

= 단 신 =

닭의 과산화수소 분해효소의 최적 pH

이범규* · 권효식** · 김경은 · 윤길중*

청주대학교 이공대학 화학과, *조선대학교 자연과학대학 물리화학부

**충북대학교 사범대학 과학교육과

(2001. 3. 8. 접수)

Optimum pH of Chicken peroxidase

Beom-Gyu Lee*, Hyo-Shik Kwon**, Kyoung-Eun Kim and Kil-Joong Yoon

Department of Chemistry, Chongju University, Chongju, 360-764, Korea

*Division of Physics and Chemistry, Chosun University, Kwangju, 501-759, Korea

**Department of Science Education, Chungbuk National University, Chongju, 360-763, Korea

(Received March 8. 2001)

Abstract : The effect of pH and the substrate concentration on the sensing ability of the chicken peroxidase enzyme electrode was examined quantitatively. Using the new Michaelis-Menten equation, to which pH concept was introduced, enabled to calculate all kinds of dissociation constant related to chicken peroxidase and subsequently to determine the optimum pH of the sensor.

Key words : biosensor ; hydrogen peroxide ; chicken peroxidase

1. 서 론

과산화수소의 정량은 화학, 생물, 의학 및 여러 산업 분야에서 대단히 중요하다. 과산화수소의 정량분석에는 고전적인 적정법¹⁻³, 분광법⁴, 전기화학적인 방법^{5,6}이 있으나, 최근에는 방해물질의 영향을 최소화하기 위하여 효소의 특이성을 이용하는 센서의 개발이 성행하고 있다.⁷⁻¹² 이들 중 생체 내에 포함된 효소를 추출과정 없이 생체조직을 탄소반죽에 직접 혼입시켜 센서로 이용하는 방법들이 많이 알려지고 있다.¹³⁻¹⁶ 그러나 효소는 이양성자성 산으로 분석 용액의 pH에 따라 양성자의 탈착이 결정되는 두 관능기(-COOH, -NH₂)를 가지고 있고, 또 효소의 활동도는 두 관능기의 양성자 유무에 의존하게 되므로, 전기화학적 측정에 이용되는 센서의 신호 크기는 용액의 pH에 의존할 수 밖에 없다.

본 연구실에서는 여러 동식물의 생체 속에 함유된 peroxidase를 이용하여 과산화수소 정량을 위한 효소전극을 제작하고 그것의 최적조건 도출에 관한 논문을 발표한 바 있다.¹⁷⁻¹⁹ 이들 중에 포함된 내용중 pH 효과는 용액의 pH변화에 따른 단순한 신호크기의 변화를 보여주는 것이었다. 이 후에는 pH 개념이 도입된 Michaelis 이론²⁰과 돼지의 생체조직을 이용하여 여러 효소종의 해리상수를 결정하고 이들을 활용하여 돼지의 peroxidase를 이용한 센서의 최적 pH를 결정하는 방법을 고안하여 발표하기도 하였다.²¹ 본 논문에서는 닭의 peroxidase를 포함한 센서를 만들어 그것의 pH 및 기질농도 의존도를 살펴보고, 후자의 방법에 따라 과산화수소 정량 센서의 최적 pH를 결정하여 그 결과를 보고하고자 한다.

2. 실험

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)43-229-8540, Fax : +82+(0)43-229-8535

E-mail : kjyoon@chongju.ac.kr

전극은 흑연가루(Fluka, powder ; ≤0.1mm)와 mine-

ral oil(Sigma)을 55:45(wt/wt)로 혼합한 흑연반죽 0.95g에 파쇄된 닭의 간조직 0.05g을 혼합시킨 후, 오음접촉(Pt)된 원통(6mm, dia. x 8mm)형 전극 물질 자리에 충전시켜 만들었다.¹⁸ HCl(Japan, 松野園製藥所, 35%)과 NaOH(Shinyo)로 pH조절된 10mL 전해질 용액에 1.0M 과산화수소(Junsei, EP, 35%) 용액, 100 μL를 첨가하여 전, 후 신호 크기의 차를 감응전류로 간주하였다. 전류측정은 일정전압전류 측정기(BAS CV-50W)를 사용하였으며, 실험 용액의 pH 측정은 Digital pH/mV/Temp meter(Suntex SP-701)를 이용하였다. 전해질 용액은 Shinyo사의 NaCl (≥99.5%)을 실험 직전에 0.1M 용액으로 만들어 사용하였다. 닭의 간조직은 재래시장에서 구입하였으며, 사용하지 않을 때는 0 °C 이하로 유지되는 냉장고에 건조한 상태로 밀폐, 냉동시켜 보관하였다. 모든 계산은 KaleidaGraph 3.0을 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

Table 1은 여러 기질농도에서 용액의 pH에 따라 신호전류가 변화하는 것을 보여주고 있다. 또 Lineweaver-Burk도시법에 따라 각각의 pH에서 구한 최대속도, V와 Michaelis상수, K_m의 대수값이 Table 2에 주어져 있다. pH 개념이 도입된 Michaelis이론으로부터 도출된 pH와 속도(V_{max}) 그리고 Michaelis상수(K_m)의 관계식은 다음과 같다.

$$V = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{es1}} + \frac{K_{es2}}{[H^+]}} \quad (1)$$

$$\frac{V}{K_m} = \frac{V_{max}}{K_s} \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_{el}} + \frac{K_{e2}}{[H^+]}} \quad (2)$$

위 식과 Table 2를 이용하여 용액중에 존재하는 여러 효소종의 해리상수(K_{e1}, K_{e2}, K_{es1}, K_{es2}, K_s, K_{s'}, K_{s''})²¹와 V_{max}를 구하면 다음과 같다.

i) K_{es1} > [H⁺] > K_{es2}의 경우 식(1)은 V = V_{max}가 되며 여기에 대수를 취하면,

$$\log V = \log V_{max} \quad (3)$$

을 얻는다. 이는 log V vs. pH 도시에서 기울기 0, 절편 log V_{max}인 수평직선으로 log V = -2.27, 즉 V_{max} = 5.37 × 10⁻³A임을 알 수 있다. [H⁺] >> K_{es1}의 경우와 K_{es2} > [H⁺]의 경우 식(1)은 각각

$V = V_{max} \frac{K_{es1}}{[H^+]}$ 과 $V = V_{max} \frac{[H^+]}{K_{es2}}$ 되어 대수를 취하면 각각

$$\log V = \log V_{max} + \log K_{es1} + pH \quad (4)$$

과

$$\log V = \log V_{max} - \log K_{es2} - pH \quad (5)$$

을 얻는다.

따라서 직선(3)과 직선(4) 및 직선(5)의 교점의 좌표는 각각 pH = pK_{es1} 및 pK_{es2}가 된다. 이로부터 얻

Table 1. Dependence of biocatalytic current upon the solution pH and substrate concentration

pH [S]	2.00	2.60	2.90	3.40	4.00	5.40	5.80	6.70	7.40
	2.7	0.06	0.55	0.97	2.04	2.13	2.48	1.66	1.47
3.3	0.07	0.69	1.14	2.38	2.52	3.06	2.21	1.69	1.65
4.0	0.08	0.74	1.36	2.83	3.19	3.42	2.52	2.06	1.86
5.0	0.09	0.80	1.76	3.57	3.81	4.84	3.04	2.73	2.40
6.7	0.11	0.99	2.32	4.99	5.05	5.93	4.22	3.51	3.40

[S] : ×10³ M, current : ×10⁻⁵ A

Table 2. Calculated logV and logK_m at various pH's of the solution

pH	2.00	2.60	2.90	3.40	4.00	5.40	5.80	6.70	7.40
logV	-5.61	-4.71	-3.37	-3.09	-2.93	-2.55	-2.24	-2.85	-3.22
logV/K _m	-3.53	-2.53	-2.44	-2.12	-2.10	-2.04	-2.20	-2.27	-2.30

어진 pK_{es1} 과 pK_{es2} 는 각각 4.49 및 6.33이므로 $K_{es1} = 3.24 \times 10^{-5}$ 와 $K_{es2} = 4.68 \times 10^{-7}$ 을 얻을 수 있다.

ii) $K_{es1} \gg [H^+] \gg K_{es2}$ 의 경우 식(2)는

$$\frac{V}{K_m} = \frac{V_{max}}{K_s} \text{ 이다. 여기에 대수를 취하면}$$

$$\log(V/K_m) = \log(V_{max}/K_s) \quad (6)$$

가 되며, $\log(V/K_m)$ vs. pH 도식에서 기울기 0, 절편 $\log(V_{max}/K_s)$ 인 수평직선이다. 위에서 얻어진 V_{max} 를 이용하면 $K_s = 0.44$ 임을 알 수 있다. $[H^+] \gg K_{e1}$ 의 경우와 $K_{e2} \gg [H^+]$ 의 경우 식(2)는 각각

$$\frac{V}{K_m} = \frac{V_{max}}{K_s} \frac{K_{e1}}{[H^+]}$$

$$\text{과}$$

$$\frac{V}{K_m} = \frac{V_{max}}{K_s} \frac{[H^+]}{K_{e2}}$$

이 되어

$$\log(V/K_m) = \log(V_{max}/K_s) + \log K_{e1} + pH \quad (7)$$

과

$$\log(V/K_m) = \log(V_{max}/K_s) - \log K_{e2} - pH \quad (8)$$

을 얻는다. 여기서 직선(6)과 직선(7) 및 직선(8)의 교점의 좌표는 각각 $pH = pK_{e1}$ 및 pK_{e2} 가 된다. 따라서 $K_{e1} = 6.92 \times 10^{-4}$ 및 $K_{e2} = 4.57 \times 10^{-8}$ 을 얻게 된다. 지금까지 얻어진 열역학적 상수와 해리상수 상호간의 관계¹⁸를 이용하면 $K_{s'}$ 및 K_s 는 각각 0.021, 0.043 이다.

Table 1의 경향성을 살펴보면 pH4.0 과 pH5.8 사이에 최대 전류값이 존재하는데, 이것은 본계에 존재하는 여섯 가지 화학종 중에서 주반응이 $EH + S \rightarrow EHS \rightarrow EH + P$ 의 경로를 통하여 이루어지고 있음을 알 수 있다. 이 효소종들의 분율을 각각 F_{EH} , F_{EHS} 라고 할 때,

$$F_{EH} = \frac{K_{e1}[H^+]}{[H^+]^2 + [H^+]K_{e1} + K_{e1}K_{e2}} \quad (9)$$

$$F_{EHS} = \frac{K_{es1}[H^+]}{[H^+]^2 + [H^+]K_{es1} + K_{es1}K_{es2}} \quad (10)$$

이 된다.

최대 반응속도는 EH와 EHS의 공동기여에 의한 것이므로 이 성격을 동시에 나타내는 새로운 함수를 정의하면,

$$G(H^+) = F_{EH}F_{EHS} \quad (11)$$

과 같다. 식(11)을 pH변화에 대하여 도식한 것이 Fig.1이다.

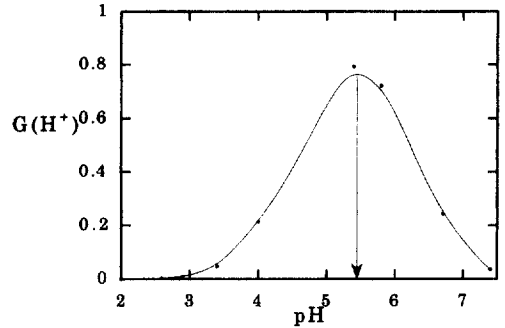


Fig. 1. Mode of variation of new function, $G(H^+)$ with pH.

이 함수의 최대값을 나타내는 pH는 실험에 사용된 효소전극의 최적 pH, 즉 닭의 과산화수소 분해효소의 최대 활동도를 얻을 수 있는 pH로 볼 수 있으며, 이 값은 ~5.44 가 된다.

4. 결 론

여러 산업분야에서 제조시약 및 생활하수처리 등 다양한 용도로 쓰이는 과산화수소를 정량하기 위하여, 닭의 생체속에 함유된 과산화수소분해 효소를 이용하는 효소전극을 제작하였다. 용액의 pH와 기질농도의 변화가 반응전류에 미치는 현상을 관찰하고, 그 결과를 pH개념이 도입된 Michaelis-Menten 모형을 응용하여 닭의 과산화수소 분해효소의 최적 pH는 ~5.44 임을 알 수 있다. 이와 같은 결과들은 생체효소를 이용하는 과산화수소 정량 바이오센서의 연구 및 제작에 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2000-2001학년도 청주대학교 학술연구조성비(특별과제)에 의하여 연구되었으며, 이에 깊이 감사드립니다.

References

1. H. H. Willard and P. Young, *J. Am. Chem. Soc.*, **55**, 3260(1933).
2. C. E. Huckaba and F. G. Keyes, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 1640(1948).

3. E. C. Hurdis and H. Jr. Romeyn, *Anal. Chem.* **26**, 320(1954).
4. P. A. Clapp, D. F. Evans and T. S. S. Sheriff, *Anal. Chim. Acta*, **218**, 331(1989).
5. W. Oungpipat, P. W. Alexander and P. Southwell-Keely, *Anal. Chim. Acta*, **309**, 35(1995).
6. E. Csoregi, G. Jonsson-Petterson and L. Gorton, *J. Biotech.*, **30**, 315(1993).
7. M. Bonarkdar, J. L. Vilchez and H. A. Mottola, *J. Electroanal. Chem.*, **266**, 47(1989).
8. (a) J. Wang, N. Naser, H. S. Kwon and M. Y. Cho, *Anal. Chim. Acta*, **264**, 7(1992).
9. C. L. Rosa, F. Pariente, L. Hernandez and E. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta*, **308**, 129(1995).
10. N. Conrath, B. Grundig, St. Huwel and K. Cammann, *Anal. Chim. Acta*, **309**, 47(1995).
11. M. D. Luque de Castro and J. M. Fernandez-Romero, *Anal. Chim. Acta*, **311**, 281(1995).
12. J. I. Lee and I. Karube, *Anal. Chim. Acta*, **313**, 69(1995).
13. J. Wang and M. S. Lin, *Electroanalysis*, **1**, 43(1989).
14. M. S. Lin, S. Y. Tham and G. A. Rechnitz, *Electroanalysis*, **2**, 511(1990).
15. Y. Fang, R. Cai and J. Deng, *Electroanalysis*, **4**, 819(1992).
16. H. S. Kwon, K. K. Kim and C. G. Lee, *J. Kor. Chem. Soc.*, **40**, 278(1996).
17. K. J. Yoon, S. Y. Pyon and H. S. Kwon, *J. Kor. Chem. Soc.*, **41**, 343(1997).
18. K. J. Yoon, K. J. Kim and H. S. Kwon, *J. Kor. Chem. Soc.*, **43**, 271(1999).
19. B. G. Lee, K. J. Yoon and H. S. Kwon, *Anal. Sci. & Tech.*, **13**, 315(2000).
20. M. Dixon and E. C. Webb, "Enzymes", 3rd Ed., p47, Longman Group Ltd., U. S. A., 1979.
21. K. J. Yoon, B. G. Lee and H. S. Kwon, *Anal. Sci. & Tech.*, **13**, 41(2000).