

논문 99-8-3-06

산소센서용 CTA/PCL 효소고정화막과 반투막을 단일화한

PVA적층막의 제조 및 특성

서종원*, 김태진**, 정용섭***, 윤정원*

Preparation and Characteristics of a Single-layer PVA Laminated

CTA/PCL Membrane for Oxygen Biosensor Electrode

Jong-Won Seo*, Tae-Jin Kim**, Yong-Seob Jeong***, Jeong-Weon Yoon*

요 약

바이오센서로 이용되는 산소센서에는 효소고정화막과 함께 반투성막이 필요한데, 이러한 두 층의 막은 취급이 쉽지 않아서 상업화 하기가 불리하므로, 이 두 막을 하나의 적층막으로 제조하였다. cellulose triacetate/polycaprolactone(CTA/PCL)막에 1,1'-carbonyl diimidazole(CDI) 방법으로 glucose oxidase, ascorbate oxidase, pyruvate oxidase와 alcohol oxidase 등의 효소를 고정화시킨 다음, 그 위에 polyvinylalcohol을 알데하이드와 산과 혼합하여 적층방법으로 단일막을 제조하였다. 고정화된 이 적층막을 산소전극에 부착하여 glucose, ascorbate, pyruvate, ethanol의 농도에 따른 전류변화를 측정된 결과, 각각 5-10mmol 이내의 기질농도에서 0.38-0.83 μ A까지 r=0.995의 선형성을 나타내었다. 한편, 고정화된 적층막의 저장중 안정성은 glucose oxidase는 8주 후에도 56% 이상의 활성을 나타내고 있었으나 나머지 효소들은 효소의 안정성이 낮았다.

Abstract

The oxygen electrode of a biosensor needs enzyme immobilized membrane and a dialysis membrane to measure the oxygen concentration that remains after an enzyme reacts with its substrate. Accordingly, a single-layer PVA laminated CTA/PCL membrane was developed as an oxygen biosensor electrode. The enzymes were immobilized on a cellulose triacetate/polycaprolactone membrane using the 1,1'-carbonyl diimidazole(CDI) method, and then laminated with polyvinyl alcohol, aldehyde and acid. The alcohol oxidase and PVA laminated CTA/PCL membrane was tested with various concentration of enzyme substrates using a Yellow Springs Instrument(YSI) oxygen sensor. Under 5-10mmol substrates produced 0.37-0.83 μ A(r=0.995) currents, and after 8 weeks the glucose oxidase activity remained at about 56%, while the other activities remained very low. A SEM indicated a smooth surface and tightly attached PVA on the enzyme-immobilized CTA/PCL membranes.

1. 서 론

* 수원대학교 생명과학부(Div. of Life Science, Suwon Univ.)

** 수원대학교 고분자화학공학부(Div. of Polymer & Chemical Eng., Suwon Univ.)

*** 전북대학교 식품공학과(Dept. of Food Scien. & Techn., Chonbuk Nat'l Univ.)

<접수일자 : 1998년 9월 30일>

산소전극을 이용한 바이오센서는 전극의 막에 효소들을 고정화하고, 효소의 기질특이성, 작용특이성, 저농도 반응성 등의 특징을 이용하여 용액 속에 존재하는 기질의 양을 측정할 수 있다^[1-5]. 측정대상물질은 포도당을 비롯하여, 알콜, 유당, 젖산, 요산, 자당 NADH,

ATP 등의^[6] 산화효소를 단일 또는 복합효소를 고정화하여 비교적 간단하게 용존화합물들을 측정할 수 있으므로 상업용 바이오센서로 많이 이용되고 있다. 그러나 산소전극을 사용하여 효소반응에 의해 소모되는 산소의 양을 측정하기 위해서는 측정용액과 효소고정화막 사이의 반투막이 필요하다. 지금까지 반투막으로는 cellulose계열의 dialysis membrane이 주로 사용되어 왔으나, 이것은 산소전극 위에도 효소고정화막과 반투막을 이중으로 씌워야 한다. 이때에 반투막과 효소고정화막과의 막 사이가 일정하지 않아서 두 막사이의 간격 차이가 나타나게 된다. 따라서 효소반응으로 발생하는 산소의 소모량은 일정하게 나타나더라도, 두 막사이의 공간이 일정하지 않으면 측정대상물질의 농도와 산소 소모량과의 비례관계가 일정하지 않게 나타나게 된다. 그러므로 본 연구의 목적은 산소전극에 부착되는 효소고정화막 위에 반투과성^[10] 고분자물질을 적층하여, 단일화된 효소고정화적층막을 제조하고, 그 특성을 검토하고자 하였다.

II. 실험

1. 효소고정화 방법

효소고정화에 사용된 막은 산소투과성이 양호하고 효소고정화가 용이한 cellulose triacetate/polycarprolactone : 80/20(w/w)을 전북대학교 식품공학실험실에서 제공받았다^[7]. 이 막을 증류수에 15분 동안 담가서 충분히 swelling 시킨 다음, 1M sodium hydroxide 용액에서 5시간 동안 상온에서 반응시켜 표면을 수산화시키고 증류수로 세척하여 공기 중에서 건조시켰다^[8]. 다음으로 1,1-carbonyl diimidazole (CDI)를 과량으로 첨가한 4°C 증류수 용액에 15분 동안 담가서 활성화시켰다. 이것을 증류수로 세척한 뒤에 12.5%의 ethylene-diamine이 녹아 있는 0.1M sodium carbonate buffer (pH 10)용액에 넣고 상온에서 3시간 동안 반응시켜 아민화하고 2.5% glutaraldehyde 와 고정화시킬 효소용액을 1 : 2(V/V) 비율로 혼합하여 건조된 후의 두께가 10 μ m 정도 되도록 처리하고 4°C에서 12시간 동안 반응시켜 효소를 고정화하였다(그림 1)^[9, 10].

2. 효소고정화막과 반투막을 단일화시킨 여러 가지 종류의 적층막 제조

4.0 unit의 Glucose oxidase를 CDI방법으로 30 mm²

넓이의 CTA/PCL막에 고정화시킨 후에, chitin, polyurethan, PVA를 가지고 적층막을 제조하여, 이들의 특성을 검토하였다(그림 3). 5%의 polyvinylalcohol (PVA, Mol. Wt. 30,000-70,000, Dry)를 가지고 공중합체를 제조하기 위하여 2.5%의 glutaraldehyde와 0.05N HCl용액을 2:1로 혼합한 다음, 양쪽 끝에 테이프를 부쳐서 두께를 조절할 수 있는 유리판위에 효소고정화막을 올려 놓고나서 그 위에도 용액을 붓고 나서 유리막대를 사용하여 약 8 μ m 정도(건조후에는 약 3 μ m 정도) 되도록 도말하였다. 4°C에서 8시간동안 반응시켜서 폴리머막을 적층하였다. 한편, 반투막으로서 효가를 기대해 볼 수 있는 chitin과 cellulose은 1:9의 비율로 N,N-dimethylacetamide와 lithium chloride(95:5/w:w)에 용해시킨 다음에 적층막으로 도말하였고, polyurethan은 그대로 효소고정화막 위에도 적층하였다(그림 2).

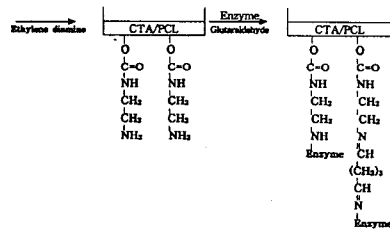
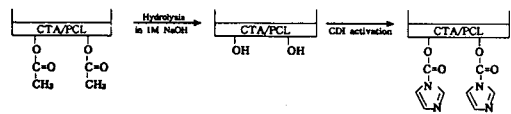


Fig. 1. The method of immobilization by CDI method on CTA/PCL membrane

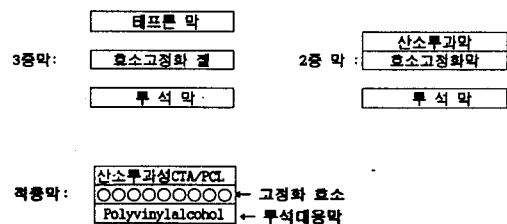


Fig. 2. The types of immobilized and dialysis membrane of DO-electrode for biosensor

3. 효소적층막을 이용한 측정대상물질의 농도측정

수원대학교 화학공학과 실험실에서 자체 제작한 Clark type 산소전극^[11] 위에 단일화된 효소적층막을

씩은 후 O-ring으로 고정화시켰다. 이 전극을 YSI 제품(Model 58)의 용존산소측정기에 연결하였으며, 출력은 XY-recorder를 사용하였다(그림 3).

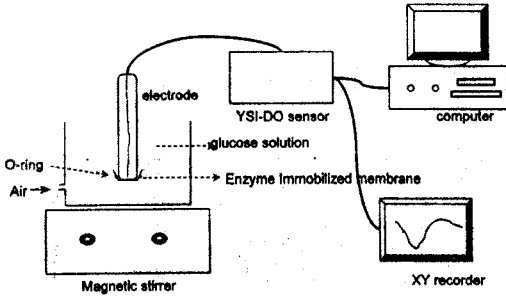


Fig. 3. The block diagram of oxygen electrode biosensor with enzyme immobilized CTA/PCL membrane

III. 결과 및 고찰

4.0 unit의 glucose oxidase를 CDI 방법으로 30 mm² 넓이의 CTA/PCL막에 고정화시킨 후에 chitin, polyurethane 및 여러 가지 PVA를 가지고 적층막을 제조하여, 이들의 특성을 검토하였다(그림 4). Chitin 적층막은 산소투과도는 양호하였으나 전류변화가 포도당 5 mmol에서 0.11 μ A만을 나타내어 포도당의 적층막 투과가 어려운 것으로 여겨졌으며, polyurethane적층막은 산소투과도가 낮아서 같은 포도당농도에서 0.10 μ A만을 나타내어 부적합하였다^[14]. PVA는 적당한 양의 알데하이드와 산이 존재할 때에 불용성의 폴리머를 형성하는데, 효소적층막으로서는 5% PVA 200 μ l에 2.5%의 glutaraldehyde 200 μ l와 0.05 N HCl 100 μ l를 혼합하여 적층막을 제조하였을 때에, 물리적 성질도 양호했으며, 5 mmol의 포도당농도에서 0.83 μ A의 전류차이를 나타내고 있었다. 반투막을 사용한 포도당센서에 비교하여 80%이상의 전류차이를 나타내어 반투막을 대신한 단일화된 효소적층막이 산소전극에 사용될 수 있음을 보여주었다. 위의 glucose oxidase를 고정화한 PVA 적층막을 가지고 용존산소측정기인 YSI 산소전극에 부착하여 포도당농도에 따라서 소모되는 산소의 양을 측정할 결과 그림 5와 같았다. 포도당농도가 0 mM에서 2.3 mg/l의 산소량을 나타냈으며, 5 mM에서는 0.17 mg/l의 산소량이 측정되었으며 r=0.9998의 값의 선형성을 나타내고 있었다. 한편, 용존산소 측정장치의 용액에 포도당을 첨가하면 1분 이내에 산소 소모량이 최

저점에 도달하여, 이 효소적층막은 효소고정화막과 반투막을 일체화시킨 단일막으로서 매우 적합하였다.

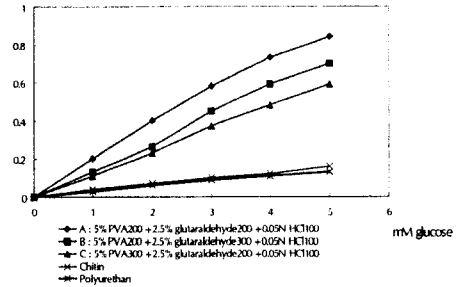


Fig. 4. The calibration curve of various mono layered membrane with immobilized GOD by CDI method on CTA:PCL/80:20 membrane from glucose concentration vs. difference of current between initial and steady state by DO-electrode

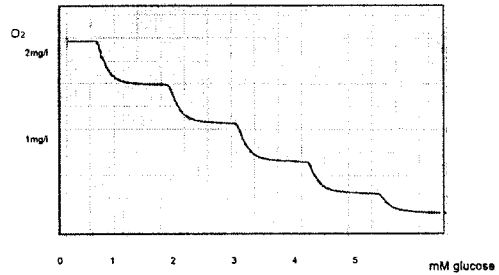


Fig. 5. Time distribution of current density at various concentration of glucose which immobilized by CDI method in PVA monolayer

같은 방법으로 ascorbate oxidase^[15]를 고정화한 PVA적층막을 가지고 ascorbate를 측정할 결과 5 mM에서 0.55 μ A를, pyruvate^[16]는 pyruvate oxidase를 고정화한 적층막에서 10 mM 까지 0.37 μ A를, 그리고 alcohol oxidase^[17]를 고정화한 적층막을 사용하여 농도를 측정할 결과 ethanol 5%에서 0.42 μ A의 전류변화를 나타내었다. 네 종류의 측정용액 모두에서 r=0.995 이상의 선형성을 보였다(그림 6).

효소가 고정화된 효소적층막들을 4 $^{\circ}$ C로 보관하면서 안정성을 측정하였다. glucose oxidase는 고정화 후에도 8주 후에 활성이 56%를 유지하고 있었으나, ascorbate oxidase는 4주 후부터는 14%이하로 떨어졌

으며, pyruvate oxidase는 3주 후에 19%만 남아 있었다(그림 7). 한편, alcohole oxidase는 1주 후에 이미 모든 효소활성을 잃어버려서, 앞으로 효소의 안정성 향상에 관한 연구가 수행되어야 한다.

PVA적층막의 미세구조를 관찰하기 위하여 전자현미경으로 촬영한 결과 그림 8과 같이 CTA/PCL막 위에 3 μm 정도의 PVA막이 형성되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

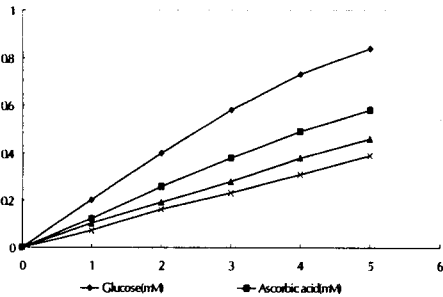


Fig. 6. The calibration curve of current by DO sensor between initial and steady state of PVA monolayerd membrane with various immobilized enzymes by CDI method

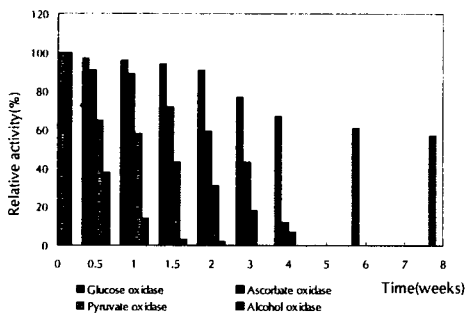


Fig. 7. The relative activity of immobilized enzymes by CDI method in PVA monolayerd membrane after storage at 4°C

IV. 결 론

산소센서용 산소전극을 바이오센서로 이용할 때에는 효소고정화막과 함께 반투성막이 필요하다. 이러한 이중막은 취급이 쉽지 않고 두막사이의 간극이 일정하지 않아 측정값이 일정하지 않으므로, 이 두 막을 하나의

적층막으로 제조하고자 하였다. 적층막으로는 chitin, polyurethane, polyvinylalcohol중에서 PVA가 접착도나 투과도 등이 가장 적당하였다.

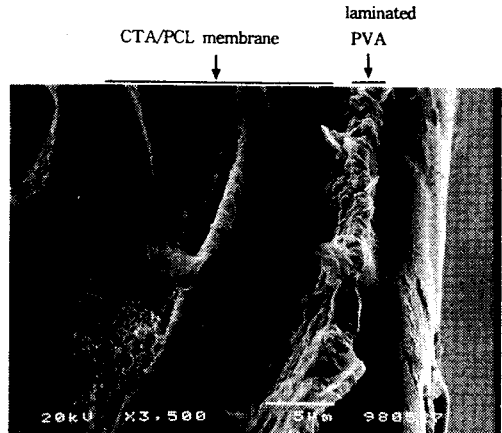


Fig. 8. Scanning electron microscoph of PVA laminated and glucose oxidase immobilized on CTA/PCL membrane by CDI method.

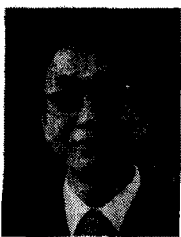
cellulose triacetate/polycaprolactone막에 CDI 방법으로 glucose oxidase, ascorbate oxidase, pyruvate oxidase와 alcohole oxidase 등의 효소를 고정화시킨 다음, 그 위에 polyvinylalcohol을 glutaraldehyde를 1:1로 혼합한후 0.01N HCl을 50%가하여 폴리머화하고 적층을 형성하였다. 효소가 CTA/PCL막과 PVA막 사이에 고정화된 PVA적층막을 산소전극에 부착하여 농도에 따른 전류변화를 측정 한 결과, glucose는 5 mM에서 0.83μA의 전류차이를, ascorbic acid는 5 mM에서 0.56 μA, pyruvic acid는 50 mM에서 0.38μA를 그리고 ethanol은 5%에서 0.43 μA의 전류차이를 나타냈으며, 선형성은 모두 r=0.995 이상을 나타내었다. 한편, 고정화된 적층막의 저장중 안정성은 glucose oxidase의 경우 8주 후에도 56% 이상의 활성을 나타냈으나 나머지 효소들은 효소의 안정성이 낮았다.

참 고 문 헌

- [1] A. E. G. Cass, Biosensors, IRL Press, New York. pp, 1-46, 1990.
- [2] M. A. Krysteva and L. K. Yotova, "Multienzyme membranes for biosensors," *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, vol. 54, pp. 13-17, 1992.

- [3] O. K. Lee, T. J. Kim and B. S. No, "Determination of ethanol in alcoholic beverages by alcohol oxidase sensor." *Korean J. Food Sci. Technol.*, vol. 27, pp. 266-270, 1995.
- [4] B. S. Thevenot and R. Stenger, "Enzyme collagen membrane for electrochemical determination of glucose," *Anal. Chem.*, vol. 51, pp. 96-101, 1979.
- [5] D. Williams, A. R. Doig and A. Korsi, "Electrochemical enzymatic analysis of blood glucose and lactate," *Anal. Chem.*, vol. 42, pp. 118-121, 1970.
- [6] R. P. Buck, E. H. William, U. Mirtha and F. B. Edmond, *Biosensor technology*, Marce, Dekker, INC., 1990.
- [7] 홍석인, 박희영, 김현준, 정용섭, "산소 전극 시스템에 사용되는 고분자막에 대한 연구," 한국화학공학회, pp. 89-92, 1995.
- [8] G. S. Cha and M. E. Meyrhoff, "Potentiometric ion- and bio-selective electrodes based on asymmetric cellulose acetate membrane," *Talanta*, vol. 36, pp. 271-278, 1989.
- [9] H. S. Yim, C. E. Kibbey, S. C. Ma, M. D. Kliza, D. Lij and B. S. Park, "Polymer membrane-based ion-, gas- and bio-selective potentiometric sensors," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 8, pp. 1-13, 1993.
- [10] 홍성현, 김태진, 정용섭, 김승욱, 윤정원, "바이오센서용 CTA와 PCL 혼합막에 효소고정화 기법의 개발," *한국생물공학회지*, vol. 10, no.3, pp. 468-474, 1995.
- [11] 박희영, 홍석인, 김현준, 김태진, 정용섭, "산소 전극 시스템에 사용되는 polysulfone 막에 대한 연구," *한국공업화학지*, vol. 7, no. 5, pp. 877-887, 1996.
- [12] M. Y. Arica and V. Hasirci, "Immobilization of glucose oxidase : A comparison of entrapment and covalent bonding," *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, vol. 58, pp.287-293, 1993.
- [13] P. C. Pandey, A. M. Kayastha and V. Pandey, "Amperometric enzyme sensor for glucose based on graphite paste modified electrode," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 33, pp. 139-146, 1992.
- [14] B. R. Eggins, "Biosensors, an introduction," John Wiley & Sons and B. G. Teubner, pp. 31-86, 1996.
- [15] B. Danielson and K. Mosbach, "Biosensors : Fundamental and Applications," Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 585-598, 1986.
- [16] F. W. Scheller, D. Pfeifer, F. Schubert, R. Renneberg and D. Kirsten, "Application for enzyme-based amperometric biosensors to the analysis of 'real' samples" in A. P. F. Turner, I. Karube, and G. S. Wilson, *Biosensors : Fundamental and Applications*, Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 315-346, 1987.
- [17] L. C. Clark, Jr, "The enzyme electrode," in A. P. F. Turner, I. Karube and G. S. Wilson, *Biosensors : Fundamentals and Applications*, Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 3-12, 1987.

著 者 紹 介



윤정원

1949년생. 1985년 독일 Hamburg 대학 이학박사 생화학전공, 1996년 - 현재 수원대학교 유전공학과 근무, 1994년 - 1995년 미국 NIH 연구원, 관심분야 : 바이오센서용 효소의 고정화방법 개발, Dex-

tranas을 이용한 충치예방제개발



김태진

1952년생, 1986년 미국 Syracuse University 공학박사, 1989년 - 현재 수원대학교 화학공학과 근무
관심분야 : 바이오센서용 전극개발, 각종센서의 제조 및 개발

서종원

1970년생, 1996년 수원대학교 유전공학과 졸업, 1996년
수원대학교 대학원 입학

정용섭

1953년생, 1989년 미국 Rutgers 대학교 공학박사, 생물
화학공학전공, 1991년 - 현재 전북대학교 식품공학과
근무

관심분야 : 반투성 막의 개발