

유기용매 첨가에 따른 Polypyrrole-Glucose Oxidase

효소전극의 효소고정화 향상

I. 자외선 분광분석

Improvement on Enzyme Immobilization in Polypyrrole-Glucose Oxidase

Enzyme Electrode using Organic Solvent Additive

I. Ultraviolet Spectroscopic Analyses

김현철, 구합본

(Hyun-Cheol Kim and Hal-Bon Gu)

Abstract

In the case of immobilizing of glucose oxidase into polypyrrole (PPy) using electrosynthesis, the glucose oxidase (GOx) forms a coordinate bond with the polymers backbone. However, because of intrinsic insulation and net-chain of the enzyme, the charge transfer and mass transport are obstructed during the film growth. Therefore, the film growth is dull. We synthesized enzyme electrodes by electropolymerization added some organic solvent, such as ethanol and tetrahydrofuran (THF). The formative seeds of film growth was delayed by adding ethanol. The delay was induced by radical transfer between ethanol and pyrrole monomer. The radical transfer reactions shared the contribution of dopants between electrolyte anion and GOx polyanion. This led to increase amount of immobilized the enzyme in PPy. For the UV absorption spectra of synthetic solution before synthesis and after, in the case of ethanol added, the optical density was slightly decreased for the GOx peaks. It suggests amount of GOx in the solution was decreased and amount of GOx in the film was increased.

Key Words : Polypyrrole, Enzyme electrode, Radical transfer, Glucose oxidase, Absorption spectra

1. 서론

효소를 이용한 바이오센서 연구에 있어서, 최근의 연구들은 효소고정화 기술 개발에 초점을 맞추고 있다. 전극으로의 효소고정화는 센서의 재사용, 효소의 안정화 및 가수분해나 열화로부터 효소의 보호 등과

같은 장점이 있다[1]. 효소고정화에 있어서 요소기술은 효소의 안정화 및 효소와 전극 재료간의 전기화학적 coupling이다. 이러한 목표를 위하여 효소전극에 대한 활발한 연구가 진행되어 오고 있다[2].

아울러 생화학적 반응의 증진을 위하여 고정화 기술 외에도, 효소의 고정화 양의 향상에 대한 많은 연구가 시도되고 있다. 이에 대한 대표적인 예가 gel matrix, cross-linking 및 전해중합에 의한 효소의 고정화이다. 실제로 gel matrix와 cross-linking에 의한 효소의 고정화는 고정화 양에 있어서는 성공적이다[3]. 그러나 전자(前者)는 기질 확산에 대한 장벽

전남대학교 공과대학 전기공학과

(광주광역시 북구 용봉동 300,

Fax : 062-530-0077

E-mail : hbgu@chonnam.ac.kr)

2001년 11월 23일 접수, 2001년 12월 18일 1차 심사 완료

2002년 3월 7일 최종 심사 완료

을 형성하여 효소 활동도의 손실을 야기시키며, 후자(後者)는 효소 자체에 손상을 일으킬 가능성이 크며, 고정화에 대한 견고성이 미약하다[4].

한편, 전해중합에 의해 도전성 고분자에 효소를 고정화 시키는 경우, 효소는 고분자의 주쇄에 정전 상호작용에 의하여 배위하게 된다. 그러나, 효소의 본질적인 절연성과 사슬구조 때문에, 중합하는 동안에 전하 수수와 물질이동이 제한된다. 고정화 양을 향상시키기 위하여 중합 용액에 보다 많은 효소를 첨가하면, 고분자 필름의 성장이 둔화되고, 심지어는 필름이 성장하지 않는 경우도 있다[5].

따라서, 본 연구에서는 폴리피롤에 포도당 산화효소를 전해중합으로 고정화하는 경우, 중합 용액에 소량의 유기 용매를 첨가함으로써 radical transfer 반응을[6,7] 통하여 초기의 중합반응을 지연시켜 전해질 음이온의 배위속도를 제어함으로써 PPy-GOx 효소전극에 GOx의 고정화 양을 향상시키고자 한다.

2. 실험 방법

2.1 효소전극의 제조

PPy-GOx 효소전극은 0.2 mol/l pyrrole (Sigma chem. co.) 수용액에 0.1 mol/l 염화칼륨 (KCl, Aldrich co.), 0.5 mg/ml GOx (*Aspergillus Niger* Type II, Sigma chem. co.)을 혼합하고, 경우에 따라 0.1 mol/l 에탄올 또는 THF를 첨가하여 +0.8 V vs. Ag/AgCl의 포텐셜을 300 mC/cm² 동안 인가하여 전기화학적으로 제조하였다. Pyrrole은 감압 증류 정제하여 사용하였으며, 전해중합 전에 중합 용액을 알곤 가스로 30분 동안 bubbling하여 용존산소의 영향을 최소화 하였다.

합성에 사용된 전기화학 셀은 전형적인 하나의 셀에 작업전극으로 In₂O₃-SnO₂ (ITO) 코팅 유리, 대향전극으로 백금선 및 기준전극으로 Ag/AgCl 전극을 사용하였다.

2.2 전류의 경시적 변화 및 자외선 흡수 스펙트럼

중합반응 동안 전류의 경시적 변화는 potentiostat/galvanostat을 사용하여 측정하였다.

전해중합 전후의 중합용액에 대한 UV 흡수스펙트럼은 light path 10 mm인 UV용 석영 셀에 전기화학 측정용 전극(작업전극, 대향전극, 기준전극)을 장착한 후, Hitachi U3501 spectrophotometer를 이용하여 in situ 측정을 행하였다.

3. 결과 및 고찰

그림 1은 PPy 및 PPy-GOx 효소전극의 전해중합 동안에 전류의 경시적 변화를 측정된 것이다. 그림의 ●는 중합 초기에 급속한 전류의 상승을 보인다. 이것은 기관전극의 표면에 중합 핵의 형성이 신속하게 이루어지고, 필름의 성장에 지연이 발생하지 않는 것을 보여준다. 또한 중합 반응과 동시에 발생하는 음이온(Cl⁻)의 도핑 즉, 물질이동에도 제약이 없음을 시사한다. 한편, 중합 용액에 에탄올을 첨가한 그림의 △의 경우, 포텐셜을 인가한 초기에 중합 핵의 형성에 약간의 지연이 발생하며, 그 이후 필름의 성장에는 지연이 거의 발생하지 않고 정상상태의 전류(capacitive current)가 얻어진다. 이 때, 초기에 발생하는 중합 반응의 지연은 포텐셜 인가에 의하여 산화된 pyrrole 모노머 radical들이 상호 결합하지 못하고, 유기 용매로 첨가된 에탄올과 radical transfer 반응을 하게되어, 기관 전극 상에 중합 핵의 형성에 지연을 초래하기 때문이다. 이것은 Xiabin Jing 등에 의해 보고된 유기용매와 radical cation 모노머와의 지연을 초래하기 때문이다. 이것은

그림 1. PPy의 전해중합 동안 전류의 경시적 변화.

- : Pyrrole과 KCl 중합용액.
- △ : 0.1 mol/l 에탄올 첨가.
- : 0.1 mol/l THF 첨가.
- : 0.5 mg/ml GOx 첨가.

Fig. 1. Chronoamperometry for PPy film growth.

- : Pyrrole and KCl synthetic solution.
- △ : 0.1 mol/l ethanol added.
- : 0.1 mol/l THF added.
- : 0.5 mg/ml GOx added.

Xiabin Jing 등에 의해 보고된 유기용매와 radical cation 모노머와의 radical transfer 반응이다[8]. 그림의 □와 같이 중합 용액에 THF가 첨가된 경우, 중합 반응 초기의 중합 핵의 형성이 △의 경우보다 약 2배정도 지연되는 것을 볼 수 있다. 이것은 THF와의 radical transfer 반응이 에탄올의 경우보다 더욱 활발하게 발생하는 것을 시사한다.

한편, PPy-GOx 효소전극의 제조와 같이 중합 용액에 GOx를 첨가한 ○의 경우, 중합 핵의 형성은 더욱 지연되고, 얻어지는 고분자 필름의 성장에도 지연이 발생한다. 중합 핵 형성의 지연에 관하여, 이 경우는 (GOx를 첨가한 경우) radical transfer 반응에 기인한 것이 아니고, 사슬구조를 가지고 있는 GOx가 전극 표면 근처에서 radical cation 모노머 즉, pyrrole 모노머의 확산에 대하여 블럭킹 역할을 하기 때문이다[8]. 따라서 전해질 음이온(Cl⁻)에 비해서 분자 크기가 큰 GOx는 radical cation 모노머에 대하여 스크린의 역할을 하게된다. 또한 중합 반응 초기에 포텐셜의 일부가 GOx의 산화에 이용되기 때문에 중합 핵의 형성이 지연되는 또 다른 요인이 된다. 필름의 성장에 있어서의 지연은 pyrrole 고분자의 주쇄와 정전 상호작용으로 배위하고 있는 GOx가 본질적으로 절연성이고 사슬구조를 띄고 있기 때문에 전자 수수반응과 물질의 이동(음이온의 도핑)이 제한되기 때문이다.

그림 2는 GOx를 포함하고 있는 중합 용액에 소량의 유기용매를 첨가한 경우, PPy-GOx 효소전극의 중합 반응 동안에 전류의 경시적 변화이다. 먼저, 용액

에 에탄올을 첨가한 경우, 중합 반응 초기의 중합 핵 형성에 대하여 에탄올에 의한 radical transfer 반응보다 GOx에 의한 blocking의 영향이 우세하게 작용하는 것을 알 수 있다. 따라서, 그림 2에서 채워진 원으로 표시된 GOx만을 첨가한 경우의 전류응답과 비슷하게 나타난다. 그러나 필름의 성장에 있어서, radical transfer 반응의 영향에 의하여 주쇄의 길이가 비교적 짧은 pyrrole 고분자가 얻어지게 되고, 이것은 도핑 수준의 저하를 초래하게 된다. 그러므로 중합 반응의 속도와 직접적으로 비례하는 중합 전류도 낮아지게 된다. 또한 이것은 크기가 작고 빠른 전해질 음이온의 도핑 속도를 저하시켜, 결과적으로 음으로 대전된 크기가 크고 느린 GOx의 배위를 조장하는 결과를 낳게되어, GOx의 고정화 양에 향상을 가져올 것으로 기대된다. 한편, THF를 첨가한 경우에는 중합 반응 초기의 중합 핵 형성에 있어서 더욱 큰 지연이 발생하는 것을 볼 수 있다. 이것은 GOx에 의한 블럭킹과 THF에 의한 radical transfer 반응에 의한 영향이 복합적으로 나타나기 때문으로 생각된다. 또한 THF가 GOx와 상호작용을 하는 것으로 생각해 볼 수 있는데, 이에 대한 근거는 그림 5의 자외선 흡수 스펙트럼에서 찾아볼 수 있는데, 그림 5에서 고찰하기로 한다.

그림 3은 0.5 mg/ml 농도의 GOx 수용액에 대한 자외선 흡수 스펙트럼을 나타낸다. 그림에서 볼 수 있듯이 흡수 피크는 각각 275, 290 및 380 nm에서 나타난다. 결합성 π 준위에서 반결합성 π^* 준위로의 전자의 천이에 해당하는 K 밴드는 일반적으로 공역 diene 또는 polyene 및 enone계 화합물의 흡수 스펙

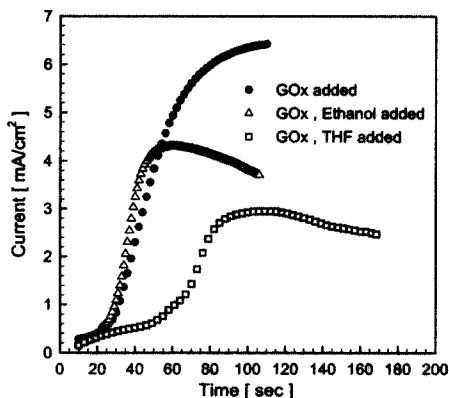


그림 2. PPy-GOx 효소전극의 전해중합 동안 전류의 경시적 변화.

Fig. 2. Chronoamperometry for the electro-synthesis of the PPy-GOx enzyme electrodes.

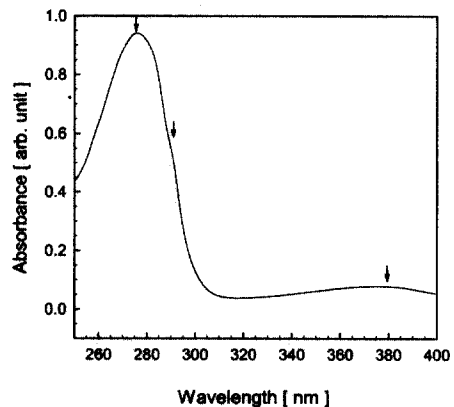


그림 3. GOx 수용액에 대한 자외선 흡수 스펙트럼.

Fig. 3. UV absorption spectrum of GOx aqueous solution.

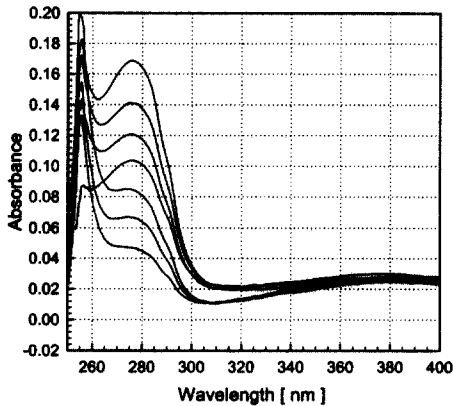
트럼에서 나타난다. GOx는 포화탄화수소에 카보닐기가 연결된 형태의 enone계 화합물에 속하고, K 밴드가 비교적 높은 흡수 강도를 보이는 특성이 있음을 고려할 때, 275 nm의 흡수 피크는 $\pi \rightarrow \pi^*$ 천이에 해당하는 K 밴드임을 알 수 있다. 또한 카보닐과 같은 chromophoric 기들은 비결합(nonbonding) p orbital로부터 반결합성 π^* 준위의 천이 즉, $n \rightarrow \pi^*$ 천이에 해당하는 R 밴드가 흡수 스펙트럼에 나타나는데, 이러한 천이는 천이 모멘트가 낮은 천이

(forbidden transitions)이므로 상대적으로 낮은 흡수 강도를 보인다. 따라서 380 nm의 흡수 피크는 R 밴드에 해당한다. R 밴드의 특징 중의 하나는 분자구조의 변형이 발생하면 단파장 쪽에 부가적인 밴드를 형성하게 되는데, 그림 3에서 290 nm의 피크가 여기에 해당된다.

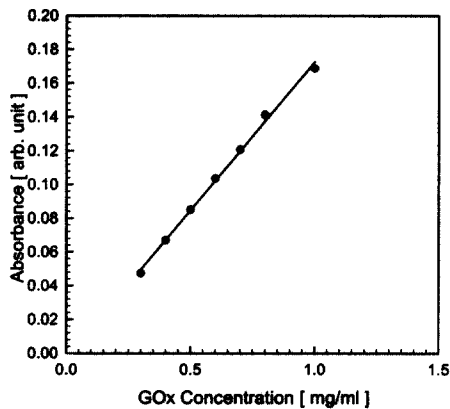
수용액 상태로 해리된 GOx는 분말상태의 분자구조에서 변형되기 때문이다.

그림 4는 GOx의 농도에 따른 GOx 수용액의 자외선 흡수 스펙트럼을 보여준다. 그림 4(a)에서 볼 수 있듯이, 용액 중의 GOx의 농도가 증가할수록 천이 모멘트가 상대적으로 큰 275 nm에서의 $\pi \rightarrow \pi^*$ 천이 즉, K 밴드의 흡수 강도가 증가하는 것을 알 수 있다. 반면에, 380 nm의 forbidden 천이에 해당하는 R 밴드의 흡수 강도는 GOx의 농도 변화에 큰 영향을 받지 않는다. 한편, 그림 4(b)는 275 nm에서의 흡광도(absorbance 또는 optical density)가 GOx의 농도와 비례관계에 있음을 시사하고 있다.

그림 5는 PPy-GOx 효소전극을 제조하기 위한 중합 용액에 0.1 mol/l의 에탄올 및 THF를 첨가한 경우에 있어서, 포텐셜 인가 전후의 용액에 대한 자외선 흡수 스펙트럼을 보여준다. 흡수 스펙트럼 측정을 위한 reference는 중합 용액에서 GOx만을 제외한 용액으로 하였으며, 따라서 측정된 스펙트럼은 중합 반응 전후의 용액상태의 GOx에 대한 것이다. 그림 5(a)에서 볼 수 있듯이 275 nm에서의 흡수 강도는 에탄올의 첨가에 대해서는 거의 영향이 없지만, THF를 첨가함으로써 흡수 강도가 현저하게 감소한 것을 볼 수 있다. 이것은 첨가된 THF가 GOx와 상호작용을 하여 $\pi \rightarrow \pi^*$ 천이에 대한 천이 모멘트(또는 쌍극자 모멘트)에 영향을 미치기 때문으로 생각된다. 흡수 강도는 전자의 천이 가능성에 의존하게 되는데, 천이 가능성은 천이 모멘트의 제곱에 비례하고, 또한 천이 모멘트(또는 쌍극자 모멘트)는 전자가 여기 되는 과정에서의 전하분포 변화에 비례한다. 따라서, THF 첨가에 따른 흡수 강도의 저하는 $\pi \rightarrow \pi^*$ 천이에 따른 전하분포의 변화가 작기 때문이며, 이것은 THF와 GOx의 상호작용을 뒷받침한다. 아울러 이것은 그림 2에서의 THF 첨가에 대한 고찰 즉, THF 첨가에 따른 중합 반응의 지연이 GOx 고정화 양의 향상에 기여할 것인가의 문제에 부정적인 답변을 제시한다. 결국 GOx 고정화 양의 향상에 있어서 THF 첨가에 의한 중합 반응의 지연은 에탄올 첨가에 있어서의 경우와 다른 양상을 보인다고 할 수 있으며, 그것은 THF와 GOx의 상호작용 때문으로 고찰할 수 있다.



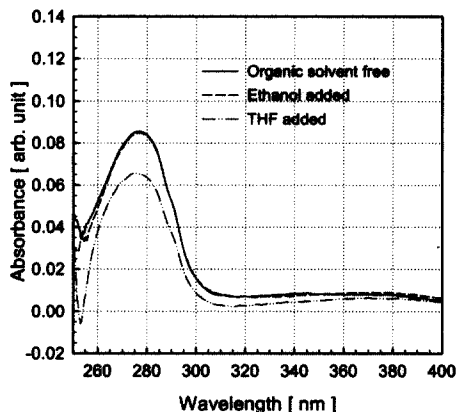
(a)



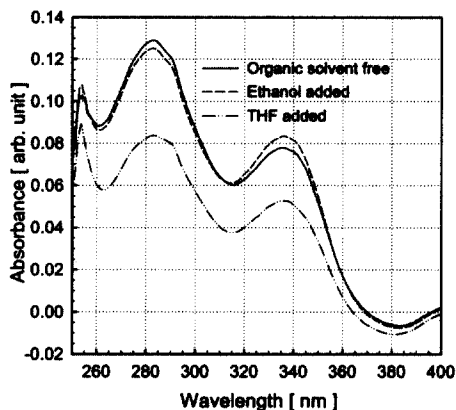
(b)

그림 4. GOx 수용액의 자외선 흡수 스펙트럼. (a) GOx의 농도에 따른 흡수 스펙트럼의 변화. (b) GOx 농도에 따른 275 nm에서의 흡광도.
Fig. 4. UV absorption spectra of GOx solution. (a) Absorption spectra of the GOx solution with different concentration of GOx. (b) Absorbance of GOx in the solution with different concentration at 275 nm.

중합 반응 이후의 용액에 대한 자외선 흡수 스펙트럼을 그림 5(b)에 나타낸다. 그림에서 주목할만한 것은 첫째, K 밴드의 흡수 강도 증가와 적색편이를 일으켜 285 nm에 피크를 형성한 것이고, 둘째, 그림 5(a)에서 고찰하였듯이 에탄올을 첨가한 후에도 변화가 없었던 K 밴드의 흡수 강도가 중합 반응 이후에 약간 감소한 점이며, 끝으로 335 nm에 피크를 갖는 새로운 흡수 밴드가 발생한 것이다. 포화탄화수소에



(a)



(b)

그림 5. Pyrrole, KCl 및 GOx로 구성된 수용액과 소량의 유기 용매(에탄올, THF)를 첨가한 경우의 자외선 흡수 스펙트럼. (a) 전해중합 전. (b) 전해중합 후.

Fig. 5. UV absorption spectra of the synthetic solution composed of pyrrole, KCl and GOx and/or some organic solvent (ethanol, THF) added. (a) Before electro-synthesis. (b) After electro-synthesis.

카보닐기가 연결된 enone계 화학 종의 흡수 스펙트럼에서 K 밴드의 특징들 중 하나는 용매 극성의 증가에 따라 K 밴드의 흡수가 적색 편이 되며 흡수 강도의 증가를 수반한다는 것이다. 따라서 중합 반응의 포텐셜 인가에 의해 용액의 극성이 증가하게 되며, 이에 따라 275 nm에 피크를 형성하던 K 밴드는 285 nm에 피크를 형성하는 적색편이를 일으키게 되고 아울러 흡수 강도의 증가를 초래하게 되는 것으로 고찰할 수 있다. 둘째, 에탄올 첨가에 의한 K 밴드의 흡수 강도 저하는 그림 4(b)의 고찰에서 알 수 있듯이, 용액 중에 잔존하는 GOx 농도의 변화를 시사하며, 이것은 중합 반응을 통하여 제조된 PPy-GOx 효소전극의 GOx 고정화 양이 향상되었음을 뒷받침한다. 마지막으로 335 nm에 피크를 갖는 새로운 흡수 밴드는 중합 반응과정에서 중합에 참여하지 못하고 용액에 잔존하는 pyrrole의 올리고머에 의해 형성되는 흡수 밴드인 것으로 판단되며, 중합 용액에 GOx가 포함되지 않은 경우 즉, 순수한 PPy의 중합에 있어서 중합 반응 후 용액에 잔존하는 pyrrole 올리고머에 대한 자외선 흡수 스펙트럼을 그림 6에 나타낸다.

그림 6은 pyrrole 및 KCl로 구성된 중합 용액에 에탄올과 THF를 각각 첨가하여 PPy를 전해 중합한 후, 용액에 잔존하는 부산물에 대한 것이다. 그림에서 볼 수 있듯이 295 nm와 335 nm에 흡수 피크를 갖는 2개의 흡수 밴드가 존재한다. 이것들은 이미

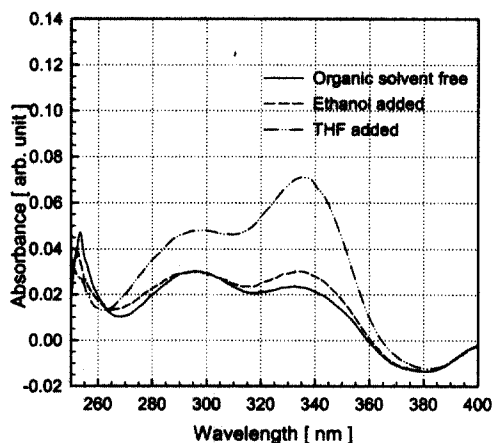


그림 6. 전해중합 후 용액에 존재하는 pyrrole oligomer에 대한 자외선 흡수 스펙트럼.

Fig. 6. UV absorption spectra of the pyrrole oligomer remained in the solution after electro-synthesis.

언급한 바와 같이 중합 반응 동안에 중합에 참여하지 못한 pyrrole의 이분자체 또는 삼분자체와 같은 올리고머에 대한 흡수 밴드이다. 중합 용액에 에탄올을 첨가한 경우, 335 nm의 흡수 강도가 증가하는 것은 그림 1 및 그림 2에서 고찰한 바와 같이 radical transfer 반응에 의하여 중합 핵의 형성에 지연을 초래하게 되고, 이것은 전해질 음이온의 도핑을 제어하여 결과적으로 주쇄의 길이가 비교적 짧은 PPy가 얻어지는 원인이 된다. 따라서 335 nm에서 흡수 강도의 증가는 중합 반응 이후에 용액에 잔존하는 올리고머의 양이 증가하는 것을 시사한다. 또한 335 nm의 흡수 강도에 대한 증가 분은 그림 5(b)에서 335 nm의 흡수강도 증가로 반영된다. 이것은 중합 용액에 GOx가 존재하더라도 에탄올은 GOx와 상호작용을 하지 않는다는 것을 뒷받침하고 있다. 또한 에탄올 첨가에 의해 발생하는 radical transfer 반응이 크기가 작고 빠른 전해질 음이온의 도핑 속도를 제어하여 크고 느린 GOx의 배위를 증가시키게 되며, 결과적으로 GOx의 고정화 양을 향상시키는 것에 대한 논거를 제시하고 있다.

4. 결론

이 연구에서 전해중합법으로 PPy-GOx 효소전극을 제조하였으며, 중합 용액에 에탄올의 첨가에 의해 발생하는 radical transfer 반응을 이용하여, 전해질 음이온의 도핑을 제어하고 이에 따라 음으로 대전된 GOx의 배위를 증대시켜, PPy-GOx 효소전극에 GOx의 고정화 양을 향상시킬 수 있었다. 그 결과로 에탄올 첨가에 따라 중합반응 초기에 반응지연이 발생하였고, 중합 반응 후 용액의 GOx에 대한 자외선 흡수 스펙트럼에서 285 nm의 흡수 강도가 감소하였다.

한편, THF를 첨가한 경우 중합 반응 전의 용액에 대한 흡수 스펙트럼에서 K 밴드의 흡수가 감소하여 THF와 GOx 사이에 상호작용이 발생하는 것을 나타내었으며, 따라서 THF의 경우 radical transfer 반응이 GOx 고정화 양의 향상에 기여하지 않았다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고 문헌

- [1] M. P. Byfield, and R. A. Abuknesha, "Biochemical aspects of biosensors", *Biosensors & Bioelectronics*, Vol. 9, p. 373, 1994.
- [2] N. C. Foulds and C. R. Lowe, "Enzyme entrapment in electrically conducting polymers", *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, Vol. 82, p. 1259, 1986.
- [3] S. Cosnier, and L. Allien, "Electropolymerizable amphiphiles: convenient tool for electrical wiring of enzymes and miniaturization of biosensors", *Sensors and Materials*, Vol. 8, p. 169, 1996.
- [4] Brian R. Eggins, "Biosensor: an Introduction", Wiley and Teubner, p. 32, 1996.
- [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] 김현철, 구할본, 사공건, "Polypyrrole-glucose oxidase 효소전극의 전기화학적 특성: 1. 효소전극의 산화환원에 대한 glucose oxidase의 영향", *전기전자재료학회논문지*, 13권, 6호, p. 520, 2000.
- [8] 김현철, 구할본, "Polypyrrole-glucose oxidase 효소전극의 배위자 크기에 따른 전기화학적 특성", *전기전자재료학회논문지*, 15권, 2호, p. 141, 2002.