

## 농업 및 생물산업에서의 바이오 센서 기술

### Biosensor for Agriculture and Bio-industry

조한근 김남수 M. J. Delwichi

H. G. Cho N. S. Kim

#### 적 요

바이오 센서 개발에 대한 주 동기는 건강보호 산업이었지만, 최근의 연구 동향은 농업 및 생물 생산 시스템 분야로 확산되고 있다. 바이오 센서의 본질과 기능에 관한 일반적인 논의가 간단히 제시되었고, 저자들에 의해 연구된 몇 종류의 바이오 센서 예와 그들의 적용에 대해 소개하였다.

#### 1. 서 론

바이오 센서 개발에 대한 관심은 건강관리 산업으로부터 출발하였으나, 최근에는 환경 모니터링, 식품 가공, 생물공학, 국가 방어 등의 다양한 분야에까지 활용이 확산되고 있다. 이와 같은 다양성은 미국 캘리포니아 샌디에고에서 개최된 제6차 바이오 센서 세계회의(Biosensors, 2000)에서 확인되었는데, 건강관리 분야가 여전히 상업적 자극제 역할을 하고 있다. 대조적으로 농업과 생물생산 분야에서는 바이오 센서의 개발과 적용은 아직 진보가 덜 되고 있는데 그 이유는 낮은 단가와 이윤 때문이다. 그러나 더 많은 관심이 모아지고 있으며, 지난 여름 미국 농공학회 생물공학부 내에 바이오 센서의 연구와 적용에 초점을 둔 기술위원회가 설치되었고, 한국농업기계학회 내에도 바이오 센서를 다루게 될 생물공학기술분과가 신설되었다.

이 강좌에서는 바이오 센서에 대한 기초개념을 간략히 소개하고 농업 및 생물산업분야에서 개발

된 일부의 바이오 센서를 소개하여, 바이오 센서 연구를 시작하려는 학자나 기술자에게 도움이 되길 기대한다.

#### 2. 바이오 센서의 기본개념

바이오 센서는 생물학적 감지 요소와 신호변환기로 구성된 장치로 정의되며, 시료의 복잡한 전처리 없이 특정성분의 존재여부나 농도를 선택적으로 신속히 측정하는데 이용된다(Hall, 1990). 일반적으로 알려진 최초의 바이오 센서로는 Clark과 Lyons(1962)에 의해 개발된 포도당 검출을 위한 효소-전극이 있으며, Yellow Springs Instrument Company에 의해 1974년 상품화되었다. 바이오 센서는 다음과 같은 세부 제목에 따라 분류할 수 있다(Eggins, 1997).

##### 가. 측정 대상물질

생화학적인 과정에서 소모되거나 생성되는 모든

The authors are H. G. Cho, Professor, Dept. of Agricultural Machinery Engineering, Chungbuk National University, N. S. Kim, Senior Researcher, Korea Food Research Institute, and M. J. Delwichi, Professor, University of California at Davis. The corresponding author is H. G. Cho, Professor, Dept. of Agricultural Machinery Engineering, Chungbuk National University. E-mail: <hkcho@chungbuk.ac.kr>.

물질의 측정이 가능한데, 대표적인 예는 다음과 같다.

- (1) 당분(sugars)
- (2) 질소(urea)
- (3) 크레아틴(creatine)
- (4) 에탄올 (ethanol)
- (5) 글루타민산 (glutamic acid)
- (6) 낙산 (lactic acid)
- (7) 인 (phosphate)
- (8) 콜레스테롤 (cholesterol)
- (9) 페니실린 (penicillins)

#### 나. 생물요소

생물요소는 선택적인 측정 대상물질에만 작용하여 다른 물질과의 간섭을 최소화해야 하므로 중요하며, 주요 그룹은 다음과 같이 분류된다.

- (1) 효소(enzymes)
- (2) 항체(antibodies)
- (3) 핵산(nucleic acids)
- (4) 리셉터(receptors)

#### 다. 고정화(immobilisation) 방법

생물요소는 변환기와 간접적으로 연결되어야 하며 다음과 같은 방법이 있다.

- (1) 흡착(adsorption)
- (2) 마이크로 캡슐화(microencapsulation)
- (3) 인트랩먼트(entrapment)
- (4) 공유결합(covalent attachment)
- (5) 교차결합(cross-linking)

#### 라. 변환요소

대부분의 바이오 센서는 전기 화학적인 변환기를 기본으로 구성되어 있으나, 다른 형식도 사용되며 주요 그룹은 다음과 같이 분류된다.

- (1) 전기 화학적 변환기(electrochemical transducers)
  - (가) potentiometric

- (나) voltammetric
- (다) conductimetric
- (2) FET-based 센서
- (3) 광학적 변환기 (optical transducers)
- (4) 압전 센서 (piezoelectric devices)
- (5) Surface acoustic waves
- (6) 열감지 센서 (biothermister)

#### 마. 성능인자

- (1) 선택성(selectivity) : 가장 중요한 특성으로 다른 기질과 구별하는 능력을 의미한다.
- (2) 감도범위 : 보통 10<sup>-6</sup> 몰 이하이지만, 특별한 경우 10<sup>-15</sup> 몰 이하인 경우도 있다
- (3) 정확도 : 보통 +/- 5% 정도
- (4) 용액 : pH, 온도 및 이온강도 등이 고려됨
- (5) 시간 : 반응시간, 재사용에 필요한 회복시간, 작동 수명 등을 고려할 수 있다.

### 3. 농업 및 생물산업에서의 바이오 센서 개발 예

#### 가. 우유의 번식 홀몬 측정을 위한 면역 센서

번식관리는 대규모 낙농업자들이 직면하고 있는 가장 어려운 일 중의 하나이다. 배란직전 시기인 발정을 감지하여 성공적인 인공수정을 가능케 하기 위해 상당한 시간과 노력을 기울였다. 우선적으로 행동의 변화에 근거한 다양한 방법으로 발정을 감지하지만, 가장 효과적인 접근 방법은 혈장 또는 우유에 있는 번식 홀몬의 주기적인 측정으로 인해 발정 주기를 추적하는 것이다(Pope 등, 1976). 이 연구에서의 목표는 (1) 실시간으로 난포 상태에서의 우유에 있는 프로게스테론의 농도 측정으로 향상된 평가방법을 개발하는 것이고 (2) 새로운 기법의 도입으로 2세대 바이오센서를 개발하고 보정하는 것이다.

기법의 기본 형태는 두 단계로 구성된다: (1) 항

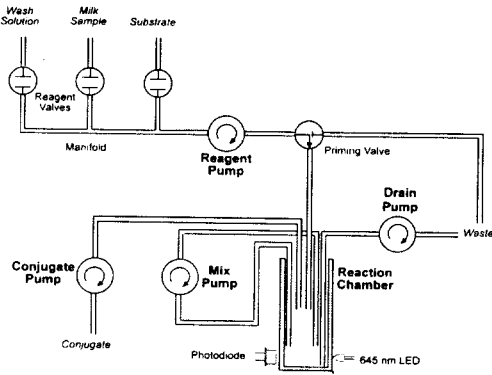


Fig. 1 Schematic of the fluid handling system.

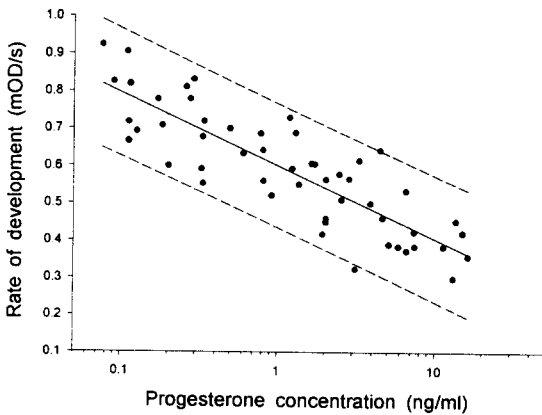


Fig. 2 Calibration of the sensor by radio-immunoassay measurement of foremilk.

원 결합단계를 시료 내에 있는 자유 프로게스테론과 효소 식별자를 부착한 프로게스테론이 멤브레인 위의 항체 결합 위치에서 서로 경쟁하며, 다음에는 (2) 기질 발달 단계로서 결합한 효소가 기질의 산화 작용을 촉진시켜 흡광도에 있어 변화를 가져오는 단계이다. 그림 1은 액체 처리 시스템의 개략도를 보여준다(Delwiche 등, 2000).

前乳(foremilk) 시료의 RIA 측정으로 인한 바이오센서의 보정 결과는 그림 2에 나타난다. 시료가 깨끗하기 때문에 프로게스테론은 정상적인 생리학

적 등급보다 제한되어 있으며 그 범위는 0.1에서부터 16.2 ng/ml이다. 프로게스테론 농도, P(ng/ml)의 상용로그값에 대한 R(mOD/s)의 선형 회귀율은 0.083mOD/s의 표준 오차를 갖는다. 보정 방정식은 회귀 결과를 역으로 취하여 예측 농도를 구하여 유도된다. 산후 초기 우유로 센서를 실험한 결과 회귀 계수는 비슷하게 나왔으나 표준 오차(0.046 mOD/s)는 작아졌으며 보정의 변이성을 나타낸 것은 RIA 측정에 기인되었다.

#### 나. 우유의 요소(尿素, Urea)에 대한 효소 센서

우유 요소(尿素, urea) 질소(MUN)는 낙농우의 단백질 효율과 에너지 이용의 믿을만한 척도로 입증되어 왔다. MUN 관찰에 기초한 젖소의 사양관리는 사료비의 상당한 절약을 가능케 하며(Baker 등, 1995; Broderick와 Clayton, 1997), 더 나가 비료 기계 질소 손실의 감소를 초래하며(Hof 등, 1996; Schepers 등, 1997), 번식성능의 향상을 가능하게 한다(Butler 등, 1996; Larson 등, 1997). 비록 시료의 수집 처리과정이 복잡하고 비용이 많이 들지만, 많은 낙농가에서 수집된 우유는 멀리 있는 실험실에서 MUN이 시험된다. 대개 시험 결과는 수일 내에 알 수 없으며, 시료는 낙농가, 실험실 혹은 운반 중에 잘못 처리될 수 있다. 이 연구의 목표는 이러한 문제를 해결할 신뢰적이며 값이 싼 실시간 MUN 센서를 개발하는 것이다.

요소(尿素, urea)에 대한 분석기법은 UC Davis에서 개발되어졌으며(Jenkins 등, 1999), 이산화 탄소에 기인한 휘발성 가스 압력은 효소 우라아제에 의한 요소(尿素, urea)의 가수분해 후에 측정된다. 이 분석기법은 강인한 변환 메카니즘 때문에 우유에 적용하는 것이 적합한 것으로 간주되는데, 이때 우유는 감지요소와 전혀 접촉을 하지 않는다. 이와 비교해 보면 다른 요소(尿素, urea) 감지 기술들은 전유(全乳)라는 복잡한 매체에서는 작동되지 않을 수 있으며, 우유 고형물을 제거하기 위해 복잡하며 고가의 설비가 필요해진다. 휘발성 가스 분석기법의 온라인 자동화는 그것의 정확성,

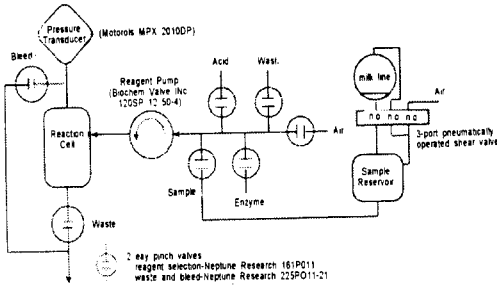


Fig. 3 Schematic of the urea sensor fluidics.

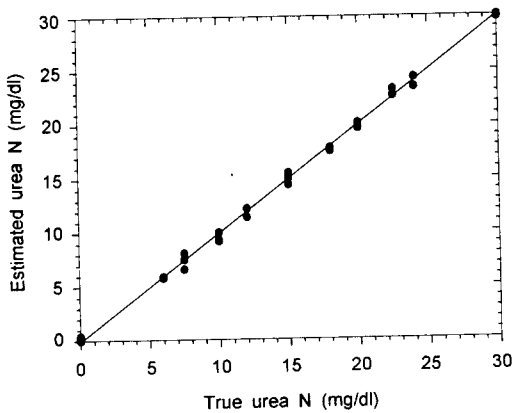


Fig. 4 Calibration of the sensor with urea N in standards prepared in EDTA buffer.

간편성, 강인성, 저비용 및 시약이나 반응물의 무독성 때문에 합리적인 접근방법이 되었다. 그림 3은 센서에 사용된 유체처리 시스템을 보여주고, 그림 4는 개발된 센서의 보정곡선을 보여준다.

#### 다. 싹의 박테리아 병원균에 대한 DNA 센서

살모넬라와 대장균 *E. coli* O157:H7은 1995년 이래로 적어도 11개의 싹의 발아와 관련되어 왔다. 싹의 생산은 다른 신선한 생산물들과 비교할 때 드문 일인데, 이유는 종자의 발아와 성장을 촉진하는 같은 조건(온도, 가능 습도, 영양분)에서

또한 박테리아 병원균의 성장이 촉진되기 때문이다(United States Food and Drug Administration, 1999). 알파파, 브로콜리 및 무와 같은 녹색의 잎을 갖는 식물의 싹에, 오염된 종자로부터의 박테리아는 발아 후 처음 며칠동안 몇 배의 크기로 증식되었다. 이러한 싹들은 보통 먹기 전에 요리되지 않고, 물에 세척하게 되면 박테리아 오염을 감소시키지만, 그것들은 음식을 통한 병원체의 좋은 매체이다(Andrews 등, 1982).

미국 식품 의약청(FDA)은 싹 생산자에게 살모넬라와 대장균 *E. coli*를 신속하게 가려내고 정식으로 확인하는 방법에 대한 지침을 제공하고 있다. 그렇지만 값이 비싸고 시간이 많이 소모된다. 심지어 신속한 점검에도 48시간 이상을 필요로 한다(United States Food and Drug Administration, 1999). 생산 과정을 좀더 효율적으로 바꾸기 위해 산업 분야에서는 생산물에 있는 병원균을 빠르고 민감하게 검출하기 위해 바이오센서로 전환하고 있다. 유전학을 바탕으로 한 센서는 9분 내에 5개 이상의 집락(colony forming units : CFU)을 검출할 수 있으므로, 산업체의 문제에 대한 답이 될 것이다(Belgrader 등, 1999). 유전학에 기초를 둔 센서의 요점은 DNA를 증폭하는 중합효소연쇄반응(PCR)이다. 뿐만 아니라 분자 신호는 PCR의 실시간 분석을 가능하게 한다.

최근 분자표지(molecular beacons)는 전기영동 방법을 사용하지 않고 PCR 결과의 실시간 모니터링을 가능하게 한다. 분자표지는 DNA의 염기순서에 맞게 붙을 수 있도록 주문 제작된 15-33개의 염기 서열이다(Tyagi와 Framer, 1996; Chen 등, 2000). 그것들은 각각의 끝에 형광성과 비형광성 분자가 붙어 있다. 이 끝은 자유로운 용액 상태일 때 상호보완적으로 설계되어 있고 U자형 구조를 가졌으며, 형광성은 quencher 분자에 의해 억제된다. 분자표지가 그것의 표적에 붙게 되면 형광은 quencher 분자로부터 분리되어 형광을 발휘한다. 각각의 사이클동안 분자표지는 증폭산물에 붙어 형광을 나타내고, 그 결과를 실시간으로 모니터 할 수 있다. 실시간으로 검출하는 것 이외에 분자표지는 2차 특이성을 제공한다. 만약 PCR이 잘못된 DNA를

증폭한다면 분자표지는 표적에 붙지 않을 것이며 형광도 검출되지 않을 것이다.

PCR과 분자표지를 이용한 바이오 센서 개발작업이 진행되고 있다. 이 센서는 열적으로 사이클화 되어 있고 형광을 광학적으로 모니터 할 수 있는 시료 반응조로 구성되어 있다. 액체 샘플은 소형 펌프와 밸브에 의해 이동되며 생산처리 유출로부터 PCR에 적합한 시료 용량(50 $\mu$ l)이 만들어져야 할 것이다. 여과(Waage 등, 1999) 또는 면역자기입자(Cudjoe 등, 1995)를 전처리로 이용할 수 있다. 또한 그것들은 필요한 경우 DNA 분리를 위한 기반이 될 수 있을 것이다.

#### 라. 어류의 선도 계측용 효소센서

최근 여러 종의 화학물질을 동시에 계측하는 바이오 센서가 개발되고 있다. 이를 위해서는 여러 개의 바이오 센서를 동시에 이용하거나(다전극 바이오 센서) 하나의 바이오 센서에서 여러 성분의 동시측정이 가능하여야 한다(다기능 바이오 센서). 어류의 선도 계측용 바이오 센서는 이러한 목적으로 개발되고 있는 효소 센서이므로 연속형의 다전극 바이오 센서를 이용한 어류의 선도 측정 시스템을 여기에서 소개하고자 한다. 생체내의 ATP 분해 산물인 ATP, ADP, AMP, IMP, inosine (HxR), hypoxanthine (Hx) 등은 어류의 선도와 관련이 있으며 이 중 IMP, inosine, hypoxanthine의 3개 화학물질이 어류선도와 관련된 주요 지표이다. 그림 5는 Park과 Kim (1988)이 개발한 선도 측정용 연속형 바이오 센서 시스템을 보여주고 있다. 그림 5의 바이오 센서 시스템은 3종류의 효소를 서로 다른 조성으로 고정화한 효소반응기를 별도로 산소전극에 연결하고 injector를 통하여 시료를 가하면 각각의 산소전극에 나타나는 hypoxanthine, inosine, IMP 독립된 신호를 기록계로 측정하는 원리에 의하여 작동된다. 이 때, 각각의 바이오 센서는 선도 지표물질에 대하여 농도 의존적으로 반응하게 된다.

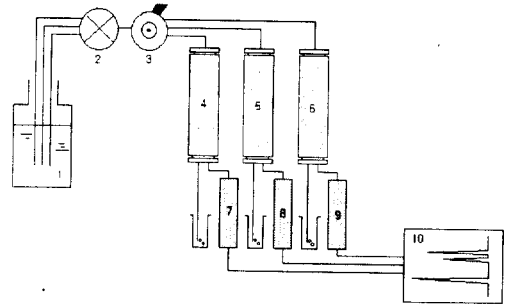


Fig. 5 Schematic diagram of the apparatus for ATP-related compounds using a FIA system with immobilized enzyme reactors.

- 1: buffer solution; 2: pump; 3: injector;
- 4: enzyme reactor 1 (XOD);
- 5: enzyme reactor 2 (XOD + NP);
- 6: enzyme reactor 3 (XOD + NP+ 5'-NT)
- 7,8,9: oxygen electrodes; 10: multirecorder.

#### 마. 살모넬라균 측정용 압전류적 면역센서

생체를 이 물질로부터 보호하는 면역반응은 이물, 즉 항원과 림프구에서 생성된 항체와의 특이한 복합체를 형성하는 것을 특징으로 한다. 바이오 센서에 의한 면역반응 측정은 크게 전극형 면역센서와 발광 측정형 면역센서로 나눌 수 있다. 전자는 항원 고정화 막 혹은 항체 고정화 막과 전극으로 구성된다. 막 표면에서 일어나는 항원·항체 반응 결과 생성되는 막 표면에 있어서의 진동수 변화나 전하변화를 전극으로 측정하는 것이다. 최근 면역센서의 반복사용도 5~6회 가능하도록 재생공정(regeneration process)이 개발되어 연속화된 면역센서의 제조도 가능하게 되었다. 후자는 luminol 등의 발광물질을 이용하며 생물반응 결과 과산화수소가 발생하면 금속 착물이나 peroxidase 촉매작용으로 일어나는 발광현상을 측정하는 시스템이다. 이러한 면역센서 기법으로 식중독균, 식품 저장·유통 중의 오염지표균 등의 신속검출이 가능하게 되었다. 그림 6은 항원·항체 반응에 의하여 *Salmonella* spp.를 선택적으로 측정하는 압전류적 항체센서 시스템의 구성도를 보여준다(Park과 Kim, 1998).

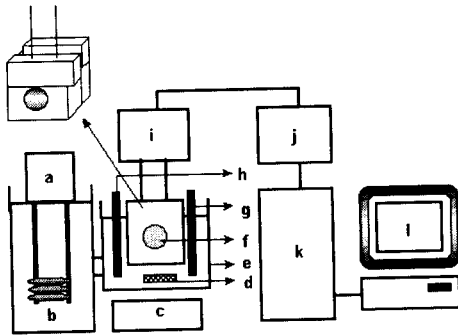


Fig. 6 Schematic of antibody immobilized PZ sensor.

- a) circulator, b) water bath, c) stirrer,
- d) magnetic bar, e) reaction cell,
- f) gold electrode, g) reference electrode,
- h) counter electrode, l) oscillator,
- j) quartz crystal analyzer, k) potentiostat, l) pc

#### 바. 어류의 선도측정용 미생물센서

미생물이 영양분을 이용하는 기능이나 그 대사 기능을 이용하면 미생물센서를 제조할 수 있다. 이에는 미생물의 호흡활성을 지표로 이용하는 것과 미생물대사 결과의 전극활성물질을 지표로 이용하는 것으로 크게 나뉜다. 전자는 호기성 미생물의 고정화 막과 효소전극으로 구성되며 이를 유기화합물을 함유한 시료액 속에 넣으면 유기화합물은 미생물 막으로 확산하여 미생물에 의하여 이용된다. 그 결과 미생물의 호흡활성은 활발해지고 이것을 막에 밀착된 산소전극으로 측정할 수 있다. 즉 이 호흡량의 변화와 유기화합물 농도 사이에서 인식되는 상관관계를 이용하여 유기화합물 농도를 산소전극의 전류 값으로 측정하는 것이다. 후자는 미생물이 유기화합물을 이용할 때 생성되는 대사 산물인 탄산가스, 수소 등의 전극활성물질을 측정하는 것으로 대사산물 농도와 유기화합물 농도간의 상관관계를 이용하는 것이다. 미생물 센서는 어류의 화학적 선도지표 중의 하나인 trimethylamine (TMA) 측정, 수질의 오염지표 중의 하나인 BOD 측정 등에 활용될 수 있다. 저자들

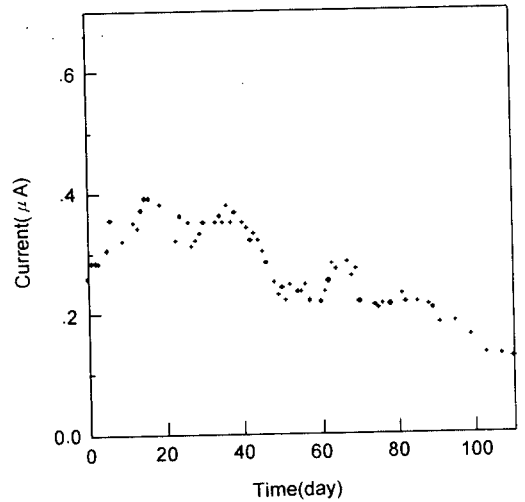


Fig. 7 Storage stability of TMA sensor.

은 *Pseudomonas* 속에 속하는 한 균주가 TMA 자화성이 있는 사실을 확인하고 이를 활용하여 TMA 바이오 센서를 제조하고 그 특성을 살펴본 결과 이 바이오 센서가 비교적 선택적으로 반응하여 TMA 측정에 활용할 수 있음을 알 수 있었다. 그림 7은 개발된 바이오 센서의 일별 저장 안정성을 보여준다.

#### 4. 결 론

바이오 센서는 주요 성분들을 저 농도에서 정확하고 특이적으로 계측할 수 있어야 하며, 비전문요원에 의해서도 취급이 가능해야 하고, 현장성, 장기간의 안정성 및 시스템의 견고성을 만족하여야 한다. 농업과 생물산업 분야에서의 바이오 센서 개발과 적용은 보건 의료 분야에 비해 상대적으로 미약한 실정이다. 농업에서 뿐 아니라 식품의 품질 및 공정관리, 세균에 의한 안전성, 생산물의 제어, 오염 처리 그리고 환경 모니터링과 같은 분야들에도 바이오 센서의 개발과 활용의 필요성이 증대되고 있다. 그러나 농업 및 생물산업에서의 바이오 센서 개발을 위해서는 바이오 센서의 기본 특성과 농업과 생물산업에서 요구하는 최종

제품의 낮은 단가를 동시에 만족시키기 위한 노력이 필요하다.

### 참 고 문 헌

1. Andrews, W. H., P. B. Mislivec, C. R. Wilson, V. R. Bruce, P. L. Poelma, R. Gibson, M. W. Trucksees and K. Young. 1982. Microbial hazards associated with bean sprouting. *J. Assoc. Of Anal. Chem* 65(2):241-8.
2. Baker, L. D., J. D. Ferguson and W. Chalupa. 1995. Responses in urea and true protein of milk to different feeding schemes for dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78:2424-2434.
3. Belgrader, P., W. Benett, D. Hadley, J. Richards, P. Stratton, R. Mariella Jr. and F. Milanovich. 1999. PCR detection of bacteria in seven minutes. *Science*, 284:449-450.
4. Biosensors 2000. The Sixth World Congress on Biosensors, May 24-26, 2000, San Diego, California, Elsevier Science, Oxford, UK.
5. Broderick, G. A. and M. K. Clayton. 1997. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. *J. Dairy Sci.* 80:2964-2971.
6. Butler, W. R., J. J. Calaman and S. W. Beam. 1996. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:858-865.
7. Chen, W., G. Martinez and A. Mulchandani. 2000. Molecular Beacons: A real-time polymerase chain reaction assay for detecting Salmonella. *Analytical Biochemistry*. 280:166-172.
8. Cudjoe, K. S., T. Hagtvedt and R. Dainty. 1995. Immunomagnetic separation of Salmonella from foods and their detection using immunomagnetic particle (IMP)-ELISA. *International Journal of Food Microbiology*, 27:11-25.
9. Delwiche, M., E. Cox, B. Goddeeris, C. Van Dorpe, J. De Baerdemaeker, E. Decuyper and W. Sansen. 2000. A biosensor to detect penicillin residues in food. *Trans. ASAE*, 43(1): 153-159.
10. Eggins, B. R. 1997. *Biosensors: an introduction*. John Wiley & Sons Ltd.
11. Hof, G., M. D. Vervoorn, P. J. Lenaers and S. Tamminga. 1997. Milk urea nitrogen as a tool to monitor the protein nutrition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:3333-3340.
12. Jenkins, D. M., M. J. Delwiche, E. J. DePeters and R. H. BonDurant. 1999. Chemical assay of urea for automated sensing in milk. *J. Dairy Sci.* 82:1999-2004.
13. Larson, S. F., W. R. Butler and W. B. Currie. 1997. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:1288-1295.
14. Park, I. -S. and N. Kim. 1998. Thiolated Salmonella antibody immobilization onto the gold surface of piezoelectric quartz crystal. *Biosensors Bioelectron.* 13:1091.
15. Park, I. -S. and N. Kim. 1999. Simultaneous determination of hypoxanthine, inosine and inosine 5'-monophosphate with serially connected three enzyme reactors. *Anal. Chim. Acta* 394:201.
16. Pope, G. S., I. Majzlik, P. J. H. Ball and J. D. Leaver. 1976. Use of progesterone concentrations in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. *Br. vet. J.*, 132: 497-506.
17. Schepers, A. J. and R. G. M. Meijer. 1998. Evaluation of the utilization of dietary nitrogen by dairy cows based on urea concentration in milk. *J. Dairy Sci.* 81:579-584.
18. Tyagi, S. and F. R. Framer. 1996. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization.

- dization. *Nature Biotechnology*, 14:303-308.
19. United States Food and Drug Administration. 1999. Guidance for industry: reducing microbial food safety hazards for sprouted seeds and guidance for industry: sampling and microbial testing of spent irrigation water during sprout production. *Federal Register* 64(207):57893-57902).
20. Waage, A. S., T. Vardund, V. Lund and G. Kapperud. 1999. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. *Journal of Applied Microbiology*, 87:418-428.