

Sol-Gel Silica Matrix에 고정화한 효소전극의 작동 특성

신 등 석 · 김 지 수 · 오 승 모

서울대학교 공과대학 공업화학과
(1995년 5월 8일 접수, 1995년 7월 4일 채택)

The Sensing Characteristics of the Enzyme Electrodes Immobilized in Sol-Gel Silica Matrix

Dong-S. Shin, Chi-S. Kim, and Seung-M. Oh

Dept. of Chemical Technology, College of Eng., Seoul Nat'l Univ., Seoul 151-742, Korea

(Received May 8, 1995, Accepted July 4, 1995)

요 약 : Sol-gel 방법을 이용하여 polymethyl siloxane(PMSO)층에 효소를 고정화한 효소전극을 제작하였다. Glucose oxidase(GOD)/PMSO/Pt 전극은 글루코스에 대하여 재현성이 우수한 전류특성을 보였으며, 글루코스 농도 약 45mM의 범위까지 직선적인 감응 특성을 나타내었다. 전극제조에 여러 공정변수 중 전구체인 methyl trimethoxy silane (MTMS)의 가수분해 과정에서 사용한 H₂O/MTMS(mol/mol) 비(R값)가 효소전극의 특성에 가장 큰 영향을 주었다. R값이 당량(3.0)보다 클 때와 그렇지 않은 경우를 대비하여 볼 때, 선형성은 당량 이하(R≤3.0)일 때에, 저장 안정성은 당량 이상(R>3.0)인 경우에 더 우수하였다. FT-IR 결과로부터 R값이 클수록 축중합이 많이 된 막이 얻어짐을 확인하였다. 또한, R값이 당량 이하인 경우 저장 시간에 따라 신호가 감소함과 동시에 센서의 선형성과 응답시간이 증가함이 관찰되었다. 이로부터 R값이 적은 경우에는 효소막 제조시 축중합 정도가 적어서 센서의 저장 기간 중에도 축중합이 계속 진행되며, 따라서 글루코스의 물질전달 속도가 감소하므로 응답 시간이 길어지고 전류의 크기도 감소한다고 설명하였다. 같은 방법으로 alcohol oxidase(AOD) 고정화 전극을 제조하여 감응 실험을 한 결과 에탄올과 메탄올에 대해서도 재현성이 우수한 감응 특성을 얻을 수 있었다.

Abstract: Enzyme electrodes were fabricated by entrapping enzymes in the polymethylsiloxane(PMSO) matrix prepared by sol-gel method. The GOD-immobilized PMSO/Pt electrodes showed reproducible current signals to glucose and the linearly responding concentration range of glucose was up to 45mM. The R values (H₂O/MTMS molar ratio) employed in the hydrolysis of MTMS had the most significant effects on the sensing properties of the resulting enzyme electrodes. With the R value of lower than the stoichiometric value(3.0), the enzyme electrodes showed better linearity than those for R>3.0. But the storage stability was better for R>3.0. FT-IR data indicated that the degree of condensation of the siloxane group was proportional to the R value. In case of R≤3.0, the linearity and response time increased with a reduction of the current signals. From the results, it was interpreted that when R≤3.0 the condensation reaction is not completed, thus the reaction proceeds further during the storage. As a result of the progressive condensation reaction the matrices become rigider and less porous, i.e. the diffusion of glucose becomes more difficult, resulting in a longer response time and smaller current signals. Similarly, the alcohol oxidase-immobilized PMSO/Pt electrodes were prepared, which showed reproducible current signals to methanol and ethanol.

1. 서 론

1962년에 Clark와 Lyons이 최초로 전기화학적 글루코스 센서의 제작을 보고한 이래 글루코스 센서의 개발은 바이오 센서 연구의 주된 관심 분야 중의 하나로 그동안 많은 연구가 진행되어 왔다[1]. 이는 글루코스 농도의 정량이 발효공정의 제어 등 산업적 응용[2, 3]에서부터, 혈당량 측정과 같은 의료진단[4, 5] 등에 이르기까지 많은 분야에서 매우 중요한 요소이기 때문이다.

글루코스는 전기화학반응에 의해 직접 산화시킬 수 없으므로 oxidoreductase계열의 효소인 Glucose oxidase(GOD)를 전극 표면에 고정화한 효소전극을 이용하여 글루코스의 양을 정량한다. Fig. 1은 GOD를 고정화한 효소전극의 글루코스 감지반응에 대한 모식도를 보여주고 있다. 먼저, 글루코스가 용액 내의 확산층과 효소막 내로 확산해 들어와 GOD의 내부에 위치한 FAD(flavin adenine dinucleotide)를 FADH₂로 환원시키면, FADH₂로부터 산소로 전자가 전달되어 산소는 과산화수소로 환원된다. 이 과산화수소가 전극표면에서 산화되면서 전류가 발생하게 되는데 이때 측정되는 전류의 크기로부터 글루코스의 양을 정량할 수 있게 된다. 이러한 효소전극에서 전류, 즉 반응속도는 여러 단계의 속도인자, 즉 글루코스의 효소막 내 확산속도, 과산화수소의 확산속도, 글루코스와 GOD간의 효소반응속도, 전자전달 속도, 과산화수소의 확산속도, 그리고 효소막 내의 전기적 중성유지를 위한 전하보상 반대이온의 확산속도 등에 의해 결정된다. 효소막의 물성(내부 이동도, 물질 투과도)에 따라 이들의 상대적 값이 결정되고, 또한 막 내 효소의 농도, 효소의 활성 등도 영향을 받으므로 효소막의 종류와 제조방법의 선정이 매우 중요하다. 이상적인 고정화 물질은 효소의 응집을 억제하고, 미생물들의 공격을 막아야 하며, 생체용액에서의 유사한 국소환경을 유지하여 효소의 활성이 최대가 되도록 하여야 한다. 일반적으로 고분자와 같은 유기물들이 효소 고정화 물질로 주로 이용되어 왔는데[6-8], 대개의 유기물들은 효소 반응에 의해서 생성된 과산화수소에 의해 산화 및 분해될 가능성이 있으며, 유연하기 때문에 화학적으로 고정화하지 않는 한 효소가 쉽게 빠져나간다는 점, 또 고정화된 효소의 활성이 용액 내에서와 다르다는 점 등이 문제점으로 대두된다. 이러한 이유로 고분자를 사용하지 않고 다른 방법을

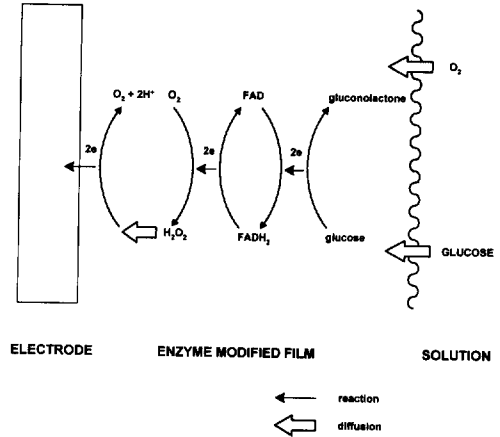


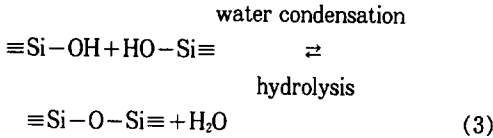
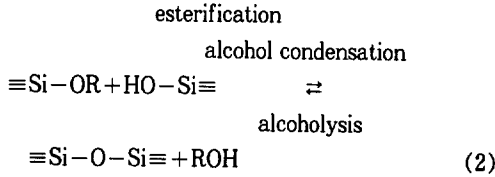
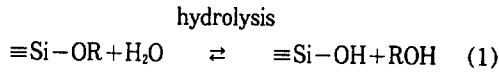
Fig. 1. Cross-section of GOD/PMSO/Pt electrode for the detection of glucose.

이용하는 연구가 진행되고 있는데, 예를 들면 Yamauchi 등[9]에 의해서 백금촉매에 효소를 entrapping하는 방법, Oh 등[10]에 의해서 matrix를 사용하지 않고 전착(electrodeposition)에 의해 효소를 고정화하는 방법 등이 시도되어 비교적 좋은 결과를 보여준 바 있다.

한편, 근래에 들어 광학센서로의 응용을 위하여 sol-gel silica matrix에 효소를 고정화하는 방법이 시도되고 있다. Sol-gel matrix는 효소 주변에서 자라 효소를 둘러싸므로 고정화 반응 중 효소의 변성이 적고, 기공 안에 용액이 일부 존재하므로 효소의 활성이 용액 내에서와 유사하게 유지된다고 알려져 있다[11]. Sol-gel silica는 투명하고 빛에 안정하다는 특성 때문에 광학센서[12, 13]의 matrix로 제거나 GOD를 이용한 글루코스 센서의 경우 가시광선 영역에서 사용하기 위해서는 peroxidase와 quinoneimine dye 전구체의 조합과 같은 광학 변환제를 추가로 도입해야 하며, 이 경우 가역적인 센서를 얻기 어렵다는 문제점이 있다. 한편, GOD의 반응 생성물인 과산화수소는 다공질인 silica matrix를 통한 확산이 용이하며, 전기화학적으로 쉽게 산화하므로 sol-gel silica matrix를 이용한 가역적인 amperometric 센서의 제작이 가능할 것으로 기대되는데, 최근에 이러한 가능성을 타진한 논문들이 보고된 바 있다[14-16].

Sol-gel 방법을 이용한 다공질 유리의 제조는 TMOS(tetramethoxysilane) 또는 TEOS(tetra ethoxy silane) 등의 alkoxide 전구체를 가수분해하고

축중합하여 Si-O-Si 결합으로 구성된 무기 고분자 물질을 형성하는 과정으로 진행된다[17]. 이때 관여하는 반응은 다음과 같다.



이 과정에서 생성된 ROH, H₂O 등의 증발에 의해 약 4~7배의 부피감소가 일어나며, 이때 matrix가 스트레스를 받으므로 균열이 생기기 쉽다. 특히 전극 표면에 silica 막을 코팅하는 것과 같이 ROH, H₂O들이 증발할 수 있는 면을 한쪽으로 한정시킬 경우에는 부피감소가 한쪽 방향으로만 일어나므로 matrix의 균열이 매우 심각한 문제가 된다[18]. 이를 해결하기 위해 formamide[19], organic acid, 계면활성제[20]와 같은 첨가제를 이용하여 건조 속도를 조절하는 방법과, methyl trimethoxy silane(MTMS)와 같이 silane의 4개 치환체 중 하나를 반응성이 없는 alkyl기 등으로 바꾼 전구체를 이용함으로써 반응 속도를 늦춰 건조 과정시 발생하는 스트레스를 완화시키는 방법[18]이 제시되었다. 전자의 경우 효소와 첨가물이 반응하여 효소의 변성이 일어날 수도 있으므로 본 연구에서는 후자의 방법을 이용하여 효소를 silica matrix에 물리적으로 끼워넣는 방법(entrapping)을 사용하였다. Sol-gel silica와 같은 무기물 matrix는 고분자 물질에 비해 유연성이 적으므로 사용중 효소가 빠져나가는 것을 줄일 수 있고, 기계적 화학적 안정성이 뛰어나므로 전극의 안정성을 높일 수 있으리라 생각하였다. 또한 같은 정도의 다공성을 갖고 있다면 비교적 유연한 고분자에 비해 기질의 확산이 힘들 것이므로 전류의 크기는 적으나 센서의 선형구간이 넓을 것이라 기대하고 MTMS로부터 sol-gel 방법을 이용해 얻은 polymethylsiloxane(PMSO)의 matrix로의 사용 가능성과 특성을 조사하였다. 또한 여러 제조 공정 변수에 따른 전극 특성의 변화를 조사하여

최적의 제작 조건을 확립하고자 하였다.

본 연구에서는 효소전극의 물성을 결정하는 여러 속도인자를 측정하기 위하여 디지털 모사방법을 이용하였다. 이 방법을 이용하여 효소반응과 물질전달을 동시에 고려하여 전류의 크기를 예측할 수 있었고, 이를 각 실험결과와 비교함으로써 효소반응에 관련된 속도인자와 물질전달에 관련된 인자를 분리하여 구할 수 있었다.

2. 이론 : Digital Simulation

디지털 모사방법을 이용하면 확산, 대류, 효소반응 등이 동시에 포함된 복잡한 문제를 수치적으로 다루어 kinetic perturbation이 존재할 때의 결과(전기화학 실험에서는 보통 전류를 의미)를 예측할 수 있다[21-24]. 이 결과는 보통의 경우 무차원 변수들로 표시되는데 이 수치들을 적당한 형태의 함수들로 나타내면 실험 결과와 직접 연관시킬 수 있다. 따라서 이 방법을 효소 전극에 적용하면 전극 반응을 해석하는데 유용한 정보를 얻을 수 있다. 효소층 내에서 일어나는 주된 현상으로는 확산법칙에 의한 물질이동, 기질과 효소의 반응 등이 있는데, 이들을 결합하면 효소전극 내에서의 반응에 대해 다음과 같은 미분 방정식을 세울 수 있다.

$$\frac{\partial [S]}{\partial t} = D_s \frac{\partial^2 [S]}{\partial x^2} - \frac{k_{cat} C_E}{1 + \frac{K_{m,s}}{[S]} + \frac{K_{m,o}}{[O_2]}} \quad (4)$$

$$\frac{\partial [H_2O_2]}{\partial t} = D_R \frac{\partial^2 [H_2O_2]}{\partial x^2} + \frac{k_{cat} C_E}{1 + \frac{K_{m,s}}{[S]} + \frac{K_{m,o}}{[O_2]}} \quad (5)$$

$$\frac{\partial [O_2]}{\partial t} = D_o \frac{\partial^2 [O_2]}{\partial x^2} - \frac{k_{cat} C_E}{1 + \frac{K_{m,s}}{[S]} + \frac{K_{m,o}}{[O_2]}} \quad (6)$$

여기서 [S]는 기질의 농도, [H₂O₂], [O₂]는 각각 과산화수소와 산소의 농도를 의미한다. 또, k_{cat}는 효소 반응 속도 상수, C_E는 효소의 농도, 그리고 K_{m,s}, K_{m,o}는 각각 기질과 효소, 산소와 효소간 반응의 Michaelis-Menten 상수를, D_s, D_R, D_O들은 각각 기질, 과산화수소, 산소의 막 내에서의 확산 계수를 나타낸다.

실험과정에서 작업전극에는 과산화수소가 산화되기에 충분한 전위를 걸어주므로 전극표면의 과산화수소 농도는 0이라고 볼 수 있다. 또한 기질은 전기화학반응을 하지 않으므로, 전극 표면(x=0)에서의 경계치

조건은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\left. \frac{\partial [S]}{\partial x} \right|_{x=0} = 0, [H_2O_2]_0 = 0, \\ \left. \frac{\partial [O_2]}{\partial x} \right|_{x=0} = - \left. \frac{\partial [H_2O_2]}{\partial x} \right|_{x=0} \quad (7)$$

또, 교반에 의해 용액 내에서 기질의 농도는 균일하게 유지되고, 효소 반응에 의해 생성된 생성물(H_2O_2)의 용액 내 농도는 무시할 정도로 작으므로 효소층과 용액 계면에서의 경계치 조건을 다음과 같이 쓸 수 있다.

$$[S]_L = C_s^*, [H_2O_2]_L = 0, [O_2]_L = C_o^* \quad (8)$$

여기서 C^* 는 용액 내(bulk)에서의 농도를 의미한다.

이들 미분 방정식을 수치해석적으로 풀기 위해 다음과 같은 무차원 변수들을 정의하였다.

$$y = \frac{x}{L} \quad (9)$$

$$T = \frac{D_s t}{L^2} \quad (10)$$

$$C_s = \frac{[S]}{C_s^*}, C_R = \frac{[H_2O_2]}{C_s^*}, C_o = \frac{[O_2]}{C_o^*} \quad (11)$$

한편, 확산 한계전류 조건에서의 전류는 다음 식(12)와 같이 표시된다.

$$i = nFAD_R \left. \frac{\partial [H_2O_2]}{\partial x} \right|_{x=0} \quad (12)$$

여기서 n 은 전극반응시 이동하는 전자의 당량, F 는 Faraday 상수, 그리고 A 는 전극 면적을 의미한다. 이를 무차원 변수를 이용하여 정리하면 다음과 같은 무차원 전류를 얻는다.

$$\frac{i}{nFALk_{cat}C_E} = \frac{C_s^* D_R}{k_{cat} C_E L^2} \cdot \left. \frac{dC_R}{dy} \right|_{y=0} \\ = \left(\frac{D_R C_s^*}{D_s K_{m,s}} \right) \cdot \left. \frac{dC_R}{dy} \right|_{y=0} \quad (13)$$

이 식으로부터 다음과 같이 정의되는 새로운 무차원 변수 V_{max} 를 얻을 수 있다.

$$V_{max} = \frac{k_{cat} C_E L^2}{D_s K_{m,s}} = \frac{\left(\frac{k_{cat} C_E}{K_{m,s}} \right)}{\left(\frac{D_s}{L^2} \right)} \quad (14)$$

k_{cat} : 효소 반응 속도상수(sec^{-1})

C_E : 막 내의 효소 농도(mol/cm^3)

L : 효소막의 두께(cm)

D_s : 기질의 막 내 확산계수(cm^2/sec)

$K_{m,s}$: Michaelis-Menten Constant of enzyme (mol/cm^3)

식(14)를 자세히 살펴 보면 V_{max} 는 최대 효소반응 속도와 효소층에서의 기질 확산속도의 상대적인 비를 나타내는 변수임을 알 수 있다. 즉, V_{max} 값이 클수록 기질의 확산속도에 비해 상대적으로 효소반응 속도가 빨라 전체 반응이 기질의 확산속도에 의해 조절되고, 반대로 V_{max} 값이 작을수록 전체반응속도는 효소반응에 의해서 조절된다.

지금까지 언급한 것에 기초를 두고 orthogonal collocation method[25]를 이용하여 PASCAL program을 작성하여 모사를 수행하였다. 이때 정상상태 전류는 다음과 같이 표현되는 최대전류(I_{max})에 대한 상대값으로 구할 수 있었다.

$$I_{max} = \frac{1}{2} nFAk_{cat}C_E L \quad (15)$$

이들 변수로 식(13)을 다시 쓰면 최종적으로 다음의 무차원 전류 $Z(C_s^*/K_{m,s}, V_{max})$ 의 식이 얻어진다.

$$Z\left(\frac{C_s^*}{K_{m,s}}, V_{max}\right) = \frac{i}{2I_{max}} \\ = \frac{\left(\frac{D_R}{D_s}\right) \cdot \left(\frac{C_s^*}{K_{m,s}}\right)}{V_{max}} \cdot \left. \frac{dC_R}{dy} \right|_{y=0} \quad (16)$$

V_{max} 를 고정하면 변수 $C_s^*/K_{m,s}$ 에 대한 Z 값을 얻을 수 있다. 즉, 각 V_{max} 값에 대한 모사 검정곡선이 얻어지는데, 이를 실험값과 비교하면 실험결과에 가장 잘 맞는 V_{max} , I_{max} 값을 구할 수 있다. Fig. 2에 V_{max} 값이 각각 1, 10, 20, 30인 경우에 대해 수행한 모사 검정곡선을 나타내었다. V_{max} 값이 클수록 전체 반응 속도 즉 전류값은 글루코스의 확산에 의해 지배되므로 전류의 절대값은 감소 하나 직선적으로 비례하는 글루코스의 농도 범위는 증가하는 경향을 보일 것으로 예측할 수 있는데, 이를 검정곡선들이 뒷받침해 주고 있다.

3. 실험

3.1. 시약

Methyltrimethoxysilane(MTMS)는 Aldrich사의

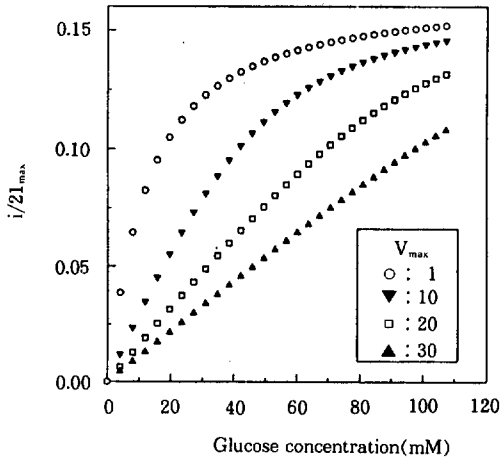


Fig. 2. Simulated calibration curves at several V_{max} values. The curves indicate that at higher V_{max} value the current signals become smaller while the linearly responding concentration range of the substrate expands wider.

제품을 정제하지 않고 그대로 사용하였다. Glucose oxidase(GOD ; Type X-S from *Aspergillus niger*, 159units/mg, EC 1.1.3.4)와 alcohol oxidase(AOD ; from *Hansenula sp.* 9.1units/mg, EC 1.1.3.13)은 Sigma Chemical사의 제품을 정제하지 않고 사용하였다. Glucose는 Shinyo Pure Chemical사의 GR급 제품을 인산염 완충용액(0.1M, pH 7.0)에 녹여 글루코스의 mutarotation을 위해 상온에서 24시간 이상 방치한 후 실험에 사용하였다. 기타 시약은 고순도의 제품을 정제하지 않고 그대로 사용하였다.

3.2. 전극 및 기기

효소전극의 제작 및 감응실험은 통상적인 3전극형 전해장치를 사용하였다. 작업전극으로는 백금을 사용하였다. 이 백금전극은 지름 1.25mm의 백금선을 stainless steel선과 용접한 후 이를 내경 3mm의 Pyrex관에 꼽고 그 사이에 에폭시 수지를 채워서 백금선의 단면(1.2mm²)을 전극으로 이용할 수 있도록 하였다. 기준전극으로 백금전극 전처리시에는 포화 카로멜 전극을, 감응실험시에는 포화 Ag/AgCl 전극을 사용하였다. 반대전극으로는 지름 1.2mm의 백금선을 사용하였다.

백금전극의 전처리시에는 PINE사의 Model AFR-

DE4 bipotentiostat을 이용하였고, 감응실험시에는 EG & G PARC사의 Model 174A polarographic analyzer를 사용하였다. 감응실험시 전류는 potentiostat에서 나온 신호를 digital multimeter를 통해 개인용 컴퓨터에 연결하여 측정 및 기록하였다.

3.3. Sol 제조

GOD 저장용액은 GOD 5.0mg을 인산염 완충용액(0.01M, pH 6.0) 1.0ml에 녹여 조제하였다. 작은 유리병에 MTMS를 넣고 자기 교반기로 교반하면서 초순수를 일정한 물비 ($R=1.5-6.0$)로 넣어주고 여기에 0.04N HCl 수용액을 촉매로 소량 첨가하여 10분간 가수분해 반응을 진행시켰다(pH=ca. 3.0). 이렇게 하여 얻은 sol과 인산염 완충용액(0.01M, pH 6.0)를 섞어 효소(GOD) 활성영역으로 pH를 맞춘 다음 GOD 저장용액을 첨가하였다. 이때 각각의 부피비가 1:1:0.1(sol:buffer:GOD 저장용액)이 되도록 하였다. 이렇게 하여 조제한 GOD가 포함된 sol을 polystyrene cuvette에 넣고 parafilm으로 덮은 후 4℃에서 보관하였다.

3.4. 전극의 전처리

백금 작업전극을 다음과 같이 전기화학적 방법으로 전처리하였다. 먼저, 백금 전극을 0.3μm alpha 알루미늄 분말을 이용하여 연마처리하고 증류수와 초순수로 세척하였다. 0.5N H₂SO₄ 수용액에서 전극의 전위를 +1.9V에서 -0.45V(vs. SCE)까지 50mV/sec의 속도로 3번 순환한 다음, +1.9V에서 5분간 유지하여 전극표면에 산화막이 형성되도록 하였다[26]. 백금의 전처리 과정을 거친 경우에는 물리적으로 안정한 효소/PMSO 전극을 얻을 수 있었으나, 전처리를 하지 않았을 때는 전극을 완충용액에 담겼을 때 PMSO 막이 쉽게 떨어져나가 센서로 사용할 수 없었다.

3.5. 효소 전극의 제작

Teflon knife를 이용하여 전처리한 백금전극 표면에 GOD doped sol을 도포한 후 전극 표면이 밀도록 향하게 하여 건조하였다. 건조 온도를 25℃로 하였을 때, 건조시간이 10일 이상이면 정확한 건조시간에 관계없이 거의 같은 특성의 전극이 얻어졌다.

3.6. 감응 실험

인산염 완충용액(0.1M, pH 7.0)을 전해질로 하고,

위의 방법에 의해 제작한 효소/PMSO 전극을 작업전극으로, 백금선(지름 1.2mm)을 반대 전극으로, 포화 Ag/AgCl 전극을 기준 전극으로 하여 cell을 구성하였다. 자기 교반기를 이용하여 충분히 교반하는 조건에서, 과산화수소의 산화반응이 물질전달 속도에 의해 조절될 수 있도록 과산화수소가 산화되기에 충분한 0.8V(vs. 포화 Ag/AgCl)의 전위를 일정하게 걸어주고, 항온조를 이용하여 온도를 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 고정시킨 상태에서 글루코스에 대한 감응 실험을 수행하였다. 실험하는 동안 계속하여 산소를 일정한 유속(50cc/min.)으로 용액 내에 불어 넣어 산소 농도가 포화상태로 유지되도록 하였다. 이와 같은 조건에서 농도를 아는 글루코스 용액을 주기적으로 주입하여 cell 내의 글루코스 농도를 변화시키면서 전류의 변화를 관찰하고, 각 농도에서의 정상상태 전류값을 구하였다. 전위를 걸어준 상태에서 충분한 시간동안 기다려 바탕전류가 일정하게 유지된 후 실험을 수행하였으며, 글루코스의 감응에 의한 전류는 측정된 전류값에서 바탕전류 값을 빼어서 얻었다.

3. 7. FT-IR 측정

Sol-gel 과정을 통해 만들어진 PMSO 막의 특성을 FT-IR을 이용하여 분석하였다. IR 분석을 간단하게 하기 위해 효소를 포함하지 않고 다른 조건은 동일한 sol을 준비하였으며 이를 유리 기판에 dip coating(3.0 cm/min.)하여 25°C 에서 10일간 건조시킨 후, PMSO 막을 긁어내어 KBr pellet법으로 측정하였다. 이때, 유리 기판은 다음과 같이 전처리하여 사용하였다. 먼저 유리 기판을 세제와 증류수로 세척하고, 6N NaOH 용액에 하루동안 담겨 표면을 깨끗하게 한 후, 다시 증류수로 세척하고 건조시켜 사용하였다.

4. 결과 및 고찰

4. 1. PMSO 막의 형태와 두께

전극에 입힌 PMSO 막의 표면과 단면을 SEM(scanning electron microscopy)으로 관찰하였다(Fig. 3). 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 균열이 없는 막이 만들어졌으며, $0.1\mu\text{m}$ 의 범위에서는 막 표면에서 기공을 관찰할 수 없었다. 또한, 두께는 약 $0.4\mu\text{m}$ 정도인 비교적 균일한 막을 얻을 수 있었다.

4. 2. 작동 특성(Batch Mode Analysis)

전형적인 GOD/PMSO 전극의 글루코스에 대한 감

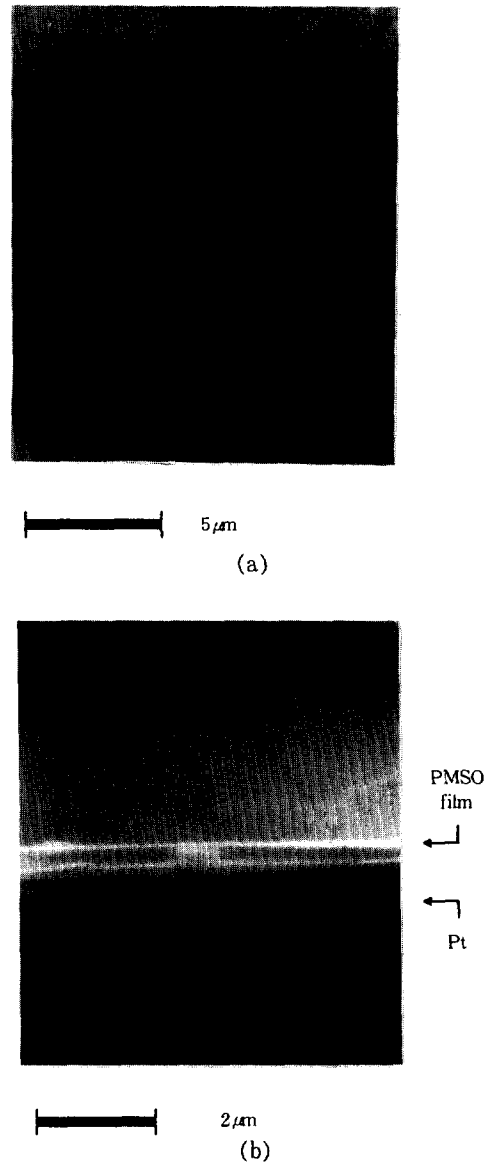


Fig. 3. SEM photographs of the GOD/PMSO/Pt electrode. (a);the top view showing the surface morphology of the PMSO film, and (b);the side view indicating the layer thickness of the film.

응곡선을 Fig. 4-a에 나타내었다. 이는 MTMS 가수분해시 $\text{H}_2\text{O}:\text{MTMS}$ 의 몰 비(R값)를 1.5로 하여 25°C 에서 10일간 건조한 전극의 감응 실험 결과이다. 한 계단마다 약 4mM의 글루코스 농도변화를 의미하

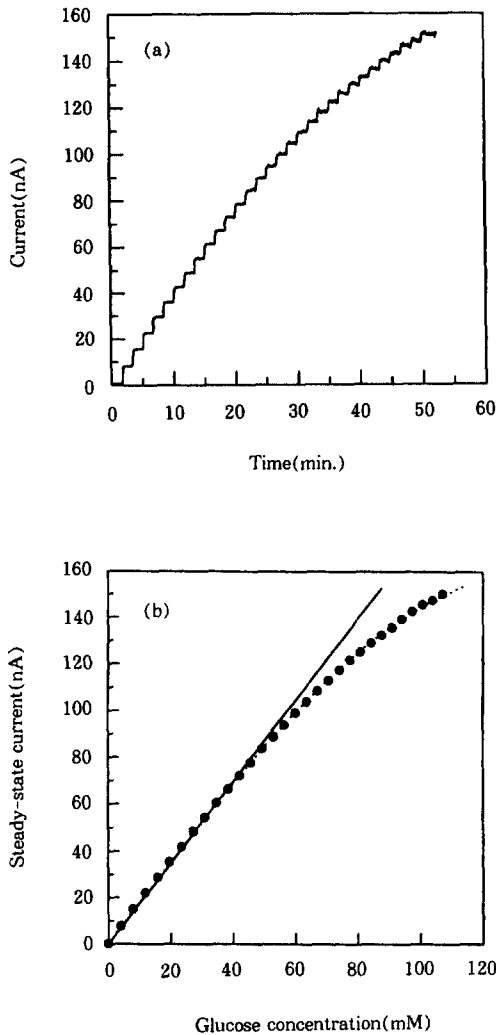


Fig. 4. a) ; A typical current response profile for the GOD/PMSO/Pt electrode prepared by sol-gel process ($R=1.5$, dried for 10 days). Each step corresponds to an increase of glucose concentration by 4mM. The measured temperature was $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$. $R = \text{H}_2\text{O}/\text{MTMS}$ (mol/mol). b) ; Calibration curve obtained from the result in a). The steady-state currents were obtained after subtracting the background current. ● ; observed currents as a function of the glucose concentration, ... ; simulated calibration curve with $V_{\text{max}} = 15.0$, and — ; linear fit up to 45mM ($R^2 = 0.998$).

는데, 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 80mM 정도의 고농도에서도 비교적 안정한 신호를 얻을 수 있었다. 또한, 농도 변화 후 정상 상태의 전류에 도달하는데 걸리는 시간은 약 30초 정도로 다른 GOD 전극에 뒤지지 않았다. Fig. 4-b는 Fig. 4-a의 결과에서 정상 상태 전류값을 취해 얻은 검정곡선이다. 점(●)으로 나타낸 것이 실험값이고, 점선으로 표시된 것이 $V_{\text{max}} = 15.0$ 일 때의 모사결과인데 두 결과가 잘 일치함을 알 수 있었다. 또, 약 45mM까지의 범위에서 R^2 값이 0.998 이상으로 높은 선형성을 보였다.

4.3. 가수분해시 $\text{H}_2\text{O}:\text{MTMS}$ 물 비(R 값)의 영향

$\text{H}_2\text{O}:\text{silane}$ 의 물 비(R 값)는 sol-gel 공정의 중요한 변수 중 하나로 알려져 있으며[17] 또한 본 연구에서 효소전극 제작 과정의 여러 변수 중 이 값이 전극특성에 가장 큰 영향을 줌을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 R 값에 따라 효소전극의 특성이 어떻게 변하는가에 초점을 두고 연구를 진행하였다. Sol 제조시에는 먼저 MTMS를 가수분해하고 여기에 완충 용액을 가하여 pH를 조절하였는데, pH 조절시 첨가하는 완충 용액의 양은 일정하게 하고 가수분해시의 $\text{H}_2\text{O}:\text{MTMS}$ 물 비(R 값)만을 조절하였다. 전극의 건조 온도는 25°C 로 하였고, 건조 시간은 15일로 고정하였다. 막의 두께, 막 내의 효소 농도, 정확한 실제 전극 면적 등은 전극에 따라 조금씩 다를 수 있으므로 단순한 신호 크기 등의 정보만으로는 각 전극의 특성을 비교할 수 없었다. 따라서 객관적이고 신뢰성 있는 비교를 위해 각 전극의 검정곡선을 얻은 후, 이를 모사 결과와 비교하여 가장 잘 맞는 V_{max} 값을 찾아 그 결과를 비교하였다.

Fig. 5에는 각 GOD/PMSO 전극의 제조(15일 건조)후 바로 측정된 결과와 5일 후에 얻은 결과로부터 구한 V_{max} 값을 보여주고 있다. R 값이 당량(3.0) 이하일 때의 V_{max} 값이 당량 이상인 경우의 것보다 더 크며, 두번째 측정 결과에서 이 차이를 더 확연하게 구별할 수 있었다. 또, 첫 측정 때의 V_{max} 값보다 5일 후에 측정된 두번째 값이 더 큰데, $R \leq 3$ 일 때 그 증가폭이 더 컸다. 이러한 현상은 R 값이 당량 이상인 경우와 그렇지 않은 경우에 대해 얻어진 PMSO 막의 성질이 다르다는 것을 의미하는데, 이는 sol에 존재하는 PMSO 소중합체 (oligomer)의 상태에 관계되는 것으로 생각된다. R 값이 3보다 작은 경우 가수분해되지 않고 남은 $-\text{OCH}_3$ 기 때문에 가교되는 정도가

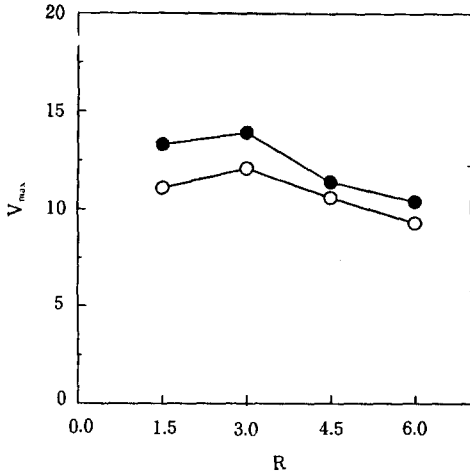


Fig. 5. Plot of V_{max} vs. R value : ○ ; the 1st measurements and ● ; the 2nd measurements after 5days of storage.

낮아 선형의 소중합체들이 생성되고, 그 결과 전조시 소중합체들이 조밀하게 쌓여 밀한 막이 얻어질 것이다. 한편, $R > 3$ 이면 가수분해시 H_2O 가 과량으로 존재하므로 많은 양의 $-OCH_3$ 기가 $-OH$ 로 바뀐다고 생각할 수 있다. 축합반응은 물이 빠지면서 진행되는 반응(식(3))이 알콜이 빠지면서 진행되는 반응(식(2))에 비해 빠르게 진행됨이 알려져 있다[17]. 따라서 $R > 3$ 일 때 축합이 보다 쉽게 일어나므로 가교가 많이 된 소중합체들이 형성되고, 이들이 선형 분자에 비해 성기게 쌓이므로 비교적 다공성이 큰 막이 생성될 것으로 생각된다. 여기서 한 가지 주목할 만한 것은, sol의 제조과정 중 산 촉매하에서 silane을 가수분해한 후 완충 용액을 첨가하여 pH를 조절하기 때문에 만들어진 sol에는 초기의 R값에 관계없이 과량의 물이 존재하게 되므로 각각이 비슷한 성질을 보일 것으로 생각됨에도 불구하고, 전극의 성질은 산 촉매하에서 가수분해 할 때에 채택한 R값이 과량이나 아니냐에 따라 다르게 나타난다는 점이다. 따라서 완충 용액으로 첨가된 물은 silane의 가수분해에 크게 도움이 되지 않는다고 볼 수 있다. 실제로 silane의 가수분해 반응 속도가 $pH=7.0$ 에서 최소가 되고 $pH=2.0$, $pH=12.0$ 에서 최대치를 보인다는 결과가 보고되어 있다[17].

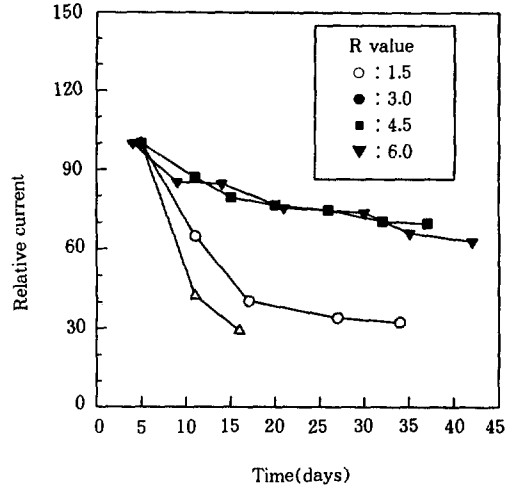


Fig. 6. Storage stability profiles for electrodes prepared with different R values. The current values at 4mM glucose were sampled from the calibration curves(for example, Fig. 4-b) and their relative values against the initial one were presented.

4.3.1. 저장 안정성

센서는 간편한 측정을 목적으로 한다. 따라서 센서를 사용할 때마다 매번 검정곡선을 새로 구해야 한다면 좋은 센서라 할 수 없다. 사용 횟수, 사용 시간, 또는 보관 시간 등에 관계 없이 일정한 감도를 유지하는 센서를 얻는 것은 센서 연구의 중요한 목적 중의 하나인데, 본 연구에서도 이에 관한 실험을 수행하였다. 장기간에 걸쳐 며칠 간격으로 각 GOD/PMSO 전극의 검정곡선을 측정하였으며, 전극을 사용하지 않을 때는 인산염 완충용액(0.1M, pH 7.0)에 담구어 $4^{\circ}C$ 에서 보관하였다. R값이 각각 1.5, 3.0, 4.5, 6.0인 전극의 저장시간에 따른 검정곡선을 구하고 glucose 4mM에 대한 초기농도를 100으로 한 후 전류의 감소크기를 이에 대한 상대적인 값으로 표시하였다(Fig. 6). 그림에서 보는 바와 같이 $R > 3$ 인 경우에는 신호의 감소폭이 비교적 작고 약 40일 후에도 기준값의 70% 정도를 유지하는데 비해, $R \leq 3$ 일 때는 약 20일 이후에는 기준값의 40% 이하로 신호가 크게 감소했다. 이 결과로부터 silane의 가수분해시 R값이 6.0이 넘지 않는 범위 내에서 물을 과량으로 하는 것이 안정한 센서를 얻는데 유리함을 알 수

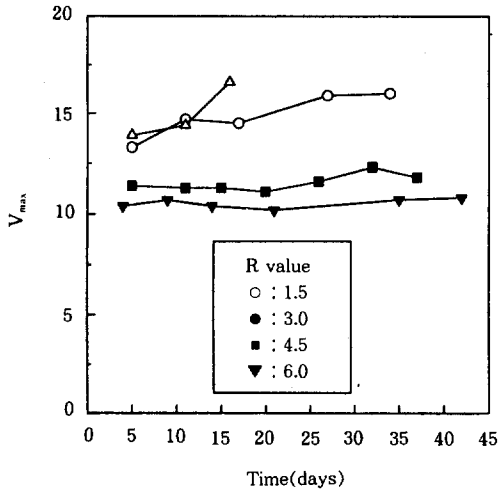


Fig. 7. Plot of V_{max} vs. storage time. The V_{max} values were obtained by simulating the calibration curves.

있었다.

4.3.2. V_{max} 값의 변화

앞에 보인 Fig. 5의 결과에서 R값이 당량 이하일 때 더 조밀한 형태의 PMSO film이 얻어짐을 알 수 있었다. 따라서 전극의 신호 감소가 단지 효소가 막 으로부터 빠져 나오는 것에만 기인한다면 전극의 저장 안정성은 $R \leq 3$ 일 때 더 좋아야 한다. 그런데 Fig. 6에 나타난 결과는 이와 반대이므로 이는 신호 감소의 원인이 다른 데에 있다는 것을 의미한다. 이를 좀 더 자세히 알아보기 위해 모사를 이용하여 실험 결과를 분석하였다. Fig. 7에는 Fig. 6에 이용된 측정 결과를 모사 결과와 비교하여 구한 V_{max} 값을 나타 내었다. V_{max} 값이 $R \leq 3$ 인 경우 시간이 경과함에 따라 계속하여 증가하는 데 비해, $R > 3$ 일 때는 거의 일정함을 알 수 있었다. V_{max} 의 증가가 기질에 대한 확산 장벽이 커짐을 의미한다고 보면, 이러한 결과는 전극 을 사용하고 저장하는 동안에 PMSO 막이 추가로 축 합, 가교되며, 그 정도가 $R > 3$ 일 때보다 $R \leq 3$ 인 경우 에 더 크기 때문이라고 생각되는데 이는 다음과 같 이 설명할 수 있다. 전극 건조시 미처 반응하지 않고 남아있던 $-OCH_3$ 기들이 전극 사용시 rewetting되면서 주위의 물과 반응하여 가수분해되고(이때 글루코스 감지시 전극 표면에서 일어나는 과산화수소의 산 화 반응에 의해 생성된 H^+ 가 가수분해 반응의 촉매

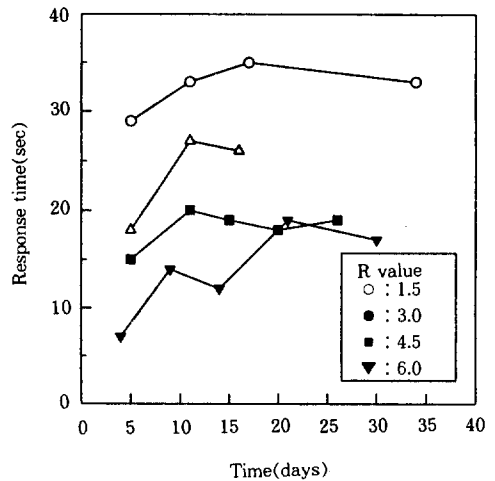


Fig. 8. Plot of response time vs. storage time. The response time was defined as the time required to reach 95% of the steady-state value after addition of glucose solution.

로 이용되는 것으로 판단된다.), 이들은 막내에서 이미 충분히 가까운 거리에 위치해 있으므로 서로 축합 반응하여 새로운 Si-O-Si 결합을 생성하고, 그 결과 막의 다공성이 감소하므로 기질의 확산이 저해된다고 여겨진다. $R > 3$ 일 때는 가수 분해 단계에서 이미 많은 양의 $-OCH_3$ 기가 $-OH$ 로 가수분해되어 전극 제조 시 축합 반응에 참여할 것이므로 rewetting에 의해 새로운 반응이 일어날 확률이 상대적으로 작고, 따라서 저장시간에 따른 감도나 V_{max} 값의 변화가 적은 것 이라고 생각된다.

4.3.3. 응답 시간의 변화

실제로 시간이 지남에 따라 기질의 확산에 대한 장벽이 커진다면, 센서의 응답 시간도 증가하리라 생각된다. 앞 절의 실험 결과에서 글루코스 농도가 $0 \rightarrow 4$ mM로 변할 때의 응답 시간을 구하여 Fig. 8에 나타내었다. 이때 응답 시간은 정상 상태 전류값의 95%에 도달하기까지 걸리는 시간으로 하였다. 이로부터 응답 시간은 저장시간에 따라 일정한 기간 동안 점차 길어지며, R값이 작을 때 그 값이 더 큼을 확인할 수 있었다.

4.3.4. FT-IR을 이용한 분석

앞 절에서의 논의들을 좀 더 확실히 하기 위하여

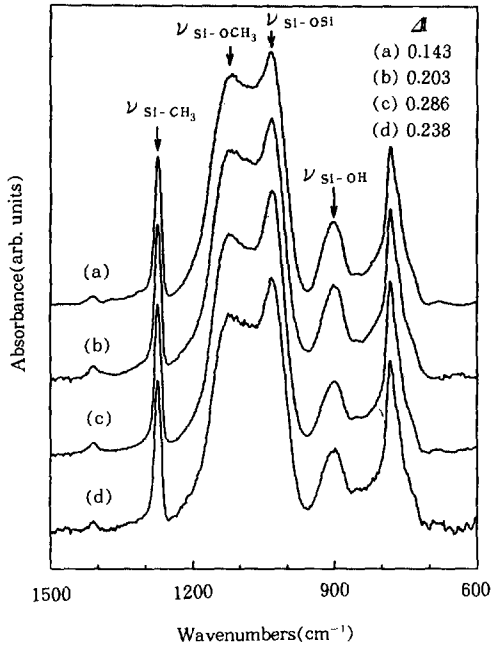


Fig. 9. FT-IR absorbance spectra for PMSO films prepared with different R. (a) ; R=1.5, (b) ; 3.0, (c) ; 4.5, and (d) ; 6.0. The meaning of I was given in the text.

R값을 변화시켜가며 얻은 PMSO 막의 FT-IR 스펙트럼을 비교하였다(Fig. 9). 문헌에 보고된 값[27-29]으로부터 Si-CH₃(1274cm⁻¹), Si-OCH₃(1105cm⁻¹), Si-O-Si(1037cm⁻¹), Si-OH(901cm⁻¹) stretching 피크를 확인하였다. 각 막의 건조 온도는 25℃, 시간은 10일로 하였다. PMSO에는 Si 원자 하나마다 -CH₃가 하나씩 있으므로 이를 내부 표준으로 삼아 다른 피크의 크기를 비교하였다. Fig. 9에는 Si-CH₃(1274cm⁻¹) stretching 피크의 크기를 같게 그림으로써 상대적인 비교가 쉽도록 하였다. R=4.5까지는 R값이 커질수록 Si-OCH₃ 피크에 대한 Si-O-Si 피크의 상대적인 크기가 커짐을 알 수 있는데 이는 앞 절(V_{max} 값의 변화)에서 예상했던 결과와 일치한다. 이를 좀 더 확실하게 비교하기 위해 다음과 같이 ΔI를 정의하여 그 수치를 그림에 같이 보였다.

$$\Delta I = \frac{I(\text{Si-O-Si}) - I(\text{Si-O-CH}_3)}{I(\text{Si-CH}_3)} \quad (17)$$

I : absorbance

한편, R < 3.0인 경우 계속되는 glucose 감응실험

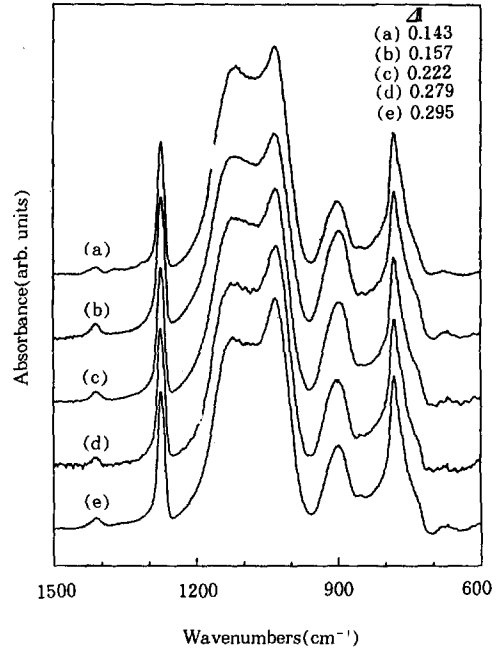


Fig. 10. FT-IR absorbance spectra for PMSO films prepared with R=1.5. (a) ; dried for 10 days at 25℃, and then stored for (b) ; 5 days in phosphate buffer(0.1M, pH 7.0), (c) ; 10 days in the same buffer, (d) ; 5 days in HCl solution(0.001N), and (e) ; 10days in HCl solution(0.001N).

결과 축중합이 계속 진행될 것으로 예측하였는데 이를 증명하기 위하여 R=1.5인 sol을 제조하여 25℃에서 10일간 건조한 후 인산염 완충용액(0.1M, pH 7.0)과 0.001N HCl 수용액(pH=ca. 3.2)에서 보관한 결과의 PMSO막에 대해 FT-IR 스펙트럼을 구하였다(Fig. 10). 그림에서 보듯이 완충 용액에 보관한 경우 ΔI값이 서서히 증가함에 비해, HCl 수용액에 보관했을 때는 ΔI값이 비교적 빨리 증가했다. 이로부터 rewetting된 PMSO 막이 추가로 축합 반응되며, 그 속도는 pH에 영향을 받음을 알 수 있었다. 따라서, rewetting시 추가로 진행되는 축합반응은 pH가 낮을수록 빨리 진행되는 반응, 곧 -OCH₃의 가수분해 반응(식(2))에 관계됨을 알 수 있었다.

4. 4. Alcohol Oxidase(AOD)에의 적용

PMSO막에 다른 종류의 효소도 고정화가 가능한지

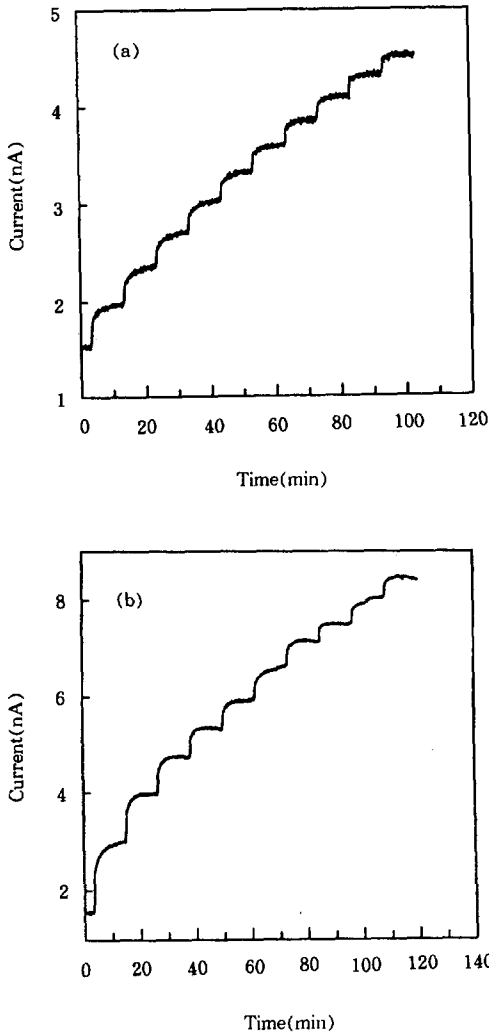


Fig. 11. Typical current response profiles for the alcohol oxidase(AOD)-immobilized PMSO/Pt electrodes prepared by sol-gel process ($R=6.0$, dried for 10days). (a) ; to EtOH and (b) ; to MeOH.

또한 제작된 효소전극이 센서로 활용이 가능한지 알아보기 위해 AOD를 고정화한 alcohol 센서를 제작하였다. AOD는 최적 pH가 7.0~8.5, 안정한 pH 구간이 5.5~9.0로 알려져 있어 전극 제작시 사용하는 완충 용액의 pH를 7.0으로 하였으며, 다른 조건들은 GOD 전극 제작 때와 같게 하였다.

Fig. 11은 각각 ethanol과 methanol에 대한 감응 곡선으로 글루코스 센서에 비하여 신호 대 잡음(S/

N)비가 작고 감응속도가 상대적으로 늦으나 매우 재현성이 있는 전류신호를 얻을 수 있었다. 여기서 한 계단은 약 0.2%(volume)의 농도 변화를 의미한다.

5. 결 론

1. Sol-gel 공정을 이용하여 제작한 GOD/PMSO (polymethylsiloxane)/Pt 전극은 글루코스에 대해 약 45mM까지의 범위에서 높은 선형성과 재현성이 우수한 전류특성을 보였다. 또한, 응답시간은 약 10~35 초 정도였다.

2. 센서제작의 여러 공정변수 중 가수분해시 적용한 R값이 센서의 특성에 가장 큰 영향을 미쳤다. R값이 당량 이하($R \leq 3.0$)일 때 선형성은 좋으나 장기간 저장 안정성이 떨어졌고, 반면에 당량보다 큰 경우($R > 3.0$)에는 선형성은 다소 떨어졌지만 저장 안정성이 좋았다.

3. $R=1.5$ 인 시료에 대한 FT-IR 측정 결과 저장 시간에 따른 전류신호의 감소는 건조시 미처 반응하지 않고 남아 있던 관능기(특히 $-OCH_3$)들이 rewetting되면서 추가로 촉합반응이 진행되기 때문으로 설명할 수 있었다.

4. Sol-gel 방법을 이용하여 silica에 alcohol oxidase를 고정함으로써 alcohol 센서를 제작할 수 있었으며 이로부터 이 방법을 일반적인 효소 고정화 방법으로 적용할 수 있음을 알았다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. J. P. Lowry, K. McAteer, S. S. El Atrash, A. Duff, and R. D. O'Neill, *Anal. Chem.*, **66**, 1754 (1994).
2. S. L. Brooks, I. J. Higgins, J. D. Newman, and A. P. F. Turner, *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 946(1991).
3. O. Holst, H. Hakanson, A. Miyabayashi, and B. Mattiasson, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 32 (1988).

4. P. Rolfe and M. J. Martin, *Chem. Brit.*, 1026 (1988).
5. G. D. Velho, G. Reach, and D. R. Thevenot, In "Biosensors ; Fundamentals and Applications", Ed. by A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson, Oxford University Press, Oxford, Chap. 22 (1987).
6. C. Malistera, F. Palmisano, L. Torsi, and P. G. Zambonin, *Anal. Chem.*, **62**, 2735(1990).
7. N. Oyama, T. Ohsaka, and S. Ikeda, *J. Macromol. Sci.-Chem.*, **A27**, 1203(1990).
8. D. R. Thevenot, R. Sternberg, P. R. Coulet, J. Laurent, and D. C. Gautheron, *Anal. Chem.*, **51**, 96(1978).
9. S. Yamauchi, Y. Ikariyama, and M. Yaoita, "Chemical Sensor Technology", **2**, 205, Kodansha, Tokyo(1989).
10. D. M. Im, D. H. Jang, and S. M. Oh, *Sensors & Actuators B*, **24**, 149(1995).
11. B. C. Dave, B. Dunn, J. S. Valentine, and J. I. Zink, *Anal. Chem.*, **66**, 1120A(1994).
12. R. Zusman, C. Rottman, M. Ottolenghi, and D. Avnir, *J. Non-Cryst. Solids*, **122**, 107(1990).
13. S. C. Kraus, R. Czolk, J. Reichert, and H. J. Ache, *Sensors & Actuators B*, **15-16**, 199 (1993).
14. P. Audebert, C. Demaille, and C. Sanchez, *Chem. Mater.*, **5**, 911(1993).
15. M. Tsionsky, G. Gun, V. Glezer, and O. Lev, *Anal. Chem.*, **66**, 1747(1994).
16. U. Narang, P. N. Prasad, F. V. Bright, K. Ramanathan, N. D. Kumar, B. D. Malhotra, M. N. Kamalasanan, and S. Chandra, *ibid.*, **66**, 3139 (1994).
17. C. J. Brinker, *J. Non-Cryst. Solids*, **100**, 31 (1988).
18. Y. Haruvy and S. E. Webber, *Chem. Mater.*, **3**, 501(1991).
19. T. Adachi and S. Sakka, *J. Non-Cryst. Solids*, **99**, 110(1988).
20. D. Avnir, V. R. Kaufman, and R. Reisfeld, *ibid.*, **74**, 395(1985).
21. S. W. Feldberg in "Electroanalytical Chemistry", Ed. by A. J. Bard, **3**, Chap. 4, Marcel Dekker, New York(1969).
22. J. T. Maloy, K. B. Prater, and A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 5959(1971).
23. R. J. Lawson and J. T. Maloy, *Anal. Chem.*, **46**, 559(1974).
24. P. N. Bartlett and K. F. E. Pratt, *Biosensors & Bioelectronics*, **8**, 451(1993).
25. S. Pons in "Electroanalytical Chemistry", Ed. by A. J. Bard, **13**, Marcel Dekker, New York (1984).
26. J. Woodward, "Immobilized Cells and Enzymes. ; A practical approach", **78**, IRL Press, Oxford(1985).
27. R. M. Silverstein, G. C. Bassler, and T. C. Morrill, "Spectrometric Identification of Organic Compounds", 3rd Ed., Chap. 3, John Wiley & Sons, New York(1974).
28. N. B. Colthup, L. H. Daly, and S. E. Wiberley, "Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy", 2nd Ed., Chap. 12, Academic Press, New York(1975).
29. L. Yang, S. S. Saavedra, N. R. Armstrong, and J. Hayes, *Anal. Chem.*, **66**, 1254(1994).