

효소 LB막을 이용한 유기인 화합물 측정용 광섬유 바이오센서

민준홍, 배주연, 정태성, 최정우, 이원홍
서강대학교 화학공학과

Fiber-Optic Biosensor for the Detection of Organophosphorus Compounds using Enzyme Immobilized Langmuir-Blodgett Film

Junhong Min, Joo Yun Bae, Tae Sung Jung, Jeong-Woo Choi and Won Hong Lee
Department of Chemical Engineering, Sogang University

서론

수질 환경의 유해물질 중 유기인 화합물(organophosphorus compounds)은 농업 분야, 의학 분야 그리고 군사용 생화학 무기로도 널리 쓰이는 물질로써 많은 제품, 특히 농약 및 살충제에 다량 포함되어 있는 물질이나[1], 동물의 신경세포 내의 필수 효소의 활동에 치명적인 해를 하는 물질로써 식물에 다량 투입되었을 경우 즉시 고사해 버리는 독성을 가지고 있다. 그러므로 우리 나라에서는 이 물질에 대하여 1급수인 경우 0.2ppm이하, 2급수인 경우 1ppm이하, 3급수에서는 2ppm이하로 그 농도를 제한하고 있다[2]. 그러나 아직까지 유기인 화합물의 낮은 규제 농도를 오염 현장에서 신속, 정확하게 측정할 수 있는 계측 장치는 개발되지 않고 있다[3,4]. 그러므로 유기인 화합물을 빠르고 간단하게 측정할 수 있고 원거리 측정이 가능한 센서의 개발이 필요로 되고 있으며, 세계적으로 여러 살충제 및 유독 물질의 검출 장치를 개발하기 위해 효소를 이용한 분석 방법이 개발되고 있다[3,4,5].

본 연구에서는 유기인 화합물에 높은 선택성이 있는 AChE효소를 이용하고, 효소반응으로 인한 흡광도변화를 측정원리로 하여 오염수에서 유해물질인 유기인 화합물을 측정하는 광 바이오센서를 개발하고자 한다. 또한 효소의 고정화조건을 조사하여 최대의 센서 신호를 얻을 수 있는 최적의 실험조건을 연구한다.

실험

시약

본 연구에서 사용되는 1000U/mg의 활성을 가진 Acetylcholinesterase효소(EC 3.1.1.7 : V-s, from electric eel)와 AChE효소의 반응물로 쓰이는 acetylthiocholine iodide는 미국의 Sigma chemical company로부터 구입하였다. 산-염기 지시약으로써 쓰이는 litmus는 BDH Laboratory(England)에서 구입하였다. 본 연구에서 측정되는 유기인 화합물의 하나인 paraoxon(diethyl-p-nitrophenylphosphate, E600, liquid, 95% purity)은 Sigma chemical company에서 구입하였다.

효소 고정화

본 연구에서는 AChE효소를 고정화하기 위해 Formherz type의 LB trough (Nima Tech., London)를 사용한다. 먼저 stearytrimethylammoniumchloride와 archidic acid methyl ester(1:4)를 혼합하여 수면상에 단분자막을 만든다. 그리고 미리 준비한 AChE효소가 퍼져있는 용액상으로 단분자막을 이동시켜 AChE효소를 흡착시킨다. 그후, 소수처리된 기판위에 AChE효소가 흡착된 지질 단분자막을 전이시켜 AChE효소 Langmuir Blodgett (LB)막을 제작한다[6].

센서 실험 장치

본 연구의 실험장치의 구성은 그림1과 같다. 실험 장치는 증류수, 산-염기 지시약과 acetylcholine iodide의 혼합용액 그리고 시료용액으로 세 종류의 용액을 포함한다. 지시약과 반응물의 혼합용액에는 180 mM의 NaCl과 48 μ M의 MgSO₄을 효소활성을 증가시키기 위해 포함시키고, 완충용액으로는 potassium phosphate buffer(pH 7.2)가 사용되었다. 용액은 초기에는 증류수와 혼합용액이 peristaltic pump (0.75mg/min)를 통하여 섞여져 효소가 고정화된 기판을 부착한 반응기를 지나간다. 이 때 두 용액의 혼합비는 1:1(v:v)가 된다.

광원으로써 632 nm를 갖는 He-Ne laser(NEC, Japan)를 사용하고, 광 검출장치로는 광 트랜지스터를 사용하였다. 광섬유로는 플라스틱 광섬유(core diameter : 0.5 mm, available range : 400-700 nm, N.A. : 28°)를 사용하였다. 반응물과 생성물의 광투과도를 반응기 입구와 출구에서 광섬유(간극 : 4mm)를 이용해 동시에 측정하도록 고안되어져 있다. 이처럼 반응물과 생성물이 동시에 측정되어지면, 반응기 내에 고정화되어 있는 효소의 반응정도를 검측함에 있어 광이나 주위의 불안정성에 의해 나타나는 오차를 없앨 수 있고, 산-염기 지시약이나 반응물의 변질로 인해 생성물에 대한 신호의 변화로 인한 오차도 없앨 수 있다. 모든 실험은 실온에서 수행되어졌다(20 - 25°C).

결과 및 토론

본 연구에서는 유기인 화합물을 측정하기 위해 그것에 의해 저해가 되는 효소의 반응을 이용한다. 이 효소는 인간이나 동물의 신경세포의 필수 효소로 알려져 있는 AChE (Acetylcholinesterase)로써 Acetylcholin iodide를 반응물질로 사용하여 acetic acid와 cholin을 생성시킨다[1]. Acetic acid가 생성됨에 따라 유체의 흡광도가 낮아지게 된다. 그러나 유기인 화합물이 존재하게 되면, 효소가 저해되므로 다시 흡광도가 증가하게 되고, 그 차이를 산-염기 지시약과 광을 이용하여 측정할 수 있게 된다. 흡광도가 다시 증가하는 양은 유기인 화합물의 양과 비례하므로 이러한 원리를 이용하여 유기인 화합물의 양을 검측할 수 있다.

순수 지질단분자막과 AChE효소가 흡착된 지질단분자막의 π -A isotherm을 비교하여 본 결과는 Fig.2와 같다. 순수 지질단분자막과 AChE효소가 고정화된 단분자막의 π -A isotherm을 비교하면, 액체상태와 고체상태의 단분자막의 명확한 구분이 사라지고 임계면적이 증가하였다. 순수지질의 단분자막의 경우에 표면압이 0 일때 한 분자가 차지하는 임계면적은 AChE효소가 흡착된 지질의 단분자막의 경우 한분자가 차지하는 임계면적보다 작음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 AChE효소가 순수지질의 단분자막에 흡착할때 지질과 지질 분자사이로 AChE효소분자가 들어감으로써 분자당 차지하는 면적이 늘어난 것으로 생각할 수 있다.

기판위에 증착된 AChE효소가 흡착된 단분자막의 수가 상호신호 차이(signal difference)에 미치는 영향은 그림3과 같다. 상호신호 차이는 반응물을 나타내는 신호와 생성물을 나타내는 신호의 차이로 정의되는 것으로써 AChE효소의 반응정도를 측정하는 척도가 되며, 상호신호 차이가 증가할수록 센서의 측정범위는 증가하게 된다. 그림3에서 보여지듯이, 단분자막이 40층일 때 상호신호 차이가 가장 커지는 것을 알 수 있다. 이것은 단분자막을 기판위에 증착시킬 때 x-type에서 y-type으로 형태가 전이되는 것으로 설명할 수 있다. 즉, signal difference가 급격히 증가하는 30-40layer일 때 Y-type으로 전이가 일어나 더욱 많은 효소를 기판위로 증착시키는 것이다. 그러므로 최적의 효소-지질 단분자막을 40layer로 결정하였다.

순수지질 단분자막에 흡착시키기 위해 주입되는 효소의 양이 상호신호 차이에 미치는 영향은 다음과 같다. 그림4에서 보여지듯이 상호신호 차이는 효소양이

20unit 이상에서 어느 정도 포화되는 것을 볼 수 있다. 그러므로 30unit이상의 효소를 주입시켜도 순수지질 단분자막에 흡착되는 효소의 양이 증가되지 않기 때문에 최적의 주입되는 효소의 양을 30unit으로 결정하였다.

본 연구에서 사용되어진 광섬유 바이오센서의 검측범위(analytical range)는 그림 5와 같다. AChE효소를 고정화하기 위해 LB Trough에 주입된 AChE효소의 양은 30unit이며, 40층을 유리기판위에 증착시켰다. 검측시간은 수분이었으며 검측범위는 0ppm - 2ppm이었다. 그림에서 보여지듯이 출력신호가 8 mV정도가 되면 신호가 포화되는 것을 알 수 있으며, 이 포화되는 정도는 고정화된 효소의 양과 밀접한 관계가 있는 상호신호 차이에 비례한다. 그러므로, 상호신호 차이가 증가될 수 있도록 고정화된 효소의 양을 증가시키면 검측범위가 증가될 수 있을 것이라 예상된다.

참고문헌

- [1] Alfthan, K., Kenttamaa, H., and Zukale, T.: *Analytica Chimica Acta*, **217**, 43(1989)
- [2] 최 의소, 조 광명: “환경공학“, 청문각(1990)
- [3] Dumschat, C., Muller, H., Stein, K., and Schwedt, G.: *Analytica Chimica Acta*, **252**, 7(1991).
- [4] Skladal, P.: *Analytica Chimica Acta*, **252**, 11(1991)
- [5] 최정우, 민준홍, 이원홍: *센서학회지*, 제3권 제2호, 50(1994)
- [6] Choi, J.W., Bae, J.Y., Min, J., Cho, K.S. and Lee, W.H.: *Proc. of the 5th conference on Sensor Technology*, 88(1994)

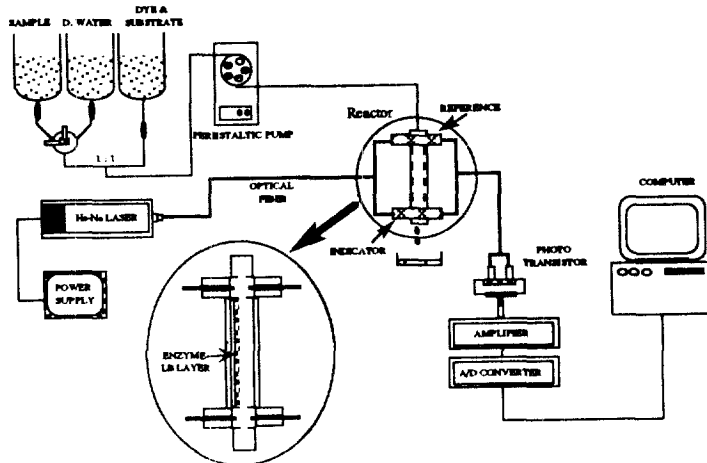


Fig.1 Schematic diagram of optical system

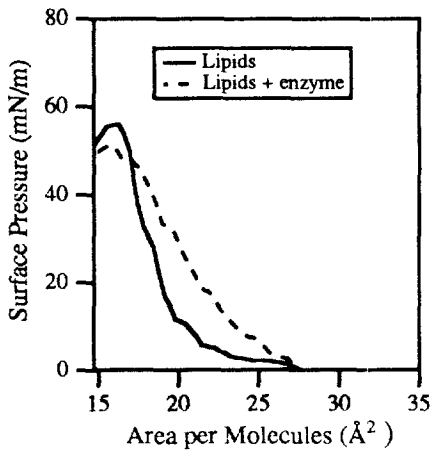


Fig.2 π -A isotherm of lipid monolayers before and after adsorbing enzyme

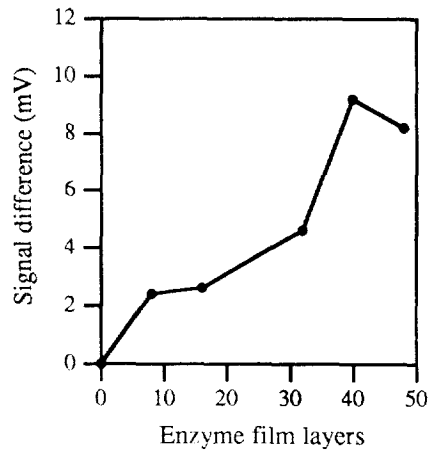


Fig.3 The effect of enzyme layer on the signal difference

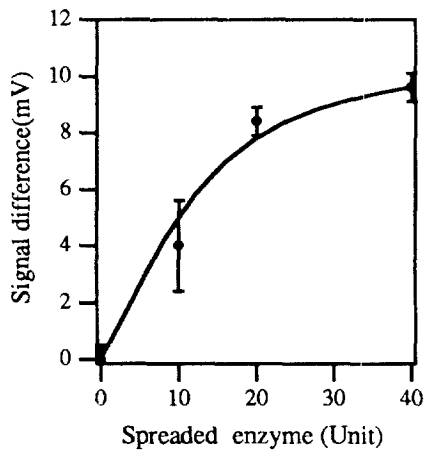


Fig.4 The effect of amount of spreaded enzyme on signal difference

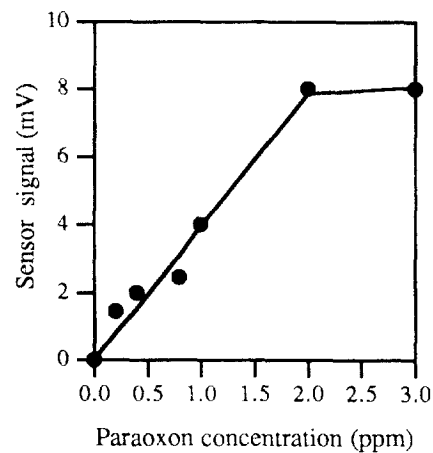


Fig.5 The sensor signal on the paraoxon concentration