

# 탄소나노튜브 전자 필름을 이용한 고감도-고선택성 전기화학 글루코스 센서

이승우<sup>†</sup> · 이동욱 · 서병관

서울과학기술대학교 정밀화학과  
(2022년 3월 7일 접수, 2022년 3월 15일 수정, 2022년 03월 15일 채택)

## Sensitive and Selective Electrochemical Glucose Biosensor Based on a Carbon Nanotube Electronic Film

Seung-Woo Lee<sup>†</sup>, Dongwook Lee and Byeong-Gwan Seo

Department of Fine Chemistry, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 01811, Republic of Korea  
(Received March 7, 2022; Revised March 15, 2022; Accepted March 15, 2022)

### 초 록

본 연구에서는 비파괴적 표면 기능기화 통하여 단일벽 탄소나노튜브(SWCNT) 탄소소재의 특성 변화를 최소화 시킬 수 있는 대면적화 공법을 제안하고, 대면적화 된 SWCNT 전자 필름 상에 효소를 집적하여 효소와 SWCNT 전자 필름 간 효율적 전자 전달을 연구하였다. p-terphenyl-4,4"-dithiol, dithiothreitol과 SWCNT의 혼합을 통해 SWCNT 전자 필름의 균일도 및 전하 전달 능력을 향상시키고, 분광학적 분석 및 전기화학적 특성을 평가하여 SWCNT 전자 필름의 향상된 전기화학적 특성을 확인하였다. 전자 필름 상에 고분자 전해질 및 포도당 산화환원 효소를 layer-by-layer 기법으로 효율적으로 집적하여, 최종적으로 음전압 범위에서 구동이 가능한 포도당(glucose) 바이오센서를 구현하였다. 개발된 포도당 바이오센서는 효소와 SWCNT 전자 필름과의 높은 전하 전달 효율을 바탕으로 -0.45 vs. Ag/AgCl 음전압 범위에서 높은 산화환원 신호를 보였을 뿐 아니라 0~1 mM의 낮은 글루코스 농도 변화에서 약 98  $\mu\text{A}/\text{mM} \cdot \text{cm}^2$ 의 높은 감도를 보였다. 또한 음전압 구동을 통하여, 산화 반응을 일으킬 수 있는 4종의 방해물질(요산, 아스코르빅산, 도파민, 아세타아미노펜) 환경에서 4% 이하의 변화를 보여 높은 선택성을 보였다.

### Abstract

This work presents a non-destructive and straightforward approach to assemble a large-scale conductive electronic film made of a pre-treated single-walled carbon nanotube (SWCNT) solution. For effective electron transfer between the immobilized enzyme and SWCNT electronic film, we optimized the pre-treatment step of SWCNT with p-terphenyl-4,4"-dithiol and dithiothreitol. Glucose oxidase (GOx, a model enzyme in this study) was immobilized on the SWCNT electronic film following the positively charged polyelectrolyte layer deposition. The glucose detection was realized through effective electron transfer between the immobilized GOx and SWCNT electronic film at the negative potential value (-0.45 V vs. Ag/AgCl). The SWCNT electronic film-based glucose biosensor exhibited a sensitivity of 98  $\mu\text{A}/\text{mM} \cdot \text{cm}^2$ . In addition, the SWCNT electronic film biosensor showed the excellent selectivity (less than 4 % change) against a variety of redox-active interfering substances, such as ascorbic acid, uric acid, dopamine, and acetaminophen, by avoiding co-oxidation of the interfering substances at the negative potential value.

**Keywords:** Glucose biosensor, Electrochemistry, Carbon nanotube, Glucose oxidase, Electron transfer

## 1. 서 론

효소기반 전기화학 측정 시스템이 고안된 1960년대 이후에 다양한 산화환원효소가 집적된 전기화학 센서 플랫폼이 제안되었다[1]. 전기화학 기반의 바이오센서는 전극상에 집적된 산화환원 효소를 감지물

질(Bioreceptor)로 이용하여 생체 물질과 효소 간의 기질 특이성 반응에 따라 형성된 생성물이 일정 전위에서 전기화학적 산화 환원 반응을 통해 전자를 주고받음으로써 생체물질의 농도를 정량 분석할 수 있는 시스템으로 1  $\text{cm}^2$  이하 전극으로 정량 분석이 가능하다[2].

초기 제안된 1세대(1<sup>st</sup> generation) 효소기반의 전기화학 측정시스템은 산화환원 효소의 산화환원 중심[Redox center, i.e, Flavin-adenine dinucleotide (FAD)]과 기질 간의 반응을 통해 화학양론적으로 비례하게 형성된  $\text{H}_2\text{O}_2$  부산물의 농도를 높은 과전압(Overpotential) 영역에서 측정하여 정량 분석을 진행하였다[3]. 하지만 1세대 바이오센서의 경우  $\text{H}_2\text{O}_2$  형성에 산소가 필요하고(산소 의존성 문제),  $\text{H}_2\text{O}_2$  산화를 위

<sup>†</sup> Corresponding Author: Seoul National University of Science and Technology  
Department of Fine Chemistry, Seoul 01811, Republic of Korea  
Tel: +82-02-970-6691 e-mail: swlee@seoultech.ac.kr

한 높은 과전압이 생체 시료 내에 존재하는 요산(Uric acid, UA)과 아스코르브산(Ascorbic acid, AA) 등의 방해물질의 표준환원전위보다 더 높기 때문에 방해물질의 산화 반응도 동시에 유발하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 산화전류에 영향을 주는 선택성 문제가 발생되었다[1,3]. 따라서, 낮은 선택성 문제를 해결하기 위해 산화환원 매개체(Redox mediator)를 사용하여 기질 농도에 따른 효소의 산화환원 상태 변화를 매개체를 통해 간접적으로 측정함으로써 과전압을 낮추어 선택성을 높이고 산소 의존성 문제를 해결할 수 있는 2세대(2<sup>nd</sup> generation) 바이오센서가 제안되었으며[3,4], 현재 상용 글루코스 센서시장의 대부분이 2세대 바이오센서 시스템을 이용하고 있다. 2세대 바이오센서 시스템의 유용성에도 불구하고 침습적 시료 채취 과정이 요구된다는 점에서 비침습적 측정이 가능한 웨어러블 형태의 바이오센서 시스템의 요구와 관심이 증대되고 있다. 하지만 2세대 바이오센서 시스템에서 산화환원 매개체로 사용되는 물질의 화학적 독성 문제로 인하여 인체에 부착하는 웨어러블 디바이스에 적용에는 한계가 있을 뿐 아니라[4,5], 땀 등의 타액 내에서는 기질의 농도가 타 방해 물질 농도에 비해 상대적으로 낮기 때문에 수십에서 수백 마이크로몰 영역에서 높은 감도 및 선택성이 요구된다. 이러한 요구를 충족하기 위해 효소의 산화환원 상태를 산화환원 매개체 없이 음전압 범위에서 구동하는 3세대 바이오센서 시스템이 주목 받고 있다[5,6].

산화환원 매개체 없이 효소와의 직접적 전자 전달을 통한 산화 환원 반응을 이용하는 3세대 바이오센서는 효소의 산화환원 중심의 표준환원 전위가  $-0.3 \text{ V} < \text{Ag/AgCl}$  이하므로 형성되기 때문에 양전압 범위에서 산화-환원을 갖는 방해 물질의 영향을 최소화시켜 높은 선택성을 구현할 수 있을 뿐 아니라[7,8], 효소의 산화환원 반응을 직접적으로 모니터링하기 때문에 낮은 기질 농도에서도 높은 감도를 확보할 수 있다. 비전도성 glycoprotein으로 둘러싸여 있는 효소의 산화환원 중심과 전자 전달을 구현하기 위해서는 효소와 aspect ratio가 비슷하면서 전기화학적 안정성 및 높은 전자 전달 능력을 갖는 전도성 나노소재의 사용이 필수적이나[9], 소수성이 강한 나노 입자를 이용하여 전극소재를 형성하여야 하기 때문에 높은 재현성 및 소재 균일성 확보가 문제가 되고 있다[10]. 따라서 효율적 3세대 효소기반 바이오센서 시스템을 구현하기 위해서는 (1) 전도성 나노 소재의 물성 저하 없이 효소와 전자전달이 가능한 대면적 소재의 형성과 (2) 효소와의 높은 전자 전달을 가질 수 있는 환경 제공이 필수로 요구된다[11].

본 연구에서는 효소와 비슷한 aspect ratio를 가지면서 높은 전자 전달 효율을 제공할 수 있는 single-walled carbon nanotube (SWNT)의 비파괴적 표면 처리를 통하여 대면적 전극 소재를 형성하고 SWNT 전자 필름 상에 효소를 효율적으로 집적하여 음전압 범위에서 높은 선택성 및 마이크로 농도의 범위의 높은 감도를 갖는 글루코스 바이오센서로서의 응용 가능성을 탐색하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 기기

SWNT는 Nanointegris (USA)에서 SuperPureTube™을 구매하여 2% sodium cholate (SC, Sigma Aldrich, USA)에 약 3일간의 용매 교환(buffer exchange)을 시행하여 불순물을 제거한 후 사용하였다. Glucose oxidase (GOx), p-Terphenyl-4,4'-dithiol (TPD), 1,4-Dithiothreitol (DTT), ascorbic acid (AA), uric acid (UA), acetaminophen (AP), dopamine hydrochloride (DA), ferricyanide, ferrocyanide, phosphate buffer saline (PBS), glucose 등의 시약은 Sigma Aldrich에서 구매하였다. 투석 공정을 위한 투석 멤브레인은 Spectra/Por (USA)를 사용하였으며, 전기화학 전극은 Metrohm DroSens사의 250BT gold screen printed electrode (Au SPE, Spain)를 사용하였다. 본 연구에서 진행된 전기화학 분석은 Princeton applied research (USA)의 Versastat 3를 이용하였으며, 전기적 특성 측정은 HP 4156B (USA)를 사용하였다.

### 2.2. 대면적 SWNT 전자 소재 합성

30 mg TPD (10 mM)를 10 ml의 2% SC 용액에 tip sonication을 통하여 30분간 8회 분산하고, 150 mg의 DTT (100 mM)을 TPD 용액에 추가하여 24시간 교반하였다. 24시간 교반후 PTFE (0.2 μm pore, Millipore, USA) 필터를 통하여 분산되지 않은 TPD를 제거하였다. Buffer exchange 공정을 통하여 불순물이 제거된 SWNT (25 mg/100 ml in 2% SC) 1 ml를 9 ml의 TPD-DTT (in 2% SC) 용액과 배합하여 약 24시간 교반을 통해 SWNT의 표면 기능기화를 진행하였다. 이후 10 ml의 SWNT/TPD-DTT 혼합용액을 투석 멤브레인에 주입하고 de-ionized (DI) water를 대상으로 24시간 투석을 진행하였다(Figure 1). 투석공정 후에 멤브레인 내측에 형성된 SWNT 전자소재를 조심스럽게 꺼내 plant petridish (SPL life science, Korea)에 보관하였다. 제작

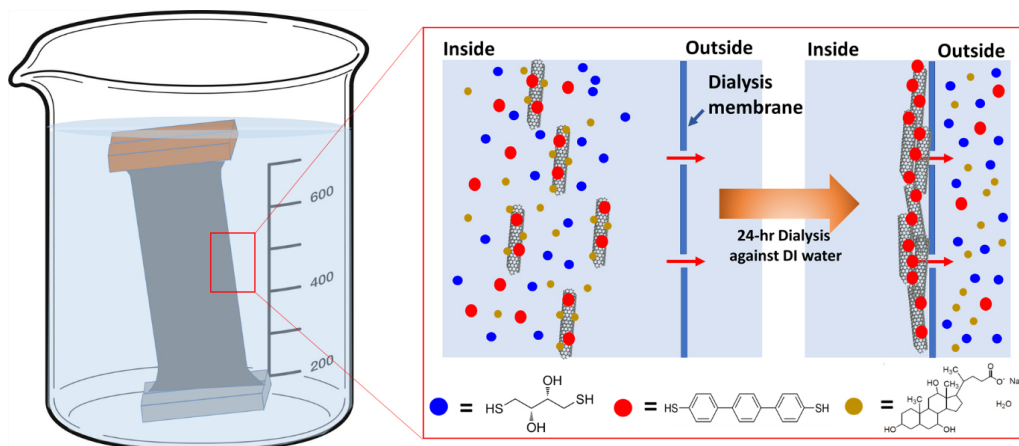
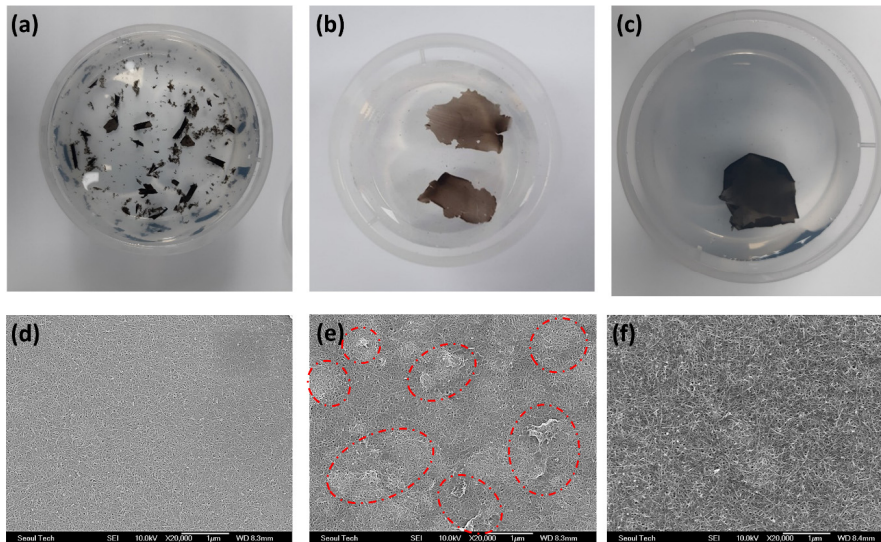


Figure 1. Schematic illustration describing the dialysis process used in this study. Highly concentrated surfactants (2% SC) produced the concentration polarization against DI water placed outside the dialysis membrane. After 24 h of dialysis, the surfactant and non-binding TPD and DTT were dialyzed while the SWNTs bigger than dialysis pore were accumulated at the inner wall of the membrane.



**Figure 2.** Optical (a, b, c) and SEM (d, e, f) images of three SWNT electronic films as a result of the dialysis process of three different solutions, specifically (a, d) pure SWNT, (b, e) SWNT/TPD solution, and (c, f) SWNT/TPD-DTT solution.

된 SWNT 대면적 전자소재의 UV-Vis 특성평가는 quartz glass (1 cm<sup>2</sup>) 상에 SWNT 필름을 집적하여, Biotek  $\mu$ Quant (USA)를 사용하여 200 nm~800 nm 영역에서 1 nm step으로 측정하였으며, Raman 측정은 동일한 방법으로 silicon wafer (1 cm<sup>2</sup>) 상에 SWNT 필름을 집적하여 Dimension-P1(USA)을 사용하여 진행하였다.

### 2.3. SWNT 전자 필름 전사 및 글루코스 센서 제작

제작된 대면적 SWNT 전자 필름을 250 BT의 작업전극(working electrode, WE)상에 국부적으로 집적하기 위해 스텐실 공법을 사용하였다. 금 작업전극과 동일한 크기(0.12 cm<sup>2</sup>)의 Via hole을 가지고 있는 스텐실 마스크를 250 BT 전극상에 3M 테이프를 이용하여 고정화하고, 스텐실 마스크 상부에 제작된 SWNT 전자 필름을 가위로 잘라 집적하였다. 집적 후 약 5분간의 건조 과정을 거치고 효율적 전자전달 및 이온친화성 계면을 제공하기 위해 5  $\mu$ L의 1% polyethyleneimine 용액을 적하하고 건조시켰다. 양전하성 고분자 전해질 도포 후 20  $\mu$ L의 효소 용액(50 mg/ml GOx)을 적하하고, 12시간 동안 4  $^{\circ}$ C 냉장고에서 고정화 공정을 진행하였다. 센서 제작 후에 스텐실 마스크를 제거하고 10 mM PBS 용액으로 3회 세척한 후 전기화학 측정을 진행하였다.

### 2.4. 글루코스 바이오센서의 측정

GOx가 집적된 SWNT 필름 기반 바이오센서의 성능 평가를 위하여 10 mM PBS를 기본 전해질로 사용하여 다양한 농도의 글루코스 조건 및 방해물질의 존재 여부에 따른 감도 및 선택성을 측정하였다. Cyclic voltammetry (CV), chronoamperometry (CA) 및 electrochemical impedance spectroscopy (EIS)를 통해 전극 특성을 평가하였으며, CV 측정은 200 mV/s의 주사 속도로 진행하였고 CA 측정은 분석용액 주입 후 1분의 안정화 후에 10초간 일정 전압에서 진행하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 대면적 SWNT 전자 필름 형성

TPD-DTT (in 2% SC)와의 24시간 교반을 통해 기능기화 된 SWNT

를 DI water를 대상으로 24시간 투석 공정을 진행하였다. DI water는 투석시작 3시간, 6시간, 9시간 후에 각각 새로운 DI water로 교체하여 투석 공정의 효율을 증대시켰다. 고농도의 계면활성액(2% SC)과 혼합된 TPD/DTT-treated SWNT는 투석 멤브레인 외부의 DI water간의 농도 차이로 인하여[12], 투석 공정 중에 멤브레인 내측 벽면으로 이동하고, SC와 더불어 SWNT와 강하게 결합되지 않고 있던 DTT는 투석 공정을 통하여 멤브레인 바깥으로 나오게 된다(Figure 1, inset). 이때 멤브레인 기공(6-8 KDa)보다 큰 TPD 처리된 SWNT 입자는 멤브레인을 투과하지 못하고 투석 멤브레인 내측에 집적된다[13]. 투석공정을 통하여 Figure 2(c)와 같이 대면적 SWNT 필름이 형성되었다. 대조군으로 TPD-DTT 처리가 되지 않은 Pure SWNT 용액과 DTT 없이 TPD용액으로만 처리된 TPD-SWNT 용액을 기 보고된 연구 기법과 동일하게 진행하였다[13]. Pure SWNT 용액을 이용하여 투석을 진행하였을 때 Figure 2(a)와 같이 대면적 SWNT 전자 필름이 형성되지 않았다. 이는 concentration polarization을 통해 멤브레인 내부 벽에 집적된 SWNT가 인접한 SWNT 간의 약한  $\pi$ - $\pi$  interaction이 유일한 결합력으로 작용하기 때문으로[14], 이로 인해 대면적 SWNT 전자 필름 형성이 되지 않았다. 이와는 대조적으로 TPD 처리를 진행한 SWNT의 경우 투석 공정 후에 Figure 2(b)와 같이 대면적 전자 필름이 성공적으로 형성되었음을 알 수 있었다. 이는 이전 연구에서 보고된 것처럼 TPD 처리가 된 SWNT의 투석공정시  $\pi$ - $\pi$  interaction과 더불어 SWNT상에 비파괴적으로 기능기화 된 TPD의 thiol 기능기간의 공유 결합을 통해  $\pi$ - $\pi$  interaction과 더불어 추가적인 glue effect가 적용되었기 때문이다. 하지만 DTT 없이 TPD 기능기화 된 SWNT 전자 필름의 경우 Figure 2(e)의 scanning electron microscopy (SEM) 이미지에서 빨강 점선 원으로 표시된 부분과 같이 TPD 입자 간의 뭉침 현상으로 인하여 표면에 유기 물질로 형성된 비전도성 필름 형성이 관찰되었다. TPD-DTT 용액을 통하여 SWNT를 기능기화 한 후 투석공정을 진행하였을 때 Figure 2(c)와 같이 성공적으로 대면적화가 진행될 뿐만 아니라, Figure 2(f)와 같이 SWNT 전자 필름 표면에서 비전도성 유기물 층이 형성되지 않았음을 확인할 수 있었다. 이는 과량의 DTT가 TPD와 공존 시에 TPD 분자 간의 disulfide 결합을 환원시켜 TPD 분자 간의 뭉침현상을 방지하여 균일한 SWNT 전자 필름을 형

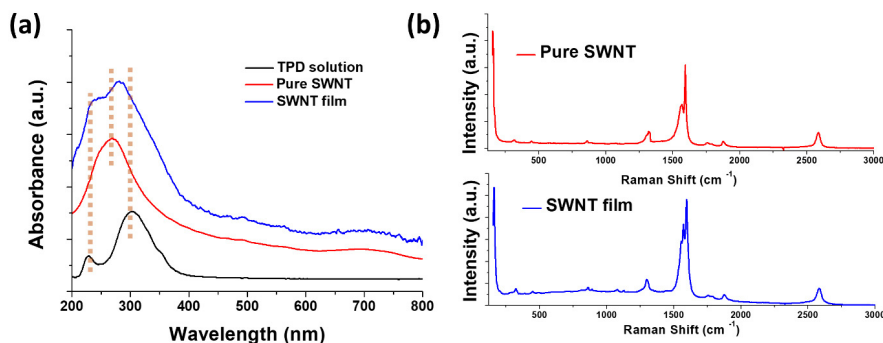


Figure 3. Spectroscopic analysis of SWNT film. (a) UV-Vis spectroscopic analysis of TPD solution (black), pure SWNT (red), and SWNT film (blue). (b) Raman comparison between pure SWNT and SWNT film.

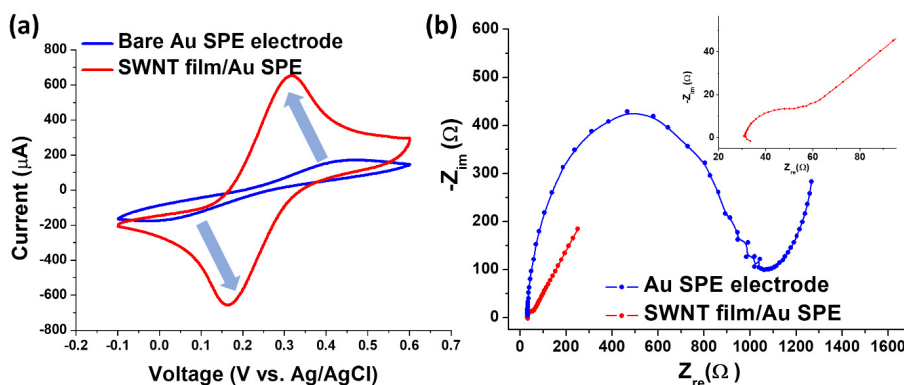


Figure 4. Electrochemical measurements before and after the deposition of SWNT electronic film. (a) CV measurements in 10 mM potassium ferro/ferricyanide solution on a bare Au SPE electrode (blue) and a SWNT/Au electrode (red). (b) EIS measurements in 10 mM potassium ferro/ferricyanide solution on a bare Au SPE electrode (blue) and a SWNT/Au electrode (red) (Inset showing the magnified version of the red EIS plot).

성할 수 있게 한 것으로 생각된다[15]. 제작된 SWNT 필름을 quartz 글라스 상에 집적한 후 흡광도를 UV-Vis spectroscopy로 분석한 결과, Figure 3(a)에서 점선으로 표시된 바와 같이 TPD 분자의 흡광 파장인 220~240 nm와 310~340 nm 부분의 흡광 밴드가 SWNT 필름상에서도 관찰되었으며, 이는 SWNT 전자 필름상에 TPD 분자가 비파괴적으로 어셈블리 되었음을 의미한다(Figure 3a). 또한 Raman spectroscopy 분석을 통하여 pure SWNT에서 관찰되는 D peak ( $1290\text{ cm}^{-1}$ ), G<sup>+</sup> peak ( $1570\text{ cm}^{-1}$ ) 및 G<sup>-</sup> peak ( $1590\text{ cm}^{-1}$ )가 SWNT 전자 필름에서도 동일하게 관찰되었으며(Figure 3b), 이는 본 연구에서 사용되는 투석기반의 대면적화 공법이 탄소나노소재의 구조적 특성을 크게 변화시키지 않는 non-destructive assembly 임을 보여준다[16].

### 3.2. SWNT 전자 필름의 전기 화학적 특성 평가

상기 투석 공법을 통해 비파괴적으로 합성된 탄소나노소재 전자 필름의 전기화학적 특성 평가를 위하여 제작된 전자필름을 스텐실 마스크 공법을 통하여 금 작업전극 상에 국부적으로 집적하고, 상용 250 BT 금전극을 대조군으로 하여 전자필름 집적 전/후의 전기화학적 특성을 비교하였다(Figure 4a). 10 mM ferro/ferricyanide 용액을 각 전극에 균일하게 500  $\mu\text{L}$ 를 적하한 후 -0.1 ~ 0.6 V 사이에서 CV 분석을 진행하였다. SWNT 전자필름이 집적되지 않은 bare Au SPE 전극의 경우, 산화 peak 전류가 약 0.467 V vs. Ag/AgCl에서 확인되었으며, 환원 peak 전류는 약 -0.026 V vs. Ag/AgCl에서 확인되었다. 이와는 대조적

으로, SWNT 전자 필름이 집적된 Au SPE 전극의 경우 전기화학적 활성이 증대[i.e., 전하전달저항( $R_{ct}$ ) 감소] 됨에 따라,  $E^0$  (= 0.24 V vs. Ag/AgCl) 대비 과전압(Overpotential)이 약 140 mV 감소(64% 감소)된 0.316 V와 0.152 V vs. Ag/AgCl에서 peak current에 도달할 수 있었다. 또한 전자 필름 집적 시 동일한 농도의 산화환원 용액에서 산화환원 peak 전류가 약 170  $\mu\text{A}$ 에서 약 650  $\mu\text{A}$ 로 280 % 증가함을 확인하였다. EIS 측정(Figure 4b)에서도 SWNT 집적 후 전하전달 저항은( $R_{ct}$ ) 크게 감소하였으며 전극 표면의 electrical double layer capacitance ( $C_{EDL}$ )도 3.18  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ 에서 254  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ 로 증가한 것으로 보아 SWNT 필름 집적을 통해 전극의 전기화학적 활성이 증가하였을 뿐 아니라, 높은 비표면적을 갖는 탄소나노소재 사용을 통해 전극 유효 면적이 크게 증가하여 전기화학적 성능이 향상되었다고 사료된다[18].

### 3.3. 효소와의 전하 전달 특성 분석

SWNT 전자 필름 상에 SWNT와 효율적 물리적 결합을 제공할 수 있는 양전하성 고분자 전해질 층을 형성한 후 음전하성 GOx 효소의 집적을 진행하였다. GOx 효소가 집적된 SWNT 필름과 효소 고정화 이전의 SWNT 필름의 UV-Vis spectra 교차 비교를 진행한 결과 효소 고정화 진행한 필름에서 약 280와 377 및 458 nm 영역에서 추가적 흡광 밴드가 확인되었다(Figure 5a, brown dotted line). 강한 280 nm 영역의 흡광은 PEI 및 GOx에서 기인한 아민 기능기의 흡광 밴드이며, 377 및 458 nm 영역에서 보이는 흡광 밴드는 GOx moiety의 특징적

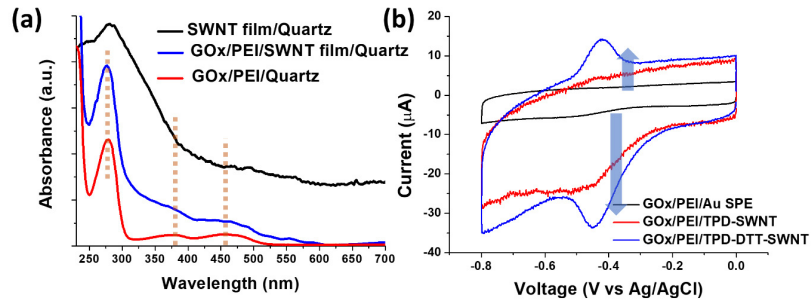


Figure 5. Characterization after enzyme immobilization. (a) UV-Vis measurement before and after enzyme immobilization. Brown dotted lines indicate the signature peaks of GOx. (b) CV measurements showing the redox peak of the enzyme's cofactor (FAD/FADH<sub>2</sub>) on various substrates.

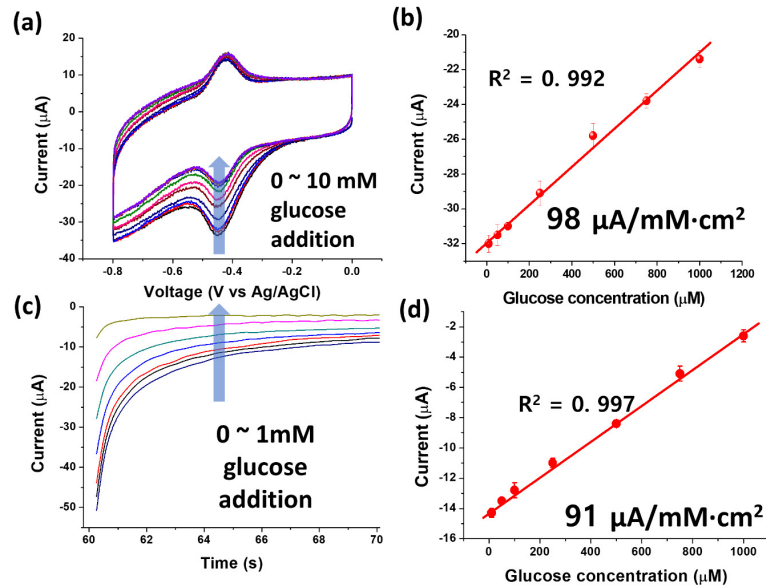
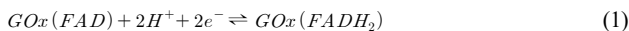


Figure 6. Electrochemical characterization of glucose biosensors. (a) A series of CV responses upon the addition of glucose with various concentrations. (b) Current changes at -0.45 V vs. Ag/AgCl upon the glucose addition with different concentrations. (c) A series of CA responses upon the addition of glucose with different concentrations. (d) Current changes after injection of various glucose concentrations.

흡광 밴드로 PEI 및 GOx가 SWNT 소재 상에 효율적으로 고정화 되었음을 보여준다[19]. 또한 고정화 전후의 흡광 밴드 shift는 2 nm 이하로 확인되었기에 효소의 conformational change가 최소화되었다고 사료된다. 이러한 효율적 효소 paring은 전기화학적 분석에서도 확인되었다(Figure 5b). GOx 효소를 SWNT/TPD-DTT 용액을 기반으로 형성된 전자 필름상에 고정화하였을 때, CV 분석에서 약 -440 mV vs. Ag/AgCl 영역에서 높은 산화환원 전류가 형성되었다. 이는 식 1과 같이 전극 표면에 집적된 효소의 FAD/FADH<sub>2</sub> 산화환원 쌍(redox couple)에서 형성되는 신호로써, 집적된 효소와 SWNT 전자 필름이 근접 거리에서 효율적 전자 전달이 이루어지고 있음을 보여준다.



하지만 대조군 실험에서는 금 전극상에 동일한 효소 집적 공법을 통하여 효소를 집적하였으나 FAD/FADH<sub>2</sub> 산화환원 전류를 확인할 수 없었으며, 또한 SWNT/TPD 용액만으로 형성된 SWNT 전자 필름 상에서는 SWNT 집적으로 인해 증가된 표면적으로 인해 충전 전류의 증가는 확인되었지만, 효소 내FAD/FADH<sub>2</sub> 기인한 산화환원 전류는

SWNT/TPD-DTT 전자필름에 비하여 약하게 발생되었다. 효율적 전자 주고받음을 갖는 효소의 집적도( $\Gamma = Q/nFA$ ,  $Q =$  전하량,  $n =$  산화환원 전자수,  $F =$  Faraday constant,  $A =$  전극 면적)을 계산하였을 때 [20], SWNT/TPD-DTT 용액으로 합성된 전자필름상의 효소 농도는 약  $3.5 \times 10^{-9}$  mol/cm<sup>2</sup>로 SWNT/TPD 필름 상에 집적된 효소의 농도보다 약 2.1배 정도 높게 나타났다. SWNT/TPD로 형성된 전자필름 상에서의 낮은 전자 전달 효율은 앞에서 설명한 바와 같이 DTT 없이 TPD 기반의 SWNT 필름을 형성하였을 때 전자 필름상에 비 전도성 TPD 막이 형성됨에 따라, 효소의 산화 환원 중심과 전하 전달 거리를 증가시키고, 이에 따라 효소와 전극 간의 전자 투과 효율이 감소하기 때문으로 사료된다.

#### 3.4. 글루코스 바이오센서의 특성 평가

GOx/PEI/SWNT 센서 전극의 전기화학적 특성 분석을 진행하였다. 다양한 농도의 글루코스 용액을 주입하고 -0.8 V ~ 0.0 V vs. Ag/AgCl 범위에서 200 mV/s의 주사속도로 전위를 인가하여 전극의 반응성을 측정하였다. Figure 6(a)에서 보이는 바와 같이 글루코스 농도가 증가함에 따라 환원전류의 감소가 확인되었다. 환원 전류의 감소는 GOx

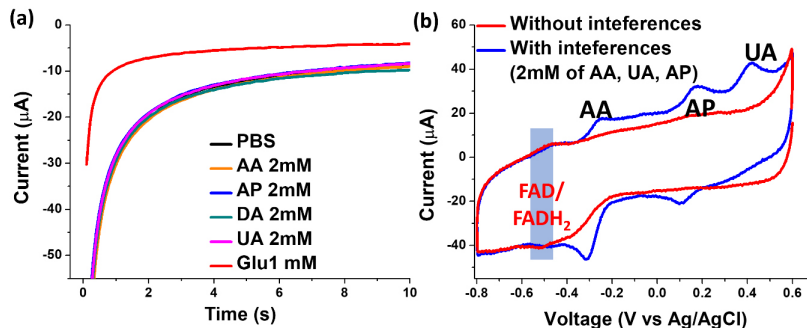
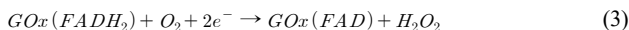


Figure 7. Electrochemical characterization with various interfering substances. (a) CA measurements with various interfering substances such as AA, AP, DA, and UA. (b) CV measurement with/without interfering substances of AA, AP, and UA.

내 산화환원 효소인 FAD moiety가 식 2와 같이 글루코스 분자를 산화시키면서 FAD는 FADH<sub>2</sub>로 환원되기 때문에 전극에서 일어나는 전기화학적 환원 전류가 감소하며, 또한 식 3과 같이 글루코스 산화반응으로 인해 형성된 FADH<sub>2</sub>가 2-electron oxygen reduction을 통하여 용존 산소를 사용함으로써 전극에서 직접적으로 일어나는 oxygen reduction reaction (ORR)이 감소하기 때문이다[5,6,10].



이러한 두 가지 요인으로 인하여 Figure 6(b)에서 보이는 바와 같이 글루코스 농도 증가 시 환원전류는 0~1 mM 영역에서 선형적으로 감소한다( $R^2 = 0.992$ ). 사람의 땀 등의 체액 내의 글루코스 표준 농도는 건강한 환자 기준으로 약 100~200  $\mu\text{M}$  농도로 존재하며, 당뇨 환자의 경우 땀 내의 글루코스 농도가 500~1000  $\mu\text{M}$  농도로 증가하기 때문에 개발된 센서의 98  $\mu\text{A}/\text{mM} \cdot \text{cm}^2$ 의 감도는 sub-millimolar 영역의 글루코스의 변화를 효율적으로 감지할 수 있을 것이라 사료된다. 또한 개발된 전극의 Michaelis Menten constant ( $K_m$ )는 약 665  $\mu\text{M}$ 로 계산되었으며 이는 효소와 기질간의 높은 친화력을 바탕으로 낮은 농도에서도 높은 전하 전달 효율을 보임으로써 웨어러블 바이오센서로 응용 시에 sub-millimolar 영역에서 높은 감도를 보일 수 있다고 생각된다. 상용화된 glucometer의 구동은 샘플 주입 후에 정전압을 일정 시간 인가하여 전류의 변화를 모니터링 하는 chronoamperometry (CA) 기반으로 구동된다[21]. 따라서 본 연구에서 개발된 센서에 FAD/FADH<sub>2</sub>의 최대 환원 전류를 보이는 -0.45 V vs. Ag/AgCl 전압을 약 10초간 인가하여 CA 측정을 진행하였다(Figure 6c). CV 측정 결과와 비슷하게 CA 측정에서도 땀 등의 생체 시료 내 글루코스 농도 범위인 0~1 mM까지 증가시켰을 때 전류가 선형적으로 증가( $R^2 = 0.997$ )하였으며, CA 모드로 측정된 글루코스 센서의 감도는 약 91  $\mu\text{A}/\text{mM} \cdot \text{cm}^2$ 로 확인되었다(Figure 6d).

서론에서 언급하였듯이 3세대 바이오센서의 가장 큰 장점은 집적된 효소와 나노전극 소재 간 효율적 전하 전달을 바탕으로 낮은 농도에서 높은 신호 변화를 보일 뿐 아니라, 음 전압 범위에서의 구동을 통하여 생체 시료 내에 존재하는 다양한 산화환원 방해 물질의 co-oxidation을 방지함으로써 높은 선택성을 확보할 수 있다는 점이다. 개발된 전극의 선택성 분석을 위해 최대 구동 농도 범위보다 2배 높은 2 mM의 다양한 방해 물질을 각각 주입하고 CA 분석을 진행하였다(Figure 7a). 1 mM 글루코스 주입 시에 10 mM PBS에서 측정된 기준 신호보다 약 58%의 전류 변화를 보이는 것에 반해, 2 mM의 UA, AA,

AP (Acetaminophen), DA (dopamine) 주입 시에 전류의 변화는 기준 신호 대비 약 2~4%의 전류 변화만을 보임으로서 높은 선택성을 가진다고 할 수 있다. Figure 7(b)에서 보이는 바와 같이 방해물질이 약 0.2~0.6 V vs. Ag/AgCl 영역에서 높은 산화 반응을 야기하더라도, 본 시스템은 -0.45 V vs. Ag/AgCl 이하 범위에서 작동하기 때문에 방해물질의 산화/환원 반응 존재 하에서도 FAD/FADH<sub>2</sub>의 산화 환원 신호 변화는 미미하며, 따라서 측정하고자 하는 물질보다 상대적으로 높은 농도의 방해물질 환경에서도 높은 선택성을 가지고 구동이 가능하고 할 수 있다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 TPD와 DTT 혼합용액을 이용하여 SWNT의 기능기화를 진행한 후, 투석공정을 통하여 대면적 SWNT 전자 필름을 제작하였다. 합성된 전자필름은 TPD용액으로만 처리된 SWNT 기반 전자 필름과 비교하여 집적된 효소의 전자 직접 주고받음 효율을 확인하였다. TPD-DTT 혼합용액으로 처리된 SWNT 전자 필름 상에서의 효소와 전극간의 전자 직접 주고받음 효율은 TPD로만 처리된 SWNT 전자 필름보다 약 2.1배의 높은 전하 전달 효율을 보였을 뿐만 아니라, sub-millimolar 영역에서 98  $\mu\text{A}/\text{mM} \cdot \text{cm}^2$ 의 높은 감도를 보였다. 또한 -0.45 V vs. Ag/AgCl 범위의 음 전압 영역에서의 센서 구동을 통하여, 분석물질 보다 상대적으로 높은 방해물질의 존재 하에서도 약 4% 이하의 변화율을 보임으로서 높은 선택성을 확인하였다. 개발된 전자 소재의 대면적화 가능성 및 높은 감도와 선택성을 바탕으로 본 시스템은 효소기반 바이오 연료 전지 전극 소재 및 낮은 농도에서 높은 감도 및 선택성을 필요로 하는 웨어러블 센서 소재로서의 발전이 가능할 것이라 사료된다.

## 감 사

본 성과는 2020년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구이다 (NRF-2020R1C1C1005743).

## References

1. J. Wang, Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges, *Electroanalysis*, **13**, 983-988 (2001).
2. N. J. Ronkainen, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, Electrochemical biosensors, *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 1747-1763 (2010).

3. C. Jang, H. J. Lee, and J. G. Yook, Radio-frequency biosensors for real-time and continuous glucose detection, *Sensors*, **21**, 1843 (2021).
4. M. Hatada, N. Loew, Y. Inose-Takahashi, J. Okuda-Shimazaki, W. Tsugawa, A. Mulchandani, and K. Sode, Development of a glucose sensor employing quick and easy modification method with mediator for altering electron acceptor preference, *Bioelectrochemistry*, **121**, 185-190 (2018).
5. Y. X. Liu, J. Zhang, Y. Cheng, and S. P. Jiang, Effect of carbon nanotubes on direct electron transfer and electrocatalytic activity of immobilized glucose oxidase, *ACS Omega*, **3**, 667-676 (2018).
6. Z. Y. Yin, Z. W. Ji, W. D. Zhang, E. W. Taylor, X. P. Zeng, and J. J. Wei, The glucose effect on direct electrochemistry and electron transfer reaction of glucose oxidase entrapped in a carbon nanotube-Polymer Matrix, *ChemistrySelect*, **5**, 12224-12231 (2020).
7. Y. Y. Yu, Z. G. Chen, S. J. He, B. B. Zhang, X. C. Li, and M. C. Yao, Direct electron transfer of glucose oxidase and biosensing for glucose based on PDDA-capped gold nanoparticle modified graphene/multi-walled carbon nanotubes electrode, *Biosens. Bioelectron.*, **52**, 147-152 (2014).
8. B. Liang, X.S. Guo, L. Fang, Y.C. Hu, G. Yang, Q. Zhu, J. W. Wei, and X.S. Ye, Study of direct electron transfer and enzyme activity of glucose oxidase on graphene surface, *Electrochem. Commun.*, **50**, 1-5 (2015).
9. J. T. Holland, C. Lau, S. Brozik, and P. Atanassov, S. Banta, Engineering of glucose oxidase for direct electron transfer via site-specific gold nanoparticle conjugation, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 19262-19265 (2011).
10. X. P. Zhang, D. Liu, L. B. Li, and T. Y. You, Direct electrochemistry of glucose oxidase on novel free-standing nitrogen-doped carbon nanospheres@carbon nanofibers composite film, *Sci. Rep.*, **5**, 9885 (2015).
11. S. Y. Yu, and N. V. Myung, Recent advances in the direct electron transfer-enabled enzymatic fuel cells, *Front. Chem.*, **8** (2021).
12. P. May, S. Laghmari, and M. Ulbricht, Concentration polarization enabled reactive coating of nanofiltration membranes with zwitterionic hydrogel, *Membranes*, **11** 187 (2021).
13. D. Lee, H.-H. Ahn, B.-G. Seo, and S.-W. Lee, Highly sensitive and selective enzymatic detection for hydrogen peroxide using a non-destructively assembled single-walled carbon nanotube film, *J. Sens. Sci. Technol.*, **30**, 229-235 (2021).
14. E. M. Perez, and N. Martin,  $\pi-\pi$  interactions in carbon nanostructures, *Chem. Soc. Rev.*, **44**, 6425-6433 (2015).
15. X. Li, Y. F. Gao, and M. J. Serpe, Reductant-responsive poly(N-isopropylacrylamide) microgels and microgel-based optical materials, *Can. J. Chem.*, **93**, 685-689 (2015).
16. Y. S. Park, K. P. S. S. Hembram, R. Yoo, B. G. Jang, W. Y. Lee, S.-G. Lee, J.-G. Kim, Y.-I. Kim, D.J. Moon, J.-K. Lee, and J.-K. Lee, Reinterpretation of single-wall carbon nanotubes by raman spectroscopy, *J. Phys. Chem. C*, **123**, 14003-14009 (2019).
17. Y. Z. Niu, J. L. He, Y. L. Li, Y. L. Zhao, C. Y. Xia, G. L. Yuan, L. Zhang, Y. C. Zhang, and C. Yu, Determination of alpha 2,3-sialylated glycans in human serum using a glassy carbon electrode modified with carboxylated multiwalled carbon nanotubes, a poly-amidoamine dendrimer, and a glycan-recognizing lectin from *Maaackia Amurensis*, *Microchim. Acta.*, **183**, 2337-2344 (2016).
18. L. Wei, and G. Yushin, Nanostructured activated carbons from natural precursors for electrical double layer capacitors, *Nano Energy*, **1**, 552-565 (2012).
19. J. Galban, V. Sanz, E. Mateos, I. Sanz-Vicente, A. Delgado-Camon, and S. de Marcos, Reagentless optical biosensors for organic compounds based on autoindicating proteins, *Protein Pept. Lett.*, **15**, 772-778 (2008).
20. A. Devadoss, R. Forsyth, R. Bigham, H. Abbasi, M. Ali, Z. Tehrani, Y. F. Liu, and O. J. Guy, Ultrathin functional polymer modified graphene for enhanced enzymatic electrochemical sensing, *Biosensors*, **9**, 16 (2019).
21. A. Nemiroski, D.C. Christodouleas, J. W. Hennek, A. A. Kumar, E. J. Maxwell, M. T. Fernandez-Abedul, and G. M. Whitesides, Universal mobile electrochemical detector designed for use in resource-limited applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **111**, 11984-11989 (2014).

#### Authors

- Seung-Woo Lee; Ph.D., Assistant Professor, Department of Fine Chemistry, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 01811, Republic of Korea; swlee@seoultech.ac.kr
- Dongwook Lee; B.Sc., Master Student, Department of Fine Chemistry, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 01811, Republic of Korea; 10ehddnr@naver.com
- Byeong-Gwan Seo; B.Sc., Master Student, Department of Fine Chemistry, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 01811, Republic of Korea; tdg04045@naver.com