

나노형상을 가진 표면플라즈몬공명 센서칩의 감도 개선 효과

조용진* · 김철진 · 김남수 · 김중태 · 김태은 · 김효섭¹ · 김재호¹
한국식품연구원, ¹아주대학교 분자과학기술학과

Effect of SPR Chip with Nano-structured Surface on Sensitivity in SPR Sensor

Yong-Jin Cho, Chul-Jin Kim, Namsoo Kim, Chong-Tai Kim, Tae-Eun Kim,
Hyo-Sop Kim¹, and Jae-Ho Kim¹

Korea Food Research Institute

¹Department of Molecular Science and Technology, Ajou University

Abstract

Surface plasmon resonance (SPR) which is utilized in thin film refractometry-based sensors has been concerned on measurement of physical, chemical and biological quantities because of its high sensitivity and label-free feature. In this paper, an application of SPR to detection of alcohol content in wine and liquor was investigated. The result showed that SPR sensor had high potential to evaluate alcohol content. Nevertheless, food industry may need SPR sensor with higher sensitivity. Herein, we introduced a nano-technique into fabrication of SPR chip to enhance SPR sensitivity. Using Langmuir-Blodgett (LB) method, gold film with nano-structured surface was devised. In order to make a new SPR chip, firstly, a single layer of nano-scaled silica particles adhered to plain surface of gold film. Thereafter, gold was deposited on the template by an e-beam evaporator. Finally, the nano-structured surface with basin-like shape was obtained after removing the silica particles by sonication. In this study, two types of silica particles, or 130 nm and 300 nm, were used as template beads and sensitivity of the new SPR chip was tested with ethanol solution, respectively. Applying the new developed SPR sensor to a model food of alcoholic beverage, the sensitivity showed improvement of 95% over the conventional one.

Key words: SPR, nano-structured chip, sensitivity, alcohol content

서 론

표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 현상은 20세기 초 Wood(1902)에 의해 처음으로 발견되었으나, 1970년대 후반에 들어서서 비로소 화학적 및 생물학적 물질의 계측에 이용되는 계측기술로 재평가 받았다(Homola et al., 1999; Cho, 2003). 특히, SPR 칩 표면에 항체와 같은 생물학적 결합물질을 고정화하여 SPR 칩을 바이오 트랜스듀서(biotransducer)로 활용하게 되면, 표면 플라즈몬 공명 현상은 생체분자나 미생물을 정성적으로 모니터링할 수 있을 뿐만 아니라 정량적으로 평가할 수 있는 바이오센서로 사용될 수 있다.

SPR 센서의 응용사례는 매우 다양하다. Cho(2003)는 SPR의 원리와 응용을 소개한 바 있는데, 대표적인 응용 사례로, 항원-항체 반응 측정, 계면에서의 생체분자 결합과 정 분석, 식품에서의 잔류농약, 항생제, 잔류약물 등의 검출을 소개하였다. 또한, 비등방성 생체막의 특성 분석, 단백질 결합에 관련된 반응속도 인자 분석, 인삼의 성분 분석, *Clostridium botulinum* 독소 측정, *Bacillus thuringiensis* 독소 측정, lectin 결합 분석, 대장균 농도 측정 등에 활용한 사례도 소개하였다.

SPR 센서의 주요 장점은 감도가 매우 높다는 점과 방사선 표지(radioactive label)나 형광 표지(fluorescent label)를 사용하지 않는 비표지식 센서라는 점이다. 그럼에도 불구하고 SPR 센서를 식품의 품질 평가를 위한 도구로 사용하기 위해서는 더 향상된 SPR 센서가 요구되고 있다. SPR 센서의 감도나 검출한계는 여러 가지 요인에 의해 영향을 받는다. SPR 칩의 재질로 금이나 은이 주로 사용되고 있는데 금속의 종류에 따라 센서의 감도는 다르게 나타난다. 또한 동일한 금속이라 하더라도 금속의 증착 두께에 의해

Corresponding author: Yong-Jin Cho, Head, Bio-Nanotechnology Research Center, Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea
Tel: +82-31-780-9136; Fax: +82-31-780-9257
E-mail: yjcho@kfri.re.kr
Received October 17, 2009; revised February 9, 2010; accepted February 10, 2010

서도 센서의 감도는 영향을 받는다(Homola et al., 1999).

그런데, SPR 센서에 영향을 주는 인자를 최적화하여 SPR의 감도를 향상시킬 수 있으나 기존 인자를 최적화하는 방법에 국한해서 SPR의 감도를 개선하기에는 제한적 결과를 얻을 수 밖에 없다. 표면이 매끄러운 평면을 가진 재래식 칩을 대체하여 나노 형상을 가지는 칩을 도입하는 방안은 SPR의 감도를 개선할 수 있는 좋은 시도로 소개되었다(Kim et al., 2007; Kim et al., 2008; Homola et al., 2008)

따라서, 본 논문에서는 재래식 SPR 칩을 이용하여 주류의 알코올 함량을 측정하였을 때 그 능력을 평가해 보았으며, 나노공기법을 이용하여 SPR 칩을 개량하였을 때 감도가 향상되는 정도를 평가하여 보고하고자 하였다.

재료 및 방법

재래식 SPR 칩을 이용한 시판 주류의 알코올 함량 측정

시판 주류의 알코올 함량을 측정하기 위하여 재래식 SPR 칩이 장착된 Spreeta®(Texas Instrument)를 사용하였다. Spreeta®는 광원, 센서 칩, 광 검출기 등 모든 구성요소가 일체화 되어 있어 사용하기가 편리한 장점을 가지고 있으나 다른 유형의 칩을 교체할 수 없는 단점을 가지고 있기도 하다. Fig. 1은 실험을 위해 구성한 SPR sensing unit이며, 높이 조절이 가능한 시료대, 암실, A/D 변환기 및 노트북 컴퓨터로 구성되었다. 실험에 사용된 Spreeta®는 840 nm의 LED 광원과 128 화소의 광다이오드(photodiode) 센서를 가지고 있다.

본 연구에서는 재래식 SPR 칩에 의한 알코올 함량 측정 능력을 평가하기 위하여 4종의 주류를 사용하였다. 실험에 사용한 4종의 주류는 소주(soju, 19-31% with 2% intervals), 청주(cheongju, 10-22% with 2% intervals), 이과두주(igwadaju, 38-50% with 2% intervals), 그리고 탁주(tacju, 10-22% with 2% intervals)이며, 주류에 함유된 알코올 이외의 물질의 영향을 살펴보기 위하여 여과막

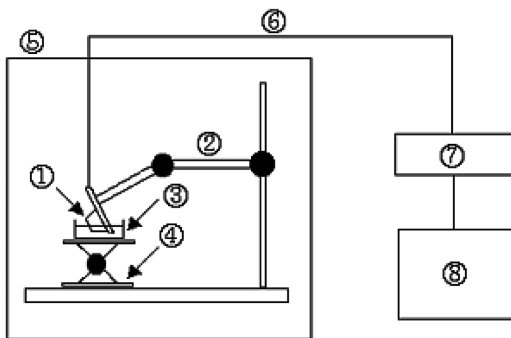


Fig. 1. An SPR sensing unit with Spreeta®: 1. SPR sensor; 2. height-and-angle-adjustable arm; 3. sample liquid; 4. height-adjustable platform; 5. dark room; 6. RS-232C; 7. A/D converter; 8. laptop computer.

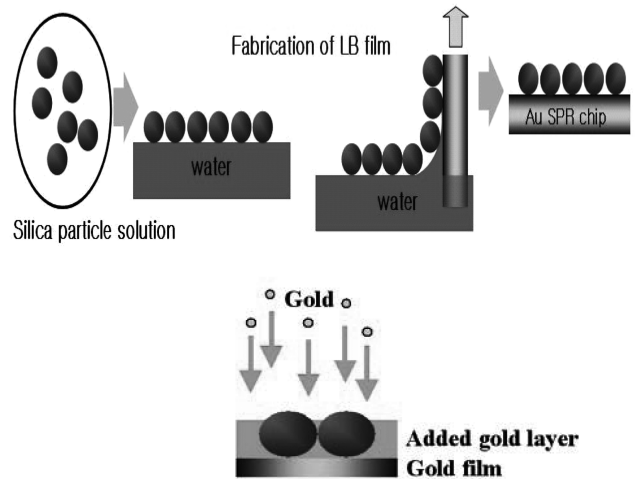


Fig. 2. Deployment of Si beads in water and their transfer onto gold film using Langmuir-Blodgett method (top) and adding a new gold layer by E-beam method (bottom).

(polytetrafluoroethylene membrane filter, 0.45 μm) 및 탄소 디스크(C₁₈, Sep-Pak)를 이용하여 전처리하여 그 효과를 살펴 보았다.

나노구조 SPR 칩 제조

나노구조 SPR 칩을 제조하기 위하여 Langmuir-Blodgett(LB) 기법을 응용하여 활용하였다(Fig. 2). 먼저 Si 나노입자의 표면이 티올기(thiol group)를 가지도록 개량하여 물 표면에 실리카 입자를 단층으로 전개한 후, Fig. 2와 같이 금 박막으로 이송하였다. 이때 이송 시 가한 압력은 40 mN/m로 하였다. 이와 같이 제조된 나노구조체 틀 위에 E-beam 방법으로 금을 추가로 증착한 후, 초음파를 5분 동안 가하여 실리카 나노입자를 떼어내면 표면이 나노구조체를 이루는 금 박막으로 만들 수 있게 된다. 후처리는 증류수로 세척하고 질소로 건조하여 완성된 나노구조 SPR 칩을 제조하였다.

나노구조 SPR 칩의 평가

재래식 칩과 개발된 나노구조 SPR 칩의 성능을 평가하기 위하여 Kretschmann geometry 원리에 의한 SPR sensing unit를 사용하였다(Fig. 3). 이 기기는 재래식 칩과 나노 칩을 용이하게 선택적으로 장착할 수 있는 장점을 가지고 있다. SPR sensing unit에서 프리즘(BK 7 glass, Sigma product)은 삼각형이며, 프리즘과 SPR 칩 사이에는 굴절률 1.516의 matching oil을 사용하였다. 광원은 실린더형 5 mW He-Ne 레이저(674.5 nm, Melles Griot)를 사용하였고 500:1 visible-optimized linear polarizer(Newport, 10-LP VIS)를 사용하여 편광을 얻었다. SPR 스캔을 위한 해상도와 속도는 각각 0.04° 및 0.2° s⁻¹이었다. 개발 칩의 성능평가를 위해 사용한 표준물질로는 모델 식품으로서 20% 에

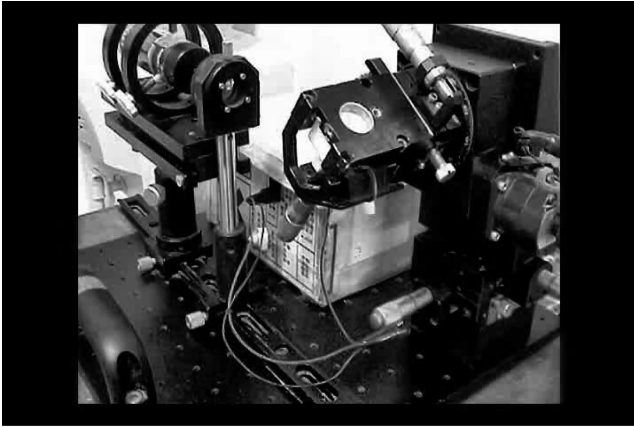


Fig. 3. An SPR sensing unit with Kretschmann geometry and goniometer.

탄올 용액을 제조하여 사용하였다.

한편, 원자힘 현미경(PSIA Instrument XE-100 system)을 이용하여 개발한 나노구조 칩의 표면을 영상으로 확인하였고, 5 kV의 조건으로 전자현미경(field emission scanning electron microscope, JEOL 6340F)을 사용하여 칩의 표면 영상을 획득하였다.

결과 및 고찰

술의 알코올 함량 평가

SPR 센서는 굴절계 기기의 일종으로서 센서 칩(금속 박

막)과 접촉하는 물질의 종류와 함량에 따라 매우 민감한 반응을 보이게 된다. 본 연구에서는 시판 중인 술의 종류별 알코올 함량을 측정하였다. Fig. 4는 재래식 SPR 센서를 이용하여 4종의 시판 술의 알코올 함량을 측정하는데 사용하기 위한 검량선을 나타낸 것이다. 그림에서 (a)는 소주에 대한 검량선을 나타낸 것으로서 1차 회귀식의 결정계수(R^2)가 0.992로 얻어졌다. 또한, 그림에서 (b)는 청주, (c)는 이과두주, 그리고 (d)는 탁주에 대한 검량선을 보여주고 있으며, 1차의 회귀식에서 결정계수는 각각 0.933, 0.918, 그리고 0.984로 나타났다. 즉, 소주의 검량선이 가장 높은 결정계수를 보인 반면에 이과두주의 결정계수가 가장 낮게 나타났다. 일반적으로 SPR 센서에서 측정을 위한 목표물질이 단일물질로 존재할 때 검량선이 가장 우수하게 나오게 된다. 그런데, 실험에 사용된 4종의 시판 술의 특징을 살펴보면, 알코올 이외의 용해물질 또는 현탁물질의 함유량이 가장 적은 술은 소주인 반면에 탁주는 그 함유량이 가장 많은 술임을 알 수 있다. 이러한 특징을 고려해볼 때, 소주의 검량선이 가장 높은 결정계수를 보인 현상은 당연한 결과로 해석될 수 있으나, 탁주의 검량선이 두 번째로 높은 결정계수를 보인 현상에 대해서는 향후 더욱 정밀한 연구가 필요하나 여기서 원리에 근거하여 대략적인 해석을 해 볼 수는 있다. SPR의 원리를 살펴볼 때, 센서 칩의 표면과 접촉한 물질에 대한 반응에서 유효한 측정 영역의 두께는 수 백 nm 이내이므로 알코올 분자가 센서 칩의 표면에서 다른 물질에 비해 배타적으로 작용하게 되면

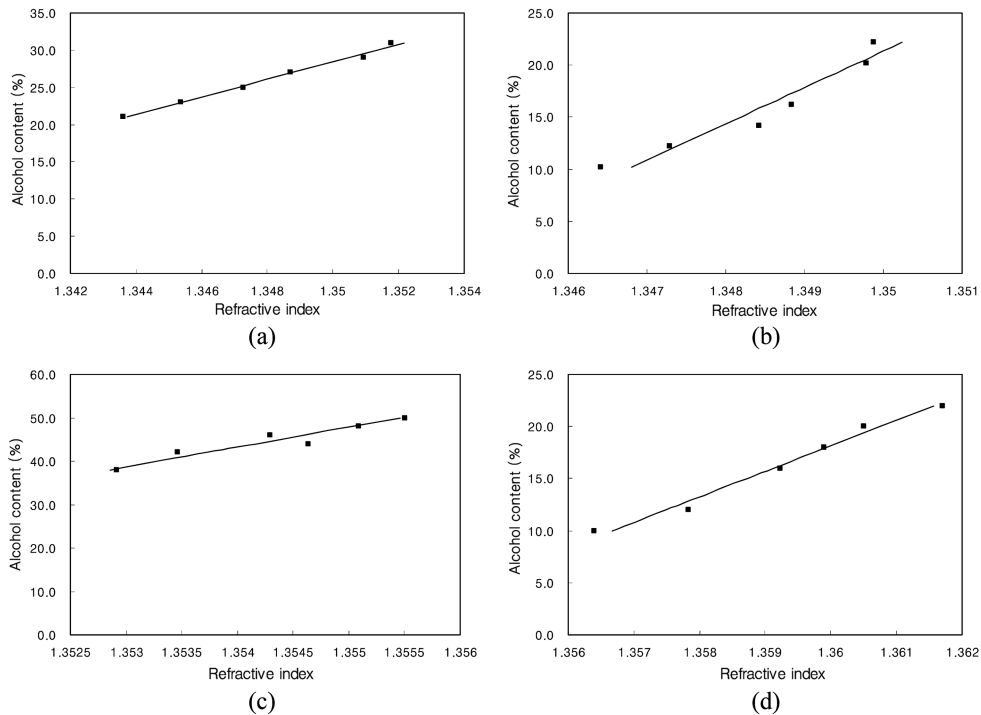


Fig. 4. Calibration lines for measurement of alcohol content by a conventional SPR sensor in commercial wine and liquor: (a) soju ($R^2=0.992$); (b) cheongju ($R^2=0.933$); (c) igwaduju ($R^2=0.918$); (d) taju ($R^2=0.984$).

Table 1. Statistical estimates in linear calibration models for measurement of alcohol contents when sample preparation was introduced

Sample preparation	Alcoholic beverage	Coefficient of determination	F value (Significant probability)	Standard error
N/A	<i>Soju</i>	0.992	470.8 (0.00002)	0.000325
	<i>Cheongju</i>	0.933	55.4 (0.00173)	0.000398
	<i>Igwaduju</i>	0.918	44.9 (0.00257)	0.000313
	<i>Tacju</i>	0.984	247.8 (0.00009)	0.000269
0.45 μ m PTFE membrane-filtered	<i>Soju</i>	0.970	127.9 (0.00034)	0.000441
	<i>Cheongju</i>	0.929	51.9 (0.00196)	0.000284
	<i>Igwaduju</i>	0.917	44.4 (0.00263)	0.000280
	<i>Tacju</i>	0.898	35.1 (0.00405)	0.000326
C_{18} disk-filtered	<i>Soju</i>	0.981	211.3 (0.00013)	0.000336
	<i>Cheongju</i>	0.970	127.7 (0.00034)	0.000229
	<i>Igwaduju</i>	0.939	61.8 (0.00141)	0.000272
	<i>Tacju</i>	0.947	72.1 (0.00105)	0.000315

외관상 목표 물질 이외의 물질이 많이 함유되어 있더라도 양호한 측정이 가능할 수 있기 때문에 Fig. 4와 같은 결과가 나올 수 있다고 해석할 수 있다. 즉, 유체역학적으로 볼 때 고분자 물질 또는 큰 입자가 형성하는 경계층 (boundary layer)은 저분자나 작은 입자가 형성하는 경계층보다 훨씬 크기 때문에 알코올 분자에 의한 SPR 현상의 발현은 외관상의 현탁도만으로 설명되지 않을 수 있다.

한편, 시판 술에는 알코올 이외에 다른 용해물질이나 현탁물질이 많기 때문에 본 연구에서는 목표 물질인 알코올 이외의 방해물질을 제거하기 위하여 PTFE 여과막과 C_{18} 디스크를 이용한 시료전처리 효과를 살펴보았다. Table 1은 시판 술 4종에 대해서 무처리 시료 및 여과막과 C_{18} 디스크로 전처리한 시료의 검량선 통계치를 나타낸 것이다. 표에서 보는 바와 같이, 시료를 전처리하여 목표 물질 이외의 다른 물질을 제거하였을 때 그 결과는 불리한 효과를 보여 오히려 시료를 처리하지 않고 그대로 측정하는 경우가 더 좋은 검량선을 얻을 수 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과가 나타난 이유는, 시료를 전처리 할 때 제거해야 하는 물질과 함께 알코올 분자도 일부 유실되기 때문인 것으로 판단된다.

나노형상 SPR 칩의 감도 개선 효과

Fig. 5는 본 연구에서 고안한 방법에 의해 제작된 나노형상 SPR 칩의 표면 특성을 전자현미경과 원자힘 현미경

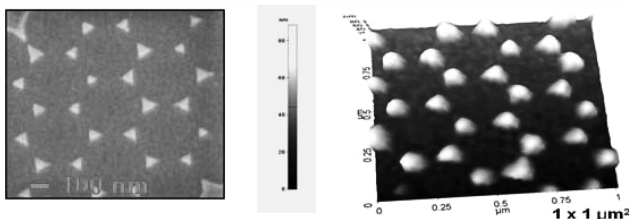


Fig. 5. Top-view SEM (left) and AFM (right) images of the nano-structured SPR sensor chip.

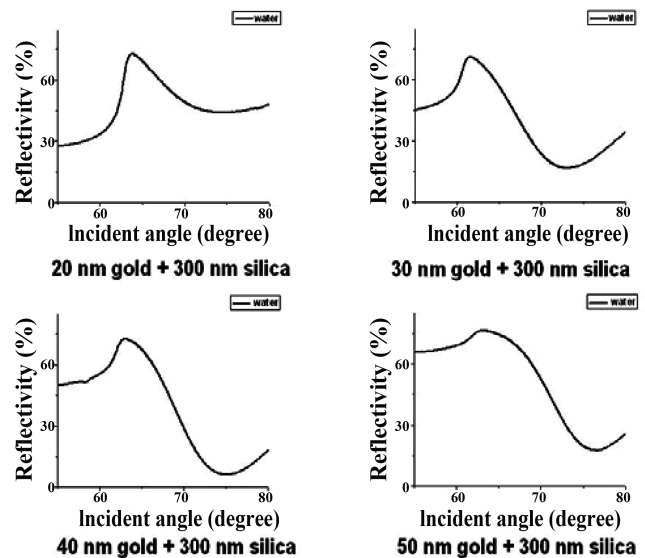


Fig. 6. SPR response curves of the nano-structured gold chips regarding base thickness of 20, 30, 40, and 50 nm when depth and periodical distance of basins are 20 nm and 300 nm, respectively.

으로 관찰한 영상을 보여주는 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 칩의 표면은 나노크기의 산과 골이 규칙적으로 잘 분포되어 있음을 알 수 있다. 본 연구에서는 바닥 금 박막의 두께, 나노형상의 크기 및 배열주기를 인자로 하여 SPR 칩의 감도 개선 효과를 분석하였다.

Fig. 6은 금 바닥 층의 두께가 20, 30, 40 및 50 nm로 달리하고, 바닥층 위에 깊이 20 nm, 배열주기 300 nm의 나노형상을 덧붙였을 때 모델 술(알코올 함량 20%)에 대한 SPR 곡선을 나타낸 것이다. 여기서 보면, 바닥층의 두께가 커질수록 전형적인 SPR 곡선의 형태를 보이는 것으로 나타났다.

Table 2는 Fig. 6과 같이 나타난 SPR 곡선에서 공명각(곡선의 최저점)의 이동 크기를 재래식 칩에 대한 상대적

Table 2. Relative sensitivities of the nano-structured SPR chips

Material	Thickness of base film (nm)	Depth of basin (nm)	Periodical distance of basins (nm)	Relative sensitivity of SPR chip	Remarks
Gold	30	30	130	1.00	
	30	50	300	1.26	
	40	30	130	1.37	
	40	50	300	1.48	
	50	30	130	1.55	
	50	50	300	1.58	
Gold	40	20	130	1.66	
	40	20	300	1.22	
	50	20	130	1.71	
	50	20	300	1.95	
Gold	50	N/A	N/A	1.00	Conventional type (Reference)

크기로 환산하여 상대감도(relative sensitivity)로 평가하였을 때 평가된 결과를 보여주는 것이다. 여기서 공명각의 이동은 모델 술(알코올 함량 20%)에 대한 공명각에서 증류수에 대한 공명각을 뺀 각도를 의미한다. 표에서 보는 바와 같이, 바닥층의 두께, 바닥층 위의 나노형상의 크기 및 배열주기에 따라 공명각의 이동은 다르게 나타났다. 공명각의 이동이 크게 일어난 것은 그 만큼 SPR의 감도가 향상되었음을 의미한다. 본 연구에서는 바닥층의 두께가 50 nm, 나노형상에서 골의 깊이가 20 nm, 나노형상의 배열 주기가 300 nm일 때 가장 큰 감도 향상을 보여 재래식 SPR 칩의 감도보다 95% 더 큰 감도를 가지는 것으로 분석되었다. 이와 같은 결과를 볼 때, 술의 알코올 함량을 측정하기 위해서는 나노형상 SPR 칩을 사용하는 것이 2배 정도의 높은 감도를 얻을 수 있음을 알 수 있다.

요 약

표면 플라즈몬 공명을 이용한 센서는 굴절계 기기의 일종으로서 높은 감도를 가질 뿐만 아니라 비표지 방식이라는 장점을 가지고 있다. 본 연구에서는 재래식 SPR 칩을 이용하여 시판 술 4종의 알코올 함량을 측정하였다. 또한, 재래식 SPR 칩의 감도를 개선하기 위하여 금 박막 위에 금으로 나노형상을 구축하여 나노형상 SPR 칩을 제조하여 모형 술에 대한 감도 개선 효과를 분석하였다. 재래식 SPR 칩을 이용하여 시판 술의 알코올 함량을 측정하기 위한 검량선을 개발하였을 때 시료를 전처리 하지 않고 그대로 측정하였을 때 가장 좋은 검량선을 얻을 수 있었다. 소주, 청주, 이과두주, 탁주 등 시판 술 4종에 대한 1차 회귀식의 검량식에서 결정계수는 각각 0.992, 0.933, 0.918, 그리고 0.984로 나타났다. 한편, 재래식 SPR 칩의 감도를 개선하기 위해 나노형상 SPR 칩을 제조하기 위하여 Langmuir-Blodgett(LB) 방법을 활용하였다. 본 연구에서는

수십 nm 두께의 금 박막을 바닥층으로 하여 그 위에 나노 크기의 실리카 입자를 단분자 층으로 덮어 형틀을 제조하고 다시 그 위에 금을 증착한 후 실리카 입자를 제거하는 방법으로 나노형상을 갖는 SPR 칩을 제조하였다. 나노형상 SPR 칩의 성능을 평가하였을 때 20% 알코올 함량을 가지는 모형 술에 대해서 바닥층의 두께가 50 nm, 나노형상에서 골의 깊이가 20 nm, 나노형상의 배열 주기가 300 nm일 때 SPR의 감도가 가장 좋아서 95%의 감도 향상을 얻을 수 있었다. SPR의 감도는 칩과 관련된 인자, 시료의 종류 및 상태에 따라 다르게 나타날 수 있으므로 측정 목적에 알맞은 칩의 설계와 선택이 요구된다.

감사의 글

본 연구는 한국식품연구원 ‘식품나노기술개발사업’의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

- Cho YJ. 2003. Surface plasmon resonance biosensors: principle and applications. *Food Eng. Prog.* 7: 54-59.
- Homola J, Yee SS, Gauglitz G. 1999. Surface plasmon resonance sensors: Review. *Sensor. Actuator. B* 54: 3-15.
- Kim HS, Choi SW, Cho YJ, Kim JH. 2007. Au nanoparticle coupled surface plasmon resonance chemical sensor for sensitivity enhancement. In: *Proceedings of NSTI, Nanotech 2007 (Vol. 3)*. May 20-24, Santa Clara, USA, pp. 124-127.
- Kim JH, Kim HS, Kim JH, Choi SW, Cho YJ. 2008. A Nano-Structured Surface Plasmon Resonance Sensor for Sensitivity Enhancement. *SPIE Symposium on NanoScience and Engineering*, Paper Number 7041-32. San Diego, USA.
- Homola J, Yee SS, Myszka D. 2008. Surface plasmon resonance biosensors. In: *Optical Biosensors*. Ligler FS, Taitt CR (ed.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 185-242.
- Wood RW. 1902. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *Phil. Mag.* 4: 396-402.