

전기화학 바이오센서의 전자전달 매개체로써의 탄소 나노튜브에 관한 연구

박은진¹, 송민정², 홍석인², 민남기¹

¹고려대학교 바이오프로세스시스템기술, ¹고려대학교 화공생명공학과

Carbon nanotube as and electron transfer mediator in electrochemical biosensors

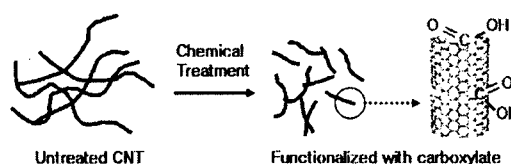
Eun Jin Park¹, Min Jung Song², Suk In Hong², Nam Ki Min¹

Department of biomicrosystem technology, Korea University

² Department of Chemical & Biological Engineering, Korea University

Abstract - 탄소 나노튜브는 기계적인 강도가 크고, 표면적이 넓으며 전기전도도가 우수할 뿐만 아니라 화학적으로도 안정하기 때문에 최근 여러 분야에 적용하려는 연구가 활발히 진행되고 있는 나노물질이다. 특히 바이오센서에서 탄소 나노튜브는 작업 전극의 활성을 증대시키는 물질로써, 안정적인 효소 고정화에 기여하는 reservoir로써 그리고 반응에서 생성된 전자를 전극에 효과적으로 전달하는 매개체로써 이용되고 있다. 본 연구에서는 다중벽 탄소 나노튜브(multi-walled carbon nanotube ; MWNT)를 화학 처리하여 작용기를 유도한 후 효소와 반응시킨 용액으로 스크린 프린팅 방법으로 제작된 탄소전극의 표면을 개질하는 방법으로 바이오센서를 제작하였다. 이렇게 제작된 바이오센서를 탄소 나노튜브를 이용하지 않은 바이오센서와 전기화학적으로 분석한 결과 감도가 약 3배정도 증가하는 결과를 얻을 수 있었다. 이것은 효소반응 시 발생된 전자가 나노튜브를 통해서 전극에 효과적으로 전달됨을 의미한다.

분간 sonication 한 후, 12 시간동안 90℃의 oven에서 incubation 하였다. 다음으로 DI water 와 메탄올로 번갈아 가며 여러 번 세척한 후 100℃dry oven에서 건조하여 분말상태로 만들었다. 말단과 측벽(sidewall)에 유도된 작용기를 확인하기 위해, 화학 처리된 MWNT을 KBr pellet을 만들어 FT-IR을 측정하였다.



<그림 1> 탄소 나노튜브의 기능화 모식도

1. 서 론

오늘날 전기화학 바이오센서에서 가장 중요하게 여겨지는 것 중 하나는 센서 전극의 감도를 높이는 일이다. 이는 생체 내에서 바이오 물질이 매우 낮은 농도로 작용하므로 이를 검출하는 바이오센서도 그 낮은 농도의 분석 물질을 검출할 수 있어야 하기 때문이다. 현재 전극의 감도를 높이기 위해서 전극의 물질 조성을 바꾸거나 이미 제작된 전극에 나노 물질 등으로 표면을 개질하여 전극 촉매작용을 촉진시키는 연구가 진행되고 있다.

나노 구조를 갖는 무기화합물인 탄소 나노튜브는 1991년에 그 구조가 알려진 이래 가장 많이 연구되고 있는 나노 물질 중 하나이다. 탄소 나노튜브는 기계적인 강도가 우수하고, 표면적이 넓고, 전기 전도도가 우수할 뿐만 아니라 화학적 안정성이 높아 다양한 분야에 응용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 탄소 나노튜브 그 자체는 물에 녹지 않아 다른 화학물질이나 생화학물질과의 반응성이 낮지만, 화학적 처리를 통해 일부 구조를 변형시키고 하이드록실기(hydroxyl group)나 카르복실기(carboxyl group)와 같은 작용기를 유도함으로써 반응성을 높일 수 있다. 화학적 처리를 통해 작용기가 유도된 탄소 나노튜브는 전체적인 원통형의 형태는 유지하면서 잘려진 말단과 부분적으로 defect가 생긴 측벽에 카르복실기가 유도되며, 이들로 표면이 개질된 전극 표면은 전극 유도면적의 증가와 탄소 나노튜브의 전자 전달을 촉진시키는 특성으로 높은 반응성을 나타낸다고 보고되었다.

탄소 나노튜브가 전기화학 바이오센서에 응용된 예로는 센서 전극 물질에 탄소 나노튜브를 포함시켜 전극의 전기화학적 활성을 높인 경우와 단백질(효소)을 encapsulation하여 활성을 높은 상태로 유지하는데 이용한 경우 등이 있다. 이러한 바이오센서에 사용된 탄소 나노튜브는 효소의 반응부위와 전극 사이에서의 전자 전달을 촉진하여 최종적으로 얻어지는 신호(response current)를 높이는 역할을 한다.

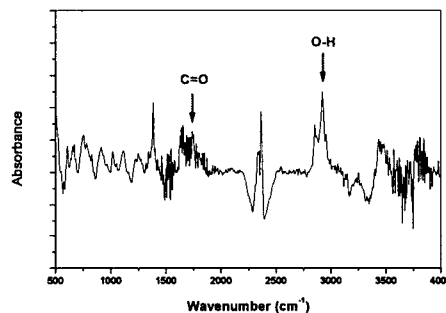
본 연구에서는, 바이오센서의 감도를 높이기 위해 탄소 나노튜브를 이용한 바이오센서를 제작하였고 탄소 나노튜브를 이용하지 않고 기존의 방법대로 제작된 센서의 감도와 각각 비교하였다. 바이오센서 전극의 감도를 측정하기 위해서는 분석물질로서 glucose를, 따라서 고정화하는 효소는 glucose oxidase(GOx)를 이용하였다. 또한, 감도 향상 효과를 확인하기 위해 탄소 나노튜브를 이용하지 않고 기존의 방법대로 제작한 전극을 제작하여 비교하였다.

2. 실험방법 및 결과

2.1 탄소 나노튜브의 화학적 처리

많은 연구에서 길이가 긴 탄소 나노튜브에 화학적 처리(산 처리)를 하면 짧은 길이의 잘린 말단과 동시에 손상된 옆면에 카르복실기(COOH)기가 형성되며, 이들을 이용하면 다른 물질과 보다 큰 반응성을 나타낸다고 보고되었다. 본 연구에서도 이러한 반응성 향상의 효과를 위해 그림 1과 같이 탄소 나노튜브를 화학적으로 처리하여 바이오센서에 이용하였다. 탄소 나노튜브의 화학적 처리 방법은 다음과 같은 과정으로 진행하였다. 직경이 10~15nm이고 길이가 10~20um인 MWNT를 70%의 질산에 넣고 30

그림 2는 FT-IR spectrum 측정결과이다. 카르복실기(-COOH)의 characterization은 OH, C=O의 확인으로 알아 볼 수 있는데, 1740cm⁻¹에서 C=O의 stretch band가, 3000cm⁻¹에서 OH stretch band로부터 화학적 처리된 MWNT에 카르복실기가 유도되었음을 확인하였다.



<그림 2> 화학처리된 탄소 나노튜브의 FT-IR 스펙트럼

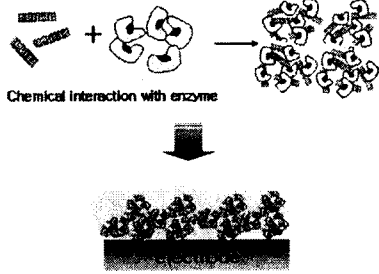
2.2 스크린 프린팅 전극의 제작

바이오센서 제작을 위한 전극은 스크린 프린팅 방법으로 제작하였다. 기판으로는 생체 반응에 참여하지 않으며 가격이 싸면서도 사용이 용이한 폴리에스터(polyester) 계열의 기판을 이용하였다. 스크린 프린팅 전극의 제작 순서는 다음과 같다. 우선 폴리에스터 기판에 은(silver) 페이스트로 도선에 해당하는 패턴을 인쇄한 후 90℃오븐에서 10분간 curing 하였다. 그 후 작업전극과 상대전극의 부분을 탄소 페이스트로 인쇄한 후 90℃오븐에서 1시간 curing 한 후 절연 페이스트로 working area를 제외한 나머지 부분을 passivation 하였다. 본 연구에서 제작된 바이오센서는 기존에 상용화된 센서 스트립과 같이 2상전극계로 상대전극이 기준전극의 역할을 동시에 수행하도록 고안되었다. 작업전극의 working area는 0.04cm²로 제작하였다.

탄소 나노튜브의 말단이나 측벽에 유도된 카르복실기는 효소와 기질의 반응에 적절하도록 안정적인 친수성 환경을 조성해 주는 역할을 하며, 산 처리에 의해 결합이 생긴 탄소 나노튜브의 빈 공간에 효소가 안정적으로 고정되어 효소의 고정도의 안정도를 높여주는 역할을 한다. 한편, 탄소 나노튜브를 산 처리 한 후 그 길이가 짧아지고 측벽에 부분적인 결합이 생겼다 하더라도, 원통형의 본래 형태를 유지하여 전자 전달을 촉진시키는 탄소 나노튜브의 특성도 유지할 수 있어 최종적으로 바이오센서의 감도를 높이는 효과를 얻을 수 있다. 실제로 본 연구에서 제작된 탄소 나노튜브를 이용한 바이오센서도 이러한 효과로 기존의 센서 스트립보다 높은 감도를 나타내었다.

2.3 탄소 나노튜브 바이오센서 제작

탄소 나노튜브를 이용하여 제작한 바이오센서는 스크린 프린팅 전극 (screen printed electrode ; SPE)에 효소반응 용액과 탄소 나노튜브를 섞은 용액을 로딩하는 방법으로 제작되었다.(그림 3) 효소 고정화를 위한 반응 용액은 pH 7.0의 0.1M potassium phosphate buffer 10ml에 potassium ferricyanide($K_3[Fe(CN)_6]$) 0.78g, 18500U/g의 GOD 0.5405g, Natrasol 0.03g, Triton X-100 20ul 을 넣고 stirring 하여 제작하였으며, 탄소 나노튜브를 넣어 stirring 한 후 이 용액의 일정량을 SPE에 dropping 하여 전극의 표면에 탄소 나노튜브와 효소를 동시에 loading 하였다. 이렇게 만들어진 바이오센서 전극 하나에 고정화된 효소의 양은 1 unit 으로 일정하다.

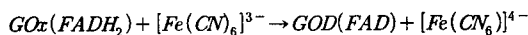
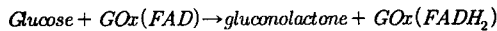


〈그림 3〉 탄소 나노튜브를 이용한 바이오센서 제작 모식도

2.4 바이오센서의 전기화학 분석

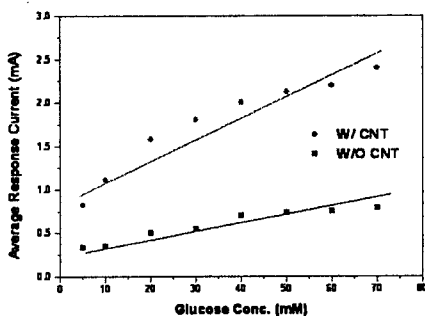
바이오센서의 전기화학 분석은 시간에 따른 전류차법(chronoamperometry) 방법으로 진행하였다. 이 방법은 작업전극과 상대전극에 일정한 전압을 가해 주면서 전류의 변화를 측정하는 방법으로, 전극 표면에서 반응이 일어남에 따라 두 전극에 흐르는 전류의 크기가 달라짐을 이용하여 전기적 신호를 검출한다. 본 연구에서는 가해주는 전압(분석 전압)은 0.6V로 하였고, 스트립 형태로 만들어진 전극에 glucose용액을 dropping한 후 30초 후의 전류값을 취하였다. 각각의 센서 전극에 반응시킨 glucose의 농도는 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 mM였으며, 탄소 나노튜브를 이용한 바이오센서의 감도향상 효과를 비교하기 위해 기존의 방법으로 제작된 혈당 센서 스트립에서도 동일한 방법으로 감도를 측정하였다.

전극의 반응 부분에 glucose 용액을 떨어뜨렸을 때의 반응은 아래와 같이 전형적인 효소 의존적 촉매 과정(enzyme-dependent catalytic process)에 의해 표현될 수 있다.



FAD와 FADH₂는 각각 GOx의 활성부위(active center)의 산화, 환원의 형태이며, [Fe(CN)₆]는 산화/환원 반응 결과 생성된 전자를 전극 표면에 전달하는 미디어이다.

그림 4은 기존의 방법으로 제작된 센서와 탄소 나노튜브를 이용하여 제작된 두 가지 유형의 바이오센서 전극의 전기화학 반응 결과를 나타낸 그래프이다. 기존의 방법으로 제작된 센서와 탄소 나노튜브를 이용한 바이오센서의 감도는 각각 0.02255 uA/mM, 0.0074 uA/mM 였고, R 값은 0.9580, 0.9673을 나타내었다. 탄소 나노튜브를 이용한 센서가 거의 세배 정도의 감도 증가를 나타내었고 직선성도 보다 우수하였다.



〈그림 4〉 탄소 나노튜브를 이용한 전극의 감도

전기화학 측정 결과 나타난 결과로부터 탄소 나노튜브를 이용한 전극에서 감도와 직선성 모두 좋은 값을 나타냄을 알 수 있었다. 탄소 나노튜브를 이용함으로써 효소의 고정화가 보다 안정적으로 될 수 있었고 전자 전달을

촉진하여 보다 좋은 감도를 나타내게 된 것이다.

이는 효소를 고정화 하는 방법에 있어 먼저 효소의 활성을 안정적으로 유지하는 효과를 향상 시킨 효과와 함께, 효소 반응결과 생성된 전자를 전극 표면에 전달하는 과정에서 탄소 나노튜브의 전자 전달 촉진 작용이 보다 효과적으로 나타났기 때문으로 생각된다.

3. 결 론

본 연구에서 탄소 나노튜브를 이용한 바이오센서를 제작하여 탄소 나노튜브를 사용하지 않은 바이오센서와 비교해보았다. 바이오센서에 이용된 탄소 나노튜브는 효소와의 반응성을 향상시키기 위해 화학적으로 처리하였고, 이러한 탄소 나노튜브를 이용하여 바이오센서를 제작하였다. 탄소 나노튜브와 효소 용액을 혼합한 형태로 스크린 프린팅 전극 표면에 고정화 하였는데 탄소 나노튜브를 사용하지 않고 제작된 기존의 혈당 센서 스트립보다 큰 감도를 나타내었고 선형성도 더 좋은 결과를 나타내었다. 탄소 나노튜브를 이용함으로써 glucose와 효소 반응결과 생성된 전자가 전극 표면에 전달하는 과정을 촉진시켜 얻어진 결과이다. 또한, 탄소 나노튜브를 이용할 때 효소와 먼저 반응시킨 후 스크린 프린팅 전극에 고정화함으로써 효소의 안정성을 높인 결과이다. 카르복실기가 유도된 탄소 나노튜브를 이용한 감도 향상 효과는 저 농도의 물질을 검출하기 위해 높은 감도가 요구되는 다양한 종류의 전기화학 센서 제작에 응용될 수 있을 것이다.

[참 고 문 헌]

- [1] J. M. Nugent, K.S.V. Santhanam, A. Rubio, and P. M. Ajayan, "Fast Electron Transfer Kinetics on Multiwalled Carbon Nanotube Microbundle Electrodes", Nano Letter 1, pp. 87-91, 2001
- [2] T. Saito, K. Matsushige, K. Tanaka, "Chemical treatment and modification of multi-walled carbon nanotubes", Physica B 323, pp. 280-283, 2003
- [3] C. G. Hu, W. L. Wang, S. X. Wang, W. Zhe, Y. Li, "Investigation on electrochemical properties of carbon nanotubes", Diamond and Related Materials 12, pp. 1295-1299, 2003
- [4] S.G. Wang, Qing Zhang, Ruili Wang, and S. F. Yoon, "A novel multi-walled carbon nanotube-based biosensor for glucose detection", Biochemical and Biophysical Research Communications 311, pp. 572-576, 2003
- [5] Maria L. Pedano, Gustavo A. Rivas, "Adsorption and electrooxidation of nucleic acids at carbon nanotubes paste electrodes", Electrochemistry Communications 6, pp. 10-16, 2004
- [6] Wen-Jun Guan, Yu Li, Yu-Quan Chen, Xiao-Bin Zhang, Gui-Quan Hu, "Glucose biosensor based on multi-wall carbon nanotubes and screen printed carbon electrodes", Biosensors and Bioelectronics 21, pp. 508-512, 2005
- [7] Yongkang Ye, Huangxian Ju, "Rapid detection of ssDNA and RNA using multi-walled carbon nanotubes modified screen-printed carbon electrode", Biosensors and Bioelectronics 21, pp. 735-741, 2005
- [8] G. Li, J. M. Liao, G.Q. Hu, N. Z. Ma, P. J. Wu, "Study of carbon nanotube modified biosensor for monitoring total cholesterol in blood", Biosensors and Bioelectronics 20, pp. 2140-2144, 2005