Journal of the Korean Institute of Electrical and Electronic Material Engineers, Vol. 15, No. 7, p. 621, July 2002.

논 문 15-7-11

# 유기용매 첨가에 따른 Polypyrrole-Glucose Oxidase 효소전극의 효소고정화 향상 II. 전기화학적 분석 및 포도당 감지

# Improvement on Enzyme Immobilization in Polypyrrole-Glucose Oxidase Enzyme Electrode using Organic Solvent Additive II. Electrochemical Analyses and Glucose Sensing

김현철, 구할본

(Hyun-Cheol Kim and Hal-Bon Gu)

**Abstract**

In the case of immobilizing of glucose oxidase (GOx) in polypyrrole (PPy) conducting polymer using electrosynthesis, the GOx 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 GOx and the backbone of the PPy. That is mainly due to insulating property and net chain of the GOx. Since being the case, it is useless to increase in amount of GOx more than reasonable in the synthetic solution. We improved the amount of immobilized GOx into the PPy by adding a little ethanol in the synthetic solution without any more amount of GOx in the solution. We electrochemically analyzed an improvement in the immobilizing event. For the glucose sensing, when ethanol was added by 0.1 mol $dm^{-3}$ in the synthetic solution, the Michaelis constant of the resulting enzyme electrode was about 32 mmol $dm^{-3}$ and maximum current was about 146 $\mu$A.

**Key Words** : Polpyrrole, Enzyme electrode, Glucose oxidase, Michaelis constant

## 1. 서 론

효소의 생화학적 반응을 전기적인 신호로 얻어내는 효소전극에 있어서, 효소를 전극에 고정화하는 고정화 기술의 핵심은 효소와 전극 사이의 전기화학적 coupling의 유지와 효소의 활동도 유지 즉, 전극물질에 효소가 고정화된 이후에 기질에 대한 친화력 및 반응 속도 등 생화학적 반응도의 저하를 최소화하는 것이다. 이것을 목표로 다양한 연구들이 진행되어 오고 있다[1,2].

한편, gel entrapment 등의 방법에 의하여, 효소전극에 고정화되는 효소의 양을 증대하려는 연구도 시도되었다. 물론, 이러한 방법은 전극물질에 고정화되는 효소의 양을 증가시킬 수 있다. 그러나 문제는 생화학적 반응을 전기화학적 수단을 통하여 전기적 신호로 얻어내는 효소전극에 있어서 요구되는 것은 효소의 고정화 양에 아울러 기질에 대한 높은 친화력의 유지 즉, 생화학적 반응도의 유지와 전기화학적 coupling의 유지가 그것이다. 이러한 관점에서

전남대학교 공과대학 전기공학과
(광주광역시 북구 용봉동 300,
Fax : 062-530-0077
E-mail : hbgu@chonnam.ac.kr)
2001년 11월 23일 접수, 2002년 1월 2일 1차 심사 완료,
2002년 3월 4일 최종 심사 완료

gel entrapment 고정화 방법은 효소전극으로의 기질의 확산에 대한 장벽을 형성하여 효소의 실효 활동도 손실을 일으킨다. 따라서 생화학적 반응도가 저하하게 된다[3].

도전성 고분자는 사슬을 따라 분포하고 있는 π전자로 인하여 본질적으로 전기화학적 활성을 가지고 있으며, 전기화학적으로 효소가 고정화되는 경우 효소의 물리적 고정화뿐만 아니라 고분자 사슬과 효소 사이에 정전 상호작용이 발생하여 전기화학적 coupling을 유지하게 된다. 그러나, 효소의 본질적인 절연성과 사슬구조 때문에, 중합하는 동안에 전하수수와 물질이동이 제한된다. 고정화 양을 향상시키기 위하여 중합 용액에 보다 많은 효소를 첨가하면, 고분자 필름의 성장이 둔화되고, 심지어는 필름이 성장하지 않는 경우도 있다[4,5].

따라서, 본 연구에서는 polypyrrole(PPy) 도전성 고분자에 포도당 산화효소(glucose oxidase, GOx)를 전해중합을 통하여 고정화하는 경우, 중합용액에 소량의 유기용매를 첨가하여, 중합용액에 첨가하는 GOx 양을 증가시키지 않고 PPy-GOx 효소전극에 GOx의 고정화 향상을 도모하고자 한다. 이에 따라, PPy-GOx 효소전극의 전기화학적 특성과 포도당 주입에 따른 감지특성을 보고하고자 한다.

## 2. 실험 방법

### 2.1 효소전극의 제조

PPy-GOx 효소전극은 0.2 mol $dm^{-3}$ pyrrole (Sigma) 수용액에 0.1 mol $dm^{-3}$ potassium chloride (KCl, Aldrich), 0.5 mg $ml^{-1}$ GOx (*Aspergillus Niger* Type Ⅱ, Sigma)을 혼합하고, 경우에 따라 0.1 mol $dm^{-3}$ ethanol 또는 THF를 첨가하여 +0.8 V vs. Ag/AgCl에서 300 mC $cm^{-2}$ 동안 인가하여 전기화학적으로 제조하였다.

### 2.2 전기화학적 특성

순환 전압법을 이용하여 유기용매를 첨가하여 제조한 PPy-GOx 효소전극의 산화환원 특성 및 GOx 고정화의 영향을 연구하였다. Ag/AgCl 기준전극에 대하여 -1.0 V ~ +0.5 V의 범위에서 순환하였고, 전해질은 0.5 mol $dm^{-3}$ KCl을 사용하였다.

### 2.3 포도당 감지 특성

포도당 산화효소를 고정화한 PPy-GOx 효소전극의 포도당 감지 특성에 대한 연구는 전류법을 이용하여 수행하였다. 생화학반응과 전기화학반응의 매개체로 1 mmol $dm^{-3}$ *p*-benzoquinone을 0.1 mol $dm^{-3}$ 인산염 완충용액에 (pH 7.0) 첨가하였으며, 포텐셜은 quinone의 산화포텐셜인 +0.35 V를 인가하였다. 포도당 용액의 주입은 완충용액이 충분히 편극이 된 이 후에 각각 0.5, 1, 5, 10 및 20 mmol $dm^{-3}$의 농도로 주입하였다.

## 3. 결과 및 고찰

그림 1은 본 연구에서 제조한 PPy-GOx 효소전극에 대한 순환 전압전류 특성을 보여준다. 그림에서 볼 수 있듯이, PPy에 GOx가 고정화됨에 따라 0 V 근방에서 관측되는 PPy의 일반적인 산화환원 피크 외에, -0.7 V 근처에서 새로운 산화피크를 관찰할 수 있다. 이것은 이미 발표한 바와 같이, 산화환원이 진행되는 동안 배위하고 있는 GOx가 용액으로 빠져나가지 못하게 되어, 전하중성상태의 유지를 위한 n-type 도핑에 의한 피크이다[4]. 그림 1(a)와 (b)의 비교에서 관찰할 수 있듯이, PPy-GOx에 고정화된 GOx의 양이 증가함에 따라 n-type 도핑의 영향은 증가하고, 전해질 음이온의 도핑 즉, 0 V 근방의 p-type 도핑의 영향이 감소하는 것을 알 수 있다. 또한 고정화된 GOx의 양이 증가함에 따라, 0 V 근방의 산화피크의 포텐셜과 환원피크의 포텐셜이 그림 1(a)보다 더욱 분리되는 것을 관찰할 수 있다. 이것은 PPy-GOx 효소전극에 고정화된 GOx가 사슬구조를 가지고 있기 때문에 PPy로의 물질이동이 제한되기 때문이며, 고정화된 GOx의 양이 증가할수록 그 영향은 증대된다. 따라서 산화환원 반응의 반응속도는 물질이동에 의존하게 되며, 전기화학 반응은 가역반응에서 준가역반응이 된다. 한편, 그림 1(c)의 경우는 중합용액에 0.5 mg $ml^{-1}$의 GOx를 넣은 그림 1(a)의 중합조건에 소량의 ethanol을 첨가하여 제조한 효소전극의 순환 전압전류 특성이다. 이 경우에도 -0.7 V 근처에 n-type 도핑에 해당하는 산화환원 피크가 관찰된다. 그러나 n-type 도핑에 의한 산화환원 피크의 상대적 크기( 0 V의 피크와 비교할 때 )는 중합용액에 1.0 mg $ml^{-1}$ GOx를 넣은 그림 1(b)와 유사한 특징을 보인다. 이러한 n-type 도핑에 의한 피크는 고정화된 GOx의 영향에 의한 것이며, 따라서 그림 1 (a), (b), (c)의 비교에서 고찰할 수 있듯이, 중합용액에 동일한 양의 GOx가 포함된 경우, 소량의 ethanol을 첨가함으로써 고정화되는 GOx의 양을 향상시킬 수 있음을 시사한다. 아울러,

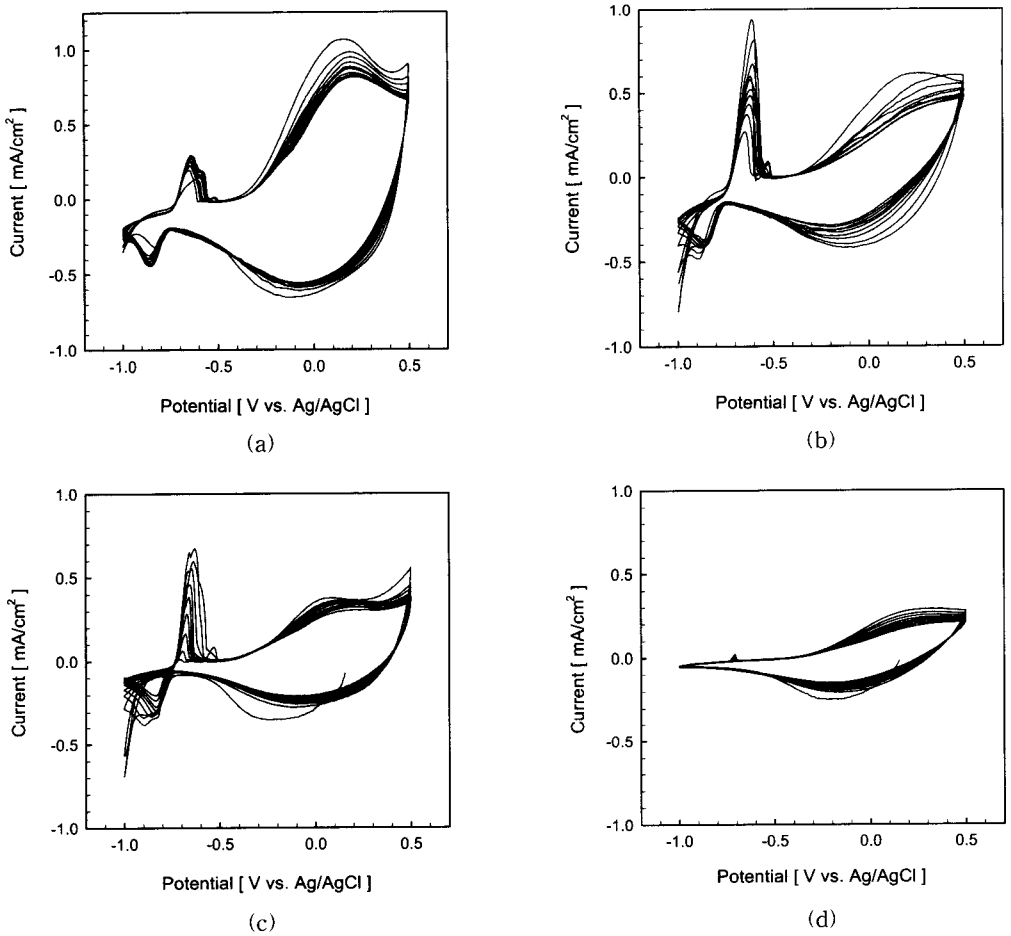


**그림 1.** PPy-GOx 효소전극의 순환 전압전류 특성. (a) 0.5 mg ml$^{-1}$ GOx를 첨가하여 얻은 효소전극의 순환 전압전류 특성. (b) GOx의 농도가 1.0 mg ml$^{-1}$인 경우. (c) 0.5 mg ml$^{-1}$ GOx와 0.1 mol dm$^{3}$ ethanol을 첨가한 경우. (d) 0.5 mg ml$^{-1}$ GOx와 0.1 mol dm$^{-3}$ THF를 첨가한 경우.

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

ethanol 첨가에 의한 GOx 고정화양의 향상은(그림 1(c)) 중합용액 자체에 GOx 양을 증가시켜 고정화양을 증대한 그림 1(b)의 0 V 근처의 산화환원 피크의 포텐셜의 분리를 초래하지 않는다. 따라서, GOx를 포함한 중합용액에 소량의 ethanol을 첨가함으로써 효소전극에 고정화되는 GOx의 양을 향상시킬 수 있으며, PPy 고분자의 산화환원 반응을 가역반응으로 유지할 수 있게된다. 반면에, 중합용액에 소량의 THF를 첨가하여 제조한 PPy 효소전극의 경우를 그림 1(d)에 나타낸다. 그림에서 볼 수 있듯이, 산화피크의 형성이 매우 완만하게 이루어진다. 이것은 반응속도가 현저히 느려진 것을 의미한다. 또한 산화피크와 환원피크의 포텐셜 분리가 증대되어 더 이상 가역반응이라고 할 수 없을 정도이다. 이러한 현상만을 고려한다면, THF 첨가에 의하여 GOx의 고정화가 더욱 향상되어, 산화환원 피크의 분리 및 반응속도의 저하가 본질적으로 절연성이고 사슬구조를 가지고 있는 GOx의 영향으로 생각할 수도 있겠지만, -0.7 V의 피크가 명확한 반증을 보여주고 있다. 이 피크는 효소전극에 고정화된 GOx의 영향에 의하

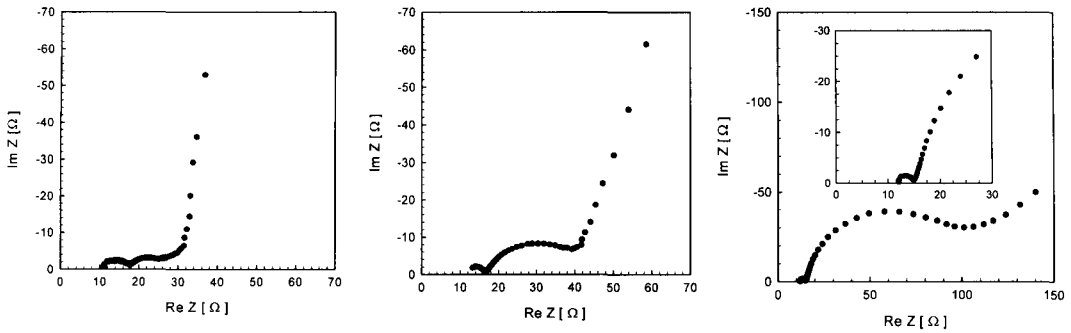


**그림 2.** PPy 및 PPy 효소전극에 대한 교류 임피던스의 Nyquist plot. (a) PPy 필름의 교류 임피던스. (b) PPy-GOx 효소전극의 교류 임피던스, 합성용액에 0.5 mg $ml^{-1}$ GOx 첨가. (c) PPy-GOx 효소전극의 교류 임피던스, 합성용액에 0.5 mg $ml^{-1}$ GOx와 0.1 mol $dm^{-3}$ ethanol 첨가.

**Fig. 2.** Nyquist plots of AC impedance for PPy and PPy-GOx electrode. (a) PPy film. (b) PPy-GOx enzyme electrode, 0.5 mg $ml^{-1}$ GOx added in the synthetic solution. (c) PPy-GOx enzyme electrode, 0.5 mg $ml^{-1}$ GOx and 0.1 mol $dm^{-3}$ ethanol added in the synthetic solution.

여 발생하는 n-type 도핑에 의한 것인데, 그림 1(d)에서 이 피크는 거의 무시할 수 있을 정도로 작다. 그러므로 THF 첨가에 의하여 GOx의 고정화가 오히려 저해된다고 고찰할 수 있으며, 따라서 0 V 근처의 산화환원 피크의 분리 등의 현상은 GOx 고정화에 의한 것이 아님을 뒷받침한다. 피크 분리 및 반응속도 저하 등의 현상은 중합용액에 THF가 첨가됨으로써 pyrrole 단분자와 THF간에 발생하는 radical transfer 반응에 기인하는 것으로 판단된다[6]. 단분자와 유기용매 사이에 발생하는 radical transfer에 대한 고찰은 이 논문의 part I에 기술하였다.

그림 2는 PPy 및 PPy-GOx 효소전극의 교류임피던스 특성을 보여준다. 그림 2(a)는 PPy에 대한 교류임피던스 응답의 Nyquist plot이다. 그림에서 볼 수 있듯이, 고주파수 영역에서 두 개의 반원이 나타난다. 고주파수 영역에서의 임피던스는 전하 수수반응에 대한 반응성 임피던스이다. 그러므로 기판전극에 부착되어 있는 활물질의 전하 수수단계는 쌍극자 재배향 단계와 배위자와의 거리 변경 및 전자 수수단계로 구분할 수 있다[7,8]. 따라서 그림에 나타나는 두 개의 반원 중에서 첫 번째 반원이 쌍극자 배향에 의해 발생하는 반응성 임피던스이고, 두 번째 반원이 배위자와의 거리 변경과 전자 수수에 의해 발생하는 임피던스이다. 그림 2(a)와 (b)의 비교에서, PPy에 GOx가 고정화됨에 따라 두 번째 반원의 임피던스가 증가하는 것을 볼 수 있다. 즉, 반응성 임피던스의 증가를 나타낸다. 이것은 GOx가 가지고 있는 본질적인 절연성에 기인한다고 볼 수 있다. 한편, 저주파수 영역의 임피던스 응답은 물질이동(확산)에 대한 임피던스를 나타낸다. 그림에서(그림 2(a)) PPy에 대한 저주파수 영역의 임피던스는 Waburg 임피던스가 나타난 후, 곧바로 포화영역으로 들어가는 것을 관찰할 수 있다. 반면에, PPy-GOx의 경우(그림 2(b)) GOx가 고정화됨에 따라 물질확산에 대한 임피던스가 심화되는 것을 알 수 있다. 그러므로 PPy에 GOx가 고정화됨으로써 반응성 임피던스가 증가하고, 물질확산이 제한되는 것을 고찰할 수 있다. 한편, 중합용액에 소량의 ethanol을 첨가하여 제조한 PPy-GOx 효소전극의 경우 교류임피던스 응답은 그림 2(c)와 같다. 그림에서 볼 수 있듯이 고주파수 영역의 반응성 임피던스가 그림 2(b)의 경우보다 증가한 것을 관찰할 수 있다. 이것은 중합용액에 ethanol을 첨가함으로써 효소전극에 고정화되는 GOx의 양이 증대되었음을 뒷받침한다.

그림 3은 중합용액에 유기용매를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우에 얻어진 PPy-GOx 효소전극의 포도당 감지 특성을 보여준다. 주입된 포도당 용액의 농도는 각각 0.5, 1, 5, 10 및 20 mmol $dm^{-3}$이었다. 중합용액에 유기용매를 첨가하지 않은 경우의 전류응답(그림 3(a))과 ethanol을 첨가한 경우의 전류응답(그림 3(b))의 비교에서 두 경우 모두 포도당 용액 주입 후 수 초 이내에 고감도의 전류응답을 보

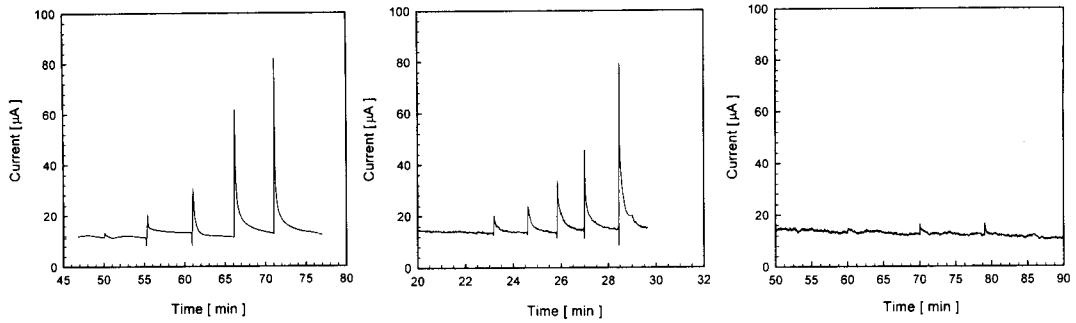


**그림 3.** 포도당 주입 농도에 따른 PPy-GOx 효소전극의 포도당 감지. (a) 중합용액에 유기용매를 첨가하지 않은 경우. (b) 중합용액에 0.1 mol $dm^{-3}$ ethanol을 첨가한 경우. (c) 중합용액에 0.1 mol $dm^{-3}$ THF를 첨가한 경우.

**Fig. 3.** Glucose detection of the enzyme electrode for glucose injection with different concentration. (a) organic solvent free in the synthetic solution. (b) 0.1 mol $dm^{-3}$ ethanol added in the synthetic solution. (c) 0.1 mol $dm^{-3}$ THF added.

였다. 이것은 기질친화력이 매우 높은 효소의 생화학적 반응의 특징이며, 이러한 고감도의 전류응답은 고정화된 효소의 활동도(activity)가 양호하게 유지되었음을 뒷받침한다. 다만 중합용액에 ethanol을 첨가하여 제조한 효소전극에 있어서, 그림 3(b)에서 관찰할 수 있듯이, 0.5 mmol $dm^{-3}$의 희박한 농도의 포도당 주입에서 그림 3(a)에 비해 비교적 높은 전류응답을 얻은 것에 주목할 필요가 있다. 이것은 그림 1 및 2에서 고찰하였듯이, 중합용액에 소량의 ethanol을 첨가함으로써 GOx의 고정화 양에 향상을 가져올 수 있었으며, 이에 따라 효소전극의 실효 활동도가 증대되었음을 시사한다. 한편, 그림 3(c)의 경우는 중합용액에 THF를 첨가하여 제조한 PPy-GOx 효소전극의 전류응답을 나타낸다. 그림 1(d)에서 고찰한 바와 같이, GOx의 고정화는 미약한 정도이며, 따라서 포도당 주입에 따라 효소전극에서 얻어지는 전류응답 또한 매우 미미하게 얻어졌다.

그림 4는 전류응답의 크기와 포도당 농도와의 관계이며, 식 (1)과 같이 표현되는 Michaelis 관계식을 이용하여, 각각의 포도당 농도에서 측정한 전류응답의 비선형 회귀분석을 통한 PPy-GOx 효소전극의 포도당 산화에 대한 생화학적 반응의 속도상수를 결정할 수 있다.

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

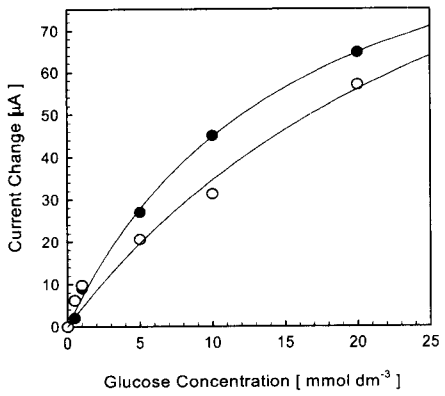


**그림 4.** 포도당 주입 농도와 전류응답의 fitting을 통한 kinetic parameter 결정. •: 중합용액에 유기용매를 첨가하지 않은 경우. ○: 중합용액에 0.1 mol $dm^{3}$ ethanol을 첨가한 경우.

**Fig. 4.** Determination of the kinetic parameters for recognition events. •: organic solvent free in the synthetic solution. ○: 0.1 mol $dm^{-3}$ ethanol added in the synthetic solution.

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 속도상수를 표 1에 정리하였다.

중합용액에 소량의 ethanol을 첨가하여 제조한 PPy-GOx 효소전극의 경우, 기질친화력과 관계되는 Michaelis상수 약 32 mmol $dm^{-3}$을 얻었으며, 기질에 대한 반응속도와 관계되는 최대응답전류는 약 146 $\mu$A를 얻었다. 따라서 중합용액에 소량의 ethanol을 첨가함으로써 효소전극의 기질친화력을 안정적으로 유지하면서, GOx 고정화의 향상으로 최대응답전류를 증대할 수 있었다.

## 4. 결 론

우리는 본 연구에서 전해중합의 방법으로 PPy-GOx 효소전극을 제조하였다. 중합 과정에서의 GOx 고정화 양에 대한 전기화학적인 정성분석을 통하여 소량의 ethanol을 첨가함으로써 효소의 고정화 양을 증대시킬 수 있음을 제시하였다. 또한 이 때 얻어진 PPy-GOx 효소전극이 산화환원 반응이 가역적으로 유지됨을 보였다.

중합용액에 0.1 mol $dm^{-3}$ ethanol을 첨가하여 제조한 PPy-GOx 효소전극에 있어서, 포도당 감지반응에 대한 속도상수로써 겉보기 Michaelis 상수 약 32 mmol $dm^{-3}$와 최대전류 약 146 $\mu$A를 얻었다. 이것은 ethanol을 첨가하지 않은 경우와 비하여, 양호한 기질친화력을 유지하면서 반응속도의 향상을 나타내며, 결과적으로 GOx 고정화의 향상을 뒷받침한다.

## 감사의 글

이 논문은 2001년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

## 참고 문헌

[1] G. F. Khan, M. Ohwa, and W. Wernet, "Desing 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] Brian R. Eggins, "Biosensor: an Introduction", Wiley and Teubner, p. 31, 1996.

[4] 김현철, 구할본, 사공건, "Polypyrrole-glucose oxidase 효소전극의 전기화학적 특성", 전기전자재료학회논문지, 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] Y. Geng, J. Li, Z. Sun, X. Jing, and F. Wang, "Polymerization of aniline in an aqueous system containing organic solvents", Synthetic Metals, Vol. 96, p. 1, 1998.

[7] C. M. Brett and A. M. Brett, "Electrochemistry", Oxford University Press, p. 70, 1993.

[8] 김현철, 구할본, "Polypyrrole-glucose oxidase 효소전극의 배위자 크기에 따른 전기화학적 특성", 전기전자재료학회논문지, 15권, 2호, p. 141, 2002.