

인쇄기법에 의하여 제조된 L-Lactic Acid 센서의 전기화학적 특성

김 남 수
이화학연구부

1. 서론

바이오센서는 효소, 미생물, 동·식물체의 세포와 조직, 항체 등의 선택적 작용력을 이용하여 특정성분을 신속·정확히 측정하는 장치로서 식품 및 농업, 임상의학, 발효산업, 환경, 국방분야에 널리 응용될 수 있으며 이에따라 최근 수년간 바이오센서 분야의 연구가 현저히 증대되고 있다(Wagner 등, 1990). 바이오센서에 의한 계측의 일반적 특징으로는 사용이 간편하며 자동화가 가능하고 별도의 시료처리과정없이 직접측정이 가능하고 밀집된 구조를 가지므로 휴대화, 미소화할 수 있으며 계측의 신뢰성이 상대적으로 우수하다는 점을 들 수 있다(Byfield와 Abuknesha, 1994). 식품산업에 있어서는 공정제어, 원재료 및 제품의 품질관리, 과실 등과 같은 신선식품의 유통과정 중의 품질평가가 측면에서 금후 그 중요성이 한층 더 강조될 전망이다.

Clark와 Lyons(1962)에 의하여 glucose 센서가 최초로 선 보인 이래 glucose oxidase(GOD)를 이용한 새로운 형태의 바이오센서 개발(Bartlett 등, 1991; Cass 등, 1984; Mascini 등, 1989) 및 미소화(Mann-Buxbaum 등, 1990) 연구가 이루어졌다. 이처럼 GOD가 바이오센서 연구의 주

대상이 되어온 데에는 안정성이 뛰어나고 가격이 저렴한 효소자체의 특성과 산업적인 필요성이 일치한 데에 기인하였다. 그러나 최근 산업발달과 함께 바이오센서의 응용범위가 넓어지면서 식품·발효산업(Dremel 등, 1990; Park 등, 1993), 임상의학 분야 등(Kulys 등, 1993; Pfeiffer 등, 1992)에 사용될 수 있는 L-lactic acid 센서가 개발되고 있고 이들을 휴대화, 미소화할 수 있는 기술개발과 재현성 있게 1회용 칩화하는 연구가 진행되고 있다.

효소센서, 특히 전자전달체(artificial electron mediator)를 포함하는 효소센서의 경우 전자전달체를 안정화시키는 기술개발이 필수적이며 이에 전자전달체를 전극주위의 얇은 polymer층에 포집시키는 방법(Back 등, 1992; Wang과 Heller, 1993), 카본 페이스트 등에 균질하게 섞인 효소와 전자전달체에 paraffin유를 가하고 적당한 주형에서 압력을 가하여 몰딩하는 방법(Amine 등, 1991; Kulys 등, 1993) 등이 보고되고 있으며 효소에 전자전달체를 공유결합시켜 사용하는 방법도 생각해 볼 수 있다.

본 연구에서는 전자전달체인 ferrocene carboxylic acid(FCA)로 lactate oxidase(LOD)의 화학변형을 행하여 Fc-LOD를 얻고 이를 적절한 인쇄

용 잉크조성물을 사용하여 polyimide base film에 인쇄하여 1회용의 L-lactic acid 센서를 제조하고 그 센서특성을 간략히 검토하였기에 결과로서 보고한다.

II. 재료 및 방법

시약

LOD(from *Pediococcus* sp.)는 Asahi 화학의 것이었으며 ethylene glycol, sodium periodate, N-2-hydroxyethylpiperzine-N'-2-ethanesulfonic acid(HEPES), polyvinylbutyral, n-pentanol, sodium dihydrogenphosphate · 2H₂O, disodium hydrogenphosphate · 12H₂O는 Wako사로부터 구입하여 사용하였다. Adipic dihydrazide, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide(EDAC)는 Tokyo Kasei사의 것, FCA는 Sigma사의 것을 사용하였다. 모든 시약들은 별도의 정제과정 없이 사용되었다.

Fc-LOD 제조

LOD에 전자전달체인 FCA를 공유결합시키는 것은 adipic dihydrazide를 spacer로 하여 carbodiimide coupling 법에 의하여 다음과 같이 행하였다. 즉 LOD 20mg을 5ml 0.1M sodium phosphate buffer(pH6)에 용해시킨 후 sodium periodate를 2mM 농도로 가하고 서서히 교반하면서 4°C에서 1시간 반응시켰다. Ethylene glycol 500 μ l를 가하고 30분간 서서히 교반하여 반응을 중단시킨 후 동일 buffer를 사용하여 4°C에서 48시간 투석처리하였으며 이때 buffer의 교환은 최소 4회 이상 행하였다. 투석 완료된 효소용액에 adipic dihydrazide를 40mM 농도로 가하고 4°C에서 하룻밤 교반하면서 반응시켰다. 위와 같이 투석처리를 행한 후 EDAC, FCA, HEPES를 각각 7.5, 5, 54mM 농도로 가하고 pH를 7.2~7.3으로 조정하여 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 최종 투석 처리는 4°C에서 72시간 이상 행하였으며 동결건조 후 수율을 계산하였고 inductively coupled plasma(ICP) 분석에 의한 변형도 분석도 행하였다.

전극 제조

상용의 metal mask(280mm square, 500 μ m thick), polyurethane squeegee(sword type, 80mm length)가 인쇄공정에 사용되었다. 먼저 인쇄를 행하기 전 polyimide 필름에 최소 60줄의 얇은 구리 호일의 주형을 입히고 양끝의 접착부위에는 150 μ m 두께로 금 증착을 행하였다. 그 후 변형효소를 포함하는 잉크조성물을 metal mask를 통하여 금 증착된 polyimide 필름의 한쪽 끝으로 전달하고 수동조작으로 인쇄를 행하였다. 그 직후 냉풍을 가하여 용매 냄새가 나지 않을 때까지 건조시키며 건조 완료 후 실험에 사용하였다. 이때 사용된 잉크조성물의 성분들인 Fc-LOD, polyvinylpyrrolidone, polyvinylbutyral, n-pentanol의 사용비율은 각각 15.0, 10.6, 10.6, 63.8%(중량기준)였으며 센서 array로부터 절취된 단위센서칩의 구조는 그림 1과 같다.

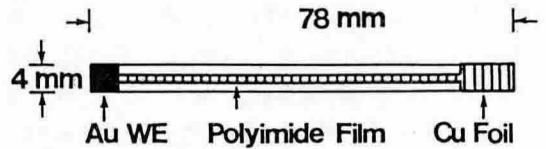


Fig.1 Overall view of working electrode for the screen-printed lactic acid sensor.

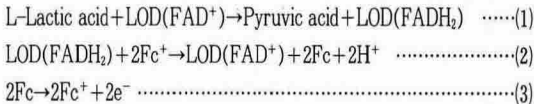
전기화학적 특성

용액상태의 Fc-LOD 및 센서칩의 전기화학적 특성은 Hokuto Denko 사의 HAB151 potentiostat를 사용하여 3전극법에 의한 cyclic voltammetry 분석과 일정전위 분석을 행하여 측정하였다. 금 disk 혹은 센서칩 작용극(working electrode, WE), 백금호일 대극(counter electrode, CE), 은/염화는 참조극(reference electrode, RE)(Toa 전자, model HS-907)을 0.1M sodium phosphate buffer(pH6) 3mL가 들어있는 반응용기에 담근 후 potentiostat에 연결하였다. 반응용기를 소형의 magnetic bar로 약하게 교반하면서

질소가스로 15분간 purging 한 후 측정을 행하였다. 이때 Graphtec WX1200 XY 기록계와 Toa 전자의 EPR-100A 기록계를 사용하였다.

작용원리

LOD는 분자질량이 370kDa이며(Bartlett and Caruana, 1994) 백금전극에 고정화된 상태로 대기 중에서 실온으로 40일간 보존시에도 활성의 손실이 전혀 없을 정도로 매우 안정도가 높은 효소이다(Kim and Karube, 1995). 한편 LOD는 flavin adenine dinucleotide(FAD)가 prosthetic group인 flavoprotein으로 효소분자 중의 산화형 FAD는 기질인 L-lactic acid로부터 전자를 받아 환원형 FAD가 되고 환원형 FAD는 반응용액 중의 산소를 환원시켜 과산화수소를 생성시키며 생성된 과산화수소는 산화전위에서 작용극 표면에서 산화되면서 전자를 방출하고 방출된 전자에 의하여 기록계에 전기화학적 신호가 표시되게 된다(Wang과 Heller, 1993). 그러나 본 실험에서와 같이 전자전달체를 사용하는 경우에는 과산화수소가 생성되지 않으며 환원형의 전자전달체의 산화가 작용극 표면에서 다음과 같이 일어난다.



이와같이 전자전달체를 사용한 L-lactic acid 센서의 경우에는 전자전달의 효율성을 극대화할 수 있어 측정전위값을 낮출 수 있으며 이에 따라 L-ascorbic acid 등에 의한 측정방해현상을 최소화할 수 있는 장점이 있다.

III. 결과 및 고찰

화학변형 후 얻어지는 Fc-LOD 중의 ferrocene 분자는 효소표면의 spacer 혹은 free NH₂기에 결합되며 효소의 활성중심과 전극 사이에서 전자전달의 relay로서 작용하게 된다(Badia 등, 1993). 본 연구에 있어 Fc-LOD의 수율은 1000% 가까이 이르렀는데 이는 투석에 사용된 buffer의 각종 성분

들이 건조 후 잔류한데 기인한다. 또한 LOD 1분자당 결합된 ferrocene 분자의 수는 ICP에 의하여 측정시 5.6 분자로 밝혀져 GOD를 같은 방법으로 변형시켰을 때의 결합 ferrocene 분자수인 19.8보다 현저하게 낮았는데(Nagata 등, 1994) 이는 LOD 표면에는 spacer 결합에 필요한 hydroxyl기가 부족하거나 free NH₂기의 상대빈도가 낮은 것을 의미하고 있다.

인쇄기법에 의하여 제조된 L-lactic acid 센서와 용액상태의 Fc-LOD의 cyclovoltammogram을 0~700mV에 걸쳐 비교하였다(그림 2).

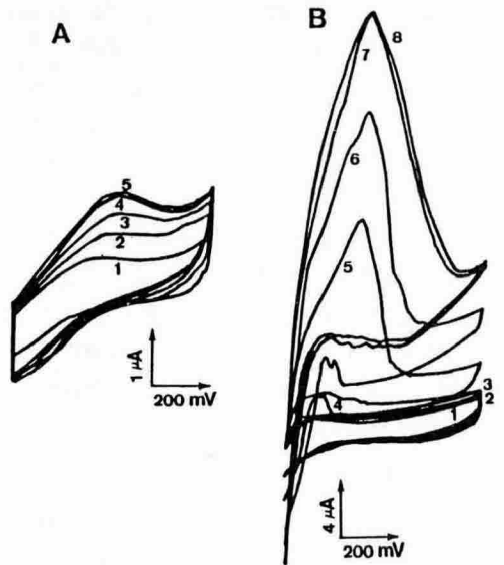


Fig 2. Cyclic voltammograms of Fc-LOD at scan rate of 5mV/s. A. Free Fc-LOD. 1, 2, 3, 4 and 5 indicate L-lactic acid concentration of 0, 33.11, 161.29, 222.93 and 253.16mg/dl. B. Immobilized Fc-LOD. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 indicate L-lactic acid concentration of 0, 33.11, 98.04, 161.29, 222.93, 283.02, 312.50 and 341.61mg/dl, respectively.

인산 buffer 중에서 측정시 센서와 용액상태의 Fc-LOD 분자는 모두 ferrocene 산화에 기인한

전류 peak를 보여주었는데 이는 본 실험의 센서가 L-lactic acid에 대하여 민감하게 반응함을 나타내고 있다. 한편 ferrocene 산화에 따른 전류 peak에서의 전위는 센서의 경우가 약 50mV정도 낮았는데 이는 고정화공정이 ferrocene의 산화전위를 낮춰줌을 의미한다. 또한 용액상태의 Fc-LOD의 경우 33.11mg/dl 농도의 L-lactic acid 존재하에서도 높은 전류반응을 보이며 L-lactic acid의 농도가 222.93mg/dl 이상일 경우 포화되나 센서의 경우는 161.29mg/dl 농도의 L-lactic acid 첨가까지 전류반응이 잘 감지되지 않으나 L-lactic acid의 농도를 이보다 더 높이면 현저한 전류반응의 증가가 관찰되었으며 312.50mg/dl의 L-lactic acid 농도까지 포함됨이 없이 전류반응을 보였는데 이 사실은 고정화 matrix 자체가 확산조절 기능을 어느 정도 수행하고 있으며 따라서 효율적 전자전달을 위해 일정농도 이상의 기질이 필요함을 의미한다.

본 실험의 L-lactic acid 센서에 대하여 250 및 400mV의 산화전위에서 calibration curve를 측정 한 결과는 그림 3과 같다. 그림 3에서 나타난 것처럼 전류 반응은 안정되었고 측정시 재현성도 양호하였다. Calibration curve는 전형적인 sigmoidal pattern을 보여주었다.

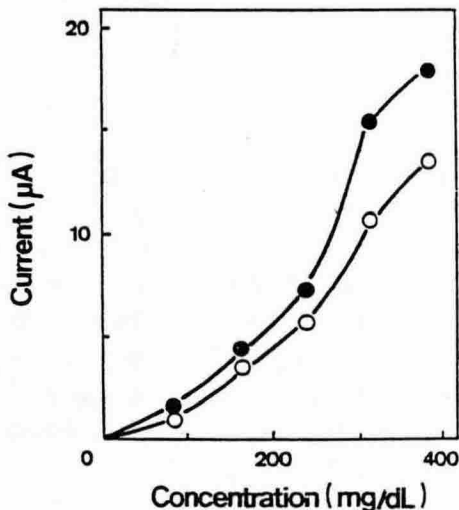


Fig 3. Calibration curves for the sensor measured at 250mV(○) and 400mV(●).

IV. 결론

효소의 변형과정을 거쳐 센서의 반응성을 크게 향상시키기 위해 carbodiimide coupling법에 의하여 Fc-LOD를 제조하였으며 이를 polyimide base film의 한쪽 끝에 있는 금으로 증착된 작용극에 인쇄기법에 의해 고정화시켜 1회용의 L-lactic acid 센서를 제조하였다. 사용된 잉크조성물은 효소가 작용극에 잘 접촉되는 동시에 효소활성을 보일 수 있도록 최적화된 것이었으며 본 실험에 사용된 인쇄기법은 안정된 전류반응을 보여주는 센서칩을 손쉽고 재현성 있게 제조하는 한 방법을 제시하고 있다.

문헌

- Amine, A., Kauffmann, J-M. and Patriarche, G.J. 1991. Amperometric biosensors for glucose based on carbon paste modified electrodes. *Talanta* **38** (1) : 107.
- Back, R. and Lennox, R. B. 1992. Electrochemical investigation of novel polymerizable thiophene/ferrocene conjugates. *Langmuir* **8** : 959.
- Badia, A., Carlini, R., Fernandez, A., Battaglini, F., Mikkelsen, S.R. and English, A.M. 1993. Intramolecular electron-transfer rates in ferrocene-derivatized glucose oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **115** (15) : 7053.
- Bartlett, P.N., Bradford, V.Q. and Whitaker, R. G. 1991. Enzyme electrode studies of glucose oxidase modified with a redox mediator. *Talanta* **38** (1) : 57.
- Bartlett, P.N. and Caruana, D. J. 1994. Electrochemical immobilization of enzymes. Part VI. Microelectrodes for the detection of L-lactate based on flavocytochrome b_2 immobilized in a poly(phenol) film. *Analyst* **119** : 175.
- Byfield, M.P. and Abuknesha, R.A. 1994. Biochemical aspects of biosensors. *Biosensors*

- Bioelectronics* **9** : 373.
- Cass, A.E.G., Davis, G., Francis, G.D., Hill, H. A.O., Aston, W.J., Higgins, I.J., Plotkin, E.V., Scott, L.D.L. and Turner, A.P.F. 1984. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.* **56** : 667.
- Clark, L.C. and Lyons, C. 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals NY Acad. Sci.* **102** : 93.
- Dremel, B.A.A., Yang, W. and Schmid, R.D. 1990. On-line determination of lactic acid during kefir fermentation based on a fibre-optic lactic acid biosensor and flow-injection analysis. *Analyt. Chim. Acta* **234** : 107.
- Kim, N. and Karube, I. 1995. Characterization and food application of an amperometric needle type L-lactic acid sensor. *J. Food Sci.* Submitted for publication.
- Kulys, J., Wang, L. and Maksimoviene, A. 1993. L-lactate oxidase electrode based on methylene green and carbon paste. *Analyt. Chim. Acta* **274** : 53.
- Mann-Buxbaum, E., Pittner, F., Schalkhammer, T., Jachimowicz, A., Jobst, G., Olcaytug, F. and Urban, G. 1990. New microminiaturized glucose sensors using covalent immobilization techniques. *Sensors Actuator B1* : 518.
- Mascini, M. and Selleri, S. 1989. Glucose biosensor with extended linearity. *Anal. Lett.* **22** (6) : 1429.
- Nagata, R., Clark, S.N., Yokoyama, K. and Karube, I. 1994. Glucose sensor fabricated by printing technique, *Biosensors Bioelectronics* Accepted for publication.
- Park, I-S., Kang, S-J., Kim, J-H. and Noh, B-S. 1993. L-Lactate oxidase electrode and dissolved oxygen meter for specific determination of L(+)-lactic acid in *Kimchi* during fermentation. *Foods Biotechnol.* **2** (1) : 39.
- Pfeiffer, D., Setz, K., Schulmeister, T. and Scheller, F.W. 1992. Development and characterization of an enzyme-based lactate probe for undiluted media. *Biosensors Bioelectronics* **7** : 661.
- Wagner, G. and Schmid, R.D. 1990. Biosensors for food analysis. *Food Biotechnol.* **4** (1) : 215.
- Wang, D.L. and Heller, A. 1993. Miniaturized flexible amperometric lactate probe. *Anal. Chem.* **65** : 1606.
-