

Polypyrrole / Glucose Oxidase 효소전극의 전기화학적 특성

Electrochemical Properties of Polypyrrole / Glucose Oxidase Enzyme Electrode

김현철*, 구할본*

Hyun-Cheol Kim*, Hal-Bon Gu*

* 전남대학교 공과대학 전기공학과

* Dept. of Electrical Eng. Chonnam Univ.

Abstract

GOD electrochemically immobilized in PPy/GOD complex have an effect on redox properties of the complex. In the cyclicvoltammetry, GOD shows the redox reaction at the potential below -0.6V vs. Ag/AgCl. That leads to new peaks in the cyclicvoltammograms in addition to typical PPy peaks. The pH of electrolyte solution during potential swing decreased to 4.4, and then increased to 10. That suggests the redox of GOD for the cycling. As the concentration of GOD was increased, the anodic wave of the new peaks was strong as much as increased.

GOD obstructs the diffusion of electrolyte anion because of its net chain. Insulating property of GOD is cause that it made the faradic impedance of complex large in charge transfer. It suggests that increase of the concentration of GOD be against electrochemical coupling. Therefore, the concentration of GOD and electrochemical coupling should be dealt with each other.

The apparent Michaelis-Menten constant (K'_M) was determined by $30.7 \text{ mmol dm}^{-3}$ for the PPy/GOD complex. The value is of the same order of magnitude as that for soluble glucose oxidase from *Aspergillus Niger*.

1. 서 론

바이오 센서는 임상에서의 활용을 비롯하여 가정에 이르기까지 실생활에 널리 이용되고 있다. 그러나 이러한 상업적 요구에도 불구하고, 바이오 센서 기술에는 현재 당면해 있는 몇 가지 과제가 있다. 생체에서 분리된 생물학적 감지 물질(효소, 항체, 수용체 및 세포 등)의 안정성, 고정화 전략 및 전자 변환기 기술이 그것이다[1,2]. 고정화 전략에 있어서, 고정화 그 자체뿐만 아니라 변환기 기술로의 연계에 유리한 것이 효소전극이며[3], 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

기질의 산화환원 등의 양자화된 전기화학적 특성을 이용하는 효소센서 즉, 효소전극은 생화학적 반응에 아울러 전기화학적 반응을 수반한다. 그러므로 전극의 표면부에 효소의 안정적인 고정화와 전기화학적으로 활성인 전극/효소의 복합체가 요구된다. 이를 위하여 전자 수용성이 큰 저분자 물질을 비롯한 다양한 재료가 연구되고 있으며, 매개체를 이용하는 것에 대한 연구도 진행되고 있다[4,5]. 고정화 전략의 핵심은 효소와 전극 간의 효과적인 물리적/전기화학적 coupling 과 그 안정성이다[6]. 도전성 고분자는 넓게 분포하고 있는 π 전자로 인하여, 본질적으로 전기화학적 활성을 가지고 있으며, 또

한 도핑에 의하여 전기적 특성은 물론 광학적, 물리적 특성이 극적으로 변화한다. 이러한 도전성 고분자에 효소를 고정화 시키면, 효소는 고분자의 사슬에 물리적으로 고착될 뿐만 아니라 그 사슬과 효소간에는 정전 상호작용이 발생하여 전하 수수 등 전기화학적 coupling 을 유지하게 된다[6]. 그러므로 도전성 고분자는 효소의 고정화 전략에 부합되며, 도핑에 의한 그 물성의 제어가 용이하기 때문에 효소전극 재료로써 유망하며, 현재 폭넓은 연구가 진행되고 있다.

우리는 이 논문을 통하여 효소의 샘플로 포도당 산화효소 (glucose oxidase ; GOD)를 polypyrrole(PPy)에 고정시켜, 고정화 막으로써 PPy/GOD 복합체의 전기화학적 특성과 그에 따른 GOD의 영향을 발표한다.

2. 실험

PPy/GOD 복합체는 0.2 mol dm^{-3} pyrrole (SIGMA), 0.1 mol dm^{-3} potassium chloride (ALDRICH), 12 또는 24 units/ mL GOD (TYPE II, SIGMA)의 혼합액에 ITO glass 작업전극, 백금선 대항전극 및 Ag/AgCl 기준전극을 사용하여 $+0.8 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl로 약 500mC/cm^2 동안 전해 중합하였다.

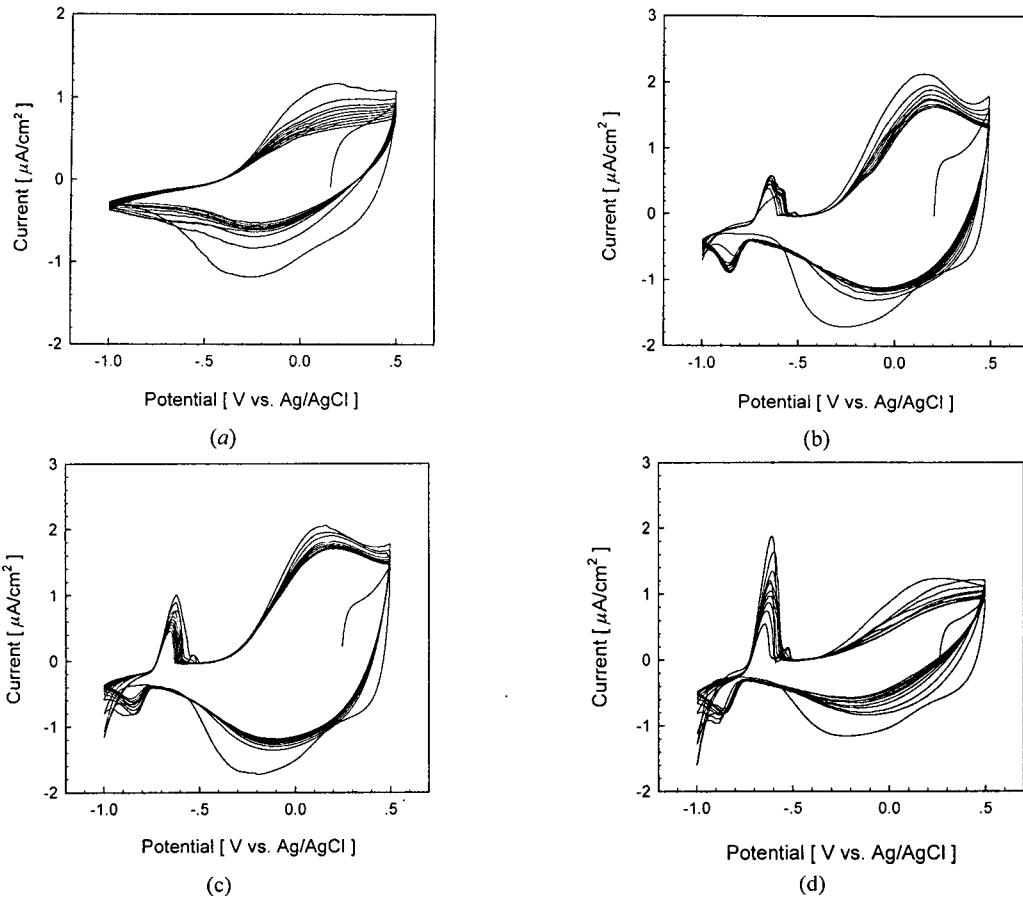


그림 1. 전해 중합된 PPy 및 PPy/GOD 복합체의 cyclicvoltammogram.

Fig. 1. Cyclicvoltammograms. (a) PPy. (b) PPy/GOD prepared in the solution with 12 units/ml GOD. (c) The same complex as (b) but cycled in the electrolyte with 19.6mmol dm⁻³ glucose added. (d) PPy/GOD prepared in the solution with 24 units/ml.

Cyclicvoltammetry는 0.5 mol dm^{-3} potassium chloride 수용액에서 10mV/s 의 주사속도로 $-1.0 \text{ V} \sim +0.5 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl의 범위에서 수행하였다.

효소전극의 glucose 감지는 0.1 mol dm^{-3} phosphate buffer 용액(pH 7.0)에 1mM *p*-quinone을 첨가한 후, $+0.35 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl를 인가하여 전류의 변화를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

Aspergillus niger GOD는 등전점(等電點)이 4.2이기 때문에, 중합 액의 pH 7.0에서는 음으로 대전되어 polyanion으로서 PPy의 주 사슬과 정전 상호작용을 하며 복합체를 형성한다[6]. 효소전극으로서의 PPy/GOD 복합체의 전기화학적 특성은 cyclicvoltammetry를 통하여 연구하였다.

그림 1은 약 500mC/cm^2 의 통전량으로 정전압 전

해 중합한 PPy 및 효소전극 PPy/GOD 복합체에 대한 cyclicvoltammogram이다. 그림 1(a)는 PPy의 전형적인 산화환원 곡선이며, 0V 와 -0.3V vs. Ag/AgCl 사이에서 $0.5 \mu\text{m}$ 이상의 두께를 가지는 필름에서 나타나는 폭이 넓은 산화환원 피크들이 관측된다. 그런데 그림 1의 (b), (c), (d)에서는 PPy의 전형적인 피크 외에 -0.6V vs. Ag/AgCl 이하에서 부가적인 피크들이 관측된다. 이것은 PPy 밴드갭에 존재하는 불순물 준위의 영향 또는 필름 내부에 분포해 있는 짧아진 고분자 사슬의 영향 및 GOD의 산화환원에 의한 것 등으로 생각해 볼 수 있다.

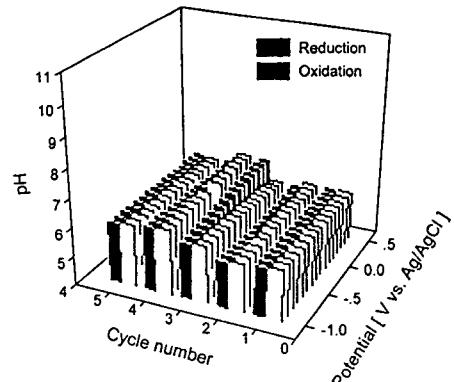
첫째, 그림 1의 (b), (c), (d)에서 복합체의 부가적인 피크는 PPy 밴드갭 내부에 존재하는 불순물 준위의 영향으로 생각할 수 있다. 이것은 Bredas 등에 의하여 제안된 경험적인 비교[7] 즉, valance effective Hamiltonian 계산과 전기화학실험의 측정과의 비교

에 의하여, onset potential에 있어서 복합체의 이온화에너지를 계산할 수 있다[8]. PPy 전형적인 피크에 대하여 약 4.1eV이고, 부가적인 피크에 대하여 3.7eV이다. 이것은 밴드갭 내부의 억셉터 준위 존재를 뒷받침한다. 그러나 불순물이 고분자 주 사슬과 배위하고 있는 도전성 고분자의 산화환원은 전하 중성상태를 유지하기 위하여 물질의 이동을 수반하게 된다. 그런데 polyanion으로서 배위하게 되는 GOD는 PPy 고분자 matrix의 장해에 의하여 복합체와 용액 사이를 이동할 수 없게 된다. 그러므로 복합체의 산화환원 과정 동안에 발생하는 새로운 피크는 불순물 준위의 영향으로 보기 어렵다.

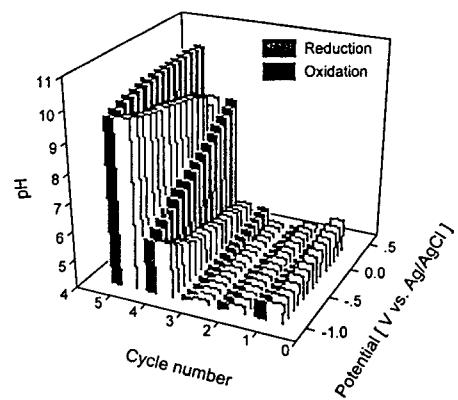
둘째, 절연성의 GOD가 PPy 필름 내부로 흔입되는 경우 PPy 사슬은 고도로 발달하지 못하게 되고, 그 결과 여러 개의 짧은 사슬들이 분포하게 된다[9]. 우리는 실제로 2 mA/cm² 이상의 전류로 PPy를 중합한 경우, 사슬의 일부가 분해되는 것을 경험하였다. 그러나 이것은 중합과 세척하는 과정에서 대부분이 용액으로 흘러나오게 된다. 그리고 이러한 사슬의 영향은 다만 피크의 강도와 관계되는 것이고, 새로운 피크를 형성한다고 보기 어렵다. 이것은 그림 2의 결과를 통하여 명백해 진다.

그림 2(a)는 PPy의 산화환원 중에 0.5M KCl 전해액의 pH 변화이다. 그림에서 알 수 있듯이 산화환원이 계속되어도 용액의 pH에는 큰 변화가 없었다. 그럼에서 회색막대는 환원파에 해당하고, 흑색막대는 산화파에 해당한다. 반면에 그림 2(b)는 PPy/GOD 복합체의 산화환원에 있어서 용액의 pH 변화인데, pH 4.4에서 pH 10.0까지 변화한다. 이러한 pH의 변화는 α -amino 산을 가지는 GOD가 전하 중성상태를 유지하기 위하여, 말단 carboxyl 기의 H⁺를 내보내거나 흡수하기 때문이다. 그러므로 복합체의 부가적인 피크가 짧아진 PPy 사슬의 일부분에 의한 것으로 보기 어렵다는 것을 뒷받침한다. 사슬이 고도로 발달하였는지의 여부에 관계없이 산화환원 동안에 용액의 pH는 크게 변화하지 않아야 하기 때문이다.

끝으로, PPy/GOD 복합체에 발생하는 새로운 피크는 GOD 자신의 산화환원에 의한 것으로 고찰하는 것이다. 그림 1의 (b)는 0.5 mol dm⁻³ KCl 수용액에서 복합체의 산화환원이며, 이 전해액에 glucose를 첨가한 결과는 그림 1(c)에 나타난다. (b)와 (c)의 비교에서 -0.6V vs. Ag/AgCl 이하에서 발생한 새로운 피크의 산화파는 전해액에 glucose를 첨가한 경우에 강해지는 것을 관측할 수 있다. 이것은 산화상태의 GOD가 glucose의 첨가에 의하여 본질적인 기질과의 반응을 시사한다.



(a)



(b)

그림 2. Cyclicvoltammetry 중의 용액의 pH 변화.
Fig. 2. Variation of pH in the solution during the swing potential. (a) PPy. (b) PPy/GOD prepared at GOD concentration of 12units/ml.

한편, 그림 1(b)와 그림 1(d)의 비교를 통하여, 2배 농도의 GOD가 복합체에 흔입되도록 한 경우, 부가적인 피크의 산화파의 강도가 약 2배가 되는 것을 관측할 수 있었다. 이것으로 복합체의 산화환원에 GOD 산화환원이 영향을 미치는 것이 명백해 진다. 한편, 환원파의 경우에는 피크의 강도에 거의 변화가 없는데, 이것은 GOD의 산화과정 동안에 carboxyl 기에서 탈리한 H⁺가 counter 전극에서 기체로 소모되어 버리기 때문에 GOD의 환원반응 동안에 다시 복귀하지 못하게 된다. 그리고 counter 전극 Pt는 H⁺에 대하여 blocking 전극이 된다.

부가적인 피크가 GOD의 산화환원에 의한 영향임

을 시사하는 또 하나의 명백한 사실을 그림 2의 (b)에서 찾을 수 있다. 그림은 복합체의 산화환원 중에서 각 cycle마다 회색막대의 환원파가 먼저 진행되고 흑색막대의 산화파가 진행되는 순서이다. 첫번째 cycle에서, 복합체의 환원반응 동안에 PPy의 환원에 의한 전하 중성상태를 유지하기 위하여 용액의 H^+ 가 필름 내부로 진행하여 용액의 pH가 증가해야 되지만, 그 potential에서 GOD는 산화반응을 한다. 그래서 용액의 pH는 오히려 감소하게 된다. GOD의 산화는 GOD 자체의 전하 중성상태를 유지하기 위하여 말단 carboxyl 기의 H^+ 를 탈리시키기 때문이다. 복합체의 산화반응에서는 PPy 와 GOD가 모두 산화반응을 하게 되어 용액의 pH 감소는 가중된다. 그런데 주목할만한 것은 세 번째 cycle이다. 용액의 pH는 4.4 까지 감소하는데 등전점이 4.2인 GOD의 전하상태는 이 때 거의 중성이 되어, 더 이상 PPy의 주 사슬과 정전 상호작용을 할 수 없게 된다. 마침내 GOD는 PPy의 사슬 가운데에서 고립상태가 되고, 사슬의 전하 중성상태의 유지는 전해질 음이온의 몫이 된다. 그 이후의 cycle은 H^+ 의 공급원이 차단된 상태에서 용액의 H^+ 를 소모하여 결국, 용액의 pH는 상승한다.

그림 3는 PPy 와 PPy/GOD 복합체의 주파수에 따른 교류 임피던스 측정의 결과이다. (a)의 경우 낮은 주파수 영역에서의 물질 이동에 대한 확산은 전형적인 반무한 확산의 경향을 보인 반면, GOD의 농도가 커질수록 확산에 의한 물질 이동의 제한이 심화되는 것을 관측할 수 있다. 이것은 GOD 역시 고분자와 같이 matrix를 형성하기 때문에 이온의 이동이 제한되는 것이다. 그리고 높은 주파수 영역에서의 faradic 저항은 그림 3(a)의 경우보다 GOD의 농도가 높아지는 그림 3(b)와 (c)의 경우가 거의 3 배 정도 증가하는 것을 볼 수 있다. 이것은 절연성 GOD의 영향으로 필름의 산화환원 반응 즉, 전자 수수에 대한 반응성 저항의 증가이다. 효소전극의 고정화 전략에 비추어 볼 때, 이것은 기질에 대한 반응을 증대시키기 위하여 보다 많은 양의 효소를 고정화 시키는 것은 효소의 긴 사슬과 절연성 때문에 물리적, 특히 전기화학적 coupling에 전혀 유리하지 않다는 것을 시사한다.

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

그림 4는 이 연구에서 제조한 PPy/GOD 복합체의 glucose에 대한 전류응답 곡선이다. +0.35 V vs. Ag/AgCl에서 정상상태의 전류 응답이 얻어진 후 0.5, 1, 4.98 및 9.9 mmol dm⁻³ 농도의 glucose를 마이

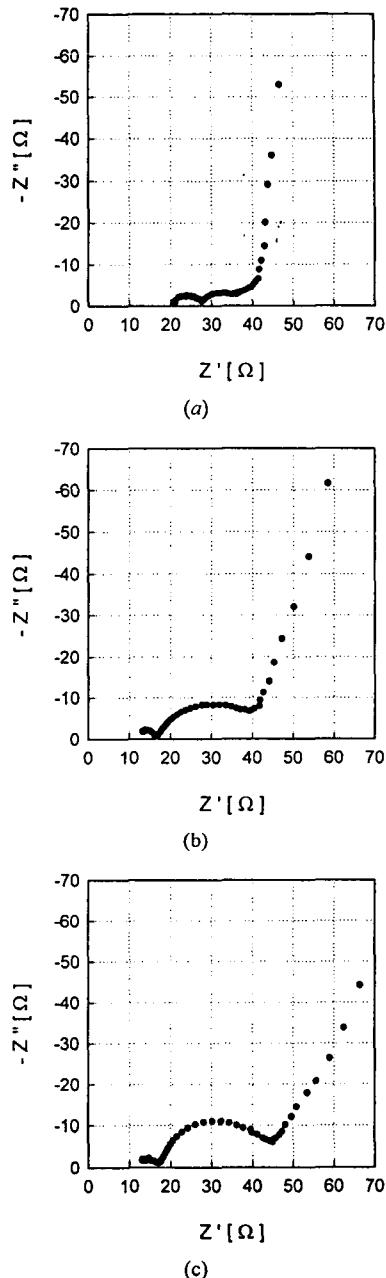


그림 3. PPy 와 PPy/GOD 복합체의 교류 임피던스.
Fig. 3. AC impedance spectroscopy of PPy and PPy/GOD complex. (a) PPy. (b) PPy/GOD prepared with 12units/ml GOD. (c) PPy/GOD prepared with 24units/ml GOD.

크로 주사기로 주입하였을 때의 전류응답이다.

그림 5는 Lineweaver-Burke plot이며[6], 식(1)의 관계에서 구한 결보기 Michaelis-Menten 상수(K'_M)와

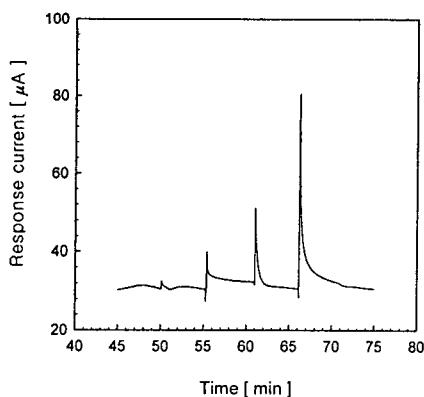


그림 4. Glucose 주입에 대한 전류응답.
Fig. 4. Response curve for glucose at +0.35 V vs. Ag/AgCl.

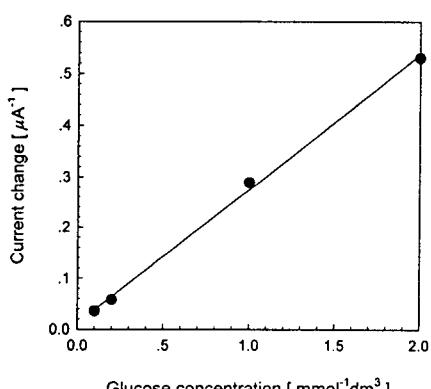


그림 5. 결보기 Michaelis-Menten 상수.
Fig. 5. Determination of the apparent Michaelis-Menten constant for the complex.

최대 응답전류는 각각 $30.7 \text{ mmol dm}^{-3}$, $83 \mu\text{A}$ 이다. 이 K'_M 값은 *Aspergillus niger* GOD의 두자리 수의 값과 일치한다.

4. 결 론

GOD가 전기화학적으로 고정화된 PPy/GOD 복합체의 전기화학적 반응에 있어서, GOD는 복합체의 산화환원에 영향을 미친다. 그 결과로 복합체의 cyclicvoltammograms에서 PPy의 전형적인 피크 외에 새로운 피크의 형태로 나타난다. GOD 농도를 증가시키면, 새로운 피크의 산화파는 그만큼 강화되고, PPy의 피크는 약화된다.

PPy에 마치 polyanion처럼 배위하게 되는 GOD는 자체의 사슬 때문에 전해질 음이온의 확산을 제한한다. 또한 본질적으로 절연성이기 때문에 산화

환원 반응 및 전자 수송에 있어서 GOD는 복합체의 전기화학 반응성 저항을 증대시킨다. 기질과의 생화학적 반응을 증대시키기 위하여 GOD의 고정화 양을 늘리면, 반응성 저항이 증가하여 전기화학적 coupling에 도움이 되지 않는다. 그러므로 서로 상반되는 효과가 있는 생화학적 반응과 전기화학적 반응은 적절한 타협 점에서 균형을 이루어야 한다.

이 연구에서 제조한 PPy/GOD 효소전극의 기질에 대한 친화력은 Michaelis-Menten 상수 $30.7 \text{ mmol dm}^{-3}$ 을 보여, 전기화학적 coupling과 고정화가 생화학적 반응을 저하시키지 않음을 시사한다.

참 고 문 헌

- [1] M. P. Byfield and R. A. Abuknesha, "Biochemical aspects of biosensors", *Biosensors & Bioelectronics*, vol.9, pp.373-400, 1994.
- [2] R. S. Sethi, "Transducer aspects of biosensors", *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 Polymers", *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I*, vol.82, pp.1259-1264, 1986.
- [7] J. L. Bredas, R. Silbey, D.S. Boudreax 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.
- [8] 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.
- [9] 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.