

Polypyrrole-Glucose Oxidase 효소전극의 Ethanol 첨가효과

An Effect of Ethanol on Polypyrrole-Glucose Oxidase Enzyme Electrode

김현철^{*}, 구할본^{*}, 사공 건^{**}

^{*} 전남대학교 공과대학 전기공학과

^{**} 동아대학교 공과대학 전기공학과

Hyun-Cheol Kim^{*}, Hal-Bon Gu^{*}, Geon Sa-Gong^{**}

^{*} Dept. of Electrical Eng., Chonnam Univ.

^{**} Dept. of Electrical Eng., Dong-A Univ.

Abstract

In the case of immobilizing of glucose oxidase in organic polymer using electrosynthesis, the glucose oxidase obstructs charge transfer and mass transport during the film growth. This may lead to short chained polymer and/or make charge-coupling weak between the glucose oxidase and the backbone of the polymer. That is mainly due to insulating property and net chain of the glucose oxidase. Since being the case, it is useless to increase in amount of glucose oxidase more than reasonable in the synthetic solution.

We establish qualitatively that amount of immobilization can be improved by adding a little ethanol in the synthetic solution. As ethanol was added by 0.1 mol dm⁻³ in the synthetic solution, Michaelis-Menten constants of the resulting enzyme electrode decreased from 30.7 mmol dm⁻³ to about 2 mmol dm⁻³. That suggests increase in affinity of the enzyme electrode for glucose and in amount of the immobilized enzyme.

Key Words (중요어) : Polypyrrole(폴리피롤), Enzyme electrode(효소전극), Glucose oxidase(포도당 산화효소), Michaelis-Menten constant(기질 친화상수)

1. 서 론

용액 상태의 산화환원 효소를 이용하는 바이오 센서에 대한 80년대 말에서 90년대 초반 연구의 단점 즉, 가수분해 및 안정성 문제를 해결하기 위하여 최근의 연구 동향은 효소를 전극에 고정화 시키는 효소전극에 초점을 맞추고 있다. 효소전극의 구현으로 센서의 재사용, 효소의 안정화 및 가수분해 방지 등을 도모할 수 있기 때문이다.^[1]

효소 고정화의 요소기술은 효소와 전극 간의 전기화학적 coupling의 유지와 효소의 활동도 유지 즉, 생물학적 반응도의 저하를 최소화 하는 것이다. 이것을 목표로 다양한 연구들이 진행되어 오고 있다.^[2,3,4] 그 중에서 도전성 고분자의 전해중합을 통하여 효소전극을 제조하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 도전성 고분자는 공역 π전자로 인하여 전기적 활성을 가지고 있으며, 효소를 고정화 시키는 경우 효소의 물리적 고정화뿐만 아니라 고분자 주쇄와의 정전 상호작용이 발생하여 전기화학적 coupling을 유지하게 된다. 한편, 효소의 반응을 증대시키기 위해서는 고정화 되는 효소의 양을 증가

시켜야 한다. 그러나 효소의 본질적 절연성과 polypeptide 구조 때문에, 고정화되는 과정에서 도전성 고분자의 전하 수수반응 및 물질 이동이 방해를 받는다. 그러므로 전해중합을 통하여 효소전극을 제조할 때, 첨가하는 효소의 양을 증가시키면 고분자의 성장이 둔화되며 심지어는 필름이 성장하지 않는 경우도 있다. 따라서 전통적인 전해중합으로 효소 고정화 양을 증가시키는 것은 제약이 있으며, 적정량 이상을 첨가하는 것은 효소전극의 형성에 있어서 바람직하지 않다.

한편, 도전성 고분자 표면에 공유적으로 효소를 고정화 시키는 다양한 연구가 시도되고 있는데, 이 방법은 효소 고정화 양을 증가시킬 수 있지만, 양호한 전기화학적 coupling의 달성이 문제이다.

따라서, 우리는 전해중합으로 polypyrrole(PPy)에 glucose oxidase(GOD)을 고정화시킬 때, 필름 성장을 제한하지 않는 적정량의 GOD를 포함하는 중합액에 소량의 에탄올을 첨가하여, 전기화학적 coupling을 유지하면서 효소 고정화 양을 증대시킬 수 있음을 발표한다.

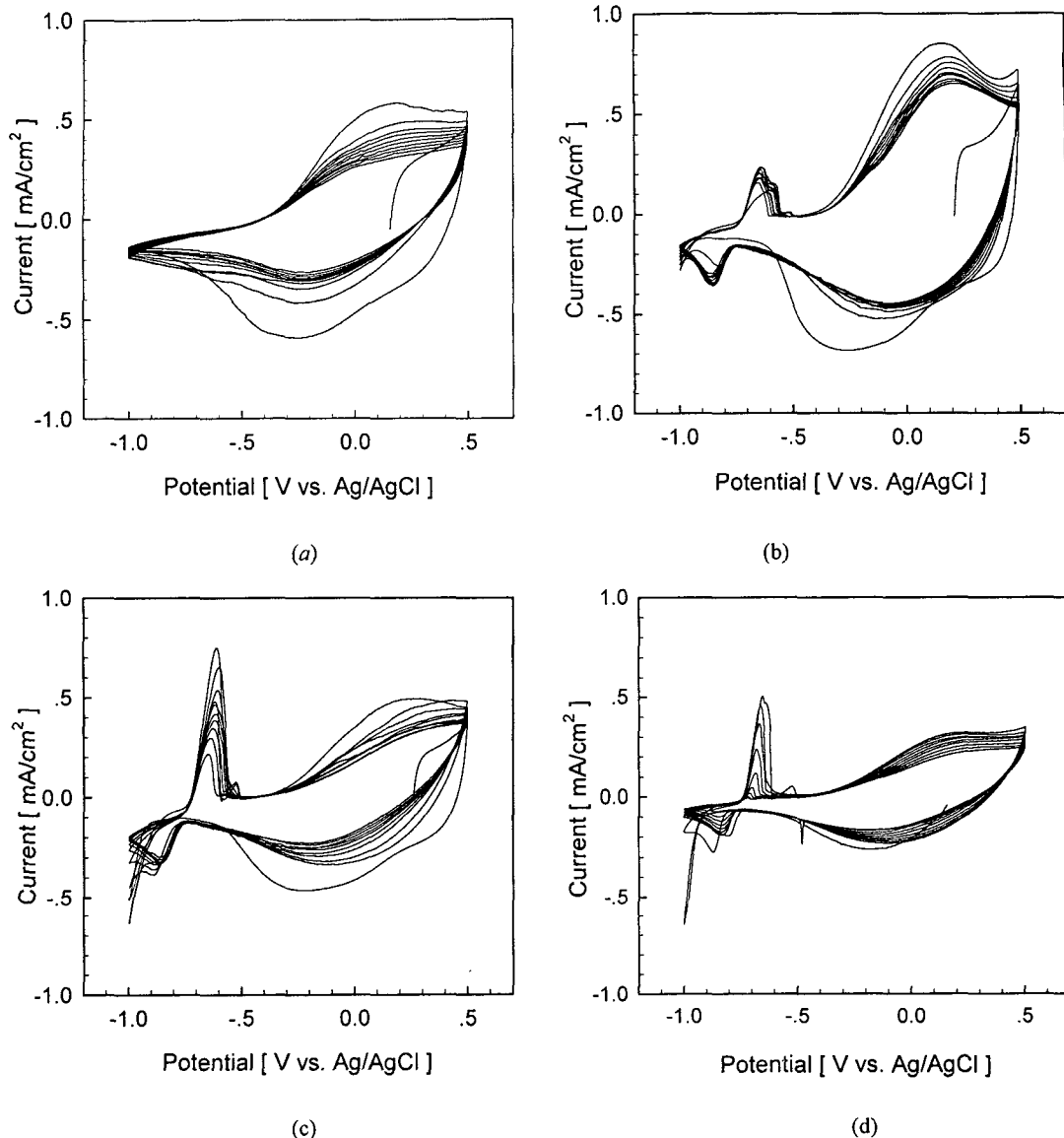


그림 1. PPy 및 PPy-GOD 효소전극의 Cyclic voltammograms.

Fig. 1. Cyclic voltammograms of PPy and PPy-GOD enzyme electrodes. (a) PPy. (b) 0.5 mg ml^{-1} GOD added in the synthetic solution. (c) 1.0 mg ml^{-1} GOD added. (d) 0.5 mg ml^{-1} GOD and 0.1 mol dm^{-3} ethanol added.

2. 실험 방법

PPy-GOD 효소전극은 0.2 mol dm^{-3} pyrrole(Sigma) 용액에 0.1 mol dm^{-3} potassium chloride(Aldrich), 0.5 mg ml^{-1} 및 1.0 mg ml^{-1} 의 GOD(Sigma, Type II)를 혼합하고, 0.1 mol dm^{-3} 에탄올(Aldrich)을 첨가하여 $+0.8 \text{ V vs. Ag|AgCl}$ 로 300 mC cm^{-2} 동안 전해중합으로 제조하였다. 모든 포텐셜은 Ag|AgCl 전극에 대한 값이다.

Cyclic voltammetry 는 0.5 mol dm^{-3} potassium chloride 수용액에서 10 mV s^{-1} 의 주사속도로, $-1.0 \text{ V} \sim +0.5 \text{ V}$ 의 영역에서 수행하였으며, 교류 임피던스는

개로 전압에 5 mV 의 리플을 2 MHz 에서 0.01 Hz 까지 변화시키며 측정하였다.

포도당 주입에 따른 효소전극의 전류응답은 0.1 mol dm^{-3} phosphate buffer 용액(pH 7.0)에 1 mmol dm^{-3} p-quinone을 첨가한 후, $+0.35 \text{ V}$ 에서 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

그림 1은 PPy 및 복합 효소전극에 대한 cyclic voltammogram이다. GOD가 고정화되는 경우에 나타나는 부가적 피크는 이미 발표한 바와 같이 짧은 고분자 사슬 및 GOD 자체의 산화환원의 영향으로

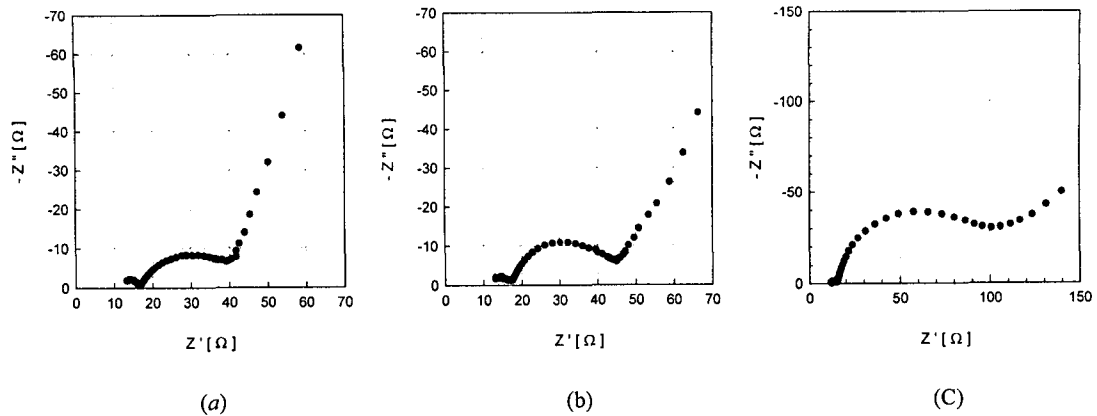


그림 2. PPy-GOD 효소전극의 교류 임피던스 특성.

Fig. 2. AC impedance spectroscopy of PPy-GOD enzyme electrode. (a) 0.5 mg ml⁻¹ GOD added in the synthetic solution. (b) 1.0 mg ml⁻¹ GOD added. (c) 0.5 mg ml⁻¹ GOD and 0.1 mol dm⁻³ ethanol added.

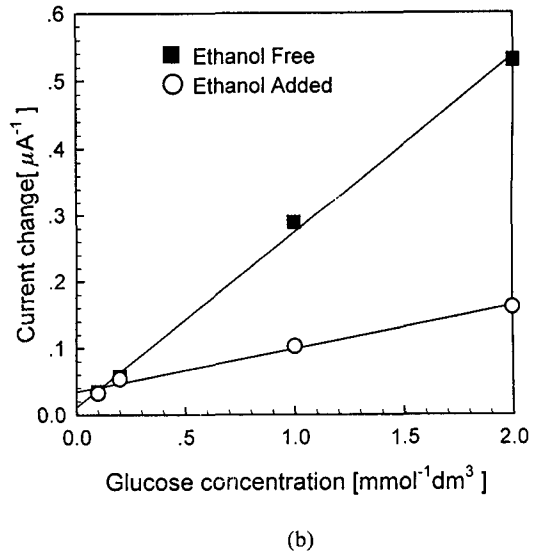
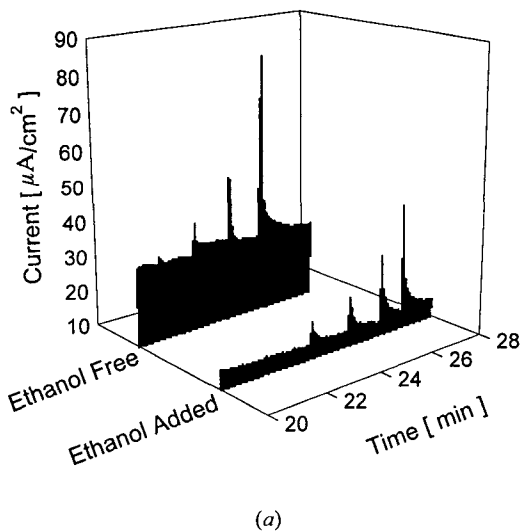


그림 3. 포도당 주입에 따른 PPy-GOD 효소전극의 전류응답.

Fig. 3. Current response of PPy-GOD electrode according to glucose injection and Lineweaver-Burke plot. (a) Current response in the case of 1.0 mol dm⁻³ ethanol added and free. (b) Lineweaver-Burke plot.

판단된다.^[5] 그림 1(b)와 (c)에서 알 수 있듯이, 중합액에 GOD의 첨가량을 두 배 증가시키면 부가 피크의 산화파는 두 배 강해지고, 주 피크는 그만큼 약화된다. 이것은 고정화된 효소 양의 증가를 시사하며, 또한 일정한 영역에서 첨가량과 고정화 양이 비례하는 것을 의미한다.

한편, 그림 1(b)의 중합액에 1.0 mol dm⁻³의 에탄올을 첨가한 경우의 결과를 그림 1(d)에 나타낸다. 에탄올 첨가의 영향은 그림에서 알 수 있듯이, GOD 고정화의 영향인 부가 피크는 주 피크보다 강한 양

상을 보이며 그림 1(c)의 산화환원 거동과 흡사한 것을 관측할 수 있다. 이것은 에탄올의 첨가로 인하여 GOD 고정화 양이 증대되는 것을 시사한다. 그 메커니즘은 아직 명확하지는 않지만, 에탄올의 첨가로 인하여 중합반응의 속도가 제어되고, 이에 수반되는 음이온의 도핑이 균등하게 이루어지는 것으로 판단된다. 이것을 뒷받침할만한 단서를 확보하고 있으며, 추후에 발표할 예정이다.

그림 2는 PPy-GOD 효소전극에 대한 교류 임피던스 특성을 보여준다. GOD의 절연성과 polypeptide

구조의 사슬 때문에, GOD 고정화 양의 증가는 고주파수 영역의 faradic 임피던스를 증가시키고 저주파수 영역의 물질 이동을 제한한다(그림 2(a), (b)). 중합액에 같은 양의 GOD 를 혼합하였을 때, 에탄올을 첨가한 경우에(그림 2(a)와 (c)의 비교) faradic 임피던스가 약 5 배 이상 증가하였으며 확산의 제한이 심화되는 것을 관찰할 수 있다. 이 결과 또한 에탄올의 첨가에 의하여 GOD 고정화 양이 증가하는 것을 뒷받침한다.

그림 3 은 포도당 주입에 따른 PPy-GOD 효소전극의 전류응답과 Lineweaver-Burke plot 이다.^[4] 포도당 주입량은 0.5, 1, 5 및 10 mmol dm⁻³이다. 그림 3 (b)에 대하여 수식 (1)을 이용하여 계산한 Michaelis-Menten 상수와 최대전류는 중합액에 에탄올이 첨가되지 않은 경우에 약 30 mmol dm⁻³와 83 μA이며 1.0 mol dm⁻³ 에탄올이 첨가된 경우는 약 2 mmol dm⁻³와 32 μA을 얻었다.

$$\frac{1}{i_{ss}} = \frac{1}{i_{max}} + \frac{1}{S} \times \frac{K'_M}{i_{max}} \quad (1)$$

여기서, i_{ss} 는 전류 변화량, i_{max} 는 최대전류, S 는 기질(포도당)의 농도 및 K'_M 는 겉보기 Michaelis-Menten 상수이다. 중합액에 에탄올을 첨가함으로써 효소의 고정화 양이 증가되어, 효소전극의 전도성의 저하로 최대전류는 다소 감소하였지만, 고정화 양의 증가로 기질에 대한 효소의 친화력이 향상되는 것을 알 수 있었다.

4. 결 론

이 연구를 통하여 우리는 전해중합의 방법으로 PPy-GOD 효소전극을 제조하였다. 중합 과정에서의 효소 고정화 양에 대한 정성적인 분석을 통하여 소량의 에탄올을 첨가함으로써 효소의 고정화 양을 증대시킬 수 있음을 제시하였다. 중합액에 0.1 mol dm⁻³ 의 에탄올의 첨가로, 겉보기 Michaelis-Menten 상수가 30.7 에서 약 2 mmol dm⁻³으로 감소하였으며 이것은 기질에 대한 친화력의 증가를 의미한다.

에탄올의 첨가량을 제어함으로써 효소의 고정화 양을 조절하여 전기화학적 반응과 생화학적 반응의 최적 타협 점을 도출할 수 있을 것으로 판단된다. 에탄올에 의한 효소 고정화 양의 증가에 대한 메커니즘은 아직 명확하지 않지만, 중합반응 초기의 속도가 제어되어 그 반응에 수반되는 음이온의 도핑이 균등하게 이루어지기 때문으로 생각할 수 있으며, 또한 에탄올의 수분 흡수작용도 영향을 미칠 것으로 생각된다.

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, "Immobilization of Glucose Oxidase in Ferrocene-Modified Pyrrole Polymers", *Anal. Chem.*, vol.60, pp.2473-2478, 1988.
- [3] M. Umana and J. Waller, "Protein-Modified Electrodes. The Glucose Oxidase/Polypyrrole System", *Anal. Chem.*, vol.58, pp.2979-2983, 1986.
- [4] 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.
- [5] 김현철, 구할본, "Polypyrrole / Glucose Oxidase 효소전극의 전기화학적 특성", 한국전기전자재료학회 춘계학술대회 논문집, pp.357-361, 1999.