

Polypyrrole-Glucose Oxidase 효소전극에 대한 효소 고정화의 정성적 평가

김현철*, 구할본*, 사공 건**
*전남대학교 전기공학과, **동아대학교 전기공학과

Qualitative Analyses of Polypyrrole-Glucose Oxidase Enzyme Electrode for Immobilization

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 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. Such being the case, it is useless to increase in amount of glucose oxidase more than reasonable in the synthetic solution.

We establish by means of qualitative analysis that amount of immobilized glucose oxidase can be improved by adding a little ethyl alcohol in the synthetic solution.

As ethyl alcohol was added by 0.1 mol dm⁻³ in the synthetic solution, the faradic impedance of resultant electrode was increased about five times as much as the case of ethyl alcohol free in the solution, and mass transport was limited more than over. That is due to insulating property and net chain of the glucose oxidase. Moreover, in ultraviolet spectra of the synthetic solution, the adsorption peak at 285nm corresponding to glucose oxidase was decreased. It suggests increase in amount of immobilized glucose oxidase.

1. 서 론

효소를 이용한 바이오 센서 연구에 있어서 최근의 동향은 효소 고정화 전략에 초점을 맞추고 있다. 용액 상태로 응용하는 것에 비해, 전극물질에 효소를 고정화시키는 경우 센서의 재사용, 효소의 안정화 및 가수분해 또는 열화의 방지를 도모할 수 있기 때문이다.^[1]

고정화 전략의 핵심은 효소와 전극 간의 물리적 및 전기화학적 coupling과 그 안정성이다.^[2] 이것을 목표로 다양한 재료와 방법을 통하여 효소전극에 접근하고 있다. 그 중에서 도전성 고분자의 전해중합을 통해 효소전극을 제조하려는 연구가 시도되고 있다.^[3,4]

도전성 고분자는 주쇄를 따라 분포하고 있는 π전자로 인하여 본질적으로 전기화학적 활성을 가지고 있으며, 효소가 고정화되는 경우 효소의 물리적 고정화뿐만 아니라 고분자 주쇄와의 정전 상호작용이 발생하여 전기화학적 coupling을 유지하게 된다. 그런데, 본질적으로 절연체인 효소가 도전성 고분자에 고정화 되면, 전하 수수반응 및 물질 이동을 방해한다. 그러므로 고분자 필름을 합성할 때, 첨가하는 효소의 양을 증가시키면 고분자 필름의 성장이 둔화되며 심지어는 필름이 성장하지 않는 경우도 있다. 따라서 고정적인 전해중합의 방법으로 효소 고정화 양을 증가시키는 것은 제약이 있으며, 어느 적정량 이상을 첨가하는 것은 필름의 성장 면에 있어서 바람직하지 않다.

고정화 양을 증대 시키려는 연구들이 다양한 방법으로 시도되고 있으며, 그 대표적인 것이 gel matrix 내부에 효소를 고정화시키는 것과, cross-linking에 의하여 효소를 고정화시키는 것이다. 물론 효소의 고정화 양을 증대시킬 수는 있지만, 전자(前者)는 기질의 확산을 방해하는 장벽을 초래하며, 효소 활동도의 손실이 야기된다. 후자(後者)는 효소에 손상을 일으킬 가능성이 크며, 기계적으

로 견고하지 못하다는 단점이 있다.^[5]

따라서, 우리는 전해중합의 방법으로 polypyrrole(PPy)에 glucose oxidase(GOD)을 고정화 시키는 경우, 필름 성장을 제한하지 않는 적정량의 GOD를 첨가할 때 전기화학적 coupling을 유지하면서 고정화 양을 향상시키는 방법과 효소의 고정화에 대한 정성적 평가를 발표한다.

2. 본 론

2.1 실험 방법

PPy-GOD 효소전극은 0.2 mol dm⁻³ pyrrole (SIGMA) 용액에 0.1 mol dm⁻³ potassium chloride (ALDRICH), 0.5 mg/ml의 GOD (TYPE II, SIGMA)을 첨가하고, 경우에 따라서 0.1 mol dm⁻³의 ethyl alcohol (ALDRICH)을 첨가하여, +0.8 V vs. Ag|AgCl로 300 mC cm⁻² 동안 전해중합으로 제조하였다.

Cyclic voltammetry는 0.5 mol dm⁻³ potassium chloride 수용액에서 10 mV s⁻¹의 주사 속도로, -1.0 V ~ +0.5 V의 포텐셜 영역에서 수행하였다.

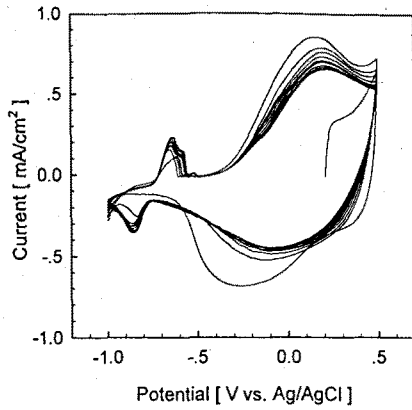
효소 전극의 전기화학적 반응의 평가를 위하여 2MHz에서 0.01Hz까지 주파수를 변하여 교류 임피던스를 측정하였다. 또한 효소 고정화의 경향을 분석하기 위하여 HITACHI 3501 spectrophotometer를 이용하여 자외선 분광분석을 행하였다.

2.2 결과 및 고찰

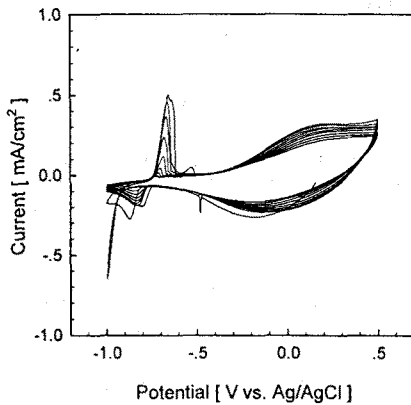
PPy-GOD 효소전극의 GOD 고정화에 대한 정성적인 해석을 위하여 cyclic voltammetry, 교류 임피던스 및 자외선 분광분석 등 전기화학적 광학적 특성을 연구하였다. 이 논문에서 사용된 포텐셜은 별도의 언급이 없는 한, Ag|AgCl 참조전극에 대한 값이다.

그림 1은 300 mC cm⁻²의 통전량으로 정전압 전해 중합한 PPy-GOD 효소전극에 대한 cyclic voltammogram이다. GOD가 고정화되는 경우, PPy의 고유한 산화환원 피크 외에 -0.7 V 근방에서 새로운 산화환원 피크가 관측되었다. 이것은 GOD가 고정화됨에 따라 고분자 사슬의 발달이 약화되고 또한 GOD자체의 산화환원의 영향인 것으로 발표한 바 있다.^[6] 그림 1(b)는 중합액에 ethyl alcohol이 첨가된 경우에 제조된 효소전극의 산화환원 특성이다. Ethyl alcohol이 첨가되지 않은 경우의 부가 피크(그림 1(a)) 즉, 고정화된 GOD의 영향은 PPy 주 피크에 비해 다소 미약한 반면, ethyl alcohol의 첨가에 의하여 GOD의 영향이 강하게 반영되는 것을 관측할 수 있다. 이것은 ethyl alcohol의 첨가로 인하여 GOD 고정화량이 증대되는 것을 의미한다.

그림 2는 상기에 언급한 효소전극에 대한 교류 임피던스 특성을 보여준다. PPy에 절연성의 GOD가 고정화됨에 따라 반응성 저항이 증가하고 물질이동에 대한 확산이 제한되는 것을 그림 2(a)와 그림 2(b)에서 알 수 있다. 고주파수 영역의 faradic 임피던스에 대하여, 중합액에 ethyl alcohol이 첨가된 그림 2(c)의 경우가 ethyl alcohol이 첨가되지 않은 채 중합된 그림 2(b)보다 약 5배 이상 증가된 것을 관측할 수 있다. 이것은 절연체적인 성질을



(a)



(b)

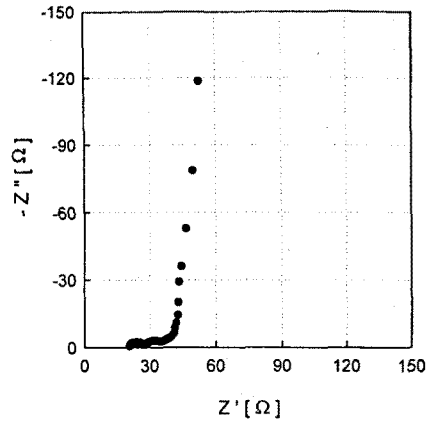
그림 1. PPy-GOD 효소전극의 cyclic voltammograms.

Fig. 1. Cyclic voltammograms of PPy-GOD enzyme electrode.

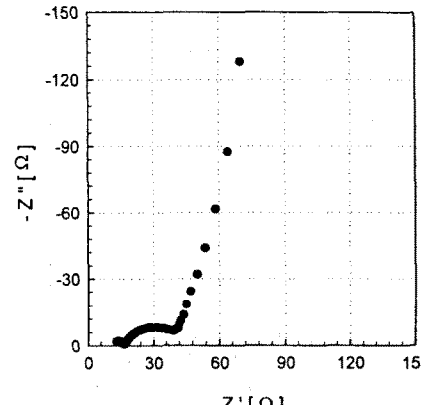
(a) 0.5 mg/ml GOD added in the synthetic solution. (b) 0.5 mg/ml GOD and 0.1 mol dm⁻³ ethyl alcohol added in the synthetic solution.

가지는 GOD에 기인한 것으로 판단되며, 또한 고정화량의 증가를 시사한다. 한편, 저주파수 영역의 확산제한에 대하여, ethyl alcohol이 첨가되어 중합된 효소전극에서 물질 이동의 제한이 심화되는 것을 관측할 수 있다. 이것은 polypeptide 구조를 갖는 GOD의 구조적 장애에 의한 것으로 판단된다. 이로써 중합액에 ethyl alcohol을 첨가하여 제조한 효소전극의 경우, GOD의 고정화량이 증대되는 것을 정성적으로 평가할 수 있다.

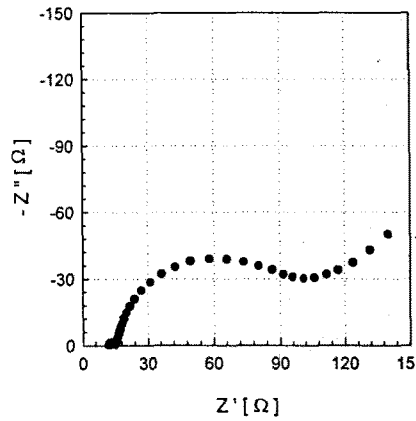
그림 3은 전해중합 전후의 용액에 대한 자외선 흡수 스펙트럼이다. 전해중합 전의 용액에 대한 스펙트럼을 그림 3(a)에 나타낸다. 그림에서 알 수 있듯이 ethyl alcohol의 첨가 여부에 관계없이 275nm에서 GOD의 흡수 피크를 관측할 수 있다. 한편, 전해중합 이후의 용액에 대한 자외선 흡수 스펙트럼은 그림 3(b)에서 볼 수 있다. 우선 GOD의 흡수 피크에 대해서 고찰해 보면, 중합 전 275nm에서 중합 후에 285nm로, 10nm 적색편이를 보이고 있다. Pyrrole을 전해중합하면, monomer들 사이에 대부분 α -coupling을 이루게 되며 일부는 β -coupling을 형성한다. 이러한 coupling의 이유와 중합조건 등에 의하여 고분자 사슬은 이상(理想)적으로 발달하지 못하고 일부는 dimer 또는 trimer 등과 같은 oligomer 형태로 용액 중에 남게 된다. 이 때 그들과 정전상호작용으로 마치 polyanion과 같이 배위하고 있던 GOD도 함께 용출 되는데, 이러한 정전상호작용에 의하여 GOD의 흡수 피크가 적색편이를 보이는 것으로 판단된다. 한편, 중합 전의 용



(a)



(b)

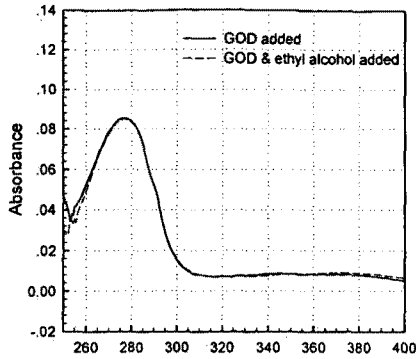


(c)

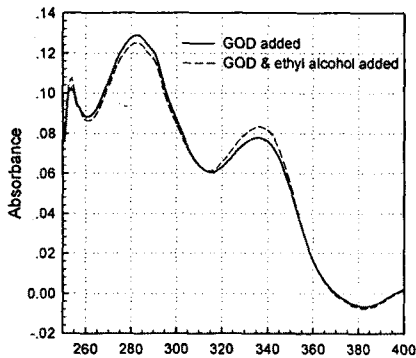
그림 2. PPy-GOD 효소전극의 교류 임피던스 특성.

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

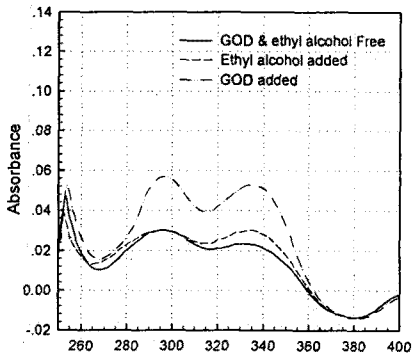
액에 대하여 보이지 않았던 피크가 중합 후의 용액에 대해서는 335nm에서 관측되었다. 이것은 용출된 oligomer에 의한 흡수 피크로 판단할 수 있으며, 그것은 그림 3(c)에서 명백히 알 수 있다. 그림 3(c)는 중합용액 자체를 reference로 하여 측정된 중합반응 후의 흡수 스펙트럼이다. 그림에서 볼 수 있듯이 295nm와 335nm에서 두 개의 흡수 피크를 관측할 수 있다. 이 피크들이 oligomer의 흡수에 의한 것으로 생각할 수 있다. 그림 3(b)에서



(a)



(b)



(c)

그림 3. 효소전극 제조를 위한 전해중합 전후의 자외선 흡수 스펙트럼.

Fig. 3. Ultraviolet spectra of synthetic solution before synthesis and after. (a) Before synthesis. Pyrrole, KCl and/or ethyl alcohol reference. (b) After synthesis. Pyrrole, KCl and/or ethyl alcohol reference. (c) After synthesis. Synthetic solution reference.

295nm의 흡수 피크를 관측할 수 없는 이유는 285nm의 강한 GOD 흡수 피크에 묻히기 때문이다. 그림 3(c)의 피크 경향을 고찰해 보면, GOD와 ethyl alcohol이 포함되지 않은 경우에도 상기에서 언급한 바와 같이 coupling과 중합조건 등의 문제로 oligomer가 용출 되는 것을 알 수 있다. 그리고 ethyl alcohol이 첨가된 경우에 전해 중합한

고분자 필름은 비교적 사슬이 발달한 것임을 예측할 수 있다. 그러나 중합액에 GOD가 포함되면, GOD의 절연성 및 물질이동에 대한 제한 때문에, 얻어지는 필름은 보다 짧은 사슬을 가지게 되고 용출 되는 oligomer의 양도 증가하는 것을 알 수 있다. 이것은 그림 3(c)에서 확인할 수 있듯이 두 흡수 피크의 증가로 나타난다.

끝으로 GOD의 고정화 경향에 대하여 고찰한다. GOD 고정화를 위한 중합액에 ethyl alcohol을 첨가함으로써 그림 3(b)의 285nm 피크의 감소가 발생하고, 이것은 효소 전극에 고정화 되는 GOD 양의 증가를 시사한다. 그러나 역설적으로 용출 된 oligomer의 흡수에 해당하는 335nm의 피크는 증가한다. 이것은 ethyl alcohol의 첨가에 의하여 GOD가 oligomer와 함께 용출 되지 않거나 또는 용출 되는 양이 감소하는 것을 의미한다. 그 메커니즘은 아직 명확하지는 않지만, ethyl alcohol의 첨가로 전해중합 반응의 초기에 필름 성장의 속도가 제어되고, 그로 인해 중합반응에 수반되는 물질의 이동(음이온의 도핑) 균등해져서 polyanion처럼 배위하는 GOD의 용출이 감소하는 것으로 생각된다. 이 점에 대한 보다 상세한 연구가 진행 중이다.

3. 결 론

이 논문을 통하여, 우리는 PPy-GOD 효소전극을 전해 중합으로 제조할 때 소량의 ethyl alcohol을 첨가함으로써 GOD의 고정화량을 향상시킬 수 있음을 정성적으로 밝혔다. 이것을 교류 임피던스의 측정 및 자외선 흡수 스펙트럼을 통하여 연구하였으며, 그 결과 효소전극에 절연성 및 사슬구조의 GOD가 고정됨으로써 전기화학 반응성 저항이 증가하고 물질이동이 제한되었다. 또한 ethyl alcohol을 첨가하여 효소전극을 제조한 경우, 중합용액의 자외선 흡수에서 285nm의 흡수가 감소하였으며, 이것으로 GOD 고정화량의 증가를 확인할 수 있었다.

[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 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 N. C. Foulds and C. R. Lowe, "Immobilization of Glucose Oxidase in Ferrocene-Modified Pyrrole Polymers," *Anal. Chem.*, vol.60, pp.2473-2478, 1988.
- [4 M. Umana and J. Waller, "Protein-Modified Electrodes. The Glucose Oxidase/Polypyrrole System," *Anal. Chem.*, vol.58, pp.2979-2983, 1986.
- [5 Brian R. Eggins, *Biosensor: an Introduction*, Wiley and Teubner, New York, 1996.
- [6 H. C. Kim and H. B. Gu, "Electrochemical Properties of Glucose Biosensor: Polypyrrole / Glucose Oxidase Membrane," *Proc. IEEE TENCON '99*, vol. 2, pp. 1565-1568, 1999.