

## 단 신

### 전기화학적 방법에 의한 효소의 pH 안정도곡선 도출

윤길중\* · 권효식† · 이범규‡

청주대학교 응용과학부

충북대학교 과학교육학부

‡조선대학교 화학과

(2005. 1. 10 접수)

### Electrochemical Determination of pH-Stability Curve of Enzyme

Kil-Joong Yoon\*, Hyo-Shik Kwon†, and Beom-Gyu Lee‡

Division of Applied Sciences, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea

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

‡Department of Chemistry, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

(Received January 10, 2005)

**주제어:** 바이오센서, 과산화수소, 담배 과산화효소, 최적 산성도

**Keywords:** Biosensor, Hydrogen Peroxide, Tobacco Plant Peroxidase, Optimum pH

## 서 론

과산화수소는 표백 및 탈취제의 제조시약으로, 전기도금 및 생활하수 처리 등, 여러 산업 분야에서 다양한 용도로 쓰이는 시약이다. 따라서 과산화수소의 정확하고 신속한 정량은 대단히 중요하다. 과산화수소의 정량에는 고전적이거나 분광학적인 여러 가지 방법들이 이미 알려져 있으나, 과산화수소 분해효소를 정량에 이용할 경우, 특이성에 의하여 방해물질로부터 방해효과를 현저히 제거할 수 있으며, 엄청난 촉매력에 의하여 신속하게 정량할 수 있는 잇점을 갖고 있다. 그러나 효소를 추출하는 과정이 대단히 복잡하므로, 생체조직에 포함된 과산화수소 분해효소를 추출과정 없이 직접 이용하는 방법이 Clark 및 Updike<sup>1</sup> 등에 의하여 처음으로 시도되었으며, 이후 많은 발전된 결과들이 소개되었다.<sup>2</sup> 과산화수소의 분해반응은 전자의 출입이 관여된 산화-환원 반응이다. N, Q 및 F를 각각 화학종의 몰수, 전하량 및 패러데이 상수라고 할 때, 전극반응속도,  $v$ 는  $v = dN/dt$ 이다. 여기서 실험 전류,  $i$ 는  $i = dQ/dt$ 이며,  $Q/nF = N$ 이므로,  $v = i/nF$ 가

되어 반응속도는 전류에 비례한다. 따라서 반응속도 측정은 전류측정으로 대체될 수 있으며, 이로부터 열역학적 정보나 전자가 이동하는 속도 및 반응메커니즘에 관하여 여러 가지 정보를 얻을 수 있다.<sup>3</sup> 본 실험실에서는 각종 생체조직에 함유된 과산화수소 분해효소를 추출과정 없이 직접 이용하는 과산화수소 정량 효소전극을 제작하여 전기화학적 성질을 고찰하며, 보다 기능이 향상되고, 감도가 뛰어난 과산화수소 정량 바이오센서를 개발하기 위하여 노력해 왔다. 그리고 그 결과들을 여러 차례 보고한 바 있다.<sup>4-6</sup> 닭의 간 조직<sup>7</sup>을 이용한 효소전극은 과산화수소의 분해 전류가 단일종의 과산화수소 분해효소에 의하여, 그리고 배추뿌리 조직을 이용한 효소전극의 경우는 두 동위효소에 의하여 촉매화되고 있다는 사실을 확인하였으며, 동위효소 각각의 기여를 도출하여 각각의 최적 산성도를 결정하는 방법을 고안하여 발표하였다.<sup>8</sup> 또 Michaelis-Menten 이론을 응용하여 과산화수소 분해효소의 pH 의존 활성변화를 살펴봄으로서, 촉매반응은 'EH<sub>2</sub> + S ⇌ EH<sub>2</sub>S ⇌ EH<sub>2</sub> + 생성물'이나 'E + S ⇌ ES ⇌ E + 생성물'의 경로보다는 'EH + S ⇌ EHS ⇌

EH + 생성물'의 경로가 지배적이라는 사실을 밝혀 보고하기도 하였다.<sup>9</sup> 효소 단백질의 활성 자리는 용액의 산성도에 따라 양성자 탈착이 가능한 아미노 및 카르복실 해리기로 구성되어 있어, 강산성이나 알칼리성 용액 중에서 양성자의 탈착유무에 따라 입체적 변화를 일으키고, 결과적으로 잔존활성이 변화된다. 그러므로 효소가 촉매 역할을 하는 화학반응의 속도는 효소의 pH 안정범위 내에서 측정되어야 한다. 본 논문에서는 담배조직을 이용하여 과산화수소 감응 효소전극을 제작하고, Michaelis-Menten 이론<sup>10</sup>에 근거하여 전극반응에 관련된 효소의 여러 가지 열역학적 파라미터들을 결정하였다. 그리고 이들을 이용하여 담배조직이 포함하고 있는 과산화수소 분해효소의 pH 안정도 곡선을 도출하고, 그 결과를 보고한다.

## 실 험

Ferrocene 0.09 g을 20 mL  $\text{CHCl}_3$ 에 녹인 후, 흑연가루 0.91 g과 혼합하여 건조시킨 후 미네랄오일과 55:45(wt/wt)의 비율로 혼합하여 반죽을 만든다. 여기에 호모게나이저로 90분 이상 파쇄한 필요량의 담배조직을 완전 혼합하여 전극물질을 제조한다. 이 반죽을 오음 접착이 있는 내경 6 mm의 폴리에틸렌 튜브에 충전시켜 전극을 성형한다. 전류측정은 pH가 조절된 10 mL 0.1 M NaCl 용액에 작업전극을 위치시키고, 환류상태에서 충전전류가 바탕선에 도달하였을 때, 기질용액 첨가 전후의 신호차를 과산화수소 분해전류로 간주하였다. 신호전류 측정은 KIPP & ZONEN X-t(BD111, Holand) 기록계가 장착된 EG&G Model 362(Princeton Applied Reach, U.S.A.)를 이용하였다. 기준전극과 보조전극으로 Ag/AgCl(BAS MF2052)과 Pt 백금전극(BAS MW1032)을 각각 이용하였다. 실험 용액의 pH측정은 Digital pH/mV/Temp meter(Suntex SP-701, Taiwan)가 이용되었으며, 이 기기는 Shinyo사(Shinyo Pure Chemicals Co., Japan, S.P.C. GR Reagent)

의 pH 4, 7, 10 표준완충용액으로 검정되었다. 흑연가루와 미네랄오일은 각각 Fluka와 Sigma사 제품이었으며, 기질로 Junsei사의 과산화수소(EP, 35%)를 이용하였다. 전해질로는 Shinyo 사의 NaCl( $\geq 99.5\%$ )을, 전해질 용액의 pH 조절은 묽은 NaOH(Shinyo Pure Chemicals Co., Japan) 및 HCl(Oriental Chem. Co. Korea)용액을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

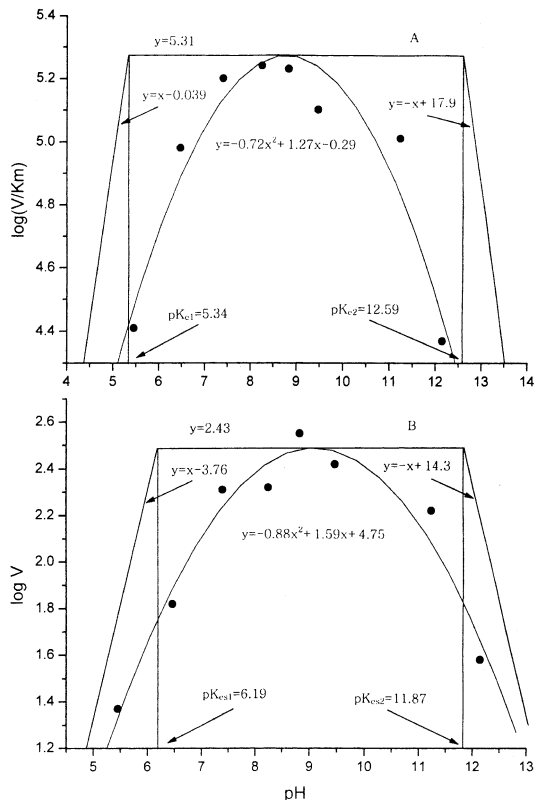
Table 1은 19%의 담배조직을 포함하고 있는 과산화수소 감응 전극이 여러 기질농도에서 용액의 pH 변화에 따라 신호전류가 변하고 있는 것을 보여주고 있다. 조사된 pH 영역의 중심 부분에서 최대 전류를 나타내고 있다. 전극의 계 내부에는 용액의 산성도에 따라 E, EH,  $\text{EH}_2$  등, 여러 효소종의 존재가 가능하다. 양성자의 탈착에 기인되는 효소 활성자리의 입체적 구조변화를 고려할 때, 기질 분해반응에 대한 이들 각각의 촉매력이 다를 것이므로 pH 변화에 따라 신호크기가 변화되리라는 것은 쉽게 예측된다. Michaelis-Menten의 두 단계 촉매 메커니즘은 양성자 농도와  $K_m$  및 V의 관계를 잘 기술하여 준다. Table 2는 Table 1에 있는 각각의 pH에서 Lineweaver-Burk 도시에 의하여 얻어진  $V/K_m$ 와 V의 상용대수를 보여주고 있다. 이들 각각을 pH 변화에 대하여 도시한 것이 Fig. 1의 A와 B이다. Fig. 1에서 pH에 대한  $\log V/K_m$ 의 변화를 시물레이션한 방정식은  $y = -0.72x^2 + 1.27x - 0.29$ 이다. 이 곡선에 대하여 +1과 -1의 기울기를 갖는 접선은 각각  $y = x - 0.039$  및  $-x + 17.9$ 이다. 곡선에 대하여 0의 기울기를 갖는 직선과 두 직선의 교점은 각각 5.34와 12.59이다. 이 값들은 기질이 결합되지 않은 효소종의 평형, ' $\text{EH}_2 \rightleftharpoons \text{EH} \rightleftharpoons \text{E}$ '에서 1차 및 2차 해리상수의  $\text{p}K_{e1}$ 과  $\text{p}K_{e2}$ 에 해당한다. 위와 같은 방법은 pH에 대한  $\log V$ 의 도시, B에 동일하게 적용되어 평형, ' $\text{EH}_2\text{S} \rightleftharpoons \text{EHS} \rightleftharpoons \text{ES}$ '에 대한 1차 및 2차 해리상수의  $\text{p}K_{e1}$ 과  $\text{p}K_{e2}$ 의 값을 구할 수 있다. 이 때 얻어진 값은 각각

Table 1. pH dependence of signal current at a variety of substrate concentrations.

[S], $\times 10^{-5}\text{M}$	pH							
	5.45	6.46	7.39	8.24	8.82	9.46	11.23	12.14
7.0	1.7	6.0	10.5	11.4	11.4	8.6	6.8	1.6
14.0	2.8	11.7	21.0	21.4	21.9	15.6	13.5	2.9
21.0	4.8	15.0	27.9	31.2	33.0	24.3	18.6	4.7
28.0	5.7	18.6	36.0	39.0	40.5	33.0	24.0	5.6 nA

Table 2.  $\log(V/K_m)$  and  $\log V$  obtained from two reciprocal plots.

	pH							
	5.45	6.46	7.39	8.24	8.82	9.46	11.23	12.14
$\log(V/K_m)$	4.41	4.98	5.20	5.24	5.23	5.10	5.01	4.37
$\log V$	1.37	1.82	2.31	2.32	2.55	2.42	2.22	1.58

Fig. 1. pH profiles of  $\log(V/K_m)$  and  $\log V$ .

6.19과 11.87이다. 또 Fig. 1의 B에서 곡선의 최대값은  $\log V_{\max}$ 로서 이로부터 최대 전류  $V_{\max}$ , 269 nA를 도출할 수 있다. 한편  $K_{e1} \gg [H^+] \gg K_{e2}$ 의 범위에서  $\log(V/K_m) = \log(V_{\max}/K_s)$ 의 관계가 성립하므로, A로부터 평형, 'EHS  $\rightleftharpoons$  EH'의 해리상수,  $K_s$ 를 구할 수 있다. 계 내부에서 가능한 또다른 평형, 'EH<sub>2</sub>S  $\rightleftharpoons$  EH<sub>2</sub>'과 'ES  $\rightleftharpoons$  E'에 대하여 효소종 EH<sub>2</sub>S, ES의 기질 해리상수를 각각  $K_{s'}$ ,  $K_s$ 라고 할 때, 관계식  $K_{es1}/K_{e1} = K_{s'}/K_s$ 과  $K_{es2}/K_{e2} = K_s/K_{s'}$ 는  $K_s$ 와  $K_{s'}$ 의 값  $1.85 \times 10^{-4}$ 과  $2.49 \times 10^{-4}$ 을 각각 얻게 해준다. 지금까지의 결과를 종합한 것이 Table 3이다. 양성자를 포함하고 있는 용액 중에서 양성자 농도에 의존하는 다양성자성 산 H<sub>n</sub>A의 해리 화학종 분률,  $F_{Hn-jA}$ 은  $F_{Hn-jA} = K_1 K_2 \dots K_j [H^+]^j / D$ 로 주어

Table 3. Thermodynamic quantities of tobacco peroxidase.

$K_{e1}$	$4.57 \times 10^{-6}$	$K_{e2}$	$2.57 \times 10^{-13}$
$K_{es1}$	$6.45 \times 10^{-7}$	$K_{es2}$	$1.35 \times 10^{-12}$
$K_{s'}$	$1.31 \times 10^{-3}$	$K_s$	$2.49 \times 10^{-4}$
$K_{s''}$	$1.85 \times 10^{-4}$	$V_{\max}(\text{nA})$	$2.69 \times 10^2$

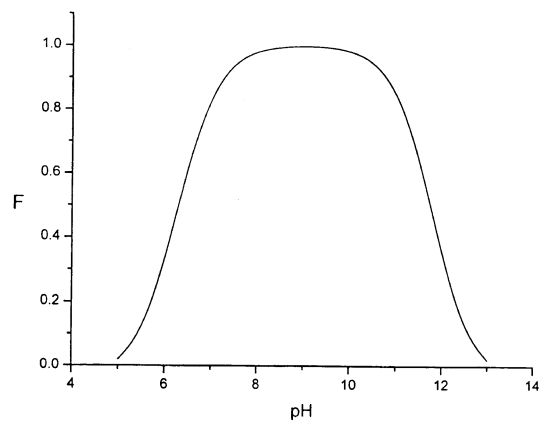


Fig. 2. Diagrammatic representation of pH stability curve.

진다. 여기서  $D = [H^+] + K_1[H^+]^{n-1} + K_1 K_2 [H^+]^{n-2} + \dots + K_1 K_2 \dots K_n$ 이다. 전보<sup>9</sup>에 따르면 과산화수소 분해효소의 주된 반응은 'EH + S  $\rightarrow$  EHS  $\rightarrow$  EH + 생성물'의 경로를 따라 이루어지는 것이 확인되었다. 따라서 반응 속도, 즉 신호크기는 EH와 EHS의 pH의존성 분률,  $F_{EH} = K_{e1}[H^+]/[H^+]^2 + [H^+]K_{e1} + K_{e1}K_{e2}$ 와  $F_{EHS} = K_{es1}[H^+]/[H^+]^2 + [H^+]K_{es1} + K_{es1}K_{es2}$ 의 동시적 기여에 의존할 것이다.  $F_{EH}$ 과  $F_{EHS}$ 의 곱을  $F$ 로 나타낸다면,  $F$ 는  $F_{EH}$ 과  $F_{EHS}$ 의 공동 기여를 반영하는 pH의존성 함수이며, 이를 도시한 것이 Fig. 2이다. 7.5 ~ 10.5의 pH영역은 이외의 영역과 달리  $F$ 가 pH변화에 크게 의존하지 않는 것을 볼 수 있는데, 이는 용액의 산성도가 담배에 포함된 과산화수소 분해효소의 최대 활동도에 크게 영향을 주지 않는 pH영역임을 말하여 주고있다.

## 결론

미네랄오일로 만든 탄소반죽에 담배 조직과 매개체

Ferrocene을 혼입시켜 과산화수소 감응 효소전극을 제작하고, 전극의 pH 의존성 감응신호를 관찰하였다. Michaelis-Menten 모형을 이용하여 전극이 포함하고 있는 과산화수소 분해효소의 열역학적 파라미터들을 구하였으며, 이들을 이용하여 담배조직이 포함하고 있는 과산화수소 분해효소의 pH 안정도 곡선을 도출하였다. 이와 같은 안정영역 도출방법은 산화-환원반응에 관여하는 다른 효소의 경우에도 적용될 수 있을 것이다.

### 인 용 문 헌

1. (a) Clark, Jr. L. C.; Lyons, C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, 102, 29. (b) Updike, S. J.; Hicks, G. P. *Nature* **1967**, 214, 986.
2. (a) Wang, J. J.; Lin, M. S. *Electroanalysis* **1989**, 1, 43. (b) Lin, M. S.; Tham, S. Y.; Rechnitz, G. A. *Electroanalysis* **1990**, 2, 511. (c) Fang, Y.; Cai, R.; Deng, J. *Electroanalysis* **1992**, 4, 819. (d) Oungpipat, W.; Alexander, P. W.; Southwell-Keely, P. *Anal. Chim. Acta* **1995**, 309, 35. (e) Csöregi, E.; Jönsson-Pettersson, G.; Gorton, L. *J. Biotech.* **1993**, 30, 315. (f) Kwon, H. S.; Kim, K. K.; Lee, C. G. *J. Korean Chem. Soc.* **1996**, 40, 4, 278.
3. (a) Luque de Castro, M. D.; Fernandez-Romero, J. M. *Anal. Chim. Acta* **1995**, 311, 281. (b) Akgöl, S.; Dinckaya, E. *Talanta* **1999**, 48, 363. (c) Baohong L.; Fang Y.; Jilie, K.; Jiaqi, D. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 386, 31. (d) Baoxin, L.; Zhunjun Z.; Yan J. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, 17, 585.
4. Yoon, K. J.; Lee, B. G.; Kwon, H. S. *Anal. Sci. & Tech.* **2000**, 13, 1, 41.
5. Lee, B. G.; Yoon, K. J.; Kwon, H. S. *Anal. Sci. & Tech.* **2000**, 13, 3, 315.
6. Kwon, H. S.; Park, I. K.; Yoon, K. J.; Seo, M. L. *J. Korean Chem. Soc.* **2000**, 44, 4, 376.
7. (a) Yoon, K. J.; Pyun, S. Y.; Kwon, H. S. *J. Korean Chem. Soc.* **1997**, 41, 7, 343. (b) Yoon, K. J.; Kim, K. J.; Kwon, H. S. *J. Korean Chem. Soc.* **1999**, 43, 3, 271. (c) Lee, B. G.; Kwon, H. S.; Kim, K. E.; Yoon, K. J. *Anal. Sci. & Tech.* **2001**, 14, 3, 286.
8. Yoon, K. J. *Anal. Sci. & Tech.* **2003**, 16, 6, 504.
9. Yoon, K. J. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2004**, 25, 7, 997.
10. Dixon, M.; Webb, E. C.; Thorne, C. J. R.; Tipton, K. F. *Enzymes*, 3rd ed.; Longman; London, 1979, p 138.