

SPCE에 HRP 효소가 고정화된 바이오센서의 전기화학적 특성에 관한 연구

한경호¹ · 이대현³ · 윤도영^{1*} · 최상일^{2*}

¹광운대학교 공과대학 화학공학과

²광운대학교 공과대학 환경공학과

³GM Technical center Korea

(2020년 7월 10일 접수 : 2020년 7월 16일 수정 : 2020년 7월 21일 채택)

A Study on the Electrochemical Characteristics of Biosensor with HRP Enzyme Immobilized on SPCE

Kyoung Ho Han¹, Dae Hyun Lee³, Do Young Yoon^{1*}, and Sangil Choi^{2*}

¹Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, Seoul 01897, Korea

²Department of Environmental Engineering, Kwangwoon University, Seoul 01897, Korea

³GM Technical center Korea, Incheon 01897, Korea

(Received July 10, 2020 : Revised July 16, 2020 : Accepted July 21, 2020)

요 약

과산화수소를 이용한 펜톤(Fenton)산화법은 수처리 및 토양 복원분야에서 활용되는 친환경 산화 방법이다. 이 방법으로 오염물질을 제거할 때, 오염물의 농도에 따라 과산화수소의 농도를 적절하게 조절하는 것이 상당히 중요하다. 이에 본 연구에서는 HRP (horseradish peroxidase) 효소를 이용한 전기화학적 바이오센서를 제조하고 효소의 활성과 과산화수소의 검출 특성에 대한 연구를 수행하였다. SPCE (Screen Printed Carbon Electrode)의 작업 전극 표면에 키토산과 AuNP를 이용하여 HRP를 전착하였다. 이 후, 전위주사법(CV)과 전기화학적 임피던스 분광법(EIS)을 이용하여 효소의 고정화를 확인하였다. 또한 시간대전류법(CA)과 UV 분광법으로부터 HRP 효소의 활성을 확인하였다. 본 연구에서 제조한 바이오센서를 PBS 전해질에 담그고 과산화수소를 적정하여 CA 분석으로부터 전극에서 발생하는 전류를 측정하였다. 발생 전류는 과산화수소의 농도에 대하여 선형적으로 증가하였으며, 전류로부터 과산화수소의 농도를 예측할 수 있는 검정곡선을 도출하였다.

Abstract : Fenton oxidation method using hydrogen peroxide is an eco-friendly oxidation method used in water treatment and soil restoration. When removing pollutants by this method, it is quite important to properly regulate the concentration of hydrogen peroxide according to the concentration of the contaminants. In this study, electrochemical biosensors using HRP (horseradish peroxidase) enzymes were manufactured and studies were conducted on the activity of enzymes and the detection characteristics of hydrogen peroxide. HRP were electro deposited with chitosan and AuNP on the working electrode surface of the SPCE (Screen Printed Carbon Electrode). Then, the fixation of enzymes was confirmed using the cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The activity of HRP enzymes was

*E-mail: yoondy@kw.ac.kr, sichoi@kw.ac.kr

also identified from chronoamperometry (CA) and UV spectroscopy. After immersing the biosensor in PBS solution the current generated from electrodes by titrating hydrogen peroxide was measured from CA analysis. The generated current increased linearly for the concentration of hydrogen peroxide, and a calibration curve was derived that could predict the concentration of hydrogen peroxide from the current.

Keywords: Biosensor, Hydrogen peroxide, Electrochemistry, Horseradish peroxidase

1. 서 론

급격한 산업화와 무분별한 연료의 사용은 전 세계적으로 환경오염 및 파괴를 야기하였고, 이를 방지하기 위해 깨끗하고 친환경적인 화학적 처리 공정의 필요성이 대두되었다. 이러한 분야의 발전은 친환경 산화 화학(green oxidation chemistry) 분야와 연관된다. 과산화물과 같은 산화물은 실온에서 철과 같은 비교적 독성이 없는 촉매에 의해 작용하여 깨끗하고 안전하게 폐수처리나 오염토양 처리에 사용된다^{1,2)}. 특히, 환경 복원 분야에서는 정수처리(water treatment)공정과 토양 내 굴착처리(ex-situ) 과정에서 과산화수소를 이용한 펜톤(fenton)산화법을 활용하는데, 이 때 오염원 제거의 높은 효율을 위해서는 과산화수소의 농도를 적절하게 유지하는 것이 매우 중요하다³⁾.

과산화수소를 검출하거나 농도를 측정하는 다양한 방법 중에서, 바이오센서는 DNA (deoxyribonucleic acid), 효소 항체 등의 바이오 물질을 생체수용기(bio receptor)로 하여 특유의 기질성을 이용하여 목표 분석물질(target analyte)을 분석하는 기술로서 높은 한계 검출 농도(limit of detection, LOD)를 가지고 있어 많은 연구가 진행되고 있다. 특히, 과산화수소는 환경, 제약 및 식품 분야 분석에서 필수적인 매개체 역할을 하기 때문에 검출에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다⁴⁾. 과산화수소 검출 방법 중 HRP (horseradish peroxidase) 바이오센서는 효소 활성 부위의 heme기를 포함하고 있어 과산화수소와 산화 환원 반응이 원활하게 일어나기 때문에 바이오센서에서 일반적으로 사용되는 효소이다. 또한 HRP는 glucose oxidase와 함께 혈당 측정에서 같이 쓰이는 등 많은 연구가 진행되고 있다^{4,5)}.

바이오센서로서 분석 기기 종류 중 분광학적, 전기화학적 분석으로 나뉘게 되는데 분광학적 분석 방법은 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)나 LSPR (localized surface plasmon resonance)와 같이 생체 수용기로부터 나온 신호 수집을 광원을 통해서 얻는 역할을 한다. 분광학적 분석 방법은 검출 한계 농도가 수 nM에서 수 aM 정도로 매우 뛰어나기 때문에 ELISA의 경우에는 의료기기에

많이 적용되고 있다⁶⁾. 하지만 이러한 분광학적 분석 방법은 분석 시간이 길며 고비용 그리고 소형화를 하기 어렵다는 단점을 가지고 있다. 이러한 문제는 전기화학적 방법을 통하여 해결이 가능하다. 전기화학적 한계 검출 농도는 분광학적 방법에 비해 낮지만 장치가 단순하고 저렴하여 경제성이 높은 장점이 있다⁷⁾. 특히 SPCE (screen printed carbon electrode)를 사용하는 경우 탄소 잉크로 전극 패턴을 플라스틱에 찍어내는 방식으로 대량 공정이 가능하여 경제성이 매우 높기 때문에 전기화학적 분석의 장점을 극대화시킬 수 있다⁸⁻⁹⁾. SPCE 전극은 1990년대 screen-printed 기술이 발달하면서 전극을 일정한 패턴에 맞게 제작할 수 있게 되었다. 플라스틱 또는 세라믹 판 위에 전극 잉크를 프린터로 출력하여 만들기 때문에 GCE (Glassy Carbon Electrode) 같은 다른 전극에 비해 단가가 매우 저렴하고 재현성이 뛰어나며 일회용 전극으로 사용할 수 있어 상용성이 크다⁹⁾. 하지만 이러한 전기화학 바이오센서는 효소의 고정화가 바이오센서의 능력을 결정하는데 있어 매우 큰 영향을 미친다. 특히 효소와 전극 간 공유결합으로 고정화된 경우 효소 활성도 손실에 영향을 준다^{4,10)}. 전극과 HRP의 고정화는 많은 연구가 진행되었다. 대표적인 방법으로 물리적인 흡착, 가교제를 이용한 고정화, sol-gel entrapment가 있다. 이 외에도 여러 가지 방법으로 고정화 연구가 진행되었는데 Llaudet 등의 연구에서는 HRP를 polypyrrole 필름에 entrapment 시켜 고정화시켰고, Park 등의 연구에서는 HRP를 펩타이드 나노튜브에 넣어 전극 위에 흡착시켰다^{5,10-11)}. 또한 Ledru 등의 연구에서는 효소를 탄소 잉크에 섞어서 전극 재료와 효소가 함께 패턴을 형성하는 방법을 사용하였다¹²⁾. 이러한 여러 방법들 중 Tangkuaram 등의 연구에 따르면 효소를 키토산을 이용하여 고정화를 시켰는데 효소가 섞여있는 키토산 용액을 전극에 전착시킬 경우 전극 위에 hydrogel을 형성하면서 효소를 고정화 할 수 있다고 보고되었다. 또한 키토산 hydrogel 안에 있으면서 효소 본래의 성질은 유지 할 수 있기 때문에 기존의 sol-gel entrapment 단점인 효소 활성도의 안정성 문제를 해결 할 수 있어 SPCE에 적용하는데 적절한 방법이다¹³⁻¹⁴⁾.

본 연구에서는 3 전극계에서 SPCE를 이용하여 효소 바이오센서의 전극 개질 및 전기화학적 성능평가를 수행하였다. 전기화학적 방법을 이용한 효소 개질화 및 활성 평가로 효소로는 HRP를 사용하였으며 전극 개질 방법은 키토산을 이용한 전착을 실시하였다. 전위주사법(cyclic voltammetry, CV)과 전기화학적 임피던스 분광법(electrochemical impedance spectroscopy, EIS)을 이용하여 개질 특성을 확인하였고, 시간대전류법(chronoamperometry, CA)과 UV분광법 (ultraviolet-visible spectroscopy)을 이용하여 효소 활성도를 측정하였다.

2. 실험

2.1 시 약

본 연구에서는 생체수용기로 HRP (type I, *Amorecia Rusticana*, Sigma-Aldrich) 효소를 사용하였으며, 분석 물질로 hydrogen peroxide (30 wt% in H₂O, Sigma-aldrich)를 사용하였다. 효소를 전극에 고정하기 위해 sodium hydroxide, hydrogen chloride, chitosan (shrimp shells, medium molecular, Sigma-aldrich)을 사용하였으며, AuNPc 제조를 위해 hydrogen tetrachloroaurate (III) hydrate (Kojima)와 함께 tri-sodium citrate (Sigma-aldrich)를 이용하였다. Phosphate buffer solution 제조로 sodium chloride, sodium phosphate dibasic anhydrous, sodium phosphate monobasic monohydrate, potassium phosphate anhydrous를 Sigma-aldrich 제품을 이용하였고 효소 활성도를 측정하기 위해 기질로 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, Sigma-aldrich) diammonium salt (이하 ABTS)를 사용하였다. 전해질인 potassium ferricyanide는 Sigma-aldrich 에서 구입하였으며 potassium chloride (Junsei)를 사용하였다. SPCE는 PineResearch Instrument 제품으로 working electrode의 지름이 2 mm이며 reference electrode는 Ag/AgCl인 전극을 사용하였다.

2.2 키토산 용액의 제조

키토산 0.1 g을 100 mL의 증류수에 녹였다. 완전히 녹게 하기 위해, 교반과 함께 진한 염산을 적정하여 pH를 3.0으로 맞췄다. 키토산이 완전히 녹인 다음 1.0 M NaOH로 적정하여 pH를 6.4로 맞췄다. 완성된 키토산 용액은 4°C 냉장고에서 보관하였다.

2.3 콜로이드 금 나노입자(AuNPc) 제조

AuNPc는 Neiman 등의 연구에 따라 실시하였다¹⁵⁾.

3 mM hydrogen tetrachloroaurate 용액 10 mL을 125°C까지 가열한 다음 0.01% tri-sodium citrate 용액 340 μ L을 넣으면 청록색에서 붉은색으로 색이 변한다. 이 후 열을 30분 추가적으로 가열한 다음 상온에서 냉각하였다.

2.4 AuNP/SPCE 전극 제조

SPE 전극을 3 mM hydrogen tetrachloroaurate 용액에 담근 다음 CA를 실시하여 전착을 실시하였다. 전위는 -0.4 V로 설정하였으며 300초 동안 전착을 실시하였다. 전착 후에는 증류수로 세척하고 질소를 불어 건조하였다.

2.5 HRP/Chit/AuNP/SPCE 전극 제조

300 μ L의 AuNPc 용액과 3 mg의 HRP 그리고 chitosan 용액 20 mL을 혼합한 다음 앞서 만든 AuNP/SPCE 전극을 혼합한 용액에 담귀 CA를 실시하였다. 전위는 -2 V로 설정하여 60초 동안 전착을 실시하였다. 전착 후에는 증류수로 세척하여 남아있는 효소나 키토산을 제거하였다. 완성된 전극은 4°C 냉장고에서 보관하였다.

2.6 전극의 전기화학적 평가 및 효소 활성 평가

본 연구의 전반적인 실험 장치의 구성은 Fig. 1과 같으며, 전극 표면에 전착이 원활하게 되었는지 확인하기 위하여 CV와 EIS 분석을 실시하였다. 전기화학 장비는 EG&G 263A potentiostat를 사용하였으며 EIS 측정 시 주파수 응답을 알아보기 위하여 FRD100을 전기화학 장비에 연결하여 실시하였다. 전극 표면의 효소가 활성을 보이는지 알기 위해 CA를 실시하였으며 UV 분광법을 이용하여 효소의 활성도 측정을 하였다. 효소 활성도 측정은 Hiner 등의 연구에 따라 진행하였고¹⁶⁾, 0.1 M phosphate buffer saline (pH 7.0) 용액 10 mL에 0.5 mM 과산화수소 용액 6 mL, ABTS 3 mg을 넣어 섞은 다음 고정화된 전극을 넣어 시간에 따른 기질 용액의 흡광도를 측정하였다. 파장은 414 nm로 설정하였으며 UV 장비는 Agilent사의 8453 모델을 사용하였다.

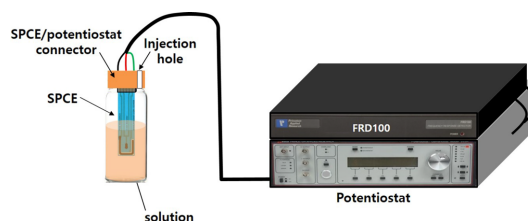


Fig. 1. Experimental scheme of CA, CV, EIS in batch system.

3. 결과 및 검토

3.1 전위주사법을 이용한 HRP 고정화 특성평가

제조된 전극 표면에 효소의 흡착 여부를 확인하기 위해 CV 분석을 실시하였다. 전기화학에서 전극과 전해질 사이에서 일어나는 전자 전달은 전극 표면에서 일어나기 때문에 전극 표면의 물질에 따라 전자 전달 속도가 다르다. CV의 경우, 위와 같은 현상을 peak separation을 이용하여 알아볼 수 있다. Formal potential을 중심으로 환원 피크 전위와 산화 환원 피크의 전압 간격인, peak separation이 작을 경우 전자 전달 속도는 빠르며 전기화학 반응이 가역적인 경향성을 나타낸다. 반대로 peak separation이 클 경우 전자 전달 속도는 느리며 전기화학 반응이 준 가역적 또는 비가역적인 상태로 볼 수 있다^{17,18}. 표면이 어떻게 개질되었는가에 따라 peak separation이 차이가 나게 되며 이에 따른 전극 개질 여부를 판단할 수 있다.

10 mM potassium ferricyanide가 포함된 0.1 M의 potassium chloride를 전해질로 이용하여 ferricyanide 이온의 전자전달 현상을 CV로부터 해석하였다. Initial / final 전위는 0.7 V, switch 전위는 -0.3 V으로 설정하였고, 주사속도(scan rate)를 0.1 V/s로 실시하였다. Bare SPCE와 HRP/Chit/AuNP/SPCE 간의 peak separation을 비교를 Fig. 2에 나타내었다. Bare SPCE의 peak separation은 0.53 V, HRP/Chit/AuNP/SPCE 경우 0.13 V으로 측정되었다. 동일한 조건에서 peak separation이 달라지는 것은 전극이 개질 되었음을 의미하며^{19,20}, peak 전류의 값이 증가함에 따라 신호민 감성이 증가된 것을 확인하였다.

앞선 bare SPCE와 개질된 전극뿐만 아니라 AuNP가 전착된 상태에서 키토산과 효소의 개질 여부를 판단하기 위하여 CV를 다시 실시하였다. 전해질은 5 mM potassium ferricyanide가 포함된 0.1 M의 potassium chloride를 이용하였고, peak separation 값을 측정하여 전극 개질 유무를 확인하였다. Fig. 3과 같이 AuNP/SPCE 경우 peak potential이 0.07 V, Chit/AuNP/SPCE가 0.08 V 그리고 HRP/AuNP/SPCE 경우 0.11 V으로 키토산과 효소가 잘 전착되었음을 확인하였다.

3.2 임피던스 분광법을 이용한 HRP 고정화 특성평가

Fig. 3과 같이 CV로부터 측정된 peak separation 결과는 Fig. 2에 비해 그 차이가 미미하다. Chang 등의 연구결과에 따르면 CV보다 EIS 경우 전자 전달의 차이를 더욱 세밀하게 측정할 수 있다고 보고되었다²¹. 따라서 본 연구에서도 EIS를 실시하여 peak separation의 차이를 확인하였다.

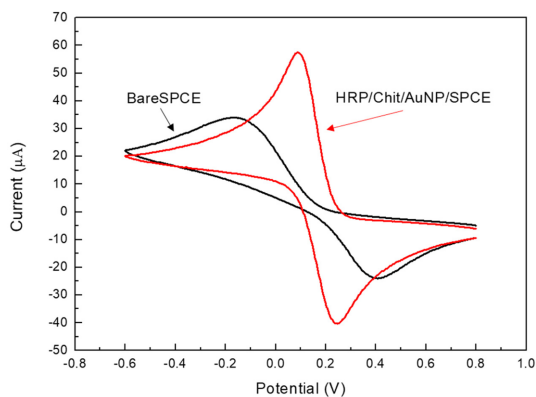


Fig. 2. Comparison of peak separation between bare SPCE and HRP/Chit/AuNP/SPCE.

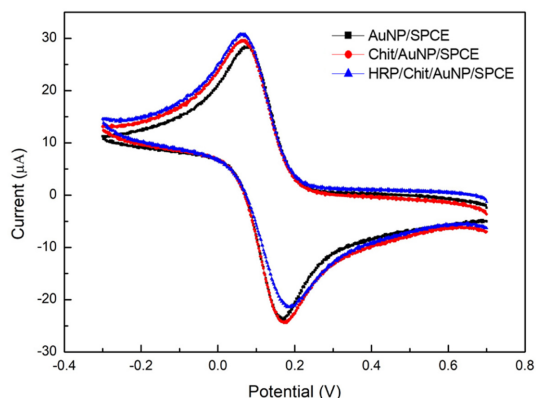


Fig. 3. Cyclic voltammetry graphs of AuNP/SPCE, Chit/AuNP/SPCE and HRP/Chit/AuNP/SPCE.

개질된 전극을 5 mM potassium ferricyanide가 포함된 0.1 M의 potassium chloride 전해질에서 EIS를 실시하였다. 주파수는 0.10 Hz에서 100 KHz까지 설정하였고 bias potential 0.1 V를 중심으로 0.01 V의 진동을 인가하여 나이퀴스트(nyquist) 선도의 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 5(b)와 같이 그래프 모두 주파수가 증가함에 따라 호의 형태로 가다가 직선으로 뻗어나가는 형태로 나타났으며, 이는 Fig. 4와 같이 Wargburg 임피던스가 포함된 Randle cell의 모델을 나타낸다. Randle cell에서는 전해질 자체의 저항 (R_s)과 전극 표면과 전해질 사이에서 생기는 전기 이중층 (C_d) 그리고 전극 표면에서 전자 전달 속도에 관련된 charge transfer resistance (R_{ct})로 이루어져 있다. Charge transfer resistance는 Randle cell 모델에서 Fig. 5(a)와 같이 반원의 형태로 나타나며 전기화

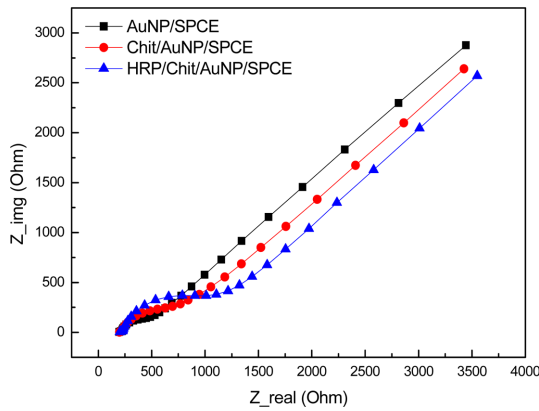
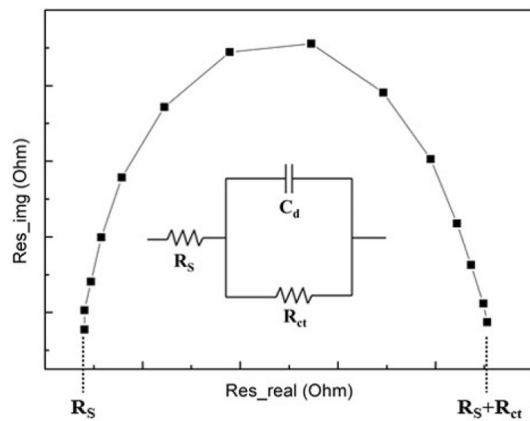
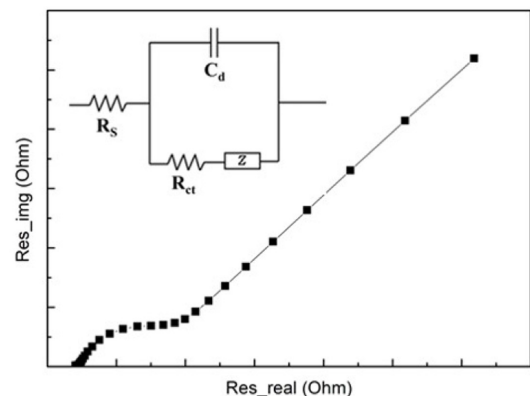


Fig. 4. Nyquist diagram of AuNP/SPCE, Chit/AuNP/SPCE and HRP/Chit/AuNP/SPCE.



(a) Without Warburg impedance



(b) With Warburg impedance

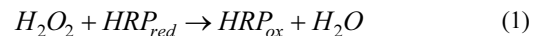
Fig. 5. Randle cell EIS; Equivalent circuit and Nyquist diagram.

학 반응속도가 물질전달 속도의 영향을 받지 않을 때 발생한다. Warburg impedance가 발생하는 경우에는 Fig. 5(b)와 같이 높은 주파수 영역에서 45도 기울기의 직선이 생기는데^{17,21,22}, 가상의 반원을 그려서 그 지름을 charge transfer resistance로 사용한다¹⁷.

EIS로 부터 전극 개질 유무를 판단할 수 있는 중요한 요소는 charge transfer resistance (R_{ct})이다. 실험 결과 해당 전해질에서 charge transfer resistance 값은 AuNP/SPCE가 297.22 Ω , Chit/AuNP/SPCE가 512.91 Ω , HRP/Chit/AuNP/SPCE가 1014.54 Ω 으로 표면에 키토산과 효소가 개질 할 때마다 약 2배씩 상승하는 것을 확인하였다. 이는 CV 결과와 마찬가지로 키토산과 효소가 상대적으로 낮은 전기전도도를 가지고 있기 때문이다.

3.3 개질된 전극 위의 효소 활성 평가

HRP/Chit/AuNP/SPCE 전극을 제조하고 난 후, 효소의 활성 유무를 판단하는 것 또한 바이오센서에서 매우 중요한 평가 요소이다. HRP는 과산화수소와 다음과 같은 전기화학 반응이 일어난다²³).



위 반응에서처럼 과산화수소가 HRP에 의해 물이 변하는 과정에서 전자를 잃게 되고, 여기서 잃은 전자를 전극으로부터 받는다. 이 반응을 이용하여 전해질 하에서 과산화수소 유무에 따른 전류 응답을 CV를 통해서 알아보았다. 전해질은 0.1 M phosphate buffer saline 용액 (pH 7.0) 용액을 사용하였으며 initial/final 전위는 0.3 V switch 전위는 -0.3 V로 설정하였으며 주사 속도를 50 mV/s로 설정하여 전류 응답을 확인하였다.

Fig. 6의 결과에서 과산화수소가 없는 경우에는 대부분의 전위에서 60 nA 정도의 매우 약한 전류가 발생하였으나, 각 0.04 V, -0.1 V의 전위에서 4 μ A의 산화 환원 피크 전류가 발생하였고, 이는 PBS 용액과 HRP/Chit/AuNP/SPCE 전극간의 전자 전달에 의한 결과이다. 다만, PBS 용액은 여러 화학물질을 포함하므로 명확한 반응 메커니즘의 규명은 매우 어렵다. 한편, 100 mM의 과산화수소가 포함된 전해질에서는 피크 전위의 위치는 변하지 않았지만 환원 피크 전위에서 전류 값이 큰 폭으로 상승하는 것을 확인하였다. Park과 Liu의 연구에 의하면 과산화수소수가 포함된 전해질에서 환원 전류 피크에서 더 높은 전류 값이 나오는 것으로부터 HRP와 과산화수소의 반응이 일어난다는 것을 확인한다^{19,20}. 본 연구에서도 이를 통하여 formal 전위를 기준으로 음전위를 걸었을 때 HRP와 과산화수소의 반응

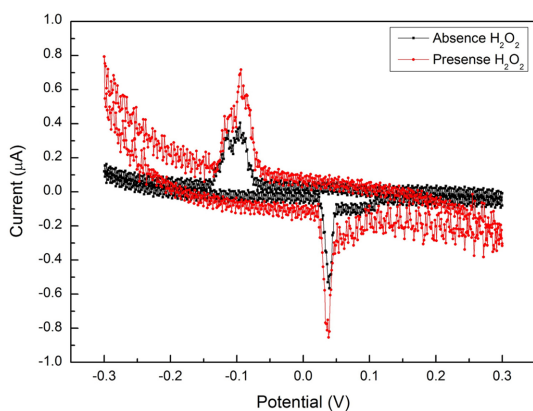


Fig. 6. Cyclic voltammogram of HRP/Chit/AuNP/SPCE electrode with respect to the presence of hydrogen peroxide

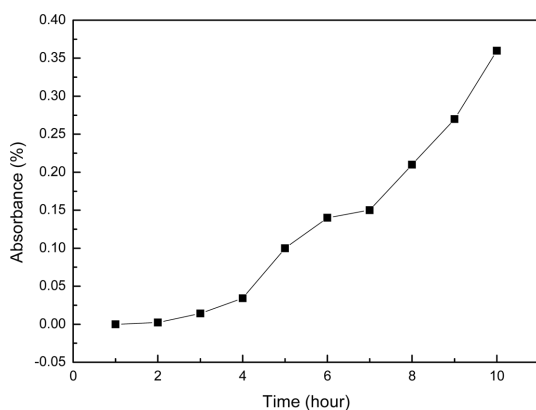


Fig. 7. UV absorbance profile of modified electrode by ABTS

에 의해 전류 응답이 일어나는 것을 알 수 있었다.

환경복원 공정에서는 지속적인 처리가 일반적이므로 효소의 안정성이 매우 중요하다. Park 등의 연구에서는 고정화된 효소의 안정성을 알아보기 위하여 활성도를 측정하는 바 있다²³⁾. 따라서 고정화 효소가 실제로 활성이 있는지를 알아보기 위해 전기화학적 방법이 아닌 분광학적 방법을 이용하여 실시하였다. ABTS가 포함된 전해질에 개질된 전극을 넣어 한 시간 간격으로 흡광도를 측정하는 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 측정을 시작한 시점부터 2시간 후까지는 활성이 거의 보이지 않다가 시간이 지날수록 기질에 의한 흡광도가 급격히 증가하는 것을 확인함으로써 전극 위에 고정화된 효소가 활성이 있다는 것을 확인할 수 있었다.

3.4 과산화수소 농도에 따른 전극의 전류 응답

Tanguaram 등의 연구¹³⁾와 본 연구에서의 차이는 SPCE 작업 전극 표면에서의 AuNP 전착 여부이다. 따라서 과산화수소 반응에서 AuNP 전착 여부가 전류 응답에 어느 정도 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 CA분석을 실시하여 전류 응답을 측정하였다. 작동 전위는 -0.4 V로 설정하였으며 0.1 M phosphate buffer saline (pH 7.0) 용액에 과산화수소를 적정 하였을 때 피크 전류를 확인하였다. Fig. 8은 AuNP가 전착된 전극과 전착되지 않은 전극에서의 전류 응답을 나타낸 그래프이다. AuNP 전착을 하지 않은 전극보다 AuNP 전착을 실시한 전극이 과산화수소를 적정 하였을 때, 더 높은 전류 피크를 나타내었고, 적정 횟수가 증가함에 따라 전류의 세기가 계단형으로 증가하였다.

과산화수소 농도 의존성에 따른 전류 응답특성을 분석하기 위해서 전해질에 과산화수소의 농도를 2 mM에서 25 mM까지 단계적으로 적정하여 전류 피크를 측정하였고, 전류의 세기와 과산화수소 농도 간의 관계를 Fig. 9에 나타내었다. 이 그림의 결과는 과산화수소의 농도가 증가할수록 전류의 세기가 거의 선형적으로 증가하는 경향을 보여준다. 바이오센서로부터 측정되는 전류 값으로부터 과산화수소의 농도를 계산하기 위해서는 검정곡선을 이용해야한다. 검정곡선은 과산화수소농도-전류의 관계를 선형회귀분석함으로써 얻어졌으며 R^2 값은 0.9028로 계산되었다.

HRP와 과산화수소의 반응속도는 Michaelis-Menten 속도식을 이용하였으며 다음 식 (3)과 같다.

$$I_{ss} = \frac{I_{max}[C]}{K_m^{app} + [C]} \quad (3)$$

위의 식을 Michaelis-Menton 해석이 용이하도록 선형 함수로 만들기 위해 Lineweaver-Burk 식의 형태로 변환하면, 다음의 식 (4)와 같다.

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_m^{app}}{I_{max}} \frac{1}{[C]} \quad (4)$$

여기서, I_{max} 는 전해질 용액내의 과산화수소의 최대 포화농도, I_{ss} 는 적정 시 일정하게 되는 전류 피크, C 는 전해질내 과산화수소의 농도, 그리고 K_m^{app} 는 Michaelis-Menten 상수이며 효소와 기질 간의 반응속도를 의미한다. 이 상수는 Fig. 9의 데이터를 식 (4)의 형태로 변환하여 그 기울기를 계산함으로써 얻을 수 있고, 그 결과를 Fig. 10에 나타내었다. Fig. 10에서 식 (4)와 같이 변환된 데이터는 선형회귀곡선의 R^2 값이 0.973으로서 거의 선형에 가까웠으며, 이는

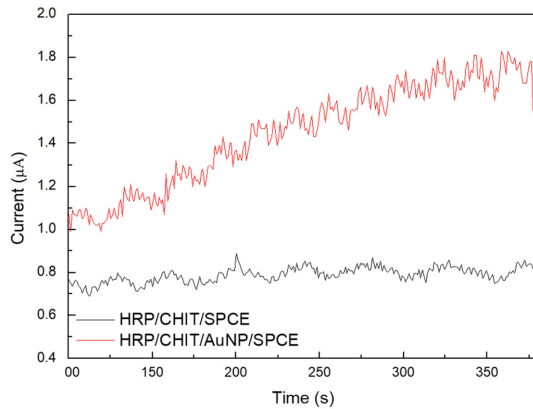


Fig. 8. Amperometric responses of hydrogen peroxide reaction with or without gold electrodeposition.

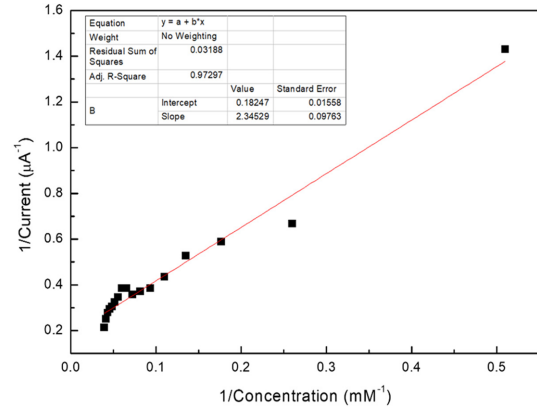


Fig. 10. Lineweaver-Burk plot from Michaelis-Menten kinetics.

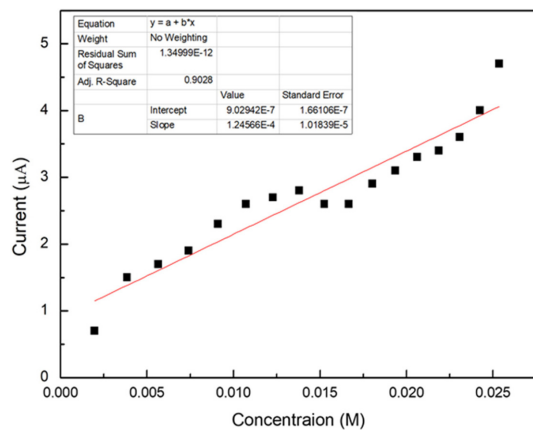


Fig. 9. Calibration curve of amperometric response with respect to hydrogen peroxide concentration.

Michaelis-Menten의 속도 메커니즘을 따른다고 볼 수 있다. 본 연구에서 얻어진 K_m^{app} 값은 1.01 mM으로서 선행 연구²⁴⁾에서의 1.3 mM 보다 낮은 수치를 보였다. 이는 개질된 전극에서 HRP와 과산화수소수의 기질 친화도가 높다는 것을 의미한다. 따라서, 오염된 토양 복원공정과 같이 농도변화가 심하지 않은 경우에는 오히려 활용이 적절한 것으로 고려된다.

4. 결 론

본 연구에서는 키토산, AuNP, 그리고 HRP 효소를 SPCE 작업 전극 위에 전착하여 과산화수소 검출용 바이오센서를 제조하였다. 전위주사법과 전기화학적 임피던스 분광법으로부터 SPCE위에 효소가 성공적으로

고정되었음을 확인하였다. 고정화된 효소의 활성 여부를 확인하기 위해 과산화수소 유무에 따른 전위주사법을 이용하여 전류 응답을 측정하였고, 환원 전위 쪽에서 전기화학적으로 활성이 있는 것을 확인하였다. 또한, ABTS 수용액을 이용하여 시간에 따른 UV 분광법으로부터 효소의 활성을 확인하였다. 시간대전류법을 이용하여 과산화수소의 농도에 따른 전류 응답을 분석하였고 전류가 계단형으로 증가함으로써 농도 의존성을 가지는 것을 확인하였다. 이에 전류로부터 과산화수소의 농도를 측정할 수 있는 선행 검정곡선을 도출하였다. 본 연구의 결과들이 바이오센서로부터 얻어지는 전류 데이터의 분석은 물론, 바이오센서 제조 및 환경 복원 분야의 과산화수소 농도측정장치 연구에 대한 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2017년 광운대학교 교내학술연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. V. Kavitha and K. Palanivelu, 'Destruction of cresols by Fenton oxidation process', *Water Research*, **39**, 3062 (2005).
2. K. H. Ro, Y. I. Choi, J. H. Jung, S. H. Jang, and B. G. Jung, 'Degradation characteristics of diesel-contaminated soil according to hydrogen peroxide (H_2O_2) concentrations', *J. of the Korean Society for Environmental Technology*, **19**, 391 (2018).
3. S. K. Rahul, M. Basavaraju, and S. Shrihari, 'Fenton and photo-Fenton oxidation processes for degradation of 3-aminopyridine from water', *APCBEE Procedia*, **9**, 25

- (2014).
4. H. L. Zhang, G. S. Lai, D. Y. Han and A. M. Yu, 'An amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilization of horseradish peroxidase on an electrode modified with magnetic dextran microspheres', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **390**, 971 (2008).
 5. B. W. Park, R. Zheng, K. Ko, B. D. Cameron, D. Y. Yoon and D. S. Kim, 'A novel glucose biosensor using bi-enzyme incorporated with peptide nanoparticles', *Biosensors and Bioelectronics*, **38**, 295 (2012).
 6. L. B. Sagie, K. R. Laura, A. R. Julia and P. V. D. Richard, 'Advances in localized surface plasmon resonance spectroscopy biosensing', *Nanomedicine*, **6**, 1447 (2011).
 7. L. Rassaei, M. Amiri, C. M. Cirtiu, M. Sillanpaa, F. Marken and M. Sillanpaa, 'Nanoparticles in electrochemical sensors for environmental monitoring', *Trends in Analytical Chemistry*, **30**, 1704 (2011).
 8. J. P. Hart, A. Crew, E. Crouch, K. C. Honeychurch and R. M. Pemberton, 'Some recent designs and developments of screen-printed carbon electrochemical sensors/biosensors for biomedical, environmental, and industrial analyses', *Analytical Letters*, **37**, 789 (2004).
 9. O. D. Renedo, M. A. Alonso-Lomillo and M. J. A. Martinez, 'Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications', *Talanta*, **73**, 202 (2011).
 10. S. Cosnier, 'Biosensors based on electropolymerized films: new trends', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **377**, 507 (2003).
 11. E. Llaudet, N. P. Botting, J. A. Crayston and N. Dale, 'A three-enzyme microelectrode sensor for detecting purine release from central nervous system', *Biosensors and Bioelectronics*, **18**, 43 (2003).
 12. S. Ledru, N. Ruille and M. Boujtita, 'One-step screen-printed electrode modified in its bulk with HRP based on direct electron transfer for hydrogen peroxide detection in flow injection mode', *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, 1591 (2006).
 13. T. Tangkuaram, C. Ponchio, T. Kangkasomboon, P. Katikawong and W. Veerasai, 'Design and development of a highly stable hydrogen peroxide biosensor on screen printed carbon electrode based on horseradish peroxidase bound with gold nanoparticles in the matrix of chitosan', *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 2071 (2007).
 14. J. Zhang and M. Oyama, 'A hydrogen peroxide sensor based on the peroxidase activity of hemoglobin immobilized on gold nanoparticles-modified ITO electrode', *Electrochimica Acta*, **50**, 85 (2004).
 15. B. Neiman, E. Grushka and O. Lev, 'Use of gold nanoparticles to enhance capillary electrophoresis', *Analytical Chemistry*, **73**, 5220 (2001).
 16. A. N. P. Hiner, J. Hernandez-Ruiz, M. B. Arnao, F. Garcia-Canovas and M. Acosta, 'A comparative study of the purity, enzyme activity, and inactivation by hydrogen peroxide of commercially available horseradish peroxidase isoenzymes A and C', *Biotechnology and Bioengineering*, **50**, 609 (1996).
 17. A. J. Bard, 'Electrochemical methods', Wiley, chapter 6 and 11 (2001).
 18. Jr. D. K. Gosser, 'Cyclic voltammetry simulation and analysis of reaction mechanisms', VCH Publishers, chapter 2 (1993).
 19. B. W. Park, D. S. Kim and D. Y. Yoon, 'Surface modification of gold electrode with gold nanoparticles and mixed self-assembled monolayers for enzyme biosensors', *Korean Journal of Chemical Engineering*, **28**, 64 (2011).
 20. Y. Liu, T. Geng and J. Gao, 'Layer-by-layer immobilization of horseradish peroxidase on a gold electrode modified with colloidal gold nanoparticles', *Microchimica Acta*, **161**, 241 (2008).
 21. B. Y. Chang and S. M. Park, 'Electrochemical impedance spectroscopy', *Annual Review of Analytical Chemistry*, **3**, 207 (2010).
 22. S. M. Park and J. S. Yoo, 'Electrochemical impedance spectroscopy for better electrochemical measurements', *Analytical Chemistry*, November **1**, 459A (2003).
 23. B. Y. Park, K. Ko, D. Y. Yoon and D. S. Kim, 'Enzyme activity assay for horseradish peroxidase encapsulated in peptide nanotubes', *Enzyme and Microbial Technology*, **51**, 81 (2012).
 24. X. Xu, S. Liu and H. Ju, 'A novel hydrogen peroxide sensor via the direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on colloidal gold modified screen-printed electrode', *Sensors*, **3**, 350 (2003).