-7.
- 13) Kell, D.B.(1983). Dielectric properties of bacterial chromatophores, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 11, 405-15.
- 14) Martins, B.B., Hodapp, S., Dufour, S.W. & Kraeger, S.J.(1982). Evaluation of a rapid impedimetric method for determining the keeping quality of milk, *J. Food Prot.*, 45, 1221-6.
- 15) Matsunaga, T., Karube, I. & Suzuki, S.(1980). Electrochemical determinations of cell populations, *Eur.J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 10, 125-32.
- 16) Park, S.H., Hong, K.T., Lee, J.H. & Bac, J.C.(1983). On-line estimation of cell growth for glutamic acid fermentation systems, *Eur.J.Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 168-72.
- 17) Reed, G.(1982). Microbial biomass, Single cell protein and other microbial products. In : *Prescott and Dunn's Industrial Microbiology*, 4th Edn(Ed. G. Reed). Macmillan, London, pp. 541-92.
- 18) Sikyta, B.(1983). *Methods in Industrial Microbiology*, Ellis Horwood, Chichester, p. 300ff.
- 19) Tilton, R.C.(Ed.) (1982a). *Rapid Methods and Automation in Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington.

20) White, D.C.(1983). Analysis of microorganisms in terms of quantity and activity in natural environments. In : Microbes in Their Natural Environments, Society for General Microbiology, Symp.

34.(Ed. J.H. Slater, R. Whittenbury and J.W.T. Wimpenny). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 37-66.