Journal of the Korean Chemical Society
1997, *Vol. 41, No. 7*
Printed in the Republic of Korea

닭의 간조직을 이용한 과산화수소 정량 바이오센서

尹吉重 · 卞相湧[†] · 權孝植[‡]
청주대학교 이공대학 화학과
[†]부경대학교 자연대학 화학과
[‡]충북대학교 사범대학 과학교육과
(1997. 3. 24 접수)

Chicken Liver Tissue-Based Amperometric Biosensor for the Determination of Hydrogen Peroxide

Kil-Joong Yoon, Sang-Yong Pyun[†], and Hyo-Shik Kwon[‡]
Department of Chemistry, Chongju University, Chongju 360-764, Korea
[†]Department of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-739, Korea
[‡]Department of Science Education, Chungbuk Nationtional University, Chongju 360-763, Korea
(Received Merch 24, 1997)

요 약. 과산화수소의 정량을 위하여 닭의 간조직과 ferrocene을 탄소반죽에 혼입시켜 만든 전류법 바이오센서의 감응 특성이 조사되었다. 또한 조사된 전극 퍼텐샬 범위(−0.5~+0.05 V *vs* Ag/AgCl) 내에서 $t_{95\%}$=13 sec의 빠른 감응시간과 5.1×10^{-5} M(S/N=3)의 검출한계를 보여 주었으며, 감응에 방해가 된다고 여겨지는 물질들에 대하여 좋은 선택성을 보여 주었다. 생촉매 안정성이 좋았으며, 이동매체를 사용하지 않는 전극의 제조 가능성을 제시하였다.

ABSTRACT. The response characteristics of a new biosensor, which was developed by co-immobilisation of chicken liver tissue and ferrocene in a carbon paste matrix for the amperometric determination of hydrogen peroxide, was evaluated. In the range of electrode potential observed (−0.5~+0.05 V *vs* Ag/AgCl), the bioelectrode showed the response time ($t_{95\%}$) as low as 13 sec and the detection limit of 5.1×10^{-5} M, and exhibited a good selectivity in the case of the addition of the possible interferents tested. Also it offered a high biocatalytic stability and opened up the possibility for the construction of a mediatorless biosensor.

서 론

Clark 등[1]이 생물체에 포함된 효소를 이용하여 만든 전기화학 바이오센서(electrochemical biosensor)의 효용성을 제시한 이래로, 최근 효소전극에 대한 많은 연구가 활발히 이루어지고 있다. 생물계 내에서 한 효소가 단일 화학반응 또는 관련된 한벌의 화학반응에서 촉매작용을 할 경우, 기질에 대한 특이성의 정도는 대단히 크며 사실상 절대적일 경우가 많다. 또 효소에 의하여 촉매된 반응은 촉매되지 아니한 반응에 비하여 적어도 백만배 이상 그 속도가 촉진된다. 따라서 효소전극을 작업전극으로 이용하여 정량할 경우 효소의 특이성(specificity)에 의하여 방해물질의 영향을 극소화할 수 있고, 촉매작용에 의하여 빠르게 분석할 수 있는 장점을 갖고 있다.

이에 근거하여 고안된 바이오센서의 감응 원리를 요약하면 다음과 같다. 효소는 활성위치의 부위가 덩어리가 큰 단백질에 의하여 둘러 쌓여 있는 구조로 되어 있다. 따라서 그 분자내에 깊숙히 파묻혀 있는 활성부분이 전극에 근접되지 않으므로 효소 자체의 산화-환원반응을 전기화학적으로 행하는 것은 용이하지 않다. 이와 같은 경우 전극으로부터 전자를 받아 효소의 활성 부위까지 깊숙히 침투하여 전자를 운반하여 줄 수 있는 중간역의 작은 분자를 활용한다면, 효소를 쉽게 산화-환원시킬 수 있다.

이와 같이 전자 운반역할을 하는 분자를 전자이동 매체(mediator) 또는 전자 shuttle이라고 하며, 이때 흐르는 전류를 측정하는 것이다.[2] 위와 같은 방법에 의하여 Bonakdar 등은 버섯에 포함된 tyrosinase를 탄소전극에 고정시켜 phenol을 정량하였고,[3] Gunasingham 등은 tetrathiafulvalene을 이용하여 혈액중에 포함된 glucose를 정량하였다.[4] Wang과 Naser등은 버섯, 바나나, 고추냉이의 뿌리조직을 이용하여 유기용매 속에서 phenol 유도체를 정량하였고,[5] Ruiz와 Kano 등은 각각 탄소전극과 백금전극에 acetylcholinesterase와 choline oxidase를 고정시켜 acetylcholine과 choline을 정량하였으며,[6a,b] Rosa 등은 위 방법을 응용하여 갯벌이나 키위 속에 잔류하는 유기농약을 정량하였다.[7] 또한 Messia 등은 Malic 및 pyruvate oxidase를 고정시킨 이성분 전극을 이용하여 포도가 익어가는 과정에서 malate의 함량 변화를 추적하였다.[8]

이와 같은 방법은 무기물의 정량에도 이용된다. Conrath등은 감자속에 있는 acid phosphatase를 이용하여 무기인산을,[9] Luque de Castro는 sulphite oxidase를 이용하여 sulphite를 분석하였고,[10] Lee 등과 Molina-Holgad 등은 각각 미생물과 dithizone을 이용하여 cyanide와 납을 정량하였다.[11a,b]

과산화수소는 산업분야에서 다양한 용도를 가진 화합물로서 중요한 역할을 하고 있다. 직물, 펄프, 피혁, 목재 등의 표백 및 탈취제로 이용되며 여러 유기화합물의 제조 시약(예; glycerol, hydrazine, caprolactam 등)으로, 그리고 전기도금 및 생활 하수 처리시 염소의 대용으로 사용되기도 한다.[12a,b] 따라서 과산화수소를 경제적이면서 신속하고 정확하게 정량하는 일은 대단히 중요하다. 과산화수소를 정량하는 방법에는 과망간산등을 이용하는 고전적인 적정법[13~15]이 있으나, 현재는 분광학기기를 이용하는 분광법[16~18]과 전기화학적인 방법[19~24]이 널리 이용되고 있다. Matsubara[16]와 Clapp[17] 등에 의한 분광법의 경우 H_2O_2를 발색시키기 위하여 착물을 형성시키는 것은 공통이나, 전자의 경우 Ti(IV)-PAPS-H_2O_2로 이루어진 삼성분착물의 수득률이 분석 대상에 포함된 방해이온의 종류에 크게 영향을 받으며 착물은 5.7×10^4 M^{-1} cm^{-1}의 비교적 작은 몰흡수계수를 가지고 있다. 후자의 경우 H_2O_2를 수용액으로부터 ethyl acetate로 추출하고, 이를 황산 티타늄(IV)용액으로 역추출시켜 발색시키는 과정에서 H_2O_2의 농도에 따라 분배계수가 다른 결점을 갖고 있다. 또 Nakano 등[18]에 의한 방법은$(0.3\sim0.7)\times10^{-5}$ M의 낮은 검출한계 범위를 갖지만 발색물질인 indamine염료의 합성 과정중 실험 분위기의 산소함량 변화에 따라 반응 속도가 변한다. 그러나 최근에는 동식물조직에 함유된 peroxidase를 이용하여 H_2O_2를 선택적으로 정량하려는 시도가 이루어지고 있다. 여기에 지금까지 사용된 식물조직의 예로 양고추냉이,[19] 파인애플,[20] 양상치씨,[21] 아스파라가스,[22] 양배추,[23] 포도,[25] 구경양배추[26] 등이 이용되어 왔다.

이들을 이용하여 제작된 전극은 공통적으로 방해물질의 영향이 적고, 감응시간이 짧으며, 낮은 가격으로 쉽게 구할 수 있는 장점이 있다. 일반적으로 동물체내에 존재하는 효소들은 간에서의 활동도가 타 조직에 비하여 대단히 높다.[27a,b]

본 연구에서는 동물의 간조직을 이용하는 과산화수소의 분석과정에서 신속, 정확, 그리고 경제성 등을 동시에 충족시킬 수 있는 전극 물질을 여러 동.식물조직 중에서 색원하던 중, 아직까지 보고된 바 없는 닭의 간조직이 이에 적합함을 발견하고 이것을 이용하여 만든 효소전극의 전기화학적 특성을 살펴보고 그 결과를 보고하고자 한다.

실 험

기구 및 시약. CV 다이어그램은 삼전극계 BAS CV-50W Voltammetric Analyzer를 이용하여 얻었고 이외의 전류 측정은 EG&G Princeton Applied Research Model 362 Scanning Potentiostat을 사용하여 측정되었다. 또한 기록계는 Houston Omniscribe strip-chart recorder를 사용하였다. 기준전극과 보조전극으로 각각 Ag/AgCl과 백금선 전극을 이용하였으며, 일정량의 시료를 취하기 위하여 Eppendorf사의 micropipet을 이용하였다. 완충용액의 pH측정을 위하여 Digital pH/Ion meter(Model DP-215)를 사용하였다. 흑연가루와 완충용액을 만드는데 사용한 초산 및 초산나트륨은 삼전순약공업사(일본, GR)의 시약을, 기질로 사용된 과산화수소는 순정화학주식회사(일본, GR)의 제품을 정제과정 없이 그대로 사용하였고, mineral oil, ferrocene 및 chloroform은 Aldrich사의 제품을 사용하였다. 방해물질의 효과를 보기 위하여 사용된 L-aspartic acid, L-histidine은 Janssen Chimica제

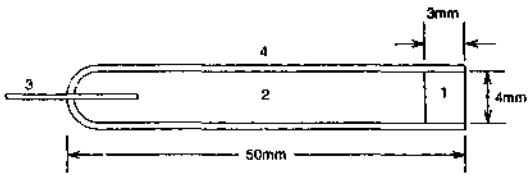

Fig. 1. Schematic diagram of the chicken liver tissue-based electrode used in this work. 1. Tissue mixed material, 2. Plain carbon paste, 3. Cu wire, 4. Glass tube.

품을, L-ascorbic acid, glycine, KNO_3는 Shinyo Pure Chemicals사 제품을, L-DOPA(3-(3,4-dihydroxylphenyl)-L-alanine), dopamine, L-threonine은 Aldrich사 제품을, 그리고 catechol은 Sigma사 제품을 이용하였다. 실험에 사용된 닭의 간(liver)은 재래시장에서 구입하였으며, 사용하지 않을때는 0°C 이하로 유지된 냉장고에 건조한 상태로 밀폐시켜 보관하였다. 완충용액의 pH는 0.045 M CH_3COOH용액과 0.005 M CH_3COONa 용액의 부피비를 적절히 조합하여 결정하였으며, 모든 용액은 48시간 이상 질소정화(nitrogen purging)된 증류수를 이용하여 제조되었으며, 항상 실험 직전에 새로 만들어 사용하였다.

전극의 제조 및 신호 측정. 6%의 간조직과 5%의 이동매체, ferrocene을 포함하고 있는 전극의 제조 과정은 다음과 같다. 0.09 g의 ferrocene을 20 mL의 $CHCl_3$에 녹인 후, 0.91 g의 흑연가루와 균일하게 혼합시킨 다음 hot plate 위에서 용매를 증발시켰다. 혼합물 0.6 g을 취하여 mineral oil 0.4 g과 혼합하여 탄소반죽을 만든 후, 이 반죽 0.94 g에 파쇄된 간조직 0.06 g을 추가한 후, 완전히 혼합시켜 순수 탄소반죽이 채워진 직경 4 mm, 길이 50 mm의 원통형 유리관 끝부분 3 mm에 충진시켜 Cu도선으로 연결하였다 (*Fig.* 1). 필요에 따라 간조직과 ferrocene의 함량은 조절되었으며, 전극이 사용되지 않을 경우는 4°C의 냉장고에 보관하였다. 감응전류의 측정은 각각의 경우 명시된 전극 전위에서, 10 mL의 초산 완충용액을 포함하고 있는 유리셀에 0.1 M, 과산화수소 용액 50 μL를 첨가한 후, 첨가 전후 신호크기의 차를 감응전류로 간주하였으며, 전류가 측정되는 동안 반응용액의 전류 포화시간을 단축하기 위하여 300 rpm으로 교반하였다.

결과 및 고찰

효소전극의 CV 다이어그램. *Fig.* 2의 a는 6%의

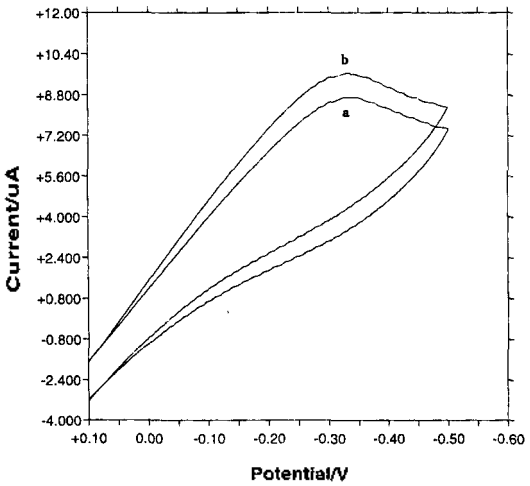

Fig. 2. CV diagram of the ferrocene(5%, w/w) and the chicken liver tissue(5%, w/w) modified carbon paste biosensor in acetate buffer(pH=3.8) without(a) and with (b) hydrogen peroxide(0.033 M). sweep rate = 100(mV/sec), sple. int.=1(mV), quiet T=2(sec), sens.=1E-5(A/V), *vs.* Ag/AgCl.

간조직과 5%의 ferrocene을 포함하고 있는 전극이 pH 3.8의 완충용액 속에서 전위 변화에 따른 CV 다이어그램을, 그리고 b는 동일한 완충용액에 과산화수소를 농도가 0.033 M이 되도록 첨가하였을 때, 전극의 반응 거동을 나타내는 CV 다이어그램을 보여주고 있다. 과산화수소를 포함하고 있지 않은 순수 완충용액으로부터 얻어진 다이어그램 a는 퍼텐샬 증가에 따라 전류의 증가속도가 감소하면서 -330 mV(*vs.* Ag/AgCl) 부근에서 최대값을 나타낸 후 반응전류가 감소한다. 이 영역에서 환원전류를 나타내는 것은 간조직 자체가 여러가지 화합물의 혼합물인 점을 고려할 때, 아직 구조가 밝혀지지 않은 전기화학적 반응이 계 내부에서 일어나고 있음을 말하여 주고 있다. 과산화수소가 첨가되면 넓은 퍼텐샬 영역에서 반응전류가 증가하는 것을 볼 수 있다.

작업전위와 전류와의 관계. *Fig.* 3은 다이어그램 b와 a의 전류차(current difference)를 전극퍼텐샬의 함수로 도시한 것이다. 과산화수소는 전극의 종류에 따라 다르지만, 넓은 퍼텐샬 영역(-1400~+200 mV *vs.* Ag/AgCl)에서 환원되는 것으로 알려지고 있다.[28a,b] *Fig.* 3에서는 약 -250 mV 부근에서 H_2O_2의 반응전류가 최대값을 나타내고 있는 것을 볼 수 있는데,[3,4] 이와 같이 확산속도에 의존하는 전류-전압

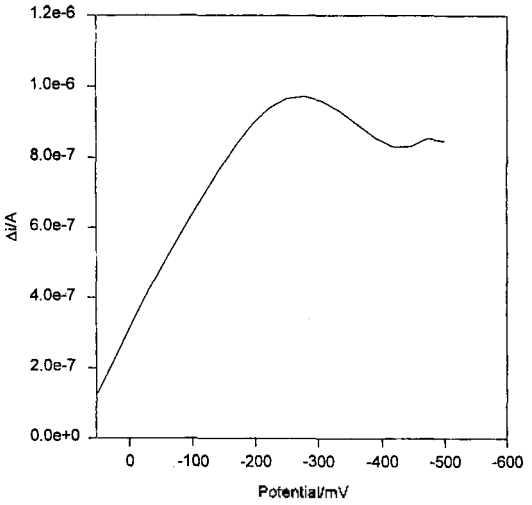

Fig. 3. Dependence of the biocatalytic current on the operating potential. Other conditions are the same as in Fig. 2.

곡선의 형태는, 다이어그램이 맹렬한 환류상태의 용액으로부터 얻어진 점과, 효소의 촉매 반응속도가 대단히 빠른 점을 고려하면, 전극 반응속도가 이동매체인 ferrocene의 확산속도에 의존하는 것으로 보여진다.[29] 그러나 *Fig.* 2의 다이어그램 a와 b의 모양이 크게 다르지 않으므로, 측정되는 전류차는 효소의 촉매작용에 의한 과산화수소의 분해에 기인한 것으로 볼 수 있다. 따라서 전류차 측정 퍼텐샬은 전극의 선택성을 고려하여 전류가 최대값을 나타내는 퍼텐샬을 넘지 않았다.

H_2O_2의 농도에 따른 감응전류의 변화. *Fig.* 4는 완충용액(pH=3.8), 10 mL에 0.1 M 과산화수소용액 50 μL가 누적적으로 6회 첨가될 때, 5%의 간조직과 5%의 ferrocene을 포함한 전극(a)과 5%의 ferrocene만을 포함한 전극(b)의 반응전류(at −250 mV *vs.* Ag/AgCl)의 변화를 보여주는 전형적인 예이다.[5,21,30a,b] a에서 계단이 시작되는 곳은 과산화수소의 첨가 시점을 나타내며, b의 경우도 첨가 시점은 동일하다. 전극이 간조직을 포함하지 않은 경우, 어떠한 감응도 보이지 않으나, 간조직을 포함할 경우, 기질의 농도변화에 대단히 빠른 감응을 나타내고 있으며, 수초이내에 전류의 정류상태를 나타내고 있다. 이와 같은 빠른 감응은 기질과 탄소전극에 고정된 효소의 활성위치 사이에 직접적인 접촉이 일어나 빠른 전자수수과정이 일어나고 있으며 제안된 메카니즘에 타당성을 부여하고 있다.[32a]

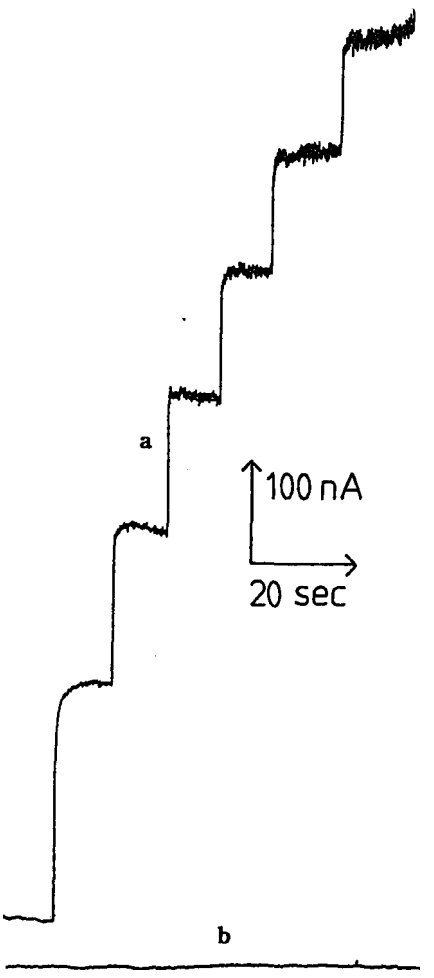

Fig. 4. Part of the steady state current-time responses obtained with the tissue modified(1, 5% tissue and 5% ferrocene, w/w) and the unmodified(2, 5% ferrocene only, w/w) carbon paste electrode(at −250 mV *vs.* Ag/AgCl) on increasing the substrate concentration in acetate buffer(pH=3.8). Successive incurements: 5.0×10^{-4} M H_2O_2.

감응시간과 잡음에 대한 신호비. 효소전극은 감응시간이 대단히 빠른 것을 그 특징으로 하고 있다. Aizawa 등[31]은 효소 광다이오드(enzyme photodiode) 전극을 그리고 Fang 등[21]은 양상추를 이용한 막전극을 이용하여 과산화수소의 감응 시간을 2분 이내로 감소시켰으며, Wang 등은 바나나 조직이 함유된 탄소반죽 전극을 이용하여 $t_{95\%}$=12 sec의 빠른 감응시간을 얻어, 시간당 60개 이상의 시료를 처리할 수 있다고 주장하였다.[32] *Fig.* 5는 완충용액(pH=4.2), 10

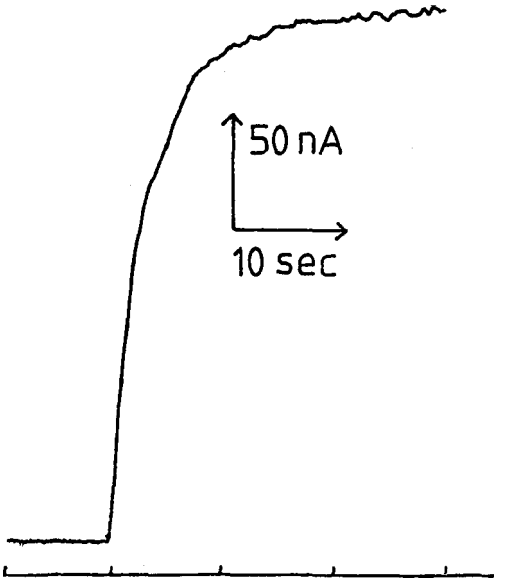

Fig. 5. Typical response curve of the biosensor for hydrogen peroxide concentration. 0.1 M H_2O_2, 50 μL was injected to 10 mL, acetate buffer (pH=4.2). Electrode is same as in Fig. 4(a).

mL에 0.1 M 과산화수소용액, 50 μL가 첨가될 때, 간조직 5%와 ferrocene 5%를 포함하고 있는 전극이 감응하는 모습을 자세히 보여주고 있다(at −250 mV *vs*. Ag/AgCl). 여기에서 측정된 $t_{95\%}$와 $t_{100\%}$는 각각 13 sec와 23 sec였다. 측정 기기의 시간상수(time constant)가 감소한다면 이 시간들은 더욱 짧아 질 수 있을 것이다.[6b] 또 잡음에 대한 신호의 비(S/N)가 3일 때 검출한계(detection limit)는 5.10×10^{-5} M이었다. 실험시 전류값 측정은 전류가 포화될 경우 잡음이 나타났으므로 포화에 가깝고 잡음이 적은 시점인 20초에서 이루어졌다.

pH에 따른 감응전류의 변화. 아미노산은 두 활성 관능기(-COOH과 -NH_2)의 상태가 수소이온 농도에 따라 변하므로 수소이온 농도가 촉매의 반응속도, 즉 반응전류에 영향을 미칠 것이 예측된다. 예외적인 경우는 있지만,[6a,16] 효소의 활동도에는 일반적으로 최적 pH가 존재한다.[11a,23,30a] Gunasinghan 등은 glucoseoxidase인 Tetrathia-fulvalene을 이용하여 glucose를 정량할 경우, 7.5와 8.5 사이의 pH값에서 최대 전류를 보여 주었으며,[4] Conrath 등은 무기인산 정량시 maltose의 활동도가 pH=5.5와 6.0사이에서,[9] Fang 등은 상추씨로 과산화수소를 정량할 경우 pH=6과 7사이에서 최대임을 보여주고 있다.[21] *Fig*. 6은 본 계의 pH 의존도를 보여주고 있다.사용된 전극은 간조직 5%와 ferrocene 5%를 포함하고 있으며, 과산화수소의 농도는 5.0×10^{-4} M로 고정되었고, 측정전위는 −250 mV(*vs*. Ag/AgCl)였다. pH가 CH_3-COOH와 CH_3COONa의 몰분율을 변화시켜 조절될 때, pH가 감소함에 따라 감응전류가 증가하는 경향을 보이고 있다. pH를 더욱 감소시키면 반응전류가 증가할 것으로 기대되나 본 실험에 사용된 초산 완충용액의 조성을 변화시켜서 2.7이하의 pH를 얻을 수 없었다. 다른 완충물질을 이용하여 원하는 pH의 완충용액을 만들 수 있으나, 완충물질이 변하면 전극의 감도가 불연속적으로 변화하였으며,[8,21] 이 결과를 초산완충용액의 결과와 직접 비교할 수는 없었다.

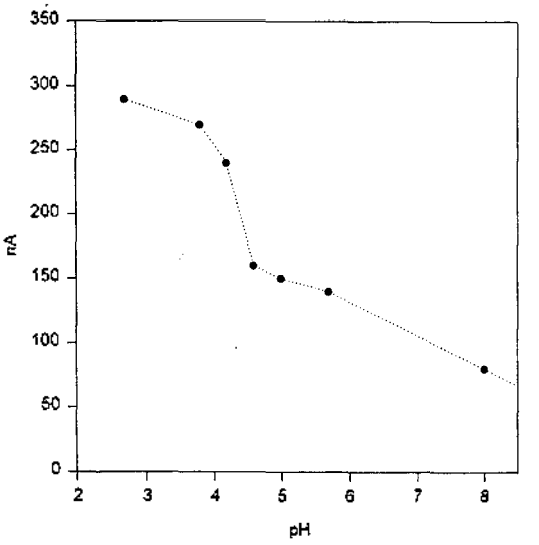

Fig. 6. Correlation between pH and biocatalytic current. Other conditions are the same as in Fig. 4(a).

반응전류의 완충용액 농도 의존도. 일반적으로 용액이 묽은 경우 전해질의 농도가 증가하면 전도도는 증가한다. 따라서 전해질의 농도가 증가한다면 전도도에 기여하는 화학종의 농도가 증가하여 용액저항을 감소시킬 수 있을 것이다. 그러나 CH_3COOH ($Ka=1.76\times10^{-5}$)는 대단히 약한 전해질이므로 CH_3-$COONa$($Kb=5.7\times10^{-10}$)과 이루어진 완충계에서, 대부분은 전리되지 않은 중성상태로 남아있어, 이들 간의 상호작용이 증가한다면 중성 화학종인 과산화수소의 확산속도에 영향을 미칠 것이다. *Fig*. 7은 반응전류의 완충용액 농도 의존도를 보여주고 있다. *Fig*.

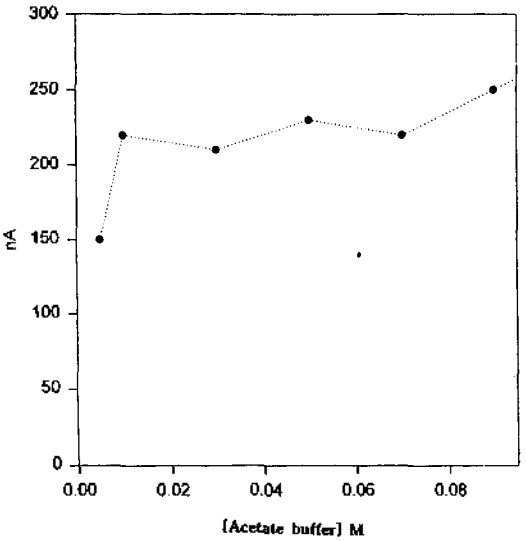

Fig. 7. Effect of the concentration of the buffer solution on the current. Other conditions are the same as in Fig. 4(a).

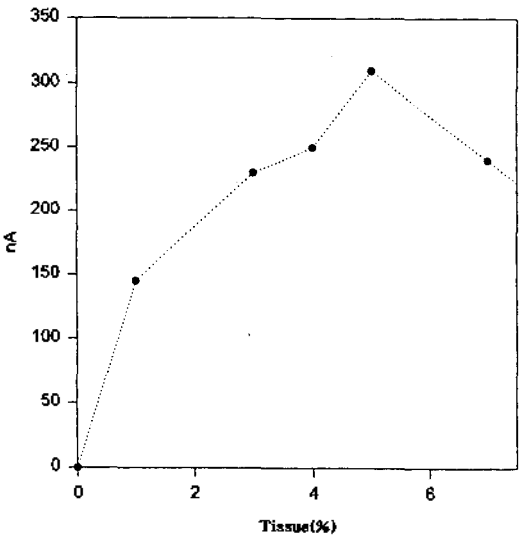

Fig. 8. The effect of the tissue composition on the response of the carbon paste electrode(Substrate conc.: 5.0×10 ^{4} M, at −250 mV *vs*. Ag/AgCl).

7에 나타낸 완충용액의 농도는 조성비가 각각 9:1(mol/mol, pH=3.8)로 고정된 CH_3COOH과 CH_3COONa의 포르말 농도합이다. 0.01 M 이하에서 감소하는 것은, 전해질 농도 감소에 따른 용액저항의 증가로 보여지며, 그 이상의 농도에서 거의 일정한 값을 보인다(−250 mV *vs*. Ag/AgCl). 0.09 M에서 다시 약간 증가하는 것을 볼 수 있는데, 이때 잡음이 급격히 증가하였으므로 작업농도는 전해질 농도의 영향이 적은 0.05 M 이내의 범위가 적합하였다.

간조직의 함량변화에 따른 감응전류의 변화. 닭의 간조직에서 촉매역할을 하는 peroxidase를 분리 추출할 수 없었다.그러나 탄소 반죽의 조직함량 변화가 전극의 효소함량 변화를 의미하므로, 전극의 간조직 함량을 변화시켜 반응전류의 변화를 관찰하였다. 이 때 사용된 탄소 반죽은 mineral oil과 혼합하기 전 단계에서 ferrocene의 함량이 9%로 제조된 것을 공히 사용하였다. 결과가 *Fig*. 8에 주어졌다. 전극의 반응전류는 조직의 함량변화에 크게 의존하였다(−250 mV *vs*. Ag/AgCl). 완충용액(pH=3.8), 10 mL에 0.1 M 과산화수소 용액 50 μL가 공통적으로 첨가될 때, 전극의 조직 함량이 증가함에 따라 5%에서 최대값을 보인 후 급격히 감소하는 것을 볼 수 있다. 간조직의 함량이 증가함에 따라 전류가 증가하는 것은 전극 표면에 노출되는 활성자리의 증가로 볼 수 있으나,[19] 일정 함량(여기서는 5%) 이상에서 감소하는 것을, Gunasingham 등은 간조직 증가에 따른 전극의 전도도 감소로 해석하고 있다.[4]

Ferrocene의 함량변화에 따른 감응전류의 변화. 이동매체의 농도는 반응전류의 크기에 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. *Fig*. 9는 ferrocene의 함량변화에 따른 감응전류의 변화를 보여 주고 있다. 간조직은 공통적으로 5%로 고정되었고, 측정 퍼텐샬은 −250 mV(*vs* Ag/AgCl), 과산화수소 농도는 위의 경우와 같다. ferrocene을 첨가하지 않은 경우에도 신호가 나타났으며, ferrocene을 첨가하면 반응전류는 증가하고, 일정 크기를 유지하다가 9%에서 최대값을 나타낸 후 다시 감소하는 것를 보이고 있다. Oungpipat 등은 Ferrocene을 첨가하면 소수성이던 간조직이 ferrocene에 대하여 더 넓은 노출 표면적을 제공하기 때문에 감응전류가 증가한다고 주장하고 있다.[22] 또, Senda 등은 이동매체가 다량 첨가될 경우, 이동매체의 농도 변화가 탄소반죽 전극의 전도도를 감소시키므로, 감응전류가 이동매체의 농도에 의존한다고 하였다.[33,34]

본 연구실에서 확인된 실험자료(근간)에 따르면 오리의 간조직을 탄소반죽 전극에 혼입시켰을 경우, 이동매체가 첨가되지 않으면 전혀 신호를 관찰할 수 없었다. 그러나 본 계에서 이동매체를 첨가하지 않

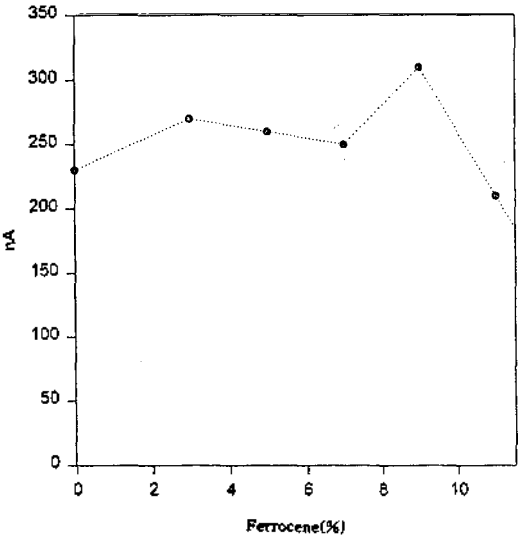

Fig. 9. Optimisation of mediator concentration in the carbon paste electrode(tissue: 5%, at −250 mV *vs*. Ag/AgCl, pH=3.8, H_2O_2 : 5.0×10^{-4} M).

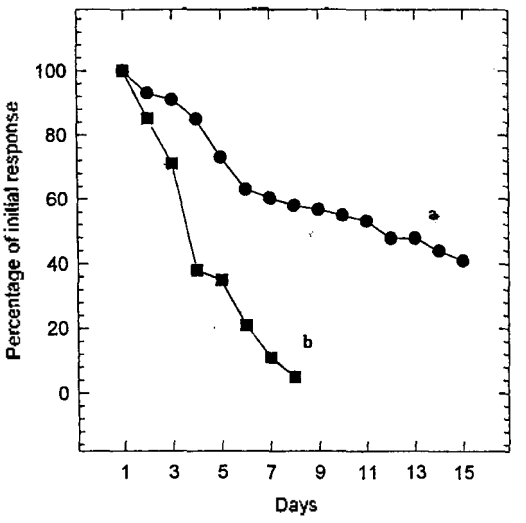

Fig. 10. Long term stability of the chicken liver tissue sensor. (a) Storaged in buffer(pH 3.8). (b) Storaged in the air. Other conditions are the same as in Fig. 4(a).

은 경우에도, 첨가한 경우와 유사한 크기의 신호를 얻을 수 있다는 것은, 이동매체를 사용하지 않고 과산화수소를 정량할 수 있는 효소 전극의 제조 가능성을 시사하고 있다.[24]

방해물질의 영향. 선택성(selectivity)은 분석용 전극의 필수조건이며, 효소전극은 대체로 이 조건을 충족시킨다.[16,18,22,35] 방해물질의 영향을 살펴보기 위하여, 분석물질에 존재한다고 가정되는 물질 중에서 −OH잔기를 가지고 있으며, 양성자 주게로 작용할 수 있다고 생각되는 아미노산과 기타 물질, 9종(실험 부분 참조)을 선택하였다. 이 때 사용된 전극은 *Fig*. 4에 사용되었던 전극이다. 5.0×10^{-4} M 과산화수소를 포함하고 있는 완충용액(pH=3.8)에 이 방해물질들의 농도가 5.0×10^{-4} M이 되도록 첨가하였을 때 어떠한 신호도 관찰할 수 없었으며, 역으로 5.0×10^{-4} M의 방해물을 포함하고 있는 용액에 동일 농도의 과산화수소를 첨가한 경우, 과산화수소의 신호 크기에 어떠한 영향도 주지 못하였다. 이는 본 계에서 사용된 전극이 조사된 물질들과 비교하여 과산화수소에 대하여 좋은 선택성을 보여주고 있음을 말하여 준다.

효소전극의 안정성. 효소전극의 수명은 보관 방법에 따라 차이가 대단히 크다.[30a] 사용되고 있는 전극의 장시간 사용 가능성을 알아보기 위하여, 15일 동안 보관하면서 전극 감응전류의 크기 변화를 조사한 결과가 *Fig*. 10에 주어졌다. *Fig*. 10의 a는 전극을 사용하지 않을 때, 4°C 냉장고에서 pH=3.8의 완충용액에 담근 상태로 보관한 것이며 *Fig*. 10의 b는 동일한 조건하에서 건조한 상태로 보관한 것이다. 건조한 상태로 보관한 것은 3일 경과시 40% 이하로 감소하였으나, 완충용액에 보관한 것은 15일이 경과한 후에도 초기 신호의 40% 이상을 유지하였다. 단백질이 공기중에 노출되면 cysteine간의 이황화물 교차결합(disulfide crosslink)을 포함하고 있는 단백질은 공기중의 환원성 물질에 의하여, cystine의 결합이 분해되고 thiol잔기가 형성되어, 효소가 갖는 활성위치의 형태(conformation)가 변형될 수 있다. 또 cysteine잔기에 공기중의 산소나, 기질로 사용된 과산화수소가 전극 표면에 잔류하여 산화제로 작용한다면, 새로운 cystine이 형성될 수 있으며 그 결과로 효소는 활성을 잃게 된다.[36] 그리고 공기중에 포함된 미생물의 protase가 보관 온도에서 활성을 가진다면, 효소전극의 단백질을 분해하여 활성 위치를 파괴할 수 있다. 용액중에 보관한 것에 비하여 노출시켜 보관한 것은 우선적으로 공기중의 여러 물질들과 접촉할 가능성이 크므로, 두 경우의 감소 경향이 다른 것은, 앞서 언급된 요인들에 기인된 것으로 추정할 수 있으나, 확실한 것은 보다 연구가 진행되어야 할 것

으로 보여진다.

결 론

본 연구에서는 닭의 간조직을 이용한 바이오센서로 수용액에서 과산화수소를 정량할 때의 최적실험조건을 제시하였다. 또한 조사된 전극 퍼텐샬 범위(−0.5~+0.05 V *vs.* Ag/AgCl) 내에서 감응시간은 대단히 짧았고, 선택성도 탁월하였다. 또한 이동매체가 없는 경우에도 감응전류가 크게 나타났으며, 생촉매 작용의 안정도 또한 매우 우수하였다. 이와 같은 결과들은 앞으로 과산화수소 정량을 위한 바이오센서 제작시, 기초자료로 크게 활용될 수 있을 것이다.

인 용 문 헌

1. Clark Jr., L. C.; Lyons, *C. Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29.
2. 小澤昭彌, 山下正通, 小浦延行 原著, 南宗祐 譯, 현대의 電氣化學; 淸文閣: Korea, 1995; p 221.
3. Bonakdar, M.; Vilchez, J. L.; Mottola, H. A. *J. Electroanal. Chem.* **1989**, *266*, 47.
4. Gunasingham, H.; Tan, C. H. *Analyst* **1990**, *115*, 35.
5. Wang, J.; Naser, N.; Kwon, H. S.; Cho, M. Y. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *264*, 7.
6. (a) Ruiz, B. L.; Dempsey, E.; Hua, C.; Smyth, M. R.; Wang, J. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *273*, 425. (b) Kano, K.; Morikage, K.; Uno, B.; Esaka, Y.; Goto, M. *Anal. Chim. Acta* **1994**, *299*, 69.
7. Rosa, C. L.; Pariente, F.; Hernandez, L.; Lorenzo, E. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *308*, 129.
8. Messia, M. C.; Compagnone, D.; Esti, M.; Palleschi, G. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 360.
9. Conrath, N.; Grundig, B.; Huwel, S.; Cammann, K. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *309*, 47.
10. Luque de Castro, M. D.; Fernandez-Romero, J. M. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *311*, 281.
11. (a) Lee, J. I.; Karube, I. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *313*, 69. (b) Molina-Holgado, T.; Pinilla-Macias, J. M. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *309*, 117.
12. (a) Kirchner, J. R. *Encyclopedia of Chemical Technology*; Wiley-Interscience: New York, U. S. A., 1981; Vol. 13, p 12. (b) Irving Sax, N. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*; Van Nostrand Reinhold: New York, U. S. A., 1987; p 618.
13. Huckaba, C. E.; Keyes, F. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 1640.
14. Willard, H. H.; Young, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55*, 3260.
15. Hurdis, E. C.; Romeyn, H. Jr. *Anal. Chem.* **1954**, *26*, 320.
16. Matsubara, C.; Kudo, K.; Kawashita, T.; Takamura, K. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1107.
17. Clapp, P. A.; Evans, D. F.; Sheriff, T. S. S. *Anal. Chim. Acta* **1989**, *218*, 331.
18. Nakano, T.; Takahashi, A. *Anal. Sci.* **1990**, *6*, 823.
19. Wang, J.; Lin, M. S. *Electroanalysis* **1989**, *1*, 43.
20. Lin, M. S.; Tham, S. Y.; Rechnitz, G. A. *Electroanalysis* **1990**, *2*, 511.
21. Fang, Y.; Cai, R.; Deng, J. *Electroanalysis* **1992**, *4*, 819.
22. Oungpipat, W.; Alexander, P. W.; Southwell-Keely, P. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *309*, 35.
23. Kwon, H. S.; Kim, K. K.; Lee, C. G. *J. Kor. Chem. Soc.* **1996**, *40*(4), 278.
24. Csoregi, E.; Jonsson-Pettersson, G.; Gorton, L. *J. Biotech.* **1993**, *30*, 315.
25. Wijesuriya, D.; Lin, M. S.; Rechnitz, G. A. *Anal. Chim. Acta* **1990**, *234*, 453.
26. Chen, L.; Lin, M. S.; Hara, M.; Rechnitz, G. A. *Anal. Lett.* **1991**, *24*, 1.
27. (a) Dixon, M.; Edwin, C.W. *Enzymes*; Academic Press Inc.: New York, U. S. A., 1979; p 633. (b) Mascini, M.; Iannello, M.; Palleschi, G. *Anal. Chim. Acta* **1982**, *138*, 65.
28. (a) Lundback, H.; Johansson, G. *Anal. Chim. Acta* **1983**, *155*, 47. (b) Akmal, N.; Mark, H. B., Jr. *Anal. Lett.* **1992**, *25*, 2175.
29. Hitchman, M. L.; Hill, H. A. O. *Chemistry in Britain December*; 1986; p 1117.
30. (a) Navaratne, A.; Rechnitz, G. A. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *257*, 59. (b) Hale, P. D.; Boguslavsky, L. I.; Karan, H. I.; Lan, H. L.; Lee, H. S.; Okamoto, Y.; Skotheim, T. A. *Anal. Chim. Acta* **1991**, *248*, 155.
31. Aizawa, M.; Ikariyama, Y.; Kuno, H. *Anal. Lett.* **1984**, *17*, 555.
32. Wang, J.; Lin, M. S. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1545.
33. Ikeda, T.; Hamada, H.; Miki, K.; Senda, M. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 541.
34. Senda, M.; Ikeda, T.; Miki, K.; Hasa, H. *Anal. Sci.* **1986**, *2*, 501.
35. Kwon. H. S.; Lee, C. G. *Anal. Sci. & Tech.* **1994**, *7*, 149.
36. Price, N. C.; Stevens, L. *Fundamentals of Enzymology*; Oxford University Press Inc: New York, 1995; p 67.