

탄소나노튜브로 개질된 탄소종이 기반 젖산산화효소 - 카탈레이즈 전극 제작 및 특성 분석

시킴* · 셀바라잔 바르시니* · 양영일*** · 김혁한**** · 김창준*,**,*†

*경상국립대학교 화학공학과 및 그린에너지 연구소

52828 경상남도 진주시 진주대로 501

**경상국립대학교 나노신소재융합공학과

52828 경상남도 진주시 진주대로 501

***경상국립대학교 반도체공학과

52828 경상남도 진주시 진주대로 501

****단국대학교 과학기술대학 화학과

31116 충청남도 천안시 단대로 119

(2023년 8월 10일 접수, 2023년 9월 25일 수정본 접수, 2023년 9월 25일 채택)

Fabrication and Characterization of Carbon Nanotube-modified Carbon Paper-based Lactate Oxidase-catalase Electrode

Ke Shi*, Varshini Selvarajan*, Yeong-Yil Yang***, Hyug-Han Kim**** and Chang-Joon Kim*,**,*†

*Department of Chemical Engineering and RIGET

**Department of Materials Engineering and Convergence Technology

***Department of Semiconductor Engineering, Gyeongsang National University, 501 Jinju-daero, Jinju, Gyeongnam, 52828, Korea

****Department of Chemistry, Dankook University, Cheonan, 3116, Korea

(Received 10 August 2023; Received in revised from 25 September 2023; Accepted 25 September 2023)

요 약

본 연구에서는 전극의 전기 전도도 증대와 젖산 산화반응의 부산물인 과산화수소 생성 완화가 젖산 산화효소 전극 성능에 미치는 영향을 조사하였다. 유연성 있는 탄소종이 표면을 단일벽 탄소나노튜브로 개질하여 전극의 전기 전도도를 향상시켰다. 카탈라아제를 도입하여 젖산 산화반응에서 발생하는 과산화수소를 제거하였다. 젖산 산화효소와 카탈라아제가 동시에 고정화된 탄소종이 전극은 젖산 산화효소만 고정화된 탄소종이 전극보다 1.7배 많은 전류를 생성하였다. 단일벽 탄소나노튜브로 개질된 탄소종이 표면에 젖산 산화효소와 카탈라아제가 동시에 고정화된 전극은 171 μA 의 전류를 생산하였는데, 이는 탄소종이 표면에 젖산 산화효소만 고정화된 전극이 생산하는 전류보다 2배 높은 값이다. 최적화된 전극은 젖산 농도가 20 mM까지 선형반응을 보여 센서용 전극으로 사용 가능성을 확인하였다.

Abstract – This study aimed to investigate the impact of enhancing the electrode conductivity and mitigating the production of hydrogen peroxide - a by-product arising from lactate oxidation - on the performance of lactate electrodes. The electrical conductivity of the electrode was improved by modifying the surface of carbon paper with single-walled carbon nanotubes. Catalase was introduced to effectively eliminate the hydrogen peroxide produced during the lactate oxidation reaction. The carbon paper electrode, with simultaneous immobilization of both lactate oxidase and catalase, yielded a current 1.7 times greater than the electrode where only lactate oxidase was immobilized. The electrode in which lactate oxidase and catalase were co-immobilized on the surface of carbon paper modified with single-walled carbon nanotubes, produced a current of 171 μA , which was more than twice as much current as the carbon paper with only lactate oxidase immobilized. The optimized electrode showed a linear response up to lactate concentration of 20 mM, confirming that it can be used as a sensor electrode.

Key words: Lactate oxidase, Catalase, Carbon paper, Single-walled carbon nanotubes, Lactate sensor

† To whom correspondence should be addressed.

E-mail: cj_kim@gnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

젖산은 스트레스, 심부전(heart failure), 저산소 상태 등 개인의 신체 건강상태를 알려주는 중요한 생체지표 물질(biomarker)이다

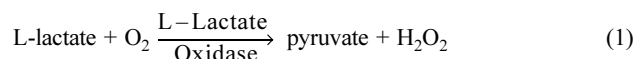
[1,2]. 스트레스 상태에서 해당작용(glycolysis)의 대사속도가 미토콘드리아의 TCA 대사속도보다 빨라져 인체 내 피루브산(pyruvate)이 축적되는데, 이는 젖산으로 전환된 후 혈액으로 이동한다[3]. 운동선수가 과도한 운동 중 혈중 젖산 농도가 급격하게 증가하고 피로와 근육경직을 경험한다[4]. 신체 내 젖산을 검출하는 젖산 센서가 개발된다면 환자들의 건강 및 스트레스 상태 또는 운동 중인 선수의 피로도를 실시간으로 모니터링하며 발생하는 문제들에 대한 빠른 대처를 할 수 있을 것이다. 그동안 널리 사용된 센서들은 피부에 바늘을 찌러넣는 침습 방법을 채용하였는데, 이는 침을 찌러 혈관의 피를 외부로 유출시킨 후 혈액의 타깃 물질 농도를 측정하는 방식이다. 이 방법은 정확도가 높지만 통증, 피부손상, 상처, 세균 침입의 가능성을 동반하며, 지속적인 타깃 물질 정보를 제공할 수 없다. 반면 신체에 어떤 구멍도 만들지 않고 질병을 진단하거나 치료하는 방식인 비침습 방법은 인체에 무해할 뿐만 아니라 상시적 진단이나 연속적 모니터링에 널리 사용될 수 있어서[5,6], 비침습 방법을 사용하는 센서가 주목받고 있다.

혈액 내 젖산농도 증가는 체외로 분비되는 땀 속의 젖산 농도를 증가시키므로[3,7,8], 인체 밖으로 분비되는 땀 분석을 통하여 실시간 인체 내 젖산 모니터링이 가능한 비침습적 센서 개발이 가능하다. 전 세계의 많은 연구자가 땀속의 젖산 측정이 가능한 전기화학 센서 개발연구를 수행하여오고 있다. Rahman 등은 전도성 고분자/다중벽 탄소나노튜브 복합체 기반의 젖산 센서를 개발하여 저농도의 젖산을 검출할 뿐만 아니라 우유 또는 사람 혈청 중의 젖산을 성공적으로 검출할 수 있음을 보고하였다[9]. Madden 등은 레이저로 각인된 탄소표면에 전기증착(electrodeposition)으로 백금 코팅 후 젖산 산화효소-키토산 혼합액을 부착한 젖산 산화효소 센서를 제작하였다. 이들은 센서가 0.11 mM의 젖산까지 검출할 수 있고 높은 민감도($35.8 \mu\text{A}/\text{mM} \cdot \text{cm}^2$)를 보였다고 보고하였다[2]. Nagamine 등은 나노입자로 코팅된 폴리에틸렌 나프탈레이트(PEN) 필름 표면에 Prussian Blue, 젖산 산화효소-아가로오스 겔 혼합액을 순차적으로 도포한 작업 전극을 제작하였다. 제작된 하이드로겔-기반 터치패드 방식의 젖산 센서는 땀으로부터 젖산을 잘 흡수하고 분석할 수 있어 비침습 젖산 센서로의 사용 가능성을 보였다[6].

이러한 노력에도 불구하고 젖산 센서의 성능이 낮아 이의 성능 개선 필요성이 꾸준히 제기되어 왔다. 전극이 젖산 센서 성능에 가장 큰 영향을 미치므로 센서 성능 향상을 위해서는 고성능 전극 개발이 필요하다. 젖산 센서는 젖산 산화효소 전극을 사용하는데[1], 효소 반응이 일어나는 활성부위(active site)가 효소 내부 깊숙한 곳에 위치해 있을 뿐만 아니라 부도체인 유기물로 덮여있기 때문에 생성된 전자가 전극으로 이동하는 것이 어렵다[10]. 이를 해결하기 위해서는 효소 활성점에서 전극표면으로 전자를 운반하는 전자전달체(electron transfer mediator)가 필요한데, 전자전달체는 효소 활성점이 위치한 지점까지 침투할 수 있을 뿐만 아니라 전극에 부착되어 안정적으로 작동할 수 있어야 한다. 또한 부도체인 효소의 부착으로 전극의 전기 전도도가 감소하므로 이를 상쇄 또는 보완시키기 위해서는 고 전기전도성 물질을 도입하여 전극성능을 향상시켜야 한다. 전극에 고정화된 젖산 산화효소는 L-형 젖산(L-lactate)을 피루브산으로 산화시킨다. 효소 반응에서 생성된 전자에 의해 환원된 전자전달체는 전자를 전극으로 전달하며 자신은 산화되고 재생된 전자전달체는 다시 효소 반응의 전자수용체로 참여한다[11].

한편, 젖산이 젖산 산화효소에 의해 피루브산으로 전환되는 산화

반응(식 (1))에서 과산화수소(H_2O_2)가 부산물로 발생한다[1,12,13].



과산화수소로 인하여 전자가 손실되고 효소 활성이 억제되어 전극이 생성하는 전류값이 감소한다. 따라서 고성능 젖산 센서 개발을 위하여 효소 전극의 전도성 증대, 과산화수소 생성 최소화, 및 효율적인 효소-전극 전자전달을 고려한 젖산 산화효소 전극 개발 전략이 필요하다. 본 연구의 목적은 땀속의 젖산을 검출하기 위한 고성능 효소 전극을 개발하는 것이다. 유연성 있는 탄소종이를 기본 전극으로 선정하였고 전극의 전기전도도를 향상시키기 위하여 탄소종이 표면에 단일벽 탄소나노튜브(single-walled carbon nanotubes, SWCNTs)를 부착하였다. 효소 활성점 부위에서 전극으로 전자를 전달하는 전자전달체로 산화·환원 고분자를 사용하였다. 카탈라아제(catalase)를 도입하여 젖산 산화반응에서 생성되는 과산화수소를 제거하였다. 순환 전압전류법과 시간대전류법을 사용하여 전극 성능을 평가하였다.

2. 실험

2-1. 실험 재료

Aerococcus viridans 유래 젖산 산화효소(lactate oxidase, LOx), 카탈라아제(catalase, Cat), 젖산나트륨(sodium-L-lactate) 및 기타 염류들을 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, USA)에서 구입하였다. ㈜위즈맥(Seoul, Korea)에서 탄소종이(HCP-020N)를 구입하였고 PVC 필름(두께, 200 μm)과 3M 사(St. Paul, USA)의 양면테이프를 오피스디포(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 카르복시기로 기능화된 단일벽 탄소나노튜브(carboxylic-acid-functionalized single-walled carbon nanotubes, SWCNTs)를 사용하였다. 제조사 정보(Sigma-Aldrich 사, 제품 번호 652490)와 발표된 논문[14]에 따르면, 개별 SWCNT의 평균 지름은 $1.4 \pm 0.1 \text{ nm}$ 이고 번들 차원(bundle dimension)은 $4.5 \text{ nm} \times 0.5\text{--}1.5 \text{ nm}$ 이다. 본 연구팀은 전자전달체인 poly(N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)2Cl] $^{+2+}$ (PVI-Os-dme)를 합성하여 사용하였다. PVI-Os-dme의 표준 산화·환원 전위는 0.23 V로 알려졌다[15].

2-2. SWCNTs로 개질된 탄소종이 전극 제작

양면테이프의 한쪽 면에 PVC 필름을 부착하고 다른 면에는 적당한 크기($3 \text{ cm} \times 0.3 \text{ cm}$)로 자른 탄소종이(carbon paper, CP)를 부착하였다. 전극은 세 부분으로 구분되었는데, 아랫부분($0.5 \text{ cm} \times 0.3 \text{ cm}$)과 윗부분은 각각 SWCNTs/효소 고정화 및 전위차계(potentiostat)의 연결부위로 사용되었다. 중간 부분을 PVC 필름으로 감싸서 탄소종이가 용액과 접촉하는 것을 방지하였다. 10 mg의 SWCNTs를 유리 시험관에 넣고 10 mL의 증류수를 첨가하였다. SWCNTs 분산액을 포함한 유리 시험관을 40 kHz에서 작동하는 초음파 세척기(160 HT, soniclean Pty Ltd., Seoul, Korea)에서 96 W로 3시간 동안 초음파처리하였다. 이를 원심분리기에서 $1,106 \times \text{g}$ 로 10분간 회전시킨 후 침전된 펄스를 제거하고 SWCNTs가 균일하게 분산된 상등액을 회수하였다. CP 아랫부분 표면에 20 μL 의 상등액(SWCNTs 용액)을 도포한 후 상온에서 2시간 건조시켜 SWCNTs로 개질된 CP 전극(CP-SWCNTs)을 제작하였다. 제작된 CP 전극 사

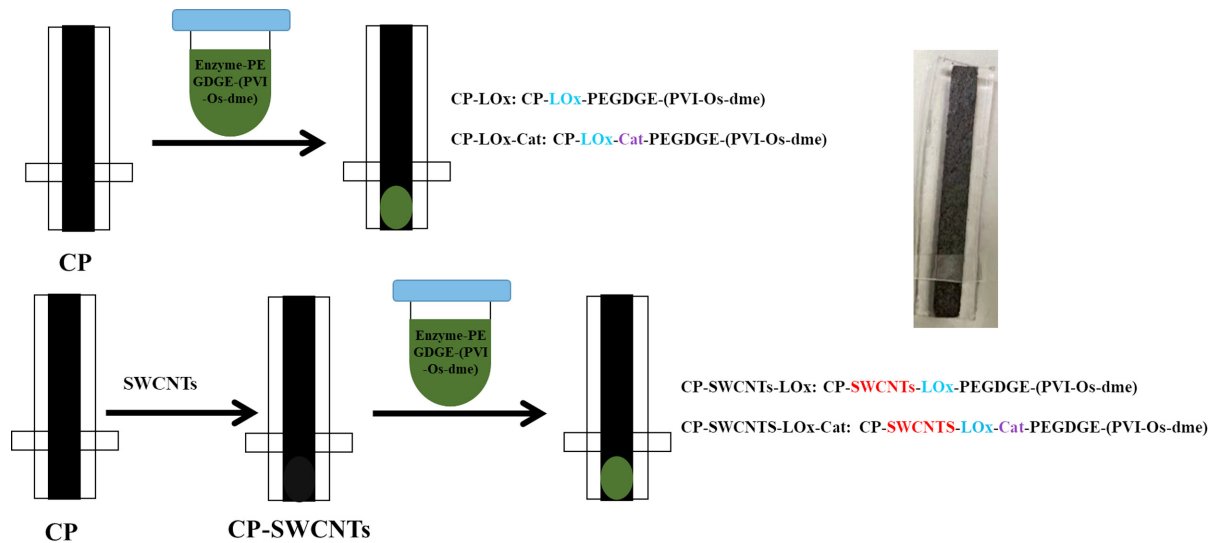


Fig. 1. Schematic illustration for the modification of carbon paper with SWCNTs and enzymes.

진, 전극 개질, 및 효소 고정화 과정을 Fig. 1에 나타내었다.

2-3. (개질) 탄소종이 기반 효소 전극 제작

CP 또는 CP-SWCNTs 표면에 LOx 또는 Cat이 부착된 전극을 제작하였다. LOx 전극을 제작하기 위하여 10 mM phosphate buffer saline (PBS, pH 7.0)에 용해된 LOx (125 U/mL), PEGDGE (40 mg/mL), 및 PVI-Os-dme (10 mg/mL)를 4:4:1의 부피비로 잘 혼합하고 혼합액 20 μ L를 CP 또는 CP-SWCNTs 표면에 도포하였다. 이를 상온에서 2시간 건조시키고 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 보관한 후 사용하였다. LOx와 Cat이 함께 부착된 전극을 제작하였다. 10 mM PBS (pH 7.0)에 용해된 LOx (250 U/mL), Cat (1 mg/mL), PEGDGE (40 mg/mL), PVI-Os-dme (10 mg/mL)를 2:2:4:1의 부피비로 잘 혼합하였다. 혼합액 20 μ L를 CP 또는 CP-SWCNTs 표면에 도포한 후 상온에서 2시간 건조시키고 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 보관 후 사용하였다.

2-4. 전극 특성 분석

전극 셀은 효소 전극(작업 전극), Pt wire(대전극), 그리고 기준전극인 Ag/AgCl (LF-2, Innovative Instruments Inc., Tampa, USA)로 구성되었다. 20 mM 젖산나트륨(젖산)이 첨가된 10 mM PBS (pH

7.0) 10 mL에 전극들을 담그고 -0.4~0.6 V 범위에서 20 mV/s의 주사속도(scan rate)로 순환전압전류법(cyclic voltammetry, CV) 분석을 실시하였다. 전극의 센싱 특성을 조사하기 위하여 다른 농도의 젖산이 첨가된 10 mM PBS (pH 7.0) 또는 인공 땀(artificial sweat) 10 mL에 전극을 담그고 셀 전압을 0.3 V로 유지하며 시간대전류법(Chronoamperometry, CA) 분석을 실시하였다. 인공 땀은 0.1 mM 포도당, 17 mM 우레아, 0.8 M NaCl을 포함한 용액(pH 6.5)이다. 모든 전기화학 실험은 상온에서 전위차계(potentiostat, CH Instruments, model 660D, Houston, USA)를 사용하여 수행되었다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 전극 개질 및 표면 분석

Fig. 2(a)는 개질 전·후 전극표면의 전자현미경(SEM) 사진을 보여준다. CP 표면에 가는 탄소섬유들이 네트워크 형태로 연결되어 있는 것이 보인 반면 CP-SWCNTs 표면에는 가느다란 섬유 형태의 SWCNTs가 잘 보였다. 이로부터 CP 표면에 SWCNTs가 잘 부착되었음을 알 수 있다. 무처리 전극(bare CP)과 비교하여 효소 전극(CP-LOx) 표면에서는 탄소섬유 네트워크를 관찰할 수 없었는데 이는

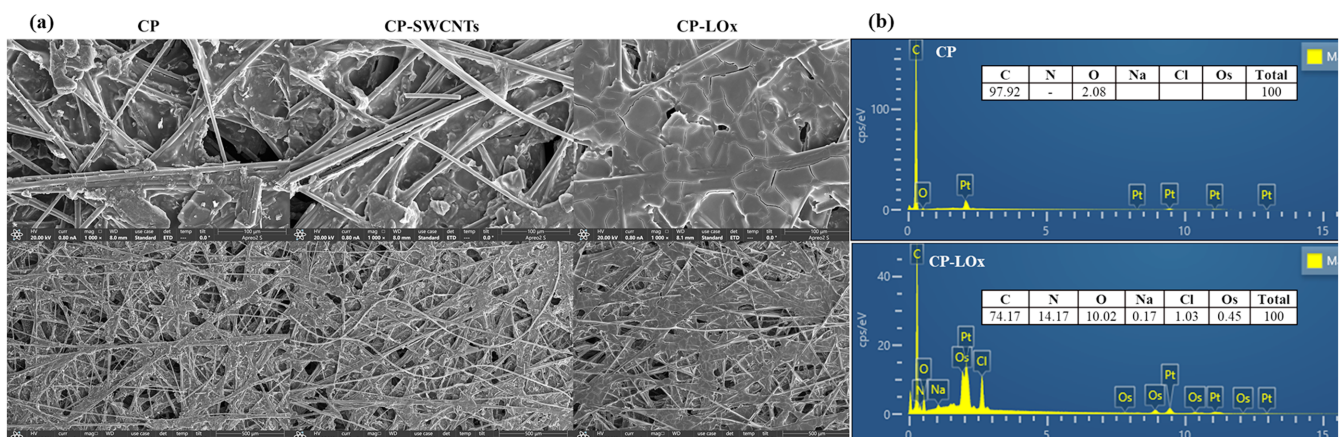


Fig. 2. (a) SEM images and (b) EDS mapping of bare, SWCNT-modified, and lactate oxidase-modified carbon paper.

유기물인 젖산 산화효소, 가교제(PEGDGE), 및 산화·환원 고분자(PVI-Os-dme)가 CP 표면을 덮기 때문인 것으로 여겨진다. Fig. 2(b)는 에너지 분산형 X-선 분광법(EDS) mapping 분석결과를 보여준다. CP에서 얻은 주 피크가 탄소(97.92 atomic %)와 산소(2.08 atomic %)인 반면, CP-LOx에서는 탄소(74.17%), 질소(14.17%), 산소(10.02%), Na(0.17%), Cl(1.03%), 및 Os(0.45%) 등 여러 피크들이 관찰되었다. LOx의 주성분은 단백질이고 이의 주요 구성성분은 탄소와 질소이다. PEGDGE의 주성분은 탄소와 산소이고 PVI-Os-dme는 탄소, 산소, 질소, Os, 및 Cl을 포함한다. EDS 분석을 통하여 얻은 전극표면 원소들의 데이터와 알려진 전극 성분 원소들의 정보를 바탕으로 CP 표면에 LOx, PVI-Os-dme, 및 PEGDGE가 가교결합을 형성하며 잘 부착된 것으로 판단되었다.

3-2. 효소 전극 성능 평가

Fig. 3은 10 mM PBS (pH, 7.0)에서 CP와 CP-SWCNTs의 CV 곡선을 보여준다. 한 쌍의 대칭적인 산화·환원 피크가 생성되었는데 이는 전기화학 반응이 가역적임을 나타낸다. 산화 전류와 환원 전류 피크가 관찰된 전위는 각각 약 0.11과 0.07 V였고 이들의 평균값은 0.1 V였다. 이는 알려진 PVI-Os-dme의 표준 산화·환원 전

위보다 약 0.1 V 정도 낮은 값이다. 재료, 합성방법 등에 따라 물질의 표준 환원 전위 값이 조금씩 달라진다는 것을 고려하면, 생성된 피크가 전자전달체인 PVI-Os-dme의 산화·환원 피크에 해당한다고 할 수 있다. 한편 CP-SWCNTs의 피크가 CP의 피크보다 높은 강도를 나타내었는데, 이는 SWCNT가 전극의 전기 전도도 향상에 크게 기여한다는 것을 시사한다. Fig. 4는 젖산 산화 반응에서 카탈라아제 첨가가 전극 성능에 미치는 영향을 보여주는 CV 곡선들이다. 효소 부착과 효소의 촉매작용으로 전위 값이 양의 전위로 이동하여 전극들은 0.3과 0.25 V에서 각각 최대 산화 전류 피크와 환원 전류 피크를 생성하였다. 최대 산화 전류값이 나타나는 전위(0.3 V)에서 전극들이 생성하는 전류값을 비교함으로써 전극들의 성능을 평가하였다. LOx가 부착된 CP 전극(CP-LOx)이 생성하는 전류량은 젖산 첨가 전 78 μ A에서 첨가 후 86 μ A로 10% 증가하였다(Fig. 4(a)). 반면 LOx와 Cat이 동시에 부착된 전극(CP-LOx-Cat)은 젖산이 없는 경우(93 μ A)에 비하여 젖산 첨가 시 57% 증가한 146 μ A의 전류를 생성하였다(Fig. 4(b)). 본 결과는 CP에 고정화된 LOx가 젖산 산화 반응을 촉진시킨다는 것을 명확히 보여준다. 특히 LOx와 Cat의 동시 부착으로 전극 성능이 월등히 향상되었다는 것이 주목할 만하다. 언급하였듯이, LOx의 촉매작용으로 젖산이 퍼루브산으로 산화되며 과산화수소(H_2O_2)가 생성된다[1]. 젖산 산화로 생성된 전자들이 전자전달체(PVI-Os-dme)를 통하여 전극으로 전달되지만 일부 전자들이 산소로 전달되어 과산화수소 생성에 소모되기 때문에 전극이 생성하는 전류량이 적을 것으로 판단되었다. 뿐만 아니라 과산화수소와 같은 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)은 효소의 활성을 저해하는 것으로 알려졌다. 카탈라아제는 과산화수소를 포함한 다양한 퍼옥사이드 분해반응을 촉진하는 효소로서 젖산 산화 반응의 부산물인 과산화수소를 제거할 수 있다[16]. 퍼옥시다제(oxidase)도 과산화수소를 제거하는 효소이지만 카탈라아제와 작용 기작이 다르다. 카탈라아제는 반응식 (2)과 같이 과산화수소를 분해하여 물과 산소로 만들지만, 퍼옥시다제는 반응식 (3)과 같이 과산화수소를 분해하여 물로 변화시키면서 다른 기질(RH_2)의 탈수소화, 즉 산화 반응을 촉매화한다[17].

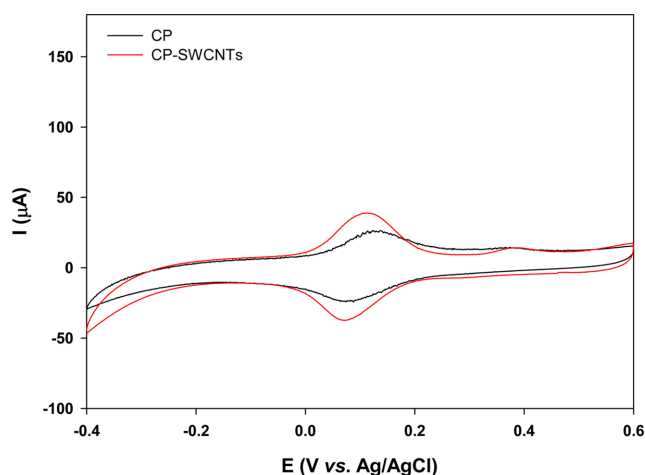
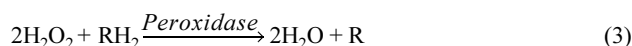


Fig. 3. Cyclic voltammograms for CP and CP modified with SWCNTs in PBS (10 mM, pH 7.0) recorded at the scan rate of 20 mV/s.

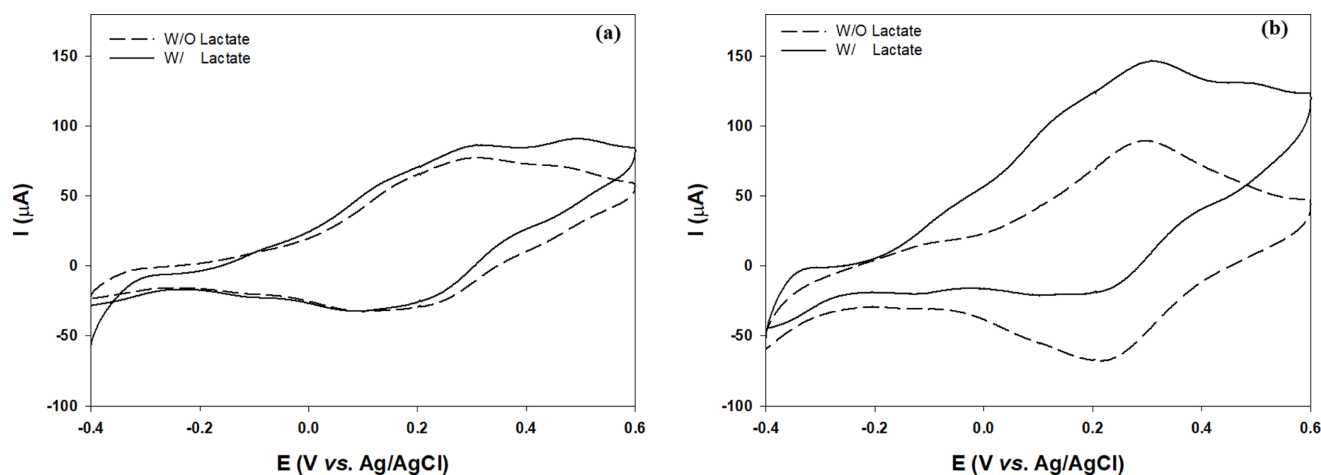


Fig. 4. Cyclic voltammograms for (a) LOx electrode and (b) LOx-Cat electrode in PBS (10 mM, pH 7.0) with or without sodium-L-lactate (20 mM) recorded at the scan rate of 20 mV/s. The LOx or Cat was immobilized on carbon paper (CP).

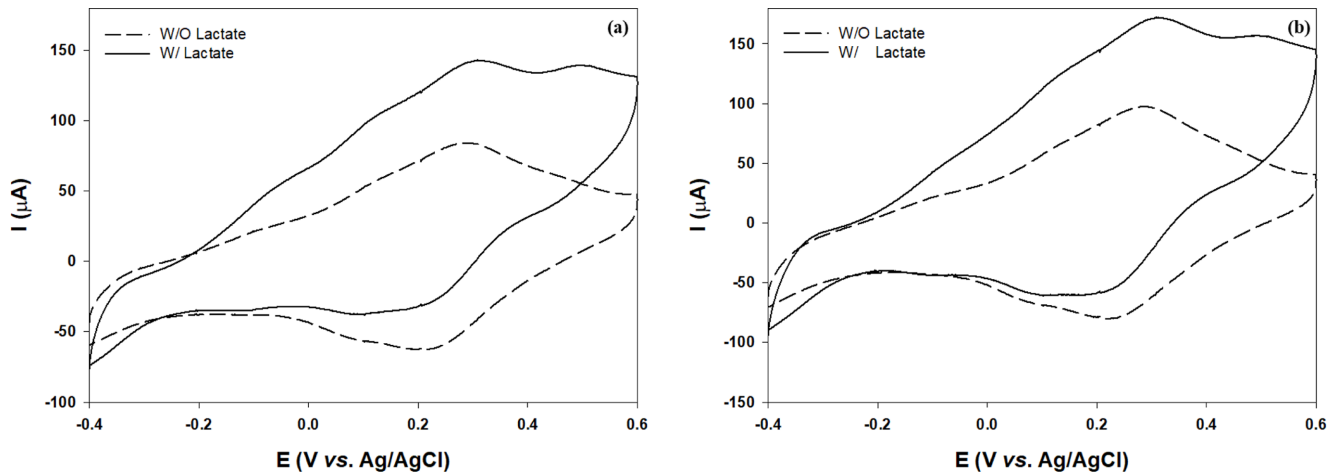


Fig. 5. Cyclic voltammograms for (a) LOx electrode and (b) LOx-Cat electrode in PBS (10 mM, pH 7.0) with or without sodium-L-lactate (20 mM) recorded at the scan rate of 20 mV/s. The LOx or Cat was immobilized on carbon paper modified with SWCNTs (CP-SWCNTs).

LOx와 카탈라아제를 함께 사용함으로써 과산화수소에 의해 유발되었던 LOx의 활성 저하 및 전자 손실이 발생되지 않으므로[18, 19], LOx-Cat 전극이 LOx 전극보다 월등히 많은 전류를 생성하며 장시간 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.

효소는 유기물이 주성분인 절연체이므로 효소 활성점에서 생성된 전자가 전극표면으로 이동하는 것이 어렵다[20]. LOx와 Cat이 동시에 부착된 전극에서는 두 효소가 전자전달에 큰 장애물이 될 수 있어 이를 극복하기 위하여 전극의 전기 전도도를 높이는 것이 중요하다. 상기에서 보였듯이, CP-SWCNTs가 CP보다 높은 전기 전도도를 보였기 때문에, 효소가 부착된 전극에서도 SWCNTs 효과가 있는지를 조사하였다. Fig. 5(a)에 나타내었듯이 SWCNTs로 개질된 CP에 부착된 LOx 전극(CP-SWCNTs-LOx)이 CP-LOx보다 월등히 많은 양의 전류를 생성하였다. CP-SWCNTs 표면에 두 가지 효소(LOx와 Cat)가 동시에 부착된 전극(CP-SWCNTs-LOx-Cat)의 성능을 Fig. 5(b)에 보였다. CP-SWCNTs-LOx-Cat은 CP-SWCNTs-LOx보다 높은 산화전류 피크를 생성하였다. 젖산이 포함된 전해질에서 측정된 전극의 CV 곡선에서 0.3 V 근처의 최대 산화전류 피크를 추려낸 후 이들을 비교함으로써 네 가지 효소 전극들의 성능을 정량적으로 비교·평가하였다(Fig. 6). CP-LOx 전극이 가장 적은 양의

산화전류를 생성하였다. CP-LOx-Cat과 CP-SWCNTs-LOx는 비슷한 양의 산화 전류를 생성하였고 생성량은 CP-LOx 전극 생산량의 1.7배였다. CP-SWCNTs-LOx-Cat가 가장 많은 양의 산화전류(171 μA)를 생산하였는데, 이는 CP-LOx가 생성하는 전류량의 2배에 해당한다. 주목할 점으로 CP-LOx-Cat이 CP-LOx보다 월등히 많은 전류를 생산하여 카탈라아제 효과가 명확히 발견된 반면, CP-SWCNTs-LOx-Cat와 CP-SWCNTs-LOx가 생산하는 전류량에서는 큰 차이가 관찰되지 않았다. 탄소나노튜브는 과산화수소를 흡착하거나 이의 분해를 촉진시킨다고 알려졌다[21-23]. 이는 SWCNTs가 전극의 전기 전도도 향상뿐만 아니라 과산화수소 제거에도 일부 기여함을 시사한다. 그렇지만 CP-SWCNTs-LOx-Cat가 CP-SWCNTs-LOx보다 많은 전류를 생산하기 때문에 SWCNTs로 개질된 전극도 카탈라아제 도입이 필요하다. 절연체인 LOx가 전극의 전도성을 떨어뜨리고 부산물로 생성된 과산화수소가 LOx의 활성을 감소시킬 뿐만 아니라 생성되는 전자를 포획하므로 CP-LOx 전극이 생성하는 전류량이 적을 수밖에 없다. SWCNTs가 전극의 전도성을 증가시키고 카탈라아제가 과산화수소 분해를 촉진시켜 CP-SWCNTs-LOx-Cat 전극이 CP-LOx 전극보다 훨씬 많은 전류를 생성하였다고 판단되었다.

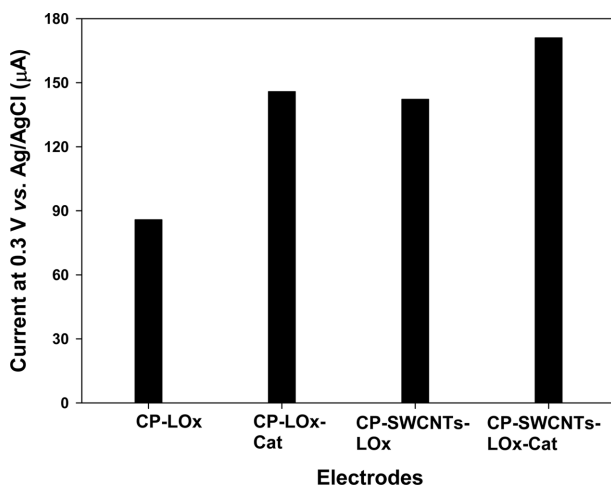


Fig. 6. Magnitude of anodic current at 0.3 V (vs. Ag/AgCl), extracted from cyclic voltammograms for four kinds of electrodes.

3-3. CP-SWCNTs-LOx-Cat 전극의 젖산 센싱 특성

시간대전류법을 사용하여 PBS (pH 7.0) 또는 인공땀[22]에서 젖산 농도를 변화(5-30 mM)시키며 가장 우수한 성능을 보인 CP-SWCNTs-LOx-Cat의 젖산 센싱 특성을 조사하였다. 두 종류 용액에서 전극이 생산하는 전류량은 시간에 따라 감소하다 정상상태에 도달하였다(Fig. 7(a)&(b)). 전류량이 일정하게 유지된 시간대인 60-100초 동안에 생성된 전류량의 평균값을 취하여 젖산 농도에 따른 생성 전류량으로 도시하였다(Fig. 7(c)). PBS 용액에서 첨가된 젖산 농도가 증가함에 따라 전극의 생산 전류량이 증가하였고 20 mM 젖산에서 최대 전류를 생산한 이후 젖산 농도 증가에도 전류량은 더 이상 증가하지 않았다. 일반적인 효소 반응에서 기질 농도 증가에 따라 반응속도가 증가하지만 기질 농도가 일정 수준에 이르면 반응속도는 더 이상 증가하지 않는다. 이는 효소가 기질과 결합하여 포화상태에 이르기 때문이다[24]. 본 연구결과와 선행 연구결과를 종합해 볼 때, 20 mM 이상의 젖산에서 전극의 생산 전류량이 더 이

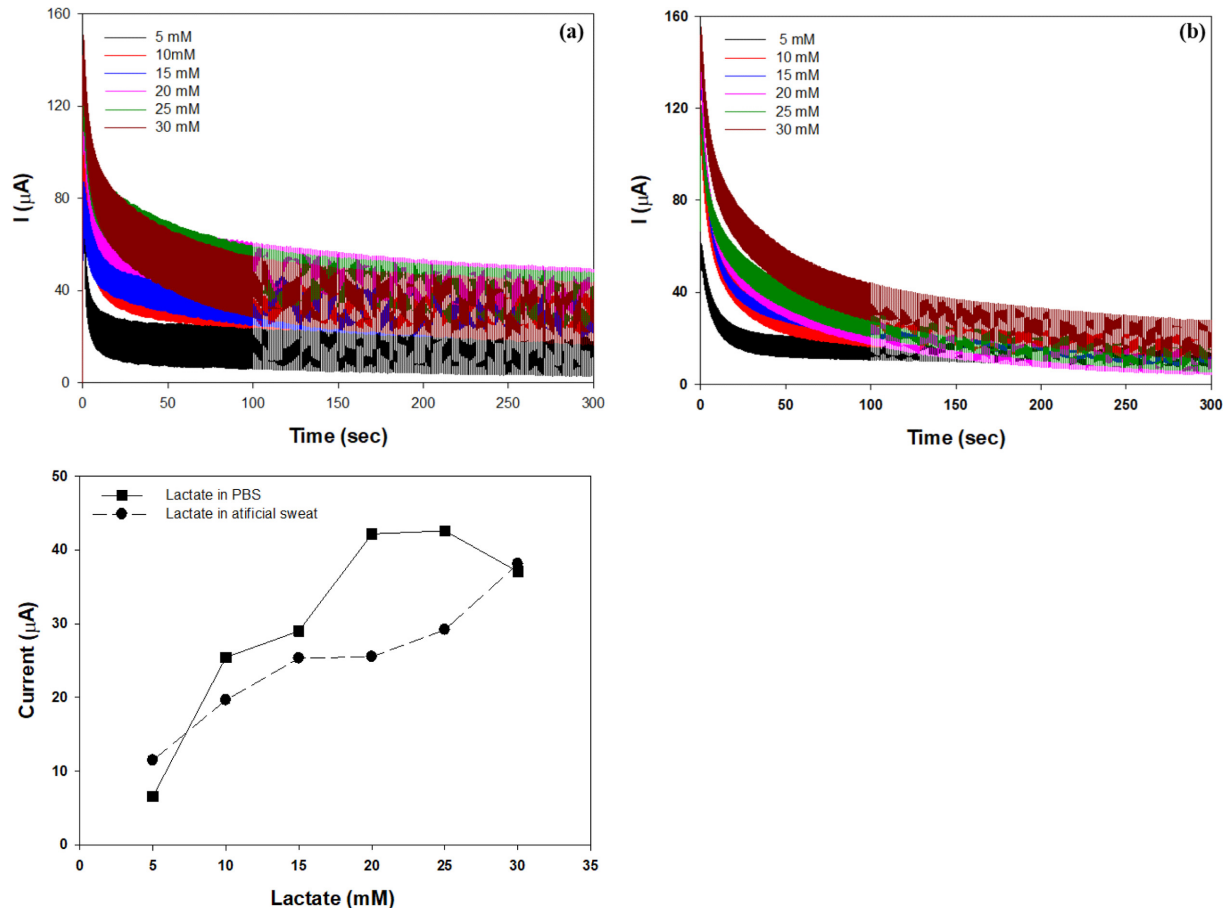


Fig. 7. Chronoamperometric measurements obtained at 0.3 V (vs. Ag/AgCl) of CP-SWCNTs-LOx-Cat by increasing lactate concentration in (a) 10 mM PBS (pH 7.0), (b) artificial sweat and (c) corresponding curves for (a)&(b).

상 증가하지 않는 것은 그 농도에서 젖산 산화효소가 젖산으로 포화되었기 때문인 것으로 사료된다. 유사한 젖산 농도-전류 검량선이 보고되었다[25]. 인공 땀에서도 젖산 농도 증가에 따라 전극이 생산하는 전류량은 지속적으로 증가하였으나 동일 양의 젖산이 첨가된 PBS에서보다는 적었다. 민감도(sensitivity)는 센서의 특성을 나타내는 지표 중 하나로 기질 농도 변화에 따른 전류 생성량을 의미한다[26]. Fig. 7(c)에서 단위 젖산 농도 변화에 대한 생성 전류 변화량(기울기)은 PBS에서 $2.2 \mu\text{A}/\text{mM}$ 이고 인공 땀에서 $0.9 \mu\text{A}/\text{mM}$ 였다. 이는 인공땀보다 PBS에 존재하는 젖산을 검출하는 경우에 전극의 민감도가 2.4배 높다는 것을 의미한다. PBS는 이상적인 전해질 용액으로 젖산 산화효소가 잘 작용할 수 있는 환경을 조성해준다. 인공 땀에는 젖산 외에도 젖산 센싱을 간섭하는 물질로 알려진 포도당, 우레아, 및 NaCl 등이 포함되어 있다[27]. 많은 연구자들이 이들 물질들의 농도 영향을 조사한 결과, 젖산 센서의 센싱 감도가 0.17 mM 포도당[28]과 100 mM NaCl[29]에 의해 영향을 받지 않는 반면, 우레아 영향에 대해서는 센서 시스템에 따라 다른 결과들이 보고되었다. Jiang 등[29]은 Prussian Blue, 환원 그래핀(rGO), 금 나노입자, 젖산 산화효소로 구성된 센서에서 20 M 우레아는 젖산 검출에 영향을 미치지 않았다고 보고한 반면, Chunha-Silva 등은 백금(platinum)으로 개질된 전극표면에 LOx가 부착된 젖산 센서가 10 mM의 우레아를 포함한 젖산용액에서 젖산 검출이 간섭을 받았다고 보고하였다[28]. 본 실험 결과와 보고된 내용을 종합하여 인공

땀에 포함된 우레아가 본 연구에서 제작된 전극의 젖산 검출 성능을 감소시키는 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 탄소종이-젖산 산화효소 전극에 카탈라아제 또는 단일벽 탄소나노튜브의 도입 유무가 전극 성능에 미치는 영향을 조사하였다. 젖산 산화효소와 카탈라아제가 동시에 고정화된 전극은 젖산 산화효소만 부착된 전극보다 월등히 많은 양의 전류를 생성하였다. 단일벽 탄소나노튜브로 개질된 탄소종이에 부착된 젖산 산화효소 전극이 탄소종이에 부착된 젖산 산화효소 전극보다 월등히 많은 양의 전류를 생성하였다. 단일벽 탄소나노튜브로 개질된 탄소종이 표면에 젖산 산화효소와 카탈레이즈가 동시에 고정화된 전극은 탄소종이 표면에 젖산 산화효소만 고정화된 전극보다 2배 많은 전류를 생산하였다. 최적화된 전극(CP-SWCNTs-LOx-Cat)이 PBS에 존재하는 젖산을 검출하는 경우가 인공 땀에 존재하는 젖산을 검출할 때보다 전극의 민감도가 2.4배 높았다.

감 사

이 성과는 정부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2020R1F1A1054433, 2021RIS-003).

References

1. Rathee, K., Dhull, V., Dhull, R., Singh, S., "Biosensors Based on Electrochemical Lactate Detection: A Comprehensive Review," *Biochem. Biophys. Rep.*, **5**, 35-54(2016).
2. Madden, J., Vaughan, E., Thompson, M., Riordan, A.O., Galvin, P., Lacopino, D. and Teixeira, S.R., "Electrochemical Sensor for Enzymatic Lactate Detection Based on Laser-scribed Graphitic Carbon Modified with Platinum, Chitosan and Lactate Oxidase," *Talanta*, **246**, 123492(2022).
3. Derbyshire, P. J., Barr, H., Davis, F. and Higson, S. P., "Lactate in Human Sweat: A Critical Review of Research to the Present Day," *J. Physiol. Sci.*, **62**, 429-440(2012).
4. Chung, M., Fortunato, G. and Radacsi, N., "Wearable Flexible Sweat Sensors for Healthcare Monitoring; A Review," *J. R. Soc. Interface*, **16**, 20190217(2019).
5. Kim, H. H., Yoo, J. and Choi, M. K., "Non-invasive Wearable Continuous Monitoring Sensors," *Polym. Sci. Technol.*, **31**, 286-290(2020).
6. Nagamine, K., Mano, T., Nomura, A., Ichimura, Y., Izawa, R., Furusawa, H., Matsui, H., Kumaki, D. and Tokito, S., "Non-invasive Sweat-Lactate Biosensor Employing a Hydrogel-Based Touch Pad," *Sci. Rep.*, **9**, 10102(2019).
7. He, W., Wang, C., Wang, H., Jian, M., Lu, W., Liang, X., Zhang, X., Yang, F. and Zhang, Y., "Integrated Textile Sensor Patch for Real-time and Multiplex Sweat Analysis," *Sci. Adv.*, **5**, eaax0649 (2019).
8. Hoovels, K. V., Xuan, X., Cuartero, M., Gijssels, M., Swaren, M. and Crespo, G. A., "Can Wearable Sweat Lactate Sensors Contribute to Sports Physiology?," *ACS Sens.*, **6**, 3496-3508(2021).
9. Rahman, M. M., Shiddiky, M. J. A., Rahman, M. A. and Shim, Y.-B., "A Lactate Biosensor Based on Lactate Dehydrogenase/Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Oxidized Form) Immobilized on A Conducting Polymer/Multiwall Carbon Nanotube Composite Film," *Anal. Biochem.*, **384**, 159-165(2009).
10. Hiraka, K., Tsugawa, W., Asano, R., Yokus, M. A., Ikebukuro, K., Daniele, M. A. and Sode, K., "Rational Design of Direct Electron Transfer Type L-Lactate Dehydrogenase for The Development of Multiplexed Biosensor," *Biosens. Bioelectron.*, **176**, 112933(2021).
11. Gamero, M., Pariente, F., Lorenzo, E. and Alonso, C., "Nanostructured Rough Gold Electrodes for the Development of Lactate Oxidase-Based Biosensors," *Biosens. Bioelectron.*, **25**, 2038-2044 (2010).
12. Choi, H., Yeo, M., Kang, Y., Kim, H. J., Park, S. G., Jang, E., Park, S. H., Kim, E. and Kang, S., "Lactate Oxidase/Catalase-Displaying Nanoparticles Efficiently Consume Lactate in The Tumor Microenvironment to Effectively Suppress Tumor Growth," *J. Nanobiotechnol.*, **21**, 5(2023).
13. Andrus, L. P., Unruh, R., Wisniewski, N. A. and McShane, M. J., "Characterization of Lactate Sensors Based on Lactate Oxidase and Palladium Benzoporphyrin Immobilized in Hydrogels," *Biosensors*, **5**, 398-416(2015).
14. Pichardo, S., Gutierrez-Praena, D., Puerto, M., Sanchez, E., Grilo, A., Camean, A. M. and Jos, A., "Oxidative Stress Response to Carboxylic Acid Functionalized Single Wall Carbon Nanotubes on the Human Intestinal Cell Line Caco-2," *Toxicol. In Vitro*, **26**, 672-677(2012).
15. Heller, A., "Electrical Connection of Enzyme Redox Centers to Electrodes," *J. Phys. Chem.*, **96**, 3579-3587(1992).
16. Ammam, M. and Fransaer, J., "AC-Electrophoretic Deposition of Metalloenzymes: Catalase As A Case Study for The Sensitive and Selective Detection of H₂O₂," *Sens. Actuators B: Chem.*, **160**, 1063-1069(2011).
17. Zamocky, M., Regelsberger, G., Jakopitsch, C. and Obinger, C., "The Molecular Peculiarities of Catalase-Peroxidases," *FEBS Lett.*, **492**, 177-182(2001).
18. Quyang, T., Feldman, B. J. and Chen, K., "Stabilized Lactate Responsive Enzymes, Electrodes and Sensors, and Methods for Making and Using the Same," European Patent No. EP 3 307 164 B1(2016).
19. Quyang, T., Feldman, B. J. and Chen, K., "Stabilized Lactate Responsive Enzymes, Electrodes and Sensors, and Methods for Making and Using the Same," U.S. Patent No. US2016/0362716 A1(2016).
20. Kuposova, E., Shumilova, G., Ermolenko, Y., Kisner, A., Offenhausser, A. and Mourzina, Y., "Direct Electrochemistry of cyt C and Hydrogen Peroxide Biosensing on Oleylamine-And Citrate-Stabilized Gold Nanostructures," *Sens. Actuators B: Chem.*, **207**, 1045-1052(2015).
21. Voitko, K., Toth, A., Demianenko, E., Dobos, G., Berke, B., Bakalinska, O., Grebenyuk, A., Tombacz, E., Kuts, V., Tarasenko, Y., Kartel, M. and Laszlo, K., "Catalytic Performance of Carbon Nanotubes in H₂O₂ Decomposition: Experimental and Quantum Chemical Study," *J. Colloid Interface Sci.*, **437**, 283-290(2015).
22. Moreno, J., Kasai, K., David, M., Nakanishi, H. and Kasai, H., "Hydrogen Peroxide and Adsorption on Fe-Filled Single-Walled Carbon Nanotubes: A Theoretical Study," *J. Phys.: Condens. Matter*, **21**, 064219(2009).
23. Engel, P. S., Billups, W. E., Abmayr Jr, D. W., Tsvaygboym, K. and Wang, R., "Reaction of Single-Walled Carbon Nanotubes with Organic Peroxides," *J. Phys. Chem. C*, **112**, 695-700(2008).
24. Willey, J. M., Sherwood, L. M. and Woolverton, C. J., Prescott, Harley, and Klein's Microbiology, 7th ed., McGraw-Hill, New York, NY(2008).
25. Payne, M. E., Zamarayeva, A., Pister, V. I., Yamamoto, N. A. D. and Arias, A. C., "Printed, Flexible Lactate Sensors: Design Considerations Before Performing On-Body Measurements," *Sci. Rep.*, **9**, 13720(2019).
26. Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N. and Estrela, P., "Introduction to Biosensors," *Essays Biochem.*, **60**, 1-8(2016).
27. Ibupoto, Z. H., Shah, S. M. U. A., Khun, K. and Willander, M., "Electrochemical L-Lactic Acid Sensor Based on Immobilized ZnO Nanorods with Lactate Oxidase," *Sensors*, **12**, 2456-2466(2012).
28. Cunha-Silva, H. and Arcos-Martinez, M. J., "Dual Range Lactate Oxidase-Based Screen Printed Amperometric Biosensor for Analysis of Lactate in Diversified Samples," *Talanta*, **188**, 779-787(2018).
29. Jiang, D., Xu, C., Zhang, Q., Ye, Y., Cai, Y., Li, K., Li, Y., Huang, X. and Wang, Y., "In-Situ Preparation of Lactate-Sensing Membrane for The Noninvasive And Wearable Analysis of Sweat," *Biosens. Bioelectron.*, **210**, 114303(2022).

Authors

Ke Shi: Master's course, Department of Chemical Engineering, Gyeongsang National University, Jinju, 52828, Korea; 1105759178@qq.com

Varshini Selvarajan: Master's course, Department of Chemical Engineering, Gyeongsang National University, Jinju, 52828, Korea; varsha0910@gnu.ac.kr

Yeong-Yil Yang: Professor, Department of Semiconductor Engineering, Gyeongsang National University, Jinju, 52828, Korea; yyang@gnu.ac.kr

Hyug-Han Kim: Professor, Department of Chemistry, Dankook University, Cheonan, 3116, Korea; hankim@dankook.ac.kr

Chang-Joon Kim: Professor, Department of Chemical Engineering, Gyeongsang National University, Jinju, 52828, Korea; cj_kim@gnu.ac.kr