

## 닭의 소장조직을 이용한 과산화수소 정량 효소전극의 전기화학적 성질

尹吉重\* · 金康鎭<sup>†</sup> · 權孝植<sup>††</sup>

청주대학교 이공대학 화학과

<sup>†</sup>고려대학교 이과대학 화학과

<sup>††</sup>충북대학교 사범대학 과학교육과

(1999. 1. 21 접수)

## Electrochemical Properties of the Chicken Small Intestinal Tissue Based Enzyme Electrode for the Determination of Hydrogen Peroxide

Kil-Joong Yoon\*, Kang-Jin Kim<sup>†</sup>, and Hyo-Shik Kwon<sup>††</sup>

Department of Chemistry, Chongju University, Chongju 360-764, Korea

<sup>†</sup>Department of Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea

<sup>††</sup>Department of Science Education, Chungbuk National University, Chongju 360-763, Korea

(Received January 21, 1999)

**요 약.** 과산화수소의 정량을 위하여 닭의 소장조직과 ferrocene을 탄소반죽에 혼입시켜 만든 효소전극의 전기화학적 특성을 조사하였다. 조사된 전극은  $t_{100\%}=3$  sec의 빠른 감응시간과  $5.0 \times 10^{-5}$  M(S/N=3)의 검출한계를 보여 주었으며, 방해 물질들에 대하여 좋은 선택성을 보여 주었다. 또한 다른 동식물 조직을 이용하여 만든 센서와 비교할 때, 검정곡선이 좋은 직선성을 보여 주었으며 생축매 안정성이 좋았고 보다 큰 감응신호를 보여 주었다.

**ABSTRACT.** A new enzyme electrode was developed by co-mobilization of chicken small intestinal tissue and ferrocene in a carbon paste for the determination of hydrogen peroxide, and its electrochemical properties are evaluated. The electrode showed the response time( $t_{100\%}$ ) as short as 3 sec, the detection limit of  $5.0 \times 10^{-5}$  M, and a good selectivity for the possible interferences tested. The electrode also offered a good linearity in calibration, a higher biocatalytic stability and a larger responding signal as compared with the other animal or plant tissue based sensors.

### 서 론

효소는 구조적으로 단백질이며 기능적으로는 촉매이다. 한 효소가 단일 화학반응 또는 관련된 한벌의 화학반응에 촉매로서 작용할 경우, 기질에 대한 특이성(specificity)의 정도는 대단히 크며 사실상 절대적이다. 또 효소에 의하여 촉매된 반응은 그렇지 아니한 반응에 비하여 적어도 백만배 이상 그 반응속도가 촉진된다. 따라서 효소의 이와 같은 성질들이 물질의 정량분석에 이용될 경우, 측정되는 신호는 특이성에 의하여 방해물질의 영향을 최소화할 수

있고, 빠른 반응속도에 의하여 신속하게 분석할 수 있는 장점을 갖게 된다.

효소의 구조는 덩어리가 큰 단백질 구조로 되어 있으며 활성자리는 일반적으로 분자내에 깊숙히 파묻혀 있다. 따라서 전기화학적 방법으로 효소를 산화-환원시켜 그 전류를 관찰하고자 할 때, 효소의 활성위치가 전극 표면 가까이 근접하는 것이 용이하지 않으므로 높은 전극전위가 요구되며 이것은 전극의 선택성을 감소시키는 결과를 가져온다. 그러나 전극으로부터 전자를 받아 효소의 활성자리까지 쉽

게 확산하여 전자를 정량적으로 운반하여 줄 수 있는 중간역의 작은 매개체를 이용한다면, 효소를 쉽게 산화-환원시켜 그 전류를 측정할 수 있다. 이와 같이 전자를 운반하는 물질을 전자 매체(mediator) 또는 전자 shuttle이라고 한다.<sup>1</sup>

Clark 등<sup>2</sup>이 생물체의 효소를 이용하여 만든 전기 화학 바이오센서의 효용성을 제시한 이래 위 원리에 근거하여 Ruiz 등과 Kano 등은 공업용 acetylcholine esterase와 choline oxidase를 산화-환원 매개체인 hexacyanoferrate(III)이온과 함께 탄소전극과 백금전극에 각각 고정시켜 choline, acetylcholine 및 arsenocholine을 정량하였으며,<sup>3a,b</sup> Rosa 등은 위 방법을 응용하여 갯벌이나 키위 속에 잔류하는 유기농약을 정량하였다.<sup>4</sup> Bonakdar 등은 공업용 tyrosinase와 버섯에 포함된 tyrosinase를 각각 매개체인 hexacyanoferrate와 함께 사용하여 phenol 감응 센서를 제작하였다.<sup>5</sup> phenol의 유도체를 정량하기 위하여 Wang과 Kwon 등은 효소원으로 버섯과 바나나, 고추냉이의 뿌리 조직을 이용하기도 하였다.<sup>6</sup> 또한 Messia 등은 Malic 및 pyruvate oxidase를 고정시킨 이성분 전극을 이용하여 포도가 익어가는 과정에서 malate의 함량 변화를 추적하였다.<sup>7</sup> Conrath 등은 감자속에 있는 acid phosphatase를 이용하여 무기인산염,<sup>8</sup> Luque de Castro는 sulphite oxidase를 이용하여 sulphite를 분석하였고,<sup>9</sup> Lee 등과 Molina-Holgad 등은 각각 미생물과 dithizone을 이용하여 cyanide와 납을 정량하였다.<sup>10a,b</sup> 최근에는 측정용 시료중에 존재하는 용존 산소의 영향없이 당을 측정할 수 있는 산화효소전극이 Wang 등에 의하여 개발되었다. 이로서 당뇨병 환자의 당측정, 심장질환 환자의 젖산측정 및 콜레스테롤 측정 센서 개발에 새로운 장이 열리게 되었다.<sup>11</sup>

과산화수소는 식물, 펄프, 피혁, 목재 등의 표백 및 탈취제 및 여러 화합물의 제조 시약으로, 그리고 전기도금 및 생활 하수 처리 등 산업분야에서 다양한 용도를 가진 화합물이다. 따라서 과산화수소를 경제적이면서 신속하고 정확하게 정량하는 일은 중요하다. 과산화수소를 정량하는 방법에는 고전적인 방법<sup>12-14</sup>을 포함하여 여러가지가 있으나 최근에는 동식물의 체내에 있는 peroxidase를 이용하는 전기 화학적인 방법<sup>15-20</sup>이 많이 소개되고 있다. 지금까지 사용된 생체조직의 예로 양고추냉이,<sup>15</sup> 파인애플,<sup>16</sup> 양상추씨,<sup>17</sup> 아스파라가스,<sup>18</sup> 양배추,<sup>19</sup> 포도,<sup>21</sup> 구경양

배추,<sup>22</sup> 등이 있으며, 본 실험실에서도 닭의 간조직을 이용하는 과산화수소 정량 효소전극을 제작하고 전기 화학적 특성 및 최적조건 도출에 관한 내용을 이미 소개한 바 있다.<sup>23</sup> 문헌에 따르면 쥐(rat)의 경우 peroxidase의 활동도는 여러 신체 부위중, 소장(small intestine)조직에서 가장 높고 이어 대장, 비장(spleen), 허파, 위점막 등의 순으로 보고되어 있다.<sup>24a,b</sup> 본 연구에서는 쥐의 경우를 미루어 볼 때 닭도 간조직보다 소장조직을 이용하는 과산화수소 센서가 여러가지 장점을 가질 것이 기대되므로 이를 제작하여 전기 화학적 특성을 살펴보고 결과를 보고하고자 한다.

## 실 험

**기구 및 시약.** 대부분의 신호 측정은 일정전압전류 측정기(EG&G Princeton Applied Research Model 362 scanning potentiostat)와 x-t기록계(kipp&zonen strip-chart recorder)를 이용하였고, 순환전압전류 곡선은 BAS CV-50W voltammetric analyzer를 이용하였다. 기준전극과 보조전극으로 각각 Ag/AgCl(BAS MF2052)전극과 백금전극을 이용하였으며, 일정량의 시료를 취하기 위하여 micropipet(Eppendorf)을 이용하였다. 특별한 언급이 없는 한 모든 전위는 기준전극에 대한 값이다. 탄소반쪽의 비저항 측정을 위하여 multimeter(John fluke 73 series)를 이용하였으며, 완충용액의 pH측정에는 Digital pH/ion meter (Model DP-215)를 사용하였다. 전극과 완충용액 제조에는 각각 흑연가루(Fluka, powder;  $\leq 0.1$  mm)와 초산 및 초산나트륨(Shinyo, first grade)을 사용하였으며, 기질 사용된 과산화수소(Junsei, EP, 35%)는 정제과정 없이 그대로 사용하였다. 전극 성형을 위하여 mineral oil(Sigma)을 사용하였고 매개체로 ferrocene(Sigma)을 그리고 매개체의 균일 혼합을 위하여 chloroform(Matsuone)을 사용하였다. 방해물질의 효과를 관찰하기 위하여 사용된 L-aspartic acid, L-histidine는 Janssen Chimica제품을, L-ascorbic acid, glycine은 Shinyo Pure Chemicals사 제품을, L-DOPA ([3-(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine]), L-threonine, catechol, 3-hydroxytyramine은 Sigma사 제품을 이용하였다. 실험에 사용된 닭의 내장은 재래시장에서 구입하였으며, 사용하지 않을 때는 0°C이하로 유지된 냉장고에 건조한 상태로 밀폐시켜 보관하였다.

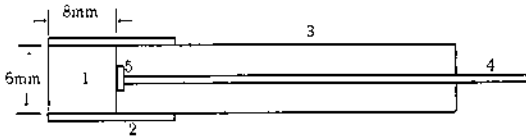


Fig. 1. Diagram of a biosensor used in this work. 1. modified carbon paste, 2. PVC tube, 3. acryl resin sheath, 4. lead wire, 5. Pt disk (2 mm dia.).

완충용액은 항상 실험 직전에 만든 0.10M 초산용액과 0.10M 초산나트륨 용액을 이용하여 만들었고, pH는 이들의 부피비를 적절히 조합하여 결정하였다.

**전극의 제조 및 신호측정.** 4%의 소장조직과 2.1%의 ferrocene(매개체)을 포함하고 있는 전극은 다음과 같이 제조하였다. 0.04 g의 ferrocene을 20 mL의  $\text{CHCl}_3$ 에 녹인 후, 0.96 g의 흑연가루와 균일하게 혼합시킨 다음 hot plate 위에서 용매를 증발시켰다. 혼합물 0.6 g을 취하여 mineral oil 0.5 g과 혼합하여 탄소반죽을 만든 후, 이 반죽 0.96 g에 과쇄된 간조직 0.04 g을 완전히 분산시켜 직경 6 mm, 길이 8 mm의 원통형 전극물질 자리에 충전시킨다 (Fig. 1). 이후에 언급되는 ferrocene의 함량은 편의상 mineral oil과 혼합하기 전의 함량을 언급하는 것이며 필요에 따라 간조직과 ferrocene의 함량을 조절하였다. 전극이 사용되지 않을 경우는 6°C의 냉장고에 보관하였다. 감응전류의 측정은 각각의 경우 제작 조건이 명시된 전극을 사용하여 10 mL의 완충용액을 포함하고 있는 반응용기에 0.10 M 과산화수소 용액 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가한 후, 첨가 전후 신호크기의 차를 감응전류로 간주하였다. 자석젓개의 회전은 작업전극 주위에 형성된 전기장에 교란을 주어 큰 잡음을 발생시키므로 신호측정은 대체로 정지된 용액에서 이루어졌으나, 빠른 감응시간이 요구될 때에는 전류 포화 시간을 단축하기 위하여 300 rpm으로 교반하였다.

**결과 및 고찰**

**탄소반죽의 전극특성.** 전기분해시 전극반응에 필요한 모든 전극전위는 작업전극 표면에 유지되는 것이 이상적이다. 그러나 mineral oil을 가하여 성형되는 탄소반죽 전극은 일정한 저항을 가지므로 이는 과전위(overpotential)의 원인이 된다. Fig. 2는 mineral oil의 함량변화에 따라 탄소반죽의 비저항(resistivity,  $\rho$ )이 변하는 것을 보여주고 있다. 비저항

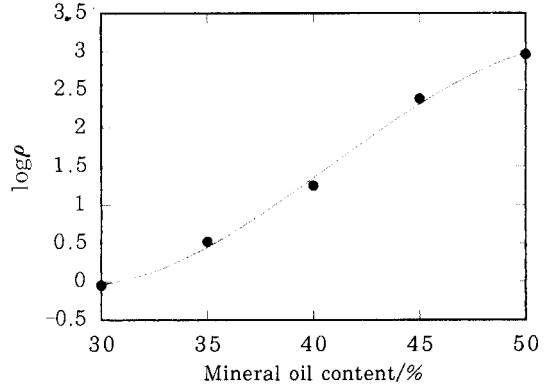


Fig. 2. Variation of resistivity with mineral oil content in carbon paste.

측정을 위하여 만든 반죽시료의 모양은 19×5×7(mm)의 직육면체로 5×7(mm)면을 구리판으로 전기접촉하였다. Mineral oil 함량을 적게하므로서 과전위가 작은 이상적인 전극을 만들 수 있으나, 지나치게 줄이면 제작된 전극이 쉽게 부서지는 단점을 갖게 된다. 또 mineral oil 함량이 크면 비저항이 커짐은 물론 탄소반죽은 유동성을 갖게되어 전극의 성형이 어렵다. 따라서 최선의 작업전극 성격과 작업성을 동시에 나타내는 mineral oil의 함량이 우선 결정되어야 한다. 좋은 작업성을 주는 mineral oil의 함량%는 흑연가루 제조회사 제품마다 다르기 때문에 이 과정이 반드시 필요하며, 본 실험에 사용된 Fluka사 제품의 경우 45%일 때 가장 좋은 전극특성을 나타내었다.

**효소전극의 순환전압전류그림.** Fig. 3의 a는 pH 4.75의 완충용액 속에서 4%의 소장조직과 4%의 ferrocene을 포함하고 있는 전극의 순환전압전류 그림이며, b는 동일한 완충용액에 0.1 M  $\text{H}_2\text{O}_2$ 용액 500  $\mu\text{L}$ 를 첨가하였을 때, 전극반응의 변화를 보여주는 순환전압전류 곡선이다. 일반적으로 탄소전극은 산화 및 환원 방향의 전위창이 넓어 작업전극으로 널리 사용되지만, Pt전극과 비교하여 잔류전류가 큰 물질이다. 과산화수소를 포함하고 있지 않은 순수 완충용액으로부터 얻어진 전류곡선 a는 전위 증가에 따라 전류가 증가하는 것을 보여주고 있다. 이것은 간조직 자체가 여러가지 화합물의 혼합물인 점을 고려할 때, 아직 구조가 밝혀지지 않은 전기화학적 반응이 계 내부에서 일어나고 있음을 말하여 주고 있다. Fig. 4는 Fig. 3의 전류곡선 증음의 방향으로 전

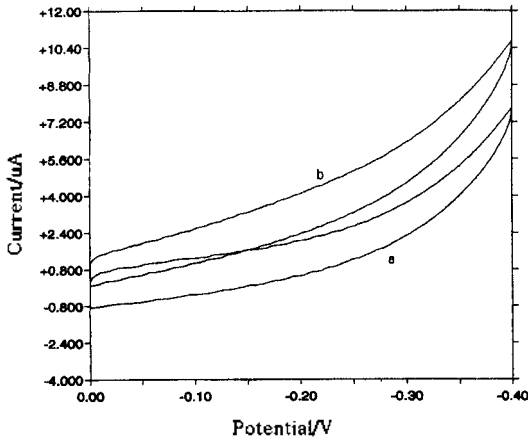


Fig. 3. Cyclic voltammograms of a biosensor modified with 4% ferrocene and 4% chicken small intestine tissue in acetate buffer (pH 4.75) without (a) and with (b) hydrogen peroxide ( $5.0 \times 10^{-3}$  M). Sweep rate (mV/s)=100, sple.int. (mV)=1, Sens(A/V)=1E-5, int P/N=N, quiet time (sec)=10.

위를 주사할 경우 a와 b의 전류차(current difference)를 전극전위의 함수로 도시한 것이다. 과산화수소는 전극의 종류에 따라 다르지만, 넓은 전위 영역(+1.2 V vs. SCE at glassy carbone, -0.075 V vs. Ag/AgC at a Cd modified Pt)에서 환원되는 것으로 알려지고 있다.<sup>25a,b</sup> Fig. 4는 전극전위가 증가함에 따라 신호전류가 포화되는 것을 보여주고 있다. Fig. 3의 a와 b가 모양이 크게 다르지 않으므로 전류차는 효소의 촉매작용에 의한 과산화수소의 패러데이 전류로 간주할 수 있다. 전극전위를 증가시키면 큰 신호를 얻

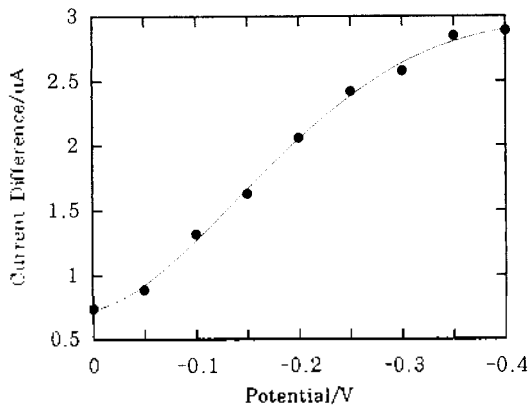


Fig. 4. Potential dependence of the biocatalytic current in Fig. 3.

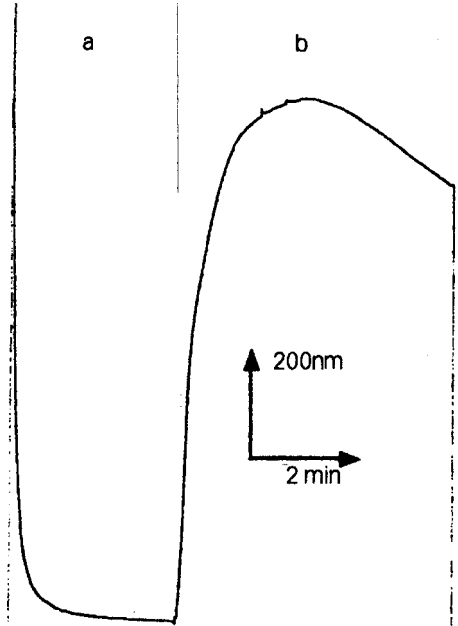


Fig. 5. Signal obtained by injection of 100  $\mu$ L of 0.1M  $H_2O_2$  into 10 mL buffer solution at a carbon paste electrode modified with 6% ferrocene and 4% tissue.

을 수 있으나 높은 전위에서는 잡음이 급격히 증가하여 신호의 순도가 떨어지며 동시에 전극의 선택성이 없어지는 점을 고려하여 대부분의 경우 -0.20 V를 넘지 않았다.

**신호의 생성.** Fig. 5는 6%의 ferrocene을 포함하고 있는 전극으로부터 정지된 용액중에서 신호가 얻어지는 과정을 보여주고 있다. a영역에서 나타나는

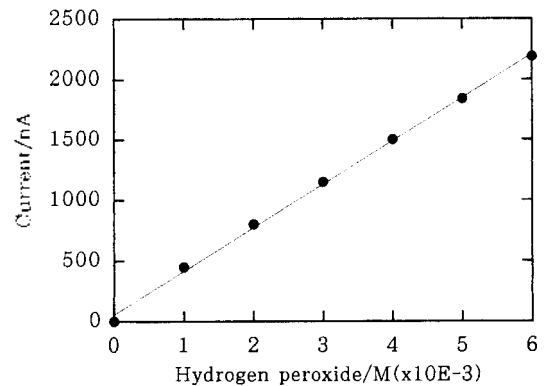


Fig. 6. Calibration curve of hydrogen peroxide at a carbon paste electrode modified with 4% tissue and 4% ferrocene. Applied potential: -0.15 V (vs. Ag/AgCl).

신호는 전위계단(potential step)의 시간에 따른 충전 전류의 감소를 보여주고 있으며, b영역은 과산화수소 용액 투입시 신호전류가 급격히 증가하여 최대값을 나타낸 후 다시 감소하는 것을 보여주고 있다. 이는 전극 표면에 확산층이 형성되고 있음을 말하여 주는 것으로 환류상태의 용액에서 측정되면 이와 같은 전류감소 현상은 나타나지 않는다(Fig. 7a). 본 실험에서는 시간에 따른 충전전류의 변화가 없는 상태에서 잔류전류 값과 과산화수소 용액을 가한 후 최대 전류값과의 전류차를 신호로 간주하였다.

**기질 농도에 따른 신호의 변화.** 효소전극의 검정 곡선을 작성하고자 할 때 검정곡선은 작은 농도 범위에서도 직선성으로부터 벗어나는 것이 일반적인 경향이다. 이것은 효소전극의 표면에 존재하는 제한된 수의 활성자리가 포화되는 과정에서 일어나는 현상으로 볼 수 있다. 본 실험실에서 관찰된 닭의 간(liver)조직의 경우도 비슷한 경향성을 이미 보고한 바 있다.<sup>23</sup> Fig. 6은 pH4.8인 완충용액 속에서 4%의 소장조직과 4%의 ferrocene을 포함한 전극에 0.150 V의 전위를 걸어 주었을 때, 과산화수소의 농도가 다른 전극계보다 높음에도 불구하고 신호의 크기가 직선적으로 변하는 것을 보여주고 있다. 쥐(rat)의 소장(small intestine)조직에서 peroxidase(EC# 1.11.1.7)의 활동도는 간조직에 비하여 절대적으로 높은 것으로 알려져 있다.<sup>24a</sup> 여기에서 보여주는 직선성은 이와 같은 사실을 반영하여 주고 있다.

**감응시간과 잡음에 대한 신호비.** 기질에 대한 감응시간이 대단히 짧은 것이 효소전극의 특성이다. Fig. 7a는 완충용액(pH=4.2) 10 mL에 0.1 M 과산화수소 용액, 100  $\mu$ L를 첨가할 때, 소장조직 4%와 ferrocene 4%를 포함하고 있는 전극에 -0.150 V를 걸어 주었을 경우 전극이 감응하는 모습을 자세히 보여주고 있다. 전류-시간 곡선에서 나타나는 진동 성분은 농도편극을 없애기 위한 자석 젓개의 회전에 기인된 것이다. Aizawa,<sup>26</sup> Fang 등<sup>17</sup>은 각각 효소 광다이오드(enzyme photodiode)전극과 양상추 막전극을 이용한 과산화수소 정량시 2분 이내의 감응 시간을 얻었다. 또 Wang 등은 바나나 조직이 함유된 탄소반죽 전극을 이용하여  $t_{95\%}=12$  sec의 빠른 감응 시간을 얻어, 시간당 60개 이상의 시료를 처리할 수 있다고 보고하였다.<sup>27</sup> 그러나 닭의 소장조직을 사용한 본 실험의 전류감응 곡선은 기질 투입 후 대략 3초

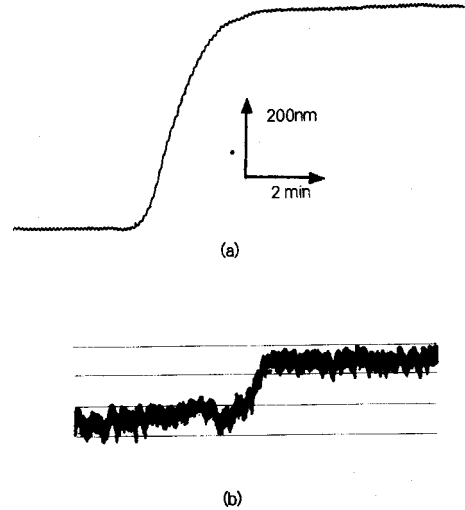


Fig. 7. Time course of responding current for the determination of response time (a) and detection limit (b) of a carbon paste electrode modified with 4% tissue and 4% ferrocene in 10 mL buffer solution, into which 10  $\mu$ L of 0.10M (a) and 50  $\mu$ L of 0.01M hydrogen peroxide were added, respectively.

가 지나면 전류신호가 포화되는 것을 보여 주었으며, 이 값은 지금까지 알려진 많은 효소전극들 중에서 가장 짧은 감응시간인 것이다. 전류가 포화될 경우 약간의 잡음이 나타났으므로, 포화에 가깝고 잡음이 적은 시점인 5초 정도에서 실험시 전류값을 측정하였다. Fig. 7b는 본 실험에서 사용한 측정계의 검출한계를 확인하기 위하여, 0.01 M 과산화수소 용액 50  $\mu$ L를 완충용액 10 mL에 투입하였을 때 얻어진 전류-시간 곡선이다. 검출한계(S/N=3)는  $5.0 \times 10^{-5}$  M임을 알 수 있으며, 이 값은 다른 효소전극들에 유사한 값이다. 그러나 Fig. 7b에서 보여준 잡음의 주 원인은 첨가된 과산화수소가 보다 빠른 시간 내에 용액 전체에 균일하게 분포할 수 있도록 자석 젓개를 사용하여 환류시켰기 때문이다. 빠른 감응시간이 요구되지 않는다면 검출한계는 상당히 낮출 수 있을 것으로 보여진다.

**신호크기에 미치는 pH의 영향.** 산화-환원 반응에 H<sup>+</sup>의 탈착이 관여되어 있거나 반응물 또는 생성물이 산이나 염기일 경우 반응속도는 반드시 용액의 pH에 의존한다. 아미노산의 경우도 두 작용기(-COOH과 -NH<sub>2</sub>)의 입체구조는 수소이온 농도에 따라 변하므로 pH가 촉매의 반응속도, 즉 신호크기에

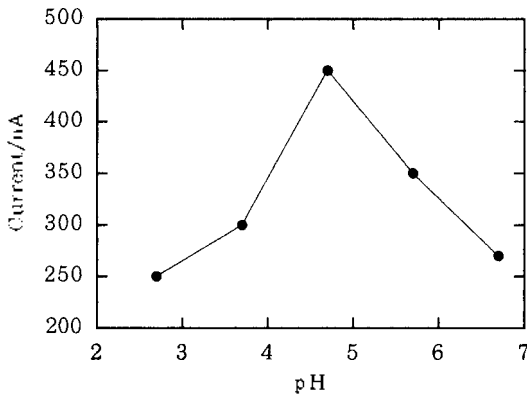


Fig. 8. pH dependence of biocatalytic current. Electrode was modified with 3% ferrocene and other conditions are the same as in Fig. 6.

영향을 미칠 것은 쉽게 예측된다. 예외적인 경우는 있지만,<sup>3a,28</sup> 효소전극의 경우 일반적으로 최적 pH가 존재한다.<sup>10a,19,29</sup> Gunasingham 등은 glucoseoxidase인 Tetrathiafulvalene을 이용하여 glucose를 정량할 경우, 7.5와 8.5 사이의 pH값에서 최대 전류를 보여 주었으며,<sup>30</sup> Conrath 등은 무기인산 정량시 maltose의 활동도가 H=5.5와 6.0사이에서,<sup>8</sup> Fang 등은 상추씨로 과산화수소를 정량할 경우 pH6과 pH7사이에서 최대임을 보여주었다.<sup>17</sup> Fig. 8은 사용한 전극이 소장조직 4%와 ferrocene 3%를 포함하고 있고, 과산화수소의 농도가  $1.0 \times 10^{-3} M$ 일 때, 본 계의 pH 의존도를 보여주고 있다. 측정 전위는  $-0.150 V$ 였으며 pH는 초산과 초산나트륨의 물분율을 변화시켜 조절하였다. 닭의 소장조직이 효소원으로 사용될 경우 대략 pH4와 pH5 사이의 영역이 감응에 최적임을 보여주는 결과이다. 일반적으로 동물세포 내부의 pH는 7부근인 것으로 알려져 있다. 그러나 최적 pH가 이와 다르게 나타나는 것은 동일한 효소라 할지라도 활동하는 위치에 따라 활동도가 다를 수 있으며, *in vivo*와 *in vitro*의 상황 변화도 그 원인의 하나일 수 있으므로 이에 대한 연구는 더 진행되어야 할 것으로 보여진다.

**조직의 함량변화에 따른 신호의 변화.** 탄소 반죽의 조직함량 변화는 전극표면에 존재하는 활성자리의 밀도와 직접적인 관계가 있다. ferrocene의 첨가 없이 전극의 소장조직 함량만을 변화시켜 반응전류의 변화를 관찰하였다. 이 때 사용된 탄소 반죽은 mineral oil 0.5 g과 탄소가루 0.5 g을 혼합하여 공히

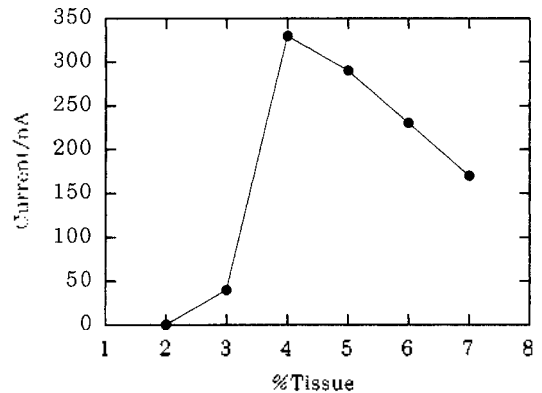


Fig. 9. Effect of the tissue composition on the biocatalytic activity of the plain carbone paste electrode at  $-0.20 V$ . Substrate conc.:  $1.0 \times 10^{-3} M$ .

사용하였다. 전극전위가  $-0.20 V$ 일 때 그 결과가 Fig. 9에 주어졌다. 전극의 신호전류는 조직의 함량 변화에 크게 의존하였다. 완충용액(pH=3.8) 10 mL에 0.1 M 과산화수소 용액 100  $\mu L$ 가 공통적으로 첨가될 때, 전극의 조직 함량이 증가함에 따라 4%에서 최대값을 보인 후 다시 감소하는 것을 볼 수 있다. 소장조직의 함량이 증가함에 따라 전류가 증가하는 것은 전극 표면에 노출되는 활성자리의 증가로 볼 수 있다.<sup>15</sup> 그러나 4% 이상에서 감소하는 현상의 원인은 혈액중에서 glucose를 정량하기 위하여 탄소전극에 효소 tetrathiafulvalene(TTF)을 흡입시킨 Gunasingham 등의 실험 결과로부터 유추할 수 있다.<sup>30</sup> 그들은 이 감소 현상을 TTF가 증가에 따른 전극의 전도도 감소로 해석하고 있다.

**Ferrocene의 농도에 따른 신호크기의 변화.** ferrocene은 백금 표면에서 ferricinium이온과 산화환원 짝을 이루어 가역적으로 전자전이가 일어나며 대단히 빠르게 평형을 이루는 것으로 알려져 있다. ferrocene은 여러 용매에 대하여 0.56-0.64 V(vs. NHE)의 산화-환원 전위차를 가지는데 이 전위는 본 계에서 주로 이용되고 있는  $-0.150 V$ 에 대하여 비교적 높은 전위이다. 또 수용액 중에서  $1.7 \times 10^{-5} M$ 의 낮은 용해도를 가지며 전자전이 전후 구조의 변화가 없는 안정한 물질로 알려져 있다.<sup>31</sup> 이와 같은 ferrocene의 전기화학적 특성은 전자 이동매체(mediator)로서 적합함을 알려 주고 있다. Fig. 10은 ferrocene의 함량 변화에 따른 감응전류의 변화를 보여 주고 있다. 소장조직은 공통적으로 4%로 고정되었고, 측정 전위는

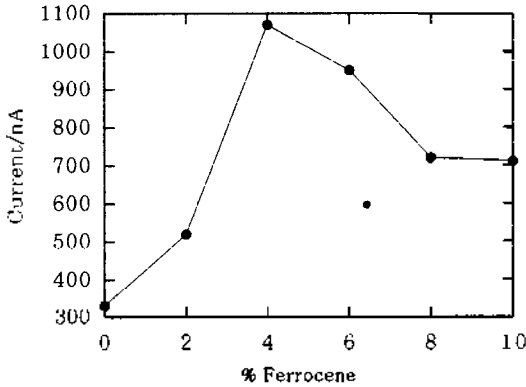


Fig. 10. Optimization of the mediator concentration in the electrode at  $-0.150V$  (tissue: 4%,  $H_2O_2: 1.0 \times 10^{-3}M$ ).

$-0.150V$ , 과산화수소 농도는 위의 경우와 같다. ferrocene을 첨가하지 않은 경우 330 nA이던 전류가 4% ferrocene을 포함하면 1075 nA로 약 3.2배 이상 증가하는 것을 볼 수 있다. Oungpipat 등은 이와 같은 증가 현상에 대하여 소수성이던 유기조직이 ferrocene에 대하여 더 넓은 노출 표면적을 제공하기 때문이라고 설명하고 있다.<sup>18</sup> 그러나 ferrocene함량이 더 증가하면 다시 감소하는 경향을 보이고 있다. 이는 이동매체가 다량 첨가 될 경우 탄소반축 전극의 전도도가 감소되어 감응전류가 감소하는 것으로 Senda 등은 설명하고 있다.<sup>32,33</sup> 이동매체의 역할은 각 조직마다 달라서 본 연구실에서 확인한 실험자료(근간)에 따르면 오리의 간조직을 탄소반축 전극에 혼입시켰을 경우, 이동매체가 첨가되지 않으면 전혀 신호를 관찰할 수 없었다.

**방해물질의 영향.** 기질에 대한 효소의 특이성은 거의 절대적이며 이와 같은 특성은 분석용 전극의 필수조건인 선택성(selectivity)을 만족시키기에 충분하다.<sup>18,28,34</sup> 여기서 취급되는 peroxidase의 경우 활성 자리의 입체구조가 전혀 알려져 있지 않고 있다. 그렇지만 기질이  $-OH$  잔기를 가지고 있으므로 방해물질의 영향을 살펴보기 위하여, 분석물질에 존재한다고 가정되는 물질 중에서  $-OH$  잔기를 가지고 있으며 동시에 양성자 주개 또는 받개로 작용할 수 있다고 생각되는 아미노산 8종(실험 부분 참조)을 선택하였다. 이 때 사용된 전극은 Fig. 4에 사용되었던 전극이다.  $5.0 \times 10^{-3}M$  과산화수소를 포함하고 있는 완충 용액(pH=3.8)에 이 방해 물질들의 농도가  $5.0 \times 10^{-3}M$ 이 되도록 첨가하였을 때 어떤 신호도 관찰할 수 없었으며, 역으로  $5.0 \times 10^{-3}M$ 의 방해물질을 포함하

고 있는 용액에 동일 농도의 과산화수소를 첨가한 경우, 신호크기는 방해물질이 없는 경우와 동일하였다. 이것은 본 계에서 사용되고 있는 peroxidase가 조사된 물질들과 비교하여 과산화수소에 대한 좋은 선택성을 보여주고 있음을 말하여 준다. 이와 같은 탁월한 선택성은 생체 조직에 함유된 효소를 이용하거나 공업용 효소를 이용할 경우라 할지라도 공통적으로 볼 수 있는 현상이다.<sup>19,23,30,34</sup>

**효소전극의 안정성.** 효소전극의 감도가 아무리 뛰어나더라도 보관수명이 짧다면 실용화되기 어렵다. 가능하다면 영구적으로 사용할 수 있는 것이 바람직하다. 본 실험에 사용되고 있는 탄소반축 전극의 장시간 사용 가능성을 알아보기 위하여, 30일 동안 보관하면서 전극 감응전류의 크기 변화를 조사한 결과를 Fig. 11에 보였다. 전극을 사용하지 않을 때는,  $6^\circ C$  냉장고에서 공기에 노출시킨 건조한 상태로 보관한 것이다. 30일이 경과한 후에도 초기 신호의 70%이상을 유지하였다. 이것은 닭의 간조직을 이용한 전극을 유사한 조건에 보관하였을 경우 3일 경과 시 70%정도로 전극 감응능력이 저하되는 경우에 비하여 대단히 우수한 것이다.<sup>23</sup> 구조적으로 단백질인 효소의 3차원 구조가 변형되는데 필요한 에너지는 15~60 kJ/mol로 대단히 작다. 따라서 공기중에 노출될 경우 그것이 변성될 경우의 수는 여러 가지가 가능하다. 우선 cystine 이황화물 교차결합이 공기중의 환원성 물질에 의하여 분해될 수 있으며 cysteine 잔기에 공기중의 산소나 기질로 사용된 과산화수소가 산화제로 작용한다면 새로운 cystine을 형성할 수도

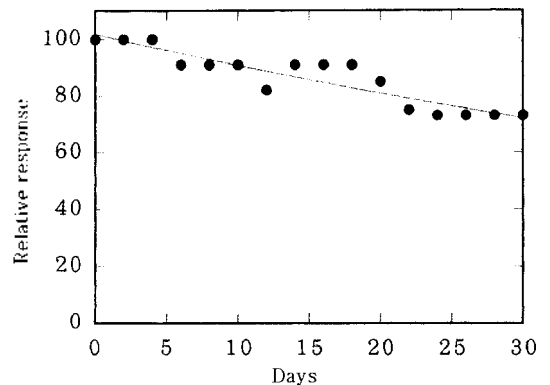


Fig. 11. Long term stability of the chicken small intestinal tissue based biosensor stored at  $-6^\circ C$  in the air. Other conditions are the same as in Fig. 6.

있다. 또 공기중에 포함된 미생물의 protase가 보관 온도에서 활성을 가진다면, 효소전극의 단백질을 분해하여 활성 위치 구조를 파괴할 수도 있다.

이와 같은 요인들은 효소전극을 공기중에 노출시켜 보관할 경우 효소의 변성을 가져와 전극의 감응능력을 악화시키는 요인들이 된다.<sup>35</sup> 효소전극의 수명은 보관 방법에 따라 차이가 대단히 크다.<sup>23,29</sup> 간조직의 경우 완충 용액중에 보관한 것은 노출시켜 보관한 것에 비하여 더 좋은 보관성을 보여 주었다. 따라서 보관 방법이 개선될 수만 있다면 이는 과산화수소 정량 효소전극의 실용화에 기여할 것으로 보여진다.

## 결 론

위의 소장에서 peroxidase의 활동도가 가장 높은 점에 근거를 두고 진행된 본 연구는 과산화수소를 정량하고자 닭의 생체 조직을 이용할 때 간조직보다 소장조직이 다음과 같은 여러 가지 장점이 있다는 것을 보여주었다.

1. 간조직<sup>23</sup>에 비하여 3.5배 이상의 큰 신호를 얻을 수 있었다.
2. 점정곡선 작성시 좋은 직선성을 보여 주었다.
3. 간조직( $t_{100\%}=23\text{sec}$ )에 비하여  $t_{100\%}=3\text{ sec}$ 의 짧은 감응시간을 얻을 수 있었다.
4. 간조직의 경우 전극제작 후 3일만에 초기 신호의 70%까지 감소하였으나 소장조직은 30일이 지나서 같은 결과를 보여주었다.

## 인 용 문 헌

1. 小澤昭彌; 山下正通; 小浦延行; 南宗祐 현대의 電氣化學; 淸文閣: Korea, 1995; p 211.
2. Clark, Jr. L.C.; Lyons, C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29.
3. (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.
4. Rosa, C. L.; Pariente, F.; Hernandez, L.; Lorenzo, E. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *308*, 129
5. Bonakdar, M.; Vilchez, J. L.; Mottola, H. A. *J. Electroanal. Chem.* **1989**, *266*, 47.
6. Wang, J.; Naser, N.; Kwon, H. S.; Cho, M. Y. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *264*, 7.
7. Messia, M. C.; Compagnone, D.; Esti, M.; Palleschi, G. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 360.
8. Conrath, N.; Grundig, B.; Huwel, S.; Cammann, K. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *309*, 47.
9. Luque de Castro, M. D.; Fernandez-Romero, J. M. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *311*, 281.
10. (a) Lee, J. I.; Karube, I. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *313*, 69.
11. Wang, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1048.
12. Huckaba, C. E.; Keyes, F. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 1640.
13. Willard, H. H.; Young, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55*, 3260.
14. Hurdis, E. C.; Romeyn, H. Jr. *Anal. Chem.* **1954**, *26*, 320.
15. Wang, J. J.; Lin, M. S. *Electroanalysis* **1989**, *1*, 43.
16. Lin, M. S.; Tham, S. Y.; Rechnitz, G. A. *Electroanalysis* **1990**, *2*, 511.
17. Fang, Y.; Cai, R.; Deng, J. *Electroanalysis* **1992**, *4*, 819.
18. Oungpipat, W.; Alexander, P. W.; Southwell-Keely, P. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *309*, 35.
19. Kwon, H. S.; Kim, K. K.; Lee, C. G. *J. Kor. Chem. Soc.* **1996**, *40*, 4, 278.
20. Csoregi, E.; Jonsson-Pettersson, G.; Gorton, L. *J. Biotech.* **1993**, *30*, 315.
21. Wijesuriya, D.; Lin, M. S.; Rechnitz, G. A. *Anal. Chim. Acta* **1990**, *234*, 453.
22. Chen, L.; Lin, M. S.; Hara, M.; Rechnitz, G. A. *Anal. Lett.* **1991**, *24*, 1.
23. Yoon, K. J.; Pyun, S. Y.; Kwon, H. S. *J. Kor. Chem. Soc.* **1997**, *41*, 7.
24. (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.
25. (a) Lundback, H.; Johansson, G. *Anal. Chim. Acta* **1983**, *155*, 47. (b) Akmal, N.; Mark, H. B., Jr. *Anal. Lett.* **1992**, *25*, 2175.
26. Aizawa, M.; Ikariyama, Y.; Kuno, H. *Anal. Lett.* **1984**, *17*, 555.
27. Wang, J.; Lin, M. S. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1545.
28. Matsubara, C.; Kudo, K.; Kawashita, T.; Takamura, K. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1107.
29. Navaratne, A.; Rechnitz, G. A. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *257*, 59.
30. Gunasingham, H.; Tan, C. H. *Analyst* **1990**, *115*, 35.
31. Bard, A. J.; Lund, H. *Encyclopedia of Electrochemistry of the Elements*; Marcel Decker Inc.: New York, U.S.A., 1979; Vol. XIII, pp 3-4.



32. Ikeda, T.; Hamada, H.; Miki, K.; Senda, M. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 541.
33. Senda, M.; Ikeda, T.; Miki, K.; Hasa, H. *Anal. Sci.* **1986**, *2*, 501.
34. Kwon, H. S.; Lee, C. G. *Anal. Sci. & Tech.* **1994**, *7*, 149.
35. Price, N. C.; Stevens, L. *Fundamentals of Enzymology*; Oxford University Press Inc.: New York, 1995; p 67.
-