

*S. cerevisiae*를 이용한 시안센서의 개발

김 중 민 · 이 현 우 · 김 광 · †장 상 목 · *장 용 근
동아대학교 화학공학과, *한국과학기술원 화학공학과

Development of Cyanide Sensor Using *S. cerevisiae*

Jong Min Kim, Hyun Woo Lee, Kwang Kim, Sang Mok Chang[†], and Yong Keun Chang^{*}

Department of Chemical Engineering, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

^{*}Department of Chemical Engineering, KAIST, Taejon 305-701, Korea

ABSTRACT

Two types of cyanide sensor system were constructed for monitoring river water simply. One is membrane type flow system composed of *S. cerevisiae* coated membrane and oxygen electrode, the other is reactor type flow system composed of *S. cerevisiae* immobilized reactor and two oxygen electrode. *S. cerevisiae* and oxygen electrode were used for detecting cyanide compounds. These sensors are based on the inhibition of cyanides on the respiration activity of *S. cerevisiae*. Membrane type sensor system could detect cyanides ranging 0.10~1.00ppm, and the respiration activity of *S. cerevisiae* continued for a day. Reactor type sensor system composed of immobilized chitopearl HP-5020 with *S. cerevisiae* could detect cyanides in the range of 0.10~1.00ppm, and maintained 90% respiration activity for sixteen days. It was found that the optimum reactor size exist for the reactor type biosensor when respiring activity inhibition is used for detection of cyanides.

서 론

급격한 산업화에 따른 환경오염, 환경과피로 환경에 대한 관심이 높아지고 있으며 환경오염의 원인이 되는 화학물질의 계측이 중요한 연구과제로 주목받고 있다. 다양한 환경계측에는 각종 물리, 화학적 계측기술이 이용되고 있으나 기존의 기기분석법은 장치가 크고 값비싼 분석기와 복잡한 조작이 필요하다는 등의 문제점을 지니고 있다. 따라서 간단히 계측 가능한 소형 센서소자의 개발이 절실히 요망되고 있는 실정이다(1, 2).

하천을 오염시키는 물질에는 도금공장에서 유출되

는 시안화물, 생활폐수, 각종 공장에서 배출되는 중금속 등이 있다. 특히 시안화 칼륨과 시안화 나트륨 등의 시안화물은 맹독성이 있어 시안화물의 하천유입은 심각한 문제를 야기한다. 따라서 시안화물이 함유되어 있는 폐액이 하천에 유입되는 것을 방지하기 위하여 시안화물을 신속하게 검출하는 간단한 센서 시스템의 개발이 강력히 요망되고 있다(3, 4).

근래 생물공학의 발달에 힘입어 효소, 미생물 등의 생체소자의 분리 정제가 가능하게 되어 이들 생체소자의 분자 인식능력과 반응의 선택성을 이용한다면 특정 화학물질을 선택적으로 측정할 수 있는 고감도의 간단한 센서의 제작이 가능하게 되었다.

이와 같은 원리에서 1966년 Updike와 Hicks(5)에 의해 포도당 산화효소와 산소전극을 이용한 최초

† Corresponding Author

의 바이오센서인 포도당센서가 개발된 이후, Guilbault, Karube 등의 그룹에 의해 각종 바이오센서가 연구 개발되었으며 지금도 활발히 연구되고 있다(6-10).

환경계측용 바이오 센서의 대표적인 것으로는 BOD 센서, 독극물 센서 등이 알려져 있다(11-14).

시안화합물은 보통 흡광도법으로 측정하지만 복잡한 전처리 과정을 거쳐야 하기 때문에 많은 시간이 소요된다(15-19). 이를 해결하기 위하여 FIA(flow injection analysis) 분석법이 제안 되었으나, 많은 시약과 값비싼 장치가 필요하다는 등의 문제점이 있다(20, 21). 전극표면의 AgI, Ag₂S와 시안과의 반응을 전압변화로 측정하는 시안전극도 개발되었으나, 간섭효과에 의한 신뢰성이 의문시 되고 있다(22).

미생물 기능 중에 호흡활성을 지표로 하는 센서를 호흡활성형 미생물 센서라고 하며, 본 센서의 원리는 Fig. 1과 같다. 호기성의 미생물의 경우, 호흡에 의해 용존산소를 소비하므로 산소전극에 미생물 고정화 막을 부착함으로써 미생물의 호흡활성을 측정할 수 있다. 즉, 유기물이 없는 수용액에 미생물 고정화막을 부착한 산소전극(미생물 센서)을 넣으면 정상전류가 얻어진다. 정상전류가 얻어진 후 수용액에 유기물 표준용액을 주입하면, 미생물의 호흡활성이 활발해져 산소소비가 증가되어 산소량이 감소되고 전류값은 급속하게 감소한다. 이 정상 전류값의 변화와 시료액중의 유기 화합물 농도와와의 상관계수를 이용하면 각종 유기화합물의 농도 측정이

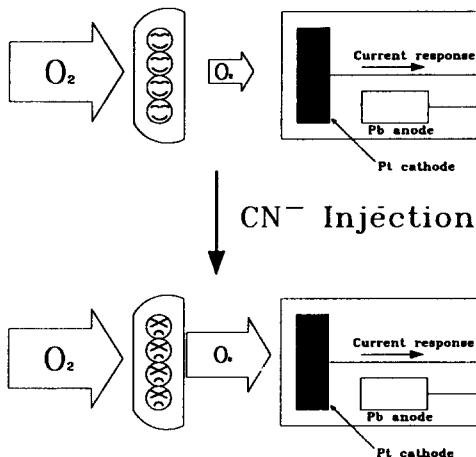


Fig. 1. The principle of microbial cyanide detecting sensor.

가능한 것이다.

시안화합물은 cytochrome c 산화효소와 강하게 결합하여 호흡작용을 저해하며(23) 시안과 같은 독극물을 계속하는 경우에는 독극물에 의하여 호흡활성이 저해되는 원리를 응용한다. 즉 시안을 첨가하면 시안이 미생물의 호흡을 저해하기 때문에 막 상에서 소비되는 산소량이 감소하여 결과적으로 산소전극에 도달하는 산소량이 증가하여 전류값이 증가하게 된다. 이 변화량은 시안농도에 비례하므로 시안농도의 측정이 가능하게 된다. 이와같은 원리를 이용한 몇 가지 시안 계측용 바이오 센서가 보고되고 있으나, 하천에 직접 사용하기에는 미흡한 점이 있었다(24-26).

본 연구에서는 이와 같은 인식과 기존의 연구 결과를 토대로 하여 하천에 직접 사용할 수 있는 시안 센서를 개발하기 위하여 막형 센서와 반응기형 센서를 제작하여 그 특성을 비교하였고, 각종 고정화 방법도 시도하여 보았다.

재료 및 방법

실험재료

Saccharomyces cerevisiae IFO 337(효모), YM 배지, 0.01M Tris-HCl 완충용액, Able(株)의 BO-G 전극, Advantec Toyoco社의 니트로 셀룰로오스 막(pore size 0.45 μ m), 투석막으로 Technicon사의 셀로판지(Part No. 105)를 사용하였다.

고정화방법

100mL YM 배지를 사용하여 *S. cerevisiae*를 30 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후, 배양액을 3000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체를 Tris-HCl 완충용액(0.01M, pH 8.0)으로 2회 세척한 후 얻어진 균체 현탁액 1mL를 셀룰로오스막에 흡인여과하여 균을 부착시켜 고정화 미생물막으로 사용하였다. 이 고정화 미생물막을 Fig. 2와 같이 투석막으로 싸서 산소전극의 끝부분을 O-Ring으로 고정시켜 미생물 센서를 제작하였다.

막형 시안센서 시스템의 구성

막형 시안센서 시스템의 장치도는 Fig. 3에 나타내었다. 여기서 사각형 영역은 반응기형 시스템에서만 사용하였고 막형시스템에서는 하나의 산소전극만 사용하였다. Fig. 2와 같이 제작한 미생물전극에 10k Ω 의 저항을 병렬로 접속하여, *S. cerevisiae*의 호

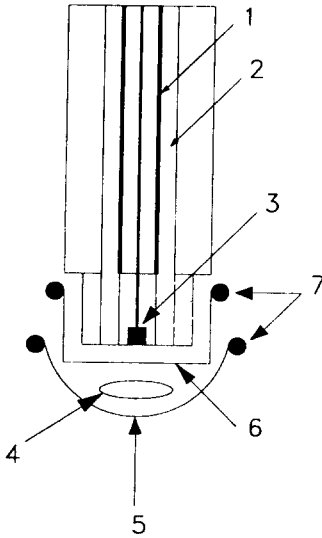


Fig. 2. Membrane type cyanide sensor using oxygen electrode(1: Pb anode, 2: electrolyte solution, 3: Pt cathode, 4: immobilized membrane with *S. cerevisiae*, 5: dialysis membrane, 6: gas permeable teflon membrane, 7: O-ring).

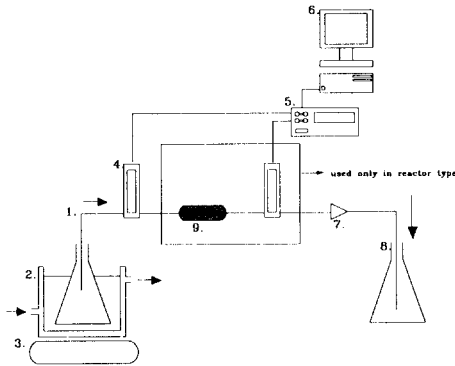


Fig. 3. Experimental setup for membrane type and reactor type cyanide sensor[(1: sample, 2: thermostated batch, 3: magnetic stirrer, 4: oxygen electrode, 5: digital voltameter, 6: computer, 7: pump, 8: waste, 9: immobilized beads(reactor type)].

흡활성 변화에 따른 전류 변화를 전압변화로 측정하였다. 시스템은 산소전극(DO7532-3F, DKK Corp.), digital voltameter(R6452A, Advantest

Co.), 컴퓨터(PC9801, NEC Co.), 연동펌프(Gilson社 MINIPULS 3), 실리콘 튜브(내부직경 2mm, 외부직경 4mm)으로 구성되었다.

연동펌프를 사용하여 일정한 유속으로 시료를 흘러 보내면서 미생물 센서를 통하여 *S. cerevisiae*에 의한 산소소비량이 일정하게 되면 시료용액에 시안 표준액을 첨가하여 그때의 산소소비량의 변화를 산소전극에서 얻어진 전류값의 변화로 측정하였다.

시안에 대한 검량선의 작성 및 안정성의 검토

최적 응답조건을 구하여 이 조건에서 *S. cerevisiae*의 호흡을 활성화시켜 센서가 정상전류를 나타낸 후, 시안이온농도 0~1.00ppm의 시안화 칼륨을 첨가하여 그때의 호흡활성의 저해를 전류값 변화로부터 측정하였다. 그리고 전극 장착형 센서의 안정성을 살펴 보기 위하여 하루간격으로 1.0ppm 농도의 시안을 함유한 시료용액을 흘려서 센서의 전류값 변화를 살펴 보았으며 시안의 계측을 하지 않을 때는 전극을 0.01M Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 넣어 4℃에서 보존하였다.

반응기형 시안센서

실험재료

사용한 시약, 균주, 배지 그리고 산소전극은 막형 시안센서와 동일하다. 고정화용 담체로는 Na-Alginate, 글래스 비드 그리고 비드 형태로 시판되는 Fujibo의 키토-펄(chitopearl) HP-2520, HP-3020, HP-3520, HP-5020을 사용하였다. Fig. 4에 키토-펄의 화학구조식을 나타내었다.

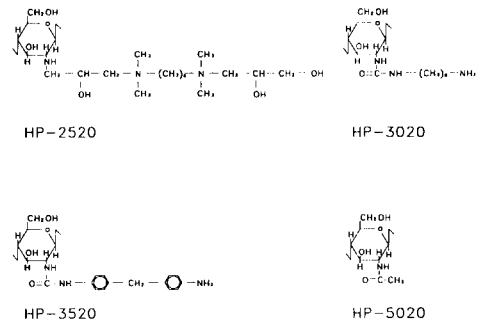


Fig. 4. The chemical structure of chitopearl carrier.

Na-Alginate를 이용한 고정화

막형 시안센서와 동일하게 250mL 삼각플라스크를 사용하여 *S. cerevisiae*를 100mL 배양한 후, 배지를 원심분리하여 균을 회수하고 회수한 균을 Tris-HCl 완충용액(0.01M, pH 8.0)으로 2회 세척하였다. 세척후 얻어진 균체에 1% Na-Alginate 20mL를 넣고 잘 흔들어 준 다음 저온에서 교반중인 0.05M 염화칼슘용액에 주사기 바늘을 이용하여 방울로 떨어뜨려 균을 고정화하였다.

글래스 비드를 이용한 고정화

S. cerevisiae 배양액에 다공성 글래스 비드(particle diameter 0.4~1.0mm, pore size 120 μ m) 20mL를 첨가하여 플라스크의 바닥에 글래스 비드가 일정하게 퍼진 상태로 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 보관하여 균을 흡착 고정화시켰다.

키토-펄을 이용한 고정화

키토-펄(particle diameter 2.0mm, pore size 50 μ m)을 반응기에 넣고 수분을 아스피레이트로 제거한 후, 배지를 넣어 autoclave로 멸균시켰다. 이 배지에 *S. cerevisiae*를 접종하여 24시간 이상 회분배양시켜 *S. cerevisiae*가 키토-펄 담체의 공극안에서 포화되게 하여 고정화 비드로 사용하였다.

반응기형 시안센서 시스템의 구성

반응기형 시안센서 시스템의 장치도를 Fig. 3에 나타내었다. 시안의 측정방법은 막형 시안센서와 동일하고 센서의 구성도 거의 동일하지만 전극의 끝부분에 고정화 미생물막을 사용하는 것이 아니라 고정화 균이 반응기형태로 독립되어 설치되어 있다. 반응기는 두 가지(30mL, 45mL) 크기로 아크릴 수지를 사용하여 제작하였다. 이와 같은 반응기형태로 구성하는 것은 막형 시안센서에 비하여 보다 많은 양의 *S. cerevisiae*를 고정화할 수 있고, 센서의 안정성을 향상시킬 수 있기 때문이다.

반응기형 시안센서를 이용한 시안계측 및 센서의 최적화

최적 응답조건을 구하여 최적조건에서 *S. cerevisiae*의 호흡을 활성화시켜 정상전류에 도달한 후, 막형 시안센서와 동일하게 0~1.00ppm의 시안화 칼륨을 첨가하여 그때의 호흡활성의 저해를 전류값 변화로부터 측정하였다. 또한 반응기형 시안센서의 안정성을 검토하기 위하여 2일 간격으로 1.00ppm의 시

안용액을 흐르게 하여 응답값의 변화를 살펴보고 반응기형 시안센서의 안정성에 대하여 검토하였다. 시안 계측을 하지 않을 때는 막형 시안센서와 마찬가지로 0.01M Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 보존하였다.

실험결과 및 고찰

막형센서의 응답과 호흡활성

균체농도 6.85×10^8 (c.f.u/mL)의 *S. cerevisiae* 1mL를 니트로 셀룰로오스막에 고정화시켜 시안센서를 제작하였다. 온도 30 $^{\circ}$ C에서 글루코스 농도 150mg/L의 표준시료 용액을 0.5mL/min의 속도로 흐르게 하여 전압이 정상상태에 도달하면 표준 시안화 칼륨 용액을 주입하여 가면서 본 센서시스템의 시안에 대한 응답을 계측하였다.

Fig. 5(a)는 시안이온농도를 0.1ppm씩 단계적으로 주입시켰을 때의 센서의 전형적인 응답곡선을 나타낸 것이다. 위의 화살표는 글루코스 표준용액을

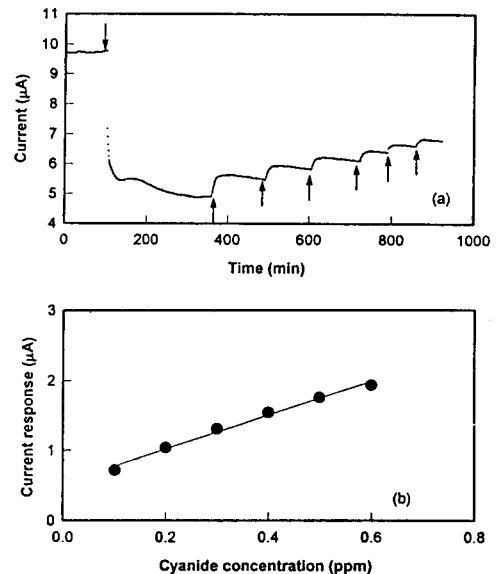


Fig. 5. (a) Typical response of the membrane type cyanide sensor to step change of cyanide concentration (\downarrow : glucose standard solution[150mg/dL] injection, \uparrow : cyanide solution(0.1ppm) injection), (b) The correlation between cyanide concentration and current response for membrane type cyanide sensor.

150mg/dL 주입한 것을 표시하고 있다. 그림에서 첨가한 시안농도에 비례하여 전류값이 증가함을 알 수 있다.

Fig. 5(b)는 막형 시안센서에서 첨가한 시안의 농도와 전류값 변화 사이의 검량선을 나타낸 것이다. 여기서 시안농도와 전류값 변화량 사이에 좋은 선형성이 있음을 알 수 있다.

Fig. 6은 하루 간격으로 1ppm 농도의 시안을 함유한 시료용액을 흐르게 하고 막형 시안센서의 안정성을 살펴본 것이다. 그림에서 하루 지난 후에 *S. cerevisiae* 호흡활성이 90%로 떨어지고 4일 후에는 호흡활성이 없어지는 것을 알 수 있다.

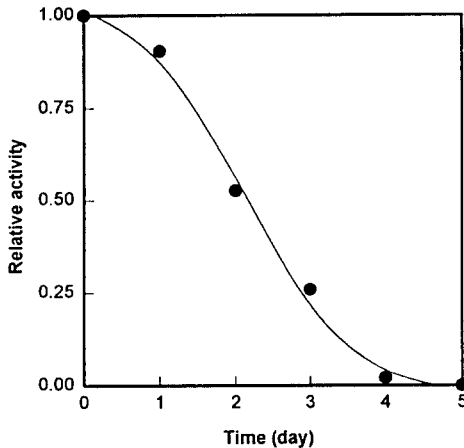


Fig. 6. The stability of membrane type cyanide sensor.

반응기형 시안센서의 응답과 호흡활성

유속은 4.5mL/min, 시료 용액 중의 글루코스 농도는 150mg/L, 온도는 30°C로 하여 시안이온농도 0~1.00ppm의 시안화칼륨을 첨가하여 가면서 호흡활성의 저해를 전류값 변화로부터 측정하였다.

Fig. 7(a)는 시안이온농도를 0.1ppm씩 단계적으로 주입시켰을 때 Na-Alginate로 고정화한 비드를 사용한 반응기형 시안센서의 전형적인 응답곡선을 나타낸 것이다. 첨가한 시안농도에 비례하여 전류값이 상승하나 응답이 다소 불규칙적인 것은 담체의 영향으로 생각된다.

Fig. 7(b)는 시안이온농도를 0.1ppm씩 단계적으로 주입시켰을 때 키토-펄 HP-5020으로 고정화한 반응기형 시안센서의 전형적인 응답곡선을 나타낸 것이다. 여기에서도 첨가한 시안농도에 비례하여 전류값이 상승함을 알 수 있다.

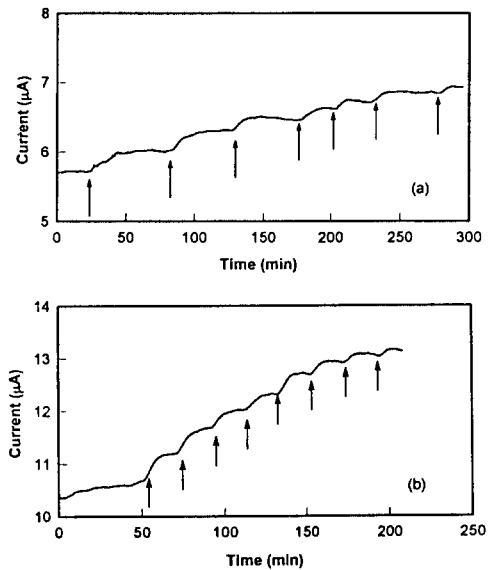


Fig. 7. (a) Typical response of the reactor type cyanide sensor with *S. cerevisiae* immobilized in sodium alginate to step change of cyanide concentration, (b) Typical response of the reactor type cyanide sensor with *S. cerevisiae* immobilized in chitopearl (HP-5020) to step change of cyanide concentration(↑:cyanide solution[0.1ppm] injection).

Fig. 8은 반응기형 시안센서에 2일 간격으로 1ppm 농도의 시안을 함유한 시료용액을 흐르게 하고 응답값의 변화를 통해 반응기형 시안센서의 안정성에 대하여 검토한 결과이다. 여기에서 균체를 고정화한 직후와 비교하여 16일이 지난 후에 90% 이상의 활성을 유지하는 것을 볼 수 있다. 따라서 반응기형 시안센서를 제작함으로써 막형 시안센서와 비교하여 안정성이 향상되며 보다 장시간 사용이 가능함을 알 수 있다.

이 이외에도 반응기 크기와 담체의 종류에 따른 응답의 영향을 검토하였다.

Fig. 9는 반응기 크기의 영향을 나타낸 것으로 반응기 용적이 30mL인 경우가 반응기 용적 45mL인 경우보다 큰 응답을 나타내었다. 반응기 용적 20mL인 경우에도 실험하였으나 안정성에서 문제가 있어 결과를 표시하지 않았다. 일반적으로 호흡 활성 측진을 이용하여 화합물을 측정하는 경우에는 반응기

요 약

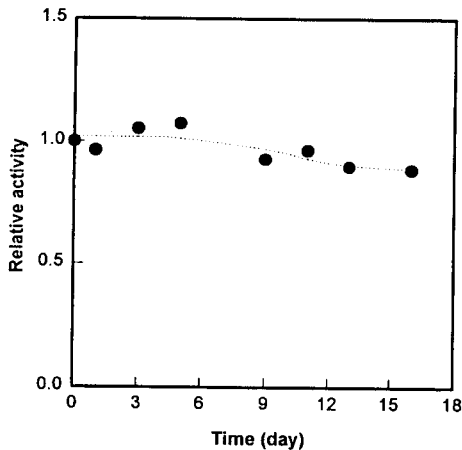


Fig. 8. The stability of reactor type cyanide sensor.

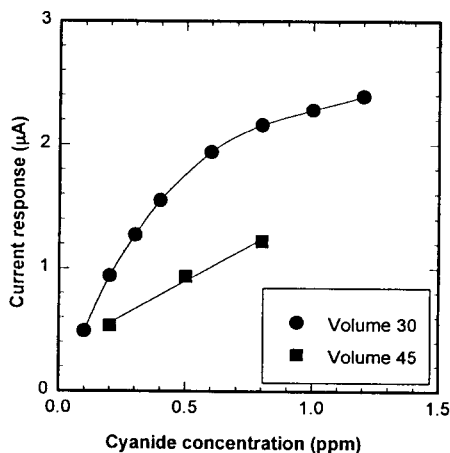


Fig. 9. The effect of reactor size on the response.

체적에 비례하여 응답이 증가하지만 호흡활성 저해를 이용하여 화합물을 측정하는 경우에는 최적 체적이 존재한다고 생각된다.

Na-Alginate와 키토-펄 HP-5020 이외에도 키토-펄 HP-2520, HP-3020, HP-3520과 글래스 비드를 사용하여 고정화하여 실험해 보았으나 시안화물에 대하여 응답하지 않았다. 이것은 키토-펄 HP-2520, HP-3020, HP-3520의 경우 담체 내의 아민기와 아미노기가 시안과 반응하여 응답이 없었다고 생각되며 글래스 비드의 경우에는 흡착이 제대로 되지 않았기 때문으로 생각된다.

간단한 조작으로 시안화물을 신속하게 제측할 수 있는 센서의 개발을 목적으로 하여 미생물과 산소전극을 이용한 시안센서의 개발을 연구하였다.

산소전극에 *S. cerevisiae*를 흡착 고정화한 막을 부착하여 막형 시안센서를 제작하고 시료용액중의 시안이온농도를 0~1.00ppm이 되게 시안을 첨가하면서 전류값 변화를 살펴본 결과 시안농도 0.10~1.00ppm의 범위에서 응답이 확인되었으며 고정화 직후의 호흡활성은 약 하루정도 유지되었다.

*S. cerevisiae*를 고정화한 키토-펄 HP-5020을 사용하여 반응기형 시안센서를 제작하고 막형 시안센서와 동일하게 시안이온농도 0~1.00ppm 용액의 전류값 변화를 살펴본 결과 0.10~1.00ppm의 범위에서 응답이 확인되었으며 고정화 직후 90%의 호흡활성이 16일간 유지되었다.

반응기형 시안센서의 반응기 크기의 영향을 검토한 결과, 반응기의 최적 체적이 존재한다는 사실을 알 수 있었다.

감 사

본 연구는 동아대학교 교내 연구비와 한국과학기술원 생물공정연구센터의 연구비로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. N. Tamazoe(1992), *Chemical Sensor Technology*, 3, 19, Elsevier, Tokyo.
2. 張尙陸 外 5人(1994), *生物反應工學*, 283, 普成文化社.
3. 梁相鉉(1990), *水質工學*, 195, 東和技術.
4. S. R. Wild, T. Rudd, and A. Neller(1994), *Sci. Total Environ.*, 156, 93.
5. S. J. Updike and G. P. Hicks(1967), *Nature*, 214, 986.
6. G. Guilbault and J. H. Lung(1988), *J. Biotechnology*, 9, 1.
7. G. Guilbault(1982), *Anal. Proc.*, 19, 68.
8. H. Muramatsu, E. Tamiya, and I. Karube (1989), *Anal. Chim. Acta.*, 225, 399.
9. S. M. Chang, E. Tamiya, and I. Karube (1991), *Biosensors & Bioelectronics*, 6, 9.

10. N. S. Hobson, I. Tothill, and A. P. F. Tunner (1996), *Biosensors & Bioelectronics*, **11**, 5.
11. I. Karube, S. Mitsuda, T. Matsunaga, and S. Suzuki(1977), *J. Ferment. Technol.*, **55**, 243.
12. M. Uo, M. Numata, M. Suzuki, E. Tamiya, I. Karube, and A. Makishima(1992), *J. Ceram. Soc. Japan*, **100**, 430.
13. Z. Kong, P. A. Vanrolleghem, and W. Verstraete(1993), *Biosens. Bioelectron.*, **8**, 49.
14. F. Mccapra(1987), *Biosensors : Fundamentals and Application*, p. 617, Oxford University Press.
15. E. Asmus and H. Garschagen(1953), *Anal. Chem.*, **138**, 414.
16. J. Epstein(1947), *Anal. Chem.*, **19**, 272.
17. S. Nagashima(1978), *Anal. Chim. Acta.*, **99**, 197.
18. Z. Zhu and Z. Fang(1987), *Anal. Chim. Acta.*, **198**, 29.
19. T. Toida, T. Togawa, S. Tanabe, and T. Imanari(1984), *J. Chromatogr*, **308**, 133.
20. A. Rios, M. D. Luque de Castro, and M. Valcarcel(1984), *Part I Anionic Pollutants. Analyst*, **109**, 1487.
21. A. Tanaka, K. Deguchi, and T. Deguchi (1992), *Anal. Chim. Acta.*, **261**, 281.
22. M. S. Frant, J. W. Ross, and J. H. Riseman (1972), *Anal. Chem.*, **44**, 2227.
23. P. Nicholls(1983), *Trens Biochem. Sci.*, **8**, 353.
24. C. A. Groom and J. H. T.(1991), *J. Biotechnol.*, **21**, 161.
25. B. Mattiasson and K. Mosbach(1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1643.
26. M. H. Smit and A. E. G. Cass(1990), *Anal. Chem.*, **62**, 2429.