바이오시스템공학 (*J. of Biosystems Eng.*)
Vol. 30, No. 4, pp. 249~253 (2005)

효소 전극을 이용한 유산균 측정 바이오센서 개발

박두산 조성인

Development of an Enzyme Electrode Biosensor for Lactic Acid Bacteria

T. S. Park S. I. Cho

Abstract

This study was carried out to develop enzyme biosensor for lactic acid bacteria. Lactic acids produced by lactic acid bacteria (LAB) was measured and good correlation R^2=0.98 between LAB count and lactic acids concentration was found. Hydrogen ion produced by L-lactate dehydrogenase (L-LDH) was measured by a potentiometer. Glutamic-pyruvic transminase (GPT) was used for eliminating inhibitor in the reaction. Polyacrylamide gel was used for immobilizing matrix of the sensor. The biosensor was tested and showed good feasibility with R^2=0.99 on validation.

Keywords : Biosensor, Enzyme, Lactic acid bacteria, Lactate, Glutamic-pyruvic transminase

1. 서 론

다양한 센서가 개발되고 있는 가운데 화학물질의 농도 측정, 식품의 독소 혹은 유해 미생물의 측정, 그리고 인체에 관련된 센서를 개발하고자 하는 접근이 시도되고 있다. 특히, 생물학적 혹은 화학적 물질을 측정용 바이오센서의 연구가 활발하게 진행되고 있다.

최초의 바이오센서는 Clark와 Lyons(1962) 등이 pH 전극에 효소를 고정하여 glucose를 검출한 것이다(Eggins, 2002). 바이오센서는 생체물질의 반응 특이성을 이용하여 항원, 항체, 효소, 핵산, 미생물, 조직, 세포, 호르몬 감지물질 등을 신호변환기에 접합시켜 물질을 선택적으로 감지하거나 농도를 측정하는 장치이다.

신호변환기는 주로 전기화학적 방법을 사용하며, 형광, 발색, SPR(surface plasmon resonance), FET(field-effect transistor), 열 센서 등 다양한 물리화학적 방법도 사용한다(김민곤, 2002). 바이오센서는 측정 물질에 대한 특이성(specificity)이 좋으며, 민감도(sensitivity)가 높은 특징으로 인해 꾸준한 연구와 실용화에 대한 모색이 이루어지고 있다.

유산균(Lactic acid bacteria; LAB)은 인체 소장과 대장 내의 유해 미생물 성장을 억제하고, 설사 질환을 예방하거나 치료하고, 면역력을 높여주고, 혈청 콜레스테롤을 저하시키는 이로운 기능을 갖는다. 유산균 발효식품이 장수식품으로서 장의 건강에 도움을 준다는 점이 알려지면서 유산균 발효 음료의 소비가 늘고 다양한 유산균 음료가 개발, 판매되고 있다 (Ko 등, 1994; 백, 1997).

유산균을 계측하기 위한 일반적인 방법으로 배지 내 유산균의 일부분을 획득하여 육안이나, 현미경을 통해 유산균의 수를 직접 세는 미생물학적 방법을 사용한다. 하지만, 미생물학적 방법은 시료에 대한 전처리가 필요하고 오랜 시간(24~48시간)이 걸리며, 눈으로 직접 세어야 하는 단점이 있다. 유산균이 발효과정 중에 생성하는 물질들인 acetic acid, lactic acid, citric acid의 양을 chromatography를 통해 얻어내어 유산균의 양을 측정하는 방법은 고가의 장비와 측정할 때마다 소요되는 경비가 문제이다.

유산균 발효과정에서 생성되는 물질과 관련하여 Sivakesava 등(2001)은 젖산과 세포밀도를 측정하기 위해 FT-MIR(Fourier transform mid infrared)의 획득된 파장별 흡광 데이터를 이용

The article was submitted for publication in June 2005, reviewed and approved for publication by the editorial board of KSAM in August 2005. The authors are Tu San Park, graduate student, Seong In Cho, Professor, School of Biosystems Engineering, Seoul National University. The corresponding author is S. I. Cho, Professor, School of Biosystems Engineering, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea; Fax : +82-2-880-4606; E-mail : <sicho@snu.ac.kr>

하였고, Zhang 등(2001)은 ion chromatography법과 석영 압전소자(series piezoelectric quartz crystal; SPQC)법을 조합하여 *Lactobacillus* 발효과정 중 젖산 생성 비율에 대한 모니터링을 하였다.

이와 같이 유산균을 직접 측정하는 방법 보다 유산균이 생성하는 젖산을 비롯한 유기산을 측정하는 방법의 사용빈도가 점차 높아지고 있다. L-lactate를 측정하기 위해 Yoon(1995)은 L-lactate dehydrogenase(LDH)와 NAD^+를 동시에 포집하여 후막소자기법을 이용한 바이오센서를 개발한 바 있고, Kim 등(1998)은 젖산을 측정하기 위해 L-lactate oxidase를 nylon포에 고정화하고 산소전극에 접합한 바이오센서를 제작하였다.

Mizutani 등(1995, 1996)은 poly-ion complex layer에 L-lactate oxidase(LOD)를 고정화하여서 혈청과 우유에서 L-lactate를 검출하는 전극을 개발하였고, 이어서 전류형 전극에 L-lactate oxidase와 복합이온을 입힌 고분자 막을 고정시켜 flow injection analysis(FIA)를 적용하여 L-lactate를 측정하였다. Casimiri와 Burstein(1996)은 산소전극에 LOD와 LDH를 'UltraBind' film에 고정한 바이오센서를 개발한 바 있다.

유산균 혹은 L-lactate를 측정하기 위해 본 연구에서는 3종류의 효소를 전극에 고정하여 유산균을 측정할 수 있는 바이오센서를 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 발효과정 중의 유산균 수와 유기산 농도의 측정

*Lactobacillus acidophilus kctc 0404*와 BD(Becton, Dickinson)사의 Lactobacilli MRS Broth와 Bacto peptone, 덕산社의 Agar powder를 이용하여 발효과정의 유산균 수의 변화를 관찰하였다.

배양액은 그림 1과 같이 MRS broth 22.5 g과 증류수 500 ㎖를 교반기로 섞고, 21개의 screw cap tube에 각각 10 ㎖씩 주입하였다. 배양액이 담긴 screw cap tube를 121℃에서 20분간 멸균 후, 배양액을 37℃로 냉각시켜 균주 100 ㎕를 멸균된 배양액에 각각 접종시키고 37℃ 조건에서 배양하였다(김현욱, 1988).

발효가 일어나지 않은 시료부터 30분 간격으로 8시간, 그 이후에는 1시간 간격으로 시료를 발효조에서 꺼내어 총 21개 시료의 유산균의 수(cfu/ml)를 측정하였다. 유산균 수의 측정은 미생물학적 방법인 총 균수법을 사용하였다.

유기산의 농도 측정은 발효시간에 따른 유기산의 생성량을 분석하기 위해 유산균 수를 측정하기 위해 발효시켰던 21개의 시료에 대한 IC(ion chromatography) 분석을 하였다. IC 분석은 서울대학교 농업과학공동기기센터(NICEM)에 의뢰하였다. 이때, 관심 유기산은 유산균이 발효과정에서 생성하는 주요 물질인 L-lactate, citrate, acetate로 하였다.

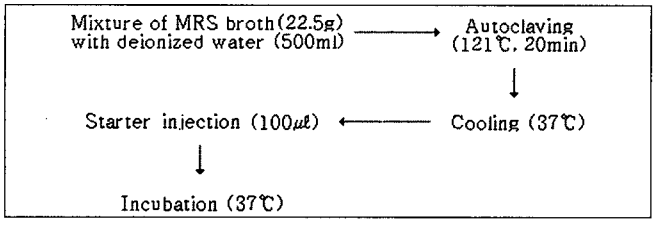

Fig. 1 Fermentation process of LAB.

나. L-lactate 측정 가능성 분석

L-lactate를 측정하기 위해 효소 반응을 통한 측정 가능성에 대한 분석이 필요하여 이에 따라 효소 반응 실험을 수행하였다. 사용된 시약과 효소는 다음과 같다.

L(+)-lactate(2-Hydroxypropionic Acid), sodium L-glutamate, NAD+(Nicotinamide adenine dinucleotide, EC 2.7.1.23, type IV, from chicken liver, 10 Units/mg), GPT(Glutamic-Pyruvic Transaminase, EC 2.6.1.2, from Porcine Heart, 90 Units/mg)를 Sigma 社로부터, Fluka 社의 L-LDH(L-lactate dehydrogenase, EC 1.1.1.27, from rabbit muscle, 215 Units/mg)를 정제과정 없이 사용하였다. 실험에 사용된 모든 용액은 증류수를 사용하여 제조하였다.

그림 2와 같이 효소 반응에 의한 수소이온 발생 정도를 pH 미터로 측정하였는데, L-lactate의 농도에 비례하여 수소이온 농도 또한 증가하기 때문이다.

하지만, L-LDH의 반응성이 L-lactate 보다 pyruvate와 우월하게 나타나기 때문에 효소 반응에 의해 생성되는 pyruvate가 저해제 역할을 하게 된다. 이점을 해결하기 위해 GPT를 사용하여 pyruvate를 L-alanine으로 치환하였다. 따라서 전체 반응식은 그림 3과 같았다.

센서에 고정할 효소량(L-LDH)을 결정하기 위해 일정 농도

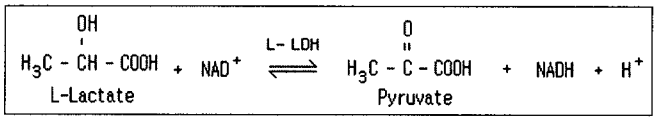

Fig. 2 Reaction of L-lactate with L-LDH.

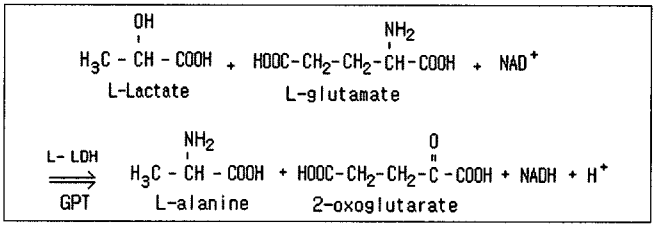

Fig. 3 Reaction of L-lactate with L-LDH and GPT.

의 L-lactate가 효소농도 변화에 따라 보이는 반응 속도 역시 측정하였다.

다. 센서 개발

효소를 센서에 고정하기 위해 선택한 담체는 poly-acrylamide gel이다. 담체를 전위차 측정 전극(9157BN, Orion社)에 접합시키기 위해 Sigma 社의 Acrylamide electrophoresis reagent, N, N'-methylenebisacrylamide electrophoresis reagent, ammonium persulfate, N, N, N', N'-tetramethylethy lenediamine (TEMED)을 사용하였다. 효소를 고정시킬 전극부에는 먼저 10%의 acrylamide 300 ㎕, 2% BIS 600 ㎕를 575 ㎕의 3차 증류수와 섞고 L-LDH, NAD, GPT, sodium L-glutamate를 제조한 용액 내에 각각 5 mg, 1 mg, 10 ㎕, 5 mg씩 넣고 섞었다. 다음, 2.5%의 ammonium persulfate 15 ㎕와 0.5%의 TEMED 10 ㎕를 넣고 상온에서 반응시켜서 효소가 고정된 poly-acrylamide gel을 전극에 성형하여 접합하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 발효과정 중의 유산균 수와 유기산 농도 간의 상관관계

발효가 진행됨에 따라서 유산균 수는 전형적인 미생물 증가 곡선을 나타냈으며, 발효 최종 시료의 균수는 2.85×10^9 cfu/ml 이었다(그림 4).

IC를 이용해 측정한 유산균 발효과정에서의 유기산 농도 변화는 그림 5와 같았다. L-lactate의 농도 변화는 유산균 수의 증가 형태와 유사한 증가를 보였지만, acetate와 citrate는 그 농도가 일정한 경향을 보였다. 유산균 수와 L-lactate 농도의 상관관계는 회귀분석에 의해 R^2=0.984의 관계를 보여(그림 6), 식 (1)을 통해 L-lactate의 농도 측정으로 유산균 수의 예측이 가능하였다.

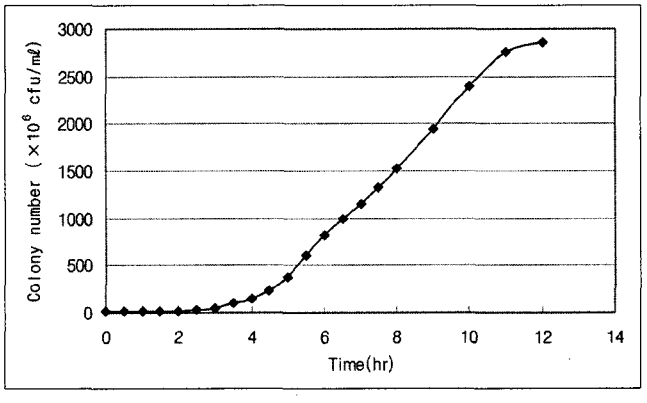

Fig. 4 Colony number of lactic acid bacteria during fermentation.

$$y = 108.82x - 87.437 \quad (1)$$

x = L-lactate의 농도(mg/mL)

y = 유산균 수(colony forming unit; $\times10^6$ cfu/㎖)

나. L-lactate 측정 가능성 분석

효소반응을 이용한 L-lactate 측정 가능성 분석을 위해 5단계의 L-lactate 농도에 따라 생성되는 수소이온 농도를 측정하였다. 반응에 필요한 L-LDH, L-glutamate, NAD, GPT를 5개의 시험관에 각각 10 mg, 20 mg, 2 mg, 10 ㎕씩 넣고 3.996 ㎖, 3.98 ㎖, 3.96 ㎖, 3.88 ㎖, 3.8 ㎖의 증류수와 함께 섞었다. 이 때, 초기 pH를 측정하고 0.004 ㎖, 0.02 ㎖, 0.04㎖, 0.12 ㎖, 0.2 ㎖의 L-lactate를 시험관에 떨어뜨림과 동시에 pH의 변화를 살펴보았다. 각 시료는 0.1%, 0.5%, 1%, 3%, 5%의 L-lactate 농도를 갖게 되며 그림 7은 반응 실험의 결과를 나타낸다.

초기 pH는 동일한 조건에서 L-lactate를 투여함과 동시에 pH는 급격히 감소하며, L-lactate의 농도가 높을수록 수소이온 농도가 증가함을 보였다.

전극에 고정할 L-LDH 량을 결정하기 위한 실험은 5개의

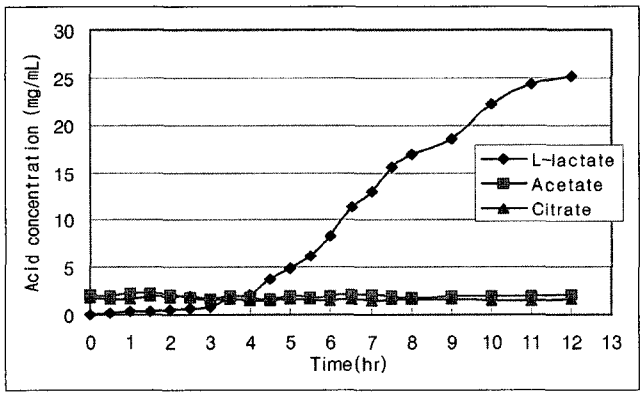

Fig. 5 Acid concentration variation during fermentation.

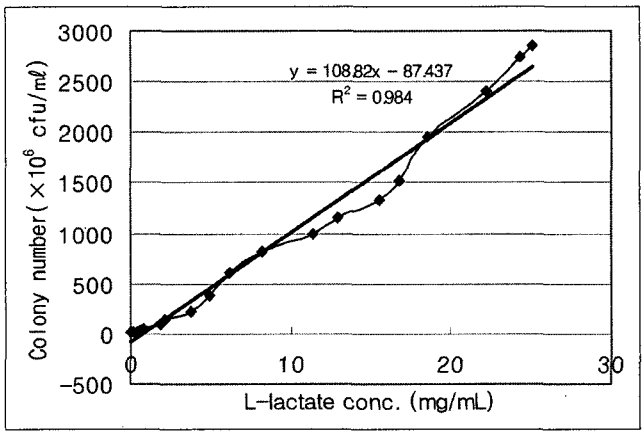

Fig. 6 Correlation between L-lactate concentration and lactic acid bacteria colony number.

시험관에 L-glutamate, NAD, GPT를 각각 20 mg, 1 mg, 10 $\mu\ell$ 씩 준비하고, 효소량에 대한 변이를 주기 위해 L-LDH를 각각 0.1 mg, 0.5 mg, 1 mg, 3 mg, 5 mg씩 넣고 990 $\mu\ell$의 증류수와 함께 섞고 pH를 측정하였다. 10 $\mu\ell$의 L-lactate를 떨어뜨림과 동시에 pH 변화를 살펴봄으로써 1%의 L-lactate를 기준으로 L-LDH의 적절한 농도를 결정지을 수 있었다. 그 결과 그림 8과 같이 효소 농도에 따른 반응 속도 차이가 났으며, 5 mg의 L-LDH 경우 1%의 L-lactate와 반응하여 안정상태에 이르기까지 10초 정도 소요되었으며, 안정상태의 90%에 이르는데 5초미만이 소요되었다.

다. 센서의 성능평가

배양된 유산균으로 측도를 설정하거나 검증을 할 경우, 표준평판법으로 유산균의 수를 측정해야하나 소요되는 시간에 의해 측정시점의 차이가 발생하게 된다. 따라서 정확한 측도 설정이 어렵기 때문에 L-lactate의 농도에 대한 측도 설정과 검증을 하였다. 센서의 측도설정을 위해 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5% 1%, 2%의 L-lactate 농도에서 센서의 출력 전압을 측정하였다. 7단계로 L-lactate의 농도 범위를 정한 것은 유산균 발효과정에서 L-lactate가 최대 2.09%까지 나타났기 때문이다. mV의 전위차를 측정하게 되는 전극은 그림 9와 같이 선형의 측도를 가졌으며, 출력 전압과 L-lactate 간의 상관관계가 높게 나타났으며(R^2=0.9959), 관계식은 식 (2)와 같다.

그림 10은 실제 센서의 모습이며, 전극에 효소가 고정된 polyacrylamide gel이 성형되기 이전과 성형된 후의 모습이다.

$$y = 0.0719x - 16.576 \quad (2)$$

x = 센서로부터 측정된 값(mV)

y = L-lactate의 농도(%)

그림 9에서 보는 바와 같이 센서의 측정값이 230 mV 이하일 경우에는 유산의 농도가 0이라고 할 수 있다. 따라서 유산균의 colony 개수도 0이거나, 발효가 시작되기 이전의 상태라고 할 수 있다. 또한, 측정값이 258.4 mV 이상일 경우 발효가 충분히 일어난 상태이고, 유산균 수는 2.8×10^9 cfu 정도 된다고 할 수 있다. 측도의 표준오차는 0.724이었다.

측도 설정으로부터 얻은 식 (2)의 검증을 위해 0.007%, 0.025%, 0.075%, 0.25%, 0.75%, 1.5%, 1.75%의 L-lactate 농도를 센서로 측정하였다. 검증 실험의 결과는 그림 11과 같고, R^2=0.9919의 높은 상관관계를 나타내었다.

식 (1)의 유산균 수와 L-lactate 농도간의 상관관계, 그리고 식 (2)에서 L-lactate 농도와 센서의 출력 전압간의 관계가 1차식으로 표현된다. 그러므로 유산균 수와 출력 전압간의 관계도 선형 관계가 성립한다. 따라서 유산균 수 측정을 위한 센서로서 본 연구에서 개발한 바이오센서의 활용 가능성은 밝을 것으로 판단된다.

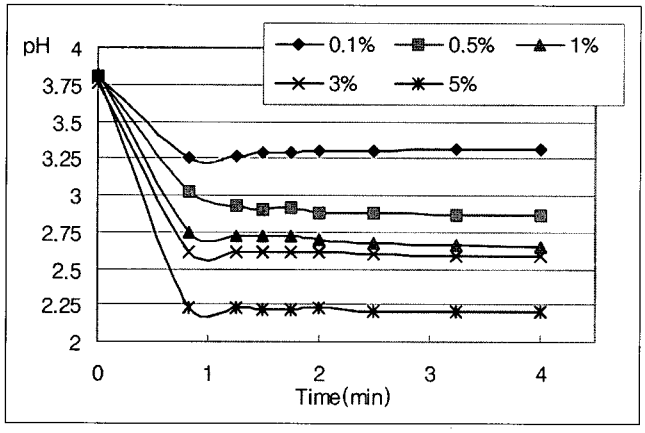

Fig. 7 Reaction curve on various concentration of L-lactate with L-LDH, NAD, L-glutamate, and GPT.

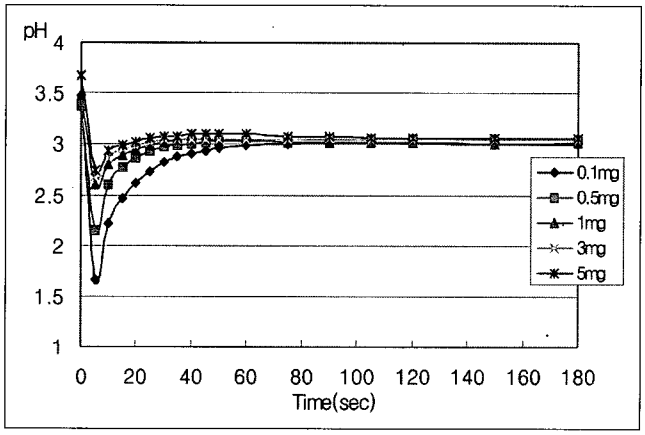

Fig. 8 pH changes trend with different L-LDH concentrations on constant L-lactate concentration.

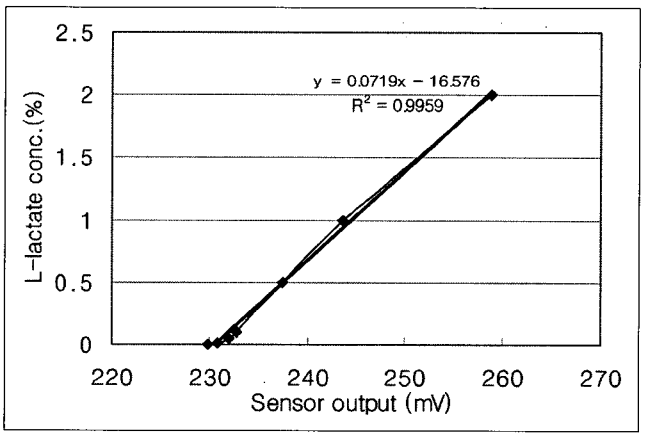

Fig. 9 Calibration on L-lactate concentration with output voltage (mV) from sensor.

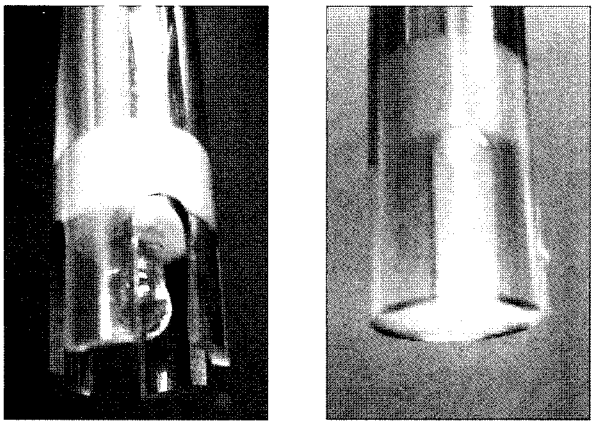

Fig. 10 Sensor image before and after enzyme immobilizaton at polyacrylamide gel.

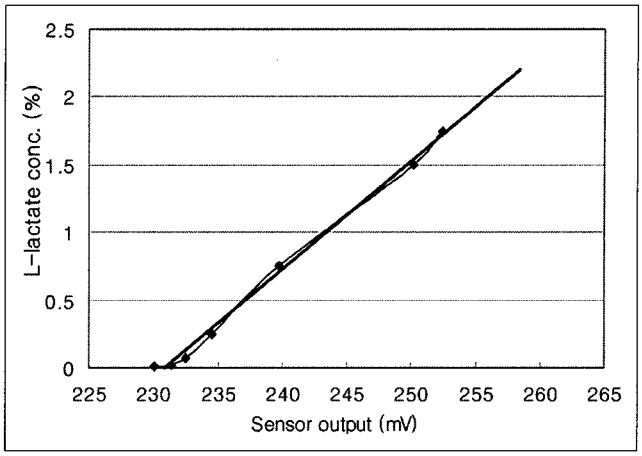

Fig. 11 Validation on L-lactate concentration with output voltage (mV) from sensor.

4. 요약 및 결론

발효과정에서 유산균의 농도에 따른 L-lactate의 농도 변화는 미생물학적 방법의 배양 및 계수, 그리고 ion chromatography를 이용하여 상관관계를 찾았으며 R^2=0.984로 나타났다.

L-lactate를 측정하기 위한 효소의 반응실험에서는 L-lactate의 농도에 따라 수소이온 농도가 변화하였다.

센서 개발을 위해 Polyacrylamide gel에 L-LDH, NAD, GPT, sodium L-glutamate를 고정하여 측도를 설정한 결과 선형 관계식과 R^2=0.9919의 상관관계를 얻을 수 있었다.

유산균 농도와 L-lactate 농도간의 관계가 구명되었기 때문에 효소 반응을 통해 생성된 수소이온 농도로부터 발생한 출력 전압에 의해 유산균의 수를 예측할 수 있었다.

바이오센서는 성능을 유지하면서 긴 수명을 갖도록 설계하는 것이 매우 중요하다. 또한, 센서 제작의 재현성은 실제로 사용할 수 있는 센서를 개발하기 위한 큰 관건이다. 따라서 효소의 고정방법에 따른 성능 분석, 고정화 과정에서 효소 활성 유지, 효소의 고정 성능, 측정 속도 향상에 대한 연구가 이어져야 할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Casimiri, W. and C. Burstein. 1996. Co-immobilized L-lactate oxidase and L-lactate dehydrogenase on a film mounted on oxygen electrode for highly sensitive L-lactate determination. Biosensors & Bioelectronics. 11(8):783-789.
2. Clark, Jr. L. C. and C. Lyons. 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Ann. N.Y. Acad. Sci. 102:29.
3. Eggins, B. R. 2002. *Chemical sensors and biosensors*. John Wiley & Sons Ltd. England.
4. Kim, J. H., D. H. Rhie, T. J. Kim and B. S. Noh. 1998. Development of Biosensor for Simultaneous Determination of Glucose, Lactic Acid and Ethanol. Korean J. Food Sci. Technol. 30(1):22-34. (In Korean)
5. Ko, Y. D., H. Y. Chung, K. S. Kim, K. H. Lee, Y. W. Kim, S. S. Chun and N. K. Sung. 1994. Effect on Fermentation and Storage of Yogurt Using Control System of Refrigerator. Korean J. Food Sci. Technol. 26(6):814-818. (In Korean)
6. Mizutani, F., S. Yabuki and Y. Hirata. 1995. Amperometric L-lactate-sensing electrode based on a polyion complex layer containing lactate oxidase. Application to serum and milk samples. Analytica Chimica Acta. 314:233-239.
7. Mizutani, F., S. Yabuki and Y. Hirata. 1996. Flow injection analysis of L-lactic acid using an enzyme-polyion complex-coated electrode as the detector. Talanta. 43:1815-1820.
8. Sivakesava, S., J. Irudayaraj and D. Ali. 2001. Simultaneous deter mination of multiple components in lactic acid fermentation using FT-MIR, NIR, and FT-Raman spectroscopic techniques. Process Biochemistry. 37:371-378.
9. Yoon, H. C. 1995. Thick-film amperometric L-Lactate biosensor using L-lactate dehydrogenase. M.S. thesis. Korea Advanced Institute of Science and Technology.
10. Zhang, J., Y. Xie, X. Dai and W. Wei. 2001. Monitoring of *Lactobacillus* fermentation process by using ion chromatography with a series piezoelectric quartz crystal detector. J. Microbiological Methods. 44:105-111.
11. 김민곤. 2002. 바이오센서 기술동향. 한국생명공학연구원 보건산업기술동향. 25-33.
12. 김현욱. 1988. 낙농 및 식품 미생물학 실험. 유한문화사.
13. 백영진. 1997. 국내 드링크 요구르트의 종류와 특성. 우유. 1997(71):15-19.