

과산화수소 정량을 위한 서양고추냉이 과산화효소 대용 아카시아의 활용

윤길종

청주대학교 응용화학과
(2017년 4월 24일 접수, 2017년 5월 12일 심사, 2017년 5월 12일 채택)

Application of Acacia as an Alternative to Horseradish Peroxidase for the Determination of Hydrogen Peroxide

Kil Joong Yoon

Department of Applied Chemistry, Cheongju University, Cheongju 28480, Korea

(Received April 24, 2017; Revised May 12, 2017; Accepted May 12, 2017)

초 록

바이오센서를 상업적으로 양산하고자 할 때 제작비의 경제성이 고려되어야 한다. 과산화수소를 정량하기 위한 효소전극 제작 시 필수적으로 사용되는, 서양고추냉이로부터 추출된 과산화효소는 대단히 고가이므로 탄소반죽법에 의한 전극제작의 제한 요인이 된다. 이 문제를 우회하고자 본 실험실에서는 생활주변에서 쉽게 얻을 수 있는 재료로 대체하기 위하여 아카시아 잎을 효소원으로 사용하여 과산화수소 센서를 제작하고 그것의 전기화학적 특성을 살펴보았다. 일정전압전류법으로 얻어진 10개 이상의 전기화학적 파라미터와 실험적 결과들은 효소전극이 정량적으로 그 기능을 발휘하고 있음을 보여주었다. 이런 사실들은 시판 과산화효소가 아카시아 잎으로 대체될 수 있음을 보여주는 것이다.

Abstract

The curtailing of production cost is important for the mass production of biosensors. Since horseradish peroxidase, which is a key material of enzyme electrodes for hydrogen peroxide analysis is rather expensive, this has been a limiting factor for fabricating carbon paste based enzyme electrodes. In this paper, the acacia leaf tissue as a zymogen easily obtainable in our living environment was used as an alternative to horseradish peroxidase for developing a hydrogen peroxide sensor and the electrochemical properties were evaluated. Ten or more electrochemical parameters alongside the other experimental results acquired by the potentiostatic method demonstrated that our enzyme electrodes can be used for the quantitative analysis of hydrogen peroxide. This also indicates that acacia leaves can take the place of the marketed peroxidase.

Keywords: acacia, hydrogen peroxide, enzyme electrode, biosensor

1. 서 론

과산화수소는 인체에서 생성되며 화학산업의 현장에서 산화제로 사용되는, 우리의 생활과 직접적 관련이 있는 물질이다. 과산화수소의 정량분석에는 고전적인 방법들이 알려져 있으나 현재는 보다 감도가 좋은 분광법으로 대치되고 있다.

Ling 등은 polyethyleneimine (PEI)-Cu 형광표지물을 합성하고 이것을 미치는 과산화수소의 소광현상을 관찰하여 5.0×10^{-7} - 1.0×10^{-5} M 범위의 직선 검정곡선과 4.0×10^{-7} M의 검출한계를 얻었고 [1], Ai-Ling 등은 과산화수소를 촉매로 사용하여 CuO를 CuO-히드록시 라디칼로 변형시킨 뒤 테레프탈산에 가하여 높은 형광성의 히드록시테레프탈산을 얻었다[2]. 이때 얻어진 검정곡선의 직선 범위와 검출

한계는 각각 5.0×10^{-6} - 2.0×10^{-4} M 및 3.4×10^{-7} M이었다. 한편 Chao 등은 비형광성 o-페닐렌디아민을 과산화수소로 산화시켜 형광성 2, 3-디아미노페니진을 합성하여 형광특성을 관찰하고 4.6×10^{-8} M의 낮은 검출한계를 얻기도 하였다[3].

화학발광(chemiluminescence)법도 과산화수소의 정량에 널리 이용되고 있다. Zhang 등은 양이온 교환법으로 Co(II)-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-Mg-Al 착물을 합성하고 이것을 석영관에 고정시켜 흐름법 센서를 개발하고 luminol과 H₂O₂의 반응으로부터 방출되는 화학발광을 관찰하여 1.4×10^{-7} M의 검출한계(S/N=3)를 얻었다[4]. Yu 등은 요오드페놀불루가 luminol과 H₂O₂ 반응의 화학발광을 증가시키는 현상을 발견하고 이것을 이용하여 1.4×10^{-8} M의 검출한계와 2.5×10^{-9} - 1.0×10^{-5} M의 직선구간을 얻었다[5]. 한편 Iranifam은 CuO 나노입자를 촉매로 사용하는 H₂O₂-HCO₃⁻ 화학발광계를 개발하여 atorvastatin, rivastigmine 및 topiramate 등의 정량분석에 활용하였다[6].

위 방법들은 검출한계의 일면을 고려할 때 대단히 우수한 방법이라 할 수 있다. 그러나 분석과정에 합성단계가 공통적으로 포함되어 있

Author: Cheongju University,
Department of Applied Chemistry, Cheongju 28480, Korea
Tel: +82-43-229-8540 e-mail: kjyoon@cju.ac.kr

ISSN: 1225-0112 eISSN: 2288-4505 @ 2017 The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry. All rights reserved.

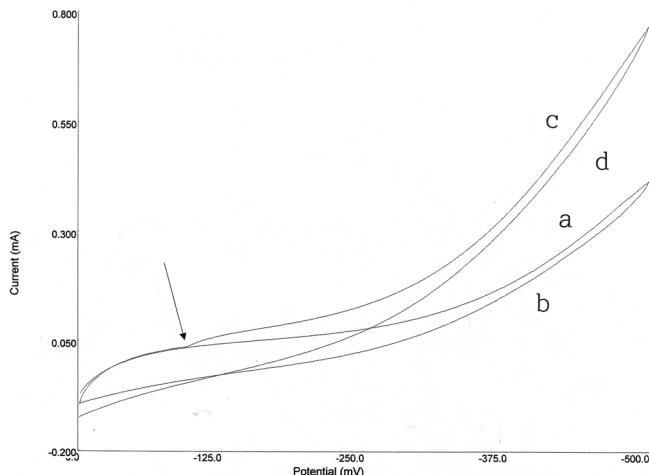


Figure 1. Four segment cyclic voltammogram showing the sensing ability of the acacia electrode for hydrogen peroxide in the absence (a-b) and in the presence (c-d) of 0.02 M hydrogen peroxide. Arrow indicates the addition of substrate.

고, 시료처리가 간단하지 않기 때문에 분석의 시간 및 경제성을 고려한다면 개선되어야 할 많은 문제점을 포함하고 있다. 따라서 범용으로 사용하기에는 비효율적이다. 이런 문제를 우회하기 위하여 전기화학적인 방법이 제시되었다.

전기화학적 방법에는 효소의 산화-환원 특성을 이용하는 효소전극을 제작하여 H_2O_2 센서로 사용하는 경우가 대부분이다. 그러나 효소의 생화학적 활성이 유지되도록 전극에 효소를 고정하는 문제는 간단하지 않다. 이를 위하여 물리적 흡착법[7,8], 스크린 프린팅법[9,10], 졸-겔법[11,12], 고분자 필름법[13,14], 탄소 반죽법[15,16] 등 다양한 기법들이 개발되었다.

기존의 연구에서는 제작과정이 간단한 탄소 반죽법을 응용하여 높은 감도의 센서를 개발하고자 다양한 노력을 시도해 왔다. 전극 구성의 핵심물질인 과산화효소는 서양고추냉이로부터 추출된 고가의 수입제품을 사용할 수밖에 없었으며, 이것은 전극제작비에 영향을 주어 효소전극의 양산에 제한요인이 된다. 이 문제의 해결을 위하여 고가의 서양고추냉이 과산화효소를 생활주변에서 쉽게 얻을 수 있는 재료로 대치하기 위하여 노력했다. 여기에 발표되는 내용은 위 노력들 중의 하나로 아카시아 잎을 효소원으로 사용하여 효소전극을 제작하고 그것의 전기화학적 특성과 응용성을 살펴보았다. 그 결과를 여기에 보고한다.

2. 실험

2.1. 시약 및 측정

아카시아 잎을 호모제이저로 완전히 파쇄하여 효소원으로 사용하였다. 전극물질로 흑연가루(Fluka, ≤ 0.1 mm)를, 그리고 흑연가루의 결합재(binder)로 chlorosulphonated polyethylene (CSM) 고무(Denki Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha Mitsui C.)를 사용하였다. 고무의 용제는 톨루엔(Sigma-Aldrich, $\geq 99.9\%$, HPLC grade)이었으며, 기질로 35% 과산화수소(Junsei Chem. Co. Ltd.)를 사용하였다. 매개체 페로센(ferrocene)은 Sigma 제품을 정제과정 없이 사용하였고, 전해질은 0.1, 0.01, 0.001 M NaCl (Shinyo pure Chem. $\geq 95.5\%$) 수용액을 실험의 최적조건에 따라 선택하여 사용하였다.

순환전압전류 그림은 BAS Model EPSILON (Bioanalytical System, Inc., U. S. A.) 일정전위를 이용하여 얻었으며, 이외의 신호는 X-t 기록기(KIPP & Zonen, BD 111)가 연결된 EG & G 362 (Princeton Applied Research)를 이용하여 얻었다. 기준전극과 대전극으로 각각 Ag/AgCl (BAS MF 2052)과 Pt (BAS MW 1032)를 사용하였다.

2.2. 센서의 제작

페로센 0.09 g을 10 mL의 클로로포름에 녹이고 여기에 0.91 g의 흑연가루를 가하여 혼합시킨 뒤 실온에서 건조시킨다. 이 가루와 1.5% CSM-톨루엔 용액을 1 : 1 (wt/wt)로 합하여 반죽을 만든 후, 이것 1.0 g에 0.20 g의 아카시아 잎 조직을 추가하여 완전히 교반한다. 깊이 1 mm와 내경 6 mm의 오음 접촉을 갖는 원형 폴리에틸렌 튜브에 위 반죽을 충진시키고, 시약주걱으로 전극표면을 완전평면으로 성형하여 센서로 사용한다. 이후 이 전극을 아카시아 전극이라고 부를 것이다. 모든 측정은 10 mL NaCl 용액의 3전극계에서 이루어졌다.

3. 결과 및 고찰

화학반응이 전자의 교환 즉 산화-환원에 의하여 이루어질 경우 전기화학적 방법은 유용한 도구이며, 계의 전반적 특성의 이해는 순환전압전류법에 의존하는 경우가 일반적이다. Figure 1은 아카시아 전극을 작업전극으로 사용하여 얻은 순환전압전류 그림이다. 환류상태에서 a, b, c, d의 순서로 얻어진 것이며, a, b는 기질이 침가되기 전, c, d는 화살표 시점의 주사전압에서 기질을 추가하고 얻은 것이다. 기질이 침가되기 전에도 계에 상당한 양의 잔류전류가 흐르는 것을 볼 수 있으며, 기질이 침가되자 전압변화에 대한 환원전류량이 현저히 달라지는 것을 볼 수 있다.

아카시아 전극은 흑연가루, 결합재 CSM 고무 및 전자 매개체 페로센을, 전해용액은 수용액으로 전해질 NaCl을 포함하고 있다. 페로센의 표준환원전위는 +400 mV (vs. SHE)이며, 본 실험실에서 확인된 부타디엔[17] 및 styrene butadiene rubber (SBR)[18] 계열의 고무를 사용한 계에서는 각각 +160 mV (vs. Ag/AgCl)와 +197 mV (vs. Ag/AgCl)에서 페리시늄의 환원이 일어나는 것으로 확인되었다. 따라서 실험전위 영역(0.0~500 mV)에서 페리시늄은 페로센으로 존재할 것이므로 전지 저항에 의한 과전위까지 고려할 경우 페리시늄의 환원이 Figure 1, a의 전류크기에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 볼 수 있다. 따라서 a의 바탕전류는 페로센의 산화-환원과 무관한 것으로 볼 수 있다.

물의 표준환원전위는 -828 mV (vs. SHE)로 실험전위 영역을 크게 벗어나지만, 이것의 환원전류 크기는 절대적이므로 Figure 1의 음전위 영역에서 급격히 증가하는 전류는 용매의 환원함수의 꼬리일 가능성성이 있다. 결합재 CSM 고무는 Reed-Horn 축합반응[19]의 생성물로 내부에 미반응 SO_2 와 Cl_2 를 포함하고 있을 것이지만 이들의 표준환원전위는 각각 +0.450 및 +1.396 V (vs. SHE)이므로 실험영역을 크게 벗어나 그 영향은 무시할 수 있다. 한편 전극을 구성하는 아카시아 잎 조직은 성분을 확인할 수 없는 혼합물로 전기화학적 활성물질을 포함할 가능성이 있다. 그러나 본 계에서 신호로 간주하는 전류는 c와 a의 차(c-a)이고, 위에 언급된 바탕전류의 근원은 a와 c에 공통적으로 기여할 것이므로 Figure 1의 바탕전류는 기질분해전류의 도출과정에서 상쇄된다.

Figure 2는 Figure 1의 전류차(c-a)를 전위의 함수로 나타낸 것이다. 확산지배형 전압-전류 도시는 S자형이 일반적이다. 그러나 여기서는 위에서 언급된 부반응의 가능성을 최소화하기 위하여 전위영역을 제한하였으므로 Figure 2는 S자형의 일부에 해당하는 것으로 볼 수 있

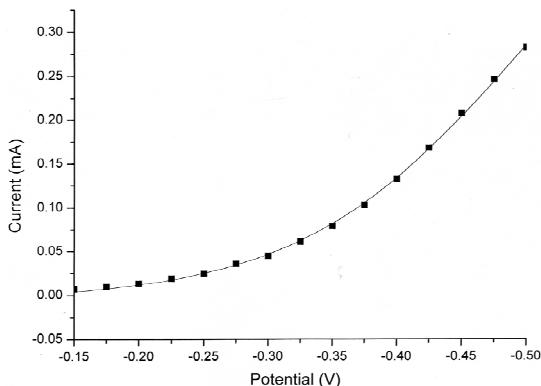


Figure 2. Dependence of current difference between (a) and (c) on the electrode potential in Figure 1.

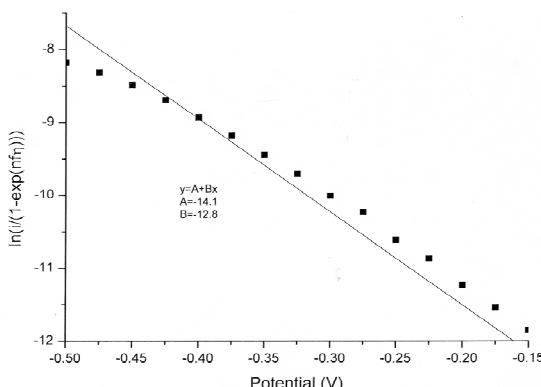


Figure 3. Linear plot $\ln(i/(1-\exp(\eta f\eta)))$ vs. η for the determination of kinetic parameters, α and i_0 .

다. Figure 2의 전압-전류 관계를 Boltzmann 방식으로 시뮬레이션한 것이 다음의 식 (1)이다.

$$i \text{ (mA)} = -0.00587 + 0.580/(1 + \exp((\eta+0.0500)/0.0866)) \quad (1)$$

여기서 신호(i)는 표면적 0.316 cm^2 인 원형전극으로부터 얻은 것이며, η 는 인가전위(V, vs Ag/AgCl)이다. (1) 식으로부터 $\eta \rightarrow \infty$ 에서 얻어지는 계의 한계전류(limiting current, i_0)는 0.575 mA 이다. 생체 속에서 일어나는 과산화수소의 환원은 일전자전이 반응($n = 1$)으로 알려져 있으므로[20], $C_o^* = 0.02 \text{ M}$, $A = 0.316 \text{ cm}^2$ 일 때 한계전류로부터 도출되는 계의 질량이동계수(mass transfer coefficient, $i_0/nFAC_o^*$), m_0 와 질량이동저항(mass transfer resistance, RT/nFi_0), R_{m0} 는 각각 $9.428 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ 와 44.9Ω 이었다.

비가역 또는 준가역계의 경우 산화나 환원의 한쪽을 무시하고 근사할 수 있으므로 $\ln(i/(1-\exp(\eta f\eta)))$ vs. η 을 도시하고 절편($\ln i_0$) 및 기울기($\alpha f\eta$)로부터 교환전류(i_0)와 대칭인자(α)를 도출할 수 있다. Figure 3은 Figure 2의 전류-전압 관계를 Butler-Volmer식에 따라 도시한 것이며, 직선의 방정식은 다음과 같다.

$$\ln(i/(1-\exp(f\eta))) = -14.1 + 12.8\eta \quad (2)$$

위 식 (2)로부터 얻은 계의 교환전류(i_0)와 대칭인자(α)는 각각 $7.52 \times 10^{-7} \text{ A}$ 와 ≈ 0.33 이다. 여기서 얻은 교환전류는 다른 식물전극에 비

Table 1. Time Dependence of the Double Layer Charging Current

-log (NaCl)	A1	t1	i0
1	2.24	0.015	1.21
2	0.023	0.012	0.57
3	0.012	0.027	0.11

$$i \text{ (mA)} = A1 * \exp(-t/t1) + i0$$

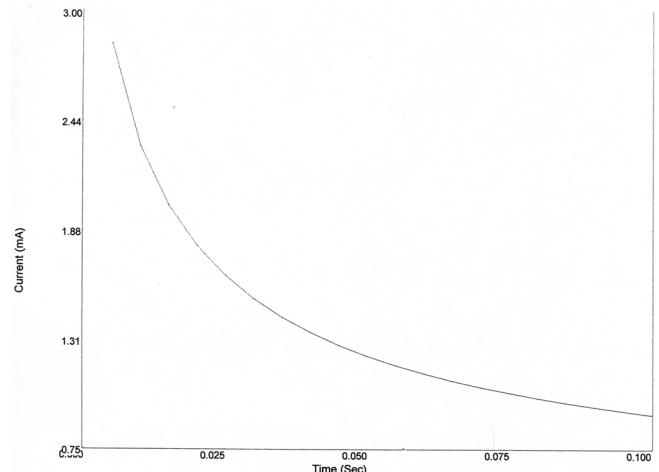


Figure 4. An exemplar condenser current transient resulted from potential step at -450 mV in 0.1 M NaCl solution.

하여 대체로 작은 값이다[21]. 교환전류가 작은 것은 전극물질의 저항에 가장 큰 원인이 있으므로 식물조직의 함량이나 매개체, 폐로젠의 함량을 최적화하면 향상시킬 수 있을 것이다. 대칭인자는 일반적으로 0.5에 가까운 것으로 알려져 있다. 그러나 본 계에서 얻어진 값은 다소 작은 편이지만 다른 식물전극으로 얻은 것들과 비교하면 대체로 유사하다[21,22]. 대칭인자가 작은 것은 전극전위 변화에 대한 산화-환원 활성화 에너지 장벽의 높이가 효율적으로 변화될 수 있음을 말하여 주는 것으로 전극의 실용화 조건에 부합하는 것이라 할 수 있다.

전극의 콘텐서전류 특성은 용액저항, 시간상수, 축전용량 등 많은 전기화학적 정보를 제공한다. 이중층은 임피던스와 콘텐서의 RC 병렬, 그리고 이것이 용액저항과 직렬로 연결된 전자회로로 취급할 수 있으며, 용액저항을 R_s , t 를 전위인가 시간이라고 할 때 전극전위(E)와 전류(i)는 $i = (E/R_s)\exp(-tR_sC_d)$ 의 관계를 갖는다. 여기서 C_d 는 이중층의 축전용량이다.

Figure 4는 아카시아 전극의 이중층 특성을 살펴보기 위하여 0.1 M NaCl 전해질용액 중에서 전위계단 방식으로 -450 mV 에서 얻은 이중층 충전전류-시간 그림이다. 전류-시간 관계식으로부터 전기화학적 파라미터를 얻고자 한다면 우선 초기전류(i_0) 값이 알려져야 하는데, Figure 4는 측정기간이 0.005 s 단위로 디지털화되어 있으므로 실험적으로 초기전류를 측정하는 것은 불가능하다. 따라서 곡선의 경향성을 시뮬레이션하고 이것을 $t = 0 \text{ (s)}$ 로 외삽하여 얻어야 한다.

전해질 농도 0.01 M 및 0.001 M 용액으로부터 얻은 전류-시간 관계식이 0.1 M 용액의 것과 함께 Table 1에 주어져 있다. Gouy-Chapman은 이중층을 내부조밀층(inner compact double layer, C_i)과 외부화산층(outer diffuse double layer, C_d)으로 구분하여 C 는 C_d 와 C_i 의 등가직류회로로 취급하였다. Table 2는 위 방법으로 얻은 초기전류

Table 2. Electrochemical Properties of the System

$-\log [NaCl]$	$i_{t=0}$, mA	R_s , Ω	τ , s	C, F	C_d , F	C_i , F
1	3.45	1.30×122	0.046	3.54×10^{-4}	0.23	$\approx 3.54 \times 10^{-4}$
2	0.59	7.63×102	4.85	6.36×10^{-3}	0.073	$\approx 6.36 \times 10^{-3}$
3	0.12	3.75×103	$10 \ll$	-	0.023	-

$i_{t=0}$: condenser current at $t = 0$ s; R_s : solution resistance; τ : time constant (obs); C : effective double layer capacitance; C_d : capacitance of the diffuse double layer; C_i : capacitance of the compact double layer.

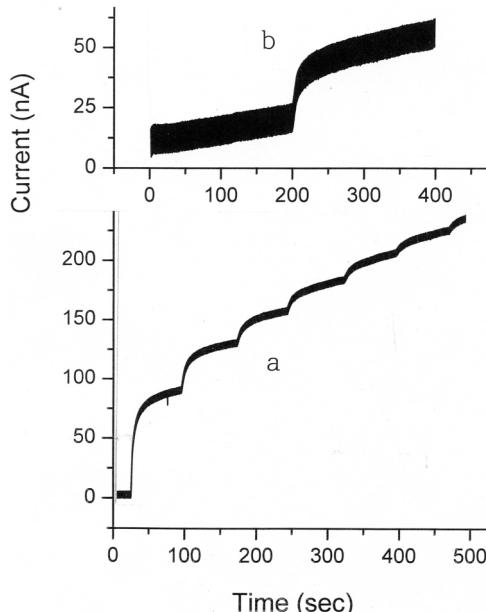


Figure 5. Typical current-time response for successive additions of 50 μ L of 0.1 M H_2O_2 (a) and for a addition of 40 μ L of 0.01 M H_2O_2 (b) at -450 mV.

(i_0)와 실측 시간상수(τ) 및 이로부터 도출된 용액저항(R_s) 및 축전용량 등의 값을 보여주고 있다. 용액의 전해질 농도가 감소함에 따라 초기전류가 감소하고 용액저항이 증가하는 것은 전해질의 농도감소에 기인한 것으로, 시간상수가 증가하는 것은 전해질 농도가 감소함에 따라 이중층의 형성이 지연된 것으로 볼 수 있다. 측정 축전용량(C_d)의 감소 또한 유전률을 증가에 기인한 것으로 볼 수 있다. 그러나 이 값들이 수용액 중에서 Gouy-Chapman 이론에 근거한 $10\sim30 \mu F cm^{-2}$ 보다 현격히 큰 것은 탄소가루를 둘러싼 결합재 고무에 의한 유전상수 증가에 기인한 것으로 볼 수 있다.

환류 중인 용액에서는 확산층의 성장이 억제되고 질량이동속도가 크게 증가하므로 전류의 포화에 이르는 시간이 단축된다. Figure 5-a는 -450 mV (vs. Ag/AgCl)의 전극전위에서 0.1 M NaCl 용액 10 mL에 0.1 M H_2O_2 용액 50 μ L를 연속 7회 가했을 때 전류신호가 순차적으로 변화하는 것을 보여주고 있다.

효소 속도론에서 가장 기본적인 파라미터는 효소의 활성 범위를 나타내는 최대속도, V와 분자활성의 척도인 Michaelis 상수이다. 이 두 파라미터를 구하는 방법 중 Eadie 도시나 Lineweaver-Burk 도시는 높은 농도영역에서 작은 오차를 가지나 작은 농도에서 상대적으로 큰 오차를 갖는다. 한편 Hanes-Woolf 도시는 기질농도/신헤크기 대 기질농도($[H_2O_2]/i$ vs. $[H_2O_2]$)의 도시로 오차의 정도는 전자보다 다소 크지만 전체 기질농도 범위에서 일정한 장점을 갖는다.

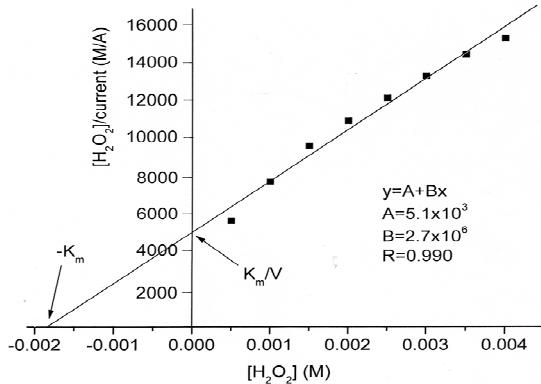


Figure 6. Linear Hanes-Woolf plot elicited from Figure 5-a.

Figure 6은 Figure 5-a의 기질첨가 각 단계별로 농도를 합산하고 신호크기도 합하여 얻은 Hanes-Woolf 도시이다. 이 도시가 직선일 때 계의 반응은 효소의 촉매작용에 의한 것이다. Figure 6의 $R = 0.990$ 의 좋은 직선성을 보여주는 것은 과산화수소의 분해가 아카시아가 포함하고 있는 과산화분해효소의 촉매작용에 의한 것임을 입증하는 것이다. 그림의 절편과 기울기로부터 얻은 Michaelis 상수와 최대속도는 각각 $1.9 \times 10^{-3} M$ 과 $3.7 \times 10^{-7} A$ 이었다. Figure 5-b는 계의 검출한계를 확인하기 위하여 Figure 5-a와 동일한 실험 조건에서 0.01 M H_2O_2 용액 40 μ L를 0.1 M NaCl 용액 10 mL에 추가했을 때 얻어진 전류-시간 그림이다. 여기서 얻어지는 검출한계는 $4.0 \times 10^{-5} M$ 이다. 이 값은 분광학적 방법에 의한 것과 비교할 때 우수한 것이라고 할 수 없으나 전극 제조 시 아카시아 조직 및 매개체의 함량, 측정전위, 온도, 용액의 pH 등을 최적화하면 보다 향상될 수 있을 것이다. 계에 근본적으로 존재하는 이중층 충전전류 때문에 전기화학적 정량이 분광학적 정확성을 뛰어넘을 수 없지만 그럼에도 불구하고 전기화학적 방법이 선호되는 것은 분석과정에서 비롯되는 경제적, 시간적인 요소들의 제약 조건을 혁신적으로 향상시킬 수 있는 탁월한 이점 때문이다.

계의 가역성은 CV의 모양을 고려하거나 $|E_p - E_{p2}| = 0.0565/n(V)$, $i \propto v^{1/2}$ 등의 관계를 살펴 판단하는 방법이 있으며, 전기화학적으로 가역인 생성물이 단시간 내에 바탕용액으로 확산하지 않고 전극표면에 머물러있다고 가정하고 역반응의 과전위를 인가하여 생성물의 전기화학적 거동을 살펴보는 이중계단 시간-전류법(double step chronoamperometry)도 그중의 하나이다.

Figure 7은 0.01 M 기질 용액 중에서 아카시아 전극에 제1계단 전위 -450 mV를 인가한 뒤 1.0 s 후 제2계단 전위 0.0 mV로 환원하여 얻은 이중계단 시간-전류 그림이다. Figure 1의 0.0 mV 부근에서 전류가 급감하기 시작하는 것을 보면 역전전위 0.0 mV는 H_2O_2 의 분해 생성물의 역반응이 일어날 수 있는 전위이다.

역반응에 부반응이 없을 경우 정반응 전류(i_f)와 역반응 전류(i_r)는

Table 3. i_f , i_r and $-i_r/i_f$ for Ten Values of t_r ($t_r = 1 + t_f$)

time, s	i_f , mA	i_r , mA	$-i_r/i_f$
0.001	0.157	-0.030	0.19
0.002	0.153	-0.026	0.17
0.003	0.151	-0.023	0.15
0.004	0.150	-0.022	0.15
0.005	0.149	-0.020	0.13
0.006	0.149	-0.020	0.13
0.007	0.148	-0.020	0.13
0.008	0.148	-0.019	0.13
0.009	0.147	-0.017	0.12
0.010	0.146	-0.017	0.12

$-i_r/i_f = 1 - (1 - \tau/t_f)^{1/2}$ 의 관계를 가지며, 그렇지 않을 경우 $-i_r/i_f$ 는 위 식으로부터 벗어난다. Table 3에 실험적으로 결정된 $-i_r/i_f$ 값이 주어졌고, Figure 8은 실험값 $-i_r/i_f$ 와 이론값 $1 - (1 - \tau/t_f)^{1/2}$ 를 함께 도시하고 있다. $\tau = 0.001$ s에서 측정된 $-i_r/i_f$ 는 0.19로 이상적인 값 0.97과 비교하여 현격히 작은 것을 확인할 수 있다. 계에 역반응 충전전류가 존재하고, 생성물이 용액을 구성하는 H_2O 인 점을 고려하면 $-i_r/i_f$ 는 무시할 수 있는 값일 것이다. 따라서 Figure 1의 모양과 위 실험적 사실을 종합할 때 기질의 분해반응은 완전 비가역이라고 말할 수 있다.

4. 결 론

아카시아가 포함하고 있는 과산화효소를 사용하여 H_2O_2 감응센서를 제작하고 그것을 기질 분해계에 적용하여 전기화학적 거동을 살펴보았다. 얻어진 12개의 파라미터와 실험적 사실들은 전극에 고정된 아카시아 과산화효소가 기질 H_2O_2 에 정량적으로 감응하는 것을 보여주고 있다. 이 사실은 아카시아 전극이 과산화수소의 센서로 활용될 수 있음을 보여 주는 것이며, 높은 가격의 서양 고추냉이로부터 추출된 과산화수소 분해효소를 우리의 환경주변에서 쉽게 구할 수 있는 아카시아로 대치될 수 있음을 밝혀준다. 따라서 이 실험 결과는 저가 H_2O_2 센서의 양산 가능성을 염 것이다. 한편 효소는 변성이 쉬운 생화학 물질이기 때문에 아카시아 전극을 실용화하고자 한다면 전극의 보관에 대한 연구가 추가적으로 병행되어야 할 것이다.

감 사

이 논문은 2017-2018 학년도에 청주대학교 산업과학연구소가 지원한 학술연구조성비(특별연구과제)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Y. Ling, N. Zhang, F. Qu, T. Wen, Z. F. Gao, N. B. Li, and H. Q. Luo, Fluorescent detection of hydrogen peroxide and glucose with polyethyleneimine-templated Cu nanoclusters, *Spectrochim. Acta A*, **118**, 315-320 (2014).
- A. L. Hu, Y. H. Liu, H. H. Deng, G. L. Hong, A. L. Liu, X. H. Lin, H. H. Xia, and W. Chen, Fluorescent hydrogen peroxide sensor based on cupric oxide nanoparticles and its application for glu-

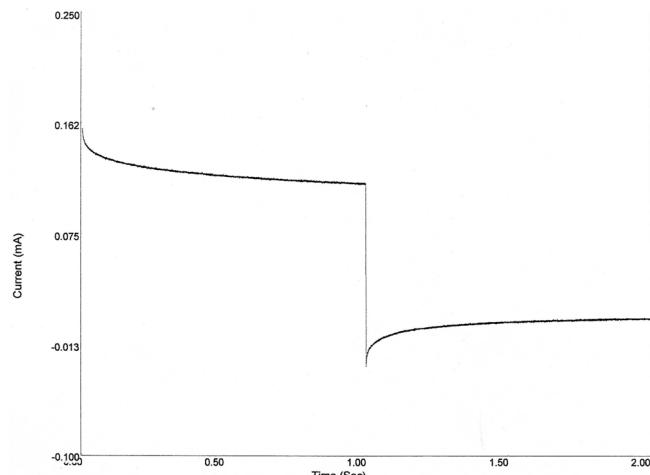


Figure 7. Amperometric response of the acacia electrode by the double step technique. Start potential : 0 (mV); first step E : -450 (mV); second step E : 0 (mV). $[H_2O_2]$: 0.01 M; $[NaCl]$: 1.0×10^{-3} M.

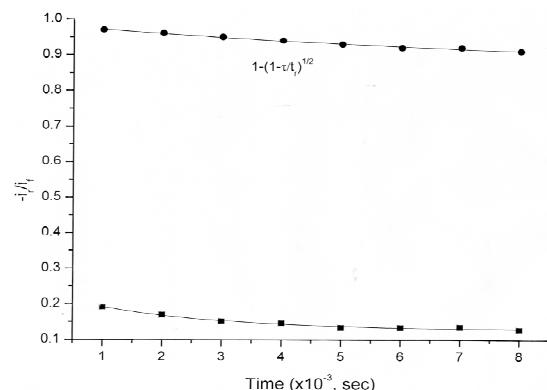


Figure 8. Plot of $-i_r/i_f$ vs. t_r ($t_r = \tau + t_f$, $\tau = 1$ s).

cose and L-lactate detection, *Biosens. Bioelectron.*, **61**, 374-378 (2014).

- C. Zhao, Z. W. Jiang, R. Z. Mu, and Y. F. Li, A novel sensor for dopamine on the turn-on fluorescence of Fe-MIL-88 metal-organic frameworks-hydrogen peroxide-o-phenylenediamine system, *Talanta*, **159**, 365-370 (2016).
- L. J. Zhang, W. C. Chen, Z. M. Zhang, and C. Lu, Highly selective sensing of hydrogen peroxide based on cobalt-ethylenediaminetetraacetate complex intercalated layered double hydroxide-enhanced luminol chemiluminescence, *Sens. Actuators B*, **193**, 752-758 (2014).
- D. L. Yu, P. Wang, Y. J. Zhao, and A. P. Fan, Iodophenol blue-enhanced luminol chemiluminescence and its application to hydrogen peroxide and glucose detection, *Talanta*, **146**, 655-661 (2016).
- M. Iranifam and N. R. Hendekhale, CuO nanoparticles-catalyzed hydrogen peroxide-sodium hydrogen carbonate chemiluminescence system used for quenchmetric determination of atorvastatin, rivastigmine and topiramate, *Sens. Actuators B*, **243**, 532-541 (2017).
- M. L. C. Passos, D. S. M. Ribeiro, J. L. M. Santos, M. Lúcia, and M. F. S. Saraiva, Physical and chemical immobilization of choline oxidase onto different porous solid supports: Adsorption studies, *Enzyme Microb. Technol.*, **90**, 76-82 (2016).

8. D. D. Zhang, X. Y. Ouyang, L. Z. Li, B. L. Dai, and Y. M. Zhang, Real-time amperometric monitoring of cellular hydrogen peroxide based on electrodeposited reduced graphene oxide incorporating adsorption of electroactive methylene blue hybrid composites, *J. Electroanal. Chem.*, **780**, 60-67 (2016).
9. X. Yang, Y. J. Ouyang, F. Wu, H. F. Zhang, and Z. Y. Wu, In situ & controlled preparation of platinum nanoparticles dopping into graphene sheets@cerium oxide nanocomposites sensitized screen printed electrode for nonenzymatic electrochemical sensing of hydrogen peroxide, *J. Electroanal. Chem.*, **777**, 85-91 (2016).
10. O. A. Loaiza, P. J. Lamas-Ardisana, L. Añorga, E. Jubete, V. Ruiz, M. Borghei, G. Cabañero, and H. J. Grande, Graphitized carbon nanofiber-Pt nanoparticle hybrids as sensitive tool for preparation of screen printing biosensors. Detection of lactate in wines and ciders, *Bioelectrochemistry*, **101**, 58-65 (2015).
11. J. L. Bai, X. Y. Zhang, Y. Peng, X. D. Hong, Y. Y. Liu, S. Y. Jiang, B. A. Ning, and Z. X. Gao, Ultrasensitive sensing of diethylstilbestrol based on AuNPs/MWCNTs-CS composites coupling with sol-gel molecularly imprinted polymer as a recognition element of an electrochemical sensor, *Sens. Actuators B*, **238**, 420-426 (2017).
12. K. Thenmozhi and S. S. Narayanan, Horseradish peroxidase and toluidine blue covalently immobilized leak-free sol-gel composite biosensor for hydrogen peroxide *Mater. Sci. Eng. C*, **70**, 223-230 (2017).
13. C. X. Chen, X. Z. Hong, T. Ti. Xu, A. K. Chen, L. Lu, and Y. H. Gao, Hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase onto a poly(aniline-co-N-methionine) film, *Synth. Met.*, **212**, 123-130 (2016).
14. T. Y. Tekbaşoğlu, T. Soganici, M. Ak, A. Koca, and M. K. Şener, Enhancing biosensor properties of conducting polymers via copolymerization: Synthesis of EDOT-substituted bis(2-pyridylimino) isoindolato-palladium complex and electrochemical sensing of glucose by its copolymerized film, *Biosens. Bioelectron.*, **87**, 81-88 (2017).
15. A. Y. Kahn, S. B. Nonura, and R. Bandyopadhyaya, Superior performance of a carbon-paste electrode based glucose biosensor containing glucose oxidase enzyme in mesoporous silica powder, *Adv. Powder Technol.*, **27**, 85-92 (2016).
16. J. Anožić, V. Guzsvány, O. Vajdle, and D. Madarász, Hydrodynamic chronoamperometric determination of hydrogen peroxide using carbon paste electrodes coated by multiwalled carbon nanotubes decorated with MnO₂ or Pt particles, *Sens. Actuators B*, **233**, 83-92 (2016).
17. K. J. Yoon, Electrochemical determination of hydrogen peroxide using carbon paste biosensor bound with butadiene rubber, *Anal. Sci. Technol.*, **23**, 505-510 (2010).
18. H. S. Dho and K. J. Yoon, Electrochemical kinetic study of amperometric hydrogen peroxide biosensor fabricated using SBR, *Ind. Eng. Chem.*, **17**, 254-258 (2011).
19. J. A. Brydson, *Rubber Materials and Their Compounds*, 289-295, Elsevier Applied Science, London, UK (1988).
20. A. Mansouri, D. P. Makris, and P. Keflas, Determination of hydrogen peroxide scavenging activity of cinnamic and benzoic acids employing a highly sensitive peroxyoxalate chemiluminescence-based assay, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **39**, 22-26 (2005).
21. K. J. Yoon, Hydrogen peroxide sensitive biosensors based on mugwort-peroxidase entrapped in carbon pastes, *Appl. Chem. Eng.*, **26**, 624-629 (2015).
22. K. B. Rhyu, Electrochemical kinetic assessment of rose tissue immobilized biosensor for the determination of hydrogen peroxidase, *Appl. Chem. Eng.*, **25**, 107-112 (2014).