

글루코스산화효소와 금나노로드 입자의 다층막으로 구성된 촉매를 이용하여 측정한 글루코스 센싱에 대한 연구

정용진¹ · 현규환¹ · 한상원² · 민지홍² · 천승규¹ · 고원건² · 권용재^{1†}

¹서울과학기술대학교 에너지환경대학원, ²연세대학교 화학생명공학과

A Study on Glucose Sensing Measured by Catalyst Containing Multiple Layers of Glucose Oxidase and Gold Nano Rod

YONG-JIN CHUNG¹, KYUHWAN HYUN¹, SANG WON HAN², MIN JI HONG², SEUNG-KYU CHUN¹,
WON-GUN KOH², YONGCHAI KWON^{1†}

¹Graduate School of Energy and Environment, Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongreung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

²Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Yonsei University 50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul, 120-749, Korea

Abstract >> In this study, we propose a catalyst structure including enzyme and metal nano rod for glucose sensing. In the catalyst structure, glucose oxidase (GOx) and gold nano rod (GNR) are alternately immobilized on the surface of carbon nanotube (CNT), while poly(ethyleneimine) (PEI) is inserted in between the GOx and GNR to fortify their bonding and give them opposite polarization ([GOx/GNR]_nPEI/CNT). To investigate the impact of [GOx/GNR]_nPEI/CNT on glucose sensing, some electrochemical measurements are carried out. Initially, their optimal layer is determined by using cyclic voltammogram and as a result of that, it is proved that [GOx/GNR/PEI]₂/CNT is the best layer. Its glucose sensitivity is 13.315 $\mu\text{AmM}^{-1}\text{cm}^{-2}$. When it comes to the redox reaction mechanism of flavin adenine dinucleotide (FAD) within [GOx/GNR/PEI]₂/CNT, (i) oxygen plays a mediator role in moving electrons and protons generated by glucose oxidation reaction to those for the reduction reaction of FAD and (ii) glucose does not affect the redox reaction of FAD. It is also recognized that the [GOx/GNR/PEI]₃/CNT is limited to the surface reaction and the reaction is quasi-reversible.

Key words : Glucose oxidase (글루코스 산화효소), Gold nano rod (나노크기의 금 막대기 입자), glucose sensing (글루코스 센싱), Glucose sensitivity (글루코스 탐지 민감도), Glucose oxidation reaction (글루코스 산화반응)

1. 서 론

당뇨병은 식생활 변화에 따라 최근 빠르게 발병률

이 증가하고 있는 병 중 하나로, 전 세계적으로 10초마다 3명이 새로 발병되고 있으며, 2030년에는 발병 비율이 전체 성인 인구대비 10%에 달할 것으로 예측되고 있다. 이에 따라 당뇨병의 예방 및 검진을 위해서 혈액 내 당(Glucose) 농도의 주기적 측정 수요가 증가하고 있으며, 정확한 측정을 위한 다양한 방법들

[†]Corresponding author : kwony@seoultech.ac.kr

Received : 2015.04.07 in revised form : 2015.04.27 Accepted : 2015.04.30

Copyright © 2015 KHNES

이 연구되고 있다. 범용적 계측방법으로 전기화학식, 광학식, 온도적정식, 압전식, 자성식 변환방법 등이 사용되고 있으며, 이 중 전기화학식 방법은 가장 대중적인 당 측정 방법으로서, 전류측정법, 전압측정법, 전도율 측정법, 감이온 전계효과법 등으로 구분할 수 있다.^[1,2]

글루코스 산화효소(Glucose Oxidase ; GOx)는 글루코스의 전기화학적 측정을 위해 현재 가장 널리 사용되고 있는 촉매로, 글루코스에 대한 선택적 반응성이 우수한 장점이 있으나, 매우 낮은 전도성은 전기화학적 측정의 적용에 걸림돌이 되고 있다. 따라서, GOx를 보다 글루코스 측정에 신뢰성있는 촉매로 사용하기 위해서는 GOx의 반응속도 증가 및 당과 GOx 촉매의 반응 메커니즘에 대한 연구가 필요할 것이다.

본 연구에서는 GOx 반응성의 증가를 위하여, 전자전달을 도와줄 수 있는 금속입자, 전도성고분자 및 탄소나노튜브를 이용한 바이오촉매를 개발하였으며, 촉매 내 GOx 담지량 최적화 하기위해, 분극성이 서로 다른 금속입자, 전도성고분자 및 GOx의 세 가지 물질을 정전법(Electrostatic) 을 이용하여 적층(Layer by layer)하였다. 최적 GOx량을 및 적층 수를 실험적으로 확인하였으며, 개발 촉매의 전기화학적 분석을 통하여 반응성을 계산하였다.

2. 실험방법

2.1 시약 및 기기

합성에 쓰이는 재료 및 기기는 다음과 같다. 촉매의 담지체로 쓰인 물질은 CNT(Carbon Nano - material Technology Co., Ltd.) 그리고 담지체에 정전기적인 인력을 부여하기 위해 전도성 고분자인 Polyethyleneimine(PEI)(50wt% solution in water, MW 750,000)을 사용하였다. 실질적으로 촉매의 역할을 하는 물질인 Glucose oxidase(Sigma Aldrich G7141)와 촉매의 활성도를 높이기 위하여 Gold nano rod(GNR)^[3]도 사

용하였다.

전기화학 측정을 위해 정전위기를(CHI 7200, CH Instrument, USA) 사용하였다. 작업전극으로는 RDE 전극(AFE5T050GC, Pine, USA), 상대전극은 Pt wire 전극 그리고 기준전극은 Ag/AgCl 전극(NaCl 3.0M)을 사용하였다. 촉매를 전극에 고정시키기 물질로 전도성 고분자인 Nafion(Sigma Aldrich 70160)을 사용하였다.

2.2 합성방법

실험재료(PEI, GNR GOx)의 전기적인 극성을 이용하여 Layer by layer을 진행하였으며, 최종적으로 $[GOx/GNR]_nPEI/CNT$ 구조의 촉매를 합성하였다. 우선 PEI를 CNT에 물리적으로 흡착시켜주기 위해서 CNT 5mg을 10mL 의 PEI 수용액에 넣어주었다. ($5mg mL^{-1}$) 분산을 위해 10분 동안 초음파를 가해주고, 1시간동안 교반한 후 증류수를 이용하여 여분의 PEI를 세정하였다. PEI/CNT에 GOx 수용액($2.0mg mL^{-1}$)을 가하여 20분간 교반하고 원심분리를 통해 이를 분리하였다. 그 다음, GNR($2.0mg mL^{-1}$)용액을 가하여, GNR 층을 형성한 뒤 마찬가지로 이를 분리하였다. 이를 반복하면서 원하는 레이어 수만큼 GOx/GNR 층을 쌓게 되며, 반복수에 따라 GOx/GNR 층이 PEI/CNT에 적층되어, $[GOx/GNR]_nPEI/CNT$ 구조를 합성할 수 있다.

2.3 전기화학측정

시료 성능 평가를 위해 정전위기를 이용한 전기화학적 인 측정을 하였다. 순환주사전류(Cyclic voltammogram ; CV)측정을 위하여 삼전극 실험을 진행하였고, 상대전극은 백금줄, 기준전극은 Ag/AgCl(3M NaCl)을 사용하였다. 작업전극을 만들기 위해서 촉매 가루를 카본전극 위에 $10\mu m$ 올려준 후 30분간 건조했다. 그 후 Nafion(0.5 wt%) $8\mu m$ 를 촉매 상층에 올려준 후, 5분간 건조해서 사용하였다.^[4]

3. 결과 및 토론

CNT 담지체 위에 음극성인(- 극) GOx를 담지시키기 위해 CNT 표면에 양극성을(+ 극)을 띠는 PEI를 물리적으로 흡착시켰다. 그 후 표면에 음극성(- 극)을 띠는 GOx에 GNR을(+ 극) 정전기적인 인력을 이용하여 고정화 시킨 후, 이를 PEI/CNT 층위에 흡착시켜 $[GOx/GNR]_1PEI/CNT$ 층을 완성하고, 순차적으로 반복하여, $[GOx/GNR]_nPEI/CNT$ 구조의 촉매를 제조했다.

1개의 GOx/GNR층을 PEI/CNT에 고정화한 구조를 TEM으로 분석하였으며, 이를 통해 CNT에 고정화된 GNR 및 GOx를 확인할 수 있었다.(Fig. 1)

GOx의 최대 담지량 및 최적량 평가, 최적 GOx/GNR의 층수를 평가하기 위해 PEI/CNT 담지체 표면에 GOx/GNR를 1층부터 4층까지 변화시켜가며 적층한 $[GOx/GNR]_nPEI/CNT$, $n = 1\sim 4$ 층의 GOx의 Redox 반응도를 CV를 이용하여 측정하였으며 그 결과는 Fig. 2와 같다.^[5] CV 결과에서 나타난 산화 및 환원 피크전류는 GOx내 Cofactor인 Flavin Adenine Dinucleotide(FAD)의 Redox 반응(식1)을 의미하며, 피크전류가 증가할수록 GOx가 CNT위에 많이 고정되어 있음을 나타낸다.

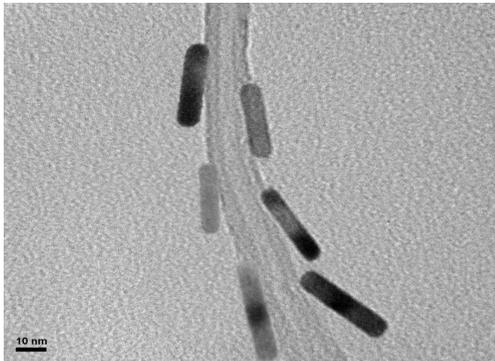
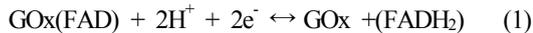


Fig. 1 TEM image of $[GOx/GNR]_1PEI/CNT$

측정결과, $[GOx/GNR]_2PEI/CNT$ 일 때, 피크전류는 최대값을 나타내었으며, 추가적으로 GOx/GNR층을 고정화해도 피크전류값은 유의한 변화가 없었다. 본 실험의 결과로 5mg/ml의 CNT 담지체의 최적 GOx/GNR 층의 갯수는 2층임을 확인하였으며, 후속 실험에서는 2층 촉매를 사용하였다.

$[GOx/GNR]_2PEI/CNT$ 의 율속단계를 판단하기 위해 주사속도를 10mV부터 100mV 까지 변화를 주며 순환전압전류법을 진행하여 피크전류, 전압의 변화를 살펴보았다.(Fig. 3)^[6-8] 측정결과, 피크전류는 주

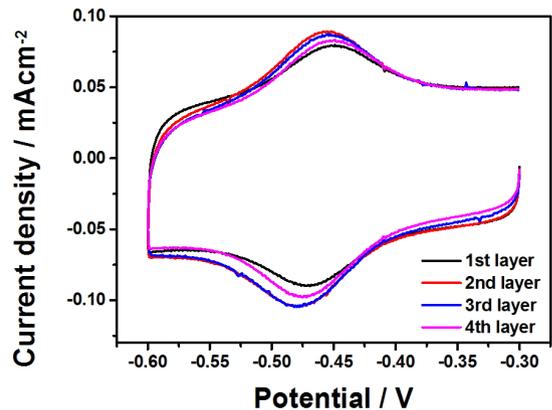


Fig. 2 Cyclo voltammograms of $[GOx/GNR]_nPEI/CNT$ ($n = 1\sim 4$) layers. Scan rate for these CV tests was 50mV/s, while PBS (pH 7.4) was used as electrolyte with N_2 purge

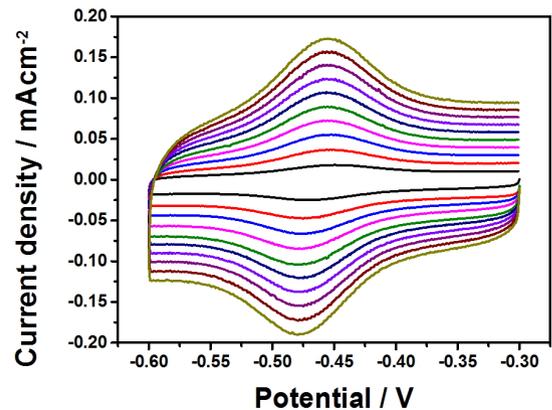


Fig. 3 Cyclo voltammogram of $[GOx/GNR]_2PEI/CNT$ layer. Scan rate for these CV tests was ranged from 10 to 100mV/s, while PBS (pH 7.4) was used as electrolyte with N_2 purge

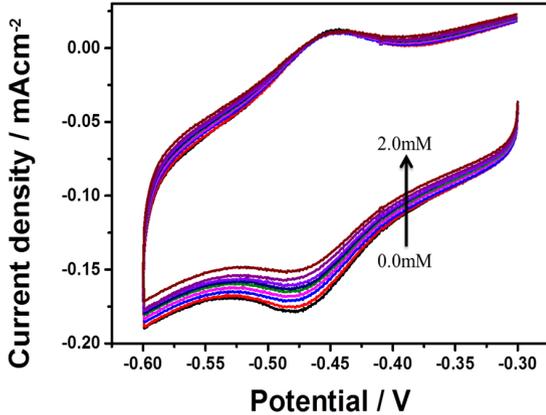
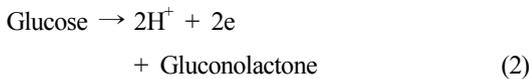


Fig. 4 Cyclic voltammogram of [GOx/GNR]₂PEI/CNT layer with provision of glucose. Concentrations of glucose supplied were ranged from 0 to 2.0 mM, while PBS (pH 7.4) was used as electrolyte with air saturated state. Scan rate for these CV tests was 50mV/s

사속도에 비례하여 증가함을 확인하였으며, 이 촉매의 반응이 반응율속임을 알 수 있었다. 또한 주사속도의 증가에도 불구하고, 피크전류의 전압 값은 변하지 않아 GOx의 반응이 실험 주사속도범위에서 가역적임을 확인하였다.

글루코스센서에 본 촉매의 적용에 대한 평가를 위해서는 글루코스 공급에 따른 반응기작을 확인할 필요가 있다. 이를 위해 [GOx/GNR]₂PEI/CNT 구조의 촉매에 글루코스 농도를 0.0 mM에서 2.0 mM 까지 증가시키며 CV를 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 4과 같다.

실험결과, 글루코스 농도가 증가할수록 환원반응 전류 피크는 감소하였으며, 이는 글루코스 농도의 증가가 환원반응을 저해함을 알 수 있다.



반응 (1) - (2)에 의하면 당의 주입량이 증가할수록 당의 산화반응 (반응2)은 증가하고, 생성된 프로톤과 전자들은 GOx(FAD)로 전달되며, 결국 전극에서 받아야 할 전자의 양이 줄어들어, GOx내 FAD의 FADH₂

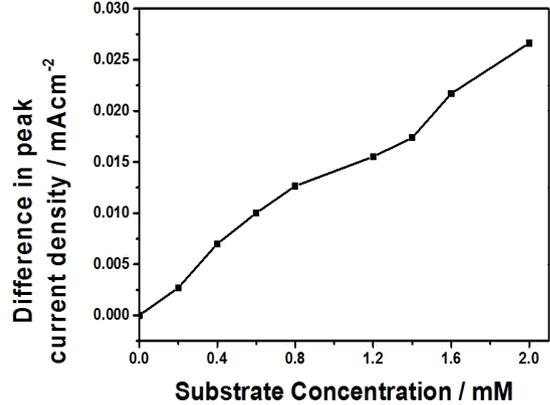


Fig. 5 A relationship between glucose concentration and difference in peak current density

로의 환원을 저해하게 된다. 이에 따라 CV의 GOx 환원반응 전류피크는 당 농도가 증가하면 감소하는 결과를 확인할 수 있다.^[9,10]

Fig. 5의 결과, 글루코스 농도 0.0mM에서 2.0mM 까지는 반응이 선형적으로 증가함을 알 수 있었고 당 반응에 대한 감도(sensitivity)를 구하였으며, 계산 결과 당반응 감도는 13.315 $\mu\text{A mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ 이었다.

4. 결 론

본 논문에서는 글루코스 산화반응 촉진을 위해 CNT위에 PEI를 고정화 시켜 PEI/CNT 구조를 제조한뒤, GOx/GNR 층을 적층한(Layer by layer)형태의 촉매구조를 제안하고 고정화 최적조건을 정량화 하였다. PEI를 CNT에 고정시키기 위한 방법으로 물리적 흡착법을 이용하였으며, 그 위에 GNR, GOx를 정전기적 인력을 이용하여 고정화시켰다.

CV 법을 이용하여 CNT에서 촉매로서 역할을 하는 GOx/GNR의 최적층이 2층임을 확인하였으며, 주사속도와 피크전류의 관계로부터 2층의 CNT/GOx 촉매구조는 반응율속임을 확인하였다. 글루코스가 공급되었을 때 GOx가 글루코스의 산화반응성에 어떤 영향을 미치는지 측정하였는데, 글루코스 농도가 증가할수록 산화반응에 대한 전류 피크는 선형적으

로 증가하는 것에서 글루코스의 농도의 증가에 따라 산화반응이 활성화되는 것을 확인하였다.

후 기

이 연구는 2015년 서울과학기술대학교 교내 학술 연구비 지원으로 수행되었습니다.

References

1. S.W. Kim, "Fabrication and characterization of glucose sensor using oxidation reaction on the carbon paste electrode" KAIST 2011 MS Dissertation.
2. M.K Chung "Ion Sensitive Field Effect Transistor based glucose sensor with Palladium gate" KAIST 2011 MS Dissertation.
3. Q. Li, Y. Cao, "Preparation and Characterization of Gold Nanorods", *Nanorods* 09 (2012) 159.
4. K. Hyun, J.H. Lee, C.W. Yoon, Y. Kwon, "The Effect of Platinum Based Bimetallic Electrocatalysts on Oxygen Reduction Reaction of Proton Exchange Membrane Fuel Cells", *Int. J. Electrochem. Sci.*, 8 (2013) 11752.
5. K. Hyun, S.W Han, W-G, Koh, Y, Kwon, "Direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on carbon nanotube for improving glucose sensing" *Int. J. Hydrogen Energy* 40 (2015) 2199.
6. M.J. Moehlenbrock, S.D. Minteer. "Extended lifetime biofuel cells." *Chem. Soc. Rev.* 376 (2008) 1188.
7. J. Kim, J.W. Grate, P. Wang, "Nanostructures for enzyme stabilization", *Chem. Eng. Sci.* 61 (2006) 1017.
8. P. Wang, *Nanoscale biocatalyst systems.* *Curr. Opin. Biotechnol.* 17 (2006) 574.
9. Q.H. Gibson, B.E.P Swoboda, V. Massey, "Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase" *J.Biol. Chem.* 239 (1964) 3927.
10. M. Wooten, S. Karra, M. Zhang, W. Gorski, "On the direct electron transfer, sensing, and enzyme activity in the glucose oxidase/carbon nanotubes system", *Anal. Chem* 86 (2014) 752.