

고무 결합재를 이용한 식물조직 바이오센서의 간편한 제작과 응용성

이범규¹ ★ · 류근배² · 윤길중²

¹조선대학교 자연과학대학 화학과, ²창주대학교 이공대학 응용화학과
(2009. 6. 8. 접수, 2009. 8. 25. 승인)

A rapid and easy fabrication of plant-tissue biosensor using rubber binder and its practicability test

Beom-Gyu Lee¹ ★, Keun-Bae Rhyu² and Kil-Joong Yoon²

¹Department of Chemistry, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

²Division of Applied Sciences, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea

(Received June 8, 2009; Accepted August 25, 2009)

Abstract: An enzyme electrode bound by rubber solution was newly constructed and the test of its practicability were carried out. The binder of carbon powder was styrene-butadiene rubber dissolved in toluene and enzyme source was ground tissue of cabbage root. Volatilization of the solvent made the electrode material possess a mechanical robustness and a fast signal appearance. The electrode showed electrochemically irreversible characteristics and a powerful catalytic power (detection limit= 5.0×10^{-5} M, S/N=2). The double reciprocal plot of signal current and substrate concentration was ideally linear and the symmetry factor and exchange current density of the electrode used in this work were 0.35 and 4.93×10^{-5} Acm⁻² respectively.

Key words : styrene-butadiene rubber; biosensor; peroxide; peroxidase; enzyme electrode

1. 서 론

효소의 촉매 특이성을 이용하여 바이오센서를 제작하고 그것을 실용화하고자 할 때, 효소의 특이성이 완전하게 유지되도록 센서 표면에 고정하는 일은 대단히 중요하다. 온도가 낮은 경우에도 최소한 백만 배 이상의 반응속도를 추진할 수 있는 효소의 촉매력과 특이성이 유지되어야 하기 때문이다. 지금까지 알려진 효소 고정 방식에는 주로 효소의 물리적 흡착성을 이

용하거나,¹ 기능성 고분자와의 공유결합,² 또는 고분자 필름을 이용하는 방식들이 소개되었다.³ 또 전극 물질, 특히 졸-겔에 효소원을 혼합하여 고정하는 방식⁴ 등이 집중적으로 개발되기도 하였다. 위 방법들은 복잡한 물리적, 화학적 과정을 거쳐야 하므로 전극제작에 많은 시간과 비용이 소모된다. 이런 비효율성을 우회하기 위하여 본 실험실에서는 미네랄 오일을 탄소가루의 결합재로 사용하여 전극을 제작하고 그것의 전기 화학적 특성을 연구하여 왔다.⁵ 그러나 미네랄 오일은

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)43-229-8540 Fax : +82-(0)43-229-2335

E-mail : kjyoon@cju.ac.kr

전극의 기계적 물성이 보장되지 않기 때문에 실용화의 가능성은 없다. 이런 미네랄 오일의 결점을 보완하기 위하여 본 실험실에서는 기계적 물성이 확보되는 흑연가루 결합재를 찾고자 노력하였고, 톨루엔에 녹인 고무가 전극 제작 후 용매가 휘발되면 기계적 물성이 얻어지는 것을 확인하였다. 그 결과로 ethylene propylene diene terpolymer,⁶ polybutadiene rubber,⁷ butyl rubber,⁸ chloroprene rubber⁹ 등 여러 종류의 고무를 결합재로 활용하여 전극을 제작하고, 그 전기화학적 성질을 조사하여 수차례 보고한 바 있다. 이들에서 결합재의 기계적 물성을 얻는 데는 고무의 사용이 성공적이었다고 할 수 있다. 그러나 탄소반죽 전극이 실용화되기 위하여 뒤따르는 또 하나의 근본적인 문제는 전극이 정성적, 정량적으로 행동하여야 한다는 것이다. 여기서는 이들의 확인을 위한 노력의 일환으로 속도론적 행동을 살펴보고자 한다.

스티렌부타디엔 고무는 부타디엔과 스티렌의 공중합체로 비교적 순물질에 가깝고, 내열성, 내마모성 그리고 저장성을 갖는 것으로 알려져 있다. 또 고탄성으로 동적 성질이 우수하며 충전제와 상용성이 좋은 것으로 알려져 있다.¹⁰ 이와 같은 스티렌부타디엔 고무의 특성이 효소전극의 실용화 조건인 기계적 안정성을 만족시킬 것으로 예측하고, 이것을 결합재로 사용하여 전극을 제작하였다. 한편 앞서 발표된 결과들에서는 효소원으로 고추냉이로부터 추출된 과산화효소(Sigma, E. C. 1. 11. 1. 7)를 구입하여 사용하였다. 배추는 십자화과(cruciferae)의 고추냉이와 동일 족(family)으로 과산화효소를 많이 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 본 계에서는 파쇄된 배추뿌리 조직을 효소원으로 직접 전극물질에 혼입시켰다. 이와 같이 만들어진 효소전극의 전기화학적 특성을 살펴보고 그 결과를 여기에 보고 한다.

2. 실험

2.1. 시약 및 측정

스티렌부타디엔 고무(styrene butadiene rubber, abbr. SBR, KOSYN 1502, styrene 23.5%)는 한국타이어(주)로부터 제공받았다. 톨루엔은 Sigma-Aldrich($\geq 99.9\%$) 제품을, 흑연가루는 Fluka사 제품(≤ 0.1 mm)을 사용하였다. 기질(abbr. S)로는 Junsei사의 과산화수소(EP, 35%)를 이용하였다. 전해질은 Shinyo사의 NaCl(99.5%)을, 신호의 안정과 증대를 위하여 매개체로 사용된 페로센(ferrocene)은 Sigma사 제품을 사용하였다. 기준전

극과 보조전극으로 Ag/AgCl(BAS MF2052)과 Pt 백금 전극(BAS MW1032)을 각각 사용하였고, 순환전압전류 그림은 BAS Model EPSILON(Bioanalytical System, Inc., U. S. A.) 전압전류계를 사용하여 얻었다. 그리고 대부분의 신호전류 측정은 KIPP & ZONEN X-t(BD111, Holand) 기록계가 장착된 EG&G Model 362(Princeton Applied Reach, U. S. A.)를 이용하였다.

2.2. 효소전극의 제작

0.09 g 페로센(ferrocene)을 10 mL의 CHCl_3 에 녹인 후, 흑연가루 0.91 g 과 혼합하여 건조시킨다. 이렇게 제조된 흑연가루 1.0 g 과 SBR 용액(5.0 %)과 1 : 1(wt/wt) 비율로 혼합하여 반죽을 만든다. 이 반죽 1.0 g에 파쇄된 배추뿌리 조직 0.1 g을 완전히 혼합하여 오음 접촉이 있는 내경 6 mm, 길이 1 mm의 폴리에틸렌 튜브에 충전시키고 스페큘라로 전극표면을 완전 평면으로 성형한다. 순환전압전류 그림은 10 mL 0.1 M NaCl 용액에 작업전극을 위치시키고, 정지 또는 교반 중인 상태에서 얻었다. 신호전류는 작업전극에 일정 전위를 인가한 후 충전전류의 감소 경향성이 수평 직선에 도달하였을 때, 기질용액을 첨가하고 첨가 전후 신호차를 기질의 분해전류로 간주하였다.

3. 결과 및 고찰

Fig. 1의 A는 0.1 M NaCl 전해질 용액 속에서, B는 1.0×10^{-3} M의 기질을 포함하고 있는 전해질 용액 중에서 얻은 효소전극의 선형 흘기 전압전류그림이다. A는 전극전위에 따라 대체로 직선적 증가 경향성을 보여주고 있다. 0.1 M NaCl 전해질 용액 속에서 유리 탄소전극으로 얻은 선형흘기그림은 이 영역에서 어떤 전류도 보이지 않았다.⁹ 전극이 포함하고 있는 페리시늄(ferricinium) 이온의 표준 환원전위는 +0.400 V이다. 따라서 페리시늄 이온의 환원함수 꼬리가 실험 영역의 전위에 크게 영향을 미치지 않을 것이다.

고무는 구성 성분이 복잡한 혼합물이기 때문에 A에서 볼 수 있는 전류는 반응메카니즘이 밝혀지지 않은 고무성분의 환원전류로 볼 수 있을 것이다. Fig. 1에서 전해질 용액에 기질이 첨가되면 A는 B로 변형된다. 이것은 전해질에 H_2O_2 첨가한 것 외에 다른 조건은 모두 A와 동일하므로 이 변화는 기질의 환원분해에 기인한 것으로 보아도 무방할 것이다. Fig. 2는 A와 B의 전류차를 전극전위에 대하여 도시한 것이다. 대체로 대칭성을 보이고 있다.

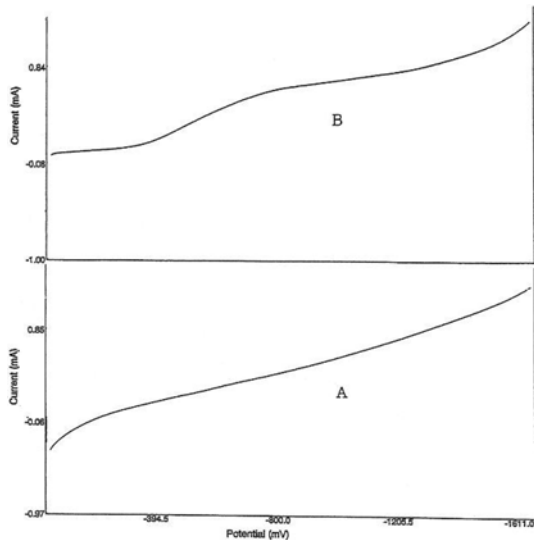


Fig. 1. Electrochemical behavior of cabbage peroxidase immobilized enzyme electrode bound by SBR. A and B were obtained without and with addition of substrate (1.0×10^{-3} M H_2O_2) in 0.10 M NaCl solution respectively. Scan rate; 100 mV/sec.

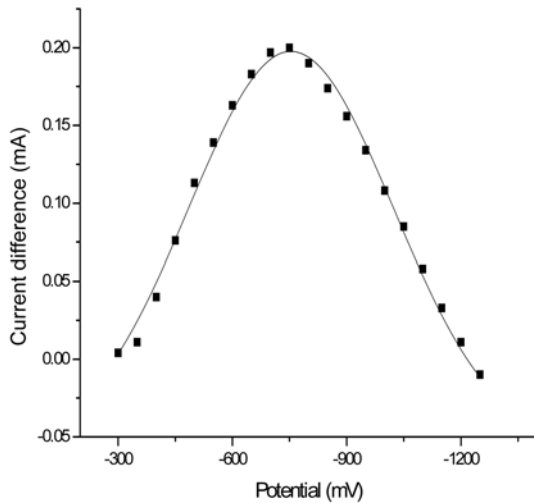


Fig. 2. Potential dependence of the current difference between A and B in Fig. 1. The fitted Gaussian function ($y = y_0 + (A/(w \cdot \sqrt{\pi/2})) \cdot \exp(-2 \cdot ((x-x_c)/w)^2)$, y_0 : -0.0582, x_c : -754, w : 537, A : 172) is solid line.

Fig. 2의 자료는 통계적 방법에 의한 분석 결과, 왜도(skewness)와 첨도(kurtosis)는 각각 -0.286과 -1.314 이었고, 정규성 검정(Shapiro Wilk test)의 p값은 0.156 으로 정규분포로 간주할 수 있다는 결과를 확인하였다. 여기에 H_2O_2 의 환원전류를 정규분포화 결과를 실

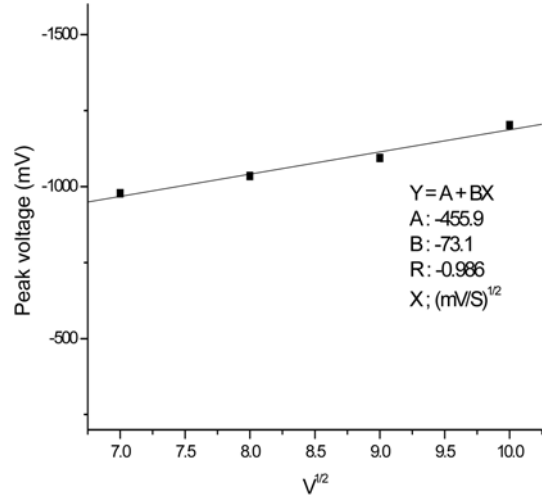


Fig. 3. Linear variation of peak voltage with scan rate.

선으로 나타내었다.

계가 완전한 가역일 경우 i_p^{rev} 는 주사속도, v 에 의존하여 증가하지만 E_p 는 무관하다. 그러나 비가역의 경우 i_p^{irrev} 와 봉우리전위(E_p)는 모두 $v^{1/2}$ 에 의존한다. 즉 환원반응에 대하여 v 가 증가함에 따라 E_p 는 음(-)의 방향으로 이동한다. Fig. 3은 주사속도 변화에 따른 E_p 의 의존도를 보여주는 것으로 계가 비가역임을 말하고 있다.

생체 조직에서 일어나는 제일철 이온과 과산화수소의 전자 교환반응은 $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$ 이며, 일전자전이 반응($n=1$)이다.¹¹ 비가역계에서 과전압, E 와 $\ln\{(i_c - i)/i\}$ 은 직선관계를 보이고, 기울기와 절편은 각각 $RT/\alpha nF$ 와 $(RT/\alpha nF) \ln i_0/i_c$ 이다. Fig. 2에서 최대 전류를 나타내는 봉우리전위(E_p)는 -0.750 V였다. 여기에서 얻어지는 0.198 mA를 i_c 로 간주하고 $\ln\{(i_c - i)/i\}$ 에 대하여 E 를 도시한 것이 Fig. 4이다. 이때 얻어지는 기울기와 절편은 각각 0.0737와 -0.488이며, 이로부터 계산된 대칭인자(α)와 교환전류밀도(i_0)는 각각 0.35와 $4.93 \times 10^{-5} \text{ Acm}^{-2}$ 이다. 비가역계의 경우의 $|E_p - E_{p/2}|$ 은 $47.7/\alpha n(\text{mV})$ 이다.

위에서 얻어진 n 및 α 를 대입하면 $|E_p - E_{p/2}|$ 은 136 mV이다. 이 값은 본 계가 비가역적 계임을 말하여 주는 것이다. 환류 상태에서 얻은 효소전극의 순환전압 전류 그림이 Fig. 5에 주어져 있다.

A는 기질을 포함하지 않은 전해질로부터, 그리고 B는 A의 한 순환이 끝나는 0.0 V 시점에서 0.1 M H_2O_2 100 μL 가 가해진 경우이다.

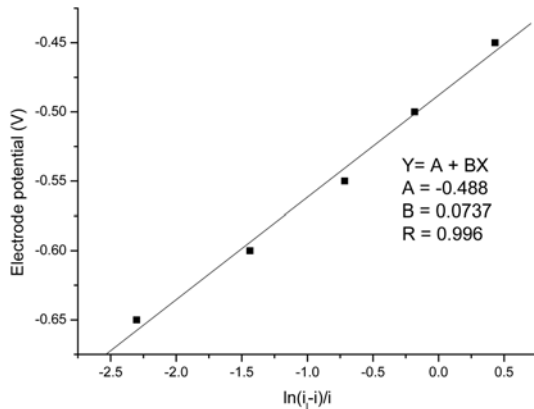


Fig. 4. Plot of overvoltage vs. $\ln\{(i-i)/i\}$. The slope is 0.0737 and the intercept is -0.488.

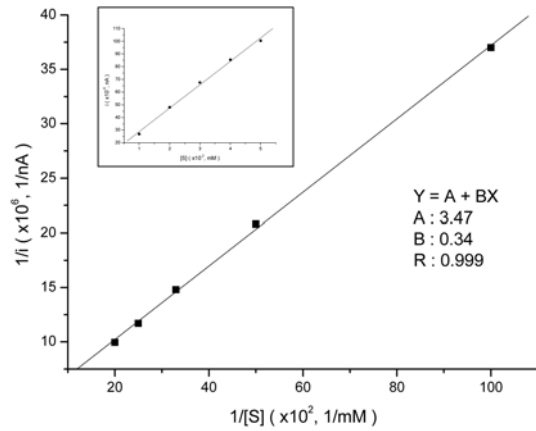


Fig. 6. Double reciprocal plot of signal and substrate concentration. Inset: Calibration.

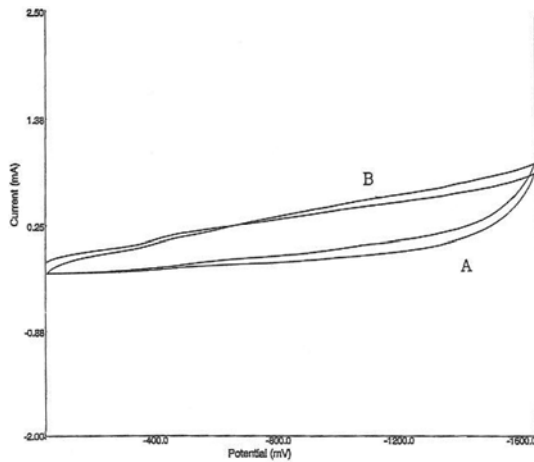


Fig. 5. Cyclic voltammograms obtained in the absence(A) and in the presence(B) of substrate(1.0×10^{-3} M H_2O_2) in the stirred 0.1 M NaCl electrolytic solution. Scan rate: 100 mV/sec.

A와 B는 전류의 크기를 제외하면 Fig. 1의 A와 크게 다르지 않다. A와 B의 차를 전극 전위에 대하여 도시했을 때 -500 mV 이상에서 직선적으로 증가하였다. 정지된 용액(Fig. 2) 중에서 극대 전류를 나타내는 것과 대조적이다. 이 전류차의 전극전위 의존도는 여러 가지 경향성, 즉 직선적 증가,⁶⁻⁸ 단조증가하는 경우를 볼 수 있는데,¹² 위 경향성의 원인을 정성적으로 설명할 이론적 근거는 아직 마련되어 있지 않다. 신호 대 기질 농도의 양역수 도식에서 직선이 얻어진다면 반응은 효소의 촉매작용에 의한 것이다. 이로부터 얻어진 도식은 $y = A + Bx$ ($A: 3.47 \times 10^6$, $1/nA$, $B: 0.34 \times 10^4$ mM/nA, $R = 0.999$)의 직선을 보여

주었다(Fig. 6).

이것은 SBR에 의하여 고정된 배추뿌리 조직의 과산화 효소가 전극 표면에서 정상적으로 촉매역할을 하고 있음을 보여주는 것으로, SBR이 과산화효소의 좋은 결합제임을 증명하는 것이다. 여기에서 사용된 전극의 검출한계는 5.0×10^{-5} M 이었다. 이 값은 줄-겔법으로 HRP를 고정시켜 만든 A. N. Daz 등의 것(6.7×10^{-4} M)¹³ 보다 우수하나, M. Y. Miao 등의 것(3.0×10^{-6} M)에 다소 미치지 못한다.¹⁴ 신호 크기에 영향을 미치는 효소, 매개체의 함량, 그리고 용액의 pH 등이 최적화된다면 검출한계는 후자보다 훨씬 향상될 것으로 보인다. 그러나 화학발광법에 의하여 J. Wang 등¹⁵ 은 6.42×10^{-8} M의 검출한계를 얻었다. 단지 검출한계만을 고려한다면 전압전류법은 분광학적 방법에 비교될 수 없다. 그러나 여기서 만들어진 전극은 실용화가 가능하고, 반영구적으로 사용할 수 있다. 따라서 검출한계 향상에 대한 연구가 병행된다면, 전압전류법이 가지는 장점은 분광법과 비교하여 검출한계의 불리한 점을 보상하고도 남을 것이다.

4. 결론

지금까지 보여준 실험적 사실들은 반영구적으로 사용할 수 있는 탄소반죽 바이오센서 개발하고자 할 때, SBR이 추천할만한 결합제임을 증명하고 있다. 제작상의 용이함과 실용화 가능성에도 불구하고 탄소반죽 방식의 센서는 검출한계 면에 있어 분광학적 방법과 비교하여 우수하지 못하다. 그러나 분광학적 방법은 복잡한 물리적, 화학적 과정을 거치기 때문에 전기화

학적 방법과 비교하여 소요되는 제작의 비용 및 시간 측면에서 대단히 효율적이지 못하다. 따라서 SBR 결합제가 가지는 장점을 이용하고, 여기에 검출한계 향상에 대한 연구가 동반된다면, SBR효소전극은 전압전류법이 공통적으로 갖고 있는 검출한계의 불리한 점을 보상할 수 있을 것이다.

참고문헌

1. I. R. W. Zwirter de Oliveira and I. C. Vieira, *Enzyme Microb. Technol.* **38**, 449-456(2006).
2. V. Carralero Sanz, M. Luz Mena, A. Gonzalez-Corts, P. Yez-Sedeo and J. M. Pingarn, *Anal. Chim. Acta*, **528**, 1-8(2005).
3. T. A. Sergeeva, N. V. Lavrik, A. E. Rachkov, Z. I. Kazantseva, S. A. Piletsky and A. V. El'skaya, *Anal. Chim. Acta*, **391**, 289-297(1999).
4. X. Chen, J. Zhang, B. Wang, G. Cheng and S. Dong, *Anal. Chim. Acta*, **434**, 255-260(2001).
5. (a) K. J. Yoon, *Anal. Sci. Tech.* **16**, 504-508(2003). (b) K. J. Yoon, *Bull. Kor. Chem. Soc.* **25**, 997-1002(2004). (c) H. S. Kwon, E. H. Jin, K. J. Yoon and B. G. Lee, *J. Kor. Chem. Soc.* **49**, 224-228(2005).
6. K. J. Yoon, *Elastomer*, **42**, 112-118(2007).
7. K. J. Yoon, *Anal. Sci. Tech.* **20**, 49-54(2007).
8. S. Y. Choi, and K. J. Yoon, *Elastomer*, **41**, 231-237(2006).
9. K. J. Yoon, *Bull. Kor. Chem. Soc.* **29**, 2264-2266(2008).
10. J. A. Brydson, 'Rubbery Materials and their Compounds', 99, Elsevier applied science publishers London and New York, 1988.
11. A. Mansouri, D. P. M. Makris and P. Kefalas, *J. Pharm. Bio. Anal.* **39**, 22-26(2005).
12. K. J. Yoon, *J. Kor. Chem. Soc.* **52**, 197-202(2008).
13. A. N. Daz, M. C. R. Peinado and M. C. T. Minguez, *Anal. Chim. Acta*, **363**, 221-227(1998).
14. Y. Miao and S. N. Tan, *Anal. Chim. Acta*, **437**, 87(2001).
15. J. Wang, H. Ye, Z. Jiang, N. Chen and J. Huang, *Anal. Chim. Acta*, **508**, 171-176(2004).