Journal of the Korean Chemical Society
2005, *Vol. 49, No. 2*
Printed in the Republic of Korea

단 신

양송이 즙-금 전극을 이용한 페놀의 전기화학적 정량

권효식* · 진은화 · 윤길중† · 박용남‡
충북대학교 사범대학 과학교육학부
†청주대학교 자연과학부
‡한국교원대학교 화학교육과
(2004. 11. 9 접수)

Mushroom-juice Based Gold Electrode for the Determination of Phenols

Hyoshik Kwon*, Eunhwa Jin, Kil-Joong Yoon†, and Yongnam Pak‡
School of Science Education, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
†Division of Applied Sciences, Chongju University, Cheongju 360-764, Korea
‡Department of Chemistry Education, Korea National University of Education, Chungbuk 363-791, Korea
(Received November 9, 2004)

주제어: 양송이 버섯 즙, 금 전극, 페놀
Keywords: Mushroom-juice, Gold electrode, Phenol

페놀과 치환된-페놀은 의학, 식품, 및 환경에서 매우 중요한 물질이다.[1] 페놀은 매우 독성이 크기 때문에 낮은 수준의 농도로 환경에 오염되어 있더라도 위험하므로 페놀의 정량방법은 좋은 감도를 가져야 한다. 페놀의 모니터링은 현재 비색분석법, 기체크로마토그래피법, 액체크로마토그래피법, 모세관전기영동법 등이 이용되고 있다.[2-5]

그러나 이들 방법은 시료의 전처리가 복잡하고, on-site monitoring이 어려운 단점이 있다. 이러한 문제들을 해결하기 위해 최근에는 페놀 화합물의 정량에 phenol oxidase를 이용한 전기화학적인 방법이 널리 사용되고 있다.[6,7] 이것은 비교적 값이 저렴하고, 보관하기가 편리하며 소형화와 자동화가 가능하기 때문이다.

페놀의 정량에는 주로 phenol oxidase와 tyrosinase를 사용한 여러 가지 센서가 제시되었다.[6-14] 특히 mushroom tyrosinase는 monophenol의 히드록시화 반응을 촉매화하여 *o*-diphenol을 만들며, *o*-diphenol은 산소분자를 사용하여 *o*-quinone이 된다.[16-17]

$$\text{Phenol} + \text{tyrosinase}\ (O_2) \rightarrow \text{catechol} \qquad (1)$$

$$\text{Catechol} - \text{tyrosinase}\ (O_2) \rightarrow o\text{-quinone} \qquad (2)$$

o-Quinone은 낮은 과전압에서 전자전달매개체 없이도 다음 식과 같이 전기화학적으로 *o*-diphenol로 환원된다.

$$o\text{-Quinone} + 2H^+ + 2e^- \rightarrow \text{catechol} \qquad (3)$$

따라서 페놀의 검출은 quinone 생성물의 생성과 산소 조효소의 소비를 모니터링함으로써 가능하다.

근래에는 탄소반죽전극에 tyrosinase를 고정한 바이오센서가 보고되었다.[7,11-13,18]

Kulys등은[19] bovine serum albumin과 glutaraldehyde를 이용하여 graphite와 printed graphite 전극에 laccase를 고정하여 페놀을 정량하였으며, pyrocatechol에 대하여 1~13 μM의 농도범위에서 직선성을 나타내었다.

Wang등은[20] 유기 용매인 chloroform 용매에서 바나나와 양송이 버섯을 탄소막대 전극에 고정하여 페놀 화합물을 정량하였으며, Kwon등은[21] chloroform 용매가 아닌 염화메틸렌 용매속에서 페놀을 정량할 수 있

는 예를 보고하였다.

본 연구에서는 우리 주위에서 쉽게 구할 수 있는 양송이 즙-금 전극 바이오센서를 제작하여 페놀을 정량 할 때의 최적 pH, 감응시간, 최적온도, 감도, 안정성 등 전극의 여러 가지 전기화학적 특성을 조사하였다.

실 험

기기 및 시약

본 실험의 전류측정은 EG&G Princeton Applied Research Model 264A Scanning Potentiostat을 사용하여 측정하였다. 또한 기록계는 Kipp & Zonnen recorder를 사용하였다. 기준전극과 보조전극으로 각각 Ag/AgCl(Model Re-1 BAS)과 백금선 전극을 이용하였으며, 일정량의 시료를 취하기 위하여 Gilson사의 micropipet을 사용하였다.

메탄올은 Merck사(99.8%)의 것을 사용하였고 KH_2PO_4와 K_2HPO_4는 Shinyo 순정 화학주식회사의 것을, phenol, catechol은 Aldrich 사의 시약을, *p*-chlorophenol(JUNSEI 98%)과 *p*-cresol(KANTO Chemical Co. 99%)을 사용하였다. 모든 용액은 증류수를 이용하여 만들었다.

페놀 화합물은 메탄올에 적정량을 녹여 만들었고, 완충용액은 0.050 M KH_2PO_4와 0.050 M K_2HPO_4 용액의 부피 비를 적절히 조합하여 만들었으며, 모든 용액은 항상 실험 직전에 새로 만들어 사용하였다.

실험에 사용한 양송이 버섯은 대형 할인점에서 구입하여 5°C로 유지된 냉장고에 보관하여 사용하였다.

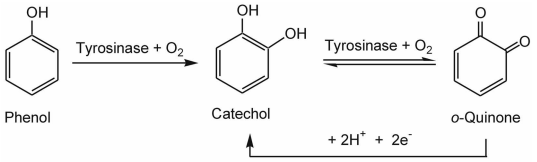
전극의 제조 및 실험 절차

반응용기는 20 mL 들이의 부피를 갖는 BAS-Model VC-2 voltammetric cell을 사용하였고, 이 cell을 구멍 뚫린 teflon 마개로 막은 다음 작업 전극, 기준 전극, 백금 보조전극을 마개의 구멍에 각각 고정시키고, 각 전극을 potentiostat에 연결하였다. 작업 전극으로는 시중 금방에서 주문 제작한 지름 8 mm, 두께 2 mm의 순금(99.9%) 전극을 사용하였다. 전류법 바이오센서로 페놀 농도를 측정하는 동안 시료 용액은 300 rpm의 속도로 저어주었다. 1×10^{-3} M phenol을 20 μL을 첨가한 후 첨가 전 후 신호크기를 감응전류로 간주하여 측정하였다.

양송이 즙은 다음과 같이 만들었다. 시중에서 구입한 신선한 양송이 20 g을 취하여 비닐 장갑을 낀 손으로 눌러 시계접시에 즙을 낸 후 5°C 냉장고에서 24시간 동안 수분을 날려보냈다. 양송이 즙은 마이크로 피펫을 이용하여 50 μL를 취한 후 금 전극의 표면에 가한 후 셀로판지로 덮어서 고정하였다. 또한, 금 전극은 먼저 증류수로 씻고, 메탄올로 씻은 후 킴와이프스로 잘 닦았다. 이것을 패드 표면 위에 polishing alumina(BAS사 CF-1050) 5방울을 떨어뜨린 후 2분 동안 문질렀다. 이것을 다시 메탄올로 씻어 말린 후 사용하였다. 남은 양송이 즙은 냉장 보관하였다. 또한 사용한 전극은 완충용액에 담가 냉장 보관하였으며 모든 실험은 실온에서 측정하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 사용한 금 전극과 양송이 즙을 사용한 바이오센서의 메커니즘은 다음과 같다.



본 연구에서는 금 전극에 양송이에 들어있는 tyrosinase 효소를 고정시켜 산소 분자의 수산기화 반응을 통해 페놀을 catechol과 *o*-quinone으로 바꾸는 산화반응의 촉매 역할을 하도록 하였다. 정량분석 신호는 *o*-quinone이 catechol로 전기화학적 환원반응에 대한 전류를 감응전류로 측정하였다.

Fig. 1은 0.050 M 인산 완충용액(pH=6.53) 10.0 mL에 1.0×10^{-3} M phenol 용액 20 μL를 누적적으로 10회 첨가하는 동안에 변화된 신호를 나타낸 것이다. 즉, 양송이 즙을 고정한 금 전극을 사용하였을 때 (b)와 금 전극만을 사용하였을 때 (a), phenol에 대한 감응전류(-0.15V vs. Ag/AgCl)의 변화를 보여주는 전형적인 예이다. *Fig.* 1a에서 계단이 시작되는 곳은 phenol의 첨가 시점을 나타낸다. 전극에 효소를 고정되지 않은 b의 경우는 거의 감응을 보이지 않았다.

pH에 따른 감응전류의 변화

효소-금 전극의 pH 의존성은 pH=5.9에서 pH=7.7 범위에서 조사하였다. *Fig.* 2는 2 μM phenol이 들어있는 0.050 M 인산완충용액에서 전극의 감응 전류를 나타낸 것이다. 순수하게 분리된 tyrosinase 효소 전극

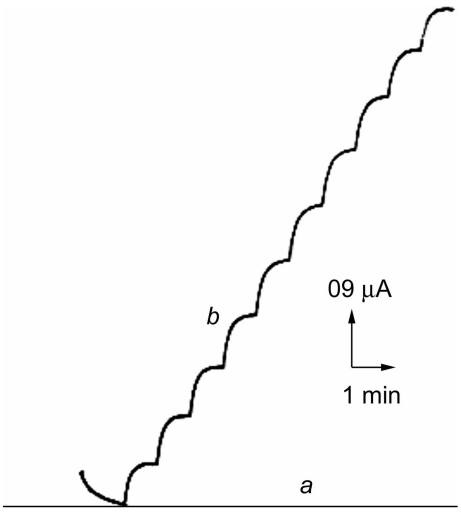


Fig. 1. Current-time recording obtained at (a) mushroom juice-modified, (b) the unmodified gold electrode on increasing the phenol substrate concentration. Successive increments of 1×10^{-5} M phenol. Operating potential, -0.150 V, pH=6.53, 0.050 M phosphate buffer. Stirred 300 rpm.

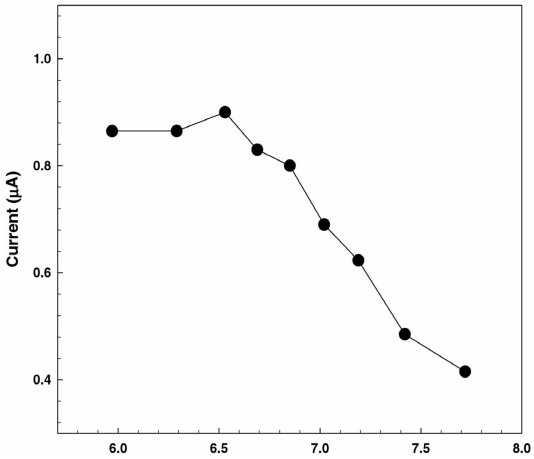


Fig. 2. Variation in current with pH. Other conditions were same as in *Fig.* 1.

에 대한 최적 감응 pH 범위는 pH=5~8로 보고되었으며, 본 실험에서는 pH 6.0~6.8로 나타났다. 특히, pH=6.9이상에서는 감응전류가 급격히 감소하였다.[22] 따라서 본 실험에서는 가장 큰 감응전류를 나타낸 pH=6.53을 선택하였다.

페놀류의 화합물의 tyrosinase-촉매 산화에서는 산소가 촉매반응에 참여하여 페놀 화합물을 catechol로 산화시키고, tyrosinase의 존재하에서 catechol을 *o*-quinone으로, 탈수소화반응을 일으킨다.[23]

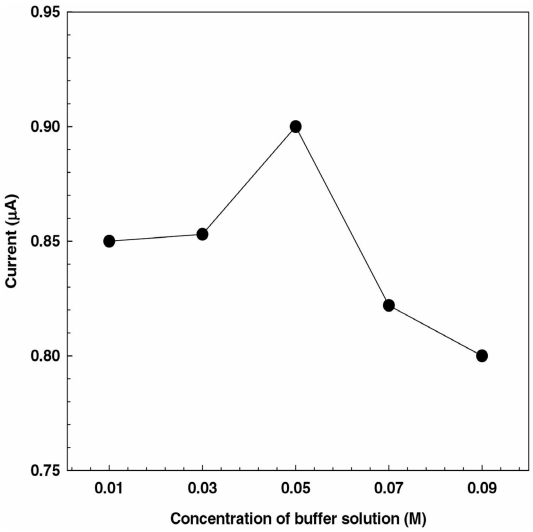


Fig. 3. Dependence of concentration of buffer solution. Other conditions were same as in *Fig.* 1.

공기로 포화시킨 완충용액과 질소로 포화시킨 완충용액에서 2 μM phenol을 넣었을 때 나타나는 감응전류를 비교하였다. 인산완충용액을 5분 동안 질소로 포화시킨 용액에서 phenol에 대한 감응전류는 공기로 포화시킨 완충용액의 신호와 거의 같게 나타났다. 그러나 30분 동안 질소로 포화시킨 완충용액에서는 공기로 포화된 용액에서 나타난 신호보다 대략 15%정도 신호의 감소가 나타났으며, 1시간 동안 포화시킨 완충용액에서는 대략 45%가 감소하였다. 이것은 이 실험에서 사용한 phenol의 농도가 2 μM로 매우 낮았으므로 30분~1시간 동안 질소로 포화시켰다 하더라도 완충용액에는 산소가 효소반응을 일으키는데는 비교적 충분한 양이 남아있기 때문이라고 생각된다.[24]

Fig. 3은 완충 용액의 농도를 달리 할 경우 나타나는 전류의 변화량을 나타낸 것이다. pH=6.53, 작업 전극의 전위 -0.15 V에서 완충 용액의 농도를 0.010 M에서 0.090 M까지 0.020 M 간격으로 농도를 변화시켰을 때, 완충 용액의 농도가 0.050 M 일 경우 감응전류가 가장 크게 나타났다. 따라서 본 페놀 정량실험은 완충 용액의 농도를 0.050 M로 고정하였다.

작업전극의 전위에 대한 감응전류의 변화

Fig. 4는 작업전극의 전위에 대한 전류의 의존도를 보여주고 있다. pH=6.53인 0.050 M 인산 완충 용액에 1.0×10^{-5} M *p*-chlorophenol 20 μL를 넣었을 때 나타난 작업전극의 전류를 측정하였다. 본 연구에서는

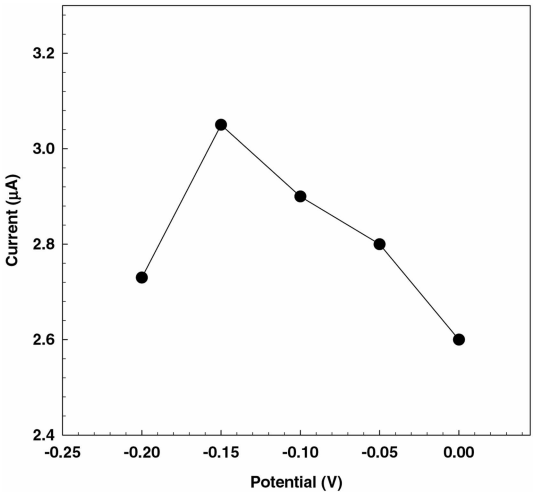


Fig. 4. Dependence of the biocatalytic current on the operating potential. Other conditions were same as in *Fig.* 1.

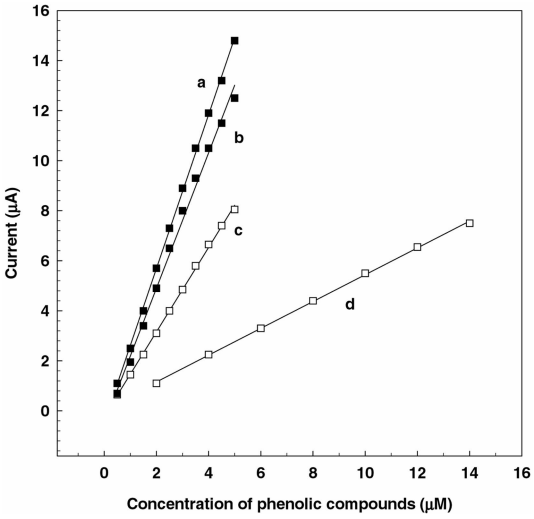


Fig. 5. Dependence of the current response of the mushroom-juice modified electrodes on the concentration of (a) phenol, (b) catechol, (c) *p*-cresol and (d) *p*-chlorophenol. Other conditions were same as in *Fig.* 1.

작업전극의 전위를 0.00 V에서부터 -0.20 V까지 0.050 V씩 변화시킬 때 -0.15 V의 환원전위에서 가장 큰 감응전류를 보인 후 다시 감소하였다. 따라서 본 실험에서는 감응전류가 높으면서 잡음이 적은 -0.15 V를 작업전위로 선택하였다.

페놀의 농도에 따른 감응 전류의 변화

Fig. 6은 감응 전류의 변화가 가장 크게 나오는 조건들에서 phenol (a), catechol (b), *p*-cresol (c), 및 *p*-chlorophenol(d)의 농도를 달리 하면서 감응 전류 값의 변화를 측정한 것을 도시한 것이다. 검정곡선의 감도는 phenol > catechol > *p*-cresol > *p*-chlorophenol의 순으로 나타났다. *Table* 1에 phenol, catechol, *p*-cresol, 및 *p*-chlorophenol의 직선범위, 상관계수, 겉보기 Michaelis-Menten 상수(K_{app}^{m})값을 나타내었다.

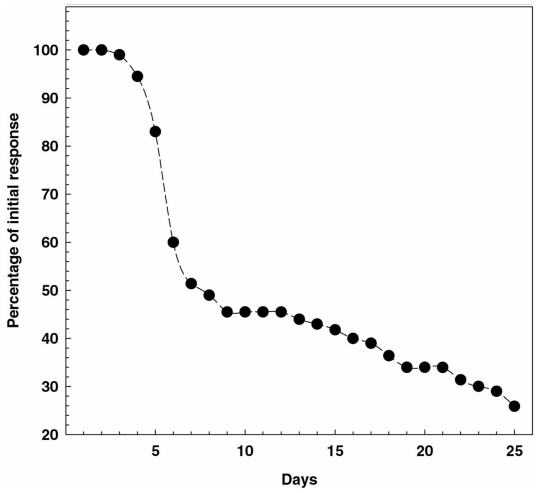


Fig. 6. Long term stability of the mushroom juice based gold electrode. Other conditions are the same as in *Fig.* 1.

Table 1. Reponse characteristics of the mushroom-juice based gold electrode to various phenolic compounds

Compound	Linear range (M)	r[a]	K_m^{app} (μM)
Phenol	5×10^{-7}~5×10^{-6}	0.9992	31
Catechol	5×10^{-7}~5×10^{-6}	0.9949	52
p-Cresol	5×10^{-7}~5×10^{-6}	0.9989	60
p-Chlorophenol	1×10^{-6}~1.4×10^{-5}	0.9995	99

[a]Correlation coefficient of the linear response of the enzyme electrode.

바이오센서로 사용할 수 있으려면 감응시간과 감도가 좋아야 한다. 많은 경우, 바이오센서의 반응속도론적 분석은 Michaelis-Menten식의 한 형태인 Eadie-Hofstee식을 사용한다. 전류법 바이오센서에서는 이 식에서 반응속도 대신 정류상태의 전류를 사용한다.

$$I_s = I_s^{max} - K_m^{app}(I_s/C_s)$$

여기에서 I_s는 정류상태의 전류이며 C_s는 기질의 농도이다. 또한, 겉보기 Michaelis-Menten 상수, K_m^{app}는 직선의 기울기이다. Phenol의 K_m^{app}값은 31 μM로 나타났으며 순수한 sol-gel 매트릭스에서 보고된 값[26]보다는 훨씬 더 낮은 값이다. 보통 기질분자와의 친화

력(affinity)이 높을수록 K_m^{app}값은 낮게 나타난다.

효소 전극의 안정성, 재현성, 검출한계

본 연구에서 사용한 양송이 즙 금 전극이 어느 기간까지 유용하게 사용할 수 있는지를 알아보기 위해 25일간 *p*-chlorophenol을 이용하여 감응 전류의 변화를 조사하였다. 이때 *p*-chlorophenol 용액은 매일 만들어 사용하였으며, 실험 동안 전극은 pH=6.53의 0.050 M 인산 완충용액에 담가 냉장 보관하였다. 실험 결과 4일째까지는 90%이상의 효율을 나타내었으나 6일째부터는 60%로 감소하였다. Onnerfjord등은[26] 순수한 tyrosinase 효소를 사용하여 페놀을 정량하였을 때 14일 후 초기 신호의 25%로 감소한 것에 비하여 본 실험에서의 양송이 버섯 즙을 고정한 금 전극은 40%의 감응도를 유지하였다. 또한, 2 μM phenol을 사용하여 15회 반복 측정한 결과 상대 표준 편차는 1.23%이었다. 또한 기록계의 감도를 조절하여 검출한계를 실험한 결과 페놀의 검출한계는 2.5×10^{-7} M이었다.

결 론

Gold 전극과 양송이 즙에 들어 있는 효소인 tyrosinase를 이용하여 페놀의 농도를 정량하기 위한 바이오센서의 최적 실험 조건을 다음과 같이 조사하였다.

전극은 pH=6.53(0.050 M 인산 완충용액)에서 가장 좋은 감응을 나타내었고, 전극은 -0.10 V~-0.15 V의 환원전위에서 가장 좋은 감응을 나타내었다.

또한 페놀류 화합물의 양이 증가함에 따라 전류도 비례하여 증가하였으므로 효소 촉매분해반응으로 좋은 전극임을 알 수 있었다. 검정곡선의 감도는 phenol > catechol > *p*-cresol > *p*-chlorophenol의 순으로 나타났다. 전극은 4일째까지는 90%이상의 효율을 나타내었으나 6일째부터는 60%로 감소하였다. 2 μM phenol을 사용하여 15회 반복 측정한 결과 상대 표준 편차는 1.23%이었으며, 페놀의 검출한계는 2.5×10^{-7} M이었다.

양송이 버섯의 즙을 이용한 경우 전극의 우수한 안정성과 감도를 가지는 것으로 나타났으며, 전극을 만들기가 쉽고, 순수한 효소전극에 비해 매우 저렴한 가격으로 만들 수 있어 페놀화합물의 정량에 유용한 바이오센서이다.

이 논문은 2004년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의해 이루어졌기에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Rogers, K. R.; Becker, J. Y.; Wang, J.; Lu, F. Field Anal. *Chem. Technol.* **1999**, *3*, 161.
2. Castillo, M.; Domingues, R.; Alpendurada, M. F.; Barcelo, D. *Anal. Chim. Acta.* **1997**, *353*. 133.
3. Maccrehan, W. A.; Brown-Thomas. J. M. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 477.
4. Beger. T. A.; Deye, J. F. *J. Chromatogr. Sci.* **1991**, *29*. 54.
5. Brage. C.; Sjostrom, K. *J. Chromatogr. Sci.* **1991**. *38*, 303.
6. Nistor, C.; Emneus. J.; Gorton L.; Ciucu. A. *Anal. Chim. Acta.* **1999**, *387*. 309.
7. Marko-Varga, G.; Emneus, J.; Gorton, L.; Ruzgas. T. *Trends Anal. Chem.* **1995**, *14*, 319.
8. Liu. Z. J.; Liu. B. H.; Kong. J. L.; Deng. J. Q. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4707.
9. Ruan. C. M.; Li. Y. B. *Talanta.* **2001**, *54*, 1095.
10. Li. J.; Chia, L. S.; Goh, N. K.; Tan. S. N. *Anal. Chim. Acta.* **1998**, *362*, 203.
11. Rogers, K. R.; Becker, J. Y.; Cembrano, J. *J. Electrochim. Acta.* **2000**. *45*. 4373.
12. Wang, J.; Lu, F.; Kane, S. A.; Choi, Y. K.; Smyth, M. R.; Rogers, K. *Electroanalysis*, **1997**, *9*, 1102.
13. Rogers, K. R.; Beckerand, J. Y.; Cembrano, J.; Chough, S. H. *Talanta*, **2001**, *54*, 1059.
14. Cummings, E. A.; Linquette-Mailley, S.; Mailley, P.; Cosnier, S.; Eggins, B. R.; McAdams, E. T. *Talanta*, **2001**, *55*, 1015.
15. Lind. T.; Siegbahn, P. E. M.; Crabtree, R. H. *J. Phys. Chem. B*, **1999**, *103*, 1193.
16. May. S. W. *Biotechnology*, **1999**. *10*. 370.
17. Duran, N.; Esposito, E. *Appl. Catal.* B: *Environ.* **2000**, *28*, 83.
18. Hedenmo, M.; Navarez. A.; Dominguez. E.; Katakis. I. *J. Electroanal. Chem.* **1997**. *1*. 425.
19. Kulys, J., Vidziunaite, R.. Biosensors and Bioelectronics **2003**. *18*. 319.
20. Wang, J.; Naser. N; Kwon. H. S.; Cho, M. Y. *Anal. Chim. Acta* **1992**. *264*. 7.
21. Kwon. H. S.; Park, I. K.; Yoon, K. J.; Seo, M. L. *J. Korean Chem. Soc.* **2000**, *44*, 376
22. Horowitz, N.; Fling. G. *Methods of Enzymology*, Academic Press, New York, **1970**. Vol. XVIIA. pp. 615-620.
23. Lerch. K. *Biochem.* **1983**. *52*. 125.
24. Li. J.; Chia, L. S.; Goh, N. K.; Tan. S. N. *Anal. Chim. Acta.* **1998**, *362*, 203.
25. Kim, M. A., Lee, W. Y., *Anal. Chim. Acta*, **2003**, *479*, 143.
26. Onnerfjord, P.; Emneus, J.; Marko-Varga, G.; Gorton, L.; Ortega, F.; Dominguez, E. *Biosensors & Bioelectronics*, **1995**, *10*, 607.