

## 나노입자 효소를 이용한 포도당 검출용 바이오센서의 전기화학적 특성

이 금주, 윤 동화, 장 준형, 홍 석인\*  
고려대학교

### Electrochemical Characteristics of Biosensor using Protected Enzyme Nanoparticles for the Detection of Glucose

Keum-Ju Lee, Dong-Hwa Yun, Jun-Hyoung Jang, and Suk-In Hong\*  
Department of Chemical & Biological Engineering Korea University

**Abstract** - 본 논문은 당뇨병의 지표 물질인 glucose의 농도를 극미량의 시료를 사용하여 정량할 수 있는 방법을 개발하기 위해 organic/inorganic 네트워크에 의해 안정화된 나노입자 효소를 이용하여 초소형 효소 전극을 개발하였다. 전극은 실리콘 웨이퍼 상에 반도체 공정을 이용하여 마이크로 크기의 금 박막 전극을 제작하였다.

Organic/Inorganic 물질과 함께 합성된 glucose oxidase 나노입자는 20nm 크기로 투과형 전자현미경 (Transmission Electron Microscope : TEM)으로 관찰하고, 푸리에변환 적외선분광법 (Fourier transform infrared spectrophotometer : FTIR) 을 이용하여 분석하였고, 전극 특성을 알아보기 위해 Potentiostat/Galvanostat을 사용하여 전기 화학 실험을 하였다.

제작된 전극은 시간대 전류법으로 glucose의 농도에 따른 감도를 측정하였다. 실험결과에 따라 전극의 표면에서 발생하는 전류는 glucose의 농도에 비례함을 알 수 있었다. 또한 순환 전압전류법을 통하여 감도를 측정하였다.

#### 1. 서 론

당뇨병 관리의 근간인 정기적인 혈중 glucose 농도 감지가 자가진단이 가능하게 된 1978년 이래로, 지난 30여 년간 glucose 감지에 대한 메커니즘과 이에 따른 기술은 점차 발전하여 왔다. 그로인해 소형이며 저가인 바이오센서가 개발되었고, 분광시스템은 밀려나게 되었다. 뿐만 아니라 실리콘 웨이퍼 상에 박막전극을 증착하고 합성된 효소를 고정화하는 방법은 제작이 용이하고, 대량생산이 가능하며, 비교적 저렴한 비용으로 바이오센서 제작이 가능할 뿐만 아니라 생체 신호를 전기적으로 빠르게 변환할 수 있기 때문에 신속 정확하고 안정적인 감도를 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있다 [1]. 이러한 다양한 이점들로 인해, 바이오센서는 병원에서 뿐만 아니라 가정에서 실시간 감지용으로도 사용되고 있다. 건강보험심사평가원에 따르면 현재 우리나라의 당뇨병 환자 수는 매년 증가하는 추세에 있으며, 2030년 당뇨병 환자가 722만명에 달할 것으로 추산되고 있는 만큼 수요도 꾸준히 증가하고 있다.

이러한 상업적 요구와 맞물려 glucose 센서에 대한 연구는 활발히 진행되어 왔다. 그러나 이러한 노력에도 불구하고, 바이오센서 기술에는 몇 가지 과제가 남아있다. 생물학적 감지물질의 안정성과 고정화 방법 등이 그것이다 [2,3]. 효소 단분자 간의 자기 조립과 구조적 변화 때문에 변성이 일어나 효소의 활성을 저하시켜 감도를 떨어뜨리게 된다. 또한, 효소의 고정화 방법은 그 자체뿐 아니라 변환기로의 관련성을 볼 때 유리한 것이 효소 전극이며 [4], 이에 대한 연구는 활발히 진행되고 있다 [5,6]. 최근 나노크기의 물질들이 전기화학 바이오센서에 많이 이용되고 있다. 나노크기의 물질과 생물분자의 조합은 생명공학 분야에서 흥미롭게 여겨진다. 왜냐하면 나노입자는 뛰어난 생 적합성과 그것의 특정표면적 때문에 바이오센서 본연의 역할을 향상시키는데 중요한 역할을 한다. 작은 나노입자 일수록 그것의 표면 곡률 때문에 보다 큰 입자와 비교했을 때, 본래에 가까운 단백질 구조 기능을 유지하는데 도움을 준다 [6].

따라서 본 연구에서는 위에서 제시한 전자의 문제점을 개선하기 위하여 반도체 공정을 이용하여 금 전극을 제작하고 유기물과 무기물을 이용하여 나노크기의 glucose oxidase 입자를 합성하였다. 합성된 나노입자를 이용하여 제작된 포도당 센서는 glucose oxidase를 보다 안정화 시키고, 극미량의 시료를 사용하여 감지가 가능하게 하며, 안정화를 바탕으로 제 사용을 함으로써 비용적인 측면을 한층 더 감소시키는 역할을 한다.

#### 2. 본 론

##### 2.1 실험

##### 2.1.1 시약 및 기기

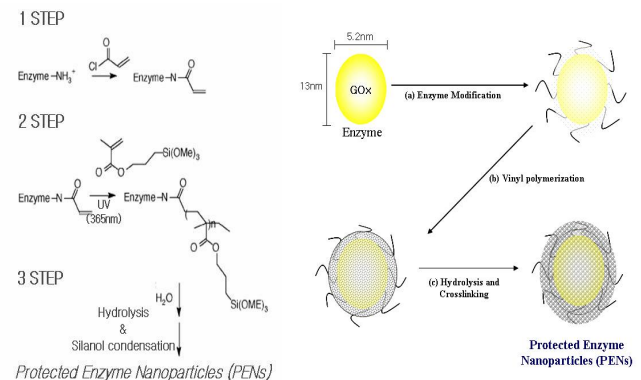
본 실험에 사용된 glucose oxidase (GOx, EC 1. 1. 3. 4, Type II-S, 500,000 units/g, from Aspergillus niger), β - D(+) glucose, 그리고 Metahcryloxypropyltrimethoxysilane (MPS, M.W. 248.35, Dow Coring Co, USA)는 Sigma사 (St. Louis, Mo, USA)의 제품이고, 네트워크를 위한 organic물질로 Acryloyl chloride (M.W, 91)와 촉매로 사용된 2,2'-azobis-(2,4-dimethylvaleronitrile)은 Wako사에서 구입하였으며 hexane (M.W. 86.18)은 Kanto사의 제품을 사용하였다.

거르는 과정을 위하여 사용된 syringe filter (PTFE, Hydrophobic, 0.2 μm)는 Advantec사의 제품을 사용하였고, membrane filter (polysulfone, UF, 60K Dalton)는 JM Co.사에서 구입하였다. 이외의 여러 가지 물질이나 완충용액 등은 특급시약등급이나 분석시약 등급에 준하는 시약을 사용하였으며, 용액의 제조에는 탈 이온수 (저항 18.2MΩ·cm)를 사용하였다.

순환 전압 전류법, 시간대 전류법 등의 전기 화학 실험은 Potentiostat/Galvanostat (Model VMP Multi-Potentiostat, USA) PerkinElmer사의 제품을 이용하여 수행하였으며, 상대 전극은 백금 코일 전극을 이용하였다. 그리고 기준 전극은 Saturated Calomel Electrode (SCE, Z112115) Aldrich사의 제품을 사용하였다. 탈 이온화한 증류수의 제조에는 Milli-Q water system을 사용하였다.

##### 2.1.2 Organic/Inorganic을 이용한 나노입자 효소 합성

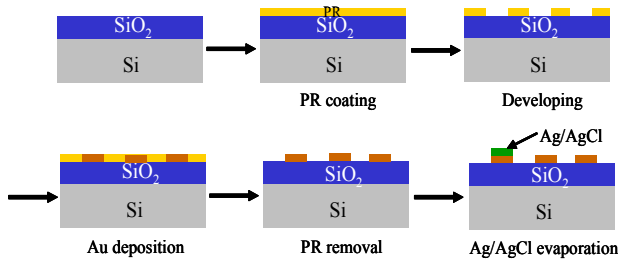
그림 1 (a)에서 보듯이 보호된 GOx의 합성은 세단계로 이루어져 있다. 첫 번째 단계는 GOx의 표면몰리에 자유 lysine residues의 covalent modification이다. GOx의 변형은 GOx를 포함하는 acryloyl chloride에서 일어난다. 두 번째 단계는 hexane에서의 비닐중합이다. 이 단계에서는 hexane과 MPS에 1단계에서 만들어진 acryloylated GOx를 용해한다. 비닐중합은 자외선 빛 (365nm)에서 개시반응을 일으킨다. 이 때, 자유라디칼 개시제로서 2,2'-azobis-(2,4-dimethylvaleronitrile)을 첨가하였다. 마지막 단계는 가수분해와 축합반응이다. 인산 완충용액 (200mM, pH 8.0) 의 동일한 양을 비닐기 중합의 중합된 생성물을 포함하고 있는 헥산에 가한다. 2-상계는 22°C에서 300rpm으로 5분간 흔들어준다. 완충용액 상은 syringe filter (pore size 0.2μm)로 걸러진다. 이 추출 과정은 5번 반복한다. 추출된 완충용액은 4°C에서 3일간 숙성시킨 후, membrane filter (MWCO 60K: molecular weight cut-off 60,000)위에서 syringe filter로 다시 걸러준다. 최종적으로 걸러진 용액은 냉장고 (4°C)에 보관한다.



〈그림 1〉 나노입자 효소의 (a) 화학 반응과 (b) 모식도

### 2.1.3 3전극의 제작

금 전극을 사용한 3전극의 제작은 전통적인 방법인 photolithography 공정을 사용하였다. 모든 단계는 마스크 패턴을 실리콘 웨이퍼 표면에 옮기는 과정을 포함하고 있다. 작업전극과 상대전극의 기질은 Si기판 위에 SiO<sub>2</sub>층이 성장된 p-type (100) 4-inch 웨이퍼를 사용하였다. 실리콘 웨이퍼는 RCA 표준공정으로 세척한 후 positive photoresist를 웨이퍼표면에 스핀 코팅 한다. 그리고 photoresist mask를 resist가 도포된 웨이퍼 표면에 근접시킨 후 exposure과 develop과정을 거친다. Au가 증착된 웨이퍼의 photoresist를 제거하기 위해 etchant시킨다. 기준전극의 제작을 위한 Ag 박막의 증착은 2000Å의 두께로 하였다.

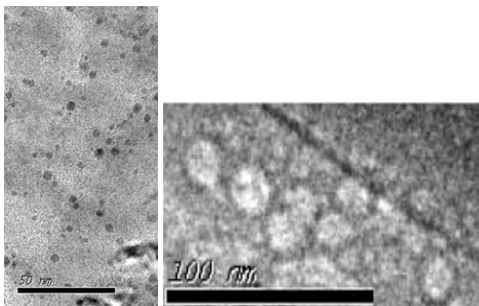


<그림 2> 3전극 제작 과정 모식도

## 2.2 결과 및 고찰

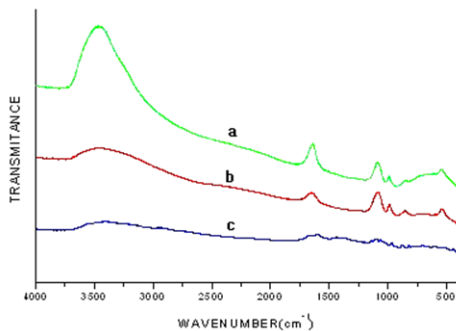
### 2.2.1 합성된 Glucose Oxidase 나노입자의 분석

Organic/Inorganic 네트워크를 통해 합성된 나노입자는 Transmission Electron Microscope (TEM)으로 확인할 수 있다. 그림 3에 나노입자의 내부 빈 공간은 전자빔의 단백질의 투과성에 의한 결과로 크기가 약 13nm로 glucose oxidase의 크기와 일치한다. 이 둘레의 어두운 이미지는 cross-link된 고분자 네트워크 혼합물이다. Inorganic으로 사용된 Metacryloyloxypropyltrimethoxysilane에 존재하는 silicon이 TEM의 energy-dispersive X-ray 분석에 의해 확인되었다.



<그림 3> 합성된 나노입자 이미지

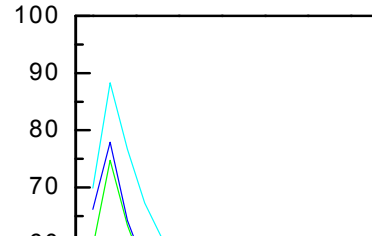
합성된 나노입자의 성분을 알아보고 합성됨을 정확히 확인하기 위해 Fourier Transform Infrared spectrophotometer (FT-IR)을 측정 한 결과이다.



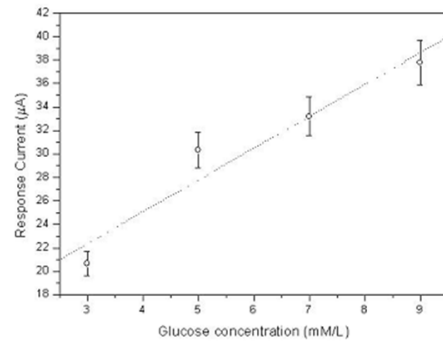
<그림 4> FT-IR spectra (a) 20% MPS포함한 GOx 나노입자 (b) 0.2% MPS 포함한 GOx 나노입자 (c) GOx

### 2.2.2 감도 측정

그림 5는 0.6 V의 일정한 전압을 인가하면서 서로 다른 양 (1, 3, 5, 7, 9 mM/L)의 glucose를 첨가 한 후 각각의 전류 곡선을 나타내고 있다. Glucose 농도를 증가시키에 따라 전류의 값도 증가하고 있음을 알 수 있다.



<그림 5> Glucose 농도에 따른 current 곡선의 시간 의존성 (in PBS, at 0.6V, vs. Ag/AgCl)



<그림 6> Planar 전극에서 glucose 센서의 정상상태 보정곡선

## 3. 결 론

나노크기의 장점을 이용하여 합성시킨 GOx 나노입자를 바탕으로 glucose 검출용 센서를 제작하였다. 제작된 센서는 3mM/L ~ 9mM/L의 범위에서 직선성을 보여 주었다. Glucose의 농도가 증가 할수록 전류의 양 또한 비례하여 증가하는 것을 알 수 있었다. 나노기술을 이용한 GOx나노입자는 체내의 질병 지표물질 (glucose)의 수치를 미량으로 검출 및 측정하는데 유용한 기술이다. 더 나아가 바이오센서의 제사용을 위한 방법으로 제시될 수 있다. 이 기술은 바이오센서의 다양한 분야에서 참신한 트랜스듀서를 제작하는데 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 4. 감사의 글

본 연구는 Second Brain Korea 21 Project 와 보건복지부 Korea Health 21 R&D Project (A050750) 지원으로 수행되었음.

## [참 고 문 헌]

- [1] J. P. Alarie, S. C. Jacoson, C. T. Sulbertson, J. M. Ramsey, "Effects of the electric field distribution on microchip valving performance", *Electrophoresis*, 21, 100-106, 2000
- [2] M. P. Byfield, R. A. Abuknesha, "Biochemical aspects of biosensor", *Biosensors & Bioelectronics*, 9, 373-400, 1994
- [3] R. S. Sethi, "Transducer aspects of biosensor", *Biosensors & Bioelectronics*, 9, 243-264, 1994
- [4] M. Umama and J. Waller, "Protein-modified electrodes. The glucose oxidase/polypyrrole system", *Anal. Chem.*, 58, 2979-2983
- [5] G. F. Khan, M. Ohwa, W. Wernet, "Design of a stable charge transfer complex electrode for a third-generation amperimetric glucose sensor", *Anal. Chem.*, 68, 2939-2945, 1996
- [6] N. C. Foulds, C. R. Lowe, "Immobilization of glucose oxidase in ferrocene-modified pyrrole polymers", *Anal. Chem.*, 60, 2473-2478, 1988