

## 효소고정화 방법에 따른 콜레스테롤 검출용 바이오센서의 전류 감응도 분석

지정윤<sup>1</sup>·김미라<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>경북대학교 식품영양학과·장수생활과학연구소

### Analysis of Amperometric Response to Cholesterol according to Enzyme-Immobilization Methods

Jung Youn Ji<sup>1</sup> and Mee Ra Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food Science & Nutrition, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Food Science & Nutrition, Center for Beautiful Aging, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

#### Abstract

Cholesterol is the precursor of various steroid hormones, bile acid, and vitamin D with functions related to regulation of membrane permeability and fluidity. However, the presence of excess blood cholesterol may lead to arteriosclerosis and hypertension. Moreover, dietary cholesterol may affect blood cholesterol levels. Generally, cholesterol determination is performed by spectrophotometric or chromatographic methods, but these methods are very time consuming and costly, and require complicated pretreatment. Thus, the development of a rapid and simple analysis method for measuring cholesterol concentration in food is needed. Multi-walled carbon nanotube (MWCNT) was functionalized to MWCNT-NH<sub>2</sub> via MWCNT-COOH to have high sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The fabricated MWCNT-NH<sub>2</sub> was attached to a glassy carbon electrode (GCE), after which Prussian blue (PB) was coated onto MWCNT-NH<sub>2</sub>/GCE. MWCNT-NH<sub>2</sub>/PB/GCE was used as a working electrode. An Ag/AgCl electrode and Pt wire were used as a reference electrode and counter electrode, respectively. The sensitivity of the modified working electrode was determined based on the amount of current according to the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The response increased with an increase of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in the range of 0.5~500 μM ( $r^2=0.96$ ) with a detection limit of 0.1 μM. Cholesterol oxidase was immobilized to aminopropyl glass beads, CNBr-activated sepharose, Na-alginate, and toyopearl beads. The immobilized enzyme reactors with aminopropyl glass beads and CNBr-activated sepharose showed linearity in the range of 1~100 μM cholesterol. Na-alginate and toyopearl beads showed linearity in the range of 5~50 and 1~50 μM cholesterol, respectively. The detection limit of all immobilized enzyme reactors was 1 μM. These enzyme reactors showed high sensitivity; especially, the enzyme reactors with CNBr-activated sepharose and Na-alginate indicated high coupling efficiency and sensitivity. Therefore, both of the enzyme reactors are more suitable for a cholesterol biosensor system.

Key words : Cholesterol, biosensor, immobilization, carrier.

#### 서론

최근 우리나라는 현대화가 급속도로 진행됨에 따라 가공 식품과 동물성 식품의 섭취가 증가하고, 식물성 식품의 섭취와 운동량 감소 등의 생활 패턴의 변화로 인한 고지혈증, 동맥경화증의 유병률이 증가하고 있으며, 이로 인해 발생하는 심혈관질환에 대한 관심이 고조되고 있다(Lee KW 1993, Stehbens WE 1989, 국민건강통계 2009). 콜레스테롤은 세포막의 주된 구성성분으로 막의 투과성과 유동성을 조절하며, 각종 스테로이드 호르몬과 담즙산, 비타민 D의 전구체로 체내에서 중요한 역할을 담당하지만(Feeley *et al* 1972, Goodhart & Shils 1980), 콜레스테롤 함량이 높은 식품의 다량 섭취는 혈중

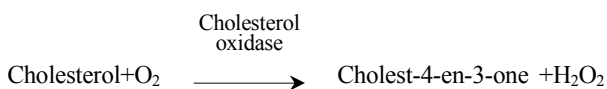
콜레스테롤 증가를 야기할 수 있으며, 혈중 고콜레스테롤은 심혈관계 질환의 발생에 중요한 위험인자로 알려져 있다(Basu *et al* 2007, Lee KW 1993, Song *et al* 1991). 또한 이는 고지혈증의 주요 원인이며, 관상동맥질환 발생에 직접적인 영향을 주는 것으로 보고되었다(Cho SH 1994, The Lipid Research Clinic Program 1984). Lee KW(1993)에 따르면 포화지방산이나 콜레스테롤이 많이 함유된 음식을 다량 섭취할 경우, 적게 섭취할 때보다 동맥경화증으로 인한 심장혈관질환, 특히 관상동맥질환의 빈도가 높다고 하였다.

일반적으로 식품의 콜레스테롤 분석은 Soxhlet 방법 등을 통하여 추출한 식물 및 동물 조직 내 지질을 sterol 용해제인 유기용매로 용해하여 GC(gas chromatography)나 LC(liquid chromatography), HPLC(high performance liquid chromatography), 동위원소를 이용한 LC/MS(liquid chromatography-mass

\* Corresponding author : Mee Ra Kim, Tel : +82-53-950-6233, Fax : +82-53-950-6229, E-mail : meerak@knu.ac.kr

spectrometry) 등의 기기분석법을 통하여 정성 또는 정량하는 방법으로 이루어져왔다. 그러나 이러한 기존의 분석법들은 고가의 장비와 기술을 요하며 시료의 전처리가 복잡하고 분석시간이 오래 걸리는 단점들을 가지고 있다(Augllo & Susna 1996, Blomhoff JP 1973, Chang & Yang 2001, Jo KS 2006, Kim *et al* 1997, Oh *et al* 1996, Shin *et al* 2008, Wong *et al* 1994). 따라서 이러한 분석법들의 단점을 보완하기 위해 기질 선택성이 높으며, 신속하고 정확한 분석이 가능한 바이오센서를 이용한 분석법에 대한 연구가 시도되고 있다(Basu *et al* 2007, Han YH 1997, Parra *et al* 2007, Shin & Kim 1993, Vidal *et al* 2004).

바이오센서란 생체감지 물질과 분석하고자 하는 물질간의 선택적인 인자로부터 유도되는 물리적 또는 화학적 변화를 감지하는 신호변환기를 통틀어 지칭하는 것으로(Ko SH 2009), 특정 화학물질을 선택적으로 식별할 수 있는 기능을 가진 생체 관련물질을 그대로 사용하거나, 고분자 담체에 고정화하여 사용하는 것 모두를 일컫는다(Kim TJ 2007). 바이오센서에서 가장 중요한 요소로 여겨지는 것은 분석 대상 물질에 대한 감도와 선택성으로, 기질의 선택성을 높이기 위해 효소를 사용하며, 효소의 효율성을 증가시키기 위해 효소를 고정화하여 사용한다. 효소고정화 방법에 따라 센서의 감도가 크게 좌우되므로 효소고정화 시에는 주로 고분자 지지체에 효소를 고정화시켜 바이오센서의 감도와 선택성을 높이고, 효소 본래의 촉매능력과 높은 기질 특이성을 오랫동안 보존할 수 있도록 한다(Kim HJ 2005). 콜레스테롤을 분석하기 위한 효소로 cholesterol oxidase를 이용할 수 있으며, 이 효소와 기질의 반응으로 cholest-4-en-3-one 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 생성된다.



최종산물로 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 일정한 전압 이상을 걸어주면 물이 되면서 전자를 내놓는데, 이때 발생하는 확산전류는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도에 비례하게 된다. 따라서 전류의 변화를 측정함으로써 기질인 콜레스테롤의 농도를 측정할 수 있다(Shin & Kim 1993).



한편 전류변화를 측정하기 위한 전극의 소재로서 최근 carbon nanotube(CNT)가 주목받고 있다. CNT는 graphite가 둥글게 말린 구조로서 구조적 특성에 따라서 single wall, multi wall 등으로 구분된다. 선행 연구에 의하면 multi-walled carbon nanotube(MWCNT)는 높은 전기 전도성, 기계적 강도, 열전도성, 가벼움 등의 고유한 특성을 가지고 있는 것으로 보고되

었다(Gooding JJ 2005, Guo *et al* 2005). 따라서 전기 촉매적 활성이 높은 MWCNT를 이용한 전기화학적 방식의 바이오센서들이 다양하게 연구되고 있으며, 이들이 적용된 바이오센서는 높은 감도와 재현성, 안정성을 나타낸다고 보고되었다(Guo *et al* 2004, Wang *et al* 2003a, Wang *et al* 2003b, Zhao *et al* 2003). 또한 여러 선행 연구들에서 MWCNT를 기능화시킨 경우, 이들의 특성이 더욱 향상되는 것으로 나타났다(Saito *et al* 2002, Santhosh *et al* 2006). 따라서 본 연구에서는 화학적으로 안정한 구조를 지니며, 전기 전도성이 좋은 MWCNT를 이용하여 콜레스테롤 측정용 바이오센서를 개발하고자 하였다. 이를 위해 MWCNT를 기능화시켜 작업전극을 제조하였고, 본 바이오센서 시스템에 적합한 효소 고정화 방법을 선택하고자 여러 효소고정화 방법을 이용하여 효소 반응기를 제작하고, 콜레스테롤에 대한 반응 전류 감응도를 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기구

실험에 사용된 MWCNT(C-tube 100)는 CNT Co. LTD(Incheon, Korea)에서 구입하였고, 작업전극으로 이용된 glassy carbon electrode(GCE, CHI 104)는 CH Instruments(Austin, USA)로부터 구입하였으며, Ag/AgCl reference electrode(K0260)는 Princeton Applied Research(Oak Ridge, USA)에서 구입하였다. Cholesterol oxidase(E.C.1.1.3.6)와 cholesterol, Triton X-100, bovine serum albumin(BSA)은 Sigma(St Louis, USA)로부터 구입하였다. 효소고정화를 위하여 glutaraldehyde, CNBr-activated sepharose 4B, sodium alginate, aminopropyl glass beads (500Å, 200-400 mesh average pore size)은 Sigma로부터 구입하였고, Toyopearl(AF-Formyl-650M)은 Tosoh사(Bellefonte, USA)에서 구입하였다. 또한 전기화학반응을 측정하기 위해서 Potentiostat/ galvanostat(model 273A, EG&G, USA)를 이용하였다.

### 2. MWCNT의 기능화

MWCNT의 특성과 기능을 향상시키기 위하여 Santhosh *et al*(2006)와 Kim *et al*(2010)의 방법을 수정하여 MWCNT의 기능화를 실시하였다. 즉, 5.0 g의 MWCNT를 60% nitric acid 100 mL와 혼합한 후 초음파 처리하여 MWCNT를 분산시켰다. 이를 65°C에서 24시간 환류한 후 polycarbonate membrane으로 여과하고, 증류수로 세척하여 60°C에서 15시간 동안 건조시켰다. 건조된 MWCNT를 thionyl chloride와 혼합하여 다시 65°C에서 24시간 환류한 후 tetrahydrofuran(THF)로 여러 차례 세척하고 건조시켰다. THF에 poly(ethylene glycol)bis(3-aminopropyl)를 용해시킨 다음 앞서 건조시킨 MWCNT를 첨가하여 전 단계와 마찬가지로 환류, 여과, 건조하여 최종적으로

아민기가 도입된 기능화 MWCNT(MWCNT-NH<sub>2</sub>)를 얻었다.

### 3. 작업전극의 제작

작업전극은 glassy carbon electrode(GCE)의 표면에 기능화된 MWCNT를 고르게 부착시켜 MWCNT-NH<sub>2</sub>/GCE를 만든 다음 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 선택적으로 검출하기 위해 산화·환원 중간 매개체로 Prussian blue(PB) film을 접착시켜 제작하였다(Karyakin *et al* 1994). MWCNT-NH<sub>2</sub>/GCE는 건조된 MWCNT 200 mg과 dimethylformamide(DMF) 5 mL를 혼합하여 유발에서 5시간 정도 강하게 저어 분산시킨 다음 GCE 표면에 고르게 분사하여 12시간 이상 건조·고착시켜 제작하였다. PB film은 MWCNT-NH<sub>2</sub>/GCE를 2 mM potassium ferricyanide와 2 mM iron chloride, 0.1 M potassium chloride를 1 mM hydrochloric acid에 용해한 용액에 -0.1~1.0 V, scan rate 50 mV로 30회 cyclic voltammetry 처리한 전기적 중합법을 이용하여 전극에 입혀 작업전극(MWCNT-NH<sub>2</sub>/PB/GCE)을 제작하였다.

### 4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 감응 전류 측정

고정화된 효소반응기를 통하여 콜레스테롤이 분해되어 생성되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 대한 전극의 검출능을 확인하기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 농도별로 주입하여 작업전극의 성능을 실험하였다. 검출을 위한 cell은 삼전극계로 구성되었는데, 작업전극으로는 제작한 MWCNT-NH<sub>2</sub>/PB/GCE를 사용하였고, Ag/AgCl과 platinum wire를 기준전극과 상대전극으로 각각 사용하였다. 전류는 potentiostat/galvanostat(model 273A, EG&G, USA)를 이용하여 측정하였고, 반응 데이터는 Model 270/250 research electrochemistry software 4.3 program을 이용하여 얻었다.

### 5. 콜레스테롤 표준용액의 제조

콜레스테롤의 수용액은 비이온성 계면활성제인 Triton X-100과 isopropanol을 이용하여 제조하였다(Charpentier & El Murr 1995, Kumar *et al* 2000). 100 μM의 콜레스테롤 표준물질에 isopropanol 1 mL를 첨가하여 60~65°C에서 중탕한 다음 Triton X-100 0.8 mL를 첨가하여 충분히 교반시킨 후 3차 증류수로 총량이 20 mL가 되도록 하였다. 이를 연속적으로 희석하여 콜레스테롤 표준용액으로 사용하였으며, 사용 전까지 4°C에서 보관하였다.

### 6. 효소고정화

#### 1) Aminopropyl Glass Beads를 이용한 효소고정화

Cholesterol oxidase를 glutaraldehyde를 이용한 가교결합 반응을 통해 glass beads(500Å, 200~400 mesh)에 고정화하였다. 0.1 M phosphate buffer solution(PBS, pH 7.0)를 이용하여 5% glutaraldehyde를 제조한 다음 이를 aminopropyl glass beads

0.5 g과 혼합하여 상온에서 12시간 동안 교반하였다. 잔류하는 glutaraldehyde를 제거하기 위하여 증류수로 수차례 세척하고 다시 PBS로 세척한 후 5 mL PBS에 담가 30분 동안 냉각고에 정치시켰다. Cholesterol oxidase 10 units를 glass beads에 첨가하여 4°C에서 24시간 동안 교반하면서 반응시킨 다음 PBS(pH 7.0)로 수차례 세척하였다. 효소반응기는 사용하기 전까지 4°C에서 냉장 보관하였다.

#### 2) CNBr-activated Beads를 이용한 효소고정화

CNBr-activated sepharose 4B 0.2 g을 glass filter에 넣은 후 1 mM HCl 1 L를 사용하여 30분간 서서히 swelling시키면서 세척하였다. 1 mL coupling buffer(pH 8.5)와 cholesterol oxidase 10 units를 실온에서 1시간 동안 혼합한 후 4°C에서 하룻밤 교반시켰다. 고정화된 효소 beads를 0.1 M Tris-HCl(pH 8.0)로 세척한 후, 여과되지 않은 beads는 0.1 M Tris-HCl buffer와 혼합한 후 2시간 동안 정치하였다. 이를 0.1 M acetate buffer(pH 4.0)와 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 연속적으로 세척하였다. 효소가 고정화된 beads는 0.1 M Tris buffer(pH 7.5)에 담가 둔 다음 사용 전까지 4°C에서 보관하였다.

#### 3) Na-alginate를 이용한 효소고정화

Cholesterol oxidase 10 units를 4% sodium alginate solution 0.5 mL에 첨가하여 10분간 혼합한 후 10분간 정치하여 평형에 도달하도록 하였다. 혼합물을 0.2 M CaCl<sub>2</sub> solution 35 mL에 천천히 소량씩 떨어뜨리며 첨가한 후, 생성된 투명 beads를 CaCl<sub>2</sub> 용액에서 30분간 경화시켰다. 생성된 효소 beads를 glass filter로 여과한 후 증류수로 세척하고 건조시킨 다음, 0.25% poly-L-lysine solution(pH 7.0) 20 mL에 넣어 10분간 부유시키고 증류수로 세척하여 건조하였다. 제조한 효소 beads는 사용 전까지 4°C에서 냉장 보관하였다.

#### 4) Toyopearl Beads를 이용한 효소고정화

Toyopearl bead 4 mL를 50 mM PBS(pH 7.0) 500 mL로 세척한 다음 2.5% glutaraldehyde 용액(50 mM PBS, pH 7.5) 10 mL와 혼합하여 30°C에서 2시간 동안 교반시켰다. 이를 증류수와 50 mM PBS 용액으로 여러 차례 세척하였다. 4 mL의 50 mM PBS 효소용액(cholesterol oxidase 10 units)과 활성화된 toyopearl beads를 혼합한 후 30°C에서 2시간 동안 교반한 다음 4°C에서 24시간 동안 교반하여 50 mM PBS로 세척하였다. 고정화된 enzyme beads는 사용하기 전까지 4°C에서 보관하였다.

### 7. 효소고정화의 Coupling Efficiency 측정

효소의 coupling efficiency는 Bradford assay를 이용하여 측

정하였다(Bradford MM 1976). Stock solution은 Coomassie Blue G(100 mg)를 methanol 50 mL에 용해한 후 85% phosphoric acid 100 mL를 가한 다음 200 mL 증류수로 희석하여 제조하였으며, 4°C에서 보관하였다. Bradford 시약은 증류수와 1:4 비율로 희석한 다음 사용하였다. BSA는 일정 비율로 희석한 다음 각 희석된 BSA를 Bradford reagent로 발색한 후 spectrophotometer(DU 800, Beckman, USA)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 값으로 검량곡선을 얻었으며, 효소고정화 시 얻은 상층액을 위와 같은 방법으로 반응시켜 흡광도를 측정하여 coupling efficiency를 구하였다.

## 8. 콜레스테롤에 대한 감응 전류 측정

Cholesterol oxidase를 aminopropyl glass beads, CNBr-activated beads, Na-alginate, toyoppearl beads에 고정화하여 제작된 각 효소반응기를 이용하여 콜레스테롤 기질에 대한 전류 감응도를 측정하였다. 각 고정화된 효소반응기를 삼전극계로 구성된 바이오센서 시스템에 도입하여 농도별 콜레스테롤 표준용액에 대한 감응도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 작업 전극의 감응 전류 측정

작업 전극의 활성을 증대시키는 물질로 알려진 나노 튜브를 바이오센서에 도입할 경우 분석물질의 극미소량 검출 및 소형화가 가능하다고 알려져 있다(박은진 등 2006, Yun *et al* 2008). 또한 MWCNT 표면을 기능화시킨 경우 이들의 특성과 기능성이 더욱 향상되는 것으로 나타나(Saito *et al* 2002, Santhosh *et al* 2006), 본 연구에서는 전극의 감응도를 증대시키기 위해 MWCNT에 NH<sub>2</sub>를 도입함으로써 MWCNT를 기능화시켜 이용하였다. 기능화된 MWCNT로 작업전극을 제조한 후 콜레스테롤과 cholesterol oxidase의 반응에서 생성되는 물질인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 전극의 감응도를 확인하기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도변화에 따른 전류 감응도를 측정하였다. 작업전극의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 감응도 측정 시에는 선행연구들을 통해 안정한 용매로 알려진 0.1 M PBS(pH 7.0)와 지질의 가용화에 효과적인 계면활성제 Triton X-100을 PBS에 첨가하여 측정하였다(Li *et al* 2003, Vidal *et al* 2004, Parra *et al* 2007), 계면활성제가 지용성 물질의 가용화에 도움을 주기는 하나, Shin & Kim (1993)은 계면활성제가 효소활성과 안정성을 저해하고 전극반응의 방해 요소가 된다고 보고하였으며, Xuecai *et al*(2005)도 높은 농도의 Triton X-100은 cholesterol oxidase의 활성을 방해할 수 있어 0.8~1.2%(v/v)의 농도 범위가 적합하다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 위에서 보고된 연구 결과들을 참고로 하여 0.1 M PBS에 1% Triton X-100을 첨

가한 용매를 이용하였다. 0.1 M PBS에 1% Triton X-100을 첨가한 용매를 이용했을 때 작업전극의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 감응전류는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액의 농도가 증가할수록 증가함을 보여주었다(Fig. 1). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 검출한계는 0.1 μM로 측정되었으며, 0.5~500 μM 농도에서 선형관계( $r^2=0.9656$ )를 나타내었다. 또한 1% Triton X-100의 첨가가 작업전극에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0.1 M PBS에 대한 MWCNT-NH<sub>2</sub>/PB/GCE의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 감응도를 측정된 결과, 0.1~500 μM의 농도에서 선형의 비례 관계 ( $r^2=0.9936$ )를 나타내었고 검출한계는 0.1 μM로 나타나 낮은 농도에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도와 감응전류간의 높은 상관성을 나타내었다(Fig. 2). Yabuki *et al* (2000)은 작업전극의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 감응도를 높이기 위해 GCE에 peroxidase를 고정화시킨 polyion complex membrane을 도입한 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>용액에 대한 검출한계가 0.5 μM으로 나타났으며, 10 μM까지의 선형관계를 보였다. Chandra *et al*(2009)의 연구에서는 GCE에 dendrimer-rhodium nanoparticle을 도입한 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대해 8~30 μM의 범위에서 선형관계를 보였으며, 검출한계는 5 μM로 나타났다. 한편, MWCNT를 이용하여 horseradish peroxidase(HRP)를 고정화시킨 GCE는 0.208~7600 μM의 범위에서 선형관계를 보였고, 검출한계는 0.102 μM으로 나타났다(Yang *et al* 2009). 이들 선행연구에서 측정된 modified GCE의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 감응도는 Triton X-100이 첨가되지 않은 phosphate buffer를 이용하여 얻은 결과로서 본 연구와의 절대적인 비교는 어렵지만, 전체적으로 볼 때 본 연구에서 제작된 MWCNT-NH<sub>2</sub>/PB/GCE는 다른 선행연구들에서 보고된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 감응도와 비교하였을 때 낮은 검출한계와 높은 선형관계를 나타내어 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 감응도가 우수한 것으로 확인되었다.

### 2. 효소반응기에 따른 Coupling Efficiency

효소고정화 방법은 센서의 감도에 영향을 미치는 주요한

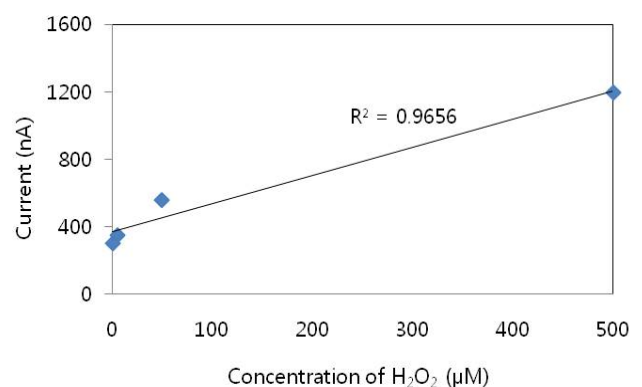


Fig. 1. Response current according to the concentration of hydrogen peroxide with carrier of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 1% Triton X-100.

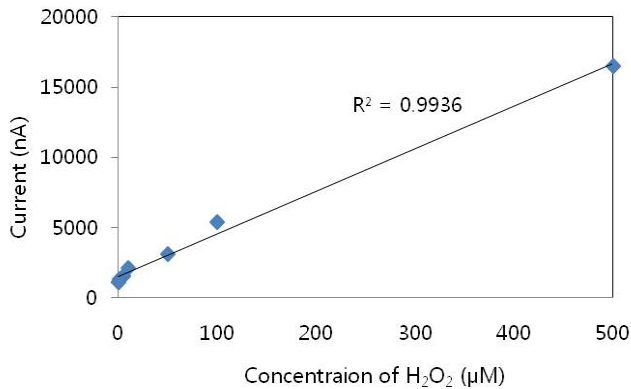


Fig. 2. Response current according to the concentration of hydrogen peroxide with carrier of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0).

요인으로, 본 연구에서는 담체로 cholesterol oxidase를 aminopropyl glass beads, CNBr-activated sepharose, Na-alginate, toyopearl beads를 이용하여 효소를 고정화시킨 후 Bradford assay (1976)을 이용하여 coupling efficiency를 구하였다. BSA를 표준물질로 하여 각 담체에 대한 coupling efficiency를 산출한 결과, CNBr-activated sepharose와 Na-alginate의 coupling efficiency가 84.9%와 84.2%로 높게 나타났다(Table 1). CNBr-activated sepharose는 리간드의 효과적인 결합력과 함께 생물학적 활성을 유지시켜 효소의 고정화 지지체로서 적합한 것으로 보고되었고(David *et al* 1974), Na-alginate의 경우에는 Na-alginate 겔에 효소를 포괄시키는 방법으로서 효소고정화 공정이 간단하고 값이 저렴하며, 내압축성, 내마모성이 큰 장점을 가지고 있어 효소고정화에 많이 이용되고 있다(Bang *et al* 1989, Won *et al* 2005). Aminopropyl glass beads와 toyopearl beads를 이용한 효소고정화에 대한 coupling efficiency는 49.5%와 47.3%로 각각 산출되어 다른 담체에 비해 낮게 나타났다. Aminopropyl glass beads는 glutaraldehyde를 이용하여 효소의 아미노잔기와 공유결합을 통해 효소가 지지체에 고정화되므로 단단한 결합이 유지되는 장점을 갖는다(Weetal HH 1969). 또한 toyopearl beads는 표면에 있는 aldehyde기와 넓은 표면적이 효소고정화에 유리함을 제공할 수 있으나(Jang *et*

Table 1. Coupling efficiency of immobilized cholesterol oxidase on supporting materials

Supporting material	Coupling efficiency(%)
Aminopropyl glass beads	49.5
CNBr-activated beads	84.9
Na-alginate	84.2
Toyopearl beads	47.3

*al* 2006, Mendes *et al* 2011), 아직까지 바이오센서에 적용된 예는 드물다. 본 연구에서 CNBr-activated sepharose와 Na-alginate의 coupling efficiency가 높아 담체로 사용하기에 유리한 조건을 가지고 있는 것을 나타냈으나, 실제 바이오센서에서는 효소고정화에 대한 coupling efficiency뿐만 아니라 효소반응기를 바이오센서 시스템에 적용하였을 때 기질에 대한 전류 감응도도 고려하여야 하므로 각 효소반응기의 콜레스테롤 기질에 대한 감응도를 측정하였다.

### 3. 각 효소반응기의 콜레스테롤 기질에 대한 감응도 비교

콜레스테롤 검출용 바이오센서 시스템에 적합한 효소고정화법을 확인하기 위하여 각 효소반응기의 콜레스테롤 기질에 대한 감응도를 비교하였다. Aminopropyl glass beads, CNBr-activated sepharose, Na-alginate, toyopearl beads에 cholesterol oxidase를 고정화시켜 제작한 효소반응기를 이용하여 콜레스테롤 표준용액에 대한 감응도를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. Aminopropyl glass beads와 CNBr-activated sepharose는 1~100 μM 범위에서 선형관계를 보였으며, 결정계수는 0.99로 나타났다. Na-alginate는 5~50 μM 범위에서 선형관계를 보였고( $r^2=0.99$ ), Toyopearl beads는 1~50 μM 범위에서 선형관계( $r^2=0.99$ )를 나타내었다. 따라서 제작한 4종류의 효소반응기가 모두 높은 선형관계를 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한 이들 효소반응기를 이용했을 때 콜레스테롤의 검출한계는 모두 1 μM로 나타나 검출력도 우수한 것으로 나타났다. 콜레스테롤 바이오센서의 선행연구에서 Parra *et al*(2007)는 gold 전극 표면에 cholesterol oxidase를 흡착시켜 제작한 전극을 사용하여 chronoamperometry 방식으로 콜레스테롤을 분석한 결과, 콜레스테롤 센서가 2,100 μM까지 광범위한 선형관계를 나타내었으나, 검출한계는 60 μM로 높아 검출력이 다소 떨어지는 것으로 나타났다. 또한 Li *et al*(2003)의 연구에서는 PB를 입힌 GCE의 표면에 sol-gel 필름을 침적시킨 다음 cholesterol oxidase를 고정하여 분석한 결과, 1~80 μM의 범위에서 콜레스테롤이 검출되었으며, 검출한계는 0.12 μM라고 보고되었다. 이들 선행연구 결과와 비교해볼 때, 본 연구에서 제작한 4종류의 효소반응기를 도입한 바이오센서는 높은 선형관계 및 낮은 검출한계를 가지고 있어 정확하고 고감도로 콜레스테롤을 분석하는데 적합한 것으로 보여졌다.

4종류의 효소반응기 모두 콜레스테롤 농도와 감응 전류간에 높은 선형관계를 보였으나, 이 중에서 CNBr-activated sepharose와 Na-alginate를 이용한 효소반응기는 coupling efficiency도 높았으며, 우수한 감응도를 나타내 콜레스테롤 검출을 위한 바이오센서 시스템에 적합한 효소 담체로 판단되었다. 전체적으로 볼 때 본 연구에서 제작한 작업전극과 고정화 효소

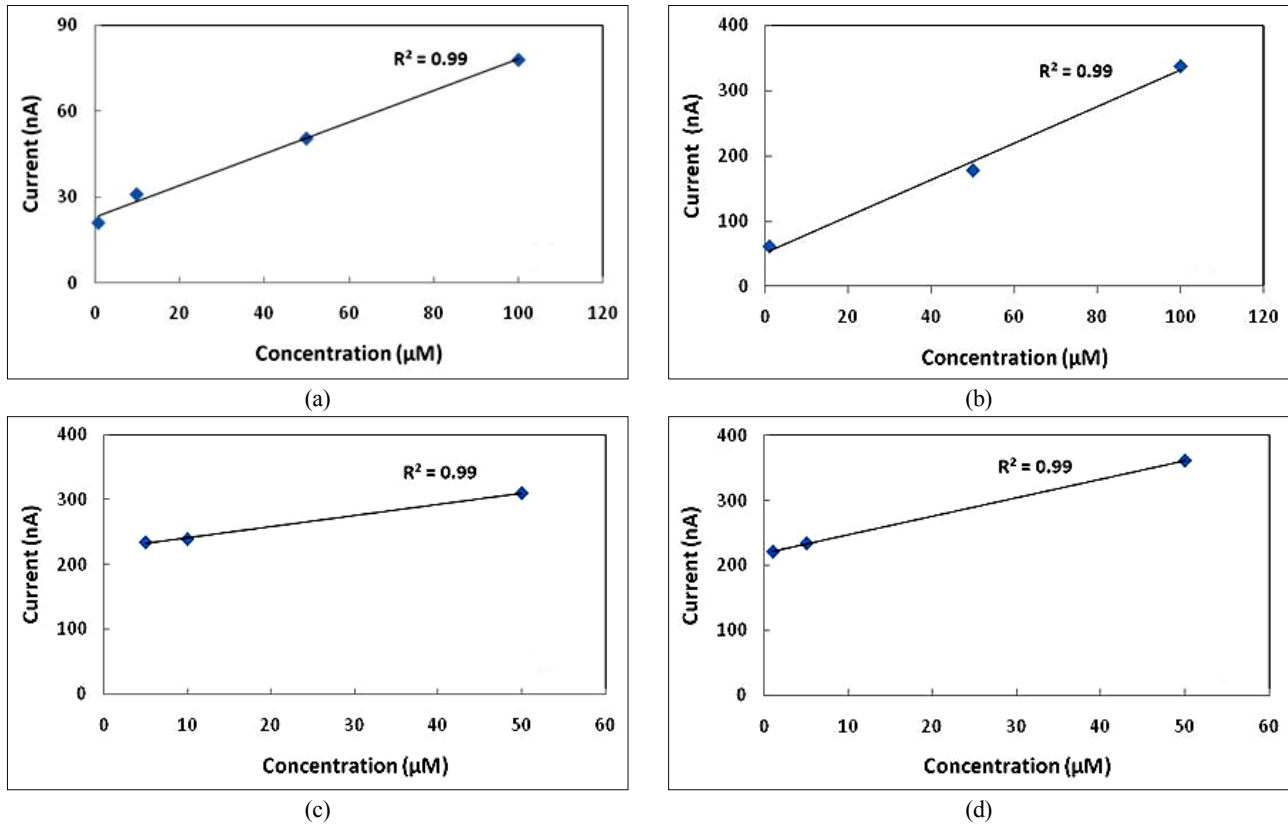


Fig. 3. The response currents according to the cholesterol concentrations with different enzyme reactors.

Carriers: (a) aminopropyl glass beads, (b) CNBr-activated sepharose, (c) Na-alginate, and (d) Toyopearl beads

Experimental conditions: applied potential,  $-0.1$  V; background electrolyte,  $0.1$  M phosphate buffer (pH 7.0) containing  $0.1\%$  Triton X-100; injection volume,  $200$   $\mu\text{L}$ .

로 구성된 바이오센서 시스템은 낮은 검출한계와 높은 수준의 반응 감도를 가지고 있으며, 반응시간도 빨라(5분 이내) 신속하게 콜레스테롤을 검출할 수 있는 것으로 나타났다.

## 요 약

콜레스테롤의 신속하고 정확한 새로운 분석방법을 모색하기 위하여 본 연구에서는 전기적 전도성이 우수한 MWCNT를 이용하여 전극을 제작하였고, 여러 가지 효소고정화 방법을 통해 전기화학적 감응도 분석을 실시하였다. MWCNT의 전도성을 향상시키기 위해 아민기를 도입한 MWCNT-NH<sub>2</sub>를 제조하였고, MWCNT-NH<sub>2</sub>/GCE에 PB를 접착하여 작업전극을 제조하였다. 제조한 작업전극은  $0.5 \sim 500$   $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도 범위에서 농도가 증가함에 따라 전류가 비례적으로 증가하였고, 검출한계는  $0.1$   $\mu\text{M}$ 로 나타나 전극이 높은 감도를 가지고 있음을 확인하였다. 또한 콜레스테롤 검출을 위해 적합한 효소반응기를 제작하기 위해 담체인 aminopropyl glass beads, CNBr-activated sepharose, Na-alginate, toyopearl beads에 cholesterol oxidase를 고정화시켜 바이오센서의 콜레스테롤 표준용액에

대한 감응도를 측정된 결과, aminopropyl glass beads과 CNBr-activated sepharose는  $1 \sim 100$   $\mu\text{M}$  범위에서 선형관계를 보였으며, Na-alginate는  $5 \sim 50$   $\mu\text{M}$ 의 범위에서, toyopearl beads는  $1 \sim 50$   $\mu\text{M}$  범위에서 선형관계를 나타내었다. 검출한계는 제작된 효소반응기 모두  $1$   $\mu\text{M}$ 로 나타나 콜레스테롤에 대한 높은 검출력을 보여주었으나, 특히 CNBr-activated sepharose와 Na-alginate를 이용한 효소반응기가 높은 coupling efficiency와 감응도를 보여 콜레스테롤 검출을 위한 본 바이오센서 시스템에 적합한 것으로 나타났다.

## 감사의 글

본 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2010-0004468).

## 문 헌

국민건강통계 : 국민건강영양조사 제4기 3차년도 (2009)

- 박은진, 송민정, 홍석인, 민남기 (2006) 전기화학 바이오센서의 전자전달 매개체로서의 탄소 나노 튜브에 관한 연구. 2006년도 대한전기학회 하계학술대회 논문집 1436-1437.
- Agullo E, Susna B (1996) Gas-liquid chromatographic determination of total free cholesterol in egg pastas. *Food Res Int* 29: 77-80.
- Bang BH, Lee SG, Yang CY (1989) Calcium alginate-entrapped yeast whole-cell invertase (II. Enzymatic properties of the immobilized cells). *Korean J Food & Nutr* 2: 14-20.
- Basu AK, Chattopadhyay P, Roychoudhury U, Chakraborty R (2007) Development of cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on oxygen electrode for the determination of total cholesterol in food samples. *Bioelectrochemistry* 70: 375-379.
- Blomhoff JP (1973) Serum cholesterol determination by gas-liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 43: 257-265.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Chandra S, Lokesh KS, Nicolai A, Lang H (2009) Dendrimer-rhodium nanoparticle modified glassy carbon electrode for amperometric detection of hydrogen peroxide. *Anal Chim Acta* 632: 63-68.
- Chang YS, Yang JH (2001) Isolation and identification of cholesterol oxidation products in heated tallow by TLC. *Korean J Postharvest Sci Technol* 8: 338-344.
- Charpentier L, El Murr N (1995) Amperometric determination of cholesterol in serum with use of a renewable surface peroxidase electrode. *Anal Chim Acta* 318: 89-93.
- Cho SH (1994) Dietary lipid and atherosclerosis. *Korean J Soc Food Nutr* 23(1): 170-179.
- David GS, Chino TH, Reisfeld RA (1974) Binding of proteins to CNBr-activated sepharose 4B. *FEBS Letters* 43: 264-266.
- Feeley R, Criner PE, Watt BK (1972) Cholesterol content of foods. *J Am Diet Assoc* 61: 134-149.
- Goodhart RS, Shils ME (1980) Modern nutrition in health and disease 6th ed. Philadelphia; Lea and Febiger, pp 83.
- Gooding JJ (2005) Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing. *Electrochim Acta* 50: 3049-3060.
- Guo M, Chen J, Li J, Tao B, Yao S (2005) Fabrication of polyaniline/carbon nanotube composite modified electrode and its electrocatalytic property to the reduction of nitrite. *Anal Chim Acta* 532: 71-77.
- Guoa ML, Chen J, Liu DG, Niea LH, Yao SZ (2004) Electrochemical characteristics of the immobilization of calf thymus DNA molecules on multi-walled carbon nanotubes. *Bioelectrochemistry* 62: 29-35.
- Han YH (1997) Determination of total cholesterol using enzyme catalyzed reaction. *J Basic Sci* 10: 239-264.
- Jang DH, Seong GH, Lee EK (2006) Comparison of enzymatic activity and cleavage characteristics of trypsin immobilized by covalent conjugation and affinity interaction. *Korean J Biotechnol Bioeng* 21: 279-285.
- Jo KS (2006) Effects of diet with *Laminaria religiosa* on egg quality. *Korean J Food Preserv* 13: 714-719.
- Karyakin AA, Gitelmacher OV, Karyakina EE (1994) A high-sensitive glucose amperometric biosensor based on prussian blue modified electrodes. *Anal Lett* 27: 2861-2869.
- Kim EM, Jo JH, Oh SW, Kim MY (1997) Characteristics of squid viscera oil. *J Korean Fish Soc* 30: 595-600.
- Kim HJ (2005) Amperometric glucose biosensor based on sol-gel derived metal oxide/Nafion/CNT composite films. *MS Thesis Yonsei University, Seoul.* p 4-5.
- Kim JW, Jeon YH, Kim MR (2010) Determination of biogenic amines using an amperometric biosensor with a carbon nanotube electrode and enzyme reactor. *J East Asian Soc Dietary Life* 20: 735-742.
- Kim TJ (2007) Biosensor. *Korean J Biotechnol Bioeng* 22: 421-425.
- Ko SH (2009) Nanobiosensor for detection of food hazards. *Bulletin of Food Technology* 22: 518-526.
- Kumar A, Malhotra R, Malhotra BD, Grover SK (2000) Co-immobilization of cholesterol oxidase and horseradish peroxidase in a sol-gel film. *Anal Chim Acta* 414: 43-50.
- Lee KW (1993) Diagnosis and management of hypercholesterolemic patients. *Korean J Lipidology* 6:280-288.
- Li J, Peng T, Peng Y (2003) A cholesterol biosensor based on entrapment of cholesterol oxidase in a silicic sol-gel matrix at a prussian blue modified electrode. *Electroanalysis* 15: 1031-1037.
- Mendes AA, Giordano RC, Giordano RLC, Castro HF de (2011) Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. *J Mol Catal B: Enzym* 68: 109-115.
- Oh SH, Ha TI, Jang MH (1996) Changes in cholesterol contents of Kwamaegi flesh by drying methods of pacific saury, *Cololabis saira*. *Koeran J Food & Nutr* 9: 271-274.

- Parra A, Casero E, Pariente F, Vazquez L, Lorenzo E (2007) Cholesterol oxidase modified gold electrodes as bioanalytical device. *Sens Actuators B* 124: 30-37.
- Saito T, Matsushige K, Tanaka K (2002) Chemical treatment and modification of multi-walled carbon nanotubes. *Physica B* 323:280-283.
- Santhosh P, Manesha KM, Gopalan A, Lee KP (2006) Fabrication of a new polyaniline grafted multi-wall carbon nanotube modified electrode and its application for electrochemical detection of hydrogen peroxide. *Analytica Chimica Acta* 575: 32-38.
- Shin HY, Lee HS, Lee GH (2008) Quantification of cholesterol in human serum by isotopedilution liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Sci Technol* 21: 502-509.
- Shin MC, Kim HS (1993) Development of flow injection analysis system for amperometric determination of cholesterol using immobilized enzyme columns. *Korean J Biotechnol Bioeng* 8: 324-335.
- Song BH, Jung HR, Moon HK (1991) Review of cholesterol contents of foods in published literatures. *Korean J Lipidology* 1(1): 19-26.
- Stehbens WE (1989) Diet and atherogenesis. *Nutr Rev* 47: 1-12.
- The Lipid Research Clinic Program (1984): The lipid research clinics coronary prevention trial results : II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *JAMA* 251: 365-374.
- Vidal JC, Espuclas J, Castillo JR (2004) Amperometric cholesterol biosensor based on *in situ* reconstituted cholesterol oxidase on an immobilized monolayer of flavin adenine dinucleotide cofactor. *Anal Biochem* 333: 88-98.
- Wang SG, Zhang Q, Wang RL, Yoona SF, Ahn J, Yang D, Tian JZ, Zhou JQ, Li Q (2003a) Multi-walled carbon nanotubes for the immobilization of enzyme in glucose biosensors. *Electrochem Commun* 5: 800-803.
- Wang SG, Zhang Q, Wang RL, Yoona SF (2003b) A novel multi walled carbon nanotube-based biosensor for glucose detection. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 572-576.
- Weetal HH (1969) Trypsin and papain covalently coupling to porous glass. *Science* 166: 615-617.
- Won KH, Kim SB, Kim KJ, Park HW, Moon SJ (2005) Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochem* 40: 2149-2154.
- Wong WW, Hachey DL, Clarke LL, Zhang S, Llaurador M, Piond WG (1994) An improved HPLC method to purify erythrocyte cholesterol for estimation of *in vivo* cholesterol synthesis using the deuterium method. *Appl Radiat Isotopes* 45: 529-533.
- Xuecai Tan, Minjian Li, Peixiang Cai, Lijun Luo, Xiaoyong Zou (2005) An amperometric cholesterol biosensor based on multiwalled carbon nanotubes and organically modified sol-gel/chitosan hybrid composite film. *Anal Biochem* 337: 111-120.
- Yabuki S, Mizutani F, Hirata Y (2000) Hydrogen peroxide determination based on a glassy carbon electrode covered with polyion complex membrane containing peroxidase and mediator. *Sensors and Actuators B* 65: 49-51.
- Yang Y, Yang G, Huang Y, Bai Huiping, Lu X (2009) A new hydrogen peroxide biosensor based on gold nanoelectrode ensembles/multiwalled carbon nanotubes/chitosan film-modified electrode. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 340: 50-55.
- Yun YH, Schulz MJ, Shanov Vesselin (2008) Carbon nanotube biosensor technology using electro-analytical method. *Journal of the Korean Society for Precision Engineering* 25: 15-21.
- Zhao GC, Zhang L, Wei XW, Yang ZS (2003) Myoglobin on multi-walled carbon nanotubes modified electrode: direct electrochemistry and electrocatalysis. *Electrochem Commun* 5: 825-829.

---

접 수: 2011년 9월 9일  
 최종수정: 2011년 10월 11일  
 채 택: 2011년 10월 18일