



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년08월14일
(11) 등록번호 10-0852255
(24) 등록일자 2008년08월07일

(51) Int. Cl.

G01N 31/10 (2006.01) G01N 31/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0063885

(22) 출원일자 2007년06월27일

심사청구일자 2007년06월27일

(56) 선행기술조사문헌

최영봉 외 1인, 오스뮴 착물 합성과 전기화학적인 방법을 이용한 바이오센서에 관한 연구, 한국전기화학회지, 제10권, 제2호, 2007*

US 2003/0164024 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375, 조선대학교 산학기
획팀

(72) 발명자

김시욱

광주 남구 봉선2동 한국아텔리움 101동 1403호

김희곤

광주 북구 동림동 죽림마을 주공3차 104동 1209호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 7 항

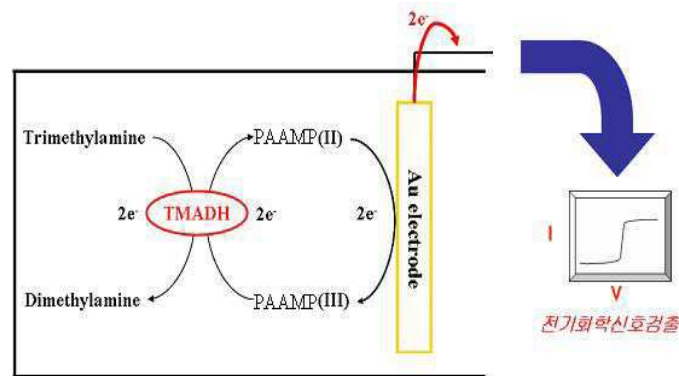
심사관 : 김명희

(54) 트리메틸아민의 검출방법

(57) 요약

본 발명은 트리메틸아민의 검출방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 금 나노입자가 증착되고, 전자전달매개체가 고정된 작업전극 상에서 트리메틸아민 탈수소효소(TMADH)와 시료 중 트리메틸아민(TMA)과의 효소/기질 산화환원반응에 의해 발생하는 촉매전류를 전기 화학적 신호로 검출하는 트리메틸아민의 검출방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 검출방법을 이용한 바이오센서는 휴대가 용이하고 정량 검출이 가능하므로, 유해한 트리메틸아민을 현장에서 정량적으로 검출할 수 있기 때문에 이를 효과적으로 제거할 수 있는 근거를 제시함으로써 환경오염으로 인한 악취 및 생태계 파괴를 방지하는 데 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김혁한

충남 천안시 안서동 산29번지 단국대학교 화학과

최영봉

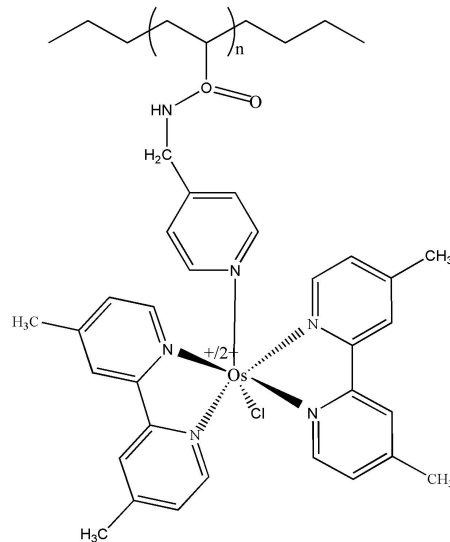
충남 천안시 안서동 산29번지 단국대학교 화학과

특허청구의 범위

청구항 1

금 나노입자가 증착되고 하기 화학식 1의 오스뮴 착화합물 PAAMP-Os인 전자전달매개체가 고정된 작업전극 상에서, 트리메틸아민 탈수소효소(TMADH)와 시료 중 트리메틸아민(TMA)과의 효소/기질 산화환원반응에 의해 발생하는 촉매전류를 전기 화학적 신호로 검출하는 트리메틸아민의 검출방법:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 작업전극은 스크린 프린팅 탄소반죽전극(SPE)인 것을 특징으로 하는 트리메틸아민의 검출방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 촉매전류의 크기는 트리메틸아민의 농도에 비례하는 것을 특징으로 하는 트리메틸아민 검출방법.

청구항 5

작업전극으로서 스크린 프린팅 탄소반죽전극(SPE)과;

기준전극으로서 Ag/AgCl 전극과; 상대전극으로서 백금전극과;

상기 작업전극 상에 증착되는 금(Au) 나노입자와;

상기 금 나노입자가 증착된 작업전극 상에 고정된 전자전달매개체로서 상기 화학식 1로 표시되는 오스뮴 착화합물인 PAAMP-Os; 및

상기 PAAMP-Os가 고정된 작업전극 위에 고정된 트리메틸아민 탈수소효소를 포함하는, 제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항의 트리메틸아민 검출방법에 사용되는 바이오 센서.

청구항 6

OHP 필름상에 인쇄된 작업전극인 스크린 프린팅 탄소반죽전극(SPE) 위에, KAuCl_4 용액을 로딩하여 금(Au) 나노입자를 증착시키는 단계(단계 1);

금 나노입자가 증착된 상기 단계 1의 작업전극에, 전자전달매개체로서 제1항의 화학식 1로 표시되는 오스뮴 착화합물인 PAAMP-Os(Poly(acrylic acid)amino methyl pyridine-[Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)₂Cl₂]^{2+/3+})를 고정시키는 단계(단계 2); 및

전자전달매개체가 고정화된 상기 단계 2의 작업전극 위에, 트리메틸아민 탈수소효소(TMADH)를 고정시키는 단계(단계 3)

를 포함하는 제5항의 바이오센서의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 단계 2의 고정은 상기 단계 1에서 금 나노입자가 증착된 작업전극 상에 3-머캅토프로피온산을 로딩하여 반응시킨 후, EDC와 NHS 혼합액을 로딩하여 반응시킨 후에 실시되는 것을 특징으로 하는 제 5항의 바이오센서의 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 단계 1 내지 3의 증착 또는 고정 후 증류수로 전극표면을 세척한 후 건조시켜 다음, 단계를 수행하는 것을 특징으로 하는 제5항의 바이오센서의 제조방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <11> 본 발명은 트리메틸아민의 검출방법에 관한 것이다.
- <12> 급속한 산업화로 인해, 종래에는 존재하지 않았던 수많은 환경오염물질이 생태계를 위협하고 있다. 이에, 환경오염물질을 제거하는 기술과 아울러 환경오염물질 탐지 및 방제의 기술적 중요성이 증대하고 있다.
- <13> 상기의 환경오염물질의 탐지와 방제는 다양한 방법으로 연구되고 있는데, 특히 환경오염 물질 검출을 위한 바이오센서 개발이 최근에 많이 적용되고 있다. 종래의 화학센서는 측정가능한 대상이 주로 무기 물질이었으나, 유기 및 생체물질을 선택적으로 측정할 수 있는 바이오센서 혹은 진단 시약이 요구됨에 따라, 1940년대부터 효소의 특정 분자식별 반응을 위한 진단시약이 사용되기 시작하였다.
- <14> Clark 그룹은 효소의 특이 분자식별 반응성에 착안하여 전극과의 조합에 따른 효소-기질 계측 원리를 제안하였고, Updike와 Hicks가 고정화 효소를 적용하여 전기화학적인 방법을 이용한 바이오센서의 개념을 확립하였다(Ref. L. C. Clark Jr. and C. Lyons, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **102**, 29 (1962)).
- <15> 상기 바이오센서는 분자식별 요소에 따라 효소센서, 면역센서, 효소면역센서, 세포기관센서, 미생물센서, 조직센서 등으로 분류될 수 있고, 신호변환 방법에 따라 화학변화를 전기신호로 변환시키는 전극형 바이오센서, 열변화를 전기신호로 변환시키는 써미스터(thermistor) 바이오센서, 광변화를 전기신호로 변환시키는 포토 바이오센서, 반도체 바이오센서 등으로도 분류될 수 있다.
- <16> 상술한 다양한 바이오센서 가운데 전기화학적인 방법을 이용한 바이오센서는 작은 금속 전극 위에, 표적물질을 인지하는 미생물 혹은 효소 등을 전극 상에 고정시킨 후에 고정화된 미생물(또는 효소)이 표적물질의 농도에 비례하여 산화/환원반응을 통하여 생성되거나 소비되는 전류(또는 전기량)를 이용하여 생체 표적물질을 정량하는 분석장치이다.
- <17> 한편, 환경 악취 오염 물질인 트리메틸아민(trimethylamine, TMA)은 어류에 존재하는 콜린, 베타인 또는 트리메틸아민 *N*-옥사이드로부터 미생물의 작용에 의해 자연적으로 생성되는 물질로서 난분해성 물질로서 악취를 발생시킬 뿐만 아니라, 사람을 포함한 포유류 동물의 근육 조직을 부식시키고, DNA, RNA 또는 단백질을 포함하는 거대 분자에 변성을 일으킴으로써 동물배태조직의 기형을 초래하는 유해한 물질이다. 특히, 트리메틸아민은 어류 사료를 생산하는 공정에서 발생하는 폐수에 포함되어 자연으로 유입됨으로써 상기의 환경 오염 및 생태계 파괴를 유발할 수 있다.

<18> 또한, 메틸 이용성 박테리아(Methylotrophic bacteria)는 에너지원과 탄소원으로 단일 탄소를 이용하는 세균집단을 일컫는다. 메틸 이용성 균체 중"facultative marine methylotrophic bacterium"인 "*Methylophaga aminisulfidivorans* MPT(KCTC 12909 = VKM B-2441 = JCM 1464)는 메탄올을 에너지원과 탄소원으로 이용할 수 있을 뿐만 아니라 메틸아민(methylamine, MMA), 디메틸아민(dimethylamine, DMA), 트리메틸아민(TMA) 등 메틸화된 질소화합물을 이용하여 성장할 수 있다. 특히, 상기 균주는 트리메틸아민을 기질로 하여 성장할 때 최초 트리메틸아민 탈수소화효소(trimethylamine dehydrogenase, TMADH, EC 1.5.99.7)를 이용한다. 상기 트리메틸아민 탈수소효소는 철-황 플라보프로테인(iron-sulfur flavoprotein)으로 트리메틸아민의 산화적 N-탈메틸화(oxidative N-demethylation) 반응을 촉매하여 트리메틸아민을 디메틸아민과 포름알데하이드로 분해할 수 있다.

<19>

<20> 이에, 본 발명자들은 바이오센서에 트리메틸아민 탈수소효소와 전극간의 전자전달반응을 용이하게 하기 위하여 전자전달 매개체를 사용한다는 점이며, 종래의 전자전달 매개체로는 페로센 및 페로센 유도체, 퀴논 및 퀴논 유도체, 헥사아민 루테늄 착화합물, 포타슘 페리엑사시아나이드 오스뮴 착화합물을 포함하는 고분자, 유기 전도성 염 또는 바이오로젠 등과 같은 전자전달 유/무기물 등이 사용되어 왔다. 이에, 본 발명에서는 시료 용액에 있는 여러 가지 방해물질의 산화/환원 전위와 겹치지 않은 전자전달매개체로 고분자 사슬에 고정된 오스뮴 착화합물인 PAAMP-Os(Poly(acrylic acid)amino methyl pyridine-[Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)₂Cl₂]^{2+/3+})을 적용시킴으로써 휴대가 용이하면서도 정확하고 빠르게 표적물질을 정량할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<21> 본 발명의 목적은 난분해성 유해물질인 TMA를 정량적으로 검출하는 방법을 제공하는 데 있다.

<22> 본 발명의 다른 목적은 상기 TMA를 검출할 수 있는 바이오센서 및 이를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.

발명의 구성 및 작용

<23> 상기 목적을 달성하기 위해, 먼저 본 발명은 TMA 검출방법을 제공한다. 이하에서 더욱 구체적으로 설명한다.

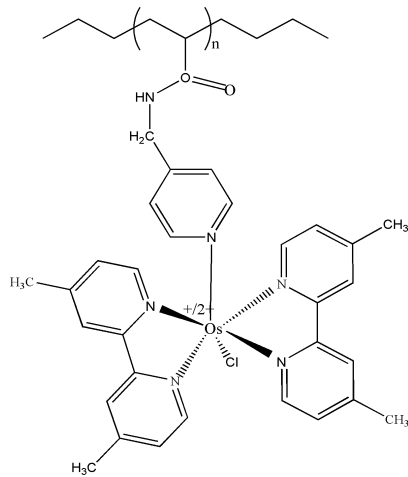
<24> 본 발명은 금 나노입자가 증착되고, 전자전달매개체가 고정된 작업전극 상에서 트리메틸아민 탈수소효소(TMADH)와 시료 중 트리메틸아민(TMA)과의 효소/기질 산화환원반응에 의해 발생하는 촉매전류를 전기 화학적 신호로 검출하는 트리메틸아민의 검출방법을 제공한다.

<25> 본 발명에 따른 검출방법에 사용되는 상기 작업전극으로는 스크린 프린팅 탄소반죽전극(SPE)를 사용하는 것이 바람직하다.

<26> 또한 본 발명에 따른 검출방법에 사용되는 상기 전자전달매개체로는 하기 화학식 1로 표시되는 오스뮴 착화합물인 PAAMP-Os를 사용하는 것이 바람직하다.

<27> 본 발명의 검출방법에 의해 측정되는 촉매전류는 TMADH와 TMA와의 효소/기질 반응에 의해 발생된다. 이러한 촉매전류의 크기는 트리메틸아민의 농도에 비례하며, 그 결과 트리메틸아민을 정량적으로 검출할 수 있다.

화학식 1



<28>

<29> 또한, 본 발명은 상기 트리메틸아민 검출방법에 사용되는 바이오 센서를 제공한다.

<30>

본 발명에 따른 상기 바이오센서는 작업전극으로서 OHP 필름상에 인쇄된 스크린 프린팅 탄소반죽전극(SPE)과; 기준전극으로서 Ag/AgCl 전극과; 상대전극으로서 백금전극과; 상기 작업전극 상에 증착되는 금(Au) 나노입자와; 상기 금 나노입자가 증착된 작업전극 상에 고정된 전자전달매개체로서 상기 화학식 1로 표시되는 오스뮴 착화합물인 PAAMP-Os(Poly(acrylic acid)amino methyl pyridine-[Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)₂Cl₂]^{2+/3+}); 및 상기 PAAMP-Os가 고정된 작업전극 위에 고정된 트리메틸아민 탈수소효소를 포함하여 구성될 수 있다.

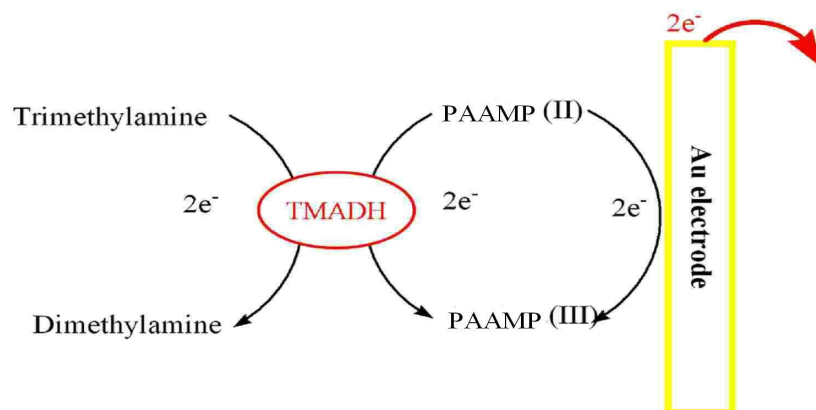
<31>

본 발명에 따른 상기 트리메틸아민의 검출방법과 이에 사용되는 바이오센서의 작동원리를 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

<32>

상기 바이오센서의 OHP 필름 위에, 인쇄된 작업전극인 탄소반죽전극 상에 표적물질인 트리메틸아민(TMA)를 정량적으로 인지하는 트리메틸아민 탈수소효소(TMADH)를 고정시키고, 상기 탈수소효소가 트리메틸아민의 농도에 비례하여 산화/환원반응을 통해 생성되는 전류를 측정함으로써, 시료 중의 표적물질(TMA)의 양을 전기화학적 신호로 정량적으로 측정하게 된다. 반응식 1 및 도 1에는 상기 탈수소효소와 표적물질인 트리메틸아민과의 효소/기질 반응을 나타내었고, 도 2 및 도 3에는 본 발명의 일 실시형태에 따른 작업전극, 기준전극 및 상대전극을 나타내었다.

반응식 1



<33>

<34>

반응식 1 및 도 1을 참조하면, 본 발명에 따른 트리메틸아민 검출방법 및 이에 사용되는 바이오센서는 트리메틸아민 탈수소효소(TMADH)와 시료 중 트리메틸아민과의 효소/기질 간 산화환원반응 결과 발생하는 촉매전류를 검출기로 송출하게 되고, 검출기에서는 이를 전기화학적 신호로 변환하여 시료 중 트리메틸아민의 양을 정량적으로 검출할 수 있다.

<35>

트리메틸아민의 검출 및 정량적 분석을 위해서는 적절한 전자전달매개체를 필요로 한다. 종래에는 페로센 및 페

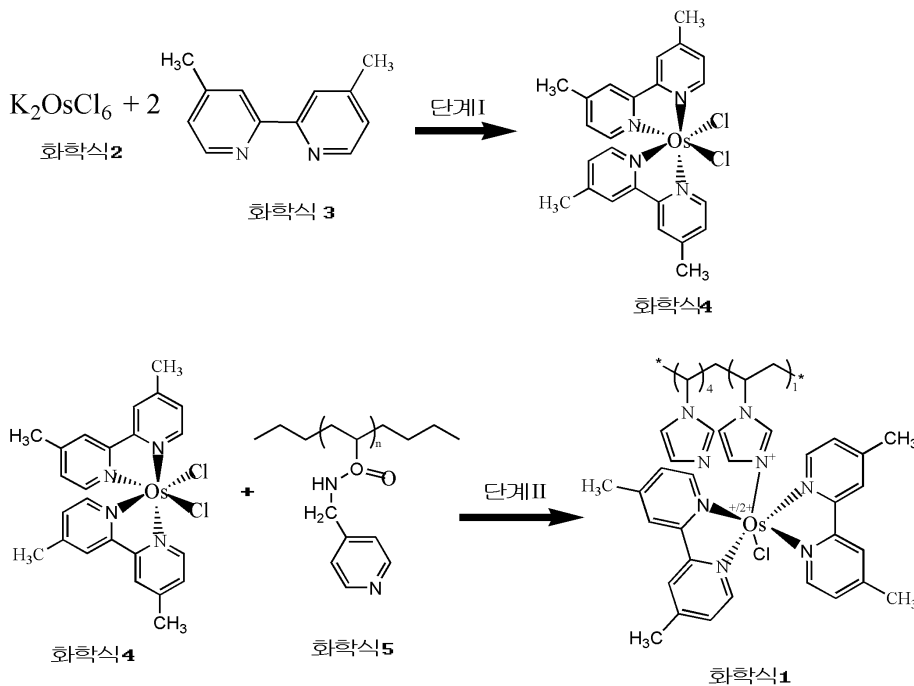
로센 유도체, 퀴논 및 퀴논 유도체, 헥사아민 루테늄 착화합물, 포타슘 페리엑사시아나이드, 오스뮴 착화합물을 포함하는 고분자 유기 전도성 염 또는 바이오로젠등 전자전달 유/무기물이 사용되었다. 이러한 전자전달매개체는 트리메틸아민 즉, 작업전극과 트리메틸아민 탈수소효소 간의 전자전달반응을 용이하게 일어나도록 시료 용액에 존재하는 여러 가지 방해물질의 산화/환원 전위와 겹치지 않는 것이 바람직하다. 이를 위해, 본 발명에서는 고분자 사슬에 고정된 오스뮴 착화합물인 상기 화학식 1의 PAAMP-Os를 사용하는 것이 바람직하다.

<36> 상기 화학식 1의 PAAMP-Os의 전자전달매개체는 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,

<37> 화학식 5의 포타슘 헥사클로로오스메이트(VI)를 화학식 3의 4,4'-디메틸-2,2'-디피리딜과 혼합한 후, 에틸렌글리콜을 혼합한 다음, 가온하여 화학식 4의 Os(dme-bpy)₂Cl₂ 복합체(Osmium complex) 제조하는 단계(단계 I); 및

<38> 상기 단계 I에서 제조된 화학식 4의 Os(dme-bpy)₂Cl₂ 복합체를 화학식 5의 폴리아크릴산 아민 메틸 피리딘과 혼합한 후, 에틸렌글리콜로 환원시키는 단계(단계 II)를 포함하는 방법으로 제조될 수 있다.

반응식 2



<40>

<41> 나아가, 본 발명은

<42> OHP 필름상에 인쇄된 작업전극인 스크린 프린팅 탄소반죽전극(SPE) 위에, $KAuCl_4$ 용액을 로딩하여 금(Au) 나노입자를 증착시키는 단계(단계 1);

<43> 금 나노입자가 증착된 상기 단계 1의 작업전극에, 전자전달매개체로서 제1항의 화학식 1로 표시되는 오스뮴 착화합물인 PAAMP-Os(Poly(acrylic acid)amino methyl pyridine-[Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)₂Cl₂]^{2+/3+})를 고정시키는 단계(단계 2); 및

<44> 전자전달매개체가 고정화된 상기 단계 2의 작업전극 위에, 트리메틸아민 탈수소효소(TMADH)를 고정시키는 단계(단계 3)를 포함하는 트리메틸아민 검출방법 및 이에 사용되는 바이오센서를 제조하는 방법을 제공한다.

<45> 본 발명에 따른 상기 바이오센서의 제조방법 있어서, 상기 단계 2는 상기 단계 1에 의해 금 나노입자가 증착된 작업전극 상에 3-머캅토프로피온산을 로딩하여 반응시킨 후, EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)와 NHS(n-hydrosuccine) 혼합액을 로딩하여 반응시킨 다음, 트리메틸아민 탈수소효소를 고정시키도록 구성된다.

<46> 또한, 본 발명에 따른 상기 바이오센서의 제조방법의 각 단계는 증착 또는 고정 후 증류수로 전극표면을 세척한 후 건조시킴으로서 다음, 단계를 수행하는 것이 바람직하다.

<47> 이하, 본 발명의 실시예에 의해 더욱 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

<48> <제조예 1> 전자전달매개체(오스뮴 착화합물, PAAMP-Os)의 제조

<49> 1) Os(dme-bpy)₂Cl₂의 제조

<50> 1 M의 포타슘 헥사클로로오스메이트(IV)를 2 M의 4,4'-디메틸-2,2'-디피리딜과 혼합한 후, 에틸렌글리콜을 첨가한 다음, 150 °C에서 1시간 동안 반응시켜 Os(dme-bpy)₂Cl₂를 얻었다.

<51> 2) PAAMP-Os의 제조

<52> 제조된 상기 Os(dme-bpy)₂Cl₂ 화합물을 폴리아크릴산 아민 메틸 피리딘과 동일한 양으로 혼합한 후 에틸렌글리콜로 환원시켜 최종적으로 오스뮴 착화합물인 PAAMP-Os를 제조하였다.

<53> <제조예 2> 트리메틸아민 탈수소효소의 분리 및 정제

<54> 트리메틸아민 탈수소효소의 분리 및 정제를 위한 모든 과정은 4 °C에서 수행하였다.

<55> 1) 세균 배양 조건

<56> 전남 목포앞바다 해수로부터 분리한 *Methylophaga aminisulfidivorans* MP^T(KCTC 10323BP)를 탄소원으로 0.45 부피% TMA 와 3 중량% 염화나트륨(NaCl)을 포함하는 30 °C의 표준광물기준배지(standard mineral base medium)에서 호기적으로 배양하였다.

표 1

<57> 표준광물기준배지의 구성

원소	중량
Na ₂ HPO ₄	2.34 g
KH ₂ PO ₄	6.1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂	0.01 g
Ferric EDTA solution ^a	0.1 ml
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.5 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.1 mg
Cobalt nitrate	0.1 mg
Sodium Borate	0.1 mg
Sodium molybdate	2.0 mg
증류수	1 l
^a Ferric EDTA solution은 17.9 g의 EDTA 용액과 증류수 186 ml에 용해된 3.26 g의 KOH용액을 함유하는 용액과 증류수 364 ml에 13.7 g의 FeSO ₄ ·7H ₂ O를 함유하는 용액을 혼합한 것으로서, 이를 대기하에서 철야 버블링한 후 갈색 유리병에 보관한 것이다.	

<58> 2) 가용성 분획물(soluble fraction)의 제조

<59> 상기의 방법으로 배양되어 지수성장기 말기에 들어선 균체는 10,000 × g로 10분간 원심분리하여 회수하였다. 회수된 균체 20 g에 25 mM 트리스-염산 완충용액(Tris-HCl buffer, pH 8.0, 표준 완충용액)로 1회 세척 후 원심분리하였다. 표준 완충용액을 넣어 재현탁시킨 후, DNA분해효소를 소량 첨가하고 초음파 분쇄기로 파쇄한 후, 15,000×g으로 30분 동안 원심분리하여 얻어진 상등액을 무세포추출물(cell free extract)로 사용하였다. 상기 상등액을 다시 100,000×g에서 90 분 동안 초원심분리하여 얻어진 상등액을 가용성 분획물로 얻었다.

<60> 3) 음이온 교환 컬럼크로마토그래피

<61> 상기에서 얻은 가용성 분획물 5 ml를 25 mM 트리스-염산 완충용액(Tris-HCl buffer, pH 7.0)으로 미리 평형화시킨 POROS 20 HQ 컬럼에 1 ml/min의 속도로 용출시켰다. 상기 컬럼에 결합된 단백질은 1 M의 염화나트륨이 들어 있는 트리스-염산 완충용액(Tris-HCl buffer)으로 농도구배하여 용출시켰으며, 각 분획물은 1 ml씩 수집하여 활성을 측정하였고, 각 분획물 중에서 활성이 있는 분획을 모아 농축하여 1차 정제 분획물을 얻었다.

<62> 4) 소수성 컬럼크로마토그래피

<63> 상기 1차 정제 분획물을 1.5 M 황산암모늄((NH₄)₂SO₄)로 미리 평형화시킨 후, 1.5 M (NH₃)₂SO₄로 미리 평형화시킨 페닐 소수성 컬럼(Phenyl hydrophobic column)에 1 ml/min의 속도로 용출시켰다. 상기 컬럼에 결합된 단백질은 pH가 8.0인 25 mM 트리스 염산 용액으로 용출시켜 모은 분획물 중 활성이 있는 분획을 모아 2차 정제 분획물을 얻었다.

<64> 5) 겔 여과 크로마토그래피

<65> 상기 2차 정제 분획물을 농축시킨 후 겔 여과 컬럼(Sephacryl S-200 gel filtration column)에 0.15 M 염화나트륨을 포함한 pH가 8.0인 트리스-염산 완충용액과 함께 0.8 ml/min 유량으로 흘려주었다. 상기 컬럼을 통해 얻어진 분획물 중에서 활성이 있는 분획을 모아 SDS-PAGE를 이용하여 각 단계별 정제도를 확인한 후, 트리메틸아민 탈수소효소를 얻었다.

<66> 6) 트리메틸아민 탈수소효소의 분자량 측정

<67> 상기 트리메틸아민 탈수소효소는 상기의 겔 여과 컬럼 정제 단계와 동일하게 수행한 후, 표준 단백질의 체류시간(예; β -amylase (200,000), alcohol dehydrogenase (150,000), bovine serum albumin (66,000), carbonic anhydrase (29,000), cytochrome c (12,400))과 비교하여 분자량을 측정하였다. 측정된 트리메틸아민 탈수소효소의 분자량은 123,000이었다.

<68> 하기 표 2에는 트리메틸아민 탈수소효소의 각 정제 단계에 따른 측정결과를 나타냈다.

표 2

	총 단백질량(mg)	총 활성도(U)	비활성도 (U/mg)	정제도(%)	수율(%)
무세포추출물	67.05	12.53	0.19	1	100
가용성분획물	42.16	10.04	0.24	1.27	80
이온교환컬럼	4.62	5.05	1.19	6.36	44
소수성 컬럼	0.61	1.32	2.18	11.66	11
겔 여과 컬럼	0.11	0.25	2.29	12.27	2

<70> 표 2에 나타난 바와 같이, 무세포추출물에서부터 네 단계를 거치는 동안 약 12 배 정도 정제되었고, 최종 수율은 2%였다. 정제된 트리메틸아민 탈수소효소의 최종 비활성도는 2.29 U/mg이었으며, 1 U는 분당 1 mol DCPIP를 환원시키는데 필요한 효소의 양으로 정하였다. 정제된 트리메틸아민 탈수소효소는 노란색을 나타내었으며 온도에 불안정하였다.

<71> 7) 트리메틸아민 탈수소효소의 활성의 측정

<72> 트리메틸아민 탈수소효소 활성은 Colby와 Zatman(1973)의 방법을 변형하여 측정하였다. 반응완충용액 3 ml에 pH 8.0의 트리스-염산 10 mM, 0.04 mM 2,6-디클로로페놀-인도페놀(2,6-dichlorophenol- indophenol, DCPIP), 1.1 mM 페나진 메토설페이트(phenazine methosulfate, PMS), 1.0 mM 시안화칼륨(KCN), 5 μ M 차아황산나트륨(sodium hydrosulfite), 10 μ M 중탄산나트륨(sodium bicarbonate)이 들어있으며, 기질로는 트리메틸아민 155 μ M 첨가하였고, 10 μ l의 트리메틸아민 탈수소효소 분획물 넣었다. 반응은 30 °C에서 트리메틸아민 탈수소효소를 넣은 직후 시작하였고 DCPIP 내에서 1분 동안의 흡광도 변화를 600 nm에서 측정하였다. 결과는 상기 표 2에 함께 나타내었다.

<73> 8) 트리메틸아민 탈수소효소의 기질 특이성 측정

<74> 기질 특이성 조사에서 사용한 기질들은 모노메틸아민(MMA), 벤질아민, n-부틸아민, 디메틸아민(DMA), 디에틸아민(DEA), 트리에틸아민(TEA) 및 트리메틸아민(TMA) 기질의 농도를 다르게 하여 활성을 측정한 후 각 기질의 K_m ,

$V_{\max}$ 값을 측정하고 $K_m/V_{\max}$ 값을 구하였다.

<75> TMA의 농도를 다양하게 하여 동일한 양의 효소와 반응시켰을 때 DCPIP의 흡광도 변화속도를 Michaelis-Menten 반응식으로 구하여 Hanes plot으로 나타냈다. TMA에 대한 $V_{\max}$ 는 7.934 nmol/min/mg protein 이고 K_m 은 1.5 μ mol이었다.

<76> 9) 2가 양이온에 따른 트리메틸아민 탈수소효소활성

<77> 효소의 활성화에 영향 주는 Cd^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} 및 Mn^{2+} 각각의 2가 양이온 1 mM 용액을 제조하여 처리하지 않은 효소의 활성과 비교하였다. 2가 양이온들이 효소에 미치는 영향을 상대적인 활성으로 조사하였다. Cd^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} 등의 2가 양이온들은 트리메틸아민 탈수소효소활성을 촉진시켰으나, Zn^{2+} 은 10%, Fe^{2+} 은 60% 효소활성을 억제하였으며, Cu^{2+} , Co^{2+} 와 Mn^{2+} 는 완전히 억제하였다.

<78> 10) 트리메틸아민 탈수소효소의 온도안정성 및 최적 pH 측정

<79> 최종 정제된 트리메틸아민 탈수소효소를 5 내지 70℃에서, 각각 10, 20, 30, 40, 50, 60분간 방치하면서 트리메틸아민 탈수소효소의 온도 안정성을 측정하여 도 5 및 도 6에 나타내었다. 또한 pH는 인산 완충용액과 트리스-염산 완충용액을 이용하여 pH 7.0 내지 10.0의 용액을 제조한 후 트리메틸아민 탈수소효소를 첨가하여 효소활성을 비교하여 도 6에 나타내었다.

<80> 도 5에 나타난 바와 같이, 트리메틸아민 탈수소효소는 55 ℃에서 가장 높은 활성을 보였다. 또한 도 6에 나타난 바와 같이, 60 ℃에서는 60분 경과 후에도 약 50%의 활성을 나타내었으나, 70 ℃에서는 10분 안에 대부분의 효소 활성을 잃었다. 따라서, 트리메틸아민 탈수소효소가 온도에 민감한 효소임을 알 수 있었다.

<81> 또한 도 7에 나타난 바와 같이, pH 8.5에서 가장 높은 활성을 나타내는 것을 알 수 있다.

<82> <실시예 1> 트리메틸아민 검출용 바이오센서의 제작

<83> 1) 스크린 프린팅 탄소전극(screen-printing carbon electrodes; SPE), 기준전극 및 상대전극의 제작

<84> 반자동 인쇄기(반도산업, 한국, 모델번호 BS-860AP)를 이용하여 스크린 프린팅 탄소전극을 OHP 필름(SK, 한국)에 인쇄한 후, 70 ℃에서 30 분간 건조하였다. 건조된 상기 스크린 프린팅 탄소전극을 측정 시료를 로딩하는 작업전극으로 사용하고, 기준전극으로는 Ag/AgCl 전극(ESA, EE009)을 사용하였으며, 상대전극으로는 백금 선을 사용하여 바이오센서의 전극부를 구성하였다(도 2 및 도 3 참조).

<85> 2) 금 나노입자의 증착

<86> 포타슘 테트라클로오레이트(III)(Potassium tetrachloroaurate(III) $KAuCl_4$) 7.56 mg을 1 M의 황산용액 10 ml에 녹여 2 mM의 $KAuCl_4$ 용액을 제조하였다. 제조된 $KAuCl_4$ 용액 40 μ l를 작업전극 위에, 로딩하고, 기준전극과 상대전극을 $KAuCl_4$ 용액에 접촉시킨 후, 660B 전기화학 워킹스테이션(660B Electrochemical Workstation)의 시간 전위차 범으로 반응시켜 금 나노입자를 흡착시켰다. 반응 후 상기 작업전극 위에, 증착된 금 나노입자의 모양을 전자주사현미경(JEOL)으로 측정하고 그 결과를 도 9에 나타냈다

<87> 3) 전자전달매개체의 고정화

<88> 다음으로, 금 원소가 증착된 작업전극 위에, 1 mM의 3-머캅토프로피온산(3-mercaptopropionic acid) 40 μ l를 로딩하고 상온에서 1 시간 동안 반응을 시켰다. 반응 후 증류수로 작업전극 표면을 세척하고 상온에서 건조한 다음, EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) 50 mg이 인산완충용액(PBS) 300 μ l에 용해되어 있는 용액 20 μ l과 n-히드로숙신(n-hydrosuccine; NHS) 30 mg이 PBS 300 μ l에 용해되어 있는 용액 20 μ l을 혼합한 용액을 작업전극 위에, 로딩하여 상온에서 1 시간 반응시켰다. 반응 후 다시 증류수로 작업전극 표면을 세척하여 상온에서 건조한 후, 상기 제조에 1에서 제조한 오스뮴 착화합물 1 mmol를 로딩하고 상온에서 1 시간 동안 반응시켜 증착되어있던 금 나노입자들을 고정화시켰다.

<89> 상기 반응종료 후, 작업전극을 증류수로 세척 및 건조시킨 다음, 40 μ l PBS를 로딩하고 기준전극과 상대전극을 이 용액에 접촉시킨 후, 660B 전기화학 워킹스테이션의 순환전압전류법으로 오스뮴 착화합물이 작업전극 위에, 고정화되었는지 여부를 전류가 통하는 것을 확인함으로써 고정화 여부를 확인하였다.

<90> 4) 트리메틸아민 탈수소효소의 고정화

<91> 전기화학적 방법으로 오스뮴 착화합물이 작업전극 위에, 고정화된 것이 확인된 작업전극 위에, 트리메틸아민을 산화시키기 위한 트리메틸아민 탈수소효소를 인산완충용액에 5 mg/ml로 고정시키고, 본 발명에 따른 트리메틸아민 검출방법 및 이에 사용되는 바이오센서를 완성하였다.

<92> <실험예 1> 본 발명에 따른 바이오센서를 이용한 트리메틸아민의 검출

<93> 상기 실시예에 의해 제작된 바이오센서를 이용하여 다양한 농도의 트리메틸아민의 촉매산화전류를 측정하였다.

<94> 금 나노입자가 코팅된 탄소반죽전극 위에 고정된 오스뮴 착화합물에 트리메틸아민 탈수소효소를 혼합하여 잘 섞어주고 기질로서 트리메틸아민을 농도별(0.125, 0.25, 0.375 및 0.5 mM)로 첨가하면서 산화/환원반응에서 발생하는 촉매산화전류를 측정하였다. 또한, 촉매전류가 나타나는 전위의 위치 중 전류 값이 일정하게 유지되는 한 지점을 0.3 V(vs. Ag/AgCl)로 고정하고 검정곡선을 도시하여 트리메틸아민의 농도에 따라 발생하는 촉매전류의 상관관계를 확인하고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

<95> 도 8의 (a)에 나타난 바와 같이, 트리메틸아민의 농도가 증가함에 따라 정량적으로 촉매산화전류가 증가함을 알 수 있다. 즉, 산화전류 값에 따른 트리메틸아민의 농도를 비례적으로 정량할 수 있음을 확인하였다. 이러한 결과로부터, 도 8의 (b)에 나타난 바와 같이, 트리메틸아민 탈수소효소에 의한 트리메틸아민의 산화반응시에 발생하는 촉매산화전류를 정량적으로 얻음으로써 다양한 트리메틸아민 농도에 대한 검정곡선을 얻을 수 있음을 알 수 있다.

발명의 효과

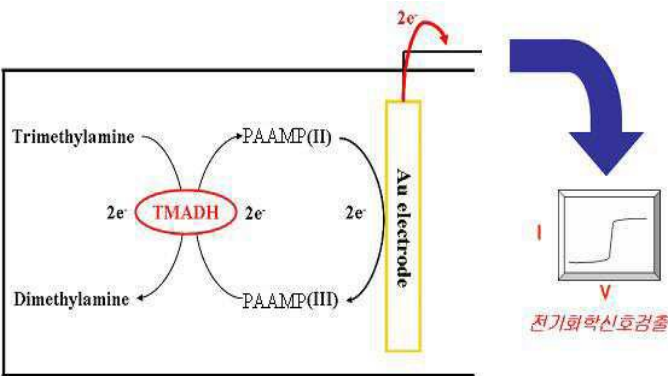
<96> 본 발명에 의한 트리메틸아민 검출방법 및 이에 사용되는 바이오센서는 휴대가 용이하고 정량 검출이 가능하므로, 유해한 트리메틸아민을 현장에서 정량적으로 검출할 수 있기 때문에 이를 효과적으로 제거할 수 있는 근거를 제시함으로써 환경오염으로 인한 악취 및 생태계 파괴를 방지하는 데 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

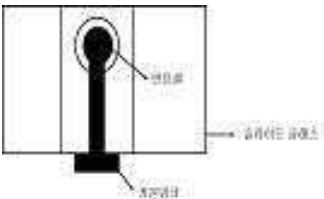
- <1> 도 1은 본 발명의 일 실시형태에 따른 트리메틸아민 검출용 바이오센서의 개념도이고;
- <2> 도 2는 본 발명의 일 실시형태에 따른 스크린 프린팅 탄소전극이고;
- <3> 도 3은 본 발명의 일 실시형태에 따른 작업전극, 기준전극 및 상대전극을 포함하는 전극부를 나타내는 개념도이고;
- <4> 도 4는 본 발명의 일 실시형태에 따른 바이오센서를 촬영한 사진이고;
- <5> 도 5는 트리메틸아민 탈수소효소의 온도에 따른 활성도를 측정한 결과를 나타낸 그래프이고;
- <6> 도 6은 트리메틸아민 탈수소효소의 온도와 시간에 따른 활성도를 측정한 결과를 나타낸 그래프이고;
- <7> 도 7은 트리메틸아민 탈수소효소의 pH에 따른 활성도를 측정한 결과를 나타낸 그래프이고;
- <8> 도 8은 본 발명의 일 실시형태에 따른 바이오센서를 이용하여 트리메틸아민의 농도에 따라 발생하는 촉매산화전류의 변화를 측정한 결과(a) 및 검량곡선(b)을 나타낸 그래프이고;
- <9> 도 9는 본 발명의 일 실시형태에 따른 바이오센서의 작업전극 위에, 증착된 금 나노입자의 형태를 나타낸 SEM 사진($\times 70000$)이다.
- <10> 도 10은 본 발명의 일 실시형태에 따른 바이오센서의 작업전극 위에, 증착된 금 나노입자의 형태를 나타낸 SEM 사진($\times 1000$)이다.

도면

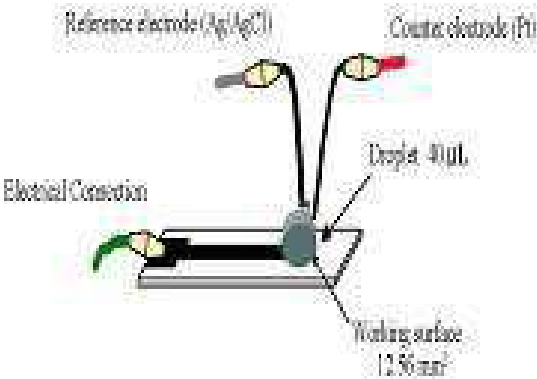
도면1



도면2



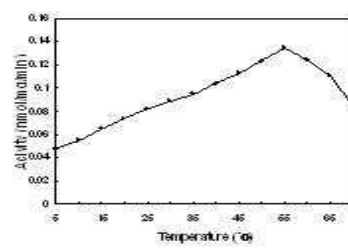
도면3



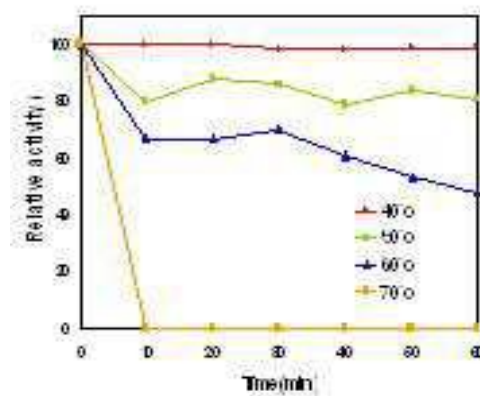
도면4



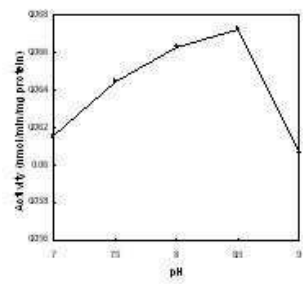
도면5



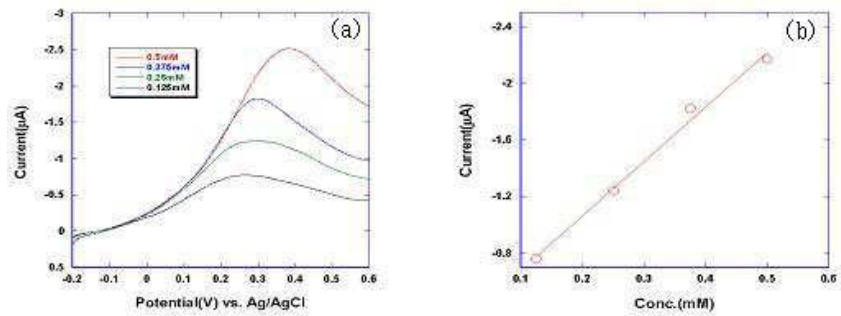
도면6



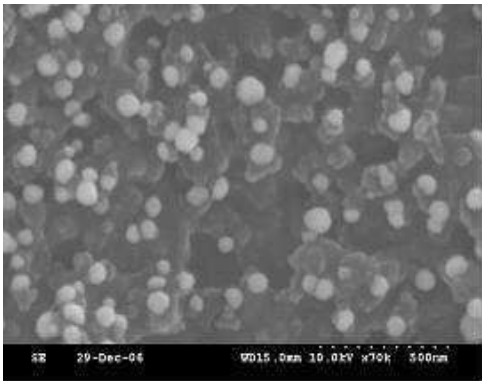
도면7



도면8



도면9



도면10

