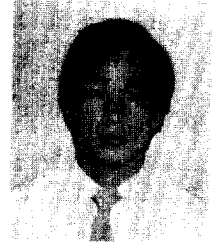


# Biosensor의 환경과학분야 활용



두산연구소 책임연구원 박 경 호

## 1. 서 론

최근 환경오염 증대의 문제가 급작히 대두되고 있다. 즉 우리의 생활환경인 자연생태계의 평형유지가 문제시되고 있는 가운데, 대기 및 수질, 토양, 해양 등을 오염시키는 원인물질과 오염의 정도를 정확하고 신속하게 분석, 측정하는 것은 매우 중요한 일이 아닐 수 없다.

기존의 분석방법이나 측정장비의 일부도 최근 biotechnology 기술을 이용하여 보다 신속, 정확하며 간편하게 측정하기 위한 연구로 진행되어 일부는 실용화되고 있다. 여기서는 환경분야에 관련된 biosensor 이용과 연구의 몇 가지 예를 들어보기로 한다.

## 2. 환경분야의 Biosensor

### (1) Gas sensor

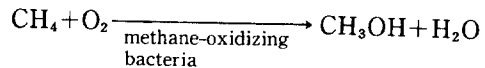
$\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  등의 gas를 대상으로 주로 연구가 되고 있다(1-4). 일반적으로 호기성 미생물과  $\text{O}_2$  electrode를 이용하여 측정하는 원리는 Fig.1과 같다.

호기성 미생물을 acetylcellulose 막이나 적절한 membrane을 선택하여 전극위에 씌운다. Cathode 표면을 산소투과성의 Teflon 막으로 덮고 Pt cathode와 Pb anode를 알칼리액에 담가 사용한다.  $\text{O}_2$ 는 cathode 표면에서 환원되고, 이 때 흐르는 cathode 전류와 Teflon 막을 통해 확산되어 들어오는  $\text{O}_2$  양은 비례관계가 있다. 전극을 완충액에 담그고 aeration하여 산소로 포화시킨다.  $\text{O}_2$ 는 고정화 미생물막을 통해 확산되고 일부는 미생

물의 호흡에 의해 소비되고 나머지  $\text{O}_2$ 는 Teflon 막을 통하여  $\text{O}_2$  electrode에 도달하면 steady state에서 cathode 전류가 흐른다. 이번에는 유기물이 포함된 시료를 완충액속에 주입하면 고정화 미생물은 유기물과  $\text{O}_2$ 를 이용하면서 미생물 호흡이 활발해지고  $\text{O}_2$  electrode에 도달되는  $\text{O}_2$  양은 감소되어 상대적으로 cathode 전류가 감소된다. 이 전류차이(current decrease)로부터 유기물의 농도를 측정할 수 있다.

#### ① $\text{CH}_4$ sensor (2)

Methane을 carbon 및 energy source로 산화시키는 *Methylomonas flagellata*를 사용하여 Fig.2와 같이 2개의 reactor system으로하여 2개의 Pt cathode와 Pb anode로 이루어진  $\text{O}_2$  electrode 사이에 발생하는 전류차이가 methane의 농도에 비례하는 원리를 이용하였다. Response time은 1분 이내며 2분 이내로 분석이 가능하다(Fig.3).



#### ② $\text{NH}_3$ sensor (3)

발효공장에서 나온 activated sludge에서 분리한 *Nitrosomonas europaea*의 배양액을 다공성의 acethylcellulose membrane에 여과하여 고정화시키고 teflon membrane 사이에 Fig.4와 같이 entrapping하여 flow cell에서(Fig.5)  $\text{O}_2$  electrode(Pt cathode, Al anode)를 사용, 폐수 중의 ammonia 농도를 측정하였다.

$$2\text{NH}_3 + 3\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Nitrosomonas sp.}} 2\text{HNO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$$

소비된  $\text{O}_2$ 에 대한 전류차이를 calibration curve(Fig.6)에 의해 ammonia 농도를 구할 수 있다.

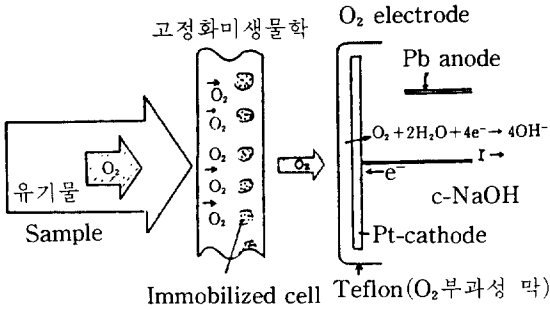


Fig. 1. 호기성 미생물을 biosensor 의 원리

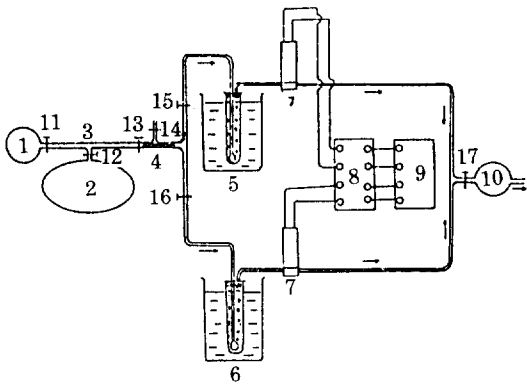


Fig. 2. Scheme of microbial sensor system for methane. 1, vacuum pump; 2, sample gas bag; 3, gas sample line; 4, cotton filter; 5, control reactor; 6, methane-oxidizing bacteria reactor; 7, oxygen electrode; 8, amplifier; 9, recorder; 10, vacuum pump; 11-17, glass stopcocks.

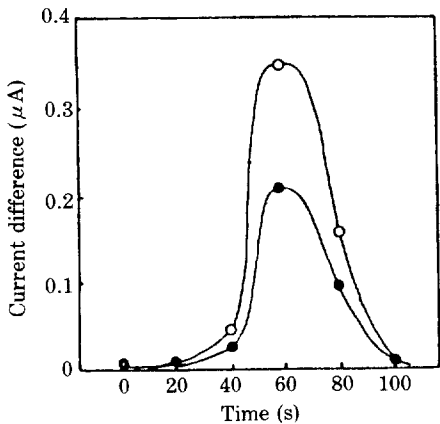


Fig. 3. Response curves of the microbial sensor for methane. The sample gas was transferred into the gas sampler at time 0: (○) 0.66 mM; (●) 0.39 mM methane. Conditions as in Experimental; 300 mg of wet cells per reactor.

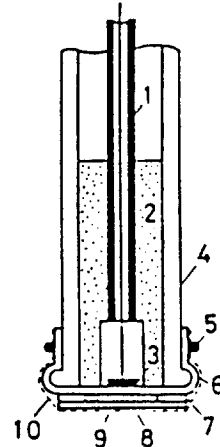


Fig. 4. Scheme of the microbial electrode for ammonia determination. (1) Aluminum anode, (2) electrolyte, (3) platinum cathode, (4) insulator, (5) rubber ring, (6) Teflon membrane, (7) vinyl patch (spacer), (8) immobilized microorganisms, (9) acetylcellulose membrane, (10) nylon net.

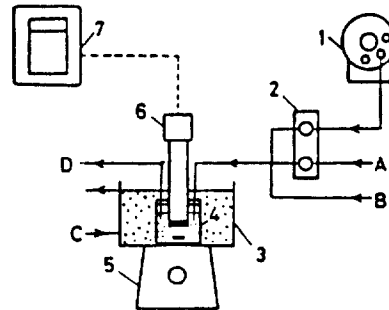


Fig. 5. Schematic diagram of the sensor system. (1) Sampler, (2) peristaltic pump (3) water jacket, (4) flow cell, (5) magnetic stirrer, (6) microbial electrode, (7) recorder. (A) Buffer solution (3.9 ml/min), (B) air (250 ml/min). (C) hot water (30°C), (D) waste

Ammonia 의 최소측정농도는 0.05 mg/l 이고 conventional method (distillation acidimetry) 와의 relative difference 는 ±6% 이었다 전류감소가 steady state 까지 도달되는 response time 은 8분이었고 이 biosensor 는 2주일간 1,400 assay 가 가능하다. 최근에는 response time 이 4분 안에 측정가능한 보고 (5) 도 있다.

③ NO<sub>2</sub> sensor (4)

NO<sub>x</sub> 중에서 대기오염에 제일 영향을 주는 NO<sub>2</sub> 는 적갈색의 자극성 냄새가 있는 유독한 기체이며

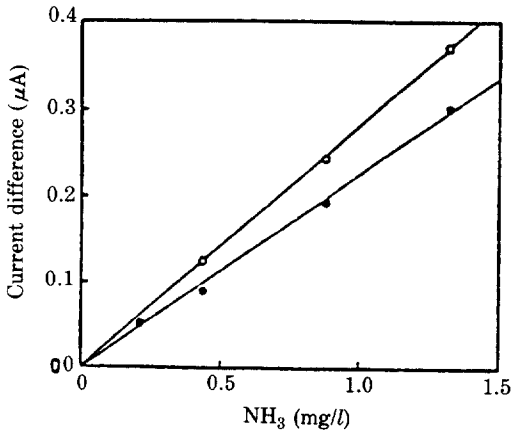


Fig. 6. Calibration curves of the microbial electrode. The determination was carried out by the steady-state method (○) and by the pulse method (●).

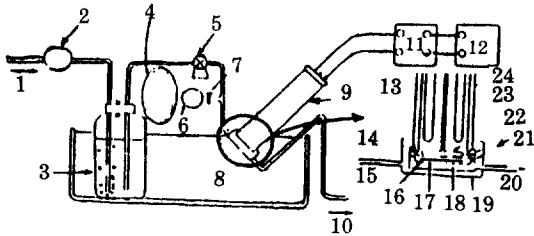
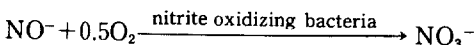
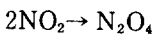


Fig. 7. Schematic diagram of the sensor system; (1) air (280 ml/min), (2) pump, (3) buffer (pH 2.0), (4) sample gas (5 l), (5) peristaltic pump, (6) pump, (7) valve, (8) incubator (30°C), (9) microbial electrode, (10) waste, (11) amplifier, (12) recorder, (13) electrolyte (30% sodium hydroxide), (14) Teflon membrane, (15) buffer (pH 2.0) containing NO<sub>2</sub> gas, (16) immobilized whole cells, (17) gas permeable membrane, (18) cell space (1.0 ml), (19) Teflon cup, (20) waste, (21) rubber rings, (22) platinum cathode, (23) lead anode and (24) insulator.

산성비의 생성과 oxidant 생성에도 주요 원인물질이 된다. NO<sub>2</sub> 정량에는 spectrophotometer에 의한 방법이 있으나 샘플의 탁도, color, 금속이온에 영향을 받고 반응시간이 긴 단점이 있다.



상기 반응에서 nitrite 산화세균에 의한 O<sub>2</sub>의 소비를 Fig.7과 같은 sensor system으로 O<sub>2</sub>

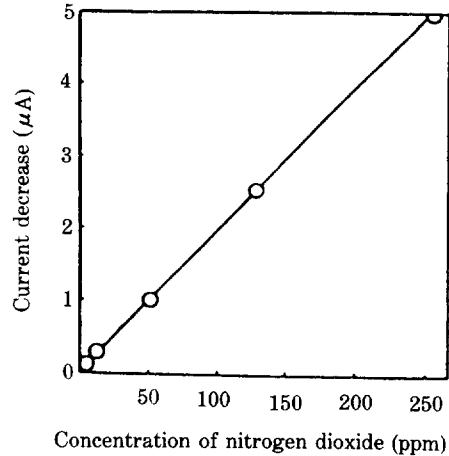


Fig. 8. Calibration curve for nitrogen dioxide sensor

electrode에 의해 측정한다. 세균배양액을 다공성의 acetylcellulose membrane (0.45 μm, pore size)으로 여과, 고정화 후 이 고정화 미생물막 양면에 teflon membrane과 gas permeable membrane을 장치한다. 용존산소로 포화된 완충액을 flow cell에 넣고 전류가 steady state로 될 때 샘플가스(NO<sub>2</sub>)를 injection하면 미생물에 의해 산소소비가 되고 membrane 주변에 용존산소가 감소함과 동시에 steady state가 될 때까지 전류 감소가 일어난다. 초기와 steady state 사이의 전류감소와 NO<sub>2</sub> 농도 사이에 Fig.8와 같이 직선관계가 된다. Response time은 3분 이내에 가능하고 NO<sub>2</sub>의 기존 측정방법인 saltzman 법과는 Fig.9와 같이 correlation coefficient 0.99의 직선관계가 된다.

이밖에 이와 같은 원리를 이용하여 CO, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S 등의 gas 농도를 측정할 수 있다. Biosensor type이 아닌 기존의 gas 분석장비를 살펴보면(6) NDIR(Non Dispersion Infra Red)법에 의한 SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, CO gas 분석은 gas에 따라 적외선에 대한 최대 gas 흡수파장이 각기 다른 원리를 이용한 것이다. 그리고 정전위전해방식(定電位電解方式)은 가스투과성 격막을 통하여 SO<sub>2</sub> gas를 전해질용액에 흡수시켜 전기화학적 반응을 이용하여 농도를 구하는 방식이다. 용액전도율(電導率)법에 의한 NH<sub>3</sub> 측정, 가열시료채취관을 통하여 흡인한 시료gas와 흡수액을 일정비율

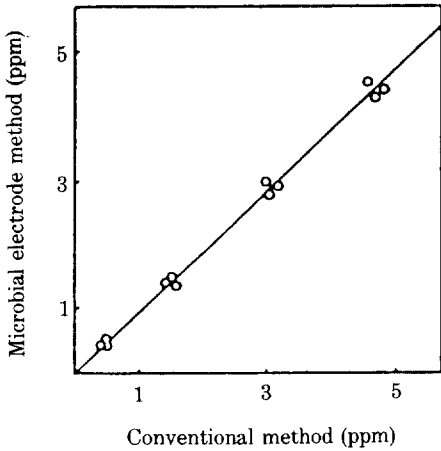


Fig. 9. Comparison of electrochemical and conventional methods.

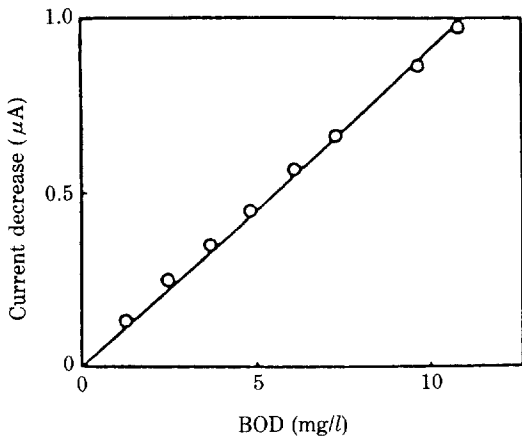


Fig. 10. Correlation between current decrease and BOD value. The measurements were attempted at pH 7.0, 50°C.

로 반응시켜 排ガスを 흡수시킨 후 흡수 전후의 전도율 변화를 측정하는 방법으로서 전도율 변화는 시료가스 중의 NH<sub>3</sub>농도와 비례하는 원리를 이용한 것이다. 또한 UV fluorescence 를 이용한 SO<sub>2</sub> analyzer, chemiluminescence 를 이용한 NO<sub>x</sub> analyzer 등의 분석장비는 PPb 단위의 gas 농도를 digital로 빠른 시간내에 측정이 가능하다. 그러나 미생물을 이용한 biosensor는 대상물질과 specific하게 반응하므로 비교적 다른 물질과의 간섭이나 방해를 피할 수 있고, 좀더 빠른 시간내에 측정이 가능한 경우가 있다.

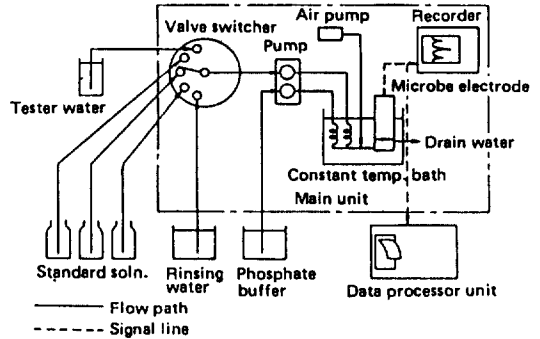


Fig. 11. Benchtop model

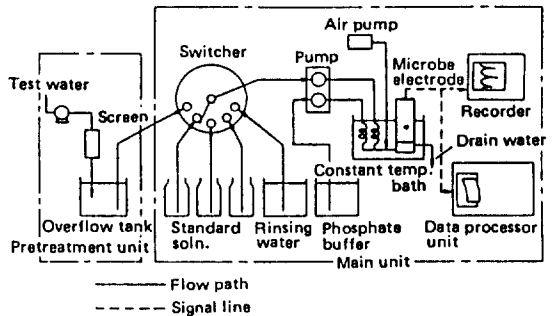


Fig. 12. Field installation model

### (2) 수질 관련 BOD sensor

최근 공장폐수, 생활하수, 농축산폐수 등이 상수원(上水源) 오염에 대한 위협을 더해가고 있다. 현재 수질환경 기준항목인 BOD 측정은 5일간이 소요되나 biosensor를 이용하면 짧은 시간안에 측정이 가능하다. Thermophilic bacteria를 이용한 경우(7)를 보면 배양균체를 nitrocellulose membrane filter에 흡착시키고 gas permeable teflon membrane과 dialysis membrane 사이에 위치하도록 하였다. 표준 BOD 용액으로는 150 mg/l glucose와 150 mg/l glutamic acid를, 전극은 O<sub>2</sub> electrode를 사용하고 steady state current는 7분 후에 관찰되어 response time으로 하였다. Fig.10은 standard BOD 용액을 사용한 BOD 값과 current decrease가 직선관계가 되어 샘플에서 얻어진 current decrease로부터 BOD 값을 구할 수 있다. Sensor의 stability는 약 40일 정도 유지하였다. 현재 제품화된 BOD biosensor의 측정시간은 20~40분으로 system의 구조는 Fig.11, 12와 같다.

(3) 유독물질

토양이나 공기, 물 중에 오염된 다성분계 중의 특정한 극미량의 유독물질 중 최근 저분자 유기화합물 분석은 항체를 이용한 면역적 분석을 이용하여 연구(8-10)되고 있다. 항체에 저분자항원(haptan)이 결합하면 그 형광강도가 감소한다(Fig.13).

이 현상은 Trp, Tyr, residue 등이 흡수한 에너지가, 결합한 haptan 으로 이행(移行)되었기 때문에 일어나는 것으로 추정되고 형광강도의 감소율은 가한 항체량과 일정범위에서 비례관계가 성립하므로 시료의 형광감소율을 측정하면 시료의 정

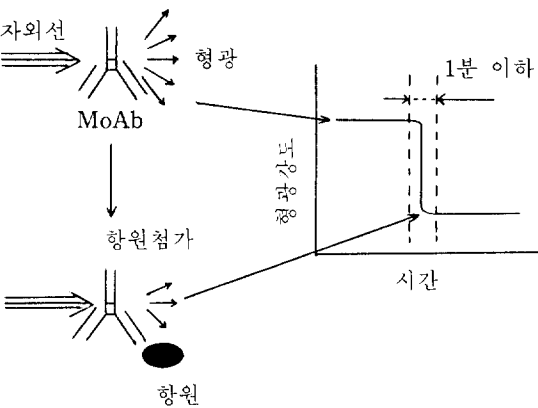


Fig. 13. 형광법의 원리

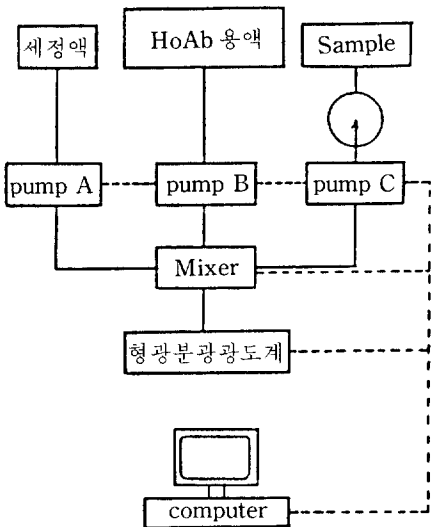


Fig. 14. 형광법에 의한 연속측정장치의 구성도

량이 가능하다. TNT(Trinitrotoluene)을 flow injection 방식으로 연속측정장치(Fig.14)를 사용하여  $10^{-9}$  g/ml 수준의 농도를 약 30초안에 분석(8)할 수 있다. 이 장치는 electrode type은 아니지만 항후 대기 및 물 중의 공해 유기물질의 신속한 분석이 가능하리라고 본다. Toxic 물질인 digoxin을 HRP로 labelling 한 digoxin에 대한 항체를 사용하여 CO<sub>2</sub> electrode로 PIMIA법(potentiometric ionophore modulation immunoassay)에 의해 pico-mol 단위로 측정할 경우(Fig.15, 16) (9, 10)도 있으나 의외로 임상분야

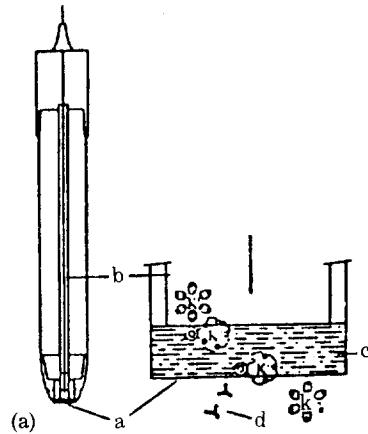


Fig. 15. (a) PVC membrane containing digoxin-ionophore conjugate. (b) 10 mM KCl solution. (c) Plasticizer. (d) Digoxin antibodies.

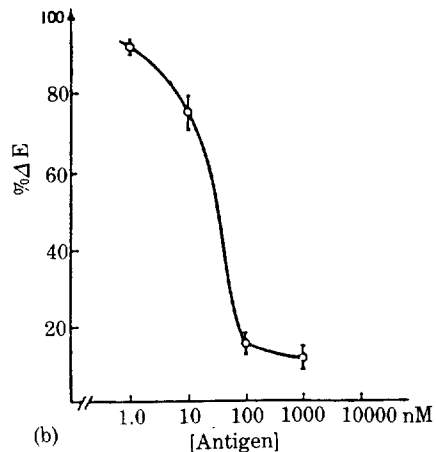


Fig. 16. (b) Competitive binding curve for digoxin working at a constant antibody concentration

를 제외하곤 환경분야에의 유독물질을 bio-electrode type 으로 측정하는 연구는 이제 시작단계이지만, immuno-biosensor 의 potential 은 상당히 크다고 볼 수 있다.

### 3. 전 망

환경오염의 원인이 되는 물질과 지표물 기준 분석방법 및 장비와 병행하여, 생물소재의 고유한 특성을 이용하여 특이적으로 신속, 정확하게 측정하기 위한 연구와 분석장비의 개발도 중요하다고 볼 수 있다. 특히 환경분야의 biosensor 는 이동 및 현장측정의 경우가 많아 의료분야와 마찬가지로 소형화가 필요하므로 FET-based biosensor 의 개발이 중요하며 다종류의 성분을 동시에 측정할 수 있는 집적화 및 다기능화도 가능하다. Enzyme 과 미생물의 whole cell 뿐 아니라 식물, 동물의 조직, organelle 등의 생물소재도 다양하게 목적에 따라 이용할 수 있다. 특히 immunology 를 이용한 농약 등의 유독물질 측정에 관한 연구가 활발해질 것으로 전망되며, electrode type 혹은 ISFET 등의 극소형으로 편하게 오염물질을 측정할 수 있을 것이다. 결국 환경에

대한 지표물 단시간 내에 monitoring 하는 것은 system control 및 정책수립과 연결될 수 있으며, 미생물학, 생물학, 전기화학, 전자공학, membrane technology, 고분자 등 여러 기술들이 matrix 로 유기적으로 연결되어야만 biosensor 의 개발은 가능할 것이다.

### 참고문헌

1. Karube, I., *et al.*, Biosensors 21 Oxford Univ. Press. 1987.
2. Karube, I., *et al.*, Analytica Chimica Acta 61, 1982.
3. Hikuma, M., *et al.*, Anal. Chem. 52, 1980.
4. Okada, T., *et al.*, Biotech. & Bioeng., 1641, 1983.
5. Karube, I., *et al.*, Anal. Chem. 53, 1852 1981.
- 6.
7. Karube, I., *et al.*, Anal. Letts. 22(4), 791 1989.
8. Mitsumata, T., *et al.*, Bioindustry 6(6), 407 1989.
9. Keating, M.Y., *et al.*, Anal. Chem. 56, 801 1984.
10. Keating, M.Y., *et al.*, Anal. Letts. 18, 1 1985.