

글루타알데하이드에 의해 결합된 효소촉매를 이용한 글루코스 센서의 성능향상

안연주* · 정용진* · 이규빈 · 권용재[†]
서울과학기술대학교 에너지환경대학원

Performance Improvement of Glucose Sensor Adopting Enzymatic Catalyst bonded by Glutaraldehyde

YEONJOO AHN, YONGJIN CHUNG, KYUBIN LEE, YONGCHAI KWON[†]

[†]Grad. School of Energy and Environment, Seoul National Univ. of Science and Technology,
232 Gongreung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

Abstract >> In this study, we synthesized a biocatalyst consisting of glucose oxidase (GOx), polyethyleneimine (PEI) and carbon nanotube (CNT) with addition of glutaraldehyde (GA)(GA/[GOx/PEI/CNT])for fabrication of glucose sensor. Main bonding of the GA/[GOx/PEI/CNT] catalyst was formed by crosslinking of functional end groups between GOx/PEI and GA. Catalytic activity of GA/[GOx/PEI/CNT] was quantified by UV-Vis and electrochemical measurements. As a result of that, high immobilization ratio of 199% than other catalyst (with only physical adsorption) and large sensitivity value of 13.4 $\mu\text{A}/\text{cm}^2/\text{mM}$ was gained. With estimation of the biosensor stability, it was found that the GA/[GOx/PEI/CNT] kept about 88% of its initial activity even after three weeks. It shows GA minimized the loss of GOx and improved sensing ability and stability compared with that using other biocatalysts.

Key words : Glucose(글루코스), Glucose oxidase(글루코스 산화효소), Protein immobilization(단백질 고정화), Biosensor(바이오센서), Amperometry(시간대전류법)

1. 서 론

당뇨병은 혈당 조절에 관여하는 호르몬인 인슐린의 문제로 인해 발생하는 만성질환으로, 세계적인 건강문제로 꼽히는 질병이다. 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에 따르면 2014년 기준으로 전세

계의 약 4억 2천여 명이 당뇨병을 앓고 있으며, 향후 20년간 두 배 이상으로 증가할 것으로 예상되고 있다¹⁾. 이의 예방 및 관리를 위해서는 주기적으로 정확하고 철저한 혈당 측정이 필요한데, 기존의 혈액을 채취하여 측정하는 침투식은 사용자의 거부감이 심하고, 연속적 모니터링이 불가능하여 이를 개선하기 위한 다양한 연구가 진행되어 왔으며, 높은 감도와 글루코스에 기질선택성이 높은 효소를 이용한 센서가 주를 이루고 있다^{2,3)}. 특히, 글루코스 산화효소는 1962년, Clark와 Lyon에 의해 처음 글루코스 효소 전

* Y. Chung and Y. Ahn are equally contributed to this work.

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

Received : 2016.7.22 in revised form : 2016.8.16 Accepted : 2016.8.30

Copyright © 2016 KHNES

극의 컨셉을 제안한 이래로 이를 이용한 많은 연구가 진행되어 왔는데, 센서 구성이 상대적으로 단순하고 효소 생산비용이 저렴하여 각광받고 있으나, 센서 표면에 글루코스 산화효소(Glucose oxidase, GOx)를 안정적으로 고정시키기 어려워, 실적용에 큰 걸림돌이 되고 있다. 효소 고정화 방법으로는 물리적 흡착과 공유결합, 가교결합 등의 화학적 결합이 있는데 흡착은 전처리나 개질이 필요하지 않아 제조가 간단한 반면, 효소가 쉽게 탈락되어 바이오센서의 안정성이 떨어진다는 단점이 있으며, 공유결합의 경우 효소를 강하게 고정할 수 있으나 담지체의 표면의 개질이 필요한 단점이 있다⁴⁾. 가교결합은 글루타알데하이드(Glutaraldehyde, GA)와 같은 가교제(crosslinker)를 이용해 효소 분자를 상호 간 결합시켜 안정적 담지를 유도하는 방법으로서, 최근에는 가교제를 이용하여 효소군집(Cross Linked Enzyme Aggregates, CLEA)을 생성하여 효소 고정화량을 극대화하는 방법이 연구되고 있다⁵⁾.

본 연구에서는 전자전달 매개체를 이용하지 않고도 우수한 안정성과 감도를 갖는 글루코스 감지용 전기화학적 바이오센서를 만들기 위해, 물리적 흡착을 이용하여 GOx를 담지체에 최대한 군집시킨 후, GA를 이용하여 담지체 및 효소를 서로 화학적으로 결합시킨 촉매를 개발하고 이의 특성을 기존의 방식과 비교하였다.

2. 실험

2.1 시약

촉매의 담지체로 전기전도성이 높고 표면적이 큰 탄소나노튜브(Carbon nanotube, MR99, Carbon Nano-Material Technology, CNT)를 사용했고, CNT와 GOx의 물리적 흡착을 유도하기 위한 물질로 폴리에틸렌이민(Polyethyleneimine, 50 wt% solution in water, MW 750,000, PEI)을 사용했다. 글루코스(Glucose, ACS

reagent)를 감지하기 위한 효소로 글루코스 산화효소(Glucose oxidase, Type X-S, 138370 U/g Solid, GOx)를, 가교제로는 글루타알데하이드(Glutaraldehyde solution, 25% in H₂O, GA)를 사용하였다.

한편, 전기화학 측정에서 촉매를 전극에 고정시키기 물질로는 Nafion[®]117을 사용하였다. 선택성 확인을 위한 실험에서는 아스코빅산(Ascorbic acid, BioXtra, ≥99.0 wt%, crystalline, AA)과 요산(Uric acid, BioXtra, ≥99.0 wt%(HPLC), UA)을 사용했고, 분광분석법(UV-vis spectroscopy)에는 완충용액인 Sodium acetate trihydrate (ReagentPlus[®], ≥99.0 wt%)와 Peroxidase (from horseradish, Type I, 146 U/g Solid), O-dianisidine dihydrochloride (≥95 wt%)를 사용하였다. CNT와 증류수를 제외한 모든 시약은 Sigma Aldrich에서 구매하였다.

2.2 촉매 제조

GOx/PEI/CNT 구조의 촉매를 만들기 위하여, 정전기적 인력과 고분자를 이용한 포집을 실시해 각 시료 간 물리적 결합을 유도하였고 방법은 다음과 같다. 2.5 mg/ml의 PEI 용액 1 ml에 5 mg의 CNT를 용해한 후 CNT가 잘 분산될 수 있도록 초음파분산기에 넣고 10분 내외로 분산시킨다. 이후 CNT에 PEI가 잘 붙을 수 있도록 1시간 교반한다. 이 분산된 용액을 원심분리기에 넣고 2회 세척해 여분의 PEI를 씻어 낸 다음, 원심분리 후 얻은 잔여물(PEI/CNT)에 2나 4 mg/ml의 GOx 용액을 넣고 분산한다. 30분간 교반하여 GOx가 PEI/CNT에 충분히 붙을 수 있게 한다. 1회 세척 후 증류수를 넣고 분산한다.

이렇게 제조된 GOx/PEI/CNT 구조에 화학적 결합을 유도하여 GA/[GOx/PEI/CNT] 구조의 촉매를 합성한다. GOx/PEI/CNT 제조 후, 물을 넣고 분산하는 단계에서 물이 아닌 0.5 wt% GA 용액을 넣고 분산하여 1시간 반응시켜 GA와 GOx/PEI/CNT가 충분히 결합할 수 있게 한 다음, 원심분리 후 증류수를 넣고

분산하여 촉매잉크를 완성한다^{6,7)}. 촉매잉크는 실험 외엔 4°C에서 냉장 보관한다.

2.3 전기화학측정

시료 성능 평가를 위해 정전위기를 이용한 전기화학적인 측정을 진행하였다.

2.3.1 순환주사전류 및 시간대전류 측정

순환주사전류(Cyclic voltammogram, CV)와 시간대전류(Chronoamperometry, CA) 측정을 위하여 삼전극 실험을 진행하였고, 상대전극은 백금선, 기준전극은 Ag/AgCl (3.0 M NaCl)을 사용하였다. 작업전극을 만들기 위해서 촉매잉크(물을 넣고 분산한 촉매)를 탄소전극(지름 5.0 mm, 면적 0.196 cm²) 위에 3.5 μ l 올려준 후 30분 이상 건조했다. 그 후 Nafion (0.5 wt%) 용액 2.0 μ l를 건조된 촉매 위에 올려준 후, 5분간 건조해서 사용하였고, 작업 전극은 실험 시 항상 1000 rpm으로 회전시켜 확산에 의한 변수를 통일시켰다. 전해질은 1.0 M과 0.1 M Phosphate 완충용액(PBS, pH 7.4)을 사용했다. 전기화학 측정을 위해 정전위기를(CHI 720D, CH Instrument, USA) 사용하였다.

촉매의 안정성 평가의 경우, 합성한 촉매로부터 GOx가 탈락되는 지를 확인하기 위해, 이 방법을 통해 주기적으로 피크전류밀도 측정함으로써 확인하였다.

2.3.2 전기화학 임피던스 측정

CV와 마찬가지로 삼전극 실험을 진행하였고, 작업전극을 만들기 위해서 촉매잉크를 백금전극(지름 12 mm) 위에 60 μ l를 올리고 30분 이상 건조한 후, Nafion 용액 40 μ l를 올려 건조했다. 전해질은 약 pH 7.4의 0.01 M PBS를 사용하였고 정전위기는 정전위 모듈과 주파수 응답분석기(frequency response analyzer, FRA)를 가진 SP-240(Bio-Logic, USA)를 사용하였다. Modulating potential은 70 mV, 주파수는

10 Hz에서 3 MHz로 가해 decade마다 10점을 측정하도록 설정했다.

2.4 분광분석

GOx의 상대적인 고정화량을 비교하기 위해서 가시-자외선 분광분석기(V-560, JASCO, USA)를 사용하여 효소분석을 하였다⁸⁾. 각 시료(buffer 6)에 0.17 mM o-Dianisidine과 1.72%(w/v) 글루코스 혼합용액 2.9 ml, peroxidase 용액 0.1 ml와 GOx가 포함된 촉매잉크나 용액 0.1 ml를 섞고 6분간 반응시킨 후 1 M 황산 500 μ l 추가하여 반응을 정지시켰다. 이것이 test 용액이며, blank 용액은 buffer 6을 sodium acetate buffer (5 mM, pH 5.1) 0.1 ml로 대체해 제조했다.

3. 결과 및 고찰

3.1 촉매 제조

체액의 pH 정상수치 값인 7.4 부근에서 체액의 pH 정상수치 값인 7.4 부근에서 (-) 극성을 띠는 CNT, GOx와 (+) 극성을 띠는 고분자 PEI 간 정전기적 인력을 이용해 일차적으로 GOx/PEI/CNT 구조를 제조하였고, 이때 GOx 농도에 따른 물리적 흡착량을 확인하기 위해 2 mg/ml와 4 mg/ml의 GOx 용액을 사용하여 촉매를 합성하였다(이하, “2-GOx/PEI/CNT”, “4-GOx/PEI/CNT”). PEI/CNT담지체에는 CNT 5 mg 당 최대 2 mg/ml의 GOx가 합성손실 없이 담지 가능한 것으로 알려져 있으나⁶⁾, 과량의 GOx 용액을 PEI/CNT에 흡착시켜 담지체에 물리적으로 최대한 담지도록 유도하였다. 정전기적 결합만으로는 결합력이 약해 GOx가 쉽게 손실될 위험이 있기 때문에 가교제인 GA를 추가하여(GA/[GOx/PEI/CNT]) 가교결합을 통해 효소의 안정적인 고정을 유도하였다(Fig. 1). GA 말단에 있는 알데하이드(-CHO)기가 GOx의 lysine residue 및 PEI의 아미노(-NH₂)기와 알돌축합반응

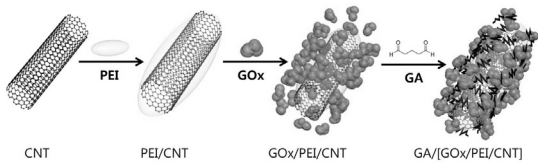
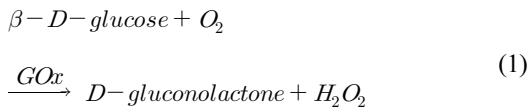


Fig. 1 Schematic illustrations showing fabrication of the biocatalyst (GA/[GOx/PEI/CNT])

(Aldol condensation)하여 (O=C)-N결합을 형성, 물리적 흡착에 비하여 GOx를 담지체에 강하게 결합시켜 장기적 안정성 및 우수한 전기화학적 성질을 나타냄을 확인하였으며⁷⁾, GA에 의한 GOx와 PEI간의 결합 화학구조 등은 Chung 등에 의하여 XPS(X-ray Photoelectron Spectroscopy)⁹⁾ 및 FT-IR⁷⁾에 의해 검증된 바 있으며, 직접전자전달(Direct Electron Transfer, DET)이 가능한 거리인 2 nm¹⁰⁾를 일정하게 유지시켜 줘, 촉매 기능의 향상을 기대할 수 있다.

각 촉매의 상대적인 GOx 고정화량을 비교하기 위해 효소 활동도를 분석하였다.



GOx와 글루코스의 산화반응을 통해 생성된 H₂O₂가 O-dianisidine dihydrochloride 등의 분석시료와 반응하면서 변화하는 흡광을 측정하는 비색법에 의한 정량법을 사용하였으며, UV-Vis에서 400 nm부근의 피크가 담지된 GOx의 양(효소 활성도)과 비례하여 증가한다⁸⁾. 이의 측정을 위하여 글루코스 용액과 촉매를 반응 시킨 후, 촉매 및 지지체의 흡광간섭을 막기 위하여 촉매를 침전시킨 상층액의 흡광도를 분석하였다. Fig. 2에 나타난 400 nm 부근에서 생긴 피크의 크기를 비교하면, 2-GOx/PEI/CNT은 0.184, 4-GOx/PEI/CNT는 0.210으로 4-GOx/PEI/CNT의 GOx활성이 높아, 조금 더 담지체에 고정된 것을 확인할 수 있었으나 그 차이가 미미하여, GOx 용액의

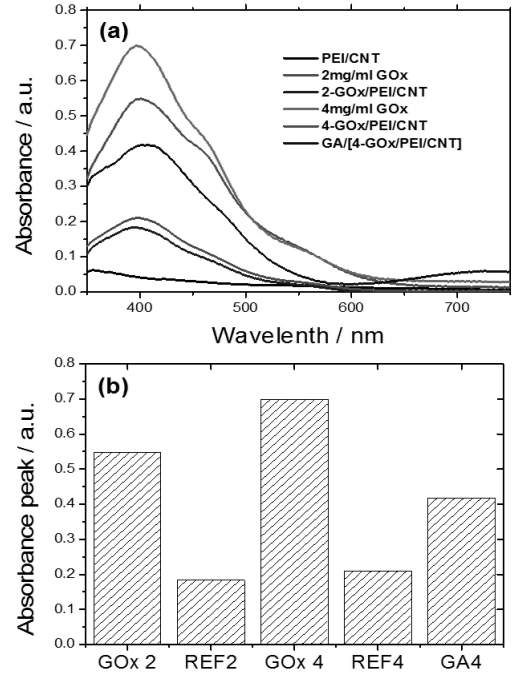


Fig. 2 The absorbance (a) results and (b) peaks of GOx in GOx solution or biocatalysts consisting of GOx (REF2: 2-GOx/PEI/CNT, REF4: 4-GOx/PEI/CNT, GA4: GA/[4-GOx/PEI/CNT] in legend)

농도를 증가시켜도 담지되는 최대량에는 한계가 있음을 확인하였다. 그에 비해 4 mg/ml GOx와 0.5 wt% GA를 이용한 촉매(GA/[4-GOx/PEI/CNT])는 0.418로, 4-GOx/PEI/CNT 결과의 약 두 배(199%)에 달하여, GOx의 물리적 흡착 후에 투입된 GA가 가교를 통하여 GOx의 손실을 방지함을 확인하였다. 또한, 물리적 결합을 통해 만든 4-GOx/PEI/CNT의 경우, 제조 시 다량의 GOx가 담지되었으나 사용 시 약한 결합으로 인해 그 담지량이 절반으로 줄어들음을 확인하였다. 즉, 물리적 결합에 의한 GOx의 담지량에는 제한이 있으나, 이를 GA와의 화학적 가교를 통하여 개선할 수 있음을 확인하였다.

3.2 전기화학적 특성 평가

합성한 촉매에 담지된 GOx의 산화환원반응 정도를 확인하기 위해 CV 측정을 진행하였다. 질소로 포

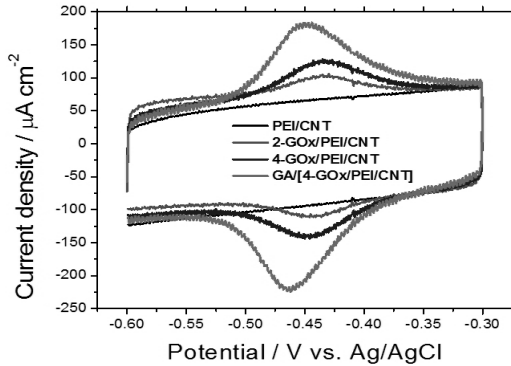
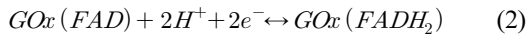


Fig. 3 Cyclic voltammograms obtained at associated biocatalysts. As electrolyte, N₂ saturated 1.0 M PBS (pH7.4) was used, while potential scan rate was 100 mV/s and rotation rate of GCE was 1000 rpm

화된 1.0 M PBS에서 주사속도가 100 mV/s일때 각 촉매들의 CV 측정 결과를 Fig. 3에 나타냈다. CV 결과에서 나타난 산화 및 환원 피크전류밀도는 GOx 내 공동인자인 Flavin Adenine Dinucleotide (FAD)의 산화환원반응을 의미하며, 피크전류가 증가할수록 GOx와 담지체 간 전자전달이 활발함을 나타낸다. FAD의 산화환원반응식은 다음과 같다.



GOx가 담지되지 않은 PEI/CNT 촉매에서는 FAD의 산화환원반응이 발생하지 않아 CV 피크전류가 생성되지 않았다. 한편, GOx 농도가 2에서 4 mg/ml로 증가함에 따라 피크 전류 역시 차이를 보이게 되며, GA를 추가로 사용한 결과 피크 전류가 눈에 띄게 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이는 GA/[4-GOx/PEI/CNT] 및 4-GOx/PEI/CNT의 전자전달속도 상수(k_s)가 각각 8.82/s, 8.36/s로, GA의 가교로 인하여 (GA/[4-GOx/PEI/CNT]의 전자전달이 촉진됨을 증명한 지난 연구결과와 일치한다⁹). 정전기적으로 활성화된 GOx의 표면 평균 농도(Γ , mol/cm²)는 다음 식에 의거하여 CV 환원 피크의 전하 적분(charge integration)을 통해 추정할 수 있다.

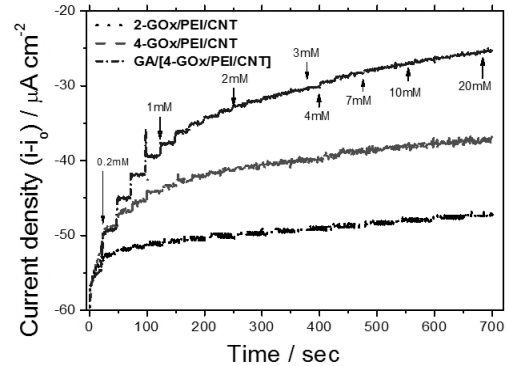


Fig. 4 Amperometric current-time responses obtained at associated biocatalysts upon additions of glucose. As electrolyte, air saturated 0.1 M PBS (pH 7.4) was used and rotation rate of GCE was 1000 rpm and E_{app} was -0.46 V

$$Q = nFA\Gamma \quad (3)$$

이때 Q는 전하, F는 패러데이 상수, n은 전달된 전자수, A는 카본전극의 면적(cm²)을 의미한다¹¹). 전달된 전자수는 식 (2)에서 알 수 있듯이 2이다. 따라서, 2-GOx/PEI/CNT, 4-GOx/PEI/CNT, GA/[4-GOx/PEI/CNT] 전극에 포함된 전기적으로 활성화된 GOx의 양은 각각 42.2, 50.9, 96.8 pmol/cm²로 GA/[4-GOx/PEI/CNT]가 가장 높은 값을 나타냈다. GA를 사용했을 때 활성화된 GOx 양이 많은 이유는 기존 논문⁵)에서 밝혀진 대로 GA가 GOx의 아미노(-NH₂)그룹과 공유결합하여 GOx의 손실 및 활성도 감소를 방지하기 때문인 것으로 추정된다.

환원 반응하던 산소가 글루코스의 산화반응(식 (1))에 사용되면서 -0.6 V에서 -0.3 V에 이르는 넓은 범위에서 산소의 환원반응은 줄어들어 환원전류는 감소하고 산화전류는 증가하게 된다. 특히 -0.46 V의 부근에서 산소와 글루코스의 반응에 따라 변화하는 산소 환원 전류의 변화가 글루코스 농도의 변화에 따라 민감하게 반응하므로 이를 기준으로 전류변화를 측정하였다(Fig. 4). PBS에 0.2 mM부터 20 mM까지 글루코스 용액을 23초마다 순차적으로 추가하여 GOx가 담지된 2-GOx/PEI/CNT, 4-GOx/PEI/CNT, GA/

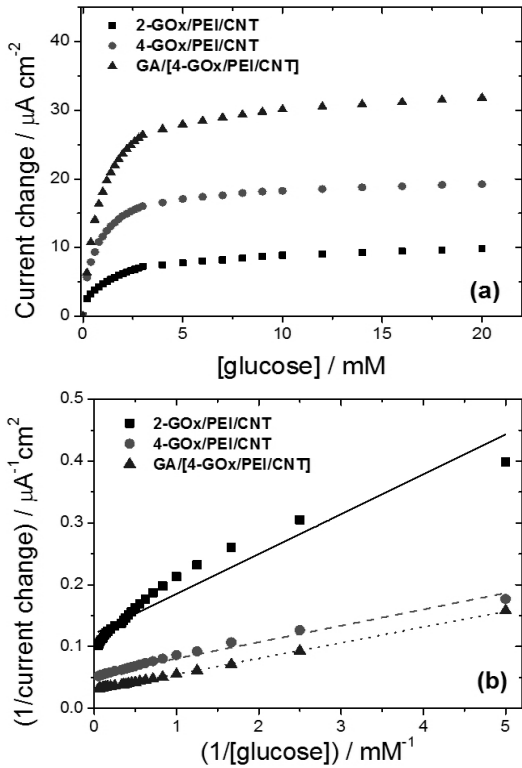


Fig. 5 (a) A plot of current density at -0.46 V vs. glucose concentration. $I_{\text{max}}=33.26\ \mu\text{A}/\text{cm}^2$. (b) Determination of the Michaelis-Menten constant (K_m) for the biosensor. $K_m=0.533$ (2-GOx/PEI/CNT), 0.486 (4-GOx/PEI/CNT) and 0.844 (GA/[4-GOx/PEI/CNT]) mM

[4-GOx/PEI/CNT]의 전류를 측정하였다. PEI/CNT에서는 글루코스 산화반응이 일어나지 않아 전류변화가 나타나지 않는 반면 다른 세 전극에서는 GOx에 의해 글루코스 산화반응이 일어나며, 글루코스 농도에 따라 전류가 변하면서 생겨난 계단모양의 응답을 확인할 수 있었다.

글루코스 농도에 따른 전류밀도($i-i_0$)의 변화는 Fig. 5에 나타냈으며, 이를 기반으로 각 촉매의 센서로서의 성능을 비교하기 위하여, Michaelis-Menten 상수 ($K_{m,app}$)를 계산하였다. $K_{m,app}$ 는 효소-물질 반응의 지표로서 고정화된 효소의 생물학적 활성도를 평가하는데 사용되며, 라인위버-버크(Lineweaver-Burk) 식을 이용해 계산할 수 있으며 그 식은 다음과 같다.

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{K_m}{I_{\text{max}} \cdot C_{\text{glucose}}} + \frac{1}{I_{\text{max}}} \quad (4)$$

이때 I_{ss} 는 반응물질 첨가 후 steady-state일 때의 전류, I_{max} 는 반응물질이 포화되었을 때 촉매가 생성해낼 수 있는 최대 전류, C_{glucose} 는 용액 내 글루코스의 농도를 나타낸다¹²⁾. 이때, I_{max} 값은 각각 8.28, 18.38, 33.26 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 이었고, 결과적으로 K_m 값은 0.533(2-GOx/PEI/CNT), 0.486(4-GOx/PEI/CNT), 0.844(GA/[4-GOx/PEI/CNT]) mM이다. $K_{m,app}$ 값은 작을수록 고정화된 GOx가 높은 효소 활성도를 지닌다는 것을 의미하며 GOx가 담지된 전극이 글루코스에 높은 친화도를 가진다는 것을 의미한다. GA를 이용하여 GOx를 담지한 전극이 그렇지 않은 전극에 비해 K_m 값이 높은데 이는 GA가 GOx와 담지체 간의 안정적인 결합을 제공하나 가교에 의하여 글루코스의 물질전달이 저해되는 효과도 있음을 확인할 수 있었다¹³⁾. 0에서 1 mM의 저농도 범위에서 감도는 각각 2.54($r^2=0.974$), 6.80($r^2=0.963$), 13.4 $\mu\text{A}/\text{mM}/\text{cm}^2$ ($r^2=0.956$)로 GA를 이용해 GOx를 담지한 전극이 가장 좋은 감도를 보였으며, 유사한 구조를 갖는 다른 선행연구결과와 비교해서도 우수한 성능을 나타냈다. 특히, SWCNT에 PEI를 이용해 GOx를 붙인 센서(GCE/(SWCNT-PEI-GOx))가 $0.23\pm 0.02\ \mu\text{A}/\text{mM}$ ¹⁴⁾의 감도를 지니며, SiO₂와 백금 나노입자에 GOx를 혼합해 만든 센서(Pt-SiO₂/GOx)의 경우 3.85 $\mu\text{A}/\text{mM}$ ¹⁵⁾의 감도를 지니, CNT와 PEI를 적용한 타 촉매에 비해 본 센서가 높은 감도를 나타냄을 확인하였다.

체액에는 요산(Uric acid, UA)이나 비타민C의 일종인 아스코빅산(Ascorbic acid, AA) 같은 산화성 물질이 존재하며 이들은 체액 내 글루코스 감지 시에 간섭을 일으킨다¹⁶⁾. 우리는 AA나 UA와 같은 다른 전기활성 물질로부터의 잠재적인 간섭을 평가하고 글루코스에 대한 선택성을 확인하기 위해 AA, UA와 글루코스를 첨가한 후 전극의 CA 반응을 살펴보았

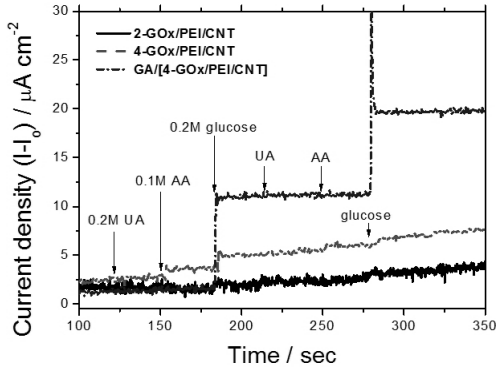


Fig. 6 Amperometric responses of the biosensor upon additions of glucose (0.2 mM), UA (0.2 mM) and AA (0.1 mM). 0.1 M PBS was used as electrolyte, while potential was fixed as -0.46 V

다(Fig. 6). 공기로 포화된 0.1 M PBS (pH 7.4)에 0.2 mM의 UA와 글루코스, 0.1 mM의 AA를 첨가해주었다. 특히 GA/[GOx/PEI/CNT] 전극에서 글루코스에 비하여 UA나 AA의 간섭에 대한 반응도가 미미해 글루코스에 대한 우수한 선택성을 보였다.

Fig. 7은 임피던스 법으로 2-GOx/PEI/CNT, 4-GOx/PEI/CNT, GA/[4-GOx/PEI/CNT] 전극을 각각 측정 후 임피던스 스펙트럼의 실수와 허수 부분(Z_{im} vs. Z_{re})을 나이키스트 그래프로 도시한 것이다. 측매를 제외한 실험 조건은 모두 동일하게 진행하였으므로, 임피던스 값 중 전하전달 저항(R_{ct})값이 크다는 것은 전도성이 낮은 GOx가 많이 고정된 것으로 생각할 수 있

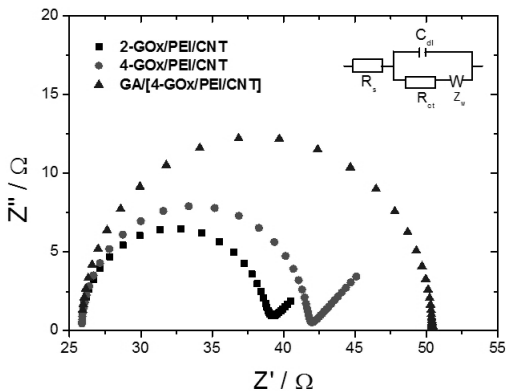


Fig. 7 Nyquist plots of 2-GOx/PEI/CNT, 4-GOx/PEI/CNT and GA/[4-GOx/PEI/CNT]. DC Potential : 70 mV

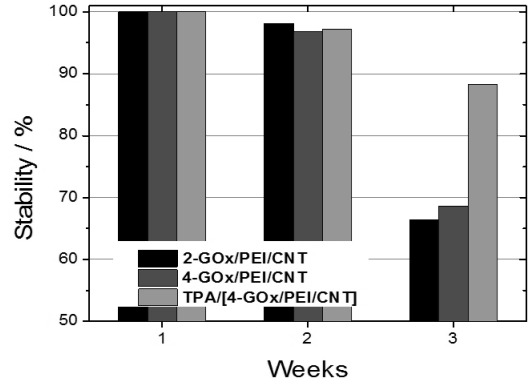


Fig. 8 Stability evaluations for 2-GOx/PEI/CNT, 4-GOx/PEI/CNT and GA/[4-GOx/PEI/CNT] during 3 weeks

다. 이는 앞서 효소분석과 CV 분석 결과와 일맥상통하는 결과이다.

3.3 안정성 평가

3주에 걸쳐 안정성 평가를 진행하였고 그 결과는 Fig. 8에 나타내었다. 2-GOx/PEI/CNT 전극의 경우 초기대비 66.4% 활동도를 유지하였으며, 4-GOx/PEI/CNT 전극은 68.6%를 유지하였다. 그러나 GA/[4-GOx/PEI/CNT]는 88.3%를 유지하여, GA 말단의 알데하이드기가 GOx 및 PEI의 아민기와 화학반응에 의하여 생성된 (O=C)-N 결합이 합성한 측매 내 GOx의 탈락을 방지하여 장기적 안정성에 기여함을 확인하였다.

4. 결론

본 연구에서는 정전기적 인력을 통한 물리적 흡착과 가교제를 통한 공유결합을 이용하여 GOx를 안정적으로 고정화한 글루코스 바이오센서를 제작하였다. CNT, PEI, GOx와 GA를 순차적으로 혼합하여 교반하는 단순한 과정으로 GOx를 고정하였다. 13.4 $\mu\text{A}/\text{mM}/\text{cm}^2$ 라는 높은 감도와 3 주간 약 88%의 안정성을 유지함을 확인하였다. GA를 이용한 고정화 방

법이 GOx가 담지체로부터 떨어져 나가는 것을 방지하며 센서의 감도를 향상시키기에 효과적인 방법임을 확인하였으며 또한 이를 이용한 전극이 체내 글루코스를 감지할 수 있는 바이오센서로서의 가능성이 있음을 확인했다.

후 기

이 연구는 2016년 서울과학기술대학교 교내 학술연구비 지원으로 수행되었습니다.

References

1. M. Chan, "World Health Day 2016: Let's beat diabetes", World Health Organization, <http://www.who.int/mediacentre/commentaries/diabetes/en/> (accessed May 4, 2016).
2. J. Wang, "Electrochemical Glucose Biosensors", *Chemical Reviews*, Vol. 108, 2008, pp. 814-825.
3. N. S. Oliver, C. Toumazou, A.E.G. Cass, and D.G. Johnston, "Glucose sensors: a review of current and emerging technology", *Diabetic Medicine*, Vol. 26, No. 3, 2009, pp. 197-210.
4. U. Hanefeld, L. Gardossi and E. Magner, "Understanding enzyme immobilisation", *Chemical Society Reviews*, Vol. 38, 2009, pp. 453-468.
5. R.A. Sheldon, "Characteristic Features and Biotechnological Applications of Cross-linked Enzyme Aggregates (CLEAs)", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 92, 2011, pp. 467-477.
6. K. H. Hyun, S. W. Han, W-G. Koh and Y. Kwon, "Fabrication of biofuel cell containing enzyme catalyst immobilized by layer-by-layer method", *Journal of Power Sources*, Vol. 286, 2015, pp. 197-203.
7. Y. Chung, K. Hyun and Y. Kwon, "Fabrication of biofuel cell improved by π -conjugated electron pathway effect induced from a new enzyme catalyst employing terephthalaldehyde", *Nanoscale*, Vol. 8, 2016, pp. 1161-1168.
8. "Enzymatic Assay of Glucose Oxidase", <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-glucose-oxidase.html> (accessed May 1, 2016).
9. Y. Chung, Y. Ahn, M. Christwardana, H. Kim and Y. Kwon, "Development of glucose oxidase-based biocatalyst adopting both physical entrapment and crosslinking and its use in biofuel cell", *Nanoscale*, Vol. 8, 2016, pp. 9201-9210.
10. P. Kavanagh and D. Leech, "Mediated electron transfer in glucose oxidising enzyme electrodes for application to biofuel cells: recent progress and perspectives", *Physical Chemistry Chemical Physics*, Vol. 15, no. 14, 2013, pp. 4859-4869.
11. C. Deng, J. Chen, X. Chen, C. Xiao, L. Nie and S. Yao, "Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on boron-doped carbon nanotubes modified electrode", *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 23, No. 8, 2008, pp. 1272-1277 (2008).
12. R. A. Kamin and G. S. Wilson, "Rotating ring-disk enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized enzyme layer", *Analytical Chemistry*, Vol. 52, No. 8, 1980, pp. 1198-1205.
13. G. Van den Berghe, "Insulin therapy in the intensive care unit should be targeted to maintain blood glucose between 4.4 mmol/l and 6.1 mmol/l", *Diabetologia*, Vol. 51, 2008, pp. 911-915.
14. Y. Liu, M. Wang, F. Zhao, Z. Xu and S. Dong, "The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix", *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 21, 2005, pp. 984-988.
15. H. Yang and Y. Zhu, "Glucose biosensor based on nano-SiO₂ and "unprotected" Pt nanoclusters", *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 22, No. 12, 2007, pp. 2989-2993.
16. J-J. Xu, and H-Y. Chen, "Amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized in electrochemically generated poly (ethacridine)", *Analytica Chimica Acta*, Vol. 423, No. 1, 2000, pp. 101-106.