

## Immobilization of enzymes on magnetic nanoparticles for biochip applications

Sohn Ok-Jae, Jong Il Rhee

Faculty of Material Chemical Engineering · Biochemical Engineering, Faculty of Applied  
Chemical Engineering, BioProcess Technology Lab.

TEL: +82-62-530-0847, FAX: +82-62-530-0846

### Abstract

In this work immobilization technique of enzymes onto the magnetic nanoparticles has been developed for biochip applications. Glucose oxidase and lactate dehydrogenase were immobilized on magnetic nanoparticles via cyanamide and glutaraldehyde. Immobilized enzymes had good operational and storage stability. The immobilized glucose oxidase and lactate dehydrogenase were characterized by some factors(pH, temperature, and components of buffer solution etc) which affect the activity. In order to characterize the magnetic nanoparticles, we have used transmission electron microscopy(TEM), X-ray diffraction(XRD) and Fourier transform infrared(FTIR).

### 서 론

분석 시스템의 소형화에 대해서 최근 수 년 동안 많은 연구들이 진행되었다. 소형화 된 분석시스템은 분석 시약의 소비량 감소로 다른 분석시스템에 비해서 경제적이며, 휴대성이 용이함으로 넓은 분야에 걸쳐 이용 가능하다. 그러나 효소를 이용한 분석에 있어서 시스템의 소형화만으로는 경제성을 극복할 수가 없다. 따라서 분석시스템의 소형화와 더불어 효소의 고정화 기술도 함께 연구되어야 한다. 지금까지 개발되어지고 사용중인 효소의 고정화는 고정화 담체의 입자크기를 뿐만 아니라 고정화 효소를 격리시킬 수 있는 막을 필요로 하고 있다. 이러한 기존의 효소 고정화 방법이 분석시스템의 소형화를 제한하고 있는 것이 현재의 실정이다. 최근 자기성 나노입자(magnetic nanoparticles)를 이용한 단백질이나 효소의 고정화, 면역분석법, 약물전달, 그리고 생물센서 분야가 큰 관심을 끌고 있다. 일반적으로 자기성 나노입자는 수 nm에서  $\mu\text{m}$ 의 크기를 갖는다. 따라서 자기성 나

노입자는 넓은 표면적으로 인해 보다 많은 양의 효소를 결합시킬 수 있다. 그리고 낮은 물질전달 저항을 지니며, 고정화 된 효소는 반응 혼합물로부터 선택적 분리가 용이하고, 격리막을 사용하지 않고도 자기장을 이용하여 격리시킬 수 있다는 큰 이점을 지니고 있다. 본 연구에서 사용한 자기성 나노입자로서  $Fe_3O_4$ 는 강한 자기성 물질이며, 낮은 독성을 지니고, 많은 생체활성물질 즉, 효소, 단백질, 항체, 항암제와 결합할 수 있다. 본 연구에서는 glucose oxidase(GOD)와 lactate dehydrogenase(LDH)를 자기성 나노입자( $Fe_3O_4$ )에 고정화하는 기술을 개발하고 이들의 물리·화학적 특성 및 구조에 대해 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 2.1. 시약 및 효소

본 연구에서는 자기성 나노입자를 합성하기 위해 Ferric chloride(Sigma Co.)과 Iron(III) chloride anhydrous(Sigma Co.)를 사용하였다. 그리고 Ammonium hydroxide(28 %  $NH_3$  in water, ALDRICH Co.)을 사용하였다. 효소는 Glucose oxidase(Sigma Co.), Peroxidase(Sigma Co.)를 사용하였고 나머지 시약들은 모두 분석등급을 사용하였다.

### 2.2. 사용기기

자기성 나노입자에 고정화된 GOD 및 LDH의 저장 안정성을 조사하기 위해 UV-spectrophotometer(Opizen2120, Mecasys Co., Korea)와 형광분광계(Spectrofluorometer F-4500, Hitachi Co., Japan)를 사용하였다. 또한 조작 안정성을 살펴보기 위해 본 실험실에서 구성한 SIA(Sequential Injection Analysis)시스템 및 검출기(Spectra 2000, USB2000, Ocean optics Co., USA)를 이용하였다.

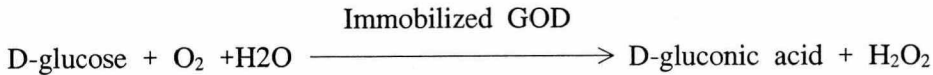
### 2.3. 자기성 나노입자의 합성

본 연구에서 고정화 효소의 담체로 사용된 자기성 나노입자의 합성은  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  수용액과  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  수용액을 2:1의 몰비율로 혼합하고 암모니아수를 가한 후 80 °C에서 30분간 가열했다. 그 후 여러 차례에 걸쳐 물과 에탄올로 세척하였다. 그리고 얻어진 자기성 나노입자는 70 °C에서 진공건조 시켰다.

### 2.4. 자기성 나노입자에 효소의 고정화

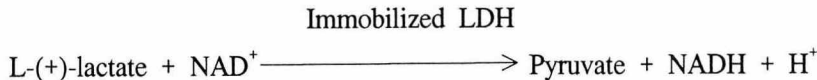
GOD와 LDH를 자기성 나노입자에 고정화하기 위해 2 mL의 완충용액(0.1 M phosphate, pH 6.0)과 0.5 mL의 Cyanamide 용액을 넣은 후 10분간 sonication 하였다. 그리고 2.5 mL의 효소용액(GOD와 LDH 각각 500 Units)과 glutaraldehyde를 첨가하고 30분간 sonication 하였다. 그 후 4 °C 냉장상태에서 하루동안 반응시켰다.

## 2.5. 효소반응



자기성 나노입자에 고정화 된 GOD의 활성을 측정하기 위해 위에 나타낸 반응식과 같이 고정화 GOD에 의해 생성된 과산화수소를 HRP와 ABTS로 반응시켜 환원된 ABTS를 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

그리고 고정화 된 LDH의 활성을 측정하기 위해 형광분광계를 사용하여 아래의 반응식과 같이 생성된 NADH를 340 nm (excitation wavelength)/440 nm (emission wavelength)에서 형광세기를 측정하였다.



## 결과 및 고찰

Biochip에 응용하기 위해 자기성 나노입자에 효소의 고정화 기술을 개발하였다. GOD와 LDH를 각각 500, 100 U을 고정화 담체인 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(magnetic nano particles)와 cyanamide 및 glutaraldehyde를 반응시켜 고정화 하였다. 그리고 고정화 된 효소의 결합 및 활성 안정상태를 조사하기 위해 저장 안정성과 조작안정성을 조사하였다. 우선 고정화 효소의 저장 안정성은 각각의 효소를 고정화 한 후 20일 동안 하루 5회 효소반응시켜 활성을 테스트 하였다. 그 결과 고정화 GOD의 경우 고정화 후 20일 동안 효소의 활성은 50% 이상 유지하였고, LDH의 경우 20일 동안 80% 이상을 유지하였다. 또한 고정화 효소의 조작안정성을 살펴보기 위해 24시간 동안 연속하여 효소반응을 시켜본 결과 고정화 GOD는 70% 이상 그리고 고정화

LDH는 85 % 이상 효소의 활성이 유지됨을 알 수 있었다. 그리고 고정화 조건을 달리하여 효소와 자기성 나노입자간의 결합 효율을 조사하였고, 완충용액의 pH, 조성 그리고 반응온도가 고정화 효소활성에 미치는 영향을 살펴보았다. 또한 TEM(Transmission Electron Micrographs)을 통하여 자기성 나노입자의 크기 및 구조와 효소가 고정화 된 자기성 나노입자의 구조를 고찰하였고, XRD와 FTIR 스펙트럼을 통하여 자기성 나노입자의 특성을 규명하였다.

### 요약 및 전망

본 연구에서는 Biochip 응용을 위해 자기성 나노입자에 효소를 고정화하는 기술을 개발하였다. 고정화 효소의 실제 소형 분석시스템에서의 사용가능성을 알아보기 위해 저장 및 조작 안정성을 조사하였고, 각종 물리·화학적 변수들이 고정화 효소에 미치는 영향을 살펴보았다. 또한 TEM, XRD 그리고 FTIR을 통하여 자기성 나노입자의 특성을 알아보았다. 향후 본 연구에서 개발된 효소의 고정화 기술을 이용하여 Biochip을 개발하고 이를 생물공정에 도입하여 각종 미생물의 기질 및 생산물을 분석하고자 한다.

### References

1. Chen, D. H., M. H. Liao (2002), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **16**, 283-291.
2. 이종일 (2003), *Journal of the Research Institute for Catalysis* **24**, 75-80.
3. Shahanara, B. G., G. M. Greenway, T. McCreedy, R. Shaddick (2003), *Analytical Chimica Acta*. **486**, 149-157.