

질산염 환원세균, 아질산염 산화세균, 암모니움염 산화세균으로부터 분리한 효소의 전기화학 반응을 이용한 질산염, 아질산염, 암모니움염 측정용 바이오센서의 제작

박두현[†] · 류혜정 · 강혜선 · 박형수* · 김무훈*

서경대학교 생물공학과, *삼성엔지니어링 기술연구소

Construction of Biosensor using Electrochemical Reaction of Nitrate Reductase, Nitrite Oxidase and Ammonium Oxidase Isolated from Nitrate Reducer, Nitrite Oxidizer and Ammonium Oxidizer

Doo-Hyun Park[†], Hye-Jung Ryu, Hye-Sun Kang, Hyung-Soo Park*, and Moo-Hoon Kim*

Department of Biological Engineering, Seokyeong University Jungneung-dong, Sungbuk-gu, Seoul 136-704, Korea

*Samsung engineering R&D center: Gongse-Ri 428-3, Kiheung-Yeup, Yongin City, Kyungi-Do 449-900, Korea

The nitrate reductase, nitrite oxidase and ammonium oxidase, respectively, co-immobilized on electrode with binder, neutral red and graphite powder was electrochemically reactive with nitrate, nitrite or ammonium. In cyclic voltammetry, current production from electrochemical reaction of nitrate, nitrite and ammonium ion was proportional to concentration of nitrate, nitrite and ammonium ion, respectively. In functional test of biosensor made from graphite powder, enzyme, binder and electron mediator, current production or current consumption was proportional to concentration of nitrate, nitrite and ammonia

Key words: Biosensor, nitrate reductase, nitrite oxidase, ammonium oxidase, neutral red

1. 서 론

질산염, 아질산염, 암모니움염은 유기질소가 미생물에 의해 산화되는 과정에서 생성되는 최종 또는 중간대사 산물로 유기물에 의해 오염되거나 오염되지 않은 수생 또는 토양 미생물생태계에 중요한 영향을 미친다.¹⁻³⁾ 특히, 유기물의 농도가 타가영양 미생물의 성장에 필요한 제한 농도 이하인 수생생태계에 무기질소 화합물이 유입될 경우 조류의 대발생에 의한 2, 3차의 오염으로 인해 수생생태계의 기능이 마비되거나 파괴될 수 있다.⁴⁾ 일반적으로 자연계에서 이루어지는 생태학적인 물질순환과정에서 무기질소화합물이 대량 생성되거나 특정한 생태계에 유입되는 경우는 매우 희박하다. 그러나 하. 폐수의 처리과정에서 발생하는 무기질소화합물은 대부분 생태계에서 요구하는 이상의 높은 농도로 방출되기

때문에 이를 제어하기 위한 다양한 연구가 이루어지고 있고 방류되기 전에 정확한 농도를 측정하려는 기술의 개발이 필요하다.⁵⁻⁸⁾ 무기질소화합물은 일단 방류되어 자연하천이나 수생생태계에 버려지면 재처리가 불가능하기 때문에 농도를 측정하는데 소요되는 시간이 5분 이상을 초과해서는 안 된다. 만약 측정시간의 연장에 따른 저수조의 용량을 확대하여 설계하면 시간제약에서 자유로울 수 있지만 처리효율에 따른 방류수의 누적현상이 반복되는 경우는 저수조의 용량을 무한대로 확대해야 할 수도 있기 때문에 가장 합리적인 것은 방류직전에 또는 방류과정에서 연속적으로 농도를 측정하여 재처리 또는 방류를 결정해야 한다.

Biosensor는 생체에서 특정한 생화학반응을 선택적으로 촉매하는 효소를 적당한 전기화학적 device에 고정하여 효소에 의한 촉매반응을 전기신호로 변환하여 반

[†]To whom correspondence should be addressed.

응물질의 농도를 직접 또는 간접적으로 측정하는 장치로 대부분 효소의 활성, 효소와 전극간의 전자전달 효율, 전극에 고정된 효소의 생화학적 안정성, 조효소의 산화-환원반응에 대한 의존성이 크다.^{9,10)} 따라서 biosensor의 기능을 유지하기 위해서는 측정대상인 반응물질(기질)이 효소의 촉매반응에 의해 산화 또는 환원될 때 전극에 전자를 공급하거나 전극으로부터 전자를 공급받는 반응이 균일하고 신속하게 이루어져야 한다. 따라서 전극표면에 고정된 효소와 기질이 반응할 때 생성되는 효소-기질 복합체가 반응물질로 전환되는 효율(V_{max})과 효소와 기질의 복합체가 형성되는 효율(K_m)이 biosensor의 감도와 기능성을 결정하는 인자가 된다. 또한 효소-기질 복합체가 형성된 후 일정 시간동안 복합체의 상태가 유지되는 경우 효소-기질 반응은 V_{max} 값을 유지할 수 없어 sensor의 기능을 저하시키는 원인이 된다. 이러한 효소-기질 복합체가 일정 농도를 유지하는 것을 sensor의 피로도라 하는데 재사용을 위해서는 피로회복이 필수적이다. Sensor의 피로회복을 위해서는 반응이 끝날 때 까지 장시간 방치해야 하는데 이 과정에서 효소의 활성은 일정 비율로 상실될 수 있기 때문에 실질적인 사용상의 문제가 발생할 수 있다.

전극표면에 고정된 효소는 고정화 방법에 따라 효소의 구조에 영향을 받을 수 있기 때문에 이 또한 biosensor의 기능을 결정하는 인자가 된다. 전극에 효소를 고정하는 방법은 공유결합법, 가교법, 흡착법, 포괄법 등이 있는데 이 가운데 biosensor의 제작을 위해 가장 적당한 것은 공유결합법이다. 그러나 공유결합법은 전극 표면에 공유결합을 위한 특정한 반응 잔기가 존재할 때만 가능하기 때문에 무기전극의 표면에 적당한 polymer를 coating한 후 polymer와 효소를 공유결합으로 고정하기도 한다.¹¹⁻¹⁵⁾ 이러한 방법은 효소와 전극사이에 polymer가 결합 매개체로 사용되어야 한다는 점에서 가교법과 매우 흡사하다. 공유결합이 불가능한 전극을 사용할 때 발생할 수 있는 문제는 효소와 전극의 직접 접촉이 안 되기 때문에 전자의 이동 효율에 영향을 줄 수 있다. 이를 극복하기 위해 본 연구에서는 입자의 크기가 $1\mu\text{m}$ 인 전도성의 흑연분말을 효소와 sodium caseinate 혼합 용액에 섞어 금 전극에 도말하여 냉장고에서 건조한 후 센서로서 사용하였다. 흑연분말은 전극과 효소사이에 일정하게 분산되어 있어 효소의 산화반응에 의해 생성되는 전자를 전극에 전달하거나 효소의 환원 반응에서 요구되는 전자를 효소에

공급하는데 필요한 전자전달 매체의 기능을 갖는다. 또한 조효소나 효소를 혼합하여 사용할 경우 조효소의 연속적인 산화-환원 반응을 유지할 수 있다는 장점이 있다.¹⁶⁻²¹⁾

본 연구에서는 금 전극의 표면에 고정된 효소와 기질이 반응할 때 발생하는 전위차를 cyclovoltammetry로 측정하여 기질의 농도에 따른 cyclovoltammogram 상에서 발생하는 전류량의 변화를 plotting하여 biosensor의 device를 개발하는데 필요한 기초 정보를 확보하는데 그 목적이 있다. 또한 전극에 효소를 고정하는 방법을 개량하여 반응성과 전도성이 우수한 효소전극을 개발하였다.

2. 실험방법 및 재료

2.1. Organisms and Enzymes

질산염 환원효소는 하수종말 처리장의 혐기소화조에서 수소를 에너지원으로 사용하여 질산염을 환원하는 기능을 갖는 세균인 *Pseudomonas* spp. 로부터 분리하였고 아질산염산화효소는 아질산을 전자공여체로 산소를 전자 수용체로 사용하여 생산되는 에너지로 성장하는 세균(미동정)으로부터 분리하였으며, 암모니움염산화효소는 암모니움염을 전자공여체로 산소를 전자수용체로 사용하여 에너지를 생산하는 중(미동정)으로부터 분리하였다.¹⁷⁾ 질산염 환원효소, 아질산염 산화효소, 암모니움염 산화효소는 모두 호흡대사의 전자전달계를 구성하는 효소 가운데 하나로 membrane에 결합되어있기 때문에 membrane으로부터 분리하면 그 기능을 상실할 수 있다. 따라서 효소를 생축매로 사용하는 바이오센서를 개발하기 위해서는 membrane으로부터 효소를 분리하면 안된다.

2.2. Membrane fraction의 분리

질산염환원효소와 아질산염 산화효소 등 세균의 호흡대사에 관여하는 모든 효소는 세포막에 결합한 membrane-binding protein이다. 따라서 이 효소들을 membrane으로부터 분리하지 않고 membrane fraction을 분리함으로써 효소를 함께 획득할 수 있다. membrane fraction을 분리하기 위해 배양한 균체를 원심분리(5,000×g, 30분)를 이용하여 수확하고 Tris-HCl buffer (pH 7.0, 50 mM)로 3회 세척하여 배지성분을 완전히 제거한 후 Lysozyme을 처리하여 -20도에 냉동하였다. 24시간 후에 냉장고에서 서서히 해동한 후 Bead

beatter를 이용하여 bacterial cell을 파쇄하였다. 파쇄한 bacterial suspension은 10,000×g에서 40분간 원심분리하여 cell debris를 제거하고 상등액을 취하여 반복해서 같은 조건의 원심분리를 하여 미세한 부유입자까지 모두 제거하였다. 이러한 과정에서 얻은 육안으로 완전히 투명한 상등액을 획득하였다. Membrane fraction은 ultra centrifugation (150,000×g, 4 hr)을 이용하여 수확하였다. Membrane fraction은 원심분리 tube의 바닥에 갈색의 투명한 고밀도의 침전물을 형성하기 때문에 상등액과 분리가 매우 용이하다. 수확한 membrane fraction은 Tris-HCl buffer (pH 7.2, 50 mM)를 이용하여 3회 세척한 후 동일 buffer에 현탁하여 사용하였다. 분리한 nitrate reductase, nitrite oxidase, ammonium oxidase의 활성은 nitrate의 환원, nitrite의 산화 및 ammonium의 산화활성을 이용하여 측정하였다.¹⁸⁾

2.3. 효소의 단백질 농도 측정

Membrane fraction에 결합된 효소단백질은 Bradford 법으로 정량하였다.

2.4. 금 전극에 효소의 고정

효소를 전극에 고정하기 위하여 10% (w/v) Na-caseinate를 Tris buffer(pH 7.2, 50 mM)에 녹이고, 이 이용액에 membrane fraction을 단백질농도로 환산하여 최종농도가 5 mg/ml이 되게 첨가하였으며 neutral red를 최종농도가 0.1 mM이 되게 첨가하였다. 이 효소-단백질 용액에 입자의 크기가 1 μm인 흑연 분말을 최종농도 20%(w/v)가 되게 첨가하여 금 표면에 0.1 mm의 두께로 도말하여 냉장고 내에서 진공 건조하였다. 건조한 후에 단백질-효소-흑연 혼합물의 두께는 0.1-0.2 mm가 되게 정량적으로 조절하였다. 이와 같이 제작된 효소 전극은 사용할 때까지 -20°C의 냉동고에 보관하였다.¹⁰⁾

2.5. 효소전극의 전기화학적 측정

효소전극을 이용하여 질산염, 아질산염, 암모니움염의 농도차이에 따른 반응을 비교하기 위하여 효소전극 (Φ 5 mm)을 작업전극으로, 백금선을 상대전극으로, Ag/AgCl 전극을 기준전극으로 활용하여 Tris-HCl buffer (pH 7.0, 50 mM)를 electrolyte로 cyclicvoltammetry를 시행하였다. Cyclicvoltammetry는 BAS model CV50W를 사용하였으며 scanning 범위는 +0.2에서 -1.2 volt였고, scanning rate는 25 mv/s로 조절하였다.

2.7. Data의 분석 및 환산

Cyclicvoltammetry에서 얻은 current의 변화는 plotting을 하여 X-Y graph로 전환하여 기질의 농도에 따른 current의 상관관계를 분석하였다.

2.8. 표준물질의 농도에 따른 biosensor의 감응성

질산염, 아질산염, 암모니움염의 농도에 따른 센서의 감응성을 확인하기 위하여 농도에 따른 전류의 생산성 또는 소비량을 6회 반복 측정하여 재현성을 확인하였다. 질산염을 측정하기 위하여 음극과 양극간의 전위차는 0.5 volt를 유지하였으며 전류량을 측정하기 위해 전원과 전류계 센서의 양극과 음극을 직렬로 연결하였으며, 음극과 전원 사이에 가변 저항을 설치하여 과전류가 흐르는 것을 방지하였다. 아질산염과 암모니움염은 약극과 음극 사이에 전류계를 연결하여 아질산과 암모니움염이 산화될 때 생산되는 전류량을 직접 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

질산염환원효소는 질산염이 환원될 때 필요한 전자를 전기에너지로부터 공급받아야하기 때문에 질산염이 일방적으로 환원되는 반응이 일어나야 한다. 그림 1에서 보는바와 같이 cyclicvoltammogram에서 질산염의 농도가 증가할 수록 전자가 전극에서 질산염으로 이동하는 것을 알 수 있다. Cyclicvoltammogram에서 화살

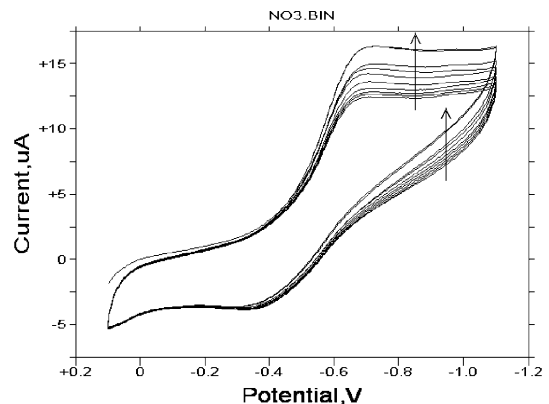


Fig. 1. Cyclic voltammogram of nitrate reductase on glassy carbon working electrode. Pt was used as counter electrode and Ag/AgCl was used as reference electrode. The current of cyclic voltammogram was immediately increased whenever the nitrite was added to the electrochemical reactor, which means nitrate can be reduced to nitrite by nitrate reductase. The reduction peak is higher than oxidation peak.

표로 표시한 것은 기질의 농도가 증가함에 따라 연속적인 기질의 환원반응이 일어나는 것을 보여준다. 질산염의 환원반응에 따른 전류의 생산량을 X-Y graph로 plotting한 결과 기질의 농도가 증가함에 따라 비례해서 증가하는 것으로 나타났다. 이것은 전극에 고정된 효소가 질산염을 아질산염으로 환원하면서 전자를 소비하는 양(current)이 질산염의 농도에 따라 비례적으로 증가한다는 것을 보여주는 내용으로 질산염 센서를 개발하기 위한 효소전극을 제작할 때 적용할 수 있는 유용한 결과이다. Cyclovoltammetry가 끝나 후 전극반응에서 생성된 아질산염의 농도를 측정 한 결과 약 55 μM 이 검출되었다. 이것은 첨가한 질산염의 약 60%가 질산염환원효소와 전극의 환원작용으로 아질산염으로 환원되었다는 것을 보여주는 것이다. 그림 2는 질산염이 아질산염으로 환원될 때 소비되는 전류량을 측정 한 결과로 농도와 전류의 소비량이 오차범위내에서 비례

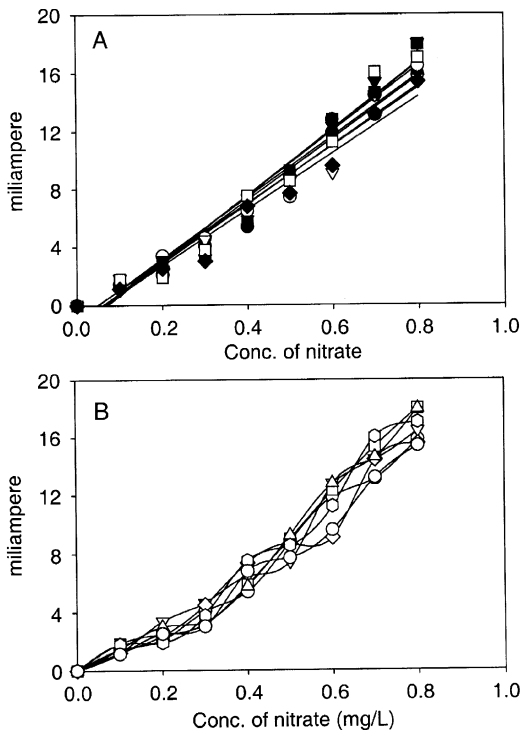


Fig. 2. Typical responses of the biosensor composed with nitrate reductase to nitrate ion. Measurements were performed at room temperature in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) with nitrate ion. Whenever addition of nitrate to the enzyme-electrode connected to ampere meter, the current was increased. The test was repeated six times. [A] showed the regressional mean value and [B] showed real value.

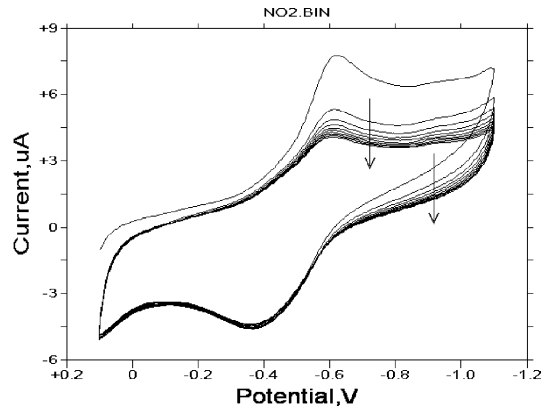


Fig. 3. Cyclic voltammogram of nitrite oxidase on glassy carbon working electrode. Pt was used as counter electrode and Ag/AgCl was used as reference electrode. The current of cyclic voltammogram was immediately decreased whenever the nitrite was added to the electrochemical reactor, which means nitrite can be oxidized to nitrate by nitrate oxidase. The oxidation peak is higher than reduction peak.

하는 것으로 나타났다. 그러나 이 결과는 순수한 질산염을 대상으로 측정 한 값으로 다양한 혼합물로 구성된 자연하천, 하수, 처리수 등에 적용할 경우 변이가 예상된다. 따라서 이러한 결과를 바탕으로 다양한 조성의 시료를 대상으로 반복 측정하여 시료에 따른 변수를 예측하거나 계산할 수 있는 방법으로 개발이 필요하다.

아질산염 산화효소는 아질산을 질산염으로 산화되는 반응을 촉매하면서 전자를 방출하거나 산소를 소비해야 하는데 무산소 상태의 electrolyte에 반응이 이루어지기 때문에 전자를 전극으로 전달하게 된다. 따라서 그림 3에서 보는바와 같이 cyclicvoltammogram에서 전자는 기질에서 전극으로 이동하는 것을 알 수 있다. Cyclovoltammetry에 표기한 화살표의 방향으로 알 수 있는바와 같이 기질의 농도가 증가함에 따라 전자가 일방적으로 기질로부터 전극으로 이동하는 것을 알 수 있다. Cyclovoltammetry에 나타난 전류값의 변화를 X-Y graph로 plotting한 결과 기질의 증가량과 current의 감소량은 부분적으로 비례하는 경향을 보였으나 전체적으로 일차 graph로 전환되지 않았다. 따라서 이러한 그래프는 log함수를 사용하여 직선화한 후 계산식을 작성하면 정량에 필요한 자료로 활용이 가능하다고 생각한다. 그러나 아질산염을 농도별로 제조하여 biosensor에 적용한 결과는 그림 4에서 보는 바와같이 농도에 따른 전류생산성이 비례하는 것으로 나타났다.

암모니아산화효소는 암모니움염을 아질산으로 산화

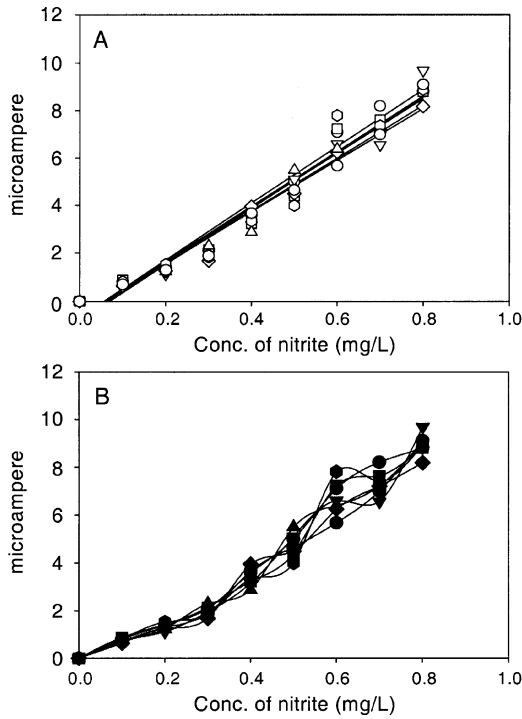


Fig. 4. Typical responses of the biosenor composed with nitrite reductase to nitrite ion. Measurements were performed at room temperature in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) with nitrate ion. Whenever addition of nitrate to the enzyme-electrode connected to ampere meter, the current was increased. The test was repeated six times. [A] showed the regressional mean value and [B] showed real value.

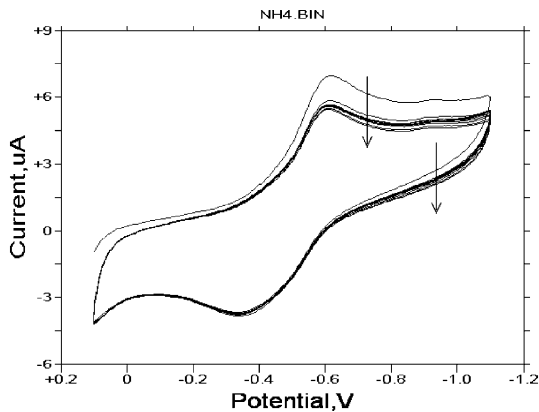


Fig. 5. Cyclic voltammogram of ammonium oxidase on glassy carbon working electrode. Pt was used as counter electrode and Ag/AgCl was used as reference electrode. The current of cyclic voltammogram was immediately decreased whenever the ammonium was added to the electrochemical reactor, which means nitrite can be oxidized to nitrate by ammonium oxidase. The oxidation and reduction peaks height are similar each other.

하는 효소이기 때문에 이론적으로 전기화학 반응에서 전류를 생산하는 반응으로 나타나야 한다. 그림 5에서 보는바와 같이 cyclovotammetry에서 전지는 기질농도의 증가량에 비례하여 기질에서 전극으로 이동하는 것을 알 수 있다. 즉 암모니아의 일방적인 산화반응에 의한 아질산염의 생산을 예측할 수 있다. 반응이 끝나 후 측정된 아질산염의 농도는 48 μM 이었다. Cyclovoltammometry를 X-Y graph로 전환한 결과 기질의 농도와 current의 변화량은 전체적으로 비례상수를 산출할 수 있을 만큼 일치하는 것으로 나타났다. 그림 6에서 보는 바와같이 암모니움염의 산화될때 발생하는 전류량은 아질산이 산화될때 생산되는 전류량에 비해 적은 것으로 나타났으나 암모니움염의 농도에 따라 비례하는 것으로 확인되었다.

이상의 결과에서 나타난바와 같이 biosensor의 제작을 위해 필요한 효소전극은 특정한 금속이나 전도성 무

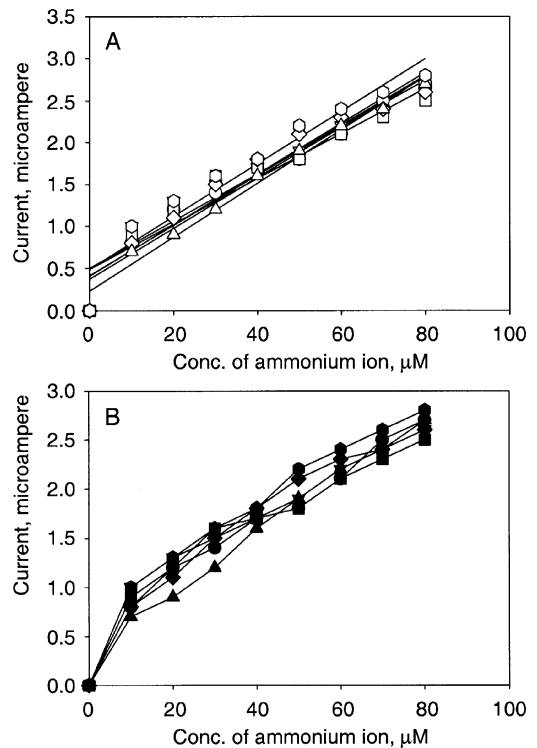


Fig. 6. Typical responses of the biosenor composed with nitrite reductase to ammonium ion. Measurements were performed at room temperature in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) with nitrate ion. Whenever addition of nitrate to the enzyme- electrode connected to ampere meter, the current was increased. The test was repeated six times. [A] showed the regressional mean value and [B] showed real value.

기물에 효소와 효소를 고정할 수 있는 매개체와 전자를 전달하는 매개체를 혼합하여 고정하여 사용할 수 있는 것으로 확인되었다. 전극에 고정된 효소와 단백질은 buffer에 30 분간 담가놓아도 자연적으로 풀리지거나 전극으로부터 탈리되는 현상이 발견되지 않았으며 날카로운 물체로 긁었을 때는 쉽게 탈리되는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 근거로 1회용 biosensor용 효소전극의 개발이 가능하게 되었으며 효소의 농도를 조절함으로써 감도와 측정기능이 우수한 효소센서용 전극을 개발할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 전술한 바와 같이 다양한 간섭이 가능한 혼합물로부터 동일한 결과를 얻을 수 있는지의 여부는 보다 다양한 추가 실험을 통해 얻어질 수 있기 때문에 향후 다양한 산업현장이나 하천, 호소, 해양 등에서 발생하는 시료를 이용한 측정 및 적용 연구가 진행되어야 할 것이다.

4. 결 론

전기화학적으로 biosensor를 제작하고 대상물질을 측정하려는 다양한 연구가 진행되어 왔으나 대부분 기능성 전극에 효소를 고정하여 효소반응의 결과 발생하는 생화학반응 물질을 간접적으로 측정하는 방법이 이용되어 왔다. 이러한 측정 방법은 생화학 반응의 2차 반응의 때문에 기능성 전극의 피로도와 전극의 감수성에 의해 영향을 받을 수 있어 직접 측정 방법에 비해 정확도가 낮아진다는 단점이 있다. Ghs 연구에서는 이를 극복하기 위해 직접 측정방법을 적용한 biosensor의 제작과 시험을 통해 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 차세대핵심환경기술사업지원으로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. D. I. Yun, J. J. Lee, D. W. Kim, and K. Y. Lee, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1998**, 26, 96-101.
2. J. C. Akunm, Bizequ and R. Motetta, *Wat. Res.*, **1993**, 27, 1303-1312.
3. J. Cole, *Tibtech.*, **1993**, 11, 368-372.
4. H. Mock, J. S. Lim, and B. G. Kim, *J. Kor. Environ. Sci.*, **1998**, 7, 493-500.
5. D. H. Park and Y. K. Park, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2001**, 11, 406-411.
6. L. H. Lars, K. Thomas, and R. P. Niels, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 3527-3531.
7. L. H. Lars, P. R. Niels, and J. B. Svend, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1996**, 62, 1248-1251.
8. L. H. Lars, R. D. Lars, K. Thomas, S. Theiss, L. J. Anders, and P. R. Niels, *Wat. Res.*, **2000**, 34, 2463-2468.
9. M. D. Gouda, M. A. Kumar, M. S. Thakur, and N. G. Karanth, *Biosensors and Bioelectronics*, **2002**, 17, 503-507.
10. H. Gulce, A. Gulce, M. Kavanoz, H. Coskun, and A. Yildiz, *Biosensors and Bioelectronics*, **2002**, 17, 517-521.
11. B. Persson, H. I. Lan, L. Gorton, V. Okamoto, P. D. Hale, L. I. Boguslavsky, and T. Skotheim, *Biosens. Bioelectron.*, **1993**, 8, 81-88.
12. E. Lorenzo, F. Pariente, L. Hernandez, F. Tobalina, M. Darder, Q., M. Maskus, and H. D. Abruna, *Biosens. Bioelectron.*, **1998**, 13, 319-332.
13. S. Koide and K. Yokoyama, *J. Electroanal.*, **1999**, **468**, 193-201.
14. S. Hammerli, A. Manz, and H. M. Widmer, *Proceedings, Biosensor '92, The second world congress on Biosensors*, **1992**, 95-97.
15. T. M. Park, E. I. Lan, M. Smyth, R. Freaney and A. J. Mcshane, *Talanta*, **1997**, **44**, 973-978.
16. D. H. Park and J. G. Zeikus, *J. Bacteriol.* **1999**, **181**, 2403-2410.
17. B. H. Kim, H. J. Kim, M. S. Hyun and D. H. Park, *J. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, **9**, 127-131.
18. D. H. Park, D. H., M. Laiveniaeks, M. V. Guettler, M. K. Jain, M. K., and J. G. Zeikus, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, **65**, 2912-2917.
19. K. Ramanathan, S. S. Pandey, R. Kumar, A. Gulati, A. Surya, N. Murthy, and B. D. Malhotra, *J. Appl. Pol. Sci.*, **2000**, **78**, 662-667.
20. M. Darder, E. Casero, F. Pariente, and Lorenzo, *Anal. Chem.*, **2000**, **72**, 3784-3792.
21. K. J. Yoon, K. J. Kim, and H. S. Kwon, *J. Kor Chem. Soc.*, **1999**, **43**, 271-279.