

## 탄소나노관을 리용한 포도당수소떼기효소고정화전극의 직접전자전달특성에 대한 연구

문충혁, 이정심

포도당정량은 보건부분과 식료공업에서 필수적인 문제로 제기되며 효소수감기에 의한 포도당정량방법은 가장 효율적이고 신속정확한 방법으로 되고있다.

최근 효소수감기에 대한 연구는 효소와 전극사이의 직접전자전달에 기초한 3세대 효소수감기를 개발[2]하기 위한 방향에서 진행되고있는데 포도당산화효소(GOD)나 포도당수소떼기효소(GDH)를 여러가지 나노물질들과 결합시켜 고정화함으로써 감도가 높은 3세대 포도당수감기를 연구[1, 4]하고있다. 최근에는 포도당수감효소로서 선택성과 열안정성이 높고 산소의 영향을 받지 않는 *Aspergillus oryzae*기원의 GDH를 많이 리용[4]하고있다.

우리는 탄소나노관(CNT)으로 수식한 불소도포산화석투명전도성유리(FTO유리)전극우에 고정화한 GDH전극의 직접전자전달특성을 검토하였다.

### 재료와 방법

포도당수소떼기효소(GDH, EC 1.1.99.10)는 *A. oryzae* 39로부터 분리정제[4]한것(10U/mg)을 리용하였다. 포도당, KCl, HNO<sub>3</sub>, HCl, 디메틸포름아미드(DMF), 에틸알콜(96%), 기타 화학시약들은 분석순이다. FTO유리전극(《 Pilkington 》, 0.49cm<sup>2</sup>), CNT(《려명기술사》, 직경 30~50nm, 길이 5~7μm, 순도 98%)를 리용하였다.

기구로는 분광광도계(《752N》), 폴라로그래프(《PA-2》), 초음파분산기(《FDL-250s》)를 리용하였다.

유리형GDH와 고정화GDH의 활성은 선행연구방법[4]에 따라 측정하였다.

GDH고정화전극은 선행연구방법[2]에 준하여 다음의 방법으로 제조하였다.

CNT/FTO유리전극제조 FTO유리전극을 96% 에틸알콜과 1mol/L HCl, 증류수에서 차례로 세척한 다음 60℃에서 건조시켰다. DMF에 CNT를 5.0mg/mL 되게 용해시키고 초음파분산기로 1h동안 분산(62.5W, 20kHz)시킨 다음 이 용액 50μL를 FTO유리전극에 떨구고 60℃에서 건조시켰다.

cCNT(카르복실화된 CNT)제조 63% HNO<sub>3</sub>용액에 CNT를 10mg/mL 되게 넣고 24h동안 방온도에서 방치한 다음 증류수로 pH가 중성으로 될 때까지 세척하고 증류수에 10mg/mL 되게 분산시켰다.

GDH/cCNT제조 0.1mol/L 린산완충용액(pH 6.0)에 푼 10mg/mL GDH를 cCNT용액과 1 : 1(V/V)로 섞고 얼음욕에서 일정한 시간동안 초음파분산(62.5W, 20kHz)시켰다.

GDH고정화전극제조 cCNT/GDH용액(4℃)에 CNT/FTO유리전극을 잠그고 일정한 시간이 경

과한 후 증류수로 세척하여 4°C에서 건조시켰다.(GDH고정화전극) 5mg/mL의 cCNT용액(4°C)에 같은 시간동안 CNT/FTO유리전극을 잠그었다가 증류수로 세척하여 4°C에서 건조시킨것을 대조전극으로 리용하였다.

염화은전극과 FTO유리전극, GDH고정화전극의 3전극체계를 구성하고 순환볼탐메터분석을 진행하였다.

## 결과 및 논의

### 1) CNT에 의한 GDH고정화에 미치는 몇가지 인자들의 영향

먼저 cCNT용액과 GDH용액을 혼합한 후 초음파분산시켰다. 초음파분산시간이 GDH활성에 미치는 영향은 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 4min까지는 90%이상의 활성을 나타내였지만 그 시간이 늘어날수록 활성이 감소하였다. 이것은 초음파처리에 의하여 GDH가 불활성화되기때문이라고 볼수 있다. 초음파처리과정에 cCNT와 GDH가 분산되어 CNT의 카르복실기와 GDH의 아미노기사이 에 정전기적결합이 이루어진다.[2] 이로부터 우리는 합리적인 초음파분산시간을 4min으로 정하였다.

초음파분산시킨 cCNT/GDH용액(4°C)에 CNT/FTO유리전극을 잠그고 각이한 시간동안 흡착시켰을 때 흡착고정화된 GDH의 활성을 측정하였다. 흡착시간에 따르는 GDH활성은 그림 2와 같다.

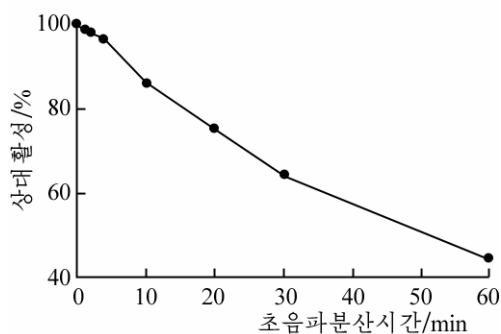


그림 1. 초음파분산시간이 GDH활성에 미치는 영향

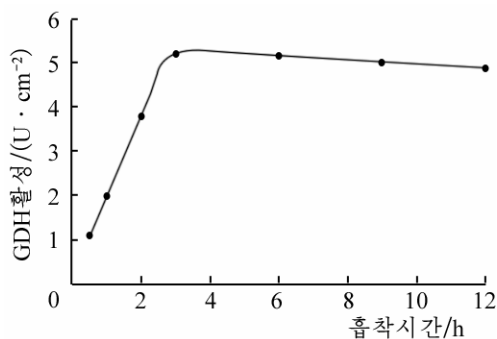


그림 2. 흡착시간에 따르는 GDH활성

그림 2에서 보는바와 같이 흡착시간이 3h일 때 GDH활성이 가장 높았으며 그 이후부터는 약간씩 감소하였다. 이것은 3h까지는 흡착효소량이 많지만 그 이후부터는 포화되고 시간이 흐를수록 GDH가 불활성화되기때문이라고 볼수 있다. 이로부터 우리는 초음파분산시킨 cCNT/GDH용액(4°C)에 CNT/FTO유리전극을 잠그고 3h동안 효소를 흡착시켜 활성이 5.2U/cm<sup>2</sup>인 GDH고정화전극을 제조하였다.

### 2) GDH고정화전극에서 GDH로부터 전극으로의 직접전자전달특성

GDH고정화전극과 대조전극을 리용하여 0.1mol/L 린산완충용액(pH 6.0)에서 200mV/s의 주사속도로 분석을 진행하였다. GDH고정화전극(1)과 대조전극(2)의 순환볼탐모그람은 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 대조전극의 경우에는 산화환원봉우리가 나타나지 않았지만 GDH고정화전극의 경우에는 뚜렷하게 나타났다. 이것은 GDH와 전극사이에 직접전자전달이 이루어진다는것을 보여준다.

0.1mol/L 린산완충용액(pH 6.0)에서 각이한 주사속도에 따르는 GDH고정화전극의 순환볼탐모그람은 그림 4와 같다.

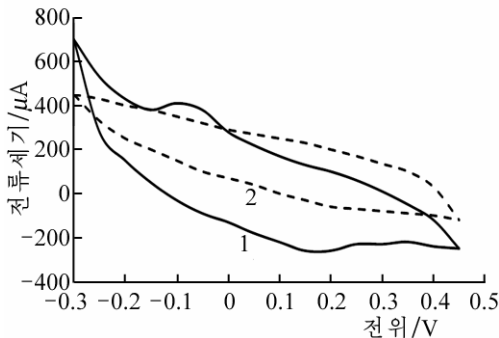


그림 3. GDH고정화전극(1)과 대조전극(2)의 순환볼탐모그람

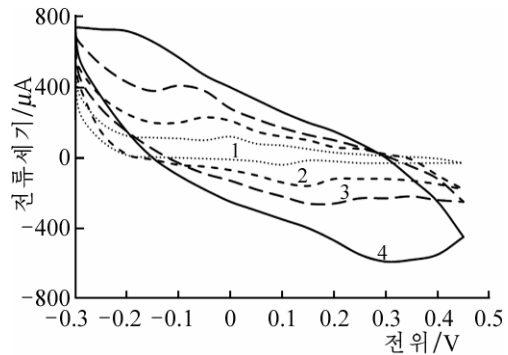


그림 4. 주사속도에 따르는 GDH고정화전극의 순환볼탐모그람

1—4는 주사속도가 각각 50, 100, 200, 500mV/s인 경우

그림 4에서 보는바와 같이 주사속도가 빨라질수록 음극봉우리와 양극봉우리는 높아지면서 봉우리간격이 커진다. 주사속도가 100mV/s일 때 양극봉우리는 +110mV, 음극봉우리는 -10mV에서 나타나며 GDH의 반파포텐셜은 +50mV이다.

라비론의 방정식으로부터 전자전달속도상수  $k_s$ 와 전자전달결수  $\alpha$ 를 계산하면  $k_s = 0.613s^{-1}$ ,  $\alpha = 0.231$ 이다. 이 값은 GOD를 CNT수식고정화한 전극의 전자전달속도상수( $1.69s^{-1}$ )[1]보다 작다. 이것은 CNT와 GDH사이의 결합이 공고하지 못하여 분석과정에 탈착현상이 일어나기때문이라고 볼수 있다.

전극에 고정화되어 전극활성을 나타내는 표면GDH농도와 봉우리전류세기사이에는 다음의 관계식이 성립한다.[3]

$$I_p = \frac{n^2 F^2 \Gamma A v}{4RT}$$

여기서  $I_p$ 는 봉우리전류세기(A),  $n$ 은 이동전자수,  $F$ 는 파라데이상수,  $v$ 는 주사속도(V/s),  $\Gamma$ 는 표면GDH농도(mol/cm<sup>2</sup>),  $A$ 는 전극면적(cm<sup>2</sup>),  $R$ 는 기체상수,  $T$ 는 절대온도(K)이다. 이로부터 표면GDH농도를 계산하면  $7.68 \times 10^{-10}$  mol/cm<sup>2</sup>이다. 이 값은 GOD를 그라펜고정화한 전극의 표면GOD농도( $4.5 \times 10^{-11}$  mol/cm<sup>2</sup>)[3]보다 10배이상 크다. 이것은 그라펜고정화에 비하여 CNT수식고정화가 더 많은 효소를 고정화시키기때문이라고 볼수 있다.

포도당농도를 2.0mmol/L로부터 20mmol/L로 증가시킬 때 포도당농도에 따르는 GDH고정화전극의 순환볼탐모그람은 그림 5와 같다.

그림 5에서 보는바와 같이 포도당농도가 증가함에 따라 음극봉우리는 감소하고 양극봉우리는 증가하다가 8.0mmol/L에서부터 포화상태로 된다.

포도당농도에 따르는 음극봉우리전류세기와 양극봉우리전류세기의 변화는 그림 6과 같다.

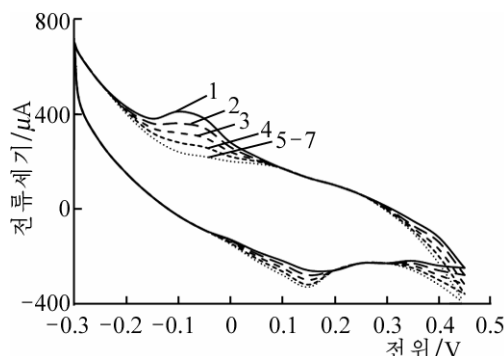


그림 5. 포도당농도에 따르는 GDH 고정화 전극의 순환볼탐모그람

주사속도 200mV/s, 0.1mol/L 린산완충용액(pH 6.0);

1-7은 포도당농도가 각각 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20mmol/L인 경우

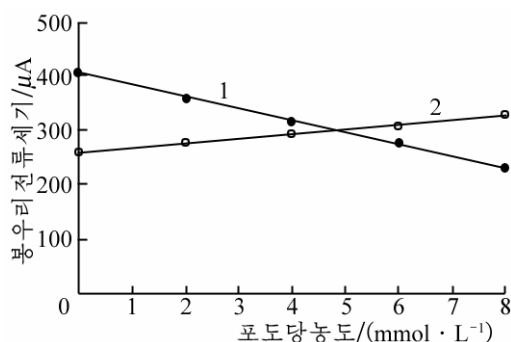


그림 6. 포도당농도에 따르는 음극봉우리 전류세기와 양극봉우리전류세기의 변화

1-음극봉우리전류세기,

2-양극봉우리전류세기

0mmol/L부터 8.0mmol/L사이의 선형구간에서 포도당농도에 대한 음극봉우리전류세기와 양극봉우리전류세기는 다음의 식으로 표현된다.

$$I_{\text{음}} = -21.95 \cdot C_{\text{포}} + 405.8$$

$$I_{\text{양}} = 8.35 \cdot C_{\text{포}} + 261$$

우리가 제조한 3세대형포도당수소감전극의 감도는  $21.95 \mu\text{A} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 이며 이것은 GOD를 CNT수식고정화한 전극의 감도( $0.4 \mu\text{A} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ )[1]나 GDH를 공유고정화한 전극의 감도( $1.0 \mu\text{A} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ )[4]보다 훨씬 높다.

## 맺는 말

카르복실화된 탄소나노관과 포도당탈수소효소의 초음파분산과 탄소나노관수식전극에서의 흡착법으로 포도당탈수소효소와 전극사이의 직접전자전달을 확인하였다. 전자전달속도상수는  $0.613 \text{ s}^{-1}$ , 표면GDH농도는  $7.68 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$ , 선형구간은 0~8mmol/L, 순환볼탐메터분석에서 주사속도 200mV/s일 때 감도는  $21.95 \mu\text{A} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 이다.

## 참고 문헌

- [1] B. C. Janegitza et al.; Sensors and Actuators, B 158, 411, 2011.
- [2] O. A. Karunwi; Carbon Nanotube-Enzyme Conjugates for the Fabrication of Diagnostic Biosensors, Clemson University, 1~199, 2015.
- [3] Y. Wang et al.; Sensors and Actuators, B 193, 708, 2014.
- [4] Y. Yamashita et al.; Enzyme and Microbial Technology, 52, 123, 2013.

주제 106(2017)년 5월 5일 원고접수

## **Direct Electron Transfer of Glucose Dehydrogenase Electrode Modified with Carbon Nanotubes**

*Mun Chung Hyok, Ri Jong Sim*

The electrodes immobilized glucose dehydrogenase with  $5.2\text{U}/\text{cm}^2$  in activity were prepared by using ultrasonication of carboxylated carbon nanotubes and glucose dehydrogenase, and adsorption on the electrode modified carbon nanotubes.

Direct electron transfer between glucose dehydrogenase and electrode was confirmed through cyclic voltammetric analysis. In this case, the electron transfer rate constant is  $0.613\text{s}^{-1}$ , active enzyme surface coverage— $7.68 \times 10^{-10} \text{mol}/\text{cm}^2$ , linear range— $0 \sim 8 \text{mmol}/\text{L}$ , and cyclic voltammetric sensitivity— $21.95 \mu\text{A} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  at  $200 \text{mV}/\text{s}$ .

Key words: direct electron transfer, glucose dehydrogenase, carbon nanotubes, glucose biosensor