

특 집

Biosensor

- | | |
|-----------------------------|--------------|
| 1. Biosensor 의 원리와 응용 | 김병홍 |
| 2. Biosensor 의 원리와 국내연구 현황 | 인권식, 김봉원 손무정 |
| 3. 의료용 Biosensor | 민흥기 |
| 4. 생물공학 분야에서 Biosensor 의 응용 | 김학성 |
| 5. Biosensor 의 식품공업적 응용 | 노봉수 |
| 6. Biosensor 의 환경과학분야 활용 | 박경호 |

Biosensor란 어떤 물질을 측정하기 위해 만들어진 장치로서 일부 혹은 전부가 생물에서 유래된 물질인 것을 말한다. Biosensor는 화학 혹은 물리센서와 달리 측정하려는 물질에 대한 특이성(specificity)이 강하며, 일반적으로 민감도(sensitivity)가 높은 특징이 있다. 세계적인 biosensor의 수요는 추정되지 않고 있으나 미국의 biosensor 시장은 1987년도에 2천7백만불이었으며, 4년 후인 1991년에는 12배가 넘는 3억6천5백만불의 시장으로 성장할 것이라는 전망이다. 다음 세기에는 biosensor가 현재의 전자제품보다 우리 생활에 더 일반적으로 이용될 정도로 시장성이 클 뿐 아니라 biosensor 기술이 super computer 개발의 열쇄인 biochip(혹은 molecular electronic device)의 기초단계로 인식되기 때문에 세계 여러 나라의 정부와 기업체들이 biosensor 기술의 개발에 크게 투자하고 있는 실정이다. 이러한 관점에서 국내 biosensor 분야의 현황을 점검하고 발전의 계기를 마련할 목적으로 특집을 구상하였다.

Biosensor의 원리와 응용



한국과학기술연구원 유전공학센터 김 병 홍

1. 머릿말

Biosensor란 어떤 물질을 측정하기 위해 만들어진 장치로서 일부 혹은 전부가 생물에서 유래된 물질인 것을 말한다. Biosensor는 화학 혹은 물리센서와 달리 측정하려는 물질에 대한 특이성(specificity)이 강하며, 일반적으로 민감도(sensitivity)가 높은 특징이 있다. 1960년대 및 1970년대에 개발되어 현재에도 널리 응용되고 있는 enzyme electrode와 고정화 효소를 이용하는 각종 임상시험지도 biosensor의 일종으로 생각할 수 있다. 현재 세계적으로 개발되고 있으며 일부 산업화된 biosensor들은 생물에서 일어나는 각종 반응을 직접 전기적 신호로 전환하여 이 신호를 물질의 측정에는 물론 측정되는 물질과 관련되는 공정의 자동화, 그리고 의료용으로 이용될 수 있다.

현재 biosensor는 의료보전 분야에서 가장 많이 사용되고 있으며, 앞으로 biosensor 기술이 더욱 보편화 되면 발효공업 등 생물공학, 농업, 환경평가 등에도 널리 이용될 것으로 생각된다. 세계적인 biosensor의 수요는 추정되지 않으나 미국의 biosensor 시장은 1987년도에 2천7백만불이었으며, 4년 후인 1991년에는 12배가 넘는 3억6천5백만불의 시장으로 성장할 것이라는 전망이다(Fig. 1). 이와 같은 전망에 따라 1960년대 이후 기초 연구를 주도해 온 구미 각국의 연구 결과가 산업화에 연결되고 있으며, 여기서 특이할 사항은 기초연구의 경험이 적은 일본에서 많은 회사들이 산업화에 성공하였다는 사실이다(Table 1). 일본에서는 통산성을 비롯한 5개 정부 부처가 biosensor의 개발을 적극 권장하고 있으며, 50개

이상의 회사들이 이에 참여하고 있기 때문에 세계의 biosensor 시장을 석권하고 있다. 일본정부가 biosensor의 개발에 이처럼 적극적인 이유는 21세기에는 biosensor가 현재의 전자제품보다 우리 생활에 더 일반적으로 이용될 정도로 시장성이 클 뿐 아니라 biosensor 기술이 super computer 개발의 열쇠인 biochip(혹은 molecular electronic device)의 기초단계로 인식되기 때문이다. 생물반응을 전기적 에너지로 전환시켜 제2세대 biosensor를 개발하기 위해서는 생물화학은 물론 전자공학과 이 두 상이한 분야를 연관시켜 주는 전기화학도 필요로 하는 종합학문 분야이다. 다른 첨단기술과 달리 biosensor 기술은 생체물질의 생산 및 고정화, 증폭장치 등은 이미 보편화된 기술이며, 생물반응을 전기적 신호로 전환시켜 주는 transducer의 개발은 측정하고자 하는 물질에 특이적이며, 개발되는 센서의 용도에 따라서도 다른 성질이 있기 때문에 우리 기술수준으로도 짧은 시간에 쉽게 도달할 수 있다.

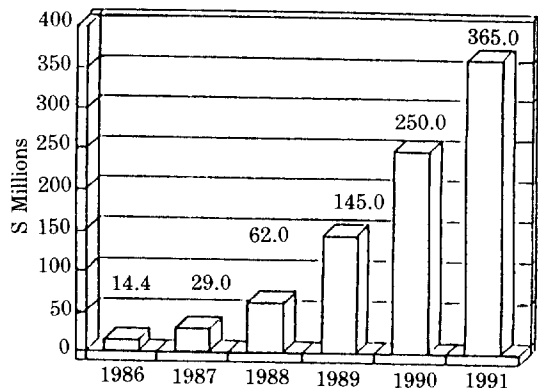


Fig. 1. The Biosensor Market in the USA.

Table 1. World Biosensor Manufacturer (1986).

Manufacturer	Compounds Analysed
France	
Solaie-Tacussel	glucose
East Germany	
MLW	glucose
Hungary	
Radelkis	glucose
Japan	
AIC	glucose, alcohol, lactate
Denki Kagaku	alcohol, acetate
Kyoto Daiichi Kagaku	glucose
Fuji Electric	glucose, alpha amylase, urate
Nikkiso	glucose
Nissin Electric	BOD
Omron Tateisi	lactate
Oriental Electric	glucose, hydrogen peroxide
Toa Electric	glucose
Sweden	
University of Lund	albumin, ascorbate, ATP cellobiose, cholesterol, creatine cyanide, ethanol, galactose gentamycin, glucose, heavy metals insecticides, insulin, lactate lactose, oxalate, penicillin sucrose, triglycerides, urea urate
United Kingdom	
Thorn EMI Simtec	nerve gas
USA	
Provesta Co	glucose, lactose, lactate ethanol
Universal Sensors	glucose, urea, amino acids
Wolverine Medical	lactate
Yellow Spring	alcohol, fructose, glucose lactate, lactose, sucrose
USSR	
Lithuanian Acad Sci	glucose

2. Biosensor 의 원리

Biosensor 는 모든 종류에서 공히 생체물질로

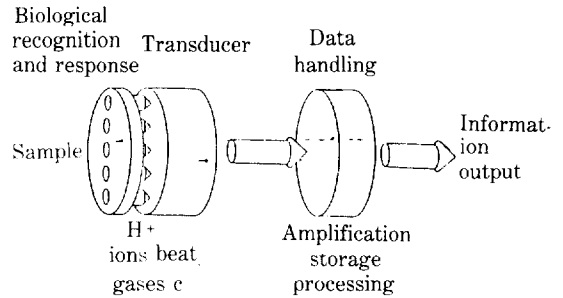


Fig. 2. General Diagram of Biosensor.

Table 2. Components that may be used to construct a biosensor

Biological elements	Transducers
Organisms	Potentiometric
Tissues	Amperometric
Cells	Conductimetric
Organelles	Impedimetric
Membranes	Optical
Enzymes	Calorimetric
Enzyme components	Acoustic
Receptors	Mechanical
Antibodies	'Molecular' electronic
Nucleic acids	
Organic molecules	

이루어지는 감지 부분, transducer 그리고 전자 부분으로 이루어 진다(Fig. 2). 따라서 Biosensor 는 사용하는 생체물질, transducer 로 그리고 측정되는 물질에 따라 분류된다(Table 2).

Biosensor 에 이용될 수 있는 생물반응은 pH 변화, ion 생산 및 소비, 기체생산 및 소비, 발열, 발광, 전자전달, 질량변화 등을 들 수 있다. 이상의 반응을 유발하는 생체물질은 Table 1에서 이미 소개한 바와 같이 효소, 항체 등 단백질과 세포, 조직 등 다양하다. 여기에서는 transducer 의 특징을 먼저 살펴보고 biosensor 각론에서 이들 생체물질의 반응 특징을 소개한다.

3. Transducer

Biosensor 에서 생물반응을 전기적 신호로 전환시키는 장치를 transducer 라 부르며, transdu-

Table 3. Classification of transducers

Class	Examples
Potentiometric	ion-selective electrode (ISE) ion-selective field-effect transistor (ISFET) gas-selective electrode
Amperometric	metal electrodes mediated systems conducting organic salts
Optical	ellipsometry planar waveguide fibre optic surface plasmon resonance
Other	thermistor surface conductance piezoelectric/surface acoustic wave (SAW)

cer는 생물반응을 전기적 신호로 전환하는 방식에 따라 전압 transducer(potentiometric transducer), 전류 transducer(amperometric transducer), 광 transducer(optical transducer), 기타로 나누어 생각할 수 있다(Table 3).

3-1. 전압 Transducer

두 전극 사이에 전리된 이온이 존재하면 전압이 형성된다. 따라서 각 이온에 특이적인 막을 이용하면 화학센서를 만들 수 있다. 이 막에 측정하려는 물질과 작용하여 이온을 생산하는 효소를 고정화시켜서 transducer로 이용할 수 있다. 이러한 장치를 ion-selective field-effect transistor (ISFET)라 한다. Amino acid deaminase와 ammonium selective membrane을 이용하면 아미노산 측정용 ISFET biosensor를 만들 수 있다.

pH metre는 수소이온을 특이적으로 측정하는 장치이며 전극표면에 기질과 작용하여 수소이온을 생산하는 효소를 고정화한 것도 전압 transducer의 일종이다(Fig. 3).

ISFET를 이용하는 biosensor는 감응장치를 극소화할 수 있기 때문에 생체에 직접 삽입하여 생체 내의 물질변화를 경시적으로 측정할 수 있다. 또한 극소형의 biosensor를 하나의 센서로 묶어 biosensor를 다중화할 수 있으며, 얇은 감응막을

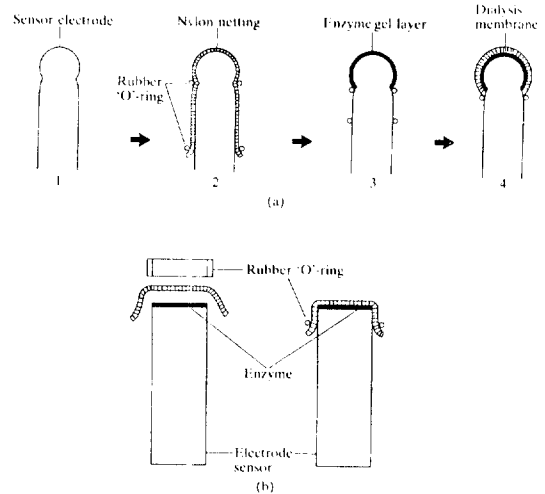


Fig. 3. Preparation of Potentiometric Transducer Using pH Electrode and Oxygen Electrode.

이용하면 측정시간을 줄일 수 있는 이점이 있다.

3-2. 전류 Transducer

신경계통의 작용이나 산화환원반응 등 생체에서 일어나는 전기작용을 직접 혹은 간접적인 방법으로 전극에 연결시키는 장치를 전류 transducer라 부르며, 산화환원효소와 연결되는 전류 transducer가 biosensor에서 가장 일반적으로 이용된다.

생체반응은 거의 모두 단백질에 의해 촉매된다. 생체반응에서 전자가 직접 전극에 전달된다는 보고도 있으나, 산화환원반응을 촉매하는 효소 단백질 중에서 전자의 전달을 담당하는 부분이 단백질로 싸여 있기 때문에 생체 산화환원반응에서 전자가 직접 전극으로 연결되기는 어렵다. 예를 들어 cytochrome c에서 전자 전달에 직접 관여하는 heme group이 단백질 구조의 내부에 존재하므로 단백질 부분이 heme group과 전극 사이를 물리적으로 분리하기 때문에 전자가 이동할 수 없다(Fig. 4). 이러한 단점을 극복하기 위해 생체반응에서 이용되는 전자전달체를 구조가 간단한 인공 전자전달체(mediator)로 대체하여 생체반응의 전자를 전극으로 이동시키는 방법(mediated system)이 많이 이용되고 있다.

전류 transducer에서 이용되는 인공전자전달체는 산소에 영향을 받지 않고, 사용하는 효소 등 생체물질과 산화환원을 할 수 있는 산화환원전위를

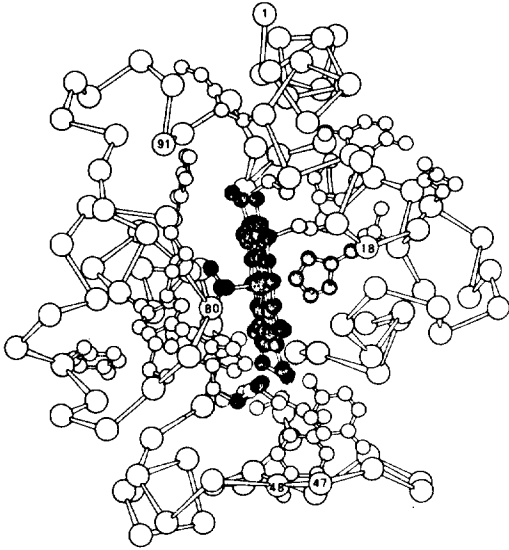


Fig. 4. Three Dimensional Structure of Cytochrome c.

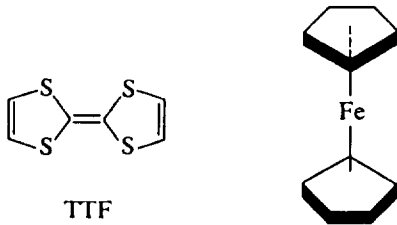


Fig. 5. Structures of Ferrocene and Tetrathiafulvalene.

가져야 한다. Benzoquinone, 2, 6-dichlorophenolindophenol(DCPIP), hexacyanoferrate, ferrocene, tetrathiafulvalene(TTF) 등이 흔히 이용되는 mediator이며, 특히 ferrocene 과 TTF는 전극으로 흔히 이용되는 graphite 등 전극에 쉽게 결합하는 성질 때문에 유용한 mediator로 밝혀졌다(Fig. 5). Ferrocene을 mediator로 이용하는 포도당용 biosensor가 산화되어 혈당측정용으로 이용되고 있으며, 식품공업에서도 활용할 수 있을 것으로 전망되고 있다.

3-3. 광 Transducer

전압 및 전류 transducer는 생물반응을 직접 전기적 신호로 전환시키는 생물전기화학적 transducer인데 비해 광 transducer는 생물반응에서 일어나는 발광 혹은 발색을 전기적 신호로 전환시키는 간접적인 방법을 이용한다.

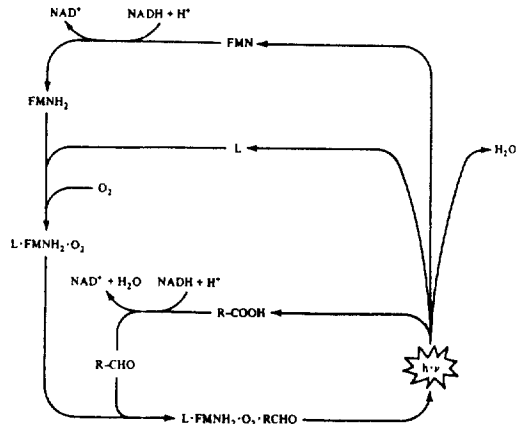


Fig. 6. Light Generation by Bacterial Luciferase.

광 transducer에 가장 일반적으로 이용되는 생체물질은 luciferase, flavin mononucleotide, 지방 aldehyde로 이루어지는 bacterial luciferase system으로 luciferase는 NADH 형태의 환원력이 있으면 빛을 받으면서 aldehyde를 지방산으로 산화한다(Fig. 6). Luciferase의 이러한 성질을 이용하여 NAD를 NADH로 환원시키는 효소와 함께 이 효소의 기질을 측정하는 biosensor를 만들 수 있다.

발색되는 생물반응도 광 transducer를 이용하여 biosensor에 사용된다. 생물반응에서 일어나는 발색의 과정에서 흡광도의 변화를 spectrophotometre로 측정하면 전기적 신호로 전환하게 된다. 발색이 되지 않는 반응도 발색제를 이용하면 광 transducer에 이용할 수 있다. 노당 측정용 시험지가 발색제를 이용하는 예이다.

최근 광섬유 기술과 laser 광의 실용화로 광 transducer의 크기가 점차 소형화되고 있으며, 감지부와 data 처리부를 분리할 수 있기 때문에 감지부를 생체에 직접 삽입할 수 있는 biosensor도 개발될 수 있다.

Biosensor에 이용되는 전기적 transducer와 광 transducer는 서로 장단점이 있기 때문에 biosensor의 용도에 따라 transducer를 결정하여야 한다(Table 4).

3-4. 기타 Transducer

생물반응에 의해 일어나는 온도변화를 전기적 신호로 전환할 수 있는 thermistor 혹은 calor-

Table 4. Biosensor 에 이용되는 광 Transducer 와 전기 Transducer 의 비교.

특징	광 Transducer	전기 Transducer
전기적 안정성	감지부에 전기 사용 없음	전압이 낮은 전기 사용
복잡성	복잡	단순
환경에 의한 간섭	시료의 색상과 주위 광에 의한 간섭	전기적 간섭
안정성	시약의 안정성이 낮음	전기적 불안정
기능성	발색 파장이 다른 타종 시료에 이용 가능	단일 물질 측정용
가격	고가	저렴

Table 5. Biosensor 에 이용되는 효소들.

기질	효소	Mediator	Electrode
포도당	glucose oxidase	수소이온 산소 요도이온 이산화수소 ferrocene	pH 전극 산소 전극 요도이온 특이 전극 산소 전극 탄소 전극
요소	urease	수소이온 암모니아 이산화탄소	pH 전극 암모니아 전극 이산화탄소 전극
Penicillin	penicillinase	수소이온	pH 전극
Acetylcholine	acetylcholine esterase	수소이온	pH 전극
Glutamate	glutamate decarboxylase	이산화탄소	이산화탄소 전극
L-amino acid	oxidase	암모니아 ferrocene	암모니아 전극 탄소 전극
Uric acid	oxidase	이산화탄소 산소	이산화탄소 전극 산소 전극
Oxalate	decarboxylase	이산화탄소	이산화탄소 전극
Alcohol	oxidase dehydrogenase	산소 NADH	산소 전극 탄소 전극
Lactate	dehydrogenase	ferrocyanide	백금 전극

imetre 등을 biosensor 용 열 transducer 로 이용할 수 있으나 sensitivity 가 낮고 복잡하며 가격이 비싸 실용성이 낮다.

전극표면의 전기저항을 변화시키거나 압전기 (piezoelectric) 를 유발하는 생물반응도 biosensor 에 이용할 수 있으나 열 transducer 와 같은 이유로 특수한 예를 제외하면 실용성이 없다.

4. 효소를 이용하는 Biosensor

생체물질 중에서 분석에 가장 일반적으로 이용

되는 것은 분석하려는 물질에 작용하는 효소이다. Biosensor 의 개발도 enzyme electrode 로부터 시작되었으며 현재까지 산업화된 대부분의 biosensor 들이 효소를 이용한 것들이다 (Table 5).

4-1. 전압 Transducer 를 이용하는 요소 측정용 Biosensor

전압 transducer 는 수소이온 등 이온을 선택적으로 측정하는 전극 (ionselective electrode, ISE) 과 이 이온을 생산하거나 소비하는 효소를 이용한다. 효소를 이용하는 전극을 만드는 방법은 Fig. 3에 예시하였다.

먼저 ISE 에 효소를 고정화시킨 막을 덮고 그 위를 투석용 cellophane 막으로 씌운다(Fig. 3a). 여기에 이용하는 효소는 투석막을 통과할 수 없으므로 전극과 투석막 사이에 고정화하지 않은 효소

용액을 그냥 사용할 수도 있다(Fig. 3b).

소변 중의 요소농도는 신장기능을 알기 위해 임상적으로 많이 분석된다. 요소는 urease 에 의해 다음과 같이 이산화탄소와 암모니아로 분해된다.

Table 6. Typical electrodes and their characteristics

Type	Enzyme	Sensor	Immobilization ^a	Stability	Response time	Amount of enzyme (U)	Range (mol/l) ^b
1. Urea	Urease (EC 3.5.1.5)	Cation	Physical	3 weeks	30 s-1 min	25	10 ² - 5 × 10 ⁵
		Cation	Physical	2 weeks	1-2 min	75	10 ² - 10 ⁴
		Cation	Chemical	>4 mounths	1-2 min	10	10 ² - 10 ⁴
		pH	Physical	3 weeks	5-10 min	100	5 × 10 ³ - 5 × 10 ⁵
		Gas (NH ₃)	Chemical	4 mounths	2-4 min	10	5 × 10 ² - 5 × 10 ⁵
		Gas (NH ₃)	Chemical	20 days	1-4 min	0.5	10 ² - 10 ⁴
		Gas (CO ₂)	Physical	3 weeks	1-2 min	25	10 ² - 10 ⁴
2. Glucose	Glucose oxidase	pH	Soluble	1 weeks	5-10 min	100	10 ¹ - 10 ³
			Chemical	>1 mounth	2-8 min	10	10 ³ - 10 ⁴
3. L-Amino acids (general) ^d	L-AA oxidase (EC 1.4.3.2)	Cation	Physical	2 weeks	1-2 min	10	10 ² - 10 ⁴
		NH ₁	Chemical	>1 mounth	1-3 min	10	10 ² - 10 ⁴
			Chemical	>1 mounth	1-3 min	10	10 ³ - 10 ⁴
L-Tyrosine	L-Tyrosine decarboxylase (EC 1.1.25)	Gas (CO ₂)	Physical	3 weeks	1-2 min	25	10 ¹ - 10 ⁴
L-Glutamine	Glutaminase (EC 3.5.1.2)	Cation	Soluble	2 days ^e	1 min	50	10 ¹ - 10 ⁴
L-Glutamic acid	Glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.3)	Cation	Soluble	2 days ^f	1 min	50	10 ¹ - 10 ⁴
L-Asperagine	Asparaginase (EC 3.5.1.1)	Cation	Physical	1 mounth	1 min	50	10 ² - 5 × 10 ⁵
4. D-Amino acids (general) ^e	D-AA oxidase (EC 1.4.3.3)	Cation	Physical	1 mounth	1 min	50	10 ² - 5 × 10 ⁵
5. Penicillin	Penicilinase (EC 3.5.2.6)	pH	Physical	1-2 weeks	0.5-2 min	400	10 ² - 10 ⁴
			Soluble	3 weeks	2 min	1000	10 ² - 10 ⁴
6. Amygdalin	-Glucosidase (EC 3.2.1.21)	CN	Physical	3 days	10-20 min	100	10 ² - 10 ⁵
7. Nitrate	Nitrate reductase/ nitrite reductase (EC 1.9.6.1/1.6.6.4)	NH ₄	Soluble	1 days	2-3 min	10	10 ² - 10 ⁴
8. Nitrite	Nitrate reductase (EC 1.6.6.4)	Gas (NH ₃)	Chemical	3-4 mounths	2-3 min	10	5 × 10 ² - 10 ⁴

^aPhysical, refers to polyacrylamide gel entrapment in all cases; "chemical" is attachment chemically to polyacrylamide, or to acrylamide, followed by physical entrapment.

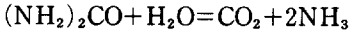
^bAnalytically useful range, either linear or with reasonable change in curvature is observed.

^cPreparation lacks stability as evidenced by constant decrease in signal each.

^dElectrode responds to L-cysteine, L-leucine, L-tyrosine, L-tryptophan, L-phenylalanine, and L-methionine.

^eElectrode responds to D-phenylalanine, D-alanine, D-valine, D-methionine, D-leucine, D-isoleucine, and D-isoleucine.

^fTime required for signal to return to base line before reuse.

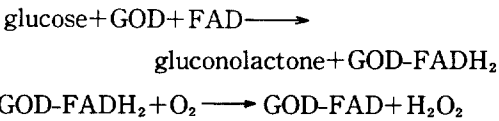


상기 반응식에서 보는 바와 같이 요소 측정용 효소 전극을 만드는데 암모니아, 이산화탄소 혹은 pH 전극을 이용할 수 있다. 어떤 전극을 사용하는 경우에도 전압의 변화를 표준물질과 비교하여 시료 중의 요소량을 측정한다.

Urease 를 이용하는 요소전극은 요소농도가 0.01-10 millimole 범위에서 측정이 가능하며, 효소의 안정성이나 측정에 필요한 시간은 사용하는 막과 효소의 고정화 방법에 의해 좌우되는 것으로 나타났다(Table 6).

4-2. 전류 Transducer 를 이용하는 포도당용 Biosensor

혈 중 포도당 농도는 당뇨병 등 여러 질병의 진단에 이용된다. 따라서 임상시험실에서 가장 많이 수행되는 분석 중의 하나가 포도당이다. 포도당의 분석에는 glucose oxidase(GOD-FAD)가 이용된다. GOD-FAD는 다음과 같은 반응으로 포도당을 산화한다.



현재 많이 사용되는 효소를 이용하는 포도당의 측정방법은 여기서 발생하는 과산화수소에 의해 산화되는 dianisidine 등 색소를 이용하는 비색법이다.

포도당에 의해 환원된 효소(GOD-FADH₂)로부터 전자를 산소로 전달시키지 않고 전극으로 직접 연결시키면 전류 transducer 를 만들 수 있다.

$\text{GOD-FADH}_2 \longrightarrow \text{GOD-FAD} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+$
Glucose oxidase 분자 중에서 직접 전자를 주고받는 부분인 FAD는 단백질로 싸여있기 때문에 전극과 접촉할 수 없다. 많은 경우 FAD와 전극 사이를 연결하기 위해 인공전자전달체인 mediator를 이용한다. Mediator는 환원된 효소로부터 전자를 받아 환원된다.

$\text{GOD-FADH}_2 + 2\text{M} \longrightarrow \text{GOD-FAD} + 2\text{M}' + 2\text{H}^+$
환원된 mediator는 전자를 전극에 전달하므로 다시 산화된다.

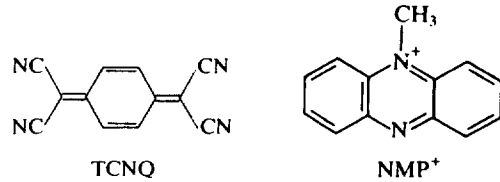
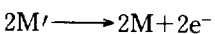


Fig. 7. Structures of Tetracyano-p-quinodimethane (TCNQ) and N-methylphenazinium (MNP⁺).

Mediator 를 효소와 함께 전극에 고정화하면 사용하기가 편리하며, 1회 이상 사용할 수 있기 때문에 생체에 직접 삽입하거나 발효조 등에서 장시간 계속 사용할 수 있다. Fig.5에서 본 ferrocene과 TTF가 가장 일반적으로 이용되는 mediator들이다. 산화환원반응을 측정하는 transducer에 이용되는 mediator는 다음과 같은 성질을 가져야 한다.

- 1) 산소보다도 환원된 효소에 대한 친화력이 높아야 한다.
- 2) 산화환원이 가역적이어야 한다.
- 3) 산화형은 물론 환원된 상태에서도 안정성이 높아야 한다.
- 4) 환원된 상태에서 전자가 산소로 이동하지 않아야 한다.
- 5) 식품, 의료 등에 이용되기 위해 독성이 없어야 한다.

최근 효소 중에 있는 전자전달체로부터 직접 전자를 받을 수 있는 전극이 개발되었다. 상온에서 고체인 7,7,8,8 tetracyano-p-quinodimethane (TCNQ)와 N-methylphenazinium (MNP) 등은 전기전도율이 높다. 이들에 산화환원효소를 고정화시켜서 전극으로 사용하면 효소로부터 직접 전자를 받을 수 있기 때문에 mediator 없이도 transducer로 이용할 수 있다(Fig.7). 분말상태의 TCNQ와 MNP를 혼합하여 고압(10만 psi)으로 성형하여 효소를 고정화시키면 선류 transducer로 이용할 수 있다. Lactate dehydrogenase, glucose oxidase, peroxidase, xanthine peroxidase 등이 TCNQ와 MNP 전극을 이용할 때 mediator를 사용할 필요가 없다.

전류 transducer 를 이용할 때 측정시간은 전압 transducer보다 짧아 1분 이내이며, 효소의 안정성은 다른 transducer에서와 같이 고정화 방법,

효소 자체의 성질 등에 따라 좌우된다.

4-3. 광 Transducer를 이용하는 포도당용 Biosensor

효소를 이용하는 각종 분석이 spectrophotometre를 이용하는 방법으로 개발되어 많이 이용되고 있으나 발광이나 발색반응을 광 transducer로 이용할려는 연구는 비교적 최근에 시작되었다. 그 이유는 광 transducer의 구조가 전기 transducer보다 복잡하기 때문이다. 최근 광섬유와 laser 광의 보편화와 광 transducer의 민감도가 다른 transducer보다 높기 때문에 광 transducer의 개발에 많은 연구가 진행되고 있다.

개똥벌레의 luciferase system을 이용하는 ATP 정량법은 잘 알려진 사실이다. 이를 ATP 등의 측정용 biosensor에서 광 transducer의 일부로 이용하는 방법이 개발되었으나 luciferase 외에 luciferin과 oxyluciferin을 luciferin으로 환원시키는 system을 같이 고정화해야 하기 때문에 ATP를 비롯하여 creatine phosphate 등의 측정용으로만 연구가 진행되고 있다. Luciferase를 이용하여 심장병 진단에 이용되는 creatine phosphate를 측정하는 biosensor는 femtomole(10^{-15} mole) 단위까지 측정할 수 있을 정도로 민감도가 높은 것으로 보고되었다.

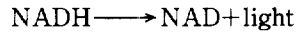
개똥벌레의 luciferase 보다는 잘 알려지지 않았으나 세균에 의한 발광은 NAD(P)H 혹은 FADH₂ 형태의 환원력만을 필요로 하기 때문에 NAD를 조효소로 이용하는 효소의 기질 측정용 biosensor의 개발에 세균의 발광을 이용할 수 있으며, glucose dehydrogenase를 이용하는 포도당 측정용 biosensor는 실험실에서 개발되었다. 세균발광을 이용하는 광 transducer 또한 민감도가 높아서 포도당과 malate는 picomole, NADH와 TNT는 femtomole, testosterone은 nanomole 단위까지 측정이 가능하다.

Glucose dehydrogenase는 다음과 같이 포도당에 작용하여 NAD를 NADH로 환원시킨다.



여기서 환원되는 NADH는 포도당의 양에 비례하며, NADH의 농도는 세균 발광계에서 광의 크기

를 결정하므로 이를 광 transducer로 이용할 수 있다.



5. 균체를 이용하는 Biosensor

지금까지 살펴본 효소를 이용하는 biosensor는 정제된 효소를 이용하기 때문에 특이성이 좋은 반면 안정성이 낮고 값이 비싼 결점이 있다. 효소센서는 안전성이 낮기 때문에 발효공업의 계측과 제어 등과 같이 장시간에 안정한 센서를 필요로 하는 분야에서는 이용이 불가능하다. 효소센서의 이러한 결점을 보완하기 위해 고정화한 균체를 transducer에 이용하는 방법이 연구되고 있으며, BOD, 암모니아 등 환경 계측용 센서와, 포도당, fermentable sugar, acetate, ethanol, formate, methane, glutamate, cephalosporin 등 발효 공업의 기질이나 산물을 측정하는 biosensor가 개발되었거나 연구되었다(Table 7).

균체센서는 효소센서에 비해 다음과 같은 장점이 있다.

- 1) 안정성(stability)이 높다.
- 2) 원하는 성질의 미생물이 많이 알려져 있으며, 쉽게 구할 수 있다.
- 3) Transducer에 이용하는 반응이 둘 이상일 때 하나의 미생물을 이용할 수 있다.
- 4) 효소처럼 정제할 필요가 없다.

이상의 장점들이 biosensor에서 단점이 될 수 있다.

- 1) 복합적인 대사반응을 갖는 균체는 선택성이 낮다.
- 2) 측정과 회복에 필요한 시간이 길다.
- 3) 균체를 살아 있는 상태로 유지해야 하므로 고정화와 유통과정에서 특별한 주의가 필요하다.
- 4) 효소센서는 살균제를 이용하여 오염을 방지할 수 있으나 균체센서는 살균제를 이용할 수 없다.

*Pseudomonas fluorescens*는 포도당을 다음과 같이 산화하기 때문에 이 세균이 소비하는 산소는 포도당의 양과 비례한다. 이러한 성질을 이용하여 산소 전극에 고정화한 균체를 띄워 포도당 측

Table 7. Characteristics of micro-organism based sensors

Sensor	Immobilized Micro-organisms	Device	Response time (min)	Range (mg dm ⁻³)
Assimilable sugars	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	O ₂ -probe	10	10-200
Glucose	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	O ₂ -probe	10	2-2×10
Acetic acid	<i>Trichosporon brassicae</i>	O ₂ -probe	10	3-60
Ethanol	<i>Trichosporon brassicae</i>	O ₂ -probe	10	2-25
Methanol	Unidentified bacteria	O ₂ -probe	10	5-2×10
Formic acid	<i>Citrobacter freundii</i>	fuel cell	30	10-10 ³
Methane	<i>Methylomonas flagellata</i>	O ₂ -probe	2	0-6.6 ^{a6}
Glutamic acid	<i>Escherichia coli</i>	CO ₂ -probe	5	8-800
Cephalosporin	<i>Citrobacter freundii</i>	pH electrode	10	10 ² -5×10 ²
BOD	<i>Trichosporon cutaneum</i>	O ₂ -probe	15	3-60
Lysine	<i>Escherichia coli</i>	CO ₂ -probe	5	10-10 ²
Ammonia	Nitrifying bacteria	O ₂ -probe	10	0.05-1
Nitrogen dioxide	Nitrifying bacteria	O ₂ -probe	3	0.51-255 ^b
Nystatin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	O ₂ -probe	1(h)	0.5-54 ^c
Nicotinic acid	<i>Lactobacillus arabinosis</i>	pH electrode	1(h)	10 ⁻⁵ -5
Vitamin B ₁	<i>Lactobacillus fermenti</i>	fuel cell	6(h)	10 ⁻³ -10 ⁻²
Cell population	-	fuel cell	15	10 ⁸ -10 ^{9d}
Mutagen	<i>Bacillus subtilis</i> Rec	O ₂ -probe	1(h)	1.6-2.8×10 ³

^a mmol, ^b ppm, ^c Units cm⁻³, ^d Number cm⁻³

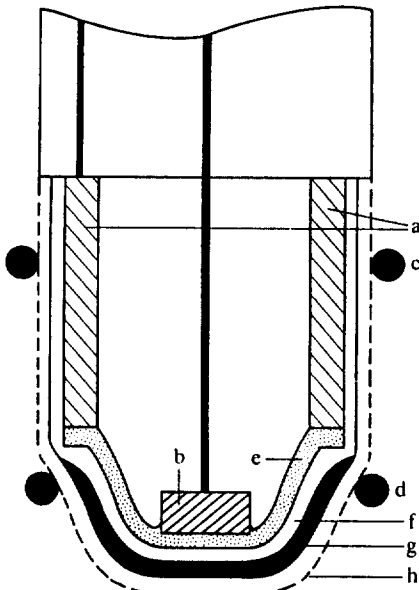
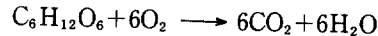


Fig. 8. Construction of Whole Cell Glucose Sensor Using Oxygen Electrode and *Ps. fluorescens* Cell. a, silver anode; b, platinum cathode; c, d, ring; e, electrolyte gel; f, teflon membrane; g, microbial cell on nylon net; h, cellophane.

정용 전극을 만들 수 있다(Fig. 8).



6. 균체 측정용 광 Transducer

일반적으로 식품의 신선도, 식수의 오염도는 시료를 적당한 고체 배지에 도말하여 2-3일 후에 나타나는 취락의 수로 판정한다. Luciferin system을 이용하여 시료 중의 살아 있는 미생물 균체를 측정하는 biosensor가 개발되었다. 취락을 형성할 수 있는 미생물체는 휴면상태의 포자(spore)와 영양세포로 구분된다. 식품 등 영양상태가 좋은 조건에서는 포자가 발아하여 영양세포의 형태로 된다. 이 biosensor는 취락을 형성할 수 있는 영양세포의 총 adenylate에 대한 ATP의 비율을 나타내는 adenylate energy charge(EC)가 0.5-0.8 이상이라는 점을 감안하여 시료 중의 ATP를 측정하는 원리를 응용하였다. Luciferase system을 응용하면 균체 측정시간을 2-3일에서 한 시간 이내로 줄일 수 있다.

발효 중에 왕성하게 생육하는 균체의 양을 측정하는 biosensor 도 세균의 발광을 이용하여 균체 중의 NADH 의 양을 측정하는 원리를 이용하여 개발되었다.

7. 면역학을 이용하는 Biosensor

효소 혹은 균체를 이용하는 biosensor 는 이들과 작용하는 물질만을 측정할 수 있기 때문에 미생물이나 효소의 작용이 알려지지 않은 물질을 측정할 수 있는 biosensor 는 만들 수 없으나 항체를 이용하면 이 항체의 항원을 측정할 수 있는 biosensor 를 만들 수 있다. 항체란 동물체에서 외부로부터 들어오는 물질로부터 자신을 보호하기 위해 외부로부터 들어오는 물질(항원)과 특이적으로 결합하는 단백질을 말한다. 이 항원-항체반응을 biosensor 의 감지부로 응용하는 방법은 다음과 같다.

1) 산소를 소비하거나 생산하는 효소를 연결한 항체와 이효소의 기질을 산소전극에 결합시킨 전류 transducer 를 이용하는 biosensor.

2) 전기화학적으로 감지할 수 있는 물질을 생산하거나 소비하는 효소를 항체에 연결한 전류 transducer.

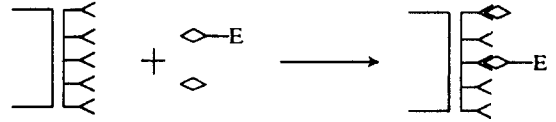


Fig. 9. Principle of Enzyme Linked Immunoassay (ELISA).

3) 전기화학적으로 감지할 수 있는 물질을 직접 항체에 결합시킨 전류 transducer.

4) 항체-항체반응에서 전기적 변화를 측정하는 전압 transducer.

5) 특정 이온전극과 이 이온을 생산하거나 소비하는 효소를 연결한 항체를 이용하는 전압 transducer.

효소를 연결한 항체를 이용하는 transducer 의 원리는 enzyme linked immunoassay (ELISA) 법과 유사하다(Fig. 9). 산소를 생산하는 효소로 catalase, 소비하는 효소로 glucose oxidase, 암모니아를 생산하는 urease, asparaginase, adenine deaminase 등이 면역학을 이용하는 biosensor 에 이용되고 있다.

항체는 단백질이기 때문에 분자 안에 charge 된 부분이 많다. 항원과 작용하면 이 charge 된 부분에 영향을 받게 되므로 이를 전기화학적으로 직접 측정할 수도 있다.

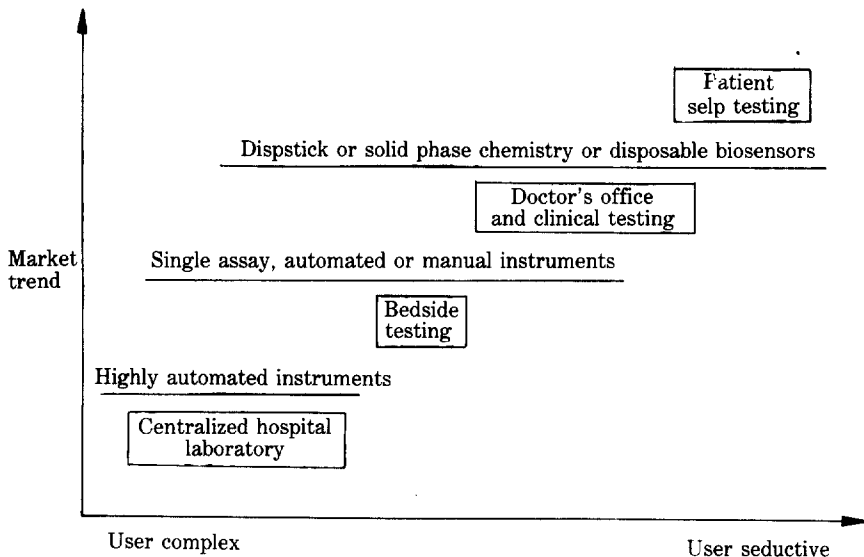


Fig. 10. Trends in Clinical Analysis.

8. Biosensor 의 활용

8-1. 의료용

질병의 예방, 진단 그리고 치료과정에서 많은 종류의 임상시료가 분석된다. 현재 종합병원의 임상실험실에서 고가의 자동화된 분석기기를 이용하여 수집된 시료를 분석하고 있으나 시료의 수집과 분석시간이 길기 때문에 긴급을 요하는 시료의 분석을 짧은 시간에 할 수 있는 방법이 필요하다. 이를 위해 시료의 전처리가 필요없고 취급이 간편한 분석기기의 개발이 요청되고 있다. 이러한 기기가 개발되면 질병의 진단시간이 짧아지고 분석에 특별한 훈련을 받지 않은 의사나 환자 자신이 직접 분석할 수 있게 될 것으로 전망된다(Fig. 10).

현재 임상분석에 많은 종류의 효소들이 이용되고 있다(Table 9). 이 효소들의 반응을 전압 및 전류 transducer 혹은 광 transducer에 이용할

수 있으며 이들을 biosensor 로 많이 개발되었다.

8-2. 식품공업

대단위 식품공업에서 원료의 신선도는 최종 제품의 품질에 지대한 영향을 미친다. 따라서 원료 처리 전에 간편한 방법으로 빠른 시간 안에 신선도를 측정할 필요가 있다. 이를 위해 우유 중의 생균체를 측정하는 biosensor 가 개발되었으며, 육류의 신선도가 육질의 포도당 함량과 관계가 있는 것을 응용하여 포도당 센서를 이용하여 육류의 신선도를 측정할 수 있는 방법이 개발되었다.

지금까지 식품에 이용될 목적으로 개발되었거나 연구되고 있는 biosensor 는 모두 의료용으로 개발된 것을 응용하는 수준이다. 이 이유는 의료 분야가 식품 분야보다 시장성이 크기 때문이다. 앞으로 예방의학의 중요성이 강조되고 즉석식품이 대중화되면 식품용 biosensor 도 개발될 것으로 전망된다.

Table 8. Enzymes Used Clinical Analyses.

Compound Analysed	Enzymes	Characteristics for Detection
Glucose	glucose oxidase	hydrogen peroxide
	hexokinase + glucose-6-ph dehydrogenase	NAD(P)H
	glucose dehydrogenase	NAD(P)H
Cholesterol	cholesterol oxidase	hydrogen peroxide
Triglyceride	lipase + glycerol dehydrogenase	NADH
	lipase + glycerol kinase	ATP
Phospholipid	phospholipase C + alkaline phosphatase	phosphate
Urea	urease	ammonia
Ammonia	glutamate dehydrogenase	NAD(P)H
Urate	urate oxidase	hydrogen peroxide
Creatinine	creatinine deiminase	ammonia
Pyruvate	lactate dehydrogenase	NADH
Lactate	lactate dehydrogenase	NADH
	lactate oxidase	hydrogen peroxide
	citrate lyase + malate dehydrogenase	NADH
Citrate	citrate lyase + malate dehydrogenase	NADH
Fatty acid	acyl-Co A synthase + acyl-Co A oxidase	hydrogen peroxide
Ammino acid	L-amino acid oxidase	hydrogen peroxide
Phosphate	pyruvate oxidase	hydrogen peroxide
Clolinesterase	choline oxidase	hydrogen peroxide
glutamic-pyruvic transaminase (GPT)	lactate dehydrogenase	NADH
glutamic-OAA transaminase (GOT)	malate dehydrogenase	NADH

8-3. 발효공업

발효공업이 발달한 일본에서 개발된 biosensor 들이 발효공업의 기질이나 발효산물을 측정하는 것들이 많다(Table 7). Biosensor 의 개발비가 수백만불에 달하는데 비해 발효공업용 biosensor 의 수요가 적기 때문에 아직 산업화된 예가 적다. 앞으로 biosensor 가 일반적으로 이용되어서 개발비가 낮아지면 microprocess 와 함께 발효공정의 자동화에 크게 기여할 전망이다.

8-4. 환경평가

BOD 측정용 biosensor 는 이미 개발되어 5일 이상 소요되는 BOD 를 수분 내에 측정할 수 있다. 대기오염의 주범이 되는 일산화탄소, 유황화합물 등을 측정하는 화학센서들이 생산되고 있으나 특이성이 낮기 때문에 특이성이 높은 biosensor 의 개발이 요청되고 있다. 산화환원효소가 알려진 각종 오염물질의 biosensor 는 의료용 biosensor 의 경험을 토대로 쉽게 개발될 것으로 생각되며, enzyme linked immunoassay 법이 biosensor 에 이용될 수 있기 때문에 거의 모든 유기오염물질을 biosensor 를 이용하여 측정하는 방법이 개발될 것이다.

8-5. 기타

영국 Thorn EMI Simtech 사는 화학무기로 이용되는 신경 gas 측정용 biosensor 를 산업화하여 방위산업 분야에도 biosensor 가 이용될 수 있음을 증명하였다. 항원항체반응을 이용하는 폭발물의 biosensor 의 개발이 진행 중인 것으로 알려져 있다.

9. Biosensor 시장의 전망

Fig.1에서 소개한 바와 같이 biosensor 시장이 1990년대 이후에 급격히 증가할 것으로 전망되고 있다. 현재 우리의 일상생활에 전자제품이 광범위하게 이용되고 있는 것과 같이 21세기에는 biosensor 가 일상생활에 필수불가결한 요소가 될 것이라는 전망도 있다. Super computer 등에도 biosensor 의 원리가 응용될 것으로 판단되고 있어

서 biosensor 시장이 전자산업의 시장성을 증가할 것이 확실하다. 따라서 우리나라도 biosensor 에 대한 중요성을 인식하고 많은 연구투자가 필요하다.

참고문헌

1. A.P.E. Turner, I. Karube and G.S. Wilson (eds.) *Biosensors; Fundamentals and application. Oxford University Press, Oxford, p.770* 1987.
2. S. Suzuki(ed) *Biosensor* (일본어), 강담사(동경), 433 pp, 1984.
3. *International Industrial Biotechnology*, 8(2), 1988 (with special feature on biosensor)
4. S.W. Birch, A.F.P. Turner and R.E. Ashby, (1987), An inexpensive on-line alcohol sensor for fermentation monitoring and control. *Proc. Biochem. April, 1987, 37-42.*
5. S.L. Brooks and A.P.F. Turner, (1987), Biosensor for measurement and control. *Measurements and Control, 20, 37-43.*
6. A.E.G. Cass, G. Davies, D. Francis and H.A.O. Hill, (1984), Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Analyt. Chem., 56, 667-671.*
7. I.J. Higgins and H.A.O. Hill, (1985), Bioelectrochemistry. *Essay Biochem., 21, 119-145.*
8. I.J. Higgins and C.R. Lowe, (1987), Introduction to the principles and applications of biosensors. *Phil Trans R Soc Lond N316, 3-11.*
9. E. Kress-Rogers and E.J. D'Costa, (1986), Biosensors for the food industry. *Analyt. Proc., 23, 149-151.*
10. V.M. Owen, (1986), The biosensor business. A paper presented at the International Symposium in Biosensor, American Chemical Society, Anaheim, September 1986.
11. V.M. Owen and A.P.F. Turner, (1987), Biosensors: A revolution in clinical analysis, *Endeavour, New Series, 11(2), 100-104.*