

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
G01N 27/31

(11) 공개번호 특2001-0036848

(43) 공개일자 2001년05월07일

(21) 출원번호	10-1999-0044034
(22) 출원일자	1999년10월12일
(71) 출원인	주식회사 수일개발 염윤희 서울특별시 동작구 흑석1동 111-1최수봉 서울특별시 서초구 반포2동 1-1 신반포한신아파트 3지구 32동205호 김희찬 서울특별시 종로구 연건동 28번지 서울대학교부속병원 의공학과 정택동
(72) 발명자	서울특별시동작구사당동신동아아파트408-404 정택동 서울특별시동작구사당동신동아아파트408-404 정란아 강원도동해시천곡동28-7신흥타워맨션시동201 김희찬 서울특별시강동구명일2동44번지신동아아파트8-1201
(74) 대리인	최종식, 박해천, 박정후, 정지원, 원석희

심사청구 : 있음

(54) 바이오 센서용 감응막 및 그의 제조방법

요약

1. 청구범위에 기재된 발명이 속한 기술분야

바이오 센서용 감응막 및 그의 제조방법

2. 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제

본 발명은 전기 화학적 고분자중합법을 이용하여 미소하면서도 균일한 두께와 원하는 물성을 갖는 내부막을 간단하고 재현성 있게 형성하고, 또 해당 효소를 신뢰성 있게 고정시킴으로써 고감도를 유지하면서 짧은 시간 안에 안정한 바탕 신호를 얻을 수 있는 바이오 센서용 감응막 및 그의 대량 제조 방법을 제공함에 그 목적이 있다.

3. 발명의 해결방법의 요지

본 발명은 테프론 외피로 감싸여진 전극의 일부분 상에 적층되며 선택적 투과성을 갖는 방향족 유도체 내부막; 상기 방향족 유도체 내부막 상에 적층되며 외부의 분석 대상물질과 화학반응을 일으켜 과산화수소를 생성하기 위한 효소가 방향족 유도 단량체들의 중합 반응에 의해 형성되는 고분자 내부에 부동화됨으로써 이루어진 효소 고정층; 및 상기 효소 고정층 상에 적층되며 내부막과 효소 고정층을 보호하고 생체 적합성을 증진시키며 외부 방해 물질들의 영향을 최소화하고 효소의 화학반응에 의해 생성된 과산화수소가 내부막 이외의 다른 부분으로 확산하는 것을 차단하기 위한 불소치환 탄소사슬을 가진 고분자 외부막을 포함하는 감응막을 제공한다.

또한, 본 발명은 전극을 소정의 방향족 유도체와 염화수소 및 전해질이 용해된 수용액에 함침시키는 제1 단계; 상기 수용액상에서 전극표면에 전기화학적 중합반응을 일으켜 과산화수소에 대한 선택적인 투과성을 가지는 소정 두께의 방향족 유도체 내부막을 형성하는 제2 단계; 상기 방향족 유도체를 단량체로 하는 고분자 내부막이 형성된 전극을 효소와 방향족 유도체 및 전해질이 용해된 수용액에 함침시키는 제3 단계; 상기 수용액상에서 방향족 유도체를 단량체로 하는 고분자 내부막 표면에 전기화학적 중합반응을 일으켜 상기 내부막 상에 효소층을 형성하는 제4 단계; 불소치환 탄소사슬을 가진 고분자가 분산된 수용액을 희석한 용액에 내부막 및 효소층이 순차적으로 적층된 전극을 함침시킨 후 말림으로써 외부막을 형성하는 제5 단계를 포함하는 감응막 제조방법을 제공한다.

4. 발명의 중요한 용도

본 발명은 바이오 센서에 사용되는 감응막을 전기화학적 고분자중합법으로 제조함으로써 두께가 얇고, 균일하면서 원하는 물성을 가진 막을 형성할 수 있는 것임.

대표도

도2

색인어

바이오센서, 감응막, 효소층, 방향족 유도체

명세서

도면의 간단한 설명

도1은 일반적인 테프론이 코팅된 금속선을 이용한 당센서의 구성도.

도2는 종래기술에 따른 혈당센서의 요부인 감응막의 구성도.

도3은 본 발명에 의한 바이오센서용 감응막의 일 실시예를 나타낸 구성도.

도4는 내부막과 효소층 형성을 위한 전기화학적 고분자 합성에 쓰이는 단량체(monomer)의 화학구조도.

도5는 수용액에 담긴 전극 위에서의 단량체의 전기화학적 산화와 고분자화의 순환전압전류를 나타낸 그래프도.

도6은 전기화학적 고분자 합성에 따른 전극 상의 질량 증가 곡선을 나타낸 그래프도.

도7은 내부막이 입혀진 전극 위에서의 전기화학적 산화 및 중합을 보여주는 순환전압전류를 나타낸 그래프도.

도8a 및 도8b는 외부막으로서 PTFE의 영향을 보여주는 농도 변화에 대한 센서로부터의 전류 신호 감응 추이를 나타낸 그래프도

도9는 외부막까지 모두 입혀진 감응막의 당에 대한 검정 곡선을 나타낸 그래프도.

도10은 당에 대한 감응도의 히스테리시스(hysteresis)를 나타낸 그래프도.

도11은 당에 대한 감응도의 연속 반복 측정 결과를 나타낸 그래프도.

* 도면의 주요 부분에 대한 세부 명칭 설명

1 : 전극

2 : 고분자 내부막

3 : 효소고정층

4 : 당산화효소

5 : 불소치환 탄소사슬을 갖는 외부막

6 : 내부막이 없는 백금-이리듐 전극으로 얻은 순환전압전류도

7 : 내부막으로 5-amino-1-naphthol을 중합시킨 고분자 막이 입혀진 백금-이리듐 전극으로 첫번째로 주사하여 얻은 순환전압전류도.

8 : 내부막으로 5-amino-1-naphthol을 중합시킨 고분자 막이 입혀진 백금-이리듐 전극으로 두번째로 주사하여 얻은 순환전압전류도.

9 : 내부막으로 5-amino-1-naphthol을 중합시킨 고분자 막이 입혀진 백금-이리듐 전극으로 세번째로 주사하여 얻은 순환전압전류도.

10 : 용액 중 과산화수소의 농도가 1mM이 되도록 했을 때 센서로부터의 전류 신호 변화

11 : 용액 중 과산화수소의 농도가 3mM이 되도록 했을 때 센서로부터의 전류 신호 변화

12 : 용액 중 과산화수소의 농도가 6mM이 되도록 했을 때 센서로부터의 전류 신호 변화

13 : 체내에 존재 가능한 최대 농도가 되도록 아스코르브산(ascorbic acid)을 첨가했을 때 센서로부터의 전류 신호 변화

14 : 체내에 존재 가능한 최대 농도가 되도록 아세트아미노펜(acetaminophen)을 첨가했을 때 센서로부터의 전류 신호 변화

15 : 1-9 mM 사이의 포도당 농도에서의 직선

16 : 0-30 mM 사이의 포도당 농도 영역에서 농도를 증가시키면서 얻은 센서로부터의 전류 신호 변화(원형 표식)

17 : 0-30mM 사이의 포도당 농도 영역에서 농도를 감소시키면서 얻은 센서로부터의 전류 신호 변화(삼각형 표식)

18 : 포도당 농도가 정상인 혈당치의 최저선인 4 mM 일때의 전류 신호

19 : 포도당 농도가 정상인 혈당치의 최대선인 7 mM 일때의 전류 신호

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 분석 대상 물질의 농도를 측정하기 위한 바이오센서용 감응막 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 특히 분석 대상 물질의 농도를 임의의 시료 속에서 1회 또는 2회 이상 단속적으로 측정하거나 생체내, 외의 환경에서 연속적으로 모니터링이 가능한 바이오센서용 감응막 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

바이오센서는 생체 물질이 전자 측정기와 유기적으로 결합되어 임의의 시료 내의 화학적 정보를 쉽게 처리 가능한 전기적인 신호로 바꾸어 주는 센서로 정의된다. 복잡한 화학적, 생물학적 처리 과정이 없이 실시간으로 원하는 화학종의 정량적 정보를 매우 선택적으로 얻을 수 있다는 장점 때문에 널리 개발되고 있다. 그래서, 의료용으로 혈당 및 각종 생리활성물질들을 측정하거나, 지질 또는 식품의 제조과정에서의 알코올이나, 유기산, 어육의 선도 등을 측정하기 위한 바이오센서가 다수 개시되어 있다. 이러한 바이오센서들은 생체 물질로서 특정한 분석대상물질과 반응하는 효소나 항체 등을 채택하여 이들을 제한된 부위에 부동화(immobilization)시킨 감응막에 의하여 분석대상물질의 농도를 측정한다. 그런데 다른 종류의 센서들과는 달리 생체 물질을 부동화시켜야 하기 때문에 생체 물질의 활성이 감응막 제조 과정에 크게 의존하며 동일한 제조 방법을 적용하더라도 계량하기 어려운 미소한 제작 환경 상의 차이에 따라 성능상 편차가 극심하다. 따라서, 상기 성능 상의 편차가 적고 제작 조건이 명료하며 과정이 간단한 감응막 제조법의 개발은 대량 생산을 통한 바이오센서의 상용화에 가장 핵심적인 문제이다.

한편, 분석대상물질의 농도를 측정하기 위한 바이오센서는 도1에 도시한 바와 같이 전극(101)과, 상기 전극(101)의 외주면에 피복된 테프론(104)과, 상기 테프론(104)의 소정 부분이 제거된 부위에 도포되는 감응막(103)과, 상기 테프론(104)의 일단부에 도포되어 전류의 흐름을 차단하기 위한 차단막(102)으로 구성되어 있으며 상기 전극(101)은 외부의 정전위 전류 측정기와 연결된 구조로 되어 있다. 여기서, 상기 감응막(103)은 혈당의 농도를 측정하기 위해 적용된 경우, 포도당과 화학반응을 일으켜 과산화수소를 발생되도록 하기 위해 주로 당산화효소를 주 매개체로 이용하여 제조되고 있다. 그리고, 상기 차단막(102)은 에폭시수지나 실리콘고무를 이용하여 테프론(4)의 단부를 차단하여 용액과 테프론이 벗겨진 금속 전극과의 접촉이 오직 전극 감응막(103)을 통해서만 이루어지도록 함으로써 전극의 균일성과 재현성을 확보한다.

상기와 같이 구성된 바이오센서의 동작 과정을 간략히 살펴보면 다음과 같다.

먼저, 분석대상물질에 감응막(103)이 형성된 부위를 시료 용액에 함침시키고 일정 전위차를 전극(101)에 걸어주면, 상기 감응막(103)은 분석대상 물질과 화학반응을 일으켜 과산화수소를 생성시킨다. 그리고, 상기 과산화수소는 전극(101)에 걸어진 전위차로 인해 산화되면서 전류를 발생시키며, 전극(101)을 통하여 외부 전류측정기에 인가된다. 상기 외부 전류측정기로 인가된 전류의 크기를 측정하여 분석대상물질의 농도를 얻는다.

상기와 같이 구성되어 작용하는 바이오센서에서 농도측정에 결정적인 요인으로 작용하는 당 감응막의 구조는 도2에 도시한 바와 같이 크게 셀룰로오스 계열 고분자나 내피온 계열 고분자로 이루어진 내부막(201)과, 고분자나 글루타르 알데하이드를 매개로 연결된 효소로 이루어진 효소 부동화층(202) 및 내피온 계열이나 폴리우레탄계열 고분자로 이루어진 외부막(203)이 순차적으로 적층된 3층구조로 이루어져 있으며, 이 3층 구조에서 내부막(201)이나 외부막(203)은 필요에 따라 생략되기도 한다. 일례로, 일회용 혈당 센서의 경우에는 내부막이 생략되고 대신 효소층(202)에 전자전달체(electron mediator)를 삽입하여 걸어주는 전위차를 작게 하기도 한다.

상기와 같은 구조를 갖는 종래의 당 감응막의 제작 방법을 혈당 센서를 예로 하여 보이면 다음과 같다.

도3에 도시한 바와 같이 전자전달체를 사용하지 않는 경우의 내부막(201)은 셀룰로오스(cellulose) 계열 고분자나, 내피온(Nafion) 계열 고분자를 사용하며, 이들은 물에 녹지 않는 고분자들이기 때문에 휘발성 용매에 녹인 후, 전극(101)을 담갔다가 꺼내 말림으로써 내부막(201)을 전극(101)상에 도포하게 된다. 그리고, 효소부동화층(202)은 연결 물질(crosslinker)을 사용하여 효소들간을 연결함으로써 효소를 고정시키거나, 단순히 고분자 물질과 혼합되도록 효소 용액에 담갔다가 꺼내 말림으로써, 상기 내부막(201)상에 형성된다. 이때, 상기 내부막(201)의 형성을 생략하고 바로 전극(101) 표면에 효소를 흡착하여 부동화시킬 수도 있다. 이 경우에는, 상기 효소부동화층(202)에 포함되어 있는 당산화효소들 사이에 매질이 없게 하거나 연결 물질들만 있을 수도 있다. 상기 효소부동화층(202)의 형성방법은 효소의 실제 용액상의 농도, 전극 표면 상태, 온도, 연결 물질과의 반응 시간 등 다양한 조건에 민감하므로, 효소가 표면에 부동화되는 양이나 부동화된 후 활성을 지닌 효소의 양을 조절하기가 어렵다.

상기 외부막(203)으로는 내피온 계열이나 폴리우레탄(polyurethane) 계열 고분자 등 다양한 물질들이 쓰인다. 의료용 혈당 센서로 활용되는 경우에는 산소 농도에 대한 의존성을 최소화해야 하고 생체적합성 고분자로서의 조건을 갖추어야 하기 때문에 매우 소수성(hydrophobicity)이 강한 고분자들이 선택되고 따라서 휘발성이 강한 유기 용매를 쓸 수 밖에 없다.

전술한 종래의 당산화막 제조 방법은 대부분이 내부막, 효소층, 외부막에 이르기까지 모두 담갔다가 꺼내서 말리는 함침 후 건조법(dipping and drying method or solvent casting method)에 의존하고 있으며 어느 한 공정 단계 이상은 반드시 수용액이 아닌 유기 용매를 사용해야 한다.

또한, 상기 내부막의 제조방법으로 전기화학적 고분자 중합법을 사용한 예가 알려져 있으나, 이 역시 효소 부동화 단계는 함침 및 건조과정으로 되어 있다. 따라서, 상기 전극상에 도포되는 효소부동화층은 균일한 증착이 이루어지지 않게 되기 때문에 센서의 감도가 불규칙한 문제점이 있다.

한편, 상기 당산화효소를 고정시키는 과정에서, 피롤(pyrrrole) 등과 같은 단량체들과 효소를 미리 일련의 화학 반응을 통해 직접 결합시키거나 폴리에틸렌옥사이드(polyethylene)와 같은 다른 고분자에 효소를 연결시킨 후에 상기 단량체들을 전기화학적으로 중합시킴으로써 수용액 상에서 부동화시킨 예들이 보고되어 있다. 이러한 관련자료로서 효소와 단량체를 미리 화학적으로 연결하여 전기화학적 고분자 중합법으로 고

정하는 방법이 『B. F. Y. Yon-Hin, M. Smolander, T. Crompton and C. R. Lowe, " Covalent electropolymerization of glucose oxidase in polypyrrole. Evaluation of methods of pyrrole attachment to glucose oxidase on the performance of electropolymerized glucose sensors" Analytical Chemistry, 1993, 65, 2067.』의 논문에서 보고되어 있으며, 또한 선행관련 특허로서는 3중 막 구조에 관한 미국특허 제5,773,270호와, 방향족 유도체를 단량체로 하는 고분자 내부막을 사용한 구조의 미국특허 제5,286,364호가 개시되어 있다.

그러나, 이 방법들은 효소층의 두께가 불필요하게 두꺼워짐으로써 포도당에 대한 감응 신호가 안정화되는데 많은 시간이 소요되며, 효소와 고분자간의 연결을 위한 합성 과정이 부가적으로 필요하므로 대량 생산에 적합치 않다. 아울러, 이 경우에도 물에 녹지 않는 소수성 고분자 외부막의 도포는 불가피하므로 종래의 합침 후 건조 방법의 문제점으로부터 자유로울 수 없다.

종래의 당 감응막 제조방법이 야기시키는 문제점들을 종합해 보면 다음과 같다.

첫째, 휘발성 용매에 담갔다 말리는 합침 및 건조공정의 연속으로 재현성이 좋지 못하여 동일한 제작 방법을 적용해도 최종 성능상의 편차가 심하다.

둘째, 막을 건조하는 과정이 반드시 필요하며, 건조과정에서 감응막내의 잔류 용매분자들을 제거해야 하므로 제작 시간에 오래 걸리고, 내부막의 제조시에는 물에 녹지 않는 셀룰로오스(cellulose) 계열 고분자나, 내피온(Nafion) 계열 고분자를 사용하기 때문에 대량 생산의 경우 휘발성 오염 물질의 배출이 심하여, 이를 처리하기 위한 부대 장비가 필요한 문제점이 있다.

셋째, 단순한 변수들만의 조절로는 제작 상의 조건을 수정하기 어려우므로, 단일 생산 장비로 여러 가지 목적의 센서를 제작할 수 없고, 불량품이 나올 경우 제작 조건을 수정하기가 용이하지 않다.

넷째, 센서의 크기가 작아지는 경우, 전극 부위에만 감응막 자체를 형성시키기가 어려워서 소형 집적 바이오센서(miniaturized integrated biosensor) 제작에 적용이 어렵다.

다섯째, 감응 시간이 오래 걸리며, 특히 치료나 생리 조절의 보조 수단으로 인체에 이식 또는 온라인으로 적용할 경우, 생리학적 요구시간을 초과하기 때문에 효과가 떨어진다.

여섯째, 내부막이 두꺼워지기 쉽고 내부막이나 효소층의 두께와 기타 성질들을 재현성있게 통제할 수 있는 제작 조건을 객관적으로 규정하기 어렵다.

일곱째, 이상의 문제점들에 대한 일부 해결이 가능한 제작 방법들은 특수한 화학적/생물학적 합성 및 처리를 별도로 필요로 하거나 제작 과정이 복잡해진다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명은 상기의 제반 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 전기화학적 고분자 중합법을 이용하여 얇고 균일한 두께와 원하는 물성을 갖는 내부막을 형성하고, 또 해당 생체 물질을 신뢰성있게 고정시킴으로써 고감도를 유지하면서 짧은 시간 안에 안정한 바탕신호를 얻을 수 있는 바이오 센서용 감응막 및 그의 제조 방법을 제공함에 그 목적이 있다.

또한, 본 발명은 제작 조건의 원활한 수정으로 센서 성능의 변화폭을 객관적인 변수로 재현성있게 조절할 수 있으며 동일한 생산장비로 여러 목적의 센서를 대량생산할 수 있는 바이오센서용 감응막 및 그의 제조 방법을 제공함에 다른 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 테프론 외피로 덮인 전극 중 외피가 벗겨져 노출된 전극 표면 위에 적층되며 선택적 투과성을 갖는 방향족 유도체를 단량체로 한 고분자 내부막; 상기 고분자 내부막 상에 적층되며 외부의 분석대상물질과 화학반응을 일으켜 전기화학적으로 검출 가능한 물질을 생성하기 위한 효소와 방향족 유도체를 단량체로 한 고분자 매질로 이루어진 효소 고정층; 및 상기 효소고정층상에 적층되며 그의 화학반응에 의해 생성된 전기화학적으로 검출 가능한 물질이 내부막 이외의 다른 부분으로 확산하는 것을 차단하고 외부로부터의 방해 물질의 투과를 방지하며 센서의 생체적합성을 증대시켜 내부막과 효소 고정층을 보호하기 위한 불소치환 탄소사슬을 가진 고분자 외부막을 포함하는 감응막을 제공한다.

또한, 본 발명은 전극을 소정의 방향족 유도체와 염화수소가 용해된 수용액에 함침시키는 제1 단계; 상기 수용액상에서 전극표면에 전기화학적 중합반응을 일으켜 과산화수소에 대한 선택적인 투과성을 가지는 소정 두께의 방향족 유도체를 단량체로 하는 고분자 내부막을 형성하는 제2 단계; 상기 방향족 유도체 내부막이 형성된 전극을 효소와 방향족 유도체가 용해된 수용액에 함침시키는 제3 단계; 상기 수용액상에서 방향족 유도체를 단량체로 하는 고분자 내부막 표면에 전기화학적 중합반응을 일으켜 상기 내부막상에 효소층을 형성하는 제4 단계; 및 불소치환 탄소사슬을 가진 고분자가 물속에 분산된 상태의 시약을 희석한 용액에 내부막 및 효소층이 순차적으로 적층된 전극을 투입시켜 외부막을 형성하는 제5 단계를 포함하는 감응막 제조방법을 제공한다.

이하, 첨부된 도3 이하의 도면을 참조하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명에 의한 방법은 간단한 전기화학적 고분자 중합법을 이용하여 바이오센서용 감응막을 전극 상에 형성할 수 있도록 하되, 얇고 균일한 두께를 가지면서 원하는 물성을 갖도록 구현한 것이다.

본 발명에 의한 감응막은 혈당을 측정하기 위한 당산화효소(glucose oxidase, GOD)의 전기화학적 변화 원리를 이용한 것이며, 이는 당산화효소가 포도당(β -D-glucose)을 만나면 매우 선택적으로 아래 과정과 같은 화학 반응을 일으키는 촉매 역할을 하기 때문에 가능하다.

$GODox + glucose \rightarrow GODred + gluco lactone$

$GODred + O_2 + 2H^+ \rightarrow GODox + H_2O_2$

$gluco lactone + H_2O \rightarrow gluconic acid$

이때, 생물로 발생하는 과산화수소는 전극에 적절한 과전압을 걸면 산화를 일으키므로 그때 흐르는 전류를 측정하면 포도당의 농도를 예측할 수 있다. 과산화수소의 산화를 일으키기 위해 걸어주는 과전압 상태에서 체내 여러가지 생리활성물질들도 산화될 수 있기 때문에, 과전압을 낮추기 위해 전자 전달체 (electron mediator)를 사용하기도 하지만, 본 실시예에서는 과산화수소를 직접 측정하는 방식을 취했다. 이것은 생리활성방해물질들의 방해 효과를 피하기 위해 첨가하는 전자전달체가 오랜 시간동안 안정하지 않고, 파괴되므로 일정한 강도를 장시간 유지하기 어려울 뿐만 아니라, 혈당 센서를 체내에 이식하여 사용할 경우 감염막 밖으로 유출되어 독성 물질로 작용할 우려가 있기 때문이다.

상기와 같은 전기화학적 변환원리를 이용한 본 발명의 감응막의 구성을 도3을 참조하여 설명한다.

도면에 도시한 바와 같이, 테프론 외피로 감싸여지는 전극(1)의 일부분상에 적층되며 효소와 포도당의 화학반응에 의해 발생된 과산화수소를 투과시키기 위한 방향족 유도체 내부막(2)과, 상기 방향족 유도체 내부막(2)상에 적층되며 외부의 포도당과 화학반응을 일으켜 과산화수소를 생성하기 위한 당산화효소(4)가 방향족 유도 단량체들의 중합 반응에 의해 형성되는 고분자 내부에 부동화됨으로써 이루어진 효소고정층(3)과, 상기 효소 고정층(3) 상에 적층되며 내부막(1)과 효소 고정층(3)을 보호하고 생체 적합성을 증진시키며 외부 방해 물질들의 영향을 최소화하고 효소의 화학반응에 의해 생성된 과산화수소가 내부막 이외의 다른 부분으로 확산하는 것을 차단하기 위한 불소치환 탄소사슬을 가진 고분자 외부막(5)으로 구성된다.

여기서, 상기 방향족 유도체 내부막(2)은 5-아미노-1-나프톨(5-amino-1-naphthol; 5A1N)으로 이루어져 있으며, 전기화학적 고분자 중합법으로 전극표면상에 형성된 구조로 되어 있다. 이때, 상기 5-아미노-1-나프톨 대신에 1,3-아미노-1-디아미노나프탈렌이나, 1,5-아미노-1-디아미노나프탈렌을 이용할 수도 있다.

상기 효소 고정층(3)은 1,3-디아미노벤젠(1,3-diaminobenzene)의 전기화학적 중합 과정에서 용액 중의 효소가 고분자 그물에 잡히는(entrapment) 현상을 이용하여 효소를 부동화시킨 층이며, 상기 내부막상에 적층, 고정시킨 구조로 되어 있다. 이때, 상기 1,3-디아미노벤젠 대신에 1,2-디아미노벤젠이나, 1,4-디아미노벤젠을 써서 비슷한 물성을 가지는 효소 고정층을 형성시킬 수도 있다.

여기서, 상기 내부막(2)과 효소고정층(3)은 벤젠계열이나 나프탈렌 계열의 여러가지 방향족 유도체를 전기화학적 고분자 중합을 위한 단량체로 사용한 것으로서, 전기화학적 방법에 의해 중합이 되면 두께가 얇고 소수성이 큰 고분자막을 전극 위에 형성시킨다.

상기 불소치환 탄소사슬을 가진 고분자 외부막(5)은 폴리테트라 플루오르화 에틸렌(PTFE; per fluorinated tetrafluoro ethylene)으로 구성되며, 60%농도의 상기 PTFE를 30~40%로 희석시킨 용액에 전극을 침식시키고 건조시키는 과정을 반복하여 형성한 구조로 되어 있는데, 두껍고 소수성이 크며 밀도가 충분히 큰 구조를 갖는다.

상기와 같이 3겹 이상의 상이한 고분자막으로 구성된 본 발명의 감응막 제조방법을 설명하면 다음과 같다.

상기 감응막을 전극에 형성시키기 전에, 상기 백금/이리듐(9/1) 합금전극의 표면에 불순물이 존재하지 않도록 처리한다. 본 실시예에서의 전극 표면처리는 먼저, 테플론(Teflon, polytetrafluoroethylene)으로 코팅된 백금/이리듐(9/1) 합금선의 테플론 표피를 5 mm 가량 벗기고 끝을 에폭시 수지(epoxy resin) 막아 금속 표면이 드러난 원기둥 부분을 전극으로 사용한다. 그리고, 상기 에폭시 수지가 충분히 경화된 다음 아세톤과 물로 전극 부위를 차례로 씻어 건조한 후, 준비된 전극을 황산용액 속에서 Ag/AgCl(in 3 몰농도 염화칼륨, 3 M KCl)의 기준전극에 대하여 1.6 V의 전위차를 30초간 걸어 표면을 산화시킨다. 다음에, -0.2 V ~ +1.2 V 사이를 100 mV/sec의 주사 속도로 25회 순환시켜 표면을 처리하였다.

상기와 같이 불순물이 처리된 전극의 표면에 감응막이 형성되는데, 이때, 감응막은 기본적으로 3겹의 서로 다른 고분자막이 적층되며, 필요에 따라 최외곽에 추가로 막을 입힐 수도 있다.

여기서, 하기의 감응막 제조방법은 최적의 고분자를 사용하여 제조한 예를 설명하고 있다.

먼저, 상기 전극을 5 밀리몰농도의 5-amino-1-naphthol(5 mM 5A1N)과 1몰농도 염화수소(1 M HCl)가 용해되어 있는 방향족 유도체 수용액(12시간 이상 저어주어 완전히 녹임)에 담근 후, 기준 전극(Ag/AgCl in 3 M KCl)에 대하여 +0.55 V ~ +0.7 V 사이의 일정 전위차를 걸어 200초 ~ 3000초 동안 전기적 중합 반응을 일으키게 함으로써 소정의 두께를 갖는 내부막을 형성한다.

상기 내부막 두께는 20 nm ~ 50 nm로 하는 것이 바람직하다. 이는 상기 내부막의 두께가 20 nm이하일 경우에는 선택성이 불량하여 방해물질의 효과가 커지며, 상기 두께가 50 nm이상일 경우에는 더 이상 두께워지기도 어렵고, 과산화수소 투과율이 낮아지고 제작소요시간만 늘어나는 등 단점이 더 많아진다.

상기와 같이 전극표면상에 형성된 내부막은 효소에 의해 발생된 과산화수소를 전극 방향으로 잘 통과시키며, 얇으면서도 과산화수소에 대한 선택적인 투과성을 가져야만 한다. 이러한 조건을 만족시키기 위해서는 가능한한 조밀해야 하고 소수성이 강해야 하며, 의료용으로 활용될 경우에는 생리액 속에서 안정해야 하고 효소에 대한 친화도가 높아야 한다. 또한, 상기 내부막 위에 후술될 효소층을 형성시키는 과정까지도 전기화학적 고분자 중합으로 이루기 위해서는, 전기화학적 전기전도도가 지나치게 작아서는 안된다.

도4의 도시한 화학구조와 같이 -H, -NH₂, -OH, -SH, 또는 -COOH 등 여러 가지 치환기를 가진 벤젠이나 나프탈렌 계열 화합물, 또는 고리수가 그 이상인 방향족 분자들의 단량체들은 일정 정도 이상의 전위차가 전극에 걸리면 전극 표면에서 중합 반응이 시작되어 고분자 상태로 전극을 덮게 된다. 0.1 M NaCl + 5 mM 5-amino-1-naphthol(5A1N) + HCl(pH 1) 용액에 작업 전극으로서 백금-이리듐(9/1) 합금 선을 담근 채, 50

mV/sec의 주사속도로 전위차를 순차적으로 변화시켜 주면, 도5에 도시한 바와 같이 백금-이리듐(9/1 wt/wt.) 합금 전극 위에서 일정 전위차 이상에서 5A1N의 산화가 일어나면서 전류가 흐르게 되고, 이 과정에서 전기화학적인 중합 반응이 진행됨을 알 수 있다. 이 때, 순환전압전류법 대신 일정 전위차(예를 들면, +0.7 V vs. Ag/AgCl)을 유지시켜 전기적 중합을 일으키면, 전극 표면에 전기전도도가 작으므로 얇고 조밀한 막이 형성되며 일정 두께가 되면 자동적으로 중합 속도가 급격히 떨어져서 시간이 더 흐르더라도 두께 증가가 거의 없게 된다.

도6은 실험 조건이 상기 도5와 동일하되, 전위차는 +0.7 V vs Ag/AgCl 상태에서 전기화학 수정미세저울(electrochemical quartz microbalance)로 측정된 전기화학적 중합 반응 중의 질량 변화 추이를 나타낸 그래프도로서, 전위차를 건 후 불과 10초 이내에 대부분의 막이 입혀지고 그 뒤로는 질량의 증가가 현격히 둔화됨을 알 수 있다. 본 발명의 실험에서는 과산화수소에 대한 감도와 생리활성 방해 물질들의 투과도를 종합 평가하여 30분 정도의 중합시간을 선택하였고, 이 결과 전후 5분 가량의 오차가 있더라도 막의 성질에 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

따라서, 중합에 필요한 전위차와 시간만 정해 주면 일정 두께의 원하는 물성을 가진 내부막을 매우 재현성있게 얻을 수 있다. 이렇게 만들어진 막은 전자 현미경 사진과 타원편광측정법(ellipsometry)의 결과로 볼 때, 두께가 30 nm 이하로서 매우 얇다. 그 결과, 물 속에 존재하는 과산화수소 분자에 대한 감응 속도가 매우 빠르며, 감도도 높다. 이런 성질은 내부막 위에 최소 2겹 이상의 막이 추가되고, 각 막들의 상대적인 투과도가 센서의 감도에 중요한 영향을 미침을 감안할 때 주목할 만한 장점이다. 즉, 효소 층에서 발생된 과산화수소는 전극 방향 뿐만 아니라, 용액 방향으로도 확산되므로, 과산화수소에 대한 투과도가 낮은 고분자막이 효소층과 전극 사이의 내부막으로 사용되면 대부분의 과산화수소가 외부막을 통해 용액층으로 빠져나가게 됨으로써 전극에 도착하여 전류를 발생시키는 비율이 상대적으로 낮아져서 감도 저하를 초래하게 된다. 따라서, 내부막은 외부 방해물질에 대한 저항성을 위해 매우 조밀하면서도 과산화수소의 투과도가 외부막에 비해 상대적으로 높은 물성을 유지하는 한 얇을수록 좋다. 또한, 내부막과 외부막의 상대적인 투과도가 감도에 미치는 영향을 고려하면, 내/외부막의 두께와 조밀성 등이 얼마나 재현성있게 구현되느냐가 신뢰도 높은 성능을 내는 바이오센서의 대량 생산의 필수 요건이 된다.

상기한 바와 같이 전극(1)에 내부막(2)을 전기화학적으로 도포하는 공정이 완료되면, 상기 내부막(2)이 입혀진 전극(1)을 효소와 또다른 단량체인 1,3-디아미노벤젠(1,3-diaminobenzene)이 함께 용해되어 있는 방향족 유도체 수용액에 침적시키고, 기준 전극(Ag/AgCl in 3 M KCl)에 대하여 -0.2 V ~ +1.2 V 사이의 임의의 구간에서 3회 이상 전위차를 순환시켜(voltage cycling) 전기화학적 중합반응을 일으키게 함으로써 소정의 두께를 갖는 효소 고정층(3)을 형성한다. 본 실시예에서의 수용액은 수소이온농도(pH) 범위가 5-8인 완충 용액(buffer solution)을 사용한 예로 되어 있다.

여기서, 상기 효소 고정층(3)의 두께는 10 nm~50 nm로 하는 것이 바람직하다. 이는 상기 효소 고정층의 두께가 10 nm 이하일 경우에는 효소자체의 크기(직경 약 5-10 nm)로 인하여 충분한 양의 효소를 고정할 수 없으며, 상기 두께가 50nm이상일 경우에는 또 바탕신호 및 안정된 감응 신호에 도달하는데 시간이 오래 걸리고 효소 고정층의 균일성이 떨어지는 문제점이 발생한다.

도7은 실험조건이 0.1 M Na2HPO4 + 0.15 M NaCl + 5 mM 1,3-diaminobenzene (pH 7.4)이며, 기타 조건은 도5와 동일한 상태에서의 전기화학적 산화 및 중합을 보여주는 순환전압전류도이다. 본 도에서는 전기전도도가 낮은 내부막(2)이 입혀져 있음에도 불구하고 내부막이 없는 경우보다 단지 과전압을 더 걸어줌으로써 수용액 속에서 내부막 위에 또 다른 고분자막을 전기화학적 중합을 통해 추가로 형성시킬 수 있음을 보여주고 있다. 이때, 사용할 수 있는 단량체는 수용액 중에서 중합반응을 일으키기에 적당한 전기화학적 산화, 환원 전위를 보이며, 효소의 활성도에 크게 영향을 주지 않는 단량체들이 요구되고 있다. 도4에 도시된 물질들은 실험을 통해 검증된 것들이다. 일례로, 1,3-디아미노벤젠을 중합시키면 방해물질에 대한 높은 선택성을 포함한 이상적인 막 성질을 보인다.

상기한 바와 같이 효소층을 형성함에 있어서, 단량체, 효소의 농도 및 걸어주는 전압의 크기 및 방법에 따라 포도당에 대한 감응 및 선택도는 다소 달라지는데, 용도에 따라 최적화가 가능하다. 이 방법은 단순히 효소와 단량체를 전해질 용액에 녹인 후 전위차만 걸어주면 효소고정층을 형성할 수 있으므로, 현재까지 게시되어 있는 어떤 효소 고정방법보다 간편하면서도 재현성이 높다.

상기 효소고정층의 제작 방법의 다른 실시예를 설명하면 다음과 같다.

전기적으로 전도도가 낮은 고분자막에 의한 효소 공정이 이루어지므로, 효소층의 두께가 수십 nm(본 실시예에서는 10nm~50nm)에 불과하다. 그러므로, 고정되는 효소의 양을 증가시킬 필요가 있을 수 있는데, 이 때 효소와 효소 간이나 고분자와 효소 간을 연결하는 연결체(crosslinker)를 쓸 수 있다. 즉, 상기 효소와 고분자 단량체가 섞인 용액에 상기 수용성 연결체를 더 용해시켜 여러 개의 효소들 사이를 연결하거나, 연결체와 함께 아민 기(amine group) 등을 가진 수용성 고분자를 첨가하여 효소와 수용성 고분자와의 결합을 유도한 후 전기화학적 중합법을 이용하여 효소를 고정한다.

상기 연결체는 역시 물에 녹고 효소의 일정 부위와 화학 결합을 자발적으로 만들어 연결체의 길이만큼 효소들 간의 간격을 떨어뜨리면서 효소들을 여러 개씩 묶어두는 역할을 한다. 효소 고정을 위해 효소와 연결체, 그리고 단량체가 함께 녹아있는 중성 용액 속에서 고분자 중합을 일으키면 하나의 효소만 잡혀도 거기에 묶인 다른 여러 개의 효소들까지 고분자 층에 걸려들게 된다. 그리고, 효소 친화도가 높은 외부막으로 덮으면 보다 많은 양의 효소가 전극 위에 고정되어, 감도 및 장기간 사용에 기여할 수 있다. 이를 위한 연결체로서는 글루타르 알데하이드(glutaraldehyde)등이 있으며, 이와 같은 목적으로 사용할 경우 효소 농도의 5-10 배 정도의 연결체 농도가 유용하다. 이 방법은 종래의 감응막 제조 방법 중에서, 미리 화학적인 처리에 의해 고분자 사슬에 여러 개의 효소를 미리 결합시키고 그것을 고분자 중합에 의해 전극에 고정시키는 방법보다 훨씬 간단하며, 재현성이 높고, 비용을 줄일 수 있는 방법이다.

수용성 고분자를 연결체와 함께 첨가하는 방법도 종래의 개념과 비슷하지만 수용액 속에서 빠른 시간 내에 자발적으로 결합되는 반응을 이용하고, 아민기를 다량 가진 고분자를 이용함으로써 효소 고정 과정을 수용액속에서 전기화학적 방법으로 구현하며 중성 pH에서 효소의 안정도를 증진시키는 효과를 거둘 수 있

다. 수용성 고분자로서는 폴리리신(polylysine)등이 적합하다.

한편, 효소고정층을 형성함에 있어서, 효소의 안정성을 증대시키기 위해 효소와 단량체가 용해된 수용액 속에 휴먼 세럼 알부민(HSA:human serum albumin) 및 보바인 세럼 알부민(BSA:bovine serum albumin)중 어느 하나를 효소와 함께 첨가하여 용해시킨후 전기화학적 중합법을 적용시켜 효소간을 고정할 수도 있다.

상기 내부막(2)상에 효소고정층(3)이 적층된 다음에는 그 위에 과산화수소의 외부 확산을 방지하면서 선택성이 양호한 외부막(5)이 도포된다.

상기 외부막(5)으로는 생체적합성이 뛰어나고 내구성이 있으면서 효소 활성도에 영향을 주지 않는 물질이 적합하다. 이를 위해서는, 소수성이 강한 고분자, 예를 들어 종래기술에 게시된 바와 같이 내피온 계열이나 폴리우레탄 계열의 고분자들을 이용하는 것이 공지되어 있지만, 그러한 물질들은 물에 녹지 않는 소수성이 강한 물질들이므로 일반적으로 극성이 작은 휘발성 용매를 써야만 한다. 또한, 대량 생산을 위한 최종 감도의 재현성 제고를 위해서는 내부막(2) 및 효소층(3)은 얇을수록 좋은 반면에, 외부막(5)은 감도의 희생을 최소화하는 범위 내에서 가능한한 두꺼워야 한다. 그러나, 효소고정층(3)이 형성된 전극(1)에 외부막(5)을 형성하기 위하여 소수성물질이 혼합된 휘발성 유기용액에 상기 전극을 함침 및 건조 공정의 수행시, 휘발성 용매 때문에 효소 활성도가 저하될 확률이 높고, 센서 제작 시간에 따라 급격히 농도가 변함으로 인하여 필요한 수준의 재현성을 얻기가 어렵기 때문에 이를 개선할 방법이 요구되고 있다.

따라서, 본 발명에서는 상기 문제를 개선하기 위하여 폴리테트라 플루오르화 에틸렌(PTFE;poly(tetrafluoroethylene))을 물 속에 분산시킨 상태의 시약을 희석하여 함침과 건조과정을 반복함으로써 두께가 $1\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ 의 원하는 외부막을 얻는다.

여기서, 상기 PTFE는 알드리치(Aldrich)사를 비롯한 여러 시약 회사들에 의해 판매되고 있는데, 판매되고 있는 알드리치사의 시약은 60% 농도로 되어 있으므로 이를 30% - 40%로 희석한 후, 10초씩 5회정도로 함침하였다가 대기압이나 상기 대기압보다 낮은 기압 예를들어 10 mmHg 이하에서 약 2 시간 가량 건조시켜 형성한다.

본 실시예에서는 외부막 제조 시, 상기 PTFE를 물속에 분산시킨 시약을 희석한 용액에 전극을 함침 및 건조시키는 과정으로 외부막을 형성한 예를 제시하고 있으나, 이밖에도 Kel-F와 같은 불소화 탄소 사슬로 이루어진 기름 상태의 고분자와 희석된 시약용액을 교대로 입히거나, 화학기상증착(chemical vapor deposition)을 통하여 비슷한 성능을 가진 외부막을 얻을 수도 있다.

도8a 및 도8b는 본 발명에 의해 제조된 외부막이 센서에 도포된 경우와, 상기 센서에 외부막이 배제된 경우의 감응 실험결과이다. 특히, 본 도에서는 생리식염수에서의 포도당에 대한 감응과 대표적인 방해물질인 아스코르브산(ascorbic acid)과 아세트아미노펜(acetaminophen)에 대한 방해 효과를 보여주고 있다. 도8a의 센서에 외부막이 존재하지 않은 경우의 감응변화를 나타낸 것으로, 10, 11, 12는 1 밀리 몰농도(mM), 3mM, 6mM의 과산화수소 용액이 순차적으로 용해되도록 했을 때의 센서로부터의 전류신호변화를 보여주며, 도시한 바와 같이 상기 과산화수소의 양을 증가시켜도 전류신호의 변화 폭은 크지 않음을 알 수 있다. 13, 14로 지시된 바와 같이 체내에 존재 가능한 최대농도가 되도록 아스코르브산이나 아세트 아미노펜을 첨가했을 경우에도 12로 지시된 6mM의 과산화수소 용액에서의 신호와 비교하여, 변화가 거의 없음을 알 수 있다.

반면에, 도8b는 센서에 외부막이 존재한 경우의 감응변화를 나타낸 것으로, 지시번호 10, 11, 12에 나타낸 바와 같이 과산화수소의 양을 증가시킴에 따라 센서로부터의 전류 신호의 변화는 대폭 증가하며, 이때 지시번호 13, 14로 나타낸 아스코르브산과 아세트 아미노펜을 각각 첨가했을 경우는 12의 변화 폭과 차등이 없음을 알 수 있다. 따라서, 외부막의 존재는 없을 경우보다도 센서의 감도를 월등히 향상시켜 10 nA/mM/mm² 이상의 감도를 내게 한다.

또한, 센서의 효소층에 고정된 효소 활성도는 순수한 생리식염수에 존재하는 똑같은 종류의 당산화효소의 활성도와 비교하여 거의 차이가 없으며, 외부막을 증착시키지 않은 상태의 활성도와 비교하면 더 좋아짐을 실험결과를 통해 알 수 있었다. 즉, 도9에 도시한 바와 같이 0-30 mM 까지의 포도당 농도에 대해서 매우 민감한 감응을 보이는데, 특히 대부분 혈당치의 측정 범위인 1-9 mM 사이에서는 지극히 우수한 직선성(15)을 보여서 0.999 이상의 상관계수 값(R²)을 보인다. 바탕 전류는 30분 이내에 재현성있게 3.2 nA/mm² 까지 감소하여 안정화되고, 전극 면적으로 보정한 감도 값(> 5.3 nA/mM/mm²)을 보면 과거에 비슷한 목적으로 보고된 어떤 센서보다도 우월한 감도를 나타냄을 알 수 있다. 또한, 10 개의 센서를 같은 방법으로 제작하여 어느 것도 누락시키지 않고 성능을 조사하였을 때, 평균 감도 5.3 nA/mM/mm²로 부터 1.5 nA/mM/mm² 이상의 편차를 보이는 센서는 없었다.

한편, 용존 산소 분압의 영향을 보면, 외부막이 형성된 상태에서는 분압이 5 mmHg 까지 낮아지더라도 30% 이상 감도가 낮아지지 않는다. 이것은 전술한 바와 같이 내부막, 효소고정층 및 외부막을 적층시켜 제조한 센서가 체내의 혈당치에 관한 정보를 연속적으로 추출해낼 수 있도록 신체에 이식할 목적의 혈당 센서로서 적합함을 의미한다. 외부막으로 사용된 PTFE는 생체 적합성이 뛰어나 의료용 용구에 널리 사용되는 재료이며, 효소를 제외한 본 센서에 사용된 어떤 물질도 이식되었을 경우 외부막 바깥으로 빠져나올 수 없도록 디자인되어 있다. 만약, 이렇게 제작된 센서를 시간에 따라 증감하는 포도당 농도에 대한 정보를 실시간으로 연속 추출하는데 사용하려면, 일회용 센서와는 달리 포도당 농도에 정비례하여 신호가 가역적으로 신속히 변화해 주어야 한다. 도10은 0-30 mM 사이의 포도당 농도영역에서 농도를 증가시키면서 얻은 센서로부터의 전류신호변화(16)와 다시 같은 농도 영역에서 농도를 낮추면서 변화하는 전류 신호(17)를 동시에 비교할 수 있도록 해준 그래프이다. 도10에 도시된 바와 같이 농도의 증감에 의한 히스테리시스는 무시할 수 있음을 알 수 있다. 또한, 도11은 전술한 바와 같이 제작된 센서로부터 나오는 전류의 크기가 정상인의 한계 혈당치에 해당하는 농도의 변화에 따라 가역적으로 변화함을 보여준다. 포도당 농도가 정상인 혈당치의 최저값인 4mM일때(18)와 최대값인 7mM일때(19)의 사이를 수 차례 반복하여 농도 변화시켜도 전류 값은 10초 이내에 이전 값을 재현성있게 회복한다. 모든 농도 변화에 대응하여 전류 신호의 변화는 10초 이내에 최종 안정 신호의 90%에 해당하는 값까지 변화하며, 이 시간은 당뇨병 환자를 위한 기계식 인공췌장의 일부로서 센서를 피하지방층에 이식할 경우, 무리 없이 체내의 혈당을 조절할 수 있기

에 충분히 짧은 시간이다. 본 센서는 생리식염수 뿐만 아니라, 사람의 혈청(human serum)에서도 작동하는데, 감도 저하는 매우 재현성있게 30%정도 일어나고, 최종 감도는 6 nA/mM 이상을 보장한다.

상기와 같은 전기화학적 고분자 중합법과 함침 후 건조방법을 이용하여 제조된 감응막 및 그의 제조방법은 혈당의 농도를 측정하기 위한 당센서에 적용시키기 위한 일례를 보여주고 있으나, 이에 반드시 국한하는 것은 아니다. 즉, 본 발명은 모든 종류의 수용성 효소 및 생물학적 요소(biological components)를 고체 전극 위에 고정시키는 형태의 바이오센서의 제작에 응용될 수 있음은 주지의 사실이다. 이를테면, 유산염(lactate), 요소(urea), 크레아티닌(creatinine) 센서의 제작을 위해 전극 위에 우레아제(urease), 락테이트 옥시데이즈(lactate oxidase), 락테이트 디하이드로지네이즈(lactate dehydrogenase), 크레아티네이즈(creatinase), 상기 크레아티네이즈(creatinase)와 사르코신 옥시데이즈(sarcosine oxidase)들과 같은 효소를 고정시키거나, 여러 가지 항체(antibody)를 고정시킬 경우에도 적용될 수 있다. 이런 예들은 모두 실시예에서 쓰인 당산화효소를 다른 종류의 생물학적 요소로 교체했을 뿐, 제작 과정에 있어서는 전혀 차이가 없다.

그리고, 내부막과 효소층에 사용하는 전기화학적 중합용 단량체들도 전기화학적 산화 또는 환원에 의한 고분자 중합 반응의 시작(initiation)이 가능한 물질이면 어느 것이든 가능하다. 따라서, 본 실시예에서는 벤젠 계열이나 나프탈렌 계열에 국한하여 설명하고는 있으나, 이밖에 수용성이면서 물 속에서 전기화학적으로 중합이 가능한 물질이면 어느 것이나 내부막과 효소층의 성능 개선을 위해서 쓰일 수 있음은 주지의 사실이다.

또한, 전술한 감응막 및 그의 제조방법은 여러가지 형태의 바이오센서에 적용될 수 있다.

예를 들어, 전극의 구조를 미세하게 만들거나 여러 개의 전극을 어레이(array) 형태로 만들어 다양한 바이오센서를 작은 칩(chip)위에 집적시키는 마이크로 바이오센서의 제작에도 응용될 수 있다. 전극이 아무리 작더라도 전극 부위에만 감응막이 도포되므로 이웃 전극과는 독립되게 바이오센서를 구현할 수 있다. 즉, 종래의 바이오센서들은 막 성분을 용매와 섞어 전극에 떨어뜨린 후 곧바로 말리는 과정을 통해 감응막을 얻었지만, 그런 방법으로는 면적이 1 mm² 이하인 미소 감응막을 만들기 어려운 반면에, 본 발명의 감응막 제조방법은 전기화학적 고분자 중합법을 사용하기 때문에 어떤 모양, 어떤 크기의 전극이든 전극 부위에만 감응막을 형성시킬 수 있으므로, 마이크로 바이오센서에도 성공적으로 적용될 수 있다.

또한, 여러 개의 채널이 달린 정전위기(multi-channel potentiostat)를 전기화학적 중합법에 사용하면, 똑같은 조건으로 채널 수 만큼의 센서를 동시에 제작할 수 있으므로 성능 편차가 지극히 적은 센서를 만들 수 있다. 외부막 형성방법도 마찬가지로 단순히 외부막용 고분자가 분산되어있는 수용액에 동시에 담금으로써 제작 조건의 단일성을 확보할 수 있다. 이는 값싼 장비로 대량 생산이 가능하며 최종 성능 편차를 대폭 줄임으로써 비용을 절감할 수 있음을 의미한다.

이상에서 설명한 본 발명은 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 의해 한정되는 것이 아니고, 본 고안의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러 가지 치환과 변경이 가능함이 본 고안이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

발명의 효과

전술한 바와 같이 본 발명에 따르면 다음과 같은 효과를 갖는다,

첫째, 제품의 최종 성능 상의 편차가 줄어서 대량 생산을 할 경우 제작 원가가 절감되며 작업처리량(throughput)이 향상된다.

둘째, 제작 시간이 5시간 이내로 단축되고, 휘발성 오염 물질을 사용하지 않고 물만을 사용하기 때문에 유기 용매 처리를 위한 부대 장비 구입과 운영을 위한 비용이 절감되고, 환경오염을 방지할 수 있다.

셋째, 종래에는 휘발성 용매에 전극을 함침 및 건조공정을 반복적으로 수행하기 때문에 농도를 일치시키기 어려워서 제작 조건의 수정이 용이하지 않았던 반면에, 본 발명은 전기화학적 고분자중합법을 이용하므로 생산 중 제작 조건을 간단한 조작으로 정밀하게 수정할 수 있게 되고, 조건의 수정에 의한 센서 성능의 변화 폭을 객관적인 변수로 재현성있게 조절 가능하다.

넷째, 전위차, 용액의 농도, 전위차를 걸어주는 시간 등의 제작 변수를 사용자의 임의대로 변화시킬 수 있으므로, 동일한 생산 장비로 여러 목적의 센서가 제작 가능하고 생산 조건의 최적화가 쉬워져서 최적 조건을 찾는 알고리즘을 가지는 자동화된 생산 장비도 적용 가능하다.

다섯째, 감응 부위의 면적이나 모양에 관계없이 실용적으로 충분히 높은 감도를 유지하면서 짧은 시간 안에 안정된 바탕신호에 도달하는 소형 센서의 감응막을 구현할 수 있다.

여섯째, 한 기관(substrate) 위에 여러 개의 전극 부위를 가진 센서 구조체에 같은 종류 또는 다른 종류의 분석 대상 물질에 감응하는 감응막을 만들 수 있고 센서가 소형화 되더라도 전극의 크기나 모양에 상관없이 원하는 전극 부위에만 선택적으로 감응막이 형성될 수 있으므로 여러 가지 분석 대상 물질들의 농도를 동시에 측정할 수 있는 소형 집적 바이오센서(integrated micro-biosensor for multicomponent analysis)의 제작이 가능하다.

일곱째, 감응 속도를 빠르게 하고, 생체 적합도를 높이며, 외부 산소량 변화에 의한 의존도를 낮추고, 동시에 여러 방해 물질들에 의한 영향을 최소화함으로써 생체 내에서의 연속 측정이 가능하다.

여덟째, 별도의 물질을 합성하거나 화학적인 처리 과정이 필요 없고, 상업적으로 구입 가능한 저렴한 가격의 물질들로 전문가가 아닌 사람도 쉽게 제작할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

테프론 외피가 벗겨져 노출된 전극 표면 위에 적층되며 선택적 투과성을 갖는 방향족 유도체를 단량체로 한 고분자 내부막;

상기 고분자 내부막 상에 적층되며 외부의 분석대상물질과 화학반응을 일으켜 전기화학적으로 검출 가능한 물질을 생성하기 위한 효소와 방향족 유도체를 단량체로 한 고분자 매질로 이루어진 효소 고정층; 및

상기 효소고정층상에 적층되며 그의 화학반응에 의해 생성된 전기화학적으로 검출 가능한 물질이 내부막 이외의 다른 부분으로 확산하는 것을 차단하고 외부로부터의 방해 물질의 투과를 방지하며 센서의 생체적 합성을 증대시켜 내부막과 효소 고정층을 보호하기 위한 불소치환 탄소사슬을 가진 고분자 외부막

을 포함하는 감응막.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 방향족 유도체 내부막은 5-아미노-1-나프톨(5-amino-1-naphthol;5A1N), 1,3-디아미노나프탈렌, 1,5-디아미노나프탈렌, 1,2-디아미노벤젠, 1,3-디아미노벤젠, 1,4-디아미노벤젠 중 어느 하나로 이루어진 감응막.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 효소고정층은 5-아미노-1-나프톨(5-amino-1-naphthol;5A1N), 1,3-디아미노나프탈렌, 1,5-디아미노나프탈렌, 1,2-디아미노벤젠, 1,3-디아미노벤젠, 1,4-디아미노벤젠 중 어느 하나가 효소와 결합되어 이루어진 감응막.

청구항 4

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서,

상기 효소고정층은 그 안에 고정되는 효소량을 증대시키고 활성도를 보존하기 위하여 효소와 방향족 고분자 단량체의 혼합 용액에 첨가되어 다수의 효소 사이를 연결하는 연결체(crosslinker)와, 아민기를 갖는 수용성 고분자중 적어도 하나를 더 포함하는 감응막.

청구항 5

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서,

상기 효소고정층은 효소의 안정성을 증대시키기 위한 휴먼 세룸 알부민(HSA:human serum albumin)과 보바인 세룸 알부민(BSA:bovine serum albumin)중 어느 하나를 더 포함하는 감응막.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 불소치환 탄소사슬을 가진 고분자 외부막은 폴리테트라 플루오르화 에틸렌 (PTFE:poly(tetrafluoroethylene))으로 이루어진 감응막.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 내부막의 두께는 20~50nm, 상기 효소고정층의 두께는 10nm~50nm 및 외부막의 두께는 1 μ m~10 μ m로 이루어진 감응막.

청구항 8

전극을 소정의 방향족 유도체와 염화수소 및 전해질이 용해된 수용액에 함침시키는 제1 단계;

상기 수용액상에서 전극표면에 전기화학적 중합반응을 일으켜 과산화수소에 대한 선택적인 투과성을 가지는 소정 두께의 방향족 유도체를 단량체로 하는 고분자 내부막을 형성하는 제2 단계;

상기 방향족 유도체를 단량체로 하는 고분자 내부막이 형성된 전극을 효소와 방향족 유도체 및 전해질이 용해된 수용액에 함침시키는 제3 단계;

상기 수용액상에서 방향족 유도체를 단량체로 하는 고분자 내부막 표면에 전기화학적 중합반응을 일으켜 상기 내부막상에 효소층을 형성하는 제4 단계; 및

불소치환 탄소사슬을 가진 고분자가 분산된 수용액을 희석한 용액에 내부막 및 효소층이 순차적으로 적층된 전극을 투입시켜 외부막을 형성하는 제5 단계

를 포함하는 감응막 제조방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 제1단계는 테프론 외피의 소정부분에 노출된 전극상에 불순물이 잔재하는 것을 제거하고 전극 표면의 상태를 초기화 시키기 위해 산화처리하는 제 6 단계를 더 포함하는 감응막 제조방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서,

상기 제1단계에서의 수용액에 용해된 방향족 유도체는 벤젠계열과 나프탈렌 계열 화합물중 어느 하나의 단량체로 이루어진 감응막 제조방법.

청구항 11

제 8 항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제2단계는

방향족 유도체 수용액 내에서 기준 전극 (Ag/AgCl in 3 M KCl)에 대하여 +0.55 V ~ +0.7 V 사이의 일정 전위차를 걸어 200초 ~ 3000초 동안 중합시키는 감응막 제조방법.

청구항 12

제 8 항에 있어서,

상기 제3단계에서의 방향족 유도체는 벤젠계열과 나프탈렌 계열 화합물중 어느 하나의 단량체로 이루어진 감응막 제조방법.

청구항 13

제 8 항에 있어서,

상기 제 3 단계는

고정되는 효소량의 증대를 위해 효소와 고분자 단량체가 섞인 용액에 수용성 연결체를 더 용해시키거나 수용성 연결체와 함께 아민기를 가진 수용성 고분자를 첨가하여 여러 개의 효소들 사이를 연결하는 제7 단계를 포함하는 감응막 제조방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

상기 수용성 연결체는 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)로 이루어지고, 상기 수용성 고분자는 폴리리신(polylysine)으로 이루어지는 감응막 제조방법.

청구항 15

제 8 항, 제 12 항, 제 13 항에 있어서,

상기 제 3 단계는 효소의 안정성을 증대시키기 위해 효소와 단량체가 용해된 수용액 속에 휴먼 세럼 알부민(HSA;human serum albumin) 및 보바인 세럼 알부민(BSA;bovine serum albumin)중 어느 하나를 첨가하여 용해시키는 제8 단계를 포함하는 감응막 제조방법.

청구항 16

제 8 항, 제 12 항 내지 제 14 항에 있어서,

상기 제4단계에서 수소이온농도(pH) 범위가 5-8인 완충 용액(buffer solution)을 사용하는 감응막 제조방법.

청구항 17

제 8 항, 제 12 항 내지 제 14 항에 있어서,

상기 제4단계는 방향족 유도체 수용액 내에서 기준 전극 (Ag/AgCl in 3 M KCl)에 대하여 -0.2 V ~ +1.2 V 사이의 임의의 구간에서 3회 이상 전위차를 순환시켜(voltage cycling) 효소층을 형성하는 제9단계를 포함하는 감응막 제조방법.

청구항 18

제 8 항에 있어서,

제5 단계는

희석된 시약용액에 전극을 10초씩 5회 함침시켰다가 2~3시간 이상 건조시키는 제9 단계를 포함하는 감응막 제조방법.

청구항 19

제 18 항에 있어서,

상기 제9 단계에서 건조조건은 대기압 또는 대기압보다 낮은 10 mmHg 이하의 기압에서 건조하는 제10 단계를 포함하는 감응막 제조방법.

청구항 20

제 8 항에 있어서,

제5 단계는

희석된 시약용액을 불소화 탄소사슬 구조를 가지는 기름 상태의 고분자와 교대로 전극 상에 묻혀 형성하는 제11 단계를 포함하는 감응막 제조방법.

청구항 21

제 8 항에 있어서,

상기 제5 단계는

불소화 탄소사슬을 가지는 고분자를 화학기상증착시켜 형성하는 제12 단계를 포함하는 감응막 제조방법.

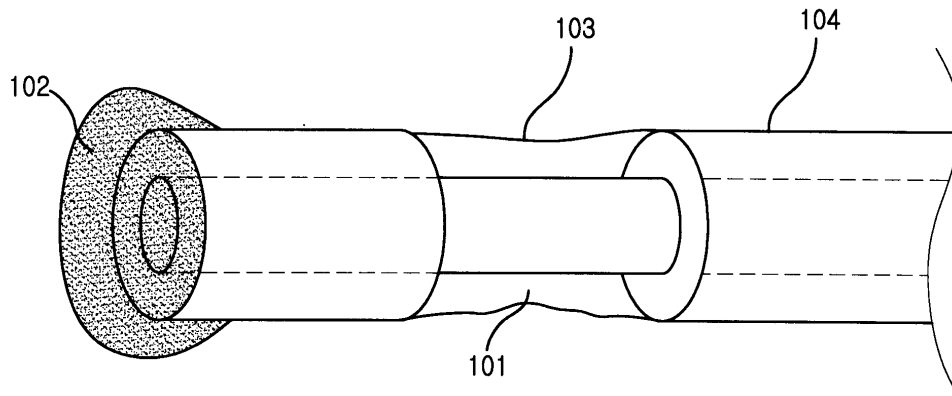
청구항 22

제 8 항에 있어서,

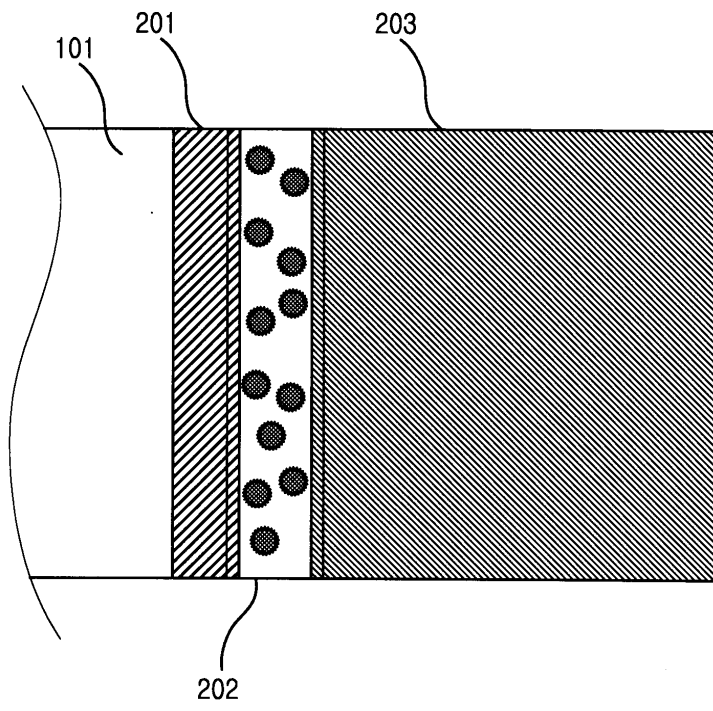
상기 제5 단계의 불소치환 탄소 사슬을 가진 고분자는 폴리테트라 플루오르화 에틸렌 (PTFE:poly(tetrafluoroethylene))로 이루어진 감응막 제조방법.

도면

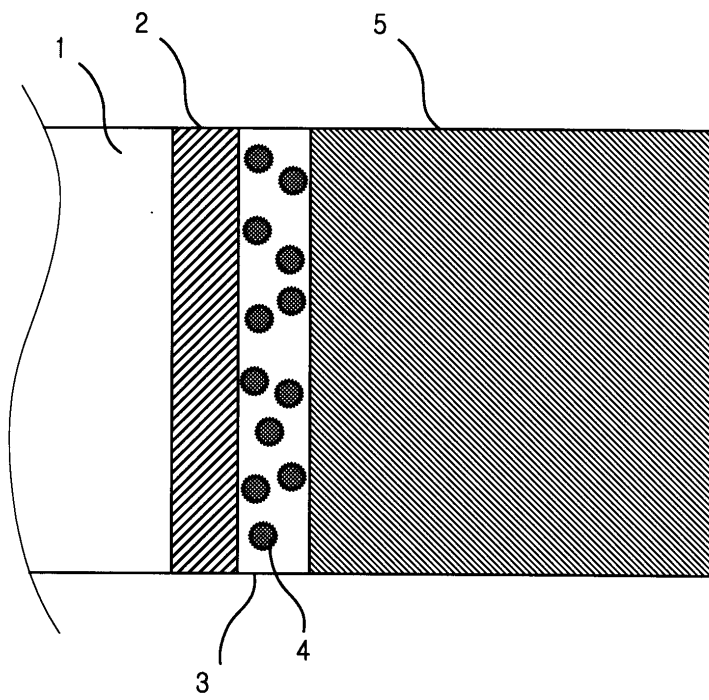
도면1



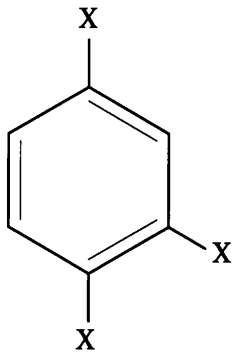
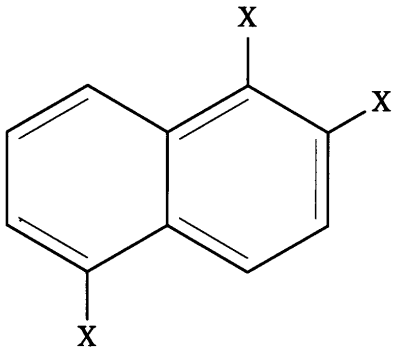
도면2



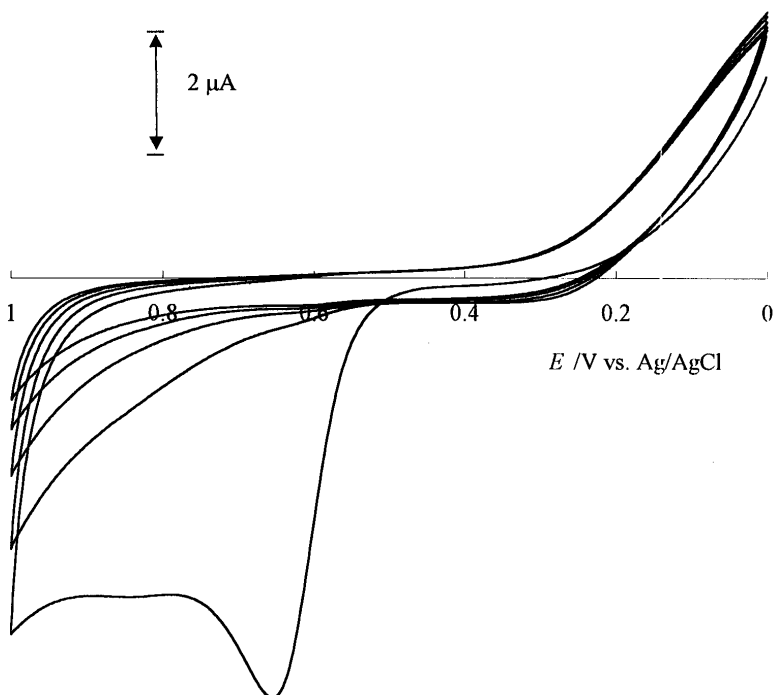
도면3



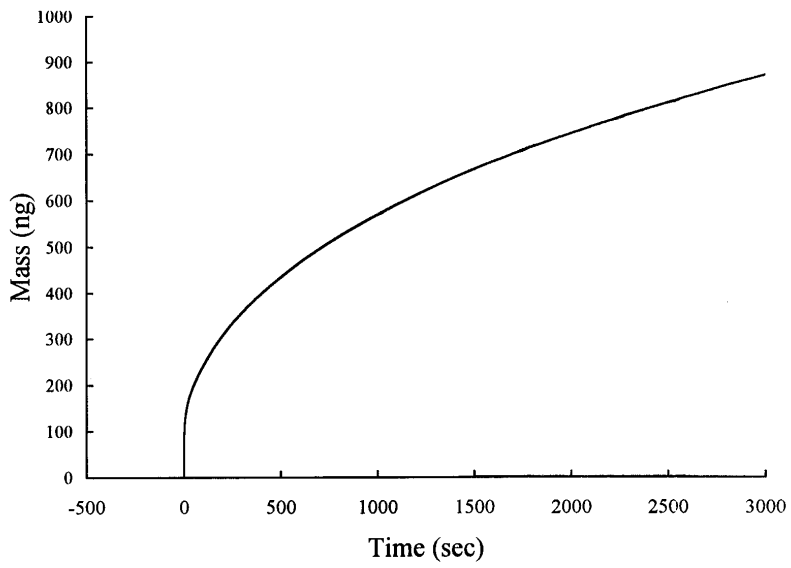
도면4



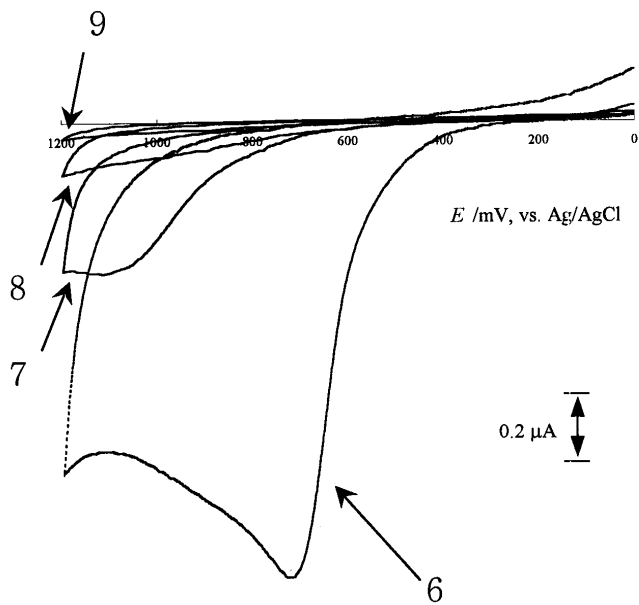
도면5



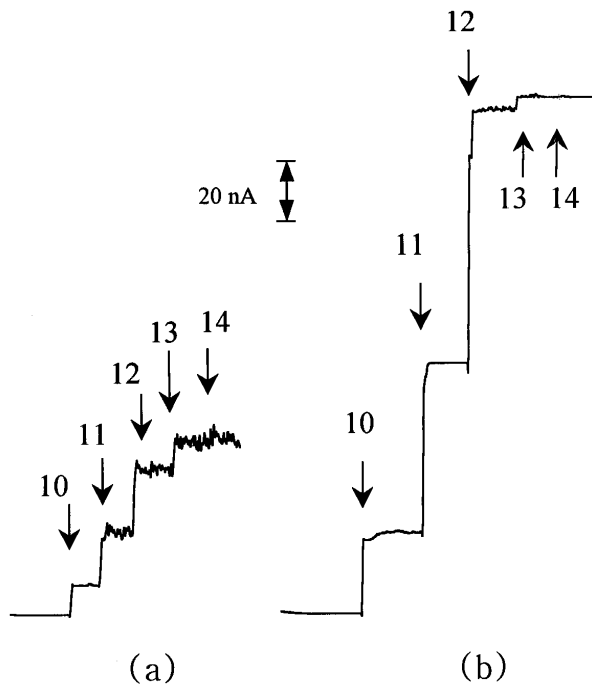
도면6



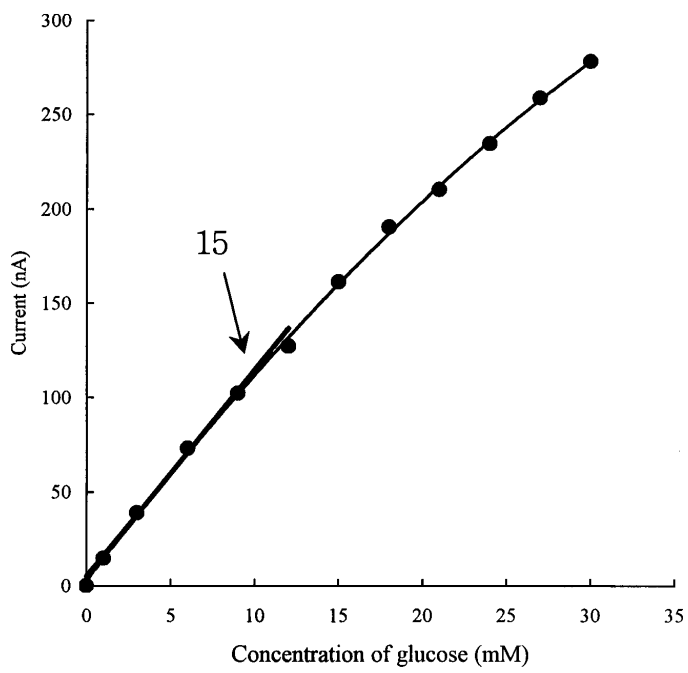
도면7



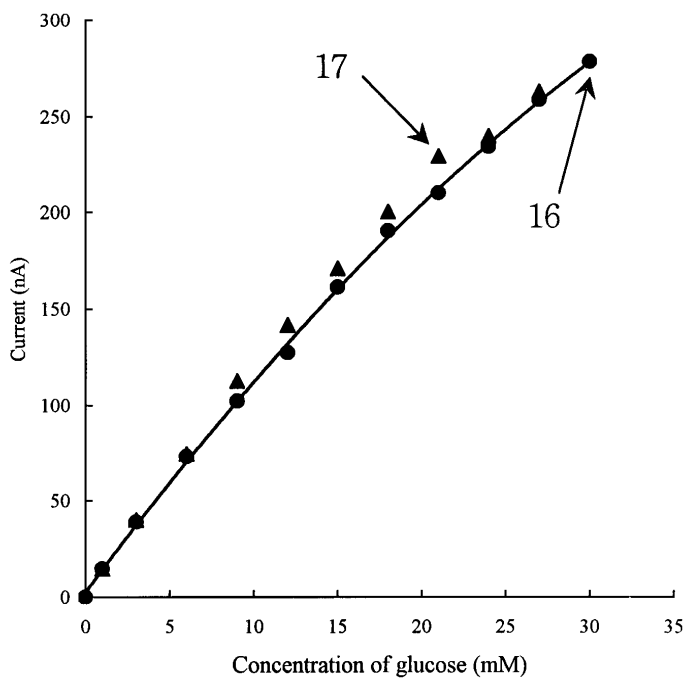
도면8



도면9



도면10



도면11

