

Radical Transfer 반응을 이용한 Polypyrrole

효소전극의 효소고정화 향상

Improvement in Enzyme Immobilization of Polypyrrole

Enzyme Electrode using Radical Transfer

김현철, 조영재, 구할본

(Hyuncheol KIM, Young-Jai Cho, Hal-Bon Gu)

Abstract

In the case of immobilizing of glucose oxidase into polypyrrole (PPy) using electrosynthesis, the glucose oxidase (GOx) forms a coordinate bond with the polymers backbone. However, because of intrinsic insulation and net-chain of the enzyme, the charge transfer and mass transport are obstructed during the film growth. Therefore, the film growth is dull. We synthesized the enzyme electrode by electropolymerization added some organic solvent. A formative seeds of film growth is delayed by adding ethanol. The delay is induced by radical transfer between ethanol and pyrrole monomer. The radical transfer shares the contribution of dopant between electrolyte anion and GOx polyanion. This may lead to increase amount of immobilized the enzyme in PPy. For the UV absorption spectra of synthetic solution before synthesis and after, in the case of ethanol added, the optical density was slightly decreased for the GOx peaks. It suggests amount of GOx in the solution was decreased and amount of GOx in the film was increased.

We established qualitatively that amount of immobilization can be improved by adding a little ethanol in the synthetic solution. It is due to radical transfer reaction. The radical transfer shares the contribution of dopant between small and fast electrolyte anion and big and slow GOx polyanion.

Key Words (중요용어) : Polypyrrole(폴리피롤), Enzyme electrode(효소전극), Glucose oxidase(포도당 산화효소) Radical transfer

1. 서 론

효소를 이용한 바이오센서 연구에 있어서, 최근의 연구들은 효소고정화 기술 개발에 초점을 맞추고 있다. 전극으로의 효소고정화는 센서의 재사용, 효소의 안정화 및 가수분해나 열화로부터 효소의 보호 등과 같은 장점이 있다[1]. 효소고정화에 있어서 요소기술은 효소의 안정화 및 효소와 전극재료와의 전기화학적 coupling이다[2]. 이러한 목표를 위하여 효소전극에 대한 활발한 연구가 진행되어 오고있다[3].

아울러 생화학적 반응의 증진을 위하여 위에서 언급한 고정화 기술 외에도, 효소의 고정화 양의 향상에 대한 많은 연구가 시도되고 있다. 이에 대한 대표적인 예가 gel matrix, cross-linking 및 전해중합에

의한 효소의 고정화이다. 실제로 gel matrix와 cross-linking에 의한 효소의 고정화는 고정화 양에 있어서는 성공적이다. 그러나 전자는 기질 확산에 대한 장벽을 형성하여 효소 활동도의 손실을 야기시킨다. 후자는 효소에 손상을 일으킬 가능성이 크며, 고정화에 대한 견고성이 미약하다.

한편, 전해중합에 의해 도전성 고분자에 효소를 고정화 시키는 경우, 효소는 고분자의 주쇄에 정전 상호작용에 의하여 배위하게 된다. 그러나, 효소의 본질적인 절연성과 사슬구조 때문에, 중합하는 동안에 전하수수와 물질이동이 제한된다. 고정화 양을 향상시키기 위하여 중합액에 보다 많은 효소를 첨가하면, 고분자 필름의 성장이 둔화되고, 심지어는 필름이 성장하지 않는 경우도 있다.

따라서, 본 연구에서는 polypyrrole (PPy)에 glucose oxidase(GOx)를 고정화 시키는 경우, 중합액에 소량

전남대학교 전기공학과

(광주시 북구 용봉동 300, FAX : 062-530-0077,

E-mail : hbgu@chonnam.chonnam.ac.kr)

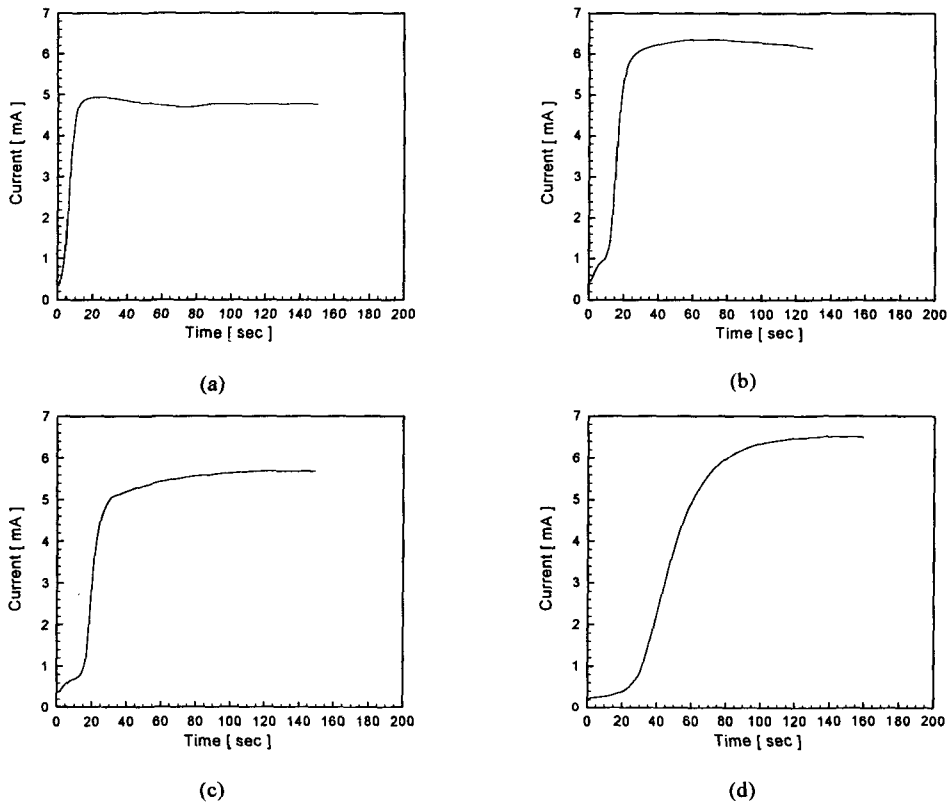


그림1. PPy의 전해중합 동안 전류의 변화. (a) 중합액(pyrrole, KCl). (b) 중합액에 0.1 mol dm^{-3} ethanol 첨가. (c) 중합액에 0.1 mol dm^{-3} THF 첨가. (d) 중합액에 0.5 mg ml^{-1} GOx 첨가.

Fig.1. Chronoamperometry for PPy film growth. (a) Synthetic solution (pyrrole, KCl). (b). 0.1 mol dm^{-3} ethanol added in the synthetic solution. (c) 0.1 mol dm^{-3} THF added in the synthetic solution (d) 0.2 mg ml^{-1} GOx added in the synthetic solution.

의 유기 용매를 첨가하여, pyrrole 모노머와 유기 용매간의 radical transfer 반응에 의한 GOx의 고정화 향상에 대하여 발표한다.

2. 실험 방법

PPy-GOx 효소전극은 0.2 mol dm^{-3} pyrrole (Sigma) 수용액에 0.1 mol dm^{-3} potassium chloride (Aldrich), 0.5 mg ml^{-1} 의 GOx (Sigma, Type II)를 혼합하고, 0.1 mol dm^{-3} ethanol 또는 tetrahydrofuran (THF)을 첨가하여 $+0.8 \text{ V vs. Ag|AgCl}$ 의 포텐셜을 300 mC cm^{-2} 동안 인가하여 전해중합법으로 제조하였다.

중합반응 동안에 전류의 경시적 변화는 WPG 100 potentiostat / galvanostat (WonA Tech)을 사용하여 측정하였다. 전해중합 전후에 있어서 중합액의 UV 흡

수 스펙트럼은 Hitachi U3501 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

그림1은 PPy의 전해중합 동안에 전류의 경시적 변화를 측정한 것이다. 그림1(a)의 경우, 중합 초기에 급속한 전류의 상승을 보인다. 이것은 기판전극의 표면에 중합 핵의 형성이 신속하게 이루어지고, 필름의 성장에 지연이 발생하지 않는 것을 보여준다. 한편, 중합액에 ethanol을 첨가한 그림1(b)의 경우, 포텐셜을 인가한 초기에 중합 핵의 형성에 약간의 지연이 발생하며, 그 이후 필름의 성장에는 지연이 거의 발생하지 않고 정상 상태의 전류가 얻어진다. 이때, 초기의 지연은 pyrrole 모노머와 ethanol간의

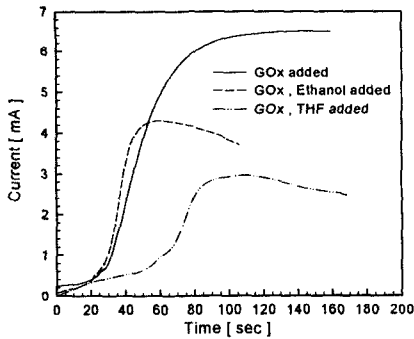


그림2. PPy-GOx효소전극의 전해중합 동안 전류의 경시적 변화
Fig.2. Chronoamperometry for PPy-GOx enzyme electrode. film growth

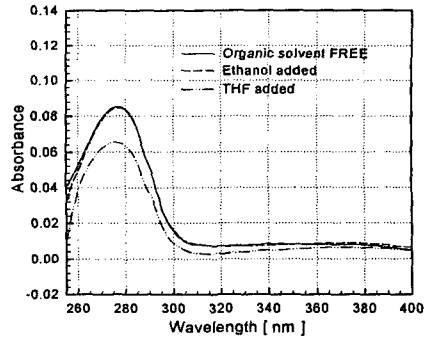


그림3. 중합액의 중합 전 자외선 흡수 스펙트럼
Fig.3. UV absorption spectra of the synthetic solution before synthesis.

radical transfer반응에 기인하며 중합 핵의 형성에 지연을 초래한다.

이것은 Xiabin Jing 등에 의해 보고된 유기용매와 radical cation 모노머와의 radical transfer반응이다.[4] 그림1(c)와 같이 중합액에 THF가 첨가된 경우, 초기의 중합 핵의 형성이 그림1(b)의 경우보다 약 2배정도 지연되는 것을 볼 수 있다. 이것은 THF와의 radical transfer반응이 ethanol에서보다 더 활발하게 발생하는 것을 시사한다. 한편, 중합액에 GOx를 첨가한 그림1(d)의 경우, 중합 핵의 형성은 더욱 지연되고, 필름의 성장에도 지연이 발생한다. 중합 핵 형성의 지연에 있어서, GOx는 전극 표면 근처에서 radical cation 모노머의 확산에 대하여 blocking 역할을 한다. 또한 중합 초기에 포텐셜의 일부가 GOx의 산화에 이용되기 때문에 중합 핵 형성이 지연된다. 실제로 중합동안에 용액의 pH는 약 4~5정도로 낮아진다. 이것은 GOx의 산화에 따라 전기 중성상태의 유지를 위하여 polypeptide 구조를 가지고 있는 GOx의 말단 carboxyl기에서 proton이 탈리가 되기 때문이다[5]. 필름 성장에 있어서의 지연은 고분자와 배워하는 GOx가 절연성을 가지고 있으며, 사슬구조 때문에 물질의 이동이(음이온의 도핑) 제한되기 때문이다.

그림2는 중합액에 GOx를 첨가하여 중합한 경우, 전류의 경시적 변화이다. GOx와 ethanol을 첨가한 경우, 중합초기 중합 핵의 형성에 대해서 ethanol에 의한 radical transfer보다 GOx에 의한 blocking의 영향이 우세하기 때문에, GOx만을 첨가한 경우의 전류 응답과 유사하다. 그러나 필름의 성장에 있어서, radical

transfer의 영향에 의한 짧은 사슬의 고분자가 얻어지고, 도핑 수준이 낮아진다. 그러므로 중합 속도와 직접 비례하는 중합전류도 낮아지게 된다. 한편, GOx와 THF를 첨가한 경우에는 중합초기의 중합 핵 형성에 더 큰 지연이 발생하는 것을 볼 수 있다. 이것은 GOx에 의한 blocking과 radical transfer에 의한 영향이 복합적으로 나타나기 때문으로 생각된다. 또한 THF가 GOx와 상호 작용을 하는 것으로 생각할 수 있다. 그림1의 (b) 및 (c)의 비교에서 알 수 있듯이, 모노머와THF와의 radical transfer반응이 ethanol보다 더 활발하기 때문에 더욱 짧은 사슬의 고분자가 얻어지고, 도핑 수준도 더욱 낮아질 것으로 판단된다. 그러므로 그림2에서 보는 바와 같이, 중합되는 전류도 더욱 낮아진다.

그림3은 중합액에 대한 중합 전 자외선 흡수스펙트럼이다. 중합액은 pyrrole 수용액에 KCl 전해질, GOx 및 유기용매를 첨가하였다. 기준용액은 GOx를 제외한 중합액이다. 그림에서 알 수 있듯이, 275nm에서 흡수 피크가 나타났다. 이것은 용액의 GOx에 의한 피크이다. 용액에 ethanol을 첨가한 경우, GOx의 흡수강도에 거의 변화가 없음을 알 수 있다. 한편THF를 첨가한 경우, GOx의 흡수 강도가 약화되는 hypochromic 효과가 나타난다. 이것은 GOx와 THF간에 상호작용이 있음을 시사한다.

한편, 중합 후의 용액에 대한 자외선 흡수 스펙트럼은 그림4에 나타낸다. 그림에서 볼 수 있듯이 흡수 피크는 285nm와 335nm에서 나타난다. 전자는 GOx의 흡수에 의한 것이고, 후자는 용액에 남아있는 pyrrole oligomer에 대한 흡수 피크이다.

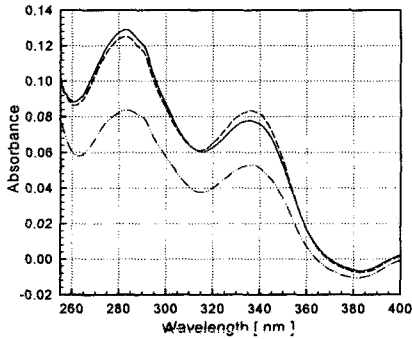


그림4. 중합액의 중합 후 자외선 흡수 스펙트럼
Fig.4. UV absorption spectra of the synthetic solution after synthesis.

GOx의 흡수에 대한 피크는 그림3의 275nm보다 10nm bathochromic shift를 보인다. 이것은 GOx에서 어떠한 치환이 발생한다는 것을 의미하며, 물론 포텐셜 인가로 발생하는 GOx의 산화 등에 기인한 것으로 생각된다. 285nm에서 ethanol의 첨가에 의하여 흡수 피크는 약간 감소하는 양상을 보인다. 이것은 용액에서 GOx 양이 감소하였으며, 필름으로 고정화 되는 GOx 양은 증가하였음을 시사한다. 한편, ethanol의 첨가에 의해 335nm의 pyrrole oligomer 피크는 증가하였다. 이것은 모노머와 ethanol간의 radical transfer 반응에 기인하며, 결과적으로 짧은 사슬의 고분자가 형성되고, 용액 중에 남게 되는 oligomer 양의 증가를 초래한다.

그림5는 중합 후 존재하는 pyrrole oligomer에 대한 UV 흡수 스펙트럼이다. 중합용액의 구성은 pyrrole 수용액에 KCl 지지 전해질 및 유기 용매의 첨가로 이루어졌다. 한편, GOx는 용액에 첨가되지 않았다. 기준용액은 중합용액과 동일한 용액으로 하였다. 그림에서 295nm와 335nm에서 oligomer에 대한 흡수 피크를 관측할 수 있다. 두 흡수 피크 가운데 전자는 그림4의 285nm 피크의 shoulder로 반영이 되고, 후자는 그림4에 그대로 나타난다. 용액에 ethanol이 첨가된 경우, 335nm에서 흡수강도가 약간 증가하였다. 이것은 radical transfer반응에 기인하며, 용액에 oligomer의 증가를 초래한다. 한편, THF가 첨가된 경우, 흡수강도는 훨씬 증가하였다. 이것은 THF와의 radical transfer반응이 더욱 활발하다는 것을 시사하며, 그 결과 용액 내부에 더욱 많은 oligomer가 발생한다.

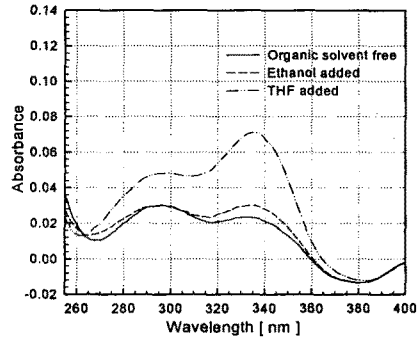


그림5. 중합 후 pyrrole oligomer에 대한 자외선 흡수 스펙트럼
Fig.5. UV absorption spectra of pyrrole oligomer in the solution after synthesis.

그러나 이 흡수강도는 GOx가 존재할 때, 그림4에서와 같이 용액의 흡수 피크에 충분히 반영되지 못한다. 그것은 THF가 GOx와 상호작용을 일으키기 때문으로 생각된다.

4. 결 론

우리는 이 연구를 통하여 전해중합법으로 PPy-GOx 효소전극을 제조하였으며, 중합 용액에 소량의 ethanol을 첨가함으로써 GOx 고정화 양이 향상될 수 있음을 전기화학적/광학적 정성 분석을 통하여 보였다.

참고문헌

- [1] M. P. Byfield and R. A. Abuknesha, Biochemical aspects of biosensors, *Biosensors & Bioelectronics*, Vol.9, pp.373-400, 1994
- [2] N. C. Foulds and C. R. Lowe, Enzyme Entrapment in Electrically Conducting Polymers, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, Vol.82, pp.1259-1264, 1986.
- [3] M. Umana and J. Waller, Protein-Modified Electrodes. The Glucose Oxidase/Polypyrrole System, *Anal. Chem.*, Vol.58, pp.2979-2983, 1986.
- [4] Y. Geng, J. Li, Z. Sun, X. Jing and F. Wang, Polymerization of aniline in an aqueous system containing organic solvents, *Synthetic Metals*, Vol. 96, pp. 1-6, 1998.
- [5] H. C. Kim and H. B. Gu, Effect of Organic Solvent on the Electrochemical Immobilization of Glucose Oxidase into Polypyrrole Film, *J. Soc. Elect. Mat. Eng.*, Vol. 9, No. 2, 2000