

고정화 효소전극을 이용한 포도당분석

장호남 · 주대권 · 김영성

= Abstract =

Glucose Analysis Using Free and Immobilized Glucose Oxidase Electrode

Ho-Nam Chang, Dae-Kwon Joo, Young-Sung Ghim

Glucose oxidase from *A. niger* was entrapped in polyacrylamide gel which was used in the enzyme electrode for glucose analysis. The electrode was assembled by placing the gel between the membranes on the surface of a Clark type electrode. In order to make it possible to analyze the experimental results later, the stagnation flow was adopted where the governing fluid mechanics were well known.

The current increased with the increase concentration in the bulk below a certain level of glucose concentration beyond which no more current increase was observed. This is probably due to the diffusion limitation of oxygen from the bulk solution. Also the current increased with the enzyme loading in the gel, but the linearity between the current and the glucose concentration was rather limited to a narrow range.

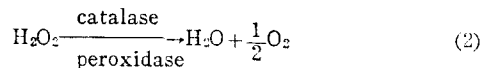
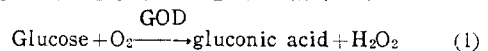
Flow rate was found to be very important, which means that film diffusion is very important under the flow rate of 5cm/sec. As a conclusion, enzyme loading, gel layer thickness, stirring speed and bulk concentration of glucose were found to be most important parameters in yielding a linear current response with respect to the bulk glucose concentration.

1. 서 론

혈액내의 포도당 분석은 시약을 사용하는 습식법, 효소를 사용하는 효소법, 그리고 효소와 전극을 같이 이용하는 효소 전극법등이 있다¹⁾. 이 중 효소전극법은 머릿의 시료만을 필요로 하고 전극을 이용하기 때문에 신속·간편하여 현재 널리 보급되고 있는 추세이다.

효소전극법은 현재 두가지 형태로 쓰이고 있는데 glucose oxidase (GOD)를 액상에 사용하는 방법과 polyacrylamide gel 속에 고정화시켜 사용하는 고정화 효소법²⁾이 있다. 이 두방법은 다같이 GOD에 의한 포

도당의 산화반응에 기초를 두고 있다. 즉



catalase가 없는 경우는 포도당 한분자와 산소 한분자와 반응하게 되나 다시 H₂O₂가 분해되면 1/2 O₂가 생기게 됨으로 결국 H₂O₂가 분해되던 포도당 한분자당 산소 한분자가 소모되게 된다. 과산화 전극의 경우는 H₂O₂의 분해반응을 Pt 전극이나 glassy carbon 표면에서 일으켜서 이 때 나오는 전류를 측정한다.

(1), (2)식을 수식화하면

$$-\frac{d[G]}{dt} = V_o \frac{[O_2][G]}{[O_2][G] + K_G[O_2] + K_{O_2}[G]} \quad (3)$$

$$-\frac{d[O_2]}{dt} = -\frac{1}{2} \frac{d[G]}{dt} \quad (4)$$

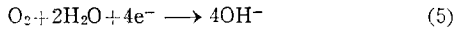
<1982. 11. 30 접수>

한국과학기술원 화학공학과

Dept. of Chemical Eng., KAIST.

여기서 $[G]$, $[O_2]$ 는 glucose 와 산소의 농도를 각각 나타낸다.

전극을 사용하여 (1), (2)반응에서 생기는 전류를 측정하는 경우는 물질전달에 대한 효과와 전극표면을 보호하기 위하여 막을 사용하며 이 때 전극표면에서 일어나는 반응은



산소의 측정원리와 유체역학과의 관계에 대한 해석은 국내에서도 이미 연구된 바 있다.^{3,4)} 이 때 측정되는 전류는

$$i_t = NFA D_m \left(\frac{\partial C_m}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (5)$$

전류는 전극표면적(A), 막과 유체경계층 사이의 물질전달, 용액중의 산소농도에 비례한다⁵⁾.

1967년 Hicks 와 Updike⁶⁾에 의해 효소전극을 이용하여 포도당의 농도분석을 시도한 이후 이에 대한 연구가 많이 이루어져 왔고 현재 상용화되어 있는 실정이다.

본 연구는 이러한 효소전극을 이용한 포도당 분석기의 국산화에 목표를 두고 free GOD와 고정화 GOD를 이용하여 유체역학이 잘 알려진 정체류⁷⁾를 사용하여 실험적으로 중요한 인자를 찾아내고자 하는데 목적이 있다. 이런 실험결과를 기초로 하여 차후에 전달현상이론을 이용하여 체계적으로 분석하면 보다 나은 효소전극의 제작에 많은 도움이 될 줄 믿는다.

2. 효소 전극

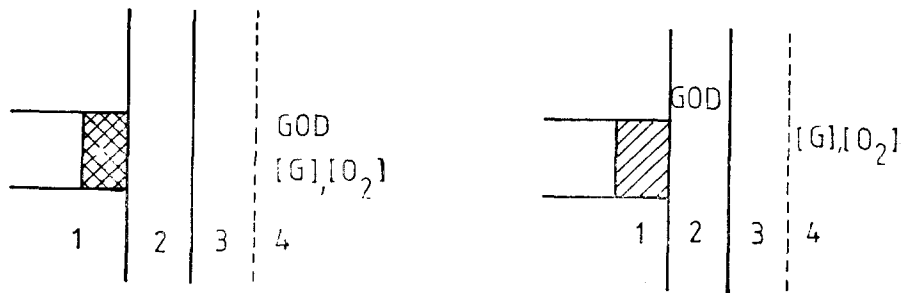
그림 1에는 용액중에 효소를 사용하여 측정하는 방법(그림 a)과 고정화효소를 사용하는 방법의 모식도가 나와있다(그림 b). 둘다 산소농도를 측정하지만 a의 경우는 GOD가 용액속에 있고 b의 경우는 GOD가 gel 속에 고정화되어 있는 점이 다르다. 전류와 포도당 농도를 결정하는 방법으로는 direct response method, derivative method, integral method, difference method 등⁸⁾이 있고 다시 direct response method에는 one, two, multi point method가 있다. 그리고 전극으로는 산소전극(주로 0.8V 근처에서 사용함), 과산화수소 전극(주로 0.6V 근처에서 사용함)이 있으며 전류법이 많이 쓰이기는 하지만 전위차법도 쓰이고 있다.

본 연구에서는 산소전극을 이용한 전류법을 사용하여 recorder에 current response를 직접 기록하는 방법을 사용하였다.

3. 실험

3-1. Membrane covered electrode 및 효소전극 제작

본 실험에서 제작사용한 전극은 Clark type 전극(그림 2)으로서 음극으로 백금 원판(직경 5mm)과 양극으로는 Ag/AgCl로 구성되어 있으며 자세한 제작방법은李의 논문⁷⁾에 기술되어 있다. 사용한 membrane



(A) SOLUBLE ENZYME METHOD

(B) IMMOBILIZED ENZYME METHOD

그림 1. 포도당 농도분석을 위한 효소전극

Fig. 1. Schematic diagram of electrode and enzyme system for glucose analysis.

(1) Pt-electrode (2) membrane (3) stagnant fluid layer (4) bulk fluid.

으로는 유리효소(free enzyme)에 대하여는 polyethylene film(33 μ , 럭키화학)을 사용하였고 고정화효소전극은 제 I membrane 으로 polycarbonate film (20 μ) 과 제 II membrane 으로는 teflon film (25 μ , YSI, U. S. A.)을 사용하였다. 두 membrane 사이에 0.5mm (500 μ)의 gel type 고정화효소를 넣었다.

3-2. 유리효소(free enzyme)에 대한 실험

2ml 용량의 bulb 형 반응기를 사용하여 25°C에서 반응을 진행하였다. Magnetic stirrer의 속도는 300 r.p.m. 이상으로 물질전달의 영향이 최소한이 되도록 하였으며 음극에는 potentiometer (Biddle Cat. 72—312—01, U.S.A.)를 사용하여 0.8V를 걸어 주었다.

기질로서 포도당은 pH5.5, 0.05M citrate-phosphate buffer에 용해시켰으며 anomer 간의 평형을 위하여 하룻밤 지나게 한후 사용하였다. 반응기내에 포도당용액을 넣고 폭기 한후 미국 Sigma사의 GOD(A. niger)제품의 14,600 units/g을 사용하고 발생하는 H₂O₂를

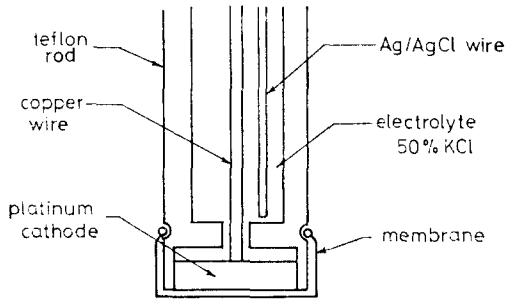


그림 2. 클라크형 전극

Fig. 2. Clark type electrode with large cathode.

제거하기 위하여 catalase 10 unit을 첨가하였다.

3-3. 효소의 고정화 과정

Polyacrylamide 지지물에 GOD를 Updila와 Hicks의 방법⁹⁾에 따라 고정화 시켰으며 자세한 것은 朱의 논문⁹⁾에 기술되어 있다.

3-4. Stagnation flow system에 대한 장치 및 실험 방법

(1) Stagnation flow chamber.

그림 5는 flow chamber의 형태를 보인 것이다. 기질은 아래 연결된 관(외경 5.5mm)을 통하여 윗쪽으로 흐르면 이 유체는 전극에 부딪혀 이 것이 stagnation flow를 일으킨다. Stagnation flow에서의 물질전달해석은 추와張¹⁰⁾에 의하여 이루어졌고 stagnation flow의 ideality에 대하여는 Ghim과 Chang⁹⁾이 수치를 통하여 밝힌 바 있다.

그림 6에 실험의 계통도가 나와있고 유속 변화의 범

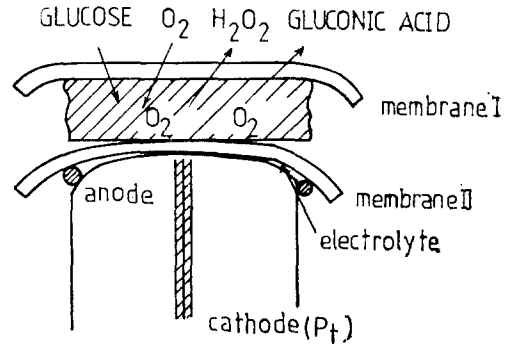


그림 3. 고정화시킨 포도당산화효소전극의 작용도
Fig. 3. Schematic diagram for an enzyme electrode.

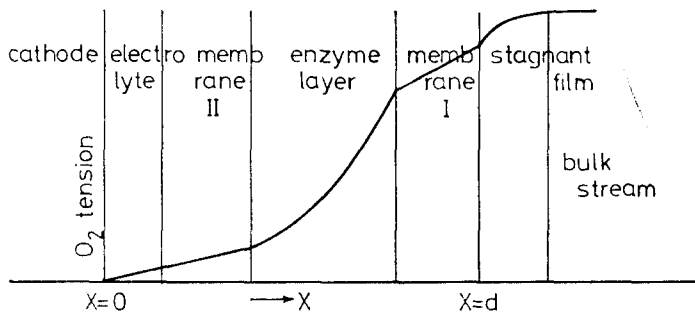


그림 4. 전극표면으로부터의 산소농도변화

Fig. 4. Oxygen tension profile over the whole layer.

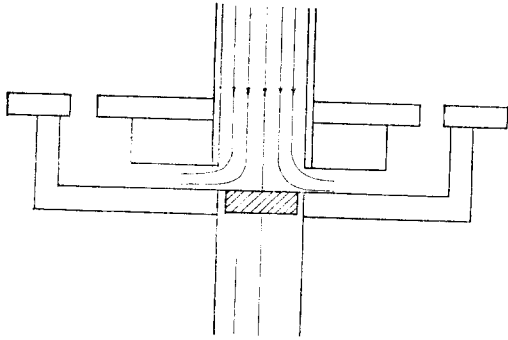


그림 5. 효소전극 주변의 정체류의 모습
Fig. 5. Schematic diagram of the stagnation flow chamber.

위는 0.02~15cm/sec 에서 행하였다.

4. 결과 및 고찰

4-1. 유리효소에 대한 전류반응(current response)

전위차에 따른 전류변화를 살펴보면 0.6~0.95V 사이에서 plateau 를 나타내었다. 따라서 이 polarogram 으로부터 0.8V 를 정하였다.

반응에 의한 산소감소에 의해서 흐르는 전류는 조금의 lag period 를 거쳐 급격히 감소한다. 전극을 통하여 흐르는 전류는 용액중의 산소농도에 비례하고 용액

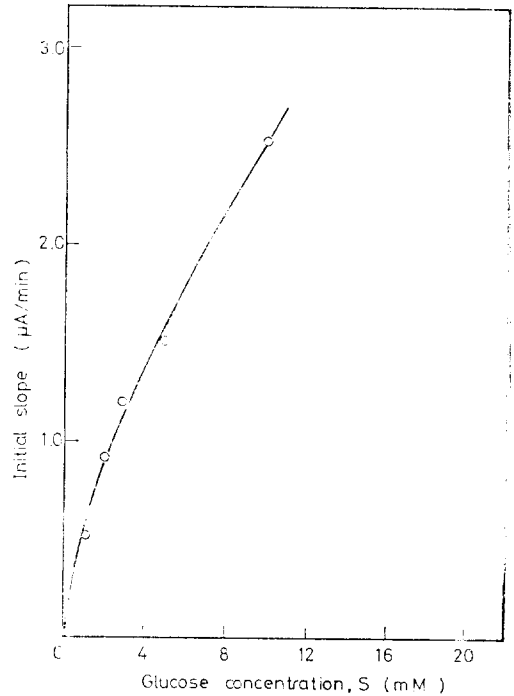


그림 7. 포도당농도에 따른 전류의 초기 기울기 변화

Fig. 7. Initial slope of the current response curve vs. glucose concentration.
 10 units of catalase, 1.45 units of glucose oxidase.

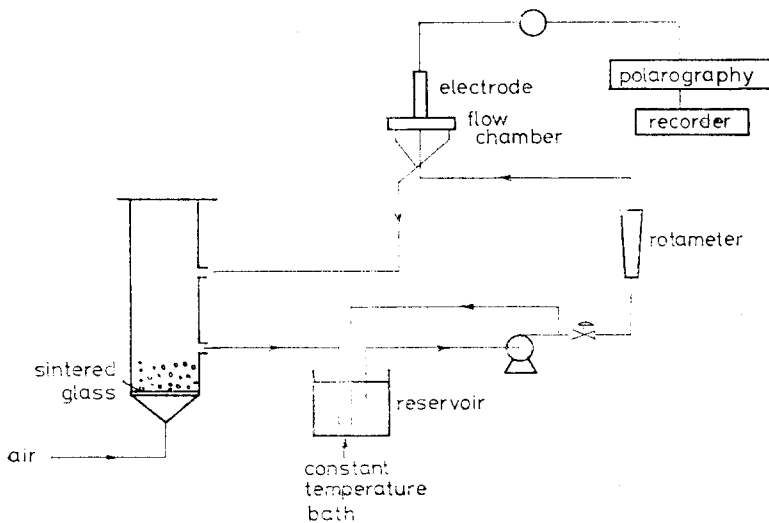


그림 6. 실험장치의 제통도
Fig. 6. Schematic diagram of the stagnation flow system.

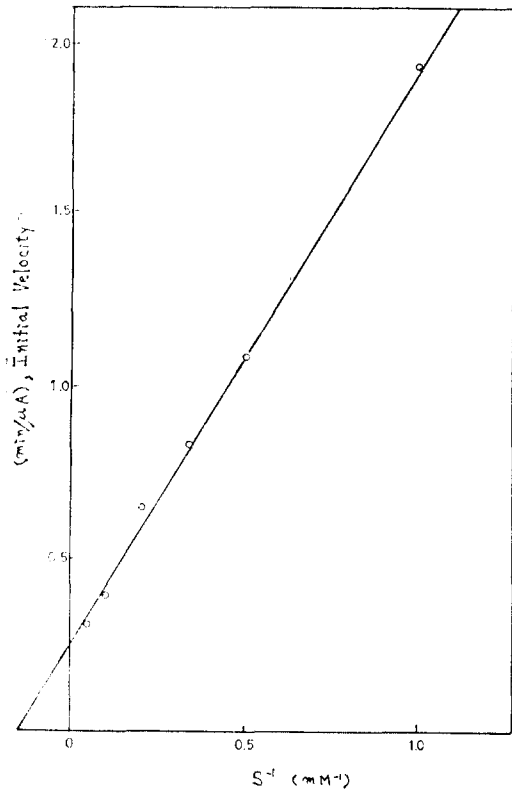


그림 8. 그림 7을 이용한 line weaver-burk
Fig. 8. Line weaver-burk plot of Fig. 7.

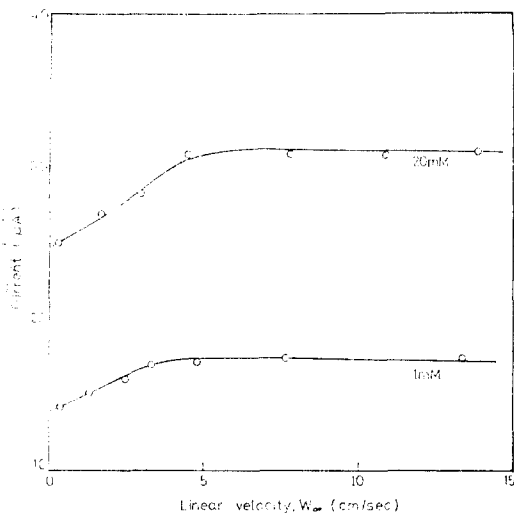


그림 9. 유속에 따른 전류의 변화
Fig. 9. Effect of external mass transfer for various flow rates.

중의 산소농도는 포도당의 양과 효소양에 따라 감소하므로 그림 7에 주어져 있다. 다시 이를 Line weaver-Burk plot 을 하면 그림 8과 같이 직선이 된다. 즉 산소농도를 포화 농도로 일정하게 하고 포도당 농도를 달리함으로써 포도당농도에 대하여 Michaelis-Menton 값이 적용됨을 보여 주며 여기서 구한 K_m 값은 6.7 mM이다.

4-2. 고정화효소전극에 대한 전류반응

(1) 유속변화에 의한 효과

Stagnation point flow 의 제일 큰 잇점은 유체역학을 정확히 알 수 있는데 있다³⁾. 그림 9에는 stagnation point flow 에서 정의된 linear velocity W_{∞} 에 따른 전류변화를 나타내고 있는데 포도당농도 1mM 인 경우는 W_{∞} 가 4cm/sec 이상에서, 그리고 20mM 인 경우는 5cm/sec 이상에서 plateau 를 보여주고 있다. 따라서 W_{∞} 를 5cm/sec 이상으로 유지하는 경우는 external mass transfer 의 영향을 받지 않는 전류를 관찰할 수 있다.

(2) 기질과 효소농도에 따른 변화

그림 10에는 기질과 효소의 농도에 따라 전류가 어떻게 변하고 있나를 보여주고 있다. 과산화 수소의 발생율은 높은 포도당 농도에서 그리고 높은 효소농도에서 많이 발생하므로 전류반응이 산소농도에 의한 것보

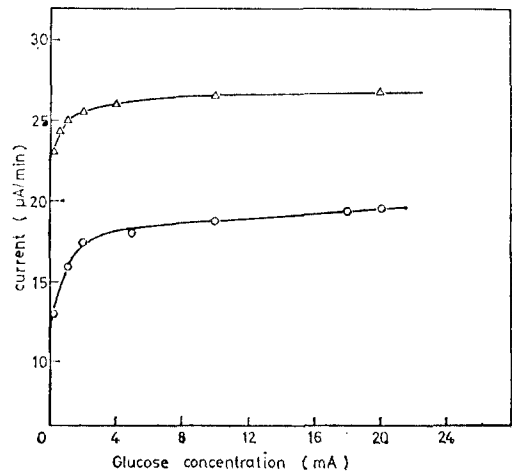


그림 10. 포도당농도변화에 따른 효소전극의 반응곡선

Fig. 10. Response curve of enzyme electrode
—△—: 3300mg glucose oxidase/100ml of gel
—○—: 2600mg glucose oxidase/100ml of gel.

다는 과산화수소의 분해에 의한 것으로 추측된다. 직선관계를 갖는 부분은 효소농도와 포도당농도가 낮을수록 유리한 것으로 보인다.

(1) 이상의 결과를 놓고 볼 때 이 실험결과를 설명할 수 있는 모델의 설정이 필요하며 이 모델에서 직선관계를 가지게해야 한다.

(2) 그러나 직선관계를 얻어내는 것이 중요하나 직선관계는 포도당농도, 효소의 활성도, 전극주변의 유체의 영향을 받음을 알았다.

(3) 따라서 넓은 범위에 걸쳐 직선관계를 갖는 system의 개발이 요청되며 이를 위하여는 모델설정을 한 후 최적화를 하여 실험하는 것이 바람직하였다.

참 고 문 헌

- 1) 정태화 : 임상 분석용 시약 및 자동 분석기, 한문회, "의료산업의 현황과 개발연구 방안에 관한 연구", KIST 연구보고서, 686~750, 1979.
- 2) Carr PW, Bowers LW : *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry, Fundamentals and applications*, John Wiley & Sons, N.Y. 1980.

- 3) 이창우, 장호남 : 정제류에서 피막전극에 대한 산소의 전달현상, 화학공학, 17, 117~124, 1979.
- 4) 손정영, 신문철 : 의료용 초소형 산소전극 제작을 위한 Clark 복합전극형 산소 Sensor 의공학회지, 1, 21~27, 1980.
- 5) Lee YH and Tsao GT: *Dissolved Oxygen Electrodes*, *Adv. Biochem. Eng.* 13, 35, 1979.
- 6) Hicks GP and Updike SJ: *The Enzyme Electrodes*, *Nature*, 214, 986, 1967.
- 7) 이창우 : *The Oxygen Transport to the Membrane Covered-Electrode in Stagnation Flow*, 한국과학기술원 화공과 석사논문, 1979.
- 8) 주대권 : *Stagnation Flow* 를 이용한 효소전극내의 물질전달효과, 한국과학기술원 화학공학 석사논문, 1981.
- 9) Ghim YS, and Chang HN: *Stagnation Point Flow in a Diffusion Cell*, *accepted for publication in Chemical Engineering Science.*