

μFIA 바이오센서를 이용한 자당 농도 측정

송대빈

Measurement of Sucrose Concentration Using a μFIA Biosensor

D. B. Song

Abstract

A microdialysis coupled flow injection amperometric (μFIA) biosensor was calibrated to measure the concentration of sucrose using 11 standard samples from 2 ml to 70 ml of sucrose solution. The output of the sensor increased linearly with an increase in the sucrose concentration with an r^2 correlation of 0.99. The amperometric biosensor was then applied to measure the sucrose concentration of 4 commercial samples (Orange and Pineapple juices, Pepsi, Sprite) and the results compared with those by HPLC. Around 20~30% error was observed in sucrose concentration measurements of the samples analyzed. The sensor has potential in rapid measurement once the calibration is done. Potential for on-line sensing is also discussed.

Keywords : Biosensor, Sucrose measurement, FIA, Microdialysis probe

1. 서론

생물반응공정은 일반 화학반응과 달리 반응에 관여하는 물질들의 상태가 pH, pO₂, 온도 및 CO₂와 같은 공정요인에 따라 매우 민감하게 변화한다. 따라서 공정을 안정적으로 유지하기 위해서는 반응에 관여하는 물질의 농도를 실시간으로 측정하는 것이 필요하다.

그러나 생물반응공정에서 반응에 관여하는 기질의 농도, 생성물의 농도를 기존의 물리적 현상을 이용하는 계측장치로 측정하는 것은 정확성 측면에서 적절한 방법이라고 볼 수 없다. 따라서 생물반응공정에서 나타나는 생물학적 인식요소들을 측정 가능한 전기적 신호로 변환시켜 주는 센서 장치의 적용이 필요하다. 발효공정은 대표적인 생물반응공정으로 기존의 음식 및 주류의 생산 외에 최근에는 유효 미생물의 생산에 다양하게 적용되고 있다. 발효공정은 대부분 당을 기질로 사용하기 때문에 공정 중 당 농도의 변화를 실시간으로 측정할

수 있는 장치의 개발이 필요하다.

흐름주입분석(FIA, flow injection analysis)은 연속적인 흐름을 유지하는 완충용액 중에 효소와 반응대상물(기질)을 투입하여 반응 결과 발생하는 산소의 농도나 과산화수소를 산화시켜 발생하는 전자를 전위차나 전류치로 측정하여 반응대상물의 농도를 측정하는 방법으로, Ruzicka와 Hansen(1975)에 의해 처음으로 소개되었다. FIA는 기존의 분석 방법에 비해 시료 샘플링 회수를 높일 수 있고 반응 시간을 단축시킬 수 있으며 다양한 대상물 측정에 적용이 가능하다는 이점이 있어 공정 분석 및 감시에 적합한 방식으로 인식되고 있다(Schugerl 등, 1996). Rocha와 Ferreira(2002)는 흐름주입식 센서를 이용하여 *E. coli* 합성 공정 중에 발생하는 포도당과 초산염의 농도를 온라인으로 동시에 측정하였으며, Min 등(1998)은 자동 샘플링 기구를 이용한 흐름주입식 센서를 이용하여 발효공정 중 포도당과 젖산의 농도를 동시에 온라인으로 감시하였다. Song 등(2003)은 자동 샘플링 기구(microdialysis probe)를

이용한 흐름주입식 센서를 이용하여 포도당 농도를 측정하고 HPLC로 측정한 값으로 성능을 검증하여 온라인 측정의 가능성을 제시하였다. 흐름주입분석법을 이용하는 바이오센서는 주로 효소를 세포막에 고정시킨 전극봉 형태로 개발되어 사용되고 있으나, 반응에 관여하는 산소 농도, 반복사용으로 인한 효소활성 저하 등의 문제로 반응공정 감시 및 온라인 제어 등의 용도로 사용하는데 한계가 있다.

따라서 이 연구에서는 효소 전극봉이 갖는 문제점을 해결하고자 효소와 기질이 완충용액 중에 투입되어 반응하는 형태의 흐름주입식 센서를 사용하여 이당류인 포도당(glucose)의 농도 차이를 이용하여 이당류인 자당(sucrose) 농도 측정의 가능성을 알아보려고 하였다.

2. 센서 측정 원리

가. 자동 샘플링

공정이 연속적으로 진행되는 가운데 분석 물질의 농도를 연속적으로 측정하기 위해서는 공정 중에 시료를 연속적으로 채취할 수 있는 적절한 샘플링 장치가 필요하다. 이 연구에서는 의료용으로 사용되는 microdialysis probe를 샘플링 장치로 사용하였다. Fig. 1은 microdialysis probe를 사용한 샘플링 장치의 개략도를 나타낸 것이다. 샘플용액에 microdialysis probe를 담근 후 완충용액의 공급을 중단하면 probe 안쪽의 완충용액과 바깥의 샘플용액간의 자당 농도 차이에 의한 삼투작용으로 샘플용액 중의 자당은 probe 안쪽으로 이동하여 probe 내부는 자당으로 충전하게 되고 이와 동시에 probe 내의 완충용액은 샘플용액으로 이동된다. 삼투작용에 의해 probe 내부로 완전히 이동된 자당은 펌프로부터 probe 아랫부분으

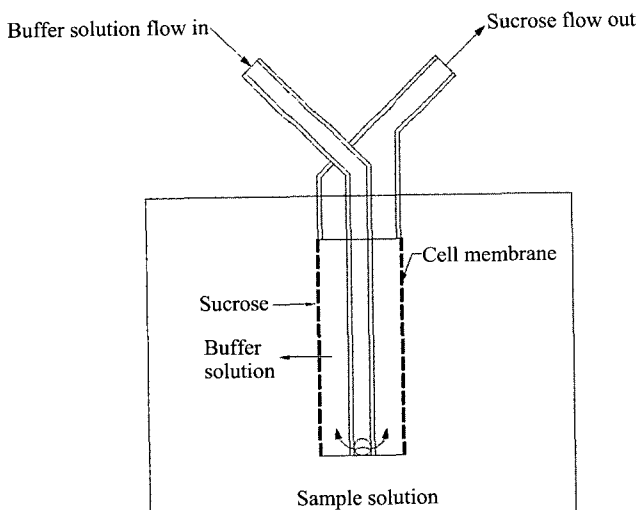
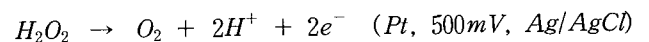
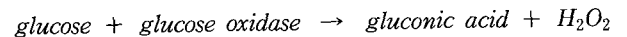
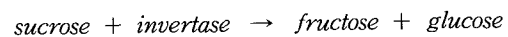


Fig. 1 Schematic diagram of the auto sampler.

로 공급되는 완충용액에 의해 probe 밖으로 배출된다. 이와 같이 완충용액의 공급, 정지, 재공급의 반복 과정으로 일정량의 자당 샘플링이 가능하도록 장치를 구성하였다.

나. 자당 농도 측정

이당류인 자당은 효소(invertase)와 반응하여 단당인 과당(fructose)과 포도당으로 나누어지고 단당인 포도당은 효소(glucose oxidase)와 반응하여 gluconic acid와 과산화수소를 생성한다. 이 때 생성된 과산화수소를 백금을 촉매제로 사용하여 전기-화학적 방법으로 산화시키면 전자를 방출하게 된다. 이렇게 방출된 전자 수는 포도당의 농도와 비례하기 때문에 포도당의 농도를 전류값으로 측정할 수 있다(Cass, 1990). 따라서 반응 전후의 포도당의 농도를 비교하여 자당의 농도를 전류값으로 측정할 수 있다. Fig. 2는 실험에 사용된 전류값 측정을 위한 electrochemical cell의 구조도이다.



3. 재료 및 방법

가. 실험 장치

실험에 사용된 μFIAS는 Fig. 3과 같이 구성되었다. 펌프에 의해 토출된 완충용액은 방향조절용 인젝션 밸브로 공급된다. 인젝션 밸브의 유로 선택에 따라 microdialysis probe에 의해 샘플 용액으로부터 자당이 인젝션 밸브내로 유입되고 혼합효소(glucose oxidase, invertase)는 주사기를 사용하여 수동으로 인젝션 밸브 내로 투입된다. 투입된 자당과 혼합효소는 흐름 관로 안에서 반응을 일으키면서 electrochemical cell의 전

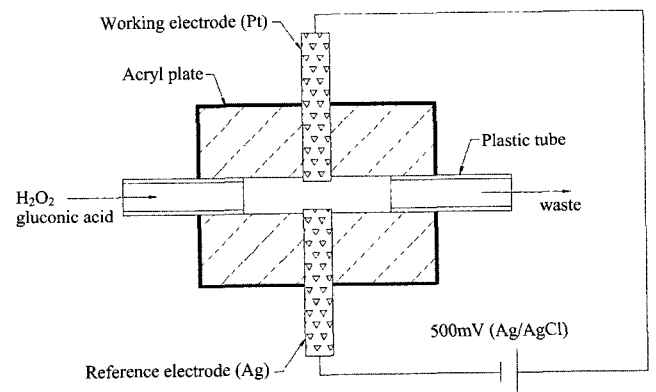


Fig. 2 Schematic diagram of the electrochemical cell.

Table 1 Specifications of μ FIA biosensor.

Component	Specification	Remarks
Syringe pump	2.5 L, 25 μ L/min	BioAnalytical Systems, Inc.
Injection valve	10port, C22Z-3180E	Valco Instrument Co. Ins.
Sampling system	2.5 μ L, CMA/12	CMA/Microdialysis
Electrochemical cell	5 μ L	W. E. (platinum. \varnothing 1 mm) R. E. (silver coated with AgCl. \varnothing 2 mm)
Potentiostat	200 nA, +500 mV (Ag/AgCl). LC-3D	BioAnalytical Systems, Inc.
Data acquisition	Lab VIEW	National Instruments.

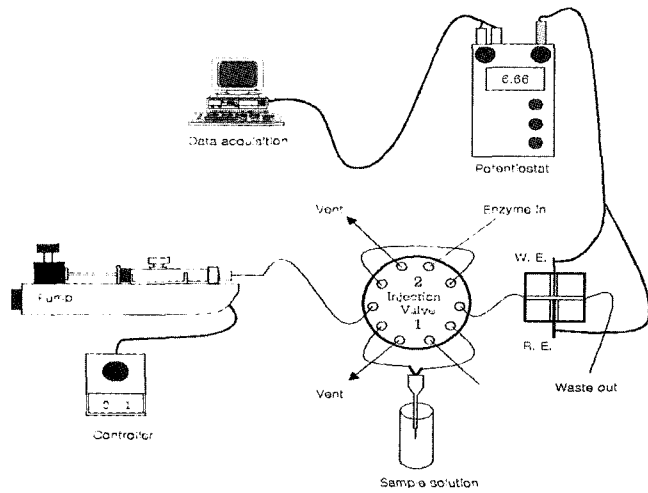


Fig. 3 Schematic representation of the μ FIA biosensor.

극봉 사이를 통과하여 배출된다. Electrochemical cell의 전극봉에서 검출된 전류값은 전류계를 거쳐 컴퓨터로 전송되어 파일로 저장되도록 구성하였다. 실험 장치를 구성하는 각 부품의 상세한 규격은 Table 1과 같다.

나. 실험 재료

실험에 사용된 재료의 종류 및 상세한 규격은 Table 2와 같다. 자당과 증류수를 사용하여 각 농도별로 4 mL의 표준 자당 용액을 제조하였다. Glucose oxidase, invertase와 증류수를 사용하여 0.5 mg/mL의 혼합효소 용액을 제조하였다. Sodium

phosphate(mono/dibasic), sodium chloride 및 증류수를 사용하여 0.5 M의 Sodium phosphate 완충용액(pH 7.0, 10 mM NaCl)을 제조하였다. 센서의 성능을 검증하기 위해 시판되는 4종류 제품(Orange juice, Pineapple juice, Pepsi, Sprite)을 사용하였다.

다. 실험 방법

1) 센서 작동

고안된 센서는 샘플링, 효소용액 투입, 전류값 측정의 3개 과정으로 구성되어 있다. 샘플링은 Fig. 4에서 인젝션 밸브가 1의 위치로 선택된 경우 펌프에서 토출된 완충용액은 microdialysis probe를 통과하면서 삼투 작용으로 probe내에 흡입된 자당 용액을 인젝션 밸브 밖으로 밀어낸다. 이 때 인젝션 밸브의 유로가 차단된 2의 위치에 주사기로 혼합효소용액을 투입하는 작업이 동시에 이루어진다. 혼합효소 용액 투입 과정은 인젝션 밸브가 2의 위치로 선택된 경우에는 펌프에서 토출된 완충용액이 샘플링 과정 중 주사기로 투입된 관로 내 혼합효소를 인젝션 밸브 밖으로 이송시키는 사이클이다. 위의 두 과정이 연속적으로 진행되면 인젝션 밸브와 electrochemical cell 사이의 관로에 자당과 혼합효소가 연속적으로 투입되어 반응하게 된다. 전류값 측정 과정은 인젝션 밸브를 통과한 자당과 혼합효소가 혼합·반응하여 생성된 과산화수소수가 electrochemical cell 내의 전극봉 사이에서 산화되어 발생하는 전류값을 측정하는 과정이다. 샘플링과 효소용액 투입 과

Table 2 Specifications of the experimental materials.

Chemical	Specification	Remarks
Glucose oxidase	Type X-S, 245.9 unit/mg	Sigma Chemical Co.
Invertase	300 units/mg	Sigma Chemical Co.
Sucrose	C12H22O11	Sigma Chemical Co.
Sodium phosphate	Monobasic (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O)	EM Industries, Inc.
Sodium phosphate	Dibasic (Na ₂ HPO ₄)	EM Industries, Inc.
Sodium chloride	NaCl	EM Industries, Inc.

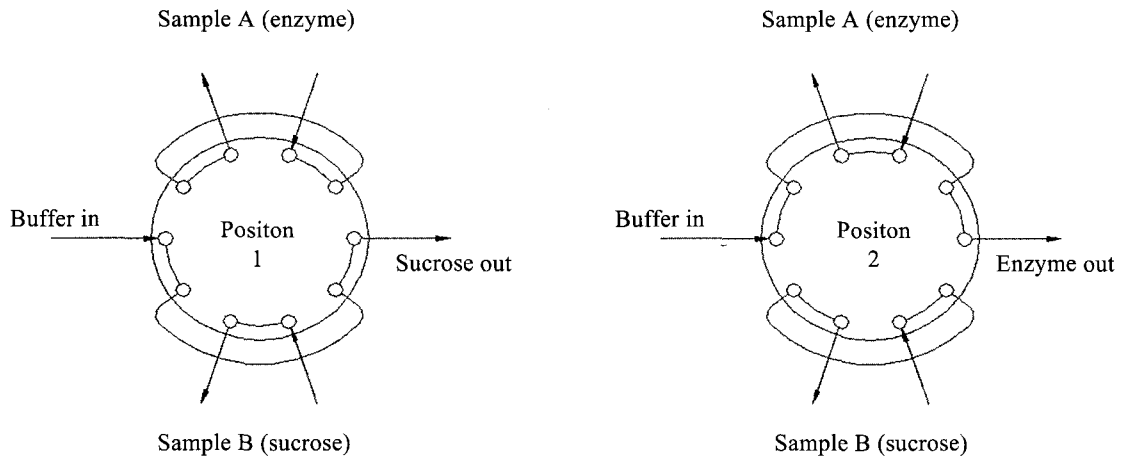


Fig. 4 Schematic diagram of the injection valve.

정은 동시에 이루어지며 나머지는 전류값 측정 과정으로 이루어진다. 실험에서 완충용액의 유속은 25 μL/min로 하였다. 샘플링과 효소용액 투입과정은 microdialysis probe의 체적과 유속을 감안하여 8초로 결정하였고 전류값 측정은 292초로 하여 1회 측정시간이 300초가 되도록 하였다.

2) 농도 측정 및 성능 검증

자당 농도를 전류값으로 환산하기 위해 11 수준(2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 mM)의 표준 자당 용액을 사용하여 각 샘플 농도에서 전류값을 측정하였다. 각 농도에서 5회 반복 측정하여 평균값을 사용하였다. 센서의 성능을 검증하기 위해 시판되는 4종류 제품(Orange juice, Pineapple juice, Pepsi, Sprite)의 자당 농도를 센서로 측정하고 이를 HPLC(Carbohydrate analysis 125A 10 μm water 3.9×300 nm)의 측정값과 비교하였다. 시판되는 시료에는 자당 외에 여러 가지 성분이 혼합되어 있으며, 특히 포도당 농도는 자당 농도에 직접적인 영향을 미친다. 따라서 glucose oxidase를 사용하여 시료의 포도당 농도를 먼저 측정하였다. 다음에 동일 시료에 glucose oxidase와 invertase를 혼합하여 포도당 농도를 측정하였으며 두 포도당 농도차를 시료의 자당 농도로 하였다. 검증용 시료의 자당 농

도를 측정한 예비 실험 결과 시료의 자당 농도가 너무 높아 최대 전류값 200 nA를 초과하였기에 구입한 시료 전량을 500 mL 비이커에 채우고 자석 교반기에서 약 30분간 균질하게 한 후, 피펫을 사용하여 1회에 1 mL 씩 비이커의 5군데에서 총 10 mL의 시료를 고르게 채취하였다. 채취한 시료는 증류수를 사용하여 1/20로 희석하여 실험에 사용하였다.

4. 결과 및 고찰

가. 농도 측정

각 표준 자당 농도에서 측정된 전류값의 평균치, 표준 편차는 Table 3과 같다. 반복간의 표준편차는 센서의 반복성능을 나타내는 중요한 인자로 가능한 작은 것이 바람직하다. 이 실험에서는 40과 70 mM을 제외하고는 모두 10 이하의 편차를 나타냈다. 특히 10 mM 이하에서는 3 이하의 작은 편차를 보였다. 실험에서 편차가 크게 나타난 이유는 샘플링 시간의 변동에 따른 것으로 향후 시스템의 자동화를 통해 개선이 가능할 것으로 판단된다. Fig. 5는 자당 농도와 전류값의 상관관계를 나타낸 것으로 r² 0.99로 매우 높은 상관관계를 보였다.

Table 3 Peak electric current with the sucrose concentration.

unit : nA

Repetition	2 mM	4 mM	6 mM	8 mM	10 mM	20 mM	30 mM	40 mM	50 mM	60 mM	70 mM
1	6.70	10.70	14.90	16.50	21.90	38.60	53.70	72.30	108.10	139.10	135.60
2	6.80	10.60	14.90	18.60	24.00	40.60	60.60	82.70	116.00	132.70	138.50
3	6.50	9.80	14.40	18.60	25.50	41.30	56.20	88.00	120.30	137.40	155.90
4	6.60	10.10	16.10	20.20	26.50	46.90	64.50	101.20	120.30	134.80	164.20
5	6.40	10.90	16.70	15.80	27.50	47.00	65.00	109.30	126.20	138.40	159.30
Mean	6.60	10.42	15.40	17.94	25.08	42.88	60.00	90.70	118.18	136.48	150.70
S. D.	0.16	0.45	0.96	1.78	2.20	3.85	5.00	14.71	6.70	2.67	12.85

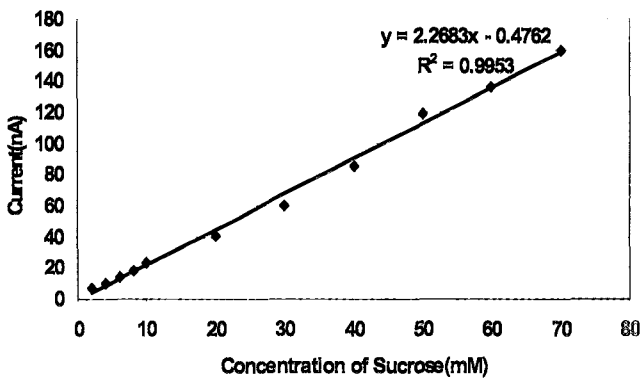


Fig. 5 Calibration of the sensor.

Table 4 Concentration comparison between the sensor and HPLC.

Product	Sensor (g/100 ml)	HPLC (g/100 ml)	Error (%)
Orange juice	1.76	2.49	29.53
Pineapple juice	0.33	0.25	34.92
Pepsi	0.83	1.04	20.56
Sprite	0.80	1.20	33.33

나. 성능 검증

센서의 성능 검증을 위해 시판되는 Orange, Pineapple juice, Pepsi, Sprite의 자당 농도를 비교한 결과는 Table 4와 같다. 실험 결과 HPLC의 측정값을 기준으로 약 20~30%의 매우 큰 오차를 보였다. 이처럼 비교적 큰 오차율을 나타낸 이유는 제품에 포함된 고형분과 기체 성분에 의한 샘플링 문제, 포도당 측정에서 나타난 약 12% 오차의 포함(Song 등, 2003) 등으로 판단되며, 향후 이러한 문제들을 보완한다면 오차율을 크게 낮출 수 있을 것으로 생각된다.

5. 요약 및 결론

반응 공정 중 특정 물질의 농도를 실시간으로 측정할 수 있도록 자동 샘플링 기구(microdialysis probe)를 사용한

틈주입식 센서(μ FIAS, microdialysis coupled flow injection amperometric sensor)의 성능 검증을 위한 실험을 수행하였다. 11개 샘플의 sucrose 농도를 측정된 결과 반복간 표준오차는 10 mM 이하에서는 3 이하, 20 mM에서 70 mM 사이에서는 40 mM과 70 mM을 제외하고는 10 이하를 보였다. 농도와 전류값은 R^2 0.99로 매우 높은 상관관계를 보였다. Orange, Pineapple juice, Pepsi, Sprite를 사용한 검증 실험결과 HPLC와의 오차율은 약 20~30%로 비교적 크게 나타났다. 이러한 반복간 표준편차 및 HPLC와의 오차율은 실험 장치의 개선, 실험 방법의 표준화 등으로 낮출 수 있을 것으로 판단되었다.

1. Cass, A. E. G. 1990. Biosensors - A Practical Approach. Oxford University Press, New York.
2. Min, R. W., V. Rajendran, N. Larsson, L. Gorton, J. Planas, and B. H. Hagerdal. 1998. Simultaneous monitoring of glucose and L-lactic acid during a fermentation process in an aqueous two-phase system by on-line FIA with microdialysis sampling and dual biosensor detection. *Analytica Chimica Acta.* 366: 127-135.
3. Rocha, I. and E. C. Ferreira. 2002. On-line simultaneous monitoring of glucose and acetate with FIA during high cell density fermentation of recombinant E. coli. *Analytica Chimica Acta.* 462: 293-304.
4. Ruzicka, J. and E. H. Hansen. 1975. Flow injection analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta.* 78:145.
5. Schugerl, K., B. Hitzmann, H. Jurgens, T. Kullick, R. Ulber, and B. Weigal. 1996. Challenges in integrating biosensors and FIA for on-line monitoring and control. *TIBTECH.* 14: 21-31.
6. Song, D. B. and J. Irudayaraj. 2003. Measurement of glucose concentration using μ FIA biosensor. *J. of KSAM.* 28(5): 465-468.