

H₂O₂-생성 산화효소계에 관한 분석 연구

韓英熙* · 趙憶琳

상명여자대학교 자연과학대학 화학과
(1993. 3. 15 접수)

Analytical Studies of H₂O₂-Producing Oxidase Systems

Younghee Hahn* and Hae-Lim Cho

Department of Chemistry, Sang Myung Women's University, Seoul 110-743, Korea

(Received March 15, 1993)

요 약. 산소를 수용체로 하여 H₂O₂를 생성하는 산화효소인 glucose oxidase(GO)와 alcohol oxidase(AO)를 이용하여 glucose와 ethanol에 대한 분광학적 효소분석법과 전기화학적 효소분석법을 연구하였다. Glucose에 대한 정량분석의 경우 GO 반응에서 생성된 H₂O₂를 peroxidase를 사용하여 K₄Fe(CN)₆에 반응시키고 그 결과 생성된 K₃Fe(CN)₆의 흡광도를 418 nm에서 측정하거나 Ag/AgCl(포화 KCl) 기준전극에 대하여 -55 mV를 부하시킨 유리질 탄소전극에서 K₃Fe(CN)₆의 확산전류를 측정하였다. 전류법 측정이 분광광도법 측정보다 1/1000 정도 더 낮은 농도까지 검출할 수 있었으며 직선성을 갖는 농도 범위도 10배 더 연장되었다. Ethanol에 대한 정량분석의 경우 K₃Fe(CN)₆가 AO에 의하여 순간적으로 소거되었으므로 AO 반응만을 이용하여 H₂O₂의 생성속도를 +0.900 V에서 측정하거나 용존 O₂의 감소속도를 -0.500 V에서 전류법으로 측정하였다.

ABSTRACT. Spectrophotometric enzymatic analysis and amperometric enzymatic analysis for the determinations of glucose and ethanol were studied utilizing glucose oxidase (GO) and alcohol oxidase (AO), respectively, which commonly consume O₂ and produce H₂O₂. For the determination of glucose, H₂O₂ were coupled to K₄Fe(CN)₆ via peroxidase producing K₃Fe(CN)₆ whose absorbance was measured at 418 nm or whose diffusion current was measured on the glassy carbon electrode at an applied potential of -55 mV vs. Ag/AgCl (sat. KCl) reference electrode. Amperometric analysis was 1000 times more sensitive as well as 10 times better in the linear concentration range than spectrophotometric analysis. For the determination of ethanol, AO only was used for the enzymatic analysis, since K₃Fe(CN)₆ was completely disappeared as soon as AO was added. Either rate of H₂O₂ produced was amperometrically measured at +0.900 V or rate of O₂ consumed was measured at -0.500 V vs. Ag/AgCl(sat. KCl) reference electrode.

서 론

산소를 수용체로 하여 과산화수소를 생성하는 산화효소계에는 glucose oxidase, xanthine oxidase, monoamine oxidase 등 생화학적으로 중요한 효소들이 포함되어 있으며 cholesterol oxidase, alcohol oxidase, lactate oxidase도 토양 또는 미생물로부터 분리되어 분석시약으로 구입할 수 있다. 이러한 산화효소의 일반적인 반응은 다음과 같다.



산화효소의 기질(substrate) 중에는 glucose, cholesterol, alcohol, lactic acid 등이 있으며 이러한 물질들은 질병을 진단하는 척도로서 임상학적으로 중요하며 또는 식품산업의 제조공정, 품질관리에 있어서 분석을 요한다. 생체액, 주류, 식품의 시료에는 분석물질 이외에 여러 가지 성분들이 포함되어 있

어서 종래의 화학분석은 흔히 간섭물질로 인한 오차를 유발할 수 있으나 기질과 특이적으로 반응하는 효소를 분석에 이용함으로써 분석물질의 정확도와 정밀도를 더 좋게 할 수 있다.

효소반응의 기질에 대한 정량분석은 효소반응의 초기속도를 측정하거나 생성물의 평형농도를 측정한다. 산화효소반응의 측정방법으로 단위시간당 용존산소의 농도감소^{1,2} 또는 과산화수소의 농도 증가^{3,4}를 전류법으로 측정한다. 그리고 산화효소반응으로 생성된 과산화수소를 peroxidase 효소를 이용하여 발색시약으로 반응시키고 분광광도법^{5,6}으로 측정하거나 전기활성물질에 반응시켜서 전류법^{7,8}으로 측정할 수 있다.

본 연구에서는 glucose와 ethanol을 각각 분석하기 위하여 glucose oxidase와 alcohol oxidase를 이용하고 분광광도법과 전류법으로 효소반응을 측정하면서 관련된 문제점들을 고찰해 보고자 한다.

실 험

실험기기. 분광광도법 분석에는 Milton Roy사의 Spectronic 1201 UV/VIS 분광광도계와 SE 790 X-Y 기록기를 사용하였다. 효소반응의 반응과정(kinetics)을 조사할 때에는 시료용기를 열반침(thermal block) 안에 장치하고 Eyla사의 Thermopet NTT-1100 항온조를 사용하여 일정한 온도의 물을 열반침에 유통시켰다.

전기화학분석에는 EG & G Princeton Applied Research사의 303 SMDE가 부착된 polarographic analyzer 174A, RE0074 X-Y 기록기와 Philips사의 PM 8252A strip chart 기록기를 사용하였다. Model 303 SMDE의 모세관 적하수은전극 대신에 원형 유리질 탄소전극(glassy carbon electrode; 표면적 28 mm²)을 작업전극으로 사용하였고 기준전극은 은/염화은(포화 KCl 용액)전극, 보조전극은 백금선이었으며, 이 세 가지 전극은 휘젓음이 없는 전해용기에 담겨져 있었다. 효소반응의 반응과정은 전해용기를 유리 이중벽의 열덮개(thermal jacket) 안에 넣고 항온조에서 공급되는 일정한 온도의 물을 유통시키면서 조사하였다.

pH meter는 동우 의료기화사의 digital pH/ion

meter이었다. 가열 증류수기에서 제조된 1차 증류수를 Millipore사의 순수제조기에 통하여 순수증류수로 제조하였다.

시약 및 용액. 사용된 시약은 특급 및 일급시약으로서 다음과 같다.

Sodium phosphate dibasic(Na₂HPO₄·12H₂O; 동양화학), Potassium phosphate monobasic(KH₂PO₄; 동양화학), Sodium azide(NaN₃; 약리화학), Potassium ferricyanide(K₃Fe(CN)₆; Aldrich Chem.), Potassium ferrocyanide trihydrate(K₄Fe(CN)₆·3H₂O; Aldrich Chem.), Hydrogen peroxide(H₂O₂; 동양화학), Ethanol(C₂H₅OH; 동양화학), Methanol(CH₃OH; Carloerba), Alcohol oxidase(0.4 U/mg; Sigma Chem.), Peroxidase(180 U/mg; Sigma Chem.), Glucose oxidase(167 U/mg; Sigma Chem.).

인산염 완충용액은 0.10 M Na₂HPO₄ 용액과 0.10 M KH₂PO₄ 용액을 제조한 다음 두 용액을 일정한 비율로 혼합하여 pH 7.0과 pH 7.5의 완충용액을 만들었다.

분광광도법 분석. 파장주사시에는 바탕용액을 시료용기 안에 넣고 바탕용액에 대한 흡광도를 측정, 입력한 후에 시료용기 안의 바탕용액을 시료용액으로 바꾸고 각 파장에서 바탕용액의 흡광도가 자동적으로 보정된 시료용액의 흡광도를 측정하고 기록하였다.

효소반응에 대한 반응과정은 일정한 파장에서 바탕용액에 대한 흡광도를 측정된 후 효소반응용액을 넣고 일정한 시간간격으로 바탕용액의 흡광도가 자동적으로 보정된 흡광도를 측정하였다.

전기화학분석. 전압전류법 측정 전에 유리질 탄소전극은 +, -1.0 volt에서 각 2분씩 정지시키는 처리를 하였다.

전압전류법 측정시에는 0 volt로부터 산화, 환원 방향에 따라 각각 +, -10 mV/sec 또는 5 mV/sec의 속도로 +, -1.20 volt까지 주사하였다.

효소반응의 초기속도 또는 평형농도는 전류법으로 측정하였는데 검출하는 물질에 따라 은/염화은 기준전극에 대하여 K₃Fe(CN)₆의 경우 -0.050 V(또는 -0.055 V), O₂의 경우 -0.500 V, H₂O₂의 경우 +0.900 V에서 전류를 측정하였다.

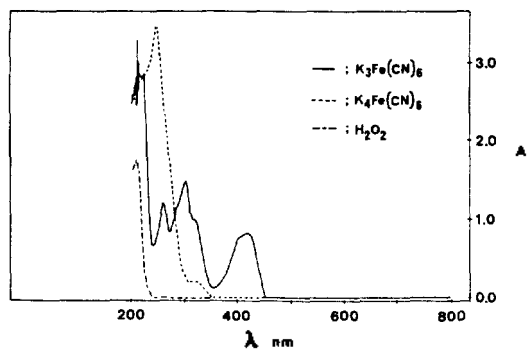


Fig. 1. Absorption spectra of $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ and H_2O_2 at the concentration of 1.00 mM in pH 7.0 phosphate buffer.

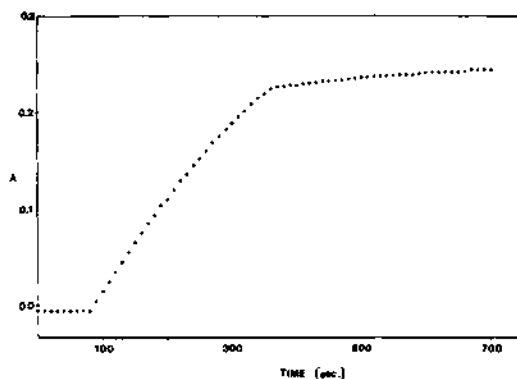


Fig. 2. Enzyme-kinetics of glucose in pH 7.5 phosphate buffer measured at 418 nm.

결과 및 고찰

Glucose에 대한 분광학적 효소분석. Glucose는 O_2 의 존재하에서 glucose oxidase에 의하여 gluconic acid로 산화되면서 H_2O_2 를 생성한다. 생성된 H_2O_2 1 mol은 peroxidase 효소에 의하여 2 mol의 $K_4Fe(CN)_6$ 와 반응하여 2 mol의 $K_3Fe(CN)_6$ 를 생성하면서 H_2O 로 변한다. Peroxidase 반응을 빠르게, glucose oxidase 반응을 느리게 조절하면 전체 효소반응은 glucose oxidase 반응속도에 따라 지배된다.

$K_3Fe(CN)_6$ 는 물에 잘 용해하는 매우 안정한 물질로서 전기화학적으로 분석이 매우 용이하나 418 nm에서도 흡광도를 나타내므로 임상화학 분야에서 응용될 수 있는가를 검토하기 위하여 이 실험을 하였다. 200~800 nm 사이에서 H_2O_2 , $K_4Fe(CN)_6$, $K_3Fe(CN)_6$ 에 대한 파장스펙트럼을 Fig. 1에 나타내었다.

Fig. 2는 glucose-glucose oxidase 반응을 감지하는 실험으로서 pH 7.5 인산염 완충용액으로 제조한 1.00 mM glucose 1 ml와 10 mM $K_4Fe(CN)_6$ 1 ml를 시료용기 안에 넣고 16.7 U의 glucose oxidase와 180 U의 peroxidase가 함유된 0.500 ml 인산염 완충용액을 시료용기 안에 가하면서 즉시 25°C에서 10초 간격으로 418 nm의 흡광도를 측정하는 것이다. 반응 시작 후 6분에 평형에 도달하였다. 이 실험에서 시료용기 안의 glucose의 최종농도는 0.400 mM이었으며, 0.400 mM glucose가 효소반응에 의하여 화학량론적으로 $K_3Fe(CN)_6$ 로 전환된다면 시료용기내의 $K_3Fe(CN)_6$ 의 농도는 0.800 mM이며 흡광도는 0.53

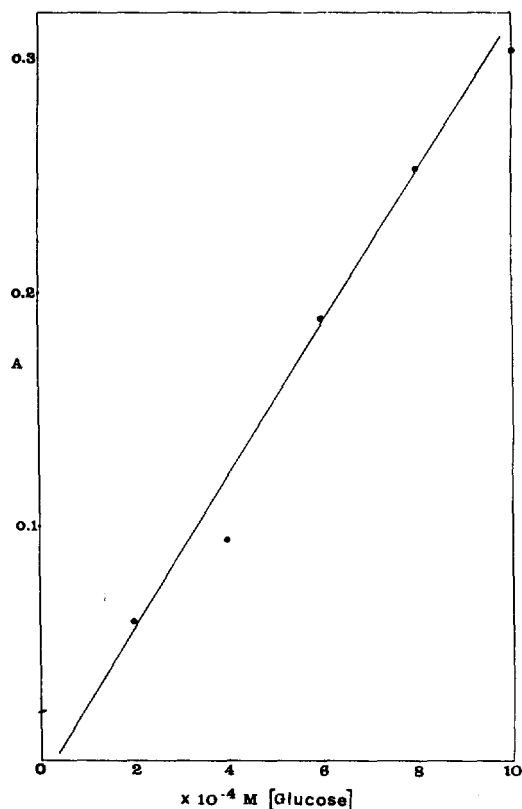


Fig. 3. Spectrophotometric enzymatic assay of glucose measured at 418 nm.

으로 예측된다($\epsilon=664$). 그러나 Fig. 2의 효소반응에서 평형상태의 흡광도는 0.24로서 약 45%의 전환을 나타내는데 이는 용액 중에 용존산소의 농도가 충분하지 않은데 기인한다. 공기포 포화된 수용액의

O₂ 농도는 약 0.25 mM⁹이므로 공기로 포화된 glucose 및 효소용액 1.50 ml가 탈공기화 된 K₃Fe(CN)₆ 1.00 ml와 섞이면 용존 O₂의 농도는 약 0.15 mM이다. 즉 이 실험에서 K₃Fe(CN)₆의 생성은 용존 O₂의 농도 때문에 제한이 되었으나 잘 정의된 glucose oxidase 반응과정을 보여주고 있다.

0.200~1.00 mM 사이의 각 glucose 용액 1.00 ml에 10.0 mM K₃Fe(CN)₆ 1.00 ml와 효소용액 0.500 ml(glucose oxidase 16.7 U+peroxidase 180 U)를 가하고 25°C에서 평형농도에 도달하는 충분한 시간인 15분간 반응시킨 후 흡광도를 측정하였더니 Fig. 3 과 같이 흡광도는 glucose 농도에 대하여 직선성을 나타내었다.

Glucose에 대한 전기화학적 효소분석. Glucose oxidase, peroxidase 효소반응을 사용하여 glucose

1 mol로부터 K₃Fe(CN)₆ 2 mol을 생성하는 반응은 전류법 분석으로 감지될 수 있다. 정지상태의 유리질 탄소 작업전극, 은/염화은 기준전극(포화 KCl), 백금선 보조전극 계를 pH 7.5, 0.10 M 인산염 완충용액으로 제조한 1 mM K₃Fe(CN)₆ 용액 10 ml에 담그고 질소가스로 탈공기화 한 다음 voltammogram을 그렸을 때 -50 mV에서 봉우리 전류에 도달하였다.

pH 7.5 인산염 완충용액으로 10⁻⁷~10⁻⁵ M 농도 범위의 K₃Fe(CN)₆ 표준용액을 제조하여 확산전류를 측정하였다. 확산전류를 K₃Fe(CN)₆ 농도에 대하여 도시하였을 때 Fig. 4과 같이 직선성을 나타내었다. 전류법 측정에 의한 K₃Fe(CN)₆ 검량곡선을 분광광도법 측정에 의한 검량곡선과 비교하여 보면 전류법 측정이 분광광도법 측정보다 검출한계는 1/1000로 더 낮은 농도까지 검출할 수 있으며 직선성을 갖는 농도 범위도 10배 더 연장되었다.

Glucose를 glucose oxidase와 peroxidase를 사용하여 화학량론적으로 K₃Fe(CN)₆로 전환시키는데 필요한 효소의 농도를 정하기 위하여 pH 7.5 인산염 완충용액을 사용하여 제조한 0.100 mM glucose 용액 4.50 ml와 1.00 mM K₃Fe(CN)₆ 용액 4.50 ml를 섞은 후 glucose oxidase와 peroxidase의 단위를 변화시키면서 각각의 효소용액을 1.00 ml씩 가한 후 25°C에서 효소반응을 전류법으로 감지하였다.

효소반응이 평형에 도달하였을 때 11.0 ml의 효소반응용액에 1.00 mM K₃Fe(CN)₆ 표준용액 0.50 ml, 1.00 ml, 1.50 ml를 각각 첨가한 후 전류를 측정하였다. 측정된 전류를 부피회석율로 보정하고 표준물 첨가법에 의하여 효소반응용액내에 생성된 K₃Fe

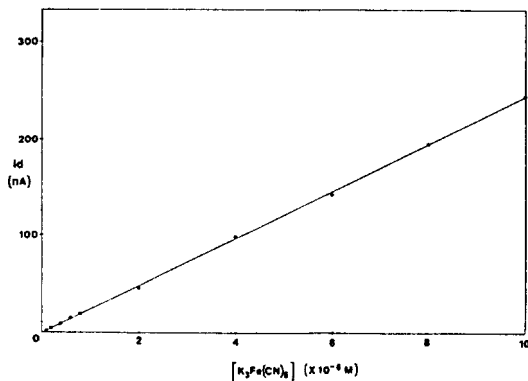


Fig. 4. Diffusion currents of K₃Fe(CN)₆ solutions at -50 mV vs. Ag/AgCl (sat. KCl) reference electrode.

Table 1. Conversion of glucose into K₃Fe(CN)₆ by glucose oxidase and peroxidase reactions

GO(U)/PO(U)	i _d (nA) of enz. sol. & [K ₃ Fe(CN) ₆] (mM) added				[K ₃ Fe(CN) ₆] (mM) in enz. soln.	% Completion
	enz. soln.	0.0435	0.0833	0.120		
1.67/18	31	76.3	117.8	153.4	0.0308	37.7
1.67/180	30	73.2	118.9	158	0.0268	32.8
4.2/180	43	82.6	127.6	178.4	0.0342	41.8
16.7/18	66	114.0	157.1	209.1	0.0541	66.1
16.7/180	64	110.8	149.5	200.0	0.0559	68.3
167/180	81	125.5	168.0	218.2	0.0691	84.5
167/270	92	141.1	193.1	231.8	0.0777	95.0
167/360	92	128.6	192.0	231.8	0.0720	88.0

GO: glucose oxidase, PO: peroxidase, i_d: diffusion current of K₃Fe(CN)₆.

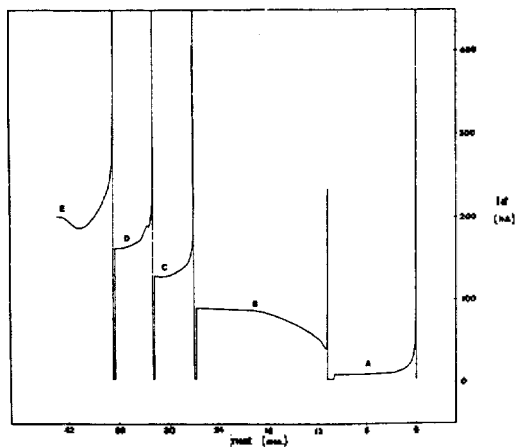


Fig. 5. Enzymatic reaction curve and that with addition of $K_3Fe(CN)_6$ standard. A: 0.100 M pH 7.5 phosphate buffer, B: enzymatic reaction curve with solution of 0.100 mM glucose 4.50 ml, 1.00 mM $K_3Fe(CN)_6$ 4.50 ml, 167 U/ml glucose oxidase 1.00 ml and 180 U/ml peroxidase 1.00 ml, C: B + 1.00 mM $K_3Fe(CN)_6$ 0.500 ml, D: C + 1.00 mM $K_3Fe(CN)_6$ 0.500 ml, E: D + 1.00 mM $K_3Fe(CN)_6$ 0.500 ml, All currents were measured at -50 mV vs. Ag/AgCl (sat. KCl) reference electrode.

($CN)_6$ 의 농도를 결정하였다. 이 실험결과는 Table 1에 요약되어 있으며 그중 한 가지 실험의 예를 Fig. 5에 나타내었다. 효소반응용액내의 glucose의 농도는 0.0409 mM이므로 효소반응이 완결된다면 이론적으로 생성되는 $K_3Fe(CN)_6$ 의 농도는 0.0818 mM이다. Table 1에서 glucose oxidase의 농도가 증가할수록 생성된 $K_3Fe(CN)_6$ 의 평형농도가 증가됨을 알 수 있다(% completion 증가) 그러나 peroxidase 반응은 glucose oxidase 반응에 비하여 빠르므로 peroxidase의 농도는 전체 반응속도에 별로 영향을 주지 않았다.

Glucose의 정량분석은 glucose oxidase 반응의 초기속도를 측정하거나 생성된 $K_3Fe(CN)_6$ 의 평형농도를 측정하였다. Fig. 6은 $0.0200 \sim 0.1000$ mM glucose 용액에 대하여 효소반응의 초기에 시간에 따라 생성되는 $K_3Fe(CN)_6$ 의 전류를 측정한 것이다. 이 실험에서는 효소반응이 시작되면서 유리질 탄소 전극에 -50 mV를 부하하였으므로 30초 동안에 충전 전류(charging current)가 급속히 감소하였고 그 이후에는 효소반응에서 생성되는 $K_3Fe(CN)_6$ 의 확산전

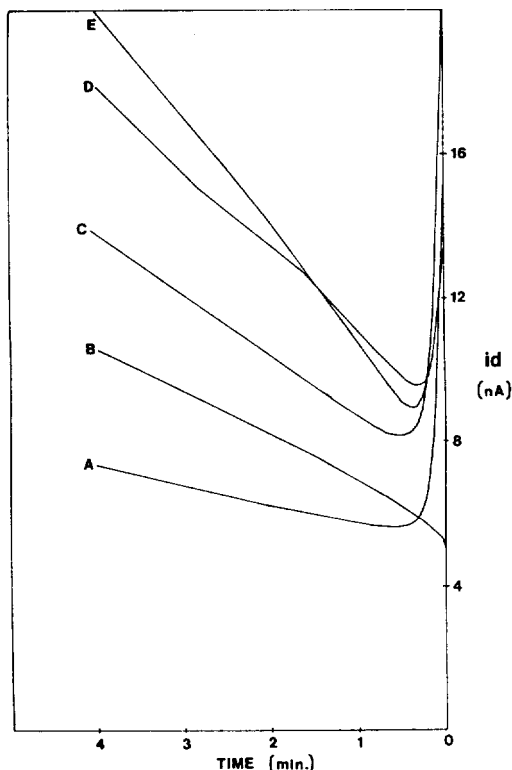


Fig. 6. Initial rates of enzymatic reactions measured at -50 mV vs. Ag/AgCl (sat. KCl) reference electrode. A: 2.00×10^{-5} M glucose, B: 4.00×10^{-5} M glucose, C: 6.00×10^{-5} M glucose, D: 8.00×10^{-5} M glucose, E: 1.00×10^{-4} M glucose, 4.50 ml of each glucose solution, 4.50 ml of 0.100 mM $K_3Fe(CN)_6$ and 2.00 ml of enzymatic solution (16.7 U GO & PO) were incubated at $25^\circ C$.

Table 2. Amperometric enzymatic determination of glucose

[Glucose] $\times 10^{-6}$ (M)	Initial rate (nA/min)		Equilibrium state (nA)	
	16.7 U	4.2 U	16.7 U	16.7 U
1.00			1.80	
2.00			3.68	2.10
4.00			5.20	3.42
6.00			6.10	5.10
8.00			7.30	5.90
10.0	0.20	0.10	9.70	9.60
20.0	0.40	0.30	18.6	19.8
40.0	1.20	0.40	35.4	43.9
60.0	1.60	0.60	49.1	67.6
80.0	2.40	0.80	66.6	92.6
100.0	3.30	0.90	84.9	117.6

류가 감지되었다. Table 2에 glucose 용액의 농도에 따라 초기속도 측정과 평형상태 측정이 요약되어 있다. 이 실험은 pH 7.5 인산염 완충용액을 사용하여 제조한 각 glucose 용액 4.50 ml와 0.100 mM K₄Fe(CN)₆ 4.50 ml를 섞은 후 효소용액(16.7 U 또는 4.2 U glucose oxidase와 180 U peroxidase) 2.00 ml를 주입시키고 25°C에서 반응시키면서 초기속도와 평형상태에서 K₃Fe(CN)₆의 전류를 측정하는 것이다. 초기속도는 충전전류가 사라진 후 즉 효소반응이 시작된 후 1분으로부터 직선관계를 주는 시간범위내에서 전류증가를 측정하여 시간간격으로 나눈 값이며 평형상태 전류는 효소반응이 시작된 후 35분에 측정하는 것이다. Glucose를 분석할 때는 평형상태에서 K₃Fe(CN)₆의 환원전류를 측정하는 것이 초기 K₃Fe(CN)₆의 생성속도를 측정하는 것보다 더 작은 농도까지 측정할 수 있었다.

Alcohol에 대한 전기화학적 효소분석. 과산화수소를 생성하는 산화효소반응을 전기화학적으로 감지하는 데에는 세 가지 방법이 있겠는데, 첫번째 방법은 산화효소반응에서 생성되는 H₂O₂에 대하여 peroxidase를 사용하여 K₄Fe(CN)₆에 반응시키고 화학량론적으로 생성되는 K₃Fe(CN)₆를 전류법으로 측정하는 것이다. Glucose-glucose oxidase 반응의 경우 이 방법은 매우 잘 정의된 방법으로서 앞의 실험결과에 나타나 있다. 또한 이 방법은 혈청 중에 함유된 총 cholesterol을 정량분석하는데 적용되어 보고된 바 있다⁸. 총 cholesterol(cholesterol ester + free cholesterol)을 분석하는데에는 cholesterol ester hydrolase, cholesterol oxidase와 peroxidase의 세 가지 효소가 이용되었다. 그러나 *Candida boidinii*에서 추출된 alcohol oxidase는 glucose oxidase, cholesterol oxidase와는 다른 특성을 갖고 있었다. Alcohol oxidase와 peroxidase를 사용하여 alcohol에 대한 전류법 분석을 연구하던 중 재현성 있는 data를 얻기 어려워 alcohol oxidase의 촉매반응 mechanism에 의문을 갖게 되었다. 0.0833 mM K₃Fe(CN)₆ 용액을 서로 다른 matrix를 사용하여 -55 mV에서 전류를 측정하였더니 Table 3과 같았다. Table 3에 요약된 바와 같이 K₃Fe(CN)₆는 pH 7.5 인산염 완충용액 중에서 peroxidase, ethanol, K₄Fe(CN)₆에 의하여 크게 영향을 받지 않았으나 소량의 alcohol oxi-

Table 3. Diffusion current of $8.33 \times 10^{-5} M$ K₃Fe(CN)₆ in different matrix

Matrix	nA
pH 7.5 phosphate buffer	175
pH 7.5 phosphate buffer with 0.033 U alcohol oxidase	2.5
pH 7.5 phosphate buffer with 1.5 U peroxidase	165
pH 7.5 phosphate buffer with 0.188 mM ethanol	180
pH 7.5 phosphate buffer with 0.375 mM K ₄ Fe(CN) ₆	150

*Residual current of pH 7.5 phosphate buffer was 3.0 nA.

dase는 K₃Fe(CN)₆를 완전히 소거하여 -55 mV에서 검출될 수 없는 물질로 바꾸어 주었다. 현재 alcohol oxidase에 의한 K₃Fe(CN)₆의 소거작용이 무엇인지 밝히지는 못하였다.

두번째 방법은 alcohol oxidase 반응에서 생성되는 H₂O₂를 직접 전류법으로 측정하는 것이다. 유리질 탄소 작업전극을 사용하여 1.00 mM H₂O₂의 pH 7.5 인산염 완충용액의 voltammogram을 그려보니 Ag/AgCl(포화 KCl) 기준전극에 대하여 +0.900 V에서 봉우리 전류에 도달하였다. pH 7.5 인산염 완충용액을 사용하여 제조한 ethanol 용액(0.100~1.00 mM) 10.0 ml와 pH 7.5 인산염 완충용액 50 μl를 전해용기에 넣고 작업전극에 +0.900 V를 부하하고 5분 후에 잔류전류를 측정하였다. 같은 농도의 ethanol 용액 10.0 ml와 alcohol oxidase(2 U/50 μl pH 7.5 인산염 완충용액) 50 μl를 섞어 25°C에서 6분간 반응시킨 다음 전해용기에 넣고 +0.900 V를 부하한 후 5분에 전류를 측정하였다. Fig. 7에 Alcohol oxidase 반응에 의하여 생성된 전류에서 잔류전류를 뺀 값(알짜 전류값)을 ethanol의 농도에 대하여 도시하였는데 Y축 절편에 나타난 바와 같이 양의 오차를 나타내었다. 알짜 전류값은 ethanol과 alcohol oxidase 반응을 25°C에서 11분간 반응시킨 후 생성된 물질이 0.900 V에서 산화되는 전류값이다. 한편, pH 7.5 인산염 완충용액 10.0 ml에 alcohol oxidase(2 U/50 μl)를 50 μl 섞어 같은 방법으로 실험하였을 때 +0.900 V에서 알짜 전류값은 1.23 μA로서 ethanol

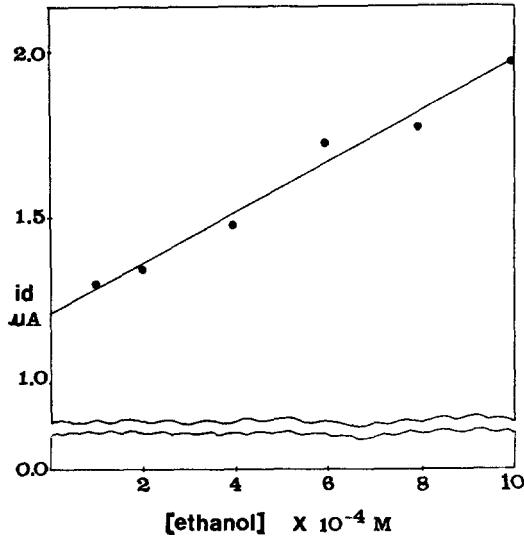


Fig. 7. Diffusion currents of ethanol-alcohol oxidase reaction measured at +0.900 V vs. Ag/AgCl (sat. KCl) ref. electrode.

검량곡선 상의 직편과 같은 전류값이었다. Alcohol oxidase가 공기포 포화된 완충용액 중에서 생성시킨 어떤 물질이 +0.900 V에서 산화되는 것이라 추측된다.

세번째 방법은 alcohol oxidase 반응에서 감소되는 O₂의 농도를 전류법으로 측정하는 것이다. 공기포 포화된 pH 7.5 인산염 완충용액의 voltammogram을 질소가스를 분산시켜 탈공기화시킨 pH 7.5 인산염 완충용액의 voltammogram과 비교하여 보니 -0.500 V에서 봉우리 전류에 도달하였다. 공기포 포화된 pH 7.5 인산염 완충용액을 사용하여 제조한 ethanol 용액 10.0 ml(0.100~1.00 mM)와 pH 7.5 인산염 완충용액 50 μl를 전해용기 안에 넣고 질소가스를 분산시키지 않고 -0.500 V를 부하한 뒤 5분에 전류를 측정하였다. 같은 농도의 ethanol 용액 10.0 ml와 alcohol oxidase(2 U/50 μl) 50 μl를 섞어 25°C에서 6분간 반응시킨 후 전해용기에 넣고 -0.500 V를 부하한 후 5분에 전류를 측정하였다. 알짜 전류값은 25°C에서 ethanol과 alcohol oxidase를 11분간 반응 시킴으로서 감소된 전류값이다. 2일에 걸쳐 실험한

data는 유사한 검량곡선을 나타내었으나 알짜 전류값과 ethanol 농도 사이의 상관계수는 0.98로서 아주 좋은 직선관계는 나타내지 않았다. 이는 ethanol-alcohol oxidase 반응에서 산소는 소비되고 과산화수소는 생성되는데 -0.500 V에서는 산소 뿐만 아니라 과산화수소는 환원되기 때문에 오차가 유발되는 것이라고 생각된다.

이상 논의된 세 가지 분석방법 중에서 ethanol의 효소분석은 alcohol oxidase 효소반응에서 생성되는 H₂O₂의 농도 증가를 측정하는 것이 제일 정확하다고 생각한다. 그러나 ethanol에 대한 효소분석이 정립되기 위해서는 alcohol oxidase의 반응특성이 명확히 밝혀져야 하며 이 효소가 저렴한 가격으로 생산되어야 한다.

본 연구는 1991년도 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 학술연구조성비 지원에 의하여 이루어진 것이며 이에 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

1. A. Noma and K. Nakayama, *Clin. Chem.*, **22**, 336 (1976).
2. M. Nanjo and G. G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta*, **75**, 169 (1975).
3. G. G. Guilbault and G. J. Lubrano, *Anal. Chim. Acta*, **69**, 189 (1974).
4. F. Tagliaro, R. Dorizzi, S. Ghielmi, and M. Marigo, *J. Chrom.*, **566**, 333 (1971).
5. P. N. Tarbutton and C. R. Gunter, *Clin. Chem.*, **20**, 724 (1974).
6. C. C. Allain, L. S. Poon, C. S. G. Chan, W. Richmond, and P. C. Fu, *Clin. Chem.*, **20**, 470 (1974).
7. W. D. Mason and C. L. Olson, *Anal. Chem.*, **42**, 488 (1970).
8. Y. Hahn and C. L. Olson, *Anal. Chem.*, **51**, 444 (1979).
9. G. D. Christian and J. E. O'Reilly, "Instrumental Analysis", 2nd Ed., p. 56, Allyn and Bacon, Boston, U.S.A., 1986.