

포도당 센서의 제작을 위한 고정화 방법의 전기화학적 결정

¹정태훈 · ¹홍석인 · ²노봉수 · ³정용섭 · ⁴윤정원 · †김태진
수원대학교 화학공학과, ¹고려대학교 화학공학과, ²서울여자대학교 식품·미생물공학과,
³전북대학교 식품공학과, ⁴수원대학교 유전공학과
(접수 : 1997. 8. 29, 게재승인 : 1997. 11. 11)

Electrochemical Determination of Immobilization Technique for Glucose Sensor Fabrication

Tae-Hoon Jung¹, Suk-In Hong¹, Bong-Soo Noh², Yong-Seob Jeong³, Jeong-Weon Yoon⁴, and Tai-Jin Kim†
Department of Chemical Engineering, University of Suwon, Suwon, Kyonggi 440-600, Korea
¹*Department of Chemical Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea*
²*Department of Food & Microbial Technology, Seoul Women's University, Seoul 139-744, Korea*
³*Department of Food Science & Technology, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea*
⁴*Department of Genetic Engineering, University of Suwon, Suwon, Kyonggi 440-600, Korea*
(Received : 1997. 8. 29, Accepted : 1997. 11. 11)

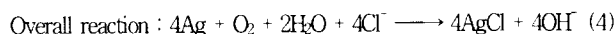
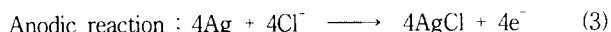
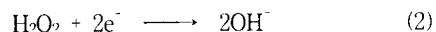
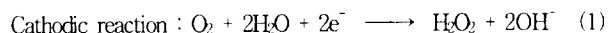
The present work proposes a simple electrochemical method applicable to any immobilization processes of oxidase using a Clark type oxygen electrode as a base transducer. The present work suggests an optimal immobilization technique among three different methods of glucose oxidase(GOD) onto one side of 37 μm thick blend membranes, composed of 80% of cellulose triacetate and 20% of polycaprolactone, on the basis of the maximum Michaelis-Menten parameter(V_m) determined by either steady state or transient analyses. The electrode system was made of disk type gold cathode(4mm diameter) and Ag/AgCl anode. One side of the blend membrane was in contact with the cathode surface while the other side was immobilized with GOD either in covalent-bond or cross-linked forms, the latter being covered by 25μm thick dialysis membrane of cellulose acetate. The resultant current density was on-line monitored by a potentiostat while glucose level was varied from 1 to 20 mM. The present study shows that direct cross-linking of GOD with glutaraldehyde was mostly preferred for fabrication of glucose sensor, on the basis of resultant kinetic parameters from either steady state or transient analyses.

Key word : biosensor, glucose oxidase, kinetic parameter, oxygen electrode, immobilization

서론

효소전극은 효소의 기질 특이성과 전기화학적 측정법의 간편함으로 지난 30여년 동안 많은 연구의 대상이었으며, 특히 포도당의 분석은 임상의학(1), 발효공정(2, 3) 및 식품산업(4) 등의 광범위한 분야에서 중요하게 다루어졌다. 포도당 전극은 일반적으로 polarographic type 용존산소 전극을 transducer로 사용하는데, 이는 금 또는 백금을 음극(cathode)으로 하고 Ag/AgCl을 양극으로하여 -0.6 ~ -0.8 V의 일정한 전위를 가해주면 용존산소가 음극표면에서 다음과 같이 전기화학적으로 반응하는 것을

이용하여 소모된 산소의 양을 측정할 수 있기 때문이다.

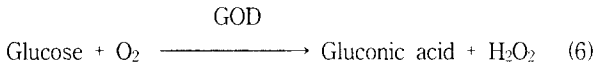


이때 음극에 흐르는 전류는 membrane 외부 산소분압에 비례하며 음극 단위 면적당 전류세기, 즉 전류밀도는 식 (5)로 표현된다(5).

$$J = nF \left(\frac{P_m}{d_m} \right) P_o \quad (5)$$

† Corresponding Author : Dept. of Chemical Engineering,
University of Suwon, Suwon P.O. Box 77, Kyonggi 440-600, Korea
Tel. : 0331-220-2294, Fax : 0331-220-2294
E-mail : tjkim@mail.suwon.ac.kr

Glucose oxidase(GOD)가 고정화 되어 있는 막에서는 식 (6)과 같은 효소촉매 반응으로 산소가 소모되므로 기질의 양에 비례하는 전기적 신호를 얻을 수 있다.



효소반응 결과 소모된 산소량은 음극에 흐르는 전류량으로 알아낼 수 있으며, 외부 glucose농도에 비례한다(6). 이러한 amperometric enzyme electrode는 전극으로의 지속적인 기질확산과 막 내부에서 반응이 동시에 진행하므로 free solution에서의 효소반응과는 다른 kinetics를 보인다(7). 본 연구의 목적은 CTA (cellulose triacetate)/PCL(polycaprolactone) 혼합 막에 다양한 방법으로 GOD를 고정화한 후 Clark type 산소전극을 이용하여 kinetic parameter를 구함으로써 임의의 산화효소를 이용한 다양한 고정화 방법중에서 효소고정화 기법을 간편하게 전기화학적으로 결정하는 방법을 제시함에 있다.

재료 및 방법

실험장치

전극을 일정한 온도가 유지되는 100ml 항온조에 설치하였으며 음극(cathode)과 양극(anode)간의 전위차를 유지시켜주기 위하여 potentiostat(지상기전 P-100)을 사용하였다. 이때 reference electrode 단자와 auxiliary electrode 단자를 함께 양극에 연결하고 working electrode 단자를 음극에 연결하였다(Figure 1). Potentiostat와 IBM PC/AT에 내장된 data aquisition card(PCL-812PG, Advanetec co.)를 이용하여 interface하였고 Turbo C로 매초마다 전류를 자동적으로 기록하도록 프로그램하였다. 한편, 음극의 전위를 -0.8V로 고정된 조건에서 각 산소분압에서 정상상태의 전류를 기록하였다.

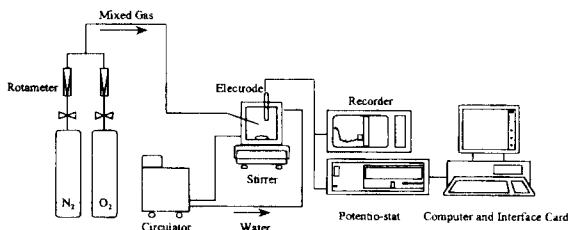


Figure 1. Schematic diagram of experimental set-up.

전극

실험에 사용한 양극은 coil 형태의 0.5mm 은선을 염다리로 연결한 500mL의 H형 cell에 설치하고 다른 한쪽에는 4cm²의 은판을 설치한 후 10분간 20mA/cm²의 전류를 흘려 AgCl을 침착시켜 제조하였다. 이때 양극의 표면을 No. 2000에서 6000까지의 사포로 연마한 후 coating하였다. 음극은 금을 직경 4mm의 disk 형태로 가공하여 아크릴 튜브에 에폭시로 고정하여 Figure 2와 같이 제작하였다. 고정된 cathode는 사포 No. 6000으로 연마하였다. 전극의 내부 전해질은 1 M KCl을 사용하였다.

효소 고정화

Glucose oxidase(EC 1.1.3.4)와 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI)은

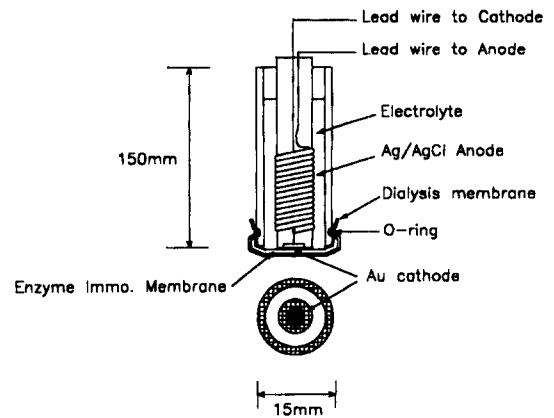


Figure 2. Schematic diagram of fabricated glucose sensor.

Sigma제품을, cellulose triacetate(CTA)와 polycaprolactone(PCL)은 Aldrich제품을 이용하였다.

효소 고정화에 사용된 CTA/PCL blend 막은 무게비가 80/20이었으며 THF(tetrahydrofuran)에 5%(w/w)되도록 용해시킨 후 casting하여 24시간 동안 상온 건조후 진공상태 60℃에서 72시간 건조하여 사용하였다. 효소의 고정화는 Meyerhoff(8)등의 방법에 따라 1M NaOH를 사용하여 막의 한 면을 5시간 동안 가수분해하고 CDI(carbonyldiimidazole)을 녹인 용액으로 membrane의 hydroxyl group을 activation시킨 후 다음과 같은 세가지의 변형된 방법(9)들을 사용하였다(Figure 3).

- (A) 활성화되어 있는 막에 3.3units/cm²의 GOD를 4℃에서 12시간 반응시켜 직접 공유결합시키는 방법,
- (B) 활성화되어 있는 막에 ethylenediamine(12.5%)이 녹아있

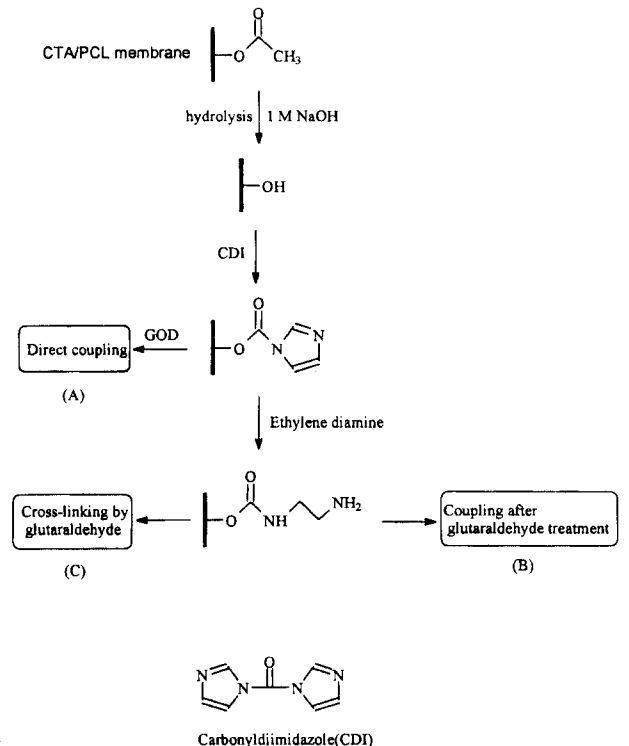


Figure 3. Flow diagram of enzyme immobilization scheme.

는 0.1M sodium carbonate buffer(pH 10.0)로 상온에서 3시간 아민화시킨 다음 glutaraldehyde (2.5%)를 가하여 5분간 반응시키고 미반응 물질을 제거한 후, 3.3 units/cm²의 GOD를 4℃에서 12시간 동안 결합시키는 방법, (C) B)와 같이 amination 되어 있는 막에 glutaraldehyde와 3.3 units/cm²의 GOD를 동시에 4℃에서 12시간 동안 가 교시키는 방법, 이때 사용한 효소량(3.3 units/cm²)은 membrane 단위 면적당 사용된 효소의 양을 뜻한다.

고정화 반응 후에는 0.05M의 Tris-HCl buffer(pH 7.2)로 membrane을 단순 세척하여 미고정화 효소(free enzyme)를 제거한 다음 0.05M sodium phosphate buffer(pH 6.0, 4℃)에 보관하며 사용하였다. Free GOD의 kinetic parameter는 GOD(0.038 unit/mL)를 peroxidase(1 unit/mL)와 o-dianisidine(0.17 μmol/mL)를 함께 pH 6.0의 Na-phosphate buffer에서 반응시켜 5분 후의 흡광도 변화를 436nm에서 측정하여 구하였다.

결과 및 고찰

Data 해석

온도(25℃)와 산소분압이 일정하게 유지되는 항온조에 전극을 설치한 후 전극에 분극전압 -0.8V(vs. Ag/AgCl)을 가하면 공기의 산소분압에 해당하는 초기 안정 전류밀도(J_{si})가 흐른다. 이때 포도당을 투입하면 전극 내부의 산소가 (6)식의 효소 반응에 의하여 소모되면서 전류가 감소하기 시작하고, 일정한 시간이 흐른 후에 안정된 값(J_{sf})을 나타낸다. 이때 안정한 전류밀도의 차이 J_Δ(=J_{si}-J_{sf})는 반응하는 포도당의 양(S_b)에 비선형으로 비례하므로 식 (7)을 얻을 수 있다(steady state analysis).

$$J_{\Delta} = \frac{V_{ms}S_b}{K_{ms} + S_b} \tag{7}$$

이때 V_{ms}와 K_{ms}는 J_Δ 와 S_b를 Eadie-Hofstee plot으로 구한

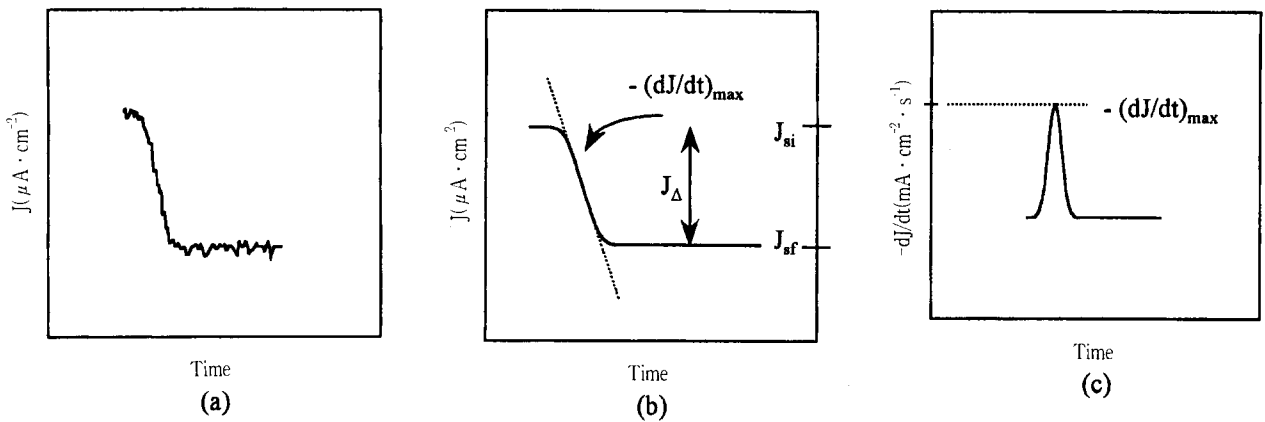


Figure 4. Transient analysis of experimental data. (a) time distribution of experimental current density, (b) time distribution of typical current density and difference, (c) time distribution of typical current density and its maximal point.

Table 1. Comparison of kinetic parameters of GOD immobilization with results from various investigators.

Investigator	State	Matrix	V _m			K _m			Immobilization Method	
			(a)	9b)	9c)	(a)	(b)	(c)		
Juhn(12)	free	-	-	-	0.15	-	-	19.0	-	
	immobilized	polyacrylamide	-	-	2.58	-	-	34.4	entrapment	
D'Angiuro(10)	free	-	-	-	-	-	-	19.3	-	
	immobilized	Sepharose	-	-	-	-	-	20.0	covalent binding	
Arica(11)	free	-	-	-	0.017	-	-	5.9	-	
	immobilized	poly(2-hydroxyethyl methacrylate)membrane	-	-	0.067	-	-	8.8	covalent binding	
			-	-	0.056	-	-	12.4	entrapment	
free	-	-	-	-	27.72	-	-	23.9	-	
Present Study	immobilized	CTA/PCL membrane	3.03	0.040	-	17.8	18.8	-	-	(A) covalent binding without glutaraldehyde
			2.83	0.038	-	10.9	7.3	-	-	(B) covalent binding with glutaraldehyde
			4.85	0.122	-	5.1	10.9	-	-	(C) cross-linking with glutaraldehyde

(a) steady state analysis, V_{ms}[μA·cm⁻²], K_{ms}[mM], (b) transient analysis, V_{ms}[μA·cm⁻²·s⁻¹], K_{ms}[mM]
 (c) initial rate method, V_{ms}[mM·cm⁻²], K_{ms}[mM]

parameter들 이다. 한편, 전극의 응답(J)을 시간에 따라 미분한 최대 반응속도, 즉 $-(dJ/dt)_{max}$ 를 기질의 양(S_b)에 대하여 표시하면 식 (8)과 같다(transient analysis).

$$-(dJ/dt)_{max} = \frac{V_m S_b}{K_m + S_b} \quad (8)$$

전극의 신호(J)는 실험적 noise를 수반하여(Figure 4a) 미분하기 어려우므로 Figure 4b에서 처럼 일정한 polynomial로 최적 fitting하여 구한 관계식을 미분하여 최대 기울기 $-(dJ/dt)_{max}$ (Figure 4)를 포도당 농도(S_b)에 대하여 Eadie-Hofstee plot을 하면 kinetic parameter로서 V_m 과 K_m 을 구할 수 있다.

Kinetic parameters

본 실험에서 고정화 되지 않은 free GOD의 경우 Figure 5에 도시한 바와 같이 K_m 은 23.9 mM로 나타났다. 다양한 포도당 농도(1~20 mM)에서 얻어진 전류 밀도의 시간 변화는 3 가지의 다른 고정화 방법으로 만들어진 포도당 센서에 대하여 Figure 6 과 같이 실험적으로 구하였다. Figure 6에서 시료 투입전의 초기 전류값이 각 방법에서 차이를 보이는 것은 membrane에 새로 형성된 고정화 층의 산소 투과도가 고정화 방법에 따라 차이를 보이기 때문으로 사료된다. Figure 6의 자료를 이용하여 steady state analysis에서 구한 K_m 은 고정화 방법에 따라 5.1 mM에서 17.8 mM의 값을 보였고(Figure 7), transient analysis 로 구한 K_m 은 8.3 mM에서 18.8 mM로 약간 큰 값으로 나타났다(Figure 8)

한편, D'Angiuro(10) 등은 GOD를 Sepharose에 공유결합법으로 고정화 하였을 때 K_m 은 20 mM이었으나 free GOD의 경우 19.3 mM이었다. 따라서, GOD의 K_m 은 고정화 여부에 큰 영향을 받지 않고 일정한 수치를 나타내었다. Airca(11) 등의 연구에 의하면 GOD를 poly(2-hydroxyethyl methylacrylate)에 공유결합법과 포괄법으로 고정화했을 때, K_m 은 각각 8.8 mM 과 12.4 mM이었으며, free GOD에 대해서는 5.9 mM이었다. 그러

나, 본 실험의 K_m 은 CDI로 직접 고정화한 방법의 경우(A)만 free GOD의 경우 유사한 값을 보였으나, glutaraldehyde를 사용한 방법들(B, C)은 낮은 K_m 값이었는데 이는 glutaraldehyde에 의한 영향으로 추정된다(Table 1).

Table 1에 요약한 바와 같이 steady state 또는 transient analysis에 관계없이 B<A<C의 순으로 고정화 GOD의 활성 크기를 나타내는 V_m 이 증가하였다. 방법 C가 가장 큰 V_m 을 나타낸 것은 glutaraldehyde와 GOD와의 cross-linking으로 비교적 두꺼운 고정화 층의 형성되었기 때문으로 사료된다. 또한, GOD 고정화 막을 포도당 센서에 사용할 때, 효소활성의 증가는

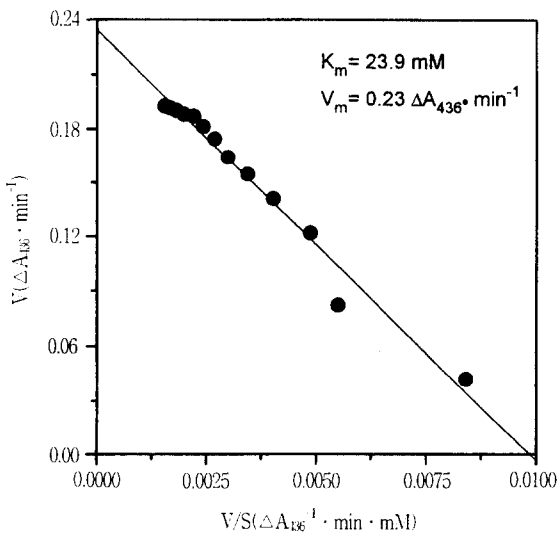
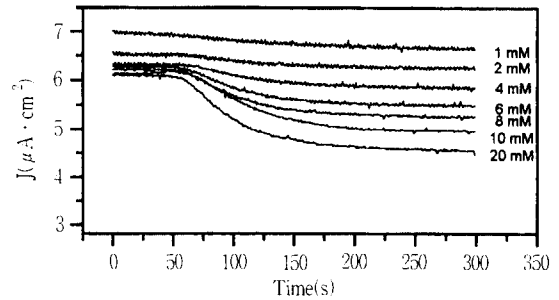
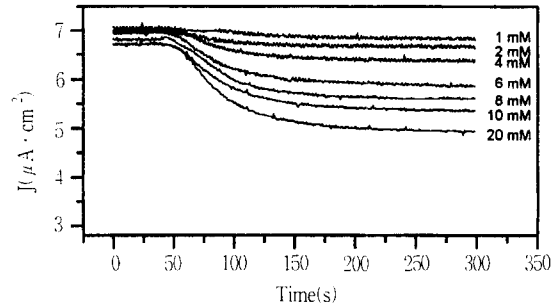


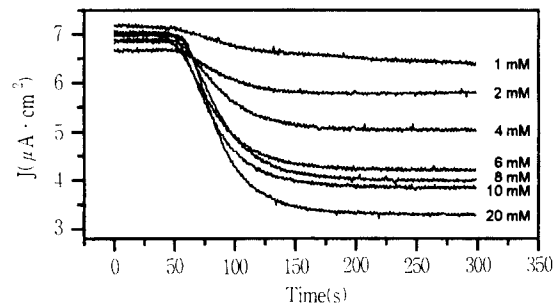
Figure 5. Eadie-Hofstee plot for free glucose oxidase (pH: 6.0, glucose oxidase : 0.038 unit/mL, peroxidase: 0.333 unit/mL, o-dianisidine: 0.17 mM, reaction time: 5 min, temperature: 25°C)



(a)



(b)



(c)

Figure 6. Time distribution of current density at various concentration of glucose with different immobilization methods: (a) direct coupling after CDI activation, (b) coupling after glutaraldehyde treatment, (c) cross-linking of GOD with glutaraldehyde.

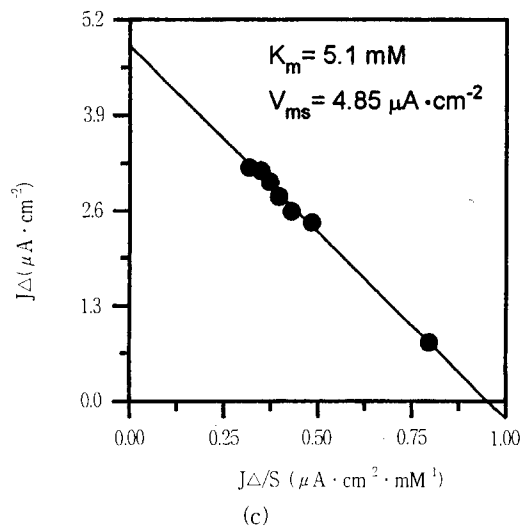
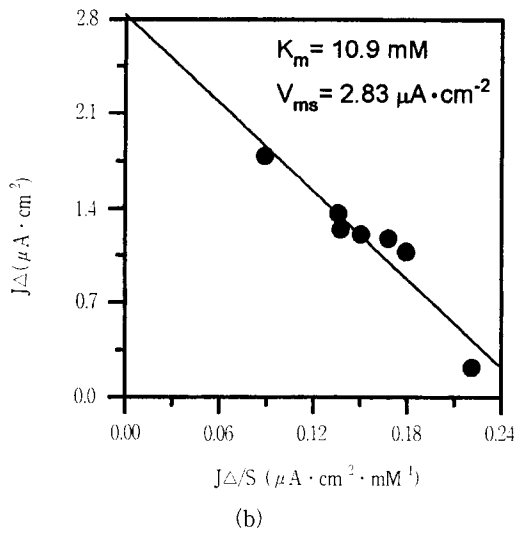
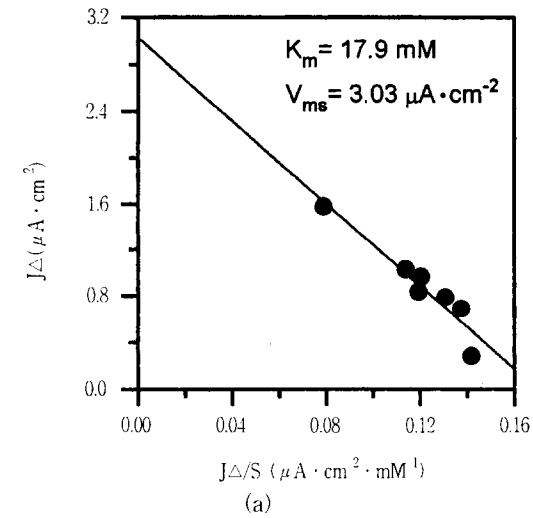


Figure 7. Steady state analysis of current density difference at various immobilization methods :

(a) direct coupling after CDI activation, (b) coupling after glutaraldehyde treatment, (c) cross-linking of GOD with glutaraldehyde.

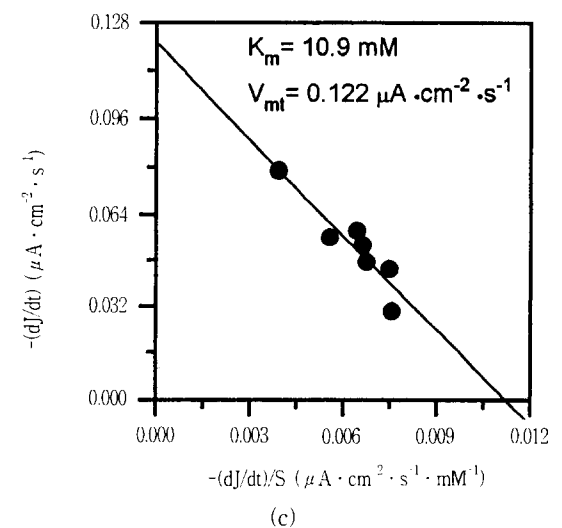
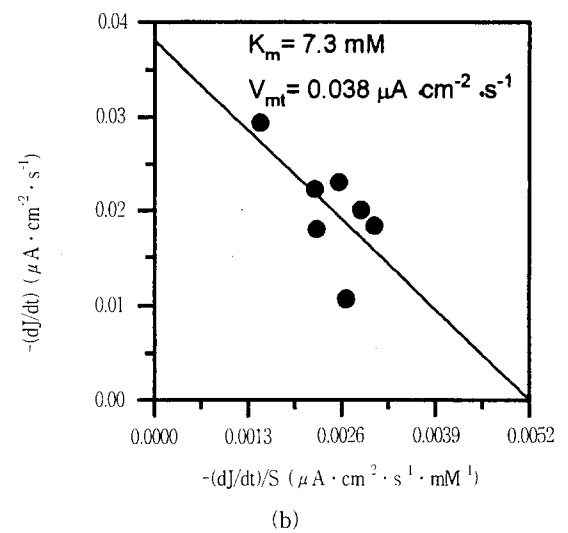
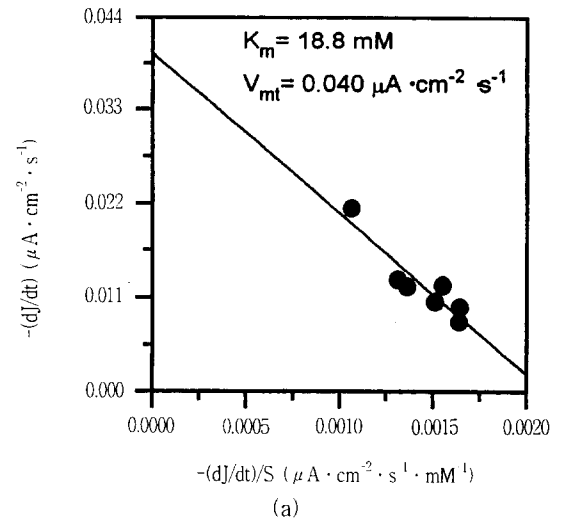


Figure 8. Transient analysis of reaction rate at various immobilization methods :

(a) direct coupling after CDI activation, (b) coupling after glutaraldehyde treatment, (c) cross-linking of GOD with glutaraldehyde.

측정가능한 농도 범위를 넓혀주는 효과가 있으므로 같은 효소량을 사용하여 더 큰 활성을 얻을 수 있는 방법 C가 나머지 방법에 비하여 더 효율적이라 할 수 있다.

따라서 본 전기화학적 방법은 CTA/PCL membrane을 활성화 후 glutaraldehyde로 가교시킨 방법(C)이 가장 효율적인 고정화 방법임을 제시하였다.

결 론

CTA(cellulose triacetate)/PCL(polycaprolactone) 혼합막에, glutaraldehyde를 사용하지 않고 공유결합시킨 것, glutaraldehyde를 사용하여 공유결합시킨 것, glutaraldehyde를 사용하여 가교결합 시킨 것의 세가지 방법으로 GOD를 고정화한 후 Clark type 산소센서를 이용하여 kinetic parameter를 구하였다. 최적 효소고정화 기법을 간편하게 전기화학적으로 결정하는 방법으로 steady state 및 transient analysis를 개발하였다. 고정화 효소의 활성도를 나타내는 고정화 방법별 V_m 값을 비교할 때, 효소 활성도는 glutaraldehyde와 GOD를 동시에 가교결합시킨 방법이 steady state 및 transient analysis에 관계없이 가장 크다는 것을 알 수 있었다. 따라서 Clark type 산소센서를 이용할 수 있는 glucose oxidase 등의 산화 효소를 다양한 방법으로 고정화할 때, steady state 또는 transient analysis를 편리한 대로 선택하여 고정화 방법별 V_m 값을 비교함으로써 최적한 고정화 방법을 선정할 수 있는 가능성을 제시하였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특장연구과제(96-0502-05-01-3)로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

용 어 설 명

d_m	: thickness of membrane (cm)
F	: Faraday constant (96500 C/mol)
J	: current density of cathode ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
J_{si}	: initial current density at steady state ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
J_{sf}	: final current density at steady state ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
J_d	: difference of current density at steady state ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
K_m	: Michaelis-Menten constant (mM)
K_{ms}	: Michaelis-Menten constant from steady state analysis (mM)
K_{mt}	: Michaelis-Menten constant from transient analysis (mM)
n	: number of electron

P_o	: partial pressure of oxygen (cmHg)
S_b	: concentration of glucose (mM)
V_{ms}	: maximum difference of current density from steady state analysis ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
V_{mt}	: maximum reaction rate from transient analysis ($\mu\text{A}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$)

참 고 문 헌

- Plamen, A. and E. Wilkins (1994), Biosensor for Continuous Glucose Monitoring, *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 262-266.
- Riedel, K., R. Renneberg, U. Wollenberger, G. Kaiser, and F. W. Scheller (1989), Microbial Sensors : Fundamentals and Application for Process Control, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **44**, 85-106.
- Vadgama, P. and P. W. Crump (1992), Biosensors : Recent Trends, *Analyst*, **117**, 1657-1670.
- 박인선, 김정호, 김태진, 노봉수 (1997), Dual Cathode Electrode를 이용한 바이오센서로 요쿠르트중의 젓당 및 젓산의 동시 측정, *한국생물공학회지*, **12**, 8-16.
- Kim, T. J. (1989), A Steady State One-Dimensional Analysis of an Oxygen Electrode in Stationary and Flowing Liquid, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **4**, 150-155.
- Cass, A. E. G. (1990), Biosensors, pp. 211-263, Oxford Univ. Press, New York.
- Mosbach, K. (1976), Method in Enzymology : Immobilized Enzymes, pp.397-450, Academic Press, New York.
- Meyerhoff, M. E. and G. S. Cha (1989), Potentiometric Ion- and Bio-Selective Electrodes Based on Asymmetric Cellulose Acetate Membranes, *Talanta*, **36**, 271-278.
- 홍성현, 김태진, 정승섭, 김승욱, 윤정원 (1995), 바이오센서용 CTA와 PCL 혼합막에의 효소 고정화 기법의 개발, *한국생물공학회지*, **10**, 468-474.
- D'Angiuro, L. and P. Cremonesi (1982), Immobilization of Glucose Oxidase on Sepharose by UV-initiated Graft Copolymerization, *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 207-216.
- Arica, M. Y. and V. Hasirci (1993), Immobilization of Glucose Oxidase : A Comparison of Entrapment and Covalent Bonding, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **58**, 287-292.
- 전재현, 한미영, 김두식 (1989), Glucose Oxidase 효소 전극 제조 : 물리적 방법에 의한 효소의 고정화, *한국생화학회지*, **22**, 473-478.