

## 열분해 질량분석법을 이용한 생물학 물질의 특성 연구(II)

Characteristics study II of biological materials using pyrolysis-mass spectrometry

**최 선 경\***  
Choi, Sun-Kyung

**박 영 규\***  
Park, Young-Kyu

**박 병 황\***  
Park, Byeng-Hwang

### ABSTRACT

Pyrolysis-mass spectrometry has been used to characterize the 17 biological materials including bacteria and proteins. In this study, an *in situ* thermal-hydrolysis methylation (THM) procedure using tetramethylammonium hydroxide (TMAH) was employed. The biological materials are ionized using chemical ionization (CI) method with ethanol by ion trap mass spectrometer (ITMS), which attached with our own made pyrolyzer module, and then their pyrolysis mass spectra were obtained. The major distinct characteristic peaks were selected from all the range of mass spectra, and analyzed using principal component analysis (PCA) method to assess the classification/identification possibility of biological materials.

주요기술용어(주제어) : Pyrolysis-Mass Spectrometry(열분해 질량분석법), *in situ* thermal-hydrolysis methylation(열분해-메틸화법), Principal Component Analysis(주성분 분석), Classification/Identification(분류/식별)

### 1. 머리말

생물학 질량분석법(biological mass spectrometry)은 생물학 물질을 대상으로 질량분석법을 이용하여 지질(lipid), 탄수화물(carbohydrate), 펩티드(peptide) 및 단백질(protein) 등에 대하여 연구를 수행하는 분야이다. 이러한 생물학 질량분석 과정에서 열분해 방법은 박테리아 등과 같은 분자량이 큰 생물체들을 보다 작은 분자량을 가지면서 생물학 표식물질(biomarker)로 사용될 수 있는 휘발성 물질로 변환

시키는 전처리 방법으로 많이 이용되고 있다. 좀더 변형된 열분해 방법으로는 생물학 물질을 열분해기 내로 도입하기전 tetramethyl-ammonium hydroxide (TMAH)와 같은 메틸 유도체화 물질을 함께 넣어 열분해 하는 방법이 있다. 이 과정은 일반적으로 *in situ* thermal-hydrolysis methylation (THM, 열분해-메틸화법)으로 명명되고 있다<sup>[1]</sup>.

생물학 물질을 열분해 질량분석 하는 경우 시료 이온화 방법으로 화학이온화(chemical ionization, CI) 방법을 많이 이용하고 있으며 이 방법은 전자충격이온화(electron impact ionization : EI) 방법과 비교하여 분자의 조각나기가 적게 일어나는 특징이 있다. 그러므로, CI 방법을 이용할 경우 세포 등에서 열분해된 물질의 고유한 특성을 갖는 분자이온과 같은 주

† 2005년 6월 10일 접수~2005년 9월 9일 게재승인

\* 국방과학연구소(ADD)

주저자 이메일 : choisk01@netian.com

요한 생물학 표식물질의 측정에 있어서 EI 방법보다 유리하다<sup>[2]</sup>.

박테리아는 핵물질, 치토프라즘 및 세포벽으로 구성되어 있으며 모양과 크기에 따라 그 형상은 다양하다. 화학 물질적인 조성 측면에서 *E. coli*는 약 70%의 물, 15%의 단백질, 6%의 RNA, 3%의 탄수화물, 2%의 지질, 그리고 기타 DNA, 피막물질, 무기물 등으로 구성되어 있다. 특히, 세포막의 주요 구성물질인 지질 성분(인지질)은 세포마다 그 조성과 함량이 다양하여 박테리아의 주요한 생물학 표식물질로 인식되고 있다<sup>[3]</sup>.

박테리아 중 일부는 그들의 생존 환경에 따라 포자를 형성하여 냉온, 열, 건조 기후, 화학물질 및 빛에도 잘 견딜 수 있게 된다. 이러한 포자성 박테리아에서 중요하게 다루어지고 있는 성분 중의 하나가 dipicolinic acid(DPA)이다. DPA는 모세포로부터 포자화 하는 과정에서 합성 및 농축되는 성분으로 포자 중심으로 이동되어 주로  $Ca^{2+}$ 와 같은 이가의 양이온과 1:1의 킬레이트 화합물을 형성한다. DPA는 포자성 박테리아 내에 건조무게로서 약 5~14%를 차지한다. 이렇게 높은 DPA 함량은 고온과 같은 극한 환경에 대한 포자가 갖는 저항성 및 안정성에 중요한 역할을 한다. 일반적으로 DPA가 부족한 포자의 경우 포자화 과정에서 빠르게 깨어지는 것으로 알려져 있다<sup>[4]</sup>.

독소는 진균독소(Mycotoxins : T-2)의 경우와 같이 분자량이 250~500Da 정도로 작은 화학독소부터 좀더 덩치가 큰 펩티드형 독소, 그리고 보툴리눔 독소와 같이 고분자량을 갖는 단백질 독소에 이르기까지 다양한 화학적 조성을 갖는다. 그러므로, 질량분석 과정을 통하여 이들의 특징적인 표식물질을 찾는 것은 아주 어려운 일이다. 단백질은 열분해 질량분석 과정에서 일반적으로 독특한 표식물질을 생성하지 않는데 이것은 열분해-메틸화 과정에 의하여 메틸화된 diketopiperazine(DKP)류의 고유한 작은 조각들로 단백질이 분해되기 때문이다. 20여 종류의 아미노산의 배열에 의해 만들어진 단백질의 열분해에 의해서 생성되는 DKP의 종류는 매우 다양하다. 따라서, 단백질의 열분해 질량스펙트럼은 아주 다양하면서 복잡한 경향을 갖는다. 또한 DKP 내에 존재하는 산성수

소(예: DKP내 질소원자에 결합된 수소)의 개수만큼 분자내에서 메틸유도체화 과정을 통하여 메틸화되는 것으로 알려져 있다<sup>[5]</sup>.

본 논문에서는 자체 제조한 열분해기를 장착한 열분해 질량분석기를 이용하여 박테리아 12종(포자성 물질 3종 포함), 단백질 4종, 그리고 환경물질 2종의 열분해 질량스펙트럼을 얻었다. 얻어진 질량스펙트럼의 비교를 통하여 각 생물학 물질의 특성을 연구하였으며, 이러한 특성을 바탕으로 주성분 분석(principal component analysis, PCA)의 통계학적인 기법을 이용하여 각 생물학 물질의 분류 가능성을 확인하였다.

## 2. 실험

### 가. 시약 및 시료

Tetramethylammonium hydroxide(Aldrich, 25%)는 메탄올(Merck, HPLC급) 용매로 묽혀서 0.1M 용액으로 제조하였으며, 이 용액은 비휘발성 시료를 휘발성으로 유도체화하기 위한 메틸화 시약으로 사용되었다.

생물학 시료 중 박테리아 종의 경우 구입한 균주를 Nutrient agar 배지를 이용하여 약 37°C에서 자체 배양한 후 세척 및 수확하여 냉장 보관하였다. 사용한 그람양성 박테리아로는 *Bacillus globigi*(BG, or *Bacillus subtilis* var. *niger*, ATCC 9372), *Bacillus cereus*(KCTC 3624), *Bacillus thuringiensis*(KCTC 3452), *Staphylococcus epidermidis*(KCTC 1917), *Staphylococcus aureus*(KCTC 1928)이며, 이 중 BG, *Bacillus cereus* 및 *Bacillus thuringiensis*는 포자를 형성하여 사용하였다. 그람음성 박테리아로는 *Escherichia coli*(*E. coli*, ATCC 15597), *Erwinia herbicola*(EH, ATCC 33243), *Pseudomonas fluorescens*(KCTC 2344), *Pseudomonas aeruginosa*(KCTC 2695), *Acinetobacter calcoaceticus*(KCTC 2357), *Acinetobacter baumannii*(KCTC 2508)이었다. 이들 각각은 실험직전에 탈이온수를 이용하여 약 25 $\mu$ g/ $\mu$ l의 현탁액으로 제조하였다.

단백질 물질로는 Ovalbumin(Sigma, 96%), Bovine albumin(Sigma, 96%), Gelatin(Sigma, G-9391),

[표 1] 실험에 사용한 생물학 물질

구분	물질명	비고
세포성 박테리아 물질	<i>Bacillus globigi</i> (BG)	그람양성, C1
	<i>E. coli</i>	그람음성, C2
	<i>Erwinia herbicola</i> (EH)	그람음성, C3
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	그람양성, C4
	<i>Staphylococcus aureus</i>	그람양성, C5
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	그람음성, C6
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	그람음성, C7
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	그람음성, C8
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	그람음성, C9
포자성 박테리아 물질	<i>Bacillus globigi</i> (BG)	그람양성, S1
	<i>Bacillus cereus</i>	그람양성, S2
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	그람양성, S3
단백질	Ovalbumin	T1
	Bovine albumin	T2
	Gelatin	T3
	Hemoglobin	T4
환경물질	송화가루	P
	부유먼지	-

Hemoglobin(Sigma, H-2625)이었으며, 환경물질로는 자체 수집한 송화가루와 부유먼지였다. 각각의 물질들은 실험직전 탈이온수를 이용하여 약 10 $\mu$ g/ $\mu$ l의 용액 또는 현탁액으로 제조하였다. 한편, 송화가루의 경우 물 위로 부유하는 성질이 있어 균일한 농도의 현탁액으로 제조할 수 없어서 실험 시 물 위로 부유한 약간의 양을 마이크로 주사기로 취하였다. 실험에 사용한 생물학 물질을 표 1에 요약하였다.

나. 열분해 질량분석 과정

석영 재질의 열분해기 내로 마이크로 주사기를 사용하여 시료 2 $\mu$ l와 0.1 M TMAH 5 $\mu$ l를 주입한 후 승온 시간 10초에 약 370 $^{\circ}$ C로 가열하여 시료의 열분해/메틸화 과정을 진행하였다. 열분해된 시료의 전송은 25ml/min 유량의 실내 공기를 운반기체로 하여 이루어졌으며, 250 $\mu$ m(내경) $\times$ 27cm(길이)의 silcosteel 튜브(Restec Corp. 제조)와 50 $\mu$ m(내경) $\times$ 60cm(길이)의 비활성화된 석영모세관(SGE 제조)이 시료 전송관으로 사용되었다. Silcosteel 튜브로 전송된 시료 중의 일부만이 T형태의 open split interface에서 질량분석

기의 진공에 의하여 모세관으로 빨려들어 가도록 하였다. 질량분석기로 도입되는 유량은 0.5ml/min 이하가 되도록 하였으며, 시료 전송관은 200 $^{\circ}$ C로 유지하였다.

반응기체로 에탄올을 이용한 화학이온화(chemical ionization, CI) 방법을 시료 이온화 방법으로 사용하였으며, Saturn<sup>®</sup> 2200GC/MS(Varian Co., USA)의 이온트랩형 질량분석기를 이용하여 도입된 열분해 시료의 질량스펙트럼을 측정하였다. 질량분석기의 질량분석 범위는 에탄올 반응기체에서 만들어진 반응이온의 영향을 최소화하기 위하여 100~450amu로 하였으며, 기기의 고진공 값은 에탄올이 도입된 후 약 8.0 $\times$ 10<sup>-6</sup>Torr로 측정되었다. 각 질량스펙트럼의 추출은 시료에 의한 신호가 처음 검출되는 지점에서부터 도입이 거의 마무리되고 있는 지점까지 인위적으로 평균하여 얻어졌다. 자세한 기기의 구성에 관한 내용은 관련 논문을 참고할 수 있다<sup>[6]</sup>.

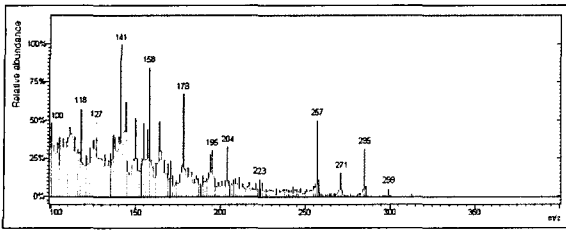
3. 결과 및 고찰

가. 박테리아 세포와 포자의 질량스펙트럼 비교

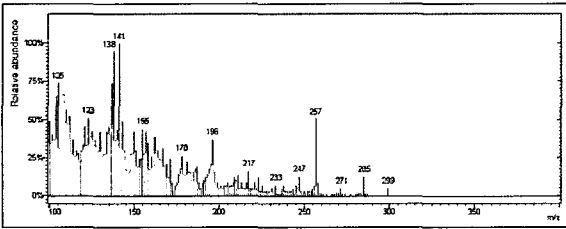
그림 1은 세포성 박테리아 물질과 포자성 박테리아 물질의 특성을 비교하기 위해서 BG의 열분해 질량스펙트럼을 보여주고 있다. 질량 200 이상에서 BG의 특징을 나타내는 m/z 257(C15:0MeH<sup>+</sup>), 271(C16:0MeH<sup>+</sup>), 285(C17:0MeH<sup>+</sup>), 299(C18:0MeH<sup>+</sup>) 등의 지방산 메틸 유도체에 의한 피크들이 세포 및 포자 모두에서 공통적으로 나타나고 있다. 그러나, 질량 200 미만에서는 BG의 세포와 포자를 구분할 수 있는 특징적인 경향들이 관찰되고 있다. 특히, 포자의 경우 dipicolinic acid(DPA)에 의한 질량 138(2MeDPAH<sup>-</sup>-58)과 196(2MeDPAH<sup>+</sup>)의 피크가 크게 나타나고 있어 전체적인 질량스펙트럼의 형태가 많은 차이점이 있는 것을 알 수 있었다.

나. 그람양성 및 그람음성 박테리아의 질량스펙트럼 비교

박테리아는 세포벽을 이루는 구조적인 특성과 구성성분의 차이에 의하여 크게 그람양성 박테리아와 그



(a)

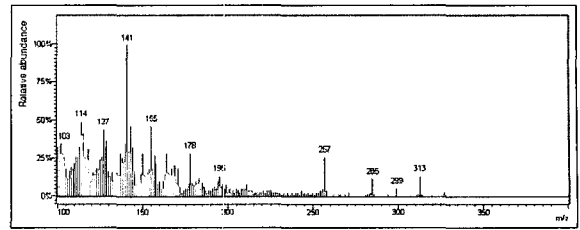


(b)

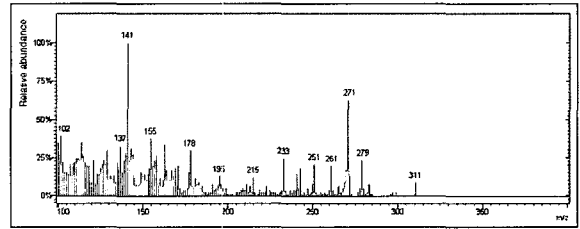
[그림 1] BG 세포(a)와 포자(b)의 열분해 질량스펙트럼 비교

람 음성 박테리아로 구분하고 있다<sup>[7~8]</sup>. 그림 2는 그람 양성 박테리아인 *Staphylococcus epidermidis*와 그람 음성 박테리아인 *E. coli*의 열분해 질량스펙트럼을 보여주고 있다. 두 물질에서 관찰되는 질량 200 미만에서의 질량스펙트럼 경향은 m/z 114, 137, 141, 155, 178, 195 등의 피크들이 공통적으로 크게 나타나 매우 유사함을 알 수 있으나, 질량 200 이상에서 관찰되는 피크들은 그람 양성 및 그람 음성의 특성에 따라 많은 차이를 나타내고 있다. 질량 200 이상에서 보여지는 *Staphylococcus epidermidis*의 주요 피크는 m/z 257(C15:0MeH<sup>+</sup>), 285(C17:0MeH<sup>+</sup>), 299(C18:0MeH<sup>+</sup>), 313(C19:0MeH<sup>+</sup>) 등이며, *E. coli*의 주요 피크는 m/z 215(C12:0MeH<sup>+</sup>), 233(C17:1(C17:cy) MeH<sup>+</sup>-50), 241(3-OH C14:0MeH<sup>+</sup>-18), 243(C14:0MeH<sup>+</sup>), 251(C17:1(C17:cy)MeH<sup>+</sup>-32), 261(C19:1(C19:cy)MeH<sup>+</sup>-50), 271(C16:0MeH<sup>+</sup>), 279(C19:1(C19:cy)MeH<sup>+</sup>-32), 283(C17:1(C17:cy)MeH<sup>+</sup>), 311(C19:1(C19:cy)MeH<sup>+</sup>) 등이다.

위의 결과는 그람 양성 및 그람 음성 박테리아의 지방산 함유 특성을 잘 따르고 있다. 그람 양성 박테리아의 세포내 지방산 분포상의 특성은 C15:0, C16:0, C17:0 등의 포화 지방산이 주로 분포하며, 특히 C15:0(pentadecanoic acid), C17:0(margaric acid)의 홀수 탄소수를 갖는 포화 지방산의 분포가 큰 것으로 알려



(a)



(b)

[그림 2] 그람 양성 박테리아와 그람 음성 박테리아의 질량스펙트럼 비교;

(a) *Staphylococcus epidermidis*, (b) *E. coli*

져 있다.

한편, 그람 음성 박테리아의 경우는 C16:0(palmitic acid) 등의 짝수 탄소수를 갖는 포화지방산과 C16:1, C18:1 등 불포화 지방산의 분포가 큰 것으로 알려져 있다<sup>[9]</sup>.

#### 다. 속(genus) 상호간의 질량스펙트럼 비교

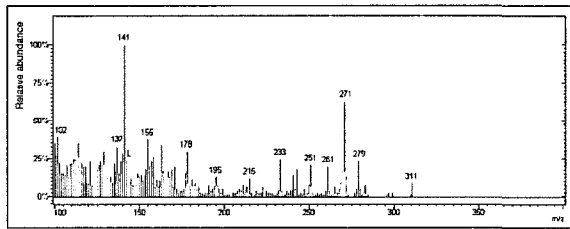
생물학 물질은 계통학에서 계, 문, 강, 목, 과, 속, 종(아종)으로 분류하고 있으며, 박테리아의 경우 *Staphylococcus epidermidis*에서 *Staphylococcus*는 속(genus)을 나타내며 *epidermidis*는 속의 하위분류인 종(species)을 나타낸다.

그림 3은 같은 그람 음성 박테리아에 속하지만 상호간 속이 다른 세 가지 물질인 *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, 그리고 *Acinetobacter calcoaceticus*의 열분해 질량스펙트럼을 보여주고 있다. 이들에게서 관찰되는 질량 200 미만에서의 질량스펙트럼 형태는 m/z 114, 137, 141, 155, 178 등의 피크들이 공통적으로 크게 나타나 상호간 매우 유사함을 알 수 있었으며, 질량 200 이상의 주요 피크는 모두 그람 음성 박테리아의 특성을 잘 따르는 것을 알 수 있었다. 각 물질의 질량 200 이상의 주요 피크로는 *Pseudomonas*

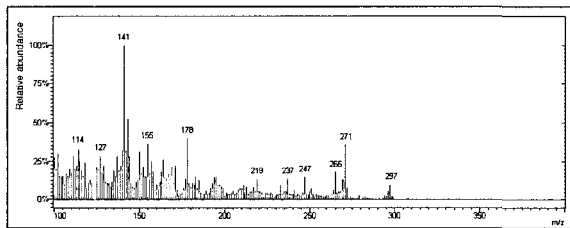
*fluorescens*의 경우  $m/z$  219(C16:1MeH<sup>+</sup>-50), 233(C17:1(C17:cy)MeH<sup>+</sup>-50), 237(C16:1MeH<sup>+</sup>-32), 247(C18:1MeH<sup>+</sup>-50), 265(C18:1 MeH<sup>+</sup>-32), 269(C16:1MeH<sup>+</sup>), 271(C16:0MeH<sup>+</sup>), 297(C18:1MeH<sup>+</sup>) 등이며, *Acinetobacter calcoaceticus*는  $m/z$  219(C16:1MeH<sup>+</sup>-50), 237(C16:1MeH<sup>+</sup>-32), 247(C18:1MeH<sup>+</sup>-50), 265(C18:1MeH<sup>+</sup>-32), 269(C16:1MeH<sup>+</sup>), 271(C16:0MeH<sup>+</sup>), 297(C18:1MeH<sup>+</sup>) 등으로 나타났다.

질량 200 이상의 주요피크에 의한 이들 질량스펙트럼의 비교에서 *E. coli*의 경우는 다른 두 물질에서는 나타나지 않는  $m/z$  243, 251, 261, 279, 311 등의 피크에 의하여 분명한 구분이 이루어졌다.

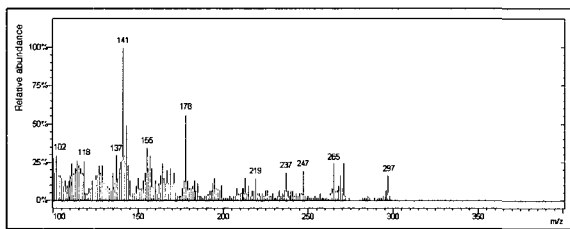
그러나, *Pseudomonas fluorescens*와 *Acinetobacter calcoaceticus*는 관찰되는 주요피크와 그 특징이 매



(a)



(b)



(c)

[그림 3] 그람음성 박테리아 물질의 속(genus) 상호간 질량 스펙트럼 비교;  
(a) *E. coli*, (b) *Pseudomonas fluorescens*,  
(c) *Acinetobacter calcoaceticus*

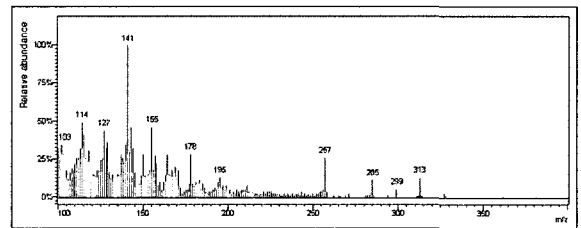
우 유사하여 속 상호간 구분이 거의 불가능함을 알 수 있었다.

라. 종(species) 상호간의 질량스펙트럼 비교

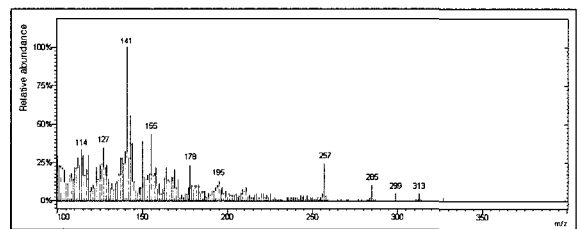
그림 4에는 같은 속에 속하는 두 물질인 *Staphylococcus epidermidis*와 *Staphylococcus aureus*의 열분해 질량스펙트럼을 나타내었다.

질량스펙트럼에서 관찰되는 질량 200 이상의 주요 피크는 *Staphylococcus epidermidis*와 *Staphylococcus aureus* 모두  $m/z$  257(C15:0MeH<sup>+</sup>), 285(C17:0MeH<sup>+</sup>), 299(C18:0MeH<sup>+</sup>), 313(C19:0MeH<sup>+</sup>) 등으로 거의 동일하였다. 이러한 경향은 종이 다른 *Bacillus cereus*와 *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas fluorescens*와 *Pseudomonas aeruginosa* 그리고 *Acinetobacter calcoaceticus*와 *Acinetobacter baumannii* 관계에서도 확인할 수 있었다.

실험 결과에서 같은 속에 속하면서 종이 다른 물질의 경우 질량스펙트럼 상의 질량 200 미만뿐만 아니라 질량 200 이상의 주요피크와 그 형태가 매우 유사함을 알 수 있어 종 상호간 구분이 거의 불가능함을 확인 하였다.



(a)



(b)

[그림 4] 같은 속에 속하면서 종이 다른 물질의 질량 스펙트럼 비교; (a) *Staphylococcus epidermidis*, (b) *Staphylococcus aureus*

마. 단백질의 열분해 질량스펙트럼 비교

단백질은 열분해 과정에서 여러 종류의 디펩티드(dipeptide)가 고리화된 diketo-piperazine(DKP)류를 생성하는 것으로 알려져 있으며, 다양한 종류의 DKP와 자유아미노산에 의해서 얻어진 질량스펙트럼은 아주 복잡한 경향을 나타내었다. 그림 5는 이러한 단백질의 열분해 질량스펙트럼을 Ovalbumin과 Bovine albumin에서 보여주고 있다.

이들 질량스펙트럼의 특징은 DKP 분자 내 메틸화 과정에서 수소가 메틸기로 치환되는 개수에 따라 14amu 씩 차이가 나는 피크들의 규칙성에 있으며, 질량스펙트럼 상에서 순차적인 큰 봉우리 형태로 나타나고 있다. 표 2에는 이러한 특성을 좀 더 자세히 살펴보기 위해서 4가지 단백질 물질에서 측정된 주요 피크와 규칙성을 비교하여 보여주고 있다. 표에서 각 일련의 피크들은 14amu의 질량 차이가 있음을 알 수 있으며, 특히 밑줄로 그어진 부분의 피크들은 4가지 단백질 모두에서 공통적인 특징으로 관찰된 것들이다.

단백질 질량스펙트럼의 또 다른 특징은 DKP가 메틸화된 후 에탄올 CI 방법으로 이온화되어 측정된 주요 피크들이 홀수의 질량 값을 갖는다는데 있다. 물론 질량스펙트럼 상에는 짝수의 질량 값을 갖는 피크들이 홀수의 질량 값을 갖는 피크와 거의 같은 수만큼

[표 2] 단백질에서 측정된 주요피크와 규칙성 비교

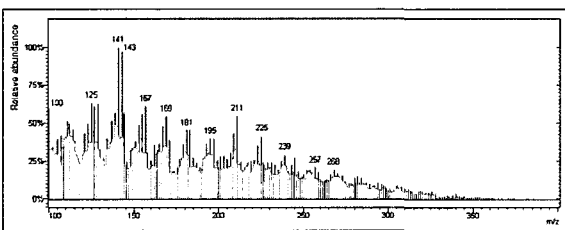
종 류	주요피크 (m/z)
Ovalbumin	<u>111, 125, 139, 153, 167, 181, 195, 209, 223, 237</u> <u>123, 137, 151, 165, 179, 193, 207</u> <u>127, 141, 155, 169, 183, 197, 211, 225, 239, 253</u> <u>129, 143, 157, 171</u>
Bovine albumin	<u>111, 125, 139, 153, 167, 181, 195, 209, 223</u> <u>109, 123, 137, 151, 165, 179, 193, 207, 221</u> <u>127, 141, 155, 169, 183, 197, 211, 225</u> <u>115, 129, 143, 157, 171, 185, 199</u>
Gelatin	<u>111, 125, 139, 153, 167, 181, 195</u> <u>109, 123, 137, 151, 165</u> <u>113, 127, 141, 155, 169, 183, 197, 211, 225</u> <u>129, 143, 157, 171, 185, 199, 213</u> <u>107, 121, 135, 149</u>
Hemoglobin	<u>111, 125, 139, 153, 167, 181, 195, 209, 223, 247</u> <u>109, 123, 137, 151, 165, 179, 193, 207</u> <u>127, 141, 155, 169, 183, 197, 211</u> <u>129, 143, 157, 171</u> <u>245, 259</u>

존재한다. 그러나, 피크의 세기는 일반적으로 짝수의 질량 값을 갖는 피크들이 홀수 질량 값을 갖는 피크들에 비해서 작아 전체적으로 두드러진 경향을 나타내지 않고 있다. 이러한 홀수 질량피크들이 두드러지는 특징은 박테리아에서 관찰되는 질량피크와는 다른 경향을 나타내고 있으며 박테리아와 단백질을 구분하는데 좋은 정보를 제공하였다.

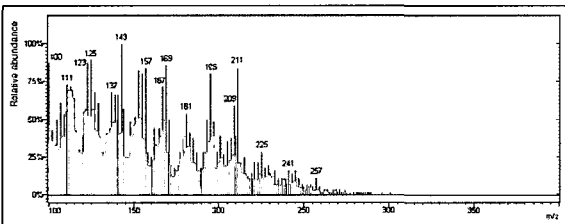
단백질의 열분해 질량스펙트럼 내에서 관찰되는 이러한 피크들의 규칙성과 상호 연관성은 박테리아와 구분되는 단백질만의 중요한 특성을 제공하지만, 사용한 4가지 단백질들 상호간의 식별은 매우 어렵게 하는 경향이 있었다.

바. 환경물질의 질량스펙트럼 비교

대표적인 불철 환경물질인 송화가루와 부유먼지의 열분해 질량스펙트럼을 얻었다. 이 중 송화가루의 질량스펙트럼을 그림 6에 보여주고 있다. 송화가루에서 관찰된 주요피크로는 질량 200 미만에서 m/z 109, 121, 137, 161, 177, 193 등이며, 질량 200 이상에서 m/z 245, 247(C18:1MeH<sup>+</sup>-50), 263, 265(C18:1MeH<sup>+</sup>-32), 271(C16:0MeH<sup>+</sup>), 297(C18:1MeH<sup>+</sup>) 등이

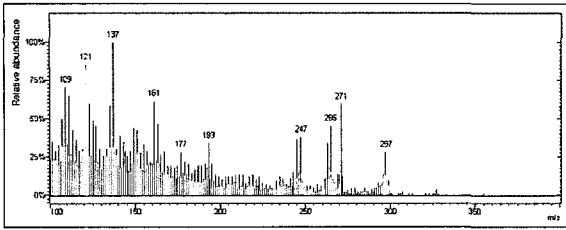


(a)



(b)

[그림 5] 단백질의 열분해 질량스펙트럼 비교; (a) Ovalbumin, (b) Bovine albumin



[그림 6] 송화가루의 열분해 질량스펙트럼

었다. 송화가루의 질량 200 미만의 주요피크에서 보여지는 특징은 박테리아와 단백질과는 분명한 차이점이 발견되었다. 그러나, 질량 200 이상의 경우는 그람 음성 박테리아의 특성과 매우 유사함을 알 수 있었다.

한편, 부유먼지의 경우 질량스펙트럼에서 관찰되는 특정한 의미를 갖는 피크는 거의 없었다.

사. 통계학적 기법을 이용한 분석

주성분 분석(principal component analysis : PCA) 방법이 열분해 질량분석을 통한 박테리아와 단백질의 특성을 통계학적으로 연구하기 위한 기법으로 사용되었다. 송화가루를 포함한 17종의 생물시료에 대해서 측정된 35개의 질량스펙트럼을 분석에 이용하였다. 각 질량스펙트럼으로부터 200 미만(100~200amu)에서 18개 주요피크와 200 이상(200~450amu)에서 21개의 주요피크들을 PCA 과정의 변수로 선택하였다. 표 3은 이러한 각각의 피크들이 갖는 분석적 의미를 보여주고 있다.

선택한 주요변수 39개는 각 질량스펙트럼에서 기준 피크(base peak)에 대한 피크세기의 정보를 갖고 있다.

그러나, 이러한 질량스펙트럼은 기준피크가 서로 다를 수 있을 뿐만 아니라 같은 시료에서 얻은 질량스펙트럼에서도 개개의 피크에 대한 상대적인 세기와 형태는 많은 차이를 나타낼 수 있다. 이러한 차이점을 보정해 주기 위해서 변수가 갖는 피크세기 정보를 정규화(normalization) 하는 과정을 거쳤다.

$$x_{i,j}^* = x_{i,j} \cdot 1000 / \sqrt{\sum_{j=1}^n x_{i,j}^2}$$

여기서,  $x_{i,j}^*$ 는  $i$  질량스펙트럼 내에서  $j$ 의 질량을 갖는 이온( $x_{i,j}$ )에 대한 정규화된 피크세기를 나타내며 1000은 비례상수(constant scaling factor),  $n$ 은  $i$  질

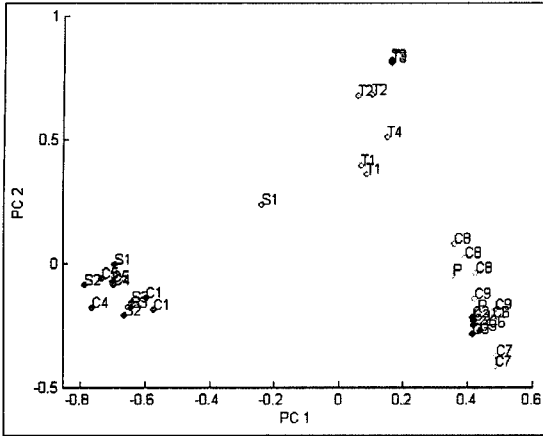
[표 3] PCA 방법에 이용한 변수(선택된 피크)가 갖는 의미

선택된 피크 (m/z)	피크의 성격	비 고
127, 137, 143, 155, 195	생물학 물질(박테리아&단백질)의 공통된 성격을 크게 갖는 피크	생물학 물질의 주요 피크
150, 164, 178	박테리아의 성격을 크게 나타내는 피크	세포&포자
138, 196	박테리아 포자성 물질의 성격을 크게 나타내는 피크	DPA에 의한 피크
125, 129, 157, 169, 171, 181, 187, 199	단백질의 성격을 크게 나타내는 피크	주로 DKP류에 의한 피크
215, 219, 233, 237, 241, 243, 247, 251, 257, 261, 265, 269, 271, 279, 283, 285, 297, 299, 311, 313, 327	박테리아의 구체적인 확인에 이용되는 피크(그람양성&그람 음성, 속(genus) 상호간 구분 등)	지방산에 의한 피크

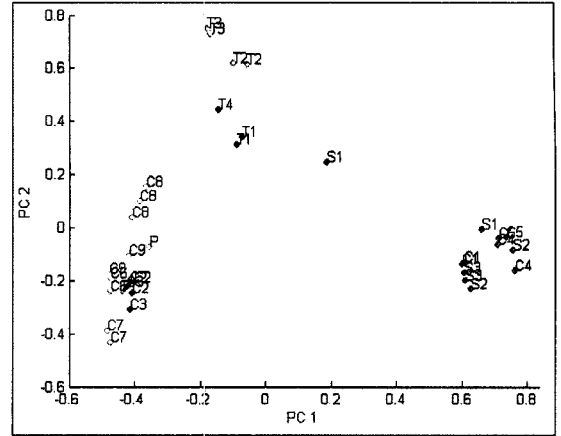
량스펙트럼에서 지정된 변수의 수를 각각 나타낸다.

한편, 대부분의 물질에서는 m/z 141이 기준피크로 나타나면서 다른 주요피크들보다 매우 크게 나타나 실제 PCA 과정에서는 이 피크가 차지하는 영향을 줄여주기 위해서 141을 변수에서 제외하였다.

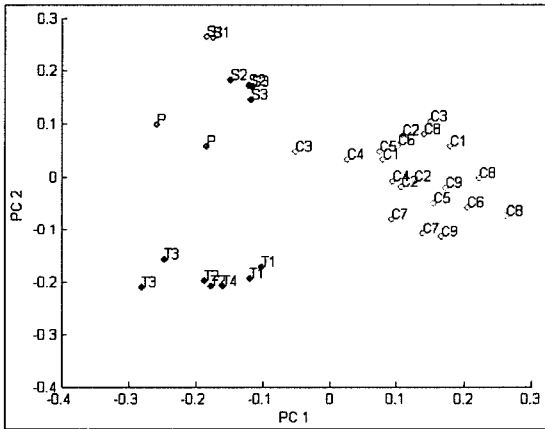
그림 7은 시료 35개에 대해서 주요변수 39개의 정보를 이용한 PCA 도시를 보여주고 있으며, 이 과정에서 정규화 과정은 m/z 100~200 구간과 m/z 200~450 구간의 변수로 나누어서 실시하였다. 이 과정을 통하여 m/z 200 이상 변수들의 영향을 상대적으로 크게 하도록 하였다. 선택한 총 PC의 수는 9개였으며, PC1과 PC2는 총 분산의 67.10%를 차지하였다. 여기서 분산 값은 PCA 도시 과정에서 선택한 PC들의 대표성을 나타내고 있다. 그림 7에서 그람양성 박테리아, 그람음성 박테리아, 그리고 단백질 종이 비교적 잘 분리되어 군집을 이룬 것을 볼 수가 있었다. 또한, C2(*E. coli*)와 C3(EH)의 경우 그람음성 박테리아 내에서도 어느 정도 분리가 되는 것을 볼 수 있었다. 그러나, 그람양성 박테리아에서 세포성 물질과 포자성 물질은 분리가 이루어 지지 못하였고, 송화가루



[그림 7] PC1과 PC2를 이용한 생물학 물질의 PCA 도시1(질량범위 100~450amu의 변수 39개 사용)



[그림 9] PC1과 PC2를 이용한 생물학 물질의 PCA 도시3(질량범위 200~450amu의 변수 21개 사용)



[그림 8] PC1과 PC2를 이용한 생물학 물질의 PCA 도시2(질량범위 100~200amu의 변수 18개 사용)

도 그람음성 박테리아에 가깝게 분류되었다.

그림 8은 시료 35개에 대하여 질량범위 100~200 amu의 18개 변수를 이용한 PCA 도시를 보여주고 있다. 이러한 변수의 선택은 m/z 200 미만의 주요피크가 전체 질량스펙트럼에 미치는 영향을 관찰하기 위해서였다. 선택한 총 PC의 수는 8개였으며, PC1과 PC2는 총 분산의 50.32%를 차지하였다. 그림 8에서 박테리아 세포성 물질(C1~C9), 포자성 물질(S1~S3), 단백질 중(T1~T4), 그리고 송화가루(P)의 네 부분으로 군집이 크게 형성되었다.

그러나, 이 질량범위에서의 변수 선택은 박테리아 세포성 물질의 그람양성 및 그람음성 구분과 같은 세부적인 분류에는 전혀 효과적이지 못함을 알 수 있었다.

그림 9는 시료 35개에 대하여 질량범위 200~450 amu의 변수 21개를 사용한 PCA 도시를 보여주고 있다.

이 변수들은 주로 지방산의 메틸유도체에 의한 피크들이다. 선택한 총 PC의 수는 6개였으며, PC1과 PC2는 총 분산의 75.15%를 차지하였다. 그림 9에서 우측 하단에 그람양성 박테리아, 좌측 중·하단에 그람음성 박테리아, 그리고 상단에 단백질 중으로 크게 군집이 이루어진 것을 볼 수 있었다. 또한, 그람음성 박테리아, 단백질 중, 그리고 그람양성 박테리아의 일부가 상호간 분류가 이루어진 것을 볼 수 있었다.

그러나, 그람양성 박테리아의 세포성 물질과 포자성 물질은 이 과정에서 분류가 되지 않았으며, 송화가루는 역시 그람음성 박테리아와 유사하게 분류되었다.

지금까지의 주성분 분석에 의한 도시들은 앞 절에서 분석한 각 물질들의 질량스펙트럼 특징들을 잘 포함하는 분류학적인 결과를 제공하였다.

#### 4. 결론

본 논문에서는 자체 제조한 열분해기를 장착한 열



분해 질량분석기를 이용하여 박테리아, 단백질 등 주요 생물학 물질의 열분해 질량스펙트럼을 얻었다.

측정된 질량스펙트럼의 주요피크 선택은 질량범위 100~200amu와 200~450amu로 나누어서 실시하는 것이 효과적이었다. 질량범위 100~200amu의 주요피크들은 박테리아, 단백질, 환경물질 등 생물학 물질을 종류별로 분류할 수 있는 중요한 결과를 제공하였으며, 특히 박테리아 경우 세포성 물질과 포자성 물질을 분류할 수 있는 특징적인 피크들도 이 범위에서 관찰되었다. 질량범위 200~450amu에서는 박테리아 내에 분포하는 지방산의 메틸유도체에 의한 주요피크들이 폭넓게 관찰되어 박테리아의 일부 속 분류에 필요한 결과를 제공하였다.

PCA의 통계학적 분석을 통하여 주요 생물학 물질이 박테리아(세포성&포자성), 단백질, 그리고 환경물질로 잘 분류되는 것을 확인하였으며, 특히 박테리아의 경우 그람양성 및 그람음성으로도 잘 분류되는 것을 확인하였다.

그러나, 박테리아의 세부적인 분류 및 식별의 과정에 있어서 그람양성 박테리아에서는 종 수준뿐만 아니라 속간 구분도 거의 불가능한 것으로 판단되었으며, 그람음성 박테리아일 경우 속 범위에서 일부 물질의 분류가 가능한 것으로 판단되었다.

### 참 고 문 헌

- [1] M. Xu and K. J. Voorhees, "Differentiation and classification of user-specified bacterial groups by in situ thermal hydrolysis and methylation of whole bacterial cells with *tert*-butyl bromide chemical ionization ion trap mass spectrometry", *Analytica Chimica Acta*, Vol. 418, 2000, pp.119~128.
- [2] K. J. Hart, M. B. Wise, W. H. Griest and S. A. Lammert, "Design, development, and performance of a fieldable chemical and biological agent detector", *Field Anal Chem Tech*, Vol. 4(2-3), 2000, pp.93~110.
- [3] M. Xu, K. J. Voorhees and T. L. Hadfield, "Repeatability and pattern recognition of bacterial fatty acid profiles generated by direct mass spectrometric analysis of in situ thermal hydrolysis/methylation of whole cells", *Talanta*, Vol. 59, 2003, pp.577~589.
- [4] V. R. Vepachedu and P. Setlow, "Analysis of the germination of spores of *Bacillus subtilis* with temperature sensitive *spo* mutations in the *spoVA* operon", *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 239, 2004, pp.71~77.
- [5] A. D. Hendricker and Kent J. Voorhees, "Amino acid and oligopeptide analysis using Curie-point pyrolysis mass spectrometry with in-situ thermal hydrolysis and methylation: mechanistic considerations", *J. Anal. Appl. Pyrolysis* Vol. 48, 1998, pp.17~33.
- [6] 최선경, "열분해 질량분석법을 이용한 생물학 물질의 특성 연구", *한국군사과학기술학회지*, 제7권 제3호, 2004, pp.110~121.
- [7] J. P. Dworzanski, A. Tripathi, A. P. Snyder, W. M. Maswdeh and C. H. Wick, "Novel biomarkers for Gram-type differentiation of bacteria by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry", *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, Vol. 73, 2005, pp.29~38.
- [8] P. Miketova, C. Abbas-Hawks, K. J. Voorhees and T. L. Hadfield, "Microorganism Gram-type dim-type differentiation of whole cells based on pyrolysis high-resolution mass spectrometry data", *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, Vol. 67, 2003, pp.109~122.
- [9] A. J. Madonna, K. J. Voorhees and T. L. Hadfield, "Rapid detection of taxonomically important fatty acid methyl ester and steroid biomarkers using in situ thermal hydrolysis/methylation mass spectrometry (THM-MS): implications for bioaerosol detection", *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, Vol. 61, 2001, pp.65~89.