

특집 : 미생물 자원을 이용한 신소재 개발 및 응용

미생물 자원을 이용한 Biosensor

양지영^{*} · 정영희

부경대학교 식품공학과

Biosensor Using Microbe Resoures

Ji-Young Yang^{*} and Young-Hee Jung

Dept. of Food Science and Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

서 론

인간은 많은 감각 기관을 가지고 있어서 오감은 물론 아픔이나 온도 등 외부에서 오는 자극을 감지한다. 이렇게 감지된 경험에 의하여 교육된 자극 자료와 비교 처리함으로써 맛이나 향의 변화, 사물의 형상들을 판단할 수 있게 된다. 이러한 기능을 생명체에서는 감각 기관이라 하고 기계나 기구에서는 센서라 한다. 이러한 생물의 기능을 모사(mimesis)하고 응용함으로써 외부로부터 받는 물리, 화학적 자극을 감지할 수 있는 바이오센서를 만들려는 연구가 한창 진행중이다. 바이오센서(biosensor)란 효소, 미생물, 항체, receptor, DNA probe 등의 생체물질(biological component)을 전기적, 물리화학적 소자(transducer)에 결합시키고, 측정대상물질(target analyte)과의 반응으로부터 발생하는 전극활성물질이나 물리적인 변화를 전극에서 전기적인 신호로 감지하여 농도를 측정하는 장치를 말한다. 생물학적인 반응을 일으키는 생체물질과 그 반응에 의한 생물학적인 신호를 전기적인 신호로 바꾸어 주는 역할을 하는 transducer는 바이오센서를 나누는 기준이 되는데, 생체물질에 따라 효소센서, 미생물센서, 면역센서, DNA 센서 등으로 나뉘며, transducer의 원리에 따라 전기화학식(electrochemical), 광학식(optic), 열식(thermal), 압전식(piezoelectric) 등으로 구분된다.

최근 bio-industry 발전의 가속화에 비례해서 생물화학 과정을 계측하는 화학센서가 요망되고 있고, 효소센서는 뛰어난 특성을 갖고 있으며, 의료계측 등의 분야에서도 실용화되고 있다. 그러나 효소는 일반적으로 고가이며 불안정하기 때문에 효소의 기원인 미생물 센서의 분자식별 소자로서 이용할 수 없겠는가를 생각하게 되었다. 미생물은 복합효소계로도 볼 수가 있으므로 미생물 균체 중의

단일 효소에서 모든 생리 기능까지 광범위한 미생물 기능을 센서로 이용할 수 있는 이점이 있다. 여기에서는 미생물을 분자식별에 이용하는 센서, 즉 미생물센서의 원리, 종류와 제조 공정, 환경, 의약, 식품 등의 계측에의 응용에 대해서 기술하였다.

미생물센서의 원리

미생물은 호기성 미생물과 혐기성 미생물로 대별된다. 호기성 미생물은 생육에 산소를 필요로 함으로 이들의 호흡활성에서 생육상태를 추적할 수가 있다. 한편 혐기성 미생물은 효소의 존재가 생육에 맞지 않는 일군의 미생물이지만 생성하는 대사산물을 지표로 그 활동상태를 추적할 수가 있다. 효소는 단일의 반응을 촉매하므로 센서의 분자식별 소자로서 사용될 경우에도 반응의 해석은 단순하며, 측정 대상물질에 대한 선택성이 극히 우수한 센서를 구성할 수가 있기는 하나, 미생물 균체 속에는 여러 종류의 효소가 생명활동의 반응에 관여하고 있으며, 그 반응해석은 대단히 복잡하다. 이것들을 분자식별소자로서 사용했을 경우에는 센서의 선택성을 향상시키기 위해서 소자 측면에서 연구를 해야 한다. 그러나 세포 내의 복합 효소계, 보조효소, energy 생산계 등을 자체 그대로 이용할 수 있는 이점이 있다. 미생물센서는 미생물 고정화막과 전기화학 소자로 구성되어 있는데 여기에서 미생물을 소자화하자면 이들을 고분자나 고분자 gel막 속에 흡착 혹은 세포자체를 고정화한다. 미생물은 생존상태로 센서의 소자로서 쓸 경우가 많으므로 온화한 고정화 방법이 일반적으로 이용이 되고 있다. 이들을 원리적으로 분류하면 미생물의 호흡활성을 지표로 하는 미생물센서(호흡활성 측정형)와 미생물이 대사하는 전극활성물질(전극에 응답 혹은 반

^{*}Corresponding author. E-mail: jyayang@pknu.ac.kr
Phone: 82-51-620-6419, Fax: 82-51-622-9248

응하는 물질)을 지표로 하는 미생물센서(전극활성물질 측정형)로 나눈다. 이들 미생물센서의 원리를 설명하면 호흡 활성 측정형 미생물센서는 미생물 고정화 막과 산소전극 그리고 탄산gas 전극으로 구성이 된다(그림 1). 예로서 생존상태의 미생물을 다공성의 acetylcellulose막 위에 흡착 고정화하고, 이것을 산소전극의 산소 gas 투과성막 상에 장착하면 미생물 sensor를 시제화할 수 있다. 이 미생물 sensor를 유기화합물이 함유된 시료용액 속에 삽입하면 유기화합물이 미생물막에 확산하여 미생물에 의해서 변화된다. 미생물이 유기화합물을 자화(섭취)하면 호흡활성이 왕성해지고 이 호흡변화는 미생물막에 밀착되어 있는 산소전극으로 측정할 수가 있다. 다시 말해서 이 미생물 sensor는 유기물 분해 전후에 있어서의 호흡변화량(산소전극의 전류치의 차이로서 측정)을 지표로 하여 시료용액 중의 유기화합물 농도를 측정할 수 있는 sensor가 된다.

한편 미생물은 유기물을 분해해서 각종의 대사산물을 생성하는데, 이 중에는 전극에 쉽게 반응하거나 혹은 감응하는 물질(전극활성물질)도 들어있다. 거기에서 고정화 미생물과 연료전지형 전극, 이온 선택성 전극 그리고 gas 전극들을 조합해서 전극활성물질 측정형 미생물 sensor를 구성할 수가 있다(그림 2). 예로서 당류와 protein 등을 분해하여 수소를 생성하는 수소 생성균을 고분자 gel막 중에 고정화하고, 이것을 연료 전지형 전극의 anode 위에 장착한다. 여기에서 연료 전지형 전극이란 anode로서 백금전

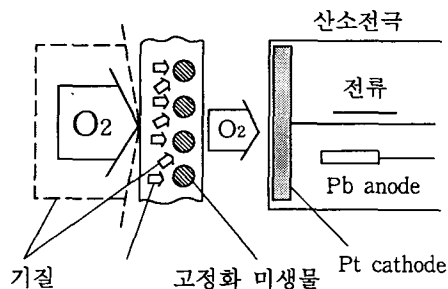


그림 1. 호흡 활성 측정형 미생물 sensor.

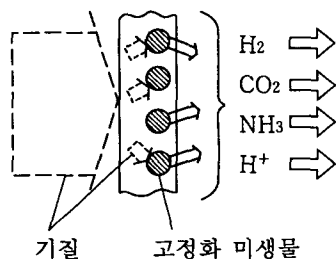


그림 2. 전극 활성 측정형 미생물 sensor.

극, cathode로서 과산화은(Ag_2O_2) 전극 및 전해액으로 인산 완충액(pH 7.0) 등을 쓰는 것으로서 수소 등의 전극활물질이 anode로 반응하면 전류를 얻을 수 있는 일종의 연료전지가 된다.

이 미생물 sensor를 유기화합물을 함유하는 시료용액 중에 삽입하면 유기화합물이 gel막 중에 수소생성균에 확산하고 자화되어 수소가 생성한다. 이 수소는 gel막에 밀착시킨 전극의 anode에 확산하여 anode에서 산화된다. 따라서 얻어지는 전류치는 확산하여온 수소량에 비례하므로 측정대상의 유기화합물 농도를 전류값으로서 측정할 수가 있다.

미생물 sensor의 응용

Bio-industry에 응용

미생물 sensor는 생존상태의 미생물을 쓰고 있으며, 일부는 막 속에서 증식하므로 소자의 수명은 효소 등을 썼을 경우보다 길다. 그러므로 미생물 sensor는 장기간 안정하게 사용할 수가 있으므로 제조공정에 적합하다. Biotechnology의 진전과 더불어 bio-industry의 발전이 예상되며, 이들의 공정을 측정하는 sensor가 절실히 요망되고 있다. 여기에서는 이미 개발되어 있는 미생물 sensor의 bio-process의 응용에 대해서 기술하기로 한다.

A. Glucose sensor

Glucose의 측정은 의료, 식품, 발효 process 등의 분야에서 필요하다. Glucose를 선택적으로 분해하는 미생물을 쓰면 glucose를 측정하는 미생물 sensor를 구성할 수가 있다. *Pseudomonas fluorescens*를 생존상태 그대로 collagen막 속에 포괄 고정화하고, 이것을 산소전극상에 장착하여 glucose sensor를 제작할 수 있다. 이 sensor를 glucose가 함유되어 있는 시료액 속에 삽입하면, glucose가 미생물막에 확산하여 미생물에 의하여 자화된다. 미생물의 호흡활성이 차츰 높아지므로 전극에 확산하는 산소가 감소하고 전류치는 감소하여 정상값을 얻을 수 있다.

B. 초산 sensor

초산은 식품제조 공정이나 발효 공정등에서 측정이 요망되는 산으로서 이것을 on-line으로 측정하기 위해서는 sensor가 필요하다. 예로서 초산은 발효원료(탄소원)로서 이용되고 있으며, 이것의 on-line측정은 발효 process에 극히 중요하다. 효모의 *Trichosporon brassicae*는 초산을 자화하므로 이것을 사용하여 초산 sensor를 제작할 수가 있다. 즉 *T. brassicae*를 다공성 acetylcellulose막 상에 흡착 고정화하여 이것을 산소전극 위에 장착하고 다시 이것을 gas 투과막으로 피복하면 그림 3과 같은 sensor가 완성

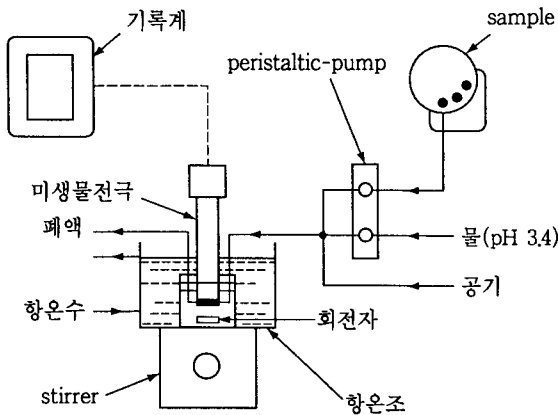
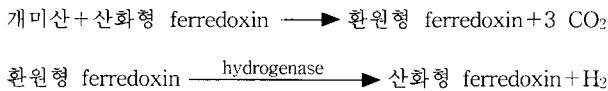


그림 3. 초산 sensor system.

되는 것이다.

C. 개미산 sensor

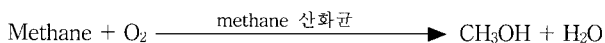
개미산은 생체의 중간 대사산물로서 이것은 보통 gas chromatography로 측정이 가능하나 수소생성균인 *Clostridium butyricum*은 hydrogenase 작용으로 아래와 같이 개미산으로부터 수소를 생성한다.



그러므로 수소생성균 고정화막과 연료전지형 전극을 조합하여 개미산 sensor를 만들 수가 있다.

D. Methane sensor

Methane 발효는 유기폐기물 처리법의 하나로서 이전부터 실용화 된 바 있으나 최근 energy 문제에 관련하여 다시 관심의 대상이 되었으며, methane 생산 system 연구도 더 활발히 진행되었다. 또 methane은 도시 gas의 주성분으로써 연료로 쓰고 있으나, 5~15%가 공기 중에 존재하면 폭발을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있기 때문에 methane은 선택적으로 더욱 신속히 측정할 수 있는 sensor가 여러 분야에서 요망되고 있다. Methane 산화균은 methane을 자화한다는 것으로서 알려졌다.



따라서 methane 산화균을 써서 methane을 측정하는 sensor system을 구성할 수가 있다(그림 4).

E. Glutamic acid sensor

Glutamic acid는 식품첨가물로서 발효 process로 대량으로 생산되고 있으며 glutamic acid를 측정할 수 있는

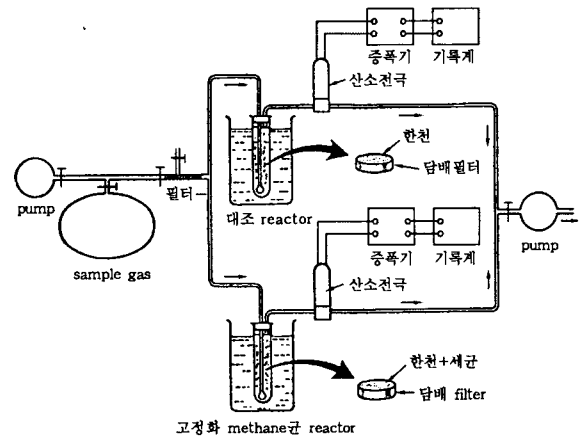
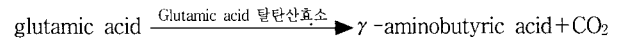


그림 4. Methane gas system.

sensor가 요구되고 있다. L-amino acid oxidase를 쓰는 sensor로 L-glutamic acid을 측정할 수 있는데 이 sensor는 다른 amino acid에도 응답하는 문제가 있으므로 glutamic acid 탈탄산효소를 쓰는 sensor를 착안하게 되었으나, 이 효소는 불안정하여 고정화 후 장기간 활성을 유지하는 것이 곤란하여 이 효소활성을 갖는 대장균을 써서 미생물 sensor를 만들게 되었다. 이 미생물은 혐기적 조건 하에서는 이산화탄소를 생성치 않으므로 이 조건 하에서 생성되는 이산화탄소는 glutamic acid 탈탄산효소에 의해서 생성되는 것이라고 생각된다. 대장균 고정화막을 탄산 gas 전극에 장착하면 glutamic acid sensor를 제작할 수 있다.



F. Cephalosporin sensor

항생물질 중에서 광범위하게 이용되고 있는 cephalosporin은 발효법으로 생산이 되고 있다. 따라서 이 process를 최적화하기 위해서는 cephalosporin sensor가 필요하다. cephalosporinase는 cephalosporin에 작용해서 lactam환을 개환시킨다. 그래서 이 효소활성을 갖고 있는 *Citrobactor freundii*를 collagen막 중에 고정화해서 이것을 roll상으로 하여 충전한 reactor와 복합형 glass 전극을 조합하여 cephalosporin sensor를 제작할 수 있다(그림 5).

G. 자화시험에의 적용

미생물의 자화시험은 미생물을 분류하거나 이용하는 측면에서 극히 중요하나 번잡한 조작과 장시간을 요하는 문제점이 있다. 그러므로 미생물 sensor의 원리를 이용해서 시험균을 다공성 cellulose막 위에 흡착고정화하여 이것을 전극에 장착하고 이 미생물에 각종의 물질을 순차로 이송하여 이들의 자화성을 전극으로 측정한다. 실제로 이 system으로 미생물의 자화성을 신속하게 측정할 수 있었

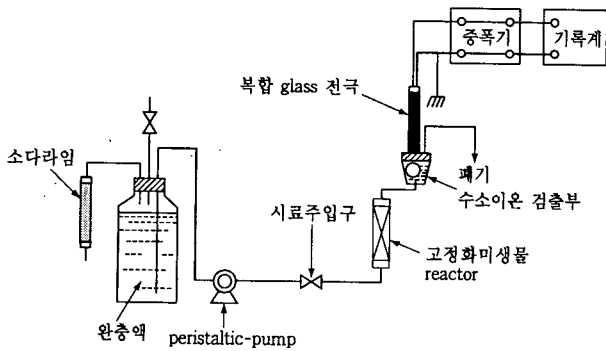


그림 5. Cephalosporin sensor system.

으며, 더구나 이 측정치는 기존방법으로 시행한 자화성 시험과 대체로 일치한다. 그러나 가용성 전분에서와 같이 자화성이 느린 물질에는 적용할 수 없는 것으로 밝혀져 있다.

전기화학적 micro-bioassay

보통 미량의 amino acid, vitamin, 항생물질 등은 micro-bioassay법으로 측정한다. 즉 amino acid나 vitamin을 생육에 요구하는 유산균과 항생물질을 자화하는 세균 등을 써서 이들의 생육을 지표로서 이들 화학물질을 계측하는 방법이다. 그러나 이 방법은 번거로운 조작을 필요로 하며, 보통 수일간을 요하게 되므로 신속하고 또한 간단한 방법이 요구되어 왔다. 여기에서 미생물 sensor의 원리를 이용한 전기화학적 micro-bioassay를 착안할 수 있다.

A. Nystatin의 측정

Polyene계의 항생물질 중에서 실제로 이용되고 있는 것은 nystatin(fungicide)이다. 이것의 bio-assay는 여러 가지 문제가 있는데 이것을 간단하게 측정하는 방법으로서 미생물 sensor를 적용하게 되었는데, nystatin은 세포막에 작용하여 막을 파괴한다고 알려져 있다. 따라서 효모 *Saccharomyces cerevisiae* 고정화막을 산소전극에 장착하여 sensor화하고 이것에 nystatin을 적용하여 이 전극에서 얻어지는 전류값은 막위의 효모수에 비례하고 nystatin의 작용으로 효모가 죽으면 이것을 전류치로 측정할 수 있다는 원리에 기반을 둔다. 이 sensor에 nystatin을 적용하면 전류값은 상승하게 되고, 이 전류값의 상승속도는 nystatin 농도에 비례하게 된다. 이 관계를 적용하여 nystatin을 간단하게 계측할 수 있다.

B. Vitamin B₁의 측정

*Lactobacillus fermenti*는 생육에 vitamin B₁을 필요로 하므로 이 미생물의 증식도는 배지 중의 vitamin B₁ 농도에 비례한다. 실제로 이 미생물을 각종 농도의 vitamin B₁을 함유한 배양액 중에 배양하여, 미생물의 증식도(광학적

으로 탁도로서 측정)나 생성하는 유산량을 지표로 하여 vitamin의 micro-bioassay가 시행되고 있으나, 조작이 번거롭고 시간이 걸리는 연료전기형 전극을 *L. fermenti*의 배양액 중에 삽입하면 전류를 얻을 수 있고, 전류값은 균수에 비례하므로 전류를 사용하면 vitamin B₁의 micro-bioassay를 할 수 있음을 알 수 있다.

C. Nicotinic acid의 측정

*Latobacillus arabinosus*는 생육에 nicotinic acid을 요구하므로 nicotinic acid micro-bioassay에 사용되고 있다. 이 미생물은 주로 유산을 생성하므로 이 미생물을 한천 등의 고분자 gel matrix 중에 포괄고정화하고 이것을 nicotinic acid의 micro-bioassay에 적용할 수 있다.

환경 계측용 미생물 sensor

미생물 sensor는 생존상태의 미생물을 쓰고 있으며 이것들은 장기간동안 막중에서 생육하고 있으므로 환경 monitor로서도 이용할 수가 있다. 보통은 미생물, 세포, 식물, 동물 등이 환경지표로서 쓰이고 있으나, 반응이 완만하여 정확히 오염을 monitoring할 수가 없다. 한편 sensor의 경우에는 미생물에 대한 화학물질의 작용을 직접 전기신호로서 취할 수가 있으므로 이들 지표로부터 대단히 신속하게 환경을 monitoring할 수가 있다. 여기에서는 환경계측용의 미생물 sensor에 대해서 기술하기로 한다.

A. BOD sensor

하천이나 공장폐수의 오염지표의 하나로 BOD(biochemical oxygen demand, 생물학적 산소 소비량)가 있다. 즉 폐수중에 있는 미생물 자화성 유기물질량은 BOD값으로 측정되고 있으나 이것을 측정하는데도 5일간이라는 시간이 요하고 번거로운 조작을 필요로 한다. 폐수처리 시설에서 잘 쓰이고 있는 효모 *Trichosporon cutaneum*을 배양해서 이것을 다공성 acetylcellulose막 상에 흡착고정화하여 이 미생물막을 산소전극의 gas투과성막 상에 장착하여 미생물 sensor를 구성하면, 미생물막 sensor를 유기물질(glucose와 glutamic acid의 당량 혼합액)을 함유하는 시료수 중에 넣었을 때 정상의 전류값과 이 정상전류값의 차는 폐수의 BOD값에 비례할 수가 있음을 알 수 있다. 그러므로 이 미생물 sensor를 써서 공장폐수의 BOD값을 빠르게 또한 연속적으로 측정할 수 있음을 보여준다. 이 원리를 기본으로 그림 6에 도시한 것과 같은 미생물 sensor가 실용화되어 실제로 공장폐수의 BOD monitoring에 이용되고 있다(그림 6).

B. Ammonia sensor

Ammonia 계측용 sensor는 의료, 제조공정, 환경 등의

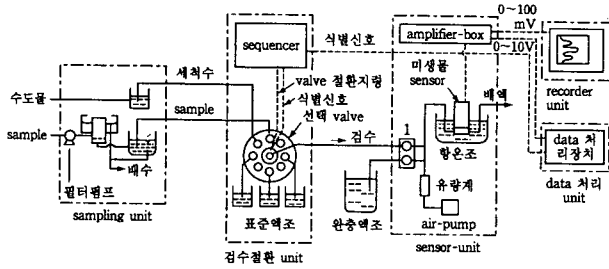


그림 6. BOD sensor.

넓은 분야에서 필요로 하고 있다. 이미 ammonia이온인 gas전극이 개발되어 시판이 되고 있으나 이것은 potentiometry에 기초를 두고 있으므로 휘발성 amine이나 이온의 영향을 받으므로 의료나 발효공정에 적용할 경우에는 여러 가지로 문제가 있다. 그래서 미생물 sensor의 원리를 이용하여 ammonia계측을 착안하게 되었다. 활성진흩에서 분리한 초화균을 배양하여 이것을 다공성의 acetylcellulose막에 흡착고정화하였다. 이것을 산소전극의 teflon막 상에 장착하고 다시 이 미생물막을 gas 투과성막으로 피복해서 ammonia sensor로 제작하였다(그림 7).

C. 변이원 sensor

발암성 물질은 일반적으로 돌연변이원이라고 하는데 이 물질에 의해서 야기되는 미생물의 변이를 조사해보면 발암성 물질의 일차적 screening을 시행할 수가 있다. 이 원리를 기본으로 한 실제의 *Salmonella*균을 쓰는 Ames test나 *Bacillus subtilis*을 쓰는 Rec-assay에 의하여 발암 물질의 일차 screening을 하고 있다. 그러나 이들의 방법으로는 번거로운 조작을 필요로 하며 측정에는 시간을 요하는 문제점이 있었기 때문에 미생물 sensor의 적용을 생각하게 되었다. *B. subtilis*의 DNA 회복기구결손주(Rec⁻)는 변이원에 의해서 균의 DNA가 손상을 받으면 그냥 그대로 죽어버리는 감수치 사상균으로 알려졌으나 이에 반하여 *B. subtilis*의 양생주(Rec⁺)는 변이원에 의해서 DNA가 손상을 입어도 복원에 의해 회복되므로 그대로 생육한다. 그래서 *B. subtilis*의 Rec⁻주와 Rec⁺주를 acetylcellulose막에 흡착고정화하여 이것을 2개의 효소전극, gas teflon막상에 각각 장착하고 그림 8에 도시하는 sensor system을 구성하였다. 이 미생물 sensor의 system을 이용하

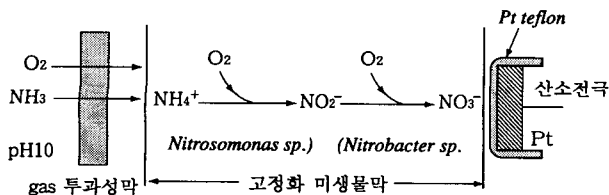


그림 7. Ammonia sensor의 원리.

므로서 짧은 시간내에 화학물질의 변이원성을 측정할 수가 있다. 또한 같은 원리와 소자로 *Salmonella*를 쓰는 변이원의 일차 screening도 가능하다(그림 8).

식품에 쓰이는 sensor

A. 초고속 독성판별 sensor

바다에 서식하는 발광체 박테리아를 테스트용 시약으로 이용하여 테스트 대상물질을 첨가한 후 박테리아의 발광정도가 어느 정도 약해지는가를 통해 유해독성의 정도를 판단하고 독성정도에 따라 발광상태가 점차 소광되는데 이 소광정도를 루멘계기로 측정하면 된다. 이 센서는 각종 음료수, 식품 및 식품원료 안전도를 측정하고 각종 소재 및 제품의 독성함유 여부를 판별할 수 있다. 식품에 쓰이는 *Salmonella*를 민감하게 생체내 감지할 수 있는 장치도 연구되고 있다.

의약분야에 쓰이는 sensor

A. QCM(Quartz Crystal Microbalance)시스템을 이용한 면역센서

QCM 시스템을 바이오센서로 이용하려는 움직임은 1964년 King에 의해서 시작되었고, QCM 시스템을 이용한 면역센서에 관한 연구는 1970년대 초반 Shons 등에 의해 시작되었는데, QCM 시스템의 높은 민감도와 항체가 지닌 높은 특이성을 접목한다는 측면에서 각광을 받기 시작했으며, 현재 QCM 바이오센서의 주류를 이루고 있다. QCM 시스템을 이용한 면역센서의 경우, coating agent를 coating 한 quartz crystal에 항원 또는 항체를 고정화한 후 이에 특이적인 측정 대상물질과 반응시키고, 면역센서에서 항

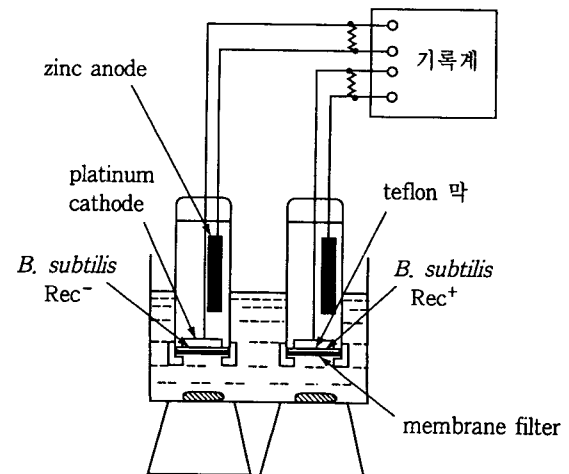


그림 8. 변이원 측정용 미생물 sensor.

체 또는 항원의 고정화는 매우 중요한데, 이에 효율을 증가시키기 위한 방법이 계속적으로 개발되고 있다. 이 QCM는 항체가 지닌 높은 선택성을 이용하기 때문에 측정하고자 하는 물질만을 정확하게 선택적으로 측정하고 측정대상물질을 쉽게 바꿀 수 있는 성질을 가진다. 또 항원항체 반응을 측정하는데 있어, label이 필요없기 때문에 기존의 radioimmunoassay에 비해 안전하고 경제적이다.

결 론

미생물 sensor는 미생물의 기능을 기묘하게 이용하여 분자식별을 한다. 미생물 기능은 대단히 복잡하며 또한 알려지지 않는 부분이 많은데 이들 미생물의 기능이 명확해지면 새로이 우수한 기능을 가진 미생물 sensor를 만들 수가 있을 것으로 본다. 다시 DNA조작 기술을 이용하여 새로운 미생물 기능을 개발할 수도 있게 되었고 미생물 sensor의 선택성이나 감도를 현저히 향상하는 것도 장래에는 가능할 것으로 본다. 또한 transducer로서 반도체를

적용하므로 sensor의 미소화나 다기능화도 가능할 것으로 예상된다.

참 고 문 헌

1. Alaedini, A. and Latov, N.A. : Surface plasmon resonance biosensor assay for measurement of anti-GM(1) antibodies in neuropathy. *Neurology*, **56**, 855-860 (2001)
2. Wu, Z., Wang, B., Dong, S. and Wang, E. : Amperometric glucose biosensor based on lipid film. *Biosens Bioelectron*, **15**, 143-147 (2000)
3. Pathirana, S.T., Barbaree, J., Chin, B.A., Hartell, M.G., Neely, W.C. and Vodyanoy, V. : Rapid and sensitive biosensor for *Salmonella*. *Biosens Bioelectron*, **15**, 135-141 (2000)
4. 김재호 : 바이오센서의 연구동향. *화학세계*, **37**, 23-32 (1997)
5. 민준홍, 최정우 : 바이오센서의 원리와 응용. *전기전자재료*, **11**, 90-96 (1998)
6. 김의락 : 바이오센서. *한국생물공학회지*, **15**, 5 (2000)
7. 정윤수 : Biosensor. *고려의학* (1994)