

TCE, PCE 측정을 위한 바이오센서의 특성

류두현, 김용미, 최상일*

전주대학교 자연과학부 환경과학과, *광운대학교 환경공학과

<요약문>

A sol-gel fiber-optic biosensor with encapsulated pH-sensitive fluorophore and immobilized genetically modified toluene-o-xylene monooxygenase was developed to detect TCE and PCE, which are carcinogenic chlorinate organic compounds prevailing in ground water. The sensitivity was characterized for the composition of sol-gel, and manufacturing procedure. The intensity curve reveals a linear range of intensity for pollutant concentration range of 0.01ppm and 1ppm. The change in intensity was appeared to be larger at each of λ for same condition, and, therefore, the wavelength of λ was chosen for the analytical measurement.

key word: biosensor, pce, fiber optics

1. 서 론

오늘날 세계적으로 지하수와 토양의 주요 오염원로 주목받고 있는 물질은 polychlorinated biphenyls(PCBs), dioxins, chlorophenols, chlorinated benzoates와 같은 염화방향족화합물들, 그리고, PCE, TCE, chlorinated alkanes와 같은 휘발성 염화지방족화합물들이다. 이 가운데에서도 PCE와 TCE는 오염토양 및 지하수에서 가장 빈번히 검출되고 있다. PCE를 비롯한 염화에틸렌은 세계적으로 연간 백만톤 이상이 생산되고 있으며, 드라이클리닝, 금속, 기계, 전자 및 화학 등 여러 산업분야에 광범위하게 사용되어 왔으나, 관리의 소홀, 보관시설로부터의 누출 등에 의해 지하수와 토양오염을 유발하여 왔다[1]. 우리나라의 경우도 새로 개정된 토양과 지하수에 관한 법규에 따라 주요 측정 물질로 포함되었다. 이들 중, PCE와 TCE 등은 산업체의 세정제나 드라이클리닝 용제로 대량 사용되어 왔고, 부적절하게 취급되고 방출되어 주요 오염원이 되었다. 반면, DCE와 VC 등은 방출된 PCE와 TCE 등이 생태계 내에서 미생물에 의해 환원 탈염소화 반응에 의하여 형성된다. 이들 화합물 중, 중간 분해 생성물인 VC는 발암성 물질로, PCE와 TCE는 발암유발 의심물질로 구분되고 있다[2]. 따라서 이러한 오염물질을 in-situ로 monitoring 할 수 있는 sensor의 개발이 요구된다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 미생물의 활성화 및 효소의 정제

특이성이 개선되어 TCE에 대한 분해능이 가장 우수하다고 판명된 E. coli TG1 pBS TOM Green,와

PCE에 대한 분해능이있는 E. coli TG1 pBS TxMO를 선택하여, 분해 효소인 toluene-o-xylene monooxygenase 특성을 비교하고 효소를 이용한 센서에 사용하기 위하여 정제법을 개발하였다. 상기 두 미생물을 적절한 활성을 유지하기 위하여 LB 배지에서 37°C에서 overnight(16시간~18시간) 배양하고 이를 다시 새로운 LB 배지에 OD600 0.05 이하로 접종한 후 OD600 2(stationery phase)까지 배양하였다. E. coli TG1 pBS TOM Green은 항상 kanamycin의 최종농도가 100µg/ml로하여 배양하여 TOM 효소의 활성을 유지하도록 하였고, E. coli TG1 pBS TxMO는 kanamycin의 최종농도가 50µg/ml로하여 배양하였다. OD600 2까지 배양한 각 미생물을 원심분리하여 세포를 선별한 후 phosphate buffer(0.1M PPB, pH 7)로 3회 세척하였다. 선별된 세포를 상기 phosphate buffer로 희석하여 현탁액을 제조하였다. 제조된 세포 현탁액은 얼음물 속에서 초음파 분쇄기(Soniprep 150 MSE, UK)로 30초/회로 4회 sonication 시켰다. 추출된 crude enzyme은 바로 4°C, 12,000rpm에서 40분간 원심분리 하였다. 분리된 crude enzyme 5ml에 Dnase I(Takara, Japan)10µl를 넣고 상온에서 15,000rpm에서 60분간 원심분리 하였다. Dnase I를 포함하는 효소를 -70°C에서 보관한 후, 적절한 농도로 희석하여 사용하였다. 정제된 효소는 냉장고에서 냉동 보관하여 사용하였다[3].

2.2 Sensor의 제조

Sol-gel 형성의 방법은 organic sillicate 한 성분만을 이용하는 방법과 inorganic sillicate까지 두 성분 모두 이용하는 방법이 있다. 문헌조사와 기초 실험을 통해 여러 가지 방법 중 가장 sol-gel 형성이 잘되는 방법을 선택하였다. Sol-gel 형성의 방법은 Makyote and Collinson[4] 방법을 참조하여 제조 하였다. Hybrid silica solution을 제조하기 위하여 PTMOS(phenyltrimethoxysilane, Sigma)와 TEOS (Tetraethoxysilane, Sigma) 및 H₂O, 촉매를 적절한 비율로 조정하였으며, 이 비율은 sol-gel형성에 중요한 역할을 한다. 상대적인 조성을 변경한 Hybrid silica solution은 PTMOS와 TEOS의 몰비율이 약 2:1 정도를 유지하도록 하였다. 유리 바이얼에 증류수 0.63ml를 넣고 에탄올(96%, Hayman)을 넣은 후, TEOS 1ml PTMOS 0.36ml넣고 마지막으로 HCl(0.1M)을 0.31ml를 넣었다.

상기에서 제조된 용액을 15분동안 sonication(Branson 2210, USA)한 후, 실온에서 overnight 하여 안정화 시켰다. 이러한 용액 1ml에 지시약으로 쓰인 3mg의 Fluoresceineamine(FLA isomer II, sigma)을 넣어 sol-gel/indicator solution을 제조하였다.

제조된 sol-gel/indicator plate를 만들기 위해 센서용 3층의 원형 판을 만들기 위한 유리부분을 유리판 (cover galss, 10mm diamter)을 이용하였다. 이를 염산용액으로 세척하고 물과 에탄올로 다시 세척한 후 건조시켰다. 건조된 유리판을 평평한 위치에 놓고 제조된 유리판 위에 sol-gel/indicator solution을 4 µl떨어뜨린다. 1~2분 후 완전건조 되기전, gel이 형성 되었을 때, membrane을 붙이지 않고 제조하거나 유리판의 크기와 같게 만들어진 Durapore membrane(HVLP 2500, Millipore)을 올려놓은 후 가볍게 압착시켰다.

이렇게 제조된 glass/sol-gel/membrane 3층을 curing 온도에 따라 건조하거나 4°C에서 40%의 습도를 유지하면서 overnight 건조시키는 등 각 조건에 따라 실험하였다. Overnight 건조된 판은 효소 및 미생물을 고정화시키기 전 PPB에 30분 동안 담귀 sol-gel solution제조 중 반응되지 않은 산을 중화시켜 안정화시킨 후 건조시켜 제조하였다[5].

(b)는 (a)의 sensing probe 부분에 들어갈 부분이다. Screwable terminal holding ring안에는 효소가 고정화된 멤브레인, sol-gel/indicator layer, supporting glass disk의 3층판이 들어가고 이를 움직이지 않게 하기 위하여 'O'ring으로 고정시키고 돌려서 막아준다(Fig. 1).

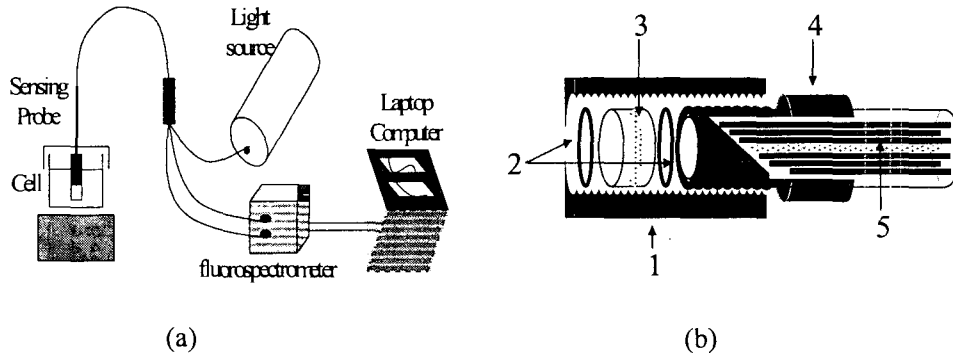


Fig. 1. 실험 장치의 개략도

- 1 : Screwable terminal holding ring
- 2 : Sealing 'O' rings
- 3 : Biosensing sandwich (left to right : Durapore membrane with immobilized enzyme, middle sol-gel/indicator layer, supporting glass disk)
- 4 : Probe tip
- 5 : multi-element optical fiber

2.3 효소의 고정화 및 특성 실험

Glutaraldehyde(8% aqueous solution, Grade I, Sigma)의 단백질을 결합할 수 있는 능력을 이용해 결합하여 고정화시켰다. 이 작업을 안정하게 하기 위해 효소의 활성을 유지할 수 있게 주의해야하며 또, bovine serum albumin(BSA, sigma)를 첨가하여 고정화되는 효율을 증가시킬 수 있도록 하였다. 효소와 phosphate buffer(5mM, PPB)등을 섞어 working enzyme solution(A)을 제조하고, 굳히는 물질 즉, glutaraldehyde(8% aqueous solution, Grade I, Sigma)가 함유되었있는 용액을 working glutaraldehyde solution(B)을 제조하였다. B용액은 phosphate buffer(5mM, PPB) 100 μ l에 glutaraldehyde 40 μ l를 혼합하여 만들어진 것을 stock으로 하며, 냉동보관하여 사용하였다.

상기 서술한 바와같이 최종 PPB 접촉후 건조된 3층의 원형 판을 평평한 곳에 놓고 유리층이 바닥로 하여 membrane 층이 상부를 향하게하였다. 상부표면에 B용액 20 μ l와 A용액 80 μ l를 재빨리 섞고 혼합액 중 10 μ l를 습한 바깥면에 떨어뜨린다. 잘 펼친 후 상온에서 건조시킨 후, 건조된 3층의 원형 판을 실험에 사용하였다.

2.4 센서의 특성 실험

상기 기술된 바와같이 효소를 고정화하여 제조된 센서를 fiber optic부분에 연결하고 오염물질 TCE, PCE의 농도를 0.01, 0.03, 0.1, 1, 10, 100 ppm로 증가시키며 회분식으로 반응시켜 intensity의 변화를 측정하였다. TCE, PCE는 휘발성이 강한 물질이므로 물을 용매로 사용할 때 용해도가 낮으므로 N,N-Dimethylformamide에 녹여 제조하고 최종농도에 맞게 사용하였다. 실험에 사용된 오염물질 용액은 enzyme의 활성을 유지할 수 있도록 hydrogen peroxide shunting법을 이용하여 조효소 역할을 할 수 있는 과산화수소(Hydrogen peroxide)가 120mM로 유지된 용액을 사용하였다.

3. 실험결과

수용상 중 오염물질 TCE, PCE의 농도의 증가에 따라 반응하여 센서는 시간에 따라 intensity가 계속 변화하였다. 약 20분 정도후 intensity가 큰폭으로 변화하지 않는 안정한 상태로 수렴되었다(Fig.2).

Intensity의 변화는 TCE, PCE의 농도가 증가함에 따라 0.01ppm에서 1ppm까지는 선형으로 증가하며 그 이상의 농도에서는 급격히 포화되는 양상을 보였다. TCE보다 PCE의 경우 intensity 변화폭이 더 크게 나타났으며, TOM이 경우 TxMO보다 상대적으로 더 큰 변화를 나타내었다. 각 효소로 제조된 센서의 검출한계(detection limit)는 10ppb이하로 나타났다(Fig. 3-4).

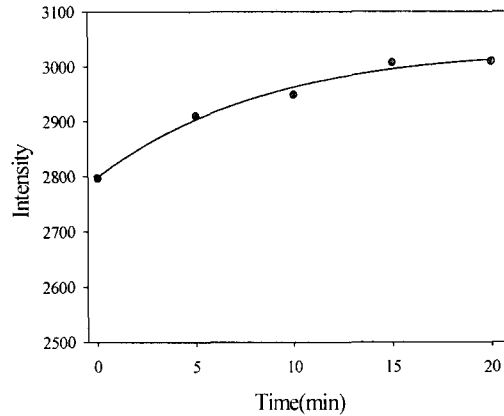


Fig. 2. Intensity change curve of the time.

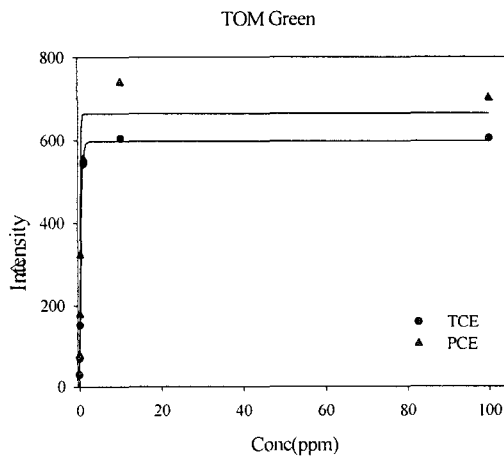


Fig. 3. Δ Intensity change of a biosensor using TOM for TCE and PCE variations.

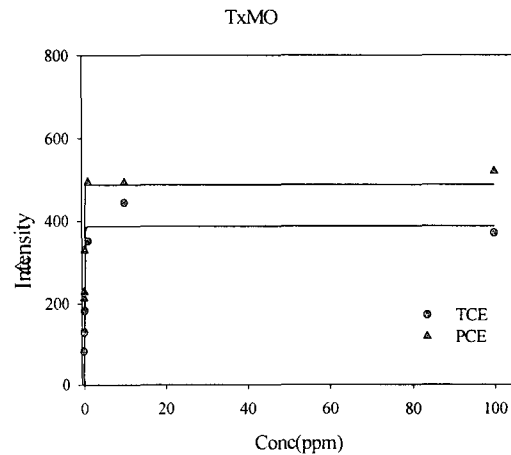


Fig. 4. Δ Intensity change of a biosensor using TxMO for TCE and PCE variations.

참고문헌

1. McCarty PL(1997), Breathing with chlorinated solvents, Science, Vol. 276. pp1521-1522.
2. ATSDR., Priority List of Hazardous Substances, 1997, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
3. W. M. de Azevedo and D. J. Brondani(2001), "Formic acid an efficient solvent to prepare polyaniline/silicate glass composite using sol-gel technique", Journal of Non-Crystalline Solids, Volume 296, Issue 3: 224-229.
4. Makote, R., Collison, M (1999)."Organically modified silicate films for stable pH sensors." Anal. Chim. Acta 394 195-200.
5. Vangelis G. Andreou and Yannis D. Clonis(2002), "A portable fiber-optic pesticide biosensor based on immobilized cholinesterase and sol-gel entrapped bromocresol purple for in-field use", Biosensors and Bioelectronics, 17(1-2), 61-69.