

논문 93-05

감광성 수용성 고분자를 이용한 Lipid 센서의 제조

朴利淳*, 金起賢**, 孫炳基***

Fabrication of Lipid Sensor Utilizing Photosensitive Water Soluble Polymer

Lee Soon Park, Gi Hyeon Kim, and Byung Ki Sohn

요 약

Si₃N₄ 박막의 코팅된 pH-ISFET의 게이트 부위 위에 lipase 효소를 고정화하여 FET(field effect transistor) 형 지질(lipid) 센서를 제조하였다. 효소 고정화막 형성 물질로는 수용성 고분자인 polyvinyl alcohol(PVA)에 감광성기인 1-methyl-4-(formylstyryl) pyridinium methosulfate(SbQ)를 결합시킨 PVA-SbQ를 사용하였다. PVA-SbQ 수용액(SbQ 1mole%, 10 wt%) 200 μL, bovine serum albumin (BSA) 7.5 mg, lipase 10 mg으로 구성된 현탁액을 사용한 사진식각(photolithographic) 공정의 최적 조건은 피막의 상온 진공 건조 시간 45분, spin coater의 회전수 5,000~6,000 rpm, UV 노광시간 20~30초, 증류수 현상 시간 30~40초로 나타났다. 이렇게 구성된 지질 센서는 triacetin을 지질 시료로 하였을 때 10~100 mM의 농도 범위에서 직선성의 검정선을 나타내었다.

Abstract

A FET(field effect transistor) type lipid sensor was fabricated by immobilizing lipase enzyme on the gate of pH-ISFET(SiO₂/Si₃N₄). A water soluble polymer, polyvinyl alcohol(PVA) was modified with 1-methyl-4-(formylstyryl) pyridinium methosulfate(SbQ) to give a photosensitive membrane(PVA-SbQ) in which lipase was immobilized. The optimum photolithographic conditions were ; spin coating speed 5,000~6,000 rpm. UV exposure time 20~30 seconds, developing time in water 30~40 seconds, and vacuum drying time 45 min. at room temperature with the suspension containing PVA-SbQ aqueous solution(SbQ 1mol%, 10 wt%) 200 μL, bovine serum albumin (BSA) 7.5 mg, and lipase 10 mg. The lipid sensor showed good linear calibration curve in the range of 10~100 mM triacetin as a lipid sample.

I. 서 론

Biosensor는 생물이 가진 우수한 분자 식별 능력

을 이용해 생체 관련 물질을 정확하게 그리고 단시간에 측정해 내는 소자로서^[1] 최근 그 중요성이 증가되고 있으며 그 중에서 반도체 제조 공정을 활용하여 제조된 FET형 반도체 바이오 센서가 많은 주목을 받고 있다. FET형 바이오 센서는 ISFET(ion selective field effect transistor)와 생체 기능성막을 결합한 소자로서 1975년 S. Moss와 J. Janata가^[2] penicillinase 효소를 ISFET의 게이트 위에 고정화한 감지막을 사용하여 페니실린의 농도를 측정함을 계기로 많은 연구가 뒤따랐다.^[3] 최근에는 Si₃N₄ 박막을 이용한 pH-ISFET 바탕소자를 이용하여 urease, glucose oxidase 등의 효소를 고분자막에 고정화한 요소 및 글루코스 측정용 바이오

* 正會員：慶北大學校 高分子工學科
(Dept. of Polymer Science, Kyungpook Nat'l Univ.)

** 學生會員：慶北大學校 高分子工學科
(Dept. of Polymer Science, Kyungpook Nat'l Univ.)

*** 正會員：慶北大學校 電子工學科
(Dept. of Electronics, Kyungpook Nat'l Univ.)
<접수일자 : 1993년 2월 27일>

※ 본 연구는 센서기술연구소의 연구비 지원으로 수행되었음.

센서들의 실용화에 관한 연구가 진행되고 있다.

Biosensor의 구조는 분자를 인식하는 기능성막과 인식된 결과를 전기적 신호로 내보내는 변환기로 구성되어 있다. Biosensor에 있어서 기능성막 즉 감지막의 형성은 감도(sensitivity), 응답 시간(response time)에 직접적인 영향을 줄 뿐 아니라 센서의 저장 및 운용 안정성에도 관계가 있다.^[4] 효소는 특정 물질을 선택적으로 식별할 수 있으나 생체 활성 물질이므로 되풀이해서 사용하기 어렵다. 따라서 효소를 고분자 혹은 무기 지지체에 고정화하는 기술이 필요하게 되었다.

몇 가지의 효소를 고정화시키는 방법중에서 효소와 직접 결합시키는 것을 배제함으로써 효소에 미치는 영향을 최소화할 수 있고, ISFET gate 위에 미소 pattern이 가능한 점 및 IC 공정에 적용가능하다는 점을 들어 UV광에 의한 entrapment 방법이 바이오 센서의 감지막 형성에 유용하게 쓰인다.^[5] 감지막 물질로는 효소를 균일하게 분산시킬 수 있으며, 생체 물질인 효소에 대한 독성이 적은 수용성 고분자를 사용하는 것이 바람직하다고 알려져 있다. 본 연구에서는 반도체 chip위에 미세한 pattern 형성이 가능한 광감성 수용성 고분자 물질을 제조하고, 이를 이용하여 UV 광원에 의한 사진식각(photolithography)법으로 lipase 효소를 고정화한 지질(lipid) 센서의 제조 및 특성에 대해 조사하였다.

II. 실험

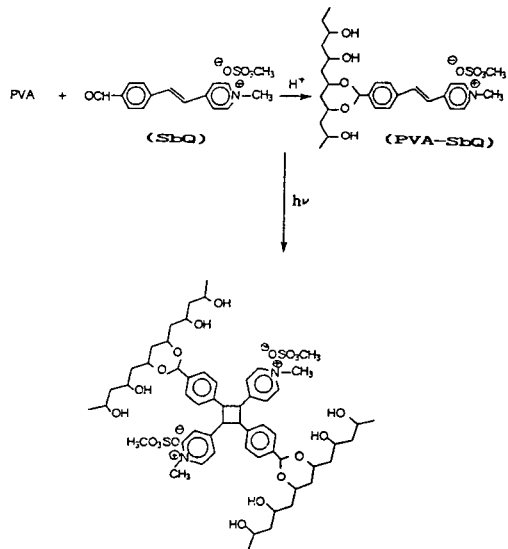
광감성기인 1-methyl-4-(formylstyryl)pyridinium methosulfate의 합성에 쓰인 terephthaldehyde, γ -picoline, dimethyl sulfate는 각각 시약급(Aldrich Chemical Co.)을 정제하지 않고 그대로 사용하였으며, 막 형성 고분자로서 polyvinyl alcohol(Aldrich Chemical Co., 88% hydrolyzed, MW=77,000~79,000)을 사용하였다. 효소로서는 lipase(L-9767, E.C 3.1.1.3, 17300 units/mg solid, Sigma Chemical Co.)를 사용하였으며, 또한 BSA(bovine serum albumin)는 Sigma Chemical Co.의 시약급을 사용하였다. 광감성기인 stilbazolium group(SbQ)으로 치환된 polyvinyl alcohol, 즉 PVA/SbQ계의 막 형성 실험에는 spin coater, vacuum desiccator, Karl-Suss사의 mask aligner를 사용하였다. 박막 형성 실험에서 현상 용액으로는 탈이온수를 사용하

였으며, 건조된 박막의 두께 측정을 위해서는 Tencor Instrument사의 α -step을 사용하였다. 또한 합성된 물질의 확인을 위해서 FT-IR(MIDAC), ¹H NMR을 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 광감성 고분자 PVA-SbQ의 감지막 형성 성질

지질 분해 효소인 lipase를 고정화하는 감지막 물질로서 수용성 고분자인 polyvinyl alcohol(PVA)를 택하고, 이를 ISFET의 게이트 위의 미세부위에 사진식각기술을 이용하여 감지막을 형성하기 위하여 PVA를 광감성기인 1-methyl-4-(formylstyryl) pyridinium methosulfate(SbQ)와 결합을 시켜서 광감성 수용성 고분자 PVA-SbQ를 만들었다. PVA-SbQ의 UV광에 의한 가교화 반응은 Scheme 1과 같으며 PVA-SbQ의 합성에 대하여는 발표된 바 있다.^[6]



Scheme 1. Stilbazolium(SbQ) 광감성기를 갖는 PVA-SbQ의 합성 및 광 가교반응

Scheme 1. Preparation and photocrosslinking of PVA modified with stilbazolium(SbQ) group, PVA-SbQ.

PVA-SbQ 광감성 고분자의 막 형성 성질을 보기 위하여 먼저 효소를 포함하지 않은 상태에서 사진식각 공정 조건을 조사하였다. PVA에 SbQ를 약 1.0 mol%

도입한 PVA-SbQ의 농도를 7.0, 8.5, 9.0, 10.0 wt%로 바꾸면서 수용액을 제조하고, UV 노광시간을 20초, 탈 이온수에서의 현상 시간을 20초로 고정한 채, spin coater의 회전수를 2,000에서 5,000 rpm으로 달리해 박막의 두께 변화를 측정하였다. 막의 두께는 rpm이 증가함에 따라 감소함을 볼 수 있었으며, PVA-SbQ 10 wt% 용액의 경우 1.25~1.95 μm 두께 범위의 박막을 얻을 수 있었다. 여기에서 한 가지 주의할 점은 통상의 반도체 공정에서 photoresist를 사용할 때는 spin coating 후, 80°C 정도에서 prebake하고, UV 노광을 하지만 바이오 센서용 감지막의 경우에는 감지막 내에 효소가 있으므로 상온에서 진공 건조를 해야 할 필요가 있다는 것이다. PVA-SbQ 수용액을 사용한 일련의 기초 실험으로 부터 효소 및 BSA를 포함하지 않는 경우 최적 사진식각 공정 조건은 spin coater의 회전수 2,000~3,000 rpm, 진공 건조 시간 30분~1시간, UV 조사 시간 20~30초, 탈 이온수에서의 현상 시간 20~30초가 적정임을 알았다.

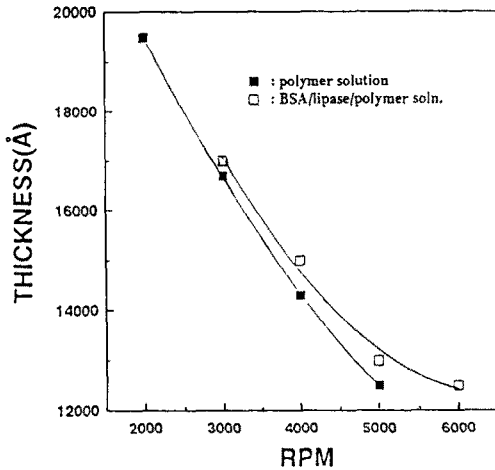


그림 1. PVA-SbQ(■) 및 BSA/lipase/PVA-SbQ(□) 용액의 박막 두께에 미치는 spin coating 속도의 영향

Fig. 1. Effect of spin coating speed on the film thickness of the PVA-SbQ solution(■) and BSA/lipase/PVA-SbQ solution(□).

다음으로 PVA-SbQ 수용액에 지질 분해 효소인 lipase와 BSA를 첨가하여 감지막 형성 조건을 조사하였다. PVA-SbQ 수용액 200 μL 에 BSA 7.5 mg, lipase 10 mg을 넣고 vortex mixer로 10분간에 걸쳐서 잘 분산시킨 후 spin coater의 회전수를 3,000~6000rpm

으로 변화시키면서 얻은 감지막의 두께 변화를 효소를 넣지 않은 경우와 비교하여 Fig. 1에 나타내었다.

Fig. 1에서 BSA와 lipase를 첨가한 경우, 막의 두께가 첨가하지 않은 경우보다 두껍게 나타났는데 이것은 현탁액의 점도 증가에 기인한 것으로 생각되었다. BSA와 lipase를 첨가한 경우, 사진식각 실험으로 부터 spin coating 회전수를 3,000 rpm으로 할 때 막은 형성되나, 현상 후에 씻겨 나간 곳이 많음을 볼 수 있었는데, 이것은 막이 너무 두꺼워져 UV 노광시 가교화가 완전히 진행되지 못한 결과로 판단되었다. 현미경으로 관찰하여 깨끗한 박막을 형성하기 위해서는 회전수가 5,000~6,000 rpm이 되어야 함을 확인하였다. UV 조사전 진공 건조 시간 및 UV 조사 시간은 BSA와 lipase를 첨가하여도 PVA-SbQ 수용액 만으로 된 경우와 큰 차를 보이지 않아서 각각 30분~1시간, 30초 정도로 유사하였다. 그러나 현상 시간은 BSA와 lipase를 첨가한 감지막의 경우가 30~40초 정도로 더 긴 현상 시간이 요구되었는데, 이것은 BSA와 lipase를 첨가한 복합막(composite membrane)의 증류수에 대한 용해도가 PVA 단독 막의 경우보다 저하된 데에 기인한 것으로 생각되었다.

2. 지질(Lipid) 센서의 구성 및 특성

지질 센서의 바탕 소자인 pH-ISFET는 문헌의 방법^[7-9]에 따라 제조된 것을 사용하였다. 앞 절의 감광성 수용성 고분자 PVA-SbQ를 이용한 지질 센서 감지막 형성 과정이 Fig. 2에 나타나 있다. 효소 감지막을 pH-ISFET의 게이트 부분($\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$) 위에 올리기 전에 먼저 바탕소자의 수소 이온 감도를 증가시키기 위하여 HF(1 : 50) 수용액으로 1분 정도 처리하고 탈 이온수로 세정하였다. PVA-SbQ 수용액 200 μL 에 BSA 7.5 mg, lipase 10 mg을 포함하는 현탁액을 pH-ISFET chip위에 6000 rpm의 회전수로 spin coating한 후, 진공 데시케이터를 사용하여 45분 동안 진공건조시켰다. 감광막이 도포된 chip을 Karl-Suss사제 mask aligner로 노광한 다음, 게이트 이외의 부분을 탈 이온수로 용해 제거하였다. Fig. 3에서 지질 센서 감지막이 게이트 부위에 형성되었음을 볼 수 있다. 이렇게 만든 소자를 잘라 헤더(header)에 붙이고, 결선을 한 다음, 게이트를 제외한 나머지 부분을 실리콘 수지로 봉지하였다.

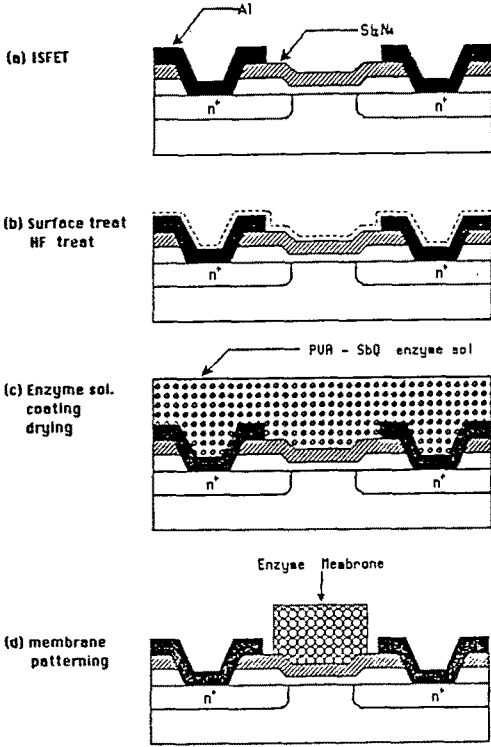


그림 2. PVA-SbQ 감광성 고분자를 이용한 지질 센서 제조 공정도
Fig. 2. Cross-sectional views of the lipid sensor fabrication process using PVA-SbQ photosensitive polymer.

제조된 지질 센서를 이용한 지질 농도의 측정에 있어서 용액의 온도는 체온을 기준으로 하여 36.5°C로 유지하였다. 측정에 사용한 합성 생리수 용액은 탈이온수 1L당 0.137M NaCl, 0.0027M KCl, 0.008M Na₂HPO₄, 0.0015M KH₂PO₄를 포함하는 완충용액^[12]으로서 pH는 7.4이었고, 기준 전극으로는 Ag/AgCl 전극을 사용하였다. 지질의 한 종류인 triacetin이 지질 센서의 lipase 효소와 반응하면 아세트산이 생성되어 수소 이온이 유리되고, 이것이 Scheme 2에 나타난 것과 같이 pH-ISFET 바탕소자에 전압 변화를 일으키게 된다.^[10,11] 생체 활성 물질인 지질은 분자구조가 다양하나 본 실험에서는 수용액에 용해성이 좋은 triacetin을 선택하여 지질 센서의 특성을 조사하였다. Triacetin 50 mM에 대한 출력 전압은 Fig. 4에 나타난 것과 같이 약 3분 후에 포화 상태에 도달하였는데, 이것은 triacetin 및 반응 결과 생성된 수소이온의 이중

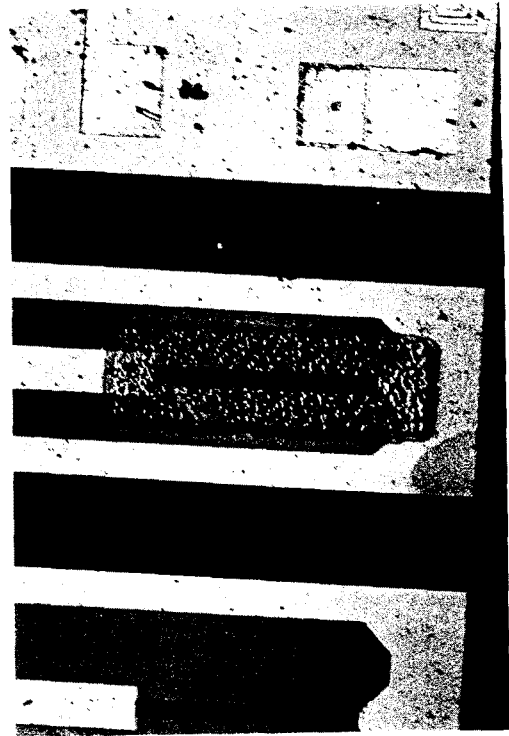
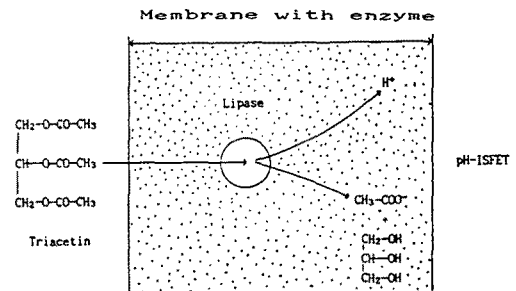


그림 3. PVA-SbQ 막에 고정화된 BSA/lipase의 현미경 사진
Fig. 3. Microscopic photograph of BSA/lipase immobilized PVA-SbQ membrane.

확산을 고려할 때, 비교적 빠른 응답 특성이라고 생각되었다.

Triacetin 농도(mM)와 출력 전압(mV)과의 관계는 Fig. 5에 나타난 것과 같이 triacetin 농도 10~100 mM의 범위에 걸쳐 직선성을 나타내었으며, 이로부터 지질(triacetin) 센서의 성능을 확인할 수 있었다.



Scheme 2. 지질 센서의 triacetin 지질과의 반응
Scheme 2. Reaction of lipid sensor with triacetin lipid.

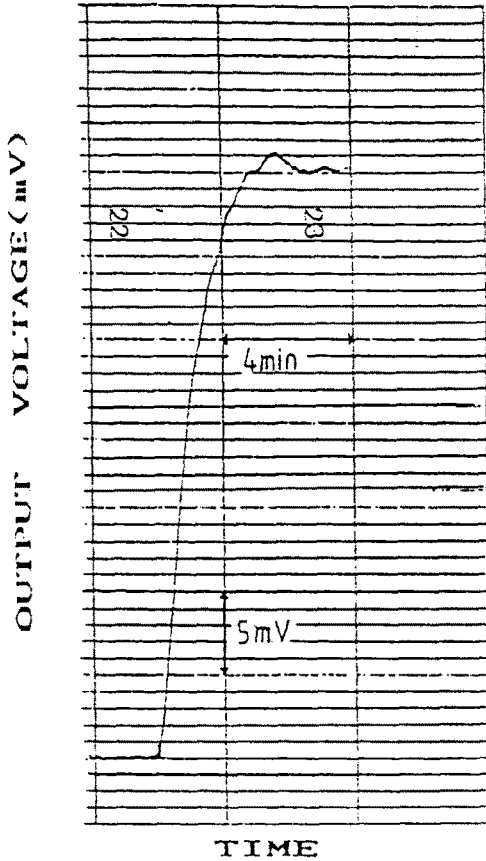


그림 4. Triacetin(50mM) 지질 용액의 응답 특성
 Fig. 4. Time response of lipid sensor with triacetin (50mM) lipid solution.

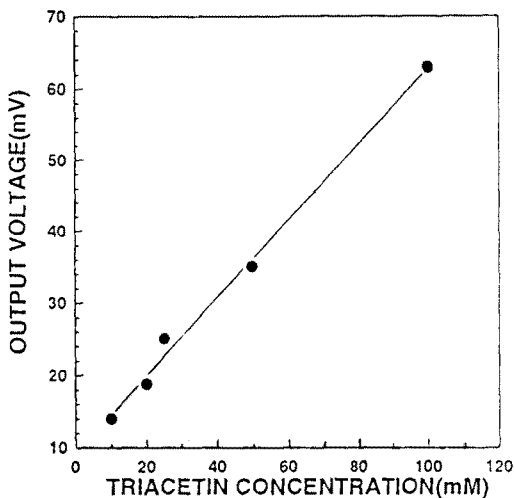


그림 5. Triacetin 지질을 이용한 지질 센서의 검정 곡선
 Fig. 5. Calibration curve of lipid triacetin sensor.

IV. 결 론

pH-ISFET 바탕소자의 게이트($\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$) 부위 위에 지질(lipid) 분해 효소인 lipase를 고정화시킨 감지막을 형성하여 FET형 지질 센서를 제조하였다. 감지막 형성 물질로는 감광성 수용성 고분자인 PVA-SbQ를 사용하였으며, 사진식각 공정 조건을 확립하였다. PVA-SbQ 수용액(SbQ 1 mol%, 농도 10 wt%) 자체의 막 형성 조건은 spin coater의 회전수 2,000~3,000 rpm, UV 노광시간 20~30초, 탈 이온수 속에서의 현상 시간이 20~30초 인데 비해 PVA-SbQ 수용액 200 μL 에 BSA 7.5 mg 및 lipase 10 mg을 포함하는 현탁액의 경우, 최적 막 형성 조건은 5,000~6,000 rpm, 노광 시간 20~30초, 현상시간 30~40초였다. 이상의 조건을 사용하여 제조된 지질 센서는 지질(lipid)의 하나인 triacetin에 대하여 10~100 mM 범위에서 출력 전압이 직선상의 관계를 나타냄으로 부터 반도체 제조공정에 사용되는 사진식각 기술을 이용하여 센서의 규격, 양산 가능성을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

- [1] G.A.Rechnitzs, *Chem. and Eng. News*, September 5, 24, 1988.
- [2] S.Moss and J.Janata, *Anal.Chem.*, 47, 2238, 1975.
- [3] 과학기술처, "半導體 Biosensor 開發 II," 1991.
- [4] 과학기술처, "ISFET에 관한 研究," 1988.
- [5] K.Ichimura, *J.of Polymer Science*, Polym.Chem. Ed., 2, 2817, 1984.
- [6] 박이순, 김기현, 하기룡, *Polymer(Korea)*, 투고 중
- [7] 이광만, "생체의 혈액 pH측정을 위한 ISFET 마이크로프로브," 경북대 박사학위논문, p. 25, 1986, 12.
- [8] 최광돈, "K⁺-ISFET의 제조 및 그 동작 특성," 경북대 석사학위논문, p. 9-13, 1984, 6.
- [9] 손병기, "감이온 전장효과 트랜지스트," 대한 전자공학회지, 18권(5호), pp. 22-29, 1981.
- [10] Y.Hanazato, N.Nakako, and S.Shiono, *Anal. Chim.Acta.*, 185, pp. 179-185, 1986.
- [11] Y.Hanzato, S.Shiono, N.Nakako, *IEEE, Trans.*

Ed., 36(7), p. 1303, 1989.

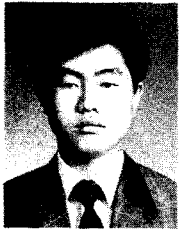
- [12] G. Palleschi, M. A. Nabirani, G. J. Lubrano, J. N. Ngwainhi, and G. G. Gulbault, *Anal. Biochem.*, 159, p. 114, 1986.

著 者 紹 介



朴 利 淳

1971년 2월 서울대학교 응용화학학과 졸업(공학사). 1973년 2월 서울대학교 대학원 화학공학과 졸업(공학석사). 1982년 5월 Univ. of So. Mississippi, Polymer Science, Ph. D. 1982년 7월~1987년 7월 Dresser Ind. Senior Chemist. 1987년 9월~현재 경북대학교 고분자공학과 부교수.



金 起 賢

1991년 2월 경북대학교 고분자공학과 졸업(공학사). 1993년 2월 경북대학교 대학원 고분자공학과 졸업(공학석사). 1993년 3월~현재 (주) 럭키 중앙연구소 연구원.



孫 炳 基

1960년 3월 경북대학교 사범대학 물리학과 졸업(이학사). 1962년 2월 경북대학교 대학원 물리학과 졸업(이학석사). 1981년 2월 동대학원 졸업(이학박사). 1976년~현재 경북대학교 전자공학 과교수. 1979년 8월~1980년 8월 University of Arizona, Microelectronics 연구소 객원교수. 1982년 5월~1984년 1월 한국전자기술연구소 위촉책임 연구원. 1983년 1월~1983년 2월 上智대학 전기전자과 객원교수. 1988년 7월~1990년 6월 경북대학교 전자기술 연구소 소장. 1990년 4월~현재 센서기술연구소 소장. 주관심분야: 센서공학전반.