

Catalase의 고정화를 이용한 알코올감지용 바이오센서의 특성 연구

주 현 · 김용환 · 변석훈 · 유영제[†]

서울대학교 화학공학과
(1995년 3월 9일 접수, 1995년 9월 11일 채택)

Characteristics of Alcohol Biosensor System with Immobilized Catalase

Hyun Joo, Yong Hwan Kim, Suk Hun Byun and Young Je Yoo[†]

Department of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742

(Received 9 March 1995; accepted 11 September 1995)

요 약

Catalase의 반응 특성을 이용하여 알코올 감지용 바이오센서를 제작하였으며, 알코올 계측 용도로의 적용 가능성을 살펴보았다. 일정농도의 과산화수소와 함께 측정하고자 하는 알코올을 센서의 반응부위에 동시 공급하여 catalase와의 경쟁 반응을 통하여 얻어진 과산화수소의 분해산물인 산소의 농도를 용존산소(DO) 전극을 통하여 측정하는 방법을 개발하였다. 제작된 센서는 에탄올뿐만 아니라 다른 알코올류에 대하여도 적용성이 있었고 센서의 측정범위는 18 mM 정도며 30-90 seconds 이내의 빠른 응답특성을 보여 주었다. 이는 기존의 NAD(H)를 동시에 공급해 주어야 하는 알코올 탈수소화효소 혹은 알코올 산화효소 등을 이용하는 계측시스템을 대신한 고속의 매우 단순화된 반응시스템으로서 기존의 알코올 계측 시스템을 대체할 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract—An ethanol-sensing biosensor was developed using catalase reaction. The method consists of supplying alcohol and given concentration of hydrogen peroxide, which reacts competitively with catalase. The resulting amount of oxygen from this reaction is analysed using a dissolved oxygen(DO) electrode. The sensor can be also used for alcohols other than ethanol. In the developed sensor, the measurable concentration range was about 18 mM of ethanol and the response time was within 30-90 seconds. The proposed sensing system is simpler and better in sensing performance compared to the systems using alcohol oxidase or alcohol dehydrogenase where NAD(H) has to be supplied.

Key words: Catalase, Biosensor, Ethanol, Enzyme Reaction, Enzyme Immobilization

1. 서 론

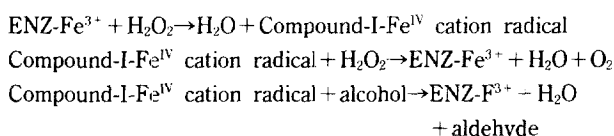
알코올 계측은 의료분야나 화학공업, 식품제조 공정 등에서 필요하다. 알코올 바이오센서는 일반적으로 알코올 산화효소(alcohol oxidase, EC 1.1.3.13)나 알코올 탈수소화효소(alcohol dehydrogenase, EC 1.1.1.1)를 이용한다. 전자를 이용하는 경우 알코올 산화효소 고정화막에 산소전극 또는 과산화수소를 검출할 수 있는 전극을 함께 연결시켜 센서를 만든다[1]. 그러나 알코올 산화효소는 기질 특이성이 넓고, 유기산도 산화시키므로 센서의 기질반응에 대한 안정성과 선택도가 좋지 않다. 한편 알코올 탈수소화효소는 선택적으로 알코올에서 수소를 제거하는 효소이므로 이것을 이용하면 센서의 선택성이 크게 향상될 수 있다[2]. 실제로 알코올 탈수소화효소를 triamine 함유 셀룰로스막에 고정화시켜 1차 알코올 투과성막을 제조한 다음, 이 고정화막을 미소 산소전극의 테프론 막위에 붙여 구성된 센서 등이 보고되었으며[3], 전기전도성 고분자에 알코올 탈수소화 효소를 NAD(nicotinamide adenine dinucleotide)와 함께 고정하여 이의 전위차를 이용 알코올농도를 측

정하는 센서가 제작되기도 하였다[4]. 최근에는 Ishizuka 등[5]에 의하여 염료(meldola blue)-알코올 탈수소화효소 복합체와 NAD의 집적흡착에 따른 전위차를 이용한 알코올 센서가 제작되었는데, 40 초 이내에 최대 100 mM의 에탄올 농도에 대한 측정이 가능하였다. 그러나 이러한 경우에는 계속적인 NAD(H) 재생용 효소의 첨가에 따른 이중 효소반응시스템(bi-enzyme system)이 요구되고 있으며, NAD 고정화를 위한 적절한 담체 선정의 어려움, 저농도 알코올의 경우 방출되는 수소이온 농도의 낮은 변화치에 기인하여 측정이 어려운 점 등이 있다. 또한 NAD 계측을 통한 측정에 있어 이들 효소 혹은 NAD의 가격은 매우 고가로 알려져 있으며, 실온보관이 어려운 점 등의 문제점을 갖고 있다. 알코올 산화효소를 이용하는 경우는 이와는 다른 종류의 반응시스템이 이용된다. 알코올 산화효소는 메탄올 혹은 에탄올을 산소와 같이 반응시켜 과산화수소와 함께 이들 알코올의 산화된 반응물을 얻는다. 여기서 측정에 이용되는 방법은 기질 반응에 따라 고갈되는 산소의 양 혹은 과산화수소를 정량화하여 알코올을 감지하는 것이다. 한 예로 알코올 산화효소를 gelatin 담체에 고정화하여 산소의 감소량을 측정하는 센서가

제작되기도 하였다[6]. 그러나 알코올 산화효소 반응시 소모되는 산소가 물에 낮은 용해도를 가지므로 센서의 측정범위는 에탄올이 약 0.5-15 mM 정도로 제한적이었으며, 반응시간은 약 2분 정도가 소요되었다. 그러나 무엇보다도 알코올 산화효소는 유기산에의 안정도가 매우 약한 점이 커다란 단점으로 지적된다[7]. 따라서 본 연구에서는 새로운 효소를 이용하여 기존의 알코올 탈수산화효소와 알코올 산화효소가 지닌 문제점을 보완할 수 있는 반응시스템을 선정하여 센서를 제작하였다. 에탄올 전환 반응에는 catalase(EC 1.11.1.6) 효소를 이용하였으며, 이 때 농도가 일정하게 유지된 과산화수소와 측정하고자 하는 에탄올을 동시에 반응에 참여시켜 여기서 얻어지는 용존산소량의 변화치를 DO(dissolved oxygen) 전극과 연결하여 에탄올 농도를 측정하였다.

2. 원 리

본 연구에서는 catalase(EC 1.11.1.6) 효소를 이용한 반응시스템을 선정하였다. 일반적으로 catalase는 과산화수소(H_2O_2)를 산소(O_2)로 촉매 반응하는 효소로 널리 알려져 있다. 그러나 또 하나의 특이한 반응이 존재하는데, 이는 과산화수소와 1차로 반응된 catalase 효소는 이의 활성부위의 산화상태가 Fe^{IV} 로 변환되며 이러한 효소의 반응중간체(intermediate)는 다시 과산화수소와 반응, 산소를 발생시키거나 알코올류가 첨가되어 들어가면 알코올을 aldehyde로 전환시키는 반응을 수행한다. 전체적인 반응의 개요는 다음과 같이 보고되어 있다[8, 9].



여기서, ENZ-Fe^{3+} 는 반응에 참여하기 전의 효소의 산화상태를 나타낸 것이고, $\text{Compound-I-Fe}^{IV}$ 는 과산화수소와 일차로 반응한 상태의 효소 활성의 중간형태를 나타낸다. 위 반응을 살펴보면 $\text{Compound-I-Fe}^{IV}$ 는 과산화수소와 알코올 두 기질사이에서 경쟁적인 반응을 수행한다. 만일 과산화수소의 농도가 매우 측정시마다 일정농도로 유지된다면, 주어지는 알코올 농도의 변화치는 곧 센서의 시그널로 표시될 수 있음을 알 수 있다. 따라서 과산화수소의 reference 농도에 대한 알코올 농도만큼의 차가 산소(O_2)의 발생으로 전환되므로 이를 DO(dissolved oxygen)전극을 이용하면 쉽게 알코올의 농도를 측정할 수 있을 것이다. 물론 이러한 제측 시스템은 신호 감지기로서 pH나 기타 NAD를 이용한 제측의 경우보다도 더욱 정교하다. 따라서 이러한 기본 원리를 이용함으로써, 최종 검출가능한 시그널로의 전환이 쉽고 용이하게 구할 수 있는 catalase 효소를 이용하여 알코올 농도를 측정할 수 있는 바이오센서를 제작할 수 있다.

3. 실험장치 및 방법

3-1. 바이오센서의 구성

센서의 전류발생을 위한 기구로는 갈바닉 형태의 용존산소 전극(dissolved oxygen electrode, New Brunswick)을 사용하였고, 발생된 전류증폭과 기록을 위한 장치로는 O_2 -amplifier(Oxygen analyzer, New Brunswick Co.)를 이용하였으며, 알코올과 과산화수소의 선택적 투과를 위한 막은 한쪽면이 formaldehyde로 가교결합된

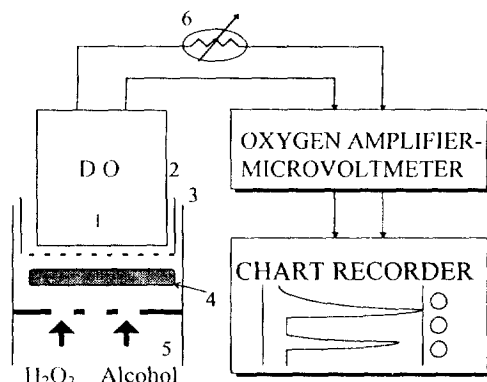


Fig. 1. Schematic diagram of a developed alcohol biosensor system.

1-galvanic type dissolved oxygen electrode system, 2-poly(tetra fluoro ethylene) membrane, Teflon, 3-poly(vinyl alcohol) membrane, 4-immobilized catalase, 5-mixing chamber, 6-10 K Ω variable electrical resistance

poly vinyl alcohol(PVA)막을 제작 사용하였다. Catalase(EC 1.11.1.6, 2800 units/mg solid)는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다. 1-unit는 25 $^{\circ}C$, pH 7.0의 sodium phosphate buffer(Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , 100 mM)에서 1 μ mole의 과산화수소를 1분 동안에 분해하는 양으로 정의하여 사용하였다. 센서의 제작시 catalase 효소는 활성의 안정화를 위하여 0.5 mL의 sodium phosphate buffer(pH 7.0, 100 mM)에 엉키지 않도록 유리 막대로 저으며 고농도로 용해시킨 후, 1 mL 용량의 주사기를 이용하여 glass micropore paper(Whatman, No., 1820 047)의 표면에 적당량 주입 흡착시켜 고정화하였다. 약 5시간 정도 진공건조기에 보관후 꺼내어 이것을 DO 전극의 Teflon막 표면과 제작된 PVA막 사이에 삽입하여 센서를 구성하였다. 두 막사이에 고정화된 효소의 양은 약 2800 unit(1 mg solid powder)가 되도록 하였으며, 이들 고정화된 효소의 보존 활성도(storage activity)는 3시간 경과후 비교적 효소(free enzyme) 보다도 약 20% 이상 높은 활성도를 보였다. 바이오센서의 개략적인 구조와 측정기구의 구성은 Fig. 1에 나타나 있다.

3-2. 센서의 알코올 농도에 대한 선형화 계수 측정

과산화수소 농도가 20 mM과 에탄올 농도가 0.63-50 mM인 각 용액에 대하여 제작된 센서에서 발생된 전압을 측정하였다. 이 때의 기준전압(reference voltage)은 순수한 20 mM의 과산화수소 용액에 대하여 가변 저항을 이용하여 100 mV로 맞추고, 위의 에탄올 농도 첨가에 따른 각각의 전압 변화치를 기록하여 선형화하였다. 선형화 계수는 1차-최소자승법(least-squares method)을 이용하여 추정하였다.

3-3. 미지의 에탄올 농도 측정 및 응답시간

Calibration curve 제작용 시약 중 에탄올 농도가 1.56과 3.75, 7.5, 16.1 mM인 용액을 전체 용적이 50 mL가 되게 비이커에 담아 센서 전압 변화치를 측정하였다. 각각의 경우에 대하여 4-7회씩에 걸쳐 응답시간을 측정하였으며 이 때 각각의 에탄올 농도에 대한 정상상태 도달 응답시간을 측정하였다.

3-4. 효소 반응 특성 분석

Catalase 효소 반응 시스템의 알코올감지형 센서로서의 적합성을

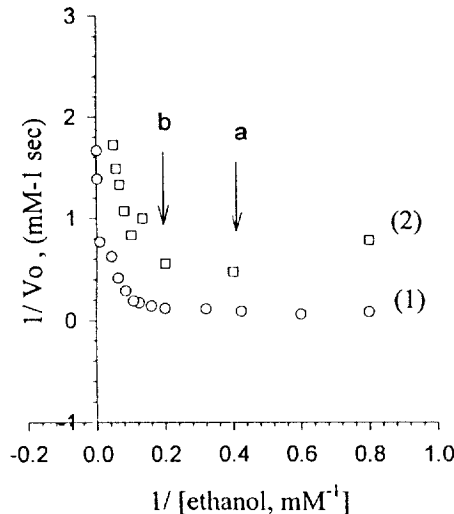


Fig. 2. Reciprocal plot for catalase reaction with ethanol for various level of hydrogen peroxide.

(1) 20 mM H_2O_2 , (2) 40 mM H_2O_2 .

검토하기 위한 기질반응 시스템의 특성을 살펴보았다. 분석용 에탄올(0.810 g/mL, 20°C)과 과산화수소(1.1335 g/mL, 20°C)는 Junsei Chemical사로부터 구입하였으며, 효소의 활성도 측정과 반응 특성 분석은 자외선(ultraviolet, UV) 스펙트럼 분광기(UVICON, Kontoron)를 사용하여 254 nm에서 분석하였다. 효소의 반응속도 분석은 과산화수소의 농도 측정이 가능한 UV 분광기를 이용한 반응시간대 흡광도를 측정할 기율기 분석과 permanganate 적정법[10]을 병행하여 수행하였다. 반응속도 분석에 사용된 과산화수소는 240-254 nm에 걸쳐 특성 peak가 발생하며 이 파장에 고정시켜서 과산화수소 농도를 6.25-100 mM까지 변화시켜가며 UV흡광도를 측정하였다. 흡광도(absorbance)는 50 mM 이하 농도에서 선형적인 관계를 보이며 그 관계는 $Absorbance = 0.037 * [H_2O_2 \text{ 농도, mM}] + 0.113$ 이었다. 1차 최소자승법에 의한 선형화 상관계수는 0.997(R^2) 값을 보였다. 따라서 본 UV 실험에서는 과산화수소의 농도를 50 mM 이하로 유지시키면서, 과산화수소와 에탄올 반응시스템의 경쟁반응 추정을 위한 여러 조건변수들을 산정하였다.

먼저 일정 농도의 알코올에 대하여 과산화수소농도가 0-40 mM인 용액에 대해 반응속도상수를 측정하였고, 과산화수소농도를 20, 40 mM로 고정시킨 상태에서 에탄올농도를 0.625-10 mM 정도가 되도록 변화시켜 가며, 2.8×10^4 units의 활성을 가지는 catalase 효소를 1.5 mL의 반응 cuvetts에 첨가하여 시간에 따른 UV흡수도 변화를 측정하였다.

그리고 실제 공정에서 예상되는 부산물들에 대한 반응시스템의 영향과 아울러 유사기질에 대한 효소의 반응 선택도와 함께, 유기산에의 안정성 등을 알아보기 위하여 메탄올, 부틸 알코올, 아세트산, 아세트알데히드를 각각 소량씩 첨가하여 개별 반응에 대한 특성 변화를 살펴보았으며, 또한 이들 기질들의 동시 첨가에 따른 반응 특성을 알아보았다.

4. 결과 및 고찰

4-1. 효소의 기질 경쟁 반응 특성

일반적으로 catalase(EC 1.11.1.6)는 과산화수소를 산소(O_2)로 촉매 반응시키는 효소로 널리 알려져 있다. 그러나 과산화수소의

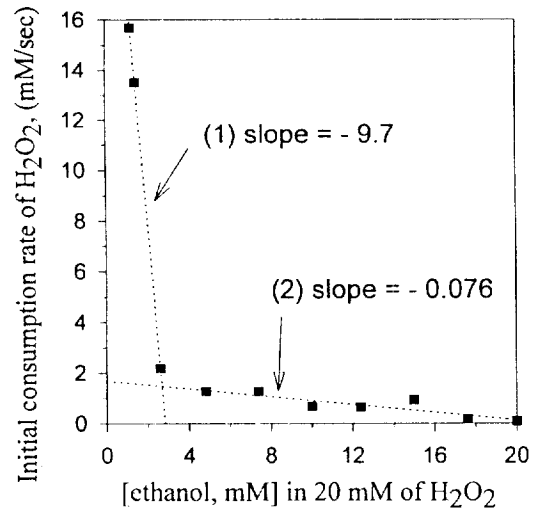


Fig. 3. Effect of ethanol concentration on hydrogen peroxide reaction rate in the catalase reaction.

다른 환원 기질로서 알코올을 선택적으로 입체 특이적(stereo-specific)으로 알데히드로 전환하는 반응도 catalase가 가지고 있는 중요한 반응 중의 하나임을 문헌에서 찾아볼 수 있다[8]. 본 연구에서도 Fig. 2에서와 같이 과산화수소와 에탄올은 catalase와 경쟁적으로 반응하며 서로 상대적인 농도비에 따라 각 기질의 반응성이 다르게 나타남을 확인할 수 있었다. Fig. 2는 초기 주입되는 과산화수소의 농도가 각각 20, 40 mM일 때 에탄올의 농도를 0-20 mM까지 변화시켜 가며 과산화수소 소모속도(V_o)를 reciprocal 도식화한 결과이다. 과산화수소 농도가 20 mM로 첨가된 경우, 과산화수소 소모속도는 첨가된 에탄올 농도에 반비례하여 감소되는 현상을 보여준다. 이는 과산화수소에 대한 catalase의 비활성화가 수반되지 않고 첨가된 에탄올이 과산화수소와 경쟁 반응을 수반하여 일어난 결과에 기인된다. 고농도 과산화수소(40 mM)가 사용된 경우는 catalase는 과산화수소에 의한 활성 저해현상을 보인다. Fig. 2에서 에탄올 농도가 2.5 mM(a-point 농도기점) 이하가 되면 다시 효소 반응속도의 감소 현상을 볼 수 있는데, 그 원인은 효소의 활성 저해에 있는 것으로 사료된다. 이러한 현상은 앞서의 결과인 두 기질 경쟁반응에 의한 과산화수소 반응속도의 감소현상과는 분명히 구별된다. 그러나 고농도 과산화수소에도 불구하고 에탄올 농도가 약 2.5 mM 이상 존재하는 catalase의 과산화수소에 의한 활성저해는 어느 정도 극복이 가능함을 알 수 있다. 따라서 센서에 사용되는 이들 두 기질의 농도는 약 2800 unit의 catalase에 대하여 과산화수소는 20 mM 이하로 제한하여 사용해야 함을 알 수 있다.

Fig. 3은 Fig. 2에서 나온 결과의 해석적 편의를 위하여 20 mM의 과산화수소가 초기반응에 참여할 때 동시에 첨가되는 에탄올 농도에 대한 반응속도 변화를 재 도식화한 그림이다. Fig. 3을 통하여 과산화수소 소모속도는 첨가되는 에탄올 농도의 증가에 따라 2단계로 차이를 보이며 줄어듦을 확인할 수 있다. 에탄올의 농도가 5 mM을 기점으로 저농도의 에탄올에서는 과산화수소의 기질 소모 속도가 대부분 2-16 mM/sec로서 매우 빠르게 반응이 진행됨을 알 수 있으나, 에탄올의 농도가 5 mM 이상일 경우는 과산화수소 소모속도는 2 mM/sec 이하로 느리게 떨어짐을 알 수 있다. 이러한 사실은 reciprocal 도식의 형태로 나타난 Fig. 2의 결과와 일치한다(Fig. 2에서는 반응속도 변화의 분기가 되는 에탄올 농도가 b-point로 표시됨). 본 결과는 센서 제작시 catalase와 직접 반응하는 에탄올은 저농도로

Table 1. Comparison of reaction characteristics between catalase and hydrogen peroxide in the presence of alcohols and inhibitors

No.	Hydrogen peroxide [mM]	Ethanol [mM]	Methanol [mM]	Butyl alcohol [mM]	Acetic acid [mM]	Acetaldehyde [mM]	Maximum rate changes*
1	18.8	1.6					control
2	18.8	1.6	3.1				+ 12.5%
3	18.8	1.6		1.3			+ 42.5%
4	18.8	1.6			2.2		- 6.7%
5	18.8	1.6				2.2	+ 55.8%
6	18.8	1.6			0.1	0.1	- 0.23%

*the values were measured after 20 seconds

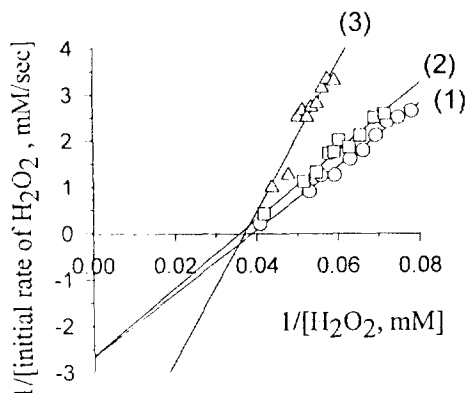


Fig. 4. The effect of alcohol substrates and inhibitor on the catalase reaction.

(1) 1.6 mM ethanol, (2) 1.6 mM ethanol + 1.3 mM butyl alcohol, (3) 1.6 mM ethanol + 2.2 mM acetic acid.

사용되어야 함을 보여주는 중요한 결과로서, 만일 고농도 에탄올이 사용시에는 검출 신호의 선형화 작업에 대한 어려움과 느린 응답성을 충분히 예측가능하다. Fig. 3에서 나타난 바와 같이 첨가된 에탄올 농도에 대한 과산화수소 소모속도의 비로 환산하면 저농도와 고농도의 에탄올일 경우 각각 기울기가 $-9.7(\text{mM/sec H}_2\text{O}_2)/(\text{mM ethanol})$ 와 $-0.076(\text{mM/sec H}_2\text{O}_2)/(\text{mM ethanol})$ 로 저농도보다는 고농도의 에탄올에서 약 120배정도 느리게 과산화수소 반응속도가 감소되어 있음을 알 수 있다. 이러한 원인은 과산화수소만을 단독 기질로 이용한 경우에 반하여 과산화수소와 에탄올이 동시에 두 기질로 주어졌을 경우 주어진 에탄올 전환을 위한 촉매경로가 존재하기 때문인 것으로, 문헌상에도 이처럼 에탄올이 aldehyde로 전환되는 과정이 율속단계임이 보고되어 있다[9].

4-2. 알코올에 대한 반응의 선택도와 유기산에의 영향

Table 1은 과산화수소와 에탄올의 반응 외에 다른 유기물질이나, 기타 다른 종류의 알코올들에 대한 영향을 알아본 실험결과이다. 수행된 6가지 실험에 대하여 과산화수소와 에탄올의 농도는 모두 18.8 mM과 1.6 mM로 일정하게 공급하였으며, 이외에 메탄올, 부틸 알코올, 아세트산, 아세트알데히드를 각각 추가로 주입하여 센서에 대한 이들 타 물질들의 간섭정도와 허용농도 범위 대를 알아보았다.

다양한 알코올과 반응의 억제제를 첨가한 경우를 살펴보면 첨가된 물질의 종류에 따라 catalase의 반응속도를 상호 감소 또는 상호 증가시키는 현상을 알 수 있다. 특히 에탄올과 유사한 알코올류 기질인 메탄올, 혹은 부틸 알코올이 첨가되었을 경우의 반응속도를 살펴보면 다음과 같다. 과산화수소와 에탄올 반응계에 메탄올이 첨가되었을 경우는 에탄올보다 2배나 높은 농도의 메탄올이 첨가

되었음에도 불구하고 전체적인 과산화수소 반응속도는 약 (+)12% 정도밖에 증가되지 않았다. 그러나, 부틸 알코올 첨가 시에는 에탄올 농도의 약 0.8배의 첨가에도 불구하고 전체 과산화수소 소모속도는 무려 (+)42.5%의 증가를 보였다. 이러한 원인은 두 알코올 기질 간의 서로 다른 반응속도 차이에 기인한 것으로 나타났는데, Fig. 4에 이러한 효과가 잘 나타나 있다. Fig. 4의 (1)은 과산화수소의 농도를 변화시켜가며, 1.6 mM의 에탄올이 반응 속에 같이 참여할 때 과산화수소의 소모속도를 나타낸 Lineweaver-Burk 도식 결과이다. 그림의 (2)번은 (1)번과 동일한 반응용액 조건 속에 1.3 mM의 부틸 알코올을 함께 첨가하였을 때의 과산화수소의 초기 소모속도를 구한 값이며, (3)은 catalase의 활성 저해제로서 유기산의 효과를 알아보기 위하여 2.2 mM의 아세트산을 첨가한 경우를 나타낸 것이다. 그림에서 보여 주듯이 에탄올과 유사한 부틸 알코올이 동시에 반응에 참여하는 경우 catalase는 이 두 종류의 알코올을 같은 기질로서 인식하여 반응을 수행함을 확인할 수 있었다. 이 때 알코올 첨가에 따른 과산화수소의 소모속도를 유사(apparent)한 Michaelis-Menten 식으로 가정하여 최대 소모속도값을 구하여 보면, $V'_{m,app}$ 값은 각각, (1) 0.376, (2) 0.377로서 두 경우의 접선(interception) 값이 거의 일치한다. 효소의 물리적 결합상수인 K'_m 의 값은 (1) 0.039, (2) 0.036 mM로서 그래프 패턴이 부틸 알코올은 에탄올과 같은 기질로 인식되는 전형적인 기질농도 증가형태로서[11], 같은 알코올류에 있어서는 첨가되는 부틸 알코올 농도의 증가에 따라 reciprocal 도식에서 전형적인 기울기 증가를 보임을 알 수 있다. 아세트산이 첨가된 Fig. 4의 (3) 경우에는 V'_{max} 값이 0.176, K'_m 이 0.037로서 동일기질 경쟁반응(competitive reaction)인 Fig. 4의 (1), (2)와 접선(interception) 값이 일치하지 않는 전혀 다른 양상의 비경쟁적(noncompetitive) 효소 활성저해 현상을 보여준다.

Fig. 2와 4의 결과로부터 다음과 같은 사실을 얻을 수 있다. Catalase는 그 가용기질로서 에탄올과 과산화수소가 동시에 반응에 참여하는 경우, 간 알코올 탈수소화효소(liver alcohol dehydrogenase)와 유사한 Theorell-Chance 메커니즘[12]의 일부를 반응 중에 포함함을 알 수 있다. Rudolph와 Fromm[13]은 NAD 대체물로서 TAD (tri-nicotinamide adenine dinucleotide)를 이용하여 Lineweaver-Burk 도식을 하여 본 결과 NAD가 알코올 반응의 전 단계에 작용된다고 보고하였다. 이 때 전체 반응의 율속은 에탄올의 결합 해리에 있다고 보고하였으며, Fig. 2 및 Fig. 4의 (1), (2)에 도식된 바와 같이 본 연구에 사용된 catalase의 경우도 이들 반응특성과 동일한 결과를 보여 주었다. 이러한 결과는 catalase는 알코올과 반응하기 위해서는 초기에 과산화수소가 미리 반응에 참여하여야 함을 뜻하며 이 때의 과산화수소는 알코올 탈수소화효소의 기질인 NAD와 유사한 역할을 함을 보여준다.

이상과 같은 결과를 종합하여 볼 때, catalase 효소는 같은 종류의 알코올류가 섞였을 경우는 같은 기질로 인식하여 여러 종류의 알

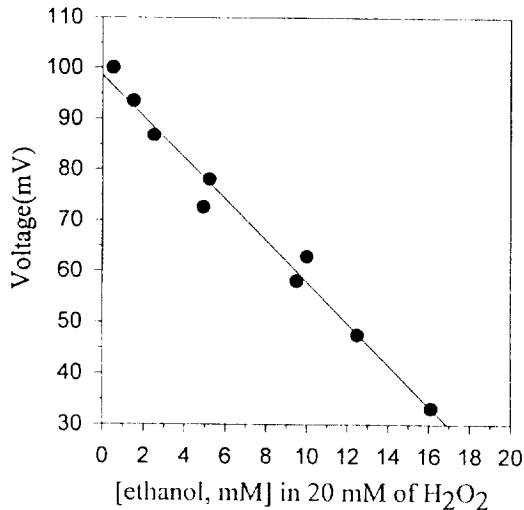


Fig. 5. Linearity of ethanol concentration with output voltage of DO electrode.

코올류에 대한 검출 가능성이 있음을 알 수 있으며, 아세트산과 같은 유기산의 첨가시에는 비경쟁적인 반응에 의한 효소의 비활성화를 수반함을 알 수 있었다. 그러나 유기산의 첨가에 의한 효소 활성의 저해는 기존에 보고된 알코올 산화효소 경우보다는 매우 적은 수치임을 알 수 있다[7]. Table 1을 살펴보면, 유기산인 아세트산에 대한 반응속도의 영향이 나타나 있는데, 사용한 catalase는 일반적으로 알코올 산화효소의 활성 저해제로 알려진 유기산에 대하여 강한 저항성이 있는 것으로 나타났다. 그러나 반응에 첨가된 아세트알데히드의 경우는 56% 가까이 매우 현저한 반응속도의 감소를 유발함을 알 수 있다.

따라서 catalase 효소를 이용한 알코올 계측 시스템은 Table 1에 나타난 바와 같이 메탄올, 부틸 알코올 등의 여러 알코올류에 대하여 같은 기질로 작용됨을 통하여 이들 물질 각각에 대한 단독 기질에 대한 측정 분석뿐만 아니라 이들이 한데 섞인 혼합알코올류에 대하여도 총량으로서 분석이 가능함을 알 수 있었다. 그러나 아세트산, 아세트알데히드 등의 기타 물질에 대하여는 이들의 존재가 효소의 반응속도에 영향이 끼침을 알 수 있는데, 이들은 catalase에 대하여 기질로 작용되지는 않지만 반응속도에는 크게 영향을 줄 수 있으므로 알코올 농도측정시 허용 농도범위 이내에 들어야 함을 알 수 있었다. 그러나 일반적인 발효액상에 적용시 용존하는 이들 아세트산과 아세트알데히드의 최대 농도는 에탄올 농도에 비하여 0.01-0.05배 정도로 적은 양이 존재하며[14], 이들 농도에서는 catalase 효소의 반응기구에 영향을 주지 않음이 실험을 통하여 관찰되었다 (Table 1의 6번 실험결과 참조). 따라서 제작된 센서는 여러 부산물이 존재하는 실제 발효조 내에 직접 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

4-3. 제작된 에탄올 센서의 특성 분석

센서의 기준전위(reference voltage)의 유지를 위하여 일정량으로 주입되는 과산화수소의 농도는 Fig. 2에서 밝혀진 바와 같이 효소 활성 저해 한계치인 20 mM로 일정하게 유지시키면서 에탄올농도를 0.625 mM에서 50 mM까지 변화시켜 각 용액에 대하여 발생된 산소를 DO 전극을 통하여 그 발생 전압을 측정하였다. 기준전위는 20 mM의 과산화수소 단독기질에 대하여 볼타메타(voltmeter)의 최종 증폭된 발생전압이 최고 100 mV가 되도록 저항치를 조절하여

Table 2. Characteristics of the developed alcohol sensor

Ethanol concentration [mM]	Avg. measured voltage [mV] \pm S.D.	Calculated voltage* [mV]	Response time [second]
1.56	94 \pm 1.3	92.21	30
3.75	82 \pm 2.8	83.32	30
7.50	72 \pm 0.5	68.06	38
16.1	33 \pm 0.5	33.08	90

*[voltage, mV] = 98.57 + (-)4.0679 \times [EtOH, mM]

측정하였다. Fig. 5를 살펴보면 에탄올 농도가 18 mM 이하에서 DO전극 전압이 선형적인 관계를 보이며 그 관계는 O_2 -amplifier전압 (mV) = $-4.068 \times [EtOH, mM] + 98.57$ 이다. 선형화 상관계수(R^2)는 약 0.967로서 비교적 선형적인 값을 얻을 수 있었다. 에탄올 검출 가능 농도는 Fig. 2와 3의 결과에서 얻어진 최적의 반응 수행에 필요한 에탄올 농도(약 5 mM)보다도 비교적 높은 수치인 18 mM 정도로 나타났는데, 이는 사용된 PVA 막(membrane) 사이의 농도 차이에 기인된 것으로 생각되며[15], Joo와 Yoo[16] 등의 실험에서도 제작된 PVA막은 과산화수소 등 대다수 기질들에 대하여 상당한 농도차이를 보이는 것으로 보고되어 있다. 그러나 막 외부에 18 mM 이상의 에탄올이 주입 시에는 출력되어 나오는 용존산소 분석기의 결과값들은 매우 불규칙한 흔들림 현상을 보였다. 제작된 센서의 재현성과 응답 지연 시간에 대한 특성 등은 Table 2에 나타나 있다. 에탄올의 농도는 약 1.5-18.1 mM로 변화시켜가며 측정을 시행하였으며, 각 농도별 측정 반복횟수는 약 4-7회씩이었다. 이 때 Fig. 5와 Table 2에 살펴볼 수 있듯이 제작된 센서는 일정농도로 주입되는 과산화수소농도 20 mM에 대하여 선형화된 calibration 값들을 가지며, 제작된 바이오센서의 응답시간은 30-90초 정도로 대체로 양호한 것으로 판명되었다. 일반적으로 본 연구에 사용된 galvanic 형태의 DO 전극의 경우 O_2 포화에 이르는 응답시간이 약 30초 정도로 알려져 있는데, 제작된 센서의 경우, 안정화된 전압치를 얻는데 알코올 농도가 7 mM 이하의 경우는 약 30-40초 정도가 소요되며, 15 mM 이상일 경우는 대체로 90초 정도가 소요되었다. 고농도 에탄올의 경우 센서의 응답속도가 느려지며 낮은 농도대의 에탄올이 첨가된 경우는 제작된 바이오센서는 상당히 빠른 응답 특성을 갖는 것으로 나타났다. 이와 같은 원인은 Fig. 3의 반응속도론적 결과에서 알 수 있듯이 반응에 참여하는 과산화수소의 양이 에탄올 농도의 증가에 의하여 점점 줄어들어 정상상태에 도달하기 위한 산소의 양을 충분히 공급하지 못한 이유와 함께 반응의 유효속단계가 에탄올과의 반응에 존재하기 때문으로 생각된다[9]. 그러나 이와 같은 응답속도는 알코올 탈수소화효소가 이용된 센서(40초 이내)보다는 느리나 알코올 산화효소를 사용하는 센서(2-5분)에 비하여 매우 빠른 응답시간을 보임을 알 수 있는데[1, 7], 이는 과산화수소 기질에 대한 catalase 효소의 빠른 반응전환율에 기인하며 과산화수소만을 이용하는 센서의 경우에도 이처럼 빠른 응답특성이 보고된 바 있다[16]. 따라서 본 연구를 통하여 제작된 알코올 측정용 바이오센서는 종전 고가의 NAD가 요구되는 알코올 탈수소화효소-NAD(H)조합형과, 주요한 문제점으로 낮은 기질 특이성과 유기산에 의한 약한 안정도를 가진 알코올 산화효소가 사용된 기존의 계측용 시스템의 단점들을 해결할 수 있었다. 따라서 제작된 catalase효소를 계측시스템으로 하는 알코올 바이오센서는 기존의 알코올 바이오센서를 대체할 수 있는 가능성을 제시하였다.

5. 결 론

에탄올 제측을 위하여 과산화수소를 산소로 전환반응시키는 효소로 잘 알려진 catalase를 이용하였다. 센서의 기본 원리는 효소에 에탄올과 과산화수소 두 기질을 경쟁 반응시켜 얻어지는 산소의 농도를 용존산소 DO 전극을 통하여 측정하는 방법을 이용하였다. 또한 센서에 사용되는 catalase의 반응속도론적인 분석을 통하여 과산화수소와 에탄올 기질 반응으로서의 타당성을 검토하였으며, 얻어진 결과를 토대로 동특성과 기질선택성 그리고 안정성이 증대된 센서를 제작하였다. 사용된 효소는 에탄올과 메탄올 그리고 부틸 알코올 등에 대하여도 기질 반응의 선택성을 보이며, 아세트산에의 안정도가 매우 높게 나타났다. 제작된 에탄올 바이오센서는 에탄올 측정 범위가 사용된 PVA막의 농도차에 기인되어 18 mM 정도까지 분석 가능하였고, 응답시간은 30-90초 이내로 우수한 측정성능을 보여주었다.

감 사

본 연구를 지원하여준 한국과학재단지원 생물공정연구센터, 그리고 실험을 도와준 이충재, 김인찬, 전홍재, 임철현에게 감사드립니다.

참고문헌

1. Aizawa, M.: *Analytica Chimica Acta*, **250**, 249(1991).
2. Turner, A. P. F., Karube, I. and Wilson, G. S.: "Biosensors", Oxford Science Publishers, Oxford(1987).
3. Winqvist, F., Danielsson, B., Lundstrom, I. and Mosbach, K.: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **7**, 135(1982).
4. Yabuki, S., Shinohara, H. and Aizawa, M.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1**, 945(1989).
5. Ishizuka, T. and Kobatake, E., Ikariyama, Y. and Aizawa, M.: "Technical Digest 10th Sensor Symposium", 73(1991).
6. Belghith, H., Romette, J. and Thomas, D.: *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 1001(1991).
7. Guilbault, G. G. and Lubrano, G. J.: *Anal. Chim. Acta*, **69**, 189 (1974b).
8. Walsh, C.: "Enzymatic Reaction Mechanisms", Freeman and Company, San Francisco(1979).
9. Schonbaum, G. R. and Chance, B.: "The Enzymes, 3rd. ed.", eds. Boyer, P., Academic Press, New York, **13**, 363(1976).
10. Chance, B. and Maehly, A. C.: "Methods in Enzymology", eds. Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Academic Press, New York, **2**, 764(1963).
11. Fromm, H. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **81**, 413(1964).
12. Dalziel, K.: *Acta Chem. Scand.*, **11**, 1706(1957).
13. Rudolph, F. B. and Fromm, H. J.: *Biochemistry*, **9**, 4660(1970).
14. Kim, J. H.: "Effects of By-Products in Ethanol Fermentation and Optimization of Ethanol Production Process", Ph.D. Thesis, Seoul National University(1993).
15. Brannon, M. L. and Peppas, N. A.: *J. Memb. Sci.*, **32**, 125 (1987).
16. Joo, H. and Yoo, Y. J.: *Biotechnol. Techniques*, **5**, 453(1991).