방사선 기술이용 미생물유래 신규 물성 폴리머 물질 제조 및 전도성 검토

김화정[1] · 송아람[1] · 김동호[1] · 박해준[1,*]

[1]한국원자력연구원 첨단방사선연구소

Preparation of a Newly Microbial Polymer Using Ionizing Radiation Technique and Its Conductivity

Hwa-Jung Kim[1], Aram Song[1], Dong-Ho Kim[1] and Hae-Jun Park[1,*]

[1]*Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongup 56212, Korea*

Abstract - Extracellular polymeric substance (EPS) is produced by microorganisms for a variety of purpose in response to environmental stresses. The EPS are heterogeneous mixture composed dominantly of polysaccharides and proteins, with nucleic acid and lipid as minor constituents. Application of a bacterial EPS is in mostly bioremediation in environment and it applied to pharmaceutical industries including indwelling medical devices. Furthermore, the EPS studies have mostly been performed in the only level of bacterial culture system. In this study, we have first investigated the structural modification of EPS using ionizing radiation technique. The extracted EPS solution from bacterial culture step was exposed to gamma-irradiation at room temperature. Especially, the EPS was given irradiation at various ranges of 0, 2, 10 and 30 kGy from ^{60}Co gamma-ray source. The structural property and surface morphology were characterized by using Fourier-transform infrared (FTIR) and field emission-scanning electron microscopy (FE-SEM). Also, the conductivity of EPS was determined by using the Van der PauW method, and the polymeric substances turned out to have semi-conductivity (about $5.38*10^{-7}$).

Key words : Extracellular polymeric substance (EPS), Gamma-irradiation, Conductivity

서 론

*Shewanella*속 세균은 전자를 공여하여 금속이온을 광물화시키는 특징을 가지고 있다. 이 세균에는 적어도 3종 이상의 cytochrom이 세포벽에 존재하고 있고 종류에 따라 세포 외부로 다량 분비한 EPS (Extracellular polymeric substance)에도 cytochrom가 존재한다(Fredrickson *et al*. 2008; Marshall *et al*. 2008). 이 세균의 세포 외부에 있는 EPS (Extracellular polymeric substance)가 세포 외부에 존재하는 금속이온에 전자를 공여하는 중요한 역할을 담당하고 있으며 이를 통하여 유해 중금속으로부터 자신을 보호하는 역할을 수행하고 있다. 이런 현상을 이용하여 미생물 연료전지, 방사성 동위원소 금속이온 고정, 우주정거장 폐기물 청소에 이용되고 있으며 미생물 전극 소재 및 금속나노와이어 생산 등 기술을 다양한 산업 용도로 개발되고 있으며 최근에는 이 EPS를 이용한 전도성 필름의 개발도 보고되어 있다(Carpentier *et al*. 2005; Windt *et al*. 2005; Lee *et al*. 2007; Fredrickson *et al*. 2008; Aldeek *et al*. 2012).

EPS (Extracellular polymeric substance)는 세균 세포의 외

* Corresponding author: Hae-Jun Park, Tel. +82-63-570-3190, Fax. +82-63-570-3195, E-mail. hjpark@kaeri.re.kr

부에 넓게 형성된 바이오필름 metrix로서 다당류로 주로 구성되어 있다고 알려져 왔으나 최근 단백질, 지질, 핵산(DNA) 등이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다. EPS는 세포벽 외부에 넓게 퍼져 있는 Loosely associated EPS (laEPS)와 세포벽 가까이 단단하게 붙어 있고 Bound EPS (bEPS)로 나눠진다. laEPS는 다당류로 구성되어 있고 bEPS는 단백질, 지질, 핵산 등이 많이 포함되어 있다. EPS의 기능은 현재 세포 간의 Communication, 메탈이온의 다양한 대사에 관여를 담당하고 있는 것으로 보고되고 있다(Cao *et al*. 2005; Fredrickson *et al*. 2008; Cao *et al*. 2011).

다양한 바이오 유래 고분자가 개발되었으나, 종래의 바이오 유래의 고분자 물질은 전기전도성이 대부분 매우 낮아 IT 소재산업용으로 적용하기에 미흡하였다. 그뿐만 아니라 일반적으로 전기전도성 등의 물성을 향상시키기 위하여 다양한 물리화학적 방법을 이용한 개질 등이 필요한데, 종래의 바이오 유래의 고분자 물질은 방사선을 이용하여 개질을 할 경우 그 과정에서 폴리머 구조가 파괴되는 문제가 있었다(Byun *et al*. 2008). 바이오 유래의 소재를 이용하여, 환경친화적이면서 생체적 적합성이 뛰어난 전도성 바이오 물질을 제조하면 바이오센서, 치료용 바이오로봇, DDS 소재 및 바이오 일렉트로닉 산업 소재로 널리 사용될 수 있다. 그러므로 미생물 유래의 전기전도성을 가지면서도 방사선 개질 과정에서 구조 파괴 등의 문제가 없는 전도성 바이오 물질의 제조방법 및 전도성 바이오 물질을 개발하고 검토할 필요가 있다.

본 연구에 있어 *Shewanella*속 세균에서 추출한 bEPS를 전기전도성 바이오폴리머필름의 제조 가능성을 검토하고 방사선을 조사에 의한 새로운 물성과 전기전도성을 조사함으로써 나노바이오 전극 등 바이오일렉트로닉스 산업 소재로서 기여를 할 수 있음을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 시료 및 재료

미생물 재료는 KCTC에서 분양받은 *Shewanella putrefaciens* 균주(KCTC 12458)를 배양하여 이용하였다. 본 균주를 LB (Luria-Bertani medium, Difuco사) 평판도말 배지에 25도씨에서 계대배양하고 평판도말 배지 균총으로부터 접종원 1.5 L (LB 액체배지 25도씨 48시간 배양)를 준비하였다. 50 L급 발효기에 LB 액체배지(30 L)를 준비한 다음 접종원을 접종하여 25도씨 48시간 배양하였다. 배양액을 원심분리(8000 rpm)하여 상등액을 버리고 팰릿을 반복적으로 집적하게 하여 균체를 회수하였다.

회수된 균체로부터 B, Cao 등이 제시한 방법을 응용하여 bEPS만 추출하여 수득하였다(Zhang *et al*. 1999; Cao *et al*. 2005; Cao *et al*. 2011). 자세하게는 다음과 같이 진행하였다. 균체의 5배 Volum의 멸균 처리한 0.9% NaCl 용액을 넣고 교반하여 충분히 부유액을 만든 다음 원심 8000 rpm 4도씨 20분간 시행한 후 상등액을 버리는 방법으로 균체를 3회 반복하여 세척한다. 세척한 균체에 5배 Volum의 2% Na_2-EDTA를 넣고 교반한 다음 같은 양의 0.9% NaCl 용액을 넣고 30분간 125 rpm으로 진탕 교반한다. 진탕 교반 후 4도씨에 3시간 동안 보관하였다. 이 균체 부유액을 원심 8000 rpm 4도씨 20분간 시행한 후 상등액만을 회수하였다. 회수한 상등액을 0.2 μm 필터로 여과 후 spectra mwco 3500 투석막을 이용하여 투석하여 bEPS 수용액을 수득하였다. 수득한 bEPS 수용액을 전극 소재 용도를 고려하여 방사선 흡수선량이 최대 30 kGy가 되도록 감마선을 조사하였다. 이때 방사선 ^{60}Co gamma-irradiator (150TBq of capacity; ACEL, Canada)을 이용하여 조사하였으며, dose rate은 10 kGy h^{-1}로 하였다. 감마선 조사된 수용액을 동결 건조하여 최종 산물을 수득하였다(Fig. 1).

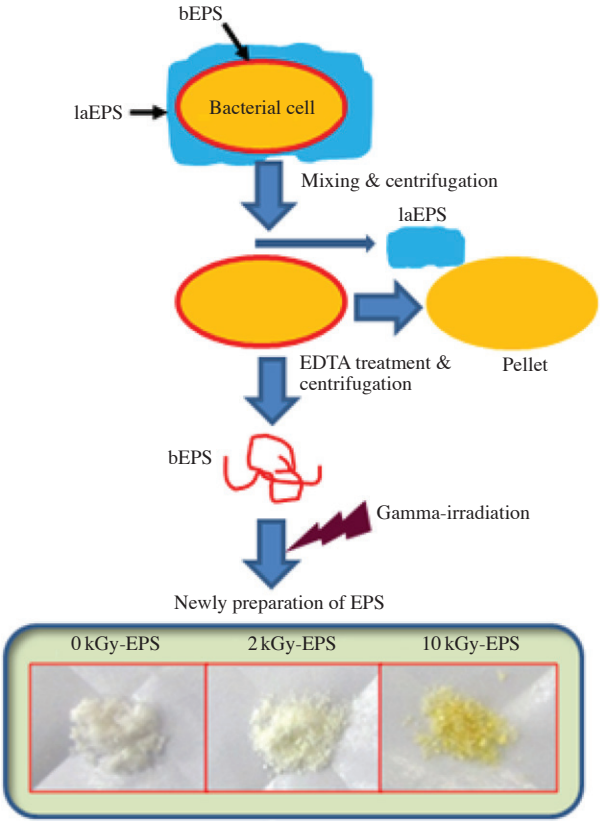

Fig. 1. Preparation of various bEPS by using gamma-irradiation technique. bEPS was extracted from *Shewanella putrefaciens* broth culture and irradiated with gamma-ray at room temperature.

2. 기기분석

동결건조한 bEPS 바이오필름 표면의 형태를 분석하기 위

하여 전방계주사현미경(FE-SEM, SU-70, HITACHI Ltd., Japan)과 사용하였으며 FT-IR (Thermo nicolet 5700, USA)을 이용하여 방사선 조사에 의한 구조 변화를 분석하였다. 전기전도도(Conductivity)를 측정하기 위하여 동결건조한 bEPS를 고운입자 상태로 준비하여 지름 14 mm의 원형 pellet으로 제작한 후 2.5톤의 압력으로 1차 프레스 후 5톤의 하중으로 약 1분간 압력을 가했다. 측정법은 Van der PauW 기법으로 하였으며 장비는 K4200 SCS (Keithley Instrument Coporation, USA)를 이용하여 측정하였다.

결 과

최종 수득산물을 관찰한 결과 방사선을 조사하지 않은 bEPS 물질은 백색이고 고운 입자 형태를 이루고 있으나, 감마선을 조사하여 흡수선량이 30 kGy에 이른 bEPS 물질의 경우, 입자의 색상이 짙은 황색을 띠기 시작하고 입자가 모여 칩 형태가 형성되었다. 그러나 10 kGy 이하의 흡수선량으로 조사된 경우는 고운 입자상으로 유지하고 있는 것을 알 수 있었고 방사선의 흡수량 크기에 따라 입자의 색상이 황색으로 변색되었다(Fig. 2a). 반면에 FE-SEM 사진으로 분석해보면 방사선 흡수선량이 증가하면서 10 kGy 이상에서는 균일한 필름 상으로 변화하는 것을 명확히 확인할 수 있었다(Fig. 2b). 그러므로 10 kGy구 이상 고른 형태의 폴리머 필름형상이 이루어지며 30 kGy구부터는 이러한 필름 상들이 모여 칩 형태를 이루고 있음을 알 수 있었다.

Table 1은 감마선을 조사하여 각각 0 kGy 및 2 kGy, 10 kGy 흡수선량에 이른 bEPS 물질의 전도성 측정 결과이다. 전도성 평가를 위하여 1.00×10^{-9} A의 인가전류를 사용하였고 전도성 평가는 실온에서 이루어졌다. *Shewanella* 세균으로부터 추출한 bEPS에 방사선 조사 처리한 경우, 모든 처리구의 전기전도도는 거의 변함이 없었다. 비조사구, 조사구 모두 전극 소재나 전도성 생체 적합성 소재 등 신소재로 적용 가능한 1.0×10^{-7} S cm^{-1} 전후의 전기전도도를 나타내었

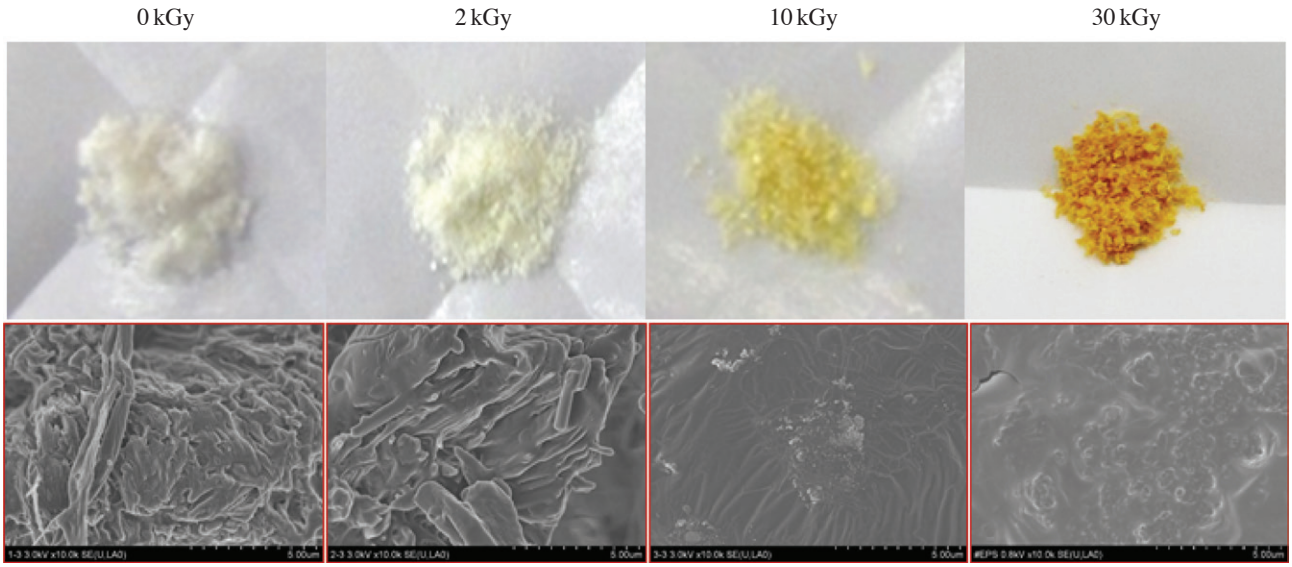

Fig. 2. FE-SEM images of various EPS by using gamma-irradiation technique. EPS was extracted from *Shewanella putrefaciens* broth culture and irradiated with 0, 2, 10, and 30 kGy at room temperature.

Table 1. Conductivity measurement of gamma-irradiated EPS[a] using Nander PauW method.

Samples[b]	Thickness (mm) / Diameter (mm)	Source current (A)	Resistivity (Ω cm)	Conductivity (S cm^{-1}) at room temperature
EPS-0 kGy	0.27 / 14.5	1.00×10^{-9}	1.44×10^{8}	2.12×10^{-7}
EPS-2 kGy	0.36 / 13	1.00×10^{-9}	1.61×10^{8}	1.92×10^{-7}
EPS-10 kGy	0.36 / 10.2	1.00×10^{-9}	4.82×10^{7}	5.38×10^{-7}
Ethyl cellulose	0.41 / 14	1.00×10^{-9}	7.63×10^{9}	2.65×10^{-9}
Curdlan	0.30 / 12.7	1.00×10^{-9}	5.00×10^{9}	8.13×10^{-9}

[a] Extracellular Polymeric Substance (EPS) was extracted from *Shewanella putrefaciens* broth culture.
[b] EPS-0 kGy; non-irradiated EPS, EPS-2 kGy; 2 kGy irradiated EPS, EPS-10 kGy; 10 kGy irradiated EPS.
[b] Ethyl cellulose is used as a binder for dye-sensitized solar cell (DSSC) preparation.
[b] Curdlan (or beta-1,3 glucan) is a biodegradable polymer bacterial extracellular production.

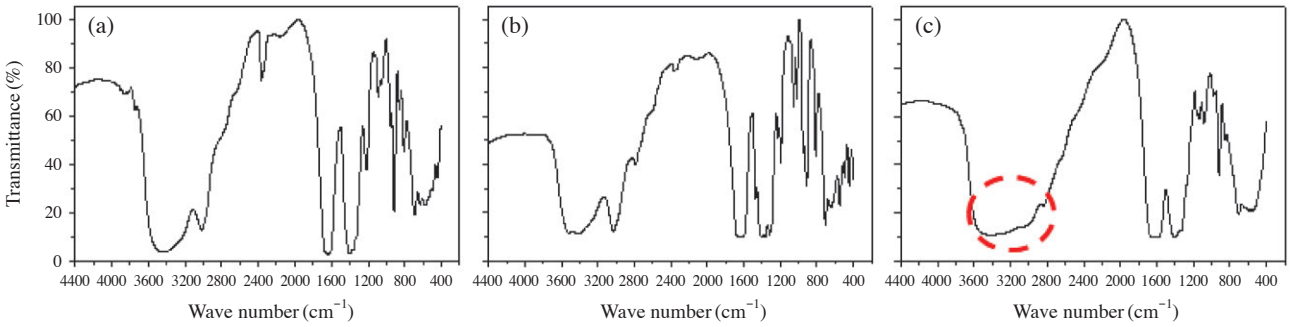

Fig. 3. FTIR spectra of various EPS by using gamma-irradiation technique. Non-irradiated EPS (a), 2 kGy-irradiated EPS (b), and 10 kGy-irradiated EPS (c). Extracellular polymeric substance (EPS) was extracted from *Shewanella putrefaciens* broth culture.

으나, 태양전지 전극 페스팅 폴리머인 Ethyl cellulose와 미생물유래 식용폴리머인 Curdlan은 1.0×10^{-9} S cm^{-1} 전후의 전기전도도를 나타내었다.

구조 변화를 보기 위하여 감마선을 조사하여 각각 0 kGy 및 2 kGy, 10 kGy 흡수선량에 이른 bEPS 물질의 FTIR 분석을 하였다. 2800~3200 cm^{-1}, 1400~1600 cm^{-1}, 400 cm^{-1} 내외의 스펙트럼 변화를 통하여 구조적 변화가 있었음을 예측할 수 있었다. 이러한 구조적 변화는 EPS의 카르복실 그룹, 아미노 그룹, 수소 결합의 변화(증가 또는 감소)가 있음을 추찰한다. FTIR 분석에서 10 kGy 이상 30 kGy 이하 흡수선량에 이른 bEPS 물질 사이에의 변화는 없었다.

고 찰

이상의 결과로부터 *Shewanella* 세균유래 bEPS 물질에 방사선 조사를 하면 물성 변화를 유도하면서도 전기저항 및 전기전도도 등의 전기화학적 특성적으로는 손상이 없는 것을 확인하였다(Fig. 2, Table 1). FTIR 분석에서 2800~3200 cm^{-1}, 1400~1600 cm^{-1}, 400 cm^{-1} 내외의 스펙트럼 변화를 통하여 구조적 변화가 있었음을 예측할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 구조적 변화는 EPS의 카르복실 그룹, 아미노 그룹, 수소 결합의 변화(증가 또는 감소)가 있음을 추찰한다. 최근 bEPS의 구조변형에 시도들이 보고되어 졌다. *Shewanella xiamenensis*의 배양 시 배양액에 CaCl의 첨가하면 bEPS의 형태와 구조가 변화하였다(Chena *et al*. 2015). 즉, Ca^{++}이온 자극에 의하여 bEPS가 넓은 필름상 구조에서 나노 필라멘트상 구조로 변화하였다. 본 연구에서도 10 kGy 고선량 방사선 조사에 의해서 bEPS 필름상에서 나노 구조체가 형성되는 것이 관찰되었다(Fig. 2b). 이상의 결과들은 방사선을 이용한 바이오유래 생체친화적인 전도성 나노구조체를 개발할 수 있음을 시사하고 있다.

본 연구를 통하여, 미생물로부터 환경친화적이고 생체 적합성이 뛰어나면서 물성의 가변성이 가능한 전도성 바이오 폴리머 및 이를 포함하는 나노 복합체를 제조할 수 있음을 시사하였고, 향후 이 소재들을 태양전지 등 전자 소자, 의료용 나노 소재 및 나노 DDS 소재 등에 적용성을 검토하여야 하며 방사선을 이용하여 신규 bioelectronics 산업 원천소재로서 효율적 생산이 이루어져야 한다.

이를 위해서는 향후 *Shewanella*균 EPS 방사선 선량별 조사 후 전도성과 구조 변화 및 물성을 관찰함으로써 방사선 조사에 의해 달라지는 물성을 검토하여 방사선이 EPS 변화에 미치는 메카니즘 규명과 전기전도도를 유지하면서 다양한 구조변환을 할 수 있는지에 대한 추가 연구가 진행되어야 한다고 생각한다.

결 론

본 연구에서는 *Shewanella* sp 세균으로부터 추출한 EPS는 전기전도도를 가지며 방사선 조사를 하게 되면 전기전도성을 유지하면서도 새로운 물성을 갖는 바이오 유래 전도성 고분자 물질을 효과적으로 창출할 수 있음을 시사하였다. 방사선 조사에 의하여 제조된 전도성 EPS 바이오 물질은 태양전지 소재나 전도성 생체 적합성 소재, 나노 DDS (Drug Delivery System) 등 신소재로써 활용 가능하다. 나아가 향후 bioelectronics 산업 원천소재로서 사용할 수 있을 것으로 기대한다.

사 사

본 연구는 미래창조과학부 방사선기술개발사업 (No. 2015M2A2A6A03045350)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 저자들은 분석기기 사용을 도와주신 (재)대구나노테크노파크 나노융합실용화센터 박수현 님, 최경식 님과 전경수 님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

Aldeek F, Schneider R, Fontaine-Aupart M-P, Mustin C, Lecart S, Merlin C and Blocka J-C. 2012. Patterned Hydrophobic Domains in the Exopolymer Matrix of *Shewanella oneidensis* MR-1 Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**(4): 1400-1402.

Byun E-H, Kim J-H, Sung N-Y, Choi J, Lim S-T, Kim K-H, Yook H-S, Byun M-W and Lee J-W. 2008. Effect of gamma irradiation on the physical and structural properties of β-glucan. *Radiat. Phys. Chem.* **77**:781-786.

Cao B, Shi L, Brown RN, Xiong Y, Fredrickson JK, Romine MF, Matthew J, Marshall MS, Lipton S and Beyenal H. 2011. Extracellularpolymeric substances from *Shewanella* sp. HRCR-1 biofilms: characterization by infrared spectroscopy and proteomics. *Environ. Microbiol.* **13**(4):1018-1031.

Cao B, Ahmed B, Kennedy DW, Wang Z, Shi L, Marshall MJ, Fredrickson JK, Isern NJ, Majors PD and Beyenal H. 2005. Contribution ofextracellular polymeric substances from *Shewanella* sp. HRCR-1 biofilms to U (VI) immobilization. *Environ. Sci. Technol.* **45**:5483-5490.

Carpentier W, De Smet L, Van Beeumen J and Brige A. 2005. Respiration and Growth of *Shewanella oneidensis* MR-1 Using Vanadate as the Sole Electron Acceptor. *J. Bacteriology* **187**(10):3293-3301.

Chena T, Zhoua Y, Nga I, Yang C-S and Wangc H-Y. 2015. Formation and characterization of extracellular polymeric substance from *Shewanella xiamenensis* BC01 under calcium stimulation. *J. Taiwan Ins. Chem. Engin.* **57**:175-181.

Fredrickson JK, Romine MF, Beliaev AS, Auchtung JM, Driscoll ME, Gardner TS, Nealson KH, Osterman AL, Pinchuk G, Reed J, Rodionov DAM, Rodrigues JL, Saffarini DA, Serres MH, Sporman AM, Zhulin IB and Tiedje JM. 2008. Towards environmental systems biology of Shewanella. *Nature Rev. Microbiol.* **6**:592-603.

Lee JH, Kim MG, Yoo B, Myung NV, Maeng J, Lee T, Dohnalkova AC, Fredrickson JK, Sadowsky MJ and Hur HG. 2007. Biogenic formation of photoactive arsenic-sulfide nanotubes by *Shewanella* sp. strain HN-41. *PNAS* (104)**51**:20410-20415.

Marshall MJ, Plymale AE, Kennedy DW, Shi L, Wang Z, Reed SB, Dohnalkova AC, Simonson CJ, Liu C, Saffarini DA, Romine MF, John MZ, Beliaev AS and Fredrickson K. 2008. Hydrogenase and outer membrane c-type cytochrome-facilitated reduction of technetium (VII) by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Environ. Microbiol.* **10**(1):125-136.

Windt WD, Aelterman P and Verstraete W. 2005. Bioreductive deposition of palladium (0) nanoparticles on *Shewanella oneidensis* with catalytic activity towards reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls. *Environ. Microbiol.* **7**(3):314-325.

Zhang X, Bishop P and Kinkle B. 1999. Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in iofilms. *Water Sci. Technol.* **39**:211-218.

Received: 18 April 2016
Revised: 25 May 2016
Revision accepted: 30 May 2016