(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0009761
(43) 공개일자 2025년01월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 27/327 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 27/3271 (2013.01)
G01N 27/3272 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0089775
(22) 출원일자 2023년07월11일
심사청구일자 2023년07월11일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김창준
경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 104동 103호 (평거동,들말대경아파트)
양영일
경상남도 진주시 석갑로 45, 110동 1403호 (평거동, 들말흥한아파트)
(74) 대리인
특허법인충현

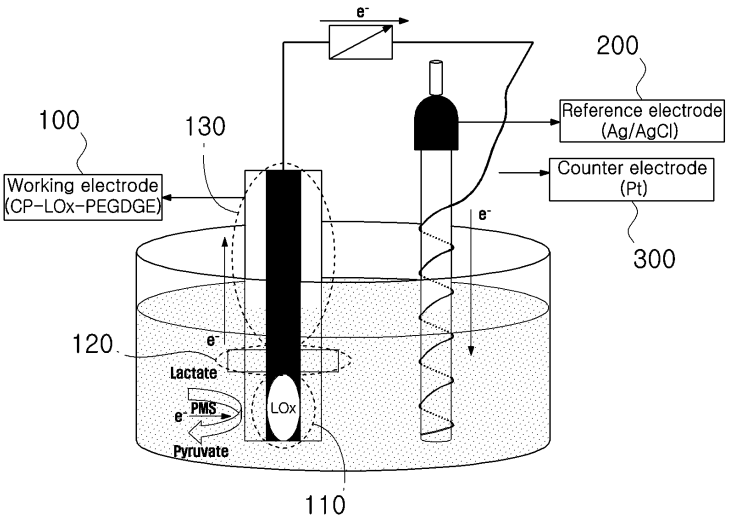
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **이효소 기반 젖산 검출용 센서 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 이효소 기반 젖산 검출용 센서 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 이효소 기반으로 전자전달매체와 가교제를 이용하여 효소층을 기능화하고, 탄소종이를 적용함으로써 낮은 감지 농도에서 높은 민감도로 동작하고, 사용자 맞춤형으로 제작이 가능한 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 27/3278 (2013.01)
G01N 2333/904 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711163844
과제번호 2020R1F1A1054433
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 땀속의 젖산을 연료로 전기를 생산하는 효소-미토콘드리아연료전지 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경상국립대학교 산학협력단
연구기간 2020.06.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2021003
과제번호 2021RIS-003
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업
연구과제명 작업자 피로도 측정 바이오센서 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경상국립대학교 산학협력단
연구기간 2022.08.01 ~ 2023.03.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

탄소종이를 포함하는 전극; 및

상기 전극 상에 고정된 전자전달매개체, 젖산 산화효소, 과산화수소 분해효소 및 가교제를 포함하는 효소층;으로 구성된 이효소 기반 젖산 검출용 센서.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 전극은,

상기 탄소종이 상에 코팅된 탄소나노튜브를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 젖산 검출용 센서.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 탄소나노튜브는 단일벽 탄소나노튜브(single-walled carbon nanotube; SWCNT) 또는 카르복실기로 기능화된 단일벽 탄소나노튜브(carboxylic acid-functionalized SWCNT)인 것을 특징으로 하는 젖산 검출용 센서.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 전자전달매개체는 Os-고분자 복합체인 산화환원성 고분자(redox polymer), 페로센메탄올(ferrocenemethanol), 페리시안화칼륨($K_3[Fe(CN)_6]$) 및 하이드로 퀴논(hydroquinone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 젖산 검출용 센서.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 가교제는 PEGDGE(Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether)인 것을 특징으로 하는 젖산 검출용 센서.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 효소층에서, 전자전달매개체, 젖산 산화효소, 과산화수소 분해효소 및 가교제는 4 : 2 : 2 : 0.5 내지 4 : 2 : 2 : 2의 부피비로 고정된 것을 특징으로 하는 젖산 검출용 센서.

청구항 7

a) 탄소종이를 포함하는 전극을 준비하는 단계;

b) 상기 전극 상에 전자전달매개체, 젖산 산화효소, 과산화수소 분해효소 및 가교제를 포함하는 혼합물을 도포하여 효소층을 제조하는 단계; 및

c) 상기 효소층을 건조하는 단계;를 포함하는 젖산 검출용 센서의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 a) 단계 이후, b) 단계 전에

a') 상기 전극의 탄소종이 상에 탄소나노튜브 분산액을 코팅하는 단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 젖산 검출용 센서의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 탄소나노튜브는 단일벽 탄소나노튜브(single-walled carbon nanotube; SWCNT) 또는 카르복실기로 기능화된 단일벽 탄소나노튜브(carboxylic acid-functionalized SWCNT)인 것을 특징으로 하는 젖산 검출용 센서의 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 탄소나노튜브 분산액은 탄소나노튜브를 증류수에 혼합하고, 초음파 처리한 후, 원심분리하여 얻어진 상등액인 것을 특징으로 하는 젖산 검출용 센서의 제조방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 전자전달매개체는 Os-고분자 복합체인 산화환원성 고분자(redox polymer), 페로센메탄올(ferrocenemethanol), 페리시안화칼륨($K_3[Fe(CN)_6]$) 및 하이드로 퀴논(hydroquinone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 젖산 검출용 센서의 제조방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 가교제는 PEGDGE(Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether)인 것을 특징으로 하는 젖산 검출용 센서의 제조방법.

청구항 13

제7항에 있어서,

상기 b) 단계에서, 전자전달매개체, 젖산 산화효소, 과산화수소 분해효소 및 가교제는 4 : 2 : 2 : 0.5 내지 4 : 2 : 2 : 2의 부피비로 혼합된 혼합물인 것을 특징으로 하는 젖산 검출용 센서의 제조방법.

청구항 14

제7항에 있어서,

상기 b) 단계는 10 내지 30 ℃에서 0.1 내지 5 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 젖산 검출용 센서의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 이효소 기반 젖산 검출용 센서 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 이 센서는 높은 정확도와 민감도를 제공하여 다양한 응용 분야에서 젖산의 신속하고 정확한 감지를 가능하게 한다.

배 경 기 술

[0002] 인체의 땀에는 건강 상태 및 질병과 관련된 분자 및 이온, 바이오마커 물질이 많이 포함되어 있기 때문에 비침습적으로 이들을 감지할 수 있는 땀 기반 웨어러블 센서가 최근에 주목을 받고 있다. 현재까지 상용화된 대부분의 웨어러블 의료 및 헬스케어 기기는 혈액, 땀과 같은 생체시료로부터 얻어지는 화학적인 바이오마커를 측정 및 정량화하기 어렵기 때문에 상대적으로 모니터링하기 쉬운 심박 수, 체온 등의 지표만을 사용하고 있다.

[0003] 신체의 화학적 지표 중 젖산은 혈액과 땀 모두에 존재하며, 산소가 없는 상태에서 포도당이 분해되는 동안 생성되기 때문에 근육의 산소 공급뿐만 아니라 신체 활동의 강도와 근육의 산소 공급 상태를 반영하는 중요한 바이오 마커이다. 따라서 젖산의 농도는 건강상태를 파악하는데 중요한 지표이며, 실시간 모니터링하면서 과도하게 분비되지 않도록 주의해야한다.

[0004] 전기화학적 바이오센싱은 땀 젖산 검출에 가장 광범위하게 사용되는 방법임에도 불구하고, 최근까지 연구 발표된 센서들은 감도가 낮고, 땀에서 예상되는 수준보다 훨씬 낮은 선형 범위의 젖산 검출을 나타내거나, 검출 속도가 느리거나 정확도가 낮아 대량 측정이 어려우며, 일부 기술은 복잡한 제조 과정이 필요하거나 비용이 많이 드는 등의 문제를 가지고 있어 상업화에 제약이 있다.

[0005] 따라서 정확하고 신속한 젖산 검출 방법과 그에 대응하는 고성능 센서의 필요성이 높아지고 있는 바, 본 발명은 상술한 문제점을 해결하고, 더 나은 젖산 검출 성능을 제공할 수 있도록 새로운 구조를 갖는 젖산 검출용 센서를 완성하고자 노력하였고, 그 결과 실용적이고 경제적이면서 검출 속도와 정확도가 우수한 젖산 검출용 센서를 완성하기에 이르렀다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 공개특허공보 제10-2020-0018208호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 감안하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 이효소 기반 젖산 검출용 센서를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 이효소 기반 젖산 검출용 센서의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 상기 목적을 이루기 위하여, 탄소종이를 포함하는 전극; 및

[0010] 상기 전극 상에 고정된 전자전달매개체, 젖산 산화효소, 과산화수소 분해효소 및 가교제를 포함하는 효소층;으로 구성된 이효소 기반 젖산 검출용 센서를 제공한다.

[0011] 상기 전극은, 상기 탄소종이 상에 코팅된 탄소나노튜브를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0012] 상기 탄소나노튜브는 단일벽 탄소나노튜브(single-walled carbon nanotube; SWCNT) 또는 카르복실기로 기능화된 단일벽 탄소나노튜브(carboxylic acid-functionalized SWCNT)일 수 있다.

[0013] 상기 전자전달매개체는 Os-고분자 복합체인 산화환원성 고분자(redox polymer), 페로센메탄올(ferrocenemethanol), 페리시안화칼륨($K_3[Fe(CN)_6]$) 및 하이드로 퀴논(hydroquinone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0014] 상기 가교제는 PEGDGE(Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether)일 수 있다.

[0015] 상기 효소층에서, 전자전달매개체, 젖산 산화효소, 과산화수소 분해효소 및 가교제는 4 : 2 : 2 : 0.5 내지 4 : 2 : 2 : 2의 부피비로 고정된 것일 수 있다.

[0016] 본 발명은 상기 다른 목적을 이루기 위하여, a) 탄소종이를 포함하는 전극을 준비하는 단계; b) 상기 전극 상에 전자전달매개체, 젖산 산화효소, 과산화수소 분해효소 및 가교제를 포함하는 혼합물을 도포하여 효소층을 제조하는 단계; 및 c) 상기 효소층을 건조하는 단계;를 포함하는 젖산 검출용 센서의 제조방법을 제공한다.

[0017] 상기 a) 단계 이후, b) 단계 전에 a') 상기 전극의 탄소종이 상에 탄소나노튜브 분산액을 코팅하는 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0018] 상기 탄소나노튜브는 단일벽 탄소나노튜브(single-walled carbon nanotube; SWCNT) 또는 카르복실기로 기능화된

단일벽 탄소나노튜브(carboxylic acid-functionalized SWCNT)일 수 있다.

[0019] 상기 탄소나노튜브 분산액은 탄소나노튜브를 증류수에 혼합하고, 초음파 처리한 후, 원심분리하여 얻어진 상등액일 수 있다.

[0020] 상기 전자전달매개체는 Os-고분자 복합체인 산화환원성 고분자(redox polymer), 페로센메탄올(ferrocenemethanol), 페리시안화칼륨($K_3[Fe(CN)_6]$) 및 하이드로 퀴논(hydroquinone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0021] 상기 가교제는 PEGDGE(Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether)일 수 있다.

[0022] 상기 b) 단계에서, 전자전달매개체, 젖산 산화효소, 과산화수소 분해효소 및 가교제는 4 : 2 : 2 : 0.5 내지 4 : 2 : 2 : 2의 부피비로 혼합된 혼합물일 수 있다.

[0023] 상기 b) 단계는 10 내지 30 ℃에서 0.1 내지 5 시간 동안 수행되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따른 젖산 검출용 센서는 이효소 기반으로 하되, 전자전달매체와 가교제를 이용하여 효소층을 기능화하고, 탄소종이를 적용함으로써 낮은 감지 농도에서 높은 민감도로 동작하고, 사용자 맞춤형으로 제작이 가능한 효과가 있다.

[0025] 또한 본 발명에 따르면, 신체 부착 가능한 젖산 검출용 센서를 착용이 가능한 헬스케어 모니터링 시스템에 적용함으로써, 생체신호를 장시간 동안 생체 신호 측정 및 정보 수집이 가능한 효과가 있다.

[0026] 또한 본 발명의 젖산 검출용 센서는 고가의 장비없이 저온 용액 공정 기반으로 제작할 수 있으므로, 저비용으로 대량 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명에 따른 젖산 검출용 센서의 구조를 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 2는 비교예 1로부터 제조된 젖산 검출용 센서의 전극 특성을 비교한 결과이다.

도 3은 실시예 1로부터 제조된 이효소 기반 젖산 검출용 센서의 전극 특성을 비교한 결과이다.

도 4는 비교예 2로부터 제조된 이효소 기반 젖산 검출용 센서의 전극 특성을 비교한 결과이다.

도 5는 실시예 2로부터 제조된 이효소 기반 젖산 검출용 센서의 전극 특성을 비교한 결과이다.

도 6은 비교예 1, 2로부터 제조된 젖산 검출용 센서와 실시예 1, 2로부터 제조된 이효소 기반 젖산 검출용 센서의 anode 전류를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 7은 다양한 농도의 젖산을 포함하는 PBS 용액과 인공 땀 용액을 전해질로 하였을 때, 실시예 2의 이효소 젖산 검출 센서에 대한 성능 평가 결과 그래프이다.

도 8은 본 발명에 따른 젖산 검출용 센서를 적용한 젖산 모니터링 시스템을 예시한 도면이다.

도 9는 본 발명에 따른 젖산 검출용 센서를 적용한 젖산 모니터링 시스템이 측정한 젖산 수치를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하에서, 본 발명의 여러 측면 및 다양한 구현예에 대해 더욱 구체적으로 살펴보도록 한다.

[0029] 본 발명의 목적들, 다른 목적들, 특징들 및 이점들은 첨부된 도면과 관련된 이하의 바람직한 실시예들을 통해서 쉽게 이해될 것이다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 실시예들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 실시예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 통상의 기술자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.

[0030] 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해

되어야 한다.

[0031] 본 명세서에 있어서, 범위가 변수에 대해 기재되는 경우, 상기 변수는 상기 범위의 기재된 종료점들을 포함하는 기재된 범위 내의 모든 값들을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, "5 내지 10"의 범위는 5, 6, 7, 8, 9, 및 10의 값들뿐만 아니라 6 내지 10, 7 내지 10, 6 내지 9, 7 내지 9 등의 임의의 하위 범위를 포함하고, 5.5, 6.5, 7.5, 5.5 내지 8.5 및 6.5 내지 9 등과 같은 기재된 범위의 범주에 타당한 정수들 사이의 임의의 값도 포함하는 것으로 이해될 것이다. 또한 예를 들면, "10% 내지 30%"의 범위는 10%, 11%, 12%, 13% 등의 값들과 30%까지를 포함하는 모든 정수들뿐만 아니라 10% 내지 15%, 12% 내지 18%, 20% 내지 30% 등의 임의의 하위 범위를 포함하고, 10.5%, 15.5%, 25.5% 등과 같이 기재된 범위의 범주 내의 타당한 정수들 사이의 임의의 값도 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0032] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0033] 본 발명의 일 측면은 탄소종이를 포함하는 전극; 및 상기 전극 상에 고정된 전자전달매개체, 젖산 산화효소, 과산화수소 분해효소 및 가교제를 포함하는 효소층;으로 구성된 이효소 기반 젖산 검출용 센서에 관한 것이다.

[0034] 본 발명에 따른 이효소 기반 젖산 검출용 센서는 헬스케어 모니터링 제품과 사물인터넷 플랫폼을 기반으로 한 포괄적인 바이오센서 시스템 그리고 그에 파생된 기타 서비스에 사용될 수 있다. 예컨대, 무선 리모컨 시스템, 스마트 의류, 모바일 헬스케어 시스템, 스마트 워치, 스마트 스킨, 로보틱스, BMI(Brain Machine Interface) 장치, 사물인터넷과 결합된 형태의 바이오 전자 응용 장치 등에 적용될 수 있다. 본 발명에 따른 이효소 기반 젖산 검출용 센서는 생체 정보를 기반으로 한 사물인터넷과 결합하여 동작할 수 있다. 본 발명에 따른 이효소 기반 젖산 검출용 센서를 이용하여 생체 정보를 기반으로 한 개개인의 의학적 빅데이터 구축도 가능하다.

[0035] 도 1은 본 발명에 따른 이효소 기반의 젖산 검출용 센서의 구조를 개략적으로 나타낸 도면으로, 본 발명에 따른 이효소 기반의 젖산 검출용 센서(10)는 탄소종이를 포함하는 전극(100); 및 상기 전극(100) 상에 고정된 전자전달매개체, 젖산 산화효소, 과산화수소 분해효소 및 가교제를 포함하는 효소층(110);으로 구성된다.

[0036] 본 발명에 따른 이효소 기반의 젖산 검출용 센서는 젖산 검출용 센서 혹은 젖산 검출을 위한 바이오 시스템으로 활용될 때 anode로 적용될 수 있다.

[0037] 상기 전극(100)은 탄소종이를 포함한다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 전극(100)은 기판 상에 탄소종이가 부착된 것일 수 있으며, 상기 기판은 투명 소재의 기판일 수 있다.

[0039] 상기 투명 소재 기판은 폴리에틸렌테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 폴리스틸렌(polystyrene, PS), 폴리이미드(polyimide, PI), 폴리염화비닐(polyvinyl chloride, PVC), 폴리비닐필로리돈(polyvinylpyrrolidone, PVP) 및 폴리에틸렌(polyethlene, PE)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있으며, 바람직하게는 폴리염화비닐(PVC)일 수 있다.

[0040] 상기 기판의 두께는, 0.1 μm 내지 100 μm; 0.1 μm 내지 50 μm; 또는 1 μm 내지 20 μm일 수 있다. 상기 두께 범위 내에 포함되면 높은 유연 특성을 유지하면서 과도한 휨에 의한 손상을 방지할 수 있으나, 사용 목적에 따라 생략할 수도 있다.

[0041] 상기 전극(100)은, 상기 탄소종이 상에 코팅된 탄소나노튜브를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0042] 상기 탄소나노튜브는 단일벽 탄소나노튜브(single-walled carbon nanotube; SWCNT) 또는 카르복실기로 기능화된 단일벽 탄소나노튜브(carboxylic acid-functionalized SWCNT)일 수 있다.

[0043] 또한 상기 전극(100)의 하단 일 표면 또는 전면에 효소층(110)이 형성될 수 있으나, 하단 일 표면에 형성되는 것이 바람직하다. 상기 전극(100)의 중간부(120)에는 탄소종이가 용액과 접촉되지 않도록 코팅막이 형성될 수 있고, 상기 전극의 상단(130) 일 표면은 전위차계와 연결될 수 있다. 상기 하단, 중간부 및 상단의 표면 범위는 당업계에 공지된 정도라면 특별히 제한되지 않으며, 상기 하단, 중간부 및 상단의 표면 범위는 각각 독립적으로 서로 같거나 다르게 설계될 수 있다.

[0044] 상기 효소층(110)은 상기 전극 상에 고정된 전자전달매개체, 젖산 산화효소, 과산화수소 분해효소 및 가교제를 포함하는 것으로, 구체적으로 상기 전자전달매개체, 젖산 산화효소, 과산화수소 분해효소 및 가교제를 포함 포함하는 혼합물을 도포하여 제조되는 것일 수 있다.

[0045] 도 1에 나타나 있는 바와 같이 둘 이상의 효소가 분리되지 않고 동시에 고정화되어 있는 경우, 서로가 서로에게 간섭하여 활성을 낮추거나, 생성된 전자가 전극으로 이동하는 것을 방해하여 저항체로 작용하는 등의 문제를 야기할 수 있다고 알려져 있다. 그러나 본 발명에 따른 젖산 산화효소와 과산화수소 분해효소로 구성되는 이효소를 포함함에도 불구하고 전자전달체와 가교제 등의 구조로 인하여 낮은 감지 농도에서 높은 민감도로 동작할 수 있다.

[0046] 상기 전자전달매개체는 Os-고분자 복합체인 산화환원성 고분자(redox polymer), 페로센메탄올(ferrocenemethanol), 페리시안화칼륨($K_3[Fe(CN)_6]$) 및 하이드로 퀴논(hydroquinone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 Os-고분자 복합체인 산화환원성 고분자(redox polymer)일 수 있으며, 구체적으로 Poly (Nvinylimidazole)-[Os(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)$_2$Cl])$^{+/2+}$ (PVI-Os-dmo) 또는 Poly (N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)2Cl2])$^{+/2+}$ (PVI-Os-dCl)일 수 있다.

[0047] 상기 가교제는 효소를 전극 표면에 고정하면서 전자전달매개체와 서로 다른 두 효소의 상호작용을 잘 전달될 수 있도록 하는 것으로, PEGDGE(Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether)인 것이 바람직하다.

[0048] 상기 효소층에서, 전자전달매개체, 젖산 산화효소, 과산화수소 분해효소 및 가교제는 4 : 2 : 2 : 0.5 내지 4 : 2 : 2 : 2의 부피비로 고정되는데, 상기 범위를 초과하거나 미만인 경우에는 각 구성성분의 기능 및 상호작용이 올바르게 수행되지 않아 성능이 저하되는 문제가 발생할 수 있으며, 화학적 반응의 균형을 저하시켜 장기적인 안정성 문제가 발생할 수 있으며, 측정결과의 비일관성이 발생하여 정확도가 떨어지는 문제가 발생할 수 있다.

[0049] 본 발명의 다른 측면은 상기 젖산 검출용 센서를 포함하는 젖산 모니터링 시스템에 관한 것이다.

[0050] 상기 젖산 모니터링 시스템은 상기 젖산 검출용 센서에 모니터링 장치를 더 포함하는 것일 수 있고, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0051] 상기 모니터링 장치는, 바람직하게는 이식형 또는 부착형 연속 모니터링 장치일 수 있고, 생체 외부 또는 내부에서 안정적으로 동작할 수 있고, 장기간 복수 회 젖산 유무를 검출할 수 있다. 부착형 연속 모니터링 장치는, 젖산 검출용 센서를 피부 또는 의류 등에 부착하고, 수신기 또는 이동 설비를 통해 실시간으로 센서가 송신하는 데이터를 수신함으로써, 젖산 농도에 대한 장기 연속 모니터링을 달성한다. 예를 들어, 젖산을 측정할 수 있는 부착형 모니터링 장치에 있어서, 젖산에 대해 모니터링을 수행함과 동시에, 위험 젖산 농도 범위를 초과하는 경우 즉시 알람을 울림으로써, 과도한 노동이나 운동을 사전에 예방하여 위험을 막을 수 있다.

[0052] 상기 젖산 검출용 센서와 생체로부터 분비되는 시료가 접촉하게 되면, 전기화학적 계측법에 의해 젖산의 존재유무 또는 농도를 검출할 수 있게 된다. 상기 전기화학적 계측법으로서는, 예를 들면 산화 전류 또는 환원 전류를 측정하는 크로노암페로메트리법(chronoamperometry), 쿨로메트리법(coulometry), 순환전압전류법(cyclic voltammetry) 등의 공지의 계측법을 사용할 수 있다. 측정방식으로서는, 디스포저블방식(disposable), 배치 방식(batch), 플로우인젝션 방식(flow injection) 중에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 당업계에 널리 알려진 방식이라면 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0053] 상기 생체로부터 분비되는 시료는 생체로부터 얻을 수 있는 생체 시료를 모두 포괄하는 의미일 수 있으며, 바람직하게는 혈액, 혈장, 타액, 땀, 눈물 및 뇨 등일 수 있으며, 보다 바람직하게는 혈액 또는 땀일 수 있다.

[0054] 본 발명의 다른 측면은 하기 단계를 포함하는 상기 젖산 검출용 센서의 제조방법에 관한 것이다.

[0055] a) 탄소종이를 포함하는 전극을 준비하는 단계;

[0056] b) 상기 전극 상에 전자전달매개체, 젖산 산화효소, 과산화수소 분해효소 및 가교제를 포함하는 혼합물을 도포하여 효소층을 제조하는 단계; 및

[0057] c) 상기 효소층을 건조하는 단계.

[0058] a) 단계는 탄소종이를 포함하는 전극을 준비하는 단계이다. 상기 전극(100)은 기판 상에 탄소종이가 부착된 것일 수 있으며, 상기 기판은 투명 소재의 기판일 수 있다.

[0059] 상기 투명 소재 기판은 폴리에틸렌테레프탈레이트(polyethylene terephthalate, PET), 폴리스틸렌(polystyrene, PS), 폴리이미드(polyimide, PI), 폴리염화비닐(polyvinyl chloride, PVC), 폴리비닐필로리돈(polyvinylpyrrolidone, PVP) 및 폴리에틸렌(polyethlene, PE)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나

이상인 것일 수 있으며, 바람직하게는 폴리염화비닐(PVC)일 수 있다.

[0060] 상기 기판의 두께는, 0.1 μm 내지 100 μm; 0.1 μm 내지 50 μm; 또는 1 μm 내지 20 μm일 수 있다. 상기 두께 범위 내에 포함되면 높은 유연 특성을 유지하면서 과도한 휨에 의한 손상을 방지할 수 있으나, 사용 목적에 따라 생략할 수도 있다.

[0061] 상기 기판 상에 탄소종이가 부착되는 방법은 당업계에 공지된 방법이라면 특별히 제한되지 않고 사용할 수 있으며, 접착제, 접착 테이프 등을 이용한 방법을 사용할 수 있다.

[0062] 상기 전극(100)은, 상기 탄소종이 상에 코팅된 탄소나노튜브를 더 포함할 수 있고, 상기 a) 단계 이후, b) 단계 전에 a') 상기 전극의 탄소종이 상에 탄소나노튜브 분산액을 코팅하는 단계;를 통해 수행될 수 있다.

[0063] 상기 탄소나노튜브 분산액은 탄소나노튜브를 증류수에 혼합하고, 초음파 처리한 후, 원심분리하여 얻어진 상등액일 수 있는데, 보다 구체적으로 탄소나노튜브를 증류수에 혼합하고, 1 내지 3 시간동안 초음파세척기를 이용하여 초음파 처리한 후, 500 내지 6,000 ×g 속도에서 1 내지 30 분 동안 원심분리하여 얻어진 상등액일 수 있다. 상기 탄소나노튜브 분산액은 탄소나노튜브가 응집되지 않고 골고루 분산되어 있어 균일한 탄소나노튜브를 탄소종이 상에 코팅할 수 있다. 탄소나노튜브가 균일하지 않은 경우, 탄소나노튜브 응집체로 인해 전극 표면이 균일하지 않아 전기적인 특성의 정확도를 저하시킬 수 있고, 불균일한 응력과 부하 분포를 초래하여 내구성을 약화시키고 손상을 초래할 수 있는 등의 문제가 발생할 수 있다.

[0064] 상기 탄소나노튜브는 단일벽 탄소나노튜브(single-walled carbon nanotube; SWCNT) 또는 카르복실기로 기능화된 단일벽 탄소나노튜브(carboxylic acid-functionalized SWCNT)인 것일 수 있다.

[0065] 상기 b) 단계는 상기 전극(100) 상에 전자전달매개체, 젖산 산화효소, 과산화수소 분해효소 및 가교제를 포함하는 혼합물을 도포하여 효소층(110)을 제조하는 단계이다.

[0066] 상기 전자전달매개체, 가교제에 대해서는 앞서 상세히 설명하였으므로, 상기 내용을 참고로 하며, 반복되는 내용은 생략하기로 한다.

[0067] 상기 효소층(110)의 제조과정에서 전자전달매개체, 젖산 산화효소, 과산화수소 분해효소 및 가교제는 적층되는 것이 아니라 하나의 층에 혼합되어 도포됨으로써 형성되는 것이 바람직한데, 적층되는 경우 전극으로부터 수직적으로 각 층이 형성되기 때문에 매우 낮은 농도로 존재하는 젖산을 측정하는데 충분한 전류변화를 기대하기 어렵다. 따라서 전극 표면에 효소층은 전자전달매개체와 이 효소 및 가교제가 혼합되어 하나의 층으로 형성되는 것이 전기전도도 특성 뿐만 아니라 시료와의 접촉면적 면에서도 모두 우수하다.

[0068] 상기 b) 단계에서, 전자전달매개체, 젖산 산화효소, 과산화수소 분해효소 및 가교제는 4 : 2 : 2 : 0.5 내지 4 : 2 : 2 : 2의 부피비로 혼합된 혼합물일 수 있다. 상기 범위를 초과하거나 미만인 경우에는 각 구성성분의 기능 및 상호작용이 올바르게 수행되지 않아 성능이 저하되는 문제가 발생할 수 있으며, 화학적 반응의 균형을 저하시켜 장기적인 안정성 문제가 발생할 수 있으며, 측정결과의 비일관성이 발생하여 정확도가 떨어지는 문제가 발생할 수 있다.

[0069] 최종적으로 상기 c) 단계는 상기 효소층을 건조하여 젖산 검출용 센서를 제조하는 단계이다. 상기 b) 단계는 10 내지 30 ℃에서 0.1 내지 5 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 범위를 벗어나는 경우 효소의 변형으로 효율이 현저히 저하될 수 있고, 상기 범위 미만인 경우, 충분히 효소층이 고정되지 못하고 분리 및 손상되는 문제가 발생할 수 있다.

[0070] 상기 제조방법을 통해 완성된 젖산 검출용 센서는, 그 표면에 폴리비닐피리딘 및 Nafion을 코팅하여 생체적합성을 가지는 젖산 검출용 센서로 형성할 수 있다.

[0071] 일반적으로 젖산은 근육활동으로 생산되며, 인체에 지나치게 많이 쌓히면 피로감이 높아지게 된다. 땀에는 젖산의 일부가 함께 배출되므로, 비침습적으로 인체의 피로도 또는 건강을 진단할 수 있다. 따라서, 상술한 바와 같이 제조된 고감도의 이효소 기반 젖산 검출용 센서를 이용하여 몸에서 분비되는 땀뿐만 아니라 혈액 내에 존재하는 젖산 농도를 측정 및 분석함으로써 인체의 피로도, 운동 정도 또는 이와 관련된 질병을 진단할 수 있다.

[0072] 이하에서 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 하며, 다만 이하에 실시예 등에 의해 본 발명의 범위와 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다. 또한, 이하의 실시예를 포함한 본 발명의 개시 내용에 기초한다면, 구체적으로 실험 결과가 제시되지 않은 본 발명을 통상의 기술자가 용이하게 실시할 수 있음은 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연하다.

[0073] **<실험재료>**

[0074] *Aerococcus viridans* 유래 젖산 산화효소(LOx)는 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, USA)에서 구입하였다. 탄소종이(HCP-020N)는 ㈜위즈맥(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 카탈라아제(CAT), PEGDGE(Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether)(Mn_{av}= ~500), carboxylic acid-functionalized SWCNTs(SWCNT)(product No. 652490), 기타 시약들을 Sigma-Aldrich 사(Saint Lous, USA)에서 구입하였다. Poly(Nvinylimidazole)-[Os(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine)$_2$Cl])$^{+/2+}$ (PVI-Os-dmo)와 Poly (N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)2Cl2])$^{+/2+}$ (PVI-Os-dCl)는 단국대학교 김혁한 교수팀으로부터 입수하였다.

[0075] **<실시예 1> 이효소 기반 젖산 검출용 센서**

[0076] 젖산 검출용 센서를 제조하기 위한 기판으로 탄소종이를 준비하였다. 10 ml 증류수로 표면을 깨끗이 씻고, 자연풍으로 완전히 건조하였다. 투명 소재의 기판(PVC 필름) 상에 탄소종이(carbon paper, CP)를 부착하여, 유연전극을 제조하였다. 젖산 산화효소(LOx)(125 U/mL), CAT(1 mg/ml), PEGDGE(40 mg/mL) 및 PVI-Os-dCl(10 mg/mL)를 2:2:4:1의 부피비(v/v/v/v)로 혼합하였다. 혼합용액 20 ㎕를 탄소종이의 아랫부분 표면(110, 0.3 × 0.5 cm^2)에 도포하고 상온에서 2 시간 건조한 다음 4 ℃에서 12시간동안 보관하였다. 탄소종이의 중간부분의 표면(120, 3 × 0.3 cm^2)은 탄소종이가 용액과 접촉되지 않도록 PVC 필름으로 코팅하였으며, 윗부분(130)은 전위차계(potentiostat)의 연결부위로 사용하였다.

[0077] **<실시예 2> 이효소 기반 젖산 검출용 센서**

[0078] 젖산 검출용 센서를 제조하기 위한 기판으로 탄소종이를 준비하였다. 10 ml 증류수로 표면을 깨끗이 씻고, 자연풍으로 완전히 건조하였다. 투명 소재의 기판(PVC 필름) 상에 탄소종이(carbon paper, CP)를 부착하여, 유연전극을 제조하였다.

[0079] SWCNT 분말 10 mg을 증류수 10 ml에 희석하고, 3 시간 동안 초음파세척기(160 HT, soniclean Pty Ltd., Seoul, Korea)에서 96 W, 5 분 동안 초음파 처리하여 균일한 상태의 SWCNT 분산액을 얻었다. 상기 SWCNT 분산액을 25 ℃에서 1106 ×g의 속도로 10 분 동안 원심분리한 후 상등액을 회수하였다. SWCNT 상등액 20 ㎕을 탄소종이의 아랫부분 표면(110, 0.3 × 0.5 cm^2)에 도포하고 상온에서 2 시간 동안 건조하였다.

[0080] 젖산 산화효소(LOx)(125 U/mL), CAT(1 mg/ml), PEGDGE(40 mg/mL) 및 PVI-Os-dCl(10 mg/mL)를 2:2:4:1의 부피비(v/v/v/v)로 혼합하였다. 혼합용액 20 ㎕를 SWCNT 상에 도포하고 상온에서 2 시간 건조한 다음 4 ℃에서 12시간동안 보관하였다. 탄소종이의 중간부분의 표면(120, 3 × 0.3 cm^2)은 탄소종이가 용액과 접촉되지 않도록 PVC 필름으로 코팅하였으며, 윗부분(130)은 전위차계(potentiostat)의 연결부위로 사용하였다.

[0081] **<비교예 1> 젖산 검출용 센서**

[0082] 젖산 검출용 센서를 제조하기 위한 기판으로 탄소종이를 준비하였다. 10 ml 증류수로 표면을 깨끗이 씻고, 자연풍으로 완전히 건조하였다. 투명 소재의 기판(PVC 필름) 상에 탄소종이(carbon paper, CP)를 부착하여, 유연전극을 제조하였다. 젖산 산화효소(LOx)(125 U/mL), PEGDGE(40 mg/mL) 및 PVI-Os-dCl(10 mg/mL)를 4:4:1의 부피비(v/v/v)로 혼합하였다. 혼합용액 20 ㎕를 탄소종이의 아랫부분 표면(110, 0.3 × 0.5 cm^2)에 도포하고 상온에서 2 시간 건조한 다음 4 ℃에서 12시간동안 보관하였다. 탄소종이의 중간부분의 표면(120, 3 × 0.3 cm^2)은 탄소종이가 용액과 접촉되지 않도록 PVC 필름으로 코팅하였으며, 윗부분(130)은 전위차계(potentiostat)의 연결부위로 사용하여 효소가 고정된 젖산 검출용 센서를 제조하였다.

[0083] **<비교예 2> 젖산 검출용 센서**

[0084] 젖산 검출용 센서를 제조하기 위한 기판으로 탄소종이를 준비하였다. 10 ml 증류수로 표면을 깨끗이 씻고, 자연풍으로 완전히 건조하였다. 투명 소재의 기판(PVC 필름) 상에 탄소종이(carbon paper, CP)를 부착하여, 유연전극을 제조하였다.

[0085] SWCNT 분말 10 mg을 증류수 10 ml에 희석하고, 3 시간 동안 초음파세척기(160 HT, soniclean Pty Ltd., Seoul, Korea)에서 96 W, 5 분 동안 초음파 처리하여 균일한 상태의 SWCNT 분산액을 얻었다. 상기 SWCNT 분산액을 25 ℃에서 1106 ×g의 속도로 10 분 동안 원심분리한 후 상등액을 회수하였다. SWCNT 상등액 20 ㎕을 탄소종이의

아랫부분 표면(110, 0.3 × 0.5 cm^2)에 도포하고 상온에서 2 시간 동안 건조하였다.

[0086] 젖산 산화효소(LOx)(250 U/mL), PEGDGE(40 mg/mL) 및 PVI-Os-dCl(10 mg/mL)를 4:4:1의 부피비(v/v/v)로 혼합하였다. 혼합용액 20 ㎕를 탄소종이의 SWCNT 상에 도포하고 상온에서 2 시간 건조한 다음 4 ℃에서 12시간동안 보관하였다. 탄소종이의 중간부분의 표면(120, 3 × 0.3 cm^2)은 탄소종이가 용액과 접촉되지 않도록 PVC 필름으로 코팅하였으며, 윗부분(130)은 전위차계(potentiostat)의 연결부위로 사용하였다.

[0087] **<실험예 1> 전극의 젖산 감응 특성 분석**

[0088] 본 발명에 따른 전극 특성 분석을 위한 작업전극, 상대전극 및 기준전극으로 구성된 셀을 다음과 같이 제조하였다. 작업전극은 비교예 1 내지 2 및 실시예 1 내지 2 중에서 선택되는 어느 하나의 젖산 검출용 센서를 사용하였고, 상대전극은 Pt wire를 사용하였고, 기준전극은 Ag/AgCl(saturated KCl)를 사용하였다. 전해질은 20 mM sodium lactate를 포함하거나 포함하지 않은 PBS 용액(pH 7.0, 10 mM) 10 mL를 사용하였다. CV(Cyclic voltammetry) 분석은 20 mV/s의 주사속도(scan rate), 전류 범위는 -0.4 ~ 0.6 V로 실시하였다. 모든 전기화학 실험을 상온에서 전위차계(potentiostat, CH Instruments, model 660D, Houston, USA)를 사용하여 수행하였다. 또한, 상기 CV 분석결과로부터 추출한 전극 피크 전류의 크기를 분석하였다.

[0089] 도 2는 비교예 1로부터 제조된 젖산 검출용 센서의 전극 특성을 비교한 결과이고, 도 3은 실시예 1로부터 제조된 이효소 기반 젖산 검출용 센서의 전극 특성을 비교한 결과이며, 도 4는 비교예 2로부터 제조된 이효소 기반 젖산 검출용 센서의 전극 특성을 비교한 결과이며, 도 5는 실시예 2로부터 제조된 이효소 기반 젖산 검출용 센서의 전극 특성을 비교한 결과이다.

[0090] 도 6은 비교예 1, 2로부터 제조된 젖산 검출용 센서와 실시예 1, 2로부터 제조된 이효소 기반 젖산 검출용 센서의 anode 전류를 측정하여 나타낸 그래프이다.

[0091] 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, 기질(젖산)의 존재 유무에 따라 비교예 1로부터 제조된 젖산 검출용 센서는 전류값의 변화가 관찰되지 않으나, 실시예 2로부터 제조된 이효소 기반 젖산 검출용 센서는 산화·환원 피크의 세기가 기질(젖산)의 유무에 따라 유의적으로 현저히 변화하는 것을 확인하였다.

[0092] 도 4, 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, 비교예 2와 같이 탄소나노튜브가 추가되는 경우, 기질(젖산)의 존재 유무에 따라 산화·환원 피크의 세기가 변화하나, 그러나 생성된 전류밀도는 동일한 기질 농도 조건에서 실시예 1의 이효소 젖산 검출용 센서보다 0.1~0.2 배 더 낮은 것으로 확인되었다. 반면 실시예 2로부터 제조된 이효소 기반 젖산 검출용 센서는 산화·환원 피크의 세기가 기질(젖산)의 유무에 따라 유의적으로 현저히 변화하는 것을 확인하였으며, 탄소나노튜브가 고정화된 비교예 2보다 1.12배 높은 전류밀도를 생산하는 것을 확인하였다.

[0093] 이로부터 탄소종이, 탄소나노튜브 및 과산화수소 분해효소(카탈라아제, CAT)의 유기적 결합에 의해 젖산 검출용 센서의 성능이 예측하는 것보다 현저히 향상되었음을 알 수 있다.

[0094] **<실험예 2> 인공 땀에서의 젖산 검출용 센서의 성능 평가**

[0095] 실시예 2로부터 제조된 이효소 젖산 검출용 센서를 사용하여, 실제 생체 접착시 땀에서 젖산을 검출할 수 있는지 유무를 분석하고자 크로노암페로메트리(chronoamperometry)법으로 분석하였다.

[0096] 이를 위해 작업전극, 상대전극 및 기준전극으로 구성된 셀을 다음과 같이 제조하였다. 실시예 2의 이효소 젖산 검출용 센서를 작업전극으로 사용하였고, 상대전극은 Pt wire를 사용하였고, 기준전극은 Ag/AgCl(saturated KCl)를 사용하였다. 전해질은 5~30 mM sodium lactate를 포함하는 PBS 용액(pH 7.0, 10 mM) 10 mL 또는 인공 땀 용액(artificial)(0.1 mM glucose, 17 mM urea, 0.8 mM NaCl 및 5~30 mM sodium L-lactate, pH 6.5)을 사용하였다.

[0097] 상기 크로노암페로메트리 전류응답(chronoamperometry current response)은 0.3 V의 전압을 가해주고, 전해질에 포함된 기질(lactate) 농도에 따라 측정되는 전류값을 기록하였다. 모든 전기화학 실험을 상온에서 수행하였다.

[0098] 도 7은 다양한 농도의 젖산을 포함하는 PBS 용액과 인공 땀 용액을 전해질로 하였을 때, 실시예 2의 이효소 젖산 검출 센서에 대한 성능 평가 결과 그래프이다.

[0099] 도 7에 따르면, 본 발명에 따른 이효소 젖산 검출 센서(실시예 2)는 PBS 용액과 인공 땀 용액 모두에서 젖산 기질 농도 5-20 mM까지 전류값이 선형적으로 증가한다는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 이효소 젖산 검

출 센서는 생체 적용시 땀에서의 젖산 농도를 효율적으로 측정할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0100] **<실험예 3> 젖산 검출용 센서를 적용한 젖산 모니터링 시스템의 성능 평가**

[0101] 실시예 2로부터 제조된 젖산 검출용 센서를 이용하여 젖산 모니터링 시스템을 설계 및 제조하였다(도 8). 본 발명에 따른 젖산 모니터링 시스템은 도 8에 나타난 바와 같이 션트(shunt) 기반 전류 측정을 적용한 젖산 모니터링 시스템이다. 상기 션트저항의 저항값이 매우 작은 값의 저항을 사용하므로, 효율적인 측정을 위해 증폭기(amplifier)가 직렬 및 병렬로 연결될 수 있으며, 증폭되어 출력된 전류값를 하나 또는 하나 이상의 측정부를 통해 측정 및 모니터에 출력할 수 있다.

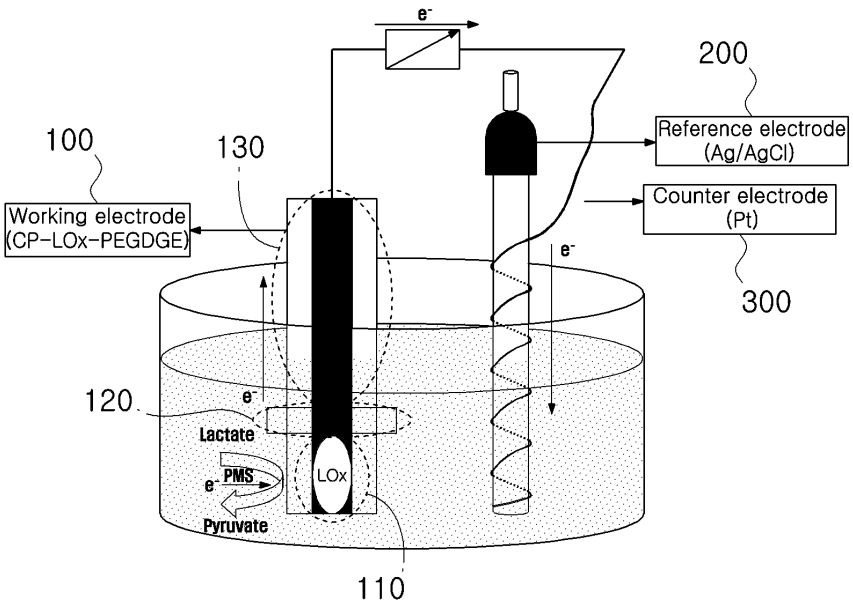
[0102] 테스트 전압은 0.2 V로 고정하였으며, 본 발명의 젖산 검출용 센서 특성에 맞는 션트 저항을 사용하여 전산 검출용 센서에 흐르는 전류를 정밀하게 측정하였다. 이때 cathode는 Pt 와이어를 사용하였고, 시료는 5 mM sodium lactate를 포함하는 10 mM PBS 10 ml를 사용하였다.

[0103] 도 9는 본 발명에 따른 젖산 검출용 센서를 적용한 젖산 모니터링 시스템이 측정한 젖산 수치를 나타낸 도면이다. 상기 도면에서 모니터에 표시되는 데이터는 젖산 검출용 센서에 인가된 전압, 젖산 검출용 센서에서 측정된 전류와 평균 전류(또는 소모전력)를 의미한다.

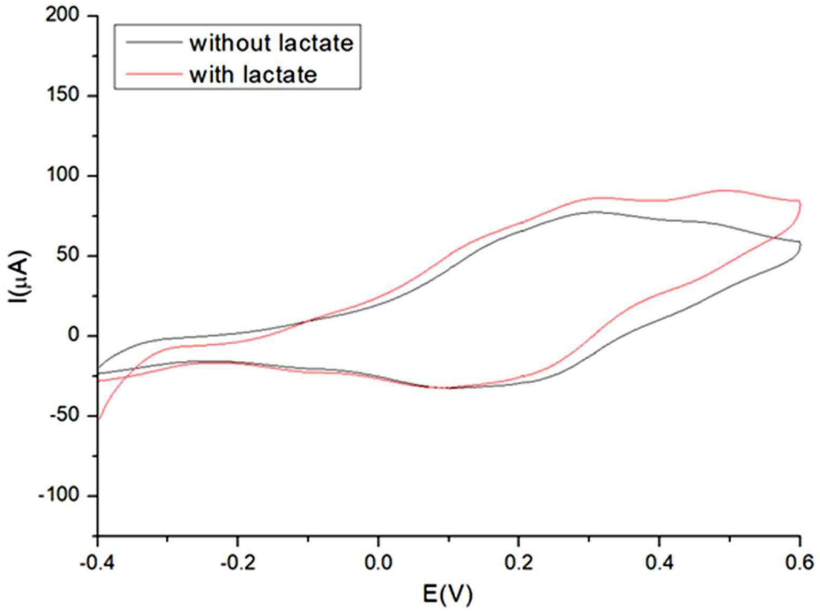
[0104] 도 9에 나타난 바와 같이, 5 mM의 매우 낮은 기질 용액(젖산 포함 완충액)에서 0.0231 μA의 수치가 검출된 바, 본 발명에 따른 젖산 검출용 센서는 성공적으로 생체로부터 분리된 시료에서 젖산의 존재와 농도를 측정할 수 있음을 알 수 있다.

도면

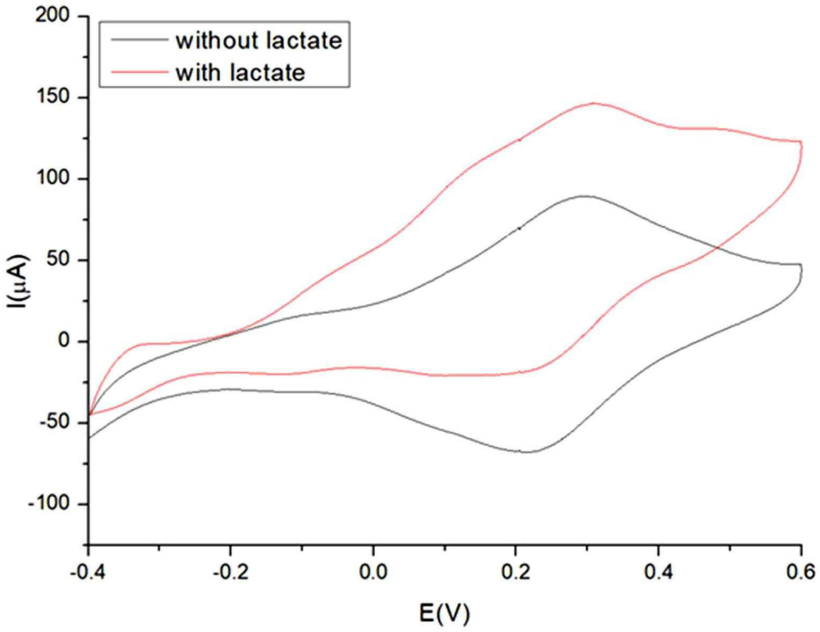
도면1



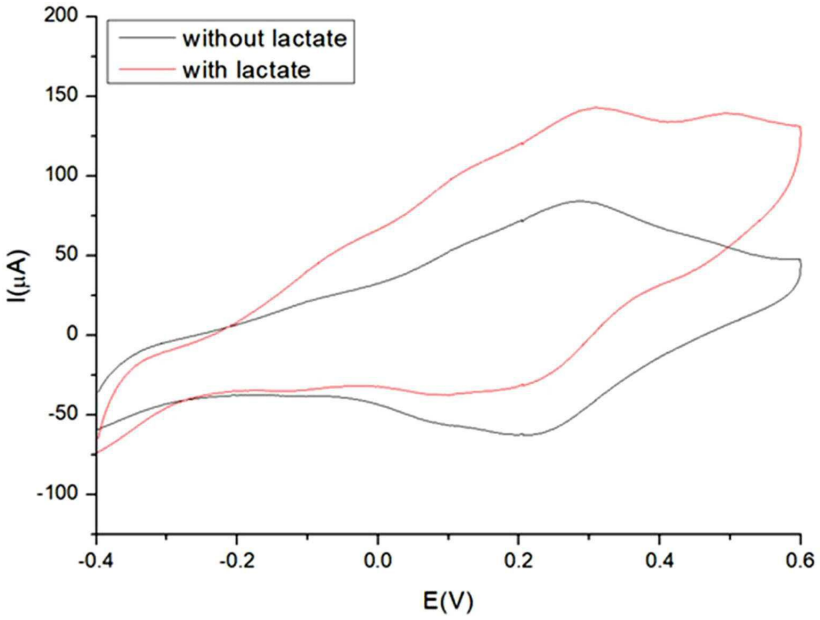
도면2


without lactate
with lactate
I(μA)
E(V)
200
150
100
50
0
-50
-100
-0.4
-0.2
0.0
0.2
0.4
0.6

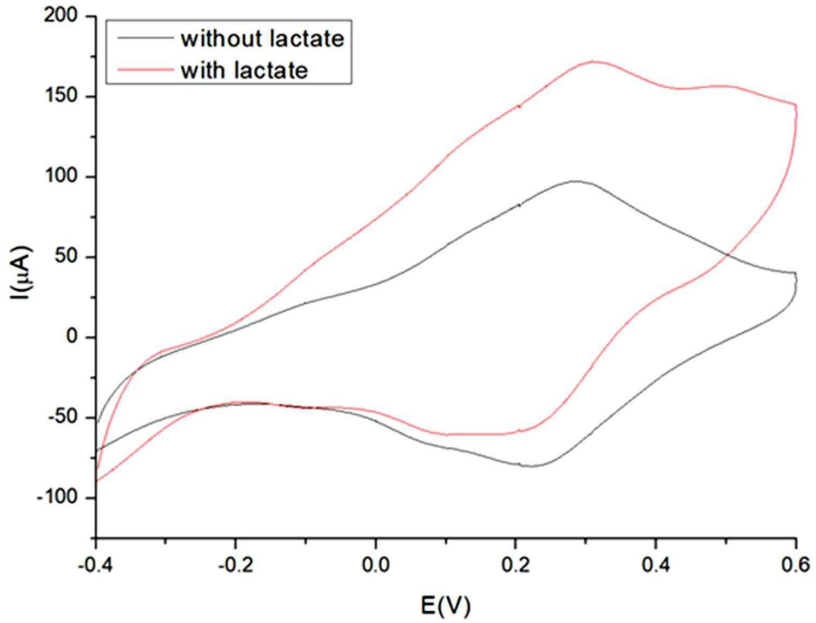
도면3


without lactate
with lactate
I(μA)
E(V)
200
150
100
50
0
-50
-100
-0.4
-0.2
0.0
0.2
0.4
0.6

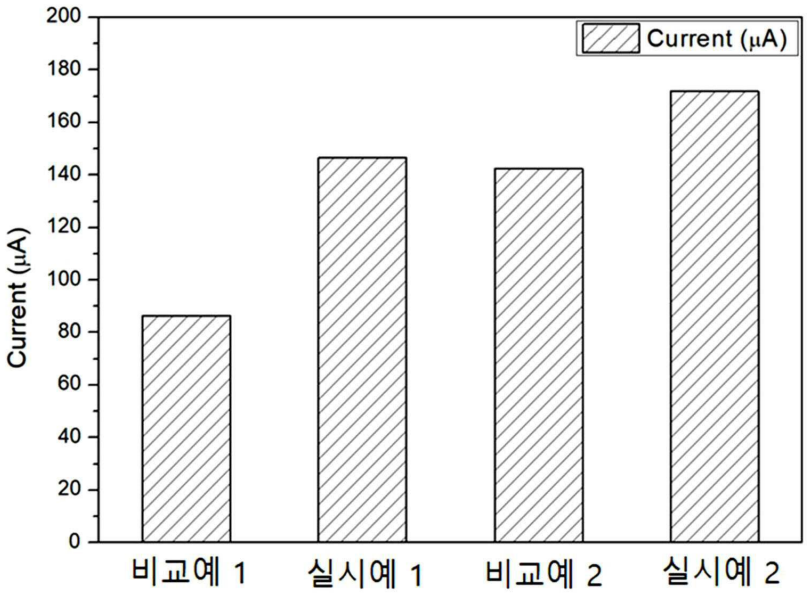
도면4


without lactate
with lactate
I(μA)
E(V)
200
150
100
50
0
-50
-100
-0.4
-0.2
0.0
0.2
0.4
0.6

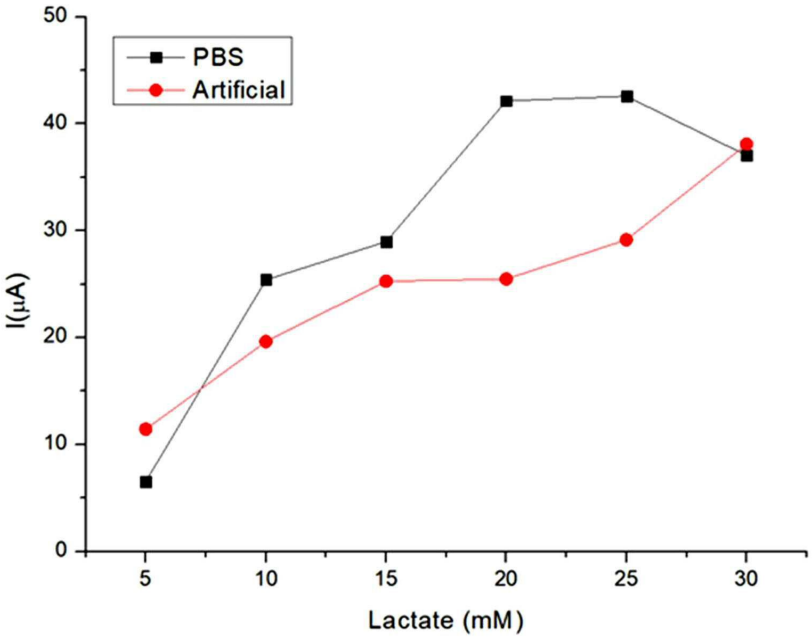
도면5


without lactate
with lactate
I(μA)
E(V)
200
150
100
50
0
-50
-100
-0.4
-0.2
0.0
0.2
0.4
0.6

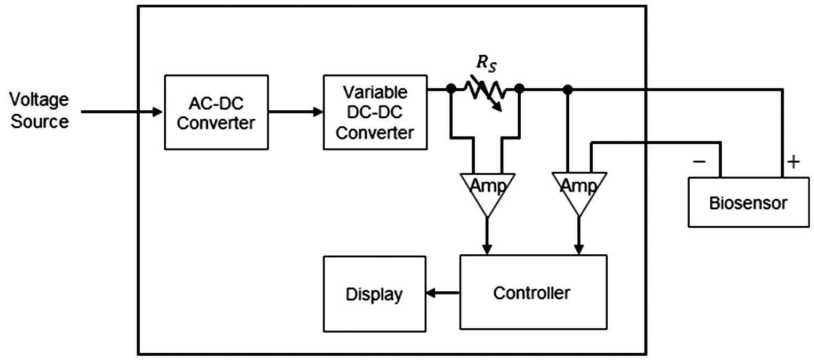
도면6


Current (μA)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Current (μA)
비교예 1
실시예 1
비교예 2
실시예 2

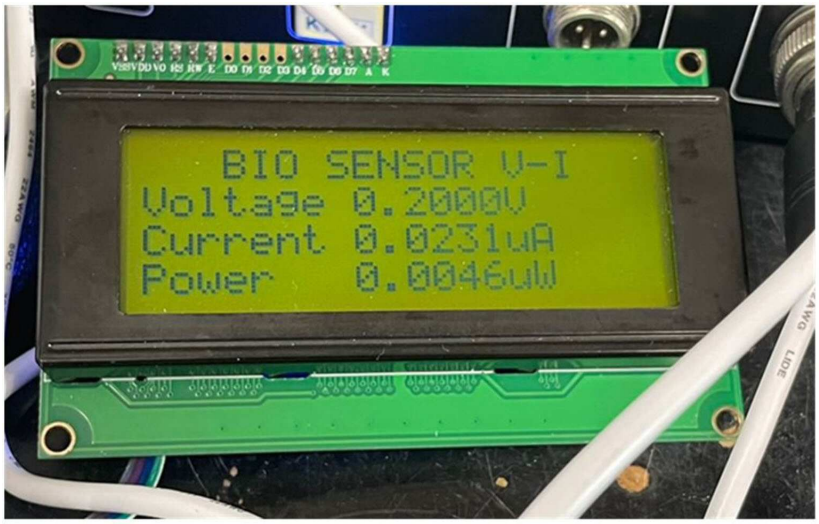
도면7


PBS
Artificial
50
40
30
20
10
0
I(μA)
5
10
15
20
25
30
Lactate (mM)

도면8


Voltage Source
AC-DC Converter
Variable DC-DC Converter
R_S
Amp
Amp
−
+
Biosensor
Display
Controller

도면9


BIO SENSOR V-I
Voltage 0.2000V
Current 0.0231uA
Power 0.0046uW