

## 단 신

### 담배조직을 이용한 바이오센서의 과산화수소 환원 최적 산도

윤길중\*

청주대학교 이공대학 응용과학부  
(2004. 8. 27 접수)

### Optimum pH of the Reduction of Hydrogen Peroxide at a Tobacco Plant Tissue Based Amperometric Biosensor

Kil-Joong Yoon\*

Division of Applied Sciences, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea  
(Received August 27, 2004)

**주제어:** 과산화수소, 전류법, 바이오센서, 최적 산도

**Keywords:** Hydrogen Peroxide, Amperometry, Biosensor, Optimum pH

## 서 론

효소는 강한 산성이나 알칼리성 용액 중에서 변성을 일으켜 활성을 잃는다. 따라서 효소반응을 이용하여 불질을 정량하고자 제작되는 효소전극,<sup>1,2</sup> 즉 바이오센서는 어느 pH영역에서 효소 촉매력의 실황이 일어나는지 확인되어야 한다. 본 실험실에서는 생체조직을 탄소반쪽에 혼입시켜 과산화수소 정량을 위한 바이오센서를 제작하고, 그것들의 전기화학적 특성을 고찰하여, 보다 기능이 향상되고 감도가 뛰어난 과산화수소 센서를 개발하고자 노력해 왔으며, 얻어진 결과들을 수차례 보고한바 있다.<sup>3-7</sup> 이들 중에는 새로운 Michaelis-Menten 이론을 응용하여 바이오센서의 pH 의존성 활동도를 관찰함으로써, 이양성자성 산인 효소단백질의 촉매반응과정이 'EH+S→EHS→EH+P'임을,<sup>8</sup> 그리고 생체에 존재하는 과산화효소 동위효소(isozyme)들의 존재를 전기화학적 방법으로 확인할 수 있음을 밝혀 보고하기도 하였다.<sup>8a,9</sup> 과산화수소는 폐수처리나 소독에 사용되며, 피혁, 직물, 펄프 등의 표백 및 탈취제로 사용되는 중요한 공업용 시약이다.<sup>10</sup> 따라서 과산화수소를 신속하고 정확하게 정량하는 것은 대단히 중요한 일이다.<sup>11</sup> 본 논문에서는 보다 크고 안정한 신호특성을 갖는 전극 불질을 찾던 중, 담배

잎이 함유하고 있는 과산화효소가 큰 감응전류와 안정한 신호 특성을 나타낸다는 사실을 발견하고, 이를 이용한 전극을 제작하여 그 특성을 전기화학적 방법으로 고찰하였다. 특히 전극신호의 안정성은 신호전류가 포화되는 시간의 측정을 가능케 하였으며, 신호전류 크기의 산도 의존성을 관찰함으로써 담배조직을 이용한 과산화수소 정량 바이오센서의 최적 산도를 도출할 수 있었다. 여기에 그 결과를 보고하고자 한다.

## 실 험

### 기구 및 시약

제작된 전극의 전기화학적 특성을 살펴보기 위한 순환전압전류도는 EPSILON(BAS Model EPSILON cyclic voltammograph, Bioanalytical System, Inc., U.S.A.)을 이용하여 얻었으며, 여기에는 Ag/AgCl 기준전극(BAS, MF2052)과 Pt 보조전극이 연결되었다. 이외의 모든 신호측정은 기록계, KIPP & ZONEN(BD 111, Holand)가 연결된 EG&G Model 362(Princeton Applied Research, U.S.A.) 일정전위기를 사용하였다. 전해질 용액의 pH 확인은 표준완충용액 pH 4, 7, 10(Shinyo Pure Chemicals Co., Japan, S.P.C. GR Reagent)을 이

용하여 검정된 Digital pH/mV/Temp meter(Suntex SP-701, Taiwan)을 이용하여 이루어졌다. 흑연가루( $\leq 0.1$  mm)와 미네랄오일은 각각 Fluka와 Sigma사 제품이었으며, 기질로 사용된 과산화수소는 Junsei(35% EP)사 제품을 이용하였다. 실험 용액은 일반적으로 사용되는 완충물질의 경우 광범위한 pH조정이 불가능하므로 0.1 M의 NaCl(Shinyo Pure Chemicals Co., Japan,  $\geq 99.5\%$ ) 중성 전해질을 이용하였다. 그리고 이 전해질 용액의 pH는 묽은 HCl(Orintal Chem. Co., Korea)과 NaOH(Shinyo Pure Chemicals Co., Japan)을 적절히 가하여 조정하였다.

### 전극의 성형

탄소반죽 전극 속에서 전자 전달물질로 사용될 매체물질, ferrocene 0.09 g을 10 mL의  $\text{CHCl}_3$ 에 녹여 흑연가루 0.91 g과 혼합한 후, 60 °C에서 건조하여  $\text{CHCl}_3$ 을 제거한다. 얻어진 ferrocene 포함 흑연가루와 미네랄오일을 55:45(wt/wt)의 비율로 혼합하여 탄소반죽을

만든다. 담배 조식은 90분 이상 호모게나이저로 파쇄하며, 필요량의 조식을 취하여 60 °C에서 수분을 제거한 후, 이 반죽에 혼합시켜 완전히 혼합한 다음, 오음 접촉이 제공되는 직경 6 mm의 polyethylene 튜브에 채워 전극으로 사용한다.<sup>26</sup>

## 결과 및 고찰

### 전극의 전기화학적 특성

Fig. 1은 산도가 pH 7.75인 전해질 용액 중에서 담배조식 함량이 10%인 전극의 전기화학적 특성을 보여주는 순환전압전류도이다. a, b, c, d의 연속된 순서로 전압 주사되었으며, a와 b는 전해질에 기질용액이 가해지지 않았을 경우의, 그리고 c와 d는 10 mL 전해질 용액에 0.10 M  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 200  $\mu\text{L}$ 가 가해진 경우의 변화된 모습을 보여주고 있다. 음의 방향으로 전압 주사(0.0 mV  $\rightarrow$  -300.0 mV)하는 a의 경우, 음전위 증가에 따라 환원전류가 점진적으로 증가하는 것을 보여

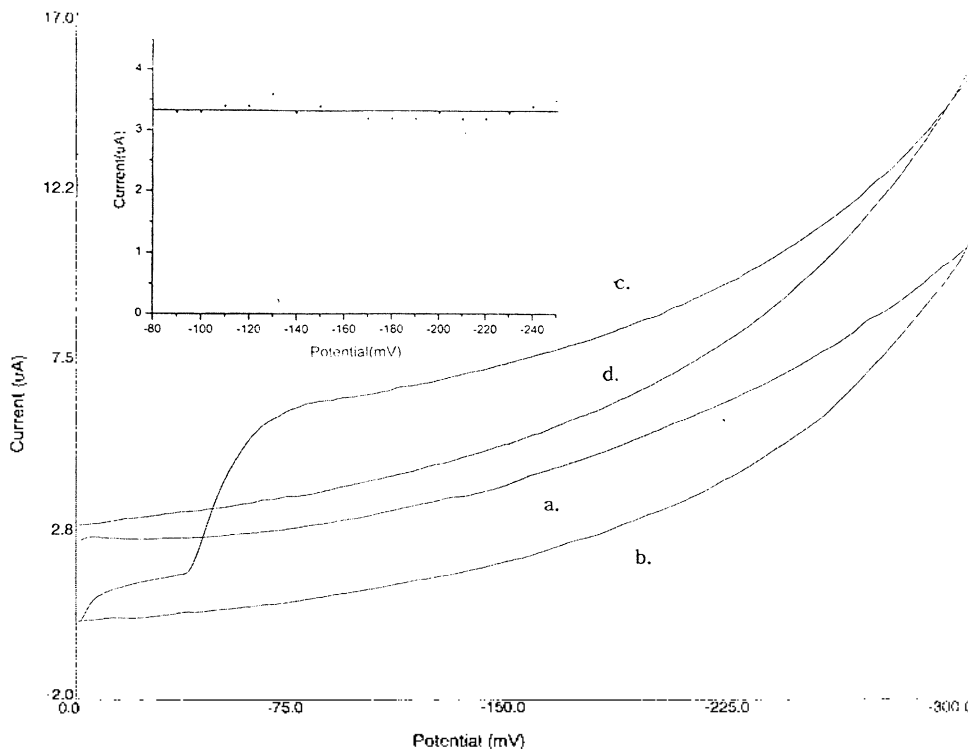


Fig. 1. Cyclic voltammograms of the tobacco plant tissue modified carbon paste electrode without(a, b) and with(c, d) 200  $\mu\text{L}$  of 0.10 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 10 mL of 0.10 M NaCl (pH: 7.75, scan rate: 10 mV/sec, tissue %: 10). The current difference between a and c is shown(inset).

주고 있는데, 이는 전극에 함유된 담배조직 자체가 여러 가지 화합물의 혼합물인 점을 감안할 때, 현 단계에서 구조가 확인되지 않은 전기화학 반응이 계 내부에서 일어나고 있을 가능성이 있으며, 전극전위 증가로 인한 충전전류의 증가가 함께 기여한 것으로 볼 수 있다. c의 경우 음전위 주사 시,  $-40$  mV(vs. Ag/AgCl) 시점에서 기질이 첨가되자 전극전류의 급격한 변화를 보여주고 있다. 이 변화는 기질의 첨가에 기인하고,  $-40$  mV 이후에 얻어지는 전압전류도의 형태가 a와 비교하여 전류증가 외에 변형된 점이 없는 것으로 보아 증가된 전류 a와 c의 차이는 오직 과산화수소의 환원에 기인한 것이라고 해도 무방할 것이다. 전류 a와 c의 차를 취하고, 그것을 전압에 대하여 도시한 것이 Fig. 1의 창에 주어졌다. 전류의 차, 즉 신호전류는 전압에 대하여 무관한 것을 볼 수 있는데, 이는 전극전위의 변화에 대하여 직선적으로 변하는 속의 경우나,<sup>9,12</sup> 단조 증가하는 닭의 간조직의 경우와는 대조적이다.<sup>6,8b,10</sup> 다만 여기서 증가된 전류가 전압 증가에 무관하게 일정한 것은 환원되는 화학종이 단일종이며, 그것이 과산화수소에 기인함을 뒷받침하여 주고 있다. 신호전류 측정을 위한 전극전위는 위 예의 경우들 보다 낮추어  $-150$  mV(vs. Ag/AgCl)로 고정하였다. Fig. 2는 본 실험에서 신호가 얻어지는 전형적인 과정을 보여주고 있다. pH 9.37의 10 mL 전해질 용액 중에서 19%의 담배조직을 포함하고 있는 전극을 이용하는 경우인데, 기질이 없는 상태에서 전위계단

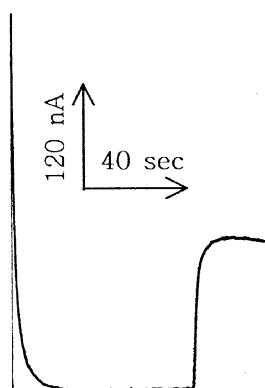


Fig. 2. Typical time course of signal showing the experimental determination of the response current and the saturation time. The measurement was under the following conditions. pH=9.37, tissue%=19, electrode potential= $-150$  mV(vs. Ag/AgCl),  $30 \mu\text{L}$  of  $0.10$  M hydrogen peroxide was added into  $10$  mL electrolytic solution.

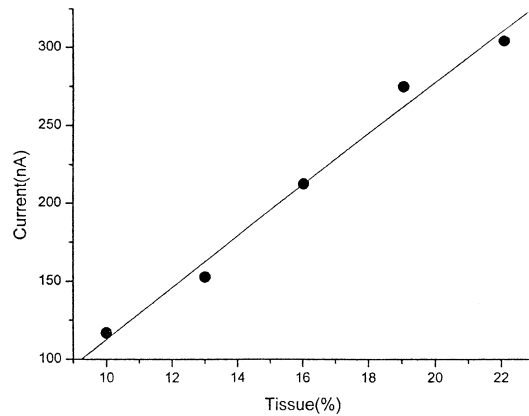


Fig. 3. Effect of the tissue composition on the response current at pH 7.75.  $50 \mu\text{L}$  of  $0.10$  M  $\text{H}_2\text{O}_2$  solution was added.

(potential step) 적용 시, 급격히 형성된 충전전류는 대략 15초 경과 후 바탕선 수준으로 감소하여 신호측정에 영향을 미치지 않는다. 바탕선의 변화가 없는 상태, 즉 위의 경우 전위계단 형성 후 70초가 경과되었을 때,  $0.10$  M  $\text{H}_2\text{O}_2$  기질용액  $30 \mu\text{L}$ 가 첨가되면 신호전류가 생성되는데, 그 전류는 대략 13초를 경과하면 포화되고, 그 크기는  $180$  nA임을 보여주고 있다. 한편 전극 표면에 존재할 수 있는 활성자리의 수는 전극 물질이 포함하는 조직의 함량 변화와 직접적 관련이 있다. 전극의 담배조직 함량만을 변화시켜 신호전류의 변화를 관찰한 결과가 Fig. 3에 주어졌다. 전극전위  $-150$  mV에서  $0.10$  M  $\text{H}_2\text{O}_2$  용액  $50 \mu\text{L}$ 를 가할 때, 신호전류는 조직의 함량 변화에 대체로 직선성 ( $y=16.7x-54.2$ , y: current(nA), x: tissue %,  $R=0.993$ )임을 보여주고 있다. 경향성에 따르면 큰 신호를 얻기 위하여 전극이 보다 많은 조직을 포함할 것이 요구된다. 함량%가 증가할수록 탄소반족의 침도가 소멸하며, 전극의 반복 사용으로 인한 전극 표면의 훼손이 전류의 재현성에 크게 손상을 주므로, 측정에 사용될 파쇄된 담배조직의 함량은 19%로 고정하였다. 위의 실험결과로부터 얻어진 실험 조건, 즉 전극전위  $-150$  mV와 조직 함량 19%인 전극을  $0.10$  M NaCl 용액  $10$  mL에 위치시키고, 여러 실험 pH값에서  $0.10$  M 기질용액  $30 \mu\text{L}$ 를 추가하였을 때 얻어지는 전류 (nA)의 값들이 Table 1에 주어졌다. 그리고 이 값들을 pH에 대하여 도시한 것이 Fig. 4에 주어졌다. Fig. 4가 보여주는 경향성은 pH 8.00과 pH 10.0 사이에서 극대값이 형성되고 있음을 알 수 있다. 단백질로 구성된 효

Table 1. Effect of pH on the response current and the saturation time. 30  $\mu$ L of 0.10 M hydrogen peroxide was added

pH	i(nA)	t(sec)	pH	i(nA)	t(sec)
3.56	33	52	8.26	158	18
4.07	45	48	9.07	177	15
4.68	60	44	9.78	153	18
5.08	83	34	10.45	132	20
5.55	105	26	11.19	117	22
6.10	120	21	11.78	84	26
6.80	140	20	12.30	64	28
7.60	150	18			

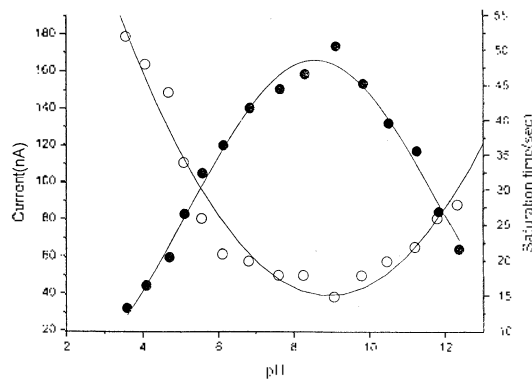


Fig. 4. pH-dependence of the current (●) and the saturation time (○). Other conditions are the same as in Fig. 2.

소의 활성자리는 용액 중에 존재하는 양성자의 탈착이 가능한 카복시 말단과 아미노 말단으로 구성되어 있다. 그러므로 용액의 pH변화는 효소 활성자리의 입체적 구조, 즉 효소의 촉매력에 크게 영향을 미칠 수 있다. 여기서 pH변화에 따라 최대 전류를 나타내는 pH값이 존재하는 것은 양성자의 탈착이 효소 단백질과 기질의 입체적 결합을 최적화시켜 촉매력을 최대화하는 pH가 존재함을 시사하고 있다. 실험적으로 pH값만을 세분하여 최적pH를 확인할 수 없으므로 고추냉이로부터 추출된 과산화수소를 이용한 전극의 경우<sup>2)</sup>와 같이 과산화수소의 환원함수가 가우스 분포를 형성할 것이라는 가정 하에 가우스 함수로 시뮬레이션하여 방정식.

$$i = (A/(w*\sqrt{\pi/2}))^2 \exp(-2*(pH - 8.517)/w)^2 - 39.17$$

을 얻었다. 여기서 A와 w의 값은 각각 1715와 6.90이며, 함수의 최대값은 pH값이 8.517일 때 얻어지는

것을 알 수 있다. 담배조직을 사용한 과산화수소 센서의 최적 산도에 대하여 보다 많은 연구가 이루어져야 할 것이다. 현 단계에서는 이 값을 최적 산도라고 해도 무방할 것이다. Table 1에는 Fig. 2에서 얻어진 것과 동일한 방법으로 측정된 전류의 포화시간이 주어지고, pH에 따른 그것의 변화가 Fig. 4에 함께 도시되어있다. pH변화에 따른 포화시간의 변화 경향성은 전류 크기와 반대 경향성을 보여주고 있으며, 그것을 시뮬레이션한 방정식은 이다. 이 식의 최소값 14.5 sec는 pH값이 8.93일 때 얻어지는데, 이 값은 위에서 전류의 크기로부터 얻어진 8.517과 크게 다르지 않다. 이는 pH 8.93의 양성자 농도가 이양성자성산(diprotic acid)인 아미노산의 잔기로 형성된 효소의 활성자리의 입체적 구조에 대하여 기질과의 상호작용이 가장 효율적이 되도록 영향을 미치고 있음을 말하여 주고 있다.

## 결론

산화-환원, 즉 전자의 이동이 수반되는 효소반응은 전기화학적인 방법으로 반응의 속도나 반응 메커니즘에 관한 정보를 얻을 수 있다. 담배조직을 포함한 전극을 제작하고, 이로부터 얻어진 과산화수소의 pH 의존성 환원전류와, 신호전류가 포화되는 시간의 변화 경향성을 분석하여 담배 과산화수소 분해효소의 최적 산도를 도출하였다. 두 방법으로 얻어진 최적 산도는 크게 다르지 않았으며, 각각 8.517과 8.93이었다.

이 논문은 2004-2006학년도 청주대학교 학술연구 조성비(특별과제)에 의하여 연구되었으며, 이에 깊이 감사드립니다.

## 인용문헌

- Ruan, C.; Yang, R.; Chen, X.; Deng, J. *Electroanal. Chem.* **1998**, *455*, 121.
- Sergeyeva, T. A.; Lavric, N. V.; Rachkov, A. E.; Kazantseva, Z. I.; Piletsky, S. A.; El'skaya, A. V. *Anal. Chim. Acta.* **1999**, *391*, 289.
- Bongiovanni, C.; Ferri, T.; Poscia, A.; Varalli, M.; Santucci, R.; Desideri, A. *Bioelectrochem.* **2001**, *54*, 17.
- Liu, S. Q.; Ju, H. X. *Anal. Biochem.* **2002**, *307*, 110.
- (a) Kwon, H. S.; Kim, K. K.; Lee, C. G. *J. Kor. Chem. Soc.* **1996**, *40*, 4, 278. (b) Yoon, K. J.; Pyun, S. Y.; Kwon, H. S. *J. Kor. Chem. Soc.* **1997**, *41*, 7, 343.

6. Yoon, K. J.; Kim, K. J.; Kwon, H. S. *J. Kor. Chem. Soc.* **1999**, *43*, 3, 271.
  7. Lee, B. G.; Yoon, K. J.; Kwon, H. S. *Anal. Sci. Tech.* **2000**, *13*(3), 315.
  8. (a) Yoon, K. J. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2004**, *25*, 7, 991.  
(b) Yoon, K. j.; Lee, B. G.; Kwon, H. S. *Anal. Sci. Tech.* **2000**, *13*(1), 41. (c) Lee, B. G.; Kwon, H. S.; Kim, K. E.; Yoon, K. J. *Anal. Sci. Tech.* **2001**, *14*(3), 286.
  9. Yoon, K. J. *Anal. Sci. Tech.* **2003**, *16*(6), 504.
  10. (a) Kirchner, J. R. *Encyclopedia of Chemical Technol-*  
*ogy*; Wiley-Interscience; New York, U.S.A., 1981; Vol. 13, p12. (b) Irving Sax, N. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*; Van Nostrand Reinhold: New York, U.S.A., 1987; p 618.
  11. (a) Lin, M. S.; Tham, S. Y.; Rechnitz, G. A. *Electroanalysis* **1990**, *2*, 511. (b) Fang, Y.; Cai, R.; Deng, J. *Electroanalysis* **1992**, *4*, 819. (c) Oungpipat, W.; Alexander, P. W.; Southwell-Keely, P. *Anal. Chim. Acta.* **1995**, *309*, 35.
  12. Yoon, K. J.; Kwon, H. S. *Anal. Sci. Tech.* **2004**, accepted.
-