

단신

배추뿌리 조직 바이오센서를 이용한 과산화수소의 정량

權孝植 · 金教根[†] · 李哲圭[†]

충북대학교 사범대학 과학교육과

[†] 청주대학교 이공대학 환경공학과

(1995. 12. 22 접수)

Cabbage Root-Tissue Based Amperometric Biosensor for Determination of Hydrogen Peroxide

Hyo-Shik Kwon, Kyeo-Keun Kim[†], and Cheal-Gyu Lee[†]

Department of Science Education, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

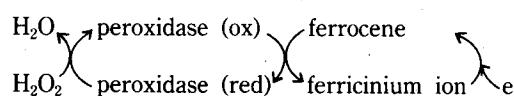
[†] Department of Environmental Engineering, Chonju University, Cheongju 360-764, Korea

(Received December 22, 1995)

과산화수소는 여러 산업분야에서 중요한 역할을 하고 있다. 예로서 식물의 표백제, 염색염료의 산화제, 사진현상에서 hypo의 제거제로 사용된다. 또한 폐수처리나 소독에 사용되며, 산소를 발생시키는 중요한 공업 재료 또는 원료이다.¹ 과산화수소를 정량하는데에는 적정법,^{2,3} 분광법,^{4~7} 화학발광^{8,9} 및 전기화학법^{10~16} 등이 있다. 처음 세 가지의 방법은 다른 물질의 간섭, 긴 측정시간, 값비싼 시약의 사용 등 주요 결점을 가지고 있다. 전기화학적 방법은 높은 감도, 더 넓은 동적인 범위(dynamic range), 빠른 감응시간과 같은 분석적인 특성이 좋은 것으로 알려져 있다. 최근에는 생촉매로부터 정제한 효소를 사용하지 않고, 생물체를 사용하는 바이오센서에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 과산화수소의 정량에 맨 처음으로 조직을 이용한 바이오센서는 catalase가 들어 있는 소의 간(bovine liver) 조직을 산소전극에 고정화시켜 만든 것이었다. 이 전극은 pH 6~8 범위에서 과산화수소의 농도에 대하여 좋은 직선성을 보여주었으며, 검출한계는 10^{-5} M이었다.¹⁷ 그 이후 식물의 조직을 이용한 과산화수소의 정량 용으로 쓴 바이오센서로서는 grape tissue,¹⁸ horseradish root,¹⁹ pineapple,²⁰ kohlrabi,²¹ cultured tobacco callus,²² lettuce seed,²³ asparagus²⁴ 등의 조직을 사용한 bioelectrode가 보고되었다. 이들 센서는 높은

생촉매의 활성도, 안정성의 개선, 낮은 가격 등의 여러 가지 장점을 가지고 있다. 또한 살아있는 조직으로 만든 전극은 순수한 효소로 만든 전극보다 더 오래 사용할 수 있고, 유기체에 존재하는 다른 효소에 의한 간섭이 나타나지 않는 장점이 있다.

본 연구에서는 과산화수소를 정량할 수 있는 새로운 배추뿌리로 만든 탄소반죽전극(carbon paste electrode)을 보고하고자 한다. 이 바이오센서의 메카니즘은 다음과 같이 요약할 수 있다.



즉, peroxidase는 과산화수소를 물로 환원시키고, 산화된 peroxidase는 ferrocene를 ferricinium ion으로 변화시키며, ferricinium ion은 전극에 의해 다시 환원된다. 본 연구에서는 이 환원전류를 전류법으로 측정하였다.

실험

기기 및 과정. 전류법실험은 10 mL의 작업부피를 가진 BAS Model VC-2 Voltammetric Cell을 사용하였다. 이 Cell에 Teflon 마개를 닫은 다음, 작업 전극, 기준전극 [Ag/AgCl electrode(3 M

NaCl), Model Re-1 BAS] 및 백금 보조전극을 마개의 구멍에 고정하고 각 전극을 Scanning Potentiostat (EG&G PAR Model 362) 또는 voltammetric analyzer (EG&G PAR Model 264A)에 연결하였다. 기록계는 Rikadenki Electronic Recoder(Model R-62)를 사용하였다. 전류법으로 측정하는 동안 반응 용액은 300 rpm으로 저어주었다.

배추뿌리 조직-mediator 전극은 다음과 같이 만들었다. 먼저 배추뿌리의 표면을 2 mm 정도 깎아내고, 조직을 깨끗한 면도날로 5 mm 두께로 잘라내었다. 0.06 g의 ferrocene을 20 mL의 CHCl₃에 녹인 후, 용액에 흑연가루를 가하였다. Fume hood에서 유리봉으로 잘 저어주면서 용매를 날려보냈다. 그 다음, 위에서 잘라 놓은 배추뿌리 조직 0.12 g과 0.98 g의 ferrocene이 들어 있는 탄소반죽을 완전히 혼합하여 최종 탄소반죽 혼합물에는 2%의 배추뿌리 조직과 3.5%의 ferrocene이 포함되게 하였다. 이것을 전극의 한쪽 끝부분(변성하지 않은 탄소반죽만을 채운 전극의 끝부분)에 채웠다. 그 다음 전극의 표면은 무게 다는 종이로 문질렀다. Mediator가 들어 있지 않은 배추뿌리 조직전극은 60%의 흑연과 40%의 mineral oil로 만든 탄소반죽을 일정량의 배추뿌리와 혼합하여 만들었다. 이렇게 만든 전극은 5 °C로 온도를 유지시킨 냉장고에서 pH 6.5인 인산 완충용액속에 보관하였다. 전해질용액은 0.1 M 인산 완충용액을 사용하였다. 일정량의 시료를 취하기 위한 micropipet은 독일산(Eppendorf)을 사용하였다. 모든 실험은 실온에서 측정하였다.

물질 및 시약. 흑연가루는 삼천순약공업사(일본, GR급)의 시약을, 완충용액을 만드는데 사용한 인산 일수소칼륨, 인산이수소칼륨과 분석물질로 사용한 과산화수소는 순정화학주식회사(일본, GR급)을 mineral oil, ferrocene 및 catechol은 Aldrich사의 시약을 정제하지 않고 그대로 사용하였다.

o-Phenylenediamine은 동경화성공업주식회사의 시약을 사용하였다.

이 실험에서 사용한 배추(한국산) 뿌리는 시장에서 얻었으며, 사용하지 않을 때에는 5 °C로 유지된 냉장고에 전조한 상태로 보관하였다. 모든 용액은 항상 실험전에 새로 만들어 사용하였다.

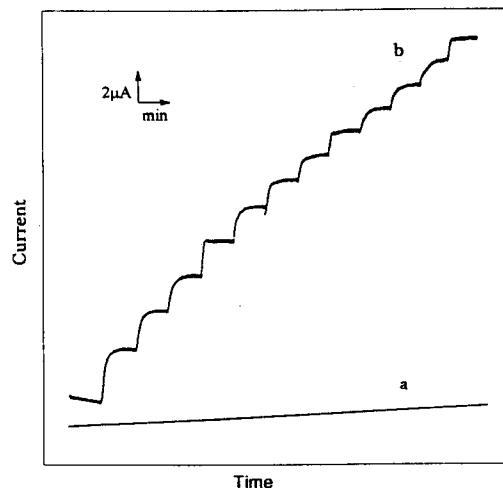


Fig. 1. Typical response curves of a biosensor at (a) the unmodified and (b) the cabbage root tissue modified carbon paste electrodes on increasing the substrate concentration (Successive increments of 100 μL of 0.10 M hydrogen peroxide). Electrolyte, 0.10 M phosphate buffer solution (pH 6.5) and operating potential -0.25 V (vs. Ag/AgCl).

결과 및 고찰

Fig. 1은 과산화수소에 대한 전극의 감응을 나타낸 것이다. Fig. 1(a)는 배추뿌리 조직을 고정하지 않은 전극에 대한 것이며, Fig. 1(b)는 배추뿌리 조직을 고정시킨 전극에 대하여 기질의 농도를 증가시켰을 때에 얻어진 전류-시간 감응을 기록한 것이다. Fig. 1(a)에서 보는 바와 같이 보통의 전극에서는 기질에 대하여 전극이 감응하지 않았다. 그러나 배추뿌리 조직을 고정화시킨 조직센서에서는 기질(과산화수소) 농도의 변화에 대하여 대략 2~3초 이내에 일정한 상태의 전류를 나타내어 매우 빠르게 감응함을 알 수 있다.

배추뿌리 조직 전극의 pH 의존성은 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 pH 6.5에서 최대의 전류를 나타내었다.

Table 1은 pH 6.5에서 탄소반죽 전극에 포함된 배추뿌리 조직의 함량과 신호의 크기를 나타낸 것이다. Table 1에서 보는 바와 같이 전극의 감응은 조직의 함량 %에 크게 의존하였다. 조직의 함량이 10%가 될 때까지는 신호의 크기가 증가하였으나 그

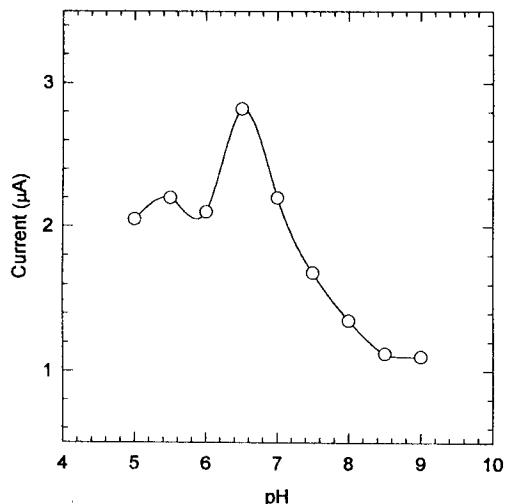


Fig. 2. Variation in current with pH. Other conditions are as in Fig. 1.

Table 1. The effect of the composition of tissue on the carbon paste electrode at pH 6.5 (at 0.1 M hydrogen peroxide concentration)

Composition of tissue (%)	ip (A)
5	1.75
7	1.80
10	2.82
13	2.20
16	2.80

이상에서는 뚜렷한 변화가 없었다. 따라서, 본 실험에서는 배추뿌리 조직의 함량이 10%인 전극을 최적조건으로 결정하여 사용하였다.

한편, 배추뿌리 조직 전극의 선택성을 알아보기 위하여 6가지의 수소 주제를 선택하여 실험한 결과를 Table 2에 나타내었다. $S_{X, H_2O_2}/S_{H_2O_2}$ 는 1×10^{-3} M의 과산화수소의 존재하에서, 1×10^{-3} M의 각 수소주제를 가하였을 때 신호의 비를 나타낸 것이다. 구경양배추 조직 전극²¹에서는 catechol, dopamine 및 L-dopa의 경우 큰 간섭을 나타내었으나, 본 실험에서 사용한 배추뿌리 조직 전극은 과산화수소에 대하여 매우 좋은 선택성을 나타내었다.

Fig. 4에 과산화수소에 대한 배추뿌리 조직 전극의 검정곡선을 나타내었다. 이 그림에서 같은 양의 배추뿌리 조직을 사용하였을 때, mediator의 농도가

Table 2. Interference studies for some important hydrogen donors in the presence of hydrogen peroxide

Compound ^a	$S_{X, H_2O_2}/S_{H_2O_2}$ ^b
Catechol	1
L-Dopa	1
Dopamine	1
Glycine	1
Glucose	1
Glutamic acid	1

^aEach injection changed in [Hydrogen donor] = 1×10^{-3} M, $[H_2O_2] = 1 \times 10^{-3}$ M. ^b S_{X, H_2O_2} = Steady-state sensitivity of hydrogen donor in the presence of H_2O_2 , $S_{H_2O_2}$ = Steady-state sensitivity of H_2O_2 , $S_{X, H_2O_2}/S_{H_2O_2}$ = Relative sensitivity.

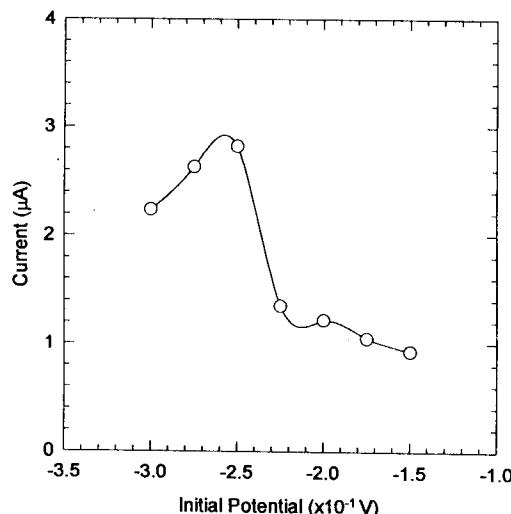


Fig. 3. Effect of applied potential on current. Other conditions are as in Fig. 1.

감응의 크기를 결정하는 주요 요인임을 알 수 있다. 또한 mediator를 가지지 않고, 조직만을 사용한 전극도 좋은 감응을 나타내고 있다. 이것은 배추뿌리 조직 속에는 mediator로 작용할 수 있는 물질이 들어 있음을 의미한다.

검출한계($S/N=3$)는 2.07×10^{-5} M(3.5% ferrocene을 넣은 전극), 1.70×10^{-5} M(3.5% *o*-phenylenediamine을 넣은 전극), 및 4.59×10^{-5} M(mediautor를 넣지 않은 전극)이었다.

Fig. 5에는 농도와 전류의 역수를 도시한 결과를

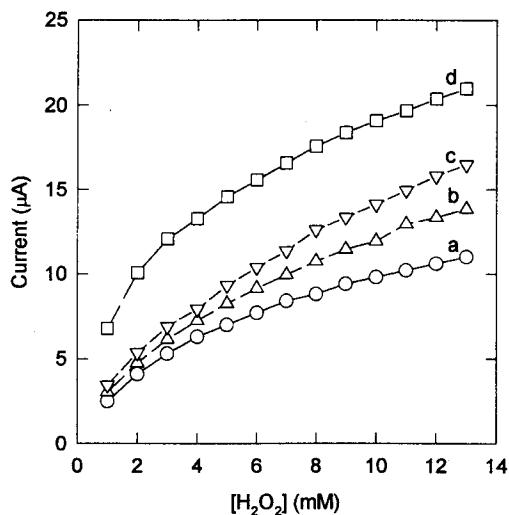


Fig. 4. Calibration curves for hydrogen peroxide with different mediators. a) no mediator, b) ferrocene (3.5 %), c) ferrocene (5%) and d) *o*-phenylenediamine (3.5 %). Conditions are as in Fig. 1.

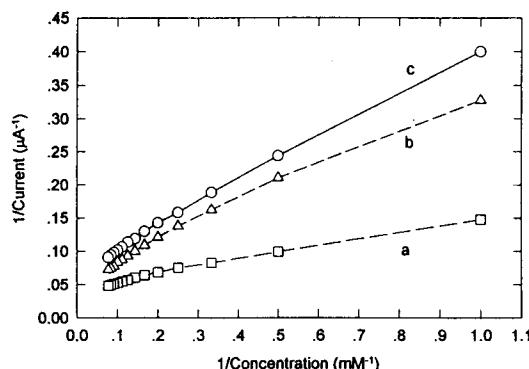


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of the same data as in Fig. 4. a) no mediator, b) ferrocene (3.5%), c) *o*-phenylenediamine.

나타내었다. 이 그림에서 보는 바와 같이 실험한 전체구간에 대하여 매우 좋은 직선성을 나타내고 있으며, 각각의 상관계수는 0.997(a), 0.989(b) 및 0.988(c)로 나타났다. 또한 과산화수소를 5회까지 주입하였을 때는 세 직선의 상관계수가 모두 1.00 이었다.

한편, 촉매에 의해 조절되는 효소반응에 대한 Michaelis-Menten constant, K_m' 은 Lineweaver-Burk 식에 적용하여 계산할 수 있다.²⁵ 계산된 K_m' 의 값은 각각 $3.35 \times 10^{-1} M$ (mediator를 넣지 않은 것), 2.79

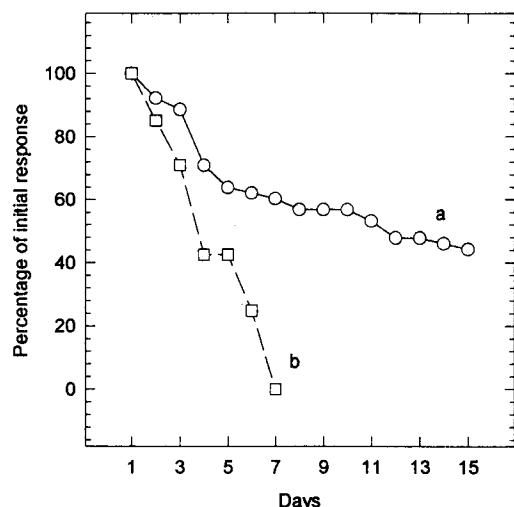


Fig. 6. Long term stability of enzyme electrode. Conditions are the same as in Fig. 1.

$\times 10^{-1} M$ (3.5% ferrocene을 넣은 전극) 및 $1.07 \times 10^{-1} M$ (3.5% *o*-phenylenediamine을 넣은 전극)이었다. 또한 Table 2에는 H_2O_2 의 존재하에서 각 간접물질의 영향을 조사한 결과를 나타내었다. 실험에 사용한 물질은 과산화수소의 정량에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

Fig. 6은 본 실험에 사용한 배추뿌리 조직 전극의 수명을 알아보기 위하여 15일 동안 전극의 감응도를 조사한 결과이다. Fig. 6(a)는 전극을 사용하지 않을 때, 5 °C의 냉장고에서 pH 6.5의 인산 완충용액에 보관한 전극의 감응을 나타낸 것이고, Fig. 6(b)는 같은 조건에서 건조한 상태로 전극을 보관한 것이다. 전극을 pH 6.5의 인산 완충용액에 보관하였을 때가 감응도의 변화가 더 크게 나타났으며, 4~15일 동안 감응도가 거의 일정하게 유지되었다. 또한, 본 실험에서 제작한 전극은 바탕전류나 잡음의 영향을 거의 받지 않았다.

인 용 문 헌

- Schumb, W. C.; Satterfield, C. N.; Wentworth, R. L. In *Hydrogen Peroxide*; Reginald: New York, 1955; p 571.
- Vogel, A. I. *Textbook of Quantitative Inorganic Analysis*; Longman: New York, 1978; p 355.
- Hurd, E. C.; Romeyn, H. *Anal. Chem.* **1954**, 26,

- 320.
4. Matsubara, C.; Kudo, K.; Kawashita, T.; Takamura, K. *ibid.* **1985**, *57*, 1107.
 5. Clapp, P. A.; Evans, D. F.; Sheriff, T. S. S. *ibid.* **1989**, *219*, 331.
 6. Nakano, T.; Takahashi, A. *Anal. Sci.* **1990**, *6*, 823.
 7. Matsubara, C.; Kawamoto, N.; Takamura, K. *Analyst* **1992**, *117*, 1781.
 8. Aizawa, M.; Ikariyama, Y.; Kuno, H. *Anal. Lett.* **1984**, *17*, 555.
 9. Nakashima, K.; Maki, K.; Kawaguchi, S.; Akiyama, S.; Tsukamoto, Y.; Kazuhiro, I. *Anal. Sci.* **1991**, *7*, 709.
 10. Aizawa, M.; Karube, I.; Suzuki, S. *Anal. Chim. Acta* **1974**, *69*, 431.
 11. Moody, G. J.; Sanghera, G. S.; Thomas, J. D. R. *Analyst* **1986**, *111*, 605.
 12. Lundbach, H.; Johanson, G.; Holst, O. *Anal. Chim. Acta* **1983**, *155*, 47.
 13. Gorton, L.; Jansson, J. *Mol. Catal.* **1986**, *38*, 157.
 14. Gao, Z.; Ivaska, A. Li, P.; Lui, K.; Yang, J. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *259*, 211.
 15. Bennetto, H. P.; Dekeyzer, D. R.; Delaney, D. R.; Koshy, A.; Mason, J. R.; Razak, L. A.; Thurston, C. F.; Stirling, J. L. *Analyst* **1987**, *8*, 22.
 16. Akmal, N.; Mark Jr., H. B. *Anal. Lett.* **1992**, *25*, 2175.
 17. Mascini, M.; Iannello, M.; Palleschi, G. *Anal. Chim. Acta* **1982**, *138*, 65.
 18. Wijesuriya, D.; Lin, M. S.; Rechnitz, G. A. *ibid.* **1990**, *234*, 453.
 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. Chen, L.; Lin, M. S.; Hara, M.; Rechnitz, G. A. *Anal. Lett.* **1991**, *24*, 1.
 22. Navaratne, A.; Rechnitz, G. A. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *257*, 59.
 23. Fang, Y.; Cai, R.; Deng, Z. *Electroanalysis* **1992**, *4*, 819.
 24. Oungpipat, W.; Alexander, P. W.; Southwell-Keely, P. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *309*, 35.
 25. Gregg, B. A.; Heller, A. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 258.