



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0016436  
(43) 공개일자 2012년02월24일

(51) Int. Cl.

*C12Q 1/26* (2006.01) *C12Q 1/42* (2006.01)  
*G01N 21/64* (2006.01) *G01N 21/88* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0078795

(22) 출원일자 2010년08월16일

심사청구일자 2010년08월16일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동)

(72) 발명자

고원건

서울특별시 관악구 봉천동 1703 동아아파트 105-502

장은지

인천광역시 남구 경인로268번길 33-38 (도화동)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 18 항

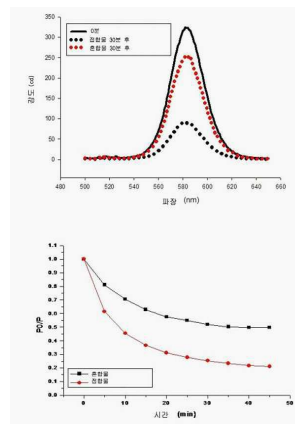
(54) 하이드로겔을 포함하는 페놀 검출용 센서 및 이를 이용한 페놀의 검출방법

### (57) 요약

본 발명은 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서 및 이를 이용한 페놀 또는 페놀 유도체 검출방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 효소와 양자점의 접합물이 고정된 하이드로겔을 포함함으로써, 보다 저렴한 비용으로 안정적으로 검출 가능한 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서, 이의 제조방법 및 이를 이용한 페놀 또는 페놀 유도체 검출방법에 관한 것이다.

또한, 상기 센서를 멀티 채널 내에서 제작함으로써 폐수 안의 페놀의 농도를 쉽게 측정할 수 있으며, 기존 페놀 센서에 비해 보다 높은 민감도를 가진다.

**대표도** - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NT080584
부처명	서울시정개발연구원
연구관리전문기관	지방자치단체
연구사업명	신기술연구개발지원사업
연구과제명	양자점과 하이드로젤 미세입자를 이용한 유해성 폐놀 검출용 미세유체시스템 개발
기여율	1/2
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2009.10.01 ~ 2010.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	R11-2007-050-03002-0
부처명	한국과학재단
연구관리전문기관	교육과학기술부
연구사업명	선도연구센터-이공학분야(SRC/ERC)
연구과제명	ERC/3-2세부/패턴집적형 능동폴리머 소재 센터
기여율	1/2
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2010.03.01 ~ 2011.02.28

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

효소와 양자점의 접합물이 고정된 하이드로겔을 포함하는 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

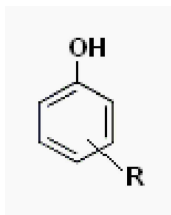
상기 효소와 양자점의 접합물은 효소와 양자점이 -CO-NH-로 결합된 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 페놀 유도체는 다음 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서;

[화학식 1]



상기 화학식 1에서, R은 C<sub>1-4</sub>알킬이다.

### 청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 효소는 티로시나아제, 글루코오스 옥시다아제, 포스파타아제 및 하이드로젠 퍼옥시다아제로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서.

### 청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 양자점은 CdSe-ZnS, CdS, CdTe, CdSe, ZnS, ZnSe 및 PbSe로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서.

### 청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 하이드로겔은 PEG(폴리에틸렌글리콜), PVP(폴리비닐피롤리돈), PVA(폴리비닐알콜), PLA(폴리락트산), 키토

산, 텍스트란, 젤라틴 및 콜라겐으로 이루어진 군 중에서 선택된 고분자로부터 유래된 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서.

#### 청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 하이드로겔은 PEG로부터 유래된 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서.

#### 청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 하이드로겔은 분자량(Mw)이 200 내지 20,000인 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서.

#### 청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 센서는 재사용이 가능한 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서.

#### 청구항 10

효소와 양자점의 집합물이 고정된 하이드로겔이 2개 이상의 채널 내에 위치된 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서.

#### 청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 센서는 1개 이상의 측정하고자 하는 시료 주입용 채널과 1개 이상의 표준 채널을 포함하는 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서.

#### 청구항 12

제 10 항에 있어서,

상기 채널은 너비가 50 내지 200  $\mu\text{m}$ 이고, 간격은 50 내지 200  $\mu\text{m}$ 인 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서.

#### 청구항 13

제 10 항에 있어서,

상기 하이드로겔이 어레이 형태로 고정된 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서.

#### 청구항 14

효소와 양자점의 집합물이 고정된 하이드로겔을 주입시켜 집합물 내 양자점의 소광 정도를 측정하는 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체의 농도 측정 장치.

#### 청구항 15

효소와 양자점의 접합물, 광가교제 및 광중합개시제의 혼합물을 UV 조사를 통해 경화시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서의 제조방법.

#### 청구항 16

제 15 항에 있어서,

상기 효소와 양자점의 접합물, 광가교제 및 광중합개시제가 100: 100 내지 500: 1 내지 50의 부피비로 혼합되는 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서의 제조방법.

#### 청구항 17

제 15 항에 있어서,

멀티 채널 내에서 제조하는 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서의 제조방법.

#### 청구항 18

제 1 항 내지 제13항 중에서 선택된 어느 한 항의 센서를 사용하여 페놀 또는 페놀 유도체를 검출하는 방법.

### 명세서

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 화학공정 및 환경적인 모니터링에서 유용하게 사용될 수 있는 효소와 양자점의 접합물을 함유하는 하이드로겔을 포함하는 페놀 또는 페놀 유도체 센서, 이의 제조방법 및 이를 이용한 페놀 또는 페놀 유도체의 검출방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 페놀 및 페놀 유도체는 환경호르몬 물질로서 미량이 존재하더라도 인체나 생태계에 영향을 미치기 때문에 화학적인 공정과정과 환경적인 모니터링에서 매우 중요하며[Wang, B., Zhang, J., Dong, S.,2000. *Biosens.Bioelectron.* 15:397.], 사람의 피부에 과도하게 노출될 경우 간 손상, 설사, 용혈성 빈혈 등을 유발시킬 수 있다 [S.M. Khor, 2003, Poly(hydroxyl ethyl methacrylate) *AsiaSENSE SENSOR*, pg207-211].

[0003] 페놀의 일반적 측정방법은 가스 크로마토그래피(GC, Gas Chromatography) 또는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC, high performance liquid chromatography)와 같은 측정장치들을 이용한다. 그러나, 상기 장치는 가격이 비싸고 조작이 복잡하여 조작 시 장치에 대한 전문적 지식이 요구되며, 긴 측정시간을 요구하고 분석현장에서의 휴대가 어렵다는 단점이 있다. 또한, 페놀류를 검출하는 다른 방법은 페놀류와 선택적으로 반응하는 효소를 사용할 수 있다. 그러나, 상기 효소는 물리적 충격, 화학적인 반응으로부터 민감하게 반응하여 쉽게 변성되는 경우가 많으며, 이 효소를 측정하기 위해선 쉽게 확인할 수 있는 형광 염료 등의 물질이 필요하다. 이러한 형광염료는 측정 시 형광을 잃을 수 있는 광탈색 작용(photobleaching)을 나타낼 수 있는 문제가 있다.

#### 발명의 내용

##### 해결하려는 과제

[0004] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 연구한 결과, 효소와 양자점의 접합물이 고정된 하이드로겔을 포함하여 적은 시간과 비용이 들며 휴대하기 편리한 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서를 개발함으

로써 본 발명은 완성하게 되었다.

[0005] 또한, 멀티 채널을 이용하여 PEG 하이드로젤 어레이를 만들어 페놀을 측정하는 간편한 센서를 개발하였다.

[0006] 따라서, 본 발명은 수분함량이 높은 생체적합성 고분자 하이드로젤 안에 양자점과 효소의 접합물을 고정한, 페놀 또는 페놀 유도체 측정 센서를 제공한다.

### 과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 효소와 양자점의 접합물이 고정된 하이드로젤을 포함하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서를 그 특징으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 효소와 양자점의 접합물이 고정된 하이드로젤이 2개 이상의 채널 내에 위치한 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서를 다른 특징으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은

[0010] 효소와 양자점의 접합물, 광가교제 및 광중합개시제의 혼합물을 UV 조사를 통해 경화시키는 단계

[0011] 를 포함하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서의 제조방법을 또 다른 특징으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서를 사용하여 페놀 또는 페놀 유도체를 검출하는 방법을 또 다른 특징으로 한다.

### 발명의 효과

[0013] 본 발명의 센서에서 사용한 양자점은 그 크기를 조절함으로써 여러 색의 형광 측정이 가능하며 형광을 잃는 현상이 없어 형광염료를 사용할 때보다 훨씬 안정하다. 그러나, 양자점과 효소는 온도와 pH에 민감하다는 단점을 가지므로 이를 보호하기 위해 수분함량이 높고 생체적합성인 고분자 하이드로젤에 효소와 양자점의 접합물을 고정시켜, 이들의 활성을 오래도록 유지시킬 수 있으며, 본 발명의 센서는 재사용이 가능하다.

[0014] 또한, 멀티 채널 제작으로 페수 안에 포함된 페놀의 농도를 쉽게 측정할 수 있으며 적은 양의 페놀과 빠르게 반응하며 효소와 양자점을 접합함으로써 기존의 페놀 센서 보다 높은 민감도를 얻을 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 티로시나아제와 양자점의 접합물을 제조하는 과정을 나타낸 것이다.

도 2는 페놀이 티로시나아제에 의해 퀴논 생성 메커니즘을 나타낸 것이다.

도 3은 퀴논에 의한 양자점의 소광 효과 방법을 나타낸 것이다.

도 4는 티로시나아제와 양자점의 접합을 알아보기 위한 DLS 측정 그래프를 나타낸 것이다.

도 5는 티로시나아제와 양자점의 접합물이 고정된 PEG 하이드로젤 패턴 이미지를 나타낸 것이다

도 6은 티로시나아제와 양자점의 접합물과 혼합물 각각에 페놀(10  $\mu$ M)을 반응시켜 시간에 따른 소광 효과를 측정한 것이다.

도 7은 티로시나아제와 양자점의 접합물과 혼합물 각각을 PEG 하이드로젤(분자량 575) 내부에 고정한 후 10  $\mu$ M 페놀을 이용하여 시간에 따른 소광 효과를 측정한 것이다.

도 8은 티로시나아제와 양자점의 접합물과 혼합물 각각을 PEG 하이드로젤(분자량 8000) 내부에 고정한 후 10  $\mu$ M 페놀을 이용하여 시간에 따른 소광 효과를 측정한 것이다.

도 9는 티로시나아제와 양자점의 접합물이 고정된 PEG 하이드로젤을 이용하여 일주일간 효소 활성을 측정한 것이다.

도 10은 채널 안에서 티로시나아제와 양자점의 접합물이 고정된 PEG 하이드로젤 패턴 이미지를 나타낸 것이다.

도 11은 페놀 농도(0, 5, 10, 20, 50  $\mu\text{g/ml}$ )에 따른 채널 안에서 티로시나아제와 양자점의 접합물이 고정된 PEG 하이드로젤 어레이의 소광 효과 이미지를 나타낸 것이다.

도 12는 페놀 농도(0, 5, 10, 20, 50  $\mu\text{g/ml}$ )에 따른 채널 안에서 티로시나아제와 양자점의 접합물이 고정된 PEG 하이드로젤 어레이의 소광 효과 측정한 것이다.

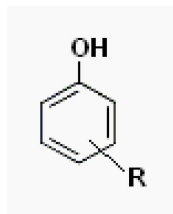
### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이와 같은 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명은 효소와 양자점의 접합물질이 고정된 하이드로젤을 포함하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서에 관한 것이다:

상기 페놀 유도체는 다음 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 R은  $\text{C}_{1-4}$ 알킬이다.

효소는 물리적 충격, 화학적인 반응으로부터 민감하게 반응하여 쉽게 변성될 수 있으나, 이러한 효소를 수분 함량이 높고 생체에 적합한 고분자 하이드로젤에 고정시키면 효소의 활성이 오랫동안 유지되며 기질과의 반응이 보다 안정적으로 진행된다.

본 발명에서, 페놀 또는 그 유도체를 기질로 하여 그 검출에 이용될 수 있는 효소라면 어느 것이든지 하이드로젤 내에 고정될 수 있으며, 특히 티로시나아제, 글루코오스 옥시다아제, 포스파타아제 및 하이드로젠 퍼옥시다아제로 이루어진 군에서 선택되는 효소가 고정될 수 있으나, 이로 한정되지 않는다.

본 발명에서는 양자점을 사용함으로써 형광염료의 광 탈색작용(photobleaching)과 같은 문제점을 해결할 수 있다.

본 발명에서, 양자점으로는 형광발현 효과를 나타내는 양자점 물질이 사용될 수 있으며, 예컨대 CdSe-ZnS, CdS, CdTe, CdSe, ZnS, ZnSe, PbSe 등이 사용될 수 있으나, 이로 한정되지 않는다.

본 발명에서는 기존에 효소와 양자점을 단순 혼합 사용하던 것과는 달리 효소와 양자점의 접합물을 사용함으로써 페놀 또는 페놀 유도체의 검출 효과를 증대시켰다.

상기 효소와 양자점의 접합물은 효소와 양자점을 가교제에 의해 결합시킬 수 있으며, 보다 바람직하게는 양자점과 가교제를 반응시킨 후, 효소를 반응시켜 접합물을 얻을 수 있다[도 1 참조].

또한, 상기 효소와 양자점의 접합물은 효소와 양자점 사이에  $-\text{CO}-\text{NH}-$ 로 결합된 것을 의미한다.

상기 가교제로는 EDC(3-sulfo-1-hydroxysuccinimide), NHS(N-hydroxysuccinimide), APTES(3-Aminopropyltriethoxysilane), GA (glutaraldehyde) 등을 포함하며, 이에 한정되지 않는다.

본 발명에서, 하이드로젤은 상기 하이드로젤은 PEG(폴리에틸렌글리콜), PVP(폴리비닐피롤리돈), PVA(폴리비닐알콜), PLA(폴리락트산), 키토산, 텍스트란, 젤라틴 및 콜라겐으로 이루어진 군 중에서 선택된 고분자로부터 유래된 것으로, 분자량( $M_w$ )이 200 내지 20000인 것이 바람직하다.

- [0031] 또한, 상기 하이드로겔은 당 기술분야에 알려진 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예컨대, 효소와 양자점의 접합물, 광가교제 및 광중합개시제를 혼합한 후 UV를 조사하여 제조할 수 있다.
- [0032] 상기 광가교제로는 광중합성 관능기를 가지는 생분해성 고분자를 사용할 수 있으며, 예컨대 (폴리)에틸렌글리콜 디(메타)아크릴레이트, (폴리)프로필렌글리콜 디(메타)아크릴레이트, 트리메틸올프로판 트리(메타)아크릴레이트, 트리메틸올프로판 디(메타)아크릴레이트, 글리세롤 트리(메타)아크릴레이트, 펜타에리트리톨 테트라(메타)아크릴레이트, 디펜타에리트리톨 헥사(메타)아크릴레이트 및 글리시딜 (메타)아크릴레이트로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상이 사용될 수 있으나, 이로 한정되지 않는다.
- [0033] 특히, 폴리(에틸렌글리콜)-디아크릴레이트(PEG-DA)는 양쪽에 디아크릴레이트(diacrylate)를 가지고 있어 광중합으로 손쉽게 겔을 만들 수 있고, 이렇게 만들어진 PEG 하이드로겔은 수분 함량이 높고 생체적합성이 뛰어난 장점이 있다.
- [0034] 본 발명은 생체적합성 고분자 하이드로겔 안에 효소가 고정되었을 경우 효소의 활성이 오래도록 유지되고, 물리적 충격 및 화학 반응으로부터 보호할 수 있으며 효소의 3차원 입체구조를 유지시킬 수 있어 기질과의 반응이 보다 안정적으로 진행되는 장점을 갖는다.
- [0035] 본 발명에서, 광중합개시제는 2,2-디메톡시-2-페닐아세토페논, 2-히드록시-2-메틸프로피오페논(2-hydroxy-2-methylpropiophenone, HOMPP), 어가큐어 2959(Irgacure 2959), 벤조인메틸에테르, 벤조일 퍼옥사이드, 아조비스이소부티로니트릴 등을 단독 또는 2종 이상을 함께 사용할 수 있으나, 이로 한정되지 않는다.
- [0036] 본 발명에서는 효소와 양자점의 접합물을 사용함으로써 기존 효소와 양자점의 혼합물을 사용한 페놀 센서 보다 높은 민감도를 얻을 수 있었다. 이는 효소와 양자점을 접합시킴으로써 서로 연결된 효소와 양자점이 서로 빠르게 반응할 수 있기 때문이다. 페놀은 티로시나아제와 같은 효소를 만나게 되면 퀴논이라는 중간물질을 생성한다. 퀴논은 전자 수용체로서 양자점에 존재하는 전자를 빼앗아 양자점이 가진 형광이 점차 약해지는 소광 효과를 나타낸다. 이는 효소와 반응이 끝나고 이어 양자점과 반응이 시작되었기 때문에 효소와 양자점의 접합물이 더 높은 민감도를 갖게 되는 것이다. 이러한 방법으로 민감도를 증가시켜 기존 센서 보다 낮은 농도에서의 페놀 측정이 가능해졌다. 페놀의 농도가 높을수록 소광 효과의 변화는 크게 측정되며 농도가 낮으면 낮은 소광 효과를 나타내 페놀의 농도에 따라 소광 효과가 나타나는 것을 알 수 있다. PEG 하이드로겔 내부에 고정된 효소와 양자점의 접합물은 기질인 페놀과 반응 후 여러 번 씻어주고 다시 페놀과 반응시키면 이전과 비슷한 소광 효과를 얻을 수 있다. 이는 양자점의 구조를 보면 알 수 있다. 코어와 셸로 이루어진 양자점은 코어의 크기에 따라 나타나는 빛을 배출하는 파장에 따라 달라진다. 코어의 크기가 클수록 붉은색 형광을 작을수록 보라색에 가까운 형광을 나타내며 코어는 쉽게 산화되기 때문에 이를 방지하기 위해 셸로 코팅하여 사용한다. 이러한 구조로 인해 형광염료를 사용할 때 보다 안정적으로 페놀 농도에 따른 형광을 측정할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 페놀 또는 그 유도체 검출용 센서는 재사용이 가능한 것을 특징으로 한다.
- [0038] 본 발명은 또한 효소와 양자점의 접합물이 고정된 하이드로겔이 2개 이상의 채널 내에 위치한 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서에 관한 것이다.
- [0039] 본 발명의 페놀 또는 그 유도체 검출용 센서는 1개 이상의 측정하고자 하는 시료 주입용 채널과 1개 이상의 표준 채널을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0040] 상기 채널은 너비가 50 내지 200  $\mu\text{m}$ 이고, 간격은 50 내지 200  $\mu\text{m}$ 인 것이 바람직하다.
- [0041] 상기 하이드로겔이 어레이 형태로 고정된 것을 특징으로 하는 페놀 또는 페놀 유도체 검출용 센서.
- [0042] 본 발명은 또한 효소와 양자점의 접합물, 광가교제 및 광중합개시제의 혼합물을 UV 조사를 통해 경화시키는 단계를 포함하는 페놀 또는 그 유도체 검출용 센서의 제조방법을 제공한다.

- [0043] 구체적으로, 광가교제, 효소와 양자점의 접합물, 및 광중합개시제를 혼합하여 하이드로젤 전구용액을 만든다. 이때, 효소와 양자점의 접합물, 광가교제 및 광중합개시제가 100 : 100 내지 500 : 1 내지 50의 부피비로 혼합되는 것이 바람직하다. 만일 광가교제가 상기 범위를 벗어나면 하이드로젤이 제대로 만들어지지 않으며 내부에 효소나 바이오물질들이 제대로 고정되지 않는 문제가 있으며, 광중합개시제가 상기 범위보다 높을 경우 하이드로젤을 만드는 과정을 방해할 수 있으며 낮을 경우에는 하이드로젤 형성에 문제가 있다. 한 문제가 있다,
- [0044] 상기 전구용액이 UV에 노출되면 라디칼 중합으로 젤이 되는 성질을 가진다. 전구용액을 채널에 넣고 경화시켜 만든 후 기질인 페놀의 농도와 시간을 달리하여 양자점의 소광 효과를 측정함으로써 페놀 농도를 측정할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 실시예에서는, 티로시나아제와 양자점의 접합물로 이뤄진 PEG 하이드로젤 내부에선 페놀과 반응 시 소광 효과를 나타냈으며 페놀의 농도가 높을수록 비례하여 더 많은 소광 효과를 보였다. 또한, PEG 하이드로젤 안에 고정된 티로시나아제와 양자점을 단순히 섞은 혼합물과 티로시나아제와 양자점의 접합물, 각각 PEG 하이드로젤 내부에 고정시킨 후 페놀을 이용하여 소광 효과를 측정하였다. 그 결과 PEG 하이드로젤 내부에 고정된 티로시나아제와 양자점의 혼합물 보다 티로시나아제와 양자점의 접합물을 사용하여 내부에 고정되었을 경우에서 더 높은 소광 효과를 볼 수 있었다. 이는 기질인 페놀과 반응 시 접합물질인 경우 티로시나아제와 페놀의 반응 후 퀴논이라는 물질이 생성되어 티로시나아제에 고정되어 있기 때문에 퀴논이 보다 빠르고 쉽게 양자점과 반응하여 소광 효과를 나타낼 수 있는 것이다.
- [0046] 또한, 여러 개의 멀티 채널을 만들고 그 안에서 효소와 양자점의 접합물을 포함한 PEG 하이드로젤을 제조하였다. 멀티 채널을 이용하면 페놀의 농도에 따라 소광 효과를 볼 수 있으며, 측정하고자 하는 시료 주입용 채널 하나를 제외한 여러 개 채널(페놀 농도별로 주입)에는 기준에 알고 있는 페놀의 농도를 흘려주어 형광의 소광 효과를 보고 샘플 주입용 채널에는 페수를 흘려줌으로써 페수에 포함된 페놀에 의한 소광 효과를 알 수 있다. 이러한 소광 효과를 기준에 알고 있는 페놀 농도에 따른 소광 효과와 비교하여 페수에 포함된 페놀의 양을 측정할 수 있다.
- [0047] 본 발명은 효소와 양자점의 접합물이 고정된 하이드로젤을 주입시켜 접합물 내 양자점의 소광 정도를 측정함으로써 페놀 또는 페놀 유도체의 농도 측정할 수 있는 장치를 포함할 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명은 상기 페놀 또는 그 유도체 검출용 센서를 사용하여 페놀 또는 페놀 유도체를 검출하는 방법을 제공하며, 특히 형광분광분석기를 통해 페놀에 의해 양자점이 빛을 점점 잃어가는 형광의 정도를 측정함으로써 페놀 또는 페놀 유도체의 농도를 측정할 수 있다.
- [0049] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 더욱 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시예는 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0050] **실시예 1: 티로시나아제와 양자점의 접합물 확인**
- [0051] 이 실험에서는 페놀의 농도에 따른 양자점의 소광 효과를 통해 페놀 센서를 개발하였다. 기질인 페놀이 티로시나아제를 만나게 되면 카테콜(catechol)이라는 물질로 바뀌고, 이 물질은 다시 티로시나아제를 만나면 퀴논(quinine)이라는 물질로 바뀐다[도 2]. 퀴논은 전자 수용체(electron acceptor)로서 자체적으로 발광하는 양자점의 형광을 점차 잃게 하는 소광 효과로 페놀의 농도를 측정할 수 있다. 페놀의 농도가 높을수록 높은 소광 효과를 낮을수록 낮은 소광 효과를 나타낸다[도 3]. 이러한 반응을 토대로 본 발명자들에 의해 티로시나아제와 양자점을 단순히 섞은 후 PEG 하이드로젤 내부에 고정하여 페놀 센서를 개발하여 특히 출원한 바 있으나, 낮은 농도의 페놀에서는 민감도가 떨어지는 경우가 나타났다. 이러한 문제를 보완하기 위해 티로시나아제와 양자점의 접합물을 만들어 PEG 하이드로젤 내부에 고정하여 낮은 농도에서의 페놀을 측정하도록 하였다.
- [0052] 3  $\mu$ M 양자점 CdSe, emission 655nm, carboxyl terminated quantum dot 20  $\mu$ l와 EDC(3-sulfo-1-hydroxysuccinimide) (1 mg/ml)/NHS(N-hydroxysuccinimide) (1 mg/ml) 용액 20  $\mu$ l를 혼합한 용액을 2시간 동안 반응 후 PBS 버퍼(pH 7)에 녹아 있는 5  $\mu$ g/ml 티로시나아제 100  $\mu$ l를 24시간 동안 반응시켜 티로시나아제와

양자점의 접합물을 얻게 되며 이 반응을 도 1에 나타내었다.

[0053] 이렇게 만들어진 티로시나아제와 양자점의 접합물은 DLS(Dynamic light scattering)라는 기기를 이용하여 측정하였다. DLS는 입자의 크기를 확인할 수 있는 기기로서 도 4에 나타내었다. 결과적으로 양자점의 크기는 8  $\mu\text{m}$ , 티로시나아제 11  $\mu\text{m}$ , 티로시나아제와 양자점의 혼합물 크기는 7 내지 15  $\mu\text{m}$ , 티로시나아제와 양자점의 접합물 크기는 40 내지 70  $\mu\text{m}$ 로 확인되었다. 도 4의 그래프 결과를 통해 티로시나아제와 양자점의 접합이 제대로 이루어졌다는 것을 확인할 수 있다.

#### [0054] 실시예 2 및 3: 티로시나아제와 양자점의 접합물을 이용하여 시간에 따른 소광 효과 측정

[0055] 상기 실시예 1을 통해 얻어진 티로시나아제와 양자점의 접합물과 PBS 버퍼(pH 7)에 녹아있는 5  $\mu\text{g/ml}$  티로시나아제 100  $\mu\text{l}$ 와 3  $\mu\text{M}$  양자점 20  $\mu\text{l}$ 로 구성된 혼합물을 이용하여 시간에 따른 소광 효과를 측정하였다.

[0056] 접합물 100  $\mu\text{l}$ , 혼합물 100  $\mu\text{l}$  각각과 10  $\mu\text{M}$  농도의 페놀 100  $\mu\text{l}$ 를 반응시켜 형광분광분석기(Fluorescence Spectrophotometer)라는 기기를 이용하여 소광 효과를 측정하였다. 형광분광분석기는 형광물질에 엑사이팅 필터(Exciting Filter)를 이용하여 빛을 투사하면 형광물질의 고유진동주파수에 상응하는 빛이 방사(Emission)되는 원리에 따라 시료 중의 형광물질의 양을 측정하는 기기이다. 이를 이용하여 페놀에 의해 양자점이 빛을 점점 잃어가는 형광의 정도를 측정하게 된다. 티로시나아제와 양자점의 혼합물의 소광 효과 보다 티로시나아제와 양자점을 접합물의 소광 효과가 훨씬 높은 것을 확인할 수 있었다[도 6].

표 1

구분	종류	측정 조건
실시예 2	티로시나아제와 양자점의 혼합물	시간에 따른 소광 효과 측정 (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30분)
실시예 3	티로시나아제와 양자점의 접합물	시간에 따라서 소광 효과 측정 (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30분)

#### [0058] 실시예 4: PEG 하이드로젤 캡슐화 하는 방법

[0059] 상기 실시예 2에서 사용한 티로시나아제와 양자점의 혼합물과 상기 실시예 3에서 사용한 티로시나아제와 양자점의 접합물 각각에 대하여 300  $\mu\text{l}$ , PEG-DA 500  $\mu\text{l}$ , 증류수 200  $\mu\text{l}$ 를 넣고 혼합한 후 광중합개시제 2-2-디메틸옥시-2-페닐-아세트페논(2-2-dimethoxy-2-phenyl-acetophenone)을 PEG-DA 양의 10% 첨가하여 혼합물, 접합물 각각의 PEG 전구체 용액을 제조하였다. 각각 만들어진 PEG 전구체 용액을 지름 0.5 cm의 실리콘 재료의 원형몰드(mold)에 붓고 100W 자외선에 노광시켰다. 자외선에 노출된 PEG 전구체는 라디칼 중합반응으로 인해 망상구조를 형성하게 된다. 구체적으로 양 말단에 비닐기를 가진 PEG-DA는 자외선에 노출되면 광개시제로부터 생성된 라디칼이 비닐기의 탄소이중결합을 끊으면서 교차결합이 생성되어 망상구조를 형성하게 되며, 그 안에 효소와 양자점을 가둘 수 있다.

[0060] 도 4에 나타낸 것과 같이, 티로시나아제의 크기는 11  $\mu\text{m}$ , 양자점의 크기는 8  $\mu\text{m}$ , 효소와 양자점의 혼합물 크기는 7 ~ 15  $\mu\text{m}$ , 효소와 양자점의 접합물 크기는 40 ~ 70  $\mu\text{m}$ 로 확인되었으며, PEG 하이드로젤 내부에 고정되었을 경우 접합물이 혼합물에 비해 내부에서 빠져나가는 문제를 보완할 수 있다. 또한, 이러한 방법으로 제작되는 PEG 하이드로젤은 지름 0.5 cm 원형몰드 뿐 아니라 원하는 모양, 크기를 달리하여 제작할 수 있으며 PEG-DA의 분자량을 변화시키며 메쉬사이즈를 조절할 수 있다는 장점이 있다.

[0061] 또한, 본 발명의 접합물이 PEG 하이드로젤에 고정화되었음을 확인하기 위하여 형광이미지를 통해 확인하였으며, 그 결과 도 5에 나타내었다.

#### [0062] 실시예 5 및 6: 광가교제의 분자량(Mw 575, 8000)에 따른 PEG 하이드로젤 이용하여 시간에 따른 소광 효과 측정

[0063] PEG-DA(분자량 575, 8000)을 이용하여 실시예 3와 같은 방법으로 지름 0.5 cm의 하이드로젤을 만든 후 페놀의 농도에 따라 양자점의 소광 효과를 형광분광분석기를 이용하여 측정하였다. 10  $\mu\text{M}$  농도의 페놀을 이용하여 시간에 따른 소광 효과를 확인할 수 있었는데, 이를 도 7, 도 8에 나타내었다.

[0064] 도 7은 PEG-DA(분자량 575)을 이용하여 접합물과 혼합물 각각을 PEG 하이드로젤 내부에 고정하고 이를 이용하여

시간에 따라 확인한 결과, 접합물의 소광 효과가 혼합물의 소광 효과에 비해 20% 더 높게 나타났다.

[0065] 마찬가지로, 도 8은 PEG-DA(분자량 8000)을 이용하여 접합물과 혼합물 각각을 PEG 하이드로젤 내부에 고정하고 이를 이용하여 시간에 따라 확인한 결과 접합물의 소광 효과가 혼합물의 소광 효과에 비해 30% 더 높게 나타났다.

[0066] 이는 티로시나아제와 양자점의 접합물은 티로시나아제와 페놀 사이의 반응이 빠르게 진행되어 중간 물질인 퀴논의 생성이 많아지고 바로 옆에 존재하는 양자점의 전자를 빼앗아 보다 빠른 양자점의 소광 효과를 측정하였다. 또한, PEG 하이드로젤 분자량이 높을수록 메쉬사이즈가 증가하여 기질인 페놀과 만날 수 있는 공간이 많아지게 되므로 티로시나아제와 양자점 모두 페놀과 빠르게 반응하여 더 높은 소광 효과를 나타낸다.

[0067] 결론적으로 용액상태, PEG-DA의 분자량에 따라 페놀 측정 결과 모두 같은 결과로 티로시나아제와 양자점의 접합물을 사용하였을 경우가 더 높은 민감도를 나타내었다.

표 2

구분	종류	측정 조건
실시예 5	PEG-DA 분자량 575	시간에 따라서 소광 효과 측정 (0.5, 10, 15, 20, 25, 30분)
실시예 6	PEG-DA 분자량 8000	시간에 따라서 소광 효과 측정 (0.5, 10, 15, 20, 25, 30분)

[0069] 실시예 7: 티로시나아제와 양자점의 접합물 안정성 측정

[0070] PEG-DA(분자량 575) 500  $\mu$ l와 티로시나아제와 양자점의 접합물 300  $\mu$ l, 증류수 200  $\mu$ l, 광중합개시제 10  $\mu$ l를 넣고 혼합하여 실시예 3 방법으로 하이드로젤을 제작하였다. 이렇게 만들어진 PEG 하이드로젤을 페놀 10  $\mu$ M의 농도와 반응하여 일주일간 소광 효과를 측정하였고, 이를 도 9에 나타내었다.

[0071]

[0072] 실시예 8: 채널 안에서 PEG 하이드로젤 어레이를 만드는 방법

[0073] PEG-DA(분자량 575) 500  $\mu$ l와 티로시나아제와 양자점의 접합물 300  $\mu$ l, 증류수 200  $\mu$ l, 광개시제 10  $\mu$ l를 넣고 혼합하여 PEG 전구체를 만들고 이를 실시예 3 방법으로 하이드로젤을 제작하였다. 채널은 여섯 개의 채널을 포함하고 있으며, 너비 100  $\mu$ m, 채널 간의 간격 또한 100  $\mu$ m를 나타내었다. 여섯 개의 채널에 모두 PEG 전구체를 주사기 펌프를 이용하여 주입시킨 후 크기가 100  $\mu$ m인 줄 패턴을 채널 위에 놓고 실시예 4와 같은 방법으로 여섯 개의 채널에 크기 100  $\mu$ m의 PEG 하이드로젤 패턴을 제작하였고, 이를 도 10에 나타내었다. 양자점의 빛 누출 파장은 655 nm이며, 붉은색 형광 이미지를 얻을 수 있었다.

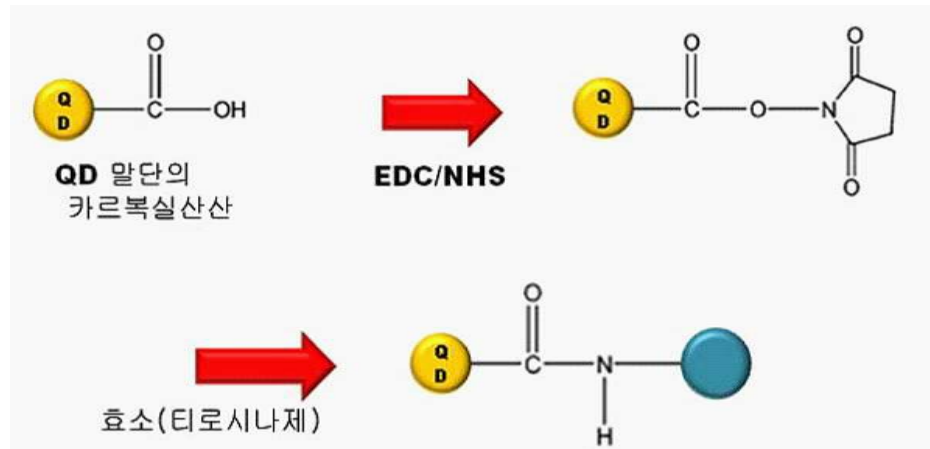
[0074] 실시예 9: 페놀 농도에 따라 채널 안에서 PEG 하이드로젤 어레이의 소광 효과 측정

[0075] 상기 실시예 8에서 사용한 채널 안에서 PEG 하이드로젤 어레이를 제작한 후 페놀 농도(0, 5, 10, 20, 50  $\mu$ g/ml)에 따라 PEG 하이드로젤 어레이 내부에 고정된 양자점의 소광 효과를 도 11 및 도 12에 나타내었다.

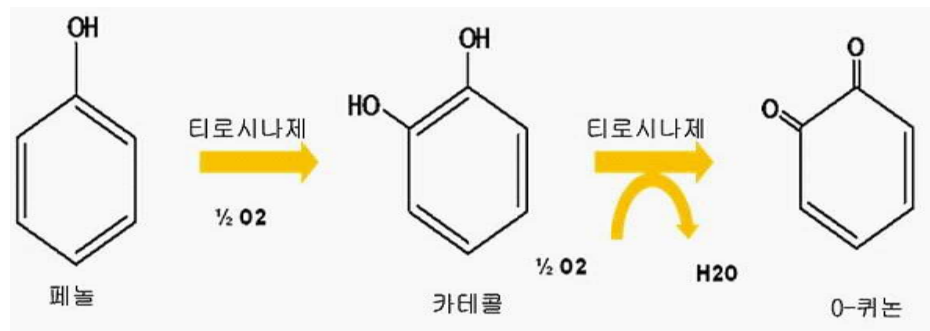
[0076] 페놀의 농도가 높을수록 소광 효과가 큰 것을 확인할 수 있었으며, 이를 스탠다드로 다른 하나의 채널에는 페수와 반응하여 소광 효과를 보인 양자점을 이용하여 페수에 포함된 페놀의 양을 측정할 수 있는 페놀 센서를 개발하였다.

# 도면

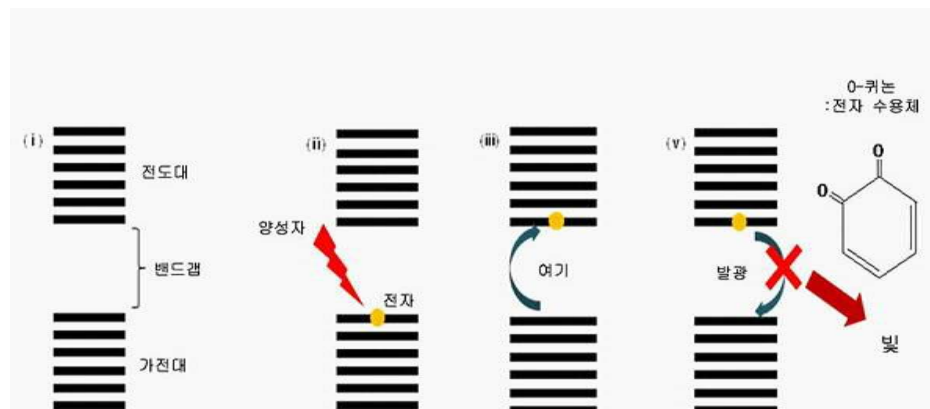
## 도면1



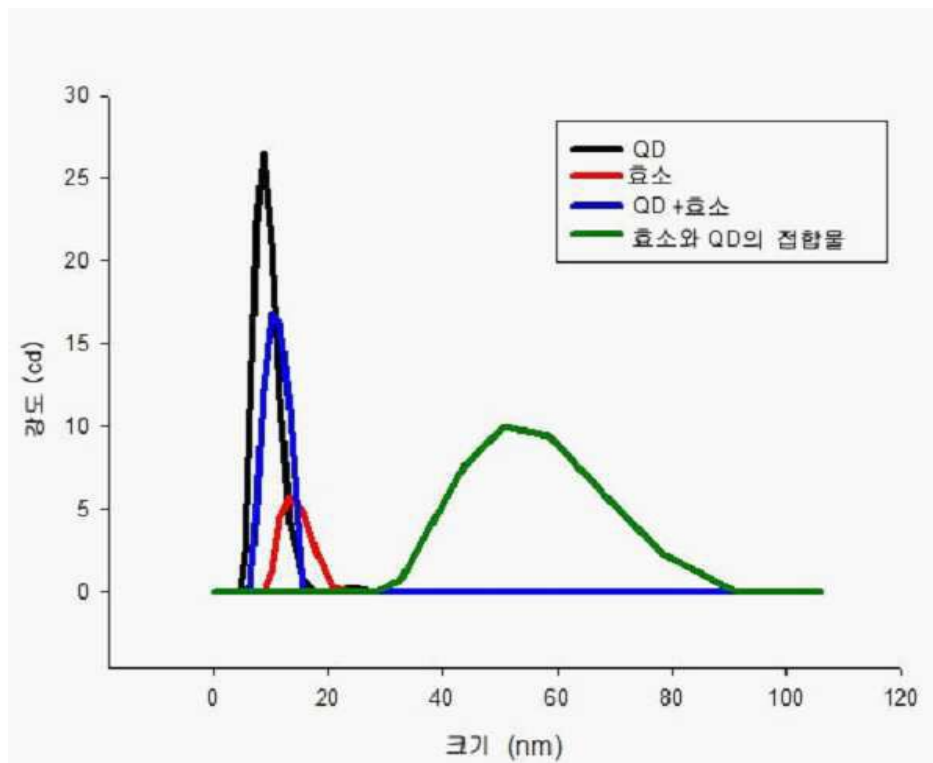
## 도면2



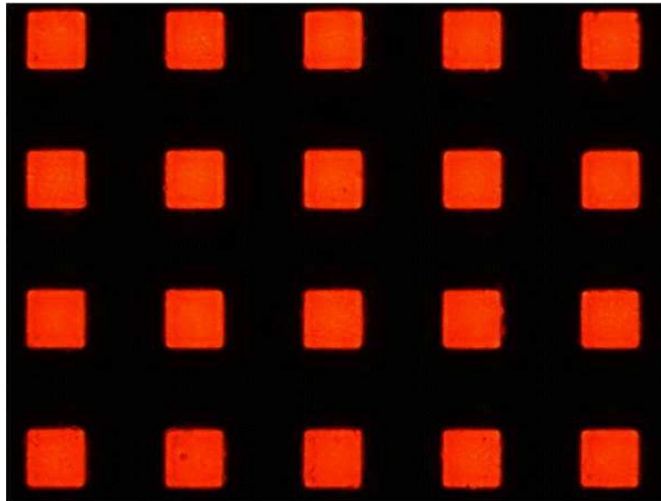
## 도면3



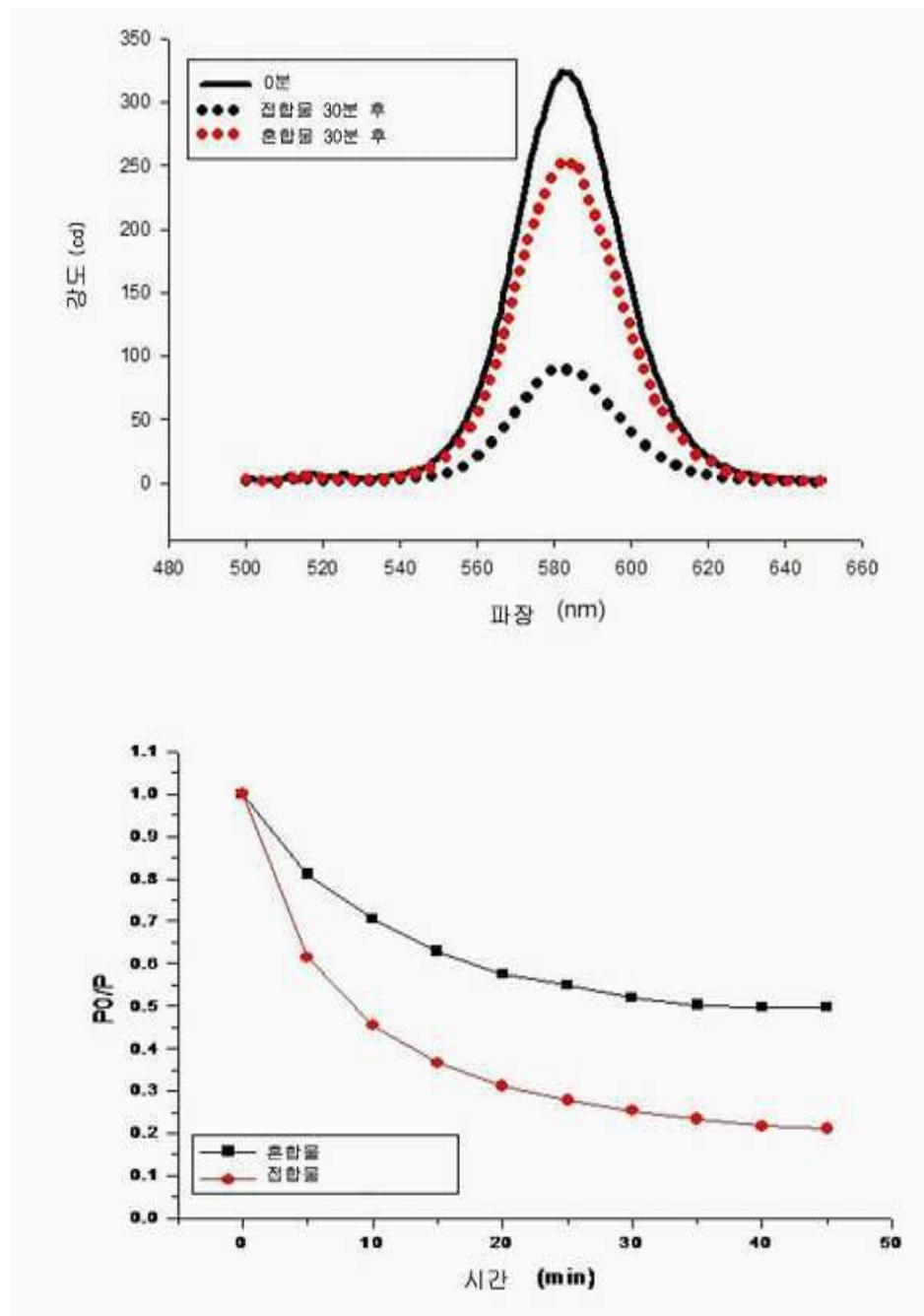
도면4



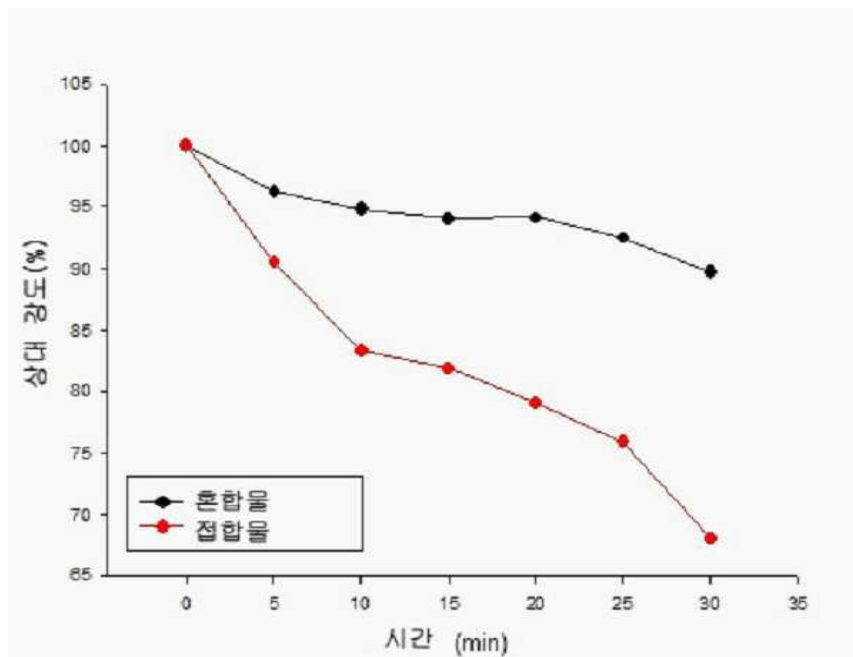
도면5



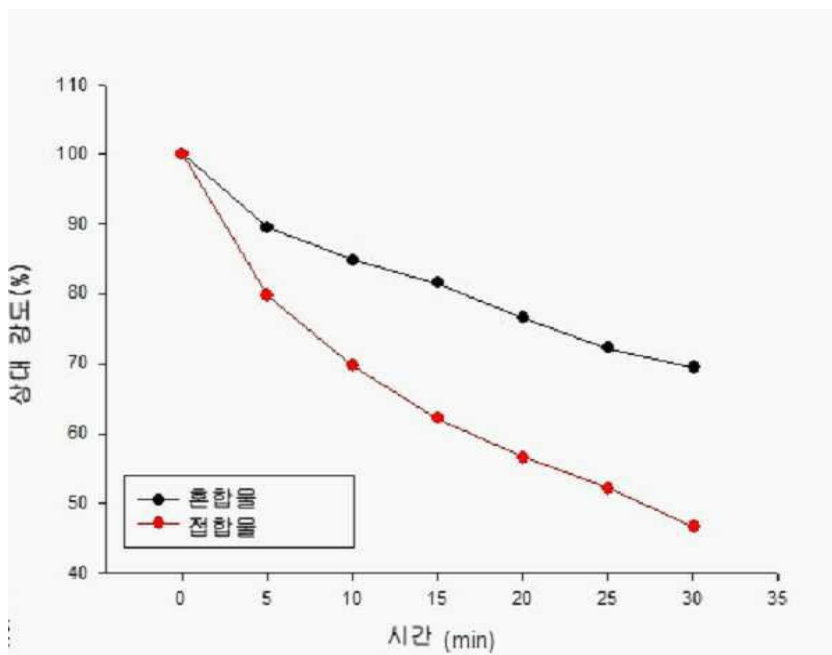
도면6



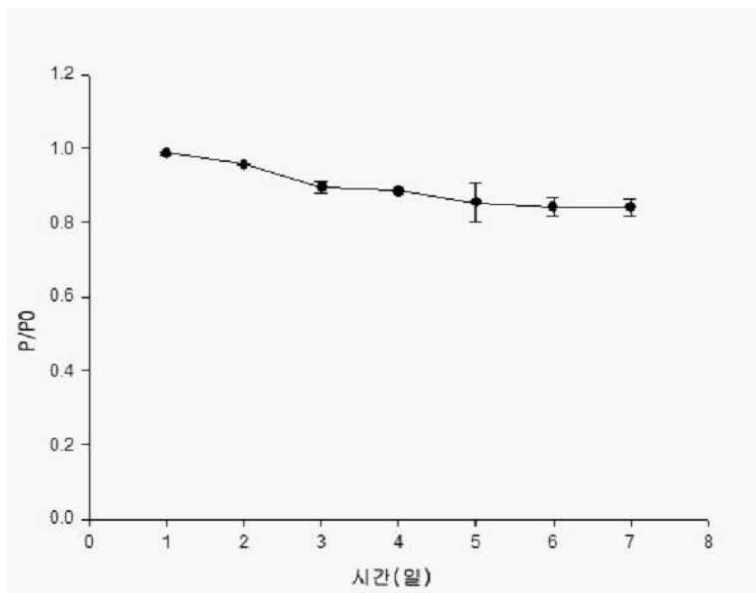
도면7



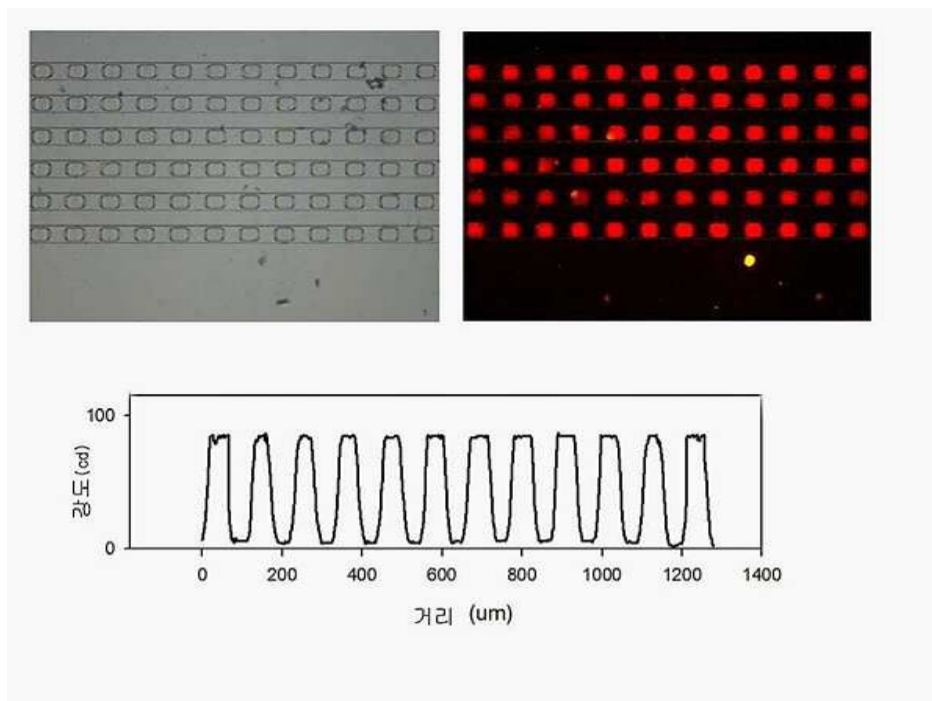
도면8



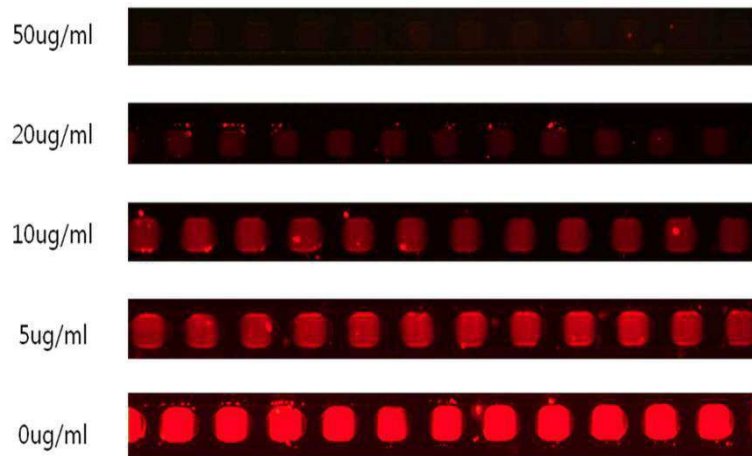
도면9



도면10



도면11



도면12

