

완충용액과 효소·기질 반응조건에 따른 효소활성도 특성

Characteristics of Enzyme Activity as Buffer Solution and Enzyme-Substrates Reaction Conditions

송대빈*	조성환**	정준호**	정효석*
정회원			학생회원
D. B. Song	S. H. Cho	J. H. Chung	H. S. Jung

1. 서론

흐름주입식 바이오센서에서 기질 농도는 효소·기질 반응 후 발생하는 과산화수소수의 양으로 측정된다. 반응 생성물인 과산화수소수는 은과 백금전극봉으로 구성되는 전류측정 장치의 전극봉 사이에서 백금전극봉의 촉매작용으로 이온화되고 이때 방출된 전자가 양극으로 이동하여 과산화수소수 양이 전류값으로 표시된다. 따라서 효소·기질 반응에 관여하는 요인이 센서의 성능에 민감한 영향을 끼칠 수 있다. 우선, 효소와 기질은 완충용액 중에 투입되어 전류측정 장치로 이송되면서 혼합과 반응이 일어나므로 완충용액의 종류, pH, 온도 등이 바이오센서의 성능에 큰 영향을 미칠 것으로 예상된다. 다음은 반응에 사용되는 효소 농도, 효소와 기질의 체적 비 등에 따라 반응 정도가 달라질 것으로 예상된다. 특히 여러 종류의 기질을 동시 측정하기 위해서는 효소를 혼합하여 사용해야 하는데 이처럼 서로 다른 효소를 혼합한 경우 반응 정도가 어떤 특성을 나타내는지 파악하여야 한다.

이 연구에서는 바이오센서에 사용되는 적정 완충용액, 효소농도, 체적 비 및 혼합 효소의 사용가능성을 파악하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 실험 재료

실험에 사용된 완충용액은 Phosphate, Acetate, Citrate의 3종류를 산도 5.0, 6.0, 7.0, 8.0으로 제조하여 사용하였다. 효소는 Glucose oxidase, Invertase, Lactate oxidase, Alcohol oxidase, Catalase, Peroxidase의 6종류를, 기질은 D-glucose, Sucrose, Fructose, L-lactic acid, Ethanol의 5종류를, 효소활성도 측정을 위해 ABTS, 4-aminoantipyrine, Dinitrosalicylic acid, Sodium azide, O-dianisidine의 5종류를 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 모든 용액은 증류수를 사용하여 제조하였다.

나. 실험 방법

1) 적정 완충용액 구명

완충 용액의 종류(Phosphate, Acetate, Citrate)와 산도(pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0)에서 효소(Glucose oxidase, Invertase, Lactate oxidase, Alcohol oxidase, Catalase)의 활성도를 측

* 경상대학교 농업생명과학대학 농업시스템공학부 생물산업기계공학전공

** 경상대학교 농업생명과학대학 환경생명식품공학부 식품공학전공

정하여 적정 완충용액을 구명하였고 완충용액의 동시 사용 가능성을 파악하였다.

2) 적정 반응 효소농도 구명

농도가 다른(0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/ml) 효소의 활성도를 측정하여 사용 가능한 효소 농도 범위를 구명하였다.

3) 효소·기질 간 적정 반응 체적 비 구명

반응 체적 비가 다른(0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 10.0 mg/ml) 효소의 활성도를 측정하여 적정 반응 체적 비를 구명하였다.

4) 이중 효소 혼합에 따른 활성도 측정

각 효소 활성도 측정 시 5개의 효소(Glucose oxidase, Invertase, Lactate oxidase, Alcohol oxidase, Caltase)를 혼합한 용액을 사용하여 활성도 변화를 측정하였다. 이를 근거로 각 기질의 농도 측정 시 혼합 효소 용액을 사용 할 수 있는지의 여부를 알아보하고자 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 적정 완충 용액 구명

그림 1, 2, 3, 4, 5는 완충용액 종류(Phosphate, Acetate, Citrate)와 산도(pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0)에서 측정된 효소(Glucose oxidase, invertase, lactate oxidase, alcohol oxidase, catalase)의 활성도를 나타낸 것이다. 그림 1에서 glucose oxidase는 완충용액의 종류와 산도에 따라 다소 차이를 나타내지만 그 차이가 크지 않음을 알 수 있다. 그림 2는 invertase의 활성도를 나타내는 것으로 phosphate 완충용액에서 산도에 따라 활성도가 크게 변하는 것을 알 수 있다. 그림 3은 lactate oxidase의 활성도를 나타내는 것으로 phosphate 완충용액 산도 7.0 이외에서는 활성도가 크게 떨어지는 것을 알 수 있다. 그림 4는 alcohol oxidase의 활성도를 나타내는 것으로 phosphate 완충용액 산도 6.0과 8.0 이외에서 활성도가 거의 없는 것으로 나타났다. 그림 5는 catalase의 활성도를 나타내는 것으로 완충용액과 산도에 따라 심하게 변하는 것을 알 수 있다. 결론적으로 phosphate 완충용액 산도 7.0의 경우 alcohol oxidase를 제외하고 나머지 효소에 사용이 가능할 것으로 판단된다.

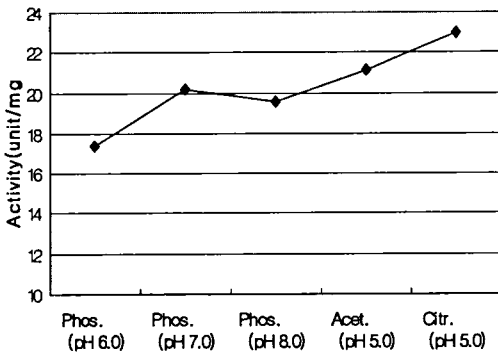


Fig. 2. Activity of glucose oxidase as buffer solution & pH.

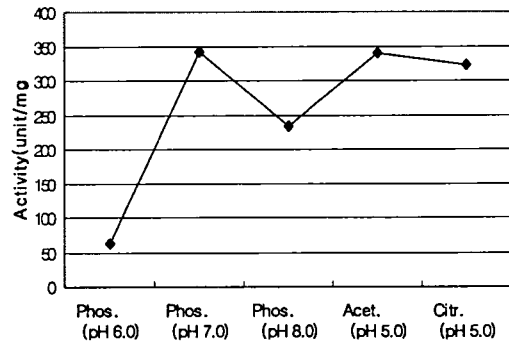


Fig. 3. Activity of invertase as buffer solution & pH.

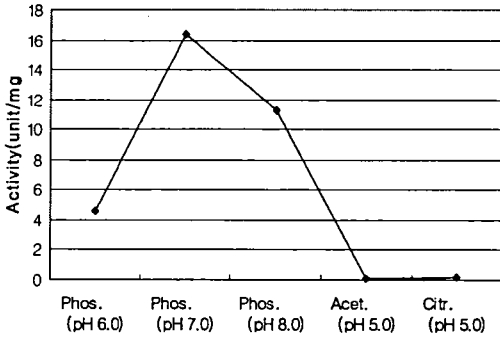


Fig. 4. Activity of lactate oxidase as buffer solution & pH.

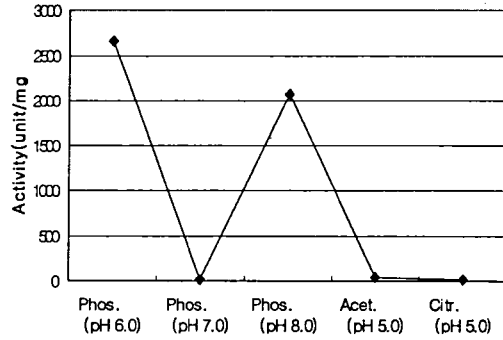


Fig. 5. Activity of alcohol oxidase as buffer solution & pH.

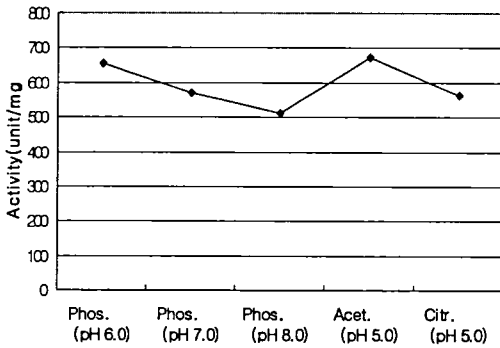


Fig. 6. Activity of catalase as buffer solution & pH.

나. 적정 반응 효소 농도 구명

표 1은 phosphate 완충용액(pH 7.0)을 사용하여 효소 농도에 따른 활성도를 나타낸 것이다. 효소는 정제과정을 거쳐 제조 되는 관계로 가격이 고가인 경우가 많다. 따라서 가능한 사용 효소의 양을 줄이는 것이 바이오 센서의 경제적 측면에서 유리하다. 표에서 효소 농도 1.0 mg/ml를 기준으로 glucose oxidase는 0.1 mg/ml, lactate oxidase는 0.5 mg/ml, alcohol oxidase는 0.1 mg/ml, catalase는 0.1 mg/ml까지 농도 희석하여 사용해도 문제가 없을 것으로 생각된다. 다만, invertase는 농도 0.5 mg/ml에서 활성도가 1.0 mg/ml에 비해 거의 반 수준으로 떨어져 농도를 낮춰 사용하는 것이 곤란할 것으로 판단된다.

다. 효소·기질 간 적정 반응 체적 비 구명

표 2는 phosphate 완충용액(pH 7.0)을 사용하여 기질과 효소의 반응 체적 비를 달리하였을 때 효소 활성도를 나타낸 것이다. 표에서 표준편차와 평균값을 기준으로 glucose, latic acid 및 ethanol은 기질과 효소의 반응 체적을 달리 사용해도 문제가 없을 것으로 판단된다. 그러나 sucrose, 과산화수소수는 그 편차가 심하여 반응체적의 변화에 따라 측정값이 다르게 나타날 가능성이 있는 것으로 예상된다. 결론적으로 효소와 기질의 반응 체적비는 1.0, 즉 같은 체적으로 사용하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

라. 이중 효소 혼합에 따른 활성도 측정

표 3은 phosphate 완충용액(pH 7.0), 기질과 효소 반응 체적비 1.0, 효소농도 1.0 mg/ml의 조건에서 5종의 효소를 혼합한 용액으로 개별 효소의 활성도를 측정한 결과이다. 표에서 glucose oxidase, lactate oxidase, alcohol oxidase는 표준편차가 비교적 작아 혼합 사용이 가능할 것으로 판단되나, invertase와 catalase는 표준편차가 크게 나타나 혼합 사용이 불가능한 것으로 판단된다. 이 결과는 종류를 알 수 없는 성분의 검출 시 특정 효소를 반복적으로 사용하는 번거로움을 해소하기 위해 혼합 효소의 사용 가능성을 알아보기 위한 것으로 포도당, 유당, 에탄올 검출 시 유용하게 사용할 수 있을 것으로 예상된다.

4. 요약 및 결론

바이오센서에 사용되는 적정 완충용액, 효소농도, 체적 비 및 혼합 효소의 사용가능성을 파악하고자 각 조건에서 효소의 활성도를 측정하였다.

적정 완충용액 구명 실험 결과 효소활성도는 완충용액 종류보다는 산도에 많은 영향을 받았으며, Phosphate 용액(pH 7.0)이 Alcohol oxidase를 제외하고 사용이 가능함을 알 수 있었다. 효소 농도의 경우 Invertase를 제외한 나머지는 0.5 mg/ml으로 희석 사용하는 것이 가능하였다. 효소·기질 간 사용체적 비 실험 결과 동일 체적으로 사용해야 함을 알 수 있었다. 효소 혼합 사용가능성 실험 결과 Invertase, Catalase는 혼합사용이 불가능 하였고 Glucose oxidase, Lactate oxidase, Alcohol oxidase는 혼합사용이 가능함을 알 수 있었다.

5. 참고문헌

- Song, D. B. and J. Irudayaraj. 2003. Measurement of glucose concentration using μ FIA biosensor. J. of KSAM. Vol. 28(5):465-468
- Song, D. B. 2004. Measurement of sucrose concentration using μ FIA biosensor. J. of KSAM. Vol. 29(6):553-557

Table 1. Activity as concentration of enzyme

Buffer	Concentration (mg/ml)	Activity(unit/mg)					S.D.	Mean
		1	2	3	4	5		
Glucose oxidase	0.1	20.12	20.55	18.16	19.34	19.23	0.92	19.48
	0.5	17.50	17.50	17.84	17.56	17.43	0.16	17.57
	1.0	19.24	20.54	19.45	20.12	20.13	0.54	19.90
	1.5	26.87	17.60	17.55	18.44	17.45	4.09	19.58
	2.0	19.92	16.33	16.43	17.34	18.23	1.48	17.65
Invertase	0.1	53.64	52.23	56.12	54.24	67.34	6.10	56.71
	0.5	107.29	107.29	112.43	114.34	109.23	3.16	110.10
	1.0	277.47	255.67	277.34	256.56	267.56	10.70	266.90
	1.5	212.73	223.76	223.45	212.72	212.34	6.03	217.00
	2.0	334.81	334.83	344.55	354.24	365.45	13.20	346.80
Lactate oxidase	0.1	14.67	13.30	13.02	13.57	13.45	0.63	13.60
	0.5	26.61	24.44	23.72	24.34	25.13	1.10	24.85
	1.0	19.97	16.43	15.57	16.34	17.01	1.70	17.06
	1.5	27.99	20.82	27.99	26.86	27.19	3.03	26.17
	2.0	26.41	30.27	30.82	30.13	29.81	1.76	29.49
Alcohol oxidase	0.1	16.77	18.12	16.54	15.53	17.66	1.01	16.92
	0.5	19.92	18.84	19.56	18.85	17.79	0.82	18.99
	1.0	22.10	20.12	21.22	19.98	20.44	0.88	20.77
	1.5	23.24	23.45	24.33	23.46	21.00	1.24	23.10
	2.0	19.34	18.24	19.92	18.83	18.34	0.70	18.93
Catalase	0.1	652.64	643.12	667.85	688.45	661.18	17.10	662.60
	0.5	662.34	651.34	655.24	689.34	698.34	21.20	671.30
	1.0	670.89	680.34	675.34	656.54	697.45	14.90	676.10
	1.5	650.34	675.43	700.32	654.34	664.56	20.00	669.00
	2.0	630.78	650.12	677.55	668.56	634.89	20.50	652.40

Table 2. Activity of enzyme as mixed volume ratio

Substrate/ enzyme	Volume ratio	Activity(unit/mg)					Mean	S. D.
		1	2	3	4	5		
D-glucose/ Glucose oxidase	0.1	18.64	18.74	18.74	18.73	18.34	18.64	0.17
	0.5	18.63	18.41	18.19	18.43	18.89	18.51	0.26
	1.0	18.09	18.53	18.43	19.01	18.67	18.55	0.34
	2.0	14.90	14.03	14.24	14.54	14.52	14.45	0.33
	10.0	14.33	16.86	16.89	17.88	16.65	16.52	1.31
Sucrose/ Invertase	0.1	345.91	320.01	394.00	394.43	356.12	362.09	32.14
	0.5	1376.23	1354.05	1298.56	1345.26	1299.34	1334.69	34.52
	1.0	2837.59	2611.91	1998.56	2771.23	2778.13	2599.48	346.18
	2.0	2591.56	2282.65	2234.34	2220.56	2184.24	2302.67	165.30
	10.0	1921.94	1485.39	1873.84	1992.24	1856.12	1825.91	197.52
L(+)-Lactic acid/Lactate oxidase	0.1	36.12	35.97	36.22	35.92	36.03	36.05	0.12
	0.5	59.49	61.53	61.24	60.13	61.32	60.74	0.89
	1.0	60.76	61.53	61.24	60.34	61.88	61.15	0.61
	2.0	59.23	60.07	61.95	62.19	62.23	61.13	1.39
	10	45.55	51.57	51.10	51.04	51.44	50.14	2.58
Ethanol/ Alcohol oxidase	0.1	22.32	21.21	22.53	20.13	21.32	21.50	0.97
	0.5	20.32	18.54	16.89	17.29	17.32	18.07	1.40
	1.0	20.12	18.23	17.34	17.20	19.22	18.42	1.25
	2.0	20.11	22.13	18.32	20.34	20.34	20.25	1.35
	10.0	22.32	18.34	19.33	23.23	20.34	20.71	2.04
H_2O_2 / Catalase	0.1	347.71	329.13	318.17	334.77	267.09	319.37	31.11
	0.5	652.29	594.38	610.55	634.14	662.53	630.78	28.36
	1.0	618.58	618.58	600.23	612.33	633.45	616.63	12.02
	2.0	643.35	755.34	871.56	744.45	644.34	731.81	94.50
	10.0	678.34	596.67	610.34	600.23	632.34	623.58	33.62

Table 3. Activity of mixed solution of enzyme

Buffer	Concentration (mg/ml)	Activity(unit/mg)					S.D.	Mean
		1	2	3	4	5		
Glucose oxidase	1.0	32.07	31.43	30.95	28.33	30.13	1.44	30.58
Invertase	1.0	1387.35	1206.07	537.44	1812.80	1656.45	496.00	1320.00
Lactate oxidase	1.0	45.34	47.34	41.23	44.23	45.27	2.23	44.68
Alcohol oxidase	1.0	13.28	15.34	18.22	17.56	16.67	1.96	16.21
Catalase	1.0	393.23	483.56	475.76	456.76	466.34	36.00	455.07