



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0084380
(43) 공개일자 2013년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

H01M 8/16 (2006.01) *H01M 4/86* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) *C12Q 1/26* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0005106

(22) 출원일자 2012년01월17일

심사청구일자 2012년01월17일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

신운섭

서울특별시 마포구 대흥동 마포태영아파트 107동 1204호

권덕

서울특별시 마포구 신수동 34번지 19호 가뉴고시원 303호

(74) 대리인

이준혁

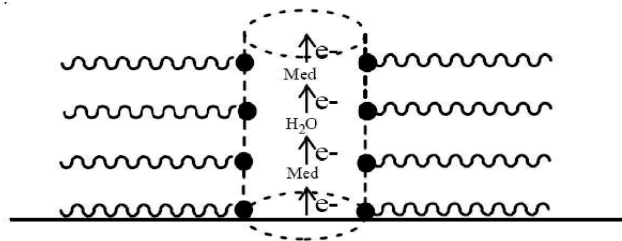
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **고효율의 산화-환원 활성 전극 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 다양한 전기화학 반응의 산화-환원 플랫폼으로 유용한 산화-환원 활성 전극에 관한 것으로, 향후 전기화학 반응이 수반되는 다양한 응용 분야, 특히 전기촉매분야, 생전기화학 분야 등에 효과적으로 적용될 수 있다.

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

전극; 및

상기 전극 표면 위에 형성되고, (i) 산화-환원 매개체로 개질된, 측쇄에 설편기를 갖는 이온교환수지 및 (ii) 친수성 폴리우레탄을 포함하는 멤브레인;

을 포함하는 산화-환원 활성 전극.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 산화-환원 매개체는 금속 착물($M(\text{ligand})_x^{n+}$), 비올로겐 화합물, 암모늄-연결(linked) 산화-환원 화합물 또는 이의 조합인 것을 특징으로 하는 산화-환원 활성 전극;

상기에서 M은 루테튬(Ru), 오스뮴(Os) 또는 코발트(Co), 철(Fe), 구리(Cu), 니켈(Ni) 이고, x는 3 내지 6이며, 그리고 n은 2 내지 3임;

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 비올로겐 화합물은 메틸 비올로겐, 디메틸메틸비올로겐, 페닐비올로겐, 벤질비올로겐 또는 이의 조합인 것을 특징으로 하는 산화-환원 활성 전극.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 이온교환수지는 채널구조를 구비하고, 상기 채널의 내벽에 설편기가 위치하여 채널 내에서 이온교환 반응이 일어나는 과불화 양이온교환수지인 것을 특징으로 하는 산화-환원 활성 전극.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 전극은 SPCE(screen printed carbon paste electrode), 잉크젯 인쇄 흑연 전극(inkjet printed graphite electrode) 또는 유리탄소 전극(glassy carbon electrode; GCE)인 것을 특징으로 하는 산화-환원 활성 전극.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 친수성 폴리우레탄은 5~25%의 물을 함유하는 것을 갖는 것을 특징으로 하는 산화-환원 활성 전극.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 멤브레인이 (i) 산화-환원 매개체로 개질된, 측쇄에 설편기를 갖는 이온교환수지 30~50중량% 및 (ii) 친수성 폴리우레탄 70~50중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 산화-환원 활성 전극.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 멤브레인의 두께는 1내지 100 μm 범위인 것을 특징으로 하는 산화-환원 활성 전극.

청구항 9

제1항에 있어서, 산화-환원 매개체/이온교환수지의 비(몰 기준)가 10 내지 300 범위인 것을 특징으로 하는 산화-환원 활성 전극.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 산화-환원 활성 전극은 -0.8 내지 1.1V (pH 7.0) 범위의 형식 전위(E^0)를 갖는 것을 특징으로 하는 산화-환원 활성 전극.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 멤브레인은 촉매를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 산화-환원 활성 전극.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 촉매는 효소인 것을 특징으로 하는 산화-환원 활성 전극.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 효소는 산화 또는 환원 효소 및 탈수소 효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 산화-환원 활성 전극.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 산화 또는 환원 효소는 아질산염 환원효소(NiR), 질산염 환원효소, 카르보닐 환원효소, 모르피논 환원효소, 자일로스 환원효소, 멘톤 환원효소, 알도스 환원효소, 과산화효소(예를 들면, 호스래디쉬 과산화효소(HRP)), 글루코스 산화효소, 라데이트 산화효소, 사르코신 산화효소, 콜린 산화효소, 콜레스테롤 산화효소, 크산틴 산화효소, 빌리루빈산화효소 또는 암모늄염 산화효소이고;

상기 탈수소 효소는 알코올 탈수소효소, 알데히드 탈수소효소, 포름메이트 탈수소효소, 포름알데히드 탈수소효소, 글루코즈 탈수소효소, 락테이트 탈수소효소, 락토오스 탈수소효소 또는 피루베이트 탈수소효소인 것을 특징으로 하는 산화-환원 활성 전극.

청구항 15

제11항에 있어서, 산화-환원 매개체/이온교환수지의 비(몰 기준)는 10 내지 300 범위이고, 산화-환원 매개체/촉매의 비(몰 기준)는 3 내지 20 범위인 것을 특징으로 하는 산화-환원 활성 전극.

청구항 16

a) 산화-환원 매개체로 측쇄에 설피온기를 갖는 이온교환수지를 개질시키는 단계; 및

b) 전극 표면 위에 상기 개질된 이온교환수지를 함유하는 친수성 폴리우레탄 멤브레인을 형성하는 단계;

를 포함하되, 상기 이온교환수지가 채널구조를 구비하고, 상기 채널의 내벽에 설피온기가 위치하여 채널 내에서 이온교환 반응이 일어나는 과불화 양이온교환수지인 산화-환원 활성 전극의 제조방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 단계 b)는 촉매를 더 포함하는 멤브레인을 형성하는 단계인 것을 특징으로 하는 산화-환원 활성 전극의 제조방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 단계 a)는 수성 매질 내에서 11 내지 13 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 산화-환원 활성 전극의 제조방법.

청구항 19

a) 전극; 및 상기 전극 표면 위에 형성되고, (i) 산화-환원 매개체로 개질된, 측쇄에 설피온기를 갖는 이온교환수지, (ii) 효소 및 (iii) 친수성 폴리우레탄을 포함하는 멤브레인을 포함하는 산화-환원 활성 전극에 시료를 제공하는 단계; 및

b) 상기 산화-환원 전극 상에서 상기 효소와 상기 효소에 대응하는 시료 내 기질(substrate)과의 효소/기질 산화-환원반응에 의하여 발생된 전류 신호를 검출하는 단계;

를 포함하는 시료의 분석방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 고효율의 산화-환원 활성 전극, 이의 제조방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 다양한 전기화학 반응의 산화-환원 플랫폼으로 유용한 산화-환원 활성 전극 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전기화학 반응은 전극과 용액의 계면에서 일어나는 불균일 전하 전달(heterogeneous charge transfer) 과정이므로 용액의 내부(bulk)보다 전극-용액 계면(electrode-solution interface)의 전기 이중 층이나 확산 층(diffusion layer)의 미세한 변화에 따라 전기 화학 반응은 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 이때, 전극-용액 계면에서의 반응성을 적절히 조절하는 것은 전기화학 연구의 중요한 부분이다.

[0003] 이중 화학적 개질 전극(chemical modified electrode; CME) 분야는 미세한 수식을 통하여 계면의 특성을 규명하는 것을 목적으로 하고 있으며, 정량분석 등에 널리 이용될 수 있다. 이는 전이금속들이 전극에 대하여 고유한 감도를 갖고 있고, 전극의 계면에 금속 반응물들이 다양하게 배위하도록 제작할 수 있다는 장점이 있기 때문이다.

[0004] 화학적으로 개질된 전극(CME)은 다양한 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들면, 화학적 흡착(chemisorption), 공유 결합, 고분자(유기), 다핵(무기) 또는 복합 필름에 의한 코팅, 전극 매트릭스 물질과 개질제를 혼합하는 등의 방법으로 제조될 수 있다. 고분자 필름(예를 들면, 산화-환원 고분자, 전도성 고분자 및 다핵 무기 화합물)으로 피복된 CME가 널리 사용되고 있다. CME는 코팅 방식에 따라 구분될 수도 있는 바, 예를 들면 가교(cross-linking), 딥 코팅(dip coating), 전기화학적 부착(electrochemical deposition), 전기화학적 중합(electrochemical polymerization), 용매 증발(solvent evaporation), 스핀 코팅(스핀 캐스팅) 등이 알려져 있다.

[0005] 상술한 개질 전극은 그 자체가 반응 중 전자를 밀어내거나 끌어당기기 위한 반응물로서 역할을 하게 되며, 특히 전기적 촉매 특성은 다양한 전기화학 분야에서 활용될 수 있다는 점에서 주목할 만하다. 상기 전극이 산화-환원 플랫폼(platform)으로서 통상의 전기화학반응의 전위 범위를 모두 커버할 수 있다면, 그 활용성은 보다 증가될 것이라는 점 역시 명백하나, 종래에는 이에 대한 규명 및 관련 연구가 미흡한 실정이다.

[0006] 한편, 개질 전극으로서 산화-환원 매개체(redox mediator)를 함유하는 PSS(poly(4-styrenesulfonic acid) 등과 같은 고분자 필름으로 도포된 전극이 보고되었으며(미국특허번호 제4,619,754호 등), 최근에는 나피온(Nafion[®]) 고분자를 산화-환원 매개체 고정용 매트릭스로 사용한 경우도 관심의 대상이 되고 있다.

[0007] 이와 관련하여, 고분자 필름을 먼저 전극 위에 코팅한 다음, 매개체 용액에 침적시키거나(2 단계 방법), 매개체를 함유하는 고분자 용액을 전극에 도포하는 방법(1 단계 방법)이 알려져 있다. 상술한 전극은 촉매반응, 전기화학계 센서, 바이오 연료전지 등, 산화-환원이 수반되는 전기화학 분야에서 사용될 수 있다. 특히, 전기화학계 센서로 응용되는 경우, 전극 상에 타겟 성분의 존재를 식별하는 효소와 같은 촉매(생촉매)를 전극 상에 고정시킨 후에 고정된 촉매가 타겟 성분의 농도에 따라 산화-환원(redox)에 의하여 생성되거나 소비되는 전류를 이용하여 타겟 성분을 정량화할 수 있다.

[0008] 이때, 산화-환원 매개체가 전기화학계 센서의 산화-환원 촉매와 전극 사이에서의 전자 이동을 용이하게 하여 촉매의 전기화학 반응성을 향상시킨다. 이러한 전기화학계 센서는 글루코스, 과산화물 등의 다양한 타겟 성분의 검출 또는 분석에 널리 활용되고 있다.

[0009] 종래에 알려진 기술의 주류는 고분자 물질(고정 물질)과 산화-환원 매개체(및/또는 효소)를 단순 혼합하여 전극 표면에 코팅하는 방식으로 고정시키는 것이다. 이에 대하여, 소수성 양이온으로 개질된 고정 물질(고분자)을 이용하여 전극 상에 효소를 고정하는 기술도 제시되고 있으나, 이러한 고분자는 일정 수준 이상의 친수성을 갖고 있기 때문에 수용성 매질 내에서의 전기화학반응 중 용출되어 전극으로부터 탈리되는 등, 낮은 안정성이 문제제시되고 있다. 또한, 나피온과 같은 고분자 물질은 저장 과정(예를 들면, 공기 중)에서 촉매(특히, 효소의 경우)의 활성을 감소시킬 수 있는 점 역시 문제점으로 지적되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 이에 대하여, 본 발명자들은 각종 전기화학 반응의 산화-환원 플랫폼으로 적합하면서 개선된 산화-환원 활성을 안정적으로 나타내는 전극을 개발하였으며, 더 나아가 전기화학계 센서로 효과적으로 적용할 수 있음을 발견하였다.
- [0011] 따라서, 산화-환원 플랫폼으로 유용한 산화-환원 활성(redox active) 전극을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 제1 면(aspect)에 따르면,
- [0013] 전극 및 상기 전극 표면 위에 형성된 (i) 산화-환원 매개체로 개질된, 측쇄에 설폰기를 갖는 이온교환수지 및 (ii) 친수성 폴리우레탄을 포함하는 멤브레인을 포함한다.
- [0014] 본 발명의 제2 면에 따르면,
- [0015] a) 산화-환원 매개체로 측쇄에 설폰기를 갖는 이온교환수지를 개질시키는 단계; 및 b) 전극 표면 위에 상기 개질된 이온교환수지를 함유하는 친수성 폴리우레탄 멤브레인을 형성하는 단계; 를 포함한다.
- [0016] 이때, 산화-환원 매개체로 개질된 이온교환수지(이온교환수지-매개체)와 함께 촉매(예를 들면, 효소)를 더 포함하는 친수성 폴리우레탄계 멤브레인을 전극 표면에 (고정) 형성함으로써 산화-환원 활성 및 첨가된 촉매에 의한 활성을 안정적으로 제공할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 제3 면에 따르면,
- [0018] a) 전극; 및 상기 전극 표면 위에 형성된 (i) 산화-환원 매개체로 개질된, 측쇄에 설폰기를 갖는 이온교환수지, (ii) 효소 및 (iii) 친수성 폴리우레탄을 포함하는 멤브레인을 포함하는 산화-환원 활성 전극에 시료를 제공하는 단계; 및
- [0019] b) 상기 산화-환원 전극 상에서 상기 효소와 상기 효소에 대응하는 시료 내 기질(substrate)과의 효소/기질 산화-환원반응에 의하여 발생된 전류 신호를 검출하는 단계; 를 포함한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에서 제공되는 산화-환원 활성 전극은 우수한 안정성을 나타낼 뿐만 아니라, 특유의 전기화학적 특성으로 인하여 전기화학 반응의 산화-환원 플랫폼으로 유용하다. 따라서, 향후 전기화학 반응이 수반되는 다양한 응용 분야, 특히 전기촉매분야(연료전지 등), 생전기화학 분야(바이오센서 등) 등에서의 상용화가 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1a 내지 도 1b는 본 발명의 실시예에 있어서, 전극 위에 고정된 나피온-매개체(Naf-med)에 대한 전자전달 메커니즘을 예시적으로 설명하는 도면이고;

도 2는 본 발명의 실시예에 따라 메틸 바이올로젠으로 개질된 나피온(Naf-MV) 및 Cu-NiR가 공동 고정된 전극(SPCE)을 이용한 아질산염의 환원 원리를 개략적으로 설명하는 도면이고;

도 3a 및 3b는 7가지 나피온-매개체((a) Naf-DMMV, (b) Naf-MV, (c) Naf-BV, (d) Naf-PhV), (e) Naf-Ru(NH₃)₆³⁺, (f) Naf-FcA, (g) Naf-Ru(bpy)₃²⁺)가 고정된 전극에 대한 순환 전압전류 그래프(cyclic voltammogram)이고;

도 4a는 실시예 2에 있어서, Naf-MV 3 μ L 및 NiR(5 mg/mL) 3 μ L가 공동 고정된 전극을 사용할 때 1 mM 아질산염에 대한 CV 그래프이고;

도 4b는 실시예 2에 있어서, Naf-Ru(NH₃)₆³⁺ 4 μ L 및 HRP(20 mg/mL) 2 μ L가 공동 고정된 전극을 사용할 때 1 mM 과산화수소에 대한 CV 그래프이고;

도 4c는 실시예 2에 있어서, Naf-FcA⁺ 4 μ L 및 GOx (50 mg/mL) 2 μ L가 공동 고정된 전극을 사용할 때 10 mM 글루코스에 대한 CV 그래프이고;

도 4d는 실시예 2에 있어서, Naf-FcA^+ 2 μL 및 BOD (5 mg/mL) 4 μL 가 공동 고정된 전극을 사용할 때 산소가 포화된 완충용액에 대한 CV 그래프이고;

도 5는 실시예 3에 있어서, 반응 용액 내의 MV 농도가 Naf-MV 고정 전극의 캐소트 전하(Q_c)에 미치는 영향을 나타내는 그래프이고;

도 6은 실시예 3에 있어서, Naf-MV 제조시 최적 반응 시간을 구하기 위한 CV 그래프이고;

도 7은 실시예 3에 있어서, Naf-MV(3 μL) 고정 전극(SPCE)에 대한 연속적인 CV(5 사이클) 그래프이고(0.1 M 인산염 완충액, pH 7.0, 주사 속도: 0.1 V/s);

도 8은 실시예 3에 있어서, Naf-MV(3 μL) 고정 전극(SPCE)에 대한 연속적인 CV(10 사이클) 그래프이고(0.1 M 인산염 완충액, pH 7.0, 주사 속도: 0.1 V/s);

도 9a는 실시예 3에 있어서, Naf-MV(1.5 μL) 고정 전극(SPCE)에 대한 CV 그래프이고(0.1 M 인산염 완충액, pH 7.0, 주사속도: 각각 0.002, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 및 0.2 V/s);

도 9b는 도 9a에 있어서의 i_p-v 프로파일을 나타내는 그래프이고;

도 10a는 실시예 3에 있어서, 다른 부피(volume)의 Naf-MV 고정 전극(SPCE)에 대한 CV 그래프이고(0.1 M 인산염 완충액, pH 7.0, 주사 속도: 0.002 V/s, 부피: 각각 1, 2, 3, 4 및 5 μL);

도 10b는 실시예 3에 있어서, MV의 고정량과 Naf-MV의 고정 부피 간의 관계를 나타내는 그래프이고;

도 11은 실시예 3에 있어서, Naf-MV(3 μL) 고정 전극(SPCE)에 대한 CV 그래프이고(0.1 M 인산염 완충액, pH 7.0, 주사 속도: 0.002 V/s);

도 12는 실시예 4에 있어서, 센서용 산화-환원 매개체 및 효소($m_{\text{Naf-MV}}+m_{\text{NiR}}$)의 최적 질량 조합을 나타내는 그래프이고;

도 13은 실시예 4에 있어서, 센서의 pH 프로파일(profile)을 나타내는 그래프이고;

도 14a는 실시예 5에 있어서, 연속적인(successive) 아질산염 주입에 대한 정상 상태(steady state) 전류 응답(response)을 나타내는 그래프이고; 그리고

도 14b는 실시예 5에 있어서, 바이오센서의 캘리브레이션 커브(calibration curve)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 첨부된 도면을 참고로 하여 하기의 설명에 의하여 모두 달성될 수 있다. 하기의 설명은 본 발명의 바람직한 구체예를 기술하는 것으로 이해되어야 하며, 본 발명이 반드시 이에 한정되는 것은 아님을 이해해야 한다. 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0023] 본 발명의 구체 예에 따르면, 친수성 폴리우레탄계 멤브레인을 통하여 전극 상에 (i) 산화-환원 매개체로 개질된 이온교환수지(이온교환수지-매개체)가 고정되거나, 또는 (ii) 산화-환원 매개체로 개질된 이온교환수지와 촉매(예를 들면, 효소)가 공동 고정된 산화-환원 활성 전극이 제공된다. 이때, 이온교환수지(바람직하게는, 측쇄에 양이온 교환기로서 설펜기를 갖는, 채널 구조의 양이온교환수지)가 산화-환원 매개체로 개질된 형태로 친수성 폴리우레탄계 멤브레인 내로 도입된다. 이러한 산화-환원 활성 전극은 적절한 산화-환원 매개체에 따라 형식 전위(E^0)를 약 -0.8V 내지 1.1V (pH 7.0) 범위로 확장할 수 있다. 이처럼, 수성 매질 내에서의 통상적인 전기화학 반응의 전위 범위를 모두 커버할 수 있기 때문에 산화-환원 플랫폼으로 유용하다.

[0024] 본 명세서에서, 개질(modification)은 전형적으로는 산화-환원 매개체와 이온교환수지 간의 이온 교환 반응을 의미하나, 이온 교환 반응 이외의 다른 반응이 함께 수반되는 것을 배제하지는 않는다. 다만, 이온 교환 반응이 특히 두드러진(prevalent) 반응 형태로 볼 수 있다. 또한, 고정(immobilization)은 전형적으로 표면(특히, 전극 표면)과 물리적(예를 들면, 포획(entrapment)) 결합 또는 화학적 결합에 의하여 부착되는 것을 의미할 수 있다.

[0025] 한편, 본 구체예에 따른 산화-환원 활성 전극을 구성하는 성분은 하기와 같다

[0026] 산화-환원 매개체

[0027] 일 구체예에 있어서, 광의로는 산화-환원 매개체는 전자를 수용하거나(환원) 공여(산화)할 수 있는 화합물을 의미할 수 있으며, 협의로는 전극(작업 전극) 표면과 촉매(구체적으로, 산화-환원 촉매) 모두와 환원 또는 산화 반응할 수 있는 화학 잔기(residue)를 의미할 수 있다.

[0028] 이러한 산화-환원 매개체로서, 바람직하게는 금속 착물($M(\text{ligand})_x^{n+}$, 상기에서 M은 루테튬(Ru), 오스뮴(Os), 철(Fe), 구리(Cu) 이고, x는 3 내지 6이며, 그리고 n은 1 내지 3임; 예를 들면 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 등), 바이올로젠 계열 화합물(예를 들면, 메틸 비올로젠, 디메틸메틸 비올로젠, 페닐 비올로젠, 벤질 비올로젠 등), 암모늄-연결(linked) 산화-환원 화합물을 단독으로 조합하여 사용될 수 있다. 이 중, 금속착물은 산화-환원 활성뿐만 아니라, 촉매 특성을 갖고 있기 때문에 별도의 촉매 없이도 촉매적 표면을 얻을 수 있다(예를 들면, DNA의 촉매적 산화 반응).

[0029] 이온교환수지

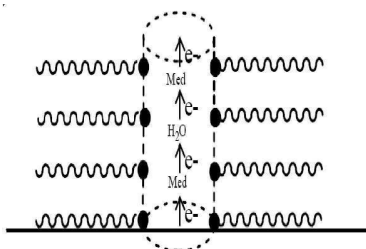
[0030] 일 구체예에 따르면, 산화-환원 매개체로 개질되는 이온교환수지는 채널 구조를 갖는 것으로, 상기 채널을 통하여 전자전달이 일어날 수 있는 종류를 선정하여 사용할 수 있다. 상기 이온교환수지의 바람직한 종류는 전형적으로 측쇄에 양이온 교환기인 설펜기(sulfonic group)가 부착되어 있는 이온교환수지일 수 있다. 이와 관련하여, 비-가교(non-cross-linked)되고, 부분적으로 설펜화되어 있는 이온교환수지를 사용할 수 있는데, 이때 설펜화도(degree of sulfonation)는 최대 약 40%, 보다 바람직하게는 약 5 내지 20%일 수 있다. 설펜화도가 높아질수록 이온교환수지의 소수성이 낮아지기 때문에 이온교환수지와 산화-환원 매개체 간의 상호작용(interaction)의 강도가 낮아져, 이온교환수지에 대한 산화-환원 매개체의 로딩(loading)이 감소될 수 있다. 따라서, 상술한 설펜화도 범위로 조절하는 것이 바람직할 수 있다.

[0031] 상술한 이온교환수지는 바람직하게는 "넓은 채널(wide channel)"을 구비하여, 비교적 큰 매개체(또는 양이온)가 내부 채널 벽에 파티션(partition)될 수 있도록 하는 것이 바람직하다. 이때, 채널은 바람직하게는 적어도 약 5 nm, 보다 바람직하게는 약 0.5 내지 2 nm 범위의 직경을 갖는다. 채널 사이즈가 일정 수준 이하에서는 산화-환원 매개체가 채널 내로 파티션되는 것을 방해할 수 있기 때문에 상술한 범위로 조절하는 것이 바람직할 수 있다.

[0032] 상기 구체예에서, 이온교환수지는 바람직하게는 측쇄에 양이온(cation) 교환기로서 설펜기를 갖는 불소계 수지(특히, 측쇄에 설펜기를 갖는 과불화 양이온교환수지)일 수 있는 바, 대표적으로는 E.I. DuPont de Nemours사의 상품명 Nafion 아사히 글라스 케이케이사(Asahi Glass KK)의 Flemion 아사히 케미컬사(Asahi Chemical Industry)의 Aciplex등을 예시할 수 있다(미국특허번호 제3,282,875호, 제4,329,435호, 4,330,654호, 제4,358,545호, 제4,417,969호, 제4,610,762호, 제4,433,082호, 제5,094,995호 등).

[0033] 예를 들면, 바람직한 이온교환수지로 사용되는 나피온은 하기 구조식을 갖는다.

[0034] [구조식 1]



[0035]

[0036] 이때, 나피온의 하전되지 않은(uncharged) 사슬 물질과 유기 양이온(소수성 양이온) 사이의 큰 소수성 상호작용에 의하여 양이온 교환반응이 이루어진다. 특히, 채널 구조를 구비하고, 이러한 채널의 내벽에 설펜기가 위치하여 채널 내에서 이온교환 반응이 이루어진다. 상기 나피온의 분자량은 가공 및 용액 모폴로지(morphology)에 따라 변화할 수 있으며, 전형적으로는 약 2.5×10^5 g/mol 수준으로 알려져 있다.

- [0037] 친수성 폴리우레탄
- [0038] 일 구체예에 따르면, 산화-환원 매개체로 개질된 이온교환수지는 친수성 폴리우레탄 멤브레인을 통하여 전극 표면에 고정된다. "친수성"은 수분에 대한 친화도가 높은 특성을 의미할 수 있는데, 친수성 화합물은 수분을 끌어당기거나, 물 또는 수용액 내에서 용해되거나 흡수되는 경향을 나타내며 바람직하게는 친수성 폴리우레탄 엘라스토머일 수 있다. 친수성 폴리우레탄의 구체적인 예로서, AdvanSource Biomaterials Corp.에 의하여 시판 중인 HydroThane™ 지방족 타입을 들 수 있다. 본 발명에 따른 구체예에서 이온교환수지-매개체(또는 이온교환수지-매개체와 촉매)를 고정하기 위하여 친수성 폴리우레탄을 사용하는 이유는 HPU membrane이 전극 위에 흡착되면서 전극 표면에 고정된 이온교환수지-매개체와 촉매 사이에 미세한 공간이 형성됨에 따라 전극 표면에 고정된 이온교환수지-매개체와 촉매를 멤브레인 안에 가둬두기에 효과적이기 때문이다.
- [0039] HPU로 이온교환수지-매개체로 구성된 전극표면을 코팅하는 것은 이온교환수지를 단독으로 사용하는 경우에 비해 탈리현상이 억제되어 센서의 우수한 안정성을 보이고, 이온교환수지-매개체를 전극 표면에 물리적으로 안정하게 부착시키는 역할을 한다. 또한, 친수성 고분자이므로 전극반응에 필요한 이온들의 이동도 용이하게 한다.
- [0040] 상기 친수성 폴리우레탄은 바람직하게는 5-25 %의 물을 함유하는 친수화 정도를 가지고 있다.
- [0041] 전극
- [0042] 본 발명의 구체예에 있어서, 전극은 몰딩 탄소 섬유 복합체로 형성되거나 폴리에스테르와 같은 불활성 비-도전성 기재로 구성될 수 있으며, 그 위에 적절한 도전층(conducting layer)이 부착될 수 있다. 상기 도전층은 일반적으로 다소 낮은 전기 저항성을 갖고, 일반적으로 작동 중에는 전기화학적으로 불활성을 갖는 것이 바람직할 수 있다. 상기 도전층의 바람직한 재질은 금, 탄소, 백금, 루테튬 다이옥사이드 및 팔라듐을 비롯하여, 기타 당업계에서 알려진 비-부식성 물질일 수 있다. 또한, 상기 전극 및/또는 도전성층은 증착 또는 프린팅 방식을 이용하여 불활성 물질의 표면 상에 부착될 수 있다. 본 발명의 구체예에서 적용 가능한 전극으로서, 예를 들면 SPCE(screen printed carbon paste electrode), 잉크젯 인쇄 흑연 전극(inkjet printed graphite electrode), 글래스 흑연 전극(glassy carbon electrode; GCE) 등을 사용할 수 있다. 상기 언급된 전극 재질은 예시적인 의미로 이해되어야 하면, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다. 특히, SPCE 등과 같이 페이스트 인쇄에 의하여 제조된 전극을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이는 페이스트의 경우, 대량생산이 용이하여 저렴하고, 1회용으로 적당하고, 시스템의 소형화가 가능하며 더욱이 본 구체예에 따른 산화-환원 활성 전극은 감도가 뛰어나기 때문에 GCE보다 감도가 다소 낮을 수 있는 SPCE에도 효과적으로 적용될 수 있다.
- [0043] 촉매
- [0044] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 산화-환원 활성 전극은 멤브레인 내에 산화-환원 매개체와 전자를 공여받거나 공여할 수 있는 촉매를 더 포함할 수 있는데, 이러한 촉매의 대표적인 예로서 효소를 예시할 수 있다. "효소"는 일반적으로 화학반응에서 촉매로서 작용하는 단백질로 정의된다.
- [0045] 이와 관련하여, 다양한 천연-유래 효소, 합성 효소, 개질 효소, 또는 이들의 조합이 특별한 제한 없이 사용될 수 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에 따르면, 효소는 전형적으로는 산화 또는 환원 효소로서, 대표적으로는, 아질산염 환원효소(NiR), 질산염 환원효소, 카르보닐 환원효소, 모르피논 환원효소, 자일로스 환원효소, 멘톤 환원효소, 알도스 환원효소, 과산화효소(예를 들면, 호스래디쉬 과산화효소(HRP)), 글루코스 산화효소, 라데이트 산화효소, 사르코신 산화효소, 콜린 산화효소, 콜레스테롤 산화효소, 크산틴 산화효소, 빌리루빈산화효소, 암모늄염 산화효소 등이 사용될 수 있다.
- [0046] 또한, 탈수소 효소 역시 사용 가능한 바, 알코올 탈수소효소, 알데히드 탈수소효소, 포름메이트 탈수소효소, 포름알데히드 탈수소효소, 글루코즈 탈수소효소, 락테이트 탈수소효소, 락토오스 탈수소효소 또는 피루베이트 탈수소효소 등을 예시할 수 있다.
- [0047] 상술한 다양한 효소 또는 이들의 조합이 특별히 제한됨이 없이 사용될 수 있으며, 이때 전형적인 효소의 분자량 범위는 전형적으로는 약 50~ 200 kDa범위일 수 있다.

- [0048] 또한, 촉매로서 상술한 효소 이외에 미생물, 균류 등이 사용 가능하다.
- [0049] 산화-환원 활성 전극의 제조
- [0050] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 산화-환원 활성 전극은 하기의 방법으로 제조될 수 있다.
- [0051] (a) 개질 반응
- [0052] 먼저, 이온교환수지와 산화-환원 매개체를 개질 반응시키는 바, 수성 매질 내에서 수행하는 것이 바람직하다. 이때, 전술한 바와 같이 이온교환수지 내의 채널 내벽과 매개체 간의 이온교환이 주된(prevalent) 개질 반응을 구성할 것이다. 바람직한 구체예에서, 산화-환원 매개체/이온교환수지의 비(무게 기준)는 바람직하게는 약 10 내지 300, 보다 바람직하게는 약 15 내지 70이며, 특히 바람직하게는 약 20 내지 40 범위일 수 있다.
- [0053] 만약, 산화-환원 매개체의 농도가 지나치게 높은 경우에는 개질 과정에서 많은 양의 불용성 겔 타입의 고형물이 생성될 수 있으며, 이러한 수성 여과물에 대하여는 검출 가능한 매개체-이온교환수지(즉, 개질된 이온교환수지)의 산화-환원 피크를 얻기 곤란하다. 그 이유는 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 및 MV와 같은 매개체가 이온교환수지에 대하여 강한 소수성 결합 특성을 나타내는 점으로 설명될 수 있다. 앞서 설명한 바와 같이, 이온교환수지의 채널 내에서는 설펜산기가 채널 내벽에 위치하고, 물 또는 에탄올과 같은 용매가 채널 내에 채워지는데, 이러한 채널 내에서 개질(예를 들면, 이온 교환)이 이루어질 수 있다. 그러나, 강한 소수성 상호작용을 통하여 채널로부터 용매를 밀어내어 채널 내로 소수성 양이온인 매개체가 과잉 존재하게 되면, 물 내에 매개체-이온교환수지의 불용성 고분자가 생성될 수 있기 때문이다. 따라서, 상술한 비율 범위로 조절하는 것이 바람직하다.
- [0054] 상기 개질 반응은 산화-환원 매개체의 양이온이 이온교환수지의 채널 내로 들어가 충분한 반응이 일어날 수 있는 시간 동안 진행되는 것이 바람직하다. 이와 관련하여, 예를 들면 약 10 내지 24 시간, 보다 바람직하게는 약 11 내지 13 시간의 반응 시간이면 적당할 것이다. 실제, 최적 반응 시간까지는 반응 속도가 기하급수적으로 증가하지만, 그 이후에는 증가 속도가 미미한 만큼, 상기 범위로 조절하는 것이 바람직하다.
- [0055] 또한, 개질 반응시 교반 보다 바람직하게는 격렬한 교반(예를 들면, 약 5000 내지 10000rpm)을 가하여, 매개체가 이온교환수지의 채널 내로 용이하게 진입하여 반응할 수 있도록 하는 것이 바람직하다.
- [0056] (b) 산화-환원 매개체로 개질된 이온교환수지(이온교환수지-매개체)의 고정
- [0057] 개질 반응 후에 수득된 이온교환수지-매개체는 친수성 폴리우레탄 멤브레인을 통하여 전극으로부터 전자를 받거나, 또는 전극으로 전자를 전달하는데 문제가 없는 한, 특별히 제한되지 않고 당업계에서 사용 가능한 멤브레인 형성 또는 고정 방법이 채택될 수 있다.
- [0058] 예를 들면, 이온교환수지-매개체를 전극 표면에 로딩(loading)한 후에 친수성 폴리우레탄 용액을 가하거나(예를 들면, 드롭-코팅), 친수성 폴리우레탄 용액 내에 침적시키는 방법을 이용할 수도 있다. 택일적으로, 친수성 폴리우레탄 용액 내에 이온교환수지-매개체를 투입하여 혼합한 다음, 이를 전극 위에 도포할 수 있다. 이러한 도포 방법으로서, 예를 들면, 딥-코팅법, 드롭-코팅법, 스핀 코팅법, 박막 캐스팅법, 전기화학 필름 코팅법 등을 이용할 수 있다.
- [0059] 상술한 방법에 의한 코팅이 이루어지면, 예를 들면 약 18 내지 25℃, 전형적으로는 상온에서 건조시켜 용매 성분을 제거하고 이온교환수지-매개체의 고정을 단단히 할 수 있다.
- [0060] 바람직한 구체예에 따르면, 전극 상에 고정된 멤브레인은 이온교환수지-매개체 약 30~50중량% 및 친수성 폴리우레탄 약 50~70중량%를 포함한다. 또한, 상기 멤브레인의 두께는 산화-환원 활성 전극이 적용되는 용도에 따라 적절하게 조절될 수 있는 바, 전형적으로는 1 내지 100 μm , 보다 전형적으로는 5 내지 30 μm 범위일 수 있다.
- [0061] 친수성 폴리우레탄 함량이 높은 경우 전극 표면 위에 형성되는 막의 두께가 두꺼워짐에 따라 측정 물질과 전극 표면 사이에 제한적 mass transport가 일어나게 되고 함량이 낮은 경우 수용액 상에서 점차적으로 HPU막이 불안정해지므로 이온교환수지-매개체의 손실이 발생한다.
- [0062] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 산화-환원 활성 전극은 이온교환수지-매개체를 촉매와 함께 전극 표면 위에

공동 고정하여 제조할 수 있다. 이때, 촉매로서 효소를 사용할 경우, 상기 전극은 "효소전극"으로 언급할 수 있을 것이다.

[0063] 이온교환수지-매개체 및 촉매의 공동 고정화(co-immobilization)는 앞서 설명한 이온교환수지-매개체 단독의 고정 방법과 유사한 방식으로 달성할 수 있다. 예를 들면, 이온교환수지-매개체 및 촉매를 균일하게 혼합하여, 전극 표면에 로딩(loading)한 후에 친수성 폴리우레탄 용액을 가하거나, 친수성 폴리우레탄 용액 내에 침적시킬 수 있다. 택일적으로, 친수성 폴리우레탄 용액 내에 이온교환수지-매개체 및 촉매를 투입하여 혼합한 다음, 이를 전극 위에 도포할 수도 있다.

[0064] 본 구체예에 있어서, 앞서 설명한 바와 같이, 산화-환원 매개체/이온교환수지의 비(몰무게 기준)는 바람직하게는 약 10 내지 300, 보다 바람직하게는 약 15 내지 70이며, 특히 바람직하게는 약 20 내지 40 범위일 수 있다. 또한, 산화-환원 매개체/촉매(특히, 효소)의 비(몰무게 기준)는 촉매의 종류 및 전극의 용도에 따라 변경할 수 있으나, 전형적으로는 약 3 내지 20, 보다 전형적으로는 약 10 내지 15 범위일 수 있다.

[0065] 바람직한 구체예에 따르면, 전극 상에 형성되는 멤브레인은 (i) 이온교환수지-매개체 약30-50중량% (ii) 친수성 폴리우레탄 70-50중량%를 포함한다. 상기 촉매의 함량은 제한 없이 사용할 수 있으나, 전술한 산화-환원 매개체/촉매(특히, 효소)의 비를 참고할 수 있다.

[0066] 상술한 구체예들에 있어서, 산화-환원 매개체 자체가 촉매 특성을 갖거나 별도의 촉매(예를 들면, 효소 촉매)와 함께 전극 상에 공동 고정되는 경우, 그 자체의 높은 산화-환원 활성에 따른 촉매 효과, 또는 산화-환원 활성 전극과 이온교환수지-매개체에 의하여 매개된 촉매(특히, 효소) 간의 전자전달(ET)에 의하여 대응하는 기질(corresponding substrate)에 대한 높은 촉매 효과를 얻을 수 있다.

[0067] 특정 이론에 구속되는 것은 아니지만, 이와 같이 높은 산화-환원 활성을 얻을 수 있는 이유는 전자전달 메커니즘으로 설명될 수 있다. 이하의 설명에서는 이온교환수지로서 나피온(Nafion)을 사용하고 촉매(효소)로서 아질산염 환원효소(NiR)를 사용한 경우를 중심으로 설명하지만, 이는 예시적인 것으로서 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0068] 도 1은 본 발명의 일 면에 따른 산화-환원 활성 전극의 전자전달 메커니즘을 예시하는 도면이다. 상기 도면에서, 물결선(wave line)은 나피온의 소수성 사슬을 가리키는 한편, 채널 내벽의 원은 설펜산기를 가리킨다. 또한, 실린더는 나피온의 채널이며, 화살표는 전자전달의 방향을 가리킨다.

[0069] 도 2는 Naf-MV 및 Cu-NiR가 공동 고정된 전극(SPCE)의 작동 원리를 개략적으로 설명하는 도면이다.

[0070] 상기 도 1에 도시된 바와 같이, 산화-환원 매개체로 개질된 나피온(나피온-매개체; Naf-med) 및 효소가 전극 표면 위에 공동 고정되는 경우, 나피온의 채널은 2가지 상이한 방향성을 가지면서 전극 표면 상에서 무작위적인 방향으로 배열된다. 이러한 방향성 중 하나는 전극 표면과는 수직인 방향성(도 1a에 도시된 바와 같은 "end-on"타입)인 반면, 다른 하나는 전극 표면과 평행한 방향성(도 1b에 도시된 바와 같은 "side-on" 타입)이다. 전자의 경우, 전극과 고정된 나피온-매개체 사이의 효율적인 전자 전달에 유리한데, 이는 전극과 매개체 사이의 거리가 단축되기 때문이다. 반면, 후자의 경우에는 효율적 전자 전달에 불리하다.

[0071] 일단, 전자전달이 유발되면, 도 1c에 도시된 바와 같이 나피온의 채널 방향에 대한 덜 가혹한 조건에서 분자간 전자전달이 진행될 것이다. 채널 내의 분자간 전자전달은 나피온 채널 내에 존재하는 물에 의하여 강화되는 것으로 고려될 수 있는데, 이는 적은 수의 산화-환원 매개체(med) 분자가 나피온의 개별적인 긴 채널 내에 채워지기 때문이다(메틸 비올로겐(MV) 분자의 경우에는 약 12).

[0072] 한편, 나피온-매개체와 효소(도 1 및 2에서는 아질산염 환원효소(NiR)) 간의 전자전달 방식은 명확히 규명된 것은 아니지만, 소수성 및 정전기적 상호작용에 의하여 나피온-매개체(Naf-med) 사이에 소위 "복합(composite)"상태가 형성되기 때문인 것으로 추측할 수 있다.

[0073] NiR는 2가지 타입, 즉 heme-NiR 및 Cu-NiR을 포함하는데, 전자에 의한 아질산의 환원은 6-전자 프로세스인 한편, 후자에 의한 아질산의 환원은 1-원자 프로세스이다. Cu-NiR의 전형적인 동종삼합체(homotrimeric) 구조에 있어서, 각각의 단량체(모노머)는 하나의 타입-1 구리(파란색, T1 Cu, 전자전달(ET) 사이트) 및 하나의 타입-2 구리(파란색이 아님, T2 Cu, 아질산의 환원 사이트)를 포함한다. 이때, 타입-1 구리는 외부 전자 캐리어로부터 하나의 전자를 수용하는 한편, 상기 타입-2 구리는 환원된 T1 Cu로부터 전자를 수용한다.

[0074] 이와 관련하여, NiR의 타입-1 구리 사이트(전자전달 사이트)는 소수성 표면 캐비티(cavity) 아래 약 7Å 거리에 위치하는데, 상기 캐비티는 다수의 음 하전된 잔기(negatively charged residue)에 의하여 둘러싸여 있어 나피

온-매개체는 소수성 상호작용에 의하여 인접하는 Cu-NiR와 복합 상태를 형성할 수 있다. 이러한 복합 상태는 나피온-매개체로부터 타입-1 Cu 사이트로의 분자 간 전자전달 및 더 나아가 타입-2 Cu 사이트(예를 들면, 도 1d에 도시된 바와 같이 Cu-NiR의 아질산염 환원 사이트)로의 분자 간 전자전달에 유리한 것으로 판단된다.

[0075] 한편, 또 다른 구체예에 따르면, 상술한 산화-환원 활성 전극, 특히 이온교환수지-매개체와 함께 촉매로서 효소가 공동 고정된 산화-환원 활성 전극을 사용하여 시료 내 타겟 성분에 대한 검출 및 정량 분석 방법이 제공된다. 구체적으로, 전극 상에 고정된 효소가 대응하는 기질(즉, 타겟 성분)의 농도에 비례하여 효소/기질 산화-환원 반응으로부터 생성된 전류 신호(amperometric signal)를 측정함으로써 시료 내 타겟 성분을 검출 및 정량 분석할 수 있다.

[0076] 상기 구체예에서 사용된 산화-환원 전극의 경우, 멤브레인 내에 고정된 효소가 특성을 양호하게 유지할 수 있기 때문에 다른 고정 기술(공유 결합, 전기중합 등)에 비하여 효과적인 검출/정량분석이 가능하다. 더욱이, 동일한 효소에 대하여, 고정된 형태 및 유리된(free) 형태 모두 최적 pH 범위에는 큰 영향이 없게 되는데, 이는 본 구체예에서 친수성 폴리우레탄을 통한 공동 고정 방식이 촉매, 특히 효소의 특성을 양호하게 유지할 수 있음을 의미할 수 있다. 상기 구체예에서 분석을 위한 pH 범위는 사용된 효소마다 다를 수 있으며, 대체적으로 약 5.5 내지 8.0 범위일 수 있다.

[0077] 상술한 분석 방법은 당업계에서 알려진 2전극법(작업전극 및 상대전극으로 구성됨), 3전극법(작업전극, 상대전극 및 기준전극으로 구성됨) 등에 의하여 수행될 수 있으며, 예를 들면 현재 상용화된 스트립 형태의 다채널 센서 구조가 사용될 수 있다. 이러한 센서 구조에서, 앞서 설명한 산화-환원 활성 전극은 바람직하게는 작업전극(working electrode: 분석물(analyte)이 산화-환원 매개체의 작용을 수반하거나 수반하지 않은 상태에서 전기적으로 산화/환원되는 전극)으로 사용될 수 있다. 이때, 작업전극에 대하여 친수화 전처리(예를 들면, 플라즈마(특히, O_2 플라즈마)에 의한 전처리)를 하는 것이 바람직하다. 또한, 상대전극(counter electrode; 작업전극과 쌍을 이루는 전극으로서 작업전극을 통하여 통과하는 전기화학적 전류와 같은 크기이면서 상반된 부호(sign)을 갖는 전극) 및 기준전극(reference electrode)으로 당업계에서 알려진 종류(예를 들면, 상대전극으로 백금 와이어 및 기준전극으로 Ag/AgCl)도 사용할 수 있다.

[0078] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해 바람직한 실시예를 제시하지만, 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0079] 실시예

[0080] 하기의 실시예에서 사용되는 반응물 및 장치는 하기와 같다.

[0081] 산화환원 매개체

[0082] - 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride (methyl viologen(MV), 98%; Sigma-Aldrich)

[0083] - benzyl viologen (BV, 97%; Sigma-Aldrich)

[0084] - hexaammineruthenium(III) chloride, $(Ru(NH_3)_6Cl_3)$, 98%; Sigma-Aldrich)

[0085] - tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium(II) chloride hexahydrate $(Ru(bpy)_3Cl_2 \cdot H_2O)$, 99.95%; Sigma-Aldrich)

[0086] - (Ferrocenylmethyl)trimethylammonium iodide (FcAI; Alfa Aesar-A Johnson Matthey Co.)

[0087] - phenyl viologen (PhV, >97%; Tokyo Chemical Industry Co.)

[0088] - 2,2'-Dimethyl-4,4'-bipyridyl(Center for Heterocyclic Compounds, University of Florida)

[0089] - 2,2'-Dimethyl-methyl viologen (DMMV; 자체 합성)

[0090] 이온교환수지

[0091] - Nafion(과불화이온교환수지, 10 wt% 수분산물; Sigma-Aldrich)

[0092] - poly(4-styrenesulfonic acid) (PSS, 18 wt% 수용액; Sigma-Aldrich)

[0093] 효소

- [0094] - 아질산염 환원제(NiR): 분자량 약 80kDa의 Nitrite reductase (EC 1.7.2.1, from *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. denitrificans, 2 U/mg(specific activity); NECi (Lake Linden, MI, USA))
- [0095] - 호스래디쉬 과산화효소: Horseradish peroxidase (HRP, EC 1.11.1.7, 200~300 U/mg(specific activity); Sigma-Aldrich)
- [0096] - 글루코오스 산화제: Glucose oxidase (GOx, EC 1.1.3.4, from *Aspergillus niger*, 100~250 U/mg; Sigma-Aldrich)
- [0097] - 빌리루빈 산화제: Bilirubin oxidase (BOD, EC 1.3.3.5, from *Myrothecium verrucaria*, 15~65 U/mg; Sigma-Aldrich)

[0098] 전극

- [0099] 스크린 인쇄 탄소 페이스트 전극(screen printed carbon paste electrodes; SPCE, SE100 model, $r = 0.25$ cm; Zensor R&D Co.).

[0100] 친수성 폴리우레탄

- [0101] AdvanSource Biomaterials Corp. (Wilmington, MA, USA)로부터 시판 중인 친수성폴리우레탄(HPU, HydroThaneTM aliphatic type (AL-25-80A), 25% water uptake)을 구입하여 사용하였다.

[0102] 기타 물질

- [0103] 인산일수소나트륨(99.95%), 인산이수소나트륨(99.999%), 질산나트륨($\geq 99.0\%$), 아질산나트륨(99.999%) 및 클로로포름(99.95%)은 Sigma-Aldrich사에 의하여 시판된 상태에서 사용하였다. 또한, 탈이온수(18 M Ω cm)는 완충 용액 및 원료 용액의 제조를 위하여 Milli Q 정수 시스템으로부터 얻어 사용하였다. 아질산염 나트륨 용액은 실험 직전에 제조하여 사용하였다.

[0104] 전기화학반응 시스템

- [0105] 전기화학분석장치(Model: CHI 1230A, TX, USA)를 사용하여 순환전류전압법 및 전류측정법을 실시하였다. 이때, SPCE 작업전극, 백금 와이어 상대 전극(코일) 및 Ag/AgCl 기준전극(3M KCl, BAS)로 이루어진 3 전극 시스템이 사용되었다. 전류측정을 위하여, 클로즈드 셀(closed cell) 내의 5 mL 완충용액을 교반 자석 막대에 의하여 연속적으로 교반하였다. 음 전위 범위에서의 실험은 5 mL 스톱퍼드 셀(stoppered cell)을 이용하여 수행되었다. 산소는 초순수 아르곤(99.9999%, DongA Co, Korea) 가스 퍼징에 의하여 용액으로부터 완전 제거되었고, 전 실험에 걸쳐 실험 온도는 서모스탯 셀(thermostated cell)을 이용하여 $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 에서 조절되었다. 모든 전위는 Ag/AgCl (3M KCl) 기준 전극에 대하여 얻어졌다.

[0106] 실시예 1

[0107] 나피온-매개체(Naf-MV)의 제조

- [0108] 1 mL 물 내에서 0.25 wt%의 나피온과 0.25 mM 메틸 비올로젠을 상온 및 교반 조건 하에서 12시간 동안 반응시켜 나피온-매개체(Naf-MV)를 제조하였다. 반응 후에는 반응 혼합물을 마이크로콘(Utracel YM-3, 3000 MWC0)으로 옮겨 10,000 rpm의 회전 속력으로 원심분리하였다. 여과물(filtrate)이 더 이상 검출 가능한 산화환원 매개체의 CV 피크를 보이지 않을 때까지 물로 튜브를 채우는 방식으로 상기 작업을 반복하였다(6회). 미반응 매개체의 분리 후에는 튜브 내의 액체를 타겟 생성물로서 회수하였다. 회수된 생성물의 체적은 155 μL 이었으며, 농도는 16.13 mg/mL이었다.

- [0109] MV 대신에 매개체의 종류(각각 DMMV, BV, PhV, $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, FcA 및 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)를 변화시킨 것을 제외하고는 상술한 실험과 동일한 방식으로 나피온-매개체를 제조하였다.
- [0110] 나피온-매개체(Naf-med)의 고정
- [0111] SPCE는 사용에 앞서 10분 동안 O_2 플라즈마로 전처리하였다. SPCE 표면 상에 나피온-매개체(3 μL)를 피펫팅(pipetting)하였으며, 5분 동안 진공 챔버 내에서 건조시켰다. 그 다음, 클로로포름에 용해시킨 10 μL 의 친수성 폴리우레탄(HPU) 용액(15 mg/mL)을 나피온-매개체가 로딩된 전극 표면 상으로 피펫팅하였으며, 주변 공기(ambient air) 하에서 건조시켰다. 용매를 즉시 건조시켜(약 20초간) 전극 표면 상에 HPU 멤브레인이 형성되었다. 이와 같이 얻어진 전극을 사용하여 나피온-매개체의 전기화학적 특성을 측정하였다.
- [0112] 측정 결과
- [0113] 도 3a 및 3b는 7가지의 나피온-매개체가 고정된 전극에 대한 순환 전압전류 그래프이다. 이때, 순환전압전류법은 pH 7의 0.1 M 인산염 완충용액 내에서 나피온-매개체(3 μL)가 고정된 전극에 대하여 0.002 V/s의 주사 속도(ν)로 수행되었다. 상기 도면에서 (a) 내지 (g)는 산화-환원 매개체로서 각각 (a) Naf-DMMV, (b) Naf-MV, (c) Naf-BV, (d) Naf-PhV, (e) Naf- $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, (f) Naf-FcA, 및 (g) Naf- $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 을 사용한 것이다.
- [0114] 이와 관련하여, Naf-MV, Naf- $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ 및 Naf-FcA⁺ 각각이 고정된 전극에서는 매우 작은 피크 분리(ΔE_p)를 갖는 거의 대칭적인 벨 형상(bell-shape), 즉 Nernstian 흡착물에 대한 형상이 얻어졌다. 이러한 작은 피크 분리는 각각의 고정화된 매개체에 대한 분자간 전자전달이 효율적임을 의미한다. 특히, Naf- $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ 의 ΔE_p (0.006V)는 가장 작았고, ν 가 0으로 근접할수록 0으로 접근하여 거의 완전한 대칭형상을 나타내었다. 또한, 비올로겐의 $E^0((E_{p,a}+E_{p,c})/2)$ 순서는 비올로겐의 치환기의 전자적 효과로부터 기대되는 바와 잘 부합되었다.
- [0115] 7개의 나피온-매개체 고정 전극에 대하여 측정된 E^0 범위(-0.743~1.079V)는 기본적으로 수성 매질 내에서의 통상적인 전기화학의 전위 범위 내이다. 특히, DMMV의 경우, pH 7에서 -0.743의 E^0 값을 나타내었는데, 이는 수성 매질 내에서 관찰될 수 있는 가장 음인 전위 값에 근사한 것이다. 금속 착물(예를 들면, $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$), 비올로겐, 및 암모늄-연결 산화환원 물질(예를 들면, FcAI)의 대부분은 도시된 바와 같이 고정화를 위하여 나피온과 이온교환능을 갖고 있는데, 이러한 특성은 다양하게 활용될 수 있다.
- [0116] 도 3에 나타난 바와 같이, 전위 갭(potential gap)은 -0.1 내지 0.2V 사이, 그리고 0.5 내지 0.9V 사이에서 존재하였는데, 예를 들면 오스뮴 착물과 같은 금속 착물을 사용함으로써 이러한 갭을 채울 수 있을 것이다.
- [0117] 산화환원 피크 전하(Q_c (캐소드) 및 Q_a (애노드)) 또는 표면 밀도(surface coverage)은 Naf- $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ > Naf-FcA⁺ > Naf-MV > Naf-DMMV > Naf-PhV > Naf-BV 순이었다. 처음 3가지(Naf- $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, Naf-FcA⁺ 및 Naf-MV) 나피온-매개체(Naf-med)의 순서는 이들 유기 양이온에 대한 나피온의 보고된 확산계수(k_D), 즉 각각 2.5×10^{-6} , 1.1×10^{-6} 및 7.9×10^{-5} 에 부합되었다. 비올로겐 계통 화합물에 대한 순서 역시 나피온의 채널 구조 및 이들 비올로겐의 사이즈 차이로부터 추측되는 바에 부합된다.
- [0118] 전술한 바와 같이, 나피온의 채널 구조 내에서 설펜산기는 채널 내벽에 위치하고 채널 내에 물 또는 메탄올과 같은 용매가 채워져 있으므로 개질 반응(특히, 이온교환 반응)은 채널 내에서 일어날 것이다. 이때, 채널은 약 4 nm 정도이므로 이러한 한정된 공간에서의 개질 반응은 비올로겐의 분자 사이즈와 직접적으로 연관된다. 환원하면, 사이즈가 작을수록 로딩 량도 증가할 것이고, 비올로겐의 분자 사이즈는 MV<DMMV<PhV<BV인 만큼, 상술한 비올로겐 로딩 량의 순서에 부합한다. 또한, 분자 사이즈 순서 역시 이들 비올로겐들에 대한 ΔE_p 값의 순서와도 일치한다. 즉, 비올로겐이 클수록 피크 분리도 증가할 것이라는 결론을 내릴 수 있다.

- [0119] 비교예 1
- [0120] 나피온 대신에 poly(4-styrenesulfonic acid; PSS)을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1에서와 동일한 방법으로 PSS-매개체(MV)를 제조하였다. 그러나, PSS-매개체가 고정된 전극은 낮은 안정성을 나타내었는데, 이는 PSS와 MV 사이의 상호 작용 강도가 나피온과 MV 사이의 상호 작용만큼 강하지 않기 때문으로 판단된다.
- [0121] 또한, 전기화학적 특성을 평가한 결과, 첫 번째 주사에서 환원 피크 전류($I_{p,c}$)는 나피온-MV 고정 전극의 약 25% 수준이었다.
- [0122] 상기 차이점은 나피온의 비-가교 및 부분적인 설폰화 구조에 따른 것으로 판단된다. 즉, 비-가교 구조는 큰 양 이온(cation)이 나피온의 채널 내로 파티션되는데 보다 유리하다. 나피온의 넓은 채널과 달리, PSS의 좁은 채널은 PSS 내로 MV가 파티션되는 것을 제한할 수 있으며, 이때 설폰화도(degree of sulfonation)는 나피온 및 PSS에 대하여 각각 약 12.5% 및 100%이다. 따라서, PSS의 소수성은 나피온의 12.5% 수준이라고 말할 수 있는 것이다. 그 결과, PSS와 MV 사이의 약한 상호작용 강도로 인하여 PSS에 대한 MV의 로딩량은 작은 것으로 관찰되었다.
- [0123] 실시예 2
- [0124] 나피온-매개체 및 효소(아질산염 환원효소)의 공동 고정
- [0125] 실시예 1에서 제조된 나피온-매개체를 Eppendorf 튜브(0.25 mL) 내에서 격렬한 교반 하에서 효소(아질산염 환원 효소; NiR)와 균일하게 혼합시켰다. 상기 혼합물을 실시예 1에서와 동일한 방법으로 SPCE 전극 위에 고정하였다. 이와 같이 얻어진 전극을 사용하여 아질산염 환원 반응에 대한 촉매 효과를 관찰하였으며, 전류 측정법을 실시하였다.
- [0126] 촉매 효과 평가
- [0127] 도 4a는 아질산염의 존재 또는 부존재 하에서 나피온-매개체 및 효소가 공동 고정된 SPCE에 대하여 순환전압전류법을 실시한 결과를 나타내는 그래프이다(pH 7의 0.1M 인산염 완충용액, 0.002V/s의 주사 속도).
- [0128] 도 4a로부터 알 수 있듯이, 아질산염의 첨가 후에는 CV의 $i_{p,c}$ 는 크게 증가하였고, 산화 피크 전류($i_{p,a}$)는 동시에 사라졌으며, S자(sigmoid) 형태를 나타내었다. 이는 전형적인 EC' 프로세스(전기화학 반응 후 촉매 반응)로부터 기인한 것이다. 완충 용액 내에 아질산염이 존재할 때, 고정된 NiR는 산화 상태로 존재하며, 전기화학적 으로 생성된 Naf-MV⁺를 급속하게 산화시킨다. 따라서, 라디칼 종이 생성되자마자 소모되었으며, 결국 $i_{p,a}$ 는 관찰되지 않았다.
- [0129] 환언하면, 도 4a에 나타난 촉매적 CV는 전극과 고정된 NiR 사이의 전자전달이 효율적이라는 것을 의미한다. 1 mM 아질산염의 첨가에 기인하는 순(net) $i_{p,c}$ 는 17.39 μ A이었다(주사 속도: 0.002 V/s). Cu-NiR 및 산화-환원 매개체가 공동 고정된 전극에 의한 아질산염 환원 반응에 있어서, 이러한 높은 촉매적 $i_{p,c}$ 는 예기치 못한 수준이었다.
- [0130] 전자전달 매개체로서 사용된 산화-환원 고분자(redox-tethered polymer)의 경우, 산화-환원 전달 그룹은 산화-환원 단백질 내로 침투하여 전자전달을 매개하는데 적당한 거리에 도달하며, 산화-환원 매개체를 고분자로 연결하는(tethering) 사슬 길이가 매개된 전자전달의 효율을 조절한다.
- [0131] 본 실시예에 따른 결과는 Naf-MV 내에 스페이서가 존재하지 없음에도 불구하고, 공동 고정된 효소와 매개체 사이의 전자전달이 여전히 효율적이라는 점에서 주목할 만하다.
- [0132] 도 4b는 Naf-Ru(NH₃)₆³⁺와 HRP가 공동 고정된 SPCE가 과산화수소의 촉매적 환원에 사용될 수 있음을 보여준다. Naf-MV와 NiR가 공동 고정된 경우와 유사하게, 상기 전극 역시 기질의 첨가시 촉매적 $i_{p,c}$ 가 높다는 것을 나타내며, 이는 전극과 HRP 사이에서의 Naf-Ru(NH₃)₆³⁺에 의하여 매개된 전자전달이 효율적임을 의미한다.

- [0133] 상기 경우, 1 mM 과산화수소의 첨가에 따른 순 $i_{p,c}$ 는 19.73 μA 이었다(주사속도: 0.002 V/s). 이러한 높은 촉매적 $i_{p,c}$ 는 오스뮴 착물로 매개된 고분자와 콩 과산화제(SBP)가 글래시 탄소 전극 상에 공동 고정된 경우에 보고된 값에 상응하였다.
- [0134] 도 4c는 Naf-FcA⁺와 GOx가 공동 고정된 SPCE가 글루코스의 촉매적 산화에 사용됨을 보여준다.
- [0135] 상기 전극은 기질의 첨가시 촉매적 $i_{p,c}$ 가 높다는 것을 보여주며, 이는 전극과 GOx 사이에서의 Naf-FcA⁺에 의하여 매개된 전자전달이 효율적임을 의미한다. 상기 경우, 10 mM 글루코스의 첨가에 따른 순 전류는 20.52 μA 이었다(주사속도: 0.002 V/s). 이러한 높은 촉매적 $i_{p,a}$ 는 오스뮴 착물로 개질된 고분자가 전자전달 매개체로 사용된 경우에 보고된 값보다 높았다.
- [0136] 도 4d는 Naf-FcA⁺와 BOD가 공동 고정된 SPCE가 산소의 촉매적 환원에 사용됨을 보여준다. 상기 전극은 포화산소의 존재 하에서 촉매적 $i_{p,c}$ 가 높다는 것을 나타내며, 이는 전극과 BOD 사이에서의 Naf-FcA⁺에 의하여 매개된 전자전달이 효율적임을 의미한다. 상기 경우, 완충액 내에서의 포화산소의 존재에 기인하는 순 전류는 15.28 μA 이었다(주사속도: 0.002 V/s). 이러한 높은 촉매적 $i_{p,a}$ 는 BOD와 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate; ABTS)의 매개체가 용해된 상태에서 사용된 경우에 보고된 값보다 현저히 높았다. 산소 환원의 형식 준위(formal potential)는 약 0.61 V(pH: 7.0)이었고, 산소에 대한 촉매적 $E_{p,c}$ 는 약 0.35 V(pH: 7.0)이었다. 따라서, 상기 타입의 전극은 약 0.26V의 과전위로 산소를 물로 환원시킬 수 있는 능력을 갖고 있음을 알 수 있다. 결국, 상기 타입의 전극은 바이오 연료전지 내의 효과적인 캐소드로 적용될 수 있을 것으로 판단된다.
- [0137] 비교예 2
- [0138] 나피온과 산화-환원 매개체 및 효소를 단순 혼합한 다음, 친수성 폴리우레탄(HPU)을 드롭-코팅하는 방식으로 공동 고정시켰다. 상기 경우, 효소와 매개체가 공동 고정된 전극의 제조가 간편하기는 하였으나, 전극의 촉매 효과는 실시예 2에서 얻은 경우에 비하여 낮았다. 예를 들면, 이와 같이 제조된 HRP 전극의 감도(주사 속도: 0.002 V/s)는 12.82 $\mu A\text{ mM}^{-1}$ 이었고, 이는 Naf-Ru(NH₃)₆³⁺를 사용한 경우의 약 65% 수준이었다. 또 다른 경우에 있어서, GOx 전극의 감도는 1.60 $\mu A\text{ mM}^{-1}$ 이었던 바, 이는 Naf-FcA⁺가 사용된 경우의 약 78% 수준이었다. 동시에, 얻어진 촉매적 CV는 다소 두꺼운 것처럼 보였으며, 이는 분자간 전자전달이 나피온-매개체(Naf-med)가 사용된 경우에 비하여 효율적이지 않음을 의미한다.
- [0139] 단순 혼합의 경우, 매개체는 강한 소수성 상호작용에 의하여 단지 나피온의 비하전된 사슬 상에 흡착되어, 전자 전달은 어느 정도까지는 함께 존재하는 나피온의 비전도성 사슬과 효소의 단백질 껍질에 의하여 방해받을 수밖에 없을 것으로 판단된다. 예를 들면, 단순 혼합의 경우에 고정된 Ru(NH₃)₆³⁺에 대한 $i_{p,c}$ 는 Naf-Ru(NH₃)₆³⁺를 사용한 경우의 겨우 56% 수준이었다.
- [0140] 단순 혼합한 경우와는 달리, 나피온-매개체가 사용된 경우의 전자전달은 상술한 바와 같은 나피온의 전달(relayed) 채널에서 일어나서, 결국에는 함께 존재하는 비전도성 물질들이 분자간 전자전달에 매우 제한적인 영향만을 미칠 수 있다는 것을 의미한다.
- [0141] 실시예 3
- [0142] 개질 반응에 적합한 조건 도출
- [0143] 1 mL 물 내에 2.5 mg/mL로 나피온 농도를 고정하여 개질 반응 실험을 수행하였다(도 5). 이때, MV 농도에 따라 얻어진 Naf-MV(3 μL) 고정 전극(SPCE)에 대하여 CV 그래프를 얻었다(0.1 M 인산염 완충용액, pH 7.0, 주사속도: 0.002 V/s).
- [0144] 상기 도면에 나타난 바와 같이, 비대칭성의 벨-형 프로파일이 얻어졌으며, 최적 MV 농도는 0.25 mM이었다. 나

피온의 분자량이 $2.5 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ 이라고 가정하면, 최적 상대량(MV/나피온)은 25이었다. MV의 농도가 3 mM을 초과할 경우(상대량이 300임), 물 내에 다량의 불용성 겔-타입 고형분이 관찰되었으며, 수성 여과물 수집물을 사용한 실험에서는 검출 가능한 Naf-MV의 산화-환원 피크가 발견되지 않았다. 이러한 결과는 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 와 MV가 나피온에 대하여 강한 소수성 결합을 나타낸다는 점과 부합된다.

[0145] 최적 개질 반응 시간을 도출하기 위하여, 시간에 따라 생성된 Naf-MV 고정 SPCE의 캐소드 전하(Q_c)를 비교하였다(도 6).

[0146] 상기 경우, 낮은 주사 속도에서 CV는 시간에 따라 생성된 Naf-MV 고정 SPCE 각각에 대하여 기록되었다. 전기량 분석에 의하여 얻어진 캐소드 전하(Q_c)를 측정하였다.

[0147] 상기 도면에 나타난 바와 같이, 정규화된(normalized) Q_c 는 반응 시간에 따라 기하급수적으로 최대값까지 상승하는 경향을 나타내며, 그래프의 전환점은 약 12 시간이었다. 12시간 반응에 대한 고정된 Naf-MV의 Q_c 는 24시간 반응에 대한 Q_c 의 95.3% 수준이었다. 따라서, 12 시간의 반응시간을 후속 실험을 위한 최적 반응시간으로 볼 수 있다.

[0148] 본 실시예에서 얻어진 최적 반응시간은 다소 긴 것으로 고려될 수 있는데, 이는 큰 양이온의 개질 반응을 위하여 보다 긴 평형 시간이 요구되는 것 이외에도 나피온의 채널 내로 양이온이 들어가기 위하여는 시간을 요하기 때문으로 추측된다. 따라서, 격렬한 교반을 수행하는 것이 바람직하다.

[0149] 최적 반응 조건 하에서의 고정된 Naf-MV의 전기화학 특성 평가

[0150] 최적 반응 조건이 결정된 후, SPCE 상에 고정된 Naf-MV의 전기화학적 특성을 평가하기 위한 추가적인 평가 테스트를 수행하였다. $-0.25 \sim -1.4 \text{ V}$ 의 전위범위에서 Naf-MV 고정 SPCE에 대하여 연속적인 CV(5 사이클)를 기록하였다(도 7). 피크 상의 화살표는 사이클 증가에 따른 피크 전류 감소를 가리킨다.

[0151] 첫 번째 주사에서 큰 환원 피크 2개와 산화 피크 1개가 각각 -0.703V , -1.196V 및 -0.631V 에서 관찰되었다. 제 1 피크의 피크 전류 비(산화/환원, $i_{p,a}/i_{p,c}$)는 0.11이었다. 또한, $i_{p,c}$ 및 $i_{p,a}$ 는 후속 연속적인 주사에서 급격히 감소하였다. 이러한 현상은 제2 환원시 MV가 이량화 및/또는 중합화되고, 특히 고정된 MV가 전극 표면 위의 나피온 채널 내에서 가두어져 있기 때문으로 생각된다.

[0152] 이량화 및/또는 중합화 여부를 추가 확인하기 위하여, $-0.25 \sim -0.9 \text{ V}$ 전위 범위에서 연속적인 CV(10 사이클)를 기록하였다(도 8). 앞선 결과와는 달리, 명확한 산화 피크가 관찰되었고, 이때 전류 비($i_{p,a}/i_{p,c}$)는 0.70이었다. 따라서, 이량화 및/또는 중합화가 야기되었다는 설명은 타당한 것으로 판단된다. 반면, $i_{p,c}$ 및 $i_{p,a}$ 는 전체 주사 과정에서 거의 감소되지 않았는데, 이는 HPU 매트릭스에 의하여 Naf-MV를 고정하는 것이 효율적이라는 것을 의미한다.

[0153] 도 9는 다양한 주사 속도에서 Naf-MV 고정 SPCE에 대한 CV 그래프이다.

[0154] 그 결과, $i_{p,c}$ 및 $i_{p,a}$ 는 0.2 V/s 까지의 주사 속도에 따라 선형적으로 증가하였다($i_{p,c}$ 에 대한 $r^2=0.991$, $i_{p,a}$ 에 대한 $r^2=0.977$). 이는 표면으로 제한된 산화-환원 물질의 전형적인 거동으로 볼 수 있다. 따라서, SPCE에 고정된 Naf-MV가 안정적이고, 상기 Naf-MV 층 내에 고정된 MV가 분자간 전자전달에 있어서 활성을 갖고 있음을 알 수 있다.

[0155] 한편, 다른 체적(volume)으로 Naf-MV가 고정된 SPCE에 대하여 CV를 기록하였다(도 10). 상기 도면에 나타난 바와 같이, 고정된 체적이 증가할수록 $i_{p,c}$ 및 $i_{p,a}$ 는 증가하였으며, 피크 분리(ΔE_p)가 약간 증가하였다.

[0156] 전기량 분석에 의하여 얻어진 Q_c 는 고정된 MV 양이 $5 \mu\text{L}$ 의 고정된 Naf-MV까지 직선 관계인 것을 보여준다

($r^2=0.996$). 이러한 결과는 비록 함께 존재하는 비전도성 나피온 고분자가 동시에 증가함에도 불구하고, Naf-MV 층 내에 고정된 MV가 분자간 전자전달에 있어서 활성을 갖고 있음을 뒷받침한다.

[0157] 도 11은 0.1 M PB, pH 7.0 및 주사속도 0.002 V/s에서 3 μ L의 Naf-MV가 고정된 SPCE에 대하여 CV를 기록한 그래프이다. 이로부터 얻어진 전기화학적 특성은 하기와 같다:

[0158] $E_{p,c}=-0.638$ V

[0159] $E_{p,a}=0.628$ V

[0160] $E_p=0.010$ V

[0161] $E^0(E_{p,c}+E_{p,a})/2=-0.633$ V

[0162] $i_{p,a}/i_{p,c}=0.807$

[0163] $E_{p,1/2}=0.0836$ V

[0164] 상기 도면에 따르면, Naf-MV가 고정된 SPCE에 대한 CV는 거의 대칭적인 벨-형상, 즉 Nernstian 흡착물(adsorbate)에 대한 형태를 보여주고 있으며, 이때 작은 ΔE_p 가 관찰되었다. 이는 고정된 MV의 분자간 전자전달이 효율적임을 의미한다. 이러한 작은 ΔE_p 는 $v \rightarrow 0$ 인 극한 조건 하에서 0까지 더 감소할 것이라는 합리적인 추론을 가능케 한다. 또한, CV로부터 얻어진 $\Delta E_{p,1/2}$ 값은 0.0836 V($v=0.002$ V/s)이었고, 이는 Nernstian 흡착물에 대하여 계산된 값(0.0906 V)과 거의 일치하였다.

[0165] 또한, 고정된 Naf-MV에 대하여 얻어진 ΔE_p 값은 확산된 MV에 대한 값에 근사하였는데, 이는 확산된 MV의 전위가 전극과 고정된 Cu-NiR 사이의 분자간 전자전달에 적합하기 때문에 매우 중요하다. 전기량 분석을 통하여 얻어진 Q_c 는 2.24×10^{-4} C로서, 이는 1.18×10^{-8} mol cm^{-2} 의 표면 밀도(surface coverage; Γ_0^*)로 변환될 수 있다.

[0166] 이외에도, 이러한 표면 밀도는 층 내에서의 MV 2.32×10^{-9} mol에 상당하고, 이는 다시 Naf-MV 내의 MV 0.773 mM로 변환될 수 있다. Naf-MV 내의 나피온 농도는 약 6.45×10^{-5} M로 계산될 수 있으며, 따라서 개질 생성물은 Naf-MV₁₂로 표시될 수 있다.

[0167] 이와 달리, 표면 밀도는 $i_{p,c}$ 로부터 계산될 수 있는데, 이와 같이 얻어진 표면 밀도는 1.27×10^{-8} mol cm^{-2} 이었으며, 이는 층 내의 MV 2.49×10^{-9} mol에 상당한다. 상기 값은 전기량 분석으로부터 얻어진 결과와 유사하다. 전기량 분석에 의하여 얻어진 생성물 내 상대량(MV/Nafion=12)은 최적 반응 혼합물 내의 상대량의 절반 수준인바, 이는 고정된 MV의 전자전달 효율이 약 50%임을 의미한다.

[0168] 환언하면, 고정된 MV의 약 50%가 나피온 채널을 통한 분자간 전자전달에 참여할 수 있는 반면, 나머지 50%는 나피온 채널의 적합하지 않은 방향성에 기인하여 참여하지 않았음을 의미한다.

[0169] 실시예 4

[0170] 공동 고정화의 최적화

[0171] 본 실시예에서는 Naf-MV 및 NiR가 공동 고정된 SPCE를 최적화하기 위한 실험을 수행하였다.

[0172] 전극의 응답은 고정된 NiR 및 Naf-MV의 량에 직접적으로 의존하였다. 각각 1.5+1.5, 2+2 및 3+3의 체적 조합($V_{\text{Naf-MV}}+V_{\text{NiR}}=\mu\text{L}+\mu\text{L}$)에 대하여 보다 높은 응답이 관찰되었는데, 이는 각각 3.75+7.5, 5+10 및 7.5+15의 질량 조합($m_{\text{Naf-MV}}+m_{\text{NiR}}=\mu\text{g}+\mu\text{g}$)에 상당한다(도 12). 따라서, 1.5 μ L+1.5 μ L(3.75 μ g+7.5 μ g)의 조합을 최적 량으로

정할 수 있을 것이다.

[0173] 도 11에 따르면, 3 μL (7.5 μg)의 Naf-MV의 고정 결과, 전극 표면 상에 2.32×10^{-9} mol의 MV가 고정되었고, 이는 3.09×10^{-10} mol MV $\cdot$ g⁻¹Naf-MV에 상당한다. Naf-MV(3.75 μg) 및 NiR(7.5 μg)의 최적 질량은 각각 1.16×10^{-9} mol(MV) 및 9.38×10^{-11} mol(NiR)로 변환될 수 있으며, 이는 MV/NiR(몰 기준)의 비가 12.4임을 의미한다. 이는 실시예 3에서 제시된 Naf-MV에서의 값(MV/Nafion)과 유사하다. 또한, NiR/Nafion 비(몰 기준)=1이 전극에 대한 적합한 조합임을 의미하며, 앞서 제시된 Naf-MV 및 NiR 고정 전극에 대한 전자전달 메커니즘과 잘 일치한다.

[0174] 반면, 3개의 질량 조합에 대한 응답은 고정된 총 질량이 증가하였음에도 불구하고 거의 변화되지 않았다. 이는 상술한 전자전달 메커니즘, 즉 분자간 전자전달이 나피온의 전달 채널 내에서 일어나므로 함께 존재하는 비전도성 나피온 고분자 및 NiR의 단백질 겹질이 이러한 전자전달에 제한된 영향만을 미친다는 것을 한층 뒷받침한다.

[0175] 전술한 바와 같이, Cu-NiR의 촉매 작용에 의하여 아질산염을 산화질소(NO)로 환원시키는 반응은 1-전자/2-양성자 프로세스이다. 따라서, pH는 전극의 응답에 직접 영향을 미칠 것이다. 도 13(1 mM 아질산염에 대한 촉매적 환원 전류(주사 속도: 0.002 V/s)를 비교하였음)에서 나타난 바와 같이, 산성 범위가 염기 영역보다 유리하고, 최적 pH는 6.5이다.

[0176] 통상 다른 소스로부터 정제된 유리(free) Cu-NiR에 대한 최적 pH 범위가 6.0~6.2인 것을 고려하면, 고정된 Cu-NiR에 대한 최적 pH는 유리 Cu-NiR에 대한 값과 비교하면, 거의 변하지 않았음을 알 수 있다. 이는 본 실시예에 따른 고정방법이 효소를 잘 유지할 수 있고, 공유 결합이나 전기중합과 같은 다른 테크닉에 비하여 우수함을 의미한다.

[0177] 실시예 5

[0178] 바이오 센서로서의 적용시 성능 인자

[0179] 도 14a는 최적 조건에서 연속적인 아질산염 농도 증가분(주입 당 1 μM)에 대한 센서의 전형적인 정상 상태 전류 응답을 나타낸다(0.1 M 인산염 완충액, pH 6.5, 아르곤 분위기). E_{app} 는 -0.75V이었다.

[0180] 기질 농도는 교반 완충용액으로 농축된 용액을 단계적으로 첨가함으로써 변경되었다. 도 14에 도시된 바와 같이, 낮은 농도의 아질산염에 대한 전기량 분석 신호는 안정적이고 명확하였다. 이 정도로 낮은 농도의 아질산염에서 얻어진 전기량 센서 신호는 현재까지 보고된 바 없다는 점은 주목할 만하다.

[0181] 센서의 응답 시간($t_{90\%}$)은 약 20초이었으며, 이는 알려진 멤브레인계 바이오센서의 응답 시간($t_{95\%}$ =3분)에 비하여 훨씬 짧았다. 이론적으로, 멤브레인은 거의 예외없이 응답 시간을 길게 하고 센서 응답 강도를 낮추는 추가적인 확산 배리어(diffusional barrier)로서 작용한다. 그럼에도 불구하고, 본 실시예에서 얻은 응답 시간은 상당히 짧다고 할 수 있다.

[0182] 연속 주입시 센서의 응답은 점차 빨라졌으며, 2~3회의 주입 후에는 점진적으로 정상 상태에 도달하였다. 이러한 현상은 친수성 폴리우레탄과 Naf-MV/Nafion 복합체를 통한 물질 전달용 채널의 형성에 기인하는 것으로 설명할 수 있다.

[0183] 도 14b는 센서의 캘리브레이션 커브를 도시한다. 센서의 감도, 선형 검출 범위 및 LOD(limit of detection)은 각각 17.0 nA μM^{-1} , 0~24 μM ($r^2=0.999$) 및 35 nM ($S/N = 3$)이었다. 앞서 제시한 전자전달 메커니즘에 따르면, 소수성 상호작용에 의하여, Cu-NiR의 타입-1 Cu 사이트(전자전달 사이트)와 나피온의 전자전달 채널의 단부 사이의 계면 상에 "복합(composite)" 상태가 형성되는데, 이는 Cu-NiR의 타입-1 사이트가 다수의 음 하전 잔기에 의하여 둘러싸여 있는 소수성 표면 캐비티(cavity) 아래 약 7Å 거리에 위치하고 있기 때문이다. 본 발명자들은 상기 얻어진 감도를 다른 보고된 결과와 비교하지는 않았는데, 본 실시예를 제외하고는 현재까지 알려진 다른 아질산염 센서에서 SPCE를 사용하지 않았을 뿐만 아니라, 탄소 페이스트 전극은 GCE만큼 민감하지 않기 때문이다. 상기 센서의 LOD는 35 nM이었던 바, 이는 상기 센서가 실제 샘플 내의 아질산염을 검출하는데 효과적이라는 것을 의미한다.

- [0184] 예를 들면, 식염수 내의 허용 가능한 최대 아질산염은 EU 기준으로 약 2.2 μM 이며, 본 실시예에서 제시된 타입의 센서에 의하여 충분히 검출될 수 있는 수준이다.
- [0185] 속도론 면에 있어서, NiR와 생동등성 고분자 사이에는 정전기적 인력, 친수성 및 소수성 접촉, 수소 결합, 염 브릿지(또는 극성 상호작용) 등과 같은 다양한 상호 작용이 존재한다. 하전되지 않은 나피온의 사슬은 높은 소수성을 나타내기 때문에 본 실시예에서 얻어진 상대적으로 큰 K_M^{app} 값(494 μM)은 공동 고정된 Cu-NiR에 대한 나피온의 상대적으로 낮은 친화도때문으로 판단된다. 반면, 상대적으로 큰 K_M^{app} 값은 멤브레인을 가로지르는 물질 전달에 있어서 상대적으로 큰 제한이 존재한다는 것을 의미한다.
- [0186] 그러나, 본 실시예에 있어서, 이러한 인자는 다음과 같은 이유에서 무시될 수 있다:
- [0187] 첫째, 모든 실험에서 고정을 위하여 동일한 멤브레인(HPU)이 사용되었다.
- [0188] 둘째, 나피온은 비-가교 고분자로 알려져 있으므로, HPU 멤브레인 내의 NiR/Naf-MV 층을 통한 물질 전달이 상대적으로 용이하기 때문이다.
- [0189] 동일한 셋(n=10) 내에서 제조된 센서에 대한 상대 표준 편차(RSD)는 3.4%이었다. 상기 값은 Cu-NiR가 고정된 아질산염 바이오센서(상대표준편차: 3.0%(n=6))에 대한 상대 표준 편차와 비슷한 수준이었다. 또한, 상기 값은 비올로젠-개질 고분자 및 Cu-NiR가 공동 고정된 센서로부터 얻어진 값과 비슷하였다(RSD: 2.8~3.5%). 그러나, 다른 셋(n=7)에서 제조된 센서의 상대표준편차는 6.2% 정도였다. 이 역시 비올로젠-개질 고분자 및 Cu-NiR가 공동 고정된 센서로부터 얻어진 값과 비슷하였다.
- [0190] NiR계 바이오센서 개발에 있어서, 과제 중 하나는 효소의 안정성이 낮다는 점을 들 수 있는데, 본 실시예에 있어서 센서의 감도는 상온, 대기 조건 하에서 1개월 저장한 후에도 14.3 nA μM^{-1} 이었다. 효소 전극의 장기적 안정성이 고정 효소가 초기 활성의 80%를 보유하는 기간으로 정의할 경우, 센서의 저장 안정성은 약 38일로 평가되었다. 이러한 장기적 안정성은 이미 보고된 수준보다는 명백히 우수하다.
- [0191] 특히, 호스트 고분자 필름의 소수성이 포획된 효소(NiR)의 구조를 변화시켜 촉매 활성을 저하시킨다는 보고가 있었음을 고려할 때, 나피온의 일정 수준의 소수성으로 인하여 센서의 안정성이 어느 정도 저하될 것이라는 추측에도 불구하고, 본 실시예에서 얻어진 장기적 안정성은 예기치 못한 것이다. 실제, Cu-NiR 및 MV를 폴리비닐알코올(PVA) 포획에 의하여 공동 고정한 유사한 예에 있어서, 동일 조건 하에서의 저장 안정성은 24일이었다.
- [0192] 바이오센서의 정확성을 테스트하기 위하여, 회수(recovery) 테스트를 수행하였다. 기질 농도는 센서의 선형 범위 내에서 캘리브레이션 커브로부터 결정되었다. 센서 감도는 표준화하여 다른 제조에서의 감도 차이를 보상하였다. 계산에 대한 선형회귀식(linear regression equation)은 하기와 같다:
- [0193] $I = 17.0 \times \text{Conc.} + 3.26$
- [0194] 상기에서, I는 nA 단위의 전류이고, Conc.는 μM 단위의 아질산염 농도이다. 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있었다.

표 1

[0195]

첨가량 (μM)	측정값 ^a (μM)	회수 (%)	RSD (%)
1	0.93	93	3.4
5	4.75	95	3.1
10	9.90	99	2.8
15	14.7	98	3.0
20	19.4	97	3.2

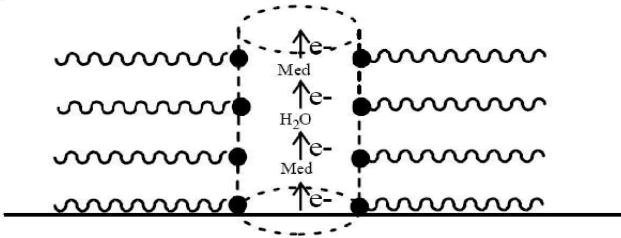
[0196] ^a: 5회 측정의 평균값임.

[0197] 다소 높은 RSD 값(실험 데이터의 분포 정도)의 경우, NiR와 Naf-MV 혼합물의 로딩 량 및 HPU 멤브레인의 균일성에 있어서의 차이에 기인하는 것으로 볼 수 있다.

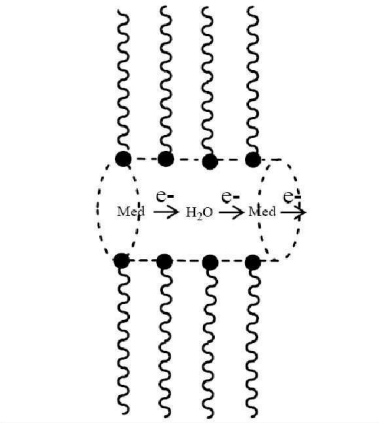
- [0198] 상술한 실험 결과를 고려하면, 상기 센서는 감도, 내구성, 신속성, 재현성, 선택성 및 간편성 면에서 우수하다는 결론을 내릴 수 있다.
- [0199] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 모두 본 발명의 영역에 속하는 것으로, 본 발명의 구체적인 보호범위는 첨부된 특허청구범위에 의하여 명확해질 것이다.

도면

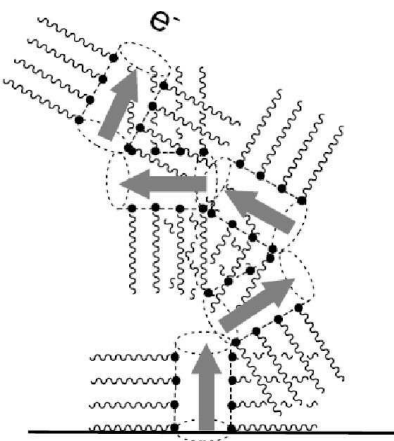
도면1a



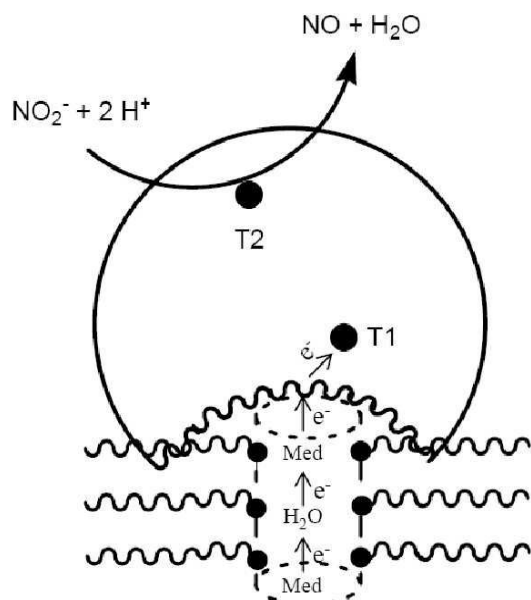
도면1b



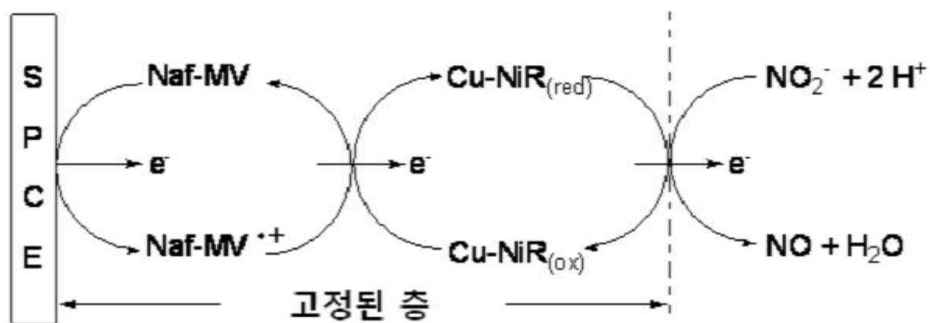
도면1c



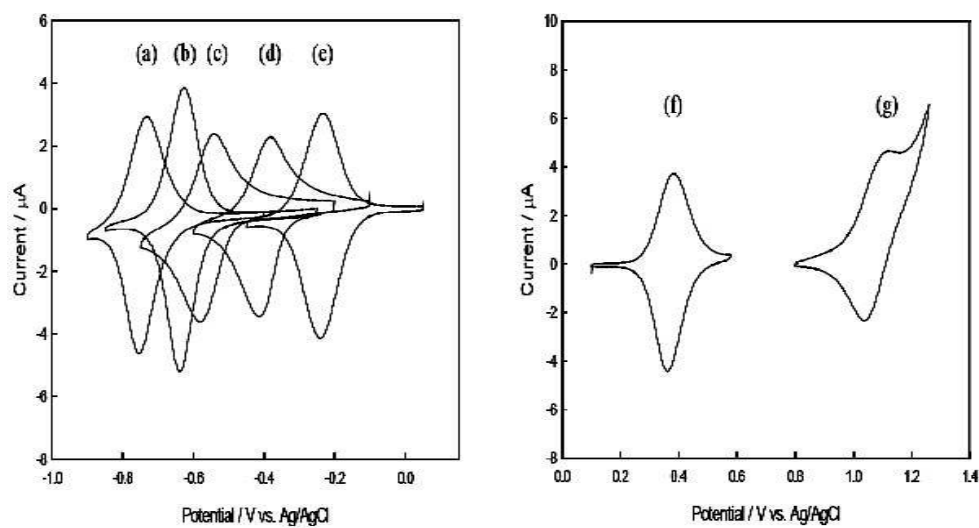
도면1d



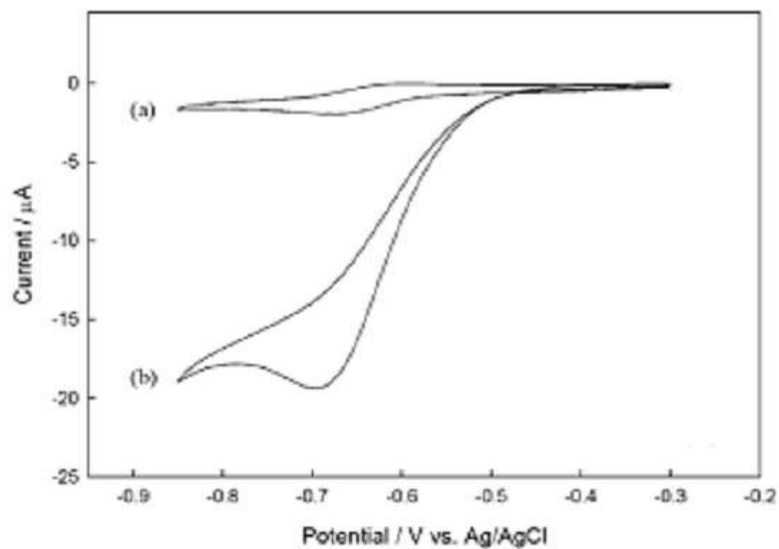
도면2



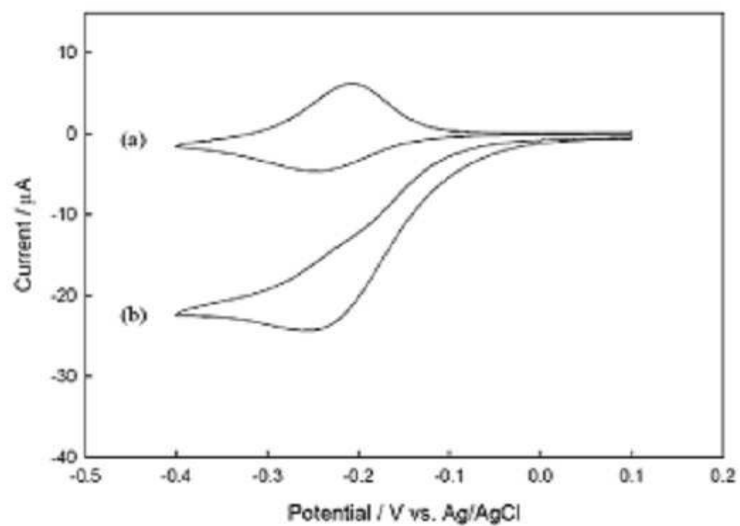
도면3



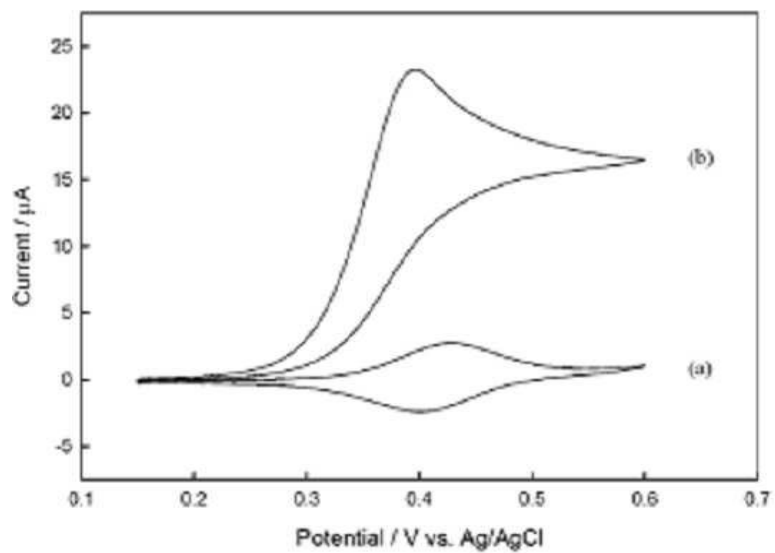
도면4a



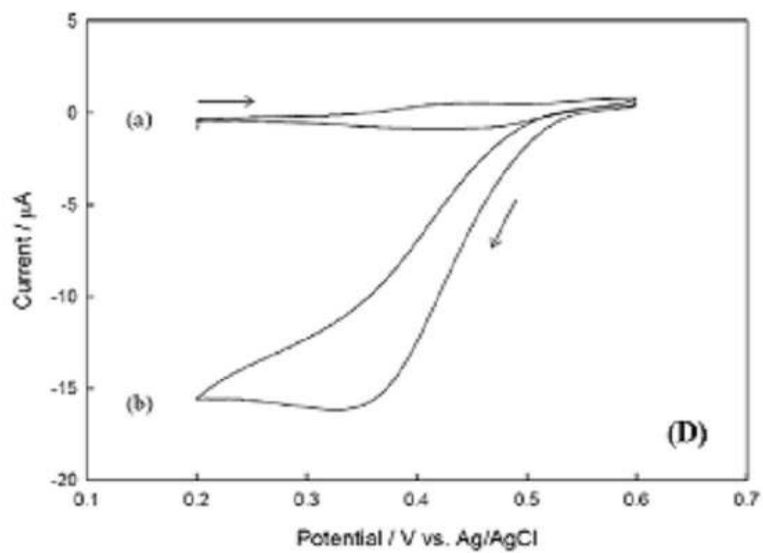
도면4b



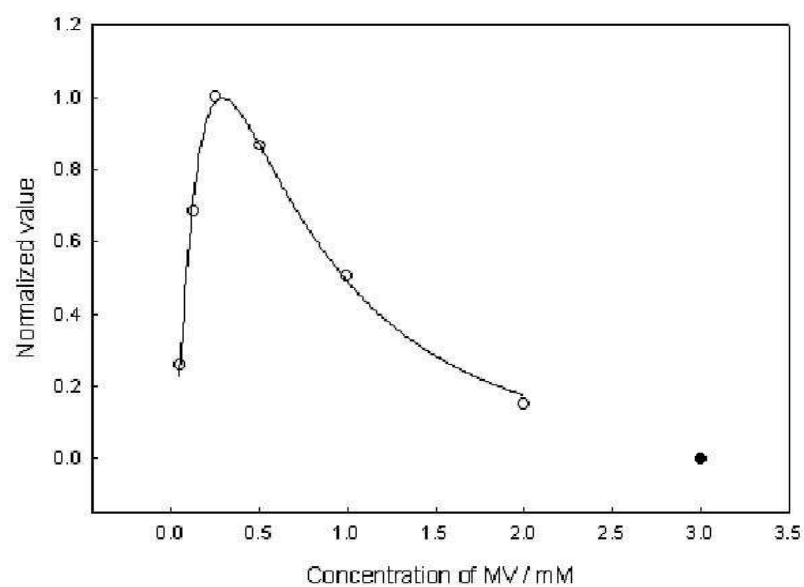
도면4c



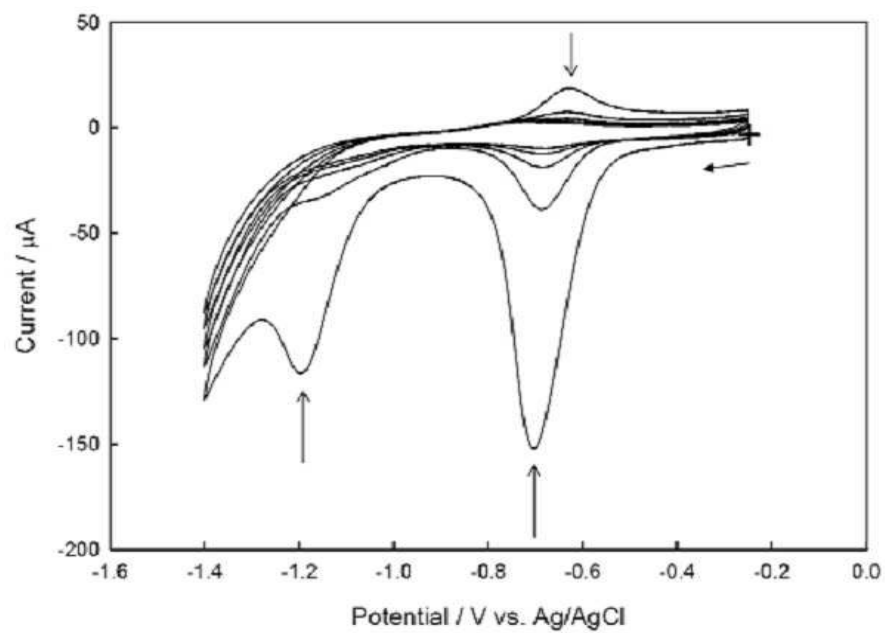
도면4d



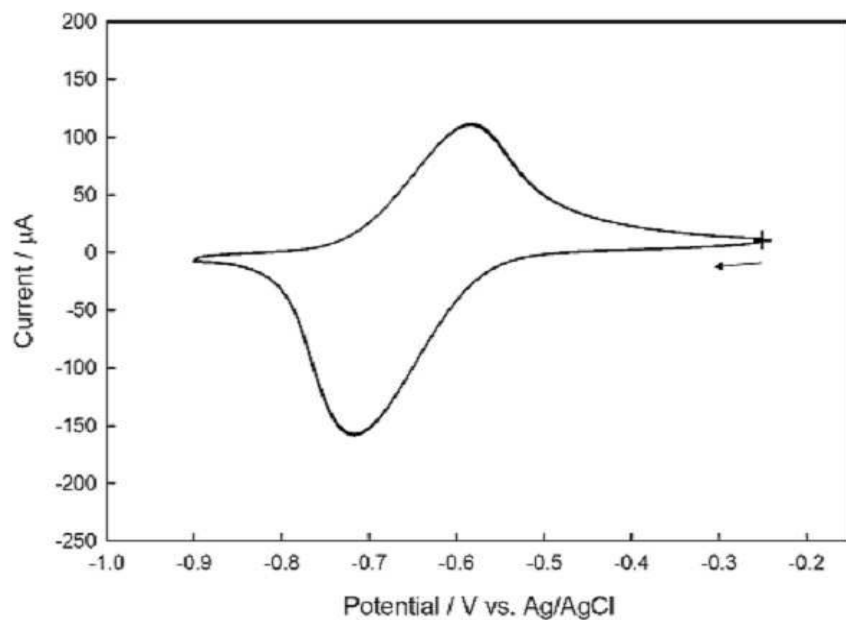
도면5



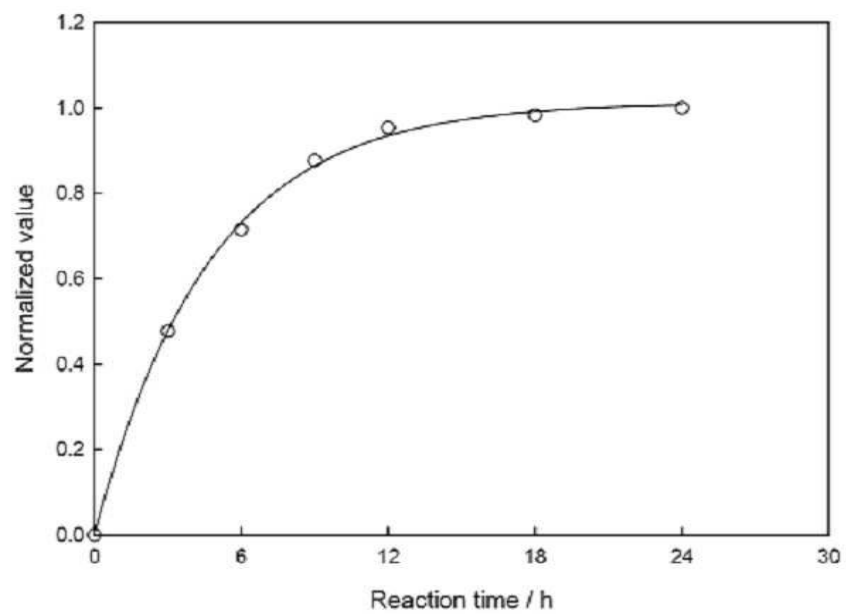
도면6



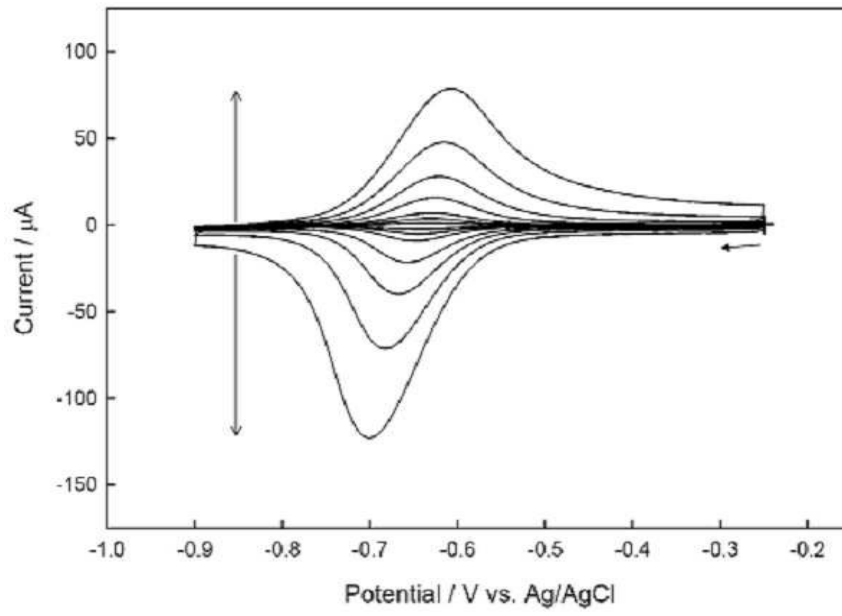
도면7



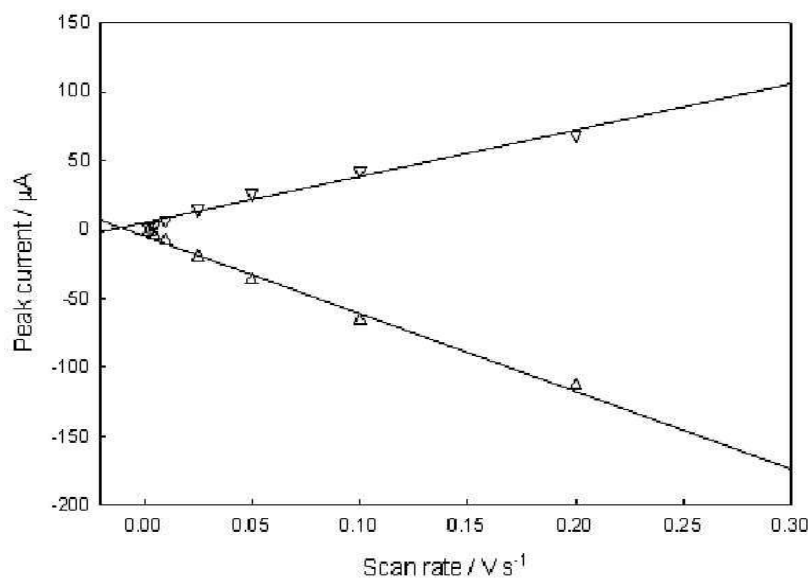
도면8



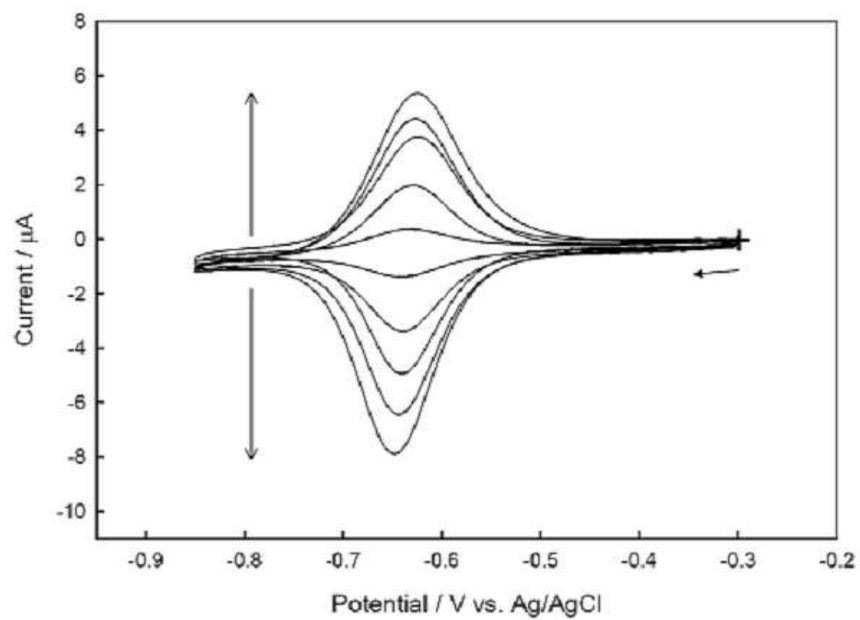
도면9a



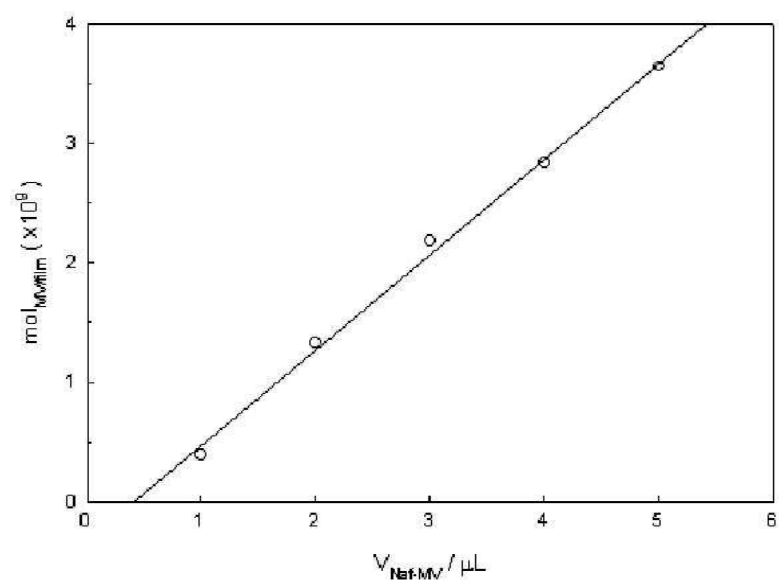
도면9b



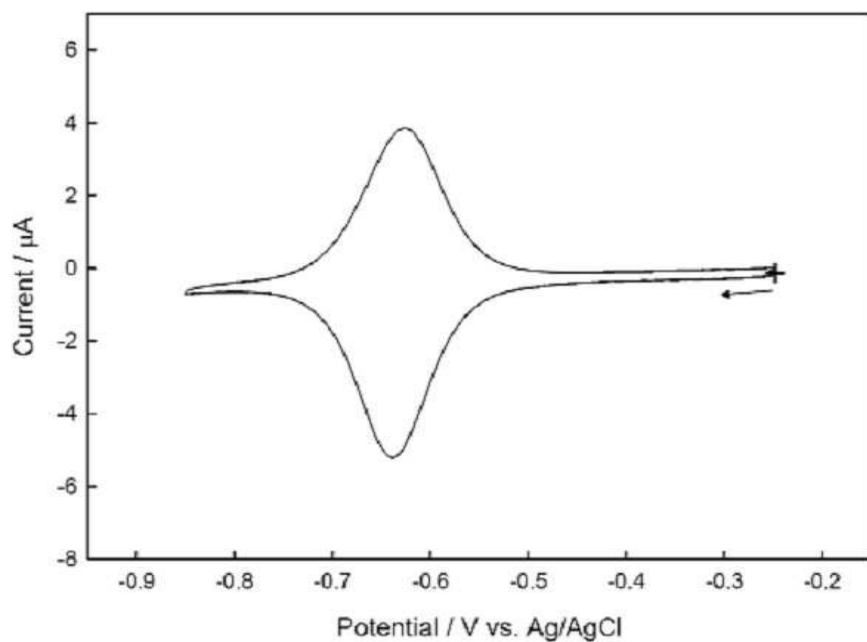
도면10a



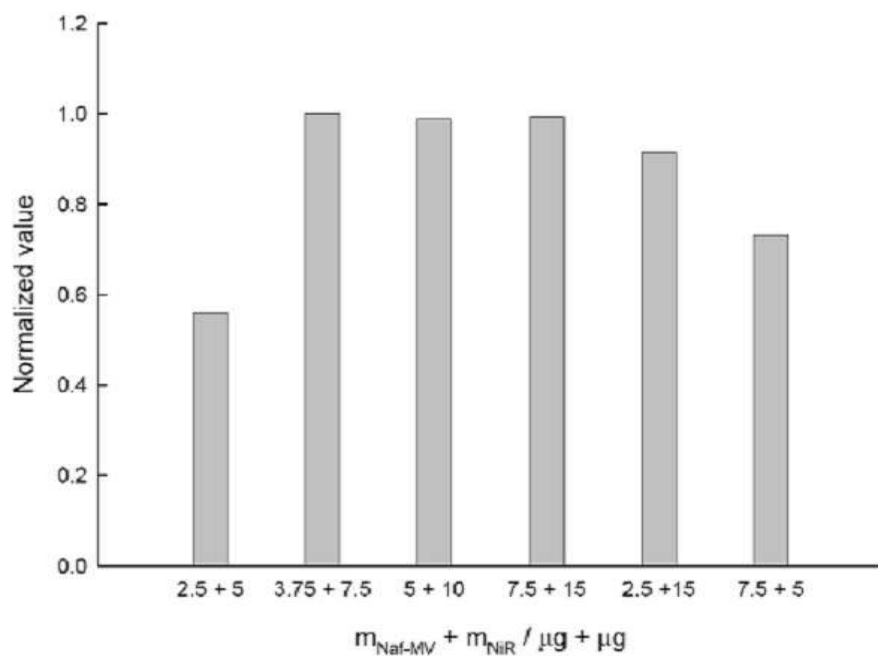
도면10b



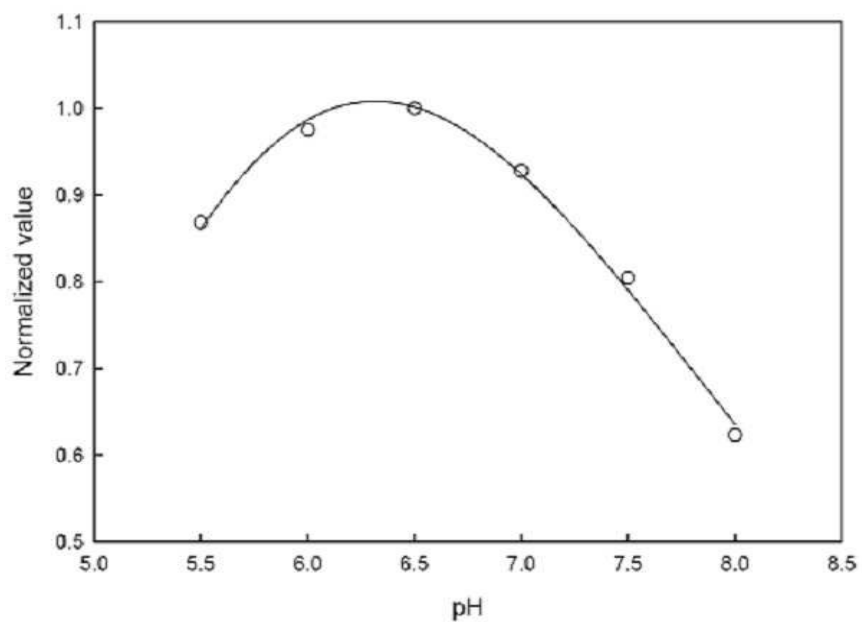
도면11



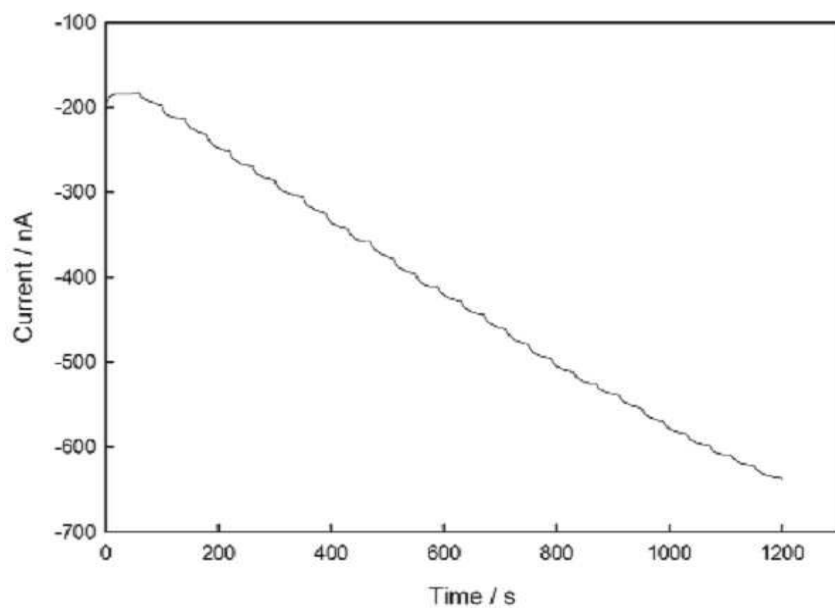
도면12



도면13



도면14a



도면14b

