

효모균을 이용한 BOD Biosensor

김 말 남

상명여자대학교 자연과학대학 생물학과

Yeast Loading BOD Biosensor

Mal-Nam Kim

Department of Biology, Sangmyung Women's University, Seoul 110-743, Korea.

ABSTRACT: A yeast loading biochemical oxygen demand (BOD) sensor was designed and constructed to quickly measure the concentration of biologically assimilable organic substances dissolved in water as BOD values to feed back to the waste water treating processes. The sensitivity of the BOD sensor reached maximum at around pH 7.0 and 30°C where yeast showed the highest assimilation activity. Biomass also affected the sensor output, and biomass of 0.14 mg/cm² on the dialysis membrane appeared to be the optimum cell mass level. The sensitivity of the sensor depended on the kinds of pollutants and increased considerably when the yeast was preincubated in the solution of respective pollutants before loading on the sensor.

KEYWORDS: BOD sensor, yeast, preincubation, assimilation activity

생물학적 산소 요구량(BOD)은 수용액 속의 생분해성 유기물의 농도를 나타내는 중요한 파라미터로 널리 사용되고 있다. BOD₅는 대개 수용액에 미생물을接种하고 공기로 수용액을 포화시킨 상태에서 용기를 밀폐한 후 5일이 경과한 다음 수용액 속에서 미생물에 의하여 소모되고 남은 용존산소의 양을 측정하여 분석한다. 이와같은 BOD₅는 여러 수처리 공정을 조절하기에는 너무 긴 분석시간이 소요되기 때문에 BOD를 보다 신속하게 측정하여 공정의 제반 조건을 점검할 수 있도록 feed back 하는 것이 필요하다. 이에 더하여 BOD₅의 측정은 숙련된 기능인이라도 측정오차가 10% 이상으로 나타난다(Karube 등, 1977).

이와같은 단점을 개선하기 위하여 flow microcalorimetry(Beaubien과 Jalicoeur, 1985)와 microprocessor(Raviv와 Ben-Yaakov, 1984)를 이용하여 BOD₅를 간접적으로 측정하는 방법이 소개되었으나 이 방법들은 측정을 위한 조작이 복잡하고 분석기기가 고가인 것이 흠이다.

미생물과 산소전극을 이용한 sensor로써 BOD

를 더욱 간편하고 신속하게 정량하려는 연구가 진행되어 왔다(Karube와 Suzuki, 1990). BOD sensor는 특정한 기질에 대하여만 감응하는 다른 biosensor와는 달리 여러 종류의 오염원을 감지할 수 있어야 한다.

Karube 등(1977) 및 Strand와 Carlson(1984)은 하수 처리장으로부터 채취한 활성슬러지를 BOD sensor에 사용하였다. 그러나 활성슬러지의 혼합균주로써 재현성 있는 BOD 측정결과를 나타내는 sensor를 제작하기는 매우 어렵다(Hikuma 등, 1979). 단일균주를 BOD sensor에 응용한 연구로는 *Clostridium butyricum*(Karube 등, 1977), *Trichosporon cutaneum*(Riedel 등, 1990), *Hansenula anomala*(Li와 Chu, 1991; Ihn 등, 1992), *Escherichia coli*(Kawabata와 Nakamura, 1986), *Bacillus subtilis*(Riedel 등, 1988; Li와 Tan, 1994), *Citrobacter* sp.(Galindo 등, 1992), *Photobacterium phoreum*(Hyun 등, 1993), Beer yeast(Chuxiang 등, 1993), *B. licheniformis*(Li와 Tan, 1994) 등이 있다. 보고된 대부분의 BOD sensor들은 미생물을 고분자막 속에 고정화

*Corresponding author

하거나(Ihn 등, 1992) 균일한 크기의 기공을 가지고 있는 막 사이에 미생물을 가두는 방법을 사용하였다. 미생물을 고분자막 속에 고정화하면 고정화 과정 중에 미생물의 활성이 크게 저하되며 고정화 조건을 균일하게 조절하지 않으면 기공의 크기나 수가 다르기 때문에 오염물질의 확산속도가 다를 소지가 있어 측정 결과의 재현성을 감소시킬 수 있다.

본 연구에서는 서울 중랑하수처리장의 반송오니로부터 직접 분리한 효모균을 자체 설계하여 제작한 미생물 biosensor에 충전하여 BOD의 측정을 행하였다. 이 BOD sensor는 미생물을 고분자 막속에 고정화하는 방법을 사용하지 않음으로써 미생물의 활성이 높게 유지되도록 설계하였다. 본 논문은 이 BOD sensor의 오염물질에 대한 감응도와 측정조건에 영향을 조사한 것이다.

재료 및 방법

균주의 배양

본 실험에 사용된 효모균(Strain SM-1)은 서울시 중랑 하수처리장의 반송오니로부터 분리해 낸 것으로, 균주 분리 및 배양에 사용한 최소배지는 glucose 10 g, glutamic acid 10 g, distilled water q.s.p. 1 l(pH 7.0)로 조성되었다. 여기에 agar (difco) 2%를 넣은 고체배지에 균체를 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 후, 4°C에서 보관하면서 계대배양하였다. 고체배지에서 배양한 균주를 액체배지에 접종하여 30°C에서 3일간 진탕배양한 후 원심 분리(8,000×g, 4°C, 15 min.)하여 3회 세척하였다. 세척한 균체를 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁한 후 spectrophotometer(Shimadzu, UV-

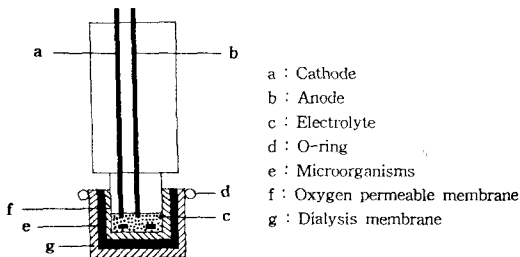


Fig. 1. Structure of biochemical oxygen demand sensor.

1200)를 사용하여 적정균체량을 측정하고 이를 BOD sensor에 충전하였다.

BOD의 측정

효모균을 Fig. 1과 같이 기체 투과막과 투석막 사이에 일정 중량으로 충전한 후 O-ring을 이용하여 산소전극에 부착한 것을 BOD sensor로 사용하였다. 이 BOD sensor를 온도가 30±0.1°C로 유지하며, 공기를 폭기하여 산소로 포화시킨 150 ml의 완충 용액(0.1M phosphate buffer; pH 7.0)속에 장착한다. 산소전극으로부터 나오는 전류신호를 0~0.5V로 변환하여 기록하였으며 이 신호가 안정화 되었을 때 오염물질을 주입한 후 충전된 미생물의 호흡대사 결과 산소가 소모되는 속도와 투석막을 확산하여 들어오는 속도가 정상상태를 이룰 때 BOD sensor의 출력 신호가 안정화되므로 이 두 출력 신호의 차이를 측정하여 BOD 값을 결정하였다. Fig. 2는 BOD sensor의 출력신호의 전형적인 예를 측정시간에 대하여 도시하였다.

미생물의 전처리

균체를 오염물질에 전처리한 후 BOD 값을 측정하는 실험을 위하여는 각 2 mM씩의 maltose, mannose, lactose, galactose, sucrose, glucose, glycine, glutamic acid, acetic acid, lactic acid, aspartic acid, citric acid 용액에 14시간 동안 균체를 전처리한 후에 이 미생물을 sensor에 장착하여 사용하였다.

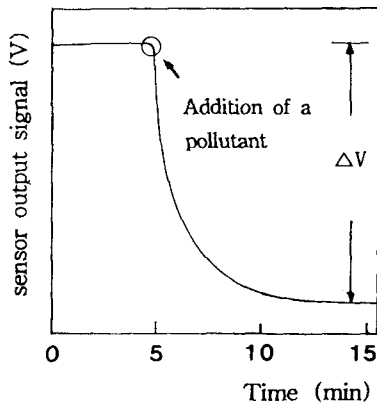


Fig. 2. A typical response curve of the biochemical oxygen demand sensor.

결과 및 고찰

BOD sensor의 감응도

기존 BOD₅의 측정에 대한 표준 glucose와 glutamic acid의 혼합물은 기존의 BOD₅ 측정값의 신빙성을 확인하기 위한 대조용액으로 사용되고 있으며 glucose와 glutamic acid가 0.1M 인산완충용액에 각각 150 mg/l씩 용해되어 있을 때 JIS 규격(JIS, 1974)은 BOD 값을 220 ppm으로 표준화하고 있다. Fig. 3은 glucose와 glutamic acid 혼합물의 농도에 따른 BOD sensor의 감응도를 나타낸 것으로 수용액의 BOD(ppm) 값에 따라 BOD sensor의 신호가 직선적으로 출력되며 오염물질의 농도에 따라 민감하게 감응하고 있음을 보여주고 있다.

수용액의 pH와 온도의 영향

BOD sensor는 오염물질의 농도가 생존 미생물의 호흡대사에 미치는 영향을 산소 전극을 이용하여 간접적으로 측정하는 원리로서 작동되므로 오염물질의 농도 뿐만 아니라 BOD 측정에 외부조건에 의해서도 영향을 받을 수 있다. Fig. 4는 표준오염물질 용액의 농도에 따른 BOD sensor의 출력신호의 직선관계 기울기를 측정하여 수용액 pH의 함수로 나타낸 것이다. pH 7.0 부근에서 가장 민감한 감응도를 나타내므로 재현성있는 BOD의 측정을 위하여는 오염물질 용액의 pH를 정확히 조절해야 한

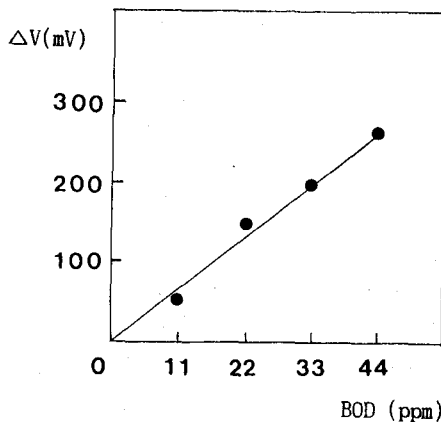


Fig. 3. The calibration curve of the biochemical oxygen demand sensor signal under 0.1M phosphate buffer, pH 7.0 and 30°C

다는 것을 보여주고 있다. Fig. 5는 BOD의 측정 수용액의 온도에 따른 BOD sensor의 감응도이다. 30°C 부근에서 가장 정확한 BOD 값을 측정할 수 있음을 나타내며 감응도의 온도 의존성이 크게 민감하지 않으므로 매우 정밀한 온도조절은 요구되지 않음을 알 수 있다. BOD sensor의 감응도가 가장 민감한 pH 7.0과 온도 30°C의 조건은 사용된 효모 균의 활성이 가장 높은 조건과 일치한다.

충전된 균체량의 영향

투석막을 확산하여 들어오는 산소의 유입 속도는

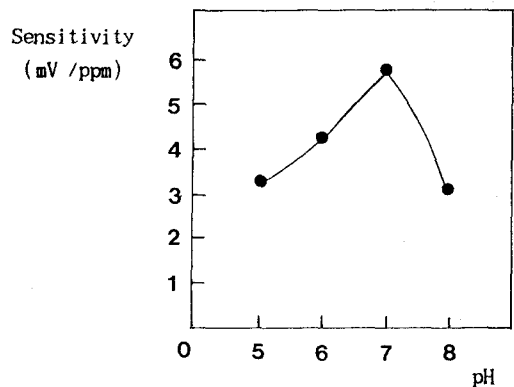


Fig. 4. Effect of solution pH on the sensitivity of the biochemical oxygen demand sensor determined from the slope of linear relationship between sensor signal and concentration of standard pollutant mixture.

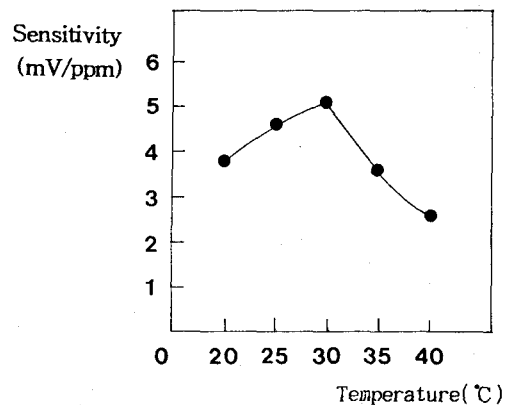


Fig. 5. Sensitivity of the biochemical oxygen demand sensor signal expressed as a function of solution temperature.

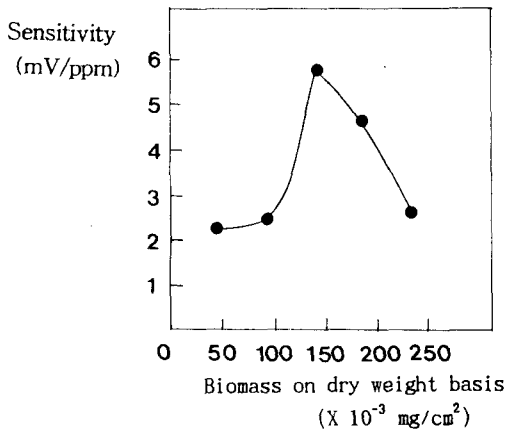


Fig. 6. Sensitivity of the biochemical oxygen demand sensor signal expressed as a function of biomass loaded.

투석막의 기공 크기와 분포 및 미생물이 충전된 공간의 산소 농도에 의하여 결정된다. 미생물의 충전량이 적을 때는 오염물질의 농도 변화에 따라 미생물의 호흡대사가 빨라지더라도 산소의 소모량이 적기 때문에 감도가 떨어지고 미생물의 충전량이 과도할 때는 미생물의 생존에 필요한 산소량이 증가하거나 effective diffusivity가 감소할 수 있으므로 BOD sensor의 back ground 신호가 커지며 오염물질 농도에 따른 BOD sensor의 출력신호가 오염물질의 농도가 낮을 때에도 직선관계를 벗어날 수 있다.

Fig. 6은 BOD sensor에 충전된 biomass의 양에 따른 BOD sensor의 감응도를 나타내고 있다. 예상했던 대로 0.14 mg/cm^2 부근에서 최상의 감응도를 나타내는 biomass가 존재하며 감응도의 변화가 비교적 급격하므로 충전되는 biomass의 양을 정확히 조절하는 것이 재현성 있는 BOD의 측정을 위하여 필요함을 알 수 있다.

오염물질과 전처리의 영향

BOD sensor는 폐수처리 공정의 BOD를 연속적으로 감지할 수 있도록 설계되어야 한다. 일반 폐수처리공정에는 다양한 종류의 오염물질이 혼합되어 있으며 혼합비율도 일정하지 않다. Table 1은 오염물질의 종류를 달리하였을 때 수반되는 BOD sensor 감응도의 변화를 수록한 것이다.

Table 1. Effect of substrates and preincubation on the biochemical oxygen demand sensor signal

| Substrate | Sensitivity [mV/(mg/l)] | |
|---------------|-------------------------|------|
| | A | B |
| Maltose | 5.44 | 1.27 |
| Mannose | 2.38 | 1.02 |
| Lactose | 4.08 | 1.81 |
| Galactose | 4.25 | 2.72 |
| Sucrose | 5.78 | 1.44 |
| Glucose | 5.44 | 4.25 |
| Glycine | 3.40 | 1.70 |
| Glutamic acid | 5.95 | 3.74 |
| Acetic acid | 4.12 | 4.08 |
| Lactic acid | 3.06 | 2.72 |
| Aspartic acid | 6.80 | 4.02 |
| Citric acid | 5.44 | 1.36 |

A: Cells preincubated in the substrate solution for 14 hours.

B: Cells without preincubation.

Maltose, mannose, sucrose, citric acid 등이 비교적 낮은 값을 나타내는 반면 glucose, glutamic acid, acetic acid, aspartic acid 등은 높은 감응도를 보여주고 있다. Table 1은 또 효모를 농도 2 mM인 오염물질 용액 속에 각각 14시간 동안 전처리 시킨 후 BOD sensor에 충전하였을 때, 오염물질의 농도에 따른 감응도가 증가함을 나타내고 있다. 전처리의 효과는 sucrose, citric acid 및 maltose에서 가장 크게 나타났으며, 전처리후 maltose, sucrose, glucose, glutamic acid, aspartic acid 및 citric acid가 높은 감응도를 나타내었다.

적 요

용존 유기물의 농도를 BOD로 신속히 측정하여 폐수처리 공정에 feed back할 수 있는 Yeast BOD sensor를 제작하여 BOD 측정의 거동을 조사하였다. BOD sensor의 감응도는 yeast의 활성이 가장 높은 pH 7.0 및 온도 30°C에서 가장 높게 나타났다. Sensor에 충전되는 효모의 양도 감응도에 영향을 미치며 투석막 단위면적당 0.14 mg/cm^2 가 최적의 균체량이었다. 오염물질의 종류에 따라

BOD sensor의 출력 신호가 다르게 나타났으며 각각의 오염물질 속에 효모균을 전처리 시킨후 sensor에 충전할 경우 sensor의 감응도가 크게 증가하였다.

참고문헌

- Beaubien, A. and C. Jolicoeur. 1985. Applications of flow micrometry to process control in biological treatment of industrial wastewater. *J. Water. Pollut. Control Fed.* 57: 95-100.
- Chunxiang, X., L. Gang, C. Haobin, and X. Yue. 1993. Microbial sensor for on-line determination of microbial population in a fermenter. *Sensor and Actuators B.* 12: 45-48.
- Galindo, E., J.L. Garcia, L.G. Torres and R. Quintero. 1992. Characterization of Microbial membranes used for the estimation of Biochemical oxygen demand with a biosensor. *Biotechnology techniques.* 6: 399-404.
- Ihn, G.S., K.H. Park, U.H. Pek and M.J. Sohn. 1992. Microbial BOD sensor Using *Hansenula anomala*. *Bull. Korean Chem. Soc.* 13: 145-148.
- Hikuma, M., H. Suzuki, T. Yasuda, I. Karube and S. Suzuki. 1979. Amperometric Estimation of BOD by Using Living Immobilized Yeasts. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8: 289-297.
- Hyun, C.K., E. Tamiya, T. Takeuchi, I. Karube and N. Inoue. 1993. A novel BOD sensor based on bacterial luminescence. *Biotech. & Bioeng.* 41: 1107-1111.
- JIS. 1974. Testing Methods for Industrial Wastewater, Japanese Industrial Standards Committee, Tokyo, Japan JIS K 0102 pp. 33.
- Karube, I. and M. Suzuki. 1990. Microbial Biosensors. In A.E.G. Cass (ed.), Biosensors A Practical Approach. Oxford University Press. p. 155-170.
- Karube, I., S. Mitsuda, T. Matsunaga and S. Suzuki. 1977. A rapid method for estimation of BOD by using immobilized microbial cell. *J. Ferment. Technol.* 55: 243-248.
- Karube, I., T. Matsunaga, S. Mitsuda and S. Suzuki. 1977. Microbial Electrode BOD Sensors. *Biotechnology and Bioengineering.* 19: 1535-1547.
- Kawabata N. and N. Nakamura. 1986. New BOD sensor utilizing a functional polymer which captures microorganisms alive. Abstract of the International Symposium on New sensors and Methods for Environmental Characterization, Kyoto, Japan.
- Li, F. and T.C. Tan. 1994. Effects of preconditioning and microbial composition on the sensing efficacy of a BOD biosensor. *Biosensors & Bioelectronics.* 9: 197-205.
- Li, Y.R. and J. Chu. 1991. Study of BOD microbial sensors for waste water treatment control. *Appl. Biochem. Biotechnology.* 28: 855-863.
- Raviv, R. and S. Ben-Yaakov. 1984. A simple algorithm for on-line prediction of BOD₅ by a microprocessor-based system. *Biotech. Bioeng.* 26: 1239-1244.
- Riedel, K., R. Renneberg, M. Kuehn and F. Scheller. 1988. A fast estimation of biochemical oxygen demand using Microbial sensors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 316-318.
- Riedel, K., K.P. Lange, H.J. Stein, M. Kuhn, P. Ott and F. Scheller. 1990. A microbial sensor for BOD. *Wat. Res.* 24: 883-887.
- Strand, S.E. and D.A. Carlson. 1984. Rapid BOD measurement for municipal wastewater samples using a biofilm electrode. *Journal WPCF.* 56: 464-467.