

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0090005 (43) 공개일자 2014년07월16일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 27/403 (2006.01) G01N 27/30 (2006.01)		(71) 출원인 서강대학교산학협력단 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(21) 출원번호 10-2013-0002198		(72) 발명자 최정우 서울 용산구 서빙고로 35, 103동 603호 (한강로3가, 용산시티파크1단지아파트)
(22) 출원일자 2013년01월08일 심사청구일자 2013년01월08일		이택 서울 동작구 상도로53길 8, 316동 1403호 (상도동, 래미안상도3차아파트) (뒷면에 계속)
		(74) 대리인 양부현

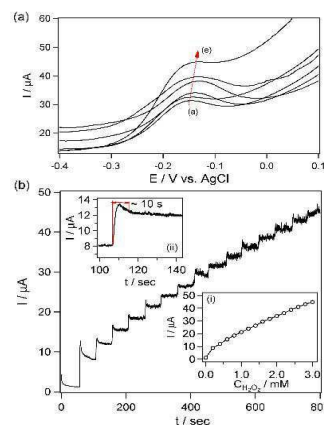
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 나노구조체를 이용한 과산화수소 검출용 센서

(57) 요약

본 발명은 (a) 전도성 산화물(Conducting Oxide) 기질 상에 결합된 산화금속; 및 (b) 상기 산화금속에 결합된 미오글로빈(Myoglobin)을 포함하는 과산화수소 검출용 센서에 관한 것이다. 본 발명의 과산화수소 검출용 센서는 CeO_2/ITO 전극 상에서의 Mb의 직접 전기화학 신호를 발생시킬 수 있으므로, 중간체 화합물에 의한 영향을 받지 않아 분석시료 내의 과산화수소를 정확하고 정밀하게 검출할 수 있다. 또한, 종래의 과산화수소 검출용 센서보다 검출한계가 매우 낮아 시료 내에 포함된 극미량의 과산화수소를 검출할 수 있으며, 반응시간 또한 매우 짧아 신속한 시료 분석이 가능하다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

아자이 야가타

서울 마포구 승문5길 16-3, (염리동)

민준홍

서울 동작구 흑석로 84, (흑석동, 중앙대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M10536090001-05N3609-00110

부처명 교육과학기술부

연구사업명 단백질/효소 초분자체로 구성된 바이오 프로세싱 디바이스 개발

연구과제명 생물분자로 구성된 바이오전자소자 기술개발

기 여 율 1/2

주관기관 재단법인 한국연구재단

연구기간 2012.03.01 ~ 2013.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0000163

부처명 교육과학기술부

연구사업명 나노 신경줄기세포 전자칩 기술 개발

연구과제명 재조합 단백질/무기입자 혼성체로 구성된 고체상태의 바이오 메모리 개발

기 여 율 1/2

주관기관 재단법인 한국연구재단

연구기간 2011.03.01 ~ 2012.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 전도성 산화물(Conducting Oxide) 기질 상에 결합된 산화금속; 및
(b) 상기 산화금속에 결합된 미오글로빈(Myoglobin)을 포함하는 과산화수소 검출용 센서.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 전도성 산화물은 인-주석 산화물, 인-아연 산화물, 주석 산화물, 아연 산화물, 구리-알루미늄 산화물, 구리-갈륨 산화물, 구리-스칸듐 산화물, 구리-크롬 산화물, 구리-인 산화물, 구리-이트륨 산화물 및 은-인 산화물로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 전도성 산화물인 것을 특징으로 하는 센서.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 전도성 산화물은 인-주석 산화물인 것을 특징으로 하는 센서.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 산화금속은 상기 전도성 산화물의 기질 상에 전착(electrodeposited)되어 결합된 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 센서.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 미오글로빈은 상기 산화금속의 표면에 결합된 고분자 고체전해질에 의해 간접적으로 상기 산화금속에 결합된 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 센서.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 센서는 상대 전극 및 기준 전극을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 센서.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 센서는 0.6 μM 의 검출한계를 갖는 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 센서.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 센서는 10초 이내에 정상상태(steady state) 전류에 도달하는 것을 특징으로 하는 과산화수소 검출용 센서.

청구항 9

다음의 단계를 포함하는 과산화수소 검출 방법:

- (a) 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 과산화수소 검출용 센서를 준비하는 단계;
- (b) 상기 센서에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및
- (c) 상기 단계 (b)에서 발생하는 전기적 신호를 측정하는 단계.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 나노구조체를 이용한 과산화수소 검출용 센서에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 전기화학 센서는 고감도, 고특이성, 빠른 반응성, 낮은 비용 등의 장점으로 인해 임상, 환경 및 식품 산업-관련 재료에 널리 이용된다(1-3). 효율적인 전기화학 바이오센서를 개발하기 위하여, 매개자로서의 산화환원효소/단백질의 촉매 과정 및 화학적 특성이 연구되어 왔다. 또한 전극 표면에서 산화 환원 단백질 보조단(prosthetic group)간의 직접적 전기화학 작용은 생물학적 산화 환원 반응의 메카니즘 및 바이오전기촉매(bioelectrocatalytic) 반응에 기반을 둔 고감도 및 고특이성의 바이오센서를 개발하는데 있어서 매우 관심을 받고 있는 대상이다(4-6). 그러나, 비피복 전극에서의 대부분 산화 환원 단백질의 직접 전기화학 신호측정은 여러 가지 요인에 의해 매우 어려운 실정이다. 첫째, 산화 환원 단백질의 전기-활성 부위는 절연처리된 단백질 껍질에 의해 단백질 내 깊은 곳에 위치하며, 이로써 전기-활성 부위 및 아래에 놓인 전극사이의 거리가 매우 길어진다. 따라서, 전자를 직접 전극으로 운반하는 것이 어렵다. 더욱이, 전극 표면과 상호작용할 때 생물학적 매트릭스가 불안정해진다(7,8)

[0003] 둘째, 단백질이 전극 표면에 흡착될 때 종종 전기화학 활성 및 생체활성의 손실이 발생한다(9). 직접 효소 전기화학 신호를 측정하는 효과적인 방법은 변형된 전극 표면 상에서 효소를 캐스트(cast) 필름 안으로 삽입하는 것이다(10,11). 단백질을 전극 표면 상에 고정시켜 직접 전기화학 반응을 일으키고, 고감도, 고특이적이며 내구성이 강한 전기화학적 바이오센서를 개발하기 위하여, 새로운 지지체 물질 및 방법을 개발하기 위한 노력이 있어왔다. 작고 확산성 있는 산화 환원 종인 전자 매개체는 종종 단백질 산화 환원 부위 및 전극 표면 간의 상호작용을 가능케 하기 위해 요구된다(12,13). 매개체-없는 바이오센서를 개발하기 위한 한 가지 대안책은, 보다 감도 있고 특이적인 막을 전극 표면에 생성시키는 화학적으로 변형된 전극(chemically modified electrode, CME)이며, CME는 그 자체로서 직접 전자 전달을 가능케하는 전자 매개 기능을 제공한다(14,15). 또한, 전극 표면에 기능성 물질을 고정화시키고, 고정화된 분자의 생물학적/화학적 활성을 유지하는 것은 직접 전기화학 신호를 측정하는데 있어 중요하다. 다공성 물질로 제조된 CME는 단백질의 직접 전자 전달 연구에서 널리 사용되며, 이는 넓은 표면적, 우수한 생체적합성 및 무독성의 특이적 성질 때문이다(16,17). 다공성 물질은 단백질에 우호적인 미세환경을 제공하며 단백질의 전기-활성 부위 및 전극 표면 간의 전자 전달을 향상시킨다.

[0004] 나노구조체인 얇은 산화 금속 필름은 다양한 분야, 예컨대 촉매 작용, 가스 센싱 및 분리, 전력 저장 및 생성, 생물학 및 약학 분야의 적용에 있어 그들의 특이적 형태, 입자 크기, 공극율, 및 물리적, 전기적, 자기적 특성으로 인하여 주목받아 왔다. 나노수준(nanoscale)의 산화 금속 필름의 기능적인 특성은 최근 광전지(18), 가스 센서(19) 및 바이오센서(20)와 같은 서로 다른 분야에서 강조되었다. 지난 수십 년 동안 다공성 물질의 조직 및 구조적 특성, 예컨대 고도의 규칙적인 구조, 초고표면적, 메소세공(mesopore) 범위의 미세공(pore)의 분포, 조절가능한 미세공 크기, 미세공 구조 등의 특성으로 인하여 정형화된 다공성 물질을(mesoporous)을 합성하고, 규명하며 적용하기 위한 많은 노력이 있어 왔다. 메소세공 물질의 구조적, 조성적 및 형태적 조절 및 최근 적용 분야인 촉매(catalysis), 흡수(adsorption) 및 센싱(sensing)에 있어 메소세공 물질의 안정성에 대한 진전이 있어 왔다(21, 22).

[0005] 센서 적용을 위한 나노구조체(nanostructured) 물질에 기반을 둔 연구는 촉망되는 연구 분야이다. TiO_2 (23), MnO_2 (24), Fe_3O_4 (25), ZnO (26) 및 다른 유사한 나노 구조의 필름은 H_2O_2 및 다른 생물학적 화합물, 예컨대 3,4-디히드록시페닐아세트산, 아스코르브산, 구아닌, 1-티로신, 아세트아미노펜 및 β -NADH(27)를 검출하는 새로운 세대의 바이오센서에 이용되었다. 본 발명자들은 넓은 표면적을 가질 뿐 아니라 전극 표면을 변형시킬 수 있

는 다공성 산화 세륨 필름을 사용하여, 산화 환원 단백질의 직접 전자 전달에 대해 연구하였다. 본 발명은 이러한 변형된 전극의 산화 금속 필름 상에서 헴(heme) 단백질의 직접 전기화학 신호에 대해 밝힌 최초의 연구이다.

[0006] 본 발명에서는 전착(electrodeposition) 방법에 의한 산화 인듐-주석(indium tin oxide, ITO) 표면 상의 산화 세륨(CeO_2) 필름의 형성, CeO_2 /ITO 표면상에서 미오글로빈(Mb)의 직접 전기화학 신호 및 과산화수소의 전기촉매 활성에 대해 연구하였다. 비록 Mb 및 산화금속 필름이 센싱 메커니즘에 사용된 바 있지만, 본 발명은 CeO_2 /ITO 전극 상에서의 Mb의 직접 전기화학 신호 및 과산화수소의 선택적 검출에 대한 최초의 시도이다. 본 발명자들은 주사전자현미경(SEM) 및 원자력 현미경(AFM)을 이용하여 나노구조체 필름을 분석하였으며, Mb/ CeO_2 /ITO 전극의 전기 화학적 특성 및 이들의 과산화수소 센싱 방법은 순환전압전류법 cyclic voltammetry (CV), 시차펄스전압전류법(differential pulse voltammetry, DPV), 및 I/t 측정을 통해 확립되었다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허 문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 과산화수소에 대한 특이성(specificity) 및 감도(sensitivity)가 우수한 바이오센서를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 넓은 표면적을 가진 다공성 이산화세륨(cerium dioxide, CeO_2)의 나노구조체 필름을 인-주석 산화물(indium tin oxide, ITO) 기질 상에 전착시키고(electrodeposited), 상기 이산화세륨에 미오글로빈(Mb)을 고정화한 후, Mb의 직접적 전기화학 신호를 측정함으로써 과산화수소를 검출하는 바이오센서를 개발하게 되었다. 본 발명자들은 순환전압전류법(Cyclic voltammetry) 및 시차펄스전압전류법(differential pulse voltammetry)을 이용하여 가공된 필름 상에 고정된 Mb의 전기화학적 특성을 관찰함으로써, 본 발명의 센서가 과산화수소의 전기촉매(electrocatalytic) 작용으로 인해 별도의 전자 매개체 없이 Mb의 직접적인 전기화학 신호를 발생시킴을 발견하였다. 즉, 본 발명의 과산화수소 검출용 센서는 어떤 시약도 사용하지 않으므로(reagentless) 중간체 화합물의 영향을 받지 않아 과산화수소를 측정함에 있어 우수한 안전성 및 높은 민감도를 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 과산화수소 검출용 센서를 제공하는데 목적이 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 과산화수소 검출 방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 전도성 산화물(Conducting Oxide) 기질 상에 결합된 산화금속; 및 (b) 상기 산화금속에 결합된 미오글로빈(Myoglobin)을 포함하는 과산화수소 검출용 센서를 제공한다.

[0013] 본 발명자들은 과산화수소에 대한 특이성(specificity) 및 감도(sensitivity)가 우수한 바이오센서를 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 넓은 표면적을 가진 다공성 이산화세륨(cerium dioxide, CeO_2)의 나노구조체 필름을 인-주석 산화물(indium tin oxide, ITO) 기질 상에 전착시키고(electrodeposited), 상기 이산화세륨에 미오글로빈(Mb)을 고정화한 후, Mb의 직접적 전기화학 신호를 측정함으로써 과산화수소를 검출하는 바이오센서를 개발하게 되었다. 본 발명자들은 순환전압전류법(Cyclic voltammetry) 및 시차펄스전압전류법(differential pulse voltammetry)을 이용하여 가공된 필름 상에 고정된 Mb의 전기화학적 특성을 관찰함으로써, 본 발명의 센서가 과산화수소의 전기촉매(electrocatalytic) 작용으로 인해 별도의 전자 매개체 없이 Mb의 직접적인 전기화학 신호를 발생시킴을 발견하였다. 즉, 본 발명의 과산화수소 검출용 센서는 어떤 시약도 사용하지 않으므로(reagentless) 중간체 화합물의 영향을 받지 않아 과산화수소를 측정함에 있어 우수한 안전성 및 높은 민감도를 나타냄을 확인하였다.

- [0014] 본 발명의 센서에 포함되는 상기 전도성 산화물은 기판(substrate) 상에 코팅하여 사용될 수 있으며, 예컨대 유기 중합체(organic polymer) 또는 무기 물질(inorganic materials)로 이루어진 고상 기판을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 이용될 수 있는 기판은 표면 특성에 무관하게 어떠한 것도 이용 가능하다.
- [0015] 상기 유기 중합체(organic polymer)는 폴리아미드 동중중합체(homopolymer) 또는 공중합체(copolymer)(예컨대, 나일론), 내열플라스틱 플루오르화(fluorinated) 중합체(예컨대, 폴리비닐리덴 플루오르화물 PVDF), 폴리비닐할로겐화물(예컨대, 폴리비닐클로라이드 PVC), 폴리설푼, 셀룰로오스 물질(예컨대, 종이, 니트로셀룰로오스 또는 셀룰로오스 아세테이트), 폴리올레핀, 폴리아크릴아미드(예컨대, 폴리(N-이소프로필 아크릴아미드), 폴리글리콜산(PGA), 폴리유산(PLA), 폴리글락틴 910 (Vicryl), 폴리글루코네이트(Maxon™), 폴리디옥사논(PDS), 폴리-4-하이드록시 부틸레이트, 카본, 탄소나노튜브, 콜로이드 및 천연 중합체(예컨대, 아가로스 또는 하이알루론산)를 포함한다. 상기 무기 물질(inorganic materials)은 유리, 석영, 실리카, 은, 금, 알루미늄, 구리, 기타 실리콘-포함 물질(예컨대, 실리콘 옥사이드 또는 니트라이드), 금속 산화물(예컨대, 알루미늄 옥사이드), 금속합금, Si/SiO₂ 웨이퍼, 게르마늄 및 갈륨 아르세나이드를 포함한다.
- [0016] 본 발명에서 고상 기질로서 이용될 수 있는 금속은 특별하게 제한되지 않으며, 당업계에서 이용되는 어떠한 금속도 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에서 이용되는 금속 고상 기질은 표면의 형상, 크기 및 화학적 조성은 특별히 제한되지 않는다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “금속 고상 기질”은 금속, 금속 옥사이드 및 합금의 기질을 모두 포괄하는 의미를 갖는다. 예를 들어, 본 발명에서 이용될 수 있는 금속 고상 기질은, 금, 은, 동, 백금, 구리, 알루미늄, 상기 금속의 합금(예컨대, 금과 구리의 합금) 또는 금속 옥사이드 기판을 포함한다. 금속 고상 기질은 금속으로 이루어진 고상 기질뿐만 아니라, 금속이 표면 코팅된 기판도 포함한다.
- [0017] 상기 고상 기질은 비-다공성(non-porous)이거나 또는 어느 정도의 공극률(porosity)을 가질 수 있다. 다공성 물질인 경우, 공극의 크기는 나노 또는 마이크로 단위일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 유리 기판에 전도성 산화물을 증착한 전도성 산화물 전극을 제조할 수 있다. 상기 전극은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 상기 기판의 표면위에 형성시킬 수 있으며, 바람직하게는 전자빔 증착, 진공 증착, 열증착(thermal evaporation), 스핀코팅(spin coating), 진공 증착, 스퍼터링(sputtering), 저압 화학기상법, 졸-겔 합성법, 전기 도금 또는 무전해 도금법을 사용할 수 있다.
- [0019] 본 명세서에서 용어 ‘전도성 산화물(Transparent conductive oxide; TCO)’은 전도성 필름의 하나로 광학적으로 투명하고 전기적 전도성을 갖는다. 광전지에 사용되는 전도성 필름은 무기물 및 유기물로 제조된다. 전형적으로 무기 필름은 인-주석 산화물, 플루오린 도프 주석 산화물 및 도프 아연 산화물과 같은 일반적인 전도성 산화물 층으로 구성된다. 유기 필름은 적외선에 높은 투명도를 갖게 제조할 수 있는 폴리(3,4-에틸렌디옥시티오펜 및 그의 유도체와 같은 폴리머 망과 함께 탄소 나노튜브 망 및 그래핀을 사용하여 개발되었다. 투명 전도성 필름은 대부분 다결정 또는 무형 미세구조로 제조된다. 평균적으로, 이러한 적용은 효율적인 담체 전송을 위해 입사광선의 80% 투과도보다 우수하고 10³ S/cm보다 높은 전도성의 전극 물질을 사용한다.
- [0020] 상기 전도성 산화물은 인-주석 산화물, 인-아연 산화물, 주석 산화물, 아연 산화물, 구리-알루미늄 산화물, 구리-갈륨 산화물, 구리-스칸듐 산화물, 구리-크롬 산화물, 구리-인 산화물, 구리-이트륨 산화물 및 은-인 산화물로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 전도성 산화물이다.
- [0021] 인-주석 산화물은 전기적 전도성 및 광학적 투명성으로 인해 가장 널리 쓰이는 투명한 전도성 산화물 중 하나이다. 또한, 박막으로 용착하기 용이하며, 모든 투명 전도성 필름과 마찬가지로 두께의 증가 및 전하 담체의 농도 증가는 물질의 투명성을 감소시키면서 전도성을 증가시키기 때문에 전도성 및 투명성을 절충해야 한다.
- [0022] 본 발명의 인-주석 산화물(Indium tin oxide; ITO, 또는 주석-도프 인 산화물)은 인(III) 산화물(In₂O₃) 및 주석(IV) 산화물(SnO₂)의 고용체로 일반적으로 중량부 90% In₂O₃ 및 10% SnO₂로 구성된다. In³⁺ 이온 자리를 Sn⁴⁺ 이온이 치환하면서 전자를 내어 놓아 전자 농도가 높아지게 되어 낮은 비저항을 나타내게 된다. 이러한 치환 과정은 높은 에너지를 필요로 하기 때문에 당업계의 통상적인 일반기술에 따르면, 유리 기판 상에 증착할 경우 300℃ 이상의 온도로 기판 온도를 상승시켜 주석 이온이 쉽게 인 이온 자리를 치환시킬 수 있어 낮은 저항의 인-주석 산화물 전극을 제작할 수 있다.
- [0023] 상기 인-주석 산화물 기질의 표면에 산화금속을 전착(electrodeposited)시킨 경우, 상기 산화금속은 다공성(porous) 구조의 산화금속 필름층을 형성할 수 있다. 또한, 분석하고자 하는 시료에 과산화수소가 존재하는

경우 상기 과산화수소의 전기촉매(electrocatalytic) 활성에 의해 상기 미오글로빈(Myoglobin) 내에서 산화환원 반응이 발생하고[Fe^{3+} 및 Fe^{2+}], 상기 미오글로빈(Myoglobin), 산화금속 및 전도성 산화물 간의 전자 전달(electron transfer)에 의한 전기화학적(electrochemical) 신호를 측정함으로써 과산화수소를 검출할 수 있다.

[0024] 상기 인-주석 산화물 기질의 표면에 전착되는 산화금속은 공지된 다양한 산화금속을 사용할 수 있으며, 예컨대 산화세륨, 산화구리, 산화 티타늄, 산화 코발트, 산화 텅스텐, 산화 몰리브덴, 산화 니켈, 산화 철, 산화 니오븀, 산화 바나듐, 전이 금속 산화물 또는 전이 금속 산화물을 사용할 수 있다.

[0025] 상기 산화금속의 전착(electrodeposition) 또는 증착(deposition)은 정전압법(potentiostatic 또는 constant potential), 정전류법(galvanostatic 또는 constant current) 또는 퍼텐셜 스위프법에 의해 수행될 수 있다.

[0026] 한편, 본 발명의 과산화수소 검출용 센서의 상기 산화금속의 표면에는 미오글로빈 단백질이 결합된다. 상기 미오글로빈은 상기 산화금속의 표면에 직접적으로 결합될 수 있으며, 또한 산화금속의 표면에 결합된 고체전해질(Solid Electrolyte)에 의해 간접적으로 결합될 수 있다. 상기 고체전해질은 산화금속 및 미오글로빈간의 전자 전달 통로 역할을 하는 물질로서, 예컨대 고분자 고체전해질 또는 금속 원자를 사용할 수 있다. 상기 고분자 고체전해질은 공지된 다양한 물질이 이용될 수 있으며, 예컨대 내피온(Nafion), PEO (Polyethylene oxide) 또는 PEG (Polyethylene glycol)을 고체전해질로서 사용할 수 있다.

[0027] 상기 미오글로빈은 산화환원효소로서 산화환원반응이 일어날 수 있는 헴(heme) 그룹을 포함하고 있으며, 과산화물(peroxide)에 의해 Fe^{3+} 및 Fe^{2+} 의 산화 환원 반응이 발생한다. 상기 미오글로빈은 상기 산화금속의 표면에서 1 개 또는 2 개 이상의 층(layer)을 형성할 수 있다.

[0028] 한편, 본 발명의 가장 큰 특징 중의 하나는 상기 시료 내의 과산화수소가 매우 미량인 경우에도 이를 검출할 수 있다는 것이다. 또한, 시료 내의 과산화수소는 본 발명의 센서에 포함된 산화환원단백질에 직접적으로 작용하여 전자전달 반응을 일으키고 반응시간 단축을 위한 추가적인 “반응촉진제”를 필요로 하지 않으므로, 중간체 화합물에 의한 영향을 받지 않아 과산화수소를 매우 정확하게 빠르게 검출할 수 있다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 본 발명의 센서의 최저 검출한계는 0.6 μM 이고, 최소 반응시간은 8-10초이며 이는 분석하고자 하는 시료의 상태, 시료 내의 과산화수소 농도 및 반응환경에 따라 근소한 차이를 나타낼 수 있다. 또한, 본 발명의 과산화수소 검출용 센서는 10초 이내에 정상상태(steady state) 전류에 도달하므로 신속하게 시료를 분석할 수 있다.

[0029] 본 발명의 센서는 작업전극 상에 과산화수소에 의한 산화환원반응을 일으킬 수 있는 미오글로빈/산화금속/전도성 산화물을 포함하는 형태로 제작될 수 있으며, 또한 본 발명의 센서는 상기 전도성 산화물, 산화금속 및 미오글로빈을 포함하는 작업전극(working electrode) 이외에 상대 전극(counter electrode) 및 기준 전극(reference electrode)을 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 상대전극은 플래티늄 또는 백금을 사용할 수 있으며, 상기 기준 전극은 Ag/AgCl 또는 Ag/AgCl/KCl_{sat}을 사용할 수 있다.

[0030] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 과산화수소 검출 방법을 제공한다:

[0031] (a) 본 발명의 과산화수소 검출용 센서를 준비하는 단계;

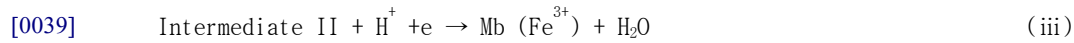
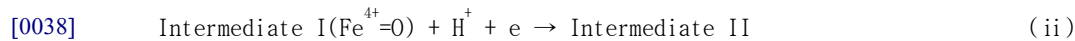
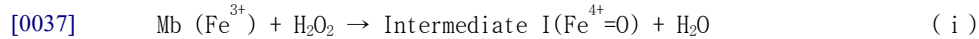
[0032] (b) 상기 센서에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및

[0033] (c) 상기 단계 (b)에서 발생하는 전기적 신호를 측정하는 단계.

[0034] 본 발명의 과산화수소 검출 방법은 상술한 본 발명의 과산화수소 검출용 센서와 동일한 기술적 사상을 기반으로 한 것으로서, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0035] 상기 본 발명의 센서에 시료를 접촉시키는 경우, 상기 시료에 포함된 과산화수소의 전기촉매(electrocatalytic) 활성에 의해 상기 센서의 표면에 고정된 단백질 내의 산화환원반응이 발생하고, 상기 센서의 전도성 금속산화물의 표면에 전착된(electrodeposited) 산화금속 및 상기 단백질 간의 전자 전달(electron transfer)에 의해 전기화학적(electrochemical) 신호를 측정함으로써 과산화수소를 검출할 수 있다.

[0036] 과산화수소의 전기촉매환원 메카니즘은 다음과 같다:



[0040] 상기 전기적 신호의 측정은 공지된 다양한 방법을 사용할 수 있으며, 예컨대 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry; CV), 시차펄스전압전류법(Differential Pulse Voltammetry; DPV), 선형 스위프 전압전류법(linear sweep voltammetry, LSV) 및 대시간전류법(chronoampermetry) 등에 의해 전류를 측정할 수 있다.

[0041] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, PBS (pH 7.0)하의 작업전극 Mb/CeO₂/ITO에 과산화수소를 첨가한 후, 전류 시그널을 측정하였으며, 선형회귀식(linear regression equation)은 다음과 같다:

[0042] $I_p (\mu A) = 13.54[H_2O_2 \text{ mM}] + 6.33, R^2 = 0.9825.$ (iv)

[0043] 과산화수소에 대한 Mb/CeO₂/ITO 전극의 민감도는 5.4 $\mu A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$ 였으며, 과산화수소의 검출한계는 0.6 μM 로서 종전의 다른 센싱을 사용하는 경우보다 더 낮은 농도의 과산화수소를 검출할 수 있다.

[0044] 본 발명의 과산화수소 검출 방법은 시료 내에 존재하는 과산화수소의 유무를 탐색하는데 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 상기 시료 내에 포함된 과산화수소의 양을 비교하는데도 활용될 수 있다. 즉, 본 발명의 센서를 이용하여 상기 시료와의 반응을 실시간으로 관찰할 수 있으므로, 각 시료에 포함된 과산화수소의 양이 동일한 경우 발생하는 전기화학적(electrochemical) 신호를 비교하여 과산화수소의 양을 비교, 예측할 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명의 센서는 과산화수소에 대하여 매우 높은 특이성을 가지므로 분석시료 내에 아스코르브산, 요산, 소듐 니트라이트 및 소듐 바이카보네이트 등의 다른 화학 물질에 의해 영향을 받지 않으며 따라서 과산화수소에 대하여 높은 선택성을 가진다. 이러한 특성은 본 발명의 센서의 빠른 반응 속도와도 관련 있으며 본 발명의 센서는 과산화물의 존재에 의해 발생한 전기적 신호(전류)가 10초 이내에 정상상태(steady state) 전류에 도달할 수 있다.

[0046] 본 명세서에서 용어 “시료”는 생물학적 시료, 화학적 시료 또는 환경 시료를 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0047] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0048] (a) 본 발명은 산화환원단백질인 미오글로빈 및 CeO₂를 이용한 과산화수소 검출용 센서를 제공한다.

[0049] (b) 본 발명의 과산화수소 검출용 센서는 CeO₂/ITO 전극 상에서의 Mb의 직접 전기화학 신호를 발생시킬 수 있으므로, 중간체 화합물에 의한 영향을 받지 않아 분석시료 내의 과산화수소를 정확하고 정밀하게 검출할 수 있다.

[0050] (c) 또한, 종래의 과산화수소 검출용 센서보다 검출한계가 매우 낮아 시료 내에 포함된 극미량의 과산화수소를 검출할 수 있으며, 반응시간 또한 매우 짧아 신속한 시료 분석이 가능하다.

[0051] (d) 본 발명에 따르면, 본 발명의 센서는 간단하고 단순한 가공과정 및 저비용으로 생산할 수 있으며, 시료 자체에 포함된 과산화수소에 의한 우수한 전기화학적 촉매작용으로 인하여 복잡한 검출과정을 피하고 빠르고 용이

하게 시그널 탐지가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0052]

도 1a는 사이클릭 볼타모그램(Cyclic voltammogram, CV)으로서, ITO 표면상의 세륨 나노구조체 필름의 전기음극성 전착을 나타낸다: (○) 0.01 M, (---) 0.1 M 및 (—) 0.2 M). 스캔 속도(주사속도) 50 mVs^{-1} . ITO 전극 상의 CeO_2 필름 SEM 이미지: (b) 0.01 M, (c) 0.1 M 및 (d) 0.2 M.

도 2는 ITO 표면(a, d), ITO 상의 세륨 필름(b,e), ITO 상의 이산화세륨 필름에 고정된 미오글로빈(c,f)의 SEM 및 AFM 이미지를 나타낸다.

도 3은 UV-Vis 흡수 스펙트럼으로서, (a) ITO, (b) ITO 표면상의 이산화세륨, 및 (c) 미증착 및 ITO 표면상에 CeO_2 증착된 필름의 XRD 패턴을 나타낸다.

도 4a는 10 mM PBS (pH 7.0)하, 스캔 속도 50 mVs^{-1} 에서의 사이클릭 볼타모그램을 나타낸다. (i) 미증착 ITO 및 (ii) ITO 표면에 CeO_2 증착된 필름; 도 4b는 CeO_2/ITO 표면상에서 0.01 mVs^{-1} 내지 0.1 mVs^{-1} 의 스캔 속도의 영향을 나타낸다; 도 4c는 넓은 전위차 범위에서의 Mb/ CeO_2/ITO 의 CV로서, ITO 표면상의 CeO_2 및 Mb 층의 산화환원 특성을 나타낸다; 도 4d는 0.02 mVs^{-1} 내지 0.2 mVs^{-1} 에서 Mb/ CeO_2/ITO 전극상에서 스캔 속도의 영향을 나타낸다; 도 4e는 Mb/ CeO_2/ITO 전극의 (스캔 속도) $^{1/2}$ 에 대하여 음극성(cathodic)(i_{pc}) 및 양극성(anodic)(i_{pa}) 피크 전류의 플롯을 나타낸다; 도 4f는 Mb/ CeO_2/ITO 전극의 $\log(\text{스캔 속도})^{1/2}$ 에 대하여 음극성(cathodic)(i_{pc}) 및 양극성(anodic)(i_{pa}) 피크 전류의 플롯을 나타낸다.

도 5는 10 mM PBS (pH 7.0) 하의 시차펄스 볼타모그램(Differential pulse voltammogram)을 나타낸다. (a) Mb/ CeO_2/ITO (b) CeO_2/ITO 및 (c) Mb/ITO 표면.

(c) 및 (d)는 각각 10 mM PBS (pH 7.0) 하의 CeO_2/ITO 및 Mb/ITO 표면의 선형 스위프 볼타모그램을 나타낸다.

도 6a는 Mb/ CeO_2/ITO 전극의 시차펄스 볼타모그램으로서 5 mL PBS (10 mM, pH 7.0)하의 $5 \mu\text{L}$ 과산화수소(100 mM) 첨가에 대한 과산화수소의 기능을 나타낸다. 도 6b는 5 mL PBS (10 mM, pH 7.0)에 $10 \mu\text{L}$ 과산화수소(100 mM) 첨가 한 후, 질소 퍼지(nitrogen purging) 하의 -0.3 V 전위에서 일정하게 교반한 경우의 Mb/ CeO_2/ITO 전극의 전류(I/t) 곡선을 나타낸 것이다. 삽입된 그래프는 각각 (i) 검량선 및 (ii) 과산화수소 검출에 대한 Mb/ CeO_2/ITO 전극의 반응시간을 나타낸다.

도 7a는 5 mL PBS (pH 7.0) 하에서 과산화수소 $5 \mu\text{L}$ 에 요산(0.2 mM, AA), L-아스코르브산(0.2 mM, AA), 소듐 니트라이트(0.2 mM, NaNO_2) 및 소듐 바이카보네이트(0.2 mM, NaHCO_3)를 차례로 $5 \mu\text{L}$ 씩 첨가하고 일정하게 교반한 경우의 전류(I/t) 곡선을 나타낸다. 도 7b는 5 mL PBS (pH 7.0) 하에서 과산화수소 $5 \mu\text{L}$ 에 요산, L-아스코르브산, 소듐 니트라이트 및 소듐 바이카보네이트를 차례로 $10 \mu\text{L}$ 및 $20 \mu\text{L}$ 씩 첨가하고 일정하게 교반한 경우의 전류(I/t) 곡선을 나타낸다.

도 8은 본 발명의 과산화수소 센서 개발을 위한 Mb/ CeO_2/ITO 전극의 가공 과정을 모식적으로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0054] 실시예

[0055] 실험재료 및 방법

[0056] 1. 실험재료

[0057] 말의 심장으로부터 얻은 미오글로빈(Myoglobin, Mb)은 시그마-알드리치(미국)에서 구입하였으며, 추가적인 정제 과정 없이 사용하였다. 지방족 알코올 및 물의 혼합물 하의 질산세륨 6 수화물(Cerium (III) nitrate hexahydrate, $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (순도 99%), 내피온 과플루오르화(perfluorinated) 레진 용액(20 wt%)은 시그마-알드리치로부터 구입하였다. 과산화수소는 대정화금(대한민국)으로부터 구입하였으며, 탈이온수에 희석하여 사용하였다. 모든 전기화학적 실험에는 10 mM PBS 버퍼용액(pH 7.0)이 사용되었다. 모든 용액은 Milli-Q 시스템(밀리포어, 미국)를 이용하여 정제된 탈이온수(18 M Ω cm) 하에서 제조되었다(28, 29).

[0058] 2. 전극 세정

[0059] ITO(인듐 틴 옥사이드)(20 Ω /cm²) 코팅된 두께 400 nm의 유리판을 사용하였다. 투명 전극(transparent electrode)은 트리톤 X-100/물(1:5, v/v), 물 및 에탄올을 사용하여 최소 40분 동안 세척하였다. ITO 전극은 $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:5) 용액 하에서 80℃, 40분 동안 가열한 후 물로 세척하고, 이어 전극 표면에 OH기를 생성 시키기 위하여 질소가스 하에서 건조시켰다(30). 0.01, 0.1 및 0.2 M $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 용액으로 구성된 상온의 전기화학적 배스상에서 CeO_2 (이산화세륨) 필름의 전기적 증착 및 미오글로빈(Mb)의 고정을 실시하였다. CeO_2 필름은 CHI 660A 전기화학 워크스테이션을 사용하여 전기화학적으로 증착되었다. 전기화학적 증착은 작업전극(working electrode)으로서 ITO를 사용하여 3-전극셀에서 실시되었으며, 플래티늄 와이어 및 Ag/AgCl 전극을 각각 상대전극(counter electrode) 및 기준전극(reference electrode)으로 사용하였다. 증착 전압은 기준전압에 대하여 -0.6 V에서 -1.8 V의 범위로 사용하였다. 상기 증착과정 후, 코팅된 필름을 탈이온수로 세척한 후 질소 가스 하에서 건조시켰다.

[0060] 0.1 mg/mL 미오글로빈(Mb) 현탁액 (20 μL)를 CeO_2 /ITO 전극 표면에 떨어뜨리고 6시간 동안 수분을 증발시켜 균일(uniform) 필름을 형성하였다. 이후, 0.1 wt% 내피온(Nafion) 용액 10 μL 을 점적한 후 4℃에서 건조시켰다. 내피온 필름은 화학적 변형된 전극에서 일반적으로 사용되는 필름으로서, 특정 이온-교환, 구별, 화학적 저항성 및 생체적합적 특성으로 인해 사용된다. Mb/ITO 전극은 CeO_2 /미증착 ITO를 사용하였다. 전극을 4℃에서 하루동안 고정시킨 후, 탈이온수로 세척하고 질소가스로 건조시켰다. 건조된 전극은 사용 전 4℃에 보관하였다.

[0061] 3. ITO 표면상의 가공된 필름의 특성

[0062] 증착 또는 증착되지 않은 필름의 표면을 JEOL JSM S-4300 현미경(20 kV)을 사용하여 SEM 측정으로 분석하였다. 나노스코프 IV/멀티모드 (디지털 인스트루먼트, 미국)를 이용하여 원자간력현미경(Atomic Force Microscope, AFM) 이미지를 획득하였다. 모든 AFM 이미지는 공명진동수(resonance frequency, f_0) 250-300 kHz인 실리콘 캔틸레버(cantilever)를 사용하여 탭핑(tapping) 모드에서 기록되었다.

[0063] 준비된 샘플은 스캐닝 속도 2 θ 당 0.02 °/초의 리가쿠(Rigaku) X-선 회절계를 이용하여 1.54056 Å의 Cu K α 방사선(λ)으로 기록하였다. X-선 회절계는 40 kV 및 150 mA에서 사용하였다. 광학적 측정에는 JASCO-V-660 분광광도계를 이용하였다. 기질(substrate)의 크기는 20 × 20 mm² 이다. 미증착 ITO 기질은 기준샘플로 사용되었다.

[0064] 4. 전기화학적 활성 및 과산화수소 측정

[0065] 회전전압전류법(Cyclic voltammetry, CV) 및 선형 스위프 전압전류법(linear sweep voltammetry, LSV)은 각각 작업전극으로서 Mb/ CeO_2 /ITO 기질, 상대 전극으로서 플래티늄 및 기준전극으로서 Ag/AgCl/KCl_{sat}을 사용하는 3-전극 시스템으로 수행하였다. 실험에는 일반 전기화학 소프트웨어를 갖춘 CHI 660A 일정전위기(potentiostat)

t)가 사용되었다. 전류(I/t) 및 시차펄스전압(differential pulse voltammetry, DPV) 측정은 다양한 과산화 수소 농도를 이용하는 Mb/CeO₂/ITO 전극상에서 수행되었다. 전위차를 -0.30 V로 하여, 10 mM PBS (pH7.0) 버퍼 5 mL 하의 100 mM 과산화수소 10 μ L을 계속적으로 첨가한 후 측정되었다. 전류를 측정하는 동안 600 rpm의 마그네틱 교반으로 대류 이동시켰다. 실험에서 첨가된 버퍼 용액은 고순도 질소로 제거되었다.

실험결과

1. ITO 표면상의 산화금속 필름의 형성 및 최적화

다공성 CeO₂ 필름의 전기적 증착은 Ag/AgCl/KCl_{sat} 대비 -0.6 V 내지 -1.8 V의 전위차 범위에서 질산세륨 용액의 농도를 증가시키면서(0.01 M, 0.1 M 및 0.2 M) 서로 다른 작업전극을 사용하는 회전 전압전류법으로 수행되었다. 도 1a에서 볼 수 있듯이, 역주사(reverse scan) 이력현상(hysteresis)은 산화금속 필름이 ITO 표면에서 증착되었다는 것을 의미한다. 또한 이력현상 및 전류 밀도는 질산세륨 용액의 농도가 증가됨에 따라 함께 증가되었다. 고감도 전류 측정 센서 개발을 위한 산화금속을 최적화하기 위하여, 단백질 고정 후 더 높은 전류 감응을 나타내는 증착농도로 산화금속을 로딩하여 산화금속에 대한 전극 성능을 최적화하였다. 서로 다른 농도의 CeO₂를 포함하는 바이오센서를 제작한 뒤 고정화 매트릭스에서 미오글로빈 양이 일정하게 유지되고 있는 동안 실험하였다. 0.1 M CeO₂ 필름에서 더 높은 전류감응이 나타났다. CeO₂ 농도의 증가는 높은 전류 강도를 나타내지 못했다. 도 1b-1d는 같은 조건하의 ITO 표면상에서 다양한 CeO₂ 농도(0.01 M, 0.1 M 및 0.2 M)에 따른 SEM 이미지를 나타낸다. 증착된 필름은 낮은 농도에서 세륨 나노파티클처럼 관찰되었으며, 다공성 구조에 첨가되는 질산세륨 용액의 농도가 증가됨에 따라 파티클의 크기가 증가되었다.

2. 가공된 표면상에서의 단백질 고정 확인

가공된 표면상의 산화 세륨 필름의 형성(도 2b 및 도 2e) 및 미오글로빈의 증착(도 2c 및 도 2f)은 SEM 및 AFM 분석으로 확인된다. 상기 두 가지 분석법은 전기증착이 어떠한 균열(breaks)도 없이 ITO 표면상에서 CeO₂ 필름을 형성할 수 있다는 것을 보여준다. ITO 표면은 증착된 필름과 비교하여 표면이 전체적으로 마루(ridge)형태를 나타내었으며, 전체표면에 걸쳐 명확한 3차원 구조를 가지는 거친 표면의 단편들을 나타내었다(도 2a 및 도 2d). 전구체 용액으로부터의 산화물의 핵형성은 분자적 수준에서 발생하며, 필름은 일정하고 밀집된 마이크로구조를 갖는다. 또한, 거친 표면의 구조에는 단백질과 내피온(Nafion)이 고정되었을 때, 더 매끄러운 표면이 형성된 단백질 분자가 흡착된다(도 2c 및 도 2f); 또한, AFM 분석은 CeO₂/ITO 표면에 미오글로빈(Mb)과 같은 분자들이 잘 흡착된다는 것을 보여준다.

3. CeO₂/ITO 전극 표면의 UV-vis 및 X선 회절분석

미증착된 ITO의 자외선 스펙트럼은 ITO 표면에 일반적으로 쓰이는 550 nm에서 흡수 피크가 나타났으며 CeO₂/ITO의 흡수단(absorption edge)은 360 nm로 나타났다(도 3a 및 3b). 선행연구에서 270400 nm 파장에서 CeO₂/ITO의 흡수 밴드가 나타났으며, CeO₂ O²⁻(2p)에서 Ce⁴⁺(4f) 오비탈로 전하 이동 전이가 나타났다(33). 또한, 도 3c는 ITO 기질 상에서 증착된(deposited) 나노-구조의 CeO₂ 필름에서 X선 회절분석(XRD)을 실시하였다. XRD 패턴 결과는 CeO₂ 필름이 결정체(crystalline)이고, (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) 및 (3 1 1) 평면에 해당하는 회절 피크를 가지며, 이는 순수한 정육면체의 플루오라이트(fluorite) 구조의 CeO₂로 분류될 수 있다. 피크의 강도 및 위치는 문헌(JCPDS card, No. 4-0593)에 부합하였다(34). 또한 이는 ITO 표면이 각각 (2 1 1), (2 2 2), (4 0 0), (4 1 1), (4 3 1) 및 (4 4 0) 면에 해당하는 XRD 피크로 분해되었음을 나타낸다. 피크의 강도 및 위치는 JSPDS 카드 파일(JCPDS 1c: 01-088-2160)에 부합하였다.

4. CeO₂/ITO 및 Mb/CeO₂/ITO 전극의 전기화학적 특성

[0074] CeO₂/ITO 및 미증착 ITO 전극의 회전 전압전류(CV)를 도 4a에 나타내었다.

[0075] 미증착 ITO 전극(i)에서 명백한 산화환원 피크는 관찰되지 않았으나, 10 mM PBS 용액 하의 전착된(electrodeposited) CeO₂-변형 전극(ii)에서 명백한 가역적 산화환원 피크($E_{pa} = 0.6$ V 및 $E_{pc} = 0.3$ V)가 나타났다. 이러한 피크들은 Ce³⁺/Ce⁴⁺ 커플의 형성으로 인해 나타났다. 상기 결과들은 ITO 전극의 표면에서 CeO₂ 형성됨으로써 확인되었으며 이는 필름의 우수한 전기화학적 성질을 의미한다. 도 4b는 pH 7.0 PBS 하에서 서로 다른 스캔 속도(주사속도)를 가지는 CeO₂/ITO의 회전 전압전류를 나타낸다. 대략적으로 대칭적인 산화환원 피크들이 나타났으며, 0.01-0.1 mVs⁻¹의 스캔 속도에서 산화환원 피크 전류와 거의 같은 높이로 나타났다. 산화환원 피크 전류 및 스캔 속도 [$I_{pc} (\mu A) = (0.0071)(mVs^{-1}) + 0.3597$ ($R^2 = 0.9931$) 및 $I_{pa} (\mu A) = (-0.0062)(mVs^{-1}) - 0.5309$ ($R^2 = 0.9952$)]간에는 선형 관계가 나타났다. 이러한 현상은 CeO₂ 필름 및 ITO 간의 전자 이동이 표면-조절된 전기화학적 과정이라는 것을 의미한다. 도 4c는 10 mM PBS 하의 CeO₂/ITO 전극 표면에 고정된 Mb의 직접적인 전기화학적 성질을 나타낸다. 두 쌍의 준-가역적(quasi-reversible) 환원산화 피크가 나타났으며, 이는 CeO₂ 및 Mb에 해당한다. -0.38 및 -0.2 V의 피크들은 Mb의 Fe³⁺/Fe²⁺ 산화환원 중심을 나타낸다. Mb의 형식 전위($E^{0'}$)는 환원 및 산화 피크 전위의 중간지점(-290 mV (Ag/AgCl에 대하여))으로부터 계산하였으며, 피크-피크간의 전위차(E_p)는 180 mV로 나타났다. 이러한 결과들은 Mb가 CeO₂/ITO 전극상에서 준-가역적(quasi-reversible) 전기화학 반응을 나타냄을 확인시켜준다. Mb/CeO₂/ITO 전극에서의 스캔 속도 분석은 10 mM PBS pH 7.0 하의, 20-200 mVs⁻¹의 범위에서 수행하였다. 결과적으로 음극성 및 양극성 피크 전류는 0.01 -0.2 mVs⁻¹ 범위에서 거의 대칭적이었으며 스캔 속도의 제곱근(square root)에 선형적으로 비례하였다. 도 4d 및 4e는 전형적인 발산형태를 나타낸다. 회귀방정식은 $I_{pc} = 0.1449 v^{1/2} - 0.528$ ($\mu A, Vs^{-1}, R^2 = 0.982$) 및 $I_{pa} = -0.138 v^{1/2} + 0.487$ ($\mu A, Vs^{-1}, R^2 = 0.983$)이다. $E_p = f(\log v)$ 의 그래프는 음극성 및 양극성 피크로서 각각 $-2.3RT/\alpha nF$ 및 $2.3RT/(1-\alpha)nF$ 의 기울기를 가지는 두 개의 직선으로 나타났다(도 4e 및 4f). 따라서 다음 식에 따른 직선 기울기로부터 α 값은 0.533로 계산된다(35).

$$\log \frac{v_a}{v_c} = \log \frac{\alpha}{1-\alpha} \quad (1)$$

[0077] 다음의 라비롱 방정식(Laviron equation)을 이용하여 겉보기(apparent) 이성질성(heterogeneous) 전자전달 속도상수(k_s)를 산출하였다(35).

$$\log k_s = \alpha \log(1-\alpha) + (1-\alpha) \log \alpha - \log \frac{RT}{nFv} - \frac{\alpha(1-\alpha)nF\Delta E_p}{2.3RT} \quad (2)$$

[0079] α 는 전자 전달 계수이며, n 은 전자 수, E_p 는 산화환원 피크의 분산도, 및 v 는 스캔 속도이다. 전자 전달 속도 상수(k_s)는 1.57 s⁻¹로 계산되었다.

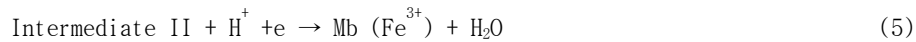
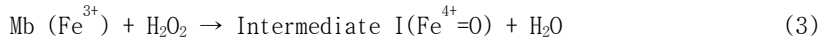
[0080] 라비롱 방정식에 따르면(36), CeO₂/ITO-변형된 전극의 표면에 고정된 Mb의 흡착률(surface coverage, Γ)은 5.142×10^{11} mol cm⁻²이며, 이는 Mb의 여러 층이 합성 필름 내에서 고정되어 전자 전달 과정에 참여하는 것을 의미한다. 10 mM PBS 하에서, Mb/CeO₂/ITO의 전기화학적 특성 및 구성성분을 조사하기 위하여 DPV 및 LSV를 측정하였다. 도 5a는 -0.15 내지 0.20 V (Ag/AgCl에 대하여) 범위의 포텐셜 스위프(potential sweep)에 의한 Mb/CeO₂/ITO의 DPV를 나타내며, CeO₂ (0.10 V) 및 Mb (-0.075 V)의 환원에 의한 선명한 환원 피크가 나타났다. 또한, 도 5b 및 5c는 CeO₂/ITO 및 Mb/ITO 전극의 DPV가 각각 -0.05 V 및 -0.125 V에서 피크를 나타내고, 하이브리드 구조와 비교하여 피크 전위 분포에서 소폭 변화를 나타냄을 보여준다. 이러한 현상은 산화환원 전위의 변화를 야기하는 분자적 환경에서의 산화환원물질의 특성 또는 전극 표면에 단백질의 표면 고정에 의해 나타

나는 것으로 예상된다. 따라서 LSV는 겉보기(apparent) CeO_2/ITO , Mb/ITO 및 $\text{Mb}/\text{CeO}_2/\text{ITO}$ 전극 표면의 형성을 보여준다.

5. 과산화수소 탐지를 위한 $\text{Mb}/\text{CeO}_2/\text{ITO}$ 전극의 분석

과산화수소에 대한 전기촉매 반응을 조사하기 위하여 $\text{Mb}/\text{CeO}_2/\text{ITO}$ 상에서 DPV 및 전류(I/t) 측정을 수행하였다.

과산화수소의 전기촉매환원 메카니즘은 다음과 같다:



10 mM PBS 하의 $\text{Mb}/\text{CeO}_2/\text{ITO}$ 에 100 mM 과산화수소 10 μL 를 첨가한 후, DPV 시그널(도 6a)을 측정하였다. 과산화수소를 첨가할 때마다 $\text{Mb}/\text{CeO}_2/\text{ITO}$ 전극은 과산화수소를 탐지하는 우수한 전기촉매 반응을 나타냄을 관찰하였다. 본 발명자들은 시험 화합물을 완전히 환원시키기 위하여 Mb의 환원전위 보다 더 낮은 -0.15 V의 전위차를 선택하였다. 따라서, -0.3 V의 전위차에서 대 시간 전류(chronoamperometric) 반응을 측정하였다. 블랭크 버퍼 용액 하의 바이오센서는 과산화수소를 달리하여 실험하였으며, 이후 검량선을 얻기 위하여 산소 방해를 피하기 위한 질소 퍼지(nitrogen purging)를 이용하여 크로노암페로그램(chronoamperogram)을 실시하였다(도 6b). 검량 그래프(도 6b의 삽입그래프 [i])는 0.2 mM 내지 5 mM 농도의 과산화수소에 대한 것이다(동적범위 3 mM 까지). 선형회귀식(linear regression equation)은 다음과 같다:

$$I_p (\mu\text{A}) = 13.54[\text{H}_2\text{O}_2 \text{ mM}] + 6.33, R^2 = 0.9825.$$

과산화수소에 대한 $\text{Mb}/\text{CeO}_2/\text{ITO}$ 전극의 감도는 $5.4 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 이며, 과산화수소의 검출한계는 0.6 μM 이다.

표 1에 나타난 바와 같이, 상기 검출한계는 종전의 다른 전기화학적 방법을 사용하는 경우보다 더 낮다(37-42).

표 1

-	고정 매트릭스	검출물질	검출한계	감도 (sensitivity)	재사용 가능성	참조 문헌
1	HRP/RANI/ CeO_2/ITO	H_2O_2	50 mM	159.6 nAmM^{-1}	8주	37
2	HRP/Nano CeO_2/ITO	H_2O_2	0.5 μM	$8.44 \times 10^{-3} \mu\text{A} (\mu\text{M cm}^2)^{-1}$	5주	38
3	CeO_2/Au	H_2O_2	1-30 μM	$0.4806 \text{ nA } \mu\text{mol L}^{-1}$	-	39
4	리파아제/nano- CeO_2/ITO	트리글리세라이드	50-500 mg/dL	$0.195 \text{ mA/mg dL cm}^2$	3개월	40
5	BSA/r-IgGs/nano CeO_2/ITO	마이크로톡신	0.5 ng dl^{-1}	$1.24 \mu\text{A/ng dl}^{-1} \text{ cm}^2$	-	41
6	ssDNA/ $\text{CeO}_2/\text{CHIT}/\text{GC}$	DNA	$1.0 \times 10^{-11} \text{ molL}^{-1}$	-	-	42
7	$\text{Mb}/\text{CeO}_2/\text{ITO}$	H_2O_2	0.6 μM	$5.4 \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	2주	본 발명

도 6b의 삽입그래프 [ii]는 과산화수소를 첨가한 후 정상상태(steady state)에서의 반응 전류를 나타내며, 정상상태 전류의 95%는 약 10초 이후에 나타났다. 가공된 바이오센서는 10초 이내에 응답하였으며, 인 비보 진

단에 적합한 것으로 판단되었다(38).

[0092] 과산화수소 농도가 > 3 mM일 때 검량선의 반응 안정기(response plateau)가 나타났으며, 이는 미카엘리스-멘텐 운동역학 메카니즘(MichaelisMenten kinetic mechanism)의 특성을 나타낸다. 미카엘리스-멘텐 상수(K_m^{app})의 효소 활성화에 대한 산화금속 미세환경의 영향에 있어 정량적인 정보를 얻기 위해 라인웨버-버크식을 이용하여 효소-기질반응속도론에 반영하였다(39).

[0093]
$$1/I_{ss} = 1/I_{max} + K_m^{app}/I_{max} C \quad (6)$$

[0094] I_{ss} 는 기질 첨가 후의 정상상태 전류이고, C는 기질의 벌크 농도(bulk concentration)이며, I_{max} 는 기질포화상태 하의 최대 전류이다. 겉보기(apparent) 미카엘리스-멘텐 상수(K_m^{app})는 3.15 mM이며, 이는 바이오센서가 과산화수소에 대하여 높은 친화도를 가짐을 나타낸다.

[0095] 선택성(selectivity)은 또한 바이오센서의 활용에 있어 중요한 부분이다. 2 mM에서 전극의 선택성을 평가하기 위하여 아스코르브산, 요산, 소듐 니트라이트 및 소듐 바이카보네이트를 측정하였다. 상기 방해 요소들과 함께 5 μ L 과산화수소(0.2 mM)를 연속적으로 첨가하여 바이오센서의 전류측정 반응(amperometric response)을 실시하였다(도 7a). 과산화수소 반응에 대하여 방해 요소가 최소한의 영향을 미침을 나타낸다. 10 μ L의 상기 방해물질과 5 μ L 과산화수소(0.2 mM)를 함께 투입한 경우, 무시할 수 있을 정도의(negligible) 반응이 나타났으며, 이는 바이오센서가 과산화수소에 대하여 높은 선택성을 가짐을 의미한다(도 7b). Mb/CeO₂/ITO의 안정성은 변형된 전극을 몇 차례 사이클 동안 전위차 범위 +0.3 내지 -0.25 V에서 사이클링한 후에 전류 반응을 모니터링함으로써 측정하였다. 또한, 바이오센서의 재현가능성(reproducibility)은 과산화수소의 선행범위에서 조사하였다. 1주일간 4°C에서 보관한 후, Mb/CeO₂/ITO 전극은 pH 7.0 PBS 하의 10 mM 과산화수소에 반응하지 않았다. 2주일 후, 센서는 과산화수소에 대한 초기 반응의 95%를 유지하였다. 따라서, CeO₂ 및 내피온(Nafion)은 필름-형성 및 Mb를 고정하기 위한 접착제 역할을 한다. 10 mM PBS (pH 7.0) 하의 3 mM의 과산화수소를 이용하여 6번의 측정결과, 상대표준편차(relative standard deviation)는 2.3%로 나타났으며, 이는 본 발명의 바이오센서가 재현성 있음을 의미한다.

[0096] 논의

[0097] 본 발명자들은 변형된 ITO 전극으로서 미오글로빈(Mb)를 고정함으로써 넓은 표면적을 가진 CeO₂ 필름을 합성하였다. 전착된(electrodeposited) CeO₂는 과산화수소를 전기화학적으로 탐지하기 위하여 Mb와 하부의 IOT 표면 간의 전자이동을 제공하였다. 전기화학적 바이오센서는 매우 낮은 검출한계(0.6 μ M)에서 과산화수소를 측정할 수 있었다. 넓은 표면적, CeO₂ 변형된 표면의 증가된 전기촉매 활성, 산화금속 물질로 인한 전도도(conductivity) 및 다양한 환경조건 하에서 최적화된 과정으로서 백그라운드 전류 레벨을 최소화시킴으로써, 고감도 센서(5.4 μ A. mM⁻¹.cm⁻²)가 될 수 있는 것으로 판단된다. 간단하고 단순한 가공과정, 저비용 및 높은 선택성을 나타내는 우수한 전기화학적 촉매작용으로 인하여 복잡한 검출과정을 피하고 시그널 탐지가 가능하다. 본 발명에서 개발된 플랫폼(platform)은 단순함(simplicity), 효율성(efficiency) 및 타겟 측정을 위한 스피드에 있어 장점을 가지며, 이는 사용자-적합한 센서 플랫폼의 개발에 필수적이며 다른 물질의 고감도 및 고특이적 검출에 유용하게 이용될 수 있다.

[0098] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0099] 참조문헌

[0100] 1. Hocevar, S. B.; Svancara, I.; Ogorevc, B.; Vytras, K. Anal. Chem. 2007, 79, 8639-8643.

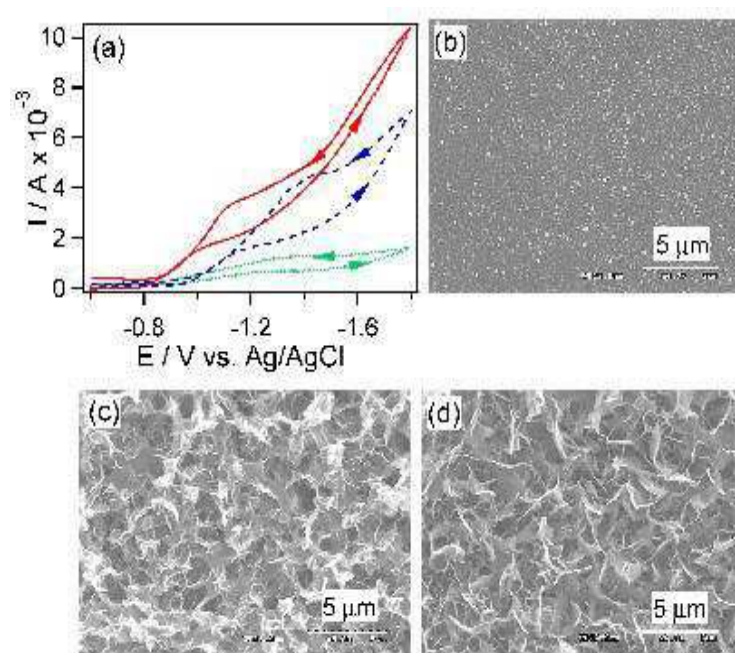
- [0101] 2. Shao, Y.; Wang, J.; Wu, H.; Liu, J.; Aksay, I. A.; Lin, Y.; *Electroanalysis* 2010, 22, 1027-1036.
- [0102] 3. Shu, X.; Chen, Y.; Yuan, H.; Gao, S.; Xiao, D.; *Anal. Chem.* 2007, 79, 3695-3702.
- [0103] 4. Xiao, Y.; Patolsky, F.; Katz, E.; Hainfeld, J. F.; Willner, I. *Science* 2003, 299, 1877-1881.
- [0104] 5. Bessenhirtz, M. K.; Scheller, F. W.; Stocklein, W. F. M.; Kurth, D. G.; Mhwald, H.; Lisdat, F.; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 4357
- [0105] 6. Wei, J. J.; Liu, H. Y.; Dick, A. R.; Yamamoto, H.; He, Y. F.; Waldeck, D. H. J. *Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 9591-9599.
- [0106] 7. Riklin, A.; Katz, E.; Willner, I.; Stocker, A.; Buckmann, A. F. *Nature* 1995, 376, 672-675.
- [0107] 8. Mu, C.; Zhao, Q.; Xu, D.; Zhuang, Q.; Shao, Y. J. *Phys. Chem. B* 2007, 111, 1491-1495.
- [0108] 9. Rusling, J. F. *Acc. Chem. Res.* 1998, 31, 363-369.
- [0109] 10. Shoddiky, M. J. A.; Torriero, A. A. J.; Sagara, T.; Nakashima, N.; Rusling, J. F. *Biosens. Bioelectron.* 2011, 26, 1775-1787.
- [0110] 11. He, P.; Hu, N.; Rusling, J. F.; *Langmuir* 2004, 20, 722-729.
- [0111] 12. Cui, X.; Li, C. M., Zang, J.; Yu, S. *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 3288-3292.
- [0112] 13. Zang, J.; Li, C. M.; Cui, X.; Wang, J.; Sun, X.; Dong, H.; Sun, C. Q. *Electroanalysis.* 2007, 19, 1008-1014.
- [0113] 14. Liu, A.; Wei, M.; Honma, I.; Zhou, H. *Anal. Chem.* 2005, 77, 8068-8074.
- [0114] 15. Gooding, J. J.; Wibowo, R.; Liu, J.; Yang, W.; Losic, D.; Orbons, S.; Mearns, F. J.; Shapter, J. G.; Hibbert, D. B. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 9006-9007.
- [0115] 16. Dai, Z.; Liu, S.; Ju, H.; Chen, H. *Biosens. Bioelectron.* 2004, 19, 861-867.
- [0116] 17. Walcarius, A. *Chem. Mater.* 2001, 13, 3351-3372.
- [0117] 18. Regan, B. O.; Gratzel, M. *Nature* 1991, 353, 737-740.
- [0118] 19. Dittrich, T.; Weidmann, J.; Koch, F. *Appl. Phys. Lett.* 1999, 75, 3980-3982.
- [0119] 20. Boyan, B. D.; Hummert, T.W.; Dean, D. D.; Schwartz, Z. *Biomaterials* 1996, 17, 137-146
- [0120] 21. Song, L.; Feng, D.; Fredin, N. J.; Yager, K. G.; Jones, R. L.; Wu, Q.; Zhao, D.; Vogt, B. D. *ACS Nano*, 2010, 4, 189-198.
- [0121] 22. Ko, H.; Chang, S.; Tsukruk, V. V. *ACS Nano*, 2009, 3, 181-188.
- [0122] 23. Luo, Y.; Liu, H.; Rui, Q.; Tian, Y.; *Anal. Chem.* 2009, 81, 3035-3041.
- [0123] 24. Yang, Y. J.; Hu, S. *Electrochimica Acta*, 2010, 55, 3471-3476.
- [0124] 25. Gao, L.; Zhuang, J.; Nie, L.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Gu, N.; Wang, T.; Feng, J.; Yang, D.; Perrett, S.; Yan, X. *Nature* 2007, 2, 577-583.
- [0125] 26. Zhu, X.; Yuri, I.; Gan, X.; Suzuki, I.; Li, G. *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 1600-1604.
- [0126] 27. A. Curullia, A.; Valentinib, F.; Padelettic, G.; Viticollic, M.; Cascherac, D.; Palleschib, G. *Sens. Actuators, B* 2005, 111, 441-449.
- [0127] 28. Kaushik, A.; Solanki, P. R.; Kaneto, K.; Kim, C. G.; Ahmad, S.; Malhotra, B. D. *Electroanalysis* 2010, 22, 1045-1055.
- [0128] 29. Fan, Z. H.; Harrison, D. J.; *Anal. Chem.* 1992, 64, 1304-1311.
- [0129] 30. Kaushik, A.; Solanki, P. R.; Ansari, A. A.; Ahmed, S.; Malhotra, B. D. *Nanotechnology* 2009 20

055105(8pp).

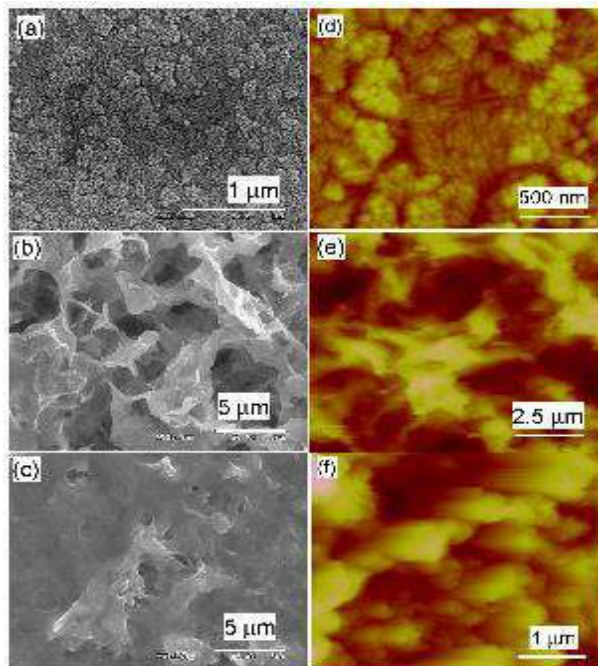
- [0130] 31. Maensiri, S., Masingboon, C., Laokul, P., Jareonboon, W., Promarak, V., Anderson, P. L., Seraphin, S. Crystal Growth Des. 2007, 7, 950-956.
- [0131] 32. Lee, T.; Kim, S. -U.; Min, J.; Choi, J.-W.; 2010, 22, 520-514.
- [0132] 33. Laviron, E. J. Electroanal. Chem.1979, 100, 263-270.
- [0133] 34. Yagati, A. K.; Lee, T.; Min, J.; Choi, J.-W.; Colloids Surf. B: Biointerfaces 2012, 92, 161-167.
- [0134] 35. Tian, F.; Gourine, A. V.; Huckstepp, R. T. R.; Dale, N. Anal. Chim. Acta 2009, 645, 2009, 86-91.
- [0135] 36. Kamin, R. A.; Wilson, G. S.; Anal. Chem. 1980, 52 1198-1205.
- [0136] 37. Ansari, A. A.; Sumana, G.; Khan, R.; Malhotra, B.D. J. Nanosci. Nanotechnol. 2009, 9, 4679-4685.
- [0137] 38. Ansari, A. A.; Solanki, P. R.; Malhotra, B.D. Journal of Biotechnology 2009, 142, 179-184.
- [0138] 39. Mehta, A.; Patil, S.; Bang, H.; Cho, H. J.; Seal, S. Sensor Actuat A-Phys. 2007, 134, 146-151.
- [0139] 40. Solanki, P. R.; Dhand, C. Kaushik, A.; Ansari, A. A.; Sood, K.N.; Malhotra, B.D. Sensor Actuat B-Chem. 2009, 141, 551-556.
- [0140] 41. Kaushik, A.; Solanki, P. R.; Ansari, A. A.; Ahmad, S.; Malhotra, B. D. Nanotechnology 2009, 20, 055105 (8pp).
- [0141] 42. Feng, K.-J.; Yang, Y.-H.; Wang, Z.-J.; Jiang, J.-H.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. Talanta 2006, 70, 561-565.

도면

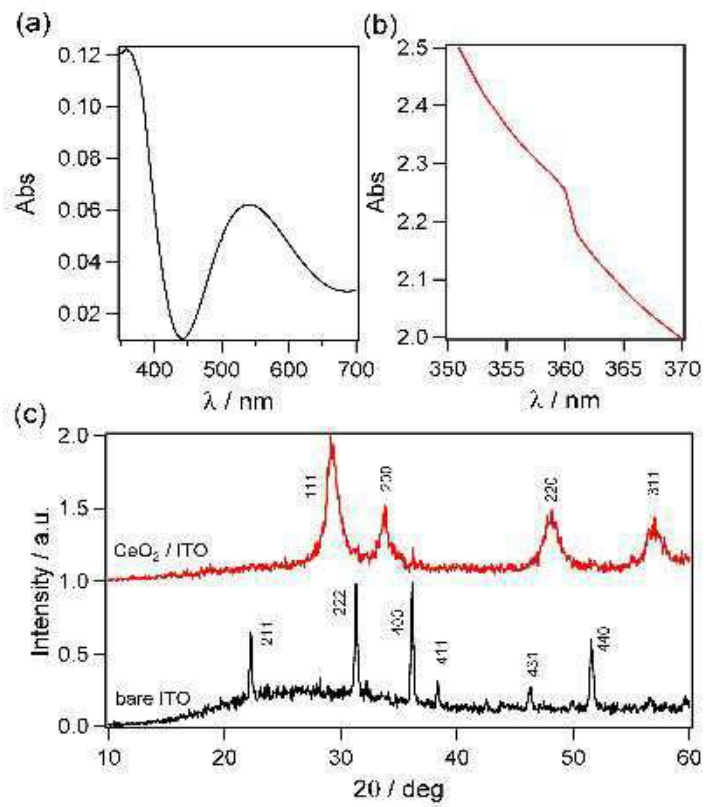
도면1



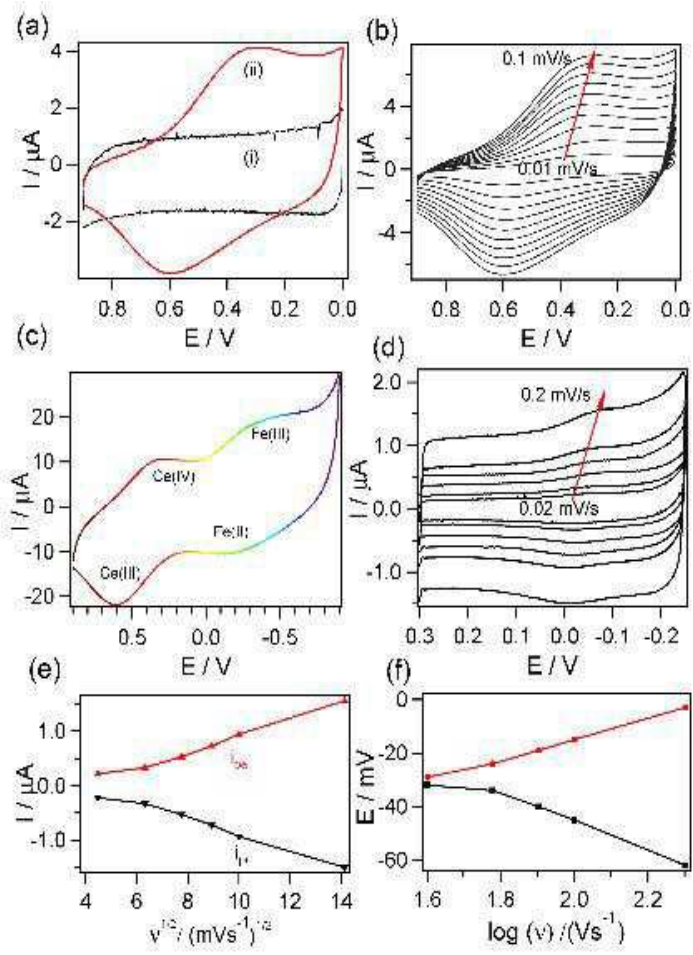
도면2



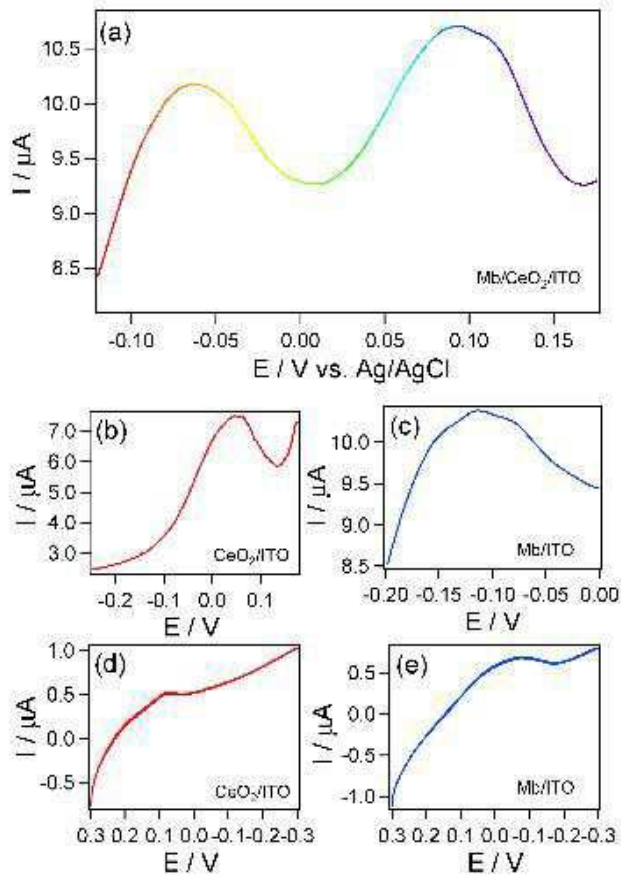
도면3



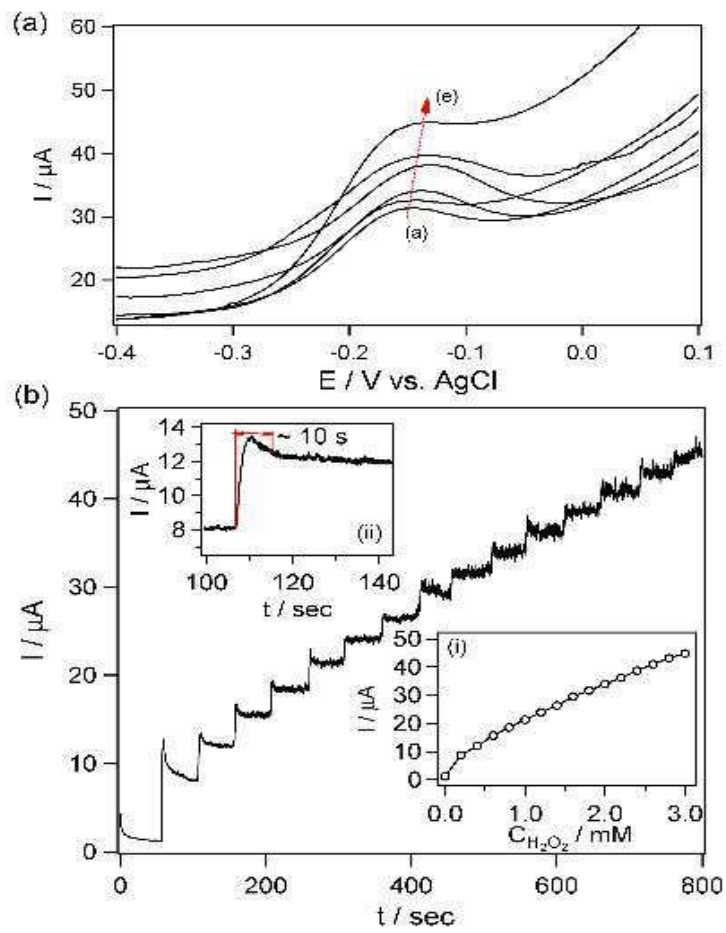
도면4



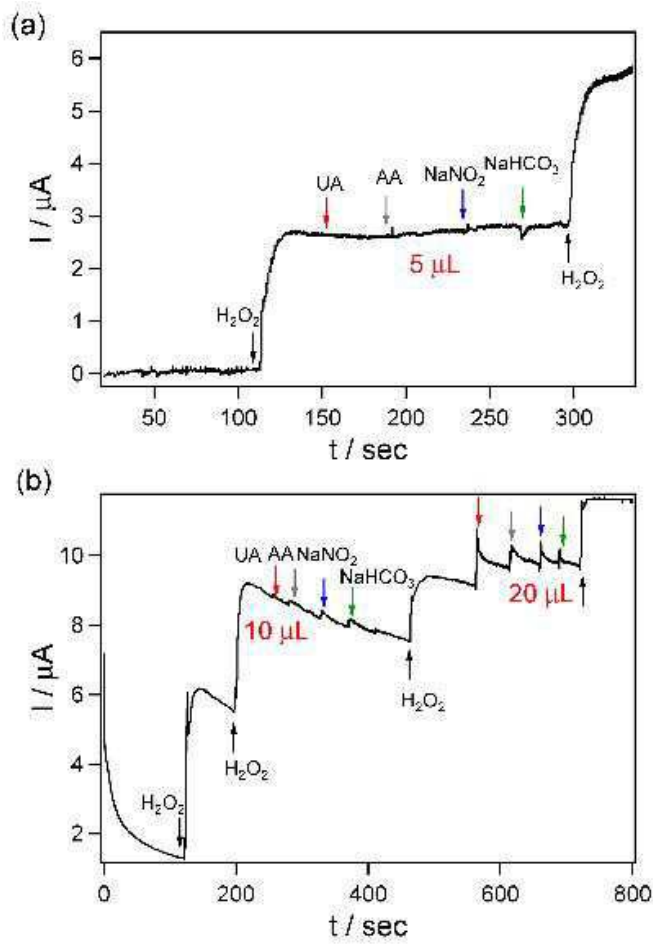
도면5



도면6



도면7



도면8

