

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0050359 (43) 공개일자 2012년05월18일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 33/48 (2006.01) G01N 33/573 (2006.01) G01N 27/26 (2006.01)		(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(21) 출원번호 10-2010-0111810	(22) 출원일자 2010년11월10일 심사청구일자 없음	(72) 발명자 김재환 인천광역시 연수구 원인재로 81, 101동 101호 (동춘동, 럭키아파트)
		(74) 대리인 특허법인세진

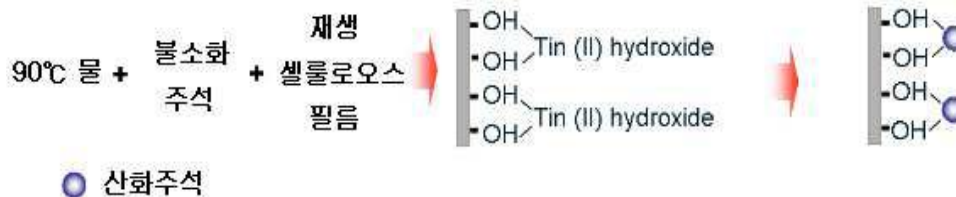
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 산화주석-셀룰로오스 나노복합재료 만든 일회용 바이오 센서, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 측정 방법

(57) 요약

본 발명은 재생 셀룰로오스 필름 표면에 산화주석을 코팅하고 생화학적 수용체를 통상의 방법으로 고정하여 생분해성, 생적합성, 유연성, 저가격, 고성능, 일회용의 특징을 갖는 산화주석-셀룰로오스 바이오 센서, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 측정 방법을 제공한다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

재생 셀룰로오스 필름;

상기 재생 셀룰로오스 필름상에 형성되고 산화주석 나노입자로 이루어지는 산화주석 코팅층; 및

상기 산화주석 코팅층 상에 고정되는 생화학적 수용체를 포함하는 것을 특징으로 하는 산화주석-셀룰로오스 나노복합재 바이오센서.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생화학적 수용체는 인트랩먼트(entrapment), 피막형성(encapsulation), 공유결합(covalent binding), 가교결합(crosslinking) 및 흡착(adsorption) 중 어느 하나에 의해 고정되는 것을 특징으로 하는 산화주석-셀룰로오스 나노복합재 바이오센서.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 생화학적 수용체는 포도당 산화효소, 유레이즈, L-AA 산화효소, L-티로신 카르복실라제, 글루타미나제, 글루타메이드 디하이드라제나아제, 아스파라기나제, D-AA 산화효소, 페니실리나아제, b-글루코옥시다제 및 니트레이트 환원효소 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 산화주석-셀룰로오스 나노복합재 바이오센서.

청구항 4

재생 셀룰로오스 필름을 제공하는 단계;

상기 재생 셀룰로오스 필름상에 산화주석 나노입자로 이루어지는 산화주석 코팅층을 형성하는 단계; 및

상기 산화주석 코팅층 상에 생화학적 수용체를 고정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 산화주석-셀룰로오스 나노복합재 바이오센서의 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 산화주석 코팅층을 형성하는 단계는 불소산화주석(SnF_2)을 증류수와 90°C 에 1-15mM 사이의 농도로 섞은 후 재생셀룰로오스 필름을 넣고 3 내지 24시간동안 교반하는 것을 포함하는 산화주석-셀룰로오스 나노복합재 바이오센서의 제조 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 생화학적 수용체를 고정하는 단계는 인트랩먼트(entrapment), 피막형성(encapsulation), 공유결합(covalent binding), 가교결합(crosslinking) 및 흡착(adsorption) 중 어느 하나에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 산화주석-셀룰로오스 나노복합재 바이오센서의 제조 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 생화학적 수용체는 포도당 산화효소, 유레이즈, L-AA 산화효소, L-티로신 카르복실라제, 글루타미나제, 글루타메이드 디하이드라제나아제, 아스파라기나제, D-AA 산화효소, 페니실리나아제, b-글루코옥시다제 및 니트레이트 환원효소 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 산화주석-셀룰로오스 나노복합재 바이오센서의 제조 방법.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 기재된 바이오센서를 피탐지 물질이 녹아있는 전해질 용액에 넣고 상기 바이오센서를 전류, 전압 또는 유전용량(Capacitance)을 측정하기 위한 측정수단에 전기적으로 연결하여 상기 측정수단을 통해 상기 피탐지 물질의 농도 또는 종류를 탐지하는 것을 특징으로 하는 산화주석-셀룰로오스 나노복합재 바이오센서를 이용한 측정 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 산화주석-셀룰로오스 나노복합재로 만든 일회용 바이오 센서, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 측정 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 바이오센서 (Biosensor)는 생물학적 수용체를 신호변환기와 연결시켜서 생화학적인 신호를 정량적인 전기신호로 바꾸는 디바이스이다.

[0003] 이러한 바이오기술과 전자기술의 결합은 바이오센서 기술이라는 새로운 분야를 탄생시켰다.

[0004] 바이오 센서는 각종 생리활성 물질 및 화학물질을 분석, 측정, 진단, 검출 등을 수행할 수 있고 기계적, 전기적 변형을 감지할 수 있어서 임상, 대기오염 측정, 수질측정, 식품, 군사, 일반산업, R&D 분야 등에 광범위하게 쓰인다.

[0005] 바이오센서의 생체 활성 복합물은 효소, 세포, 조직, 수용기, 항체 등이 있다. 생체 신호의 검출은 전기화학적, 광학적, 기계적, 물리적 변화를 이용하는 다양한 방식이 있다.

[0006] 생물학적 수용체를 전극에 고정하는 방식에는 인트랩먼트(entrapment), 피막형성 (encapsulation), 공유결합 (covalent binding), 가교결합 (crosslinking), 흡착 (adsorption)이 있다.

[0007] 생물학적 수용체를 신호변환기에 고정하는 방식은 반응시간, 감도, 안정성, 가격, 선택성 등 우수한 센서 특성의 구현에 영향을 미치게 된다.

[0008] 바이오센서의 중요한 부분은 신호변환기로서 생물학적 반응에 의한 생리화학적인 변화를 전기적인 신호로 나타내게 된다.

[0009] 바이오센서에 쓰이는 신호변환 기구에는 전류의 유출을 측정하는 방식 (amperometric), 전극 사이의 전기적인 전위차를 측정하는 방식 (potentiometric), 생화학적 반응에 의해 변화하는 온도를 측정하는 방식 (thermometric), 흡착/탈착에 의해 변하는 발진자의 진동주파수를 측정하는 방식 (piezoelectric), 생화학적 반응에서 발생하는 전자기 방사를 측정하는 광학 방식 그리고 전계 효과 트랜지스트(Field effect transistor) (FET)에 생화학적 반응이 발생했을 때 달라지는 전기적인 특성을 측정하는 FET 방식이 있다. 바이오센서의 제작 및 특성평가는 이러한 신호변환방식에 따라 달라진다.

[0010] 종래에, 요소(urea) 바이오센서로서 유레이즈(urease) 효소와 산화주석을 사용한 바이오 센서가 제조된 바 있다. 여기서, 산화주석을 500-800 °C에서 100W RF 파워의 플라즈마 강화 CVD를 사용하여 실리콘 웨이퍼에 증착을 하였으며 유레이즈를 산화주석 표면에 공유결합으로 고정시켰다. 1-100mM의 요소 농도에 대해 측정할 수 있으며 50mM의 농도에서 포화가 나타난다.

[0011] 또한, Polyvinyl sulfonate (PVS)로 도핑한 Polypyrrole (PPy)필름으로 요소 바이오 센서가 개발된 바 있다. PPy-PVS 필름은 다공성으로서 유레이즈 효소를 가교결합을 시켜 쉽게 고정할 수 있다. 광섬유를 사용하여 특성을 평가한 결과 1-100mM의 요소농도에 선형적으로 신호가 발생하였으며 높은 선택성과 재현성을 보였다.

[0012] 최근에는, 포도당센서가 탄소 전극에 올린 치토산 층에 포도당 산화효소 (glucose oxidase)를 가교결합하여 제조된 바 있다. 여기서 탄소 전극은 금-백금합금의 나노입자를 다중벽 탄소 나노튜브(multiwall carbon nanotube)에 전착(electrodeposition) 시켜서 만들었다. 이 바이오 센서는 전위차를 측정하는데 응답속도가 빠르고 0.001-7.0mM의 포도당 농도영역에서 선형적인 응답을 보인다.

[0013] 또한 백금 나노입자로 처리된 탄소나노섬유로 포도당 바이오센서가 제조되기도 하였다. 탄소나노섬유를 흑연층에 정장을 시키고 백금 나노입자로 탄소나노튜브를 수정한 후 포도당 산화효소를 입힌 위에 네이피온(Nafion) 이온막을 씌웠다. 그 결과 0.1- 13.5 mM의 포도당 농도에서 빠른 응답특성을 가지고 높은 전류밀도와 민감도를 나타냈다.

[0014] 하지만, 상기한 바와 같이 지금까지 연구된 바이오 센서들은 생적합성, 생분해성이 없으며 제조가격이 비싸고 광학을 이용하는 경우 신호변환기가 비싸지는 문제점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명은 상술한 바이오센서가 갖고 있는 문제점을 해결하기 위한 것으로 생분해성, 생적합성, 저가격, 제조용이성, 유연성이 있는 일회용 바이오센서, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 측정 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명에 따른 산화주석-셀룰로오스 나노복합재 바이오센서는,
- [0017] 재생 셀룰로오스 필름;
- [0018] 상기 재생 셀룰로오스 필름상에 형성되고 산화주석 나노입자로 이루어지는 산화주석 코팅층; 및
- [0019] 상기 산화주석 코팅층 상에 고정되는 생화학적 수용체를 포함한다.
- [0020] 바람직하게는, 상기 생화학적 수용체는 인트랩먼트(entrapment), 피막형성(encapsulation), 공유결합(covalent binding), 가교결합(crosslinking) 및 흡착(adsorption) 중 어느 하나에 의해 고정된다.
- [0021] 바람직하게는, 상기 생화학적 수용체는 포도당 산화효소, 유레이즈, L-AA 산화효소, L-티로신 카르복실라제, 글루타미나제, 글루타메이드 디하이드라지나아제, 아스파라기나제, D-AA 산화효소, 페니실리나아제, b-글루코옥시다제 및 니트레이트 환원효소 중 어느 하나이다.
- [0022] 또한, 본 발명의 다른 측면에 따른 산화주석-셀룰로오스 나노복합재 바이오센서의 제조 방법은,
- [0023] 재생 셀룰로오스 필름을 제공하는 단계;
- [0024] 상기 재생 셀룰로오스 필름상에 산화주석 나노입자로 이루어지는 산화주석 코팅층을 형성하는 단계; 및
- [0025] 상기 산화주석 코팅층 상에 생화학적 수용체를 고정하는 단계를 포함한다.
- [0026] 바람직하게는, 상기 산화주석 코팅층을 형성하는 단계는 불산화주석(SnF_2)을 증류수와 90 °C에 1-15mM 사이의 농도로 섞은 후 재생셀룰로오스 필름을 넣고 3 내지 24시간동안 교반하는 것을 포함한다.
- [0027] 바람직하게는, 상기 생화학적 수용체를 고정하는 단계는 인트랩먼트(entrapment), 피막형성(encapsulation), 공유결합(covalent binding), 가교결합(crosslinking) 및 흡착(adsorption) 중 어느 하나에 의해 이루어진다.
- [0028] 바람직하게는, 상기 생화학적 수용체는 포도당 산화효소, 유레이즈, L-AA 산화효소, L-티로신 카르복실라제, 글루타미나제, 글루타메이드 디하이드라지나아제, 아스파라기나제, D-AA 산화효소, 페니실리나아제, b-글루코옥시다제 및 니트레이트 환원효소 중 어느 하나이다.
- [0029] 또한 본 발명의 또 다른 측면에 따른 산화주석-셀룰로오스 나노복합재 바이오센서를 이용한 탐지 방법은, 상기 바이오센서를 피탐지 물질이 녹아있는 전해질 용액에 넣고 상기 바이오센서를 전류, 전압 또는 유전용량(Capacitance)을 측정하기 위한 측정수단에 전기적으로 연결하여 상기 피탐지 물질의 농도 또는 종류를 탐지한다.

발명의 효과

- [0030] 지금까지 바이오센서는 생적합성, 생분해성이 없으며 제조가격이 비싸고 광학을 이용하는 경우 신호변환기가 비싸다.
- [0031] 본 발명은 이러한 단점을 보완하게 되므로 더욱 다양한 분야에 사용될 것이다. 재생셀룰로오스에 산화주석을 코팅하고 여기에 생화학적 수용체를 고정하여 만든 바이오센서는 재생셀룰로오스의 생분해성, 생적합성, 저가격, 유연성이 있고 산화주석에 생화학적 수용체를 안정되게 고정함으로써 균일한 센서성능을 보이고 장기간 시간이 지나도 안정된 성능을 보인다. 특히 재생셀룰로오스 종이로 만들어진 바이오센서이므로 일회용으로 값싸게 사용하기에 적합하다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 산화주석-셀룰로오스 바이오 센서의 단면 구성을 개략적으로 나타낸 도면이다,
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 셀룰로오스에 산화주석을 생성하는 과정을 나타낸다.
- 도 3는 본 발명의 일 실시예에 따른 산화주석-셀룰로오스 바이오 센서를 이용한 측정 시스템의 구성을 개략적으로 나타낸 도면이다,
- 도 4은 본 발명의 일 실시예에 따른 산화주석-셀룰로오스 요소 바이오센서 성능곡선을 나타낸다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 산화주석-셀룰로오스 포도당 바이오센서 성능곡선을 나타낸다.
- 도 6은 본 발명에 따른 산화주석-셀룰로오스 바이오센서의 시간에 따른 성능곡선을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 산화주석-셀룰로오스 바이오 센서의 단면 구성을 개략적으로 나타낸 도면이다. 도 1에 나타난 바처럼, 본 발명의 일 실시예에 따른 산화주석-셀룰로오스 바이오 센서는 재생 셀룰로오스 필름(11), 상기 재생 셀룰로오스 필름(11)상에 형성되고 산화주석 나노입자로 이루어지는 산화주석 코팅층(12); 및 상기 산화주석 코팅층(12) 상에 고정되는 생화학적 수용체(13)를 포함한다.
- [0034] 자연의 나무나 식물에 존재하는 파이버는 셀룰로오스, 리그닌, 헤미셀룰로오스로 구성되어 있다. 셀룰로오스는 자연에서 매년 약 1500억 톤이 생산되고 있으며 자연계에 존재하는 가장 풍부한 유기물질이다. 셀룰로오스는 생분해성, 생적합성, 저가격, 유연성, 우수한 기계적 강도의 장점이 있다.
- [0035] 산화주석-셀룰로오스 나노복합재 바이오센서(10)를 만들기 위해서는 먼저 재생셀룰로오스 필름(11)을 만든다.
- [0036] 재생 셀룰로오스 필름(11)은 셀룰로오스 펄프를 녹인 후 용매를 제거하면서 셀룰로오스 섬유를 재생하여 만든 필름이다.
- [0037] 셀룰로오스는 일반적인 용매에 녹지 않는 특성이 있어 수산화나트륨, 황산, N,N'-dimethylacetamide (DMAc), N-methylmorpholine-N-oxide (NMMO) 등의 용매를 사용하여 셀룰로오스를 녹여 가공을 하고 있다. 재생셀룰로오스는 셀룰로오스 펄프를 LiCl과 섞은 후 약 110 °C로 한 시간 가량 가열하고, LiCl을 DMAc에 녹인 용액을 위에서 처리된 셀룰로오스 펄프와 같이 섞은 후 155 °C로 가열 후 40 °C로 두 시간 정도 냉각한다. 이렇게 만든 투명한 셀룰로오스 용액을 테이프 캐스팅한 후 증류수와 아이소프로필 알코올을 섞은 용액에 담가서 DMAc와 LiCl 용매를 빼냄으로서 재생 셀룰로오스 필름(11)을 만든다.
- [0038] 산화주석 코팅층(12)을 형성 하는 방법은 먼저 불소화주석 (SnF_2)을 증류수와 90 °C에 1-15mM 사이의 농도로 섞은 후 재생셀룰로오스 필름을 넣고 3 내지 24시간동안 교반한다. 이 때 용액은 6시간 간격으로 새로운 용액으로 교체한다. 이 과정 속에서 산화주석 코팅층(12)이 연속적으로 재생셀룰로오스의 표면과 표피속에서 생성되게 된다. 산화주석 코팅층(12)이 형성된 재생 셀룰로오스 필름(11)은 증류수로 씻은 후 상온에서 건조한다. 도 2에 나타난 것처럼, 용액 속에서 산화주석(SnO_2)이 생성되는 과정은 먼저 용액속에 있는 SnF_2 가 $\text{SnF}(\text{OH})$ 로 재생셀룰로오스 표면에서 먼저 생성되고 이것이 Sn(II) hydroxide로 변형된 후 열가수분해(thermal hydrolysis)에 의해서 산화주석으로 바뀐다. 산화주석은 재생셀룰로오스 표면에서 층을 이루고 셀룰로오스 표피층 아래에 어느 정도 침투하여 생성되는 것을 알 수 있다.
- [0039] 이렇게 얻어진 재생 셀룰로오스 필름(11)과 산화주석 코팅층(12)의 나노복합체는 재생 셀룰로오스 필름(11)의 장점과 산화주석 코팅층(12)의 전기적 특성 및 기능성을 함께 살릴 수 있다. 즉, 이 나노복합체는 약 310 °C 이상의 고온에서도 잘 견딜 수 있으며, 전기적 특성이 좋다(전기전도도 측정 결과 최대 0.5 S/m). 또한 이 나노복합체는 유연하고 생분해성과 생적합성을 갖는다.
- [0040] 바이오센서(10)의 제작에서 중요한 부분은 생화학적 수용체(13)를 신호변환기(본 발명에서는 산화주석 코팅층(12))에 고정하는 과정(Immobilization)이다. 이 고정과정은 바이오센서(10)의 성능과 신뢰성을 좌우한다. 전술한 바와 같이 고정과정에는 인트랩먼트(entrapment), 피막형성(encapsulation), 공유결합(covalent binding), 가교결합(crosslinking), 흡착(adsorption)의 여러 방법이 있는데 각각에는 장점과 단점이 있다.
- [0041] 본 발명에서는 여러 가지의 생화학적 수용체를 다양한 방법으로 고정할 수 있는데, 예를 들어, 요소 바이오센서의 경우 유레이즈(Urease) 효소를 흡착의 방법으로 고정을 하고, 포도당 바이오센서의 경우 포도당 산화효소

(Glucose Oxidase)를 흡착의 방법으로 고정한다. 아래 표 1은 생화학적 물질에 따라 필요로 하는 수용체를 나타낸다.

표 1

종류	효소
L-Amino acids:	L-AA oxidase
L-Tyrosine	L-Tyrosine carboxylase
L-Glutamine	Glutaminase
L-Glutamic acid	Glutamate dehydrogenase
L-Asparagine	Asparaginase
D-Amino acids	D-AA oxidase
Penicillin	Penicillinase
Amygdalin	b-Glucooxidase
Nitrate	Nitrate reductase

도 3는 본 발명의 일실시예에 따른 산화주석-셀룰로오스 바이오 센서를 이용한 측정 시스템의 구성을 개략적으로 나타낸 도면이다. 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 바이오 센서(10)를 전해조(1) 내의 피탐지 물질(3)이 녹아 있는 전해질 용액(2)에 넣고 바이오 센서(10)를 측정 수단(20)에 전기적으로 연결한다. 여기서, 상기 측정 수단(20)은 바이오 센서(10)의 변화하는 전류, 전압 또는 유전용량(Capacitance)을 측정하여 상기 피탐지 물질(3)의 농도 또는 종류를 탐지할 수 있다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 산화주석-재생 셀룰로오스로 만든 일회용 요소 바이오센서의 성능을 나타낸다. 본 발명의 일 실시예에 따른 산화주석-셀룰로오스 요소 바이오 센서는 재생 셀룰로오스 필름, 상기 재생 셀룰로오스 필름상에 형성되고 산화주석 나노입자로 이루어지는 산화주석 코팅층; 및 상기 산화주석 코팅층 상에 고정되는 생화학적 수용체로 유래이즈 효소를 포함한다.

여기서 민감도 (sensitivity)는 다음과 같이 정의된다.

$$Sensitivity = \frac{\left(\frac{\Delta I}{\Delta V} \right)_x - \left(\frac{\Delta I}{\Delta V} \right)_0}{\left(\frac{\Delta I}{\Delta V} \right)_0}$$

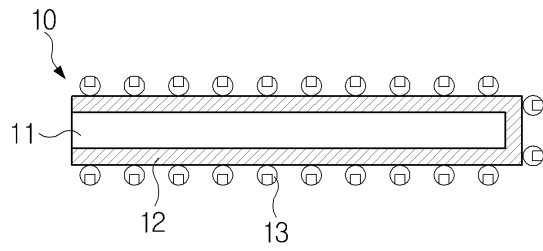
여기서 (DI/DV) 는 전기 포텐셜 곡선 ($I-V$)의 기울기를 말하며 $(DI/DV)_x$ 는 x 물에서의 기울기이고 $(DI/DV)_0$ 는 0 물에서의 기울기이다. 산화주석-재생셀룰로오스로 만든 요소 바이오센서의 경우 10mM의 요소 농도까지 선형적인 응답특성을 보인다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 산화주석-재생셀룰로오스로 만든 일회용 포도당 바이오센서의 성능을 나타낸다. 본 발명의 일 실시예에 따른 산화주석-셀룰로오스 포도당 바이오 센서는 재생 셀룰로오스 필름, 상기 재생 셀룰로오스 필름상에 형성되고 산화주석 나노입자로 이루어지는 산화주석 코팅층; 및 상기 산화주석 코팅층 상에 고정되는 생화학적 수용체로 포도당 산화 효소를 포함한다. 12mM의 포도당 농도까지는 선형적인 응답을 보이며 그 이후에는 포화된 응답을 보인다.

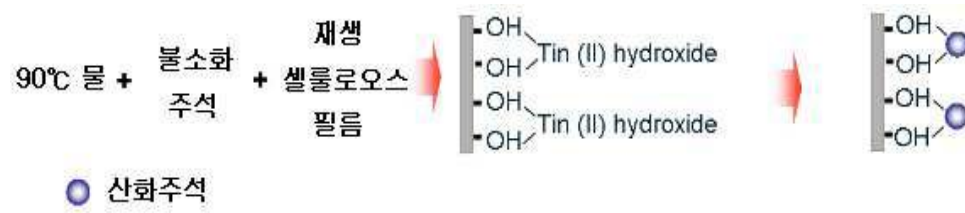
도 6은 본 발명에 따른 바이오센서의 안정성을 나타내는데 10일 동안 민감도에 거의 변화가 없음을 알 수 있다.

도면

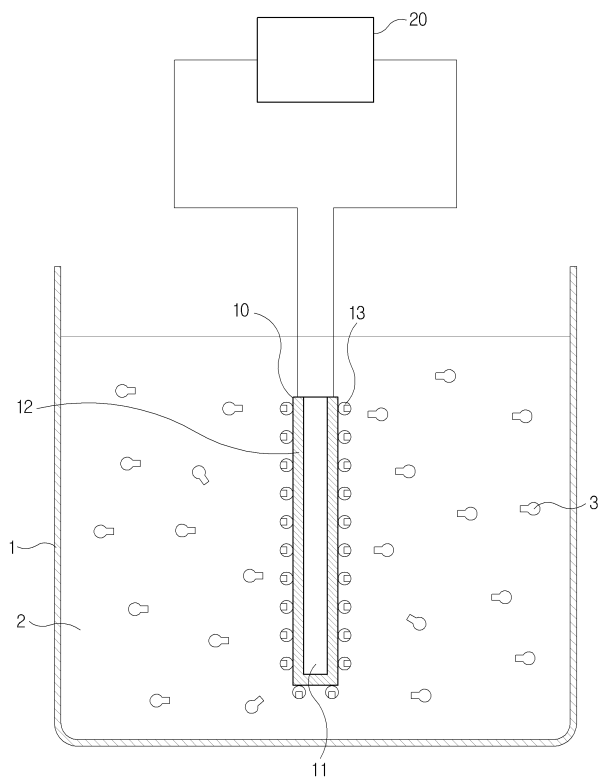
도면1



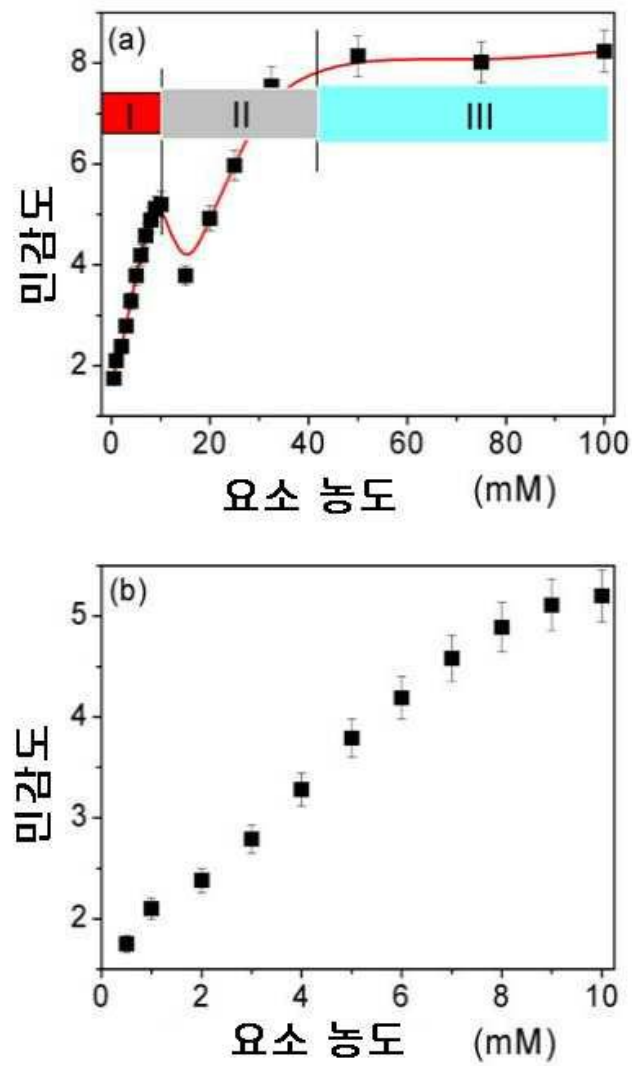
도면2



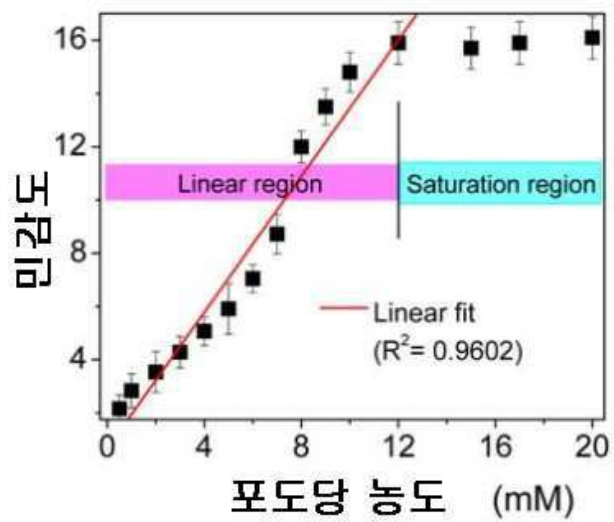
도면3



도면4



도면5



도면6

