2003년도 대한전기학회 하계학술대회 논문집 2003.7.21-23

효소 고정화 방법에 따른 콜레스테롤 센서의 감도 특성

송민정, 윤동화, 진준형, 민남기, 홍석인*
고려대학교

The senstivity characteristics of cholesterol sensor by immobilization methods of the enzyme

Min-Jung Song, Dong-Hwa Yoon, Joon-Hyung Jin, Nam-Ki Min, Suk-In Hong*
Korea University

Abstract - 최근 콜레스테롤 센서는 전극 상에 효소를 고정화 하는 방식을 이용하여 센서의 집적도를 높이는 시도가 이루어지고 있다. 이러한 전극 상의 효소고정화 방식으로 entrapment, cross liking, covalently binding 등이 있다. 본 논문에서는 이러한 효소 고정화 방식-전도성 고분자인 P3MT를 사용하여 entrap시키는 방법과 silanization을 이용한 covalent bonding 시키는 방법-에 따른 전기화학 센서의 감도 특성에 관한 연구를 수행하였다. 전도성 고분자를 사용한 고정화 방법은 cyclic voltammograms으로 scan rate 10 mA/s, potential 0.5-1.3V의 조건하에서 P3MT를 polymerization하고, 효소 고정화를 위해 chromoampermeter로 potential 0.6V에서 900초 동안 수행하였다. silanization을 이용한 covalent bonding 시키는 방법은 nitric acid로 Pt 전극 표면을 산화시키고, APTER로 silanization 공정을 시행하였다. 효소 고정화를 위해 전해질로는 0.1M phosphate buffer solution을 사용하여, cyclic voltammograms으로 scan rate 50 mA/s, 전위 0.0-0.7V의 조건 하에서 수행하였다. 이 결과, 전도성 고분자를 이용한 고정화 방법에서의 senstivity가 0.89 ㎂/mM·㎠이고, silanization을 이용한 효소 고정화 방법에서는 1.51 ㎂/mM·㎠였다. 이처럼 후자의 방법에서 더 좋은 감도 특성이 나타났다. 따라서, silanization을 이용한 고정화 방법이 센서 제작 방식으로 더 적합하다고 사료된다.

1. 서 론

콜레스테롤은 모든 동물 세포에서 필수적인 구성 성분으로, 콜레스테롤의 농도 결정은 임상적으로 매우 중요하다. cholesterol의 비정상적인 농도는 갑상성 항진증, 빈혈증, 심장 질환 등을 야기시킬 수 있기에, cholesterol의 빠르고 정확한 농도 측정은 이런 치명적인 질병의 진단을 쉽게 할 것이다.
효소의 화학적 반응을 이용한 전기적 센서들은 선별적 감지와 빠른 감지 시간 등과 같은 잇점 때문에 최근에 많이 연구되고 있다[1]. 따라서 전기 화학적 센서 제작에 있어서 효소 고정화 방법은 센서의 감도에 있어 크게 좌우한다. 전도성 고분자를 이용한 효소 고정화 방법은 가장 손쉬운 방법으로 효소를 고정화시키는데도 유용하다. 반면에 free radical들로 인해 효소의 변질을 야기할 수 있으며, 누출에 의한 효소의 활성을 저하시키기도 한다. 또 다른 효소 고정화 방법인 silanization 공정은 전극 표면에 silane기를 고정시켜 그 작용기에 효소를 covalent binding시키는 것이다. 이는 짧은 chains을 가진 고분자의 표면에 효소를 직접 결합시키기 때문에 효소 자체에도 좀 더 자연적인 환경을 제공할 수 있어 안정성을 증가시키고, 더 높은 효율을 가질 수 있다[2]. 그렇지만, 공정이 너무 복잡하고 많은 시간이 소비된다는 단점들을 가지고 있다. 이런 효소 고정화 방법을 이용하여 그에 따른 감도를 비교하고자 한다.
콜레스테롤 센서는 일반적으로 콜레스테롤과 O_2가 cholesterol oxidase에 의해 반응하여 H_2O_2가 생성되게 된다.

enzymatic response curve:

$$Cholesterol + O_2 \xleftrightarrow{COX} Cholest-4-en-3-one + H_2O_2$$

이 때 생성된 H_2O_2를 enzyme electrode에서 amperometric current method에 의해 감지함으로써, 신호를 검출한다.

2. 실 험

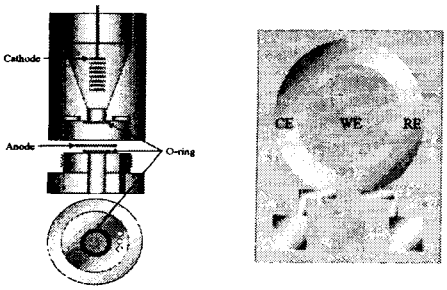
2.1 재 료

Streptomyces sp.로부터 생산되어진 25U/mg protein 농도의 cholesterol oxidase (ChOx, EC 1.1.3.6, C-8649)와 cholesterol (C-8667) 그리고 non-ionic surfactant인 Triton X-100은 모두 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하였다. 0.01M cholesterol stock solution은 65℃에서 pH 7.0인 10% (m/v) Triton X-100을 첨가한 0.05M phosphate buffer (PB)으로 제조하였다. 이 용액은 4℃의 어두운 곳에서 저장하며, 10-15일 동안 안정하다.
희석된 cholesterol solution은 1% (m/v) Triton X-100을 포함한 0.05M PB을 이용하여 stock을 만들었다. poly-3-methylthiophene (P3MT)는 Aldrich chemicals Co. Inc.로부터 구입하였다. polymerization 과정에서 사용되어진 electrolyte는 0.1M $NaClO_4 \cdot H_2O$와 0.1M P3MT를 acetonitlie에 녹여서 만들었다. 이 때 사용된 acetonitlie는 Daejung Chemicals로부터 구입하였다. silanization 공정을 위한 potassium dichromate, nitric acid, 3-aminopropyl-triethoxysilane (APTES), 25% glutaraldehyde solution 등 모든 시약은 Junsei Chemicals Co. Ltd.로부터 구입하였다.

2.2 효소 고정화

2.2.1. 전도성 고분자를 이용한 효소 고정화

전형적인 3개 전극을 사용하여 전기 화학 cell (그림 1)에 로딩을 한다. 이 때 사용되는 3개의 전극은 Pt 작업 전극과 상대 전극으로 Pt wire, 기준 전극으로 saturated calomel electrode (SCE)를 사용했다.
우선 Pt 특성 peak를 잡기 위해 0.5M H_2SO_4을 electrolyte로 사용하여 cyclic voltammogram으로 scan rate 50mV/s, 0.0~1.5 V 하에서 5회 수행되었다.
P3MT의 polymerization 공정은 cyclic voltammetry를 이용하여 scan rate는 10mA/s, 0.5~1.3V 하에서 수행하고, 효소를 고정화하기 위해 0.7V 하에서 900s 동안 chromoamperommetry로 cholesterol oxidase를 고정화시켰다.



(a) (b)

그림 1. (a) 전기 화학 cell 모식도, (b) 전극 구조 [3].

2.2.2. Silanization 공정을 이용한 효소 고정화

그림 2는 Pt가 증착되어진 전극 위에 효소를 covalent binding method인 silanzation 공정을 하기 위한 개략적인 scheme이다. Pt 작업 전극을 산화시키기 위해 15% nitric acid에 potassium dichromate를 첨가시켜 5% 용액을 제조하고, 전극을 넣어 80℃에서 2시간 동안 처리한다. 이를 pH 6.8의 2% APTES 수용액에 37℃ 하에서 11시간 동안 담가둔 후 silane layer의 stability를 강화시키기 위해 120℃의 oven에서 30분 동안 넣어둔다. 이를 25% glutaraldehyde solution에 1시간 동안 담구어 처리한다. 이런 silanazation 공정 후 CV를 이용하여 효소를 고정화 시킨다. 이 때 scan rate 50mV/s, 0.0~0.7V 하에서 pH 6.0의 0.1M PB를 electrolyte로 사용하였다. 효소 고정화 후 전도성 고분자를 사용한 효소 고정화법에서와 같이 농도별로 감도를 측정하였다.

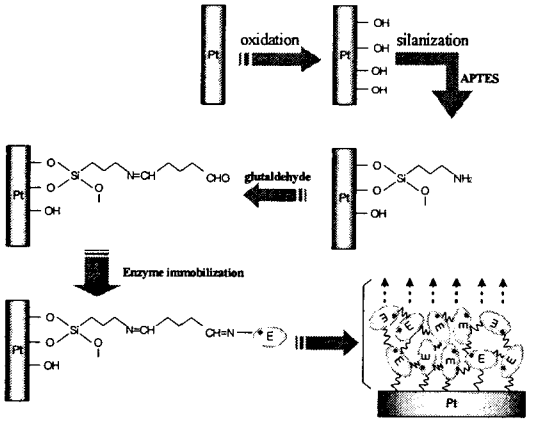


그림 2. cholesterol oxidase 고정화를 위한 silanization 공정

2.3. 전기 화학적 측정

전기화학적 측정은 Potentiostat (VMP 40, Perkin Elner, USA)으로 수행하였다. CA를 이용하여 0.7V 하에서 600초부터 100초 간격으로 30분 동안 response를 측정하고, 또, 30분 동안 농도별로 senstivity를 측정하였다. 전도성 고분자를 이용한 고정화 방법과 silanization을 이용했을 때의 감도를 비교하였다.

3. 결 론

그림 3은 Ti가 증착되어진 실리콘 웨이퍼 위에 Pt 박막 전극의 특성 peak에 대한 것이다. 이는 0.5M H2SO4를 electrode로 사용하였으며, CV를 이용하여 scan rate 50mV/s, -0.25~1.15V 하에서 10회 scan한 것으로, 일반적으로 작업 전극의 표면을 세정하는 효과가 있다. 여기서 peak Ha와 Hc는 흡착되어진 hydrogen의 산화·환원을, peak Oa는 흡착된 oxygen의 생성, peak Oc는 산화층의 환원을 나타낸다.

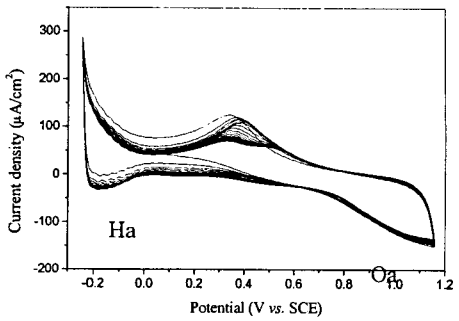


Figure 3. 0.5mol/L H_2SO_4 용액 scan rate 50mV/s 하에서 박막 Pt 전극의 cyclic voltammograms.

그림 4은 0.5~1.3V, scan rate 20 mA/s 하에서 CV를 이용한 15회 scan한 P3MT의 polymerization 공정을 나타낸다. 일반적으로 Pt 박막 전극에 전도성 고분자의 막 두께는 산화전류가 증가함에 따라 더욱 두꺼워진다.

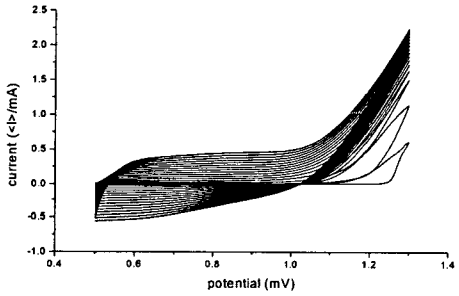


Figure 4. saline 용액, scan rate 50mV/s 하에서 P3MT의 고분자화에 따른 cyclic voltammograms.

그림 5 는 전도성 고분자를 이용하여 효소를 고정화시킨 cholesterol sensor의 amperometric response를 나타낸 것이다. 이는 saline solution에서 0.7V 하에 600초부터 100초 간격으로 0.01M 콜레스테롤 용액을 100㎕ injection한 것이다.

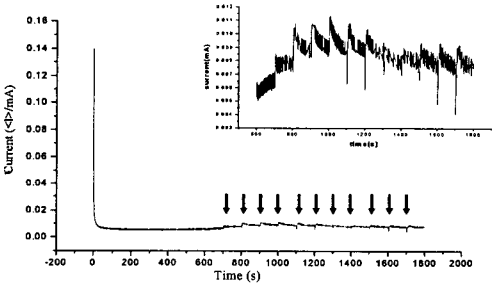


그림 5. 전도성 고분자인 P3MT를 이용한 효소 전극에서 100초 간격으로 콜레스테롤 주입 시 0.7V에서의 연속적인 amperometric responses.

그림 6은 silanization 공정을 이용하여 효소를 고정화시킨 콜레스테롤 센서의 연속적인 amperometric response를 나타낸 것이다. 이 역시 전도성 고분자를 이용했을 때와 마찬가지로 saline solution에서 0.7V 하에 600초부터 100초 간격으로 0.01M 콜레스테롤 용액을 100㎕ injection한 것이다.

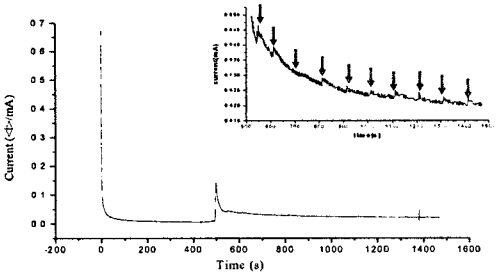


그림 6. silanization 공정 후 100초 간격으로 콜레스테롤 주입 시 0.7V에서의 연속적인 amperometric responses.

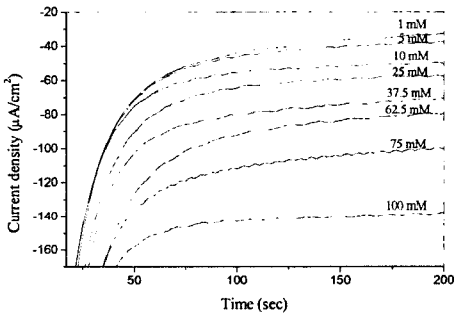


그림 7. 전도성 고분자인 P3MT를 이용한 효소 전극에서의 농도에 따른 senstivity

그림 7는 전도성 고분자를 이용하여 효소를 고정화시킨 콜레스테롤의 감도를 각각의 농도에 따라 측정한 결과이다.

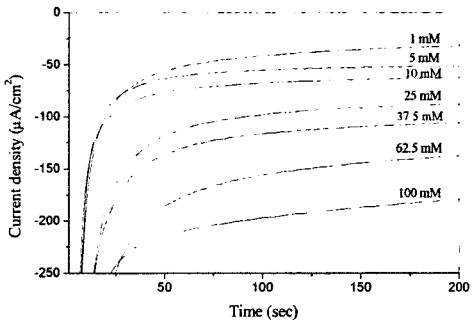


그림 8. silanization 공정을 이용한 효소 전극에서의 농도에 따른 senstivity

그림 8은 silanization 공정을 이용하여 효소를 고정화시킨 콜레스테롤의 감도를 각각의 농도에 따라 측정한 결과이다.

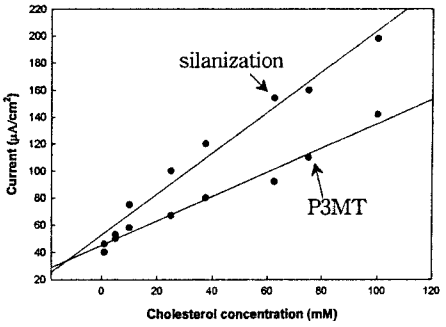


그림 9. 전도성 고분자인 P3MT를 이용한 효소 전극과 silanization 공정을 이용한 효소 전극에서의 콜레스테롤 농도에 따른 calibration curve.

그림 9는 두 효소 고정화 방법을 이용했을 때, 얻은 calibration curve이다. 전도성 고분자를 이용한 효소 전극에서의 senstivity는 0.89 ㎂/mM · ㎠이고, silanization 공정을 이용한 효소 전극에서의 senstivity는 1.51 ㎂/mM · ㎠이였다. 결과에서 보는 것처럼 센서의 감도 특성 비교 결과 전도성 고분자를 이용한 효소 고정화 방법보다는 silanization 공정을 이용하여 효소를 고정화 시킨 방법이 더 좋게 나왔다.

그림 9는 농도에 따른 response time을 나타낸 것이다. 결과에서 보듯이 response time은 약 50s로, 농도에 상관없이 같기 때문에 센서로써 이용이 가능하다.

4. 감사의 글

본 연구는 한국 과학 재단 목적 기초 연구 사업 (R01-2002-000-00591-0) 지원으로 수행되었음.

[참 고 문 헌]

[1] K. Vengatajalabathy Gobi, Fumio Mizutani, "Layer by layer construction of an active multilayer enzyme electrode applicable for direct amperometric determination of cholesterol", Sensors and Actuators B, Vol. 80, 272-277, 2001

[2] Kumaran Ramanathan, Shyam S. Pandey, Rajesh Kumar, Anamika Gulati, A. Surya, "Covalent Immobilization of Glucose Oxidase to Poly(O Amino Benzoic Acid) for Application to Glucose Biosensor", Journal of Applied Polymer Science, Vol. 78, 662 667, 2000

[3] Joon Hyung Jin, Nam Ki Min, Chul Goo Kang, Sung Ho Park, Suk In Hong, "Characteristics of Urea sensor based on Platinum Deposited Porous Silicon", *Journal of the Korean Physical Society*, Vol. 39, pp. S67~S69, 2001