

## Carboxylated PVC에 페니실리나제를 고정된 효소 센서의 특성

김기묘\* · 김영학 · 이은엽 · 허문희 · 안문규

경성대학교 약학대학

(Received October 6, 1995)

### Characteristics of Enzyme Sensors using Carboxylated PVC for Immobilizing Penicillinase

Ki-Myo Kim\*, Young-Hak Kim, Eun-Yup Lee, Moon-Hye Hur and Moon-Kyu Ahn  
College of Pharmacy, Kyungseung University, Pusan 608-736, Korea

**Abstract**—Penicillin sensor was manufactured by immobilizing penicillinase with glutaraldehyde on the H<sup>+</sup>-selective membrane based on PVC-COOH-TDDA. This membrane was not interfered by K<sup>+</sup> ion in Pc-G potassium salt. When enzyme was immobilized with glutaraldehyde, the PVC-COOH matrix was more effective than PVC matrix. Calibration curve calculated from Nernst equation was not linear. But potential was relative to concentration of Pc-G. And maximal potentiometric velocity was also relative to concentration of Pc-G. Therefore, it may be applied to Michaelis-Menten equation. The penicillin sensor was useful for determination of Pc-G at concentration of 0.1~10 mM level.

**Keywords** □ Penicillin sensor, penicillin, PVC-COOH, Michaelis- Menten equation.

바이오센서는 생체 물질을 사용하여 특정 대상물에 대한 높은 선택성을 추구하면서 이를 센서와 조합하여 간편성을 갖춘 분석 장치로서, 그 장치가 간단하고 측정이 신속 간편하며 물질을 분리하지 않고 직접 측정할 수 있을 뿐만 아니라 탁도 등에 의한 영향을 받지 않는 등, 여러가지 장점을 가지고 있어 환경 오염물질의 측정 및 감시, 의료 진단, 생명공학, 식품 공정 등에 있어서 매우 중요한 역할을 한다.

초기에 효소를 이용한 바이오센서는 각종 효소 등을 pH 유리 전극에 고정시킨 것<sup>1),2)</sup>을 사용하였으나 근래에 다양한 이온 선택성 막이 등장하면서 새로운 바이오센서의 개발이 되고있다. 대표적인 것으로 H<sup>+</sup> 선택성 ionophore인 tridodecylamine (TDDA)<sup>3)</sup>이나 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 선택성 ionophore인 p-trifluoroacetyl butylbenzene<sup>4)</sup> 등을 이용하여 PVC 등 각종 polymer로 이온 선택성 막을 만든 각종 바이오센서가 제작되었다. 한편,

효소 고정화의 한 방법으로 penicillinase를 기존의 pH 유리 전극 대신 coated-wire 전극<sup>5)</sup>을 사용하여 그 matrix로 carboxylated PVC를 사용하였으나, carboxylated PVC는 각종 금속염의 영향을 받는 것으로 보고<sup>6)</sup>된 바 있다. 또한 효소 고정화에 있어서 glutaraldehyde를 사용하여 효소막을 다소 두껍게 만든 것이 얇은 효소만으로 구성된 막의 경우에 비해 막 전위 값이 안정됨이 보고<sup>7)</sup>된 바 있으며, 이러한 효소막의 두께와 감응도와의 상호 관계를 수치적으로 계산한 바<sup>8)</sup>도 있다.

이에 본 연구자들은 이온 선택성 전극을 이용하여 PVC와 carboxylated PVC matrix에 glutaraldehyde로 penicillinase를 고정화하여, 그 감응의 안정성과 고정화의 효율성 등을 비교하고 금속염에 대한 영향을 검토코자 한다. 아울러 간 조직 센서에 적용한 rate method<sup>9)</sup>로 penicillin을 정량함으로써 penicillin계 항생제에 대한 내성의 주요 요인인 penicillinase에 대한 억제 약물들의 효과를 비교하기 위한 방법으로 바이오센서를 이용코자 한다.

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 051-620-4882 (팩스) 051-628-6540

## 실험방법

**시약** - Penicillin G (Pc-G), penicillinase (type II, Pcase) 등은 Sigma사제, tetrahydrofuran (THF), poly (vinyl chloride) (PVC), carboxylated poly (vinyl chloride) (PVC-COOH), 2-nitrophenyloctyl ether (NPOE) 등은 Aldrich, tri-dodecyl amine은 Fluka, sodium tetraphenylborate (NaTpB)는 Hayashi 그리고 glutaraldehyde (GTH)는 동경 TCI 시약을 사용하였고, 그의 시약들은 특급 시약을 사용하였으며, 증류수는 모두 Millipore Milli-Q system으로 탈염한 2차 증류수를 사용하였다. 완충 용액은 pH 7.0으로 조정된 5 mM potassium phosphate (K.P. 완충용액)를 사용하였다. 효소액은 0.05 M K.P. 완충용액(pH 7.0)에 녹여서 0.5 mg/10  $\mu$ l 용액으로 만들었다.

**장치** - Potentiometer는 Orion사의 920A를, pH 전극은 Orion사의 Model 9102BN Rose combination glass 전극을, 그리고 온도 감응 센서는 Orion사의 Model 917005 ATC probe를 사용하였다. Electrode body는 Phillips사의 IS-561, 기준 전극은 Orion사의 Model 90-01-00 Ag/AgCl single junction 전극을 사용하였으며, 매초마다의 데이터를 얻기 위해 potentiometer를 386DX 컴퓨터에 연결하여 실험하였다.

**바이오센서의 조립** -  $[H^+]$  선택성 막은 총 200 mg중 PVC-COOH 47.0%, NPOE 47.0%, TDDA 5.5%, NaTpB 0.5%로 혼합하고 이를 THF에 녹인 후 유리관에 고정된 직경 22 mm인 유리관에 부어 하룻동안 방치하면서 THF를 휘발시켜 만들었다. PVC polymer를 사용할 경우에도 위와 같은 비율로 제작하였다. 이들 막을 직경 7 mm로 잘라서 한쪽막 위에 5  $\mu$ l 효소액과 2.5% GTH 5  $\mu$ l를 떨어뜨려서 작은 막대로 잘 저어준 다음 4°C에서 24시간동안 방치하였다. Filling solution으로는 0.02 M  $NaH_2PO_4$ , 0.03 M  $Na_2HPO_4$ 와 0.015 M NaCl 혼합액을 사용하였으며 background electrolyte는 K.P. 완충용액을 사용하였다. 사용전에 K.P. 완충용액에 담귀서 결합되지 않은 GTH와 효소를 제거하였으며, 사용하지 않을 때는 K.P. 완충용액에 담귀 4°C에서 보관하였다.

**측정 및 검량선** - 효소가 고정된 전극, 기준전극, 그리고 ATC probe를 상온(26.6 $\pm$ 0.1°C)의 K.P. 완충용

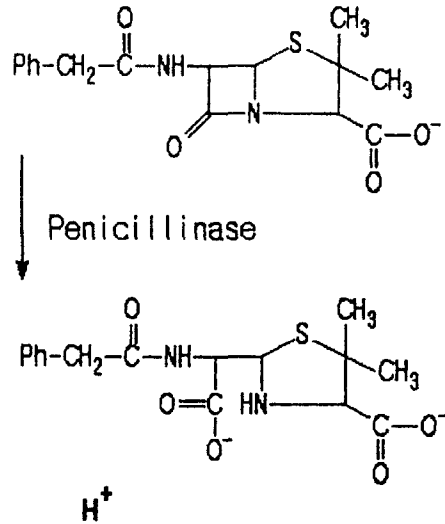


Fig. 1 - Structures of Pc-G and penicilloic acid formed by penicillinase.

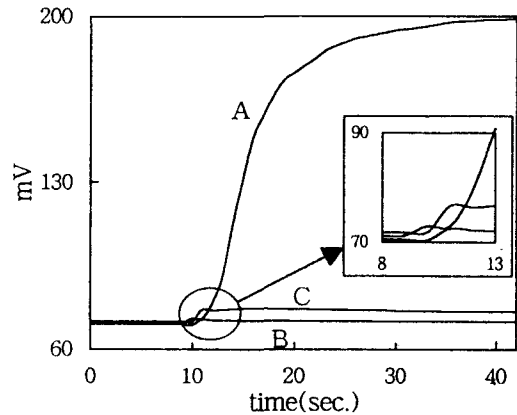


Fig. 2 - Potentiometric response curves. A:  $2 \times 10^{-2}$  M Pc-G, B:  $2 \times 10^{-2}$  M KCl, C:  $1 \times 10^{-1}$  M KCl.

액에 담귀서 전위값을 안정시킨 후 일정량의 Pc-G를 첨가하여 매초마다 그 mV 수치를 컴퓨터로 얻어 전위값의 최대 변화 속도를 측정하였다(rate method). 또는 Pc-G 첨가 후 안정된 전위값에 도달할 때까지 기다린 후 그 전위값을 측정하였다(steady-state method).

## 결과 및 고찰

**측정원리** - Pc-G는 Pcase에 의해  $\beta$ -lactam 환이 깨지면서 penicilloic acid가 되며 (Fig. 1) 이때 발생하는  $H^+$ 를 ISE로 측정하여 간접적으로 Pc-G를 정량할

수 있다.

**Membrane 성질** - Fig. 2는  $2 \times 10^{-3}$  M Pc-G 용액에 대한 감응 곡선을 나타낸 것이다. Osa 등<sup>5)</sup>은 coated-wire 전극 제작 시 PVC-COOH를 31.0% 함유시켜 막을 제조하였으나, 본 실험에서 그 비율을 높인 이유는 IS-561 전극으로 효소센서를 제작 시 matrix를 낮은 비율로 할 경우 막이 electrode body에 고정될 때 막에 상당한 압력이 가해져 막 표면이 평평해지지 못하고 공처럼 둥글게 돌출되어 GTH로 고정화된 효소막이 접어질 우려가 있기 때문이다. 이때 PVC-COOH의 함량 증가에 따른 금속 양이온에 대한 방해<sup>6)</sup>가 우려되나, Fig. 2에서 본 바와 같이  $K^+$  염인 Pc-G  $2 \times 10^{-2}$  M를 첨가하여 얻은 곡선과 동일량의 KCl만으로 얻은 곡선을 비교한 결과 KCl의 경우 2~3초후부터 감응되다가 약 6초후에 감소하지만 Pc-G  $K^+$  염은 분해되어 생성된  $H^+$ 이 약 6초 이후부터 감응되는 시기이다. 그러므로 Fig. 2의 처음 조그만 곡선은 Pc-G potassium 염의  $K^+$  ion에 의한 것이며 이보다 5배 진한  $10^{-1}$  M KCl에 대한 곡선도 Pc-G의 감응 곡선에 비해 상당히 낮은 편이다. Cosofret 등<sup>6)</sup>은 carrier 없이 PVC-COOH와 NPOE로 구성된 막을 사용시 금속이온에 대한  $H^+$ 의 선택성은  $K^+$ 이 가장 많은 영향을 주는 것으로 보고하였다. 또한,  $H^+$  선택성 ionophore인 TDDA의 선택성을 높이기 위해서 NPOE/PVC-COOH 비율이 2:1 이상이어야 한다고 제안하였다. 그러나 본 실험에서는 그 비율이 1:1인 점을 감안하면 금속 이온에 의하여 상당한 영향을 받을 것으로 생각되나, 이들 유리형 carboxyl group에 효소가 결합함에 따라 상대적으로 유리형 carboxyl group이 감소하여 양이온과의 결합 능이 감소하는 것으로 생각된다.

**Enzyme 고정화** - Cha 등<sup>7)</sup>은 ethylene diamine을 CTA (cellulose triacetate)에 치환, 결합시킨 후 효소를 고정화할 때 GTH 사용 여부에 대하여 보고한 바 있다. 이때 감응 물질이 GTH 막내에서 일정 기간동안의 머무름으로 인하여 GTH 막이 없는 경우에 비해 감응도가 높을 뿐만 아니라, 자석 막대에 의한 물리적 영향을 GTH 막이 보호함으로써 안정된 전위값을 얻을 수 있는 것으로 추정하였다. 본 실험에서 GTH를 사용하여 고정화한 것과 그렇지 않은 경우를 비교한 결과, GTH로 고정화한 막이 penicillin에 대한 높은 감응성을 보였다. (Fig. 3) 이는 GTH로 고정화하지 않은 막에서 발생한  $H^+$  등의 대사 산물이 자석 막대의 영향에 의

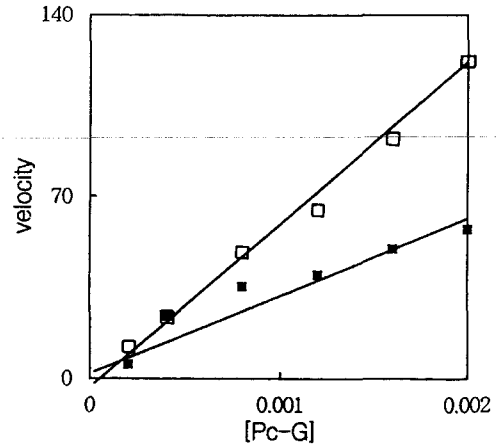


Fig. 3—Calibration curves of Pcase immobilized membranes with GTH (□, correlation coefficient  $r = 0.9929$ ) and without GTH (■, correlation coefficient  $r = 0.9622$ ).

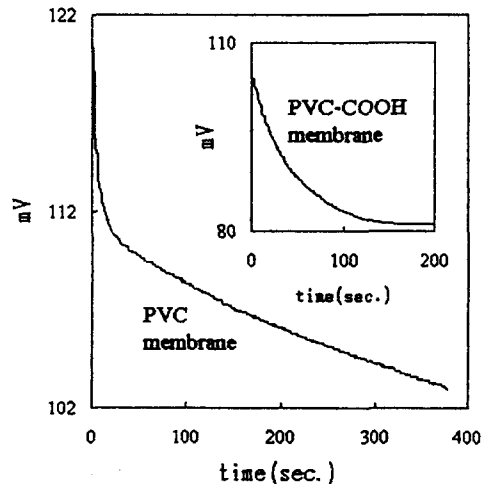


Fig. 4—Equilibrium time to baseline after measurement of  $2 \times 10^{-3}$  M Pc-G.

해 쉽게 막 표면에서 시료액으로 확산되기 때문으로 생각된다. GTH로 고정화할 때 그 matrix로 소수성이 강한 PVC를 사용할 경우, 효소액과 GTH액이 막 표면에 퍼지지 못하고, 방울 모양으로 한 곳에 모이는 문제가 있으나, PVC-COOH는 carboxyl group에 의한 극성으로 인해 흡착성이 강하여 효소액과 GTH액이 균등하게 분포될 수 있다. 아울러 효소 센서의 감응성은 고정화된 효소의 양에 따라 영향을 받는다는 점에서, GTH에 의한 고정화 이외에 막의 높은 구성 비율로 함

유된 PVC-COOH에 의한 효소 고정화가 고정 효율성을 향상시킨 것으로 생각된다.

$2 \times 10^{-3}$  M Pc-G에 대한 감응성 측정 후 다시 baseline으로 회복되는 시간은 Fig. 4와 같이 PVC-COOH를 사용한 경우 약 2분 40초 정도 이었으나, PVC를 사용한 경우 10분정도로 상당히 오랜 시간이 소요되었다.

이상과 같이 막의 안정성, 감응성, baseline으로의 회복 속도 등을 미루어보아 PVC보다 PVC-COOH를 사용하여 GTH로 고정화하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

**검량선** - Pc-G에 대한 전위값을 Nernst 식에 적용할 경우 Osa 등의 경우와 마찬가지로 이론적인 직선의 검량선은 얻을 수 없었다(Fig. 5-a). 반면 농도에 대한 최대 전위 변화 속도, 전위차값 등의 곡선은 직선상으로 나타났다(Fig. 5-b, 6).

$$v = \frac{V_{MAX} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

[S]: 반응물 혹은 생성물 농도

$K_M$ : Menten 상수

$V_{MAX}$ : 반응 최대 속도

Michaelis-Menten 식<sup>10)</sup>(Eq. 1)에서  $K_M$ 은 반응 속도가  $V_{MAX}/2$ 의 속도에 도달하는데 소요되는 기질의 양으로서,  $K_M$  이하의 농도일 때는 반응 속도가 기질의 농

도에 대하여 일직선성을 갖는다.  $K_M$ 은 일정 단위의 효소에 대한 고유 상수로서, 효소 양의 증가는  $V_{MAX}$ 의 증가와  $K_M$ 의 증가를 초래한다. 그러므로 본 실험에서 최대 전위 변화 속도가 농도에 대하여 직선성을 보인 것은 고정화된 효소의 양이 많은 것에 따른 결과가 아닌가 생각된다. 한편 전위차값이 농도에 일직선성을 갖는 것은 Pcase에 의한 Pc-G 분해 산물에 의한 것 이외에 Pc-G 자체에 의한 전위값의 변화를 고려할 수 있으나 Ols-son<sup>11)</sup>이 Pc-V 자체에 의한 전위 변화가 Pcase에 의해

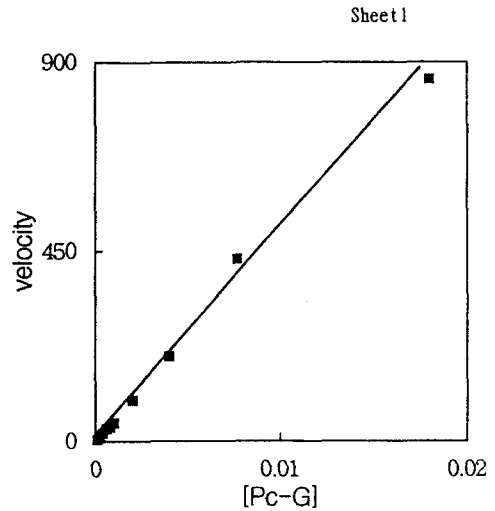


Fig. 6 - Relation between the maximal potentiometric velocity and concentration of Pc-G. Unit of velocity is dmV/min. (correlation coefficient  $r = 0.9942$ ).

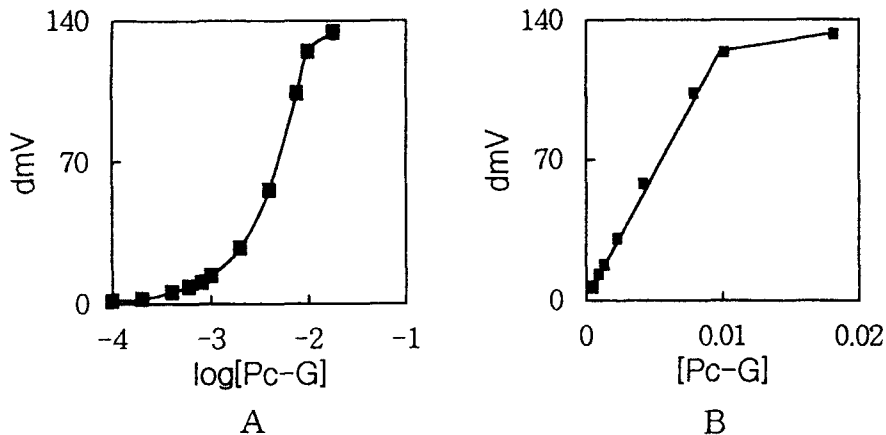


Fig. 5 - Calibration curves of Pc-G with PVC-COOH enzyme membrane. Curve A: dmV vs.  $\log[Pc-G]$ , Curve B: dmV vs.  $[Pc-G]$  (correlation coefficient  $r = 0.9965$ )

분해됨에 따른 변화에 비해 매우 미세하다고 보고한 내용을 미루어보아 Pc-G 자체에 의한 영향은 없는 것으로 생각된다. 또 주입된 Pc-V이 그 대사 산물인 H<sup>+</sup>에 의한 pH 변화에 일직선성을 갖는다고 보고하였다. pH의 변화는 곧 전위값의 변화로 고려할 수 있으며, 이것이 주입된 농도에 비해 관계를 갖는다는 것은 Nernst 식과는 상이하다. 본 실험에서도 주입된 농도에 대한 전위값이 비례관계를 갖는 것과 일치한 점에 대하여는 보다 연구가 필요할 것으로 생각된다. pH glass 전극을 사용하여 보고된 직선의 정량 범위는 0.08~0.5 mM 혹은 1~20 mM<sup>12)</sup> 등이었으나 본 실험에서는 0.1~10 mM의 넓은 범위의 직선성 검량선을 얻을 수 있었다. Olsson<sup>11)</sup>의 방법으로는 0.1~15 mM의 넓은 범위의 검량선을 얻을 수 있었으나, 효소를 화학적으로 처리한 다공질성 유리에 고정화하여 이를 flow-system 일부 과정에 고정하는 등 다소 불편한 방법이라 생각된다.

**효소활성도** - Michaelis-Menten 식에서 특정 약물에 의해 V<sub>MAX</sub>가 일정한 상태에서 K<sub>M</sub>이 상승할 경우, 이는 곧 그 약물이 기질에 대한 효소에의 경쟁적 억제 작용을 한다는 것을 뜻하며, 반대로 K<sub>M</sub>은 일정하나 V<sub>MAX</sub>가 감소할 경우 효소에 대한 비경쟁적 억제 작용을 함을 뜻한다.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{MAX}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{MAX}} \quad (2)$$

$$\left( \text{Slope} = \frac{K_M}{V_{MAX}} \right)$$

$$V = \frac{V_{MAX}}{K_M} \cdot [S] \quad (3)$$

한편, Michaelis-Menten 식을 변형시킨 Lineweaver-Burk 식(Eq. 2)에서 slope의 증가는 곧 효소 활성의 감소를 뜻하는 것으로서, 이러한 물리적 상호 관계를 통하여 효소 활성의 변화를 감지한다. 그러나 Fig. 5, 6에서와 같이 본 실험 방법으로는 [S]에 비해 높은 K<sub>M</sub>으로 인하여 전위값 최대 변화 속도는 주입되는 Pc-G 농도에 직접적으로 비례하므로, Lineweaver-Burk 식 대신 Eq. 3같이 정리된 식을 사용하여 효소 활성의 감소를 측정하는 것이 효율적일 것으로 생각되며 이로써 효소 활성의 변화 및 억제 약물의 억제 방식에 대한 관찰이 가능할 것으로 생각된다. 이것은 기준

의 Nernst 식으로는 이용할 수 없는 것으로써, 특히 효소에 대한 억제제들의 영향을 검토할 수 있는 유익한 방법으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

앞으로 Pc-G 이외의 다른 penicillin계 의약품에 대한 정량, Pcase 억제제에 대한 영향 및 flow system을 이용한 정량 그리고 주입 시료액과 전위값간의 상호 수치지적 연관성도 검토하여보고자 한다.

## 문 헌

- 1) Tran-Minh C., Broun G.: Construction and study of electrodes using cross-linked enzymes. *Anal. Chem.*, **47**, 1359 (1975).
- 2) Cass A. E. G.: "Biosensors, A practical approach", Oxford university, U.S.E. (1990).
- 3) Schulthess P., Shijo Y., Pham H. V., Pretsch E., Ammann D. and Simon W.: A hydrogen ion-selective liquid-membrane electrode based on tri-n-dodecylamine as neutral carrier. *Anal. Chim. Acta*, **131**, 111 (1981)
- 4) Meyerhoff M. E., Pretsch E., Welti D. H., and Simon W.: Role of trifluoroacetophenone solvents and quaternary ammonium salts in carbonate-selective liquid membrane electrodes. *Anal. Chem.*, **59**, 144 (1987).
- 5) Anzai J. I., Shimada M., Osa T. and Chen C. W.: Enzyme sensors based on coated-wire electrode; use of carboxyl-substituted poly(vinyl chloride) as a support for immobilizing penicillinase. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 4133 (1987).
- 6) Cosofret V. V., Buck R. P. and Erdosy M.: Carboxylate poly(vinyl chloride) as a substrate for ion sensor; effects of native ion exchange on response. *Anal. Chem.*, **66**, 3592 (1994).
- 7) Cha G. S., Meyerhoff M. E.: Potentiometric ion- and bio-selective electrodes based on asymmetric cellulose acetate membranes. *Talanta*, **36**, 271 (1989).
- 8) Carr P. W.: Fourier analysis of the transient response of potentiometric enzyme electrodes. *Anal. Chem.*, **49**, 799 (1977).
- 9) Hur M. H., Kim K. M., Kim Y. H., Paek K. J., Choi H. Y. and Ahn M. K.: Liver tissue sensor for the determination of dopamine. *Anal. Sci.*

- Technol.*, **8**, 365 (1995).
- 10) Stryer L.: *Biochemistry*, 3rd. Edit., p188 (1988).
- 11) Olsson B.: A flow-injection system on immobilized penicillinase and a linear pH-buffer for potentiometric determination of penicillin. *Anal. Chim. Acta*, **209**, 123 (1988).
- 12) Scheller F., Schubert.: *Biosensors*, p.177, Elsevier, Netherlands (1992).