

단 신

천연고무로 고정된 과산화수소 바이오센서의 전압전류 특성에 관한 전기화학적 연구

윤길중*

청주대학교 이공대학 응용과학부
(2007. 11. 22 접수)

Electrochemical Studies on the Voltammetric Characteristics of Hydrogen Peroxide Biosensor Immobilized by Natural Rubber

Kil-Joong Yoon*

Division of Applied Sciences, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea
(Received November 22, 2007)

주제어: 천연고무, 바이오센서, 효소전극, 과산화수소

Keywords: Natural rubber, Biosensor, Enzyme electrode, Hydrogen peroxide

서 론

효소를 이용하여 바이오센서를 제작하고 그것을 실용화하고자 할 때, 효소의 특이성이 완전하게 유지되도록 전극물질에 고정하는 일은 전극 신호의 안정성과 더불어 본질적이다. 이를 위하여 물리적 흡착 방식, 기능성 고분자와의 공유결합, 고분자 필름을 이용하는 방식, 또는 전극물질에 효소를 혼합하여 고정하는 방식 등, 많은 방법이 지금까지 활용되었다.¹⁻⁴ 이들의 대부분은 복잡한 물리적, 화학적 과정을 거치기 때문에 제작비용과 소요시간 측면에서 효율성이 문제된다.^{5,6} 본 실험실에서는 흑연가루와 효소를 혼합한 후, 미네랄 오일을 결합재로 사용하여 전극을 성형하는 방법이 오랫동안 이용되어 왔다. 이 방법은 제작과정이 간편하고, 오일 자체가 비휘발성이므로 성형된 전극의 조성이 안정하여 단기간에 전극 성분 효소의 전기화학적 특성을 관찰하기에 최적이다. 하지만 효소전극이 실용화하려면 전극물질의 기계적 안정성이 보장되어야 하는데, 미네랄 오일에서는 이런 점을 기대할 수 없다. 1958년 R. Adams에 의하여 전기화학 분석에 도입된 탄소반죽전극은

지금도 효소의 특성 연구 분야에서 유용하게 활용되고 있다. 그러나 많은 시간이 지난 지금도 이것이 실용화되지 못하고 있는 것은 이런 기계적 안정성을 충족하지 못하고 있기 때문이다. 본 실험실에서는 기계적 물성이 확보되는 전극결합재를 찾고자 노력하면서, 톨루엔에 녹인 고무가 전극 제작 후 용매가 휘발되면 완전한 기계적 안정성을 갖는 것을 확인하였다. 그 결과로 ethylene propylene diene terpolymer,⁷ polybutadiene rubber,⁸ butyl rubber⁹ 등, 합성고무를 이용하여 전극을 제작하고, 각각의 경우 전기화학적 성질들을 고찰하여 수차례 보고한 바 있으며, 현재에도 그 영역을 확장해 가고 있다. 여기에 발표되는 천연고무는 합성고무보다 저장 안정성이 좋고 저온에서도 습윤 겔 강도가 큰 것으로 알려져 있다. 또 피막강도 및 탄성은 합성고무에서 도저히 얻을 수 없는 우수한 특성을 나타낸다.¹⁰ 이와 같은 천연고무의 특성이 효소전극의 실용화 조건을 상당히 충족시킬 것을 예측하고, 결합재로 사용하여 효소전극을 제작하고 전기화학적 특성과 실용화의 가능성을 살펴보고자 한다.

실 험

기구 및 시약

선형 훑기 전압전류그림(linear sweep voltammogram)은 BAS Model EPSILON(Bioanalytical System, Inc., U.S.A.) 전압전류계를 사용하여 얻었다. 이외의 모든 신호전류 측정에는 KIPP & ZONEN X-4(BD111, Holand) 기록계가 장착된 EG&G Model 362(Princeton Applied Reach, U.S.A.)가 이용되었다. 기준전극으로 Ag/AgCl (BAS MF2052)을 이용하였고, 전극물질의 전도도 측정은 ALS 1116SLD(Japan) 전도도 측정기를 이용하였다. 과산화효소(Horseradish peroxidase, HRP)는 고추냉이로부터 추출된 Sigma사 제품(E.C.1.11.1.7)을 이용하였다. 천연고무(natural rubber, NR)는 말레이시아산 RSS#1(Mooney viscosity; 61, density; 0.92)이었으며, 톨루엔은 Sigma-Aldrich($\geq 99.9\%$) 제품이었다. 흑연가루는 Fluka사 제품(≤ 0.1 mm)이었으며, 기질(abbr. S)로 Junsei사의 과산화수소(EP, 35%)를 이용하였다. 전해질로는 Shinyo 사의 NaCl(99.5%)을 사용하였으며, 매개체는 화학의 복잡성을 피하기 위하여 일체

사용되지 않았다.

전극의 제조

10.0 mg의 HRP 를 포함하고 있는 증류수 1.0 g에 흑연가루 1.0 g을 혼합한 후, 수분을 완전히 증발시킨다. 1.5% 천연고무를 포함하는 톨루엔 용액과 위 흑연가루를 1:1(wt/wt)의 비율로 혼합하여 반죽을 만들고 이것을 오음 접착을 갖는 내경 6 mm, 길이 1 mm의 폴리에틸렌 튜브에 충전시킨 후, 전극 표면을 완전한 평면으로 성형한다. 신호측정은 환류상태에서 10 mL 0.1 M NaCl 용액 중에서 실험 전극전위를 인가한 후, 시간 경과에 따른 충전전류의 감소 경향성이 수평직선에 도달하였을 때, 기질용액을 첨가하여 첨가 전후 신호차를 과산화수소 분해전류로 간주하였다.

결과 및 토의

전극의 표면에서 일어나는 전자 전달특성은 이중층의 구조에 크게 영향을 받는다. Fig. 1의 A는 실험

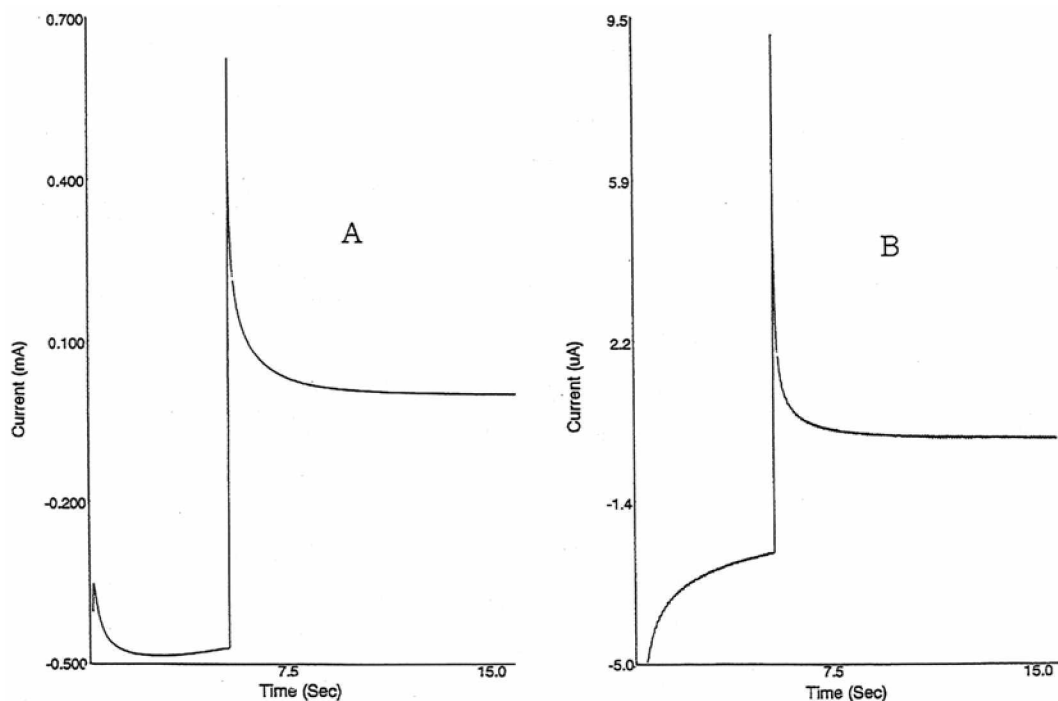


Fig. 1. Current transient (i vs. t) resulting from the potential step (-400 mV vs. Ag/AgCl) experiment in 0.1 M NaCl solution. A; natural rubber electrode, B; glassy carbon electrode. τ_A ; 0.18 sec., τ_B ; 0.10 sec.

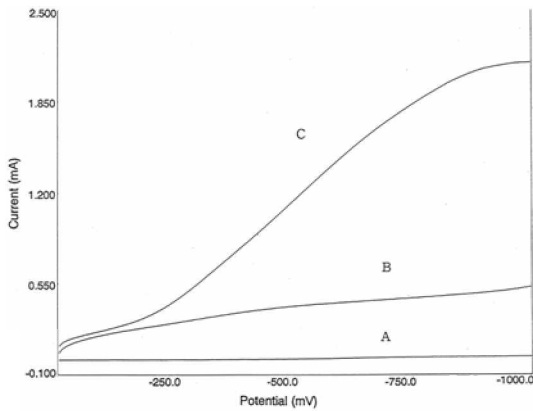


Fig. 2. Linear sweep voltammograms showing the electrochemical behavior of the biosensor used in this work. A is a linear sweep voltammogram of the glassy carbon electrode in 0.02 M hydrogen peroxide solution. B and C were obtained before and after adding 200 μ L of 1.0 M hydrogen peroxide solution respectively in an unstirred 0.1 M NaCl 10 mL at 100 mV/s scan rate.

에 사용된 바이오센서에 -400 mV(vs. Ag/AgCl)의 전위계단을 인가하였을 때 시간에 따라 충전전류가 변화하는 것을 보여주고 있다. 동일한 조건에서 순수한 유리탄소전극으로부터 얻은 전류-시간 곡선이 비교를 위하여 B에 함께 주어져 있다. A의 전류는 B와 비교하여 대단히 크며, 시간상수도 대략 2배 정도이다. 이것은 유리탄소전극과 비교하여 NR을 포함한 탄소전극의 이중층 구조에 변화가 있음을 말해주는 것이다. 일반적으로 전기이중층의 충전용량은 퍼텐셜에 대한 계면장력의 2계 도함수에 반비례한다. 그리고 전극 표면에 중성분자가 흡착할 경우 흡착량에 비례하여 계면장력은 감소한다. 여기서 고무 결합재를 포함한 탄소전극이 큰 충전전류를 보이는 것은 순수 유리탄소전극에 비하여 고무에 의한 탄소전극 이중층 안의 장력 감소가 충전전류의 증가를 가져온 것으로 볼 수 있다. Fig. 2의 A, B, C는 정지된 용액 중에서 전극들이 보여주는 세 가지 다른 선형 홀기 전압전류그림이다. A는 순수한 유리탄소전극이 200 μ L의 1.0 M H₂O₂ 기질을 포함하는 0.1 M NaCl 10 mL 용액 속에서, B와 C는 각각 실험에 사용된 바이오센서가 0.1 M NaCl 용액 10 mL 중에 200 μ L의 1.0 M H₂O₂를 가하기 전, 후에 보여주는 거동이다. 물과 H₂O₂의 표준환원전위는 각각 -0.828 V 및 1.77 V이다. A는 실험 전위 영역에서 어떤 산화-환원반응

도 일어나고 있지 않음을 보여주고 있다. 따라서 B와 C가 보여주는 환원전류는 물이나 과산화수소의 환원과는 무관한 것으로 볼 수 있을 것이다. B는 기질이 첨가되지 않은 경우의 전압전류그림이다. 실험 영역에서 상당한 환원전류가 나타나는 것을 볼 수 있다. 여기에 사용된 바이오센서 전극은 흑연가루에 고무를 포함하고 있다. 고무의 구성 성분은 화학적으로 볼 때 불균일 혼합물이다. 따라서 B가 보여주는 환원전류는 현 단계에서 확인하기 힘든 고무 성분들의 환원에 의한 것으로 볼 수 있다. 또 전위 증가에 따른 충전전류의 기여도도 배제할 수 없을 것이다. 그러나 이와 같은 기여가 B와 C에 동일하게 적용될 것이므로, 신호로 간주되는 B와 C의 차는 이들의 기여가 없는, 효소의 순수한 촉매작용에서 비롯된 과산화수소의 분해전류로 간주해도 무방하다. B와 C의 차를 전극전위에 대하여 도시한 것이 Fig. 3이다. 대체로 단조 증가하는 것을 볼 수 있다. 지금까지 확인된 전류의 증가형태에는 직선적 증가⁷, 단조 증가⁹ 그리고 전극전위에 무관하게 일정한 경우¹² 등이 있으나, 이들의 변화 형태에 대하여는 아직 밝혀진 바가 없다. 한편 과산화수소는 순수한 물의 대략 50배에 해당하는 전도도(2.0×10^{-6} S, at 20 °C)를 갖는다. 기질 첨가 시 전류증가가 전도도 증가에서 비롯된 것으로 볼 수 있다. 그러나 전류차가 전극전위에 의존하며, 2.0×10^{-3} M의 기질 농도변화가 mA 단위의 큰 전류변화를 가져올 수 있다고 주장하는 것은 무리일 것이므로, 이 전류변화는 효소의 촉매작용에 의한 것으로 볼 수 있다.

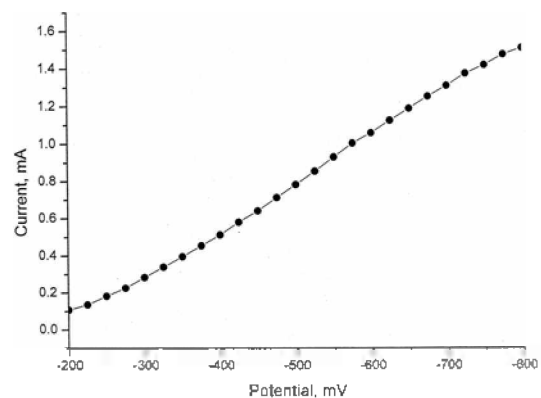


Fig. 3. Dependence on the biosensor response at a function of the electrode potential in Fig. 2.

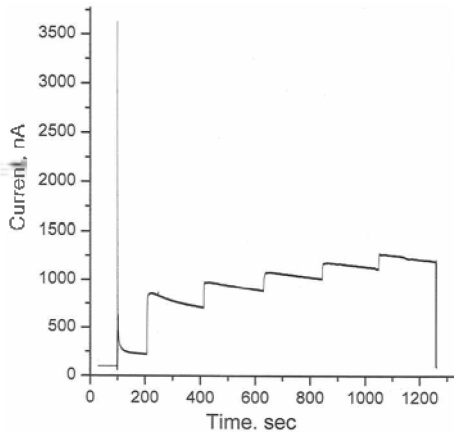


Fig. 4. Current-time plot for successive adding 100 μL of 1.0 M hydrogen peroxide solution in 10 mL of electrolyte solution at -400 mV.

Fig. 4는 신호가 얻어지는 전형적인 과정을 보여주고 있다. 전극전위 -400 mV에서 환류상태의 용액 10 mL에 1.0 M 과산화수소 100 μL 를 연속적으로 추가했을 때 보여주는 amperogram이다. 이 방법은 전기화학적 활성 화학종의 질량이동속도가 확산속도보다 훨씬 크기 때문에, 쉽게 정류상태에 도달하며, 정류상태에서 충전전류가 최소화되는 이점을 갖는다. Fig. 4의 특성으로 우선 포화감응속도가 빠른 것을 꼽을 수 있다. 이것은 고무가 효소를 전극 표면에 고정시켜 효과적으로 촉매력을 발휘하게 하는 것으로 볼 수 있으며, 천연고무가 바이오센서의 결합재로서 사용 가능함을 보여주는 것이다.

Fig. 4에서 농도에 따라 누적적으로 합산된 신호의 크기를 농도의 함수로 Fig. 5에 도시하였다. 효소전극의 검정곡선 특성은 낮은 기질농도에서도 쉽게 직선성으로부터 벗어나는 것이 일반적이다.^{13,14} 이와 같은 현상은 다음의 여러 가지로 해석될 수 있다. 우선 효소가 다단계 반응으로 진행되는 기질의 분해반응 중 어느 특정단계만을 촉매할 수 있으며, 전극 표면의 활성 자리가 제한되어 있기 때문으로 볼 수 있다. 또 동위효소가 서로 다른 속도로 분해반응에 참여할 가능성도 한 이유가 될 수 있다. Fig. 6은 Fig. 5로부터 계산된 신호 대 기질 농도의 Lineweaver-Burk 양역수 도시이다. 이 도시에서 직선이 얻어지면 반응은 효소의 촉매작용에 의한 것이다. Fig. 6의 도시는 $R=0.996$ 의 상관계수를 갖는 좋은 직선성을 보여주고

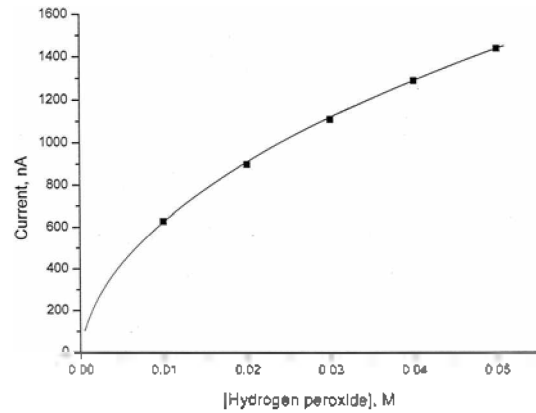


Fig. 5. Calibration graph of the graphite powder electrode with NR binder at -400 mV(vs. Ag/AgCl).

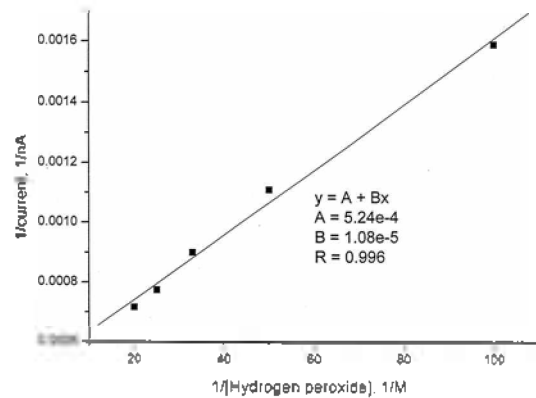


Fig. 6. Double reciprocal plot of the same data as in Fig. 5.

있다. 이것은 천연고무에 의하여 고정된 효소가 전극 표면에서 정상임을 보여주는 증거이며, 천연고무가 탄소전극의 결합재로 사용될 수 있음을 다시 확인시켜주는 것이다.

바이오센서의 신호크기에 영향을 주는 요인은 용액의 pH, 매개체의 유무 및 농도, 결합재의 종류 그리고 전극에 포함된 효소의 함량 등을 들 수 있다. 기사용 중인 전극의 검출한계를 살펴보기 위하여 얻은 amperogram이 Fig. 7이다. 전극전위 -400 mV에서 전해질 용액 10 mL에 0.01 M H_2O_2 용액 100 μL 가 더해졌다. 대략 10초 이내에 신호전류가 포화되는 것을 볼 수 있으며, 1.0×10^{-4} M(S/N=3)의 검출한계를 보여준다. 이 값은 줄-겔법으로 HRP를 고정시켜 만든 A. N. Diaz 등의 결과(6.7×10^{-4} M)와 비교될 수 있으나,¹⁵ M. Y. Miao 등의 것(1.0×10^{-6} M)에 미치지 못

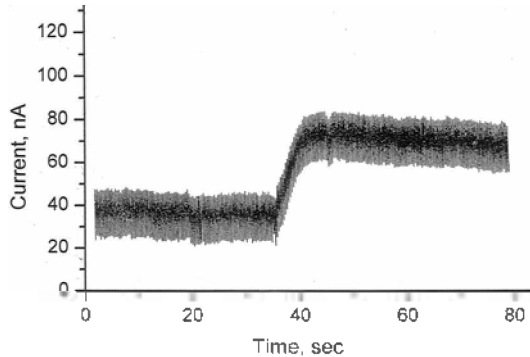


Fig. 7. Time profile of the current signal for the determination of detection limit. 100 μ L of 0.01 M hydrogen peroxide solution was added in 0.1 M NaCl 10 mL at -400mV(vs. Ag/AgCl).

한다.¹⁶ 그러나 앞서 언급된 여러 가지 조건들이 동시에 최적화된다면 검출한계는 보다 향상될 것이다.

탄소가루에 효소를 고정시킨 바이오센서가 실용화되기 위한 가장 중요한 조건은 전극신호의 지속적 안정성이다. 그러나 효소 단백질의 삼차원 구조 변형에 필요한 에너지는 15~60 kJ/mol로 대단히 작아서 공기 중에 노출될 경우, 그것이 변성될 경우의 수는 대단히 많다. cystine같은 단백질의 경우 황의 교차 결합이 공기 중의 환원성 물질에 의하여 분리될 수 있으며, 기질로 사용되는 과산화수소가 산화제로 작용하여 역으로 황의 교차결합을 형성할 수도 있다. 또 공기 중의 미생물이 단백질을 분해할 가능성도 있다. 이외의 여러 요인들도 효소의 변성을 가져와 제작 후 시간 경과에 따라 전극의 감응 능력을 감소시키는 역할을 할 것이다. Fig. 8의 경향성은 위의 사항들이 종합적으로 나타난 결과로 볼 수 있다. 제작 직후 800 nA 이상에 이르던 신호크기는 4°C의 냉장소에서 공기 중에 노출시켜 하루 보관할 경우 거의 절반으로 수준으로 감소하는 것을 볼 수 있다. 그러나 이후 15일에 이르기 까지 대체로 일정한 감응도가 유지된다. 이와 같은 경향성은 EPDM[®]이나 BR[®]을 사용한 경우의 경향성과 대조적이다. 이 경향성이 얼마나 더 연장될 수 있을지는 현 단계에서 단언할 수 없다. 그러나 실험 영역의 기간에서는 비교적 좋은 재현성을 보이고 있다. 따라서 전극이 완전히 실용화되면 수명 및 보관 방법에 대한 체계적인 연구도 병행되어

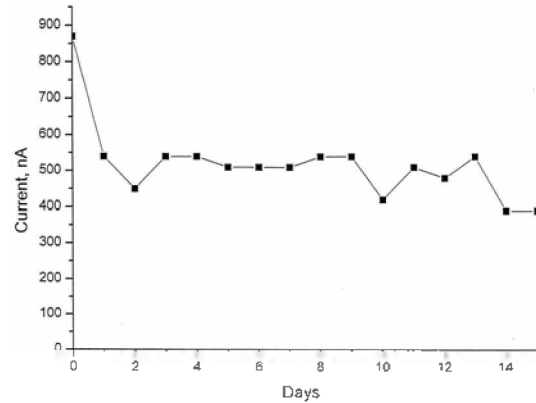


Fig. 8. Stability test of the biosensor. It was stored at 4 °C in the dark between the measurements.

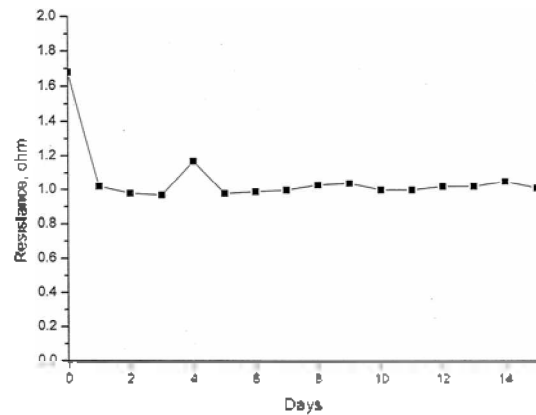


Fig. 9. Resistance change of electrode material with the storage time. Immobilization matrix: graphite powder, 50%; CR; 0.75%; toluene; 49.25%. Other conditions are same as in Fig. 8.

야 할 것이다. Fig. 9는 Fig. 8과 동일한 조건에 전극을 보관시키며 전극물질의 저항 변화를 관찰한 것이다. 전극 물질은 톨루엔에 녹인 고무에 의하여 성형된 탄소가루이다. 전극 물질의 저항은 1일 경과 후 급격히 감소하며, 이후로는 일정한데, 이것은 전극으로부터 휘발성이 강한 톨루엔의 유출이 1일 정도면 완성되는 것으로 볼 수 있다. Fig. 8에서 1일 경과 후, 즉 톨루엔의 유출이 끝난 후 신호가 안정화되는 것과 Fig. 9의 경향성이 유사한 것은 주목할 만하다. 톨루엔도 앞서 언급된 효소 단백질의 안정성에 관련이 있는 것으로 볼 수 있으나 현재로서는 어떤 결론을 내릴 수 없다.

결 론

천연고무를 이용하여 HRP를 고정시킨 과산화수소 정량 바이오센서의 Lineweaver-Burk 도시는 직선성을 보여주었다. 이것은 천연고무가 HRP의 촉매특성이 유지될 수 있도록 전극에 효소를 고정하고 있음을 보여주는 것이다. 또 톨루엔의 유출이 완성된 1일 후부터 관찰된 15일에 이르기 까지 재현성 있는 신호를 보여주었다. 이런 사실들은 천연고무가 탄소가무를 센서로 성형할 수 있는 좋은 결합재임을 말하여 주는 것이다. 그러나 센서성능의 지속성만을 고려할 때, 천연고무는 다른 결합재와 마찬가지로 만족한 결과를 보이지 못하였다. 고무결합재를 이용하여 만든 센서를 완전히 실용화하고자 한다면 이 분야에 관한 연구가 보충되어야 할 것이다.

인용문헌

- Reshetilov, A. N.; Donova, M. V.; Dovbnya, D. V.; Boronin, A. M. *Biosensors & Bioelectronics*, **1996**, *11*, 401.
- Sanz, V. C.; Mena, M. L.; Cortés, A. G.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, *528*, 1.
- (a) Mailley, P.; Cummings, E. A.; Mailley, S.; Cosnier, S.; Eiggins, B. R.; McAdams, E. *Biochemistry*, **2004**, *63*, 291. (b) Vostiar, I.; Tkac, J.; Sturdik, E.; Gemeiner, P. *Biochemistry*, **2002**, *56*, 113.
- Crouch, E.; Cowell, D. C.; Hoskins, S.; Pittson, R. W.; Hart, J. P. *Anal. Biochem.* **2005**, *347*, 17.
- Wang, J.; Li, S.; Mo, J. W.; Porter, J.; Musameh, M. M.; Dasgupta, P. K. *Biosensors and Bioelectronics*, **2002**, *17*, 999.
- Kirgöz, Ü. A.; Timur, S.; Wang, J.; Telefoncu, A. *Electrochemistry Communications*, **2004**, *6*, 913.
- Yoon, K. J. *Elastomer*, **2007**, *42*, 2, 112.
- Yoon, K. J. *Anal. Sci. & Tech.* **2007**, *20*, 1, 49.
- Choi, S. Y.; Yoon, K. J. *Elastomer*, **2006**, *41*, 4, 231.
- Stevens, M. P. "Polymer Chemistry", 3rd Ed. Oxford New York, U. S. A., 1999. p. 476.
- Yoon, K. J.; Kim, K. J.; Kwon, H. S. *J. Kor. Chem. Soc.*, **1999**, *43*, 3, 271.
- Yoon, K. J. *J. Kor. Chem. Soc.*, **2004**, *48*, 6, 654.
- Lakard, B.; Herlem, G.; Lakard, S.; Antoniou, A.; Fahys, B. *Biosensors & Bioelectronics*, **2004**, *19*, 1641.
- Wäibel, M.; Schulze, H.; Huber, N.; Bachmann, T. T. *Biosensors & Bioelectronics*, **2006**, *21*, 1132.
- Díaz, A. N.; Peinado, M. C. R.; Mínguez, M. C. T. *Anal. Chim. Acta*, **1998**, *363*, 221.
- Miao, Y.; Tan, S. N. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, *437*, 87.