

논문 15-2-6

Polypyrrole-Glucose Oxidase 효소전극의 배위자 크기에 따른 전기화학적 특성

Electrochemical Properties of Polypyrrole-Glucose Oxidase Enzyme Electrode with Different Dopants

김현철, 구할본

(Hyun-Cheol Kim and Hal-Bon Gu)

Abstract

We synthesized polypyrrole (PPy) by electrolysis of the pyrrole monomer solution containing support electrolyte, KCl and/or *p*-toluene sulfonic acid sodium salt (*p*-TS). The electrochemical behavior was investigated using cyclic voltammetry and AC impedance. In the case of using electrolyte *p*-TS, the oxidation potential of the PPy was about -0.2 V vs. Ag/AgCl reference electrode, while the potential was about 0 V for using electrolyte KCl. The falloff of the oxidation potential gave a sign of an improvement in the electron hopping mechanism on the backbone. The AC impedance plot gave a hint of betterment of mass transport. PPy doped with *p*-TS improved in mass transport or diffusion. That was because the PPy doped with *p*-TS was more porous than PPy with KCl.

We attained an effect of good kinetic parameters, in the case of PPy-GOx enzyme electrodes doped with *p*-TS, which were determined by 58 mmol dm⁻³ for apparent Michaelis constant and by 581 μA for maximum current respectively.

Key Words : Polypyrrole, Enzyme electrode, *p*-TS, Glucose oxidase, Michaelis constant

1. 서 론

효소전극은 생화학적 반응에 아울러 전기화학적 반응을 수반한다. 그러므로 전극의 표면 부에 효소의 안정적인 고정화와 전기화학적으로 활성인 전극/효소의 복합체가 요구된다.[1,2]

도전성 고분자는 π전자로 인하여, 본질적으로 전기화학적 활성을 가지고 있으며, 효소의 고정화에 있어서 물리적 고착뿐만 아니라 고분자 사슬과 효소 간에 정전 상호작용이 발생하여 전자수수 등 전기화학적 coupling을 유지하게 된다.[3]

도전성 고분자로 polypyrrole(PPy)을 이용하는 효소전극의 경우, 전해중합법에 있어서 지지전해질로 KCl을 사용하는 연구가 많다. 우리는 이러한

효소전극에 대한 전기화학 및 생화학적 특성과 고정화되는 효소의 영향에 대하여 발표한바 있다.[4] 지지전해질로 KCl을 사용하여 합성한 PPy는 전기화학적 산화환원 반응에 있어서 산화 포텐셜이 비교적 높고, 반응 속도상수가 충분히 빠르지 않다. 그러므로 고분자 내의 전자의 호핑에는 어느 정도의 장벽이 존재하게 되는데, 이것은 효소전극의 전류응답 특성에도 영향을 미치게 된다.[4] 또한, 전해중합법으로 합성과 동시에 효소를 고정화하기 때문에 크기가 작고 빠른 지지전해질의 음이온과 크고 느린 효소가 고분자 주쇄에 함께 배위하게 된다. 이 과정에서 전해질 음이온이 우선적으로 배위하게 되며, 일반적으로 알려진 바와 같이 작은 크기의 도판트는 고분자의 배위성을 저해하고, 또한 효소의 배위과정이 열세(劣勢)하게 되어 효소전극으로서의 특성을 저하시킨다.[5]

따라서, 우리는 PPy의 산화 포텐셜을 낮추고 효소전극의 생화학적 반응속도를 개선하여, 포도당 산화효소(glucose oxidase, GOx)를 고정화한 효소

전남대학교 전기공학과
(광주광역시 북구 용봉동 300,
Fax : 062-530-0077
E-mail : hbgu@chonnam.ac.kr)
2001년 10월 15일 접수, 2001년 11월 1일 1차 심사완료
2001년 11월 20일 2차 심사완료

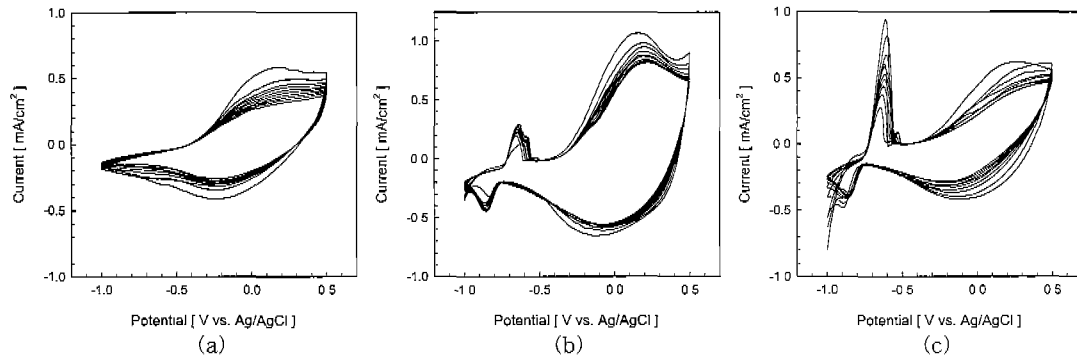


그림 1. 지지전해질 KCl을 사용하여 합성한 PPy 및 PPy-GOx 효소전극의 순환전압전류 특성. (a) PPy. (b) PPy-GOx, 0.5 mg ml⁻¹ GOx 첨가. (c) PPy-GOx, 1.0 mg ml⁻¹ GOx 첨가.

Fig. 1. Cyclic voltammograms of PPy and PPy-GOx enzyme electrodes synthesized using KCl electrolyte. (a) PPy. (b) PPy-GOx, 0.5 mg ml⁻¹ GOx added in the synthetic solution. (c) PPy-GOx, 1.0 mg ml⁻¹ GOx added in the synthetic solution.

전극의 포도당에 대한 전류응답 특성의 향상을 도모하기 위하여 비교적 크기가 큰 *p*-toluene sulfonic acid sodium salt (*p*-TS)와 poly(sodium 4-styrene sulfonate) (PSS)를 지지전해질로 하여 PPy-GOx 효소전극을 제조하였다. 이 연구를 통하여 전기화학적 특성 및 포도당 감지 특성을 발표한다.

2. 실험 방법

PPy의 합성은 0.2 mol dm⁻³ pyrrole 수용액에 지지전해질로 0.1 mol dm⁻³ 농도의 KCl 또는 *p*-TS 및 PSS를 용해시킨 후, Ag/AgCl 전극에 대하여 +0.8 V의 포텐셜로 300 mC/cm² 동안 1셀 3 전극법으로 중합하였다. 작업전극으로는 In₂O₃-SnO₂ (ITO)코팅 유리전극을 사용하였고, 기준전극과 대향전극은 각각 Ag/AgCl 및 백금선을 사용하였다. 이 후의 모든 포텐셜은 Ag/AgCl 전극에 대한 값이다.

PPy-GOx 효소전극의 제조는 중합용액에 0.5 mg ml⁻¹ GOx (Aspergillus Niger Type II, Sigma)를 용해 시킨 후 PPy의 합성과 동일한 조건에서 제조하였다.

PPy 및 PPy-GOx 효소전극에 대한 순환 전압전류 특성은 0.5 mol dm⁻³의 KCl 수용액에서 -1.0 V ~ +0.3 V(또는 +0.5 V)의 영역에서 10 mV/s의 주사속도로 포텐셜을 순환하여 연구하였으며, 교류 임피던스 특성은 개로전압에 미소 포텐셜 5 mV의 신호를 2 MHz ~ 10 MHz로 주파수를 변화하면서 인가하여 연구하였다.

포도당의 주입에 따른 PPy-GOx 효소전극의 전류응답은 0.1 mol dm⁻³ phosphate 버퍼(pH 7.0)에 1 mmol dm⁻³ *p*-quinone을 매개체로 첨가한 후, +0.35 V의 포텐셜을 인가하여 전류의 변화를 측정하였다. 주입된 포도당의 농도는 각각 0.5, 1, 5, 10 및 20 mmol dm⁻³이었다.

3. 결과 및 고찰

그림 1은 KCl을 지지전해질로 사용하여 합성한 PPy 및 PPy-GOx 효소전극에 대한 순환 전압전류 특성을 보여준다. 그림에서 볼 수 있듯이, PPy의 경우 산화파의 피크가 약 0 V 근방에서 관측되는 반면에, 포도당 산화효소가 고정화된 PPy-GOx의 경우에는 0 V 근방의 산화피크 외에 -0.7 V 근처에서 새로운 산화피크를 관찰할 수 있다. 이것은 산화환원 반응이 진행됨에 따라, GOx는 크기가 크고 사슬구조를 가지고 있기 때문에 PPy 고분자 matrix를 자유롭게 빠져나오기 어렵게 된다.[4] 따라서 GOx의 확산에 의한 전하 중성상태의 유지가 어렵게 되고, 이를 대체하는 것이 용액 중의 H⁺ 또는 K⁺ 이온이 전하 중성상태의 유지를 담당하게 된다. 이것은 마치 복소 원환계 도전성 고분자에 alkanesulfonate 또는 carboxylic acid가 공유결합을 하고 있는 경우의 self-doping과 유사한 메커니즘이다.[6] 따라서, 그림 1(b)와 (c)에서 관찰할 수 있는 -0.7 V 근처의 산화환원 피크는 n-type 도핑에 의한 것으로 생각할 수 있다. 또한 중합용액에 첨가된 GOx의 양이 증가하면, 얻어지는 PPy-GOx에 고정화되는 GOx의 양이 증가하게 되어 그림

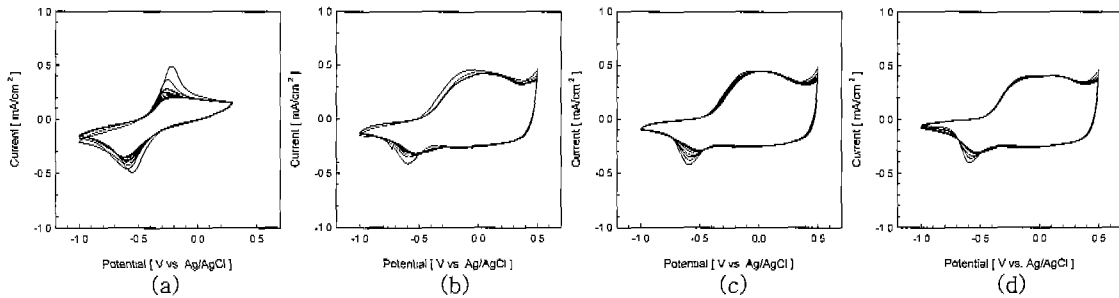


그림 2. 지지전해질 *p*-TS를 사용하여 합성한 PPy 및 PPy-GOx 효소전극의 순환전압전류 특성. (a) PPy, 0.5 mol dm⁻³ *p*-TS 용액에서 측정. (b) PPy. (c) PPy-GOx, 0.5 mg ml⁻¹ GOx 첨가. (d) PPy-GOx, 1.0 mg ml⁻¹ GOx 첨가.

Fig. 2. Cyclic voltammograms of PPy and PPy-GOx enzyme electrodes synthesized using *p*-TS electrolyte. (a) PPy, potential swing in 0.5 mol dm⁻³ *p*-TS solution. (b) PPy. (c) PPy-GOx, 0.5 mg ml⁻¹ GOx added in the synthetic solution. (d) PPy-GOx, 1.0 mg ml⁻¹ GOx added in the synthetic solution.

1(b)와 (c)의 비교에서 알 수 있듯이, n-type 도핑에 의한 피크가 증가하게 되는 것이다.

그림 2는 지지전해질을 *p*-TS로 사용하여 합성한 PPy 및 PPy-GOx 효소전극의 순환 전압전류 특성을 보여준다. 그림 2(a)는 지지전해질 *p*-TS를 이용하여 합성한 PPy 필름을 0.5 mol dm⁻³ *p*-TS 수용액에서 포텐셜을 순환하여 얻은 전압전류 특성이다. 그림에서 알 수 있듯이 *p*-TS 도프 및 언도프가 -0.2 V와 -0.6 V 근방에서 피크를 형성하는 것을 관찰할 수 있다. 한편, 그림 2(b)는 합성에 이용한 지지전해질이 *p*-TS이고, KCl 수용액에서 포텐셜을 순환하여 얻은 전압전류 특성이다. 그림에서 볼 수 있듯이 *p*-TS 도핑에 의하여 PPy의 산화포텐셜이 그림 1(a)에(Cl⁻ 도핑) 비하여 낮아진 것을 확인할 수 있다. 즉, 산화피크는 약 0 V에서 -0.2 V로 낮아졌고, 산화시작 포텐셜(oneset 포텐셜)도 약 -0.3 V에서 -0.5 V로 낮아졌다. 이것은 *p*-TS의 도핑에 의한 PPy의 전자적 물성의 개선 즉, 전자의 호핑 메커니즘의 개선을 암시한다. 또한 *p*-TS의 도핑에 의하여 PPy의 주쇄의 배열이 보다 규칙적으로 정렬한 것과 배위한 *p*-TS가 PPy 주쇄의 전자 전도에 영향을 미치는 것을 시사한다.

한편, 중합용액에 GOx를 포함시켜 얻은 PPy-GOx 효소전극의 경우, 그림 2(c)와 (d)에서 볼 수 있듯이 n-type 도핑에 의한 산화환원 피크는 관측되지 않는다. 다만, GOx의 첨가량을 증가시킨 경우, *p*-TS에 의한 산화피크와 Cl⁻에 의한 산화피크에 약간의 분리가 발생하는 것을 관찰할 수 있다. 이것은 *p*-TS의 도핑을 수반하여 합성한

PPy-GOx 필름의 다공성이 향상되어, 비교적 크기가 큰 GOx의 도프 및 언도프가 가능해 졌다는 것이며, 이 때문에 n-type 도핑이 발생하지 않는 것이다. 이러한 현상들은(산화 포텐셜의 저하와 다공성의 개선) 포도당을 주입하였을 때, PPy-GOx 효소전극의 포도당 감지 특성의 향상에 기여할 것으로 기대된다.

그림 3은 PSS를 지지전해질로 이용하여 합성한 PPy 및 PPy-GOx 효소전극의 순환 전압전류 특성이다. 그림 3(a)에서 볼 수 있듯이, PPy의 경우 산화 및 환원피크가 약 -0.2 V와 -0.4 V 근방에서 관측된다. 그림 1(a)와 비교해 볼 때, Cl⁻의 도핑에 의한 산화 환원 피크와 비슷한 양상을 보인다. 이 경우에도 *p*-TS의 도핑(그림 2(b))과 마찬가지로 산화피크의 포텐셜이 낮아지고, 산화의 시작 포텐셜도 저하한다. 이것은 PSS의 도핑에 의해서도 PPy의 산화 포텐셜의 저하가 발생하는 것을 시사한다. 한편, PPy-GOx 효소전극에 대한 산화환원은 그림 3(b) 및 (c)에서 볼 수 있듯이, GOx의 첨가에 따라 PPy-GOx의 산화반응에 대한 반응속도 상수가 저하하는 것을 알 수 있다(산화피크가 형성되는 기울기가 낮아진다). 또한, GOx의 양이 증가한 그림 3(c)의 경우는 PPy의 산화환원 경향이 마치 그림 1(a)와 비슷한 양상을 보인다. 이것은 PSS의 도핑에 의하여 산화 포텐셜이 낮아질 수는 있지만, GOx의 고정화에 의해 PPy의 물성에 변화를 가져오는 것을 시사하며, 포도당 주입에 따른 PPy-GOx 효소전극의 포도당 감지 특성에 어떠한 형태로든 영향을 미칠 것으로 추측해 볼 수 있다.

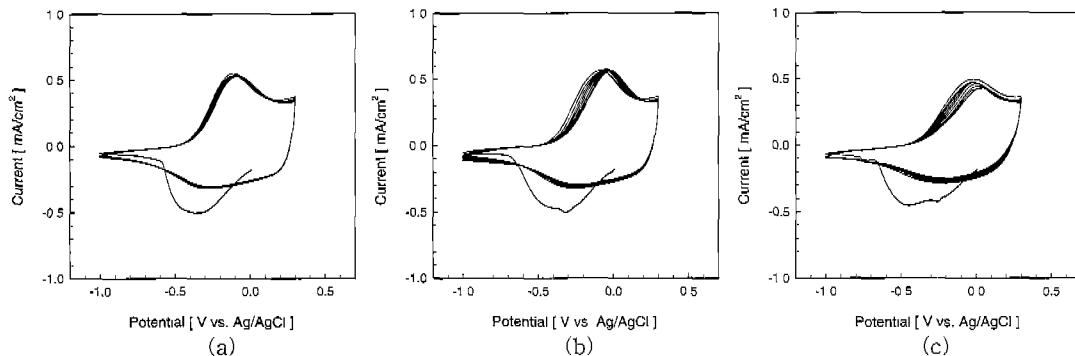


그림 3. 지지전해질 PSS를 사용하여 합성한 PPy 및 PPy-GOx 효소전극의 순환전압전류 특성. (a) PPy, (b) PPy-GOx, 0.5 mg ml⁻¹ GOx 첨가. (c) PPy-GOx, 1.0 mg ml⁻¹ GOx 첨가.

Fig. 3. Cyclic voltammograms of PPy and PPy-GOx enzyme electrodes synthesized using PSS electrolyte. (a) PPy. (b) PPy-GOx, 0.5 mg ml⁻¹ GOx added in the synthetic solution. (c) PPy-GOx, 1.0 mg ml⁻¹ GOx added in the synthetic solution.

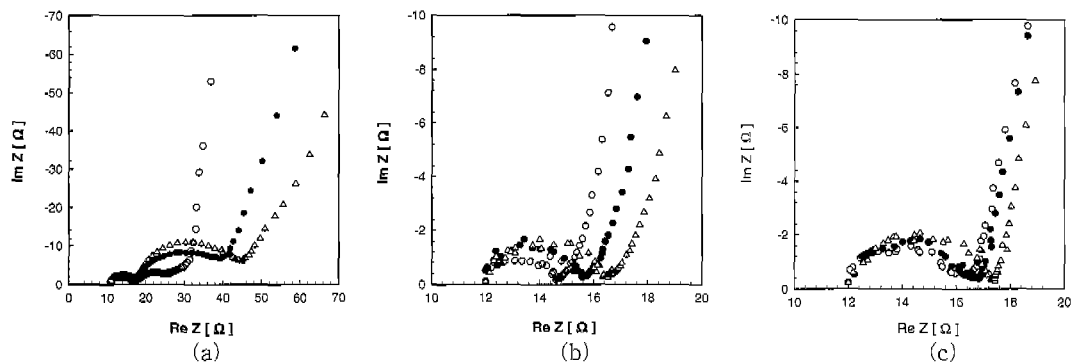


그림 4. PPy 및 PPy-GOx 효소전극에 대한 교류 임피던스 특성, ○: GOx를 첨가하지 않은 경우, ●: 0.5 mg ml⁻¹ GOx를 첨가한 경우, △: 1.0 mg ml⁻¹ GOx를 첨가한 경우. (a) 지지전해질 KCl. (b) 지지전해질 p-TS. (c) 지지전해질 PSS.

Fig. 4. Nyquist plots for AC impedance of PPy and PPy-GOx enzyme electrodes, ○: GOx free in the synthetic solution, ●: 0.5 mg ml⁻¹ GOx added, △: 1.0 mg ml⁻¹ GOx added. (a) KCl support electrolyte. (b) p-TS support electrolyte. (c) PSS support electrolyte.

그림 4는 PPy와 PPy-GOx 효소전극의 교류 임피던스 특성을 보여준다. 그림 4(a)는 지지전해질로 KCl을 사용한 경우의 PPy 및 PPy-GOx에 대한 교류 임피던스 응답의 Nyquist plot이다. 그림에서 볼 수 있듯이, 고주파수 영역에서 두 개의 반원이 나타난다. 고주파수 영역에서의 임피던스는 전하수수반응에 대한 반응성 임피던스이다.[7] 따라서 그림 4(a)에 나타나는 두 개의 반원은 쌍극자 배향 및 전자 수수에 의해 발생하는 임피던스이다. PPy-GOx 효소전극에서 고정화된 GOx의 양이 증가할수록 반원의 임피던스가 증가하는 것을 볼 수 있다. 즉, 반응성 임피던스의 증가를 나타낸다. 이것은 GOx가 가지고 있는 본질적인 절연성과 지지

전해질 KCl의 사용에 의한 PPy-GOx 효소전극의 비교적 높은 산화포텐셜에 기인한다고 볼 수 있다. 한편, 저주파수 영역의 임피던스 응답은 물질이동(확산)에 대한 임피던스를 나타낸다. 그림에서(그림 4(a)) PPy에 대한 저주파수 영역의 임피던스는 Warburg 임피던스가 나타난 후, 곧바로 포화영역으로 들어가는 것을 관찰할 수 있다. 반면에, PPy-GOx의 경우 GOx의 고정화 양이 증가할수록 물질확산에 대한 임피던스가 심화되는 것을 알 수 있다. 그러므로 반응성 임피던스의 증가와 물질 확산의 제한은 PPy-GOx 효소전극의 포도당 감지 특성에 마이너스 효과를 가져올 것으로 예측된다.

한편, 그림 4(b)와 (c)에서는 고주파수 영역의 반

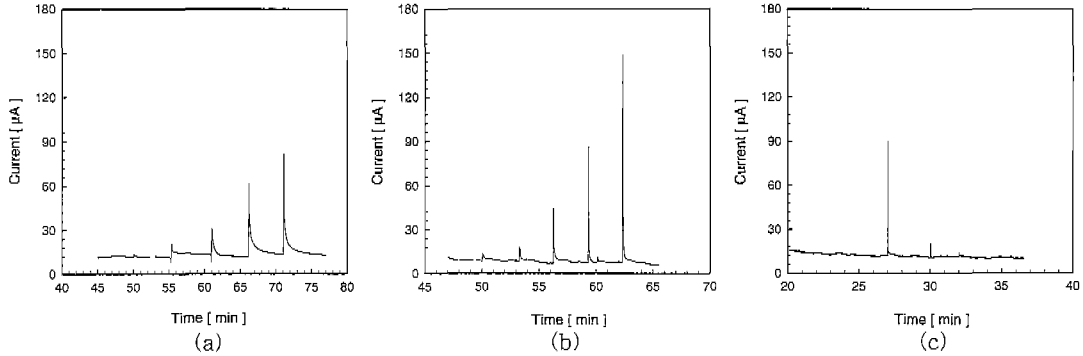


그림 5. PPy-GOx 효소전극의 포도당 주입에 따른 전류응답, 주입한 포도당 농도는 각각 0.5, 1, 5, 10 및 20 mmol dm⁻³. (a) 지지 전해질 KCl. (b) 지지 전해질 p-TS. (c) 지지 전해질 PSS.

Fig. 5. Amperometric determination of glucose using PPy-GOx enzyme electrodes at different concentration of 0.5, 1, 5, 10 and 20 mmol dm⁻³. (a) KCl support electrolyte. (b) p-TS support electrolyte. (c) PSS support electrolyte.

응성 임피던스가 하나의 반원만이 관측된다. 또한 관측되는 반응성 임피던스의 크기도 수 Ω으로 그림 4(a)와 비교할 때, 1/10 정도의 크기이다. 이 경우 첫 번째 반원이 나타나지 않는 것은 2 MHz 정도의 주파수보다 빠른 속도로 쌍극자 배향이 발생하기 때문이며, 따라서 전하 수수반응에 있어서 쌍극자 배향은 반응성 임피던스로 작용하지 않는다. 이것은 p-TS 또는 PSS를 지지 전해질로 사용하여 합성한 PPy 및 PPy-GOx가 KCl을 지지 전해질로 사용한 경우보다 주체의 배향성이 향상되고, 전자의 수수가 원활해 졌음을 암시한다. 바꿔 말하면, 주체의 배향성 증대와 전자 호핑 메커니즘의 개선에 의하여, 절연성인 GOx가 고정화 되더라도 전자의 수수 반응에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 시사한다. 또한 저주파수 영역의 물질 확산의 제한에 있어서도 GOx의 양이 증가하더라도 거의 비슷한 양상을 보이고 있다. 따라서, 이러한 결과는 그림 1, 2, 3과 관련하여 고찰해 볼 때, 크기가 큰 p-TS 및 PSS를 지지 전해질로 사용하여 합성한 PPy 및 PPy-GOx 효소전극은 고분자 주체의 배향성이 향상되고 산화 포텐셜이 낮아지며, 다공성의 개선에 따라 물질이동의 향상을 가져올 수 있을 것으로 기대된다. 결과적으로 포도당 주입에 따른 PPy-GOx 효소전극의 포도당 감지 특성에 향상이 기대된다.

그림 5는 제조한 PPy-GOx 효소전극의 포도당 주입에 따른 전류응답을 나타낸다. 주입된 포도당의 농도는 각각 0.5, 1, 5, 10 및 20 mmol dm⁻³ 이었다. 그림에서 볼 수 있듯이, 포도당 주입과 거의 동시에 포도당 농도에 따른 고감도의 전류응답을

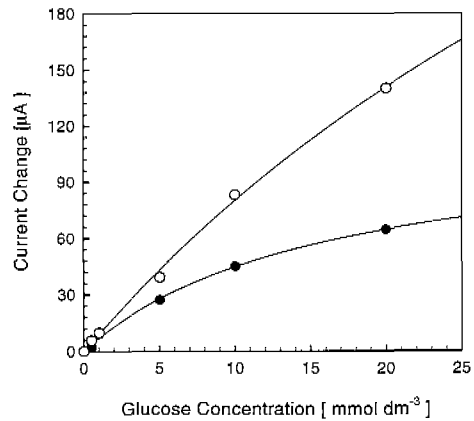


그림 6. 포도당 농도에 따른 전류응답의 비선형 회귀분석을 통한 kinetic parameter의 결정. ●: 지지 전해질 KCl을 사용하여 제조한 효소 전극의 전류응답. ○: 지지 전해질 p-TS를 사용하여 제조한 효소전극의 전류응답.

Fig. 6. Determination of the kinetic parameters using nonlinear regression to current response at different concentration of glucose. ●: Current response of the enzyme electrode synthesized with KCl support electrolyte. ○: Current response in the case of using p-TS support electrolyte.

얻을 수 있었다. PPy-GOx의 전기화학적 실험에서 예측하고 기대하였듯이, 지지 전해질로 KCl을 사용

표 1. PPy-GOx 효소전극의 포도당 감지 반응에 대한 kinetic parameters.

Table 1. Kinetic parameters of PPy-GOx enzyme electrodes for glucose sensing.

지지전해질	Michaelis 상수 mmol dm ⁻³	최대전류 μA
KCl	16	116
p-TS	58	581
PSS	-	-

한 경우보다 p-TS 및 PSS를 사용하여 합성한 PPy-GOx 효소전극에서 보다 높은 응답전류를 얻을 수 있었다. 한편, PSS를 지지전해질로 사용한 경우의 PPy-GOx 효소전극의 전류응답은(그림 5(c)) 0.5 mmol dm⁻³의 포도당 농도에서 약 85 μA의 대단히 높은 전류응답을 얻었으나, 그 이후의 농도에서 전류응답이 급격히 감소하였다. 이것은 최초의 생화학적 반응 후에 발생하는 GOx의 활동도 저하 또는 GOx의 포도당 산화반응의 활동지점에 대한 구조적 블로킹 등으로 추측되지만, 아직 명확한 근거는 없다.

그림 6은 전류응답의 크기와 포도당 농도와의 관계이며, 식 (1)과 같이 표현되는 Michaelis 관계식을 이용하여, 비선형 회귀분석을 통한 PPy-GOx 효소전극의 포도당 산화에 대한 생화학적 반응의 kinetic parameter를 결정할 수 있다.

$$I = \frac{I_{max} \cdot S}{K_M' + S} \quad (1)$$

여기서, I 는 응답전류의 크기이고, I_{max} 는 반응속도와 직접 비례하는 최대전류, S 는 기질 즉, 포도당의 농도, K_M' 는 효소의 기질친화력과 관계되는 겉보기 Michaelis 상수이다. 컴퓨터를 이용하여 계산된 PPy-GOx 효소전극의 생화학적 반응의 kinetic parameter를 표 1에 정리한다.

PPy의 배위자로 p-TS를 사용한 경우, 기질친화력과 관계되는 Michaelis상수 58 mmol dm⁻³을 얻었으며, 기질에 대한 반응속도와 관계되는 최대응답전류는 581 μA를 얻었다.

4. 결 론

본 연구에서 우리는 Cl⁻에 비해 크기가 큰 배위자로 p-TS를 사용하여 증합한 PPy의 경우, 지지

전해질 KCl을 사용한 경우에 비해 주체의 고배향성과 다공성의 확보로 인하여 전자의 호핑이 개선되고 산화 포텐셜이 낮아지며, 물질이동이 향상되는 것을 정성적으로 보였다. 또한 포도당 산화효소를 전해증합법으로 고정화시킨 PPy-GOx 효소전극에 있어서도 배위자 크기에 따른 전자적 물성의 개선에 기인하여, 포도당 주입에 있어서 기질에 대한 반응속도와 관계되는 최대전류 581 μA를 얻었으며, 이것은 KCl을 지지전해질로 사용한 경우보다 5배 이상 향상된 값이다. 또한 최대전류의 증가에도 불구하고 기질에 대한 친화력은 약간 감소한 정도로 58 mmol dm⁻³의 양호한 기질친화력을 유지할 수 있었다.

참고문헌

- [1] 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, p. 2939, 1996.
- [2] N. C. Foulds and C. R. Lowe, "Immobilization of glucose oxidase in ferrocene-Modified pyrrole polymer", Anal. Chem., Vol. 60, p. 2473, 1988.
- [3] N. C. Foulds and C. R. Lowe, "Enzyme entrapment in electrically conducting polymers", J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1, Vol. 82, p. 1259, 1986.
- [4] 김현철, 구할분, 사공건, "Polypyrrole-Glucose oxidase 효소전극의 전기화학적 특성", 한국전기전자재료학회 논문지, 13권 6호, p. 520, 2000.
- [5] 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, p. 161, 1996.
- [6] H. S. Nalwa, "Handbook of Organic Conductive Molecules and Polymer", John Wiley & Sons, New York, p. 833, 1997.
- [7] 김현철, 구할분, 사공건, "Polypyrrole-Glucose oxidase 효소전극의 Ethanol 첨가효과", 한국전기전자재료학회 1999추계학술대회 논문집, p. 147, 1999.