

TMAH에 기반한 열분해 질량분석법의 생물 탐지체계 적용

Application of TMAH-based Pyrolysis Mass Spectrometry to a Biological Detection System

김 주 현*

JuHyun Kim

Abstract

TMAH-based Py-MS has been investigated to apply for a real-time classification of biological agents in the field. Acquiring reproducible data from mass spectrometry is a key to biological detection in the field. Nevertheless, it has been little studied on what factors could affect to the reproducibility of the TMAH-based Py-MS spectrum patterns. Given the TMAH-based Py-MS applied to the field system, several factors which could affect to the reproducible pattern of TMAH-based Py-MS spectra are needed to be examined, including changes in TMAH injection volume, growth temperature for microorganism, and number of cells collected in pyrolyzer, and implication of stabilizer used for lyophilization.

This study showed that the reproducibility of the spectrum patterns was significantly hindered by changes in TMAH concentration and cell number, and stabilizer implication but not by growth temperature. Among those at low TMAH concentration(0.015m) was not observed the significant alterations of the spectrum pattern even when its injection volume was changed, yet was in different cell numbers and stabilizer implication.

Keywords : TMAH(Tetramethylammonium Hydroxide), Py-MS(열분해 질량분석법), Biological Agents(생물학작용제), Reproducibility(재현성)

1. 서론

열분해 질량분석법(Pyrolysis Mass Spectrometry, Py-MS)는 야전에서 실시간 생물학작용제 탐지를 위한 실용적 기술로 인식되어 체계개발에 적용되고 있다^[1]. Py

-MS는 생물체 및 생체 고분자의 열분해 과정에서 생성된 biomarkers의 질량분석 스펙트럼을 기초로 하여 탐지 식별하는 기술로 자동화 및 소형화가 요구되는 야전 운용 장비로는 class 분류가 가능한 수준까지 와 있다^[2]. 본 연구에 사용된 시스템은 생물학작용제 class 분류 성능의 향상과 대기 물질의 간섭을 최소화하기 위해 ethanol 화학 이온화(CI : Chemical Ionization) 방식을 채택하였고, 비교적 낮은 온도에서도 biomarkers의 휘발성을 높이기 위하여 TMAH(Tetramethyl

† 2011년 2월 1일 접수~2011년 3월 25일 게재승인

* 국방과학연구소(ADD)

책임저자 : 김주현(kiminkma@yahoo.co.kr)

Ammonium Hydroxide)를 도입하였다.

열분해 질량분석법을 야전체계에 적용하는 과정에서 개발 목표 장비와 분석하고자 하는 생물학작용제의 특성을 고려하여 핵심적 성능을 결정하고 이와 관련된 영향을 분석하여 극복할 수 있는 방안을 강구하는 것이 개발 장비의 실용성을 높일 수 있다. TMAH에 기반한 Py-MS를 적용한 야전 생물 탐지체계는 미군의 CBMS Block II가 유일하며^[3], 이와 관련하여 Colorado School of Mines(Golden, CO)의 Kent Voorhee' group에서 세균 탐지 및 분류와 관련하여 핵심적 연구를 실시하였다^[4,5]. 그러나 야전 탐지체계로서의 Py-MS 실용성에 대한 연구내용은 제한적으로 공개되어 있는 실정이다.

이미 알려진 바와 같이 생물은 수많은 고분자체로 구성되어 있고 열분해시 다양한 biomarkers가 발생하므로 스펙트럼은 매우 복잡한 형태를 나타낸다. 복잡한 스펙트럼에서 개별 피크의 정보를 추출하여 가공하는 것은 매우 어렵다. 따라서 스펙트럼의 패턴을 결정하는 특징을 추출하여 class를 구분하는 방법을 적용하고 있다^[6].

본 연구에서는 Py-MS의 야전 적용체계에서 고려해야 할 자동화 시스템과 분석 대상이 되는 생물학작용제의 특성이 Py-MS 스펙트럼 패턴의 재현성에 어떤 영향을 미치고, 이를 개선할 수 있는 방안과 제한점을 이해하기 위하여 가능성이 높은 영향 요소들을 도출하였다. 먼저 biomarkers의 메틸유도체화를 위해 도입한 TMAH^[7]는 자동분사 방식으로 생물시료에 분사되어 혼합되도록 하였으며, 주입량의 제어 범위(2 μ l~5 μ l)가 허용되어 있다. 따라서 TMAH의 주입량 제어 범위 내에서 Py-MS 스펙트럼 패턴에 어떤 변화가 초래될 것인지 조사해 볼 필요가 있겠다. 또한 분석 대상은 대기 중에 살포된 에어로졸 형태의 생물학작용제로 다양한 성장조건을 가정해 볼 수 있다. 보고된^[8] 바에 따르면 그람 음성 세균 중 일부는 성장 온도에 따라 세포벽의 구성 성분이 변하는 경우가 있어 성장온도 변화와 Py-MS 스펙트럼 재현성의 상관관계를 분석해 볼 필요가 있겠다. 더불어 대기 중 세균을 살포할 때에는 분말형태가 유리할 것으로 판단된다. 분말로 제조하는 과정에서 세균의 생존률을 높이기 위하여 sucrose 등 안정제를 첨가할 수 있어, 이로 인하여 간섭을 분석해 볼 필요가 있겠다. 마지막으로 실 환경에서 시료를 수집할 경우 세포의 정량적 재현성을 갖기는 어렵다. 따라서 정량적 불균일성이 존재할 때 Py-

MS 스펙트럼 패턴에 대한 분석이 필요하다.

이와 같은 요소들을 검토함으로써 TMAH 기반 Py-MS의 야전 체계 적용의 실효성을 평가해 볼 수 있겠다.

2. 실험방법 및 조건

가. 실험장비

실험장비는 열분해기(Pyrolyzer)를 Fig. 1에서 보는 바와 같이 Varian-240 MS에 결합하여 실험에 활용하였다.

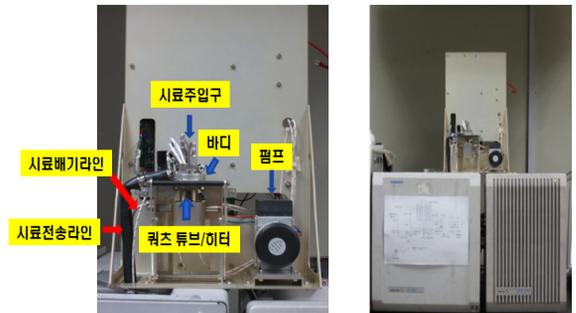


Fig. 1. 열분해기와 Varian-240 MS의 interfacing

마이크로시린지를 이용해 액상의 생물시료와 특정 농도의 TMAH 용액을 시료주입구를 통해 주입하면 퀴즈 튜브 하단부에 침착이 되도록 하였으며, 퀴즈 튜브 외부를 감싸고 있는 히터의 온도를 급격히 승온하여 튜브 내부 생물시료가 열분해 되도록 하였다. 이와 동시에 펌프를 작동하며 퀴즈 튜브로 부터 증기화된 biomarkers가 열분해기 바디 상단에 연결된 시료전송 라인을 통해 이송 되면서 소량의 시료만이 질량분석기로 전송되고 대부분은 Open-split에 연결된 시료배기 라인으로 배출되도록 제작하였다.

나. 생물시료 준비

Table 1에 제시한 생물 시료 중 포자(*Bacillus Subtilis* 등 2종)와 세균(*E. Coli* 등 10종)은 질병관리본부에서 분양을 받았다. 독소의 simulant인 단백질 3종(Bovine Serum Albumin(BSA), T4 lysozyme, Chicken egg white albumin)은 Sigma사에서 구입하였다. 세균은 37 $^{\circ}$ C(또는 25 $^{\circ}$ C), Trypticase soy broth agar plate에서 하루 동안 배양 하여 단일 colony를 취하고, 새롭게 만든 액체

배지에 접종하여 37°C(또는 25°C)에서 하루 동안 진탕 배양하였다. 진탕 배양한 세포 용액을 일부 취하여 새로운 액체 배지에 1/10~1/20배 정도 희석하여 동일 조건에서 진탕 배양하면서 mid-log phase에 이르렀을 때 원심분리기로 세포를 수확하였다. 수확한 세포는 saline(pH 7.0)으로 3차례 이상 씻어주어 배지 잔류를 최소화 했다. 최종적으로 새로운 saline로 시료를 희석하여 10^9 cells/ml 농도 만들어 분석에 사용하였다. 또한 안정제인 Sucrose는 생물시료 1ml에 40mg을 용해시켜 최종 4%(w/v)가 되도록 하였다.

다. Pyrolysis MS

본 실험에서는 열분해/메틸화 방법을 시료의 전처리 과정으로 이용하였으며, 칼럼에 의한 분리없이 도입된 시료를 에탄올 CI를 사용하여 이온화시킨 후 이온트랩 질량분석기(Varian-240MS)로 분석하였다.

기기와 열분해기의 상태가 설정 파라미터(바디 온도 : 210°C, 전송라인 : 220°C)에 도달한 것을 확인한 후 마이크로시린지를 이용하여 생물시료를 열분해기 튜브내로 주입하였다. TMAH 용액은 메탄올로 희석하여 최종 0.1M(또는 0.015M) 농도로 제조하였으며 마이크로시린지로 2 μ l 또는 5 μ l를 취하여 주입하였다.

TMAH 용액과 시료를 주입한 후 열분해기 온도를 16초 동안 가열코일에 전압을 가하여 400°C로 승온하였다. 열분해 및 메틸화 된 시료는 유량 10ml/min의 공기에 의해 시료전송관으로 전송되었으며, Open-split interface에서 약 0.5ml/min의 시료 유량만 석영모세관을 통해 질량분석기로 전송되었다. 이때의 시료도입 분배비율은 약 20:1이었다. 시료는 석영모세관을 통해 Varian MS의 이온트랩 내로 직접 도입되었으며, 여기서 이온화된 에탄올 이온들과 반응하여 2차 이온이 생성되는 화학적 이온화 과정을 거쳐 질량스펙트럼을 생성하였다. 획득된 질량스펙트럼의 TIC plot에서 최고 정점을 기준으로 전단 7개 포인트 평균하여 질량스펙트럼을 획득하였다.

라. Data 분석

Py-MS 스펙트럼에 대한 패턴인식 절차는 MATLAB 7.0과 PLS toolbox를 이용하여 수행하였다. 각 시료에 대하여 3회 이상 측정된 Py-MS 스펙트럼 중 m/z 120 이상의 biomarker peaks의 세기를 추출하여 total ion current로 정규화 및 autoscaling 하였다. 처리된 데이터 를 principal component analysis(PCA)에 적용하였다.

3. TMAH 주입량과 스펙트럼 패턴 변화

Tetramethylammonium hydroxide(TMAH)는 강염기로 열분해 과정에서 생성된 biomarkers의 메틸유도체화 물질로 biomarkers의 carboxylic acid나 -OH기나 -NH기 등 산성인 부위를 공격하여 알킬화를 유도한다. TMAH 기반한 열분해는 강염기인 TMAH에 의한 화학용해가 열분해 보다 우세하여 비교적 낮은 온도에서도 높은 온도에서 생성되는 정도의 열분해 biomarkers를 발생시킨다는 장점이 있다⁹⁾. 더불어 점성이 큰 biomarkers가 TMAH에 의해 메틸유도체가 됨으로서 증기화가 촉진되어 보다 적은 시료로도 분석이 가능하게 하는 효과가 있다. 이와 같이 TMAH의 긍정적 요소도 있지만 메틸유도체화 정도에 따라 Py-MS 스펙트럼은 변화될 소지가 다분하다. 따라서 TMAH의 자동제어 범위를 고려하여 TMAH 용액 각각 2 μ l와 5 μ l 주입시 스펙트럼을 획득하여 비교하였다.

가. 0.1m TMAH 조건하 Py-MS 스펙트럼 패턴

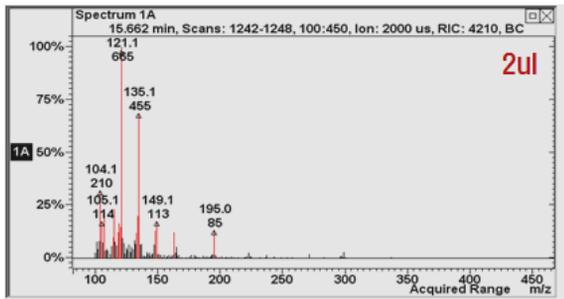
0.1m TMAH 조건은 Kent J. Voorhees 그룹에서 Py-MS를 이용한 생물분류 연구에서 적용했던 농도이며¹⁴⁾, 미국의 CBMS(Cheical & Biological Mass Spectrometer) Block II 개발 과정에서도 적용한 사례가 있어 선정하였다. 열분해 및 질량분석 조건이 동일한 가운데 0.1m TMAH 용액의 주입량만을 변화 시키면서 포자(*B. Globigii*), 그램양성 세균(*B. Globigii*), 그램음성 세균(*Samonella Enteritidis*) 등에 대한 Py-MS 스펙트럼을 분석하였다.

Fig. 2는 포자(*B. Globigii* ; 1×10^9 cells/ml) 2 μ l를 주입한 후 0.1m TMAH 용액을 각각 2 μ l와 5 μ l 주입하였을 때 스펙트럼 패턴을 보여주고 있다.

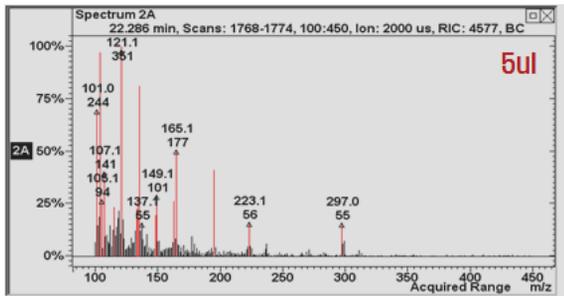
0.1m TMAH 용액의 주입량이 증가하면서 주요소 피크(Base Peak)는 m/z 121로 변화가 없었으나, m/z 165, 223, 297 등이 현저히 증가하면서 유의적인 패턴 변화가 관찰되었다.

한편 Fig. 3에서는 위와 같이 동일한 실험 조건에서 0.1m TMAH 용액의 주입량에 의한 그램양성과 음성 세균(각각 *B. Globigii*, *Samonella Enteritidis*)의 Py-MS 스펙트럼 패턴의 변화를 비교하였다. *B. globigii*(그램양성)는 Fig. 2의 포자와 현격히 다른 패턴의 스펙트럼을 보였다. 0.1m TMAH의 주입량이 증가할 경우 m/z 178의 현저히 증가하고 다른 피크들은 감소하는 현상이 관찰되었다. 이와 같은 현상은 *Samonella enteritidis*(그

램 음성)에서도 유사하게 관찰되었으나 원인을 추론할 만한 연구결과는 보고된 바가 없다. 다만 강염기인 TMAH 용액에 의해 세포의 화학용해 및 가수분해가 촉진되었거나, 열분해시 선택적으로 특정 분자에 대한 메틸유도체화가 진행된 결과로 추정해 볼 수 있겠다. 결론적으로 0.1m TMAH를 사용할 경우 자동분사 제어 범위 내에서 스펙트럼 패턴의 변화가 커 재현성 있는 결과를 얻기가 어려울 것으로 판단되었다.



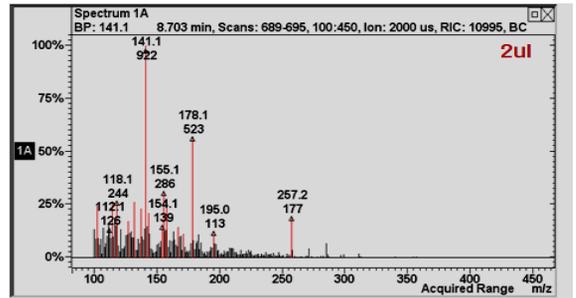
(a)



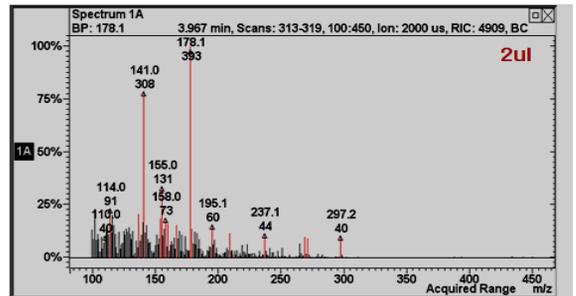
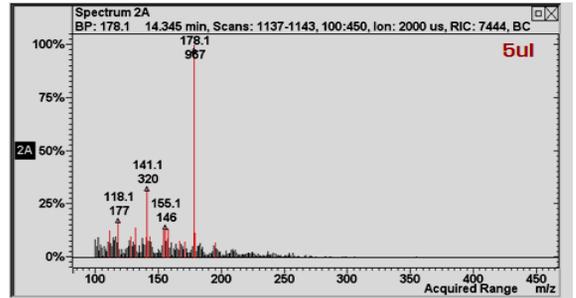
(b)

Fig. 2. 0.1m TMAH 주입량에 따른 *B. globigii*(포자)의 Py-MS 스펙트럼 ; a. 0.1m TMAH 2 μ l 주입시, b. 0.1m TMAH 5 μ l 주입시

나. 스펙트럼 패턴 재현성을 위한 TMAH 농도 조정 야전체계는 충격 및 진동이 가해지는 상황으로 TMAH 분사량을 엄격히 제어하는 것은 대단히 어려운 작업이다. 대신 TMAH에 의한 Py-MS 스펙트럼 패턴의 변화가 최소화되는 조건을 찾는 것이 현실적으로 판단되었다. 이와 관련하여 Oak Ridge National Laboratory의 CBMS Block II 개발과정에서 발표한 논문^[10] 따르면 TMAH 용액의 농도를 0.03m~0.015m을 적용한 사례가 있어 0.015m TMAH를 채택하여 실험을 실시하였다.



(a)



(b)

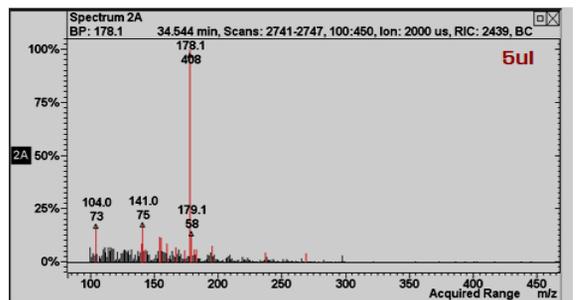


Fig. 3. 0.1m TMAH 주입량에 따른 세균의 Py-MS 스펙트럼 패턴 변화 ; a. 0.1m TMAH 주입량 증가시(2 μ l→5 μ l) *B. globigii*(그림 양성)의 Py-MS 스펙트럼 비교, b. 0.1m TMAH 주입량 증가시(2 μ l→5 μ l) *Salmonella enteritidis*(그림 음성) Py-MS 스펙트럼 비교

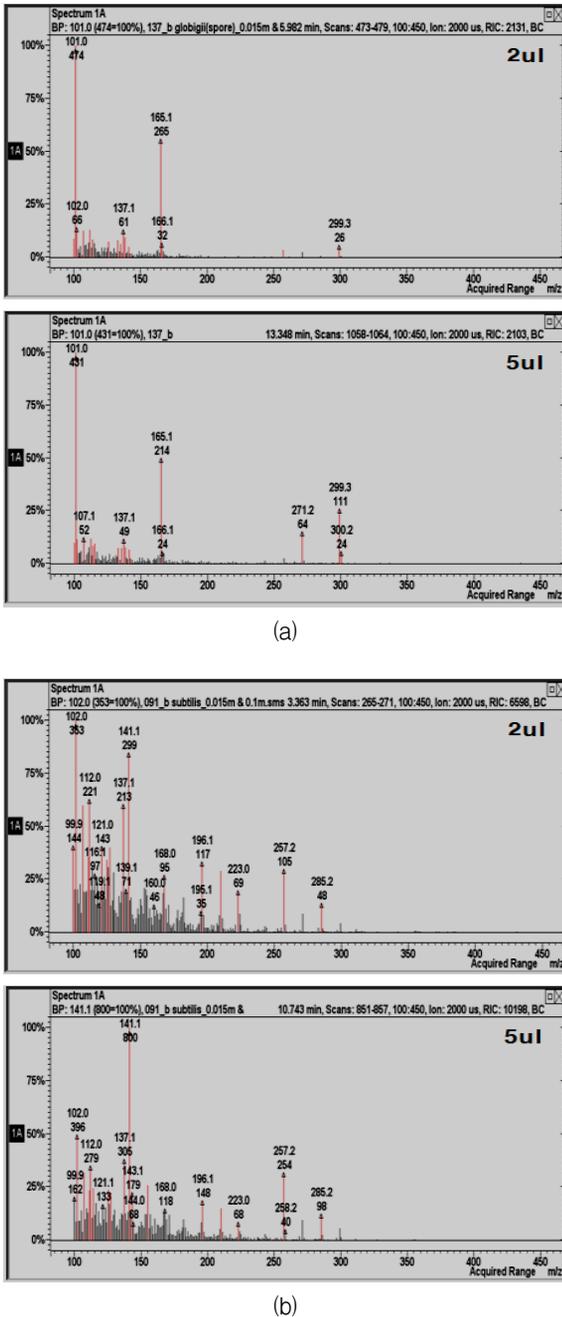


Fig. 4. 0.015m TMAH 주입량에 따른 포자 및 세균의 Py-MS 스펙트럼 패턴 변화 ; a. 0.015m TMAH 주입량 증가시(2µl→5µl) *B. globigii*(포자)의 Py-MS 스펙트럼 비교, b. 0.015m TMAH 주입량 증가시(2µl→5µl) *B. globigii*(그램양성)의 Py-MS 스펙트럼 비교

Fig. 4에서는 0.015m TMAH 용액 주입량에 따른 포자(*B. Globigii*)와 세균(*B. Globigii*)의 Py-MS 스펙트럼을 비교하였다.

TMAH 용액 주입량이 증가하는 경우에도 개별 피크의 상대적 세기에 변화는 있었으나 Py-MS 스펙트럼 패턴의 변화는 크지 않은 것으로 관찰되었다. 하지만 이 정도의 변화가 생물학작용제 분류에 어떤 영향을 미치는 분석할 필요가 있겠다.

4. Py-MS 스펙트럼 패턴 인식 및 생물 분류

가. 모의 생물학작용제 및 Biomarkers

위에서 결정된 TMAH 조건을 이용하여 독소, 포자, 세균(그램 양성 및 음성)을 대표하는 모의 생물학작용제 15종을 Table 1과 같이 선정하여 Py-MS 스펙트럼을 획득하였다.

Table 1. Class 별 모의 생물학작용제

구 분		모의 작용제
포 자(2종)		<i>B. subtilis</i> , <i>B. globigii</i>
세 균 (10종)	그램 양성 (5종)	<i>B. cereus</i> , <i>B. thuringensis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. globigii</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
	그램 음성 (5종)	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Brucella neotomae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
독 소(3종)		BSA, T4 lysozyme, Albumin

Table 1의 모의 생물학작용제는 대기 중 살포가 가능한 독성 생물학작용제에 대한 유사 종으로 분류체계 상 같은 “속”에 속하는 종들이다. 이들에 대한 Py-MS 스펙트럼을 획득하여 class별 비교분석을 통해 특징적인 biomarker 피크를 Table 2와 같이 선정하였다. Biomarker 피크를 선정하는 과정에서 m/z 120 이하는 생체 고분자의 단량체 비중이 높을 것으로 추정되었고 class 구분에 간섭을 초래하여 제거하였다.

공통 피크들은 각 스펙트럼에서 패턴의 특징으로

작용하지만 2개 이상의 class에서 관찰된 것이고, 특성 피크들은 하나의 class에서만 특징으로 작용하여 class 구분에 핵심적 요소로 간주하였다. 아래 22개의 biomarker 피크에 대한 정보를 Py-MS 스펙트럼에서 추출하여 class 구분 가능성을 분석하였다.

Table 2. Biomarker 피크 선정

구분	피 크 (m/z)	Sources
공통 피크	137	그램양성, 그램음성, 포자, 독소
	149, 157, 159, 160, 183, 196, 217, 237, 297	그램양성, 그램음성, 독소
	141, 155, 178, 195, 271, 299	그램양성, 그램음성
특성 피크	215, 243	그램음성
	257, 285	그램양성
	165, 166	포자

나. Principal Component Analysis(PCA)

PCA는 unsupervised 패턴인식 기술로 분류 할당에 의해 영향을 받지 않는다. 위에서 추출한 22개 biomarker peaks의 위치정보 및 세기를 각 Py-MS 스펙트럼에서 획득하여 전처리 및 정규화 후에 PCA에 적용하였다.

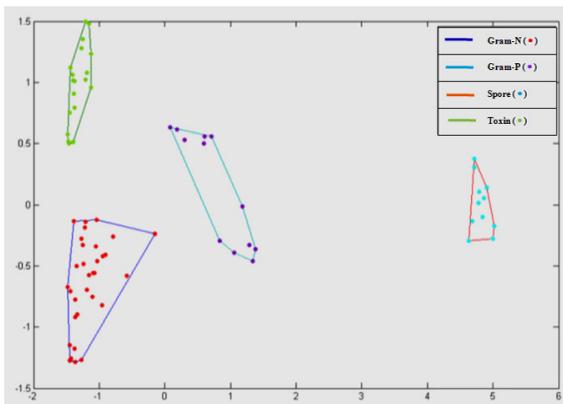


Fig. 5. Class 구분 PCA score plot. 그램음성균(Gram-N), 그램양성균(Gram-P), 포자(Spore), 독소(Toxin)에 대한 그룹별 군집화 및 그룹 간 분류를 PCA를 통해 분석함.

Fig. 5의 PCA score plot은 X-축이 PC1(총 분산 42%), Y-축이 PC4(총 분산 6%)로 시료들이 이미 알고 있는 class(그램음성균(Gram-N), 그램양성균(Gram-P), 포자(Spore), 독소(Toxin))별 군집화가 잘 이루어졌으며, 궁극적으로 분류가 됨을 알 수가 있었다.

위 결과로 부터 0.015m TMAH 조건하에서 주입량이 제어범위 내에서 변할 경우에도 class 구분은 가능하다는 것을 알 수 있었다.

5. 생물 시료 특성이 Py-MS 미치는 영향

TMAH 용액 주입량의 증감이 Py-MS 스펙트럼 패턴 변화에 영향을 미치나 농도를 낮춤으로서 개선이 가능하였다. 그러나 시스템에서 발생하는 TMAH 영향 외에도 분석 대상이 되는 생물학작용제의 시료 특성이 Py-MS 스펙트럼의 재현성에 영향 또는 간섭을 초래할 수 있다. 서론에서 언급하였듯이 많은 가능성 중 생장온도, 세포수, 안정제에 의한 Py-MS 스펙트럼 패턴의 재현성을 실험하였다.

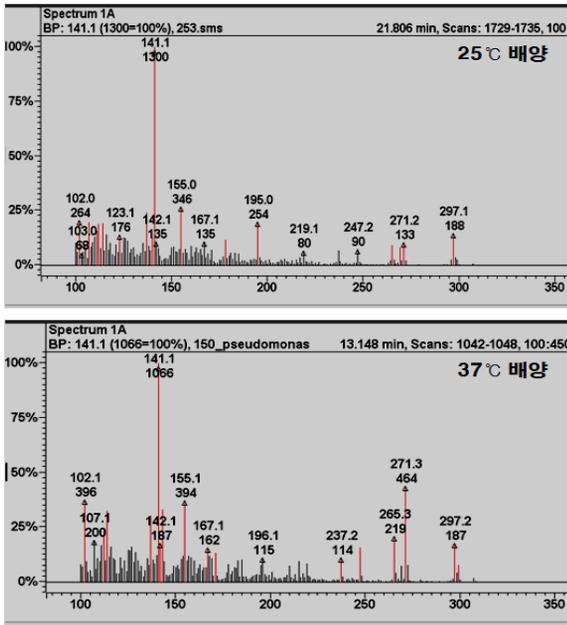
가. 세포 생장온도와 Py-MS 스펙트럼 변화

세균의 생장온도에 따라 세포벽 구성성분의 변화가 발생한다. 이와 같이 구성성분의 변화가 Py-MS 스펙트럼 패턴에 미치는 영향을 분석하기 위하여 세균의 생장온도를 일반적으로 적용하고 있는 25℃와 37℃에서 각각의 세균을 진탕 배양하였다. Fig. 6에서는 *Pseudomonas aeruginosa*(그램음성)과 *Bacillus subtilis*(그램양성)를 각각 25℃와 37℃에서 배양한 후 Py-MS로 분석한 스펙트럼의 결과이다.

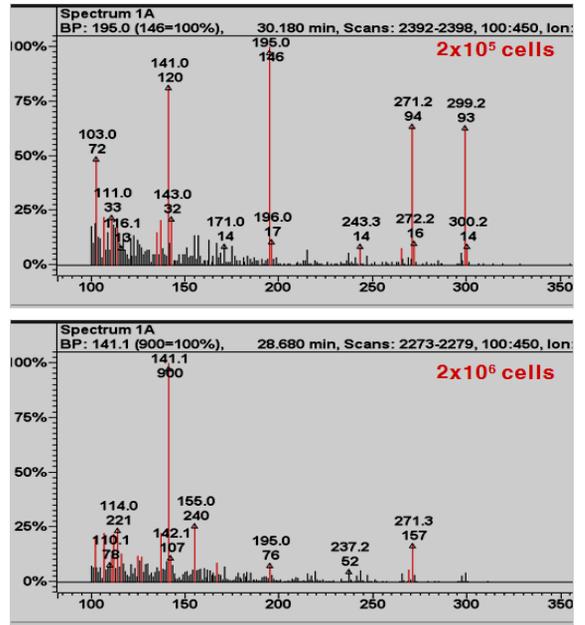
위 결과로 볼 때 배양온도는 Py-MS 스펙트럼의 패턴에 유의적인 변화를 초래하지 않은 것으로 판단되며, PCA 수행 결과 class 분류가 가능한 것으로 분석되었다(세부 데이터 미 포함).

나. 세포수와 Py-MS 스펙트럼 변화

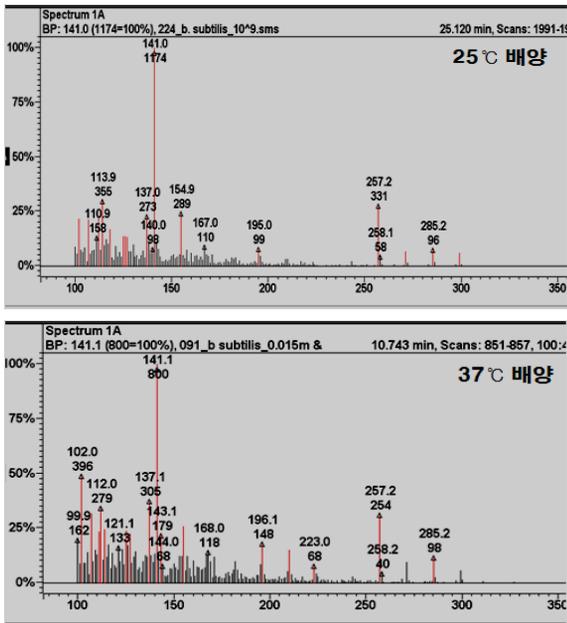
TMAH 기반의 Py-MS를 야전체계에 적용하기 위해서는 미지의 생물학작용제를 탐지하고 분석할 수 있어야 한다. 미지의 생물학작용제는 그 종류 뿐만 아니라 농도도 알려지지 않았음을 의미한다. 실험실 조건에서는 정량적으로 결정된 생물시료의 분석이 가능하겠지만 실제 환경에서는 변화가 클 개연성이 높다. 따라서 실제 환경을 고려하여 세포수가 상이 할 경



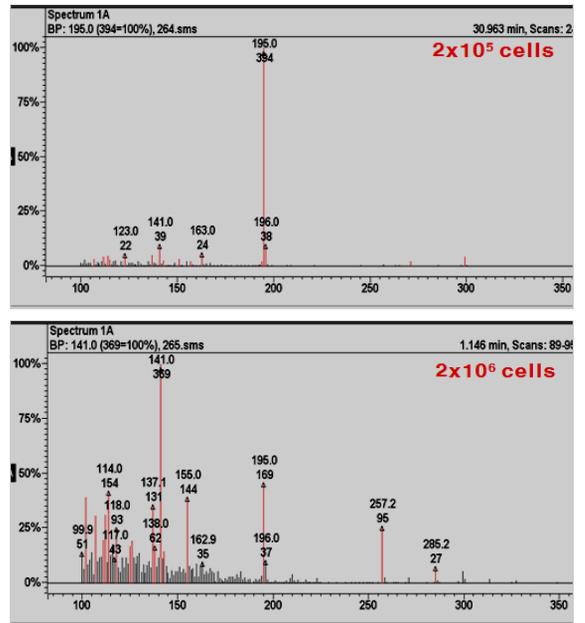
(a)



(a)



(b)



(b)

Fig. 6. 생장온도에 따른 Py-MS 스펙트럼의 패턴 변화 ; a. *Pseudomonas aeruginosa*(그램음성)의 25°C 와 37°C 배양시 Py-MS 스펙트럼 비교, b. *Bacillus subtilis*(그램양성)의 25°C와 37°C 배양시 Py-MS 스펙트럼 비교

Fig. 7. 세포수에 따른 Py-MS 스펙트럼의 패턴 변화 ; a. *Salmonella enteritidis*(그램음성), b. *Staphylococcus epidermidis*(그램양성)

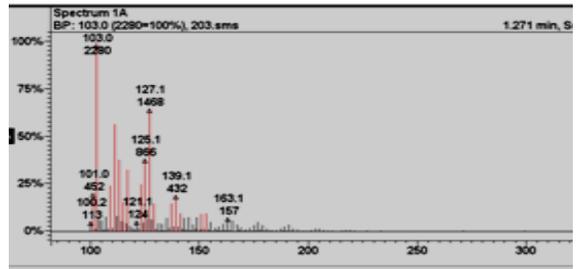
우 Py-MS 스펙트럼에 변화가 있는지 확인해 볼 필요가 있었다. Fig. 7은 *Salmonella enteritidis*(그램음성)과 *Staphylococcus aeruse*(그램양성)에 대한 Py-MS 스펙트럼으로 최저 탐지한계에 근접한 2×10^5 cells과 그 10배인 2×10^6 cells을 주입하여 분석하였다.

위 결과로 부터 세포수에 따라 Py-MS 스펙트럼에 심대한 변화가 초래됨을 알 수 있었다. 이와 같이 스펙트럼의 패턴이 확연히 변화되고 특징적 biomarkers의 변동 폭이 커지면 class 군집화를 저해하여 궁극적으로 분류를 어렵게 할 것이다. 세포수에 따라 Py-MS 스펙트럼의 현저한 변화는 세포 및 생체고분자에 가해지는 열과 TMAH 량이 상이하여 biomarkers 생성 패턴과 메틸 유도체화 패턴이 변화됨으로서 발생하는 결과로 추정된다.

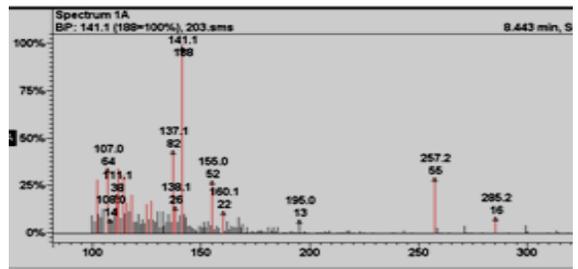
다. 안정제(Sucrose)의 간섭효과

세포를 동결 건조하여 분말로 제조하는 과정에서 대부분 안정제를 첨가한다. 세포의 특성에 따라 첨가하는 안정제의 종류가 다양하지만 본 연구에서는 안정제에 의한 간섭 정도를 이해하기 위하여 대표적인 안정제 첨가 방식인 4%(w/v) sucrose를 사용하였다. Fig. 8에서는 4% sucrose가 *Staphylococcus epidermidis*에 포함될 경우 Py-MS 스펙트럼의 변화를 관찰할 수가 있다.

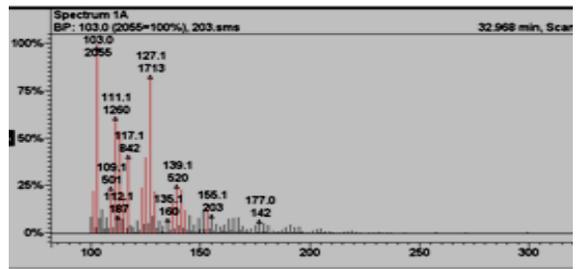
Fig. 8의 a와 b는 각각 4% sucrose와 2×10^6 cells에 대한 Py-MS 스펙트럼이며, Fig. 8의 c와 d는 1×10^9 cells/ml과 1×10^{10} cells/ml에 각각 4%(w/v) sucrose를 첨가한 후 2μl의 샘플을 분취하여 분석한 Py-MS 스펙트럼이다. 4% sucrose의 total ion current가 높아(약 20 kcounts) 세균의 특성 피크들이 잘 관찰되지 않는다(Fig. 8의 c). 그러나 Fig. 8의 d에서 보듯이 세균의 량이 증가하면서 그 특성 피크들이 두드러지는 현상을 관찰 할 수 있었다. 이는 안정제와 세포의 상대적 비율에 의해 Py-MS 스펙트럼 간섭에 결정적 요소가 될 수 있다는 것을 의미한다. 일반적으로 저장을 위한 동결건조시 $10^9 \sim 10^{10}$ cells/ml에 4% sucrose를 첨가하는데, 저장이 아니라 분말형태의 생물학작용제로 운용하기 위하여 동결 건조를 할 경우 상대적으로 고농축의 세포를 사용할 가능성이 높다. 따라서 안정제에 의한 간섭을 평가하기 위해서는 실제 생물학작용제로서 효과를 나타내면서 안정성을 확보하기 위하여 어느 정도의 비율로 안정제와 생물학작용제가 혼합될 것인지 연구가 선행되어야 할 것이다.



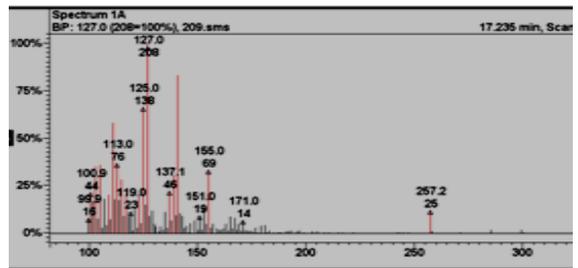
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 8. 4% sucrose 첨가시 *Staphylococcus epidermidis* (그램양성)의 Py-MS 스펙트럼 ; a. 4% sucrose, b. *Staphylococcus epidermidis*(그램양성), c. 4% sucrose 첨가 *Staphylococcus epidermidis*(1×10^9 cells/ml), d. 4% sucrose 첨가 *Staphylococcus epidermidis*(1×10^{10} cells/ml)

6. 결론

본 연구는 TMAH 기반 Py-MS의 야전 생물학탐지체계 적용을 위한 실용성을 분석하는 토대를 마련하였고 극복해야 할 과제가 무엇인지 식별하는데 의의가 있다. 위 결과에서 보듯이 TMAH 주입량의 변화가 Py-MS 스펙트럼 재현성에 상당한 영향을 초래하였으나 농도를 0.1M에서 0.015M로 낮춤으로서 개선할 수 있었다. 이는 자동분사시 제어 범위를 엄격히 제한하지 않더라도 재현성 있는 결과를 얻을 수 있다는 것을 의미하고, 하드웨어 제작 및 제어의 부담을 경감하는 성과를 얻었다.

더불어 시스템적 요소 외에도 분석 대상이 되는 생물학작용제에 내재되어 있는 특성이 Py-MS 스펙트럼 분석에 영향을 초래함을 알 수 있었다. 생장 온도에 따른 세포벽 성분의 변화가 Py-MS 스펙트럼 변화를 초래할 것으로 판단하였으나 실험결과 패턴의 변화가 크지 않은 것으로 관찰되었고, PCA 결과 class 구분은 가능한 것으로 확인되었다. 하지만 세포수의 증감에 따른 Py-MS 스펙트럼의 패턴이 현저히 달라지는 현상은 미지 생물학작용제를 분석해야 하는 야전 탐지체계에서는 피할 수 없는 상황이며, 이에 대한 대책을 강구하지 못할 경우 TMAH 기반 Py-MS의 실용성에 대한 의구심이 발생할 것이다. 현재 단계에서 대책으로 제시할 수 있는 아이디어는 세포수에 따른 데이터베이스를 분리 구축하여 단계적으로 연산이 되도록 하는 알고리즘을 구축하는 방안이 있다. 이것은 상당히 복잡할 수 있으나 많은 정보가 난립하는 상황을 극복하는데 효과적인 것으로 판단되므로 추후 연구를 수행할 가치가 있다.

한편 안정제에 의한 간섭 또한 Py-MS 스펙트럼에 상당한 영향을 초래할 수 있음을 알 수 있었다. 하지만 세포와 안정제의 상대적 비율에 의해 간섭의 정도는 상이하고, 실제 생물학작용제의 제조 방법에 대한 정보가 부족한 상황에서 간섭을 판단하기 곤란하다.

본 연구를 통해 TMAH 기반 Py-MS의 야전 생물학탐지체계 적용을 위해서 극복해야 할 과제가 식별되었고, 일부는 해결하였으나 그렇지 못한 부분은 제시된 아이디어를 실험하여 해법을 찾아야 할 것이다.

Reference

- [1] Basile, F., Voorhees, K. J., Hadfield, T. L., "Microorganism Gram-type Differentiation based on Pyrolysis Mass-spectrometry of Bacterial Fatty-acid Methyl-ester Extracts", *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 61, pp. 1534~1539, 1995.
- [2] Hart, K. J., Wise, M. B., Griest, W. H., Lammert, S. A., "Design, Development, and Performance of a Fieldable Chemical and Biological Agent Detector", *Field Anal. Chem. Technol.* Vol. 4, pp. 93~110, 2000.
- [3] Griest, W. H., Lammert, S. A., "The Development of the Block II Chemical Biological Mass Spectrometer", John Wiley & Sons, Inc., pp. 61~89, 2006.
- [4] Voorhees, K. J., Basil, F., Beverly, M. B., Haws, C. A., Hendricker, A., Cody, R. B., Hadfield, T. L., "The Use of Biomarker Compounds for Identification of Bacteria by Pyrolysis-mass Spectrometry", *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* Vol. 40~41, pp. 111~134, 1997.
- [5] Basile, F., Beverly, M. B., Voorhees, K. J., "Pathogenic Bacteria : Their Detection and Differentiation by Rapid Lipid Profiling with Pyrolysis Mass Spectrometry", *Trends in Analytical Chemistry* Vol. 17, No. 2, pp. 95~109, 1998.
- [6] Goodacre, R., Shann, B., Gilbert, R. J., Timmins, E. M., McGovern, A. C., Alsberg, B. K., Kell, D. B., Logan, N. A., "Detection of the Dipicolinic Acid Biomarker in *Bacillus* Spores using Curie-Point Pyrolysis Mass Spectrometry and Fourier Transform Infrared Spectroscopy", *Anal. Chem.* Vol. 72, pp. 119~127, 2000.
- [7] DEL RÍO, J. C., HATCHER, P. G., "Analysis of Aliphatic Biopolymers using Thermochemolysis with Tetramethylammonium Hydroxide(TMAH) and Gas Chromatography-mass Spectrometry", *Org. Geochem.* Vol. 29, No. 5~7, pp. 1441~1451, 1998.
- [8] Yuriy A. Knirel etc. "Cold Temperature-induced Modification to Composition and Structure of the Lipopolysaccharide of *Yersinia Pestis*", *Carbohydrate Research*, Vol. 340, pp. 1625~1630, 2005.

- [9] Hatcher, P. G., Clifford, D. J., "Flash Pyrolysis and in Situ Methylation of Humic Acids from Soil", *Org. Geochem.*, Vol. 21, pp. 1081~1092, 1994.
- [10] Griest, W. H., Wise, M. B., Hart, K. J., Lammert, S. A., "The Block II Chemical Biological Mass Spectrometer-Point Detection for Both Chemical and Biological Warfare Agents", To be published in *Proceedings of the First Joint Conference on Point Detection for Chemical and Biological Defense*, Williamsburg, VA, pp. 81~91, Oct. 23~27, 2000.