

Polypyrrole-Glucose Oxidase 효소전극의 전기화학적 특성: 1. 효소전극의 산화환원에 대한 Glucose Oxidase의 영향

Electrochemical Properties of Polypyrrole-Glucose Oxidase Enzyme Electrode: 1. An Influence of Glucose Oxidase on Redox Behavior of Enzyme Electrode

김현철*, 구할본*, 사공 건**
(Hyun-Cheol Kim*, Hal-Bon Gu*, Geon Sa-Gong**)

Abstract

Glucose oxidase was immobilized in polypyrrole by electrosynthesis. The enzyme had an influence on the redox properties of a complex enzyme electrode. In the cyclic voltammograms of the enzyme electrode, new peaks were appeared at the potential around 0.7 V vs. Ag/AgCl in addition to the typical peaks for polypyrrole. The more immobilized, the stronger the peaks became. During the cycling, the pH of electrolyte solution was decreased to about 4.4. The reason for that is to be the proton released from the carboxyl in the glucose oxidase in order to keep on a charge neutrality of the oxidized enzyme. This fact suggests that the new peaks in the voltammograms are caused by the redox of glucose oxidase.

In the AC impedance spectrum analysis of the electrode, the diffusion of electrolyte anion was limited because of chained structure of the enzyme. The faradic impedance was large since the glucose oxidase is an insulator. Therefore, when glucose oxidase is entrapped, the enzyme should be limited in amount. Because the growth of the polypyrrole is accompanied both charge transfer and mass transport. For the traditional electrosynthesis, that means amount of enzyme present in the electrode is limited to as much as film growable.

Key Words(중요용어) : Polypyrrole(폴리피롤), Enzyme electrode(효소전극), Glucose oxidase(포도당 산화 효소), Michaelis-Menten constant(기질친화력)

1. 서론

혈중 포도당 농도의 자가진단이 당뇨병 관리의 근간으로 1978년 발표된 이래, 지난 20년간 포도당 감지에 대한 메커니즘과 그에 대한 기술은 날로 발전하여 왔다. 분광시스템에 비해 바이오센서는 간편할 뿐만 아니라 소형이고 저가이기 때문에 병원 및 가정에서 환자관리용으로 그 사용이 증대되고 있다.

이러한 상업적 요구에도 불구하고, 바이오센서 기

술에는 당면해 있는 몇 가지 과제가 있다. 생체에서 분리된 생물학적 감지물질(효소, 항체, 수용체 및 세포)의 안정성과 고정화 전략 및 전자 변환기 기술이 그것이다[1,2]. 고정화 전략에 있어서, 고정화 자체뿐만 아니라 변환기 기술로의 연계에 유리한 것이 효소전극이며[3], 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[4,5]. 기질의 산화환원 등의 양자화 된 전기화학적 특성을 이용하는 효소전극은 생화학적 반응과 아울러 전기화학적 반응을 수반한다. 그러므로 전극의 표면부에 효소의 안정적인 고정화와 전기화학적으로 활성인 전극-효소의 복합체가 요구된다. 고정화 전략의 핵심은 효소와 전극간의 효과적인 물리적 및 전기화학적 결합과 그 안정성이다.

* 전남대학교 전기공학과
(광주광역시 북구 용봉동 300, Fax: 062-530-0077,
E-mail : hbgu@chonnam.chonnam.ac.kr)

** 동아대학교 전기공학과
2000년 3월 23일 접수, 2000년 5월 29일 심사완료

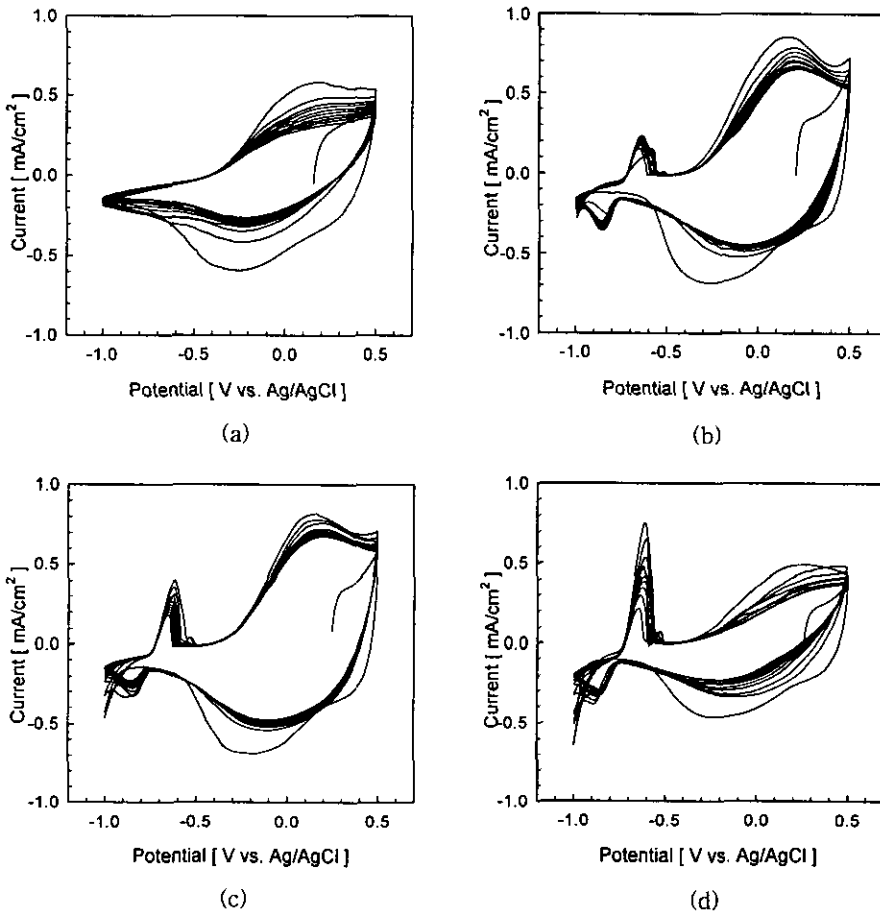


그림 1. 전해중합으로 제조한 PPy 및 PPy-GOx 효소전극의 순환 전압전류 특성. (a) PPy. (b) 0.5 mg/ml GOx를 포함하는 용액에서 제조한 PPy-GOx. (c) (b)와 동일한 샘플이고, 순환 전압전류 측정 전해질에 20 mmol/dm³ 포도당 첨가. (d) 1.0 mg/ml GOx를 포함하는 용액에서 제조한 PPy-GOx.

Fig. 1. Cyclic voltammograms of PPy and PPy-GOx enzyme electrode. (a) PPy. (b) PPy-GOx prepared in the solution with 0.5 mg/ml GOx. (c) The same membrane as (b) but cycled in the electrolyte with 20 mmol/dm³ glucose added. (d) PPy-GOx prepared in the solution with 1.0 mg/ml GOx.

도전성 고분자는 공역계의 발달로, 본질적으로 전기화학적 활성을 가지고 있다. 이러한 도전성 고분자에 효소를 고정화시키면, 효소는 고분자의 사슬에 물리적으로 고정화될 뿐만 아니라, 고분자 사슬과 효소간에는 정전 상호작용이 발생하여 전하 수수 등 전기화학적 결합을 유지하게 된다[6].

그러나 효소가 본질적으로 절연성이고, 폴리 펩타이드 구조를 가지기 때문에, 고정화 양을 증가 시킬 경우 도전성 고분자의 성장 및 전기화학적 결합에 문제를 야기시킨다. 한편, 고정화 양을 감소 시키게 되면 생화학적 반응이 저하하여 효소 전극으로서 성

능을 기대하기 어렵게 된다.

따라서 본 연구에서는 효소가 고정화되는 경우, 효소-도전성 고분자 복합체의 전기화학적 특성에 효소의 고정화가 미치는 영향에 대한 연구결과를 보고한다.

2. 실험방법

효소전극은 전해중합법으로 polypyrrole (PPy)에 glucose oxidase (GOx)를 고정화하여 제조하였다. 효소전극의 제조 방법은 0.2 mol/dm³ pyrrole (SIGMA), 0.1 mol/dm³ KCl (ALDRICH)에 0.5 또는

1.0 mg/ml GOx (TYPE II, SIGMA)를 첨가한 수용액에 In₂O₃-SnO₂ (ITO) 코팅 유리를 작업전극, 백금선 및 Ag | AgCl을 대향전극과 참조전극으로 사용하여, 전형적인 3전극 시스템을 사용하여 +0.8 V vs. Ag | AgCl로 300 mC/cm² 동안 전해중합법으로 합성하였다. 모든 포텐셜은 Ag | AgCl 참조전극에 대한 값이다.

순환 전압전류 특성의 측정은 0.5 mol/dm³ KCl 수용액에서 10 mV/s의 주사속도로 -1.0 V ~ +0.5 V 범위에서 수행하였다. PPy와 PPy-GOx 효소전극에 대하여 포텐셜 주사 동안 용액의 pH 변화를 모니터링하였다. Zahner Elektrik의 IM6 시스템을 이용하여 주파수 변화에 따른 PPy 및 효소전극의 교류 임피던스 응답을 측정하였으며, 이 때 리플은 5 mV 이고, 주파수 범위는 2 MHz ~ 0.01 Hz로 하였다.

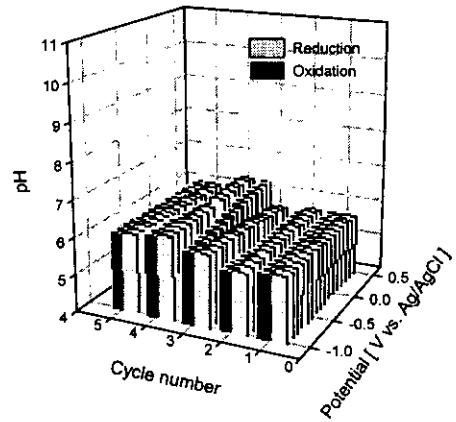
포도당 주입에 따른 효소전극의 감지전류의 측정은 1 mmol/dm³ p-quinone을 포함하는 0.1 mol/dm³ phosphate buffer(pH 7.0)에서 +0.35 V를 인가하여, 전류응답의 경시적 변화를 측정하였다.

3. 실험결과 및 검토

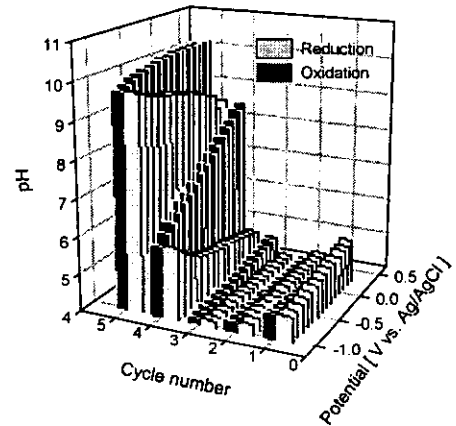
GOx의 등전점(等電點)이 4.2이기 때문에 pH 7.0 인 중합액에서는 음으로 대전이 되어 polyanion으로서 PPy의 주 사슬과 정전 상호작용을 하며 복합체를 형성한다.

그림 1은 전해중합법으로 제조한 PPy 필름 및 PPy-GOx 효소전극의 순환전위에 따른 전류응답이다. 그림 1(a)는 PPy의 전형적인 산화환원 곡선이며, 0 V 부근에서 산화환원 피크가 관측되었다. 한편, PPy-GOx 복합체의 전류응답에 해당하는 그림 1의 (b), (c), (d)에서는 PPy의 전형적인 피크 외에 약 -0.7 V와 0.9 V 부근에서 새로운 산화환원 피크들이 관측되었다. 이것은 비교적 짧은 고분자 사슬의 영향과 GOx의 산화환원에 의한 것 등의 두 가지 경우로 생각할 수 있다.

첫째, GOx가 PPy의 주 사슬과 배위하여 필름에 혼입되는 경우 PPy의 주 사슬은 고도로 발달하지 못하게 되는데, 그것은 GOx의 절연성과 폴리펩타이드 사슬 구조의 물질이동 방해에 기인한다. 그 결과 여러 개의 짧은 사슬들이 분포하게 된다[7]. 이러한 사슬들의 상호작용과 도핑이 전자의 파동함수에 영향을 주어 밴드갭 내에 새로운 에너지 준위가 형성되는 것으로 생각할 수 있다. 이것은 Bredas 등[8]에 의하여 제안된 경험적인 비교 즉, valance effective Hamiltonian 계산과 전기화학 실험의 측정과의 비교



(a)



(b)

그림 2. 순환 전압전류 특성의 측정 중 용액의 pH 변화. (a) PPy. (b) PPy-GOx 효소전극.

Fig. 2. Variation of pH in the solution during the potential swing. (a) PPy. (b) PPy-GOx enzyme electrode.

로 산화가 시작되는 포텐셜에서 이온화에너지를 계산할 수 있다[9]. PPy 전형적인 피크에 대한 이온화 에너지는 약 4.1 eV이고, 새로운 피크에 대한 이온화 에너지는 약 3.7 eV이다. 이것은 밴드갭 내부에 억셉터 준위의 존재를 뒷받침한다.

둘째는 PPy-GOx 효소전극의 산화환원 특성에서 발생하는 새로운 피크는 GOx 자신의 산화환원에 의한 것으로 생각할 수 있다. 즉, 그림 1(b)는 KCl 수용액에서의 산화환원 특성이며, 그림 1(c)는 KCl수용액에 포도당을 첨가한 경우의 산화환원 특성이다.

이들의 비교에서 -0.7 V 부근에서 발생한 새로운 피크의 산화파는 포도당을 첨가한 경우에 조금 강해지는 것을 관측할 수 있다. 이것은 고정화된 산화상태의 GOx와 기질과의 반응을 시사하며, 또한 이 새로운 피크가 GOx의 산화환원에 의한 영향을 내포하고 있음을 의미한다.

그림 1(b)와 그림 1(d)의 비교를 통하여, 중합액에 첨가하는 GOx의 양을 2배 증가시켜 합성한 효소전극의 경우, 새로운 피크의 산화파의 강도가 약 2배 증가하는 것이 관측되었다. 이것은 효소 고정화 양의 증가로 인하여, GOx의 산화환원 영향이 강하게 반영되는 것을 의미하며, 또한 PPy의 주 사슬과 배위하는 GOx가 불순물로서의 영향과 자신의 산화환원에 대한 영향을 효소전극에 반영하는 것을 시사한다. 한편, 환원파의 경우에는 피크의 강도가 거의 변화가 없는데, 이것은 GOx의 산화과정 동안에 carboxyl 기에서 탈리한 H⁺가 대향전극에서 소모되어 버리기 때문에 환원과정 동안에 복귀하지 못하고 용액의 H⁺만이 전하 중성상태를 유지하기 위하여 이용되기 때문에 환원파의 피크는 거의 변화가 없는 것으로 생각된다.

그림 2는 PPy와 PPy-GOx 효소전극에 전위를 주사하는 동안에 용액의 pH 변화를 각 사이클마다 측정하는 것이다. 그림에서 한 사이클은 회색막대(환원파)와 흑색막대(산화파)로 이루어진다. 그림 2(a)는 PPy의 산화환원 과정동안에 용액의 pH 변화이다. 사이클에 따른 pH 변화는 크지 않으며 거의 일정한 것을 알 수 있다. 한편, 그림 2(b)는 PPy-GOx의 경우인데, 포텐셜 인가와 동시에 PPy에 고정화된 GOx가 산화반응을 시작하고, GOx 자체의 전하 중성상태를 유지하기 위하여 폴리펩타이드 구조의 말단 carboxyl 기의 H⁺가 탈리된다. 그 결과 용액의 pH는 감소하게 되며, 사이클이 진행됨에 따라 용액의 pH는 약 4.4까지 감소하였다. 그러나, 세 번째 사이클 이후에 pH는 증가하기 시작하는데, 이것은 등전점이 4.2인 GOx가 pH 4.4에서 거의 중성상태가 되어 더 이상 polyanion으로서 PPy의 주 사슬과 정전 상호작용을 할 수 없기 때문이다. 그렇게 되면 PPy 사슬의 전하 중성상태 유지는 전해질 음이온만의 몫이 된다. 그 이후의 사이클은 H⁺의 공급원이 차단된 상태에서 용액의 H⁺를 소모하여 결국 용액의 pH는 상승하게 된다. 전위 주사에 따른 용액의 pH가 급변하는 이러한 결과는 PPy-GOx 효소전극의 산화환원 특성에서 관측되는 새로운 피크의 원인이 GOx의 산화환원의 영향임을 명백히 뒷받침한다.

그림 3은 PPy와 PPy-GOx 효소전극의 주파수에

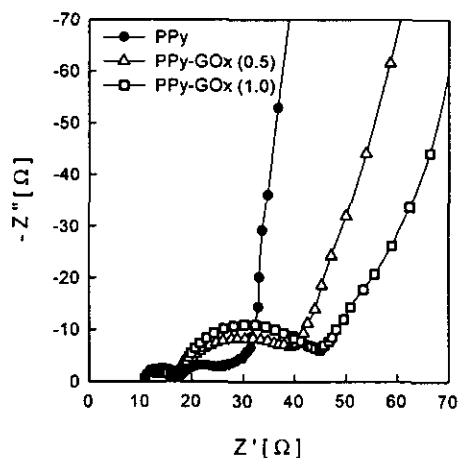


그림 3. PPy와 PPy-GOx 효소전극의 교류임피던스.

Fig. 3. AC impedance spectroscopy of PPy and PPy-GOx enzyme electrode. Filled circles stand for impedance profile of PPy, blank triangles PPy-GOx prepared with 0.5 mg/ml GOx and blank squares PPy-GOx prepared with 1.0 mg/ml GOx.

따른 교류 임피던스 측정의 결과이다. X축이 임피던스의 저항 성분에 해당하고, Y축은 임피던스의 용량성 리액턴스 성분이다. 저주파수 영역에서의 물질 이동에 대한 확산은 그림에서 알 수 있듯이 PPy의 경우 전형적인 반(半)무한 확산의 경향을 보인 반면, PPy-GOx에 대해서는 고정화 양이 증가할수록 확산에 의한 물질이동의 제한이 심화되는 것을 관측할 수 있었다. 이것은 GOx또한 고분자처럼 matrix를 형성하기 때문에 물질의 이동이 제한되는 것으로 판단된다. 한편, 고주파수 영역에서의 전자수수 반응에 대한 반응성 저항은 GOx가 고정화된 경우에 그림에서 알 수 있듯이 약 3배정도 증가하였다.

이것은 절연성 GOx의 영향으로, 효소전극의 산화환원 반응 즉, 전자 수수에 대한 반응성 저항의 증가이다[10]. 또한 이 사실은 전통적인 전해 중합법이 GOx의 고정화 양을 증가시키는 것에는 한계가 있음을 시사한다. 그것은 고분자의 성장과 동시에 물질의 이동을 수반하는데, 사슬 구조를 가지고 있으며 절연성인 GOx가 배위함으로써 전자 수수에 대한 저항이 증가하고 물질 이동이 제한되기 때문이다. 그러므로 생화학적 반응을 도모하기 위하여 효소의 고정화 양을 증가시키기 위해서는 전통적인 전해중합법은 효과적이지 못하며, 개선이 필요하다. 이를 위

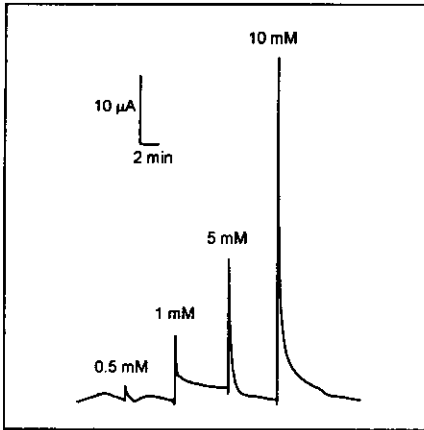


그림 4. PPy-GOx 효소전극의 포도당 주입에 따른 감지전류.
 Fig. 4. Current response of PPy-GOx enzyme electrode according to injection of different glucose concentration.

하여 우리는 지속적인 연구 중에 있다.

그림 4는 포도당 주입에 따른 PPy-GOx 효소전극의 전류응답을 보여준다. +0.35 V의 포텐셜에서 정상상태의 전류응답이 얻어진 후, 0.5, 1, 5 및 10 mmol/dm³ 농도의 포도당을 마이크로 주사기로 주입한 후 전류변화를 측정하였다. 여기서 얻어진 전류변화를 포도당 주입 농도에 대하여 그림 5와 같이 나타내었다.

그림 5는 효소전극의 포도당 감지전류에 대한 Lineweaver-Burke plot이다. 그래프에서 근사적으로 구한 겉보기 Michaelis-Menten 상수(K'_M)는 약 30.7 mmol/dm³이며, 최대 전류(I_{max})는 약 83 µA이다. 기질에 대한 친화력을 나타내는 K'_M은 효소가 용액상태에 있는 경우, 일반적으로 수 ~ 수십 mmol/dm³의 값을 나타내는데[6], 본 연구에서 합성한 효소전극이 양호한 기질 친화력을 보이는 것을 알 수 있다. 이것은 효소의 활동도에 큰 손실이 없음을 시사한다.

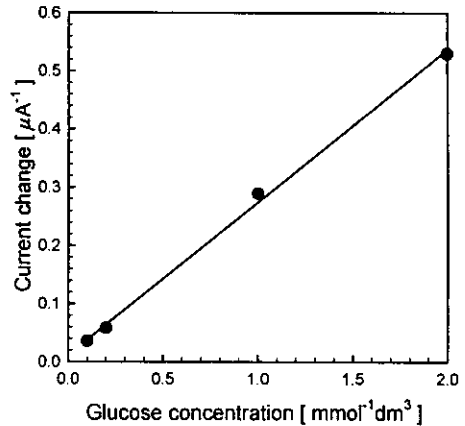


그림 5. Lineweaver-Burke 관계에 의한 근사적 기질 친화력의 결정.
 Fig. 5. Lineweaver-Burke plot for calculation of the apparent Michaelis-Menten constant.

4. 결 론

전해중합법으로 GOx가 고정화된 PPy-GOx 효소전극의 전기화학 반응에 있어서 GOx는 효소전극의 산화환원에 영향을 미치며, 그 결과 순환 전압전류 특성에 PPy의 전형적인 피크 외에 새로운 피크로 반영된다. 이것은 짧아진 고분자 사슬간의 상호작용과 GOx 산화환원의 복합적인 영향임을 보였다.

본 연구에서 합성한 PPy-GOx 효소전극의 기질에 대한 친화력은 겉보기 Michaelis-Menten 상수 30.7 mmol/dm³을 보여, 용액상태의 효소와 비교할 때 고정화된 효소의 기질 친화력에 큰 손실을 야기하지 않음을 보였다.

그러나, 효소의 생화학적 반응을 향상시키기 위한 고정화 양의 증대는 전통적인 전해중합법으로는 한계가 있다. 그것은 polyanion으로서 고분자의 주 사슬에 배워하는 GOx는 스스로 사슬구조를 가지고 있기 때문에 확산에 의한 물질의 이동을 제한한다. 또한 본질적인 절연성으로 인하여 PPy-GOx 효소전극의 전자 수수에 있어서 반응성 저항을 증가시킨다. 그러므로 효소의 고정화 양을 도모하기 위하여 중합 용액에 첨가하는 효소의 양을 증가시키면, 고분자 필름의 성장을 둔화시키며 심지어는 필름이 성장하지 않는 경우도 있다. 따라서 고정화 양의 향상을 도모하기 위해서는 전해중합의 합성방법에 개선이 필요하며 이에 대한 연구가 진행 중이다.

참고 문헌

- [1] M. P. Byfield and R. A. Abuknesha, "Biochemical aspects of biosensor", *Biosensors & Bioelectronics*, Vol. 9, pp. 373-400, 1994.
- [2] R. S. Sethi, "Transducer aspects of biosensor", *Biosensors & Bioelectronics*, Vol. 9, pp. 243-264, 1994.
- [3] M. Umana and J. Waller, "Protein-Modified Electrodes. The Glucose Oxidase/Polypyrrole System", *Anal. Chem.*, Vol. 58, pp. 2979-2983, 1986.
- [4] G. F. Khan, M. Ohwa and W. Wernet, "Design of a Stable Charge Transfer Complex Electrode for a Third-Generation Amperometric Glucose Sensor", *Anal. Chem.*, Vol. 68, pp. 2939-2945, 1996.
- [5] N. C. Foulds and C.R. Lowe, "Immobilization of Glucose Oxidase in Ferrocene-Modified Pyrrole Polymers", *Anal. Chem.*, Vol. 60, pp. 2473-2478, 1988.
- [6] N. C. Foulds and C. R. Lowe, "Enzyme Entrapment in Electrically Conducting Polymer", *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, Vol. 82, pp. 1259-1264, 1986.
- [7] M. Shin and H. Kim, "Electrochemical characterization of polypyrrole/glucose oxidase biosensor: Part I. Influence of enzyme concentration on the growth and properties of the film", *Biosensors & Bioelectronics*, Vol. 11, pp. 161-169, 1996.
- [8] J. L. Bredas, R. Silbey, D. S. Boudreaux and R. R. Chance, "Chain-Length Dependence of Electronic and Electrochemical Properties of Conjugated System: Polyacetylene, Polyphenylene, Polythiophene and Polypyrrole", *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 105, pp. 6555-6559, 1983.
- [9] A. K. Agrawal and S. A. Jenekhe, "Electrochemical Properties and Electronic Structures of Conjugated Polyquinolines and Polyanthrazolines", *Chem. Mater.*, Vol. 8, pp. 579-589, 1996.
- [10] 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, pp. 139-140, 2000.