

= 단신 =

전기화학적 방법에 의한 HRP의 최적 pH 도출

윤길중*

청주대학교 이공대학 응용과학부
(2003. 7. 16. 접수, 2003. 10. 30 승인)

Electrochemical Determination of the Optimum pH of HRP

Kil-Joong Yoon*

Division of Applied Sciences, Chongju University, Chongju, 360-764, Korea
(Received Jul. 16, 2003, Accepted Oct. 30, 2003)

Abstract : A carbon paste electrode was constructed with peroxidase extracted from Horseradish and the variation of the response of the sensor with pH was investigated. Current profiles showed two highest sensitivities at two pH values respectively. In addition, two bands were observed in the electrophoretic expansion. A coincidence of the two experimental results added support to the possibility that the biosensor has two different isozymes. Assuming that current profiles are the sum of two gaussians, we deconvoluted them and determined the optimum pH of peroxidase isozymes.

Key words : biosensor, carbon paste electrode, isozyme, peroxidase

1. 서 론

과산화수소의 정량은 산업과 환경의 여러 분야에서 대단히 중요하다.^{1,2} 최근, 추출되거나 혹은 동식물의 조직에 포함된 과산화수소 분해효소를 이용하여 전기화학적 감응 센서를 만들고, 그것을 이용하여 과산화수소를 정확하고도 신속하게 정량하기 위하여 많은 노력이 경주되어 왔다.³⁻⁶ 효소는 반응속도를 적어도 백만 배 이상 촉진시키는 엄청난 촉매력과, 반응물인 기질 선택에 있어 절대적인 특이성을 갖고 있다. 이와 같은 특성들은 효소를 구성하는 아미노산 잔기에 의하여 형

성된 활성자리의 삼차원적 구조에 의존한다. 아미노산은 용액의 pH에 따라 양성자를 주고 받을 수 있는 카르복실기와 아미노기를 갖고 있다. 따라서 용액의 pH는 효소활성자리의 입체구조, 즉 효소의 활동도에 큰 영향을 미친다. 본 실험실에서는 동식물의 생체를 탄소 반죽 전극에 직접 혼입시켜 효소전극을 만들고, 그것의 전기화학적 특성을 조사하여 수차례 보고한 바 있다.⁷ 배추뿌리 조직을 이용하여 만든 전극의 전기화학적 특성을 조사하던 중, 용액의 pH 변화에 따른 감응전류의 변화가 두 pH 값에서 극대현상이 나타나는 것을 관찰하였다.⁸ 형태가 다르면서 동일한 반응을 촉매할 경우, 이들을 동위효소(isozyme)라고 한다. 위 실험적 사실은 배추뿌리 조직이 과산화수소를 분해하는 두 동위효소를 함유하고 있음을 암시하였다. 우선 전기영동 전개에 의하여 두 화학종의 존재를 확인한 후, 배추와 동일 종

★ Corresponding author
Phone : +82+(0)43-229-8540 Fax : +82+(0)43-229-8535
E-mail : kjyoon@chongju.ac.kr

(family)인 십자화과 (cruciferae)의 고추냉이로부터 추출된 효소를 이용하여 탄소반죽전극을 제작하였다. 이로부터 pH 변화에 따른 감응전류곡선을 얻고, 이들을 두 동위효소의 기여, 즉 두 가우스함수의 합이라고 가정 한 후, 각각을 분해하여 두 동위효소의 최적 pH를 도출하였다.

2. 실험

2.1. 기구 및 시약

CV와 전류 측정을 위하여 Ag/AgCl 기준전극 (BAS, MF2052)과 Pt 보조전극 (BAS MW1032)이 연결된 EPSILON (BAS Model EPSILON cyclic voltammograph, Bioanalytical System, Inc., U. S. A.)과 EG&G Model 362(Princeton Applied Research, U. S. A.) 일정전위기를 각각 사용하였다. 후자는 KIPP & ZONEN(BD111, Holand) X-t 기록기가 장착되었다. 전해질 용액의 pH 측정은 Digital pH/mV/Temp meter(Suntex SP-701, Taiwan)를, 그리고 전기영동 전개는 Dual Gel Caster(Might Small II kit, SE 250, Hoefer Scientific Inc., U. S. A.)를 사용하여 이루어졌다. 흑연가루 ($\leq 0.1\text{mm}$)와 미네랄오일은 각각 Fluka와 Sigma사 제품이였다. 기질 (substrate, abbr. S)로 사용된 과산화수소는 Junsei사 (35%, EP)의 제품이였으며, 고추냉이 과산화수소 분해효소 (Horseradish peroxidase, abbr. HRP, E.C. 1.11.1.7)는 Sigma사 제품을 사용하였다. 전해질은 0.1 M, NaCl(Shinyo Pure Chem. $\geq 99.5\%$)을 사용하였으며, pH는 HCl(Oriental Chem. Co.)과 NaOH(Shinyo Pure Chem.)를 적절히 가하여 조절되었다.

2.2. 전극의 제조

0.09 g의 ferrocene을 포함하고 있는 클로로포름 10 ml와 흑연가루 0.91 g을 혼합한 후, 교반하여 완전히 건조시킨다. 미리 만들어진 1.0% HRP 용액 100 μl 에 위 흑연가루 100 mg을 혼합하여 공기 중에서 다시 건조시킨다. 이 흑연가루와 미네랄오일을 55:45(wt/wt) 비율로 합하여 만든 탄소반죽은 46.9% 흑연가루, 4.9% ferrocene, 45.0% 미네랄오일, 0.5% HRP의 조성을 갖는다. 탄소반죽을 내경 6 mm 의 오음접촉된 polyethylene 튜브에 채워 전극을 성형한다. 이 전극을 0.1 M NaCl 용액 10 mL에 위치시킨 후, 기질첨가 전후의 신호차를 효소의 촉매작용에 의한 신호로 간주하였다. 효소의 전

기영동 전개는 10% native polyacrylamide gel에서 이루어졌으며, 15 mM guaiacol과 5 mM H_2O_2 용액 중에서 발색되었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 정량 조건의 도출

Fig. 1은 0.1M NaCl 전해질 용액 중에서 위 전극의 전기화학적 거동을 보여주는 순환전압전류도이다. A는 순수한 전해질 용액의, 그리고 B는 0.02 M H_2O_2 를 포함하고 있는 용액의 전압변화에 대한 전류의 변화를 보여주고 있다.

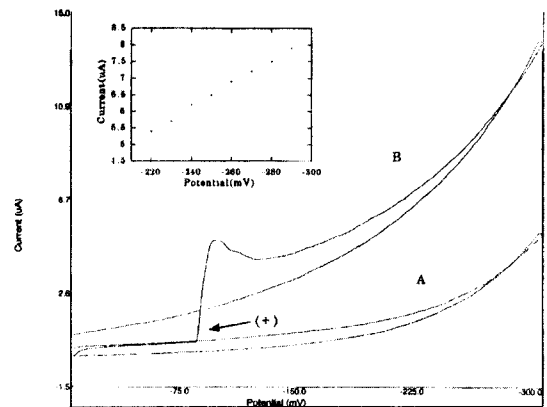


Fig. 1. Cyclic voltammetric behavior of HRP embedded carbon paste electrode before(A) and after(B) adding 200 ul of 1.0 M H_2O_2 with 10 mV/s scan rate. Also shown (inset) is the difference current between A and B with applied potential. The (+) indicates the addition of H_2O_2 .

H_2O_2 를 첨가하자 감응전류가 급격히 증가하는 것을 볼 수 있다. 이는 전극에 포함된 과산화수소 분해효소가 촉매력을 발휘하고 있음을 나타낸다. Fig. 1의 창에 기질분해에 의한 순수 신호로 간주되는 A와 B의 차를 전압에 대하여 도시하였다. 전압에 대하여 좋은 직선성을 보여주고 있는데, 이는 전극전위가 H_2O_2 의 환원반응에 주요 인자임을 보여주는 것이다. 전극전위가 감소함에 따라 감응전류, 즉 신호가 증가하지만, 잡음과 부반응의 가능성을 배제하기 위하여 실험의 작업전위를 -275 mV로 고정하였다. Fig. 2는 pH 6.14의 전해질 용

액 100 ml에 1.0 M H₂O₂ 용액 50 μl를 연속적으로 첨가하였을 때 보여주는 전형적인 감응 전류의 변화이다.

소에 의하여 촉매되는, pH 의존성 전류의 변화를 보여주고 있다.

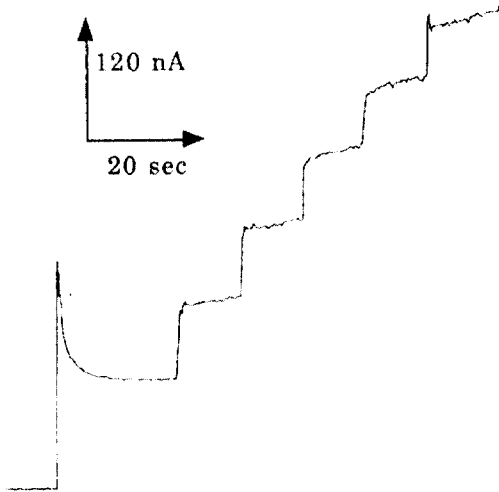


Fig. 2. Typical current-time response curve for successive addition of 50 μl, 1.0M H₂O₂ in 0.1 M NaCl electrolytic solution at the applied potential of -275 mV.

전극의 switch-on시 전류의 돌출현상은 충전전류의 변화를 보여주는데, 그 감소속도가 대단히 빨라 10초 이내에 포화되므로, 기질 첨가전후 신호차를 도출하는데 영향이 없음을 보여주고 있다. 또 기질 추가 시 1~2초 이내에 감응하여 포화되는 것을 볼 수 있으며, 최대 작업 농도에 이르기 까지 신호는 대체로 직선성임을 보여주고 있다.

3.2 최적 pH의 도출

Table 1은 여러 기질 농도에서 과산화수소 분해효

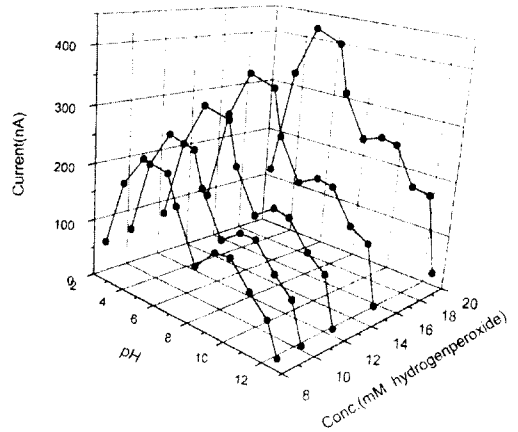


Fig. 3. pH-dependent current profiles at a variety of H₂O₂ concentrations. Other conditions are the same as in Fig. 2.

이들을 도시한 것이 Fig. 3이며, pH 4 와 pH 8 부근의 두 곳에서 극대값이 형성되어 있음을 볼 수 있다. Fig. 4는 서로 다른 세 농도의 효소용액을 전개시킨 전기영동 결과를 보여주고 있다. 붉은 두 농도 (lane 1: 0.5 μg/mL, lane 2: 1.0 μg/mL)에서 두 띠 (band 1, 2)만을 보여주고 있다. 진한 농도의 경우 (lane 3), 약한 두 띠 (band 3, 4)를 추가적으로 보여주고 있는데, 이것은 lane 1에서 띠 1과 띠 2의 세기에 비하여 대단히 약하므로 띠 1과 띠 2를 주띠 (major band)로 간주하였다. 위 두 실험적 사실은 사용된 과산화수소 분해 효소가 두개의 동위효소로 구성되었을 가능성을 보다 구체화시켜 주고 있다.

Table 1. Effect of pH on the biocatalytic currents

[S], mM	pH											
	2.33	3.47	4.66	6.14	6.70	7.93	8.94	9.78	10.86	11.81	12.42	
8.4	60	177	231	222	174	99	126	129	90	60	8	
9.9	70	201	264	252	192	120	144	144	102	75	9	
12.0	82	225	303	291	216	144	168	162	117	93	11	
15.0	94	264	348	333	252	180	198	192	135	117	15	
20.0	115	324	420	399	309	231	243	237	168	162	22	nA

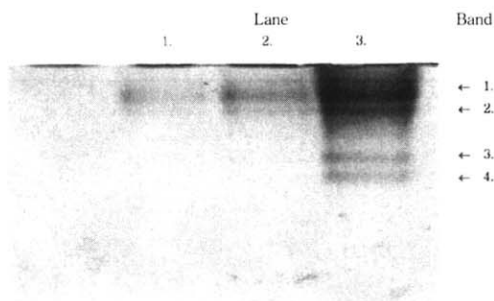


Fig. 4. Native polyacrylamide gel electrophoretic expansion of horseradish peroxidase.

이런 실험적 사실에 근거하여 Fig. 3에 있는 각각의 곡선을 두 가우스 함수의 합으로 간주하고, 프로그램 Origin 7.0을 이용하여 두 가우스 함수로 분해하였다. 모든 농도에 대한 결과를 여러 가지 파라미터와 함께 Table 2에 요약하였다.

Table 2. Calculated optimum pH(xc) and other parameters

[S], mM	peak A			peak B		
	xc	w	A	xc	w	A
8.4	5.13	3.50	1107	9.89	2.51	394
9.9	5.08	3.46	1240	9.88	2.79	489
12.0	5.08	3.44	1403	9.84	2.93	586
15.0	5.05	3.44	1606	9.78	3.13	731
20.0	4.58	5.48	6676	10.9	5.18	4665

$$I = (A/(w * \sqrt{\pi/2})) * \exp(-2 * ((pH-xc)/w)^2)$$

낮은 pH와 높은 pH에서 활성을 갖는 동위효소를 각각 A, B라고 할 때, 이 둘의 pH 의존성 활동도를 보여주는 두 곡선의 최대값을 나타내는 xc값, 즉 최적 pH는 재현성있는 낮은 네 기질농도의 경우에 비하여, 가장 높은 농도인 20.0×10^{-3} M에서 크게 벗어나는 것을 볼 수 있다. 이때 Q값은 A와 B에 대하여 각각 0.85와 0.90이다. 이는 5회 측정시의 Q값 0.64보다 큰 값이므로 고려 대상에서 제외될 수 있으며, 나머지 네 농도에서 얻어진 xc의 평균값은 A와 B의 경우 각각 5.09와 9.85였다. 이 값들을 두 동위효소의 최적 pH로 규정하여도 무방할 것이다.

4. 결론

산화-환원을 행하는 효소인 과산화수소 분해효소의 최적 pH를 전기화학적 방법으로 도출하였다. 고추냉이로부터 추출된 과산화수소 분해효소가 혼합된 탄소 반죽 전극의 pH 의존성 신호전류는 두 pH 값에서 극대현상을 보였다. 전기영동에 의하여 전개된 두 띠는 효소가 두 동위효소로 구성되었음을 확인시켜 주었으므로, pH 의존성 신호를 두 동위효소에 의한 기여의 합으로 가정한 후, 이들을 분해하여 각각의 최대 전류 신호를 나타내는 pH 값을 두 동위효소의 최적 pH로 규정하였다.

감사의 글

이 논문은 2002-2004학년도 청주대학교 학술연구조성비(특별과제)에 의하여 연구되었으며, 이에 깊이 감사드립니다.

참고 문헌

1. J. R. Kirchner, "Encyclopedia of Chemical Technology", Vol. 13, 12, Wiley-Interscience, New York, U.S.A., 1981.
2. N. I. Sax, "Hawley's, Condensed Chemical Dictionary", 618, Van Nostrand Reinhold, New York, U.S.A., 1987.
3. V. Rajendran, E. Csoregi, Y. Okamoto and L. Gorton, *Anal. Chim. Acta*, **373**, 241-251(1998).
4. E. Casero, M. Darder, F. Pariente and E. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta*, **403**, 1-9(2002).
5. S. Gaspar, K. Habermuller, E. Csoregi and W. Schumann, *Sens. Actuators B*, **72**, 63-68(2001).
6. B. Li, Z. Zhang and Y. Jin, *Biosensors & Bioelectronics*, **17**, 585-589(2002).
7. (a) K. J. Yoon, S. Y. Pyun and H. S. Kwon, *J. Kor. Chem. Soc.*, **41**(7), 343-350(1997). (b) K. J. Yoon, K. J. Kim and H. S. Kwon, *J. Kor. Chem. Soc.*, **43**(3), 271-279(1999). (c) K. J. Yoon, B. G. Lee and H. S. Kwon, *Anal. Sci. Tech.*, **13**(1), 41-48(2000). (d) B. G. Lee, K. J. Yoon and H. S. Kwon, *Anal. Sci. Tech.*, **13**(3),

- 315-322(2000). (e)H. S. Kwon, I. K. Park, K. J. Yoon and M. L. Seo, *J. Kor. Chem. Soc.*, **44**(4), 376-379(2000).
8. H. S. Kwon, K. K. Kim and C. G. Lee, *J. Kor. Chem. Soc.*, **40**(4), 278-282(1996).