

최 종
연구보고서

발효식품내의 유산균 및 유산 측정

바이오센서 개발

Development of Biosensor for Lactic Acid Bacteria
and Lactic acid on Fermentation Food

연구기관

서울대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “발효식품 내의 유산균 및 유산 측정 바이오센서 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 서울대학교
총괄연구책임자 : 조 성 인
세부연구책임자 : 조 성 인
연 구 원 : 김 용 노
연 구 원 : 박 두 산
연 구 원 : 황 규 영
연 구 원 : 김 민 수
연 구 원 : 박 태 진
연 구 원 : 심 민 진

여 백

요 약 문

I. 제 목

발효식품 내의 유산균 및 유산 측정 바이오센서 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

바이오센서는 효소-기질, 항원-항체 등과 같이 분자 인식기능을 갖는 생체분자를 전기, 물리, 열, 진동, 광학 소자에 결합시켜 이들과 특이적으로 반응하는 기질을 감지하거나 농도를 측정하는 장치이다. 바이오센서는 생체분자의 높은 반응 특이성을 이용하여, 특정 성분만을 정확하고 신속하게 분석할 수 있으며, 질병의 조기 진단, 독성 오염 물질의 측정 등 환경, 식품, 생명공학 분야에서 광범위하게 활용될 수 있는 기술이다.

유산균의 농도를 측정하기 위해 많은 기술들이 개발되고 있다. 배지 내의 impedance의 변화를 통해 유산균의 농도를 분석하거나, FT-MIR나 SPQC(series piezoelectric quartz crystal) 소자를 사용하여 생성되는 산 물질의 농도를 통해 유산균의 농도를 분석하고자 하는 등의 연구가 있다. 유산균은 발효의 진행에 따라 유산을 비롯한 산성 물질을 배출하기 때문에 발효가 진행될수록 pH가 낮아진다. 따라서 pH의 변화만을 통해 발효과정을 모니터링 하는 방법도 사용되고 있다. 하지만, 유산균 수와 상관관계가 높은 특정 물질의 측정을 통해 유산균의 농도를 측정하는 것이 아니고, pH에 변화를 주는 많은 다른 요소들의 영향을 받기 때문에, 유산균의 농도를 측정하기 위한 방법으로는 적절하지 않다고 사료된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 미생물학적 방법, 복잡한 장비의 사용과 유산균 발효과정을 모니터링 하기 위해 pH의 변화를 측정하였던 방법에서 벗어나 유산균의 농도를 바이오센서 기술을 이용하여 측정하고자 한다. 이에, 발효 과정에서 유산균 수의 변화에 대해 분석하고, 동시에 생성되는 유기산의 종류와 농도를 측정하여 유산균 수와 유기산의 농도와의 관계를 찾는다. 유산균의 농도와 가장 유의성이 높을 것으로 판단되는 L-lactate의 농도를 측정하기 위해 효소를 이용한 측정 가능성에 대한 실험을 수행한다. L-LDH(L-lactate dehydrogenase)와 NAD(nicotinamide adenine dinucleotide)를 poly-acrylamide gel에 고정하여 효소반응을 통해 유산균이 배출하

는 L-lactate를 측정함으로써 유산균의 농도를 계측할 수 있는 센서를 개발하고자 한다. L-LDH의 효소 역반응을 막기 위해 GPT(glutamic-pyruvic transaminase), L-glutamate를 함께 poly-acrylamide gel에 고정하여 센서의 성능을 향상시키고자 하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

발효과정에서 L-lactate의 농도와 유산균의 농도는 지수 모형의 변화를 갖고, L-lactate의 농도와 유산균의 농도의 상관관계는 $R^2=0.984$ 이다. 유산균의 농도를 측정하기 위해 $y = 108.82x - 87.437$ 에 L-lactate의 농도를 대입하면, 유산균의 수를 알 수 있었다. L-lactate 이외의 acetate, citrate는 발효과정에서 유산균 수와 상관성이 없음을 확인하였고 이로서 L-lactate를 측정함으로써 유산균의 수를 측정할 수 있음을 확인하였다.

L-lactate dehydrogenase(L-LDH)와 NAD의 효소 반응에 의한 L-lactate의 농도 측정은 문제가 있으며, 이를 해결하기 위해 glutamic-pyruvic transaminase (GPT)와 L-glutamate를 함께 이용하는 반응을 활용하였다. L-LDH의 반응에서 생성되는 pyruvate를 L-alanine으로 전환시켜서 수소이온의 감소를 막을 수 있었으며 이로서 생성되는 L-lactate의 농도에 비례하는 수소이온의 농도를 측정함으로써 유산의 농도 측정이 가능함을 알 수 있다.

Poly-acrylamide gel에 L-LDH, NAD, GPT와 L-glutamate를 고정시키고, 이를 전극 끝에 접합시킴으로써 센서의 개발이 이루어졌으며, 여러 농도의 L-lactate를 측정하여 얻은 출력 전압 값과 L-lactate의 농도의 캘리브레이션 결과, 관계식은 $y = 0.0719x - 16.576$ 이며 상관관계는 $R^2=0.9959$ 이다. 검증실험에서는 상관관계 $R^2=0.9919$ 로 나타났다. L-lactate를 측정하게 되는 본 센서는 유산균의 농도와 L-lactate의 농도와의 관계가 구명되었다.

SUMMARY

While economy construction changed by history, human dietary life have changed from quantity to quality and further as functional diet. Yogurt could be the best case of food product which has healthy function and being widely consuming. Yogurt has called longevity food because of lactic acid bacteria. Lactic acid bacteria help bowel to digest ingesta easily, and forms an environment which harmful microorganism can not survive easily. It prevent getting disease such as diarrhea, constipation and so on.

There are microbiological ways to measure lactic acid bacteria such as total bacteria counting method, methylene blue reduction test and so on. But those need pre-treatment and take long time to get the results. Other ways using chromatography to measure organic acids produced by lactic acid bacteria, impedance measuring method, optical method are expensive ways and also need pre-treatment.

This study was to solve those problem with using biosensor technique by immobilizing enzyme on electrode. During lactic acid bacteria fermentation, sample was taken to find tendency of colony number change by total bacterial counting method. And also concentration change of organic acids while fermentation was measured with ion chromatography. Analysis of enzyme reaction on L-lactate was performed with L-LDH(L-lactate dehydrogenase), NAD^+ (nicotinamide adenine dinucleotide). To complement enzyme reverse reaction of LDH, GPT (glutamic-pyruvic transaminase) and L-glutamic acid were supplied. Those enzymes were immobilized on poly-acrylamide gel on tip of voltage electrode.

The relation between colony number of lactic acid bacteria and L-lactate concentration had correlation as $R^2=0.984$, and $y = 108.82x - 87.437$. By this equation, lactic acid bacteria number could be examined by L-lactate concentration.

By using only LDH and NAD was unable to measure L-lactate concentration. Otherwise, reaction with GPT and L-glutamate, every concentration of L-lactate was able to measure in 1minute.

Electrode was made by immobilizing enzyme in poly-acrylamide gel on electrode tip. mV was measuring unit on L-lactate concentration. The relate equation between L-lactate and signal was $y = 0.0719x - 16.576$, had correlation of $R^2=0.9959$ on calibration and $R^2=0.9919$ on validation.

Biosensor for measuring lactic acid bacteria was designed and developed. But basic detecting substrate is L-lactate, so this sensor could be work as 'L-lactate biosensor' also. More application with this sensor is using as medical field as detecting acidosis, heart disease, acute circulatory shock or use on cardiovascular surgery. Even more sports medical field as stress on muscles.

CONTENTS

| | |
|--|----|
| Chapter 1. Synopsis | 1 |
| Chapter 2. Present state of technology | 5 |
| Chapter 3. Contents and results | 7 |
| Paragraph 1. Basic theory study | 7 |
| 1. Principles and character of biosensor | 7 |
| 2. Biological properties of lactic acid bacteria | 9 |
| 3. Characteristics of enzyme | 12 |
| 4. Enzyme and biosensor | 14 |
| Paragraph 2. Correlation between lactic acid bacteria and organic products | 16 |
| 1. Cultivation of lactic acid bacteria and change of bacteria number during fermentation | 16 |
| 2. Organic products analysis during lactic acid bacteria fermentation | 21 |
| 3. Correlation analysis between lactic acid bacteria number and organic products during fermentation process | 25 |
| Paragraph 3. Enzyme selection and removal of inhibitor | 28 |
| 1. Enzyme reaction on L-lactate | 28 |
| 2. Inhibitor removal on L-lactate dehydrogenase reaction | 31 |
| 3. Determination of proper amount of enzyme on reaction | 37 |
| Paragraph 4. Enzyme immobilization and characteristics | 40 |
| 1. Theoretical approach | 40 |
| 2. Polymerization of polyacrylamide gel | 42 |
| 3. Enzyme immobilization on polyacrylamide gel and enzyme activity | 51 |

| | |
|---|----|
| Paragraph 5. Enzyme immobilized sensor development and performance | 54 |
| 1. Development of data acquisition and storage part | 54 |
| 2. Performance of data acquisition and storage part | 58 |
| 3. Development of enzyme immobilized sensor | 61 |
| 4. Performance of developed biosensor | 63 |
| Paragraph 6. Summary and results | 66 |
| Chapter 4. Achievement of the goal and contributions | 68 |
| Chapter 5. Application plan of achieved results | 69 |
| Chapter 6. References | 70 |

목 차

| | | |
|-------|---------------------------------------|----|
| 제 1 장 | 연구개발과제의 개요 | 1 |
| 제 2 장 | 국내외 기술개발 현황 | 5 |
| 제 3 장 | 연구개발수행 내용 및 결과 | 7 |
| 제 1 절 | 기초 이론 연구 | 7 |
| 1. | 바이오센서의 원리 및 특성 | 7 |
| 2. | 유산균의 생리학적 특성 | 9 |
| 3. | 효소의 특성 | 12 |
| 4. | 효소와 바이오센서 | 14 |
| 제 2 절 | 유산균 수와 생성 유기물의 상관관계 | 16 |
| 1. | 유산균 배양과 발효과정에서 균수 변화 | 16 |
| 2. | 유산균 발효과정에서 생성 유기물 분석 | 21 |
| 3. | 발효과정에서 유산균 수와 생성된 유기물의 상관관계 분석 | 25 |
| 제 3 절 | 효소의 선택과 저해제 제거 | 28 |
| 1. | L-lactate와 반응 효소의 선택 | 28 |
| 2. | L-LDH 효소 반응의 저해제 제거 | 31 |
| 3. | 효소 적정 사용량 결정 | 37 |
| 제 4 절 | 효소의 고정법과 특성 | 40 |
| 1. | 이론적 접근 | 40 |
| 2. | Polyacrylamide gel 성형법 | 42 |
| 3. | Polyacrylamide gel에 효소 고정과 효소 활성도의 관계 | 51 |
| 제 5 절 | 효소 고정화 효소를 이용한 센서 개발 및 성능 평가 | 54 |
| 1. | 데이터 수신 및 저장부 개발 | 54 |
| 2. | 데이터 수신 및 저장부의 성능 평가 | 58 |
| 3. | 효소를 고정화한 센서 개발 | 61 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 4. 센서의 성능평가 | 63 |
| 제 6 절 요약 및 결론 | 66 |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 68 |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 | 69 |
| 제 6 장 참고문헌 | 70 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

우리 식생활은 양적 추구에서 질적 추구로 변화하였고, 최근에는 음식 섭취로 인해 건강 유지, 질병 예방, 치료, 다이어트 효과를 얻으려는 기능성 식단을 추구하게 되었다. 유산균 발효식품이 장수식품으로 알려지고, 장의 건강에 도움을 준다는 정보로부터 그 소비가 늘고 있다. 특히 현대인들의 잘못된 식습관으로 인한 변비 혹은 잦은 설사는 유산균 발효식품 혹은 발효유의 섭취로 해결하게 되었다.

유산균은 소장과 대장에서 유해 미생물의 성장을 억제하여 설사 질환의 예방 및 치료, 대장 내 pH를 저하시켜 장(腸) 운동을 촉진하여 변비 개선, 혈청 면역계 자극을 통해 면역력 향상, 혈청 콜레스테롤 저하, 대장암 발암기전에 관여되는 물질 생성의 억제를 통한 항암 효과 등의 이로운 기능을 한다.

국내 발효유의 소비는 92년 이후 약 14%의 꾸준한 증가 추세를 보이며 국내 시장을 키워왔고 소비자의 입맛에 맞추고 기능성을 향상시킨 제품들을 생산하면서 6년 평균 5,400억원의 매출을 냈다. 2006년에는 약 60만kl의 출하로 대부분 내수시장에서 소비되고 약 1%의 수출을 하고 있다.

Table 1 Market and increases rate of domestic yogurt.

| | 1992 | 1993 | 1994 | 1995 | 1996 | 1997 |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 매출액(억원) | 4,208 | 4,547 | 5,336 | 6,807 | 7,425 | 4,055 |
| 신장율(%) | 13.4 | 8.1 | 17.4 | 27.6 | 9.1 | 9.2 |

(자료 출처 : 우유, 1997 여름호)

Table 2 Production, domestic demand, export and increase rate of yogurt
by year. (Unit : kl, %)

| | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 |
|-----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 출하량 | 534,759 | 544,067 | 572,385 | 564,207 | 577,456 | 573,978 | 591,510 |
| 내수량 | 532,024 | 540,941 | 567,766 | 559,673 | 572,937 | 569,019 | 586,541 |
| 수출량 | 2,735 | 3,126 | 4,619 | 4,535 | 4,519 | 4,959 | 4,969 |
| 신장율 | -1.22 | 1.74 | 5.20 | -1.43 | 2.34 | -0.60 | 3.05 |

(자료 출처 : 통계청)

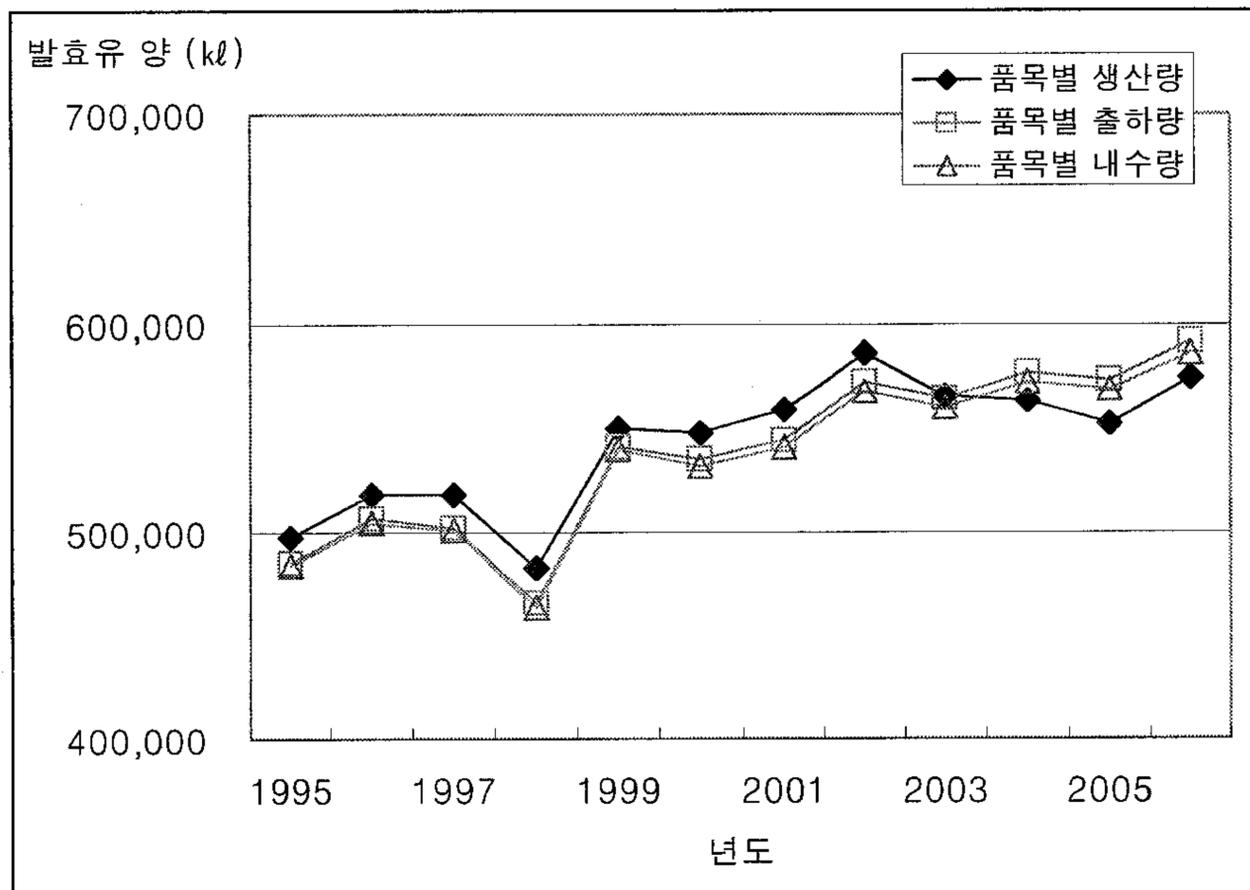


Fig. 1 Transition of production, consign and domestic demand of yogurt by year.

발효식품에서 발효 기능을 하는 유산균은 식품의 발효 정도와 발효에 기인하는 맛을 결정하는 주요 요인이나, 이를 빠르게 정량하기란 쉬운 일이 아니다. 미생물학적 방법으로는 정량하고자 하는 유산균 시료로 여러 단계의 희석액을 만들어 각각을 적정 온도에서 고체 배지에 배양하여 균락을 이루는 균체의 수를 세어 정량하는 균수 측정법을 사용한다. 이 방법은 실험 중에 시료가 유산균 이외 균으로부터 오염되는 것을 막아야하기 때문에 전문성이 필요하며, 소요 시간이 길고, 최종으로 눈으로 직접 균집 균체를 계수해야하는 어려움이 있다. 배양된 고체 배지의 일부를 획득하여 육안이나 현미경을 통해 직접 계수하는 간단한 방법이 있지만 배지의 국부를 채취한다는 점에서 샘플 전체의 균수를 측정하는데 적절하지 않은 방법이다.

보다 간편한 유산균 정량 방법으로는 발효과정 중 생성되는 물질 중에 유산균 농도와 상관관계가 높은 대사물질의 농도를 측정하여 간접적으로 정량화 하는 방법이 있다. 이때 사용되는 장비와 소모품은 비싸다는 단점을 가지고 있다. 발효식품공정에서 이용되는 pH 측정은 공정 모니터링을 위한 일반적인 방법이나 대략적인 측정이고 정밀도가 낮다.

바이오센서란, 생체감지물질과 신호변환기로 구성되어 분석하고자 하는 물질을 선택적으로 감지하거나 그 농도를 측정할 수 있도록 한 장치를 말한다. 바이오센서 연구는 Clark와 Lyons(1962)가 전극에 효소를 고정하여 glucose의 정량 가능성을 제안하였고 이를 Updike와 Hicks(1967)에 의해 제안이 구체화됨으로서 시작되었다.

화학센서와 달리 생물학적 물질을 반응에 이용하는 바이오센서는 식품, 의료, 환경, 방위, 연구 등 다양한 분야에 적용될 수 있는 기술로서 활발한 연구가 이루어져 왔고 앞으로도 많은 개발과 응용이 가능하다. 식품 내의 잔류농약, 항생제, 병원균, 기타 독성 물질을 감지하거나, 혈당이나 콜레스테롤 등 인체 혹은 생체 물질을 분석하고 진단하거나, 폐수 혹은 토양의 중금속, 농약, 인 화합물, 질소 화합물 등을 검출하거나, 독성 생화학 물질의 감지 혹은 마약의 검출 등이 그러한 개발 사례 혹은 응용 가능한 분야이다. 특히, 나노 기술의 발전과 바이오 기술의 접목으로 더욱

섬세하고 민감한 성능을 갖는 센서의 개발이 전망되고 있다.

농림 분야에 바이오센서의 활용은 식품 독성, 식중독 균을 비롯한 유해 미생물, 토양의 잔류 농약, 식육 도체의 잔류 항생제 등의 검출이 있고 이를 위해 여러 접근과 기술 개발이 이루어지고 있으며 더욱 다양한 분야로 적용이 가능하다.

본 연구는 발효 식품의 유산균을 정량화 할 수 있는 기술의 개발로서 유산균의 대사과정에서 생성되는 물질의 측정을 통해 균수를 간접적으로 측정 할 수 있는 바이오센서 개발을 목표로 한다. 유산균 대사 물질과 선택적으로 반응하는 기질 특이성을 갖는 효소를 이용하여 전극 형태의 센서를 개발한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

유산균의 농도를 측정하기 위해 Čurda 등(1995)은 실험용 자동 미생물 검사기를 이용하여 우유와 벌꿀을 혼합한 배지에 impedance 측정법으로 배양된 유산균을 측정하였다. 벌꿀이 발효에 주는 영향을 파악하고자 *Lactobacillus acidophilus*와 *mesophilic* 발효균의 성장량을 impedance의 변화를 통해 측정하였다.

Sivakesava 등(2001)은 젖산발효(lactic acid fermentation) 과정에서 나타나는 포도당, 젖산, 세포 밀도에 대한 측정을 Fourier transform mid infrared(FT-MIR), near infrared red (NIR), Fourier transform (FT)-Raman 분광 기술을 이용하여 측정하였다. FT-MIR로부터 획득된 파장별 흡광도 데이터에서 PLS의 1차 미분 값의 calibration (R^2)과 validation(R^2)의 값이 각각 포도당 0.98, 0.98, 젖산 0.96, 0.98, 세포밀도 0.93, 0.88로 높은 상관관계를 보였다. SEC와 SEP는 각각 포도당 2.5, 2.92g/l, 젖산 0.74, 0.53g/l, 세포밀도 0.23, 0.37로 나타났으며 NIR이나 FT-Raman 분광 기술을 사용한 결과 값보다 좋은 결과를 얻었다.

Zhang 등(2001)은 *Lactobacillus*의 발효과정을 ion chromatography법과 석영 압전소자(series piezoelectric quartz crystal; SPQC)법을 조합하여 모니터링 하였다. 발효 과정 중에 젖산이 생성되는 비율에 대한 측정을 하였으며, chromatography를 통해 발효과정 중 acetic acid, lactic acid, citric acid의 변화량을 얻어낼 수 있었다. SPQC를 이용하여 전기전도도가 변하는 시점의 주파수 변동과 위 물질들 간의 관계를 나타내었다. acetic acid, lactic acid, citric acid의 구분이 가능하였으며, acetic acid와 lactic acid에 대해 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 와 citric acid에 대해 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 까지 측정 가능하였다.

유산균을 직접 측정하는 바이오센서는 아직까지 개발된 바 없으며, 윤현철(1995)은 젖산(lactic acid)의 측정을 위해 젖산탈수소효소(L-lactate dehydrogenase)와 NAD^+ 를 동시에 포집하여 후막소자기법(thick-film technology)을 이용하여 바이오센서를 개발한 연구가 국내에서 진행된 바 있다. 10mM까지 선형 반응을 보이며 측정 한계는 0.106mM이었으며, 15초의 반응 시간을 갖는다.

김정호(1998)등은 포도당, 에탄올 그리고 젖산을 동시에 측정하기 위해 시작된 연구로서 젖산을 측정하는 전극은 LOD(L-lactate oxidase)를 nylon포에 고정화하고 산소전극에 접합하여 바이오센서를 제작한 연구도 진행된바 있다. 이 센서는 젖산과 포도당이 혼재되어 있는 시료의 경우 순수한 포도당의 양과 젖산의 양을 측정할 수 있는 보정 식의 개발에 의해 측정 가능하였다. 젖산 농도에 따른 시간당 전압 변화량은 0.15~1.2g/100mL까지 직선관계를 보여주었으며 상관관계는 0.998로 나타났다.

외국에서 진행된 젖산 측정용 바이오센서 개발에 관한 연구로서 Mizutani(1995)등은 poly-ion complex layer에 L-lactate oxidase(LOD)를 고정화하여서 혈청과 우유에서 L-lactate를 검출하는 전극을 개발하였다. poly-L-lysine과 LOD가 섞인 용액을 유리 탄소전극에 위치시키고 poly(4-styrenesulfonate)를 그 위에 첨가하고 건조시켜서 효소를 고정화시켰다. 이 센서는 5초미만의 반응속도를 보였으며, L-lactate 농도 0.1 μ M부터 0.3mM까지의 반응이 선형으로 나타났다.

Mizutani(1996)등은 전류형 전극에 L-lactate oxidase와 복합이온을 입힌 고분자막을 고정시켜 flow injection analysis(FIA)에 적용하여 L-lactate를 측정하는 시스템을 개발하였다. 6mM까지 측정가능하고 혈청과 우유 시료를 통해 검증 실험을 하여 0.991의 정확도를 확인하였다.

Casimiri(1996) 등은 산소전극에 L-lactate oxidase(LOD)와 L-lactate dehydrogenase(L-LDH)를 'UltraBind' film에 고정화한 산소 소모형 바이오센서를 개발한 바 있다. 두 효소를 함께 고정화함으로써 한 가지 효소만을 고정화 했을 때 보다 분해능이 향상되었으며 L-lactate의 농도를 20nM까지 측정할 수 있는 바이오센서를 개발한 바 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 기초 이론 연구

바이오센서는 생체물질의 특성과 특이 반응을 활용하는 센서로서 화학, 생물학 및 미생물학 등 생체물질과 관련된 기초 학문 영역과 전기, 전자, 광학 등의 공학적 기술의 접목을 통해 센서의 개발이 가능하다.

1. 바이오센서의 원리 및 특성

센서는 주변의 압력, 온도, 습도, 속도 등 여러 종류의 물리량 및 화학량을 검지 혹은 검출하거나 판별 또는 정량하는 장치, 또는 이를 전기적 신호로 변환하는 장치를 말한다. 그림 2와 같이 사람의 감각 기관으로 표현하자면 눈, 코, 귀, 혀와 같은 역할을 하며 신경을 통해 뇌에 전달됨으로서 인지하게 된다. 사람의 감각 기관이 센서(감지기)이고, 뇌는 센서로부터 입력된 신호를 저장하거나 처리하는 장치에 비유할 수 있다.

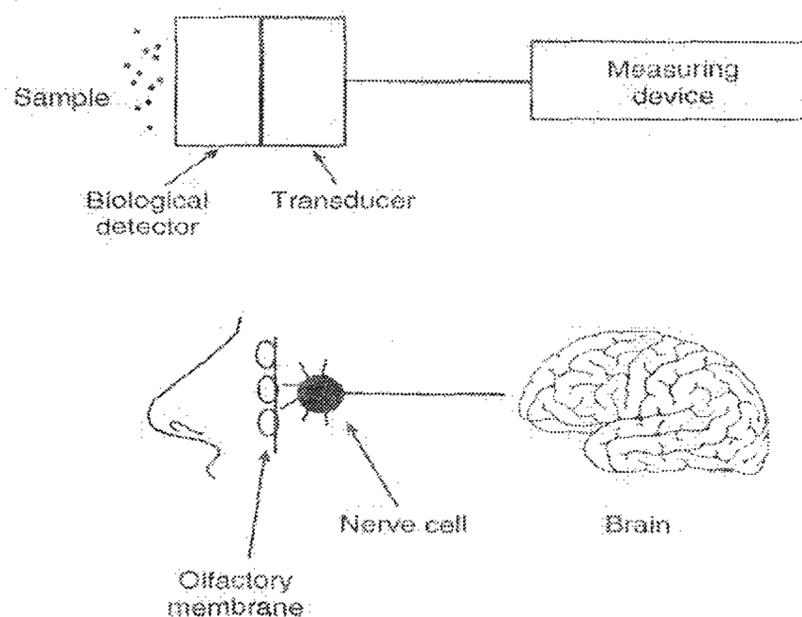


Fig. 2 Schematic of a biosensor and nose as a sensor (Eggins, 2002).

바이오센서는 생체 감지 물질(bio-receptor)과 신호변환기(signal transducer)로 구성된다. 생체 감지 물질은 특정 성분의 물질과 선택적으로 반응하는 특이성을 가지고 있다. 신호변환기는 생체 감지 물질과 특정 성분의 반응이 일어났을 때 생기는 전기적 특성, 열 변화, 광학적 변화, 질량 변화를 측정하는 역할을 한다. 이때 특성 변화를 통해 반응에 관여한 물질의 유무를 판단할 수 있으며, 특성 변화량과 반응에 관여한 특정 성분의 농도의 상관관계를 통해 정량적 분석이 가능하다. 생체감지물질로는 감지하고자하는 특정 물질과 선택적으로 반응 및 결합하는 효소, 미생물, 항체, 항원, 조직, 호르몬 그리고 호르몬감지물질 등이 있다. 신호변환방법으로는 전기화학, 형광, 발색, SPR(surface plasmon resonance), FET(field-effect transistor), 열 센서 등 다양한 물리화학적 방법을 사용하고 있다. 바이오센서의 구성을 그림 3에 나타내었다.

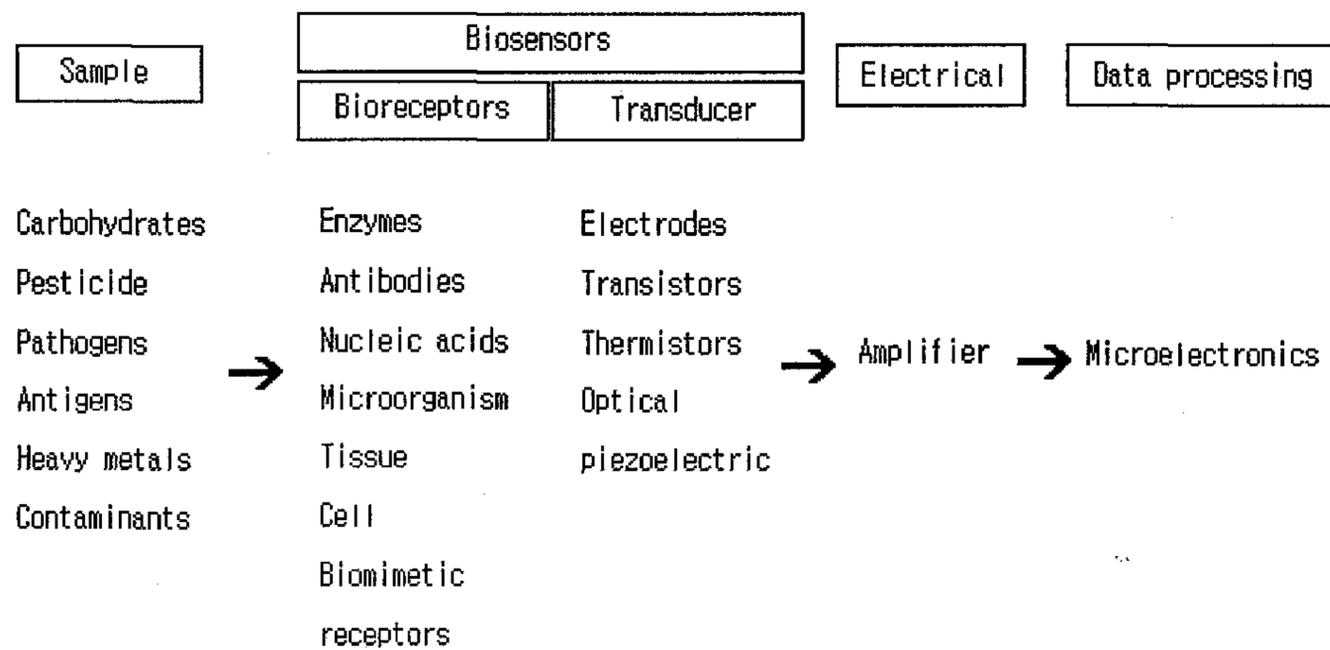


Fig. 3 Principle of biosensor.

바이오센서는 생체물질의 특이적 반응성을 이용한 센서로서 특정물질과 반응하는 특이성(specificity), 고도의 민감성(high sensitivity)을 갖으며 실제로 사용이 가능한 센서로서의 개발을 위해 휴대성(portability), 간편성(simplicity), 실시간, 현장 분석이 가능해야하고, 검출 결과가 빠르고, 센서의 가격이 저렴할수록 활용 범위와 실용성이 커진다.

2. 유산균의 생리학적 특성

유산균(Lactic acid bacteria)은 포도당, 유당과 같은 탄수화물(당류)을 분해하여 유산(젖산)이나 초산(acetic acid)을 생성하는 세균으로서 락트산균 또는 젖산균이라고도 한다. 한국식품의약품안전청의 건강기능식품의 기준 및 규격 제정에 의한 유산균의 정의는 유산간균(*L.acidophilus*, *L.casei*, *L.gasseri*, *L.helveticus*, *L.fermentum* 등) 또는 유산구균(*S.thermophilus*, *S.lactis*, *E.faecium*, *E.faecalis* 등)을 배양한 것으로 식용에 적합한 것을 말한다. 유산균은 젖산발효에 의해 생성되는 유산에 의해서 병원균과 유해세균의 생육이 저지되는 성질을 요구르트, 치즈 등의 유제품, 김치, 된장, 간장과 같은 양조식품 등의 식품제조에 이용한다. 포유류의 장내에 서식하여 잡균에 의한 이상 발효를 방지하여 정장제로도 이용되는 중요한 세균이다. 그람 염색에서 양성을 나타내는 균이며, 산소의 존재와 상관없이 활동이 가능한 통성 혐기성 또는 혐기성이다. 운동성은 없고, 생육에는 각종 비타민, 아미노산, 몇몇 종류의 펩티드 등이 필요하다.

유산균의 분류는 미생물 분류학적, 형태학적, 생리학적으로 구분될 수 있다. 미생물 분류학상으로는 유박테리알레스목(Eubacteriales)에 포함된다. 이는 락토바실레아에족(Lactobacilleae)과 스트렙토코카세아에족(Streptococcaceae)으로 구분되는데, 전자는 락토바실루스속(*Lactobacillus*)이, 후자에서는 락토코쿠스속(*Lactococcus*), 스트렙토코쿠스속(*Streptococcus*), 페디오코쿠스속(*Pediococcus*), 엔테로코쿠스속(*Enterococcus*), 류코노스톡속(*Leuconostoc*)이 주요한 균이다. 표 3은 유산균의 미생물학적 분류에 대한 정리이고 그림 4는 유산균의 종류인 bifidobacteria, lactobacillus 그리고 streptococcus의 사진이다.

Table 3 Microbiological classification of Lactic acid bacteria.

| Family | Genus | Cell form | fermentation |
|------------------|---------------|------------------|--------------|
| Streptococcaceae | Lactococcus | globular, chain | Homo |
| | Streptococcus | globular, chain | Homo |
| | Enterococcus | globular, chain | Homo |
| | Leuconostoc | globular, chain | Hetero |
| | Pediococcus | globular, tetrad | Homo |
| Lactobacillaceae | Lactobacillus | rod, chain | Homo |
| | | rod, chain | Hetero |

형태학상으로는 너비가 0.5~1.0mm 정도인 젖산 간균(락토바실루스속)과 0.5~1.5 × 1.0~2.0mm 정도의 크기를 갖는 젖산 구균(락토코쿠스속, 스트렙토코쿠스속, 페디오코쿠스속, 엔테로코쿠스, 류코노스톡속)으로 대별된다.



Fig. 4 Image of Bifidobacteria, Lactobacillus and Streptococcus.

생리학적으로는 당을 혐기적으로 분해하여 주로 젖산을 생성하는 호모 발효균 (Homo fermentative lactic acid bacteria)과, 젖산 외에 부산물을 생성하는 헤테로 발효균(Hetero fermentative lactic acid bacteria)으로 분류된다. 각 균종은 각기 다른 대사과정을 거치게 되는데 이때, 호모 발효균은 대사산물의 85%이상이 젖산이며 대사과정을 그림 5에 나타내었다.

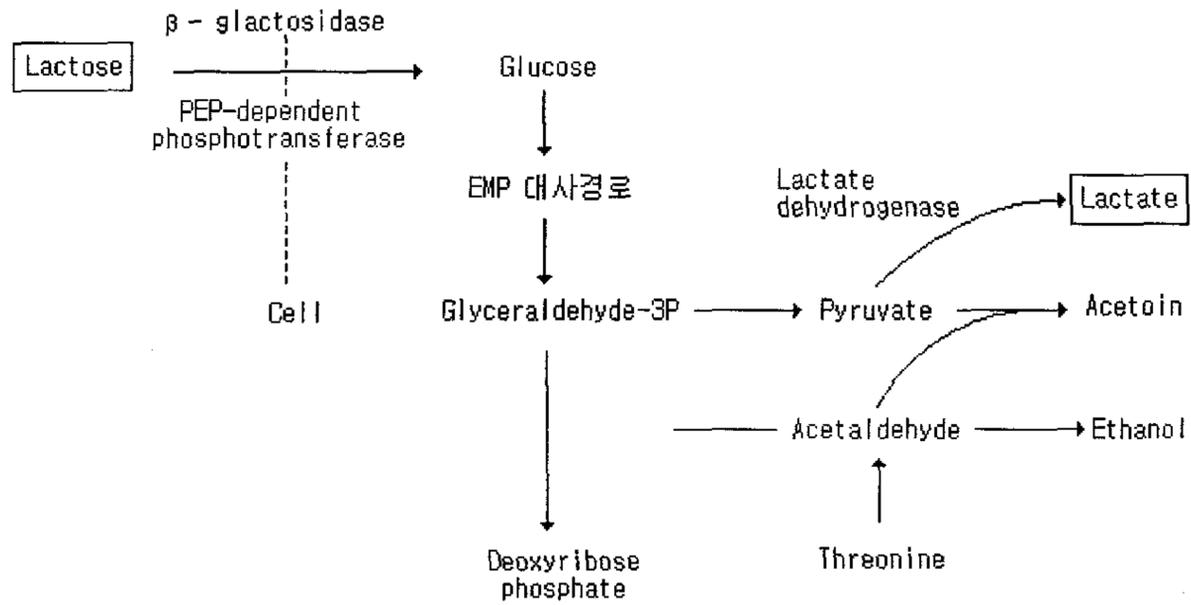


Fig. 5 Metabolism of homo lactic acid bacterium.

또한, 50% 이하의 젖산과 알코올, 이산화탄소 등을 대사산물로 생성하는 헤테로 발효균의 당 대사과정을 그림 6에 나타내었다.

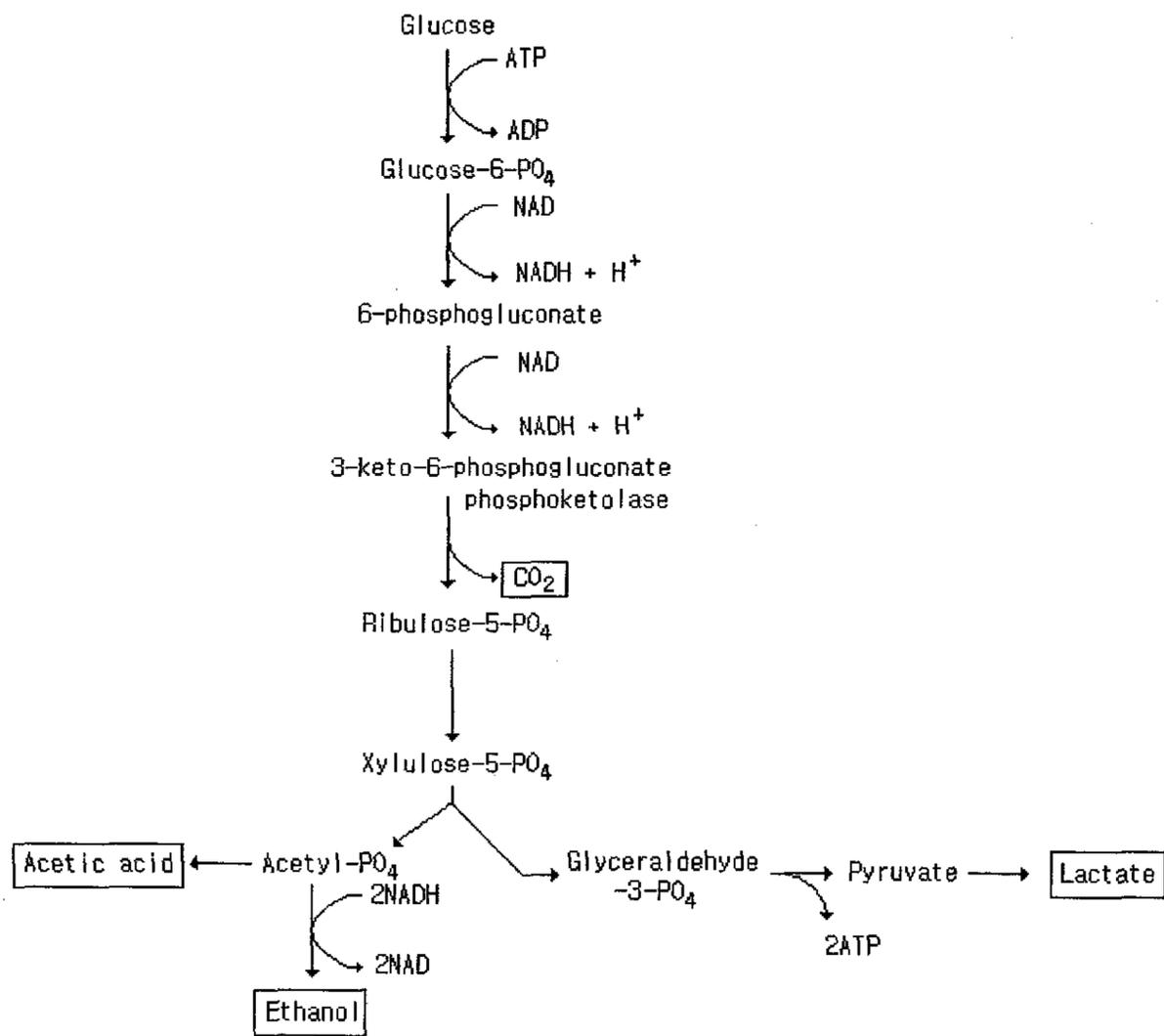


Fig. 6 Metabolism of hetero lactic acid bacterium.

3. 효소의 특성

효소란 생물체에 의하여 생산되어 미량으로 화학반응의 속도를 촉진시키는 화학물질로서, 생촉매(biocatalyst)를 말한다. 효소는 엄청난 촉매 작용을 가지고 있으며, 기질에 대해서 고도의 특이성(specificity)을 가지고 있다. 또한 특이적인 화학반응을 촉진하고, 온도와 pH가 매우 온화한 조건하에서, 그리고 묽은 용액에서 작용한다. 효소는 단백질로 구성되어 거대분자를 이루는데, 고분자 단백질로서 3차원 구조를 갖는다. 효소는 순수한 단백질로만 이루어진 경우도 있으나 복합단백질로 구성되어 비단백성 물질이 결합한 경우에만 활성을 나타내기도 한다.

복합 단백질에서 단백질 부분으로서 효소의 특이성을 결정짓는 효소를 결손효소(apoenzyme)라고 한다. 화학 성분을 부수적으로 필요로 하여 무기 혹은 유기 화합물을 필요로 하는 효소가 있다. 이들 무기·유기 화합물을 효소의 비단백성 성분이라고 하며 조효소(coenzyme=cofactor)라고 한다. 결손효소와 조효소가 함께 결합되어 완전한 촉매 작용을 가지고 있는 형태를 완전효소(holoenzyme)라고 한다.

효소는 특정 기질에 대해 선택적으로 반응하는 특징을 갖는다. 활성부위(active site)라고 부르는 효소 분자의 극히 한정된 일부분의 영역과 효소작용을 받는 분자인 기질(substrate)이 결합하여 기질을 생성물질(product)로 변화시킨다.

어떤 화학 반응이 일어나기 위해서는 그림 7의 점선과 같은 반응 곡선을 따라 일어나게 된다. 반응 초기와 S \ddagger 수준의 에너지 차이를 활성화 에너지(activation energy)라고 한다. 기질(S)이 갖는 에너지보다 활성화 에너지 만큼 에너지를 얻어야 생성물(P)을 얻을 수 있는데, 효소의 역할은 이 활성화 에너지를 낮춰줌으로서 반응 속도를 빨리 일으키도록 촉매역할을 하는 것이다. 그림 7의 점선 곡선은 효소가 작용하지 않은 반응이고 실선 곡선은 효소가 작용했을 때 반응을 나타낸다.

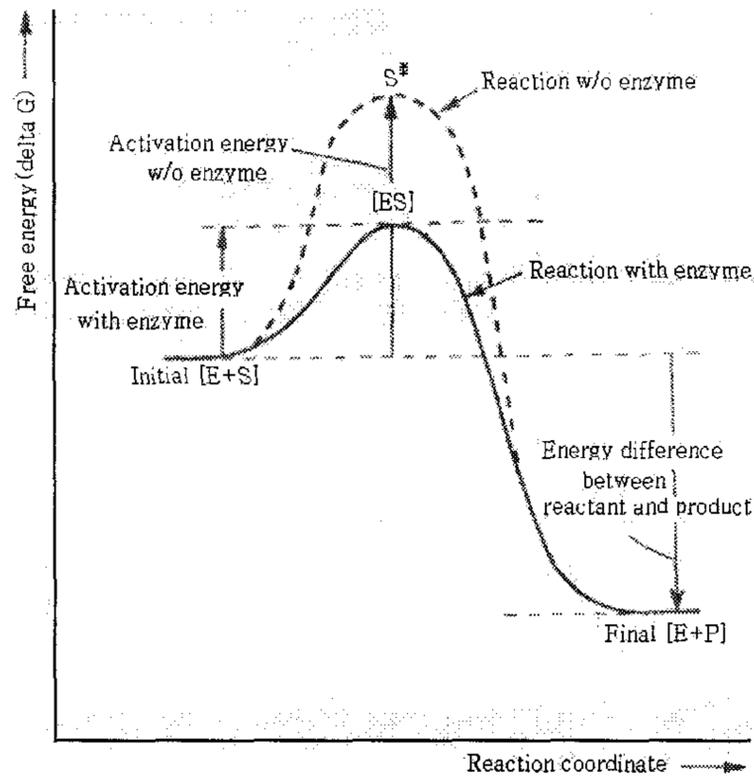


Fig. 7 Role of enzyme on reaction curve.

효소는 기질과 결합하여 효소-기질(ES)의 형태를 하고 기질을 생성물로 변화시킨 효소-생성물(EP)의 형태로 존재하다가 생성물질과의 결합을 끊고 자유 효소 (free enzyme)의 형태를 유지한다. 또 다시 기질을 만나면 위와 같은 효소의 촉매 역할을 하기 위해 다시 기질과 결합하게 된다. 이를 그림 8과 같이 표현 할 수 있다.

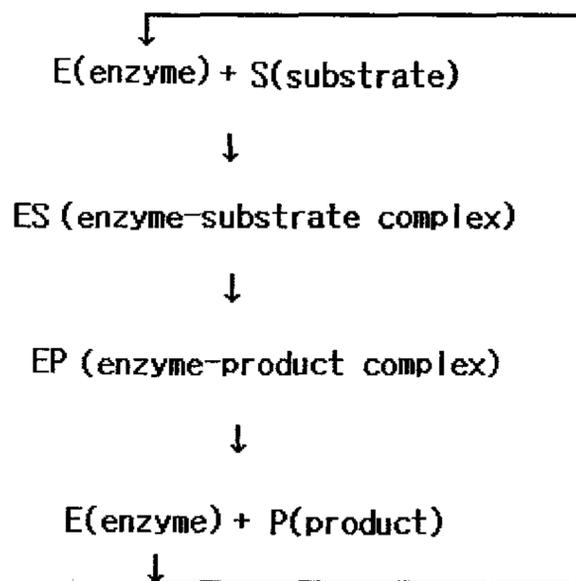


Fig. 8 Mechanism of enzyme reaction.

효소의 분류는 IUB(international union of biochemistry)에 의한 촉매 반응에 따라 구분을 한다. 그 구분은 다음과 같고 각각의 역할에 대해 설명한다.

산화환원 효소(oxidoreductase)는 기질의 산화 혹은 환원반응을 일으키는 효소이고, 전이 효소(transferase)는 한 기질에서 다른 기질로 기 또는 원자단을 이동시키는 효소이다. 가수분해 효소(hydrolase)는 물분자를 첨가시켜 기질의 공유결합을 가수분해 하는 효소로 구분하며, 기제거 효소(lyase)는 기질에 이중결합을 생성하거나 이중결합에 어떤 작용기를 첨가하는 반응을 촉매하는 효소를 말한다. 합성 효소(ligase)는 ATP를 이용하여 두 분자를 결합시키는 효소이며, 이성화 효소(isomerase)는 분자간 재배열을 일으켜서 이성질체를 형성하는 효소이다.

4. 효소와 바이오센서

초기 바이오센서 개발에서부터 현재까지 생체활성물질로서 주로 사용된 물질은 효소이다. 효소는 생촉매(biocatalyst)로서 화학 촉매에 비해 환경 친화적이고 기질 특이성이 뛰어나다는 장점을 지니고 있다. 그럼에도 불구하고 pH, 온도와 같은 주변 환경에 매우 민감하게 특성이 변하고, 재활용이 어려우며, 만들어진 생성물과의 분리가 어렵다는 한계를 가지고 있다. 이런 문제를 해결하기 위해 효소를 고정하는 방법이 있다.

고정화된 효소는 비록 그렇지 않은 효소에 비해 활성이 떨어지는 단점이 있으나, 여러 활용이 쉽다는 장점을 가진다. 고정화된 효소는 무엇보다 편리하게 다룰 수 있는 장점을 가지며, 생성물과 효소의 분리가 용이하고, 재사용이 가능하며 효소 공정에서 효소의 단가를 낮추는 장점을 갖는다.

효소를 고정하여 개발된 센서의 장점은 안정성이 높고, 이용 목적에 따라 적합한 성질과 형상을 얻을 수 있다. 또한, 고정화 방법에 따라 재사용이 가능하고, 연속적인 반응에 대한 감지가 가능하다. 이와 반면에 고정화하는 과정에서 효소의 손실이 일어날 수 있으며 효소의 고정화 방법에 따라 효소의 성격이 바뀔 수 있다. 담체에

효소를 고정하는 방법에 따라 개발비용의 차이가 나고, 장치 및 기술 비용의 차이가 발생한다는 단점이 있다. 하지만, 개발되고 있는 많은 바이오센서가 효소의 고정화를 이용하고 있으며, 이는 단점에 비해 장점이 높게 부각되기 때문이라고 판단된다.

제 2 절 유산균 수와 생성 유기물의 상관관계

1. 유산균 배양과 발효과정에서 균수 변화

유산균 발효과정에서 L-lactate, acetate, citrate 등이 주요 생성 유기물이다. 이때, 발효가 진행되는 동안 유산균 수와 상관관계가 높은 물질을 결정하고 이를 측정하는 방법으로 유산균 수를 예측하기 위해 유산균을 배양하였다.

Lactobacillus acidophilus kctc 0404의 균종을 사용하여 실험하였고, 이 균주는 발효유에 일반적으로 사용되는 균이다. 서울대학교 농업생명과학대학 유과학·유산균 미생물학 연구실로부터 분주하였다.

배양액 제조를 위해 BD(Becton, Dickinson)사의 *Lactobacilli* MRS broth 22.5g과 증류수 500ml를 교반기로 섞고, 21개의 screw cap tube에 각각 10ml씩 주입한다. 배양액이 담긴 screw cap tube를 121℃에서 20분간 멸균시켜 유산균 이외의 잡균을 멸균시켰다. 멸균 후, tube의 배양액을 약 37℃로 냉각시킨 후 Homo형 간균인 *Lactobacillus acidophilus* 100 μ l를 멸균된 배양액에 접종시키고 37℃ 조건의 배양기에서 배양시킨다. 그림 9는 broth 준비부터 발효과정까지의 공정을 정리한 흐름도이다.

배양기에서 배양시키기 전에 초기 유산균 농도 측정부터 30분 간격으로 8시간, 그 이후에는 1시간 간격으로 발효조에서 시료를 꺼내어 희석 단계를 거쳐 고체 배지이 균을 키웠다. 각 시료당 30~300개의 colony로 희석되도록 BD(Becton, Dickinson)사의 Bacto peptone에 희석하여 사용한다. 30~300개의 colony로 희석시키는 이유는 plate에 균주가 colony를 형성할 때 계수하기 용이하게 하기 위함이다. 유산균 수를 측정하기 위해 총 균수 측정법을 사용하였다. 덕산사의 Agar powder를 고체 배지로 사용하였고 자세한 과정은 다음 그림 10과 같다.

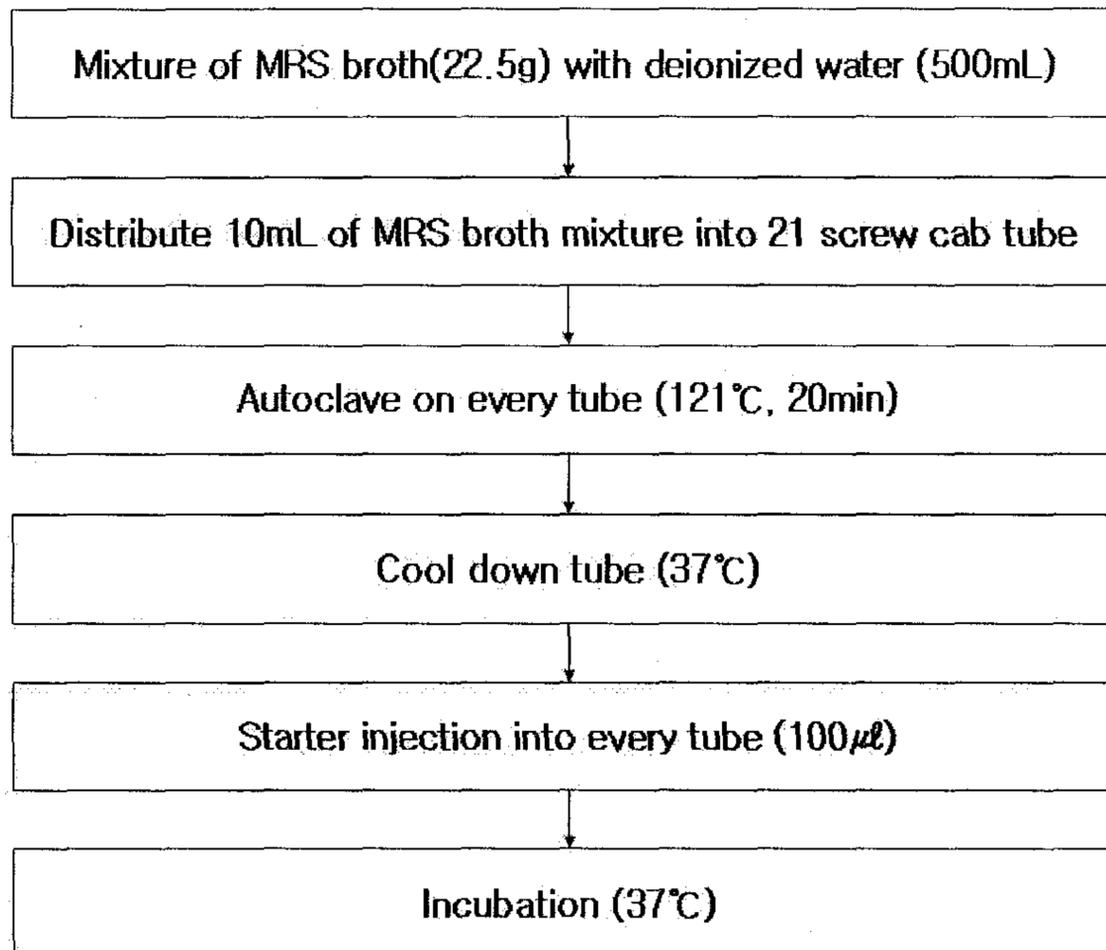


Fig. 9 Flow diagram of fermentation process of *Lactobacillus acidophilus*

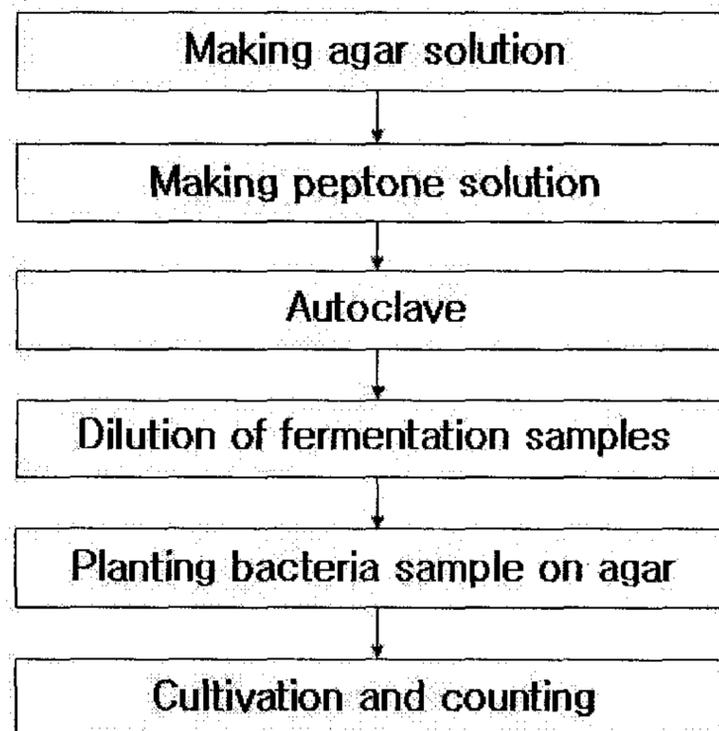


Fig. 10 Flow diagram of preprocess of dilution fermented bacteria counting.

- ① Agar 제조 - 3l의 증류수에 165g의 broth와 52.5g의 agar를 용해시킨다.
- ② 희석액 제조 - 1.2l의 증류수에 1.2g의 peptone을 용해시켜, 0.1% 용액을 제조한 후 screw cap tube에 넣는다.
- ③ 멸균 - autoclave에서 agar 제조액, 희석액, petri dish를 121℃에서 20분간 멸균한다.
- ④ 시료 조제 - 1ml의 시료를 무균적으로 9ml peptone 희석액에 넣어 혼합시킨다. 희석 비율은 배양 후 petri dish에 30~300개의 colony가 나올 수 있도록 희석한다.
- ⑤ Planting - 희석액 1ml를 취한 petri dish에 미리 44~46℃ water bath에 넣어 둔 agar를 10~12ml 정도 부어 희석액과 잘 섞이게 한 후 정지시켜 agar를 굳힌다. 이 샘플을 시료당 2개씩 제조한다.
- ⑥ 배양 및 Count - 완전히 굳은 plate를 뒤집어서 항온기(37℃)에서 12시간을 배양한 후 colony를 센 후 희석 비율을 곱하여 균수를 계산한다. 같은 샘플의 시료 2개를 평균하여 최종 colony 수를 결정한다.

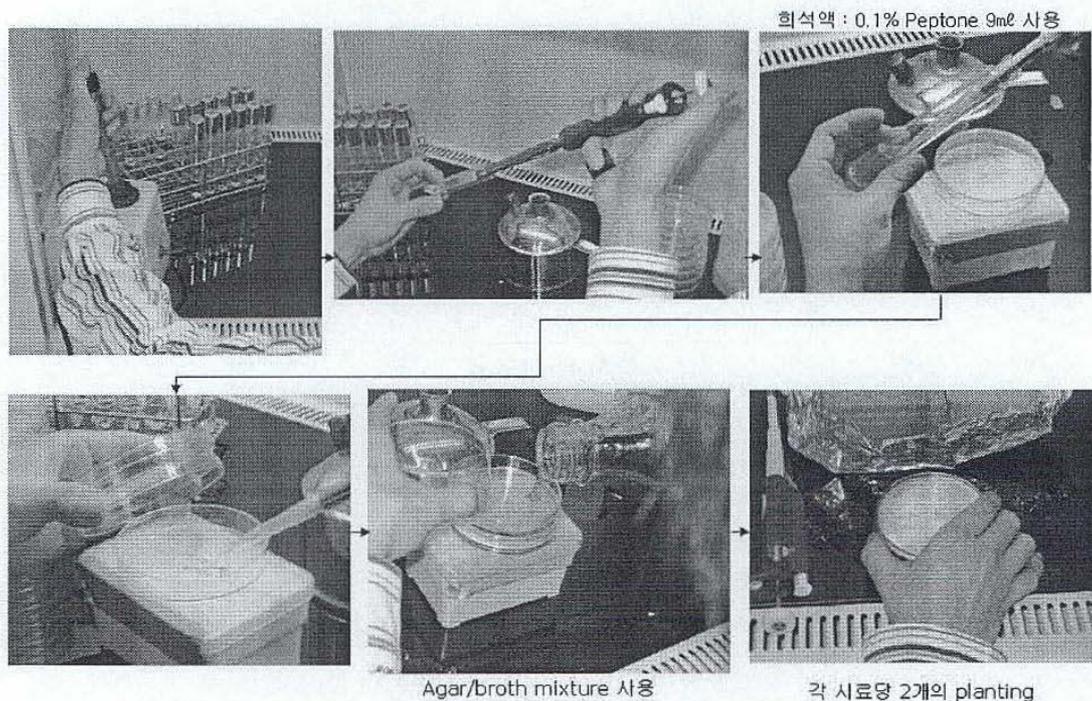


Fig. 11 Image of dilution of fermented bacteria and planting.

MRS broth에 유산균을 접종하자마자 찍은 발효 초기의 사진과 접종 이후 11시간 동안 37°C의 조건에서 발효된 샘플의 사진을 그림 12에 나타내었다. 발효가 진행될수록 tube 바닥에 하얀 침전물이 생겼으며 이는 유산균이 배양되어 침전되었기 때문이다. 또한 발효가 진행되면서 접종된 MRS broth 용액의 투명도가 떨어짐을 알 수 있었다.

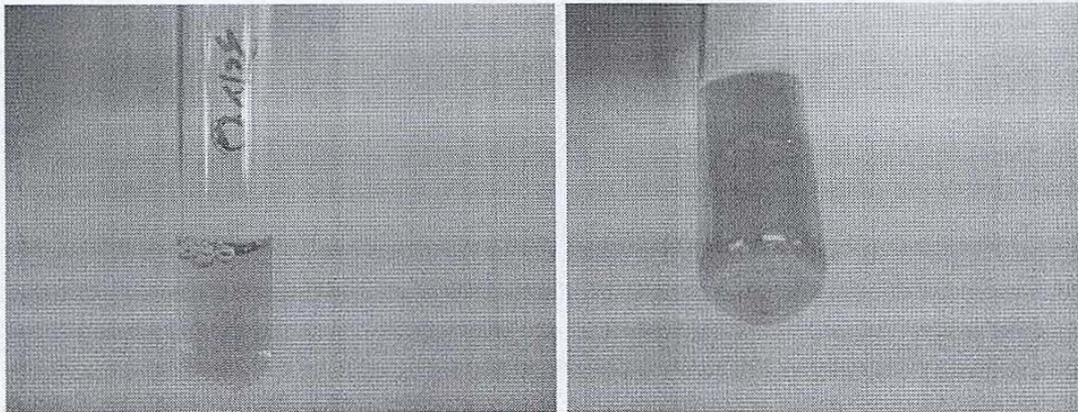


Fig. 12 Image of before and 12 hours after fermentation of *Lactobacillus acidophilus*.

발효 이후에 희석된 유산균을 agar에 plating 하여 agar가 굳고 이어서 12시간 배양시키면 그림 13과 같이 균이 균집(colony)을 형성하게 된다. 그림 14는 균주를 12시간 배양시키고 10^7 배 희석하여 agar plate에서 균집을 형성시킨 모습이다. 이때 각 균집을 계수하여 발효 시간에 따라 유산균의 농도변화를 도식해보면 그림 15와 같다. 일정한 배양조건에서 미생물의 일반적인 개체 증가 곡선을 보인다. 초기 4시간 동안은 지연기(lag phase)로서 균주가 배지 조건에 적응하는 기간으로 볼 수 있고, 발효 4시간부터 11시간은 지수성장기(exponential phase)로서 균주가 환경에 적응하여 빠르게 증식하는 기간이다. 발효 11시간 이후에는 감속성장기(deceleration phase)로서 균주가 성장하기에 한 개 또는 그이상의 영양소가 고갈되어 증가율이 감소하는 기간이다.

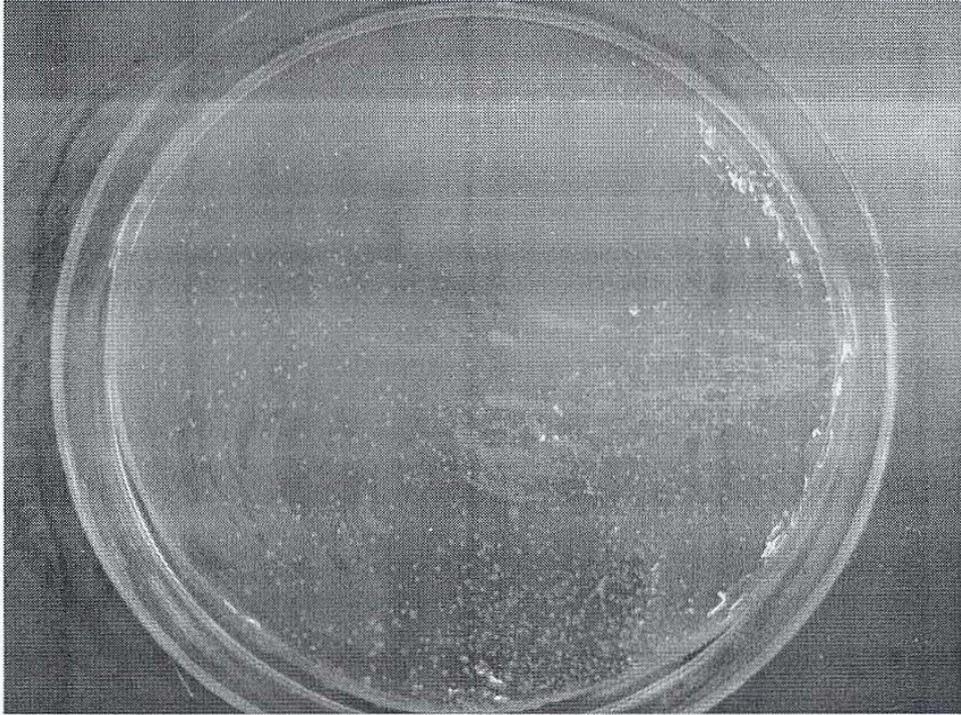


Fig. 13 Image lactic acid bacteria colony formed on agar plate.

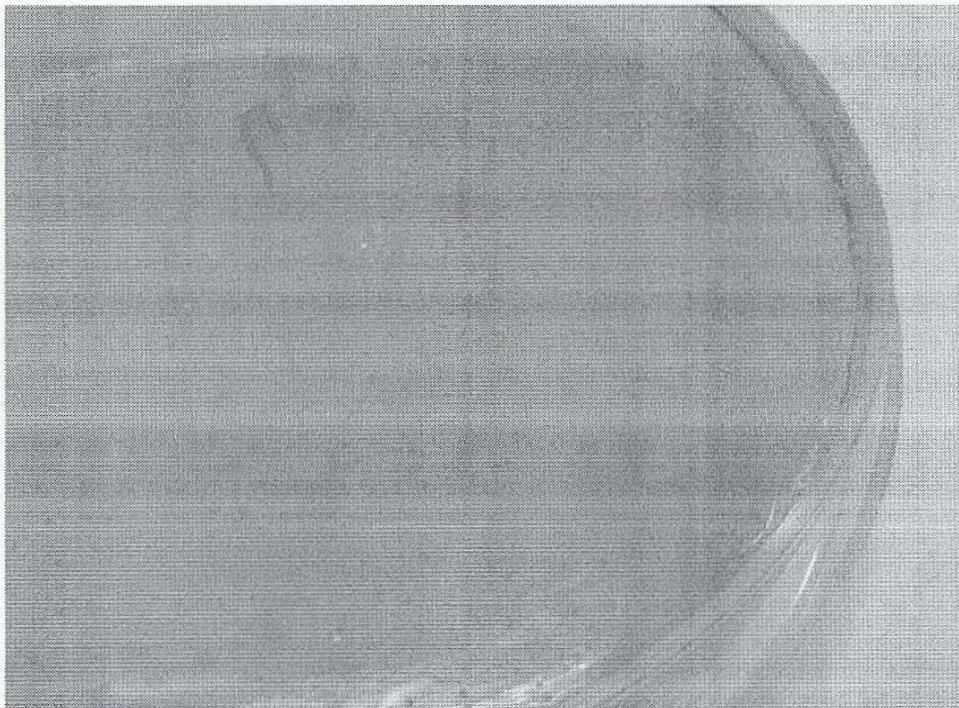


Fig. 14 Image of 12 hours fermented, 10⁷ times diluted and colony formed sample.

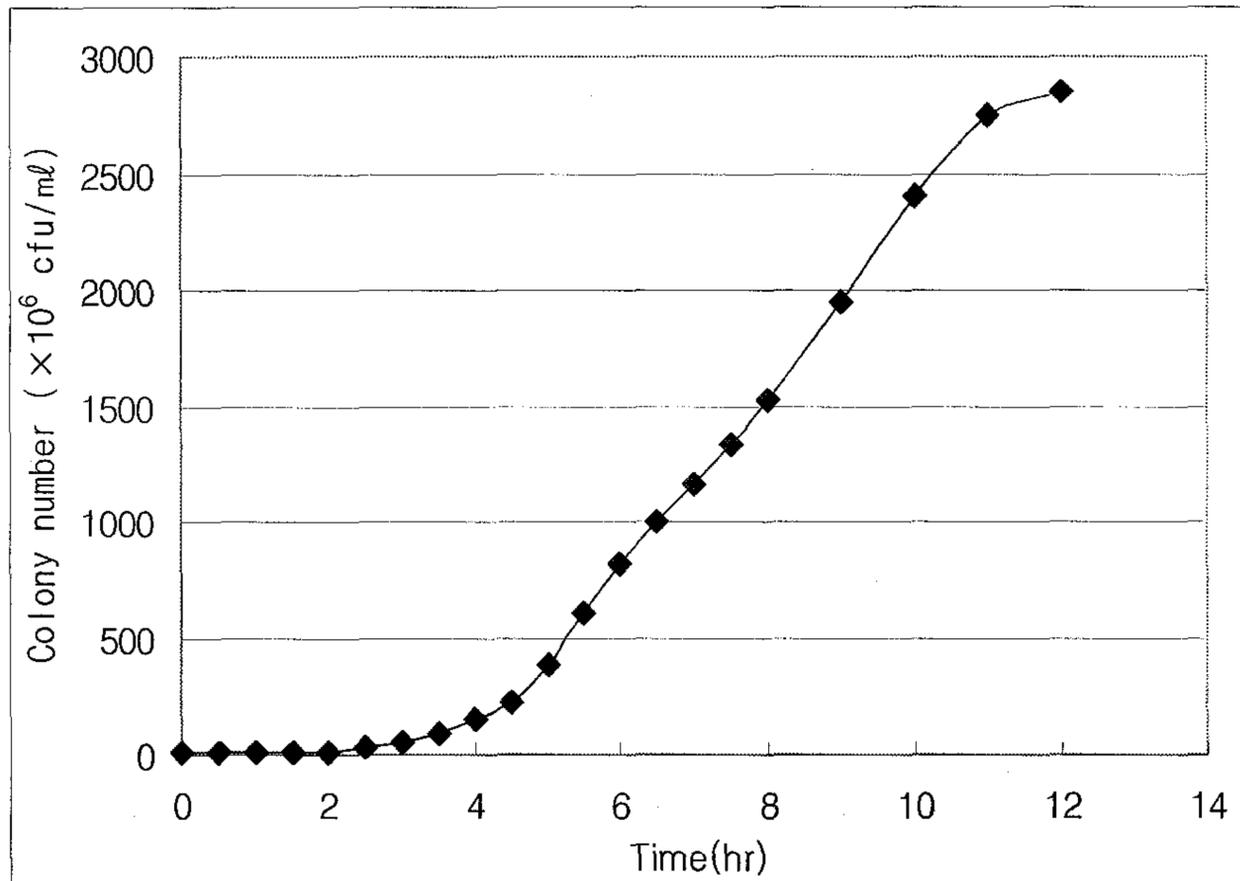


Fig. 15 Colony number of lactic acid bacteria during fermentation.

유산균 발효유도 위와 같은 균주의 발효과정을 통해 균 개체 수를 증가시키게 되기 때문에 위의 발효과정에서 균수 측정이 가능할 경우에 실제 발효시스템에도 적용하여 발효 정도 및 균수를 예측 할 수 있을 것으로 판단된다.

2. 유산균 발효과정에서 생성 유기물 분석

유산균이 발효하면서 생성되는 주요 유기산의 종류와 농도 변화 추이를 분석함으로써 이들 유기물과 유산균 수의 상관관계를 분석하고자 하였다. 위의 발효과정에서 발효시간에 따라 균수를 측정했던 동일 시료에서 유기산의 농도를 측정하였다. 유기산의 변화량을 측정하기 위해 IC(ion chromatography)를 사용하였다. 이온크로마토그래피의 분석 흐름도는 다음 그림 16과 같다. 분석에 사용된 Dionex社의 이온크로마토그래피는 ppm에서 ppb까지의 농도 측정이 가능하며 각 시료는 50 μ l씩 주입하여 분석하였다. 장비와 분석에 관련된 자료는 표 4와 같고 그림 17은 실제 이온크로마토그래피의 모습이다.

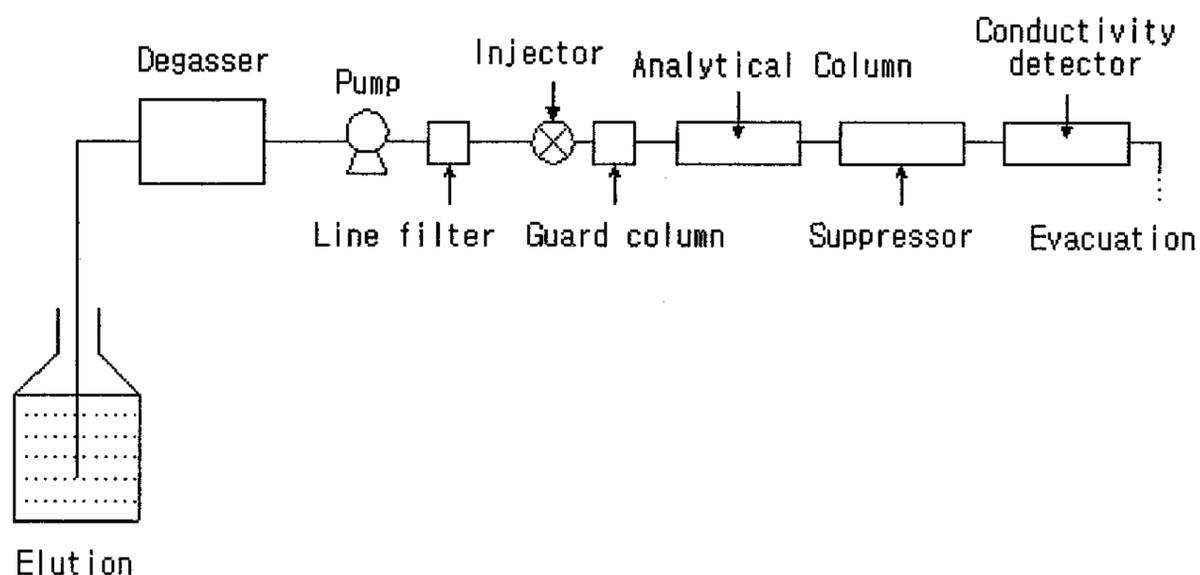


Fig. 16 Basic flow diagram of ion chromatography.

Table 4 Specification of ion chromatography.

| Item | Specification |
|---------------------|--|
| Company | Dionex, USA |
| Model | DX-500 |
| Range | ppm ~ ppb |
| Extraction solution | 80% ethanol |
| Sample injection | 50 μ l |
| Pump flow rate | 1 ml/min |
| Suppressor | Anion-ICE micromembrane suppressor |
| Column | ICE-AS6 (9 × 250mm) Guard column, Analytical column |
| Detector | ED40 Electro conductivity detector(ECD) |

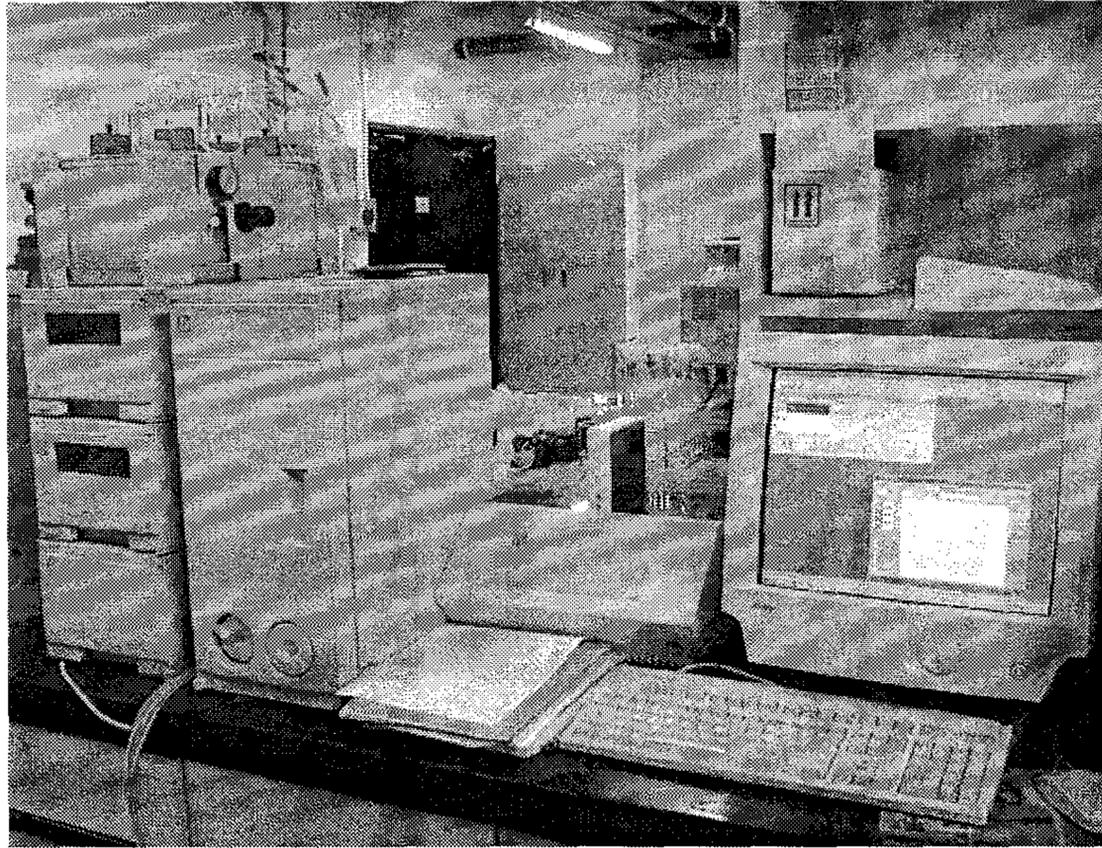


Fig. 17 Image of ion chromatography.

분석된 시료의 이온 농도는 발효시간에 따라 변화를 보였다. 그 변화는 그림 18과 같이 피크 형태로 나타난다. 이때 보이는 피크의 위치는 각 유기산의 종류에 따라 다르게 나타나며 농도가 높을수록 피크가 그리는 면적이 커지고 면적 계산을 통해 농도를 알 수 있다. 그림 18은 30분 발효한 시료의 유기산 분석 피크 자료이고 그림 19는 12시간동안 발효시켜 유산균 수가 증가하였을 때의 유기산 분석 피크이다. 분석된 유기산의 종류는 citric acid, L-lactic acid, acetic acid의 순서로 피크를 나타냈다. 상대적으로 발효 초기의 L-lactic acid의 농도는 낮고 citric acid와 acetic acid의 농도는 높았다. 하지만 12시간 발효된 시료의 피크는 L-lactic acid의 농도가 우월하게 높음을 알 수 있다. 시간에 따라 유기산의 농도를 나타내었을 때 그림 20과 같이 L-lactic acid의 농도는 증가하는 반면에 citric acid와 acetic acid의 농도는 그 변화가 크지 않은 범위에서 일정하게 유지됨을 알 수 있었다.

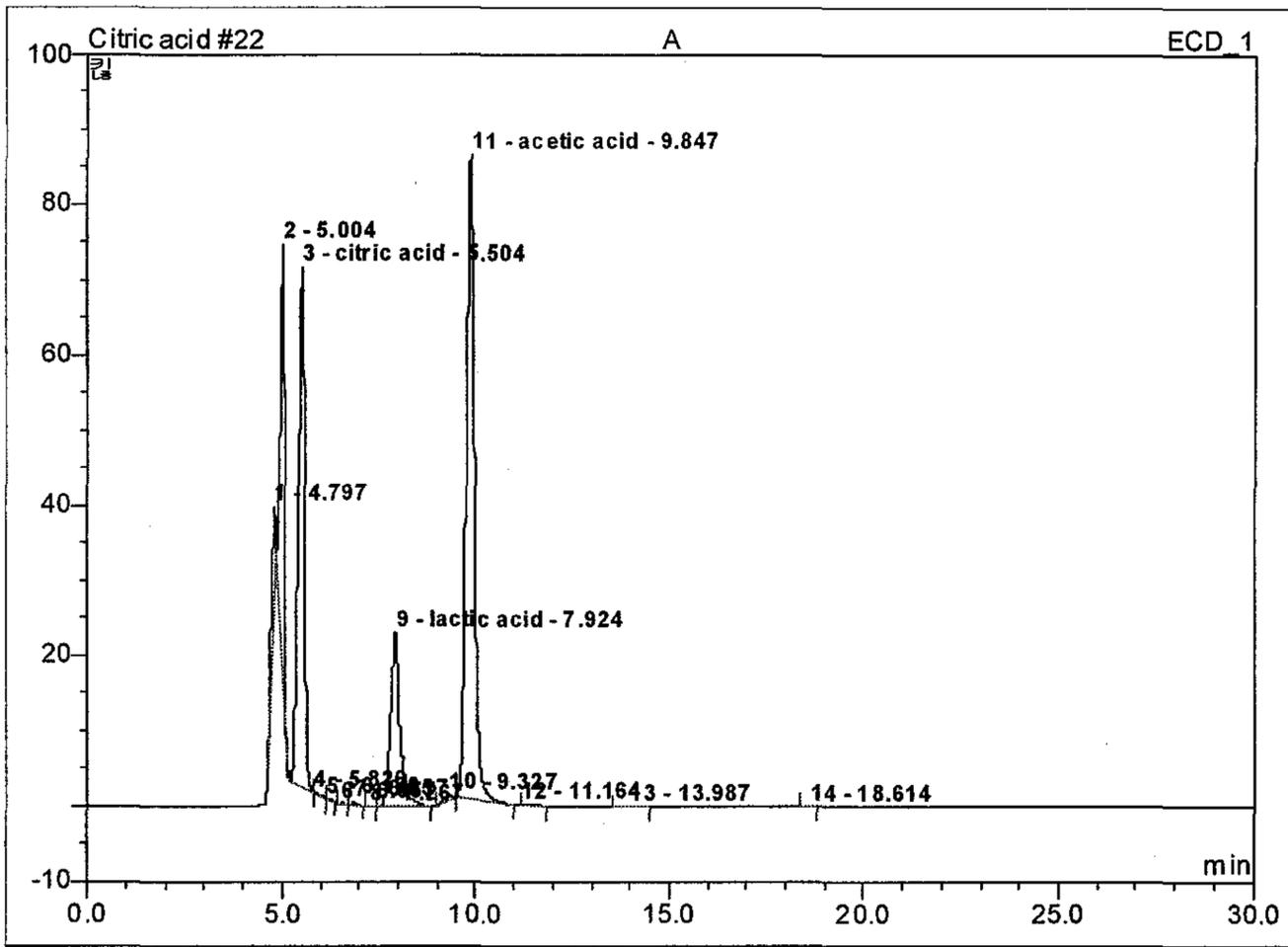


Fig. 18 Ion chromatography results on 30 minutes fermented sample.

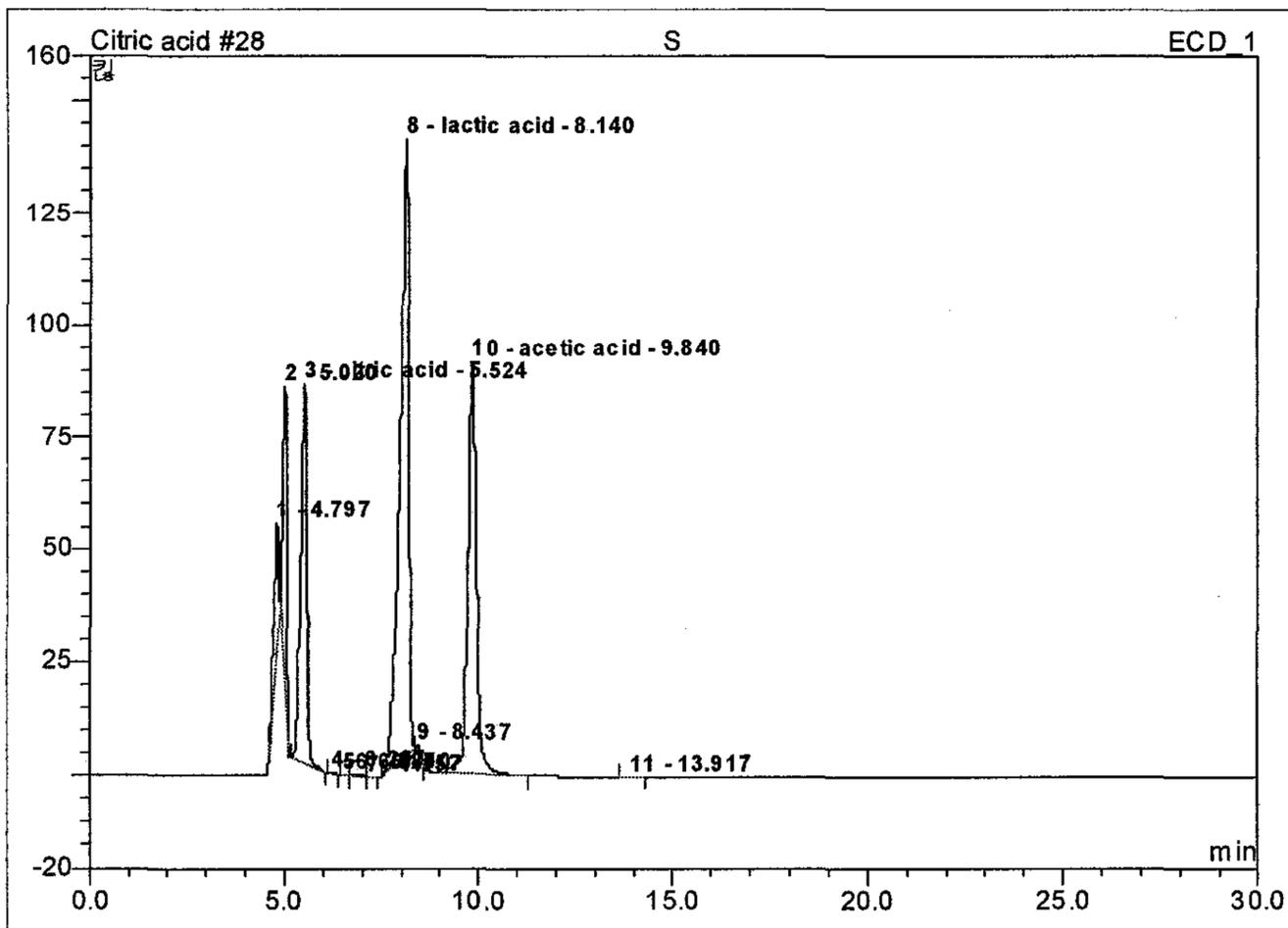


Fig. 19 Ion chromatography results on 12 hours fermented sample.

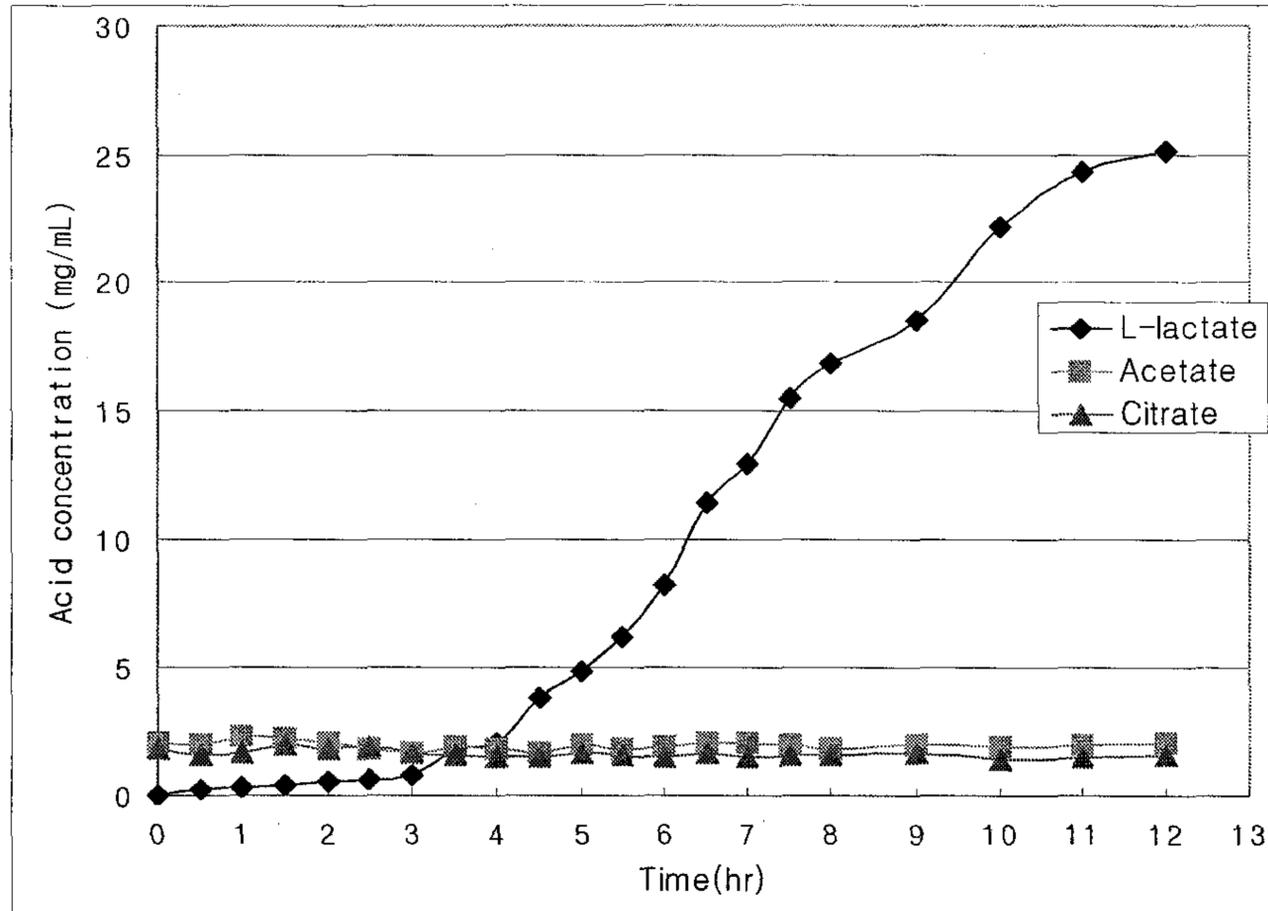


Fig. 20 Acid concentration variation during fermentation.

3. 발효과정에서 유산균 수와 생성된 유기물의 상관관계 분석

유산균의 발효는 시간에 따라 지연기, 지수성장기 그리고 감속성장기를 거쳤고 이와 동시에 유기산의 농도는 각 시간에 따라 특성을 보이며 변화를 보였다. 생성된 유기산 중에 citric acid와 acetic acid는 유산균 수와 상관관계를 갖는다고 하기에는 농도의 변화가 보이지 않고 일정하게 유지되었기 때문에 배제할 수 있다. 하지만 L-lactic acid의 경우에는 발효 시간에 따라 농도가 증가하였기 때문에 유산균 수와 L-lactic acid의 상관관계 분석을 수행하였다.

발효시간에 따른 L-lactate의 농도 변화와 유산균 수의 변화를 비교하기 위해 이를 그림 21에 도시하였다. L-lactate의 농도는 유산균의 수와 유사한 증가 양상을 보이며, 이들의 관계를 알아보기 위해 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 회귀 분석하였다.

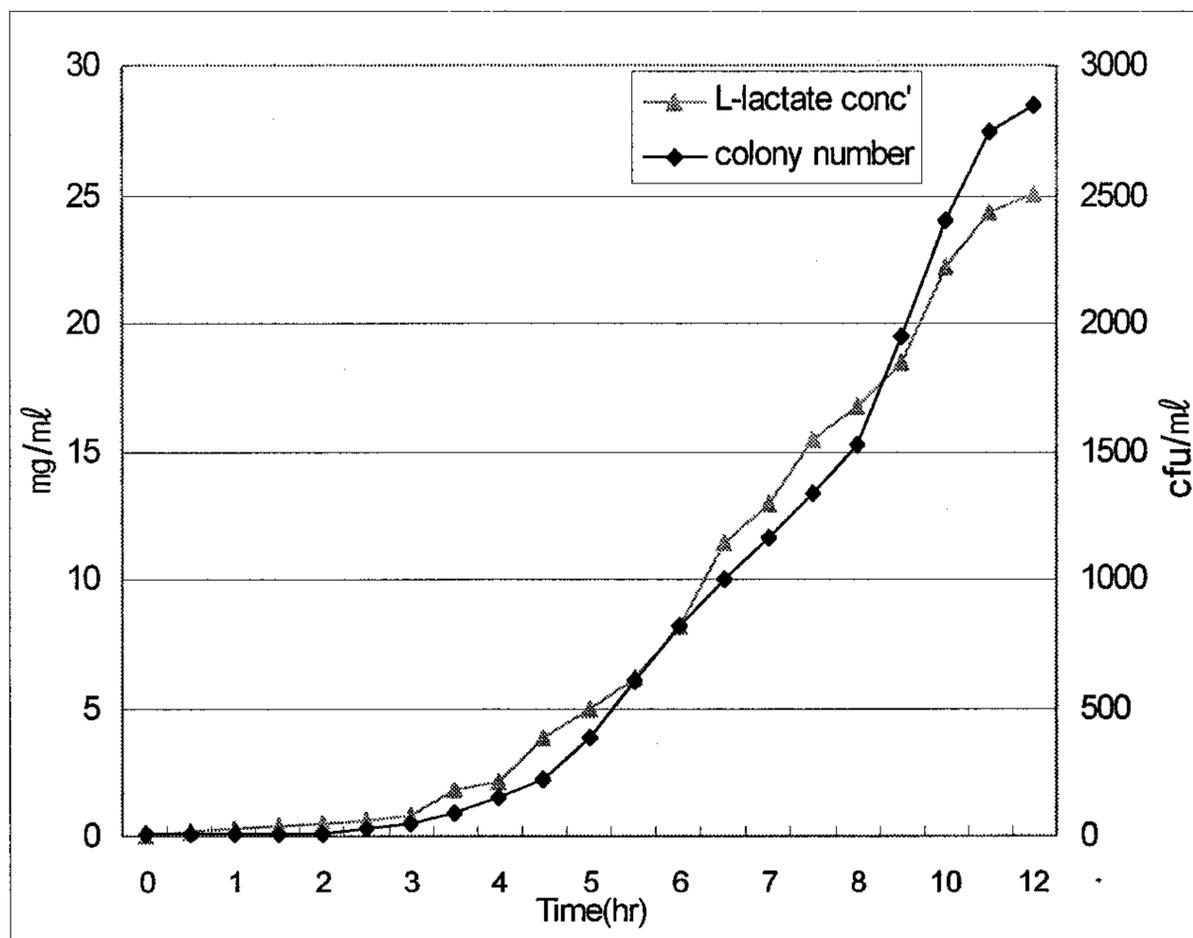


Fig. 21 Relation between lactic acid bacteria colony number and L-lactate concentration.

회귀분석의 결과, 유산균 발효과정에서 생성되는 유산균 수와 L-lactate의 농도 사이에는 그림 22와 같이 $R^2=0.984$ 의 유의성이 있음을 알 수 있다. 유산균 수와 L-lactate 농도와의 관계식을 통해 L-lactate의 측정으로 유산균 수를 예측할 수 있을 것으로 판단되며 관계식의 표준오차는 1.14로 나타났다.

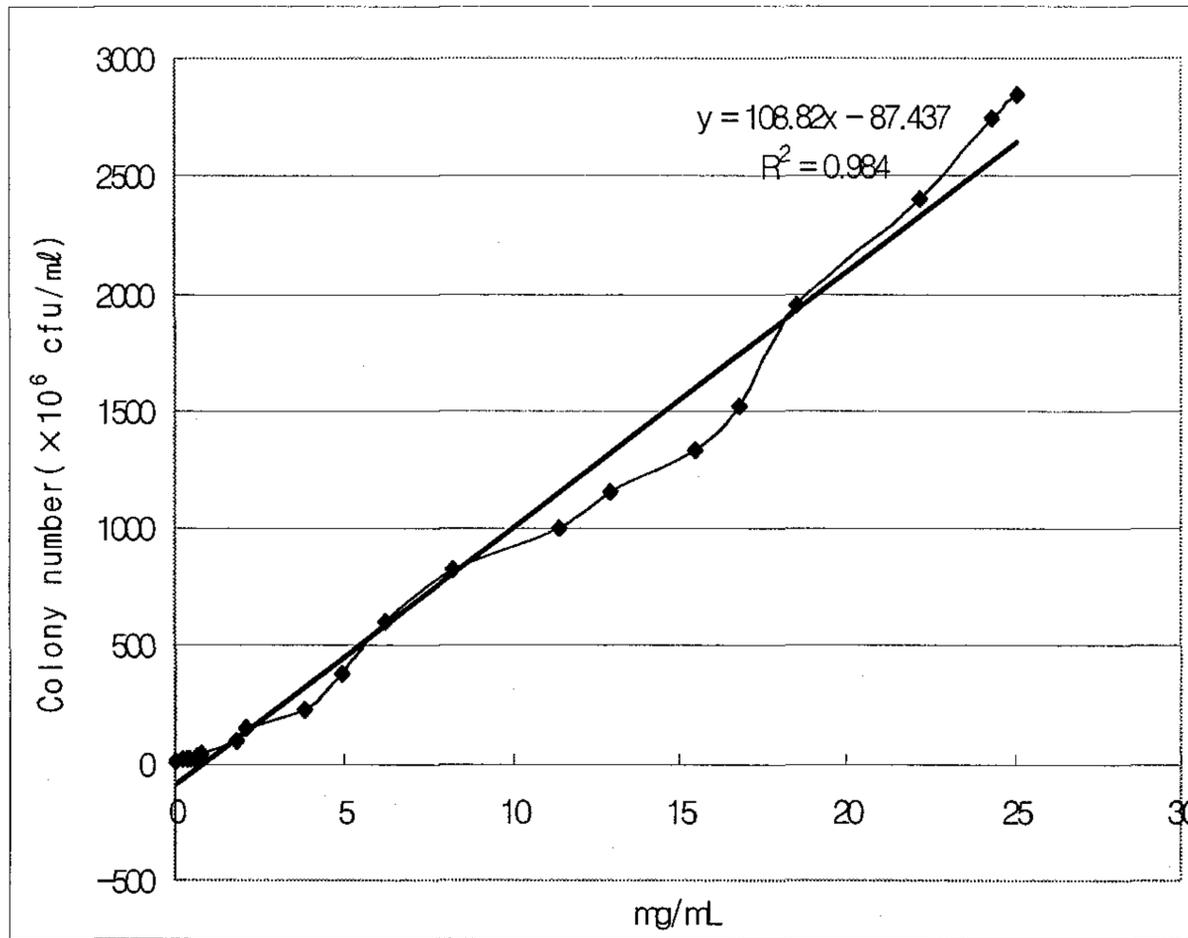


Fig. 22 Correlation between L-lactate and lactic acid bacteria colony number.

$$y = 108.82x - 87.437 \dots \dots \dots \text{(식 1)}$$

여기서, x = L-lactate의 농도 (mg/mL)

y = 유산균 수 (colony forming unit; $\times 10^6$ cfu/ml)

제 3 절 효소의 선택과 저해제 제거

1. L-lactate와 반응 효소의 선택

유산균 발효과정에서 생성되는 유기산의 상관관계 분석을 통해 유산균과 L-lactate는 높은 상관관계를 나타냄을 알았다. 따라서 L-lactate의 농도를 측정함으로써 유산균의 농도를 측정할 수 있을 것으로 판단하였다. 효소 반응을 이용한 L-lactate의 측정을 위해 효소를 선정하고 반응 특성을 실험하여 센서 개발의 가능성을 판단하였다. 유산균의 대사 작용을 통해 생성되는 L-lactate를 L-LDH(L-lactate dehydrogenase)와 NAD(nicotinamide adenine dinucleotide)를 사용하여 L-lactate의 정량 가능성을 실험하였다. 이때 사용된 시약은 다음과 같다.

L-lactate dehydrogenase (L-LDH, EC 1.1.1.27, Fluka, from rabbit muscle, 215 Units/mg), L-lactate (2-Hydroxypropionic Acid, Sigma), Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺, EC 2.7.1.23, Sigma type IV, from chicken liver, 10 Units/mg)를 정제과정 없이 사용하였다. 실험에 사용된 희석을 위한 모든 용액은 증류수를 사용하였다.

효소 반응의 개요를 그림 23에 나타내었다. L-lactate에 L-lactate dehydrogenase와 NAD⁺가 동시에 작용하면서 L-lactate에서 두 분자의 수소이온을 떨어뜨려 산화작용을 일으킨다.

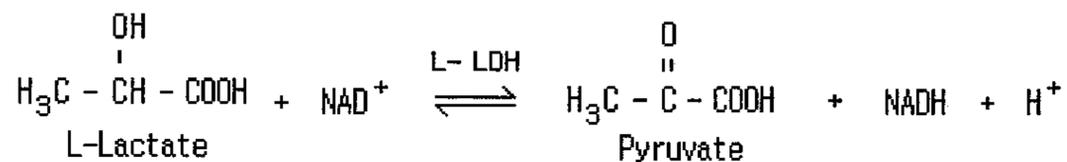


Fig. 23 Reaction of L-lactate with L-LDH.

NAD⁺는 일반적으로 많이 사용하는 조효소로서 효소반응에서 수소를 이동시키는 반응(hydrogen-transfer reaction)에 관여하여 수소와 결합하여 NADH 형태로 존재하게 된다. 수소가 유리된 L-lactate는 pyruvate가 되고 남아있는 한 분자의 수소이온에 대한 측정을 통해 L-lactate의 농도를 측정하고자 한다. 유산균의 수에 따라 농도의 차이를 보이는 L-lactate와 L-lactate dehydrogenase의 반응에 의해 생성되는 수소이온의 농도를 측정하기 위해 pH meter를 사용하였으며 사용된 pH meter는 표 5와 같다.

Table 5 Specification of pH meter.

| Item | Specification |
|-------------|-----------------------|
| Company | Orion |
| Model | 420A ⁺ |
| Range | -2.00 ~ 19.99 |
| Resolution | 0.001 / 0.01 / 0.1 pH |
| Accuracy | ± 0.005 |
| Temperature | -5.0 ~ 105.0 °C |

L-LDH, NAD, 증류수의 양을 동일하게 하고 L-lactate의 농도를 변화시켰을 때, pH의 변화를 실험하였다. 5개의 시험관에 L-lactate를 각각 0.1mg, 0.2mg, 0.3mg, 0.4mg, 0.5mg씩 넣고 NAD, 증류수를 각각 5mg, 1ml씩 충분히 넣어 준비한다. pH meter를 통해 초기 pH를 측정한 후 L-LDH 50 μ l를 시험관에 주입하였을 때 변화를 각각 살펴보았다. 그 결과를 그림 24에 나타내었다.

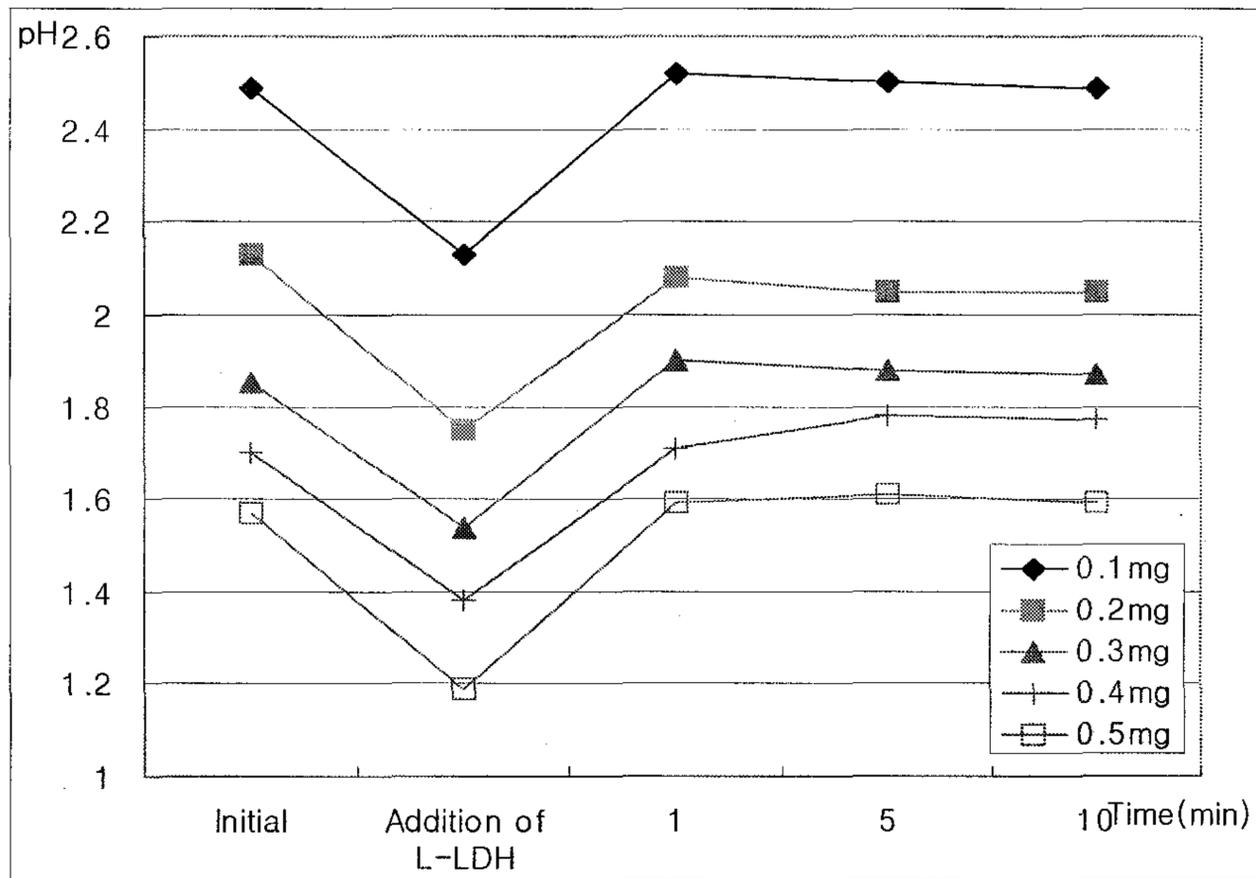


Fig. 24 Reaction of L-LDH on different concentration of L-lactate.

그림 24에서 Initial은 L-LDH를 제외한 NAD, 농도별 L-lactate가 섞여있을 때의 pH를 나타내며 L-LDH를 주입한 이후에 급격히 떨어졌던 pH는 1분 이내로 초기 pH에 거의 유사한 값을 나타내었다. 그 이유는 L-LDH가 pyruvate의 생성에 대한 반응 보다 pyruvate에서 L-lactate을 생성하는 역반응에 더 우월하게 작용하기 때문이다. 더불어 pyruvate에서 L-lactate로의 반응 평형상수(K_{eq})가 2.5×10^4 로서 본 실험에서 요구하는 반응의 역반응이 더 쉽게 일어난다는 것이다. 따라서 L-LDH와 NAD만을 이용한 L-lactate의 측정은 불가능함을 알 수 있었다. 따라서 pyruvate의 생성은 L-lactate의 측정에 저해제로 작용함을 알 수 있었고, pyruvate의 제거를 위한 방안이 필요했다. 특히 pyruvate를 다른 물질로 전이시켜 pyruvate가 L-lactate로 되는 반응을 막고 또한 동시에 수소이온을 소비하지 않도록 하는 방법을 모색하게 되었다.

2. L-LDH 효소 반응의 저해제 제거

앞에서 L-LDH와 NAD의 L-lactate에 대한 반응은 pyruvate에서 L-lactate로의 반응이 우월하게 나타나기 때문에 최종 pyruvate의 농도보다 L-lactate의 농도가 높게 된다. 이러한 역반응을 막기 위해 저해제 기능을 하는 pyruvate를 다른 물질로 전이시킬 필요가 있다. 그렇게 되면 L-LDH로부터 pyruvate가 생성되는 즉시 다른 물질로 전이되어 L-LDH로부터 생성된 수소이온을 소비하지 않게 되기 때문이다. 따라서 전이효소인 GPT(glutamic-pyruvic transaminase)를 사용하여 pyruvate가 L-glutamate와 함께 있을 때 각각 L-alanine과 2-oxoglutarate로 전이시키는 반응을 이용하려고 한다. 이때 GPT의 반응식을 그림 25에 나타내었다.



Fig. 25 Reaction of pyruvate with GPT and L-glutamate.

결과적으로 pyruvate의 L-lactate로의 역반응을 pyruvate를 제거함으로써 L-lactate의 농도에 따른 수소이온의 농도를 얻을 수 있도록 하였다. L-lactate의 측정 가능성 실험의 전체적인 화학반응은 그림 26과 같다.

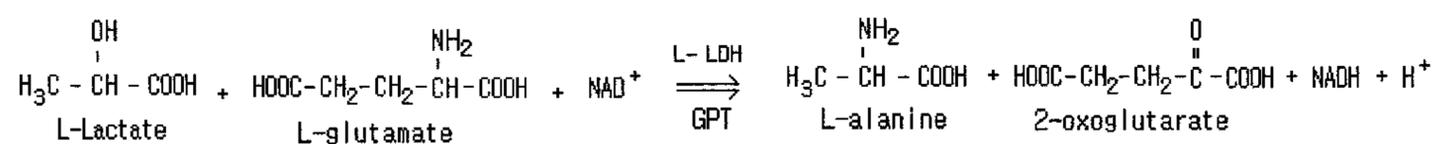


Fig. 26 Total reaction of L-lactate with L-LDH and GPT.

위의 반응식을 이용하여 L-lactate 농도에 따라 H^+ 농도를 충분히 얻을 수 있는 지에 관한 실험을 수행하였다. 먼저, L-LDH만을 사용하고 GPT의 반응을 사용하지 않은 실험과 GPT의 반응을 함께 사용한 반응과의 차이를 실험을 통해 분석하고, L-lactate의 농도별 pH의 변화를 분석한다. 반응식에 의하면 pyruvate를 제거하는

GPT의 반응에서는 수소이온의 농도 변화가 없기 때문에 pH 변화는 없다고 가정한다. 마지막으로 유산균 농도를 측정하기 위해 필요한 L-LDH의 양을 결정하기 위한 실험을 하였다.

L-lactate를 측정하기 위해 GPT와 L-glutamate를 이용했을 때, 반응의 양상을 알아보았다. 5개의 시험관에 L-LDH, L-glutamate, NAD, GPT를 각각 10mg, 20mg, 2mg, 10 μ l씩 넣고 3.996ml, 3.98ml, 3.96ml, 3.88ml, 3.8ml의 증류수와 함께 섞는다. 이때, 초기 pH를 측정하고 0.004ml, 0.02ml, 0.04ml, 0.12ml, 0.2ml의 L-lactate를 test tube에 떨어뜨림과 동시에 pH의 변화를 살펴본다. 이에 각 시료는 0.1%, 0.5%, 1%, 3%, 5%의 L-lactate 농도를 갖게 된다.

그림 27부터 31은 각각의 농도에서 효소가 유산과 반응했을 때의 pH 변화를 나타낸다. 각 그림에서 L-lactate의 순수한 농도는 유산의 농도가 높을수록 낮은 pH를 보임과 L-lactate와 효소의 반응에 의한 pH 변화를 뒷받침 한다. 유산의 농도가 높을수록 pH 변화가 크므로 효소반응을 통해 유산의 측정이 가능함을 알 수 있다.

GPT와 L-glutamate가 사용된 반응에서 각각의 L-lactate 농도에 따른 반응 결과를 비교하기 위해 그림 32에 정리하였다. 모든 실험에서 초기 pH에서 1분 이내로 최종 pH의 최소 95%에서 99%에 도달함을 알 수 있다. 이를 통해 L-LDH와 NAD를 이용하고 또한 역반응을 억제시키는 GPT와 L-glutamate를 이용하여 L-lactate를 측정이 가능함을 알 수 있다. 이로서 L-LDH를 이용하여 L-lactate를 측정할 수 있는 기반을 마련하였다고 할 수 있다.

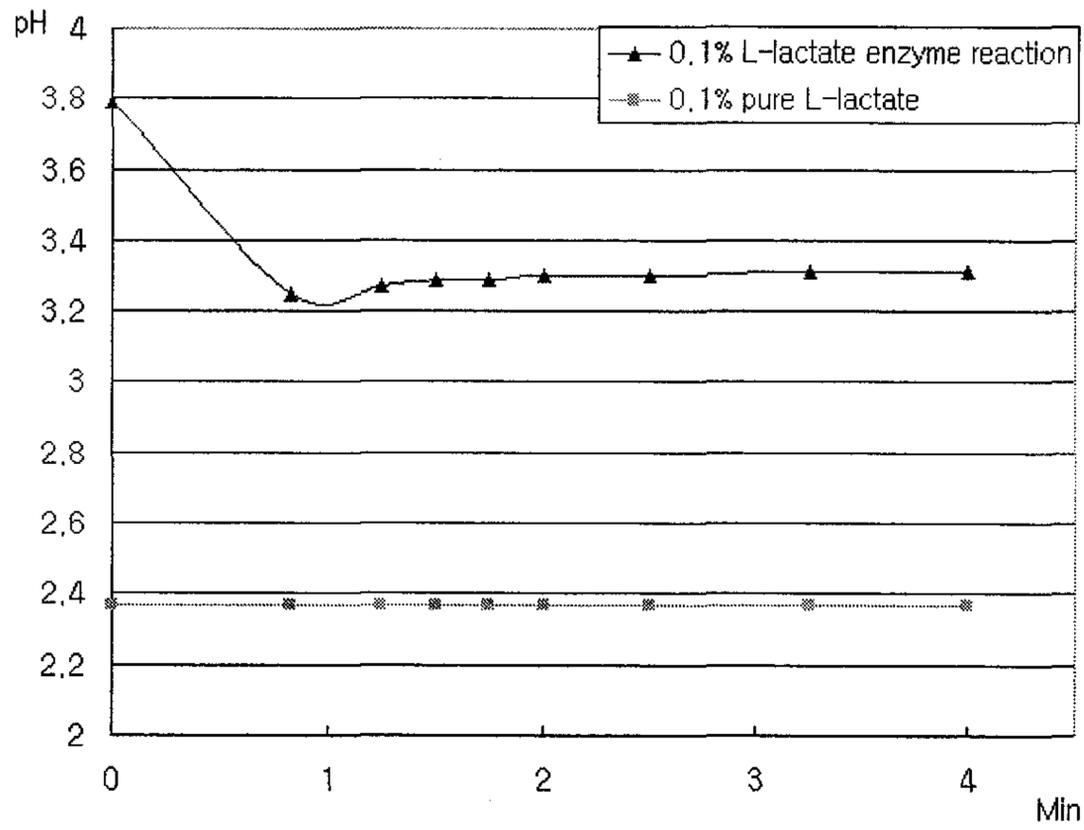


Fig. 27 Reaction of 0.1% L-lactate with L-LDH, NAD L-glutamate, GPT.

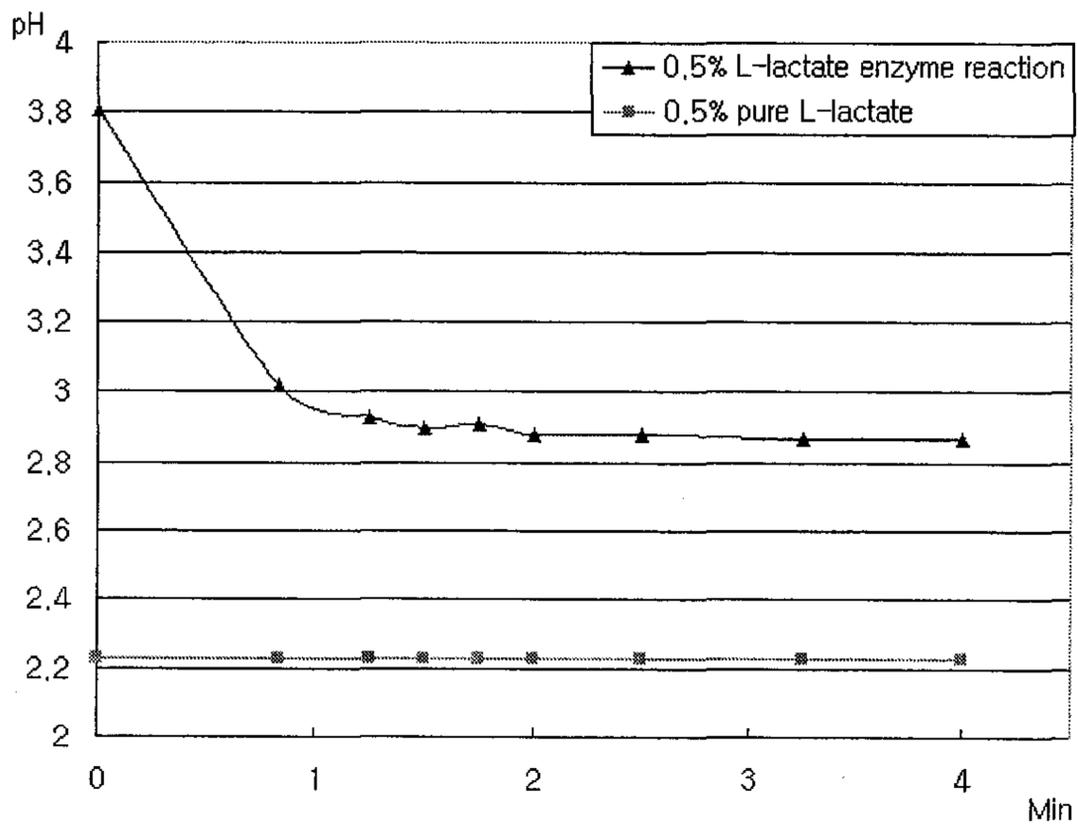


Fig. 28 Reaction of 0.5% L-lactate with L-LDH, NAD L-glutamate, GPT.

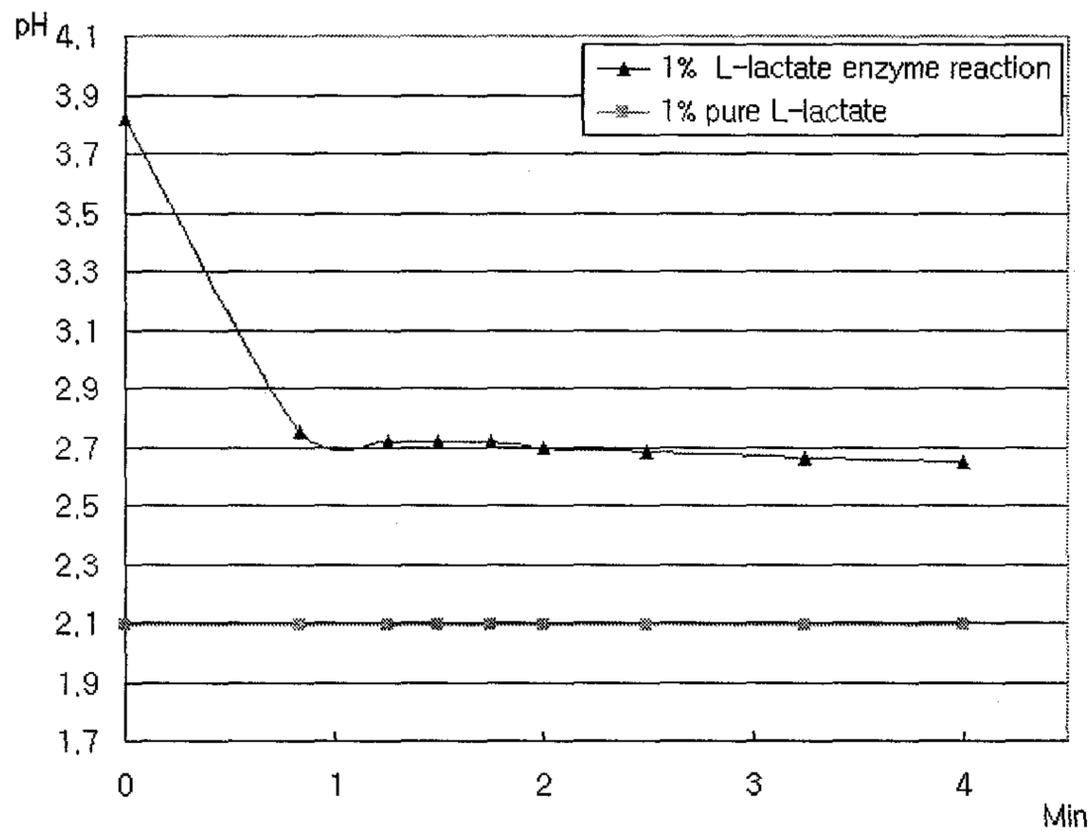


Fig. 29 Reaction of 1% L-lactate with L-LDH, NAD L-glutamate, GPT.

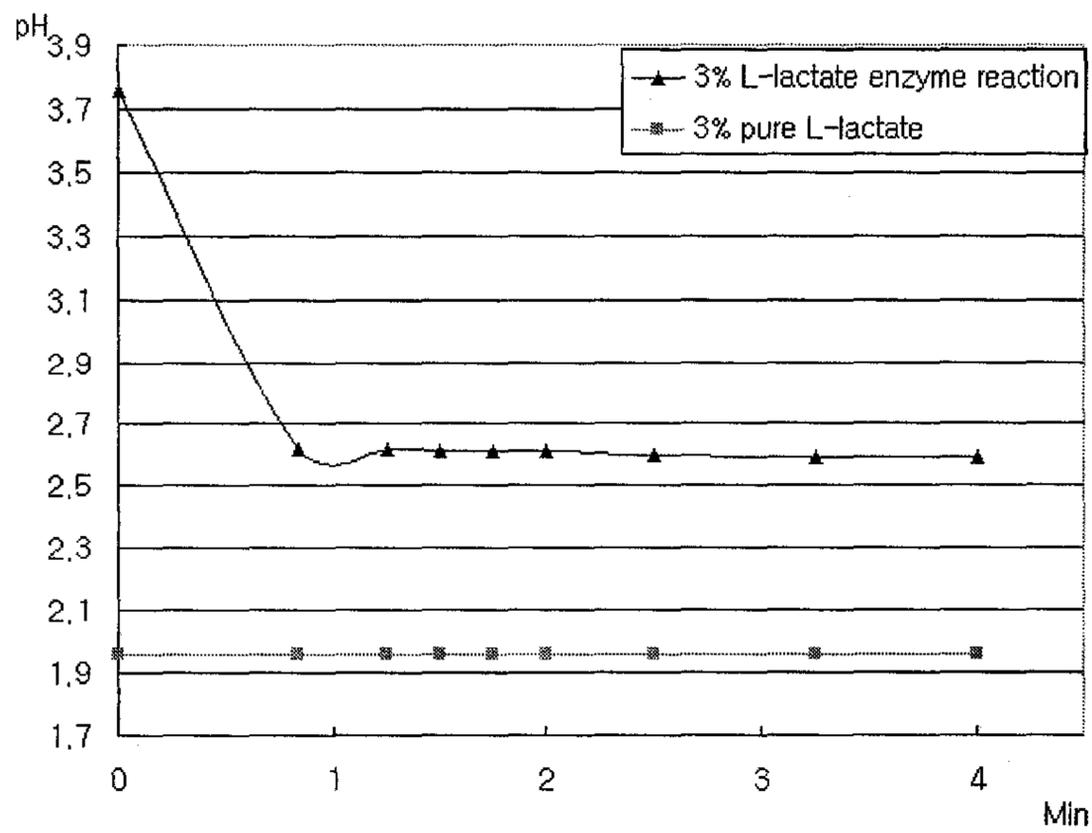


Fig. 30 Reaction of 3% L-lactate with L-LDH, NAD, L-glutamate, GPT.

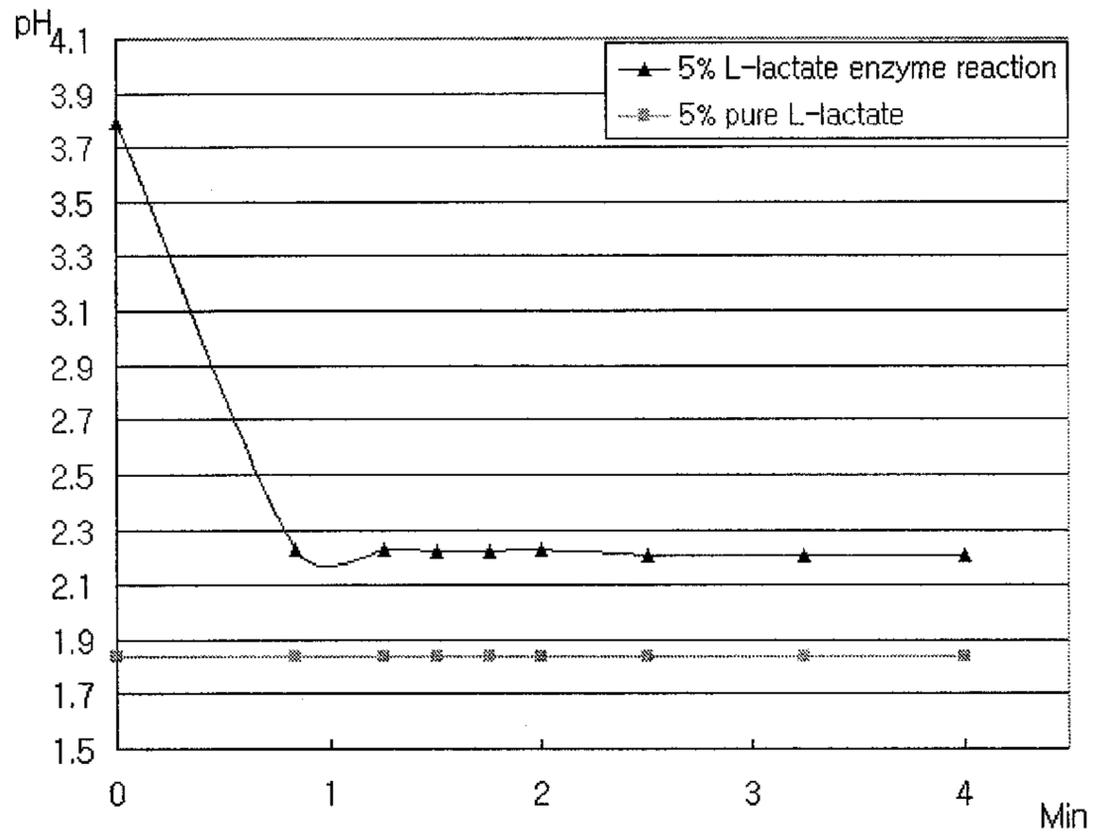


Fig. 31 Reaction of 5% L-lactate with L-LDH, NAD, L-glutamate, GPT.

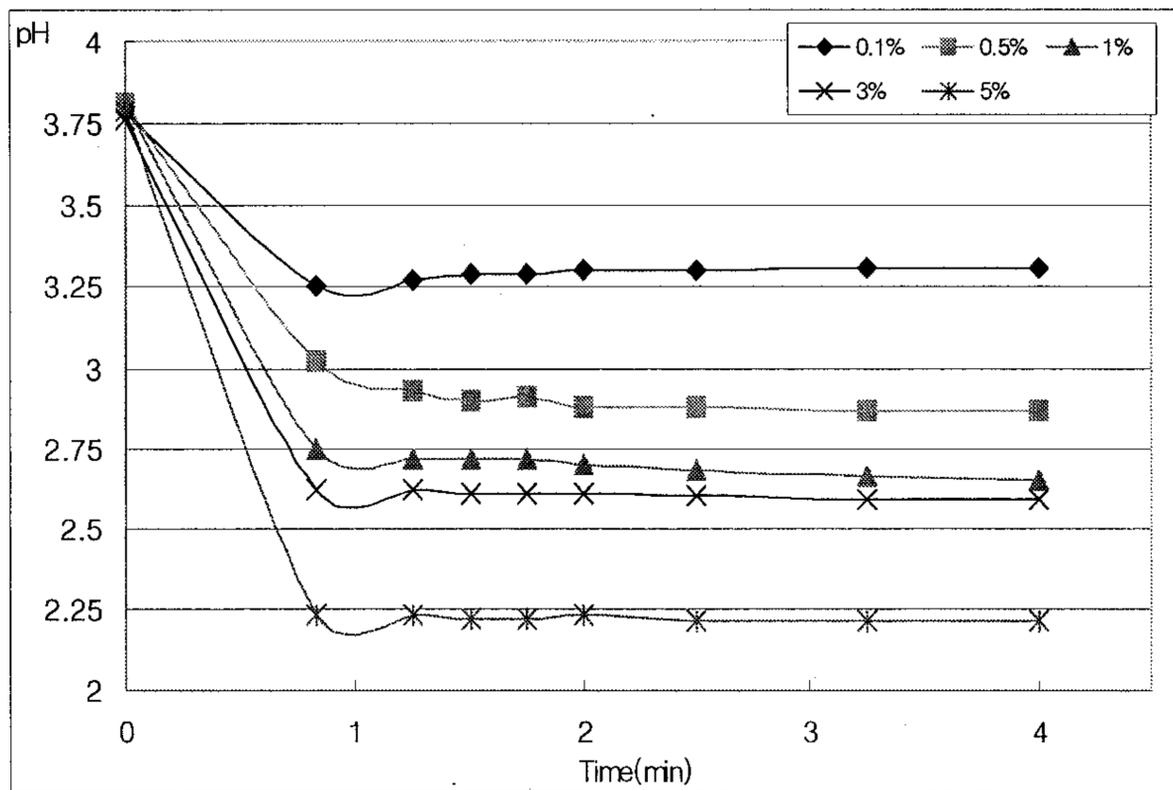


Fig. 32 Reaction curve on various concentration of L-lactate with L-LDH, NAD, L-glutamate, GPT.

그림 33은 효소 반응을 통해 유산의 농도를 측정하고자 할 때, 얼마만큼의 효소를 사용하는 것이 적당한지 알아보기 위해 수행된 실험의 결과이다. 5개의 test tube에 L-glutamate, NAD, GPT를 각각 20mg, 1mg, 10 μ l씩 준비하고, 효소량에 대한 변이를 주기 위해 L-LDH를 각각 0.1mg, 0.5mg, 1mg, 3mg, 5mg씩 넣고 990 μ l의 증류수와 함께 섞고 pH를 측정하였다. 10 μ l의 L-lactate를 떨어뜨림과 동시에 pH 변화를 살펴본다. 따라서 1%의 L-lactate를 기준으로 L-LDH를 측정하기 위해 가장 적절한 농도를 결정지을 수 있었다.

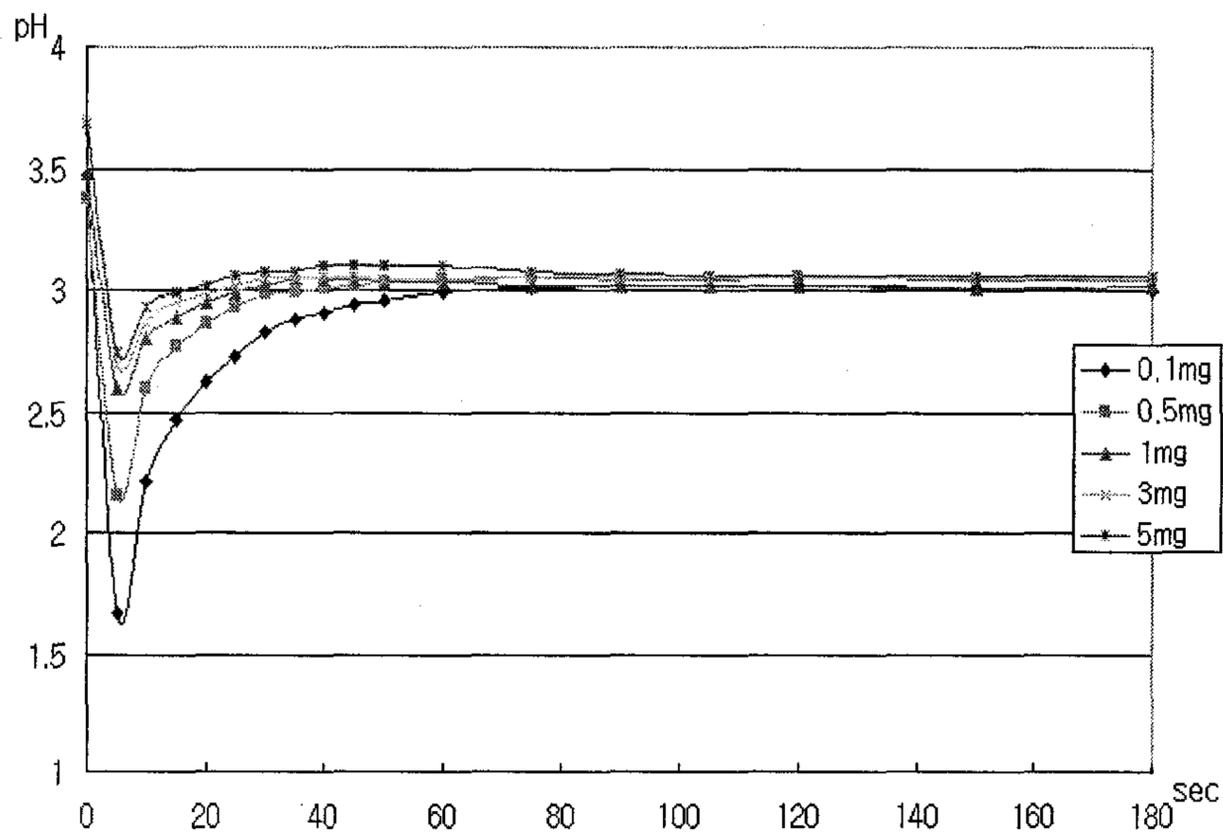


Fig. 33 pH changes trend with different enzyme concentrations on constant L-lactate concentration.

효소의 농도가 높을수록 빠른 반응을 보이며, 효소의 양이 0.1mg와 0.5mg일 때를 비교하면 0.1mg의 효소가 1%의 L-lactate와 반응하여 안정화 상태의 95%이내의 결과를 얻기까지 35초가 소요되고, 0.5mg의 경우에는 10초 정도 소요된다. 90%이내의 결과를 얻기까지는 효소량 0.1mg은 25초, 0.5mg은 5초미만으로 소요된다.

3. 효소 적정 사용량 결정

효소는 생물학적 촉매역할을 하지만 화학적 촉매와는 달리 비교적 값이 비싸다 따라서 그 사용량을 결정짓는 실험을 수행해야 한다. L-lactate dehydrogenase의 적정 사용량 결정을 위해 5ml의 2% L-lactate 용액을 만들기 위해 4.9ml 증류수에 L-LDH를 각각 0.05mg, 0.1mg, 0.2mg, 0.5mg, 1.0mg을 넣어준다. 이외의 효소 NAD, GPT 그리고 L-glutamate는 각각 0.1mg, 0.7mg, 11.8mg을 넣어준다. pH 전극을 혼합 용액에 담구고 신호를 받기 시작하면서 L-lactate를 0.1ml 넣어 반응을 시켰다. 그 결과를 그림 34에 나타내었다. 0.05부터 0.2mg의 반응은 농도가 높아질수록 반응 속도는 빨라졌으나 0.5mg이나 1.0mg은 반응 속도의 차이를 확인할 수 없었다. 따라서 L-lactate dehydrogenase의 사용량은 0.5mg으로 결정하였다.

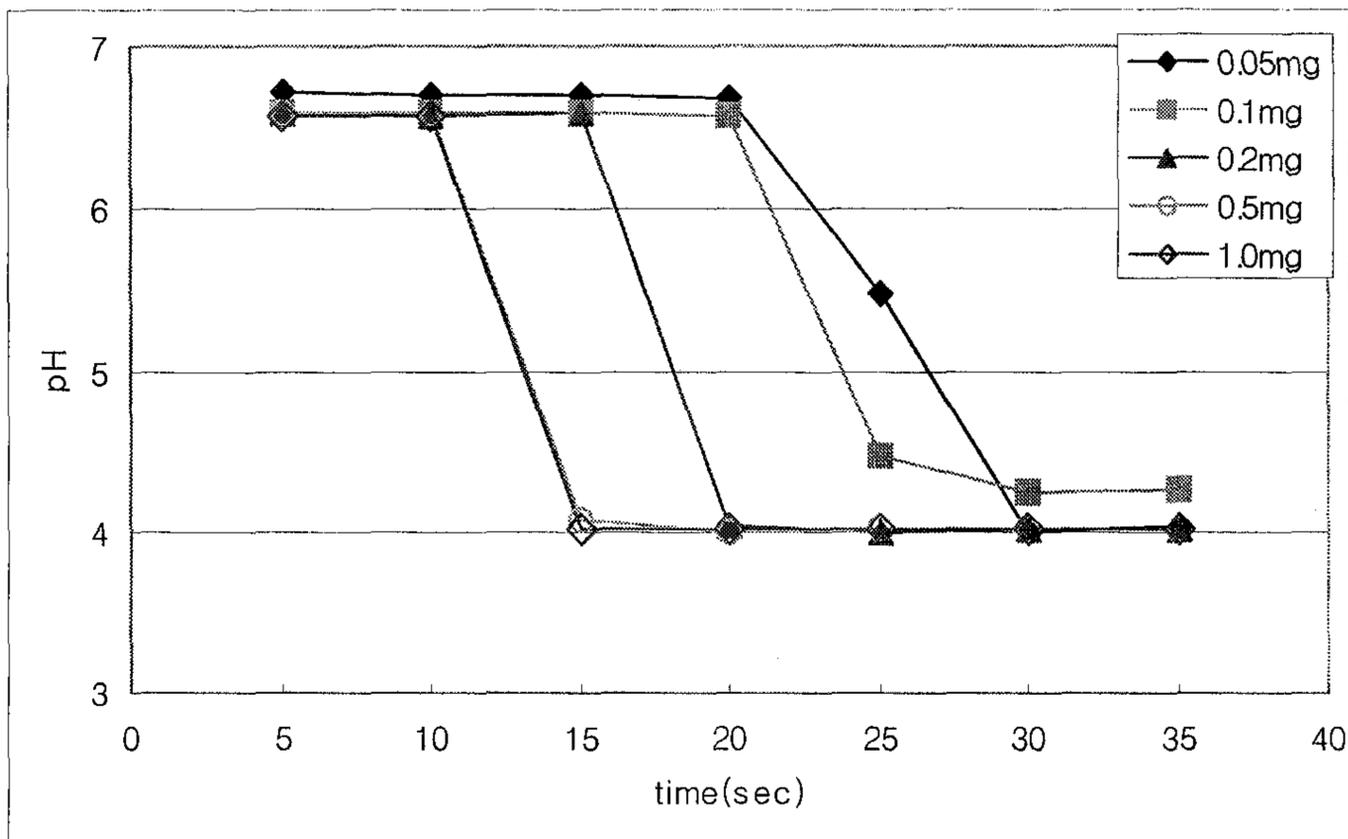


Fig. 34 L-LDH variable reaction on 2% L-lactate.

조효소 NAD의 사용량을 결정하기 위한 방법은 L-LDH의 적정량 사용법과 유사하다. 5ml의 2% L-lactate 용액을 만들기 위해 4.9ml 증류수에 NAD를 각각 0.01mg, 0.05mg, 0.1mg, 0.5mg, 1.0mg을 넣어준다. 이외의 효소 L-LDH, GPT 그리고 L-glutamate는 각각 1mg, 0.7mg, 11.8mg을 넣어준다. pH 전극을 혼합 용액에 담구고 신호를 받기 시작하면서 L-lactate를 0.1ml 넣어 반응을 시켰다. 그 결과를 그림 35에 나타내었다. 0.01부터 0.1mg의 반응은 농도가 높아질수록 반응 속도는 빨라졌으나 0.1부터 1.0mg은 반응 속도의 차이가 뚜렷하지 않았다. 하지만 NAD가 조효소라는 특성을 고려하여 1mg을 사용하기로 결정하였다.

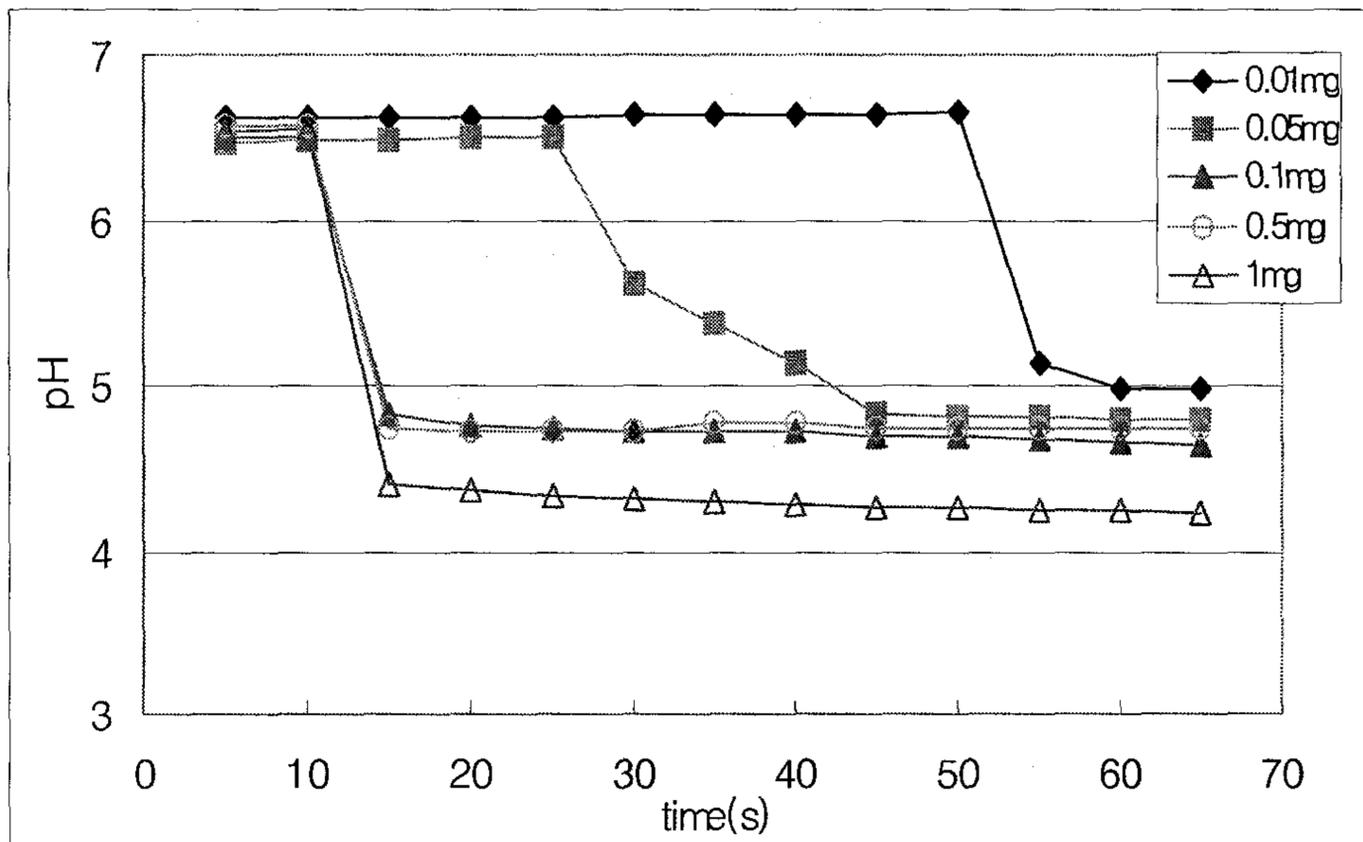


Fig. 35 NAD variable reaction on 2% L-lactate.

저해제 제거를 목적으로 사용된 GPT의 사용량 결정은 L-LDH의 적정량 사용법과 유사하다. 5ml의 2% L-lactate 용액을 만들기 위해 4.9ml 증류수에 GPT를 각각 0.1mg, 0.3mg, 0.7mg, 1.5mg을 넣어준다. 이외의 효소 L-LDH, NAD 그리고 L-glutamate는 각각 1mg, 1mg, 11.8mg을 넣어준다. pH 전극을 혼합 용액에 담구고 신호를 받기 시작하면서 L-lactate를 0.1ml 넣어 반응을 시켰다. 그 결과를 그림 36에 나타내었다. 0.1부터 0.7mg의 반응은 농도가 높아질수록 반응 속도는 빨라졌으나 0.7mg과 1.5mg의 반응은 그 차이가 크지 않았다. 따라서 GPT의 사용량은 0.7mg으로 결정하여 센서 개발에 적용하기로 하였다.

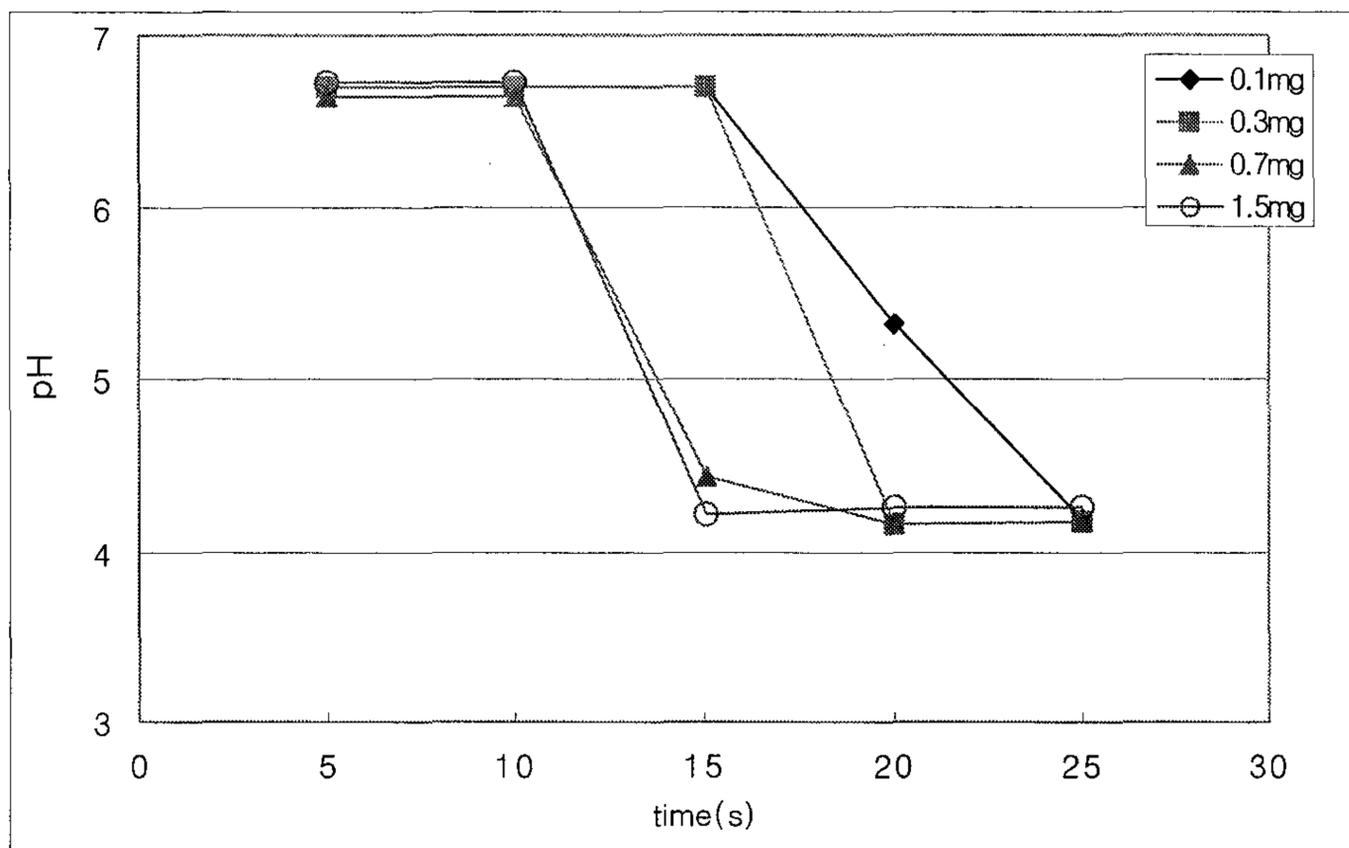


Fig. 36 GPT variable reaction on 2% L-lactate.

제 4 절 효소 고정법과 특성

1. 이론적 접근

효소 고정법에 따라 효소의 활성을 떨어트리기도 하고, 기질 특이성에 영향을 미쳐 원래의 효소 특성을 변화시킬 수 있으며, 효소와 기질 간의 결합력에 영향을 미쳐 반응속도에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 효소의 고정 방법은 센서 성능에 큰 영향을 미치는 요인이 되기 때문에 효소를 이용하는 바이오센서는 효소 고정법이 가장 중요한 문제라고 할 수 있다.

효소를 고정화하는 방법에는 공유결합법, 물리적 흡착법, 이온 결합법, 가교법, 포획법, 캡슐화 방법이 있다. 효소를 고정화하기 위해 이와 같은 방법을 사용할 때, 효소의 활성을 얼마나 유지시키는지, 기질 특이성을 잃지 않는지, 결합하는 담체와의 결합력은 약하지 않은지 등의 특성이 중요하다. 연구의 목적과 필요에 따라 효소의 재사용이 필요한 경우가 있다. 하지만 센서 개발에 있어서 효소는 그 활성이 어느 수준 이하로 떨어질 때까지 사용되며 이후에 효소의 기능을 사용하기 어렵기 때문에 재사용의 필요성은 중요하지 않은 요소라고 할 수도 있다. 그림 37은 일반적으로 효소를 고정시키는 방법을 도식화한 그림이다.

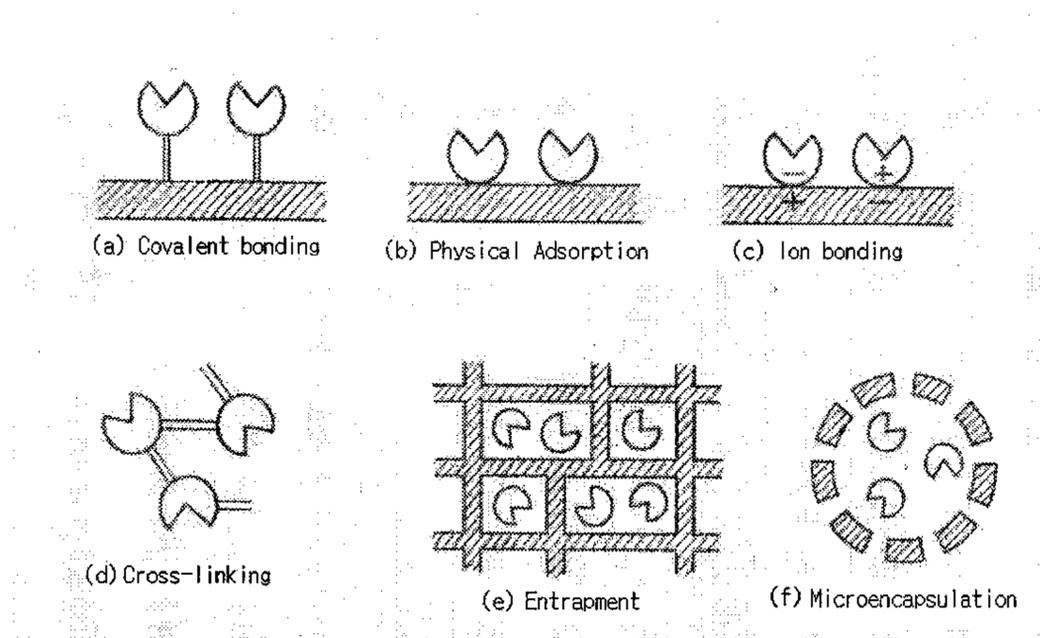


Fig. 37 Methods of immobilizing enzyme.

공유결합(covalent bonding)을 이용한 효소의 고정은 그 공정이 복잡하다. 화학적 결합 중에 강한 공유결합을 이루기 때문에 고정율은 좋으나 효소가 특정 물질과 반응하는 반응부(binding site)의 보존이 해결하기 어려운 문제이다. 공유결합이 효소의 반응부에 형성될 경우, 효소는 원래의 특이성을 잃어버리기 쉽기 때문이다.

물리적 흡착(physical adsorption)은 흡착 공정이 매우 간단하고 효소의 활성과 특이적 반응을 유지할 수 있지만 고정율이 매우 낮다. 따라서 물리적 흡착의 경우 단순한 실험에서 사용될 뿐, 센서 개발에는 용이하지 않은 고정법이다.

이온 결합법(ion bonding)은 화학적으로 공정이 간단하고, 효소의 특이성, 활성에 영향을 미치지 않고, 효소의 재사용이 가능한 방법이지만 물리적인 성질에서 센서 개발에 유용하지 않은 방법이다.

가교법(cross linking)은 공정 자체가 까다롭고 효소의 특이성에 변화를 초래하며 활성에 영향을 미친다. 이 또한 효소의 반응부에 화학적 링커가 존재하게 되면 활성도가 변하게 되며 화학적 결합이기 때문에 효소 단백질의 3차원 구조에 영향을 미치기 때문이다.

포획법(entrapment)은 효소의 활성과 특이성 유지가 가능하고 효소의 고정력이 강하다. 일반적인 경우에 그 공정이 복잡하지만 고분자 물질의 합성과정에서 효소를 포획시킴으로 간단한 고정이 가능한 방법이다.

캡슐화(micro encapsulation) 방법은 캡슐 내에 효소를 고정하는 방법으로 공정이 복잡하다는 단점이 있다. 그러나 효소에 어떠한 화학적 처리가 가해지지 않기 때문에 효소의 활성이나 특성 변화가 생기지 않는다. 효소가 캡슐로 인해 외부와 차단되며 저분자량 반응물질이 캡슐을 투과하여 효소와 반응하게 된다. 위의 효소 고정법에 따른 특성을 표 6에 정리하였다.

Table 6 Characteristic of immobilizing enzyme.

| Specification | Covalent bonding | Physical adsorption | Ion bonding | Cross linking | Entrapment | Micro encapsulation |
|----------------------|------------------|---------------------|-------------|---------------|------------|---------------------|
| Process | Difficult | Easy | Easy | Difficult | Difficult | Difficult |
| Enzyme activity | High | Low | High | Moderate | High | High |
| Specificity | Change | Preserve | Preserve | Change | Preserve | Preserve |
| Coherence | Strong | Weak | Moderate | Strong | Strong | Strong |
| Re-use | Unable | Able | Able | Unable | Unable | Unable |
| Immobilization price | Moderate | Low | Low | Moderate | Low | Low |

2. Polyacrylamide gel 성형법

Polyacrylamide는 acrylamide와 N,N'-methylene-bis-acrylamide(MBA)로 구성된 고분자 중합체이다. 물에 녹은 각각의 단량체를 중합시켜 gel 형태의 구조를 얻을 수 있다. 효소를 고정하는 방법 중에 포획법의 하나라고 할 수 있다. 포획법의 일반적인 특성 중에 효소의 활성을 유지할 수 있고, 특이성이 보존된다는 점과 효소를 고정하고 있는 지지체의 결합력이 강하다는 점 때문에 효소의 손실을 줄일 수 있다는 장점을 가지고 있다. 단점으로 지적되는 공정의 복잡성에 대해서 polyacrylamide gel은 효소가 섞여있는 각각의 구성 화학물을 비율별로 반응시켜 중합반응만 유도하면 되는 비교적 간단한 공정을 가지고 있기 때문에 단점의 보완이 가능한 공정이라고 할 수 있다. Acrylamide와 MBA의 비율에 따라 gel 구조 내부 크기도 조절이 가능한 물질로 알려져 있다. 따라서 효소를 고정하는 물질로 사용하기에 유용한 물질이라고 할 수 있다. 따라서 바이오센서를 개발하는데 있어서도 이용 사례와 유용성은 잘 알려져 있다. 단백질의 분자량에 따른 동정 분석을 할 때 사용되기도 하는 고분자 물질이다. 그림 38은 각 물질의 화학 구조를 나타낸다.

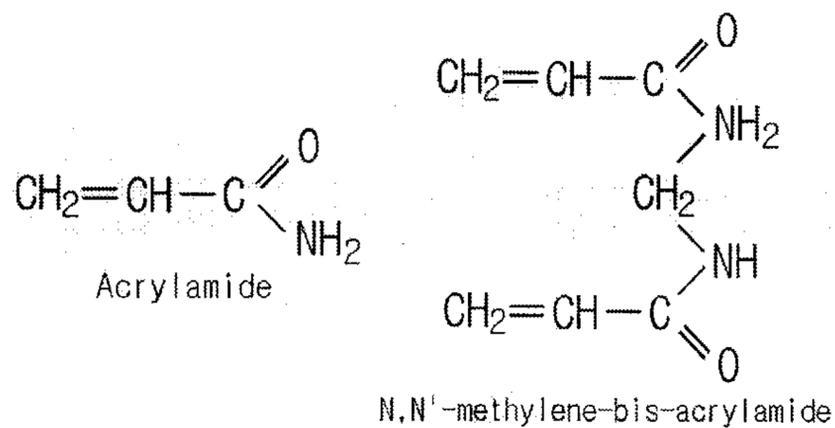


Fig. 38 Chemical structure of acrylamide and N,N'-methylene-bis-acrylamide.

그림 39는 acrylamide와 MBA가 중합되는 화학식과 최종적으로 gel 형태를 갖추었을 때의 구조를 나타낸다. 반응 이후 구조에서 사각형으로 표시한 부분이 acrylamide와 MBA의 각 부분으로 결합된 형태를 보여준다.

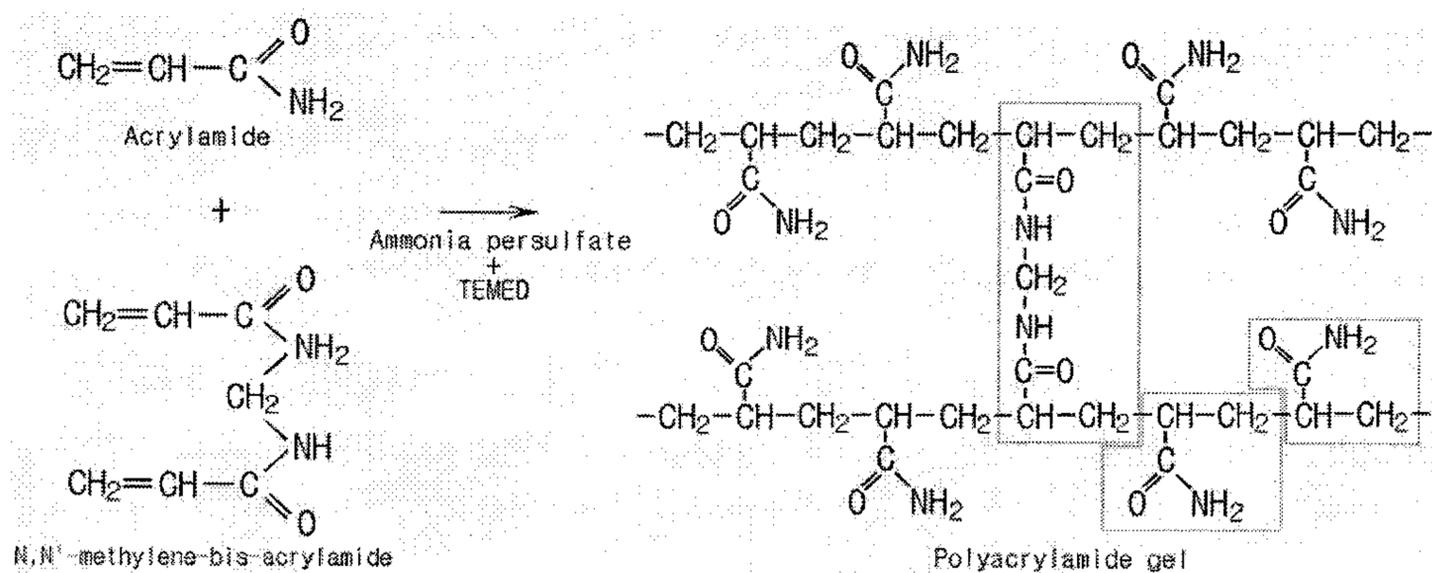


Fig. 39 Polymerization reaction of polyacrylamide gel.

그림 39에서 반응에 이용된 ammonium persulfate와 N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine (TEMED)는 acrylamide와 MBA가 골자를 이루는 중합체를 이루기 위한 촉매 및 반응을 시작시키는 역할(initiator)을 하는 물질이다. 이와 같이 polyacrylamide gel 성형에는 4가지 화학물이 사용되는데 반응에 사용되는 물질들의 비율에 따라 조성이 다르기 때문에 이들 비율에 따른 중합 실험을 수행하였다.

Acrylamide와 MBA의 비율을 조절하고 ammonium persulfate와 TEMED 용액 농도를 일정하게 유지하면서 중합체의 성질을 분석하고자 하였다. Acrylamide의 농도는 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 그리고 MBA의 농도는 0.4%, 0.8%, 1.2%, 1.6%, 2.0%로 준비하여 각각 300 μ l와 600 μ l를 반응 튜브에 섞어준다. 그리고 ammonium persulfate와 TEMED 2% 용액을 각각 50 μ l씩 섞어 총 1ml의 중합을 시켰다. 표 7은 반응시킨 용액의 비율과 그 결과를 연결 짓는 시료 번호를 나타낸다. 시료 번호는 중합 결과와 연결되는 실험 번호이다.

Table 7 Reaction ratio of Acrylamide and N,N'-methylene-bis-acrylamide and test file number.

| Acryl MBA | 5% | 10% | 15% | 20% | 25% |
|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0.4% | 1_1 | 2_1 | 3_1 | 4_1 | 5_1 |
| 0.8% | 1_2 | 2_2 | 3_2 | 4_2 | 5_2 |
| 1.2% | 1_3 | 2_3 | 3_3 | 4_3 | 5_3 |
| 1.6% | 1_4 | 2_4 | 3_4 | 4_4 | 5_4 |
| 2.0% | 1_5 | 2_5 | 3_5 | 4_5 | 5_5 |

그림 40은 위의 조건에서 중합 실험을 한 결과의 사진이다. 각 사진의 왼쪽부터 오른쪽으로 갈수록 MBA의 농도가 0.4%에서 2.0%로 변이를 준 결과이다. 그림 (a)부터 (e)까지의 중합 결과는 MBA의 농도가 높아질수록 탁도가 증가한 중합체의 모습을 나타내었다. 중합이 이루어진 이후 각 중합체 시료 상층부에 액상이 떠있는 것을 확인할 수 있는데, 이는 acrylamide와 MBA의 농도별 용액을 제조할 때 사용되었던 물이 gel이 성형되고 나서 gel 내에 포화를 이룬 나머지가 상층에 남은 것으로 판단되었다.

그림 (a)는 실험 번호 1_1부터 1_5까지의 결과로서 acrylamide를 5%로 고정시키고 MBA 농도에 변화를 주면서 반응하였던 실험이다. (a) 이외의 다른 시료와 마찬가지로 투명도나 탁도가 비슷한 결과를 보였으나 그 물성은 그렇지 않았다. 이는 그림 41의 각각의 시료 사진으로부터 설명이 가능하다. 5%의 acrylamide 용액으로 만들어진 1_1부터 1_3은 중합이 됐다고 할 수 없는 액상을 보였고, 1_4와 1_5의 경우에는 일부 중합이 되었으나, 용기의 형태에 따라 외형적 구조가 변할 정도의 강도가 없는 물성을 보였다. 따라서 효소를 고정하기에 그 물성이 흐물흐물하고 gel 자체의 파쇄가 일어남으로 인해 사용이 불가능하다는 결론을 내렸다.

그림 42는 각 사진의 왼쪽부터 오른쪽으로 갈수록 acrylamide의 농도가 5%에서 25%로 변이를 그리고 각 사진 (a)부터 (e)까지는 MBA의 농도가 0.4%에서 2.0%로 섞인 실험군의 사진이다. 각 (a)부터 (e)까지 탁도가 점점 증가하는 것을 알 수 있다. 실험에서 전반적으로 탁도가 증가할수록 물성이 부드럽고 약한 특성을 보인 반면, 투명한 중합이 이루어진 경우에는 비교적 딱딱하고 강한 특성을 보였다.

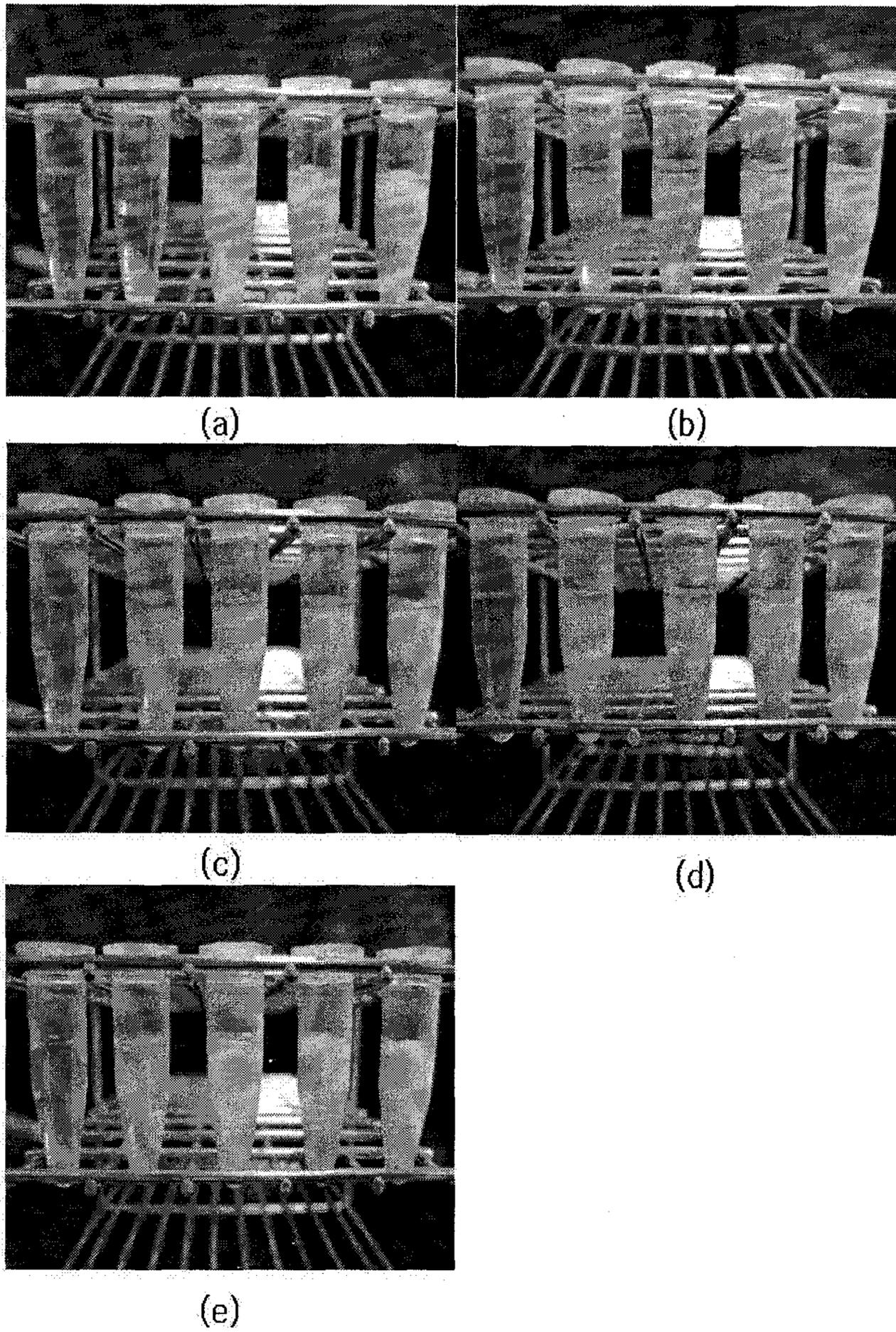
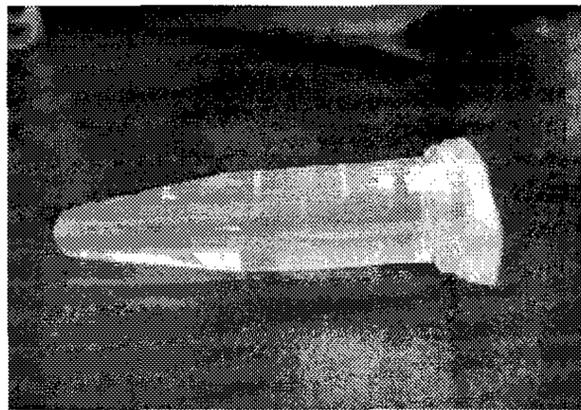
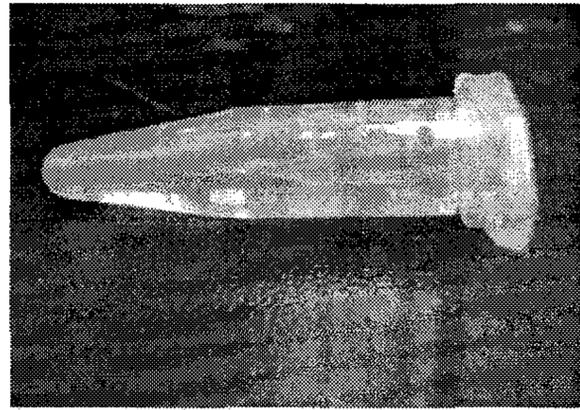


Fig. 40 Polymerized images polyacrylamide gel with (a) 5%, (b) 10%, (c) 15%, (d) 20%, (e) 25% of acrylamide and 0.4%, 0.8%, 1.2%, 1.6%, 2.0% of N,N'-methylene-bis-acrylamide, each.



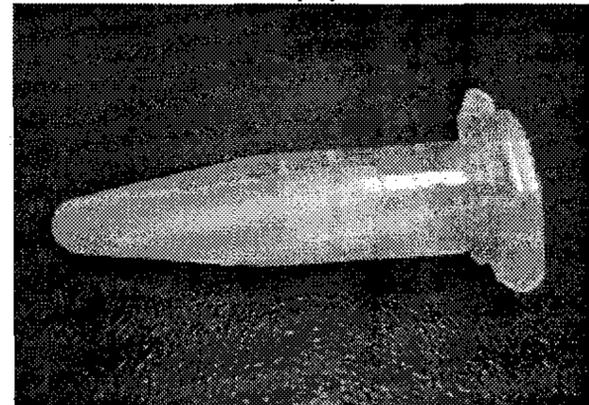
(a)



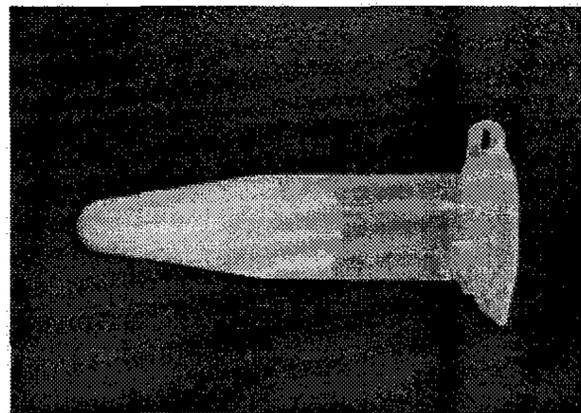
(b)



(c)



(d)



(e)

Fig. 41 Polymerized images of sample number 1_1 to 1_5.

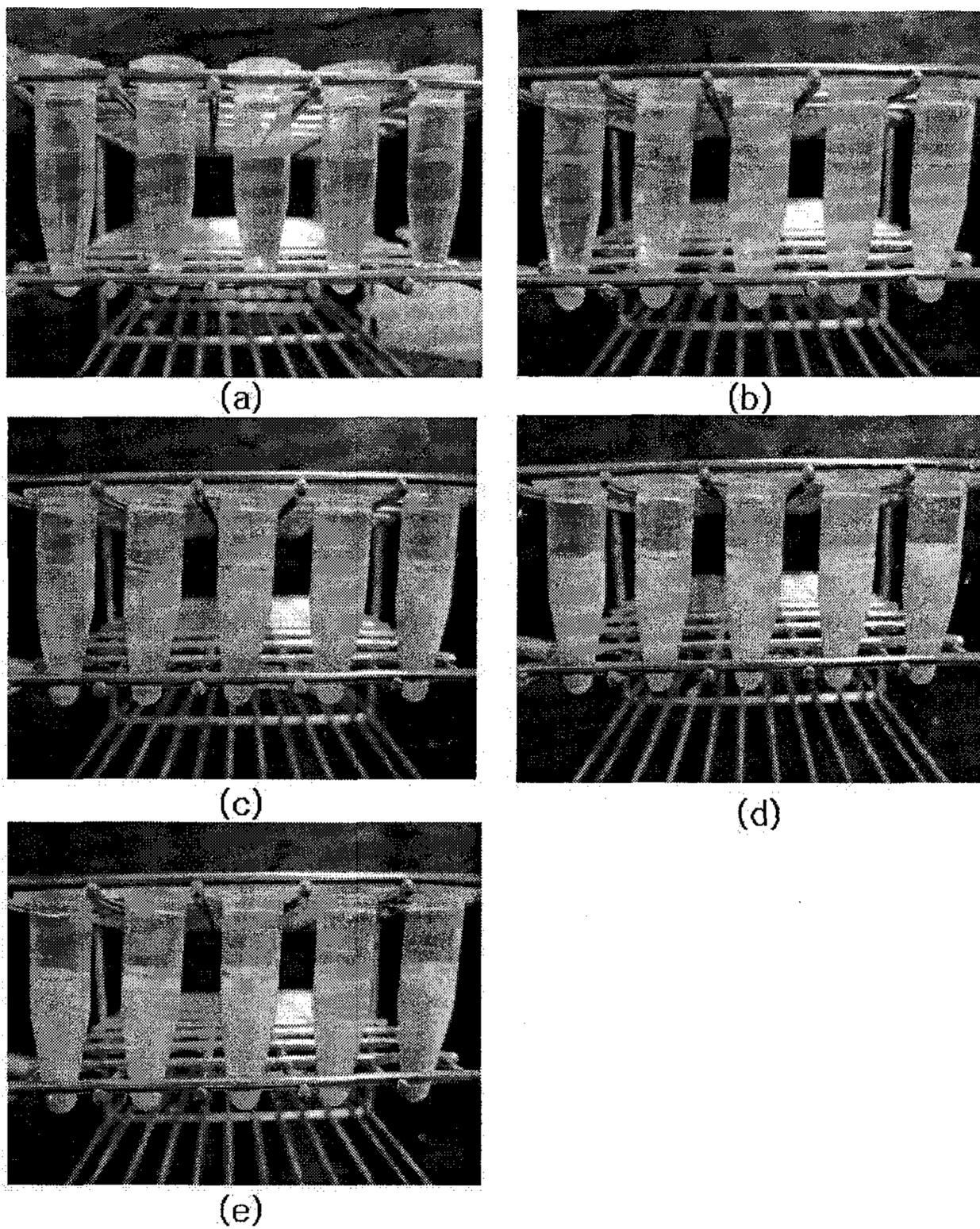


Fig. 42 Polymerized images polyacrylamide gel with (a) 0.4%, (b) 0.8%, (c) 1.2%, (d) 1.6%, (e) 2.0% of N,N'-methylene-bis-acrylamide and 5%, 10%, 15%, 20%, 25% of acrylamide, each.

촉매의 역할과 중합 반응의 초기 기폭제 역할을 하는 ammonium persulfate와 TEMED의 농도 변이에 따른 중합반응의 결과를 알아보기 위해 10%의 acrylamide 300 μ l와 1.2%의 N,N'-methylene-bis-acrylamide 600 μ l에 표 8과 같은 조합으로 중합 실험을 수행하였다.

Table 8 Reaction ratio of Acrylamide and N,N'-methylene-bis-acrylamide and test file number.

| TEMED Ammonium | 0.5% | 1.0% | 1.5% | 2.0% | 5.0% |
|-------------------|------|------|------|------|------|
| 0.5% | 1-1 | 1-2 | 1-3 | 1-4 | 1-5 |
| 1.0% | 2-1 | 2-2 | 2-3 | 2-4 | 2-5 |
| 1.5% | 3-1 | 3-2 | 3-3 | 3-4 | 3-5 |
| 2.0% | 4-1 | 4-2 | 4-3 | 4-4 | 4-5 |

그림 43은 위의 농도 조건으로 polyacrylamide gel을 중합시킨 사진이다. (a) 사진은 ammonium persulfate의 농도를 0.5%, (b)는 1.0%, (c)는 1.5%, (d)는 2.0%로 고정시키고 TEMED의 농도에 변화를 주어 중합시킨 결과이다. 실험 결과 acrylamide와 MBA의 농도가 동일한 조건에서 ammonium persulfate와 TEMED의 농도 변화에 따라서도 중합률이 달라짐을 알 수 있었다. 성형된 gel 상부에 있는 액상의 부피를 확인했을 때, 1-1 시료는 50%가량 액상으로 남아있었고, TEMED의 농도가 높아질수록 잔존하는 액상의 양이 줄어드는 것을 확인하였다.

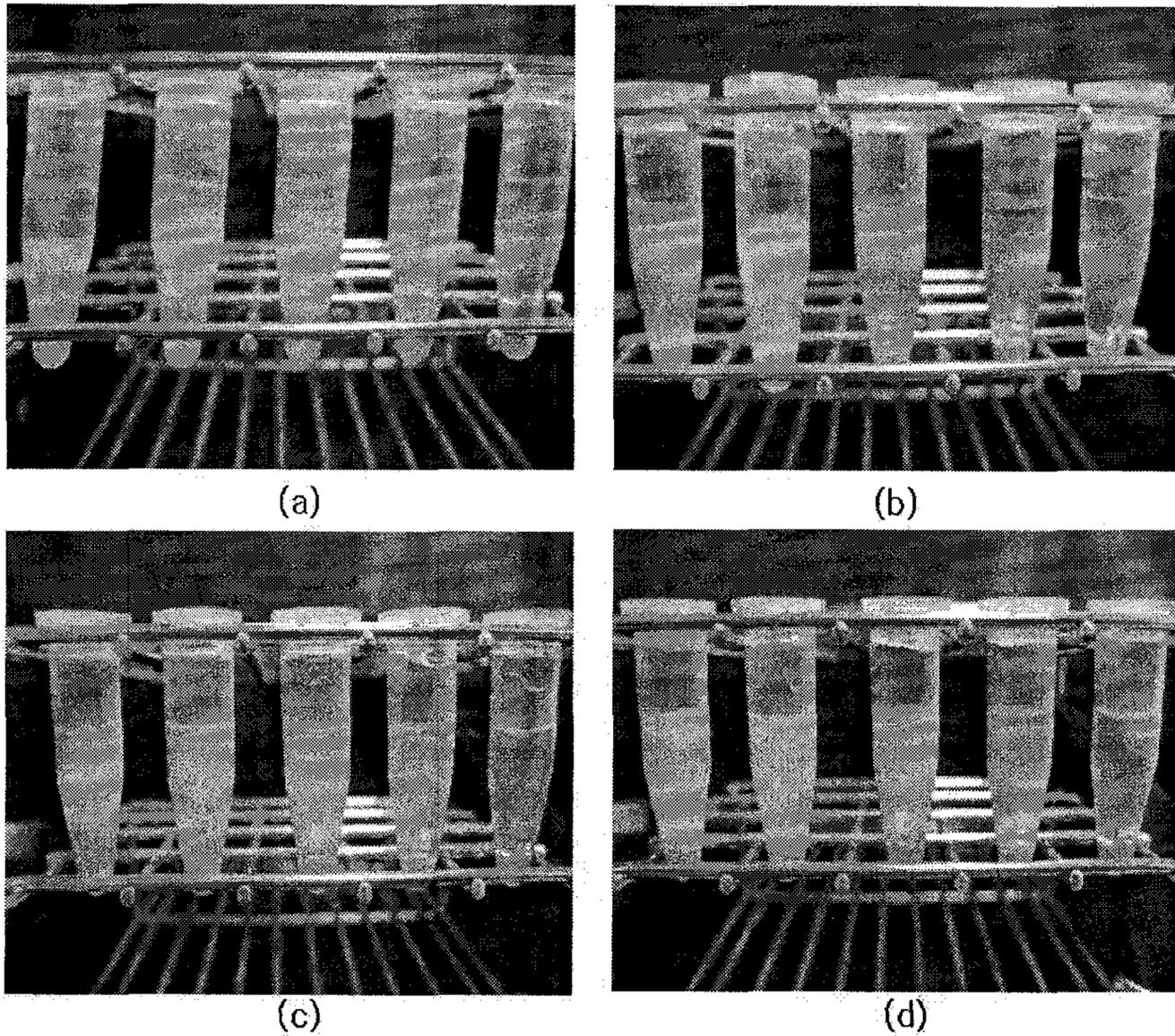


Fig. 43 Polymerized images polyacrylamide gel with (a) 0.5%, (b) 1.0%, (c) 1.5%, (d) 2.0% of ammonium persulfate and 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 5.0% of N,N,N',N'-tetra methylethylenediamine, each.

Ammonium persulfate와 TEMED의 농도에 따른 중합률에 대한 결과를 그림 44에 정리하였다. ammonium persulfate의 농도가 높아질수록, 그리고 TEMED의 농도가 높을수록 1ml의 중합체를 만들려고 했을 때, 원하는 부피의 중합체를 얻을 수 있었다. 하지만, 두 물질의 농도가 2% 이상일 경우에는 중합의 정도에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되어 센서 개발에서 polyacrylamide gel을 성형하여 효소를 고정할 때, ammonium persulfate와 TEMED의 농도를 결정할 수 있었다.

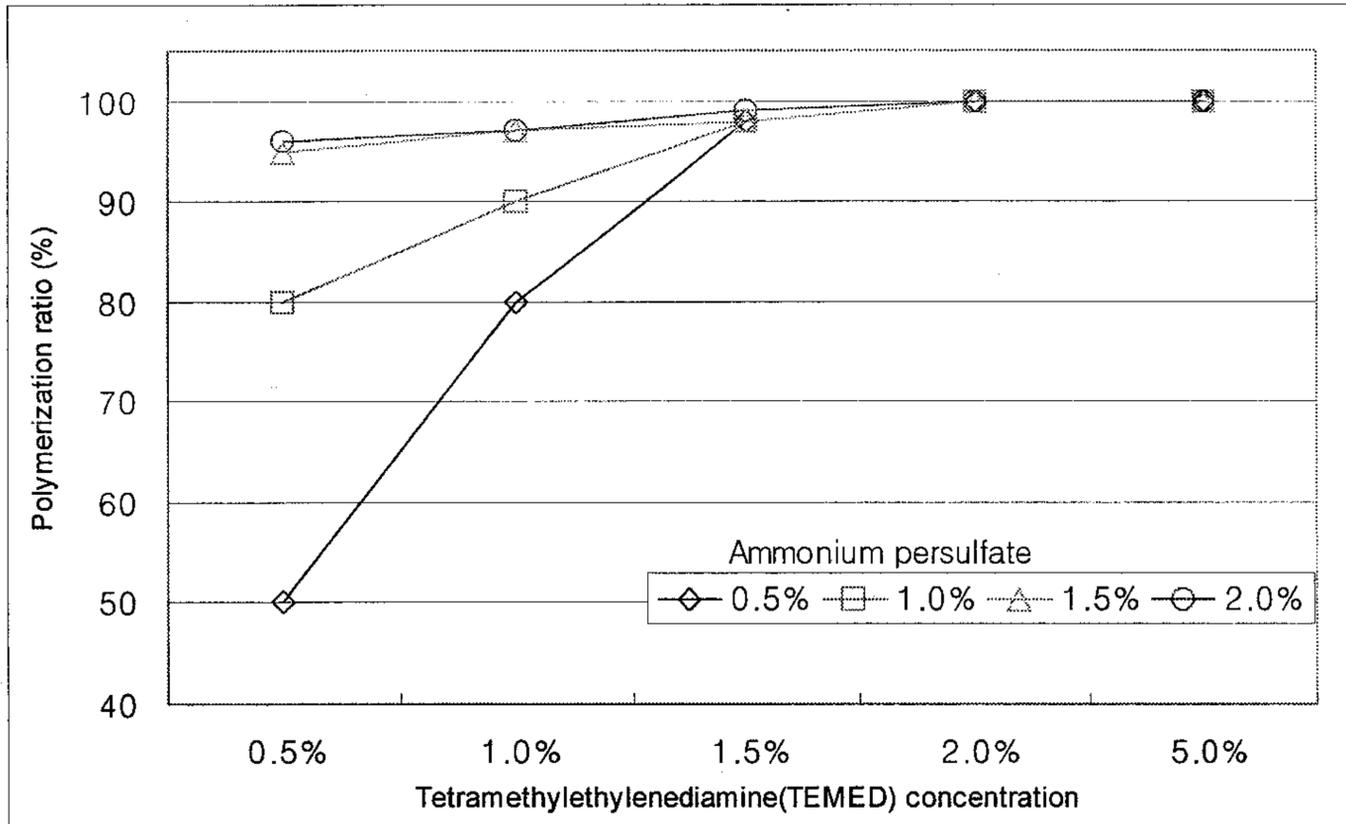


Fig. 44 Polymerized ratio depending on ammonium persulfate and N,N,N',N'-tetra methylethylenediamine.

실험에서 전반적으로 탁도가 증가할수록 물성이 부드럽고 약한 특성을 보인 반면, 투명한 중합이 이루어진 경우에는 비교적 딱딱하고 강한 특성을 보였다. 두 물질별 그리고 촉매와 반응을 시작시키는 역할의 물질들의 비율에 따라 각각의 물리적 특성을 고려하였다. 그러나 센서 개발에 있어서 물리적인 특성보다 효소의 고정율 그리고 효소의 활성도 유지가 가능한 지지체의 조성을 찾는 것이 중요하기 때문에 고정된 효소의 활성도 측정을 통해 polyacrylamide 성형에 최적 비율을 찾고자 하였다.

3. Polyacrylamide gel에 효소 고정과 효소 활성도의 관계

물리적 특성으로 acrylamide와 MBA의 효소 고정 가능성에 대해 실험을 수행했다. 그러나 효소를 고정했을 때 polyacrylamide gel의 효소 고정율 그리고 효소의 활성도를 기준으로 gel 성형에 이용될 두 화학물질의 비율을 결정해야 할 것으로 판단되었다. 따라서 지지체 성형에 필요한 물질의 비율별로 효소를 고정시켰을 때

L-lactate dehydrogenase의 활성도 변화를 측정하여 polyacrylamide gel에 필요한 최적의 acrylamide와 MBA의 비율을 결정하기로 하였다.

MBA(N,N'-methylene-bis-acrylamide)의 농도를 0.8%, 600 μ l로 고정시키고, 300 μ l acrylamide의 농도를 5%, 10%, 15%, 20%, 25%로 변화시키면서 L-lactate dehydrogenase, NAD(Nicotinamide adenine dinucleotide), L-glutamate, glutamate-pyruvate transaminase를 넣어주고 2% ammonium persulfate 50 μ l와 2% N,N,N',N'-tetra methylethylenediamine 50 μ l를 넣어주고 gel을 성형시켰다. 또한, MBA 농도 변이에 따른 고정 효소의 활성을 측정하기 위해 20%의 acrylamide 300 μ l로 고정시키고 600 μ l MBA의 농도를 0.4%, 0.8%, 1.2%, 1.6%, 2.0%로 변화시키면서 효소와 ammonium persulfate와 TEMED를 정해진 농도로 넣어 총 10개의 효소가 고정된 polyacrylamide gel 시료를 만들었다.

성형된 gel 부위를 분쇄기로 분쇄시킴으로서 gel 성분을 분해시켜 효소반응을 시켜 효소의 활성을 측정하였다. 이는 성형된 gel 상태에서 효소의 활성을 측정하기가 방법상 어렵기 때문이다. Polyacrylamide gel에 성형시켰던 효소의 활성도를 비교하기 위해 고정시키지 않았던 효소의 활성을 측정하여 이를 기준으로 고정시켰던 효소의 활성도를 나타내었다.

효소의 활성은 Michaelis-Menten가 제시한 효소가 시간에 따라 생성하는 생성물의 농도 혹은 소모되는 기질의 농도를 시간에 따라 측정하여 나타낸다. L-lactate dehydrogenase가 활성을 나타내도록 2%의 L-lactate 농도에 gel을 분쇄하여 얻은 용액을 넣어 효소가 반응하도록 한 이후, trichloroacetic acid(TCA)를 이용하여 효소 활성을 제거한 이후에 L-lactate 농도를 측정하였다. 그림 45와 46은 각각 acrylamide와 MBA 농도에 따라 보이는 효소의 활성을 고정화하지 않은 효소의 활성을 기준으로 활성을 나타낸 결과이다. 그 결과 acrylamide 20%와 MBA 1.2%의 조건에서 효소의 활성 및 고정율이 높다는 것을 알 수 있었다. 따라서 센서 개발에 이용될 이들의 농도 조건은 결정이 됐다고 할 수 있다.

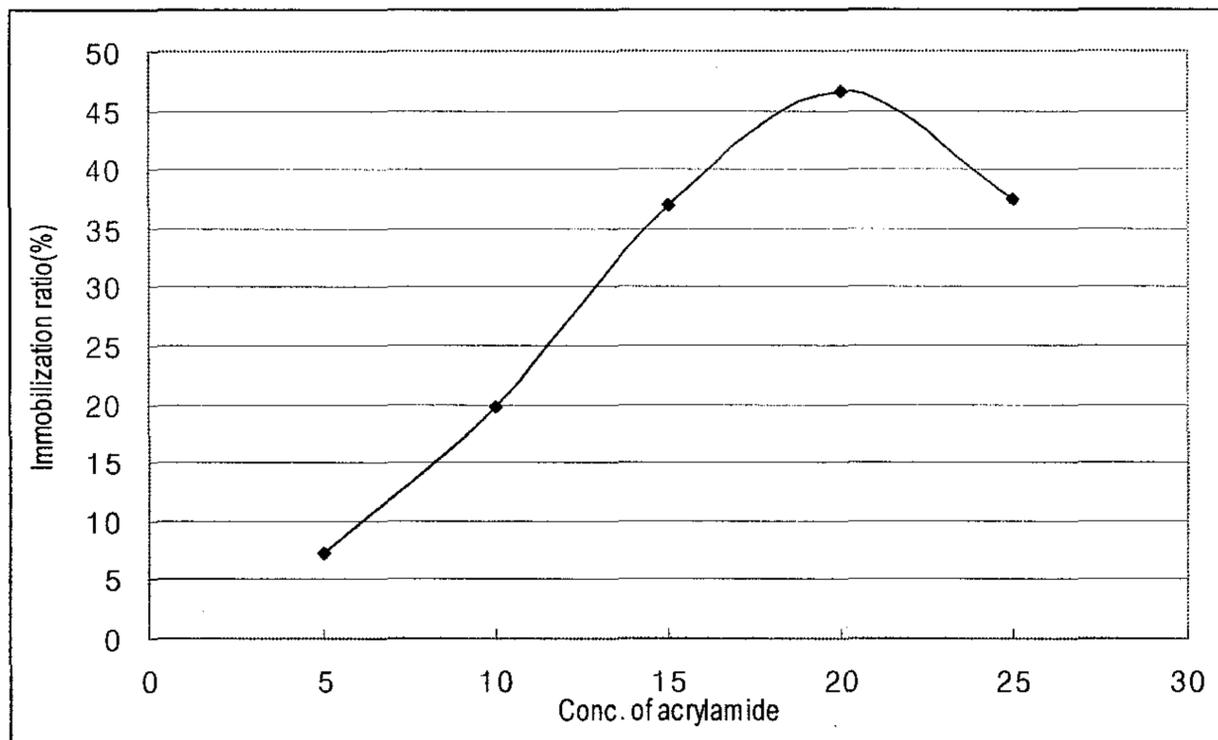


Fig. 45 Enzyme immobilized ratio on acrylamide concentration.

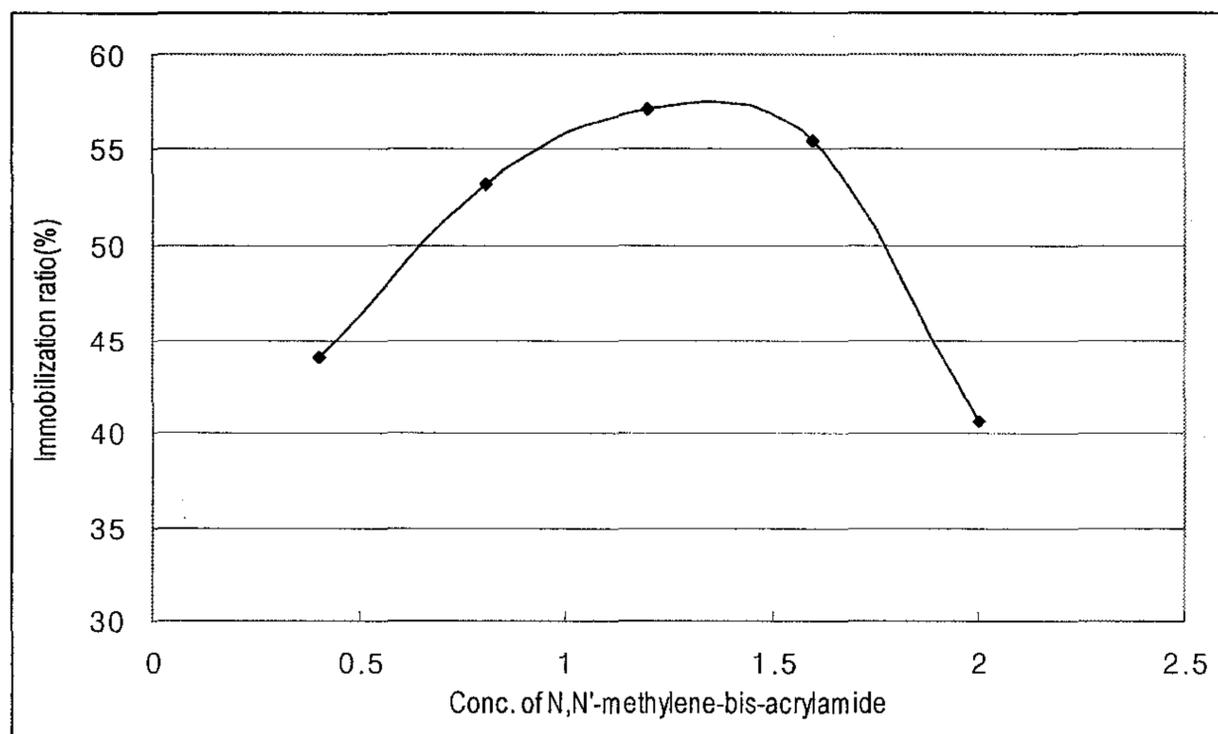


Fig. 46 Enzyme immobilized ratio on N,N'-methylene-bis-acrylamide concentration.

제 5 절 고정화 효소를 이용한 센서 개발 및 성능평가

1. 데이터 수신 및 저장부 개발

전극으로부터 생성되는 신호를 저장하고, 노이즈를 제거하기 위해 완충 회로를 구성하였다. 완충회로는 전극부에서 생성될 수 있는 높은 임피던스의 영향에 대비하여 입력되는 신호의 임피던스를 낮추는 역할을 한다. 이를 위해서는 입력 임피던스가 높은 OP 앰프를 이용하였다. 표 9는 데이터 수신부 증폭회로에 사용된 주요 부품의 제원을 나타낸다.

Table 9 Specification of signal amplification chip.

| | Specification |
|-----------------|---------------|
| Product number | CA3160 |
| Company | intersil |
| Input Impedance | 1.5 TΩ |
| Input current | 5 pA |

그림 47에 CA3160을 이용하여 설계한 증폭 회로를 나타내었다. 실제 증폭회로를 제작하면서 중요한 부분은 연산 증폭기의 입력 단자에서의 입력 전류를 최소화하기 위해서는 연산 증폭기의 입력 단자(3번)를 회로 기판으로부터 절연시켜야 한다. 이를 위해서 입력 단자에 테프론 관을 씌운 후에 외부 입력선과 연결하였다. 최종적으로 위의 회로를 16개 병렬로 연결하여 16채널의 고입력 증폭 회로를 완성하였으며, BNC 케이블을 이용하여 전극을 연결 할 수 있도록 제작하였다. 실제로 제작된 신호 증폭기를 그림 48에 나타내었다. 사진 하단부에 최대 16개의 센서를 연결할 수 있는 BNC 단자가 있고 각각은 위의 증폭회로를 거쳐서 analog/digital 신호변환기를 거쳐서 최종적으로 컴퓨터에 USB 형태로 데이터를 보내준다. 다채널 A/D보드는 National Instrument Co.의 모델명 AT-MIO-16E-10 보드를 이용하였다. 그림 49은 개발한 시스템의 전체 모습을 나타낸다.

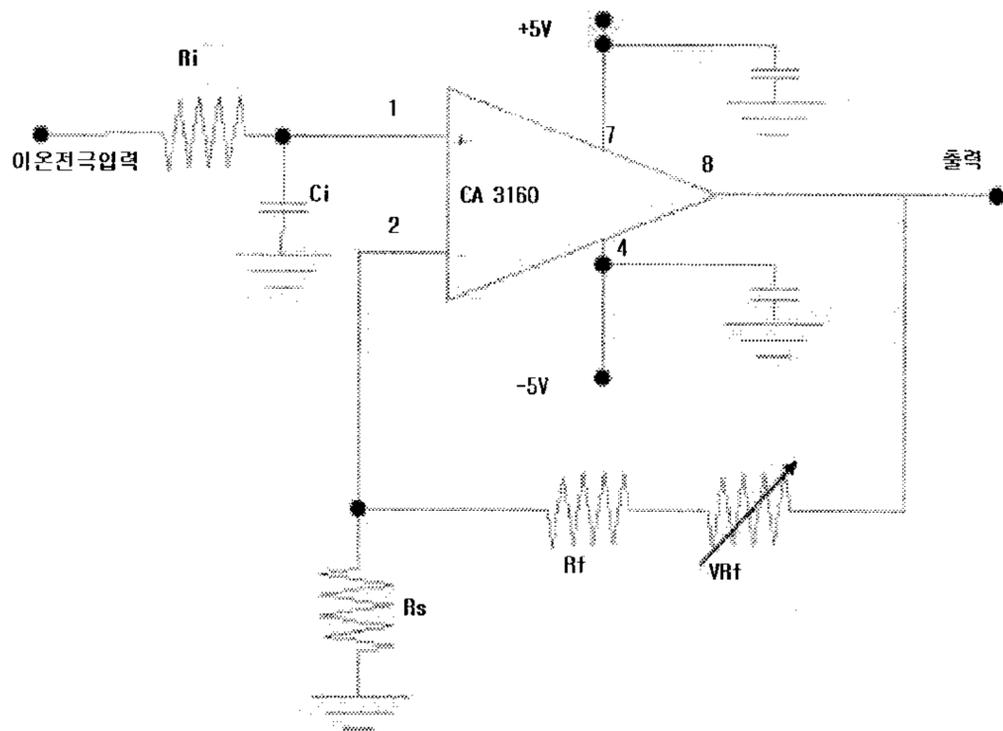


Fig. 47 Circuit diagram of signal amplification.



Fig. 48 Image of signal acquisition system.

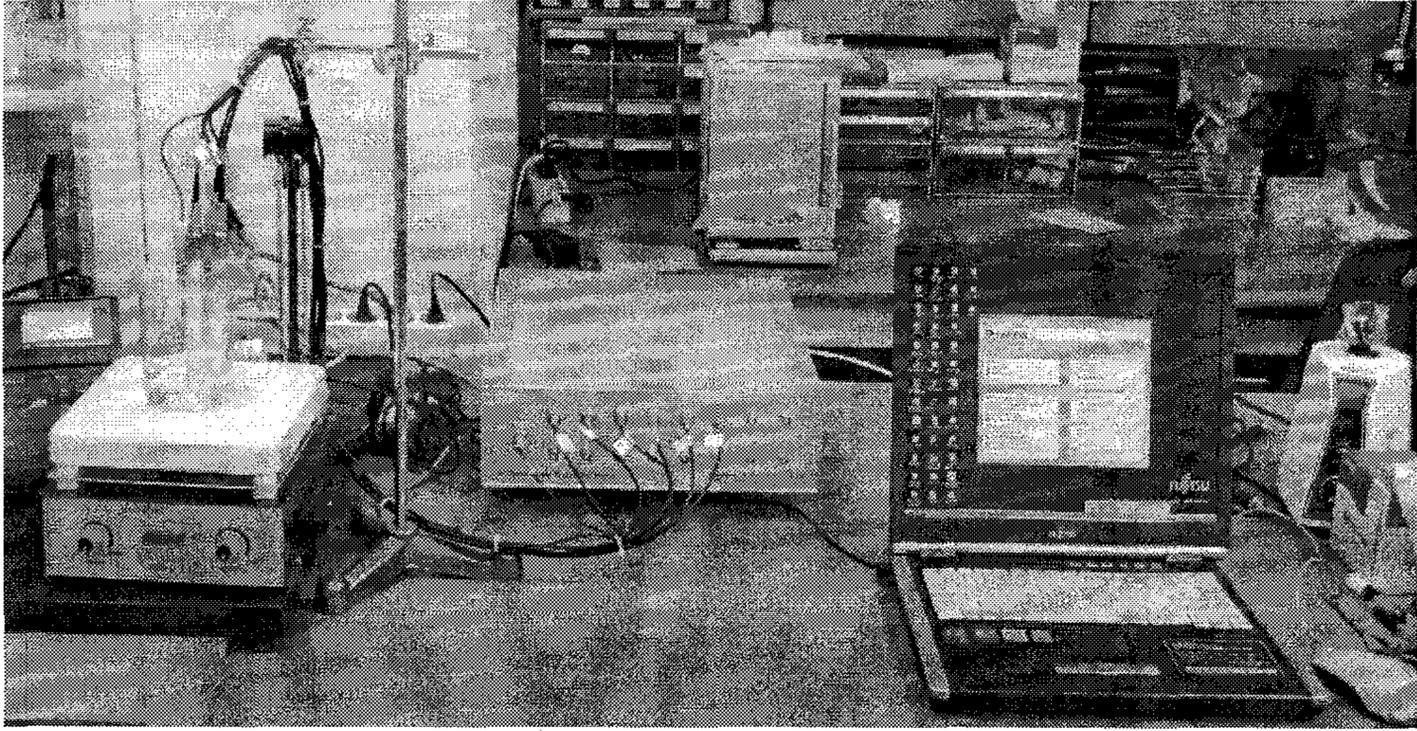


Fig. 49 Image of total system.

Analog/digital 신호변환기로부터 컴퓨터로 전송된 데이터는 실시간으로 데이터 수신과 저장이 필요하고 이때 데이터 수신 간격과 데이터의 초당 평균값들을 결정해야한다. 무엇보다 데이터를 눈으로 확인할 수 있는 소프트웨어의 개발이 필요하기 때문에 하드웨어 구동과 소프트웨어 개발을 위해 LabView 8.0(National Instrument Co.)를 이용하였다. 그림 50은 개발된 소프트웨어가 구동되면서 사용자에게 보여지는 화면으로서 최대 16개의 전극에서 수신되는 신호를 측정할 수 있다. 또한 그림 51은 그림 50의 소프트웨어를 개발하기 위해 사용된 모듈형 소프트웨어 다이어그램이다.

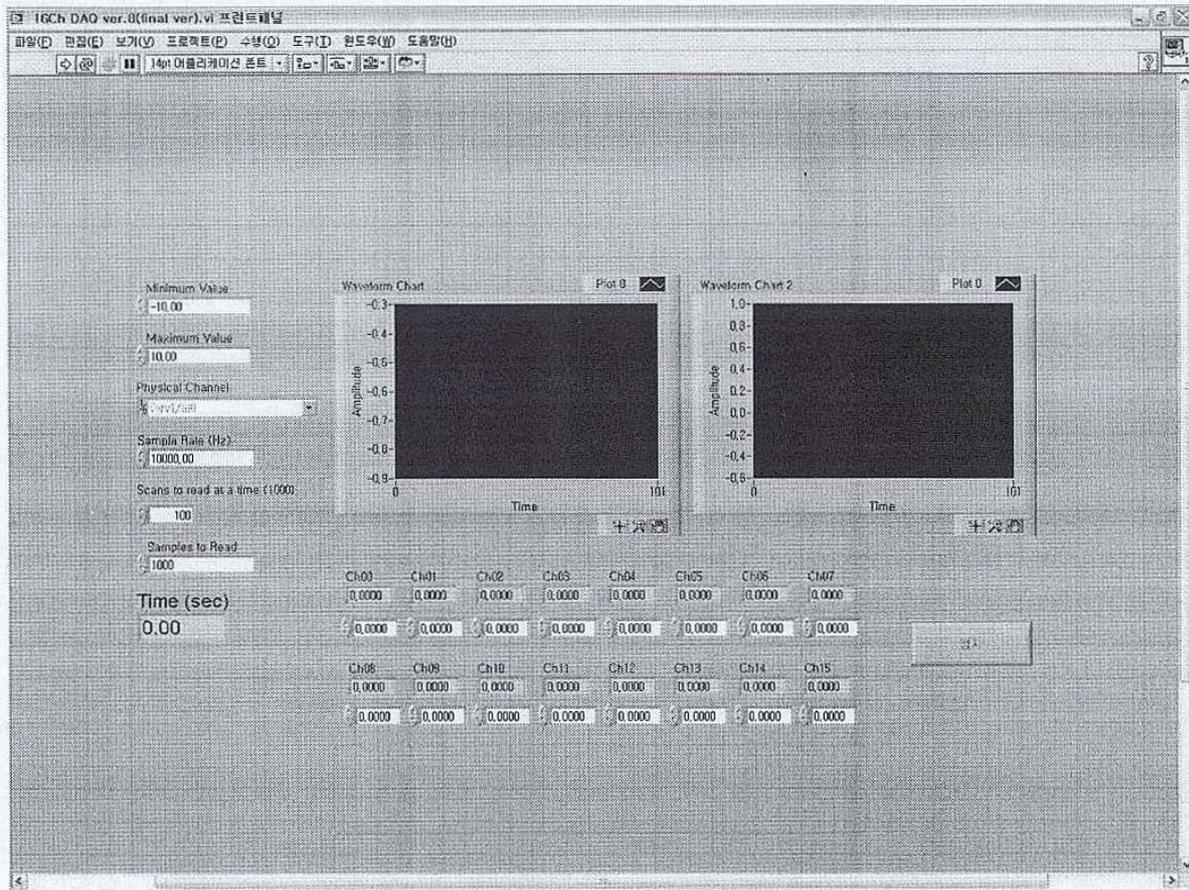


Fig. 50 Image of programmed data acquisition software.

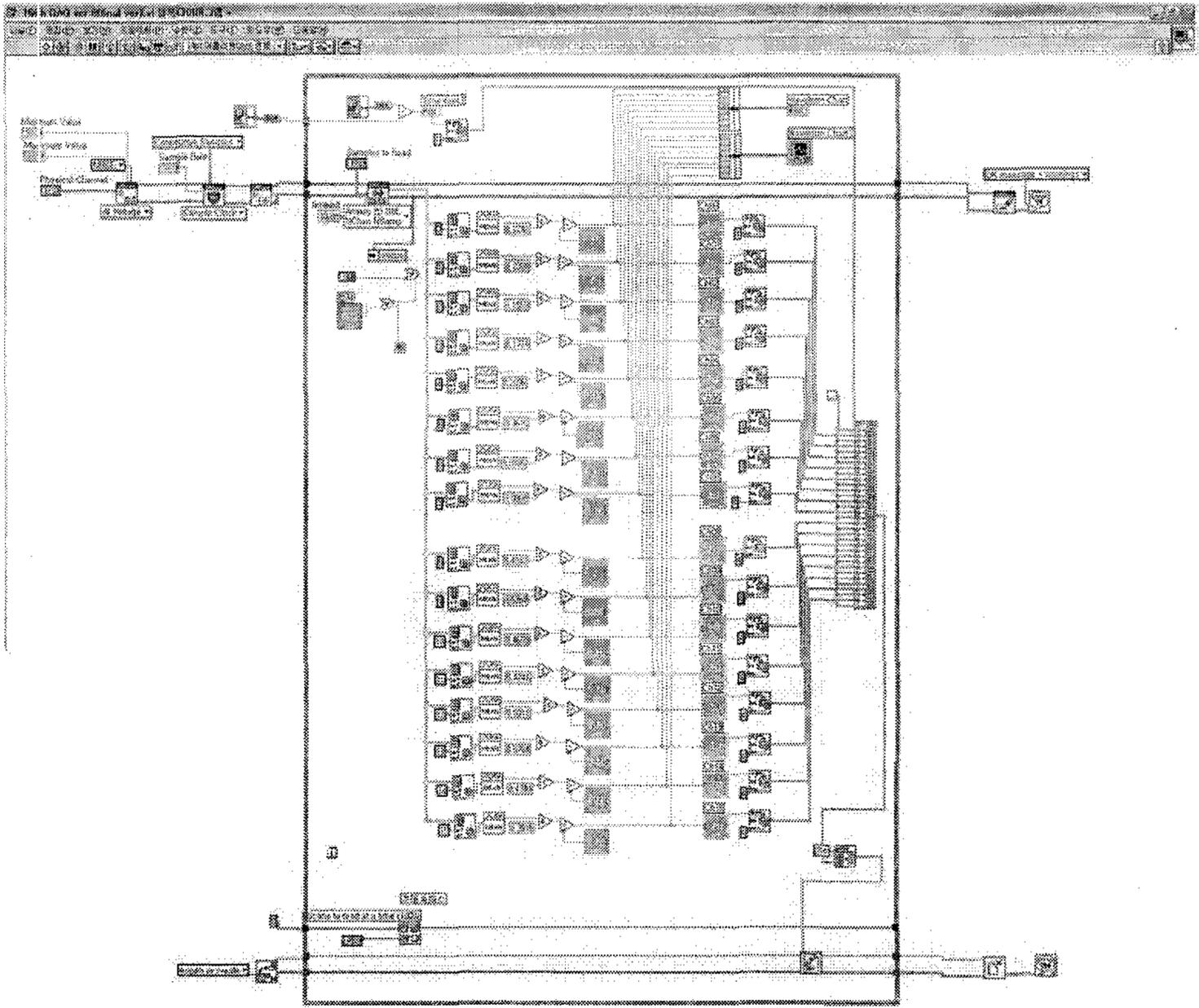


Fig. 51 Diagram of programmed data acquisition software.

2. 데이터 수신 및 저장부의 성능 평가

다채널 계측 장치의 신뢰도 평가를 위해 1000Hz로 데이터를 입력 받으면서 10개, 100개, 1000개의 데이터의 평균값을 획득했다. 데이터의 분석에 사용 가능한 데이터 평균값을 결정하기 위함이다. 그림 52, 53, 54는 각각 10개, 200개, 1000개의 데이터 평균값을 조정하여 데이터를 획득한 결과이다.

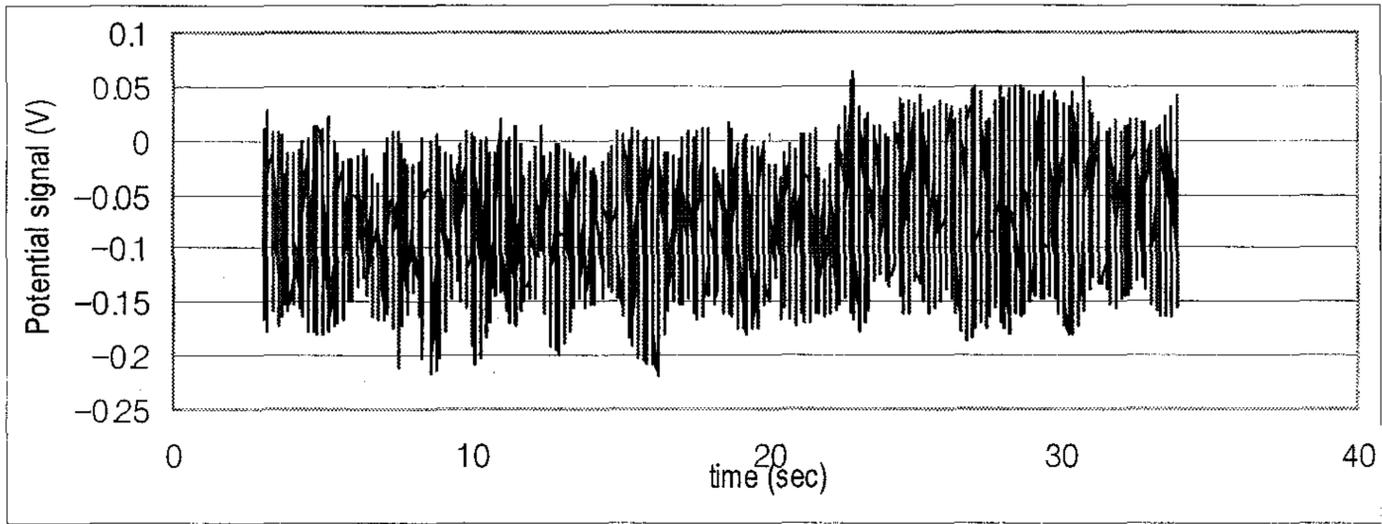


Fig. 52 Data sampling with averaging 10 samples under 1000Hz.

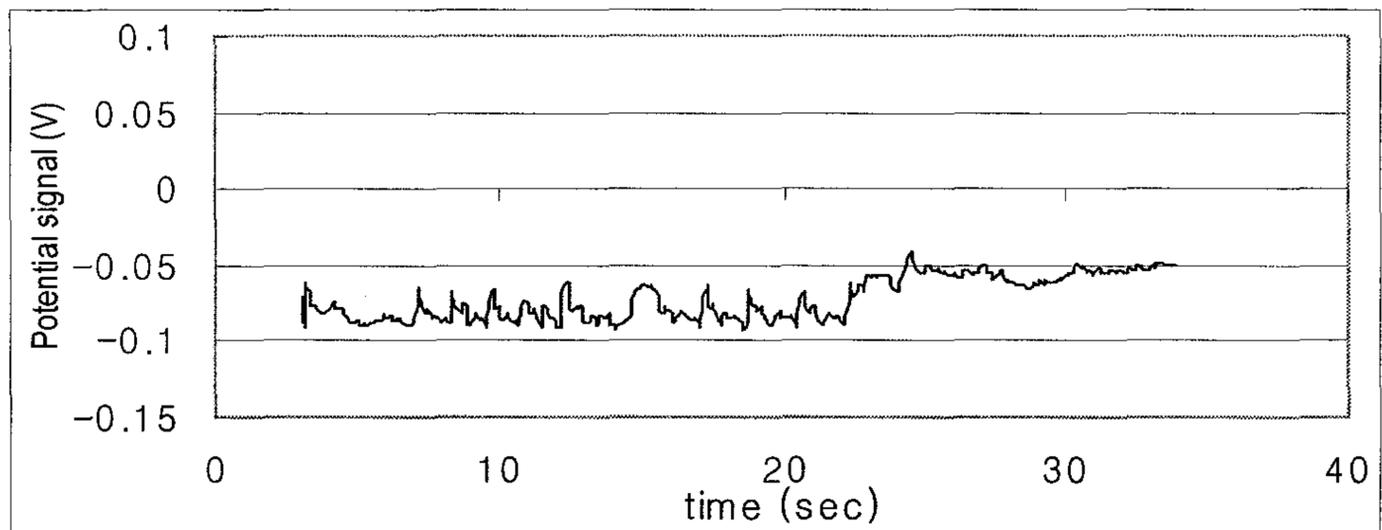


Fig. 53 Data sampling with averaging 100 samples under 1000Hz.

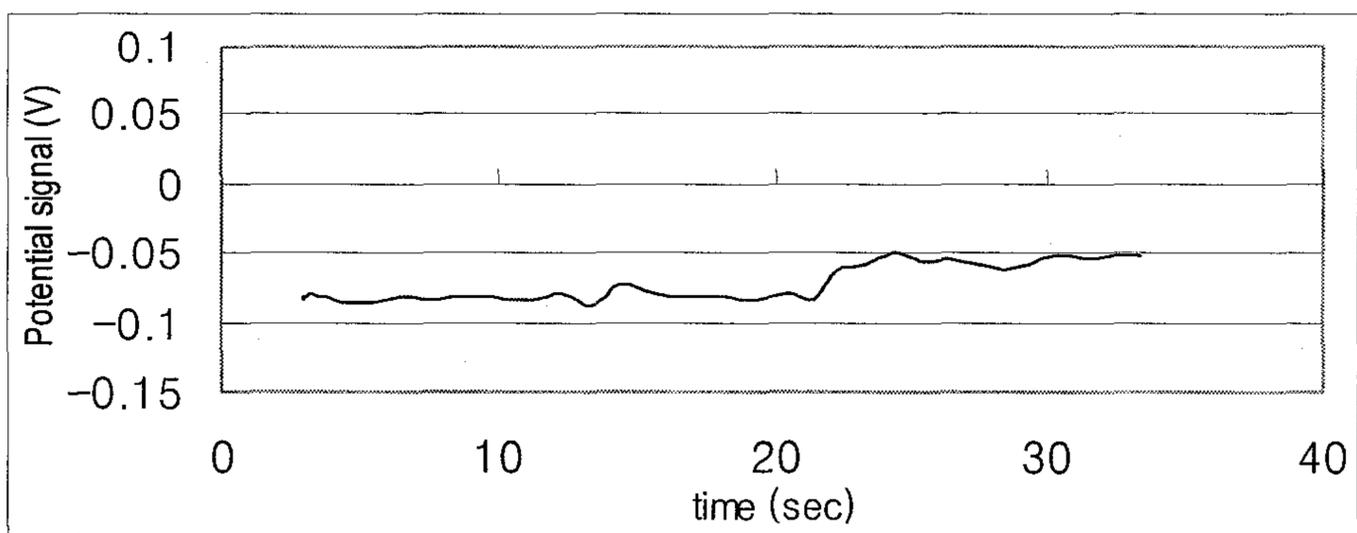


Fig. 54 Data sampling with averaging 1000 samples under 1000Hz.

1000Hz의 10개 평균 데이터에서는 많은 노이즈가 포함되어 있는 것을 볼 수 있으나, 연속된 1000개의 데이터를 평균한 값에서는 노이즈가 대부분 제거됨을 확인할 수 있었다. 연속된 10개, 100개, 1000개의 데이터 평균을 계산하고, 각각의 S/N 비를 계산하였다. 표 10은 이를 정리하여 보여준다.

Table 10 Signal to noise ratio and standard deviation of signal acquired from system developed on 1,000Hz sampling time.

| | Average of 10 samples | Average of 100 samples | Average of 1000 samples |
|-------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| Input signal(V) | -0.08127 | -0.08126 | -0.08121 |
| Noise (V) | 0.09787 | 0.01964 | 0.008599 |
| S/N ratio (dB) | -1.61439 | 12.33487 | 19.50364 |
| Standard deviation (mV) | 51.26 | 6.9 | 3.3 |

데이터의 개수가 증가함에 따라 S/N 비가 증가하는 것을 볼 수 있으며 10개, 100개, 1000개의 데이터 평균값에서 표준편차가 각각 51.26mV, 6.9mV, 3.3mV를 나타내었다. 따라서 막 전위차 측정 실험에서는 연속된 1000개의 데이터의 평균값을 저장하기로 하였다.

각 채널별 변이를 확인하기 위해 임의로 선택한 6개의 채널에 전극을 연결한 상태에서 동일한 용액에 담가 1분간 전위차 측정을 하였다. 각 채널당 60개의 데이터에 대한 표준편차는 표 11과 같이 1.5mV이내의 편차를 보였다. 이는 신호를 증폭하는 과정에서 생기는 측정 장치 자체의 오차로 판단되며 본 연구에서 1.5mV이내의 편차는 허용할 수 있어야 한다.

Table 11 Standard deviation of output signal on random selected 6 channel.

| Channel number | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Standard deviation (mV) | 1.376 | 1.278 | 0.897 | 1.154 | 1.308 | 1.473 |

3. 효소를 고정화한 센서 개발

Polyacrylamide gel을 성형할 때 acrylamide와 MBA의 농도를 앞의 실험에서 결정지었다. 따라서 효소를 고정시킬 전극 끝에 20%의 acrylamide 300 μ l, 1.2% N,N'-methylene- bis-acrylamide (MBA) 600 μ l의 효소를 poly-acrylamide gel에 고정하였다. 효소가 주입되고 난 이후에 ammonium persulfate, N,N,N',N'-tetra methylethylenediamine (TEMED)를 각각 2% 주입하였다. 이에 전극부에 효소를 고정시킨 센서를 제작하였고 그 기본 구조는 그림 55와 같다. 사용된 전극의 사양은 표 12와 같다. 센서 개발에 사용된 전극은 기준 전극과 활동 전극이 동시에 있으며, 전극 내부에는 Ag/AgCl의 충전용액이 들어있다. 전극의 측정부분의 끝은 유리질이고 이를 보호하기 위해 플라스틱 재질로 10.7mm 정도 돌출되어 보호하고 있다. 이 빈 공간에 효소를 고정한 poly-acrylamide gel을 성형시켰다.

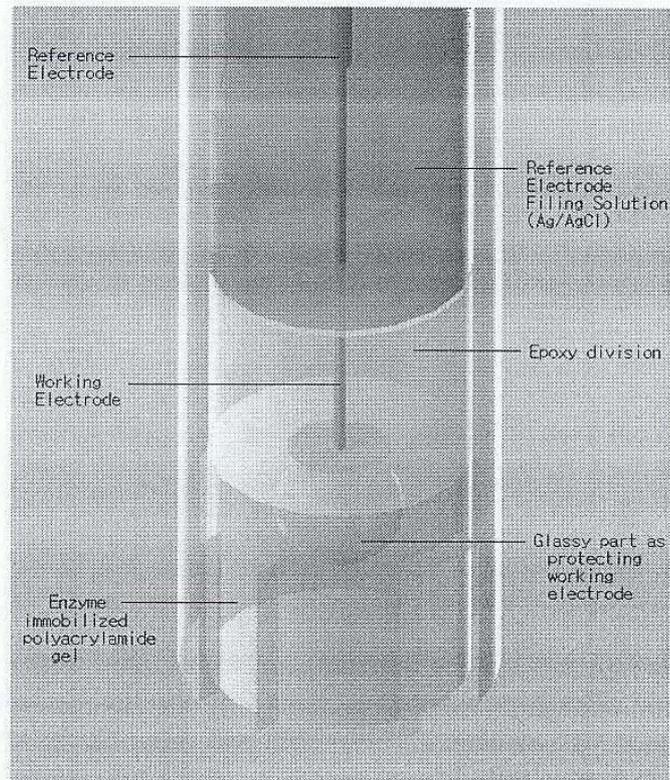


Fig. 55 Structure of enzyme immobilized electrode.

Table 12 Specification of electrode.

| Item | Specification |
|------------|-------------------|
| Company | Orion |
| Model | 9157BN |
| Range | -1600.0~+1600.0mV |
| Resolution | 0.1 mV |
| Accuracy | ±0.2 mV or ±0.05% |

4. 센서의 성능평가

센서의 측도 설정(calibration)은 L-lactate의 농도별 기준 용액을 이용하여 시행한다. 발효 시간 동안 L-lactate의 농도 변화는 백분율 농도로 0%에서 2.09%까지 변화였다. 따라서 캘리브레이션을 위해 사용된 L-lactate 용액의 농도는 0.005%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%로 한다. 7단계의 농도에 따른 센서의 전압 값을 측정하여 L-lactate의 농도와 전극으로부터 출력 값을 측정하여 관계식을 얻고 이에 대한 검증 실험을 수행한다. 그림 56은 센서의 측도를 나타낸다. 비교적 선형을 보이며 L-lactate의 농도가 증가할수록 출력 전압은 높아지며 관계식은 식 2와 같다. 실제 측정된 값과 관계식과의 상관관계는 $R^2=0.9959$ 로서 높은 결과를 얻을 수 있었다. x 축을 출력 전압으로 나타낸 이유는 결국에 전압 측정을 통해 L-lactate의 농도를 측정하고 더 나아가 그림 22를 참고하여 유산균 수를 예측할 수 있기 때문이다.

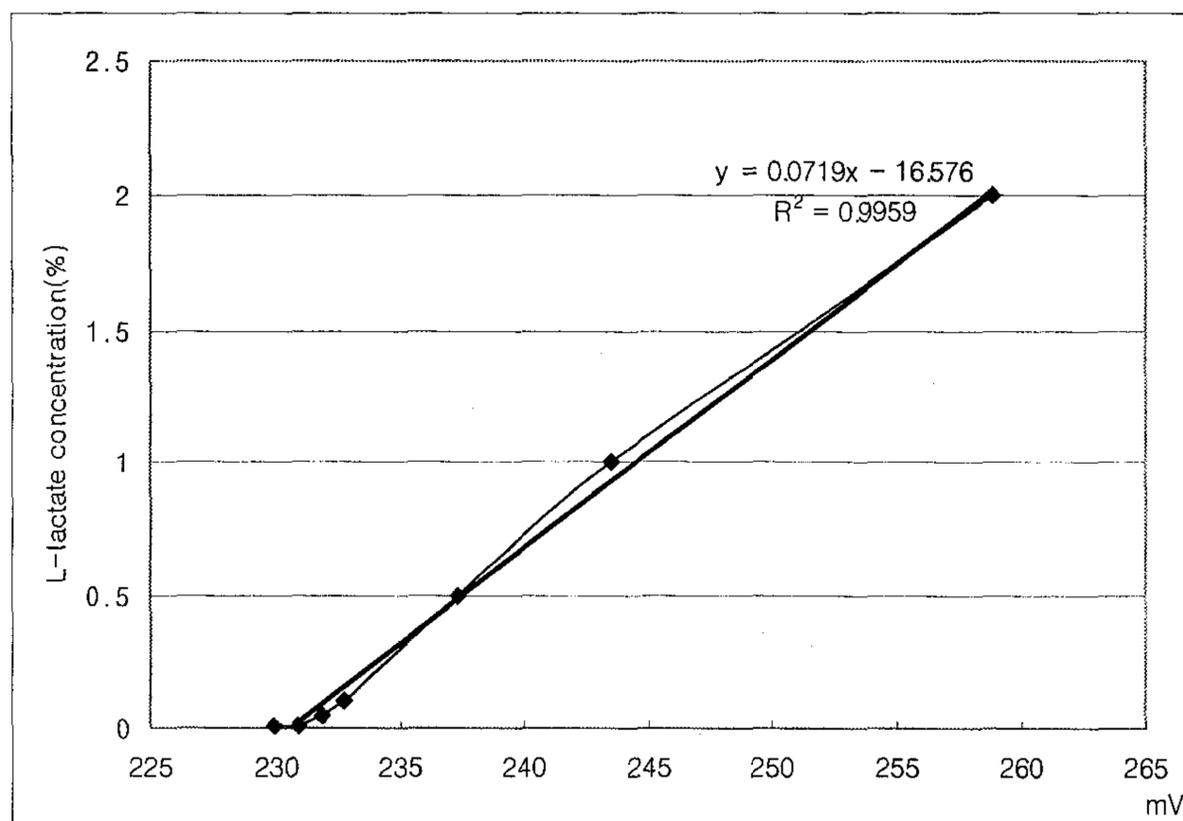


Fig. 56 Calibration curve on L-lactate concentration with output voltage(mV) from sensor.

$$y = 0.0719x - 16.576 \dots \dots \dots (식 2)$$

여기서, x = 센서로부터 측정된 값 (mV)

y = L-lactate의 농도 (%)

단위 변환을 위해 L-lactate의 밀도가 1.25g/ml이기 때문에 식 3을 고려하여 센서로부터 측정값이 230mV 이하일 경우에는 유산의 농도가 0이라고 예측할 수 있다. 유산균의 colony 개수가 0이거나, 발효가 시작되기 이전의 상태라고 할 수 있다. 측정값이 258.4mV 이상일 경우 발효가 충분히 일어난 상태이고, 유산균 수는 2.8×10^9 cfu 정도 된다고 할 수 있다. 캘리브레이션의 표준오차는 0.724이다.

$$L - lactate(\%) \times 1250mg/ml \div 100 = L - lactate(mg/ml) \dots \dots (식 3)$$

캘리브레이션을 통해 얻은 식2의 검증을 위해 0.007%, 0.025%, 0.075%, 0.25%, 0.75%, 1.5%, 1.75%의 L-lactate 농도를 센서로 측정하였을 때 출력 값을 읽어서 비교하였다. 검증 실험의 결과는 그림 57과 같고, $R^2=0.9919$ 의 상관관계를 나타내었으며 이로서 센서의 성능은 검증되었다.

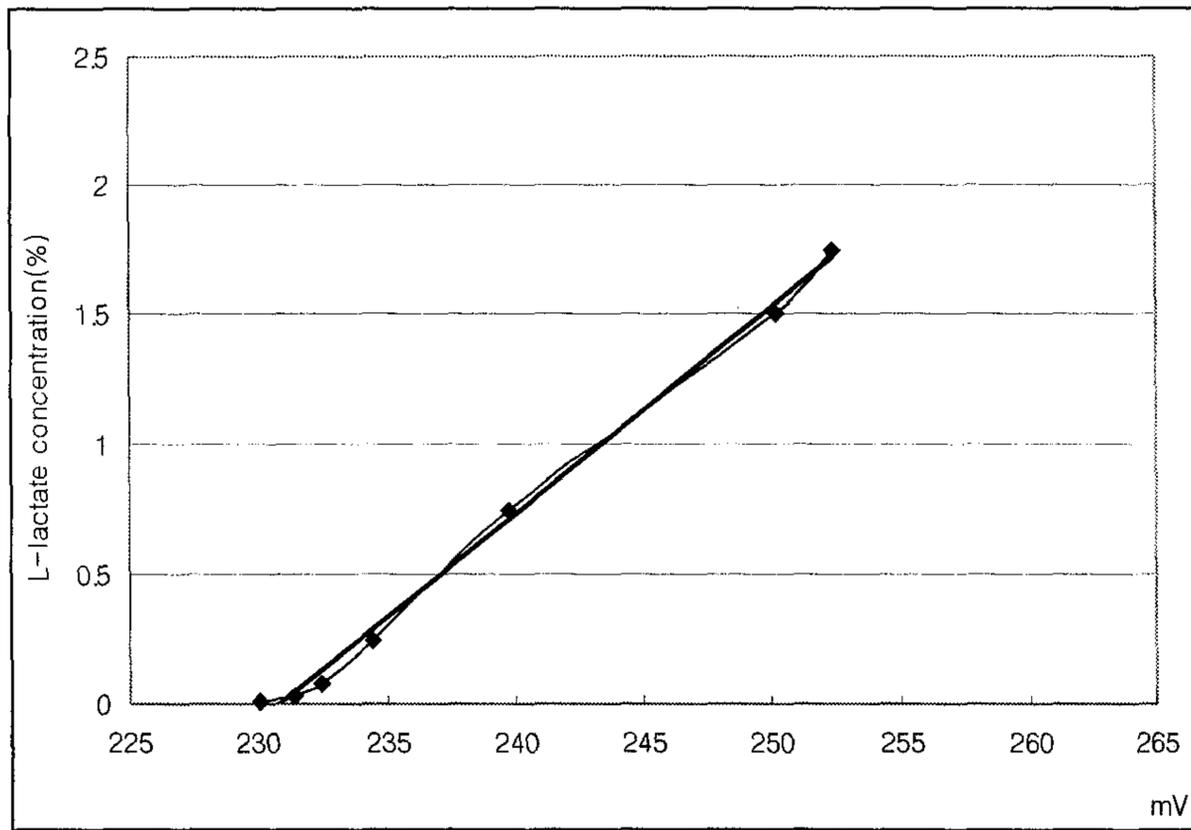


Fig. 57 Validation curve on L-lactate concentration with output voltage(mV) from sensor.

센서의 성능 중에 수명은 센서가 어떤 조건에서 보관이 되는가에 따라 결정된다. 고정된 효소가 높은 온도에서 보관이 된다거나 pH가 낮은 조건에서 장기간 보관되면 활성을 쉽게 잃어버리게 된다. 효소가 최적의 조건에 보관되어야 수명을 보장된다는 점은 효소 센서의 단점이라고도 할 수 있다.

제 6 절 요약 및 결론

유산균의 농도를 측정하고자 하는 연구는 다양한 방법으로 진행되어 왔으나 실험적 방법이거나 고가의 장비가 필요한 방법들이다. 본 연구의 목적은 이와 같이 복잡한 장비를 사용하지 않고 간편하게 유산균의 농도를 측정할 수 있는 센서를 개발하기 위해 수행되었다.

젖산(유산) 발효 과정에서 유산균의 농도변화와 유산균의 대사에 의해 생기는 유기산의 농도와 상관은 높기 때문에 대표적인 유기산의 농도를 측정함으로써 유산균을 측정하였다. 특히 유산균의 농도와 유산(L-lactate)의 농도는 다른 유기산과 달리 높은 상관관계를 갖기 때문에 유산을 측정함으로써 유산균의 수를 얻어낼 수 있는 센서를 개발하고자 하였다. Poly-acrylamide gel에 L-lactate와 반응하여 H⁺를 생성하는 반응과정에 관여하는 효소(L-LDH, NAD, GPT)와 L-glutamate를 고정화하여 pH 전극의 측정부에 접합시킴으로서 센서가 개발되었다.

본 연구의 결과를 정리하면 다음과 같다.

1. 발효과정에서 L-lactate의 농도와 유산균의 농도는 지수 모형의 변화를 갖고, L-lactate의 농도와 유산균의 농도의 상관관계는 $R^2=0.984$ 이다. 유산균의 농도를 측정하기 위해 $y = 108.82x - 87.437$ 에 L-lactate의 농도를 대입하면, 유산균의 수를 알 수 있다. L-lactate 이외의 acetate, citrate는 발효과정에서 유산균 수와 상관성이 없다. 이로서 L-lactate를 측정함으로써 유산균의 수를 측정할 수 있음을 확인하였다.

2. L-lactate dehydrogenase(L-LDH)와 NAD의 효소 반응에 의한 L-lactate의 농도 측정은 문제가 있으며, 이를 해결하기 위해 glutamic-pyruvic transaminase (GPT)와 L-glutamate를 함께 이용하는 반응을 활용하였다. L-LDH의 반응에서 생성되는 pyruvate를 L-alanine으로 전환시켜서 수소이온의 감소를 막을 수 있었으며 이로서 생성되는 L-lactate의 농도에 비례하는 수소이온의 농도를 측정함으로써 유산의 농도 측정이 가능함을 알 수 있다.

3. Poly-acrylamide gel에 L-LDH, NAD, GPT와 L-glutamate를 고정시키고, 이를 전극 끝에 접합시킴으로서 센서의 개발이 이루어졌으며, 여러 농도의 L-lactate를 측정하여 얻은 출력 전압 값과 L-lactate의 농도의 캘리브레이션 결과, 관계식은 $y = 0.0719x - 16.576$ 이며 상관관계는 $R^2=0.9959$ 이다. 검증실험에서는 상관관계 $R^2=0.9919$ 로 나타났다. L-lactate를 측정하게 되는 본 센서는 유산균의 농도와 L-lactate의 농도와의 관계가 구명되었기 때문에 효소 반응을 통해 생성된 H^+ 농도로부터 발생된 전압 값은 유산균의 수에 대한 값으로 볼 수 있다.

본 연구는 LDH가 갖는 역반응 특성을 제 2의 효소(GPT)를 사용함으로써 억제시켰으며 효소의 활성을 보다 유지하면서 고정시킬 수 있는 방법의 연구를 통해 센서의 성능 향상을 도모할 수 있을 것으로 보인다.

효소 고정화 공정에서 효소의 활성을 최대한 유지할 수 있는 방법을 연구하여 센서의 반응성을 높이고, 정확도 혹은 정밀도가 높은 전극을 이용하여 성능이 뛰어난 센서의 개발이 가능할 것으로 판단된다. 따라서 효소 고정을 위한 다양한 기술적 시도가 필요하고 이에 따른 효소 활성 변화와 환경 변화에 대한 연구가 필요하다. 본 센서를 여러 식품에 활용하기 위해서는 식품 내에 존재하는 유산균의 성장과 L-lactate의 생성에 대한 관계 규명을 통한 calibration을 통해 적용이 가능하다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

다음은 연구 계획서에서 제시한 연차별 연구개발 목표와 내용이다.

| 구 분 | 연구 개발 목표 | 연구개발 내용 및 범위 | 달성도 |
|-------------------|----------------------------|---|------|
| 1차 년도 (2005) | 기초조사 | <ul style="list-style-type: none"> · 기존 연구, 개발된 센서의 특성 분석 · 센서의 요구 성능 분석 · 센서 개발안 수립 | 100% |
| | 유산균 수와 생성 유기물 의 상관관계 분석 | <ul style="list-style-type: none"> · 발효과정의 유산균 수 변화 분석 · 발효과정의 유기물질 변화 분석 · 유산균 수와 유기물질 간의 상관분석 | 100% |
| | 효소의 선택 및 저해제 제거법 연구 | <ul style="list-style-type: none"> · 효소의 선택 및 사용량 결정 · 효소 반응 분석 · 저해제 제거 방법 연구 | 100% |
| 2차 년도 (2006) | 효소 고정법의 선택 및 성능 실험 | <ul style="list-style-type: none"> · 여러 효소 고정법의 특성 분석 · 효소 고정법 선택 및 성능 분석 | 100% |
| | 센서의 개발 및 성능실험 | <ul style="list-style-type: none"> · 센서의 설계 및 개발 · 유산 농도별 성능 평가 · 센서의 소형화 및 간편화 · 유산 및 유산균 측정 프로그램 개발 | 95% |

본 연구를 통해 발효식품에서 생성되는 주요 생성물 측정을 통해 발효의 정도 및 유산균 수를 예측할 수 있는 센서 시스템을 개발하였다. 이로서 유산균 발효유를 비롯하여 발효를 기초로 하는 식품에서 발효의 정도를 예측 및 측정하는데 사용될 수 있는 기술을 얻었다고 할 수 있다. 발효식품의 소비 증가와 다양한 식품의 개발로 인해 본 연구의 활용 범위도 점차 증가할 수 있을 것으로 판단된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

연구를 수행한 결과, 센서의 소형화 연구가 필요하고 이를 통해 발효식품에 직접 사용할 수 있는 시스템 개발에 대한 연구가 필요하다. 특히 김치류의 경우에는 식품의 부유물로 인해 고정된 효소에 물질 투과를 저해하는 특성을 보일 것으로 예상되기 때문에 필터링 및 희석 장치를 동반한 시스템 개발이 필요하다. 유산균 발효유의 경우에는 점도가 높기 때문에 시료를 희석해야 본 연구에서 개발된 센서로 측정이 가능하리라는 문제가 예상된다. 앞의 문제들과 더불어 센서의 보관 방법과 효소를 고정화하면서 활성을 충분히 유지할 수 있는 고정법 연구가 수행된다면 실제 식품 공정상에서 사용이 가능한 시스템이 완성되리라고 생각된다. 추가적인 연구를 통해 특허 출원 가능성에 대한 검토와 연구 성과를 활용하기 위해 기술 이전 등을 통해 기업화 추진에 대한 가능성을 검토 중이다.

제 6 장 참고문헌

1. 고용덕, 정희엽, 김경숙, 이광훈, 김양우, 전성식, 성낙계. 1994. 냉장고 제어시스템을 이용한 요구르트의 발효 및 저장효과. 한국식품과학회지. 26(6):814-818.
2. 김민곤. 2002. 바이오센서 기술동향. 한국생명공학연구원 보건산업기술동향. 25-33
3. 김선희. 2003. 나노기술을 이용한 바이오센서. 한국특허정보원 특허동향보고서.
4. 김정호, 이동희, 김태진, 노봉수. 1998. 포도당, 젖산 및 에탄올의 동시 측정용 바이오센서의 개발. 한국식품과학회지. 30(1)22-34.
5. 김현욱 외7인. 1994. 낙농 및 식품 미생물학. 선진문화사.
6. 김현욱. 1988. 낙농 및 식품 미생물학 실험. 유한문화사.
7. 백영진. 1997. 국내 드링크 요구르트의 종류와 특성. 우유. 1997(71):15-19.
8. 소명환. 1985. 국내 액상발효유에서 분리한 유산균의 동정 및 소화관액 내성조사. 한국식품과학회지. 17(3):192-196.
9. 손종구, 이상필, 김상우. 2002. 바이오센서. 한국과학기술정보연구원.
10. 윤현철. 1995. L-lactate dehydrogenase를 이용한 후막형 전기화학식 L-lactate 바이오센서의 개발. 한국과학기술원 석사학위논문.
11. 이송세. 2002. 효소고정화를 위한 폴리스티렌계 담체 및 키토산 고분자 담체의 개발. 서울대학교 대학원 석사학위 논문.
12. 장호남, 서진호. 2002. 생물화학공학. 아카데미 서적.
13. 정동효. 1987. 효소학. 선진고려의학.
14. 정윤수. 1994. 바이오센서. 고려의학.
15. 한국식품의약품안전청장. 2003. 건강기능식품의 기준 및 규격 제정.
16. Blum, L. J. and P. R. Coulet. 1991. Biosensor Principles and Applications. Marcel Dekker, inc. U.S.A.
17. 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.
18. Chaubey, A., K. K. Pande, M. K. Pandey, and V. S. Singh. 2001. Signal amplification by substrate recycling on polyaniline/ Lactate oxidase/ Lactate dehydrogenase bienzyme electrodes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 96:239-248.
 19. Clark, Jr. L. C. and C. Lyons. 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 102:29.
 20. Čurda, L., and M. Plocková. 1995. Impedance Measurement of Growth of Lactic Acid Bacteria in Dairy Cultures with Honey Addition. *International Dairy Journal*. 5(7):727-733.
 21. Eggins, B. R. 2002. *Chemical sensors and biosensors*. John Wiley & Sons Ltd. England.
 22. González-Sáiz, J. M. and C. Pizarro. 2001. Polyacrylamide gels as support for enzyme immobilization by entrapment. Effect of polyelectrolyte carrier, pH and temperature on enzyme action and kinetics parameters. *European polymer journal*. 37:435-444.
 23. Halliwell, C. M., E. Simon, C. S. Toh, P. N. Bartlett, A. E. G. Cass. 2002. Immobilisation of lactate dehydrogenase on poly(aniline)-poly(acrylate) and poly(aniline)-poly(vinyl sulphonate) films for use in a lactate biosensor. *Analytica Chimica Acta*. 453:191-200.
 24. Haouz. A., A. G. Meyer, and C. Burstein. 1994. Assay of dehydrogenases with an O₂-consuming biosensor. *Enzyme Microbial Technology*. 16:292-297.
 25. He, Y. N., H. Y. Chen. 1997. The kinetics-based electrochemical determination of serum glutamate pyruvate transaminase activity with a gold

- microelectrode. *Analytica Chimica Acta*. 353:319-323.
26. Le, M., and G. E. Means. 1998. NAD⁺/NADH recycling by coimmobilized lactate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase. *Enzyme and Microbial Technology*. 23:49-57.
 27. Lehninger, A. L., D. L. Nelson and M. M. Cox. 1993. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, Inc. U.S.A.
 28. Leroy, F., and L. D. Vuyst. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*. 15:67-78.
 29. Lobo-Castañón, M. J., A. J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco. 1997. A bienzyme-poly-(o-phenylenediamine)-modified carbon paste electrode for the amperometric detection of L-lactate. *Analytica Chimica Acta*. 346:165-174.
 30. 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.
 31. 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.
 32. Ortega, N., M. D. Busto, and M. Perez-Mateos. 1998. Optimisation of β -Glucosidase entrapment in alginate and polyacrylamide gels. *Bioresource Technology*. 64:105-111.
 33. Shu, H. C., H. Håkanson, B. Mattiasson. 1995. On-line monitoring of D-lactic acid during a fermentation process using immobilized D-lactate dehydrogenase in a sequential injection analysis system. *Analytica Chimica Acta*. 314:233-239.

- Acta. 300:277-285.
34. Simon, E., C. M. Halliwell, E. Simon, C. S. Toh, A. E. G. Cass, P. N. Bartlett. 2002. Oxidation of NADH produced by a lactate dehydrogenase immobilised on poly(aniline)-poly(anion) composite films. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 538-539:253-259.
 35. Sivakesava, S., J. Irudayaraj, and D. Ali. 2001. Simultaneous determination of multiple components in lactic acid fermentation using FT-MIR, NIR, and FT-Raman spectroscopic techniques. *Process Biochemistry*. 37:371-378.
 36. Updike, S. J. and G. P. Hicks. 1967. *Nature*. 214: 786
 37. Wise, D. L. 1991. *Bioinstrumentation and Biosensors*. Marcel Dekker, Inc. U.S.A.
 38. Yang, V. C., T. T. Ngo. 2000. *Biosensors and Their Applications*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. U.S.A.
 39. Zhang, J., Y. Xie, X. Dai, 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.