





2018년 2월 석사학위논문

효소 고정화 기법을 이용한 환경 호르몬 Bisphenol A (BPA) 검출 바이오센서 개발

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

유 수 경



효소 고정화 기법을 이용한 환경 호르몬 Bisphenol A (BPA) 검출 바이오센서 개발

Development of biosensor for the detection of endocrine disruptor Bisphenol A (BPA)

2018년 2월 23일

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

유 수 경





효소 고정화 기법을 이용한 환경 호르몬 Bisphenol A (BPA) 검출 바이오센서 개발

지도교수 이중헌

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2017년 10월

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

유 수 경





유수경의 석사학위논문을 인준함 위원장 조선대학교 교 수 신현재 (2007) 위 원 조선대학교 교 수 이재욱 (2007) 위 원 조선대학교 교 수 이중헌

2 0 1 7 년 1 1 월

조선대학교 대학원

Collection @ chosun



Contents

List of Tables III
List of Figures IV
ABSTRACT VII
제1장 서론1
1.1 연구배경 및 목적1
1.2. 국내외 동향
제2장 이론적 배경····································
제3장 실험 재료 및 방법15
5.1. 요소 고성와 ···································
312 고젓화
3.1.2.1. 담체 준비
3.1.2.2. 효소 고정화 방법
3.1.2.3. 효소 고정화율





3.1.2	.4. 효소 활성도 측정
3.2. 전	.기 화학적 분석
3.2.1.	시약 및 기기20
3.2.2.	Bisphenol A sample 제조
3.2.3.	Cyclic Voltammetry (CV) 20
3.2.4.	Amperometry

제4장 결과 및 고찰 22
4.1. 효소 고정화
4.1.1. 담체의 완성22
4.1.1.1. Polyaniline nanofiber (PANI) 22
4.1.1.2. Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) 전처리 22
4.1.2. Laccase 고정화
4.1.2.1. 최적 조건 확립
4.1.2.2. 효소의 안정성 평가
4.2. 전기화학적 측정 결과
4.2.1. 고정화 방법에 따른 Cyclic Voltammetry, Amperometry 31
4.2.2. 감도 증가를 위한 염료 첨가

제5장	결론		48	;
-----	----	--	----	---

References 49





List of Tables

Table	1.	Theorem	n ba	ased on	endocrine disturbance	5
Table	2.	The lis	t of	linkers	used in the experiment	5
Table	3.	The lis	t of	dyes us	sed in the experiment4	2





List of Figures

Figure 1. Endocrine disruptors (EDCs) entry path4
Figure 2. Synthesis of (A) Bisphenol A, (B) poly carbonate and (C) epoxy
resin. 7
Figure 3. Laccase structure (A) 3D structure and (B) active site
Figure 4. Schematic for the enzyme immobilization strategies with PANIs, (a) enzyme
adsorption (EA), (b) enzyme adsorption and crosslinking (EAC) and (c) en-
zyme adsorption, precipitation and crosslinking (EAPC) 10
Figure 5. Cyclic voltammetry. 13
Figure 6. Standard curve for the determination of protein concentration
Figure 7. Laccase assay. 19
Figure 8. Images of immobilization media (A) SEM images of PANI and (B) pretre-
atment of MWCNTs (a) before pretreatment and (b) after pretreatment. \cdots 23
Figure 9. The changes of immobilization rate with the changes of linker concentration
(A) PANI, (B) MWCNTs and (C) pretreatment MWCNTs
Figure 10. The immobilized enzymes activity according to precipitation (A) PANI,
(B) MWCNTs and (C) pretreatment MWCNTs 28
Figure 11. Long term stabilities of laccase and immobilized laccase (A) PANI, (B)
MWCNTs and (C) pretreatment MWCNTs
Figure 12. SEM images of PANI chip (A) before immobilization, (B) after immobiliz-
ation and (C) after 50 times measurement





- Figure 17. Cyclic voltammograms of MWCNTs SPE with different concentrations of BPA of (A) Immobilization 1, (B) Immobilization 2 and (C) Immobilization 3 (Inset: Calibration curve of concentration of BPA, scan rate: 300 mV/s).
- Figure 18. Amperometric response sensing system using MWCNTs SPE with different concentrations of BPA, concentrations range from 0.1 ppb to 5 ppm (Immobilization 1, Immobilization 2 and Immobilization 3). -----40
- Figure 19. Cyclic voltammograms of PANI screen print electrode (SPE) in different concentration of BPA (from the bottom to top: 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 ppb BPA) of (A) Reactive red 120, (B) Bromothymol blue and (C)





Toluidine blue (Inset: Calibration curve of concentration of BPA, scan rate: 300 mV/s). 44

- Figure 20. Amperometric response sensing system using PANI SPE with different concentrations of BPA, concentrations range from 0.1 ppb to 5 ppm (No dye, Reactive red 120, Bromothymol blue and Toluidine blue). 45
- Figure 21. Cyclic voltammograms of MWCNTs screen print electrode (SPE) in different concentration of BPA (from the bottom to top: 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 ppb BPA) of (A) Reactive red 120, (B) Bromothymol blue and (C) Toluidine blue (Inset: Calibration curve of concentration of BPA, scan rate: 300 mV/s).
- Figure 22. Amperometric response sensing system using MWCNTs SPE with different concentrations of BPA, concentrations range from 0.1 ppb to 5 ppm (No dye, Reactive red 120, Bromothymol blue and Toluidine blue). 47





ABSTRACT

Development of biosensor for the detection of endocrine disruptor Bisphenol A (BPA)

Yoo, Su-Kyoung

Advisor: Prof. Jung Heon Lee, Ph.D. Department of Chemical Engineering Graduate School of Chosun University

Bisphenol A (BPA) was used in raw materials to make polycarbonate or epoxy resins and used extensively in everyday life. The 300 tons of BPA was produced and consumed per year. Early studies have shown that BPA is an endocrine system disruptor that the same action and estrogen from the core of the body. Endocrine system disruptors act as the endocrine hormone and give the confusion in the endocrine system. BPA is an endocrine disruptor that acts like an estrogen in woman's body and also have a detrimental effect on child behavior and learning. BPA is a substance that causes interference even at low concentrations. However, BPA in the plastics, canned, and receipts was used in a variety of locations and is easily exposed to daily life. Since BPA is absorbed even by contact with the skin, it needs to be deal with very carefully.

In this study developed a BPA detection system using biosensor immobilized with laccase. The detection was realized by immobilizing laccase on the working electrodes which are Multi-walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) and Polyaniline (PANI). When laccase was immobilized on the surface of working electrode, the sensing activity showed differences in accordance with the immobilizing method. After immobilizing the enzyme on the electrode, cyclic voltammetry was measured with the changes of BPA





concentrations. The electrode potential was driven in the cathodic direction from 2 to -2 V at scan rate of 300 mV/s. In order to increase the sensitivity of the biosensor, experiments were carried out with the addition of dyes which function as electron transfer mediator at the stage of immobilization. Toluidine blue, Bromothymol blue and Reactive red 120 were used as the intermediate dyes. The linear range of biosensor was from 1 ppb to 10 ppm and the detection limit was as low as 0.01 ppb. Amperometry was measured to observe the change in current value due to BPA concentration change.



VIII



제 1 장 서론

1.1. 연구배경 및 목적

오존층파괴, 지구온난화와 함께 환경호르몬 (environmental hormone)이라고 불리 는 내분비계 교란물질 (endocrine disrupters, EDCs)은 세계 3대 환경문제로 대두 되고 있다. 이 환경문제의 공통점은 모두 우리의 삶을 편리하게 만들어 준 산업의 발달에 의해 발생했다는 것이다. 산업이 발전함에 따라 사용되는 화학물질의 종류 가 다양해졌으며, 소비량이 증가함에 따라 일상생활에서 화학제품을 접하는 경우가 많아졌다. 화학제품 없이는 생활이 불가능 해질 정도로 삶에 깊숙하게 관여하고 있 다. 이러한 화학제품은 때때로 환경호르몬을 발생하는데[1], 발생한 환경호르몬은 생 체에 들어와 정상 호르몬의 역할을 방해하거나 모방하여 비정상적인 반응을 유도 하여 내분비계를 교란시킨다. 이러한 이유로 환경호르몬을 내분비계 교란물질이라 고 부른다[2][3][4]. 대표적인 내분비계 교란물질에는 Bisphenol A (BPA)가 있다. BPA는 아기 젖병, 식품저장용기, 영수증, 캔 등에 사용되어 남녀노소 불문 없이 자 주 접하게 되는 물질이다. 하지만 용출된 BPA는 체내로 유입되어 생식기관 등을 교란시켜 문제를 야기하기 때문에 규제가 필요한 시점이다. 뿐만 아니라 BPA가 검 출되지 않은 (BPA free) 제품을 인증하는 인증 시스템의 점검 또한 요구되고 있다. 이러한 점검과 규제를 위해서는 농도를 측정할 수 있는 측정기술이 필요하며, 이 측정기술을 검증하는 단계가 필요하다. 기존의 측정기술은 GC, HPLC등이 있지만 분석 물질을 측정하는 과정이 복잡하고 많은 시간이 걸릴 뿐만 아니라 전문 기술 인이 필요하여 비용적 측면이 문제점으로 작용한다. 이에 반해 전기화학적 방법을 이용한 바이오센서를 사용하면 측정시간이 빠르고 측정방법이 간단하며, 비교적 낮 은 농도까지 측정 할 수 있어 비용대비 효율성이 좋다는 장점이 있다[5][6]. 이러한 장점을 가진 바이오센서를 활용하여 내분비계 교란물질인 BPA를 전기화학적 방법 으로 빠르고 정확하게 검출하고자 한다.

Collection @ chosun



1.2. 국내외 연구동향

일상생활에서 남녀노소 불문하고 자주 접하는 화학물질인 bispehnol A (BPA)는 소량의 섭취나 피부 접촉만으로도 내분비계를 교란시키기 때문에 전 세계적으로 활발한 연구가 진행되고 있다. BPA의 측정은 GC, HPLC등의 측정 기술을 이용하 여 측정하였다. 하지만 기존의 방법은 분석 물질을 측정하는 과정이 복잡하고 많은 시간이 걸릴 뿐만 아니라 전문 기술인이 필요하여 고비용이라는 문제점이 존재한 다.이에 반해 측정비용이 적게 들고 측정과정이 간단하여 측정시간이 짧은 바이오 센서를 이용한 연구가 활발하게 진행되고 있다^[7]. 기존의 바이오센서에 효소를 접 목시킨 센서를 제작하여^[8] BPA를 측정하기도 하였으며, 전극 물질을 다양하게 바 꿔가며 센서의 감도를 증가시켜 낮은 농도까지 측정이 가능하게 되었다^{[9][10]}.

전극 물질로는 MWCNTs, PANI 등의 전도성 고분자 물질을 주로 사용하고 있다^{[11][12]}. MWCNTs와 PANI는 차, 커피, 와인 등에 들어있는 polyphenol 측정이나 글루코스, 콜레스테롤 검출 등에 사용되고 있다^{[13][14][15][16][17]}. 전극물질에 고정화하는 효소로는 laccase와 tyrosinase, horseradish peroxidase를 주로 사용하며, laccase는 식품, 제지, 섬유 및 제약 산업, 또는 화장품 및 페놀릭 폐수 정수, 바이오 연료 세포와 같은 분석 응용 분야뿐만 아니라 바이오센서에도 응용하고 있다. laccase 기반 바이오센서는 차, 와인 및 수질 환경에서 페놀 검출을 목적으로 하고 있다^{[18][19]}.

국내의 바이오센서 연구동향을 살펴보면 주로 수요가 큰 의료분야의 연구가 활 발하게 진행되고 있으며, 나노바이오센서의 소자 부문은 연구의 수준이 높지만 소 재 부문의 경우는 기술적 측면에서 뒤쳐지고 있다. 국내에서 센서의 연구는 대학과 연구소, 기업체등에서 활발하게 진행되고 있다^[20]. 대학, 연구소의 경우 biochip, lab on a chip뿐만 아니라 미래형 기술과 융합하여 실험도 진행 중에 있다. 1984년에 처음 특허 출원되었던 나노바이오센서는 그 후에도 꾸준한 증가세를 보이며 특허 출원되어 2014년 나노종합기술원에 따르면 총 600여개의 나노바이오센서의 특허가 등록되었다. 센서의 특허동향을 비교해보면 일본과 미국의 차지 비율이 전체의 78%를 차지하고 있으며, 광학센서 등에 비해 전기화학적 센서의 특허수가 월등히 많았다.



제 2 장 이론적 배경

2.1. 내분비계 교란물질과 분해효소의 고정화

주로 환경호르몬이라고 불리는 내분비계 교란물질은 생물체내에 들어와 내분비 계를 교란시키기 때문에 내분비계 교란물질이라고 불리고 있다[21]. 호르몬은 생물 의 내분비계에서 생성되어 혈액을 타고 체내를 순환하다 표적기관의 수용체와 결 합하여 화학적 신호를 전달하거나 호르몬 분비를 자극한다. 하지만 환경호르몬이 생물체에 들어오게 되면 크게 네 가지 방법으로 내분비계를 교란시킨다[22]. 호르몬 수용체의 결합부위를 막아버려 표적세포와 결합하지 못하도록 하거나 호르몬 수용 체와 결합하여 비정상적인 반응을 일으킬 때도 있으며, 정상 호르몬처럼 표적기관 의 수용체와 결합하기도 하며, 생체 호르몬의 대사나 합성과정에 개입하여 비정상 적 반응을 유도한다 (Table 1)^[23]. 교란물질에 의해 교란된 내분비계는 정상적인 내 분비 반응이 일어나지 못해 생물체의 성장과 발달, 생식, 대사 및 항상성을 유지하 는데 어려움을 겪게 된다. 이러한 교란물질은 여러 경로를 통해 인체 또는 동식물 에 유입되어 생태계를 교란시키고 있다 (Fig. 1)^[24]. 미국의 경우 67종을 (EPA, 1996년) 일본은 일본국립의약품식품위생연구소 (NHS)의 분류에 따라 1997년부터 142여종을 내분비계 교란물질로 보고 있으며, 우리나라는 세계야생동물기금 (WWF)가 96년 지정한 67종과 더불어 정부의 규제를 받는 42종, 받지 않는 9종을 포함하여 총 118종을 내분비계 교란물질로 규정하고 있다.







Figure 1. Endocrine disruptors(EDCs) entry path.





Table 1. Theorem based on endocrine disturbance^[25]

Stages of hormonal action	Endocrine disruptors
1. Hormone synthesis	Styrene Dimer and Trimer
2. Hormone release	
3. Hormone transport to target tissue	
4. Hormone-receptor recognition, binding and receptor activation	 ·Mimics: DES, PCB, 4-Nonylphenol, Bisphenol A, Phthalate ester etc. ·Blocked: DDE, vinclozolin
5. Modulation of gene expression and cell proliferation at DNA level	·Trigger: Dioxins, Organotin (TBT, TPT)





Diphenylmethane을 기반으로 두 개의 hydroxyl을 가진 화학 물질 그룹인 Bisphenol 중 가장 잘 알려진 물질인 BPA는 1891년 화학자 디아닌이 페놀 2분자 와 아세톤을 합성시켜 만들었다^[26]. BPA는 phosgene과 함께 반응시켜 폴리카보네 이트를 합성하거나 epichlorhydrin과 축합중합 반응을 통해 에폭시 수지를 생성한 다(Fig. 2)^[27]. 만들어진 고분자 물질은 식품용기의 주원료로 사용되거나 영수증, 캔 등의 코팅 재료로 사용되고 있다. 뿐만 아니라 수도 공급 system에 사용되는 강철 탱크와 파이프를 코팅하는데 사용되어 BPA가 음용수에 방출되기도 한다^[28]. 이는 공업용폐수 뿐만 아니라 생활용 폐수에서도 BPA가 존재하는 이유이다. 또한 식품 용기나 캔, 젖병 등에 사용된 BPA는 고온이거나 강력한 세제, 산성상태에서 소량 녹아 나온다는 수많은 연구 결과들이 있다. BPA 노출의 주요원인은 식품섭취 등을 통한 경구 노출이지만 영수증 감열지 등을 통해서도 피부노출에 의해 체내에 유입 되기도 한다^[29]. 감열지에서 BPA는 표면의 현색제로 주로 사용되는데 이때 BPA는 매트릭스에 공유결합하지 않은 비중합 형태인 자유 형태로 존재하게 되어 감열지 에서 다른 개체로 쉽게 이동되어 접촉만으로도 흡수가 용이하다^{[30][31]}.

섭취를 통하여 체내에 흡수되는 BPA의 99%가 간을 통해 제거되는 것과 달리 피부를 통해 흡수된 BPA는 걸러지지 않은 채 혈액에 머물러 체내에 잔류하는 시 간이 길다는 연구결과가 최근 발표되었다^{[32][33]}. BPA는 몸속에 머무는 동안 여성 호르몬인 에스트로겐과 유사작용을 함으로써 생식기관을 교란시켜 유방암 등을 유 발하거나 정자수를 감소시키기도 한다^[34]. 어린 아이들의 경우 성조숙증과 행동 장 애에 영향을 미칠 수 있는 것으로 알려져 있어 젖병과 식품용기 등에 사용되는 BPA의 문제성이 더욱 심각하다. 최근 동물연구에 따르면 BPA가 생식기관뿐만 아 니라 비만 위험성을 증가시키는 것으로 보고되었으며, 사람을 대상으로 한 일부 연 구에서도 보고되었다^{[35][36]}.

매일 영수증을 처리하는 사람들은 하루에 71 µg 정도의 BPA를 흡수한다는 연구 결과가 보고되어 있다[16]. BPA는 소량만으로도 내분비계 교란을 일으킬 수 있는 물질이기 때문에 계산관련 직업군을 가진 사람과 영수증 감열지와 자주 접촉하는 사람 또는 일반 소비자들의 BPA에 대한 노출에 대한 규제 강화가 시급하며 BPA 노출에 대한 추가 연구가 필요한 시점이다[17].







(A) $2 \swarrow -OH + O = 4 \lor CH_3 \longrightarrow HO - 4 \lor CH_3 \longrightarrow OH + H_2O$ Phenol Acetore Bispherol A





Figure 2. Synthesis of (A) Bisphenol A, (B) poly carbonate and (C) epoxy resin.

Collection @ chosun



디페놀의 한 종류인 BPA를 분해하기 위해서는 페놀산화효소를 사용한다. 대표적 인 폴리페놀산화효소로 laccase와 tyrosinase, horseradish peroxidase등이 있으며, 이 효소들은 o-, p- 및 일부 m-diphenols, aminophenols, polyphenols 및 phenol과 같은 다양한 페놀계 화합물의 산화를 촉매한다^[37]. 그 중 laccase는 일반적인 폴리 페놀 산화 효소와 달리 일산화탄소의 저해를 받지 않으며, tyrosinase와 horseradish peroxidase보다 넓은 기질 특이성을 가진다^[38].

Laccase (Lac, EC 1.10.3.2)는 1883년 H. Yoshida가 최초로 옻나무인 Rhus vernicifera 수액에서 발견했다. 청색 산화 효소 군으로 균류에서 광범위하게 발생하지 만 고등식물, 곰팡이, 곤충과 박테리아에서도 발견될 만큼 널리 분포하는 산화 효 소이다. 단량체 당 4개의 구리 이온 (Cu2+)을 가지며, 이 부분을 활성 site로 하는 3개의 활성 site를 가진 당 단백질로 활성 site는 전자스핀 공명의 특성에 따라 T1, T2, T3 site로 분류된다^[39]. T1과 T2는 각각 1개의 구리 이온을 가지고 T3는 구리 이온 2개가 짝을 이루고 있다. T2, T3에 위치한 세 개의 구리이온은 trinuclear copper site라 불린다 (Fig. 3). laccase에 의한 일반적인 촉매반응은 T1 주변에 있 는 아미노산에 의해 형성된 소수성 부분에 환원 기질이 결합하여 1전자 산화와 T1 site의 환원이 동시에 일어나고, 이때 생성된 전자는 Type-2, Type-3에 결합하는 산소에 전달되어 산소의 물로의 4전자 환원이 일어난다^[40].

Laccase는 섬유, 제약 산업, 화장품 및 페놀릭 폐수 정수뿐만 아니라 바이오센서 에도 응용하고 있다. Laccase 기반 바이오센서는 차, 와인 및 수질 환경에서 페놀 을 검출하는데 주로 사용된다[41][42].









Figure 3. Laccase structure of (A) 3D structure and (B) active site.







Figure 4. Schematic for the enzyme immobilization strategies with PANFs, (a) enzyme adsorption (EA), (b) enzyme adsorption and crosslinking (EAC), and (c) enzyme adsorption, precipitation and crosslinking (EAPC)^[43].



2.2. 바이오센서 및 전기화학적 측정법

측정대상에서 물리적 특성(소리, 빛, 열, 진동 등)의 정보를 얻어 정보화하여 신 호로 변환시키는 장치를 센서라고 한다. 센서는 물리적 센서, 화학적 센서로 나눌 수 있는데 화학적 센서의 한 종류로 바이오센서가 있다^[44].

바이오센서는 광학, 열량 측정, 압전 및 전기 화학적 바이오센서로 분류할 수 있는데, 광학 바이오센서는 생화학 반응의 결과로 흡수되거나 방출되는 빛의 측정하는 센서로 pH, O8 또는 CO8 등의 측정에 주로 사용한다. 열량 측정 바이오센서는 분석물질과 효소의 생화학적 반응으로 인해 발생하는 열을 기반으로 분석물질을 감지하며, 압전 바이오센서는 암모니아, 아산화질소, 일산화탄소, 수소, 메탄 및 특정 유기 인 화합물의 측정에 사용 한다^[45]. 광학 바이오센서는 매우 민감하지만 혼탁한 물질 측정에는 사용할 수 없다는 점과 열량 측정 바이오센서는 열 변화가 거의 없는 시스템에는 사용 할 수 없다는 단점이 존재했다. 이에 반해 전기 화학적 바이오센서는 다른 바이오센서들의 단점들을 보완 할 수 있고 빠르고 조작이 쉽고 값이 싸다는 장점도 가지고 있어 가장 보편적으로 사용되고 있는 바이오센서다.

전기 화학적 바이오센서는 bio-interaction에서 전자가 소비되거나 생성되어 전기 화학적 신호를 생성하는 원리를 이용하여 전기 화학적 신호를 검출기로 측정하는 데, 전기 화학적 바이오센서는 일반적으로 potentiometry 및 amperometry를 기반 으로 하며, 검출기 시스템에 의해 측정되는 전기 화학적 성질에 따라, conductometric, potentiometric 그리고 amperometric 바이오센서로 나눌 수 있다^[46]. Potentiometric 바이오센서는 기준 전극에 대한 작용 전극에서의 전위 측정을 기반 으로 하여 이온이 적절한 이온 교환막에 결합 할 때 전극 전위의 변화를 감지하며, amperometric 바이오센서는 전극 사이에 전위가 가해질 때 전류를 생성하는 원리 를 사용하며, 측정물질 농도에 대하여 선형적인 결과를 얻을 수 있다. Amperometric 바이오센서는 민감도와 결과치의 신뢰성 또한 높은 것으로 알려져 있다.



Cyclic voltammetry (CV)는 전기화학적 분석시 먼저 수행되는 실험으로, 전극 의 표면과 표면 근처에서 어떠한 반응이 일어나는지 직접적으로 파악할 수 있는 전기화학 측정법이다. CV 측정을 통해 산화-환원이 제대로 이루어 졌는지, 실험과 정 중에 불순물이 첨가되진 않았는지 peak를 통해 확인이 가능하다. CV는 전압을 역방향, 정방향을 주기적으로 번갈아가며 주사하여 전류의 변화를 측정하고 얻은 곡선을 cyclic voltammogram이라고 한다. 기준 전극에 대하여 Fig. 5의 (A)와 같 이 작업 전극에 전위를 주사하면 (B)와 같은 cvclic voltammogram을 얻을 수 있 다. 전류가 흐르지 않는 초기전위부터 역전전위까지 주사 한 후, 주사 속도는 동일 하되 전위 방향을 역으로 변경하여 초기전위로 되돌아오게 하는 과정을 통해 CV 를 측정한다. Fig. 5 (B)의 (a)는 실제적으로는 전류가 흐르지 않는 상태이다. 여기 에 전위를 (+)로 주사하면 산화 반응이 일어나면서 산화 전류가 급격히 증가하여 산화 피크 전류 (anodic peak current) (b)에 도달한다. 여기에 전류를 계속 가하면 산화 전류가 감소하게 되면서 (c)에 도달하게 되고 이때 전위 주사 방향은 (-)전위 방향으로 바뀌게 되어 환원 반응이 일어나게 되면서 환원 전류가 증가하게 된다. 그 이후 곡선의 모양은 산화곡선과 같이 나타난다. 이렇게 얻어진 cvclic voltammogram를 통해 산화와 환원의 특성을 밝힐 수 있다.

Amperometry는 전극 표면의 전류량을 측정하는 방법으로 working electrode, counter electrode, reference electrode로 이루어진 센서에 일정한 전압을 흘려주고 그에 따른 전류량을 시간에 따라 나타낸다. 이때 전류값의 변화는 Cottrell equation 에 의해 나타낼 수 있다. Cottrell equation식은 다음과 같다.

$$i = \frac{nFA C_j^0 \sqrt{D_j}}{\sqrt{\pi t}} \tag{1}$$

식에 사용된 기호 n은 전자 수, F는 패러데이 상수, A는 전극의 표면적, C_j⁰는 환원 가능한 분석물 j의 초기농도, D_j는 j에 대한 확산 계수이며, t는 시간으로 단 위는 초를 사용한다. 위 식의 전류량은 √t 에 반비례함을 확인 할 수 있으며, 전극 에 흘려준 전압에 의해 생성된 물질이 확산하는 정도를 통해 농도의 기울기를 알 수 있다[47].











Figure 5. Cyclic voltammetry.





전자 전달 매개체는 효소와 함께 산화-환원 반응에 참여하여 발생한 전자를 빠 르게 전달하는데 도움을 주는 물질로 전극과 효소 사이에서 전자를 전달하는 역할 을 수행한다. 전자 전달 매개체는 효소와 기질물질의 반응이 진행되는 동안 전극표 면과 효소사이에서 산화-환원 반응을 끊임없이 반복하여 확산반응에 의해 전자를 전달하게 된다^[48]. 이러한 전자 전달 매개체의 역할을 하기 위해서는 효소와 빠르 게 반응하면서 가역적이고 불균일한 반응성을 가져야한다. 또한 pH에 의존적이지 않아야 하고 산화-환원 상태가 안정해야하며, 산화-환원 반응에서 환원된 전자 전 달 매개체는 산소와 반응을 하지 않아야 한다. 이 조건들을 만족하는 전자전달 매 개체를 사용하게 되면 반응을 방해하는 물질에 의한 방해와 산소의 영향을 덜 받 게 된다. 이러한 전자 전달 매개체로는 유기염료와 무기이온들과 그밖에도 여러 가 지가 있다^[49].



제 3 장 실험 재료 및 방법

3.1. 효소 고정화

3.1.1. 시약 및 기기

본 연구에 사용될 효소 고정화 담체의 제조와 전처리과정에 필요한 시약 중 aniline, ammonium persulfate와 H₂SO₄는 Sigma-Aldrich(Missouri, USA)에서 구매하 였으며, HCl, HNO₃는 Junsei(Tokyo, Japan)를 사용하였다. 효소 (Laccase from *Trametes versicolor*)와 효소 활성 측정시 사용되는 syringaldazine, 단백질 검출을 위한 기준물질인 BSA은 Sigma-Aldrich(Missouri, USA) 제품으로 실험하였다.

3.1.2. 고정화

3.1.2.1. 담체 준비

1.Polyaniline nanofiber (PANF) 제조

1 M HCl에 99% Aniline을 15%가 되게 넣은 후 흔들어 제조한 용액과 1 M HCl에 ammonium persulfate를 0.1%만큼 넣은 후 흔들어 제조한 용액과 섞어 격하 게 흔든다. 두 용액이 반응하여 용액의 색이 진한 청남색이 되면 150 rpm으로 맞 춰진 orbital shaker에 24시간동안 shaking해준다. 24시간이 지나면 4°C, 6000 rpm 으로 설정된 원심분리기에 넣고 10분간 작동시킨 후 6회 이상 증류수로 washing 한 후 바이알에 넣어 보관한다.

2.Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) 전처리

Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs)의 전처리는 HNO₃, H₂SO₄의 부피 비가 1:3으로 섞인 용액에 MWCNTs 분말을 넣고 130°C에서 30분간 가열한 후 증 류수를 사용하여 pH가 7.0이 될 때까지 washing하였다. Washing이 끝난 MWCNTs는 40°C dry oven에서 약 24시간동안 건조시킨 후 사용했다.





3.1.2.2. 효소 고정화 방법

담체는 Laccase from *Trametes versicolor*의 완충용액인 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5)로 5번 washing 한 후 25 U/ml으로 만든 효소액을 넣고 반응 시킨다. 그 후 ammonium sulfate를 넣고 녹을 때까지 잘 흔들어 준 후 linker 를 첨가하여 17시간 동안 교반시킨다.

3.1.2.3. 효소 고정화율

단백질 측정을 통해 효소의 고정화율을 계산했다. Coomasie brillant blue 염료가 들어있는 Bradford용액을 사용하는 Bradford법을 이용하여 단백질 측정 실험을 진 행했다 (Fig. 6). Bradford용액과 sample을 30: 1의 부피비로 넣은 에펜도르프 튜브 (eppendorf tube)를 vortexing한 후 상온에서 5분 동안 방치 한 후 595 nm에서 분 광광도계를 사용하여 흡광도를 측정한 결과 값을 protein standard (bovine serum albumin ,BSA)으로 잡은 단백질 검량선에 대입하여 얻은 결과를 통해 담체에 대한 효소의 고정화정도를 계산했다^{[50][51]}.







Figure 6. Standard curve for the determination of protein concentration.





3.1.2.4. 효소 활성도 측정

효소 활성은 Laccase from *Trametes versicolor*와 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5), 0.216 mM syringaldazine를 17: 73: 10의 부피 비로 반응시 켜 측정했다. 0.216 mM syringaldazine은 메탄올에 녹여 만들었으며 laccase 용액 은 차가운 증류수에 녹여 사용했다. laccase와 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5)를 혼합한 용액을 30°C로 설정된 thermomixer에 15분간 넣어 반응 온 도를 맞춘 후 0.216 mM syringaldazine을 넣고 잘 섞은 후 UV-Vis Spectrophotometer를 사용하여 530 nm의 파장에서 10분 동안 흡광도를 측정했다 (Fig. 7). 흡광도 측정시 흡광도 값이 1.2보다 컸을 때는 희석하여 측정하였으며, 흡 광도 값의 기준이 되는 영점은 효소용액 대신 증류수를 넣어 진행했다^[52].







Figure 7. Laccase activity.



3.2. 전기 화학적 분석

3.2.1. 시약 및 기기

본 연구의 측정물질인 Bisphenol A (BPA)는 Sigma-Aldrich(Missouri, USA)에 서 구매하였으며, 전기화학적 분석에 사용되는 센서 케이블과 screen printed electrode (SPE)는 DropSens(Chennai, India)의 제품을 사용하였다. SPE는 110-CNT, 110-PANI 모델이며, CHI사의 660c 모델을 전기화학 계측기로 사용하여 Cyclic voltammetry와 Amperometry를 측정했다.

3.2.2. Bisphenol A sample 제조

Bisphenol A 120 mg을 0.1 M Sodium phosphate buffer (pH 7.0)와 증류수 1 L 에 각각 넣고 1일 동안 교반해주었다. 이렇게 만들어진 시약은 0.526 mM의 농도를 가지게 되며 이 용액을 buffer와 증류수로 각각 희석하여 분석용 샘플을 제조하였 다.

3.2.3. Cyclic Voltammetry (CV)

BPA의 CV를 측정하기에 앞서 측정에 알맞은 scan rate을 구하기 위해 1 ppm BPA 50 µl를 scan rate을 변경해가며 CV를 측정한다. 측정에 사용된 전압은 2에 서 -2 V이며, 측정간격은 0.05 s로 지정하였다. 증류수와 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)를 측정한 후 저농도 BPA 용액에서부터 고농도의 BPA 용액 순으로 측정하였다. 실험이 끝난 후에는 buffer를 사용하여 충분히 washing한 후 재사용했다. 모든 측정이 완료되면 CV 측정을 통해 얻은 cyclic voltammogram을 서로 겹쳐 그려 산화 환원 피크분석을 진행하였다.





3.2.4. Amperometry

Amperometry 측정 전위는 CV로 얻은 결과로 설정했다. 전기화학 계측기의 측 정 전위를 설정한 후 SPE의 3전극위에 측정물질을 올려 실험을 진행하였다. 시간 에 따른 전류 측정은 100초 간격으로 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 를 시작으로 하여 저농도 BPA 용액에서부터 고농도의 BPA 용액을 차례대로 올려 측정하였다. 실험이 끝난 후에는 buffer를 사용하여 충분히 washing한 후 보관하여 재사용했다.



제 4 장 결과 및 고찰

4.1. 효소 고정화

4.1.1. 담체의 완성

4.1.1.1. Polyaniline nanofiber (PANI)

Polyaniline (PANI)은 전도성 고분자 물질 중에서도 원료의 가격이 싸고 안정성 과 가용성이 뛰어나다는 이점을 가져 공업적 응용 연구가 활발히 진행되었다. PANI은 전도성의 성질을 지녀 전하 수송체 재료로 사용되고 있으며, 다공성을 띄 고 있어 고정화용 담체로도 적합하다. 본 실험에 고정화 담체로 사용되는 PANI는 aniline과 HCl의 중합반응으로 합성되며 반응 개시제로는 비금속 산화제의 한 종류 인 ammonium persulfate ((NH4)2S2O8)를 사용하여 직접 제조하였다. 제조한 PANI 은 nanofiber 형태를 띄고 있어 polyaniline nanofiber (PANF)라고도 부른다.

합성한 PANI는 SEM을 찍어 합성이 잘 이루어 졌는지 확인하였다. Fig. 8의 SEM을 통하여 고정화 담체로 적합한 구조를 가진 담체가 생성되었음을 볼 수 있 었다.

4.1.1.2. Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) 전처리

Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs)는 상당히 우수한 기계적, 열적, 전 기적 특성을 가지고 있어, 다양한 분야에서 활용되고 있다. 하지만 CNT의 뭉침 현 상으로 인해 이론값과 실험값의 격차가 크다는 문제가 있었다. 이러한 문제점을 해 결하여 여러 분야에 적용시키기 위해서는 CNT의 분산은 상당히 중요한 요소 중 하나이다. CNT 분산기술에는 기계분산, 용매 혹은 분산제나 강산, 고분자를 이용 한 반응법 등이 있다.

MWCNTs의 경우 전처리 전과 후를 비교해보니 전처리 전에 비해 전처리 후의 MWCNTs의 분산도가 증가하였음을 확인했다. 전처리 전 MWCNTs에서는 작용기 가 존재하지 않아 분산되지 못하고 바닥에 가라 앉아 있는 형태를 띄지만 강산으 로 전처리를 해주게 되면 MWCNTs의 표면에 carboxyl과 hydroxyl이 관능화 되어 반데르발스 (Van der waals) 힘에 의해 분산된다. 전처리 전과 후의 비교는 FTIR 을 통해 확인하였다 (Fig. 8).









Figure 8. Images of immobilization media (A) SEM images of PANI and (B) pretreatment of MWCNTs (a) before pretreatment and (b) after pretreatment.





4.1.2. Laccase 고정화

4.1.2.1. 최적 조건 확립

고정화는 값 비싼 효소를 회수, 재사용하기 위한 공정으로 효소가 담체에 최대한 오랜 시간동안 고정되는 것과 더불어 고정된 효소와 free enzyme의 활성을 비교했 을 때 활성을 잃지 않고 오랫동안 높은 활성도를 유지하는 것이 중요하다^[53]. 이를 바탕으로 최적의 고정화 조건은 고정화율과 활성유지 등을 고려하여 수립하였다. 본 실험은 전기화학 측정에 앞서 최적 조건을 확립하고자 tube에 시행하였다.

측정물질인 BPA 분해를 위해 페놀 산화 효소로 잘 알려진 laccase와 tyrosinase, horseradish peroxidase 중 고정화율과 활성을 비교하였을 때 가장 적합했던 laccase를 선택하여 실험을 진행했다. 실험에 사용된 효소는 구름버섯 (*Trametes versicolor*)에서 얻어진 laccase를 사용했다.

본 실험의 주목적인 중 하나인 최적의 고정화 조건을 확립하는데 있어 변수는 다음과 같다. 반응 온도, 담체와 링커의 종류, 고정화에 사용되는 링커와 효소의 양, ammonium sulfate의 유무 등을 변수로 두고 실험을 진행했다. PANI와 MWCNTs를 담체로 선정하였으며 MWCNTs의 전처리 영향을 알아보기 위해 MWCNTs의 전처리 전과 후 그리고 PANI까지 총 3가지의 담체를 가지고 실험을 진행했다. 실험에 사용된 링커는 Carbonyldiimidazol (CDI), Glutaraldehyde (GA), 1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) (EDC), Hydrazine으로 총 4종류이며 구조식은 Table 2에 나타 내었다.

반응온도는 4°C와 상온에서의 결과를 비교해 보았다. 고정화율과 활성도등의 실 험 결과에서 두 실험군의 차이가 거의 없는 것으로 보아 온도의 영향은 크지 않다 는 것을 확인 할 수 있었다. 본 실험에서는 안정성 등을 평가하기 위해 긴 시간동 안 재사용과 보관을 해야 함을 고려하여 효소의 변형 등을 막고자 4°C를 반응온도 로 설정하였다. 이후의 모든 실험은 4°C에서 진행하였다.







Linker name	Structural formula of linker
Carbonyldiimidazol (CDI)	
Glutaraldehyde (GA)	°,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,
1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) (EDC)	H ₃ C N N NH ₂
Hydrazine	

Table 2. The list of linkers used in the experiment





링커의 종류와 양에 대한 영향을 비교하기 위해 담체마다 CDI, GA, EDC, Hydrazine을 전체 고정화 부피의 0.1, 0.3, 0.5, 0.7%의 부피가 되게 넣어 주었으며 (Fig. 9), ammonium sulfate의 영향을 알아보기 위해 ammonium sulfate를 첨가하 지 않은 고정화법인 EAC와 ammonium sulfate를 첨가한 EAPC법을 사용하여 고 정화 한 후 활성을 비교했다. Fig. 10는 Fig. 9의 모든 담체에서 낮은 고정화율을 보인 hydrazine을 제외한 CDI, GA, EDC 링커의 EAC 활성을 100%로 설정하여 EAPC법의 활성을 나타낸 그래프이다.

PANI의 경우 CDI의 농도를 높여 줄수록 고정화율이 증가하였다. 그로인해 ammonium sulfate의 영향이 조금 낮다는 결과를 얻었으며, GA와 EDC를 사용하여 고정화 하였을 때 링커의 농도가 증가할수록 고정화율 또한 증가하였다. 또한 ammonium sulfate를 첨가하였을 때 GA의 고정화율과 활성이 증가하였다. 이는 이미 높은 고정화 율은 가진 CDI보다 낮은 고정화율을 보였기 때문이라고 판단된다. 전 처리 전의 MWCNTs는 링커의 농도가 증가함에 따라 CDI, GA의 고정화율을 증가 하였으며 대체적으로 고정화 율이 낮았으며, ammonium sulfate를 첨가한 EAPC법 은 PANI와 전처리를 진행한 MWCNTs보다 대체적으로 활성도와 고정화율 측면에 서 낮은 경향성을 띄었다. 반면 산으로 처리한 MWCNTs는 CDI뿐만 아니라 GA와 EDC 에서도 고정화율이 높았지만 hydrazine에 의한 고정화율은 낮음을 확인 할 수 있었다.

종합적으로 담체의 종류와 상관없이 대체적으로 CDI의 고정화율이 다른 링커에 비해 좋음을 확인 했으며, 링커의 양이 증가 할수록 고정화율 또한 증가하는 경향 을 보였다. 또한 EAC법보다 EAPC법의 활성이 증가한 이유는 효소끼리 침전과 뭉 침이 일어나 똑같은 담체에 보다 많은 효소가 고정화되었기 때문이라고 보여 진다.







Figure 9. The changes of immobilization rate with the changes of linker concentration (A) PANI, (B) MWCNTs and (C) pretreatment MWCNTs.







Figure 10. The immobilized enzymes activity according to precipitation (A) PANI, (B) MWCNTs and (C) pretreatment MWCNTs.

4.1.2.2. 효소의 안정성 평가

효소의 고정화 조건을 확립한 후 안정성을 확인하기 위해 약 2주간 매일 비슷한 시간에 효소의 활성을 측정하고 고정화 첫날의 효소활성과 비교하여 어느 정도의 활성을 유지하는지 담체별로 비교하여 실험을 진행했다 (Fig. 11). 최적 조건 확립 에서 가장 높은 고정화 율을 나타낸 링커 Carbonyldiimidazol (CDI), Glutaraldehyde (GA)을 실험에 사용했다. 그 결과 담체별로 편차가 있지만 대체적 으로 GA를 사용했을 때 활성이 조금 높게 나오거나 오랫동안 유지하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 PANI 담체에 GA 링커를 사용하였을 때 가장 안정하게 활성이 유지됨을 확인 할 수 있었다.

PANI의 경우 CDI은 GA의 경우에 비해 고정화율은 높았지만 활성은 더 낮았을 뿐만 아니라 안정성 또한 더 낮음을 확인 할 수 있었다. 이는 반복되는 활성측정에 의해 고정화 되었던 효소가 GA를 사용했을 때 보다 더 빨리 방출되었기 때문이라 고 사료된다. 5일까지 활성이 높게 유지 되었지만 6일부터 급격하게 활성을 잃어 실험이 종료되는 15일에는 세 담체 중에서 가장 낮은 활성을 띄었다. 이를 보아 장 기간보다 빠른 시간 안에 측정해야 하는 바이오센서에 알맞은 링커는 GA라고 판 단 할 수 있었으며, 후에 진행된 전기적 특성을 확인하기 위한 고정화에는 GA를 사용하여 EAPC법으로 고정화를 진행했다.

처리하지 않은 MWCNTs에서 활성도는 CDI와 GA의 차이가 크지 않았다. 초반 의 활성은 free enzyme과 비슷한 경향을 띄었지만 시간이 지남에 따라 활성이 유 지되는 것을 볼 수 있었으며 실험에 사용한 담체 가운데 활성의 낙폭이 가장 좋았 다.

산처리를 진행한 MWCNTs는 활성은 5일까지 90%정도로 유지되었지만 이후 활성의 감소와 유지가 반복되다가 실험이 종료될 시기에는 첫날에 비해 30%의 활성을 띄었다.







Figure 11. Long Long term stabilities of laccase and immobilized laccase (A) PANI, (B) MWCNTs and (C) pretreatment MWCNTs.



4.2. 전기화학적 측정 결과

4.2.1. 고정화 방법에 따른 cyclic voltammetry, amperometry

앞서 4.1에서의 고정화는 튜브에서 진행되었지만 4.2에서는 전기 화학 측정을 위 해 screen printed electrode (SPE)에 고정화를 진행했다. SPE는 working electrode (WE), counter electrode (CE), reference electrode (RE)등으로 이루어져 있으며 WE부분에 PANI, MWCNTs등이 프린트되어 있다. WE에 효소 고정화를 진행하여 고정화 방법과 프린트되어 있는 담체에 따른 전기화학적 특성을 확인하였다.

고정화 방법에 따른 전기화학적 분석을 진행하기에 앞서 MWCNTs SPE의 WE 에 전처리 과정을 진행 하였을 때 washing이 원활하게 이루어지지 못하여 씻겨 나 가지 못한 산이 전극에 남아 스크린 프린트되어 있던 MWCNTs를 전극에서 벗겨 내는 현상 등이 일어났다. 따라서 본 실험에서는 PANI와 전처리를 하지 않은 MWCNTs에 대해 전기화학적 분석을 진행 하였다.

Fig. 12과 13는 WE의 PANI, MWCNTs에 laccase 고정화 전과 후, 고정화한 SPE를 여러번 재사용 한 후 SPE의 WE부분을 SEM을 이용하여 관찰한 모습이다. 고정화 전 PANI는 Fig. 8의 SEM과 비슷한 형상을 보였으며, MWCNTs는 실과 같은 모양을 띄고 있지만 고정화가 진행된 Fig. 12과 13의 (B)를 보면 효소가 담체 에 고정화 되어 본래 담체의 모양과 다르게 표면이 smooth해지며 두꺼워졌음을 보 고 효소가 붙어 있음을 확인 할 수 있었다 (Immobilization 3의 방법으로 고정화 하여 찍은 SEM이다.). (B)를 30-40번 정도 측정에 사용한 후 표면을 촬영한 (C)의 이미지는 (B)와 비교하였을 때 효소의 용출이 있어 담체 표면이 (A)와 비슷해짐을 확인 할 수 있었다. 이를 보아 측정을 반복 할수록 센서의 WE에 고정화 되어 있 던 효소의 결합이 끊기며 방출되어 바이오센서로서의 측정을 진행하기 힘듦을 확 인 할 수 있었다.







Figure 12. SEM images of PANI chip (A) before immobilization, (B) after immobilization and (C) after 50 times measurement.



(A)

(B)

(C)



Figure 13. SEM images of MWCNTs chip (A) before immobilization, (B) after immobilization and (C) after 50 times measurement.

4.1을 통해 (A) 얻은 최적 고정화 조건인 GA 링커를 사용하여 EAPC법으로 고 정화할 때 링커는 전체 부피의 0.5%가 되게끔 첨가해준다는 조건을 가지고 세가지 방법으로 고정화를 진행하여 어느 방법이 가장 전기적 특성을 잘 나타내는지 확인 하고자 하였다. 방법은 아래와 같다.

- (1) Immobilization method 1 Linker_ Enzyme_ Ammonium sulfate
- (2) Immobilization method 2 (Enzyme_Ammonium sulfate)_ Linker
- (3) Immobilization method 3 Enzyme_ Ammonium sulfate_ Linker

방법 (1)은 링커를 먼저 반응시킨 후 효소와 과산화황산암모늄 (ammonium sulfate)를 일 정한 시간을 두고 차례대로 넣어주어 고정화를 진행하였고, 방법 (2)의 경우 효 (B) 전한 시간을 두고 차례대로 넣어주어 고정화를 진행하였고, 방법 를 넣어주었다. 방법 (3)은 이전에 고정화 실험에서 사용하였던 방법으로 작용전극 (WE)에 효소, ammonium sulfate, 링커 순서대로 반응시간을 두고 첨가하여 효소 를 고정했다. 위 방법들과 앞선 튜브에서 행해졌던 고정화와의 큰 차이점은 반응부피이다. 튜브에 비해 100배 정도 축소된 20 µl 부피에서 반응이 이뤄지기 때문에 반응 물질끼리의 교반이 제대로 이루어지지 않을 가능성이 있어 1분간 천천히 pipetting을 해준 후 4°C의 냉장고에 넣어 반응을 진행하였다.

Cyclic voltammetry (CV) 측정 시 scan rate를 다르게 하여 CV를 측정하게 되 면 계면에 존재하는 산화-환원에 관련된 이온들의 농도에 따라 cyclic voltammogram의 특성 ^(C) 이 달라지기 때문에 전극의 종류, 고정화 방법, 염료의 유무 등 다양한 변수에 대한 영향을 보다 정확하게 비교 분석하기 위해 동일한 scan rate을 사용하였다. 이로 인해 본 실험의 측정 물질인 BPA의 CV 측정에 앞서 알맞은 scan rate을 선정하는 작업이 선행되었다. Scan rate을 선정 과정은 다음과 같다. 1 ppm 농도의 BPA를 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 mV/s의 속도로 흘려주면서 cyclic voltammogram을 얻은 후 측정에 적절한 전류 속도를 설정하였다. 그 결과 300 mV/s가 측정에 알맞은 속도라고 판단되어 scan rate으로 지정하였다 (Fig. 14). 본 실험의 모든 CV 측정은 300 mV/s 속도로 하였다.









Figure 14. Cyclic voltammograms of MWCNTs of 1 ppm bisphenol A recorded at different scan rates (from bottom the top: 50, 100, 200, 300, 400, 500 and 600 mV/s (Inset: Calibration curve of scan rate of BPA).





Bisphenol A (BPA) 120 ppm은 0.53 mM로 1 ppm은 4.38 µM 농도와 동일하다.

0.1 M Sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 녹인 1, 5, 10, 50, 100, 500 ppb, 1 ppm BPA를 사용하여 PANI, MWCNTs의 CV를 측정한 후 겹쳐 그려 얻은 그래 프를 Fig. 15, 17에 나타내었다.

Amperometry는 0.1 M Sodium phosphate buffer (pH 7.0)를 시작으로 하여 buffer에 녹인 0.1, 1, 10, 50, 100, 500 ppb, 1, 5 ppm BPA를 100초 간격을 두고 차 례대로 주입하여 측정하였다. Fig. 16, 18은 방법을 달리하여 고정화한 PANI와 MWCNTs chip의 amperometry 결과와 그에 대한 검량선을 표기하였다.

방법 (1), (2), (3)의 amperometry를 비교하였을 때 PANI SPE에서는 (3)의 방법 이 (1), (2) 방법에 비해 월등히 좋은 경향성을 띄었으며, MWCNTs SPE는 저농도 의 BPA에서는 (1)의 전류량이 (2), (3)보다 높았지만 전체적으로 방법 (1), (2), (3) 은 비슷한 결과값을 보였다. 위 결과를 바탕으로 10 ppm의 BPA를 측정한다고 가 정하면 PANI chip에 방법 (3)으로 고정화했을 때가 (1)의 방법으로 고정화되었을 때 보다 약 31.8%, 방법 (2)를 사용했을 경우보다 14.3%가 증가된 전류량이 측정되 었다. MWCNTs chip의 경우 (1)의 방법으로 고정화를 했을 때보다 11.1%, 방법 (2) 경우에는 7.6% 향상된 결과 값을 얻었다.

PANI와 MWCNTs chip에 (1), (2), (3) 방법으로 고정화하여 같은 농도의 BPA 를 측정하였을 때 PANI chip보다 MWCNTs chip에 더 많은 전류가 흐른다는 결 과를 얻었다. 같은 방법으로 고정화 하였을 때 MWCNTs가 프린트된 chip이 PANI 가 프린트된 chip보다 평균적으로 18.0%정도 높은 전류량을 보였다. 이는 PANI보 다 MWCNTs의 전도성이 더 우수하기 때문이라고 사료된다.







Figure 15. Cyclic voltammograms of PANI SPE recorded at the different concentrations of BPA (A) Immobilization method 1, (B) Immobilization method 2 and (C) immobilization method 3 (Inset: Calibration curve of concentration of BPA, scan rate: 300 mV/s).







Figure 16. Amperometric response sensing system using PANI SPE with different concentrations of BPA, concentrations range from 0.1 ppb to 5 ppm (Immobilization method 1, Immobilization method 2 and Immobilization

method 3).







Figure 17. Cyclic voltammograms of MWCNTs SPE recorded at the different concentrations of BPA (A) Immobilization method 1, (B) Immobilization method 2 and (C) immobilization method 3 (Inset: Calibration curve of concentration of BPA, scan rate: 300 mV/s).







Figure 18. Amperometric response sensing system using MWCNTs SPE with different concentrations of BPA, concentrations range from 0.1 ppb to 5 ppm (Immobilization method 1, Immobilization method 2 and Immobilization method 3).





4.2.2. 감도 증가를 위한 염료첨가

본 연구에서는 고정화 방법뿐만 아니라 센서의 민감도를 높이기 위해 전자 전달 매개체인 염료를 첨가하여 실험을 진행하였다. 전자 전달 매개체는 효소와 함께 산 화-환원 반응에 참여하여 발생한 전자를 빠르게 전달하는데 도움을 주는 물질로 전극과 효소 사이에서 전자를 전달하는 역할을 한다^[54]. 유기염료와 무기이온들과 그밖에도 여러 가지가 있지만 본 실험에서는 유기염료를 사용하였다^{[55][56]}.

염료는 작용기에 따라 분류 할 수 있다. 본 실험에서는 유기염료 종류인 Azo, Triarylmethane, Thiazine, Anthraquinone를 사용하였으며 종류별로 약 3개정도의 염료를 선발한 뒤 가장 결과가 좋았던 염료를 바탕으로 실험을 다시 진행하였다. Azo는 Reactive red 120를 Triarylmethane의 경우는 Bromothymol blue를 지정하 였으며, Thiazine계열은 Toluidine blue를 사용하였다. 염료에 대한 정리는 Table 3 에 나타내었다^[57].





Chrpmophoer type	Dye name	Structural formula of dye
Azo	Reactive red 120	$\begin{array}{c} & NaO_3S \\ & H \\ $
Triarylmethane	Bromothymol blue	$\begin{array}{c} HO \\ H_3C \\ H_3C \\ H_3C \\ \hline \\ H_3C \\ \hline \\ \\ \hline \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ $
Thiazine	Toluidine blue	$H_{3}C$ $H_{2}N$ K

Table 3. The list of dyes used in the experiment





염료를 추가한 chip의 CV는 Fig. 15, 17와 동일하게 1, 5, 10, 50, 100, 500 ppb, 1, 5 ppm 농도의 BPA를 측정하였다. 측정에 대한 결과는 Fig. 19, 21에 나타내었다.

Amperometry는 0.1 M Sodium phosphate buffer (pH 7.0)부터 100초 간격으로 0.1, 1, 10, 50, 100, 500 ppb, 1, 5 ppm 농도의 BPA를 측정하였다. Fig. 20, 22은 서 로 다른 염료를 추가하여 고정화한 PANI와 MWCNTs chip의 amperometry 결과 와 그에 대한 검량선을 표기하였다.

Reactive red 120, Bromothymol blue, Toluidine blue의 결과를 비교해 보았을 때 PANI SPE는 세 염료의 결과차이가 확연하게 보였던 반면, MWCNTs에서는 Toluidine blue가 좋은 감도를 나타내었고 Reactive red 120과 Bromothymol blue 에서는 비슷한 결과치를 얻었다. 위 결과를 기반으로 하여 10 ppm을 측정한다고 가정할 때 Fig. 20, 22의 방법 (3)으로 고정화를 진행했을 때보다 PANI chip에 Reactive red 120를 첨가하였을 때는 약 38.6%, Bromothymol blue를 추가하여 실 험하였을 경우에는 58.2%, Toluidine blue를 사용했을 때는 73.3%의 전류량이 증가 되어 측정되었다. 마찬가지로 MWCNTs chip에 (3)의 방법으로 고정화를 했을 때 보다 Reactive red 120를 추가하였을 때는 약 35.4%, Bromothymol blue를 사용하 여 실험하였을 경우에는 41.0%, Toluidine blue를 첨가 해주었을 때는 72.6%의 전 류량이 향상되어 측정되었다.

PANI, MWCNTs chip 모두 Reactive red 120를 첨가했을 때보다 Bromothymol blue를 추가하였을 때 보다 높은 전류량을 얻을 수 있었으며, Bromothymol blue를 사용했을 때보다 Toluidine blue를 첨가해주었을 때 측정되는 전류값이 대체적으로 높게 측정되었다. 또한 염료 추가 전에 비해 추가 후에 약 53.2%정도 증가된 값을 얻을 수 있었는데 이는 염료가 전자 전달 매개체의 역할을 하여 전기화학적 반응 측정시 보다 많은 전자를 전달했기 때문이라고 사료된다.

Collection @ chosun





Figure 19. Cyclic voltammograms of PANI screen print electrode (SPE) in different concentration of BPA (from the bottom to top: 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 ppb BPA) of (A) Reactive red 120, (B) Bromothymol blue and (C) Toluidine blue (Inset: Calibration curve of concentration of BPA, scan rate: 300 mV/s).





Figure 20. Amperometric response sensing system using PANI SPE with different concentrations of BPA, concentrations range from 0.1 ppb to 5 ppm (No dye, Reactive red 120, Bromothymol blue and Toluidine blue).





Figure 21. Cyclic voltammograms of MWCNTs screen print electrode (SPE) in different concentration of BPA (from the bottom to top: 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 ppb BPA) of (A) Reactive red 120, (B) Bromothymol blue and (C) Toluidine blue (Inset: Calibration curve of concentration of BPA, scan rate: 300 mV/s).







Figure 22. Amperometric response sensing system using MWCNTs SPE with different concentrations of BPA, concentrations range from 0.1 ppb to 5 ppm (No dye, Reactive red 120, Bromothymol blue and Toluidine blue).



제 5 장 결론

본 연구에서는 내분비계 교란물질인 bisphenol A (BPA)를 검출하기 위해 페놀 산화 효소인 laccase를 여러 방법으로 고정화하여 최적의 고정화 방법을 찾아 바이 오센서의 working electrode (WE)에 고정화한 후 전기화학적 분석 방법인 cvclic voltammetry와 amperomtry를 사용하여 BPA 검출 바이오센서를 개발하였다. 고정 화시 Carbonyldiimidazol (CDI), Glutaraldehyde (GA), 1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) (EDC), Hydrazine을 링커로 사용한 결과 반복 실험을 진행 해야하는 센서 실험에는 Glutaraldehyde가 높은 안정성과 활성을 보였다. 반복실험을 진행하 지 않는 일회용 측정 센서라면 고정화율과 활성이 높은 CDI가 적절한 링커라고 사 료된다. 고정화 반응은 4°C와 상온에서의 결과차이가 크지 않아 온도의 영향은 크 게 존재하지 않을 것으로 판단되었으며 ammonium sulfate를 넣지 않는 EAC법보 다 ammonium sulfate를 통해 침전을 일으켜 고정화를 진행하는 EAPC법으로 실험 을 진행하였을 때 고정화율과 활성이 더 높은 것을 알 수 있었다. 위 결과를 종합 하여 담체와 enzyme을 반응시킨 후 ammonium sulfate를 첨가한 후 마지막에 GA linker를 넣어 4°C에서 반응을 진행하였던 고정화 방법의 결과가 가장 좋았다. 또한 염료를 추가하여 실험했을 때 전체적으로 감도가 향상되었으며, 그 중 Thiazine계 열의 Toluidine blue를 첨가 하였을 때 전류값이 가장 높음을 확인 할 수 있었다. 전반적으로 MWCNTs SPE chip으로 측정된 전류량이 PANI가 프린트된 SPE보다 더 높음을 보아 MWCNTs chip에 Toluidine blue를 고정화 방법 (3)으로 고정화 했을 때 BPA 측정에 가장 민감한 센서를 얻을 수 있었다.





References

- Messaoud, N. B., Ghica, M. E., Dridi, C., Ali, M. B., & Brett, C. M. (2017). Electrochemical sensor based on multiwalled carbon nanotube and gold nanoparticle modified electrode for the sensitive detection of bisphenol A. Sensors and Actuators B: Chemical, 253, 513-522.
- [2] Di Donato, M., Cernera, G., Giovannelli, P., Galasso, G., Bilancio, A., Migliaccio, A., & Castoria, G. (2017). Recent advances on bisphenol-A and endocrine disruptor effects on human prostate cancer. Molecular and Cellular Endocrinology.
- [3] Gore, A. C., Holley, A. M., & Crews, D. (2017). Mate choice, sexual selection, and endocrine-disrupting chemicals. Hormones and Behavior.
- [4] Fénichel, P., & Chevalier, N. (2017). Environmental endocrine disruptors: New diabetogens?. Comptes Rendus Biologies.
- [5] Rawal, R., Chawla, S., & Pundir, C. S. (2012). An amperometric biosensor based on laccase immobilized onto Fe 3 O 4 NPs/cMWCNT/PANI/Au electrode for determination of phenolic content in tea leaves extract. Enzyme and microbial technology, 51(4), 179-185.
- [6] Kaur, N., & Prabhakar, N. (2017). Current scenario in organophosphates detection using electrochemical biosensors. TrAC Trends in Analytical Chemistry.
- [7] Sinha, A., Wu, L., Lu, X., Chen, J., & Jain, R. (2017). Advances in sensing and biosensing of bisphenols: A review. Analytica Chimica Acta.
- [8] Maduraiveeran, G., & Jin, W. (2017). Nanomaterials based electrochemical sensor and biosensor platforms for environmental applications. Trends in Environmental Analytical Chemistry.
- [9] Rawal, R., Chawla, S., & Pundir, C. S. (2011). Polyphenol biosensor based on laccase immobilized onto silver nanoparticles/multiwalled carbon nanotube/polyaniline gold electrode. Analytical biochemistry, 419(2), 196-204.
- [10] Chawla, S., Rawal, R., & Pundir, C. S. (2011). Fabrication of polyphenol





biosensor based on laccase immobilized on copper nanoparticles/chitosan/multiwalled carbon nanotubes/polyaniline-modified gold electrode. Journal of biotechnology, 156(1), 39-45.

- [11] Yang, Y., Zhang, H., Huang, C., & Jia, N. (2016). MWCNTs-PEI composites-based electrochemical sensor for sensitive detection of bisphenol A. Sensors and Actuators B: Chemical, 235, 408-413.
- [12] Chawla, S., Rawal, R., Sharma, S., & Pundir, C. S. (2012). An amperometric biosensor based on laccase immobilized onto nickel nanoparticles/carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polyaniline modified gold electrode for determination of phenolic content in fruit juices. Biochemical engineering journal, 68, 76-84.
- [13] Chawla, S., Rawal, R., Kumar, D., & Pundir, C. S. (2012). Amperometric determination of total phenolic content in wine by laccase immobilized onto silver nanoparticles/zinc oxide nanoparticles modified gold electrode. Analytical biochemistry, 430(1), 16-23.
- [14] Mittal, G., Dhand, V., Rhee, K. Y., Park, S. J., & Lee, W. R. (2015). A review on carbon nanotubes and graphene as fillers in reinforced polymer nanocomposites. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 21, 11-25.
- [15] Rawal, R., Chawla, S., Malik, P., & Pundir, C. S. (2012). An amperometric biosensor based on laccase immobilized onto MnO 2 NPs/cMWCNT/PANI modified Au electrode. International journal of biological macromolecules, 51(1), 175-181.
- [16] Dhand, C., Arya, S. K., Datta, M., & Malhotra, B. D. (2008). Polyaniline-carbon nanotube composite film for cholesterol biosensor. Analytical biochemistry, 383(2), 194-199.
- [17] Dhand, C., Arya, S. K., Singh, S. P., Singh, B. P., Datta, M., & Malhotra, B. D. (2008). Preparation of polyaniline/multiwalled carbon nanotube composite by novel electrophoretic route. Carbon, 46(13), 1727-1735.
- [18] Barrios-Estrada, C., de Jesús Rostro-Alanis, M., Muñoz-Gutiérrez, B. D., Iqbal, H.
 M., Kannan, S., & Parra-Saldívar, R. (2018). Emergent contaminants: Endocrine





disruptors and their laccase-assisted degradation-A review. Science of the Total Environment, 612, 1516-1531.

- [19] Vasilescu, I., Eremia, S. A., Kusko, M., Radoi, A., Vasile, E., & Radu, G. L. (2016). Molybdenum disulphide and graphene quantum dots as electrode modifiers for laccase biosensor. Biosensors and Bioelectronics, 75, 232-237.
- [20] Zeng, Y., Zhu, Z., Du, D., & Lin, Y. (2016). Nanomaterial-based electrochemical biosensors for food safety. Journal of Electroanalytical Chemistry, 781, 147-154.
- [21] Nadal, A., Fuentes, E., Ripoll, C., Villar-Pazos, S., Castellano-Muñoz, M., Soriano, S., ... & Alonso-Magdalena, P. (2017). Extranuclear-initiated estrogenic actions of endocrine disrupting chemicals: Is there toxicology beyond paracelsus?. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.
- [22] Rogers, J. A., Metz, L., & Yong, V. W. (2013). endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. Molecular immunology, 53(4), 421-430.
- [23] Moosa, A., Shu, H., Sarachana, T., & Hu, V. W. (2017). Are endocrine disrupting compounds environmental risk factors for autism spectrum disorder?. Hormones and Behavior.
- [24] Wu, L. H., Zhang, X. M., Wang, F., Gao, C. J., Chen, D., Palumbo, J. R., ... & Zeng, E. Y. (2018). Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: A short review. Science of The Total Environment, 615, 87-98.
- [25] Kang, C. G., Lee, S. H., & Kim, E. K. (2007). Endocrine Disruptors. Journal of the Korean Medical Association, 50(4), 359-368.
- [26] Biedermann, S., Tschudin, P., & Grob, K. (2010). Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. Analytical and bioanalytical chemistry, 398(1), 571-576.
- [27] Goldinger, D. M., Demierre, A. L., Zoller, O., Rupp, H., Reinhard, H., Magnin, R., ... & Bourqui-Pittet, M. (2015). Endocrine activity of alternatives to BPA found in thermal paper in Switzerland. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 71(3),





453-462.

- [28] Huang, Q., & Weber, W. J. (2005). Transformation and removal of bisphenol A from aqueous phase via peroxidase-mediated oxidative coupling reactions: efficacy, products, and pathways. Environmental science & technology, 39(16), 6029-6036.
- [29] Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: a review of the literature. Reproductive toxicology, 42, 132-155.
- [30] Grob, K., Gürtler, R., Husøy, T., Mennes, W., Milana, M. R., Penninks, A., ... & Tlustos, C. (2015). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Executive summary. EFSA J, 13, 3978-4599.
- [31] Terasaki, M., Shiraishi, F., Fukazawa, H., & Makino, M. (2007). Occurrence and estrogenicity of phenolics in paper-recycling process water: Pollutants originating from thermal paper in waste paper. Environmental Toxicology and Chemistry, 26(11), 2356-2366.
- [32] Liu, J., & Martin, J. W. (2017). Prolonged exposure to bisphenol A from single dermal contact events. Environmental Science & Technology, 51(17), 9940-9949.
- [33] Hormann, A. M., vom Saal, F. S., Nagel, S. C., Stahlhut, R. W., Moyer, C. L., Ellersieck, M. R., ... & Taylor, J. A. (2014). Holding thermal receipt paper and eating food after using hand sanitizer results in high serum bioactive and urine total levels of bisphenol A (BPA). PloS one, 9(10), e110509.
- [34] Trasande, L., Attina, T. M., & Blustein, J. (2012). Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. Jama, 308(11), 1113-1121.
- [35] Rhie, Y. J., Nam, H. K., Oh, Y. J., Kim, H. S., & Lee, K. H. (2014). Influence of bottle-feeding on serum bisphenol a levels in infants. Journal of Korean medical science, 29(2), 261-264.
- [36] 이빛나, 신혜정, 나현경, 이나경, & 양미희. (2009). Bisphenol A 노출과 소아 비만. Environmental Health and Toxicology, 24(4), 287-292.



- [37] Li, M., & Zhang, C. (2016). y-Fe2O3 nanoparticle-facilitated bisphenol A degradation by white rot fungus. Science Bulletin, 61(6), 468-472.
- [38] Pouran, S. R., Raman, A. A. A., & Daud, W. M. A. W. (2014). Review on the application of modified iron oxides as heterogeneous catalysts in Fenton reactions. Journal of Cleaner Production, 64, 24-35.
- [39] Vlamidis, Y., Gualandi, I., & Tonelli, D. (2017). Amperometric biosensors based on reduced GO and MWCNTs composite for polyphenols detection in fruit juices. Journal of Electroanalytical Chemistry.
- [40] Chung, Y. R., & Song, W. S. (2013). Denim Decolorization Using Laccase. Journal of the Korean Society of Clothing and Textiles, 37(3), 348-356.
- [41] Kurniawati, S., & Nicell, J. A. (2008). Characterization of Trametes versicolor laccase for the transformation of aqueous phenol. Bioresource technology, 99(16), 7825-7834.
- [42] Zhou, H., Qiu, X., Yang, D., & Xie, S. (2016). Laccase and xylanase incubation enhanced the sulfomethylation reactivity of alkali lignin. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 4(3), 1248-1254.
- [43] Kim, H., Lee, I., Kwon, Y., Kim, B. C., Ha, S., Lee, J. H., & Kim, J. (2011). Immobilization of glucose oxidase into polyaniline nanofiber matrix for biofuel cell applications. Biosensors and Bioelectronics, 26(9), 3908-3913.
- [44] Li, G., Sun, K., Li, D., Lv, P., Wang, Q., Huang, F., & Wei, Q. (2016). Biosensor based on bacterial cellulose-Au nanoparticles electrode modified with laccase for hydroquinone detection. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 509, 408-414.
- [45] Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications-A review. Journal of oral biology and craniofacial research, 6(2), 153-159.
- [46] Narang, J., Bhambi, M., & Pundir, C. S. (2010). Determination of serum triglyceride by enzyme electrode using covalently immobilized enzyme on egg shell membrane. International journal of biological macromolecules, 47(5), 691-695.





- [47] Fleischmann, M., Lasserre, F., Robinson, J., & Swan, D. (1984). The application of microelectrodes to the study of homogeneous processes coupled to electrode reactions: part I. EC' and CE reactions. Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry, 177(1-2), 97-114.
- [48] Nakaminami, T., Kuwabata, S., & Yoneyama, H. (1997). Electrochemical oxidation of cholesterol catalyzed by cholesterol oxidase with use of an artificial electron mediator. Analytical chemistry, 69(13), 2367-2372.
- [49] Sekretaryova, A. N., Volkov, A. V., Zozoulenko, I. V., Turner, A. P., Vagin, M. Y., & Eriksson, M. (2016). Total phenol analysis of weakly supported water using a laccase-based microband biosensor. Analytica chimica acta, 907, 45-53.
- [50] Zor, T., & Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. Analytical biochemistry, 236(2), 302-308.
- [51] Compton, S. J., & Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. Analytical biochemistry, 151(2), 369-374.
- [52] Leonowicz, A., & Grzywnowicz, K. (1981). Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. Enzyme and microbial technology, 3(1), 55-58.
- [53] Phaugat, K., Bhambi, M., & Pundir, C. S. (2010). Polyethylene terephthalate membrane as a support for covalent immobilization of uricase and its application in serum urate determination. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 62(1), 27-31.
- [54] Brunetti, B., Ugo, P., Moretto, L. M., & Martin, C. R. (2000). Electrochemistry of phenothiazine and methylviologen biosensor electron-transfer mediators at nanoelectrode ensembles. Journal of Electroanalytical Chemistry, 491(1), 166-174.
- [55] Chaubey, A., & Malhotra, B. (2002). Mediated biosensors. Biosensors and bioelectronics, 17(6), 441-456.
- [56] Thenmozhi, K., & Narayanan, S. S. (2017). Horseradish peroxidase and toluidine





blue covalently immobilized leak-free sol-gel composite biosensor for hydrogen peroxide. Materials Science and Engineering: C, 70, 223-230.

[57] Verrastro, M., Cicco, N., Crispo, F., Morone, A., Dinescu, M., Dumitru, M., ... & Centonze, D. (2016). Amperometric biosensor based on Laccase immobilized onto a screen-printed electrode by Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation. Talanta, 154, 438-445.

