

NAD(P)⁺의 산화·환원반응을 촉매하는 질산염 측정센서용 전극소재의 개발

박두현 · 장민호 · 박형수* · 김무훈*

서경대학교 생물공학과
*삼성엔지니어링 기술연구소

Development of electrode material catalyzing the oxidation-reduction of NAD(P)⁺ for composition of nitrate-biosensor

D.H. Park, M.H. Chang, *H.S. Park and *M.H. Kim

Department of Biological Engineering, Seokyeong University, 16-1 Jungneung-dong,
Sungbuk-gu, Seoul 136-704, Korea

*Samsung engineering R&D center. Gongse-Ri 428-3, Kiheung-Yeup, Yongin City,
Kyungi-Do, 449-900, Korea

The NAD(P)⁺ (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) was electrochemically reduced to NAD(P)H (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen) without enzyme catalyst by using the special electrode which functions as an electrochemical catalyst. The electrode was made from kaolin, graphite powder and Mn-ion by baking at 1200°C. The neutral red was covalently bound to the electrode without Mn-ion. The modified electrode with Mn-ion function as a catalyst for reduction of NAD⁺ to NADH and that with neutral red function as a catalyst for reduction of both NAD⁺ and NADP⁺ to NADH and NADPH, respectively. Nitrate was confirmed to be reduced to nitrite coupling with oxidation of NADH which was electrochemically reduced or NADH which was commercially purchased as a chemical. Nitrate biosensor is possible to be made with the catalytic electrode but without NAD⁺-reductase or dehydrogenase.

Key word: Bioelectrochemical oxidation-reduction, Biosensor, Mn(IV)-graphite electrode, Nitrate, NAD(P)H, NAD(P)⁺

1. 서 론

질산염은 생태계의 순환물질의 최종 산물로 각종 유·무기 질소의 생물학적 산화결과 생산되는 생태계의 주요 순환물질 중의 하나이다. 그러나 하·폐수 처리과정에서 발생하는 질산염은 대부분 생태계에서 요구하는 이상의 높은 농도로 방출되기 때문에 이를 제어하려는 다양한 연구가 이루어지고 있다. 그러나 일단 방류된 처리수의 질산염을 역반복 처리하는 것이 불가능하기 때문에 방류되기 전에 정확한 질산염의 농도를 연속적으로 측정하는 것이 필요하다.¹⁻³⁾

Biosensor는 생체에서 특정한 생화학반응을 촉매하는 효소를 적당한 물리학적 device에 고정하여 효소에 의한 촉매반응을 전기신호로 전환하여 반응물질의 농도

를 측정하는 장치로 대부분 조효소의 산화-환원반응에 대한 의존성이 크다. 따라서 biosensor의 기능을 유지하기 위해서는 측정대상인 반응물질(기질)과 효소의 반응에 의해 산화 또는 환원된 조효소가 물리화학적 device(전극표면)의 표면에서 재환원 또는 재산화 반응이 지속적으로 유지되어야 한다. 그러나 전극소재로서 가장 많이 사용되고 있는 각종 소재(탄소 및 탄소의 변형체, 백금, 금, 산화티타늄 등)에 의한 조효소의 직접 산화 또는 환원이 불가능하기 때문에 이를 극복하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다.⁴⁻⁶⁾ Adenosine 유도체의 하나인 환원형의 nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)는 모든 생물에서 중심 전자 및 수소전달체로서의 기능을 갖기 때문에 약 300여 가지의 탈수소효소의 조효소로서 작용한다.⁷⁾ NADH의 nicotinamide

ring은 가역적인 산화-환원반응의 중심으로 적당한 효소의 촉매에 의해 두 개의 전자와 한 개의 proton을 수용하거나 제공할 수 있다. Glycerol dehydrogenase와 NAD^+ 를 포괄법⁸⁾으로 고정된 전극의 표면에서 효소촉매에 의해 환원된 NADH 는 NAD^+ 의 환원반응과 coupling되어 산화될 수 있기 때문에 이를 이용하면 glycerol과 NADH 의 농도를 측정할 수 있는 biosensor의 구성이 가능하다.⁷⁾ Dard 등⁹⁾은 금전극에 5-(Octyldithio)-2-nitrobenzoic acid를 물리적으로 고정하여 그 위에 효소를 glucose dehydrogenase, fructose dehydrogenase, lactate dehydrogenase 등을 추가 고정하여 제작한 biosensor로 glucose, fructose, lactate 등의 농도를 측정할 수 있는 전극을 구성하였으며, Munteanu 등¹⁰⁾ Zirconium phosphate에 고정된 electron mediator를 이용하여 NADH 의 산화반응을 촉매하는 전극을 개발하여 그 기능을 확인하였다. 지금까지 가장 많이 사용되어온 전자전달 매개체(electron mediator)는 neutral red,¹¹⁾ thionine,¹²⁾ methyl viologen¹³⁾ 등으로 이 물질들은 공통적으로 특정 조효소와 반응하여 조효소의 산화-환원 반응을 촉진시키는 기능이 있는 것으로 보고된 바 있다. 그러나 이러한 물질들은 전극에 고정시키기 복잡하고 포괄법이나, 가교법 등으로 고정할 경우 수용액으로 용출되기 쉽다는 단점이 있어 공유결합 방법에 의해 고정해야 한다는 문제가 있다. 전극에 효소나 조효소를 고정하는 방법은 공유결합법, 가교법, 흡착법, 포괄법 등⁸⁾이 있는데, 이 가운데 biosensor의 제작을 위해 가장 적당한 방법은 공유결합법이다. 그러나 금속전극에 유기물을 공유결합법으로 고정하기 어렵기 때문에 금속표면에 고분자 유기물질을 물리적인 접촉방법으로 coating하여 이 위에 효소나 조효소를 공유결합시켜 사용한다. 그러나 이 방법은 고분자 물질에 의해 효소가 직접 전극에 접촉되기 어렵기 때문에 효율이 낮다는 문제가 있다.¹⁴⁾ 이러한 문제들을 극복하기 위해 본 연구에서는 자체 제작한 전극을 열처리 하여 carboxy기를 형성한 후 이 carboxy기에 neutral red의 amino기를 peptide bond로 고정시켜 그 기능을 조효소의 산화-환원 반응과 관련된 기능을 확인하였고, Mn(IV) -ion을 물리적으로 고정시킨 탄소전극을 사용하여 neutral red를 고정시킨 전극과의 성능을 비교하였다. 또한 변형전극을 이용하여 NAD^+ 를 조효소로 이용한 biosensor의 기능을 확인하였다.

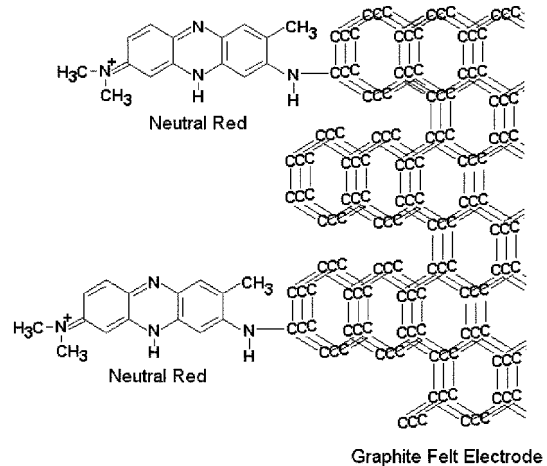


Fig. 1. Schematic structure of neutral red bound to graphite electrode. The carboxy group can be produced by heating treatment at 200 for 24 hr, to which amine of neutral red can be bound by covalent bond.¹⁵⁾

2. 실험방법 및 재료

2.1. 전극물질의 제조

전극은 55-60%(W/W)의 미세흑연분말, 30-34%(W/W)의 미세분말형의 도자기 제작용 점토 및 3-6%(W/W)의 망간이온을 혼합하여 3차 증류수로 반죽하고 일정한 형태로 넣어 고압 press(200kg/cm²)로 성형한 후 섭씨 1200도에서 12시간 동안 고온소결하여 제작하였으며, 전기화학반응기의 구조에 맞게 적당한 크기로 절단하여 사용하였다. 또한 망간이온을 배제하고 50-60%(W/W)의 미세흑연분말과 40-50% (W/W)의 도자기 제작용 점토를 혼합하여 상기와 같은 방법으로 제작한 후 섭씨 1,200도에서 12시간 동안 고온소결하여 제작한 전극의 표면에 산화-환원반응이 우수하고 조효소와 반응성이 우수한 전자전달매체인 neutral red를 Fig. 1과 같이 공유결합법으로 고정하여 다른 형태의 전극소재를 제작하였다. Mn-ion은 전극이 고온소결되는 동안 다른 무기물과 반응하여 특정한 무기물질 complex를 형성하여 용출되지 않으며, neutral red는 공유결합으로 고정되어 전극으로부터 분리되지 않으며 전극과의 전자의 교환이 용이하기 때문에 높은 반응효율을 유지할 수 있다.

2.2. 반응기의 제조¹⁵⁾

제작된 전극소재(2 cm × 5 cm × 두께 0.4 cm)를 음극

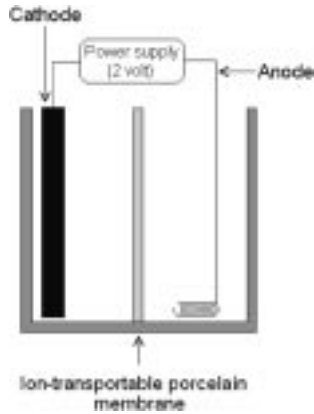


Fig. 2. Diagrammatic electrochemical cell with porcelain septum as a ion-transportable membrane, anode and cathode. The modified graphite electrode with Mn(IV) or NR was used as an anode and platinum wire was used as a cathode.

으로, 백금선(직경 0.5 mm, 길이 10 cm)을 양극으로 양극과 음극 사이에는 본 연구실에서 자체 제작한 격막(100% 도자제작용 집토, 섬씨 1,300도에서 24시간 고온소결, 두께 3 mm)을 이용하여 양극반응조와 음극 반응조가 각각 20 ml 용량의 전기화학 반응장치를 구성하였다(Fig. 2 참조). 반응기는 pyrex로 제조하였으며 양극과 음극을 구분하는 격막은 silicon을 이용하여 고정하였다. 초벌구이 도자기 격막의 Na⁺와 Cl⁻ 투과성을 전도도 변화를 이용하여 측정한 결과 72 시간 동안 격막사이의 전도도의 변화가 관찰되지 않아 Na⁺와 Cl⁻의 투과성이 없는 것으로 확인되었다. 그러나 H⁺은 투과하는 것으로 확인되었으며 반응기의 cell 저항은 250-300Ω 이었다. 이것은 기본적인 반응기의 규격 및 특성과 관련된 내용으로 data로 정리하지 않았다.

2.3. NAD(P)⁺의 전기화학적 환원

1 mM의 NAD(P)⁺(Sigma)를 100 mM Tris buffer (pH 7.0)에 용해하여 즉시 사용하였다. NAD⁺ 수용액을 준비한 반응기의 음극반응조에 넣고 양극반응조의 전해질로 200 mM NaCl을 포함하는 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)를 사용하여 직류전압 2 volt를 공급하였다. 이 때 초기의 전류값은 0.1 mA를 유지하였으나 반응이 진행되면서 점차 감소하여 최종 전류값은 0.05 mA 까지 하강하였다.

2.4. 전기화학적으로 환원된 NADH의 전기화학적 산화

전기화학적으로 환원된 NADH가 시약으로 판매하는 NADH(Sigma)와 같은 기능을 갖는지 확인하기 위하여 NADH를 환원력으로 하는 biofuel cell을 제작하여 NADH가 산화하면서 발생하는 전류값을 측정하였다. 2.3 항의 실험이 끝난 직후 음극과 양극에 전류측정기(Fluke model 8842A)를 연결하여 생산되는 전류값을 시약으로 판매하는 1 mM의 NADH를 환원력으로 하는 연료전지의 전류 생산값과 비교하였다.

2.5. 질산염과 NAD⁺를 이용한 질산염 농도측정 센서의 구성

Fig. 1의 전기화학반응장치의 cathode compartment에 100 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1.0 mM의 NAD⁺, 질산염환원기능이 우수한 세균으로부터 분리한 cytoplasmic membrane fraction (단백질 농도로서 320 μg/ml) 10%(v/v), 10 mM nitrate-potassium salt를 준비하여 10분 간격으로 전기에너지를 공급하면서 질산염이 아질산염으로 환원되는 비율을 Ion Chromatography로 측정하여 Sigma에서 판매하는 NADH를 환원력으로 첨가한 실험군과 비교하였고 control은 환원력으로 1.0 mM의 NAD⁺를 사용하였다.

2.6. 질산염환원세균으로부터 membrane fraction의 분리·정제¹⁶⁾

질산염환원세균(Pseudomonas spp)은 본 연구실에서 분리하여 characterization 한 후 -85°C에 보존한 것을 3회 계대배양하여 사용하였다. 20 litre carboy에 배양한 질산염환원세균은 원심분리(5000xg, 4°C, 30 min)를 이용하여 얻었으며, lysozyme(1 μg/ml)을 처리하여 freezing-thawing(-80°C와 4°C)을 3회 반복한 후 ultra sonicator로 파쇄하였다. 파쇄한 세균은 8,000xg 4°C에서 40분간 원심분리하여 cell debris를 제거하고 다시 150,000xg 4°C에서 3시간 동안 초고속원심분리하여 membrane fraction을 수확하였다. 수확한 membrane fraction은 molecular sieve column chromatography (sepharose G-50)을 이용하여 size-fraction하여 정제하였으며 단백질 함량은 Bradford 방법으로 정량하였다. Membrane fraction의 질산염환원 활성은 membrane fraction(단백질 농도로서 1 mg/ml)을 촉매로 수소기체를 환원력으로 하여 혐기성 via내에서 이루어졌으며 아질산염과 질산염의 농도는 Ion chromatography를 이용하여 측정하였다.

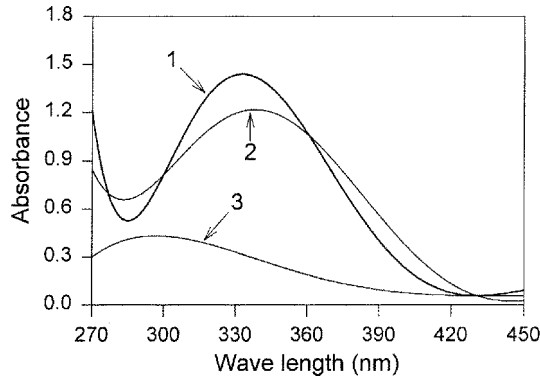


Fig. 3. Electrochemical reduction of NAD⁺ to NADH by Mn(II)-graphite electrode that is cathode and platinum wire was used as an anode. 1mM NAD⁺ solution in Tris-HCl buffer (100mM, pH 7.0) was catholyte and 100 mM NaCl and 100mM potassium phosphate buffer solution in DDW was anolyte. The spectrum 1 is for 0.5 mM NADH, the spectrum 2 of NADH which is treated with Mn(II)-graphite electrode and the spectrum of 1mM NAD⁺ that is treated with non-modified graphite electrode and was not reduced.

3. 결과 및 고찰

NAD⁺는 생체내에서 효소에 의해서만 환원이 가능한 조효소로 시험관내에서는 다양한 electron mediator를 사용하여 환원된 NADH를 NAD⁺로 산화되는 것으로 보고되고 있다.¹⁷⁾ 그러나 이와같은 산화반응은 효소에 의해 환원된 NADH를 기질로 이용하는 반응에 제한되기 때문에 NAD⁺의 환원과 관련된 반응에 적용할 수 없다는 단점이 있고, NAD⁺/NADH의 recycling 통한 산화-환원반응과 관련된 반응기를 구성하는데 이용할 수 없다는 문제가 있다. 이를 해결하기 위해서는 NAD⁺/NADH의 산화-환원반응을 가역적으로 촉진시키는 전극을 개발하는 것이 필요하다. 전극을 촉매로 사용하는 경우 산화-환원반응에 필요한 추가의 산화력과 환원력을 공급할 필요없이 전극자체가 산화제와 환원제의 기능을 하기 때문에 단순하고 정확한 반응을 유지하는데 유리하다. Fig. 3과 4에서 보는 바와 같이 특정한 전자전달 매개체나 촉매없이 Mn-ion을 고정시킨 전극의 촉매작용과 전기에너지의 환원력에 의해 NAD⁺는 NADH로 환원되었으며, neutral red를 고정시킨 전극에서는 각각 NAD⁺와 NADP⁺는 NADH와 NADPH로 환원되었다. 이것은 전극에 고정된 Mn-ion과 neutral red가 전극의 전기에너지에 의해 환원된 후

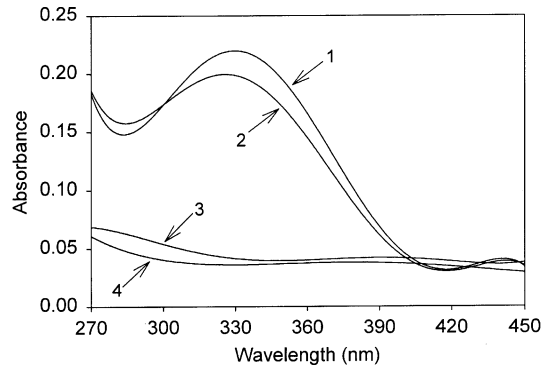


Fig. 4. Electrochemical reduction of NAD⁺ and NADP⁺ to NADH and NADPH by the modified graphite electrode with Mn(IV) and neutral red (NR) which was covalently bound to the electrode. The modified electrode is a cathode and Platinum wire was used as an anode. 1mM NAD⁺ or NADP⁺ solution in Tris-HCl buffer (100mM, pH 7.0) was catholyte and 100 mM NaCl and 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) mixture was anolyte. The spectrum 1 is for 0.5 mM NADH and spectrum 2 is NADPH reduced by the modified graphite electrode with NR. The spectrum of 3 and 4 are for NAD⁺ and NADP⁺, respectively, which are treated with non-modified graphite electrode.

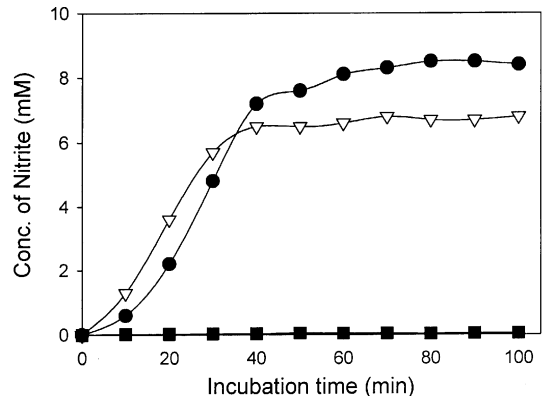


Fig. 5. Reduction of nitrate to nitrite coupled to oxidation of NADH, which was catalyzed by cytoplasmic membrane fraction isolated from *Pseudomonas spp.*. The electrochemically reduced NADH (●), commercially purchase NADH (▽) and NAD⁺ (■) were used as a reducing power, respectively.

전자를 NAD(P)⁺로 전달하는 기능에 의한 것으로 생각된다. Fig. 5는 질산염센서를 제작하기 위한 기초실험의 결과로 전기화학적으로 환원된 NADH의 환원력과 질산염 환원효소의 촉매에 의해 질산염이 아질산염으로 환원되었다. 비교실험으로 시약으로 판매하는

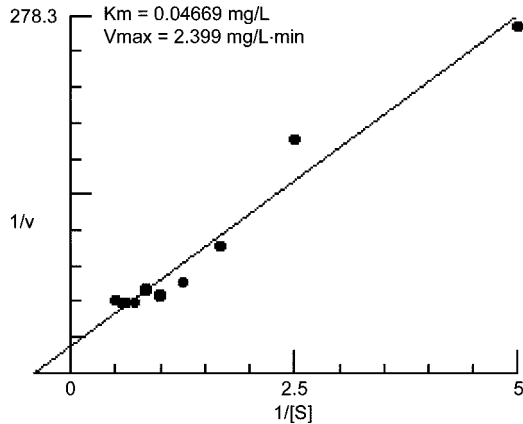


Fig. 6. Enzyme kinetics of nitrate reductase separated from denitrifying bacteria. The K_m and V_{max} were calculated by Lineweaver-Burk plot. The minimal detection limit can be determined by the K_m value, from which the theoretical detectable concentration of enzyme sensor can be estimated to be 0.047 mg/L.

원된 NADH를 사용한 결과에 비해 낮은 농도의 아질 산염이 생성되었다. 이것은 질산염의 환원 반응과 coupling되어 산화된 NAD⁺가 전기에너지 및 전극의 촉매반응에 의해 NADH로 환원되어 환원력의 양이 높은 농도로 유지되었기 때문으로 생각된다.

이와 같이 질산염 환원효소의 촉매에 의한 질산염의 환원과 coupling된 NADH의 산화는 음극과 reference 전극간의 potential 차이로 나타나기 때문에 질산염의 농도를 측정할 수 있는 potentiometric sensor의 제작이 가능하다. Biosensor는 효소와 기질의 반응결과 발생한 potential 차이 또는 current를 전기신호로 전환하여 농도에 따른 차이를 비교함으로써 즉시적이고 재현성이 높은 정량적인 분석 system으로 전극과 효소 사이에 복잡한 효소나 factor 또는 binder 등을 사용할 경우 신호의 전달속도나 반응 후 회복능력, 재현성 등에 문제가 발생할 수 있다. 따라서 전극과 효소와 반응 물질이 항상 쉽게 접촉할 수 있는 단순한 system이 유리하다. 따라서 본 연구에서 개발한 촉매형 전극은 상기의 sensor용 소재로 적합한 물질이라고 생각된다.

한편, 분리한 membrane fraction의 질산염 환원 활성은 Michaelis-Metens 방법으로 측정하여 Lineweaver-Burk 식에 대입하여 계산하였다. Fig. 6에서 보는바와 같이 K_m 값은 0.04669 mg/L이고 V_{max} 는 2.399 mg/L·min으로 기질 친화성이 비교적 높게 나타나 센서용 촉매로 적당한 것으로 판단된다.

4. 결 론

전기화학적으로 NAD⁺를 환원하려는 연구는 다양하게 진행되어 왔으나 일방적으로 산화 또는 환원반응만 가능한 것으로 나타났다. 본 연구에서는 biosensor, biotransformation, bioconversion, biocatalyst 등의 분야에서 필수적으로 요구되는 NADH를 효소의 촉매없이 직접 전기화학적으로 환원할 수 있는 방법을 개발함으로써 다양한 분야에서의 요구에 충족할 수 있는 보다 효율적인 촉매의 개발이 가능해지게 되었다.

감사의 글

본 연구는 차세대핵심환경기술개발사업지원으로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Yun, D.I., Lee, J.J., Kim, D.W. and Lee, K.Y., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1998**, 26, 96-101.
- 2) Akunm, J.C., Bizequ, C. and Motetta, R., *Wat. Res.*, **1993**, 27, 1303-1312.
- 3) Cole, J., *Tibtech.*, **1993**, 11, 368-372.
- 4) Pariente, F., Lorenzo, E. and Abruna, H.D., *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 4337-4344.
- 5) Nowall, W.B. and Kuhr, W.G., *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 3583-3588.
- 6) Samphath, S. and Lev, O., *J. Electroanal. Chem.*, **1998**, 446, 57-65.
- 7) Alvarez, G.M.I., Saidman, S.B., Lobo-Castanon, M.J., Miranda, O.A.J. and Tunon, B.P., *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 520-527.
- 8) Boyer, R.F., "Modern experimental biochemistry", 2nd edit. **1993**, Benjamin/Cummings Publishing Company, USA.
- 9) Darder, M., Casero, E., Pariente, F. and Lorenzo, E., *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 3784-3792.
- 10) Munteau, F.D., Kubota, L.T. and Gorton, L., *J. Electroanal. Chem.*, **2001**, 509, 2-10.
- 11) Park, D.H. and Zeikus, J.G., *J. Bacteriol.*, **1999**, 181, 2403-2410.
- 12) Thurston, C.F., Bennetto, H.P., Delaney, G.M., Mason, J.R., Roller, S.D. and Stirling, J.L., *J. Gen. Microbiol.*, **1985**, 131, 1393-1401.
- 13) Park, D.H., Kim, B.H., Moore, B., Hill, H.A.O., Song, M.K. and Rhee, H.W., *Biotech. Tech.*, **1997**, 11, 145-148.

- 14) Shuler, M.L. and Kargi, F., “*Bioprocess Engineering: Basic Concepts*”, 1993, Prentice Hall International Series in the Physical and Chemical Engineering Science.
- 15) Park, D.H. and Park, Y.K., *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 11, 406-411.
- 16) Park, D.H., Laiveniaeks, M. Guettler, M.V., Jain, M.K. and Zeikus, J.G., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65, 2912-2917.
- 17) Willner, I. and Willner, B., *TRENDS in Biotechnology.*, 2001, 19, 222-230.
- 18) Miyawaki, O. and Yano, T., *Microbiol. Technol.*, 1993, 15, 525-529.