



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2022년 8월
석사학위 논문

우레아제 효소 고정화를 위한
스크린프린팅 전극 기반 전기화학
바이오센서 개발

조선대학교 대학원

화학공학과

엘덴달아이 어트경토야

Development of screen-printing electrode-based electrochemical biosensor for urease enzyme immobilization

우레아제 효소 고정화를 위한 스크린프린팅 전극
기반 전기화학 바이오센서 개발

2022년 8월 26일

조선대학교 대학원

엘덴달아이 어트경토야

Development of screen-printing
electrode-based electrochemical
biosensor for urease enzyme
immobilization

지도교수 이중현

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2022년 4월

조선대학교 대학원

엘덴달아이 어트경토야

엘덴달아이 어트경토야의 석사학위논문을 인준함

위 원 장 조선대학교 교 수 이재욱 (인)

위 원 조선대학교 교 수 이중현 (인)

위 원 조선대학교 교 수 안성훈 (인)

2022년 5월

조선대학교 대학원

목차

| | |
|---|-------------|
| List of Tables | IV |
| List of Figures | V |
| ABSTRACT | VIII |
| | |
| 제1장 서론 | 1 |
| 1. 연구의 배경 | 1 |
| 2. 이론적 배경 | 4 |
| 1) 요소 (urea) | 4 |
| 2) 효소 (Enzyme) | 5 |
| 가) Urease | 5 |
| 3) 효소 고정화 (Enzyme Immobilization) | 6 |
| 4) 바이오센서 (Biosensor) | 9 |
| 가) Electrochemical biosensor | 9 |
| (1) Amperometric biosensor | 9 |
| 나) Screen printed electrode | 10 |
| 제2장 실험 재료 및 방법 | 11 |
| 1. 재료 및 기기 | 11 |

| | |
|---|----|
| 2. 실험 방법 | 12 |
| 가. 효소 고정화 특성 분석 | 12 |
| 1) Co-N-C membrane 담체 제조 | 12 |
| 2) Co-N-C membrane 효소 고정화 | 12 |
| 3) 효소 활성 측정 방법 | 13 |
| 4) 효소 정량 | 13 |
| 5) 고정화 효소의 최적 pH와 온도에 따른 활성 측정 | 13 |
| 6) 고정화 효소의 안정성 및 재사용성 평가 | 14 |
| 나. Electrochemical performance | 15 |
| 1) Co-N-C/SPE 제조하는 방법 | 15 |
| 가) Scanrate | 15 |
| 나) Cyclic Voltammetry | 15 |
| 다) Amperometric I-t curve | 15 |
| 라) Effect of Mediator | 17 |
| 제3장 실험 결과 및 고찰 | 20 |
| 1. Co-N-C membrane에 효소 고정화 | 20 |
| 가. Free와 고정화 효소의 활성화 측정 | 20 |
| 나. 고정화 효소의 pH와 온도에 따른 활성화 측정 ... | 23 |
| 다. 고정화 효소의 재사용 및 안정성 | 26 |
| 2. Electrochemical Analysis | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 가. Scan rate | 29 |
| 나. Cyclic Voltammetry (CV) | 32 |
| 다. Amperometric I-t curve | 36 |
| 라. Effect of Mediator | 39 |
| 3. Modified Screen Printed ELeCtrode | 43 |
| 가. Scanning Electron Microscope (SEM) 분석 | 43 |
| 나. Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy 분석 | 48 |
| 제4장 결론 | 51 |
| | |
| References | 52 |

List of Tables

| | |
|---|----|
| Table. 1. Urease enzymes immobilized on nanoparticles and their biotechnological applications | 8 |
| Table. 2. Enzyme immobilization with mediator | 17 |
| Table. 3. FT-IR peak and corresponding functional groups of CNT/SPE, Co/SPE and Co-N-C/SPE membrane | 50 |

List of Figures

| | |
|--|-----------|
| Figure. 1. Schematic illustration of procedures of enzyme immobilization onto modified Co-N-C/SPE. | 3 |
| Figure. 2. Chemical structure of urea | 4 |
| Figure. 3. Reaction scheme of lipase catalyzed esterfication | 5 |
| Figure. 4. Method of the enzyme immobilization | 7 |
| Figure. 5. Structure of Screen painted electrode | 10 |
| Figure. 6. Schematic illystration of synthetic process of fabricate membrane as Co-N-C * CNTs are in-situ grown on the 1D microfiber at 900°C under argon flow * | 16 |
| Figure. 7. Structure of mediator and immobilization mediator and Urease to SPE | 17 |
| Figure. 8. Standard curve for the determination of protein concentration | 18 |
| Figure. 9. Standard curve for the determination of ammonia concentration | 19 |
| Figure. 10. Production of Ammonia with Free Urease (operational condition: 1ng/ml enzyme, V=10nl, T=30°C) | 21 |
| Figure. 11. Production of Ammonia Immobilized urease on Co-N-C (operational condition: 1mg/ml of enzyme, V=10ml, T=30°C) | 22 |
| Figure. 12. Effect of pH on the activity of free and immobilized urease | |

| | |
|---|----|
| enzyme | 24 |
| Figure. 13. Effect of Temperature on the activity of free and immobilized urease enzyme | 25 |
| Figure. 14. The activity changes of free and immobilized urease with storage time (Storage condition: pH=7.5, T=4°C) | 27 |
| Figure. 15. Residual activity of immobilized urease after enzyme recycle .. | 28 |
| Figure. 16. Cyclic voltammograms of (A) Urease/GA/SPE according to the scan rate range of 50 mV/s to 500 mV/s. (B) Calibration curve | 30 |
| Figure. 17. Cyclic voltammograms of (A) Urease/GA/Co-N-C/SPE according to the scan rate range of 50 mV/s to 500 mV/s. (B) Calibration curve | 31 |
| Figure. 18. Cyclic voltammograms of (A) Urease/GA/SPE scan rate 300 mV/s. (B) Calibration curve | 33 |
| Figure. 19. Cyclic voltammograms of (A) Urease/GA/Co/SPE scan rate 300 mV/s. (B) Calibration curve | 34 |
| Figure. 20. Cyclic voltammograms of (A) Urease/GA/Co-N-C/SPE scan rate 300 mV/s. (B) Calibration curve | 35 |
| Figure. 21. Amperometric I-t curve of (A) Urease/GA/SPE (-1.175V). (B) Calibration curve | 37 |
| Figure. 22. Amperometric I-t curve of (A) Urease/GA/Co-N-C/SPE (-1.175V). (B) Calibration curve | 38 |
| Figure. 23. Cyclic Voltammetry of (A) Urease/MG/Co-N-C/Spe (B) | |

Urease/TB/Co-N-C/SPE (scanrate: 300mV/s, 0.1mM Urea) 40

Figure. 24. Cyclic Voltammetry of Total (scan rate: 300mV/s, 0.1mM Urea) 41

Figure. 25. Cyclic Voltammetry calibration curve of Total (scan rate: 300mV/s, 0.1mM Urea) 42

Figure. 26. SEM images of (A)(B) Co-N-C membrane, (C)(D) Urease immobilization after Co-N-C membranes 44

Figure. 27. SEM images of (A),(B),(C) CNT/SPE, (D),(E) modified after CNT/SPE with Co-N-C membranes, (G),(H), Urease immobilization after Co-N-C/CNT/SPE 46

Figure. 28. SEM images (A),(B),(C) CNT/SPE, (D),(E),(F) modified after CNT/SPE with Cobalt hydroxide, (G),(H),(I) Urease immobilization after Co/CNT/SPE 47

Figure. 29. FT-IR spectra of (A) CNT/SPE (B) Co/SPE (C) Co-N-C/SPE membrane 49

ABSTRACT

우레아제 효소 고정화를 위한 스크린프린팅 전극 기반 전기화학 바이오센서 개발

Erdenedalai Otgontuya

Advisor : Prof. Lee, Jung
Heon, Ph.D.

Department of Chemical
Engineering,

Graduate School of
Chosun University

The determination and evaluation of urea levels aid in the diagnosis of kidney diseases. In this study, Cobalt-Nitrogen-Carbon (Co-N-C) synthesized by chemical oxidative polymerization was used as an immobilization support for jack bean urease. Cobalt-Nitrogen-Carbon (Co-N-C) catalytic membrane were successfully prepared and used as carriers for the immobilization of urease.

Urease was immobilized on the surface of catalytic membrane by Enzyme adsorption precipitation crosslink (EAPC) methods. Urease immobilization activity were measured using indophenol method. The effect of pH and temperature on urease activity were studied. The result showed that the optimum temperature of immobilized urease was 60°C and optimum pH was 8.

The urea biosensor was with an ammonium selective electrode along with the urease immobilized nanoparticles. Synthesized nanoparticles were characterized by SEM and attachment of the enzyme onto the nanoparticles was evaluated by FT-IR analysis.

Amperometric response of the biosensor was examined as a function of the different concentrations of urea solution, and linear concentration range of urea was demonstrated in the range of 0.01 mM- 10 mM. The proposed enzymatic urea sensor is highly selective even in the presence of common onterferents such as glucose and organic acids. The developed urea biosensor has good properties for urea analysis in urine samples and can archieve a significant improvement for its simple and cost-effective of electrodes.

제1장 서론

1. 연구의 배경

효소는 모든 틈새 시장에서 화학 반응을 촉매하는 특이성이 높은 생체 촉매이다. 생촉매는 생산 용이성, 기질 특이성 및 녹색 화학으로 인해 다양한 분야에서 널리 사용되고 있다. 그러나 이러한 생체 유래 촉매의 대규모 상업화를 위해서는 재사용 요소가 경제성을 높이기 위해 필수적이다. 모든 생화학 반응 동안 구조적 안정성을 유지하는 것은 매우 어렵다. 따라서 효소 고정화는 생명공학 과정에서 효소를 보다 실용적이고 비용 효율적으로 활용하는 데 사용되는 방법 중 하나이다. [1-3]

효소 고정화는 수년 동안 관심의 대상이었다. 흡착, 공유 결합 및 포획을 포함한 다양한 방법이 개발되었다. 일반적으로 고정된 효소는 free 효소보다 낮은 촉매 활성을 나타내지만 더 안정적이고 재사용 가능하며 결과적으로 많은 응용 분야에서 비용이 적게 든다. Transducer 표면에 효소를 고정하는 것은 바이오센서 설계에서 필수적이고 중요한 단계이다. [4-9]

세라믹 모노 또는 멀티채널 멤브레인, 나노 섬유 멤브레인, 금속 나노 입자, 탄소 나노튜브 및 메조포러스 재료, 자기 가교 효소 응집체(M-CLEA)와 같은 고정화 지원 재료는 효소의 고정화를 성공적으로 입증했다. 다양한 나노물질 중에서 다중벽 탄소 나노 튜브(MWCNT)는 기계적, 전기적, 열적, 생체적합성이 뛰어난 특성을 가지고 있어 강력한 복합 재료를 제조하기 위한 최고의 보강 후보가 되기 때문에 많은 관심을 받았다. 효소를 고정화 할 수 있는 나노 복합체는 여러 여과 기술의 사용을 결정하는 마이크로미터에서 나노미터까지의 반경을 가지고 있고, 박막에 다량의 생물 활성 화합물을 보유 할 수 있는 우수한 지지체 이다. 나노 복합체(NC) 합성을 위한 충전제로서 코발트(Co)는 우수한 생체적합성, 전기 및 열적 특성 외에도 자기장 하에서 반응 혼합물로부터 NC를 선택적으로 분리하기 때문에 중요한 잠재력을 보유한다. [10-13]

바이오센서는 특정 표적 분석물이 있는 상태에서 시료를 분석하는 기능을 하는 분석 장치이다. 바이오센서는 의학, 식품 품질 관리, 환경 모니터링 및 연구에서 더 실용적이고 유용해지고 있다. 그 중에서도 건강관리, 특히 환자 감시용으로 가장 많

이 사용되고 있다. 원칙적으로 생물학적 시스템과 특이적으로 상호작용하는 거의 모든 표적 분자 또는 결합체에 대한 개별 분석 요구 사항에 맞게 맞춤화할 수 있다. 바이오센서는 분석물을 검출하기 위해 변환기 근처에 고정된 생물학적 분자를(효소) 사용하고, 궁극적으로 상호 작용에 의해 생성된 화학 신호를 측정 가능한 반응(대부분 전자 신호)으로 변환한다. 바이오센서가 기존 측정기술보다 우수한 점은 좁은 것에서 부터 넓은 것에 이르는 광범위한 analyte 파장영역을 실시간으로 감지할 수 있어서 분산방식의 애널라이트 실험을 가능하게 해준다. [14-19]

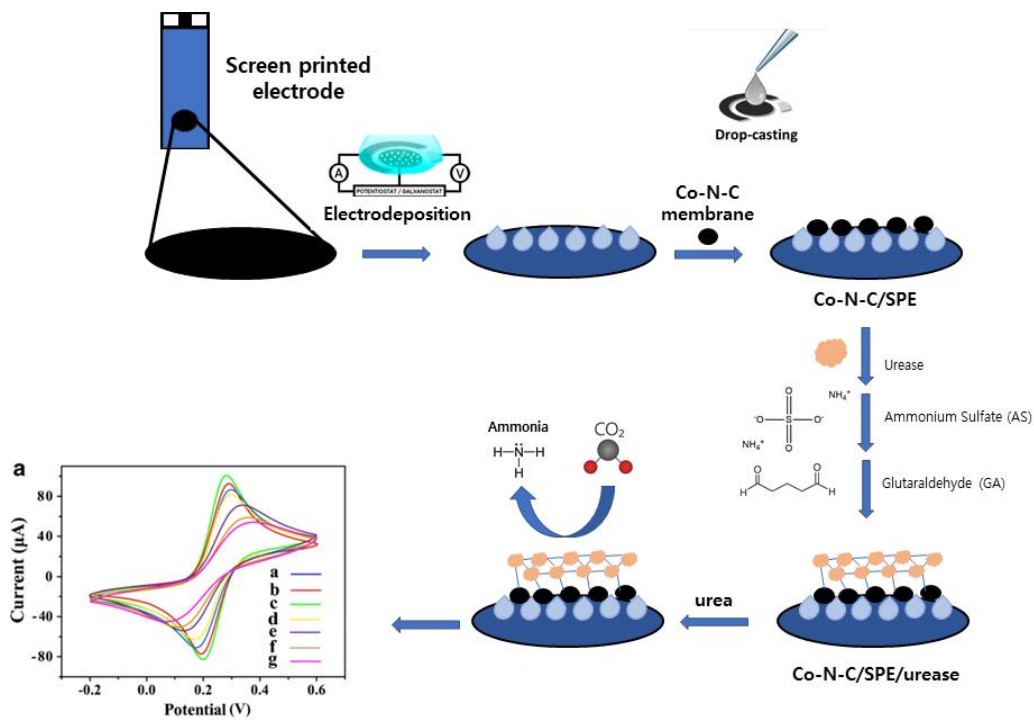


Figure. 1. Schematic illustration of procedures of enzyme immobilization onto modified-Co-N-C/SPE

2. 이론적 배경

1) 요소 (Urea)

인간의 질병을 통제하여 삶의 질을 향상 시키고 지표수의 오염을 평가하기 위해서는 요소의 실시간 모니터링을 위한 저렴하고 안정적인 도구(바이오센서)의 확보가 매우 중요하다. 요소를 포함하는 과량의 비료는 토양에 남아 있으며 강수 및 관개 중에 지표수를 오염시킨다. 인간 혈청에서 요소의 정상 범위는 2.5-7.5mM이다. 혈청 내 높은 수준의 요소는 신부전, 쇼크, 탈수, 화상, 요로 폐쇄 및 위장관 출혈로 인한 것일 수 있다. 신염 증후군, 간부전, 저단백 식이, 고탄수화물 식이는 낮은 농도의 요소를 유발한다. [20-21]

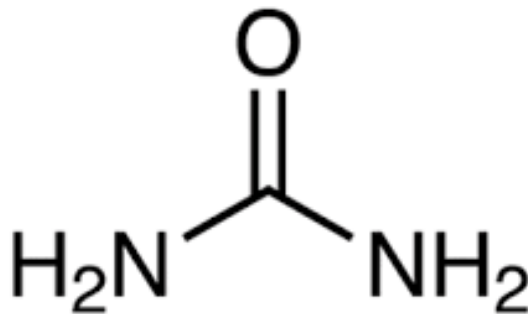


Figure. 2. Chemical structure of urea

2) 효소 (Enzyme)

효소는 생체 적합성, 생분해성이며 저렴하고 재생 가능한 자원으로 제조된다. 귀금속 촉매와 달리 효소 가격은 시간이 지남에 따라 합리적으로 안정적이며 미량의 촉매를 제거하기 위한 값비싼 제품 정제 단계가 필요하지 않다. 효소 반응은 높은 속도와 선택성을 제공하는 생리학적 pH의 물에서 주변 온도와 압력에 가깝게 수행된다. 또한, 작용기 보호 또는 활성화가 필요하지 않으며 공정은 보다 원가 및 단계적 경제적이어서 기존 공정보다 폐기물을 적게 생성하고 에너지를 덜 소비한다. 요컨대, 생체 촉매 공정은 화학 물질 제조를 위한 기존 공정보다 비용 효율적이고 환경 발자국이 적으며 지속 가능하다. [22-23]

가) Urease

Urease는 요소 가수분해를 위한 매우 강력한 촉매 단백질이다. 요소분해효소는 요소를 CO₂와 NH₃로 전환시킨다. Jack bean의 요소 분해효소는 결정화되는 최초의 효소이다. 요소는 주요 독성 생화학적 작용제이며 이 폐기물을 제거하는 것은 신장 환자에게 중요한 관심사이다. 효소는 정상적인 질소 관리에 중요한 역할을 하는 여러 박테리아, 균류 및 식물에 존재한다. 생명 공학에서 요소 분해 효소의 사용은 혈액, 소변, 맥주, 자연수 및 환경 폐수의 요소 함량을 분석하는 것이다. 수용액에서 요소를 추출하는 효율적인 방법은 효과적인 흡착제가 없기 때문에 요소 제거를 위해 결합된 요소 분해효소를 사용하는 것이다. 요소 분해효소 활성은 광범위한 미생물과 식물에서 발견되며, 그 중 일부는 요소를 대량으로 생산할 수 있다. 요소 분해효소의 고정된 형태는 인공 신장에서의 혈액 해독, 식품 산업의 음료 및 식품에서 요소 제거, 농업의 폐수 처리에서 요소 함량 감소와 같은 광범위한 응용을 발견했다. [24-26]

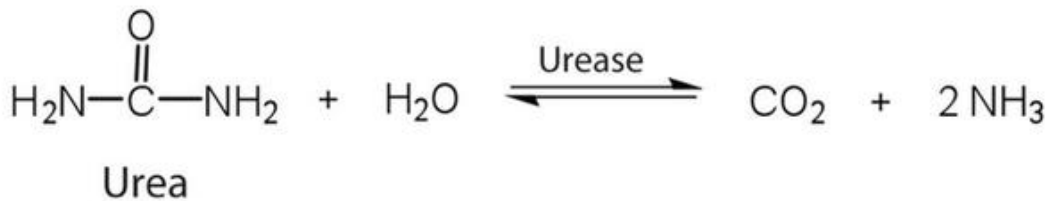


Figure. 2. Reaction scheme of lipase catalyzed esterification

3) 효소 고정화 (Enzyme Immobilization)

효소 고정화는 오랫동안 free 효소와 비교할 수 없는 저장 안정성 및 재사용성 등의 장점으로 인해 생명 공학 및 효소 기반 생물 의학 산업 분야에서 가장 중요한 기술 중 하나로 간주되어 왔다. 효소 고정은 생체 촉매의 물리적 및 효소 안정성을 주요 기능으로 최대화하는 특수 제제인 담체의 물리화학적 특성을 결합하는 것을 의미한다. 물리적(흡착, 포획) 및 화학적(공유 결합, 가교) 방법을 포함하여 효소를 고정화하는 많은 기술이 있지만 업계는 여전히 경제적이고 직접적인 기술을 선택한다. 물리적(흡착 또는 포획) 고정 및 화학적(공유 결합 및 상호 연결)이 가장 널리 사용되는 접근 방식이다 [27]. 어떤 경우에는 용해성 효소가 연속 공정에서 재사용되는 안정적인 불용성 제품에 고정되어 반응 후 생화학적 결과에 상당한 손실 없이 효소를 경제적으로 회수할 수 있다. 온도 변동 및 유기 용매에 직면하여 고정화는 엄청난 안정성을 제공한다. 다중 및 다중 장치 연결이 있는 올바르게 기능화된 커넥터 지지대의 공유 효소 부착은 효소의 고정된 구조에 강성을 제공하여 점차적으로 효소의 안정성을 향상시킨다. 순차 및 호환 가능한 효소 변형 접근 방식 변형은 단백질 공학 및 고정화 전략이다. 가용성 효소는 일반적으로 내구성 있는 사용을 위해 포획되어야 한다. 또한 안정성, 활성, 반응 억제 및 비천연 기질에 대한 선택성과 같은 기타 필수 특성을 강화해야 한다. 고정은 이러한 목표를 달성하기 위해 가장 선호되는 진행 방식이다. [28-34]

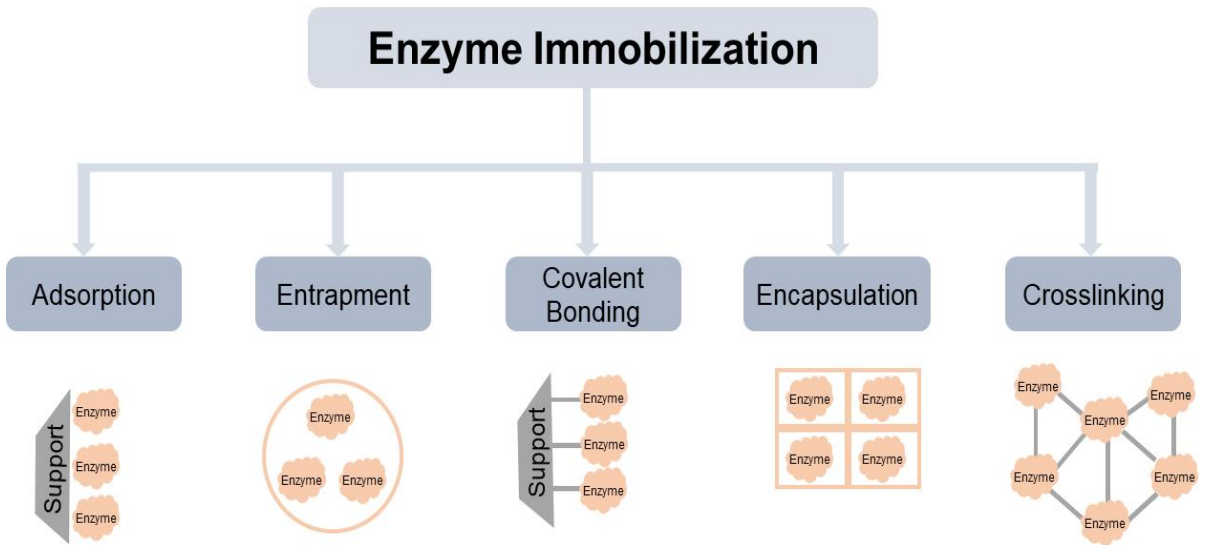


Figure. 4. Method of enzyme immobilization

Table 1. Urease Enzyme Immobilized on nanoparticles and their biotechnological applications [35-36]

| Nanomaterial | Immobilized technique | Application | Ref. |
|--|---------------------------|--------------------|------|
| Graphene oxide | | Blood purification | 16 |
| Nanoparticles (NPs) aggregates | Cross linkage | Biosensor | 17 |
| Nanoceria | Adsorption | | 18 |
| Nickel ferrite (NiFe ₂ O ₄) nanoparticles | Adsorption | Biosensor | 19 |
| Glutathione-capped gold nanoparticles | Covalent Bonding | Biosensor | 20 |
| Magenite nanoparticles | Adsorption and entrapment | | 21 |
| Polypyrrole (Ppy) and carbon nanotubes | | Biosensor | 22 |
| Fullerene | Entrapment | Biosensor | 23 |
| Magenite nanoparticles | Carbodiimide reaction | | 24 |
| Zinc oxide | | Biosensor | 25 |
| Rhodium nanoparticles | | Biosensor | 26 |
| Gold nanoparticles | Covalent bonding | Biosensor | 27 |
| Nanoporous alumnia membranes | | Biosensor | 28 |

4) 바이오센서

바이오센서는 반응에서 분석 물질의 농도에 비례하는 신호를 생성하여 생물학적 또는 화학적 반응을 측정하는 장치이다. 바이오센서는 질병 모니터링, 약물 발견 및 오염 물질, 질병을 유발하는 미생물 및 체액(혈액, 소변, 타액, 땀)의 질병 지표인 마커 감지와 같은 응용 분야에 사용된다. 바이오센서는 일반적으로 세 가지 구성 요소로 구성된다. 생물학적 인식 요소, 변환기 및 신호 처리 시스템 [37]. 효소 기반 바이오센서에서 효소는 인식 요소로 활용되며, 효소 활성을 유지하기 위해 transducer 표면의 지지체 매트릭스 위/내에서 고정된다. 효소-기질 상호작용의 높은 특이성 및 생체 촉매의 높은 전환율과 같은 효소 사용의 이점은 효소 기반 바이오센서를 가장 광범위하게 연구된 영역 중 하나로 만들었다. 효소 기반 바이오 센서의 감지 원리는 양성자 농도, 가스 방출 또는 흡수, 발광, 흡수 또는 반사, 열 방출 등과 같은 변화를 측정하여 특정 분석 물질의 존재를 감지하는 것이다. [38-42]

가) Electrochemical biosensor

전기화학은 화학반응에 의한 전기의 생성 및 전기에 의한 화학반응이 전극계면에서 일어나는 전하의 이동과 같은 현상을 연구하는 것을 말한다. 전기화학적 바이오센서는 고정된 생체 분자와 전기 활성 분석물 사이의 이온/전자생성 및 감소하는 화학 반응을 전류, 전위, 전하 측정 및 임피던스와 같이 분석되는 전기화학적으로 측정 가능한 신호를 생성하여 전기화학검출기로 분석이 가능하게 한다. [43-45]

(1) Amperometric biosensor

효소 기반 전류 측정 바이오센서에서 측정된 신호는 전류이며, 이는 작동 전극에서 전기 활성 종의 산화 또는 환원에 의해 생성된다. 작업전극의 표면에서 발생하는 전류의 크기는 기질을 첨가할 때 시험용액에 존재하는 분석물질의 농도에 비례하며 두 전극 사이에 고정전위가 인가될 때 관찰된다. 효소 기반 전류 측정 바이오센서는 소형화의 용이성, 견고성 및 다소 복잡한 매트릭스의 작은 샘플 부피로 작동할 수 있는 능력과 같은 이점으로 인해 널리 연구되었다. [46-47]

나) Screen printed electrode

Screen printed electrode (SPE)는 저렴한 비용, 대량 생산, 일회용 및 낮은 배경 전류와 같은 장점을 가진 일회용 전기화학 전극으로, 지루한 청소 절차 및 메모리 영향과 같은 탄소 paste 전극 및 유리 탄소 전극의 여러 단점을 개선할 수 있다. Screen printed electrode는 인쇄 전극은 재현성 및 감도가 낮다는 단점으로 인해 실용화에 한계가 있지만 표면을 변형할 수 있어 다양한 감지 재료를 검출 성능 측면에서 향상시킬 수 있다. Screen Printed electrode는 환경, 의료, 식품 및 바이오센소 개발 분야에서 많이 이용되고 있다. Ceramic 기판 위에 Electrochemical electro system과 동일하게 working, reference, counter 전극이 모두 인쇄되어 있어 이용하기 편하며, 사용 목적에 따라 인쇄된 전극의 수량이나 종류가 다양하게 공급되고 있다. [48-50]

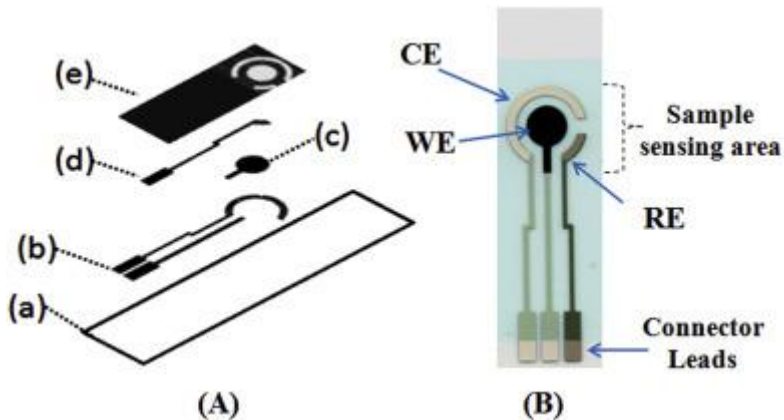


Figure. 5. Structure of Screen printed electrode

제2장 실험 재료 및 방법

1. 재료 및 기기

본 연구에서는 Urease (Sigma, from Jack beans)를 고정화 효소를 사용하였다. Urease 활성화 측정을 위한 기질로는 Urea (Amersham) 사용하였고 활성 측정 시 사용된 시약은 Sodium hypochlorite (Daejong Chemical), Phenol (Junsei Chemical)를 사용하였다. 효소 고정화한 전극 (Direct Sense)을 CNT, MC를 사용하였다. 또한 본 연구에서는 Ammonia Sulfate (Duksan Pure Chemical) Tris-HCL(Sigma, USA), Glutaraldehyde (25%, Sigma) Sodium Hydroxide (NaOH, Junsei Chemical), HCl (Duksan)등 시약을 사용하였다. 단백질 정량 분석을 위한 BSA(Sigma, USA), Bradford (Sigma, USA),를 사용하였다.

사용한 기기로는 반응 온도를 유지하기 위해 Thermo mixer(Fine mould precisionznd.co), 효소 활성 측정하기 위해 UV/Visible-spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham), pH을 맞추기 위해 pH 미터 (Sanxin) 사용하였고 또한 전기화학 분석을 하기 위한 잔치는 CHI 600 (CH Instrument)을 사용하였다.

2. 실험 방법

가. 효소 고정화 특성 분석

1) Co-N-C membrane 담체 제조

Cobalt(II) Chloride hexahydrate 1.5g 및 nitrilotriacetic acid 1.2g을 isopropyl 20ml를 함유하는 수용액 80ml에 녹이고 25°C에서 균일하게 자기 교반하여 녹인다. 그 후, 균일한 용액을 테프론 라이닝(Teflon-lined) 오토클레이브에 넣고 200°C의 오븐에서 24시간 동안 반응시킨다. 실온에서 냉각시킨 후, 제조된 생성물을 메탄올과 물로 여러 번 세척한다(Co-M). 준비된 Co-Membrane은 어닐링 과정을 거쳐 재구성된다. 어닐링 과정은 900°C에서 6시간 동안 5°C/min의 램핑 레이트(ramping rate)로 수행된다. 자연적으로 실온으로 냉각시킨 후, 흑색 막을 효소 고정화로 사용하였다. [51] (Figure 5)

2) Co-N-C membrane 효소 고정화

Co-N-C membrane을 Tube에 넣어 준 후에 Urease (1mg/ml) 효소를 1ml 넣어 주고 4°C에서 30분 반응시켰다. 30분 지난 후에 Ammonium sulfate (AS)을 0.5g을 넣어 주고 다시 30분 반응시켰다. 25% glutaraldehyde (GA) linker 용액을 40 ul 넣은 후 17시간 동안 4°C에서 반응 시켰다. 17시간 반응 시킨 후에 원심분리기 이용해서 상등액을 버리고 반응하지 않은 용액을 제거하기 위해 0.1M Tris-HCl (pH 7.9)를 넣어서 30분 4°C에서 반응 시켰다. 반응 후 0.1M Potassium phosphate buffer (pH 7.0)을 이용해서 5회 이상 세척하여 이용하였다.

3) 효소 활성 측정 방법

Urease 효소의 기질인 Urea를 사용하여 암모니아와 이산화탄소로 가수분해 반응을 통하여 측정하였다. 이 중 인도페놀 방법을 이용하여 암모니아 농도를 측정을 통해 효소 활성을 측정하였다 [49]. 암모니아 생성을 UV/Visible-spectrophotometer를 사용하여 640nm에서 흡광도를 측정하였다. 0.1M Urea를 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 녹였다. Tube에 0.1M Urea를 100배 희석한 다음에 free와 고정화 효소를 각각 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30분 시간마다 효소 활성화를 측정하였다. Ammonia Standard curve를 농도별로 0.1mM Ammonia sulfate을 이용하여 작성하였다. (Figure 6)

4) 효소 정량

효소 고정화 후 남아 있는 정량을 측정하기 위해 Bradford 시약을 이용하였다. 측정할 때 효소 샘플 50uL를 1000uL Bradford 시약에 넣고 Vortex Mixer로 혼합하여 5분동안 반응 시켰다. 반응 후 UV/Visible-spectrophotometer를 사용하여 595nm에서 흡광도를 측정하였다 [52]. 단백질 Standard curve는 Bovine serum albumin (BSA)을 0-2mg 농도 별로 제조하여 측정하였다. (Figure 7)

5) 고정화 효소의 최적 pH와 온도의 따른 활성 측정

Free와 고정화 효소의 온도에 따른 활성을 측정하기 위해 Thermo Mixer를 이용하여 20°C에서 70°C까지 온도를 변화를 시켜 활성화를 측정하였다. 효소 활성을 위해 같이 인도페놀 방법을 이용하여 90분 동안 반응시켜서 측정하였다.

Urease 효소의 pH를 따른 활성을 하기 위해 pH를 4-9범위의 buffer를 제조하여 30°C에서 90분 동안 반응시켜 실험을 진행하였다.

6) 고정화 효소의 저장 안정성 및 재사용성 평가

고정화된 효소의 안정성과 재사용성을 평가하기 위해 1mg/ml의 urease가 고정된 Co-N-C를 효소 활성에 대해 실험 진행하였다. 고정화 된 효소의 재사용성은 동일한 요소 농도로 더 많은 주기 동안 동일한 샘플을 사용하여 확인하였다.

고정화 효소의 안정성을 확인하기 위해 효소 용액을 4°C, 상온에서 건조한 상태로 보관하고 7일마다 효소 활성을 측정하여 효소의 보관 안정성을 조사하였다. 효소 보관 용액으로는 0.1M potassium phosphate buffer를 이용하였다. 효소 활성화 방법은 동일하게 인도페놀 방법을 사용하였다.

나. Electrochemical performance

1) Co-N-C/SPE 제조하는 방법

Co-N-C membrane은 10 μ L 수용액을 첨가하여 작업 전극(working electrode)의 표면에 조립되었다. Co-N-C membrane의 수용액을 1.0×10^{-6} M Triton X-100을 함유하는 membrane의 0.5 중량 % 수용액을 제조하였다. 수용액을 사용하기 전에 5분 동안 sonication bath에 넣었다. 그런 다음 동일한 부피의 수용액을 전극 위에 증착했다. 마지막으로 4시간 동안 100°C의 오븐에 넣고 건조 시켰다. 4 시간 후에 증류수로 세척하여 상온에 완전히 건조 시켰다. [53]

가) Scanrate

고정화된 효소 SPE의 scan rate에 따른 전기화학적 분석을 위해 고정농도 40 μ l SPE에 올리고 scan rate 범위를 50 mV/s에서 500 mV/s까지 변화를 주면서 이에 따른 current값을 측정하였으며 적용된 potential 범위는 2.5 V에서 -2.5 V에서 측정하였다.

나) Cyclic Voltammetry

고정화된 효소 SPE의 전기화학적 분석 전에 미반응 linker를 제거해준 뒤 사용하였다. CV측정은 기질volume을 SPE의 세 전극이 기질용액과 반응시킬 수 있는 40 μ l로 정하여 세 전극위에 40 μ l을 올려 측정을 하였다. Scan rate은 300 mV/s로 2.5 V에서 -2.5 V범위에서 측정하였다.

다) Amperometric I-t curve

Amperometric I-t curve는 CV을 통해 얻어진 산화 potential을 고정으로 가해주면서 blank은 200초 기질은 농도에 따라서 100초 단위로 농도를 높여가며 측정하였다.

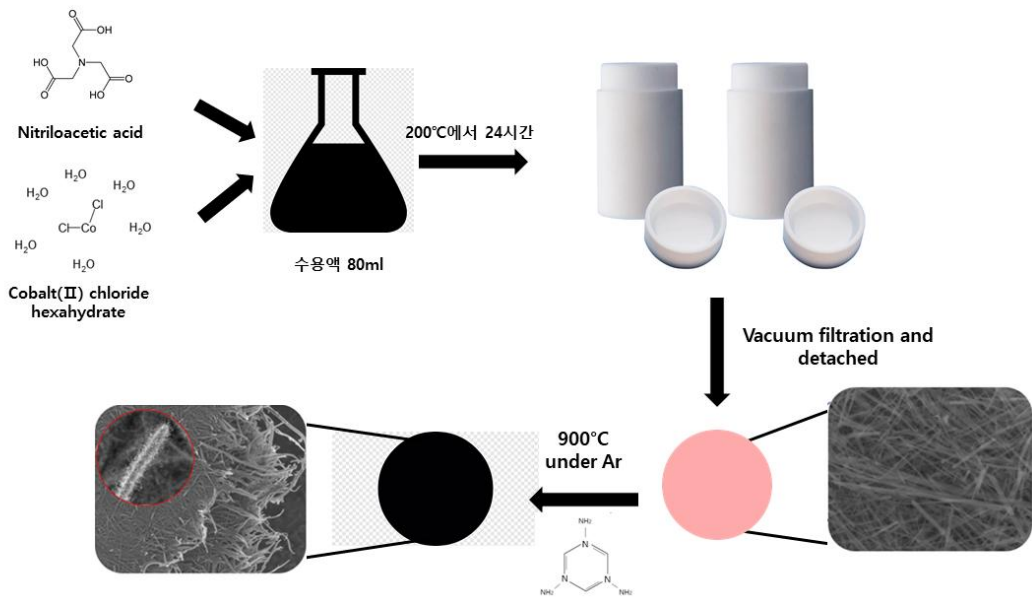


Figure 6. Schematic illustration of synthetic process of fabricate membrane as Co-N-C * CNTs are *in-situ* grown on the 1D microfiber at 900°C under argon flow

*

라) Effect of Mediator

Table 2.에 있는 각 mediator를 각 solvent 1 ml에 정해진 양만큼 녹인 뒤 Glutaraldehyde (GA) 40 μ l를 첨가하여 1시간동안 invert해준다. Urease 15 μ l와 AS 1 mg를 넣어 효소를 응집시켜 주고 linker 2 μ l를 넣어 반응시킨다. Solvent에 녹인 mediator혼합용액을 5 μ l를 넣어 반응시킨 뒤 working electrode에 혼합용액을 올려주고 4°C에서 반응시킨다.

Table 2. Enzyme immobilization with mediator.

| Solvent | Mediator | Mass (mg) |
|----------|----------------------|-----------|
| Methanol | Toluidine Blue (TB) | 30 |
| DW | Malachite Green (MG) | 30 |

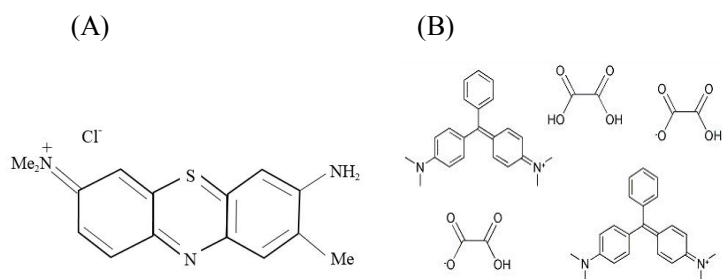


Figure. 7. Structure of mediator and immobilization mediator and Urease to SPE.

(A) TB (B) MG

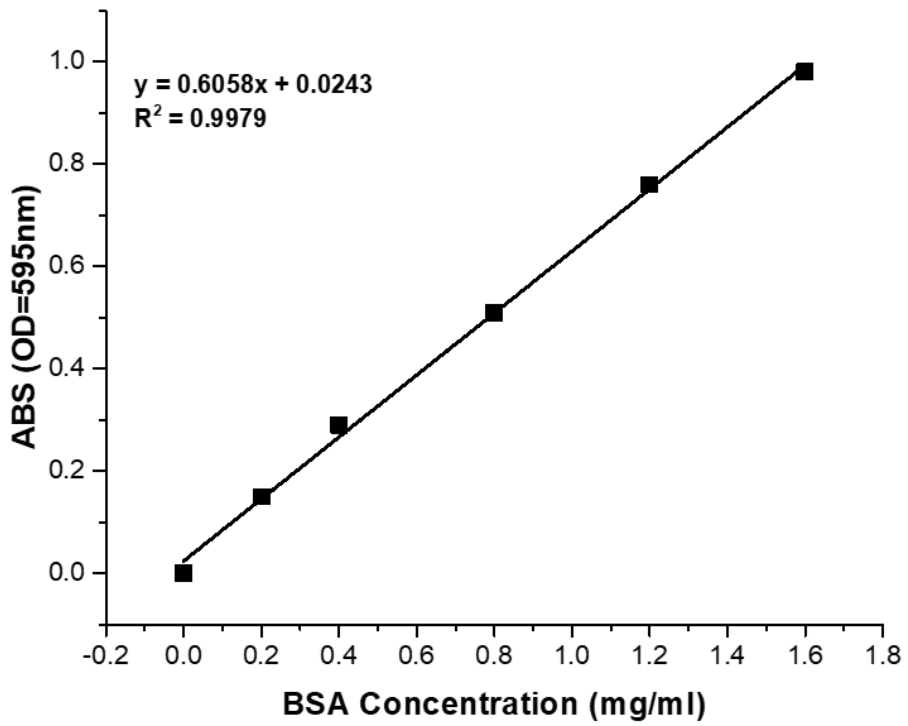


Figure. 8. Standard curve for the determination of protein concentration

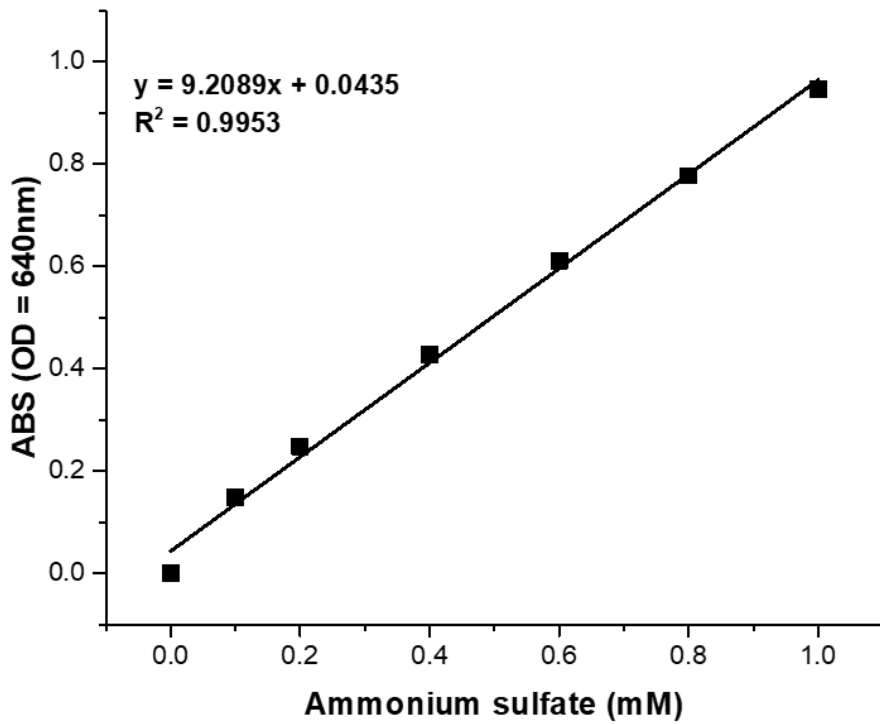


Figure. 9. Standard curve for the determination of ammonia concentration

제3장 실험 결과 및 고찰

1. Co-N-C membrane에 효소 고정화

가. Free와 고정화 된 효소의 활성화 측정

Urease 효소를 Enzyme Adsorption Precipitation Crosslinking(EAPC) 고정화 방법을 이용해서 암모니아의 생산을 관찰하여 활성화를 측정하였다. EAPC 방법은 황산암모늄 (AS) 침전과 crosslinking 용액에 의해서 효소가 고정화 하는 것이다. Crosslinking 용액으로 GA를 사용하였다. Figure 8은 free와 고정화 된 효소의 각각 시간에 따른 측정한 활성화의 변화를 보여준다. Figure 8은 1 mg/ml 농도의 free urease 암모니아의 생산 결과로 0분에서 30분까지 꾸준히 증가한 것으로 나타났다. Figure 9는 고정화 된 효소의 암모니아 생산의 0분일 때 free urease와 차이가 크지 않지만 암모니아가 0.15mM 농도 생산되는데 free urease은 20분 걸렸고 고정화 된 효소는 5분의 걸린 것으로 보여준다. 결과는 유리 효소와 비교하여 고정화로 인한 활성이 손실하지 않은 것을 보여준다.

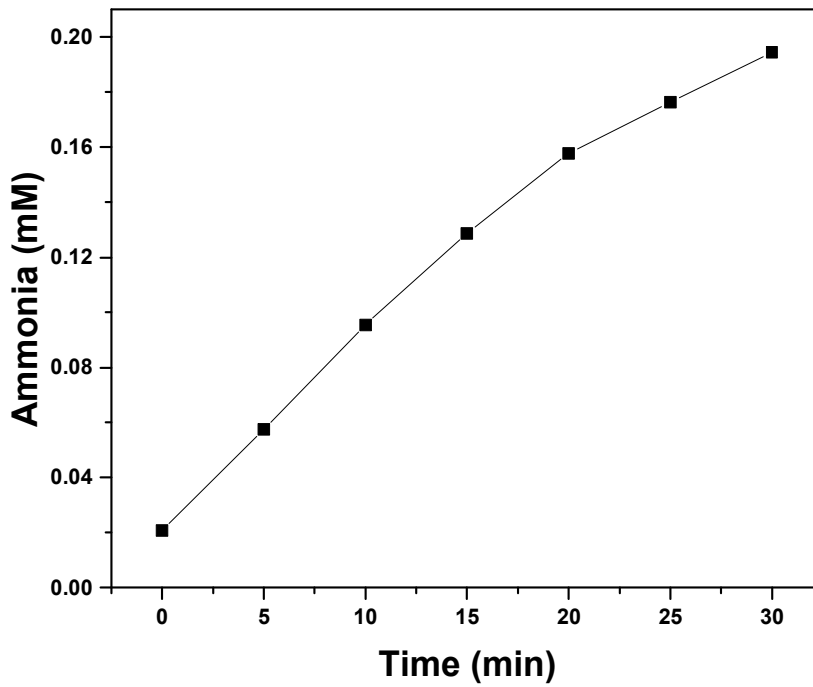


Figure. 10. Production of Ammonia with Free urease (operational condition: 1mg/ml of enzyme, V=10nl, T=30°C)

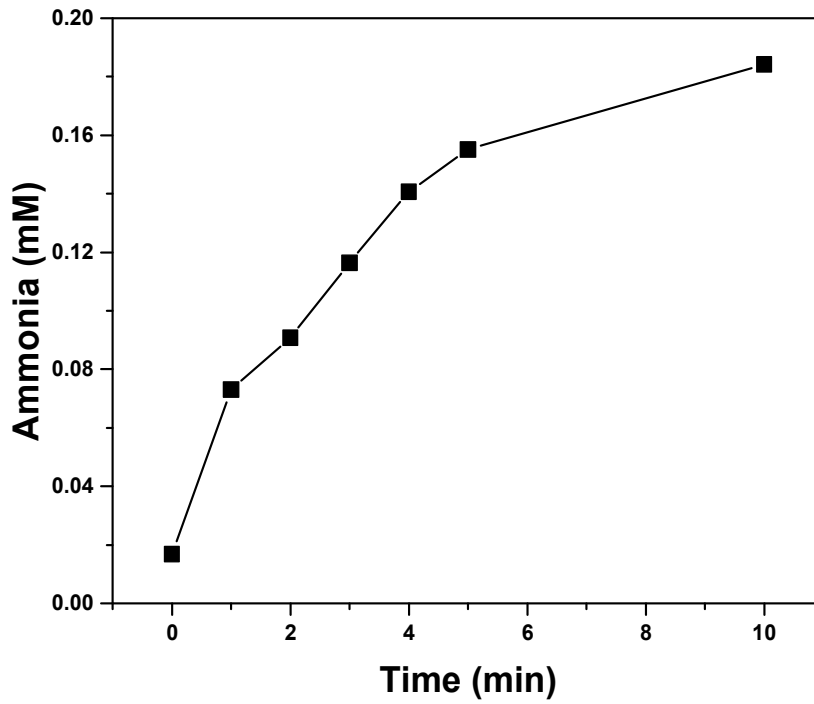


Figure. 11. Production of Ammonia with Immobilized urease on Co-N-C (operational condition: 1mg/ml of enzyme, V=10nl, T=30°C)

F

나. 고정화 효소의 pH와 온도에 따른 활성화 측정

각 효소는 최대 활성이 측정되는 최적의 pH 값을 특징으로 한다. 고정화 효소의 pH 따른 활성화 변화를 측정하기 위해 pH에 따른 buffer에 pH 4-9까지의 범위 내에서 반응을 진행시킨 후, pH 변화에 따른 활성 변화를 관찰하였다. 가장 높은 활성 값을 100%로 하여 다른 활성을 측정하였다. Free urease와 고정화 된 효소의 최적 pH 값은 각각 pH 7.0과 pH 8.0에서 매우 유사했다. 고정화 된 효소는 Figure 10와 같이 담체에 효소가 고정화 되면서 효소의 미세 환경에 의해 변형될 수 있기 때문에 다른 pH 범위에 free urease보다 활성이 높게 나타냈다. 또한 최적 pH에 고정화 하였을 때 염기성 쪽으로 이동한 것을 확인할 수 있다. 최적 pH의 이러한 이동은 고정화 된 효소가 환경 산성도에 적응한 데 기인한 것이다. 이는 고정화 된 이관능성 산 urease가 pH에 대한 저항성이 더 우수하고 광범위한 pH에서 추가 적용에 더 도움이 됨을 나타냈다. [54,55]

온도 변화에 따른 고정화 urease을 측정하기 위한 Figure 11에 나타낸 바와 같이, free 최적 온도는 20-70°C 범위였다. Free urease의 경우 40°C에서 가장 높은 활성을 보였고 고정화 된 urease 최적의 온도는 60°C로 free urease의 활성에 필요한 온도보다 높았다. 결과는 고정화 된 효소의 생체 변형이 상당한 양의 열을 흡수하고 더 높은 온도에서 변성으로부터 효소를 보호하는 지지체의 존재로 인해 free urease보다 더 높은 온도에서 안정적임을 보여준다. 따라서 고정화 된 효소는 어떤 온도에서도 free urease보다 더 유용하다. [56]

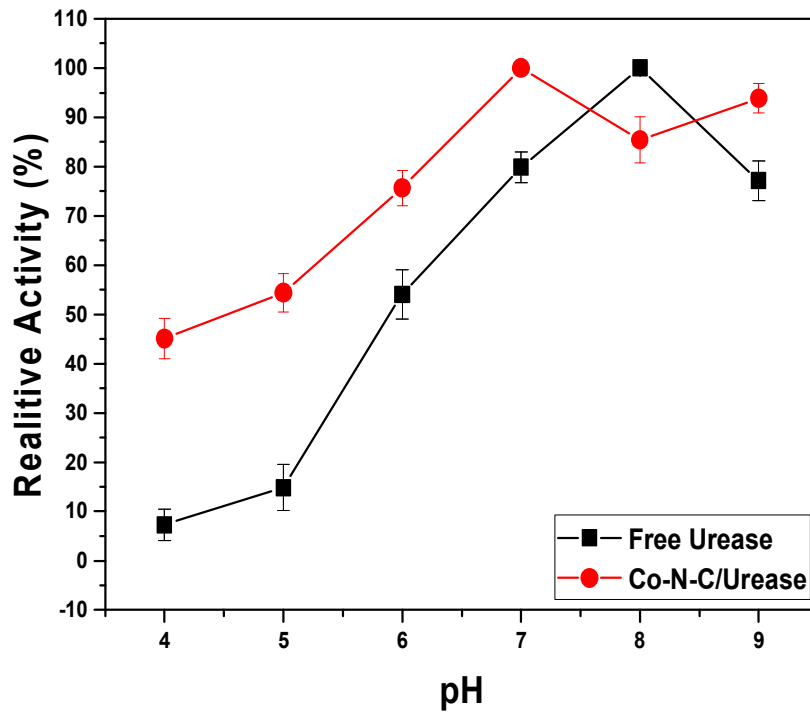


Figure. 12. Effect of pH on the activity of free and immobilized urease enzyme

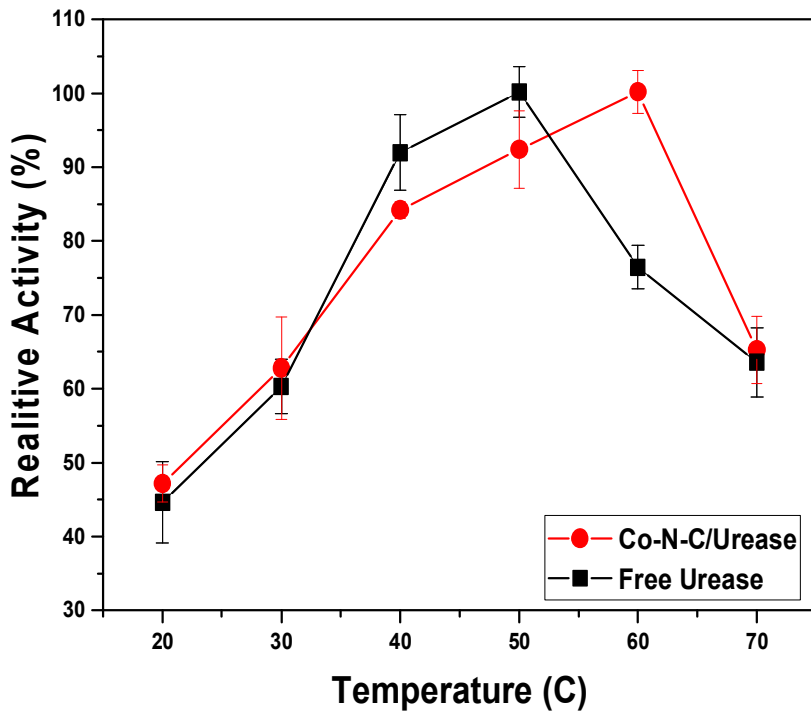


Figure. 13. Effect of Temperature on the activity of free and immobilized urease enzyme

다. 고정화 효소의 재사용 및 안정성

Free urease의 열악한 저장 안정성은 실제 적용을 제한하는 또 다른 난해한 문제이다. 고정화 된 urease는 free urease보다 더 나은 저장 안정성을 갖는 것으로 알려져 있다. [35] 이 연구에서 urease 효소의 저장 안정성을 테스트하기 위해 고정화 된 urease와 free urease를 4°C에서 다른 일수 동안 보관하여 실험을 진행하였다. Figure 12에서 볼 수 있듯이 Co-N-C membrane과 free urease의 보관 안정성은 7일 동안 보관한 후에도 100%를 유지한 것으로 나타났다. Free urease의 경우 15일 후에 저장 안정성이 59%로 감소하고 30일 동안 저장하면 18%로 추가로 감소하였다. Urease 고정화 시료(Co-N-C membrane)의 경우 각각 15일 및 30일 보관 후 89% 및 81% 값으로 보관 안정성이 훨씬 높은 것을 확인하였다. 따라서 고정화 된 urease의 저장 안정성은 free urease의 저장 안정성에 비해 향상된다.

Urease 효소는 요소를 효과적으로 제거하는 것으로 간주되지만 free urease는 분리 및 재사용할 수 없으므로 비용이 많이 들고 혈액에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 따라서 고정화된 urease의 재사용성은 실제 적용에서 매우 중요하다. Co-N-C membrane에 고정화 된 효소의 재사용을 측정하기 위해 16회 재사용하여 남아 있는 효소의 활성을 측정하였다. Co-N-C membrane의 경우 10회 연속 사용 후 87.3% 활성, 16회 사용 후 68.1% 활성으로 나타났다. 이는 Co-N-C membrane 표면에 효소가 더 안정적으로 담체와 결합되어 좋은 안정성을 보여주었다.

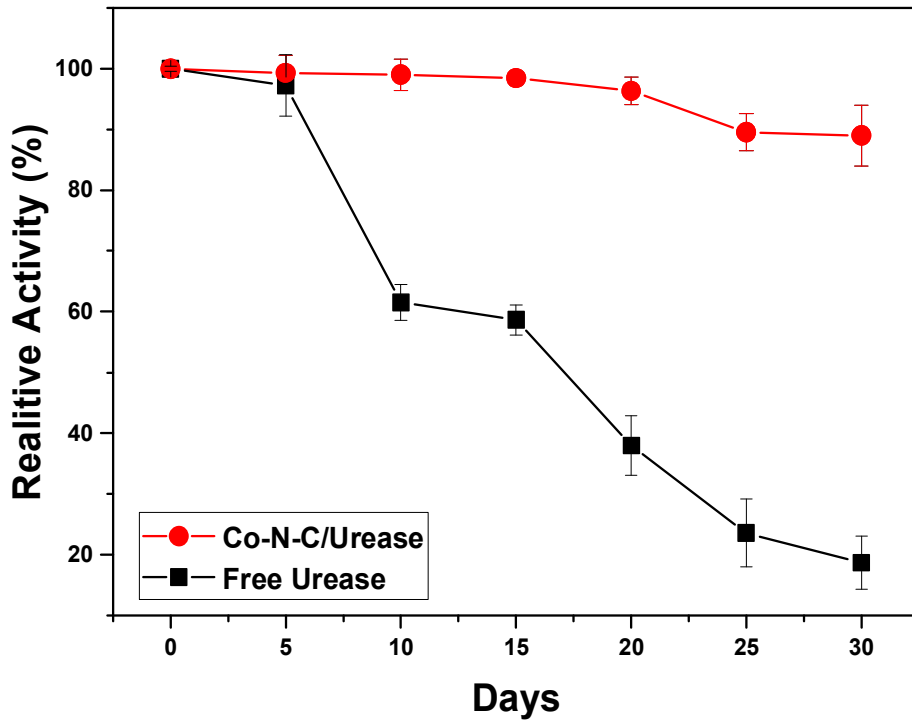


Figure. 14. The activity changes of free and immobilized urease with storage time (Storage condition: pH=7.9, T=4°C)

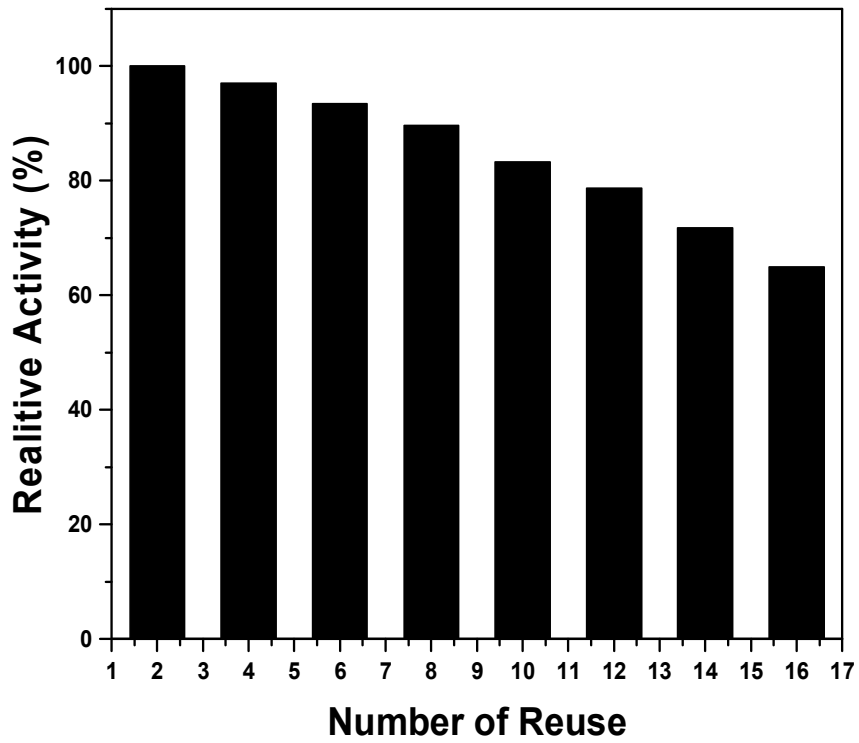


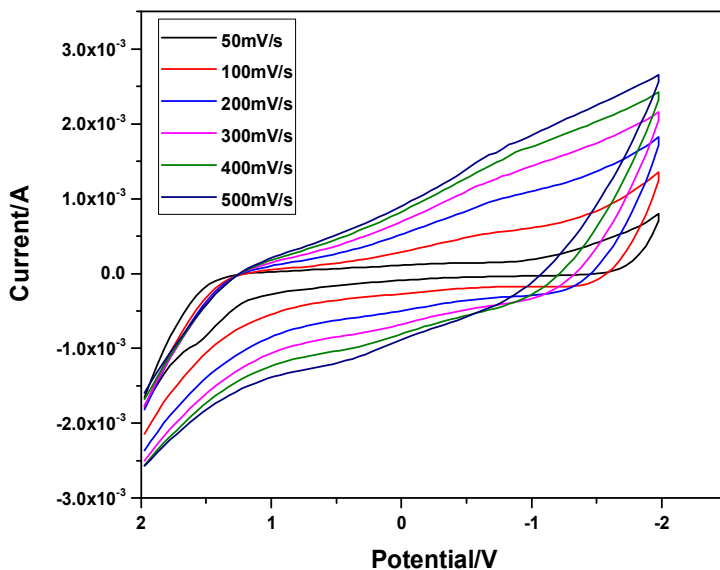
Figure. 15. Residual activity of immobilized urease after enzyme recycle

2. Electrochemical Analysis

가. Scanrate

본 실험에서는 2 V에서 -2 V범위 안에서 scan rate를 올려가면서 그에 따른 전류값을 측정하였다. Scan rate를 증가시킬수록 측정되는 산화 환원 전류값이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 50 ~ 500 mV/s 범위에서 수정 전극의 피크 전류에 대한 scan rate의 영향은 Figure 15(A)에 나와 있다. 그림에서 scan rate가 50mV/s에서 500mV/s로 증가함에 따라 피크 전위가 이동하여 특정 운동적 제한이 있는 것을 알 수 있다. 수정 안 된 SPE는 -0.975 V에서 R square value가 0.994가 나왔으며 Co/SPE와 Co-N-C/SPE는 -1.175 V에서 R square value 0.9912, 0.98 얻었다. Figure 16(A)의 삽입은 scan rate의 함수로서 피크 전류의 플롯을 보여준다. 이러한 결과를 바탕으로 최적의 scan rate를 300mV/s로 설정했다.

(A)



(B)

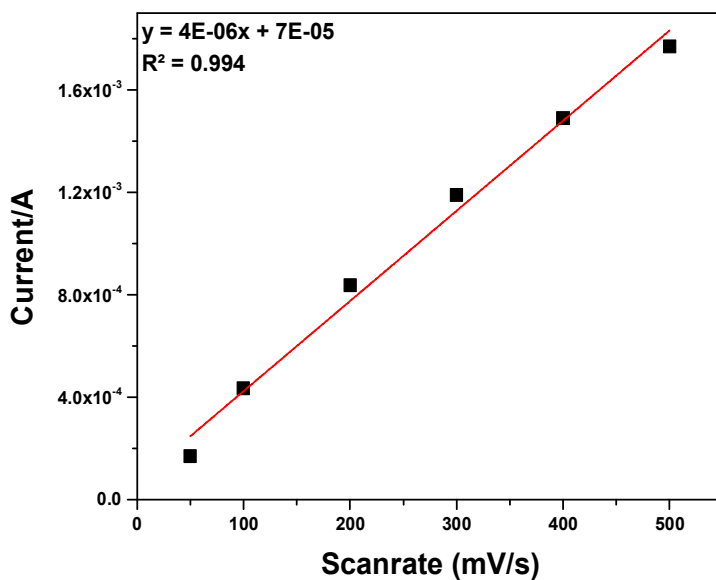
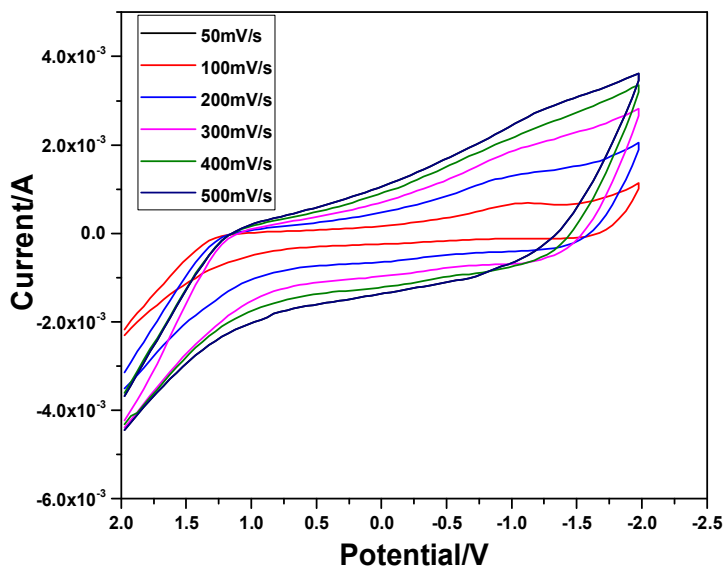


Figure. 16. Cyclic Voltammograms of (A) Urease/GA/SPE according to the scan rate range of 50mV/s to 500 mV/s. (B) Calibration curve

(A)



(B)

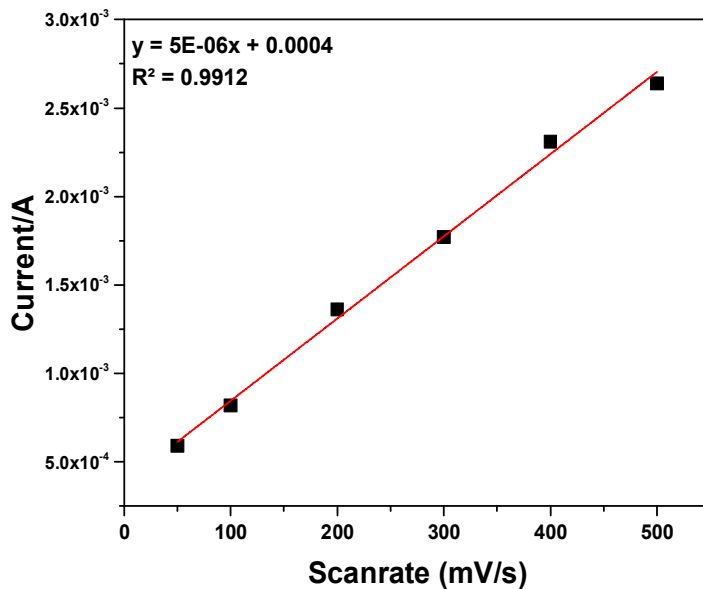


Figure. 17. Cyclic Voltammograms of (A) Urease/GA/Co-N-C/SPE according to the scan rate range of 50mV/s to 500 mV/s. (B) Calibration curve

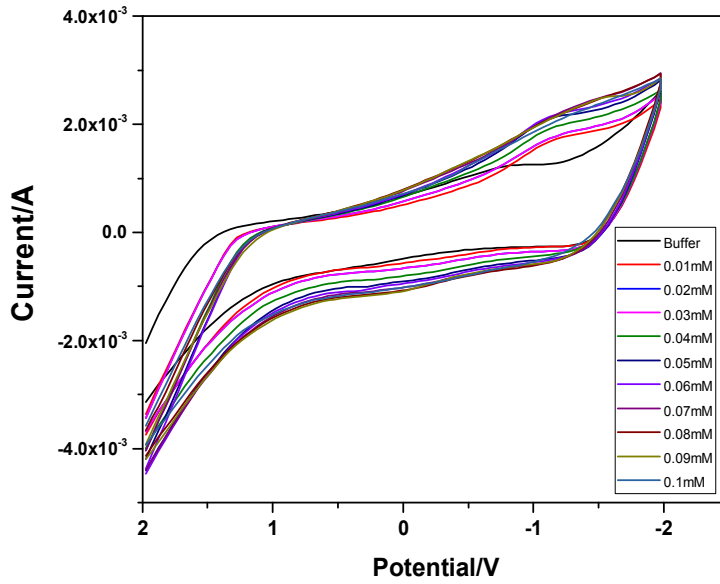
나. Cyclic Voltammetry (CV)

CV는 전기화학연구에 일반적으로 사용되는 기법으로 복잡한 전극 반응에 대한 정보를 얻는데 유용하기 때문에 두 최적 조건의 산화와 환원이 일어나는 범위와 가역성 등 전기화학적 특성을 알아보기 위해 cyclic voltammogram을 통해 확인하였다. [36] urease/Co/SPE, urease/Co-N-C/SPE 및 urease/SPE의 CV는 300mV/s의 scanrate에서 0.01mM에서 0.1mM 범위의 다양한 urea 농도를 갖는 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.0)에서 수행되었다. urease/SPE와 urease/Co-N-C/SPE은 -1.175 V 서 산화 피크를 띠며 urease/Co/SPE은 -0.975V에서 산화 피크를 띠는 것을 확인할 수 있었다. urease/Co-N-C/SPE의 경우 다른 electrode부터 피크가 크게 뜨는 것으로 확인하였다. 이 결과는 urease/Co-N-C/SPE은 biosensor 공정에 유용한 electrode인 것을 알 수 있다.

분석물질 urea의 농도가 0.01 - 0.1mM으로 증가할수록 전류값이 증가하는 상관관계를 나타내었고 urease/SPE, urease/Co/SPE와 urease/Co-N-C/SPE의 R square value는 각 0.9929, 0.9829, 0.996로 분석물질의 정성 및 정량이 가능함을 확인하였다.

\

(A)



(B)

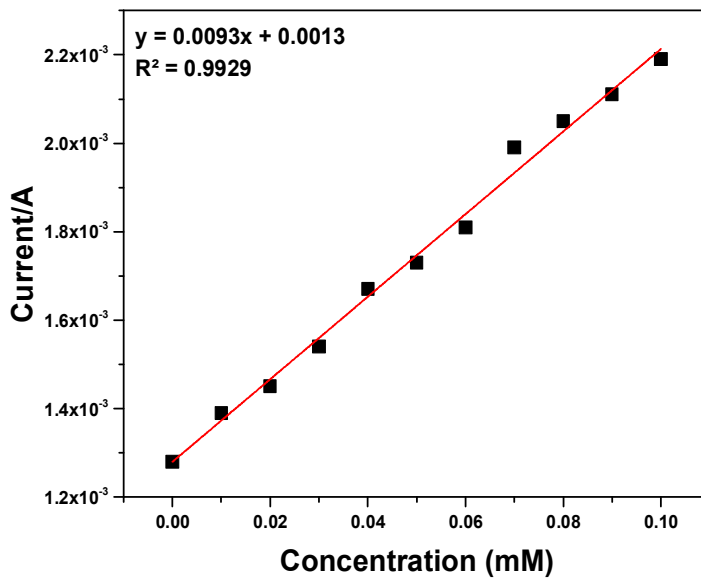
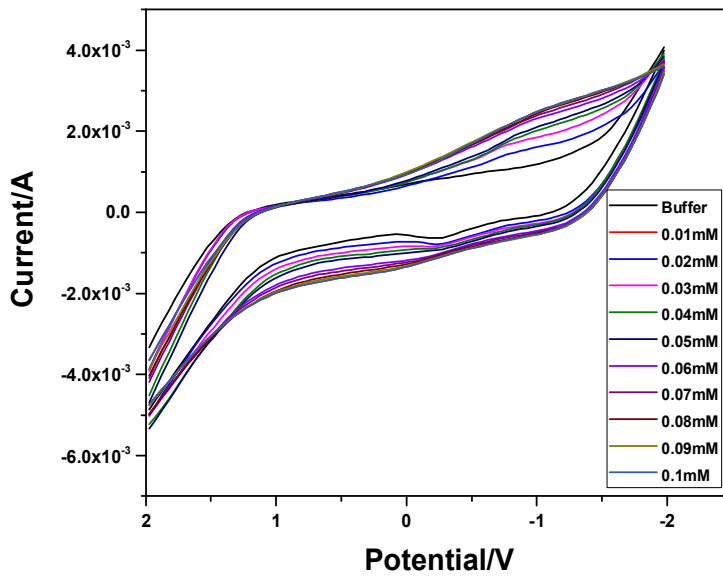


Figure. 18. Cyclic Voltammograms of (A) Urease/GA/SPE at scan rate 300mV/s.

(B) Calibration curve

(A)



(B)

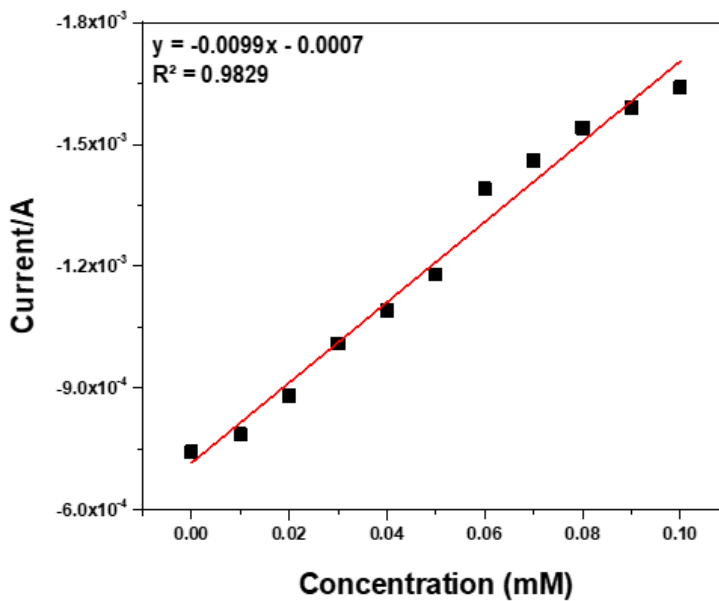
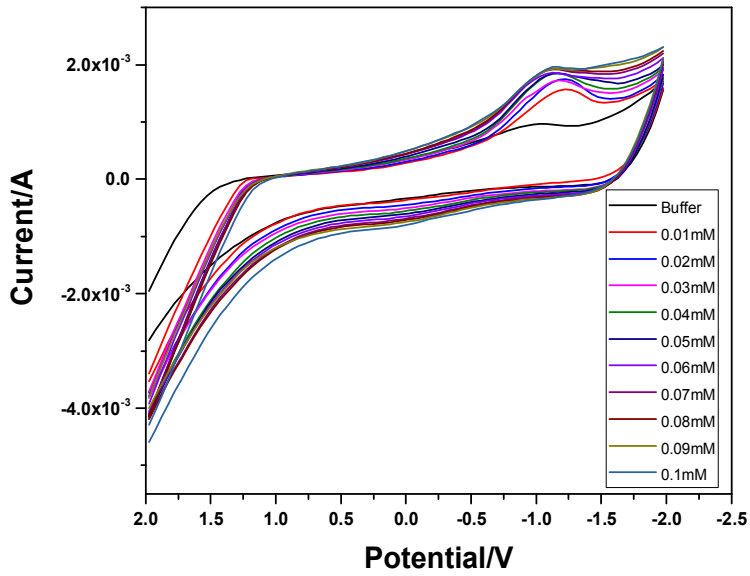


Figure. 19. Cyclic Voltammograms of (A) Urease/GA/Co/SPE at scan rate 300mV/s.(B) Calibration curve

(A)



(B)

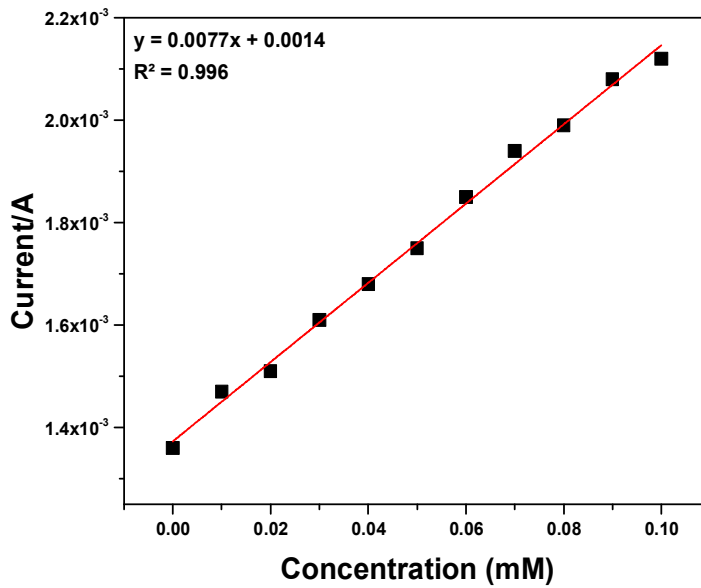
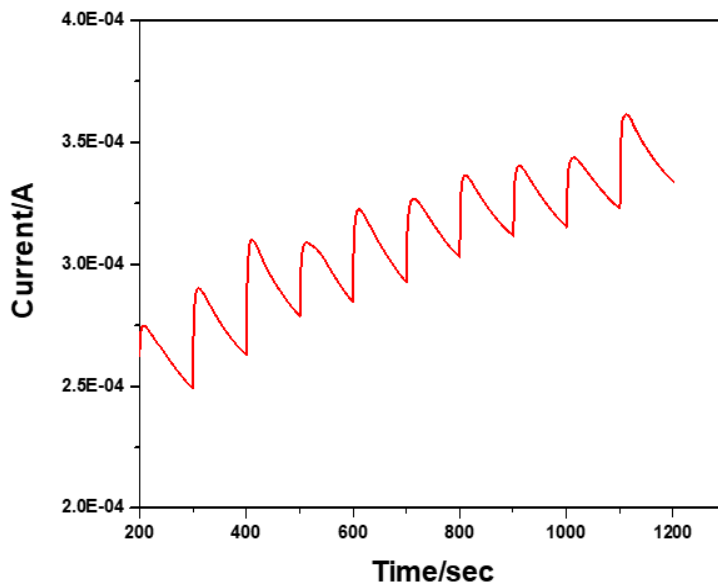


Figure. 20. Cyclic Voltammograms of (A) Urease/GA/Co/SPE at scan rate 300mV/s.(B) Calibration curve

다. Amperometric I-t curve

CV기법에서 urease/GA/SPE와 urease/GA/Co-N-C/SPE의 전기화학적 특성과 분석물질의 정성 및 정량적 분석이 가능함을 확인하였다. 이를 바탕으로 더 정량적으로 분석물질을 측정하기 위해서 urease/GA/SPE와 urease/GA/Co-N-C/SPE의 산화 potential을 일정하게 가해주면서 분석물질 농도 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1 mM을 100초 단위로 순차적으로 반응시켜 전류를 측정하였다. 두 최적조건 SPE 모두에서 분석물질의 농도를 높여가며 반응시킬수록 나타나는 전류는 증가하였고 urease/GA/SPE와 urease/GA/Co-N-C/SPE의 R square value는 각 0.9812, 0.9723로 분석물질의 정성 및 정량이 가능함을 재차 확인하였다.

(A)



(B)

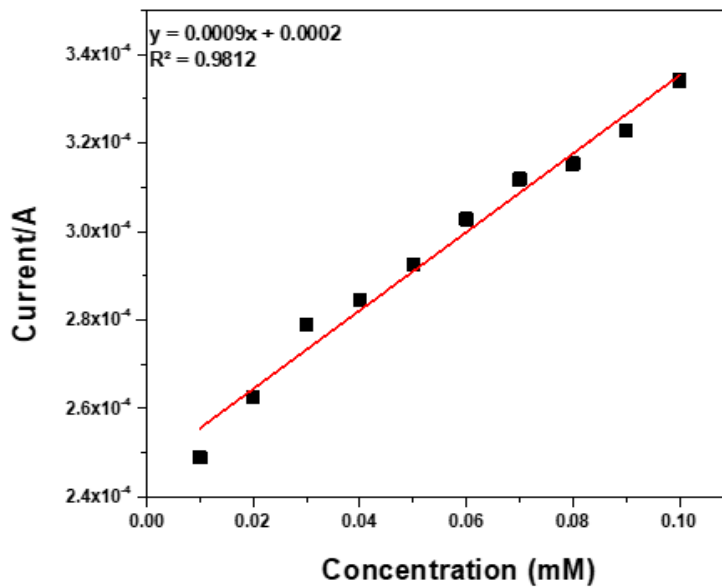
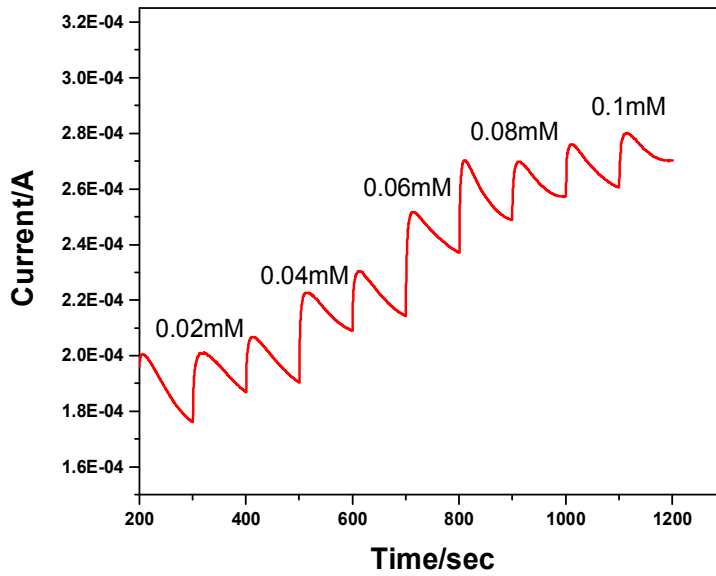


Figure. 21. Amperometric I-t curve of (A) Urease/GA/SPE (-1.175V). (B) Calibration curve

(A)



(B)

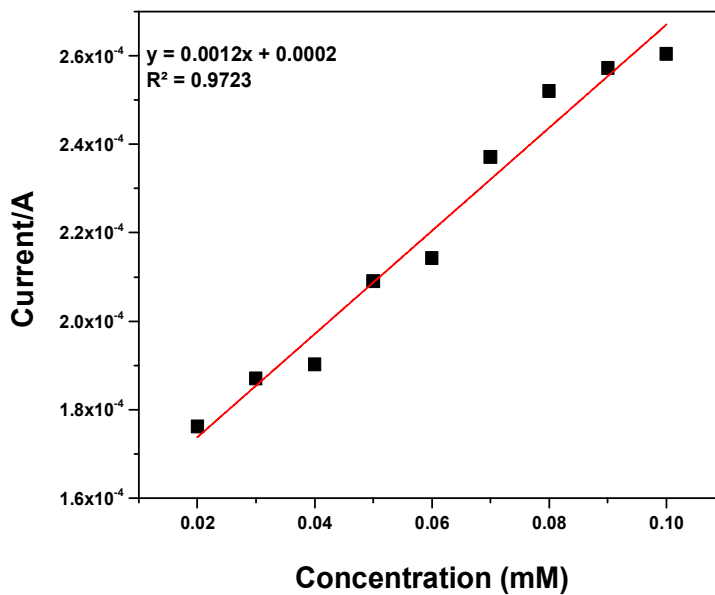


Figure. 22. Amperometric I-t curve of (A) Urease/GA/Co-N-C/SPE (-1.175V).

(B) Calibration curve

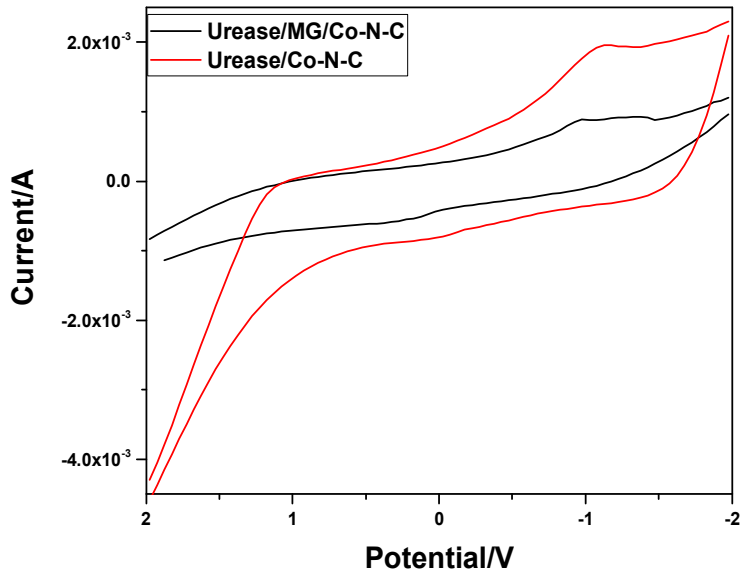
라. Effect of Mediator

전자 전달 매개체 기능을 가지는 2 종류의 TB, MG를 사용한 SPE특성을 확인하기 위해 CV로 정성분석이 가능함을 1차적으로 확인한 뒤 정량분석의 가능성을 확인하기 위해 amperometric I-t curve를 통해 전자전달 효과를 확인하였다.

효소와 염료가 모두 EAPC 방법으로 고정화되는 결과로 Urease/Co-N-C/SPE 경우 MG를 사용했을 때 산화 potential은 -1.075 때 떴지만 mediator 사용하지 않는 electrode가 산화 피크가 크게 나타나는 것을 확인하였다. TB의 경우에는 피크는 안 뜨는 것으로 TB를 사용했을 때 효과가 없는 것으로 확인하였다. 따라서 염료를 사용 안했을 때 효소 활성의 더 높은 것으로 판단되어진다.

..

(A)



(B)

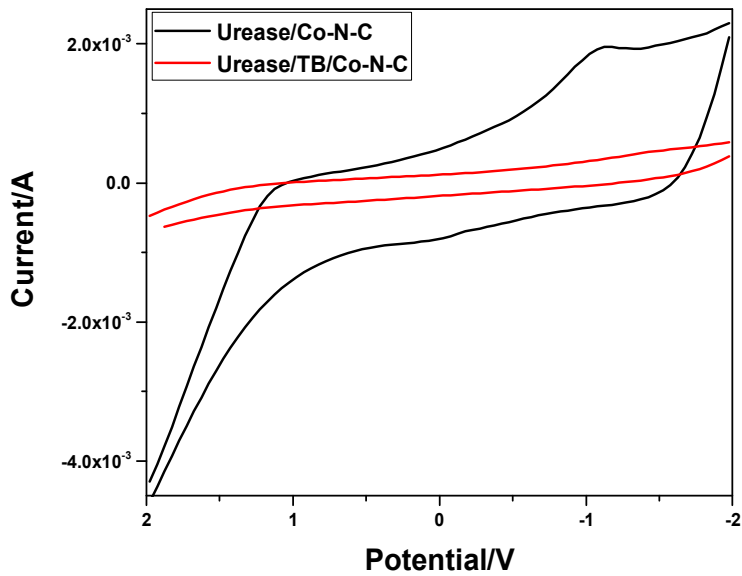


Figure. 23. Cyclic voltammetry of (A) Urease/MG/Co-N-C/SPE (B) Urease/TB/Co-N-C/SPE (scan rate: 300mV/s, 0.1mM Urea)

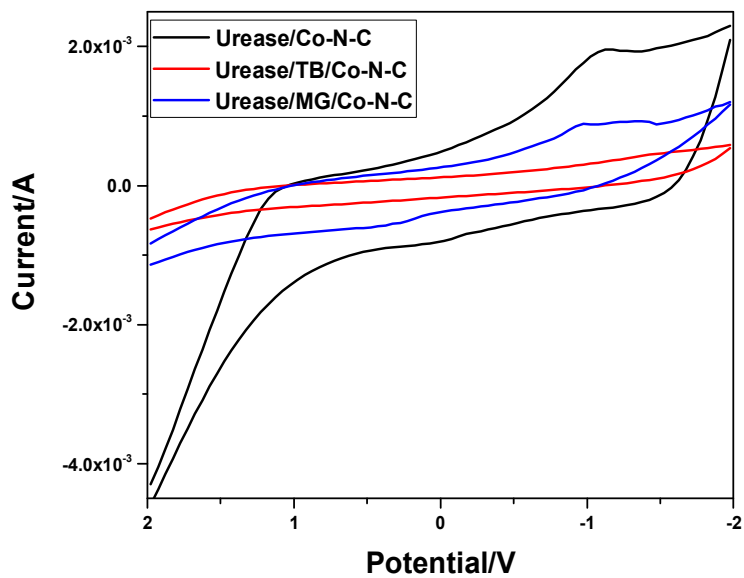


Figure. 24. Cyclic voltammetry of Total (scan rate: 300mV/s, 0.1mM Urea)

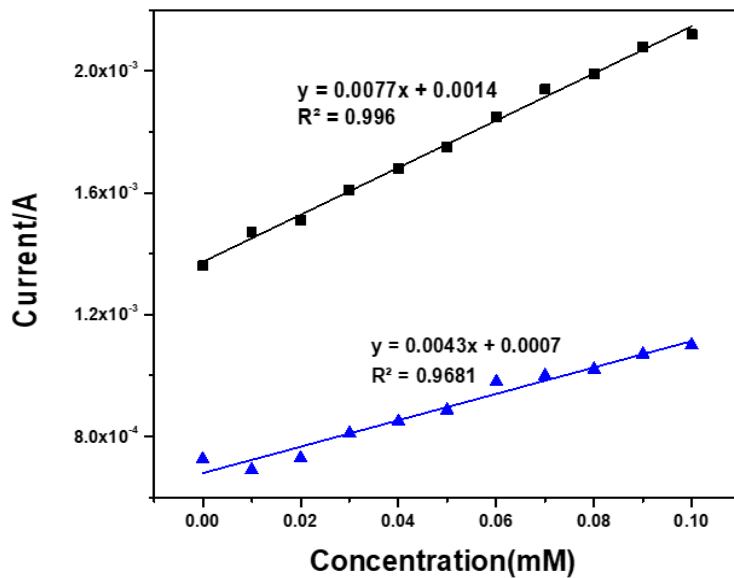


Figure. 25. Cyclic voltammetry calibration curve of Total (scan rate: 300mV/s, 0.1mM Urea)

3. Modified Screen Printed Electrode

가. Scanning Electron Microscope (SEM) 분석

Co-N-C membrane 및 고정화된 urease 효소의 SEM 사진. 합성된 나노섬유의 얻어진 형태는 Figure 26(a)(b)와 같으며, 효소 고정화 후에 나노섬유의 형태 변화를 SEM 사진을 이용하여 나타내었다. Figure 26(a)에서 알 수 있듯이, 나노섬유의 직경은 SEM 장치로 계산된 30~70nm 사이에서 다양하다. 효소 고정 후 나노섬유 구조에서 상당한 변화를 관찰할 수 있었다 Figure 26(c)(d). 효소 고정화 후에 나노섬유에 효소를 많이 붙은 것으로 보였다.

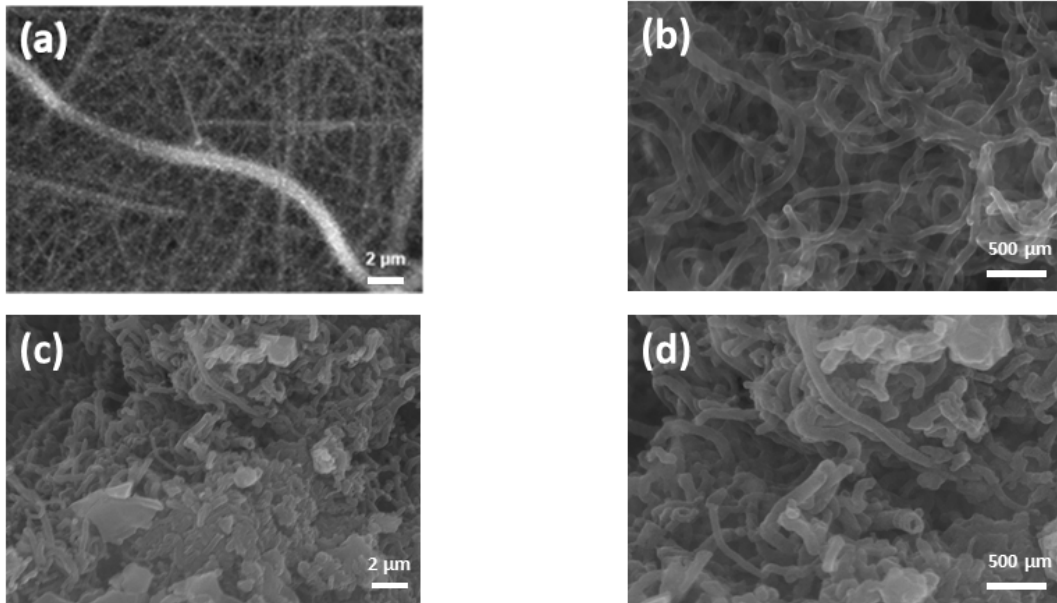


Figure. 26. SEM images of (A)(B) Co-N-C membrane, (C)(D) Urease immobilization after Co-N-C membranes.

1) Scanning Electron Microscope (SEM) 분석 (Screen Printed Electrode)

Bare SPCE, Co-N-C-modified SPCE, Urease/Co-N-C/SPCE를 포함한 변형된 전극의 표면 형태를 SEM으로 조사하였다(Figure 27, a-h). Sample 분석 전 증류수로 3회 이상 세척 후 동결 건조 하여 측정하였다. Co-N-C로 변형된 SPCE 표면에서 고도로 상호 침투된 Co-N-C 막 네트워크가 관찰되었는 것을 확인 할 수 있었다.(Figure 26d). 대조적으로, A Urease/Co-N-C/SPCE는 표면이 더 매끄럽고 황산암모늄과 요소분해효소 용액이 Co-N-C/SPE 네트워크의 간격을 분명히 채우고 있는 것을 확인하였다. 이것은 코발트 막의 네트워크가 전기 활성 표면적을 증가시키고 근위 흡착물과의 전자 전달을 촉진하는 이상적인 시나리오일 수 있다.

또한 스크린 크린프린팅 전극 기반을 Cobalt Hydroxide로만 변형되었다 (Figure 27). Cobalt hydroxide 용액을 약 30mg/ml 농도로 반응시켜 분석하였다. 이 결과는 SPCE 표면에 Cobalt hydroxide 코팅된 것을 확인하였다. 코팅 후에 Bare SPCE의 pore 사이즈가 작아진 것으로 보였으며 이 electrode에 효소 고정화를 한 다음에 pore 사이즈가 많이 안 보이는 것을 확인하였다

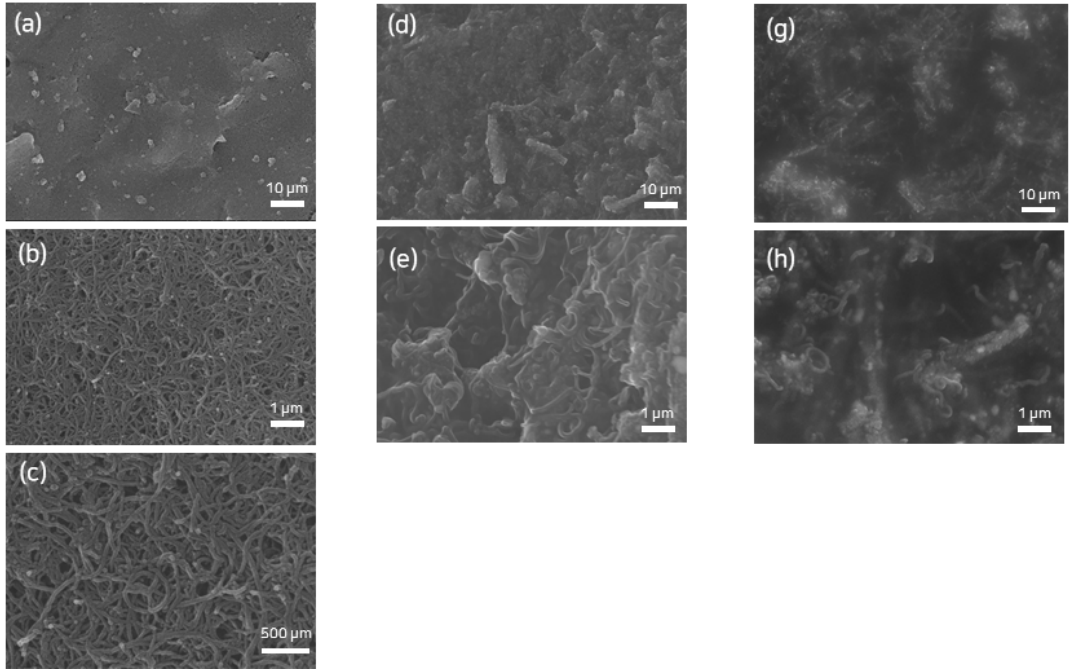


Figure. 27. SEM images of (A),(B),(C) CNT/SPE, ((D),(E) modified after CNT/SPE with Co-N-C membranes, (G),(H),Urease immoiliation after Co-N-C/CNT/SPE.

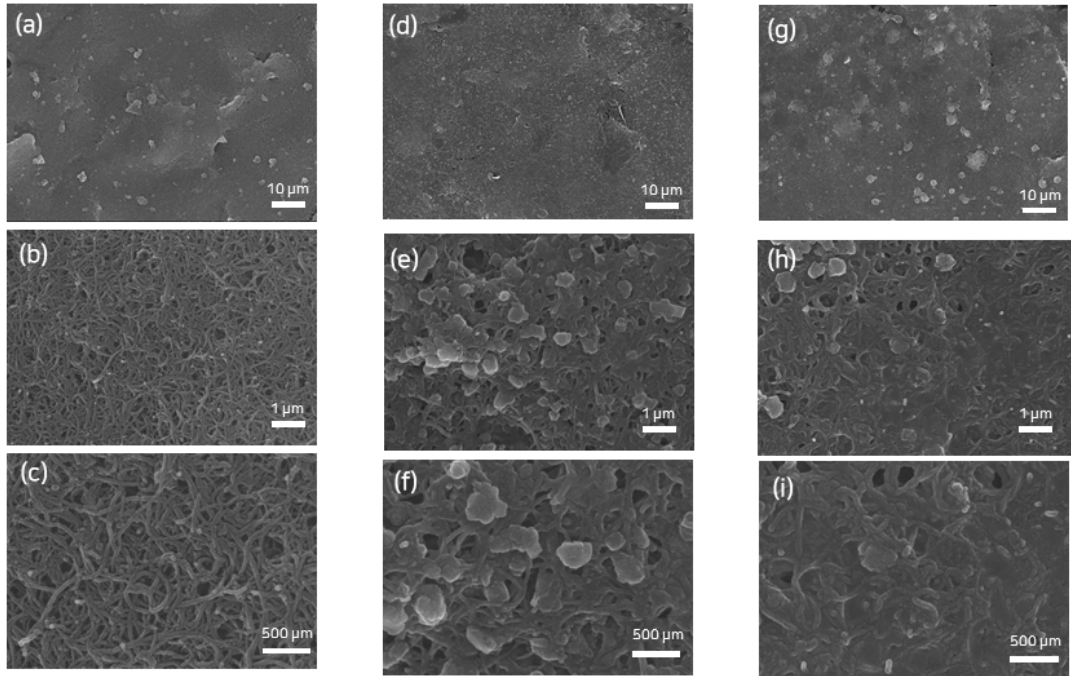


Figure. 28. SEM images of (A),(B),(C) CNT/SPE, ((D),(E) modified after CNT/SPE with Cobalt hydroxide, (G),(H),Urease immoilization after Co/CNT/SPE.

나. Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy 분석

제조된 Co/SPE와 Co-N-C/SPE의 화학적 특징을 특화하기 위해 FT-IR 분석하였다. SPE의 표면에 이루어지는 합성을 확인하기 위하여 측정한 FT-IR 분석 결과는 Figure 29와 같다. FT-IR 분석을 500-4000cm⁻¹의 파장범위에서 진행하였다. 결과는 전기화학적 증착 과정에서 초산 및 질산 이온이 삽입된 수산화코발트가 형성됨을 확인하였다. 결과는 (B)와 (C) spectrum에서 1106cm⁻¹의 파장은 hydroxide group의 stretching band가 생기는 것을 확인할 수 있었다. 1517cm⁻¹에서 나온 파장은 C=C 벤젠 고리의 피크를 뜨는 것을 확인하였다. 또한 1000cm⁻¹ 이하에 나타나는 작은 피크들은 흡수 Co-O 진동에 기인할 수 있다. 1255 및 2858 cm⁻¹의 다른 피크는 C-O, C-H 그룹의 존재를 보여준다.

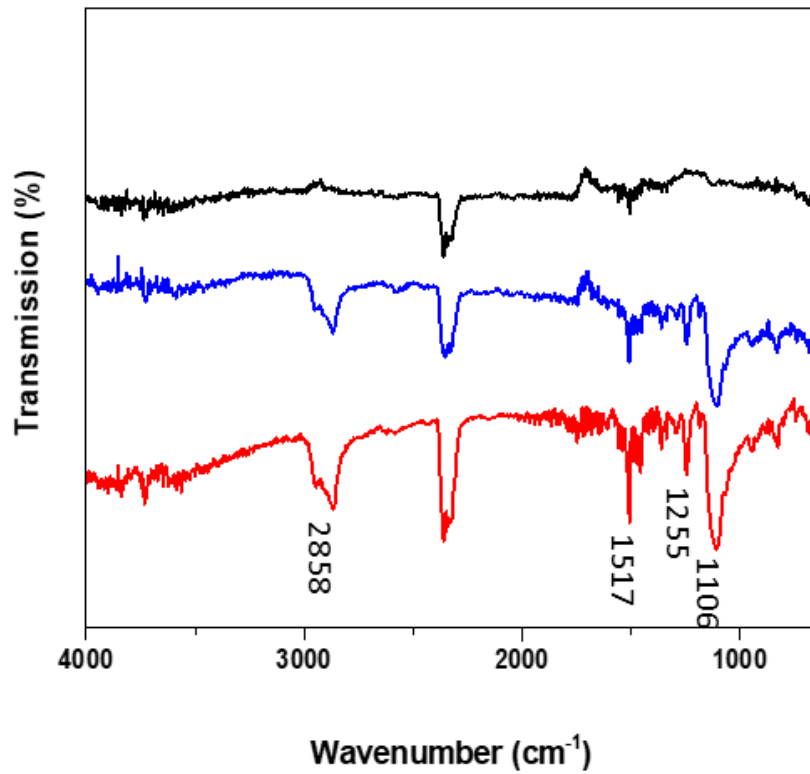


Figure. 29. FT-IR spectra of (A) CNT/SPE (B) Cobalt/SPE (C)Co-N-C/SPE membrane.

Table 3. FT-IR peak and corresponding functional groups of CNT/SPE, Co/SPE and Co-N-C/SPE membrane

| Wavenumber (cm) | Functional group | Vibration mode |
|-----------------|------------------|------------------------------|
| 1106 | OH | Stretching Vibration |
| 1517 | C=C | Aromatic ring C=C stretching |
| 2858 | C-H | aliphatic Vibration |
| 1255 | C-O | Bending Vibration |
| 851 | Co-O | Cobalt Range |

제4장 결론

본 연구에서는 인간이 무기 화합물로부터 합성한 최초의 유기 화합물로 알려져 있는 요소 (urea)를 제거할 수 있는 요소분해효소 (urease)를 고정화하기 위해 SPE를 수정하여 Co-N-C/SPE를 개발하였다. Co-N-C로 수정된 센서는 가장 높은 산화환원 반응을 보였다. 요소의 바이오센서에서 일회용 스크린 인쇄 전극(SPE)의 사용은 표면 수정 및 두께 측면에서 쉽게 제어할 수 있었고 센서 플랫폼의 대규모 생산에 적합하다. 따라서 Co-N-C/SPE의 안정적인 전도층이 가교 전에 형성되고 효소 고정화를 하였다. 외인성 산화환원 매개체의 사용을 피하기 위해 다중벽 탄소 나노튜브와 Co-N-C/SPE의 하이브리드를 사용하여 효소적으로 생성된 암모늄 이온의 직접 산화를 성공적으로 얻었다. 본 연구의 결과는 요소 제거를 위한 Co-N-C/SPE전극 기반 urease 전기화학 바이오센서의 활용 가능성이 있을 것으로 판단된다.

References

- [1] Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1-9
- [2] Zakaria, N. I., Mohammad, R., Hanifah, S. A., Kamarudin, K. H., & Ahmad, A. (2021). Low cost and eco-friendly nanoparticles from cockle shells as a potential matrix for the immobilisation of urease enzyme. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(4), 103056.
- [3] Laska, J., Włodarczyk, J., & Zaborska, W. (1999). Polyaniline as a support for urease immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6(6), 549-553.
- [4] Liu, D. M., Chen, J., & Shi, Y. P. (2018). Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102, 332-342.
- [5] Sigurdardóttir, S. B., Lehmann, J., Ovtar, S., Grivel, J. C., Negra, M. D., Kaiser, A., & Pinelo, M. (2018). Enzyme immobilization on inorganic surfaces for membrane reactor applications: mass transfer challenges, enzyme leakage and reuse of materials. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 360(14), 2578-2607.
- [6] Zhou, W., Zhang, W., & Cai, Y. (2021). Laccase immobilization for water purification: A comprehensive review. *Chemical Engineering Journal*, 403, 126272.
- [7] Wu, L., Lu, X., Wu, Z. S., Dong, Y., Wang, X., Zheng, S., & Chen, J. (2018). 2D transition metal carbide MXene as a robust biosensing platform for enzyme immobilization and ultrasensitive detection of phenol. *Biosensors and Bioelectronics*, 107, 69-75.
- [8] Adeel, M., Bilal, M., Rasheed, T., Sharma, A., & Iqbal, H. M. (2018).

Graphene and graphene oxide: Functionalization and nano-bio-catalytic system for enzyme immobilization and biotechnological perspective. *International journal of biological macromolecules*, 120, 1430-1440.

[9] Naghdi, M., Taheran, M., Brar, S. K., Kermanshahi-Pour, A., Verma, M., & Surampalli, R. Y. (2018). Pinewood nanobiochar: A unique carrier for the immobilization of crude laccase by covalent bonding. *International journal of biological macromolecules*, 115, 563-571.

[10] Girelli, A. M., Astolfi, M. L., & Scuto, F. R. (2020). Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. *Chemosphere*, 244, 125368.

[11] Nadar, S. S., & Rathod, V. K. (2018). Magnetic-metal organic framework (magnetic-MOF): A novel platform for enzyme immobilization and nanozyme applications. *International journal of biological macromolecules*, 120, 2293-2302.

[12] Asmat, S., Anwer, A. H., & Husain, Q. (2019). Immobilization of lipase onto novel constructed polydopamine grafted multiwalled carbon nanotube impregnated with magnetic cobalt and its application in synthesis of fruit flavours. *International journal of biological macromolecules*, 140, 484-495.

[13] García-Colmenares, J. M., & Reyes-Cuellar, J. C. (2020). Immobilization of bromelain on cobalt-iron magnetic nanoparticles (CoFe₂O₄) for casein hydrolysis. *Revista Colombiana de Química*, 49(1), 3-10.

[14] Scouten, W. H., Luong, J. H., & Brown, R. S. (1995). Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. *Trends in biotechnology*, 13(5), 178-185.

[15] Nguyen, H. H., Lee, S. H., Lee, U. J., Fermin, C. D., & Kim, M. (2019). Immobilized enzymes in biosensor applications. *Materials*, 12(1), 121.

[16] Ahmad, S., Sebai, W., Belleville, M. P., Brun, N., Galarneau, A., & Sanchez-Marcano, J. (2021). Enzymatic monolithic reactors for micropollutants degradation. *Catalysis Today*, 362, 62-71.

[17] Asmat, S., Anwer, A. H., & Husain, Q. (2019). Immobilization of lipase onto novel constructed polydopamine grafted multiwalled carbon nanotube impregnated with magnetic cobalt and its application in synthesis of fruit flavours. *International journal of biological macromolecules*, 140, 484-495.

[18] Sheldon, R. A., Basso, A., & Brady, D. (2021). New frontiers in enzyme immobilisation: robust biocatalysts for a circular bio-based economy. *Chemical Society Reviews*, 50(10), 5850-5862.

[19] Zhang, J., Yan, B., He, C., Hao, Y., Sun, S., Zhao, W., & Zhao, C. (2020). Urease-immobilized magnetic graphene oxide as a safe and effective urea removal recyclable nanocatalyst for blood purification. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 59(19), 8955-8964.

[20] Tamaddon, F., & Arab, D. (2019). Urease covalently immobilized on cotton-derived nanocellulose-dialdehyde for urea detection and urea-based multicomponent synthesis of tetrahydro-pyrazolopyridines in water. *RSC Advances*, 9(71), 41893-41902.

[21] Bachmeier, K. L., Williams, A. E., Warmington, J. R., & Bang, S. S. (2002). Urease activity in microbologically-induced calcite precipitation. *Journal of biotechnology*, 93(2), 171-181.

[22] Kantar, C., Baltaş, N., Karaoğlu, Ş. A., & Şaşmaz, S. (2021). New Potential Monotherapeutic Candidates for *Helicobacter pylori*: Some Pyridinazo Compounds Having Both Urease Enzyme Inhibition and Anti-*Helicobacter pylori* Effectiveness. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 55(3), 246-252.

[23] Pratama, G. B. S., Yasuhara, H., Kinoshita, N., & Putra, H. (2021). Application of soybean powder as urease enzyme replacement on EICP method for soil improvement technique. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 622, No. 1, p. 012035). IOP Publishing.

[24] Hussain, A., Rafeeq, H., Afsheen, N., Jabeen, Z., Bilal, M., & Iqbal, H. (2021). Urease-Based Biocatalytic Platforms—A Modern View of a Classic Enzyme with Applied Perspectives. *Catalysis Letters*, 1-24.

[25] Jamwal, S., Ranote, S., Dautoo, U., & Chauhan, G. S. (2020). Improving activity and stabilization of urease by crosslinking to nanoaggregate forms for herbicide degradation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 521-529.

[26] Akkas, T., Zakharyuta, A., Taralp, A., & Ow-Yang, C. W. (2020). Cross-linked enzyme lyophilisates (CLELs) of urease: a new method to immobilize ureases. *Enzyme and Microbial Technology*, 132, 109390.

[27] Luo, Z., & Fu, X. (2010). Immobilization of urease on dialdehyde porous starch. *Starch-Stärke*, 62(12), 652-657.

[28] Zahirinejad, S., Hemmati, R., Homaei, A., Dinari, A., Hosseinkhani, S., Mohammadi, S., & Vianello, F. (2021). Nano-organic supports for enzyme immobilization: scopes and perspectives. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 204, 111774.

[29] Bilal, M., Asgher, M., Parra-Saldivar, R., Hu, H., Wang, W., Zhang, X., & Iqbal, H. M. (2017). Immobilized ligninolytic enzymes: an innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants—a review. *Science of the Total Environment*, 576, 646-659.

[30] Basso, A., & Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized

enzymes—A review. *Molecular Catalysis*, 479, 110607.

[31] Girelli, A. M., & Scuto, F. R. (2021). Eggshell membrane as feedstock in enzyme immobilization. *Journal of Biotechnology*, 325, 241-249.

[32] Aggarwal, S., Chakravarty, A., & Ikram, S. (2021). A comprehensive review on incredible renewable carriers as promising platforms for enzyme immobilization & thereof strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 962-986.

[33] Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1-9.

[34] Du, L., Huang, M., & Feng, J. X. (2017). Immobilization of α -amylase on eggshell membrane and Ag⁻nanoparticle-decorated eggshell membrane for the biotransformation of starch. *Starch-Stärke*, 69(9-10), 1600352.

[35] Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1-9.

[36] Netto, C. G., Toma, H. E., & Andrade, L. H. (2013). Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 85, 71-92.

[37] Gabrovska, K., Ivanov, J., Vasileva, I., Dimova, N., & Godjevargova, T. (2011). Immobilization of urease on nanostructured polymer membrane and preparation of urea amperometric biosensor. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(4), 620-626.

[38] Kale, P. D., Bodade, A. B., & Chaudhari, G. N. (2016). Study of immobilization of urease on pva-nano nife₂o₄ nanocomposite for biosensor applications. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 8(7), 380-385.

[39] Lv, M., Ma, X., Anderson, D. P., & Chang, P. R. (2018). Immobilization of urease onto cellulose spheres for the selective removal of urea. *Cellulose*, 25(1), 233-243.

[40] Yildirim, S., Borer, M. E., Wenk, E., Meinel, L., & Lacroix, C. (2010). Development of silk fibroin-based beads for immobilized cell fermentations. *Journal of microencapsulation*, 27(1), 1-9.

[41] Nguyen, H. H., Lee, S. H., Lee, U. J., Fermin, C. D., & Kim, M. (2019). Immobilized enzymes in biosensor applications. *Materials*, 12(1), 121.

[42] Botewad, S. N., Gaikwad, D. K., Girhe, N. B., Thorat, H. N., & Pawar, P. P. (2021). Urea biosensors: A comprehensive review. *Biotechnology and Applied Biochemistry*.

[43] Saenchoopa, A., Klangphukhiew, S., Somsub, R., Talodthaisong, C., Patramanon, R., Daduang, J., ... & Kulchat, S. (2021). A Disposable Electrochemical Biosensor Based on Screen-Printed Carbon Electrodes Modified with Silver Nanowires/HPMC/Chitosan/Urease for the Detection of Mercury (II) in Water. *Biosensors*, 11(10), 351.

[44] Hassan, R. Y., Kamel, A. M., Hashem, M. S., Hassan, H. N., El-Ghaffar, A., & Mahmoud, A. (2018). A new disposable biosensor platform: carbon nanotube/poly (o-toluidine) nanocomposite for direct biosensing of urea. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 22(6), 1817-1823.

[45] Nien, Y. H., Su, T. Y., Chou, J. C., Lai, C. H., Kuo, P. Y., Lin, S. H., ... & Rangasamy, M. (2020). Investigation of flexible arrayed urea biosensor based on graphene oxide/nickel oxide films modified by au nanoparticles. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 70, 1-9.

[46] Hermanto, D., Kuswandi, B., Siswanta, D., & Mudasir, M. (2019). Inhibitive determination of Hg (II) in aqueous solution using urease amperometric biosensor. *Indonesian Journal of Chemistry*, 19(3), 786-795.

[47] Hosseinian, M., Najafpour, G., & Rahimpour, A. (2019). Amperometric urea biosensor based on immobilized urease on polypyrrole and macroporous polypyrrole modified Pt electrode. *Turkish Journal of Chemistry*, 43(4), 1063-1074.

[48] Tajik, S., Beitollahi, H., Ahmadi, S. A., Askari, M. B., & Di Bartolomeo, A. (2021). Screen-printed electrode surface modification with NiCo₂O₄/RGO nanocomposite for hydroxylamine detection. *Nanomaterials*, 11(12), 3208.

[49] Zhang, J., Yan, B., He, C., Hao, Y., Sun, S., Zhao, W., & Zhao, C. (2020). Urease-immobilized magnetic graphene oxide as a safe and effective urea removal recyclable nanocatalyst for blood purification. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 59(19), 8955-8964.

[50] Sanjaya, R. K., Ismillayli, N., & Hermanto, D. (2019). An Amperometric Biosensor For Hg (II) Based On Urease/Alginate-Chitosan Membrane Modified Screen Printed Carbon Electrode. *Jurnal Pijar Mipa*, 14(3), 184-188.

[51] 손흥진. (2021). Transition metal based free-standing membrane as a multi-functional electrode for Zinc-air batteries and water splitting (Doctoral dissertation, 조선대학교 대학원).

[52] Al-Shams, J. K. J., Hussein, M. A., & Al-Hakeim, H. (2019). Activity and stability of urease enzyme immobilized on Amberlite resin.

[53] Tajik, S., Beitollahi, H., Jang, H. W., & Shokouhimehr, M. (2021). A screen printed electrode modified with Fe₃O₄@ polypyrrole-Pt core-shell nanoparticles for electrochemical detection of 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *Talanta*, 232, 122379.

[54] Vojdanitalab, K., Jafari-Nodoushan, H., Mojtabavi, S., Shokri, M., Jahandar, H., & Faramarzi, M. A. (2022). Instantaneous synthesis and full characterization of organic-inorganic laccase-cobalt phosphate hybrid nanoflowers. *Scientific Reports*, 12(1), 1-16.

[55] Alptekin, Ö. (2022). Characteristics of immobilized urease onto modified zirconium (IV) oxide via glutaraldehyde: kinetic, stability, and operational stabilities in bioreactors. *Chemical Papers*, 76(2), 749-761.

[56] Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2018). A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8(2), 92.