

**친환경농산물을 위한 잔류농약 효소  
속성검사용 바이오 전극 개발**

Development of Biosensor for Fast Determination of Residual  
Pesticides in Environment Friendly Agricultural Products

**잔류농약 효소 속성검사용 바이오전극 개발**

**/ 바이오전극용 AChE 효소 개발 / 바이오전극법의 민감도 비교**

Development of Biosensor for Fast Determination of Residual Pesticides/  
Development of Ache for bio-electrode sensor/ Compare bio-electrode  
sensor to the conventional assay detecting

제 주 대 학 교

농림수산식품자료실



0017725

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “친환경농산물을 위한 잔류농약 효소 속성검사용 바이오 전극 개발” 과제의  
보고서로 제출합니다.

2009 년 7 월 10 일

주관연구기관명 : 제주대학교

주관연구책임자 : 유 영 훈

세부연구책임자 : 조 문 체

연 구 원 : 조 형 준

연 구 원 : 김 영 미

협동연구기관명 : 품관원시험연구소

협동연구책임자 : 조 경 구

# 요 약 문

## I. 제 목

친환경농산물을 위한 잔류농약 효소 속성검사용 바이오 전극 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 유통 농산물 중 잔류농약의 분석은 고가의 분석기기(GLC, HPLC) 등을 사용하며 분석시간이 많이 소요되므로 간편하게 농약의 잔류 정도를 속성으로 분석하기 위하여 acetylcholinesterase(AChE) 저해율로 나타내는 방법이 대만에서 개발되어 국내에 도입되어 사용되고 있음.
- 본 연구팀은 참여회사와 공동으로 2004년도부터 효소 기술개발을 완료하여 현재 대만 수입 제품에 경쟁력이 있는 효소개발에 성공하여 국내에 일부 공급하고 있음. 이 방법은 실험실 규모를 갖추고 있는 환경에서는 매우 간편한 방법이지만 현장용 또는 농민이 사용하기에는 다소 무리가 있음.
- 기존의 잔류농약 속성검사는 농산물 추출액을 취하여 반응정지액, 발색용액 등을 혼합한 후에 발색된 정도를 분광광도계로 측정하는 과정을 거치며, 이 방법은 효소 용액을 사용하거나 스트립을 사용하는 방법에 모두 이용되고 있음. 그러나 이와 같은 복잡한 과정은 분석오차를 크게 하며, 일반인들의 사용에 어려움이 있으므로 이를 개선하기 위해 검사방법을 단축시킨 바이오전극을 이용한 잔류농약 속성검사 기술 개발이 필요함.
- 효소를 스트립으로 만드는 과정은 복잡한 단계를 거쳐야 하며, 상온에서의 life time을 연장할 수 있는 기술, 반응정지액, 발색시약 등을 첨가하기 때문에 검사과정의 복잡하여 바이오전극을 이용한 간편한 검사방법의 기술개발이 필요함.
- 사회·문화적으로는 정부는 친환경농업과 안정 농산물 생산을 위해 농약 및 화학비료 등의 농자재를 적게 사용하는 시책을 펴나가고 있으며, 소비자는 가능하면 무농약, 저농약 농산물을 이용하고자 함. 이를 위해서 반드시 필요한 기술이 잔류농약 분석 kit 개발이다
- 본 연구에서는 간편한 바이오전극을 사용하여 잔류농약을 속성 검사하는 기술을 개발하고 생산 현장에서 직접 유기인계와 카바메이트계 농약의 잔류여부를 측정하기 위한 것이다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 기존의 AChE 를 이용한 strip 형 측정 기술을 개량하고 이를 이용하여 재현성 및 신뢰성이 우수한 잔류농약 간이 검정 키트를 만드는 기술을 개발하여 현장에서 농가가 간편하게 농약의 잔류정도를 진단할 수 있는 기술을 개발하는 것이다. 이를 위하여 다음과 같은 기술을 개발한다.

- 잔류농약 효소 속성검사용 바이오전극 개발
  - 측정전극개발 및 전극표면 기생산화 방지 기술
  - 초저잡음 전류측정기술 개발 및 GUI(Graphic User Interface) 개발
- 민감도를 높이기 위한 AChE 유전자 변형기술 및 바이오전극 부착기술 개발
  - 바이오 전극용 효소 및 정제기술개발
  - 효소고정기술 및 안정성 조사
  - 효소생산 제반 기술의 참여기업 기술이전
- 시제품 개발 및 참여기업 기술이전을 위한 실용화 기술개발

### Ⅳ. 연구개발 결과

- 재현성 및 민감도가 좋은 잔류농약 효소 속성검사용 바이오전극 개발
  - : 잔류농약 양에 따른 AChE 의 변화량을 측정할 수 있는 바이오 전극을 구성하였다. 바이오 전극의 working electrode는 CoPh 와 탄소 유기화합물을 조합하여 구성 하였다. 잔류 농약 측정 결과 기존에 사용 되었던 strip 형 분광 방법에 비하여 재현성 및 신뢰성이 우수한 것으로 판명 되었다.
- 현장 적용 용 잔류 농약 속성 검사기 시제품 개발
  - : 개발된 바이오 전극 센서와 센서 신호를 입력 받아 잔류 농약 정도를 표시 할 수 있는 기기를 개발 하였다. 이 기기는 휴대가 용이하고 측정 시간도 기존의 분광법 방법에 비해 50% 정도이며, 재현성 및 민감도 면에서 우수 하였다. 그리고 개발한 측정 및 구동 소프트웨어를 시제품에 적용하여 사용자가 편리하게 기기를 사용 할 수 있게 하였다.

- 재현성 및 민감도가 좋은 AChE 유전자 변형기술 개발

: 효소는 고정화과정에서 쉽게 변성이 가능하고 활성의 손실을 가져오나 본 연구에서는 X1213 와 배합을 통하여 효소의 안정적 고정과 고정 후 보관 성 모두에 만족할만한 결과를 얻었다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

기존의 간이 측정법에 비해 감도 및 재현성이 매우 우수한 전극용 센서를 개발 하였으며 이러한 개발 결과는 다음과 같이 활용할 계획이다.

- 현장에서 잔류농약을 검사함으로써 우리 농산물의 안정성 확보
- AChE 효소를 이용한 간이 잔류 농약 검사기 수출
- 농림부의 친환경농업 인증제도 확대에 기여
- 우리 농산물의 안정성 확보 및 소비자 기호도 높이는 효과
- 현재 대만에서 수입하여 사용하고 있는 AChE 효소의 수입대체

## SUMMARY

### I. Title

Development of the Bio-electrode using Enzyme to detect the residual pesticide in the eco-friendly agricultural products.

### II. Aim and Needs

- Detections of the residual pesticide in the distributing agricultural products were carried out by high price instruments such as GLC or HPLC responding slowly. So, Taiwan developed a rapid detection method comparing to previous method, so called Acetylcholinesterase-based inhibition method (AChEBIM) that already imported and used in Korea.
- Our team and a partner company already completed to develop and started to sell AChEBIM in the market from 2004. However, this method provide convenience for the researchers in the well-established laboratory but for the farmers in the field.
- The previous pesticide detection methods consist of the complicate processes such as the process to extract solution from agricultural products, the mixing process to mix enzyme(AChE), substrate, stoping solution, and coloring solution, and the measuring process to detect the changed color by spectrophotometer. Those complicate processes provide the large measurement fluctuation for the non-experts. So, we needed the new, simple, and accurate detection method based on a Bio-electrode.
- It consists of many complicate processes to arrange the enzyme into a strip formation. We needed to simplify this method, because it requires the sever steps and the careful treatments for storing enzymes unchanged.
- For the social and cultural aspect, government recommends to reduce the usage of pesticide and fertilizer while the consumer also prefer the eco-friendly products. For these reasons, it is necessary to develop the residual pesticide detection kit.

- Our project aims to develop the rapid and simple detection method to measure the residual pesticides using Bio-electrode. Also, Our project aims to develop the detection method to measure easily the residual organophosphorous and Carbamate pesticides for the farmers in the field.

### **III. Contents**

Our project aims to improve the previous AChE strip method and to develop the more reproducible and accurate residual pesticide detection kit for detection in the field. For these reasons, we needed to develop the following techniques.

- Development of the Bio-electrode using Enzyme to detect the residual pesticide
  - Develop the measuring electrode and technique for preventing oxidation on the electrode surface
  - Develop the Current measuring technology with ultra low noise and the GUI(Graphic User Interface)
- Develop the AChE mutant technique for raising detection sensitivity and the bio-electrode attachment technique for raising stability.
  - Develop the Enzyme for bio-electrode and a purification method
  - Develop the Enzyme Fixing method and the stability measurement method.
  - Transfer the enzyme producing technology to the companies.
- Develop a prototype instrument and the related methods

### **IV. Results**

- Development of the reproducible and sensitive AChE based on a bio-electrode for the rapid residual pesticide detection.

: We developed the bio-electrode measuring the variance of the amount of acetylcholine affected by residual pesticide. The working electrode of Bio-electrode

was made by combination of CoPh and carbon organic compounds. Detection result of our detection method were more reproducible and more reliable comparing to the strip or spectrophotometric methods.

- develop the prototype detector for using in the field.

: Using the developed bio-electrode and sensing circuit, we developed the new detector for measuring the residual pesticide. This instrument was portable, reproducible, sensitive, and faster twice than the previous methods. We also applied the acting software to the prototype circuit for the consumer's easy use.

- development of a reproducible and sensitive AChE mutant method.

: We developed several mutant AChEs for the reproducibility and high sensitivity using point mutagenesis. We also developed the method that prevent denaturation by mixing enzyme and X1213 compound.

## **V. Outcome and application plan**

We develop the electrode detector that provides the better sensitivity and the better reproducibility comparing to the previous simple measurement method. Our research results will be applied in the such ways described below.

- To make possible to detect the residual pesticides in the field and to ensure the safety of our agricultural products
- To export the residual pesticide detector based on the AChE.
- To contribute to the eco-friendly products certification system
- To guarantee the security of our agricultural products and to raise the consumers' preference to our products
- Import replacing effect for AChE from Taiwan.



# CONTENTS

I. Introduction .....	12
1. Necessity of development .....	12
1.1. Technical side .....	12
1.2. Economic · Industrial side .....	13
1.3. Social · Cultural side .....	14
II. The present condition of native and foreign technical development .....	15
1. The condition and the problem of native and foreign related technique .....	15
1.1. Foreign technique condition .....	16
1.2. Native technique development present condition .....	16
1.3. Native and foreign condition .....	17
III. Contents of development .....	18
1. Development aim and contents .....	18
2. Annual development aim and contents .....	20
3. Development method and design .....	23
1.1 Development design .....	23
1.2. Development method .....	23
IV. Results .....	32
1. Development of bio electrode and oxygen radical protective technique .....	32
1.1. Development of bio electrode .....	32
1.2. Prototype development .....	38
2. Development of bio electrode measurement system .....	47
2.1. Development of low current measurement technique .....	47
2.2. Development of Prototype measurement system for bio electrode .....	65
3. Enzyme development for bio electrode .....	71
3.1. The research progress method .....	71

3.2. The research progress results .....	75
4. Technology transfer of promotion .....	95
4.1. Technology transfer about bio electrode .....	95
4.2. Technology transfer about bio electrode measurement system .....	96
4.3. Technology transfer about enzyme for bio electrode .....	97
5. Sensitivity analysis of bio electrode and strip .....	100
5.1. Sensitivity analysis of bio electrode and strip .....	100
V. Development results and application design .....	119
1. Evaluation conception and standard and achievement .....	119
2. Development of bio electrode .....	120
2.1. Development of bio electrode .....	120
2.2. Ultra low noise current measurement technique .....	120
2.3. Development of Prototype .....	120
2.4. Standardization of response time .....	121
2.5. Simplification of measurement .....	121
2.6. Residual pesticide detection range and limit .....	122
2.7. Precision of measurement results .....	122
3. Enzyme development for bio electrode .....	123
3.1. Enzyme production and development of refining process .....	123
3.2. Development of immobilized enzyme .....	123
3.3. Enzyme efficiency .....	123
3.4. Technology transfer about enzyme for bio electrode .....	123
4. Sensitivity analysis of bio electrode and strip .....	125
4.1. Sensitivity analysis of bio electrode and strip .....	125
5. Application design of development results .....	126
VI. Foreign technique information through study .....	128
VII. Reference .....	129

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	12
제 1 절	연구개발의 필요성 .....	12
1.	기술적 측면 .....	12
2.	경제·산업적 측면 .....	13
3.	사회·문화적 측면 .....	14
제 2 장	국내·외 기술개발 현황 .....	15
제 1 절	국내·외 관련기술의 현황과 문제점 .....	15
1.	국외 기술현황 .....	16
2.	국내 기술개발 현황 .....	16
3.	국내·외의 연구현황 .....	17
제 3 장	연구개발 수행 내용 .....	18
제 1 절	연구개발의 최종목표 및 성격 .....	18
1.	연구개발의 최종목표 .....	18
2.	연구개발의 성격 .....	19
제 2 절	연차별 연구개발의 목표 및 내용 .....	20
제 3 절	연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계 .....	23
1.	연구개발의 추진전략 .....	23
2.	연구개발의 방법 .....	23
제 4 장	연구결과 .....	32
제 1 절	바이오 전극 개발과 기생산화 방지기술 .....	32
1.	바이오 전극 개발 .....	32
2.	상용화를 위한 시제품 개발 .....	38
제 2 절	바이오 전극용 측정기 시제품 개발 .....	47
1.	바이오 전극의 미소 전류 측정 기술 개발 .....	47
2.	바이오 전극을 위한 시제품용 측정기 개발 .....	65
제 3 절	바이오 전극용 효소 개발 .....	71

1. 연구수행 방법 .....	71
2. 연구수행 결과 .....	75
제 4 절 참여기업의 기술 이전 .....	95
1. 바이오 전극 개발 결과 참여기업에 기술 이전 .....	95
2. 바이오 전극용 측정기 개발 결과 참여기업에 기술 이전 .....	96
3. 바이오 전극용 효소 개발 결과 참여기업에 이전 .....	97
제 5 절 바이오 전극 및 스트립 측정기 민감도 비교 .....	100
1. 바이오 전극 및 스트립 측정기 민감도 비교 .....	100
2. 바이오 전극의 재현성 측정 .....	118
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	119
제 1 절 평가 착안점, 척도 및 달성도 .....	119
제 2 절 제1세부 : 바이오 전극 개발 .....	120
1. 바이오 전극 개발 .....	120
2. 초저잡음 전류 측정기술 개발 .....	120
3. 시제품 개발 .....	120
4. 반응시간의 규격화 .....	121
5. 검사법의 간편성 .....	121
6. 진단의 한계 및 사용 농약의 검출능력 .....	122
7. 기존의 방법과 바이오 전극 진단 결과의 정밀도 .....	122
제 3 절 제2세부 : 바이오 전극용 효소 개발 .....	123
1. 바이오 전극용 효소 생산 시도 및 정제기술 개발 .....	123
2. 바이오 전극용 효소 고정기술 개발 .....	123
3. 바이오 전극용 효소 효율 비교 .....	123
4. 바이오 전극용 효소 생산 제반 기술 참여기업 기술 이전 .....	123
제 4 절 협동 : 바이오 전극 및 스트립 민감도 비교 .....	125
1. 시제품을 이용한 잔류 농약에 대한 민감도 조사 .....	125
제 5 절 연구개발 성과의 활용 계획 .....	126
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	128
제 7 장 참고문헌 .....	129

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

- 유통 농산물 중 잔류농약의 분석은 고가의 분석기기(GLC, HPLC) 등을 사용하며 분석시간이 많이 소요되므로 간편하게 농약의 잔류 정도를 속성으로 분석하여 아세틸콜린에스테라제(AChE:acetylcholinesterase) 저해율로 나타내는 방법이 대만에서 개발되어 국내에 도입되어 사용되고 있음.
- 본 연구팀은 참여회사인 (주)소일테크와 공동으로 2004년도부터 효소 기술개발을 완료하여 현재 대만 수입제품에 경쟁력이 있는 효소개발에 성공하여 국내에 일부 공급하고 있음. 이 방법은 실험실 규모를 갖추고 있는 환경에서는 매우 간편한 방법이지만 현장용 또는 농민이 사용하기에는 다소 무리가 있음.
- 기존 기술의 취약점은 현재의 AChE 효소와 스트립 이용한 잔류농약 속성검사에서 가장 큰 문제점은 잔류농약 추출액에 반응정지액, 발색시약 등의 시약을 uL 단위로 첨가하므로 현장에서 잔류농약을 측정하는데 취약 요인임.
- 기존의 잔류농약 속성검사는 농산물 추출액을 취하여 반응정지액, 발색용액 등을 혼합한 후에 발색된 정도를 분광광도계로 측정하는 과정을 거치며, 이 방법은 효소 용액을 사용하거나 스트립을 사용하는 방법에 모두 이용되고 있음. 그러나 이와 같은 복잡한 과정은 분석오차를 크게 하며, 일반인들의 사용에 어려움이 있으므로 이를 개선하기 위해 검사방법을 단축시킨 바이오전극을 이용한 잔류농약 속성검사 기술 개발이 필요함.
- 본 기술개발에서는 추출액에 직접 농약과 반응하여 발생하는 choline을 직접 AChE 바이오전극을 이용하여 측정함으로써 반응정지액, 발색시약 등의 시약 첨가 단계를 없애고 이 과정에서 발생하는 오차를 줄이기 위한 것임

### 1. 기술적 측면

- 현재 국내에서 잔류농약(유기인계, 카바메이트계 살충제)의 속성 검사용 AChE 효소는 대만 TARI(Taiwan Agricultural Research Insititute)가 집파리로부터 추출한 효소를 수입하여

분광광도계로 측정하고 있음. 대만효소는 국내뿐만 아니라 주변 국가에도 수출하고 있음.

- 대만 AChE 효소를 수입대체하기 위해 많은 연구자가 연구를 진행시켰으며, 국내 연구진에 의해서도 꿀벌, 돼지 뇌, 누에, 집파리 등으로부터 AChE를 추출하기 위한 연구가 시도되었음, 그러나 추출곤충들이 농약 노출에 의한 유전자의 변형으로 농약에 대한 저항성이 발현되어 AChE 추출원으로 사용할 수 없음.
- 본 연구팀과 참여회사는 선행연구에서 유전자를 이용한 방법으로 대만효소와 유사한 민감도를 갖는 효소를 개발하였으며, 선행개발 내용은 다음과 같음.

① 효소의 개발: 한라산에서 채집한 파리류로부터 AChE 유전자를 분리하여 곤충세포를 배양액으로 Baculovirus system에서 생산하고 있으며, 이는 국산신기술(KT)로 인증 받았음.

② 스트립의 개발: 본 연구팀과 참여회사는 농림기술개발과제로 성공한 효소를 사용하여 고정제로 PVA-SbQ를 사용하고 Im-P 막에 부착하여 사용할 수 있는 스트립을 개발하였으며, 상품화에 성공하였으며, 일부 농업기술센터와 농협에 공급하여 현장에서 사용하고 있음.

### ③ 바이오전극 개발 필요성

- 효소를 스트립으로 만드는 과정은 복잡한 단계를 거쳐야 하며, 상온에서의 life time을 연장할 수 있는 기술, 반응정지액, 발색시약 등을 첨가하기 때문에 검사과정의 복잡하여 바이오전극을 이용한 간편한 검사방법의 기술개발이 필요함.
- 본 연구에서는 임신진단 키트 및 당뇨측정에 버금가는 간편한 바이오전극을 사용하여 잔류농약을 속성 검사하는 기술을 개발하고 생산 현장에서 직접 유기인계와 카바메이트계 농약의 잔류여부를 측정하기 위한 것임.

## 2. 경제·산업적 측면

- 농산물의 잔류농약 속성검사 효소는 대만의 TARI에서 개발되어 공급되는 효소를 사용하고 있음. 따라서 국내 농산물의 잔류농약 오염 검사가 많아지면 많아질수록 수입물량이 늘어나기 때문에 국내에서의 실용화 기술이 반드시 필요한 실정임.

- 따라서 본 연구과제의 수행과 성공은 대만으로부터 수입하고 있는 잔류농약 검사시약 kit의 수입대체 효과뿐만 아니라 중국 및 동남아는 물론 세계를 상대로 신 개념의 간이 잔류농약 strip의 수출도 가능함.

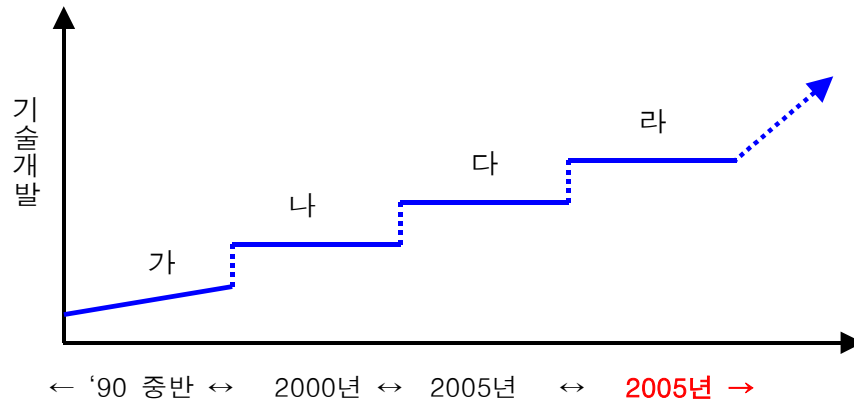
### 3. 사회·문화적 측면

- 정부는 친환경농업과 안정 농산물 생산을 위해 농약 및 화학비료 등의 농자재를 적게 사용하는 정책을 펴나가고 있으며, 소비자는 가능하면 유기농산물, 전환기 유기농산물, 무농약, 저농약 농산물을 이용하고자 함. 이를 위해서 반드시 필요한 기술이 빠른 시간 내에 잔류농약을 검사할 수 있는 기술의 개발이 필요함.
- 본 기술의 실용화는 생산농가에는 안정농산물의 생산에 주력하게 되고 소비자는 유기농산물, 전환기 유기농산물, 무농약, 저농약 농산물 등의 친환경농산물에 대한 선호도를 높여 결국 그 이익은 친환경농산물을 생산하는 농가에게 돌아가게 됨. 따라서 본 연구의 수행과 성공은 전체 농가와 우리 농산물을 지키는데 크게 이바지 할 수 있을 것임.

## 제 2 장 국내·외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

- Acetylcholinesterase(AChE)를 사용한 잔류농약 속성검사와 관련된 기술개발 및 실용화 흐름도는 그림과 같이 본 연구진 및 참여기업은 세계적인 기술개발 흐름과 비슷한 기술개발을 진행하고 있음.



가 단계	• 곤충으로부터 AChE 추출 및 잔류농약 검사 가능성 연구(여러 연구자)
나 단계	• 대만 TARI로부터 AChE 효소 국내 수입 및 농협 등에서 정밀검사 사전 screening 용으로 사용(용액형으로 검사과정 복잡함)
다 단계	• (주)소일테크는 유전자 변형을 이용한 AChE 효소 실용화 및 대만효소 수입대체 위해 시장 진입(국산신기술 KT 1085호 인증) • 검사 편이성 위해 스트립 기술개발 실용화 완료 및 국내 시장 진입, 수출 준비
라 단계	• 국외에서 바이오전극으로 혈액 내 choline 측정 바이오전극 개발 중 (Parikh 등, 2004 - 현재) • 검사 편이성 위해 바이오전극 개발 착수. 채소류 잔류농약 검사에 바이오전극 적용 가능성 확인 • 농림기술개발과제 신청



## 1. 국외 기술현황

### 가. AChE 효소 개발 분야

- 포유류 또는 곤충류에서 acetylcholinesterase를 추출하는 방법은 오래 전부터 많은 연구자들에 의해 보고된 것으로 특별한 실험 테크닉을 필요로 하지 않는 방법임(Adamson 등, 1975; Devonshire, 1975; Kumar 등 1973; McIntosh와 Plummer 1973; Sussman 등, 1988; Ngo와 Laidler. 1975). 그러나 추출원의 농약에 대한 저항성이 있을 경우에는 추출원으로 사용할 수 없기 때문에 추출 기술보다 추출 곤충의 선택이 더 중요함.
- 대만 TARI에서 집파리에서 직접 추출한 AChE는 기업화되어 동남아시아 시장에서 사용하고 있으며, 국내에서도 수입하여 사용하고 있음.
- 미국 Envirologix사에서는 호주 CSIRO에서 AChE를 유전자 변형으로 생산하는 방법을 라이선싱 받아 생산하고 있으나 고가이어서 미국 시장에서만 사용되고 있음.

### 나. AChE 바이오전극

- 2004년부터 인체 내의 잔류농약을 혈액에서 직접 바이오전극으로 측정할 수 있는 이론이 제시되었으며, 2006년도 인터넷 판에 실용화 가능성을 제시하였음. 아직 농업용으로 사용은 시도되지 않음.

구 분	세계적 수준					
	AChE 효소	개념정립 단계		기업화 단계	○	기술 안정화 단계
바이오전극	개념정립 단계	○	기업화 단계		기술 안정화 단계	

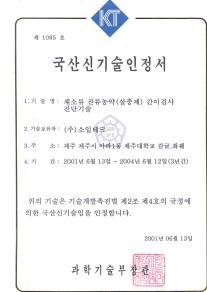
## 2. 국내 기술개발 현황

### 가. AChE 효소 개발 분야

- 꿀벌, 누에 등의 곤충류에서 직접 AChE 효소 추출을 시도하였으나 농약에 대한 저항성이 발생되어 민감도가 낮은 편임.
- 본 연구팀은 소형 파리류로부터 AChE 유전자를 분리하여 Baculovirus 배양방법으로 생

산을 성공하였으며, 스트립을 사용하는 방법도 성공하여 시장에 진입하였음.

- 최근에 본 연구팀이 소형 파리류로부터 AChE 유전자를 추출하여 Baculovirus 배약을 통해 다량생산에 성공하였음. (“아세틸콜린에스터라제를 이용한 농산물의 잔류농약 진단 방법. 특허등록번호 제0441056호)



- 본 연구팀과 참여기업은 AChE를 이용한 잔류농약 속성검사 기술의 실용화에 성공하여 국산신기술로 인증 받았으며, 농업기술센터, 농협 등에서 사용하고 있음.

### 나. AChE 바이오전극

- 선행연구로 실용화한 스트립형 속성검사키트가 농민수준에서 사용이 불편하여 좀더 간편하고 전 세계적인 측정기 흐름인 AChE 바이오전극의 가능성을 검토한 결과 선행연구에서 개발 성공 가능성을 확인하였음.

## 3. 국내 · 외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
대만 TARI(1990년 중반)	농약 저항성 free 집파리로부터 AChE 생산	한국 및 동남아국가에서 사용
제주대, 소일테크(2002년)	유전자변형으로 AChE 생산	농업기술센터, 농협 등에서 사용
Envirologix사(1990년 중반)	유전자 변형으로 AChE 생산	호주 CSIRO 개발, 미국 Envirologix사 생산
제주대, 소일테크(2004년)	스트립형 잔류농약 속성검사 기술개발	농업기술센터, 농협 등 사용
Parikh 등(2004-현재)	2004년부터 인체 내에서 AChE의 농약 반응물인 choline의 바이오전극 측정 기술 연구	인체의 잔류농약 검사방법으로 측정하기 위한 이론 정립
제주대, 소일테크	2005년 말 Parikh 이론 이용하여 바이오전극 제작 방법 시도	식물체 내의 잔류농약 속성검사 가능성 확인. 특히, 스트립 부착 기술 일부 보유

## 제 3 장 연구개발 수행 내용

### 제 1 절 연구개발의 최종목표 및 성격

#### 1. 연구개발의 최종목표

##### 가. 잔류농약 효소 속성검사용 바이오 전극 개발

- 본 과제에서 메탄올로 추출한 잔류농약의 AChE 효소 반응에서 발생하는 choline과 과산화수소를 측정할 수 있는 바이오전극을 개발하며 목표를 달성하기 위한 측정원리는 아래와 같으며 필요한 요소기술을 5개로 나누어 개발함.

1차 반응: Acetylcholine + 농약 → Choline + acetic acid

2차 반응: Choline + 2O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O → (ChOx) → Betaine + 2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

\* 1차 반응에서 농약과 반응하고 남은 Choline의 양과 2차 반응에서 측정하는 2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 비례하며 바이오전극은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 측정하여 choline의 양을 정량하는 것임.

- Acetylcholinesterase(AChE)와 농약이 반응하여 발생하는 과산화수소를 측정하기 위해 carbon 계열과 Novel 금속을 이용하여 5nA/ μmol ±0.2 전류를 측정할 수 있는 바이오전극 개발
- 바이오전극과 농약과 AChE 반응물 외의 물질에 의한 간섭을 방지할 수 있는 바이오전극의 기생산화 방지 기술
- 바이오전극 위에 정량적으로 AChE를 부착할 수 있는 부착기술 및 안정화 기술개발
- 농약과 AChE 반응에 의해 정량적으로 발생하는 nA 이하의 전류를 측정할 수 있는 저가의 측정 기술개발
- 일반 농민이 현장에서 농약 잔류량을 손쉽게 측정 할 수 있는 작동 소프트웨어를 개발하여 시제품에 적용

#### 나. 민감도를 높이기 위한 AChE 유전자 변형기술 및 바이오전극 부착기술 개발

- AChE 효소의 유전자를 이용한 baculovirus 배양방법을 이용한 다량 생산기술개발
- AChE 효소의 PVA-Sbq를 이용한 효소 안정화 기술 및 바이오전극 부착 성능 높이는 기술
- 바이오전극 부착 AChE 효소의 농약반응성을 높이고 민감도를 높이기 위한 기술개발

#### 다. 효소 및 바이오전극 측정법의 분석정밀도 비교

- 대만효소와 유전자 변형으로 개발된 효소의 농약 민감도 비교측정
- 주관연구기관과 세부과제에서 개발된 바이오전극법과 대만효소법과의 정밀도 및 오차분석
- 기존 방법인 반응정지액, 발색시약을 사용하는 방법과 주관연구기관에서 개발된 바이오전극형 측정방법의 민감도 비교 및 개선방안 연구

#### 다. 참여기업

- 제품 개발을 위한 바이오전극 설계, 금형제작 등 실용화를 위한 기술개발
- 보유하고 있는 AChE 효소와 개발되는 효소의 농약 반응성 조사
- 바이오전극의 실용화를 위한 분주기술, 효소 안정성 등 조사

## 2. 연구개발의 성격

- 본 연구는 기존에 연구팀과 참여기업이 갖고 있는 기술을 발전시켜 제품을 생산하고 실용화하여 국내 친환경인증용 잔류농약 속성검사 바이오전극 측정법을 개발하는 것임.
- 본 연구와 관련된 아이디어 및 효소 기반 기술은 2003년 이전에 완료하였음.
- 본 기술의 기반기술을 이용한 스트립형은 2005년에 실용화를 완료하여 일부 농협 및 농업기술센터에서 잔류농약 속성검사용으로 사용하고 있음.
- 본 기술은 1차년도에 A version, 2차년도에 B version을 개발하여 제품생산을 위한 준비를 하고 3차년도에 여러 가지 검증과정을 거쳐서 실용화할 것임.

## 제 2 절 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차년도	2007년	<b>제1세부: 바이오전극개발</b> •과산화수소 측정전극개발  •기생산화방지 기술  •바이오 전극상의 효소 부착기술 (2차년도 계속)  •A version 용 시제품 개발	•크로마토그래프방식과 전기-화학적 방법의 비교 •교유 일함수 변화물질의 탐색 •Carbon과 Novel 금속의 일함수 변화 조사 •Ag/AgCl 전극의 효율 조사 •목표: 4 uA/umol ±0.2 전극 개발 가능성 조사 •Nafion 코팅 및 코팅시 전기분해 전압, pH, 온도, 시간 함수 제작 •Polybenzidine film 코팅 및 조건 조사 •제2세부과제에서 개발되는 효소의 코팅 기술 개발 •효소와 choline oxidase의 정밀 분주기술 개발 •A version용 수작업 시제품을 협동과제에서 민감도 측정오차에 사용하도록 개발	•과산화수소 농도와 일함수 변화율의 선형적 관계 유무 •극저전류 측정 •백금계열 전극의 가능성 조사 •기생산화에 의한 오차 감소 •코팅 조건조사 •효소의 부착특성 조사 •참여기업과 공동으로 시제품개발
		<b>제2세부: 바이오전극용 효소개발</b> •효소 생산 및 정제기술 개발  •효소 PVA-Sbq 고정기술 개발 (2차년도 계속)  •고정 효소의 보관중 안정성 조사(2차년도 계속)	•Baculovirus를 이용한 배양기술의 정리 •일반 병을 이용한 shaking culture 배양 기술개발 •효소를 고정할 수 있는 물질의 탐색 •탐색된 효소 고정물질의 안정도 조사 •온도 및 습도에 따른 고정 효소 안정도 •빛 차단 정도에 따른 안정도 조사	•배양조건 •배양 시 오염도 조사 •PVA-Sbq의 가능성 조사 •보관중 민감도 조사
		<b>협동: 바이오전극 및 스트립 민감도 비교</b> •기존방법의 개선점 조사  •효소시험  •고정효소 민감도 조사	•메탄올, 브롬수, 기질, 반응시약, 발색시약 등 첨가량 및 반응시간 조사 및 최적 조건 확립 •제2세부과제 개발 효소의 활성화도 조사 •카바메이트계 5-10, 유기인계 20개 조사 •제1, 2세부과제에서 제조한 평판에 고정된 효소의 민감도 조사 •카바메이트계 5-10개, 유기인계 20개 조사	•대만효소법의 장단점 조사 •chlorpyrifos, carbaryl 등 •chlorpyrifos, carbaryl 등 바이오전극 부착상태에서 측정

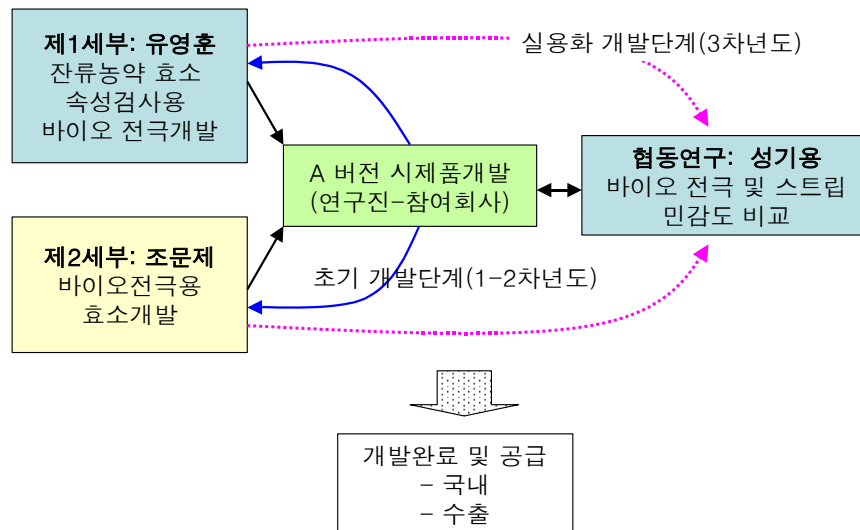
구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
2차년도	2008 년도	<b>제1세부: 바이오전극개발</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>•바이오 전극상의 효소 부착기술 (1차년도의 계속)</li> <li>•기생산화방지 기술 (1차년도의 계속)</li> <li>•초저잡음 전류 측정기술 (3차년도 계속)</li> <li>•B version용 시제품개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•분주후 고정화 온도, 시간 UV 세기 조사 및 고활성도 유지 조건 조사</li> <li>•silk printing 조건에서 제작한 전극의 실용화 가능성 검토</li> <li>•Nafion과 polybenzidine 코팅물질과 효소의 부착 반응의 최적화 기술개발</li> <li>•간섭 방지 최소화 물질의 탐색 및 적용</li> <li>•과산화수소 선택성의 높은 물질에 대한 간섭효과 최소화 기술의 완료</li> <li>•저가의 nA 이하의 전류 측정장치 탐색</li> <li>•초저잡음 전류측정을 위한 다단계 전류 증폭과 노이즈 제거기술 개발</li> <li>•기술 적용을 위한 회로도 작성</li> <li>•B version용 시제품 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•1차년도에 이어 보관하면서 안정성, 부착 문제점 조사</li> <li>•간섭에 의한 오차를 줄이기 위한 내용 조사(선택비 100 이상)</li> <li>•choline의 최소량 측정을 위한 전류 관련 요인 조사</li> <li>•참여기업 공동</li> </ul>
		<b>제2세부: 바이오전극용 효소개발</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>•효소 고정기술 개발 (1차년도의 계속)</li> <li>•고정 효소의 보관중 안정성 조사(1차년도의 계속)</li> <li>•바이오전극 부착용 표준 시료 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•부착 안정도, 농약과 효소 반응성 조사</li> <li>•부착상태에서의 안정성 조사</li> <li>•1차년도의 계속으로 부착 효소의 안정성을 1, 2, 3, 6, 12개월간 보관하면서 안정성 조사</li> <li>•온도조건: 4 - 30℃, 습도조건: 0 - 100%</li> <li>•농약허용기준치를 기준으로 AChE 저해도 조사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•부착된 효소의 기능 탐색, 안정성 조사</li> <li>•안정성 조사, 부착조건 등은 1세부와 공동조사</li> <li>•참여기업 공동</li> </ul>
		<b>협동: 바이오전극 및 스트립 민감도 비교</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>•A version 시제품을 이용한 오차 분석</li> <li>•잔류농약에 대한 민감도 조사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•제1세부과제 1차년도에서 개발한 A version용 시제품을 사용하여 채소류 잔류농약 민감도 조사</li> <li>•대만효소를 기준으로 시제품 기기 및 바이오전극의 오차 분석</li> <li>•1차년도와 다른 농약(카바메이트, 유기인계)에 대한 민감도 조사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•주요 잔류 농약에 대한 식물체 조사</li> <li>•대만효소와의 오차 분석</li> <li>•10-20개 농약 선정 조사</li> </ul>

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
3차년도		<b>제1세부: 바이오전극개발</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>초저잡음 전류측정기술 개발완료</li> <li>GUI(Graphic User Interface)</li> <li>C version 용 시제품 개발 및 참여기업 이용 가능한 자료 제공</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>측정과정에서 노이즈에 의한 오차 최소화 방법 제안 및 참여기업에 기술이전</li> <li>현장에서 농민이용 간편한 작동 소프트웨어 개발</li> <li>Microprocessor 내 ROM, RAM 작동 flow 개발</li> <li>측정된 데이터의 저장 및 다른 저장장치로 이용할 수 있도록 소프트웨어 개발</li> <li>상품화 가능한 형태의 시제품 제작 및 참여기업에 실용화를 위한 자료 제공</li> <li>기술적인 know how 및 참여 학생의 참여기업 취업 및 기술 이전</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>실용화를 위한 제반 문제점과 개선점 조사</li> <li>농가 입장에서 구동의 편리성, 농림부 저해율 규정에 따른 software 구성</li> <li>참여기업과 공동으로 시제품 개발</li> </ul>
		<b>제2세부: 바이오전극용 효소개발</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>바이오전극용 효소의 효율 비교</li> <li>현장 사용시 문제점 조사 및 개선방안</li> <li>효소생산 제반 기술의 참여기업 기술이전</li> <li>개발효소의 DNA 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>대만효소와 개발효소의 활성화도 및 민감도 조사 비교</li> <li>사용 편의성 비교</li> <li>기존 속성검사법과 바이오전극의 정밀도 비교 및 오차 분석</li> <li>T-flask와 일반병을 이용한 shaking culture의 참여기업 이전</li> <li>배양용 효소 cell 및 baculovirus 생산 기술 이전</li> <li>효소생산에 사용한 AChE DNA sequencing 결과 참여기업 이전</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>최종 민감도 비교 시험</li> <li>1세부과제의 구동 특성 분석</li> <li>효소생산시 경제성 등을 고려한 생산기술 이전</li> <li>특허출원을 위한 제반 기술</li> </ul>
		<b>협동: 바이오전극 및 스트립 민감도 비교</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>B version 시제품을 이용한 오차분석</li> <li>바이오전극 측정법의 문제점 및 개선방안</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>제1세부과제 2차년도에서 개발한 B version용 시제품을 사용하여 채소류 잔류농약 민감도 조사</li> <li>표준 용액 및 채소류 추출물에 대한 대만효소를 기준으로 시제품 기기 및 바이오전극의 오차 분석</li> <li>대만효소와 바이오전극의 오차분석 및 작동상의 문제점 개선방안 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1,2,3차년도 총 42개의 유기인계, 11개의 카바메이트계 농약 정밀도 오차 분석</li> <li>제품 생산용 제반 문제점 조사</li> </ul>

## 제 3 절 연구개발의 추진전략 · 방법 및 추진체계

### 1. 연구개발의 추진전략

- 총괄추진전략은 제2세부과제에서 잔류농약 속성검사용 AChE 효소와 관련된 연구를 수행하고 제1세부과제에서 이 효소를 이용하여 바이오전극을 개발하며, 협동연구에서 개발된 기술의 정밀도 분석 및 개선방안을 검토하고 참여기업이 제품화하여 국내 및 외국 시장 진입.

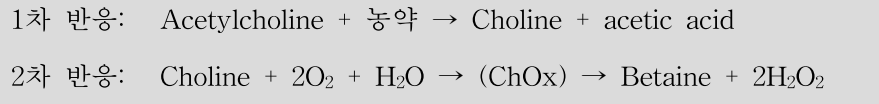


### 2. 연구개발의 방법

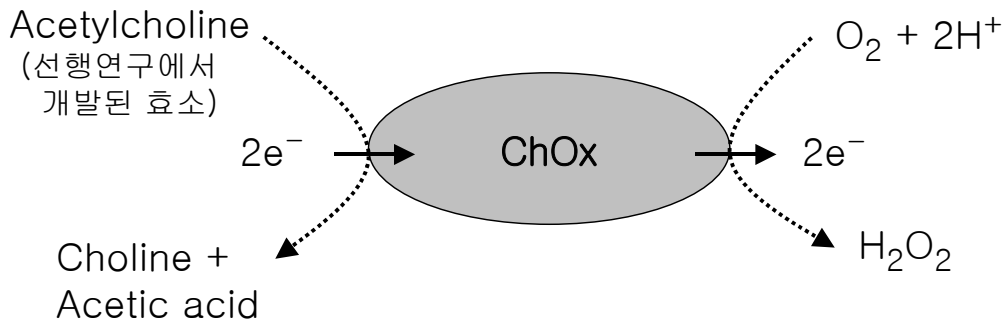
#### 가. 제1세부과제: 잔류농약 효소 속성검사용 바이오 전극 개발

- 메탄올로 추출한 잔류농약의 AChE 효소 반응에서 발생하는 choline 의 정량을 측정 할 수 있는 바이오 전극을 개발하고자 한다. 잔류농약의 AChE 효소 반응에서 발생한 choline 과 choline oxidase를 반응 시키면 choline 양에 비례하여 과산화수소를 발생한다. 그러므로 과산화수소를 정확히 측정하면 choline 의 양을 비례적으로 측정 할 수 있고, 이를 통해 농약 잔류량을 측정 할 수 있다. 개발하고자 하는 목표를 달성하기 위한 측정원리는 다음과 같다.





\* 이 때 1차 반응에서 농약과 반응하고 남은 Choline의 양과 2차 반응에서 측정하는  $2\text{H}_2\text{O}_2$ 는 비례



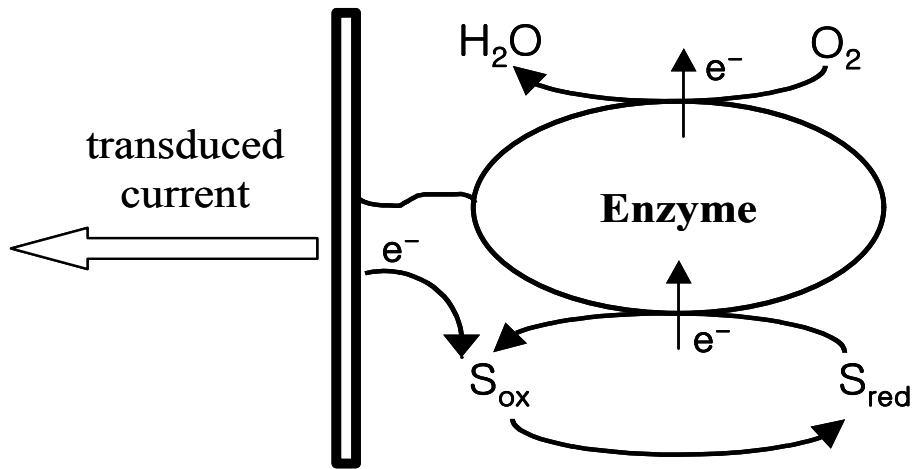
이러한 바이오 전극 및 측정장치를 개발하기 위해서는 다음과 같은 요소 기술이 필요하다.

- 1) 과산화수소 측정 전극 개발
- 2) 기생산화 방지 기술
- 3) 효소 고정기술
- 4) 초저전류 측정기술
- 5) GUI(Graphic User Interface)

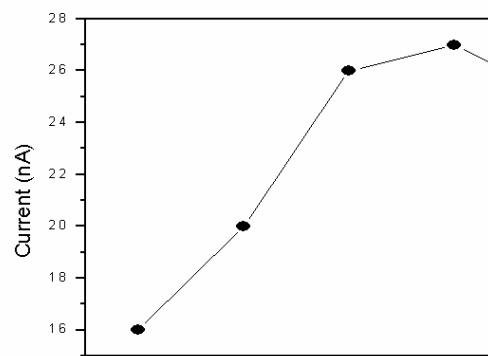
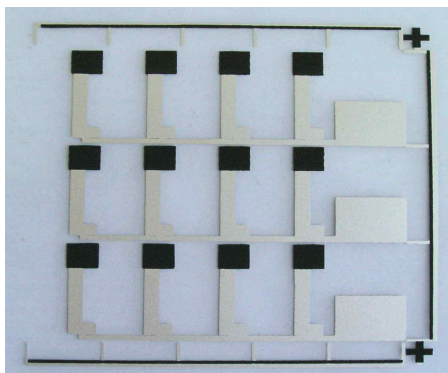
### (1) 요소기술별 개발 방법

#### (가) 측정 전극 개발:

○ 현재 많이 쓰이는 과산화 측정 방법은 크로마토 그래프(Chromatograph) 방법이 많이 사용되었으나 이 방법은 측정이 복잡하고 고가라는 단점이 있다. 이를 극복하기 위하여 전기-화학적 방법이 제시 되었다. 이 방법은 물질이 과산화수소에 의해서 산화되면서 물질이 가지고 있는 고유의 일함수(work function)가 변화되는 것을 이용하는 것이다. 이를 그림으로 표현 하면 다음과 같다.



- 이와 같이 전기 화학적으로 산화에 의해 일함수가 변화하는 물질로는 많은 물질이 있으나, 넓은 범위의 과산화수소 농도를 측정하기 위해서는 과산화수소 농도에 따른 일함수 변화율이 선형적인 물질이 요구 된다. 이와 같은 요구 조건을 만족하는 물질로 많이 사용되는 것은 carbon 계열 물질과 Novel 금속이 있다. 두 물질 모두 과산화수소와 반응하여 일함수 변화가 선형적으로 변화하는 특징이 있다.
- 본 연구를 위해 선행한 carbon 계열의 전극과 과산화 농도에 따른 전류의 변화가 다음 그림과 같다. 그 결과 과산화수소 발생량과 전류의 흐름은 비례하였으며, 이 이론이 본 기술의 기반 기술로서 작용하게 된다.



선행연구에서 시험 제작한 바이오전극(왼쪽)과 바이오전극으로 측정된 과산화수소와 전류(오른쪽)와의 관계

- 선행 연구에서 사용한 전극은 Ag/AgCl을 기준 전극으로 하였고, 작동 전극은 Ag 전

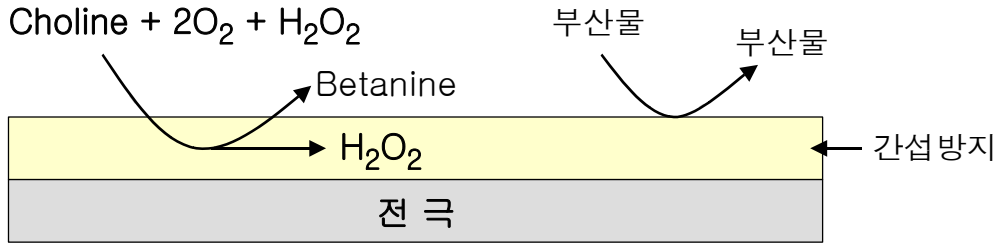
극위에 Carbon을 코팅하여 사용하였다. 이때 모든 전극 제작 공정은 실크프린트 방법으로 제작하였다. 위의 그림에서 보는 것과 같이 과산화수소 농도 변화에 전극이 잘 반응 하는 것을 볼 수 있으나 전극의 반응도( 출력전류/과산화수소농도)가 좋지 않고, 선형성은 고 농도에서 좋지 않은 것을 볼 수 있다.

- 수행연구계획 및 목표 : 목표 :  $4 \text{ nA}/\mu\text{mol} \pm 0.2$
- 일함수 변화율 증가: 센서로서 정밀도를 향상시키고, 에러율을 감소시키기 위해서는 산화 환원 반응에 의한 일함수 변화율이 큰 물질을 트랜스듀서(transducer)로 사용하여야 한다. 이를 위하여 carbon 계열 물질과 백금 계열 물질에 대하여 다음과 같은 방법으로 연구 한다.
  - ① carbon 계열: 산화되는 정도에 따라 일함수 변화율이 정해짐으로 산화율을 크게 하기 위하여
    - 카본 코팅 후 열처리 과정을 통해 산화 환원 반응 정도에 대하여 조사한다.
    - 카본 코팅 후 산화 환원 반응을 향상시키기 위하여 카본 막 위에 전이 금속과 전기 도금 방식을 이용하여 카본 막을 변형시켜 산화-환원 반응 정도를 조사 한다.
    - 산화-환원 반응이 카본 막 면적에도 관계함으로 코팅 후 나노 기술을 이용하여 막을 변형 시켜 산화 환원 반응 정도에 대하여 조사한다.
  - ② 백금계열 : 일반적으로 금은 산화 환원 반응이 일어나지 않으나 백금은 산화 환원 반응이 일어나는 것이 알려져 있다. 그러나 carbon 계열 보다는 산화-환원 반응이 정도가 미미하나, carbon 계열에 비해서 산화-환원 반응시간이 약 10배 정도 빠른 것이 알려져 있다. 이와 같은 장점이 있기 때문에 연구 할 가치가 충분히 있는 물질이다. 이를 위하여
    - 백금과 로디늄 합금을 이용한 전극을 제작하여 환원 반응 정도에 대하여 조사한다.
    - 산화-환원 반응이 카본 막 면적에도 관계함으로 코팅 후 나노 기술을 이용하여 막을 변형 시켜 산화 환원 반응 정도에 대하여 조사한다.

#### (나) 기생산화 방지 기술

- 농약이 포함된 액체 물질 효소가 반응할 때 매개 물질이 물과 산소이다. 바이오 전극은 choline에 발생한 과산화수소에 의한 산화정도를 측정하는 것이 목표이나 반응 과정에서 매개 물질로 작용하는 물과 산소에 의해서도 일부 산화가 되어 정확한 choline의 변화량을 측정하는 것을 어렵게 한다. 이를 간섭(interference) 효과라 한

다. 이러한 간섭 효과를 줄이기 위해서는 전극위에 과산화수소 선택성이 좋은 물질을 코팅하여 간섭효과를 최소화 하여야 한다. 이를 그림으로 표현하면 다음과 같다.



○ 과산화수소 선택성이 좋은 막을 형성하기 위하여 다음과 같은 연구를 한다.

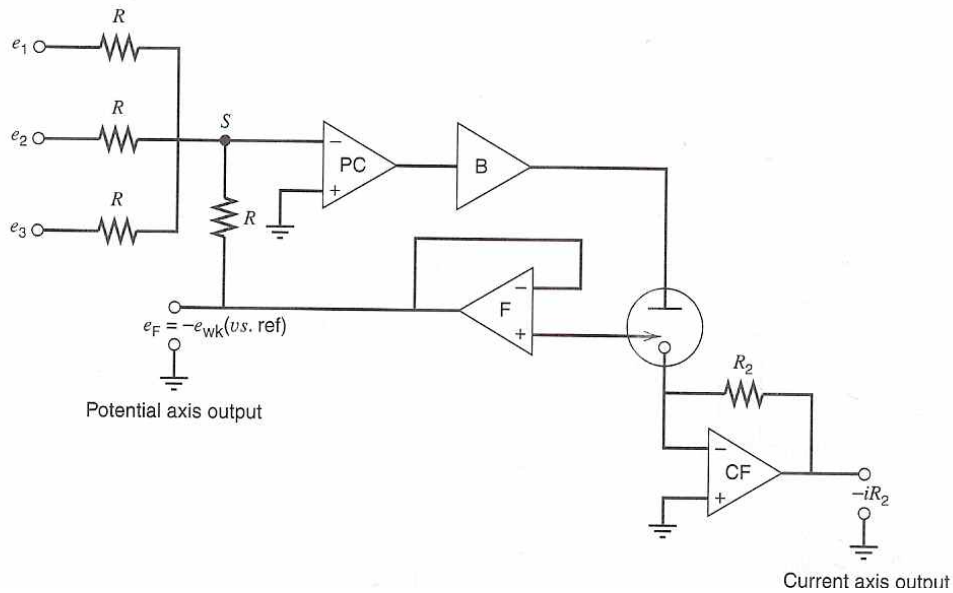
- ① Nafion 코팅 : 기존에 알려져 있는 Nafion 과 적절한 폴리머를 중합하여 전극위에 코팅한다. 이때 중합 비율, pH, 열처리 온도, 열처리 시간, 두께의 함수로 하여 선택비를 측정한다.
- ② Polybenzidine film 코팅 : Polybenzidine을 전기 분해 방법으로 코팅하여 선택비를 조사한다. 코팅할 때 전기 분해 전압, pH, 온도, 시간의 함수로 제작하여 선택비를 조사한다.

#### (다) 효소 고정:

○ 기존 본 연구팀이 보유하고 있는 유전자 조작에 의해 만들어진 농약 반응 효소와 ChOx(Choline Oxidase)를 정밀 분주방법으로 전극 위에 분주 하여 고정화한다. 기존의 본 연구 팀의 연구 결과에 의하면 건조 시간에 따라 반응성이 매우 민감하게 변화하는 것이 조사되었기 때문에 분주후 고정화 온도, 고정화 시간, UV(UltraViolet)세기의 함수로 조사하여, 활성도가 가장 좋은 고정화 조건을 조사한다.

#### (라) 초 저 잡음 전류 측정기술

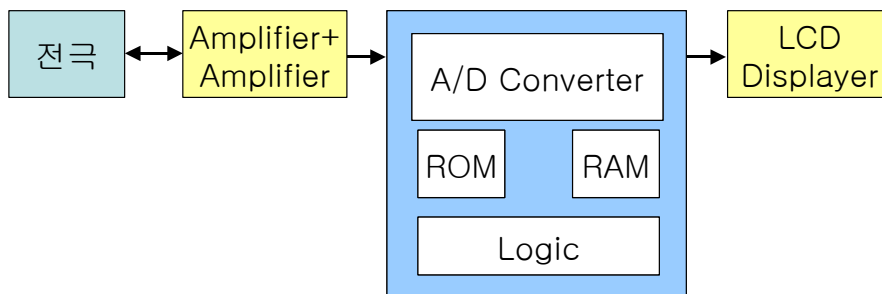
○ 현재 nA (nano-ampere) 이하의 전류를 측정하는 장치는 매우 고가이고 복잡하여, 일반인이나 농가에서 사용하는 것은 매우 어렵다. 바이오 전극으로부터 발생하는 전류의 양이 매우 미세하기 때문에 개발된 바이오 전극이 널리 사용되기 위해서는 저가이며 간단하게 측정하는 기술도 개발 되어야 한다.



- 위와 같은 회로를 이용하여 다단계 전류 증폭과 노이즈 제거 기술을 개발한다. 이때 사용되는 증폭기들은 기본적으로 전력 소모가 작은 것과 온도 의존성이 작은 것을 사용하여야만 매우 미세한 전류를 감지 할 수 있다.

**(마) GUI(Graphic User Interface)**

- 일반인들이 현장에서 농약 잔류량 측정기를 손쉽게 사용할 수 있도록 작동 소프트웨어를 개발한다. Microprocessor 내 ROM과 RAM을 이용하여 작동 flow를 일반인들에게 알려주고, 측정된 데이터를 저장했다가 필요할 때 다시 이용할 수 있도록 구성하며, 필요하면 측정기 내의 데이터를 다른 저장장치에 옮길 수 있는 소프트웨어를 개발한다. 그림으로 표시하면 다음과 같다.



## 나. 제2세부과제: 바이오전극용 AChE 효소 개발

### ○ 바이오 전극용 AChE 효소 분리 정제기술 개발

- 기존에 소형 파리류로부터 분리한 AChE 유전자를 이용하여 Baculovirus 배양액 종류별 분리의 편이성, 민감도 증대 기술을 개발한다.
- 액체배양 다량 생산 기술의 개발한다. 주요 배양액 성분인 FBS의 효소 분리를 용이하게 할 수 있는 분리기술의 개발한다.

### ○ 바이오전극용 고정 효소의 PVA-Sbq와의 반응성 및 안정성 조사

- 바이오전극에 부착된 효소를 온도(0℃ 이하, 5℃, 10℃, 25℃, 25℃ 이상), 습도(개발실 여건에 따라 조절)가 다른 조건에서 1세부과제에서 개발된 바이오전극에 고정된 저장성 및 안정성을 조사한다.
- 효소의 안정화 기술은 (주)소일테크가 안정화시킨 PVA-Sbq 고분자물질과 반응시켜 안정화시킨다.

### ○ 바이오전극 부착용 표준시료의 제작

- 표준시료제작 방법 기술은 농림부가 고시하고 있는 각종 유기인계 및 카바메이트계 살충제의 농도별 허용기준치와 기준치 대비 AChE의 저해도를 기준으로 각각의 농약별 농도를 정한 후 각 농도의 농약을 표준 농약 농도로 정하고 이 농도에서 반응하여 나타나는 바이오전극의 전위 차이를 이용하여 표준시료로 정한다.

### ○ 바이오전극용 원료용 효소의 효율 비교

- 본 연구팀과 (주)소일테크가 생산하고 있는 효소(AChE)와 대만의 TARI(Taiwan Agricultural Research Institute)에서 생산하고 있는 효소의 활성도 및 저해율을 10개 내외의 농약을 대상으로 비교하여 strip의 진단효율을 높이기 위한 연구를 진행한다.

### ○ 기존의 속성검사법의 end point 방법과 kinetic assay 방법과 본 기술의 바이오전극 측정 방법의 오차 요인 분석

- 기존의 잔류농약 속성검사에서 실험실 수준에서 실시하고 있는 end point 방식과 이를 개선을 시도하고 있는 kinetic assay 방법 및 본 기술의 strip 방식의 오차요인 및 문제점을 파악하고 상품화시 개선점을 조사한다.

### ○ 바이오전극의 현장성, 결과 재현성, 동작환경 개선

- 현장성을 높이기 위해 크기(15 x 10 x 7 cm 내외), 진단 결과 재현성, 고온과 저온에서의 동작환경 유지 기술을 개발한다.

#### 다. 협동과제: 바이오 전극법의 대만효소와의 민감도 비교

- 표준용액으로 제조한 농약에 대한 진단정밀도 검사
  - 제1세부과제의 기술개발 결과로 얻은 효소, strip, 바이오전극을 이용하여 chlorpyrifos 를 사용하여 바이오전극용 효소의 민감도를 조사한다.
  - 정밀분석: gas chromatography, HPLC 등으로 농도 측정
  - 간이속성 검사: 본사 기개발 AChE 유전자변형 진단키트, 대만 TARI 진단키트
- 채소류 현장 진단 시 정밀도 및 문제점 조사
  - 본 기술의 바이오전극에 사용한 방법과 기존의 효소 이용 속성검사법과의 진단정밀도와 편이성을 조사 비교한다.
- 효소의 민감도 비교 시험방법
  - 현재 기준으로 사용하고 있는 대만효소의 민감도와 스트립에 사용하는 민감도의 비교는 다음의 방법에 준하여 시험한다.
    - ① 메탄올에 용해된 농약의 표준용액에 브롬수 20 uL 첨가
    - ② 잘 혼합한 후 2분간 방치
    - ③ 별도의 시험관에 인산완충용액 5 mL 첨가
    - ④ 대만효소 및 본 개발 효소 10 uL 첨가
    - ⑤ 시험관에 추출액 100 uL 첨가
    - ⑥ 반응정지액 100 uL 첨가
    - ⑦ 37℃에서 5 분간 반응
    - ⑧ 기질용액 첨가하고 20초간 간격으로 교반하면서 15분간 반응
    - ⑨ 반응정지액 100 uL 첨가하고 2분간 더 반응
    - ⑩ 항온수조에서 꺼내어 발색용액 100 uL 첨가 ⑪ 기기로 측정
- 효소의 민감도 비교 시험 농약 종류
  - 0.01 - 1 ppm 범위의 농약 표준용액을 사용하여 대만효소와 본 연구과제에서 사용되는 효소에 대한 민감도 비교한다. 농약의 종류는 다음과 같으며, 농도와 농약의 종류는 변경될 수 있음.
  - 농약의 종류: Aldicarb, Azinphos-methyl, Cadusafos, Carbaryl, Carbofuran,

Chlorfenvinphos, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Diazinon, Dimethoate, Disulfoton, EPN, Ethion, Ethoprophos, Fenamiphos, Fenitrothion, Fenobucarb, Fenthion, Fosthiazate, Isazofos, Isofenphos, Malathion, Mecarbam, Methidathion, Metolcarb, Mevinphos, Omethoate, Oxamyl, Parathion, Parathion-methyl, Phenthoate, Phosalone, Phosmet, Phosphamidone, Phoxim, Pirimicarb, Pirimiphos-ethyl, Pirimiphos-methyl, Profenofos, Propoxur, Prothiofos, Pyraclofos, Pyrazophos, Pyridaphenthion, Tebupirimfos, Terbufos, Thiodicarb, Thiometon, Triazophos, Vamidothion 등

· 농산물 중 잔류농약에 대한 시험은 가락동 안정성 검사팀에서 농약잔류로 판정된 시료를 사용하여 검사효율 및 민감도의 성능을 비교한다.

- 스트립 고정 효소의 민감도 비교: 주관연구기관 및 참여회사에서 제공하는 스트립을 이용하여 농약의 농도별 반응조건별 민감도와 대만효소와의 민감도를 비교하고 스트립의 문제점 및 개선방안 조사
- 바이오전극형 측정방법의 비교: 주관 연구기관 및 참여회사에서 제공하는 본 연구의 결과물인 바이오센서형 측정방법과 대만효소 방법과의 민감도를 비교하여 바이오센서형 측정방법의 문제점과 개선방안 조사



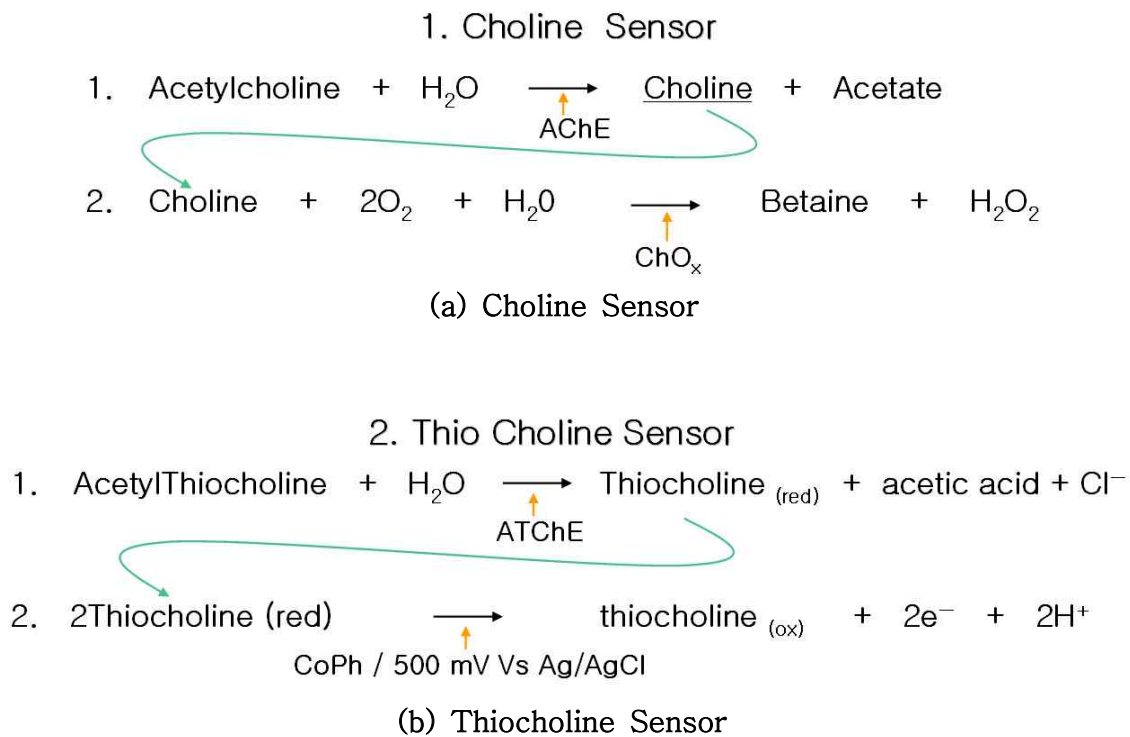
# 제 4 장 연구 결과

## 제 1 절 바이오 전극 개발과 기생산화 방지기술

### 1. 바이오 전극 개발

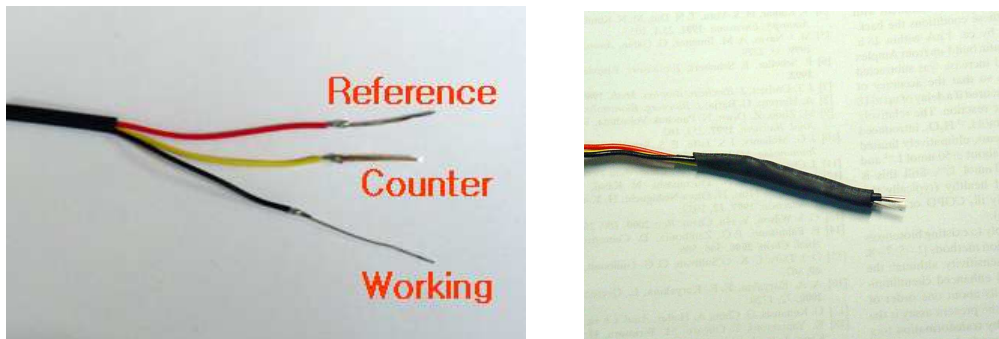
#### 가. 바이오 전극의 원리 및 전극 방식의 채택

잔류 농약 측정을 위한 바이오 전극의 원리는 그림 4-1과 같다. 그림 4-1(a)는 Choline 센서의 원리이고, (b)는 Thiocholine 센서 원리이다. 그림 4-1(a)에서 보는 것과 같이 바이오 전극에 있는 Acetylcholine(AChE)과 물(H<sub>2</sub>O)이 AChE와 반응하여 acetate와 Choline을 생성한다. 여기서 AChE는 농약에 의하여 저해되고 남은 양이므로, 생성되는 Choline의 양은 농약의 양에 반비례한다. 이러한 Choline을 측정하기 위하여 Choline Oxidase(ChO<sub>x</sub>)를

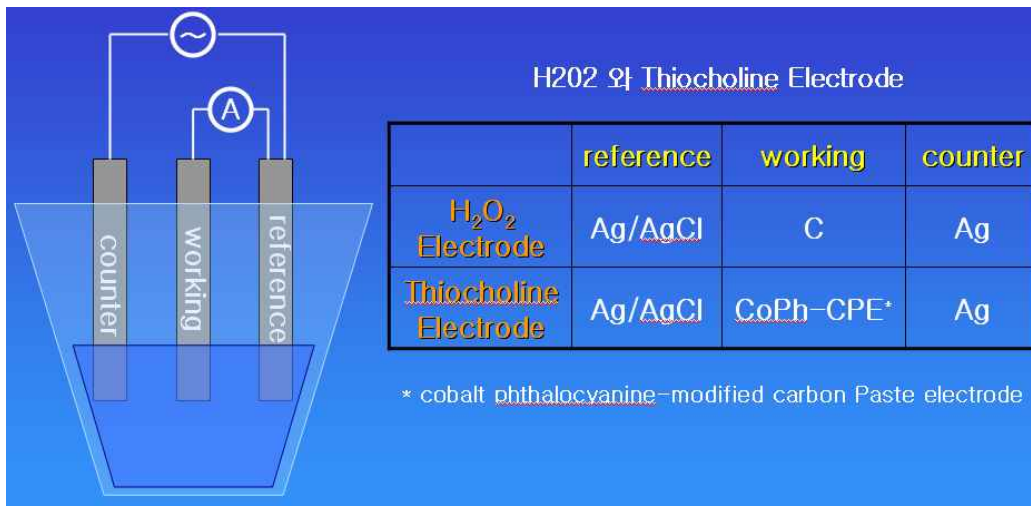


[그림 4-1] 전극을 이용한 바이오 전극의 측정원리.

이용한다. Choline은 ChOx 과 반응하여 betaine과 2개의 과산화수소를 만든다. 생성된 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)의 양은 잔류 농약에 반비례함으로 과산화수소 측정 센서를 제작하면 잔류 농약의 양을 측정 할 수 있다. 그림 4-1(b)는 Acetylthiocholine Estrase(ATChe) 효소를 이용하여 잔류 농약을 측정 할 수 있는 Thiocholine 센서 원리이다. Choline 센서와 마찬가지로 농약 양과 Thiocholine 양은 관계가 있다. Thiocholine 은 Cobalt phthalocyanine (CoPh)과 외부 전압에 의해서 전자와 수소 이온을 발생하며, 발생된 전자의 양과 수소이온의 양은 Thiocholine양에 비례한다. 그러므로 수소 이온 양을 측정하거나 전하량을 측정하면 농약 잔류 양을 측정할 수 있다.

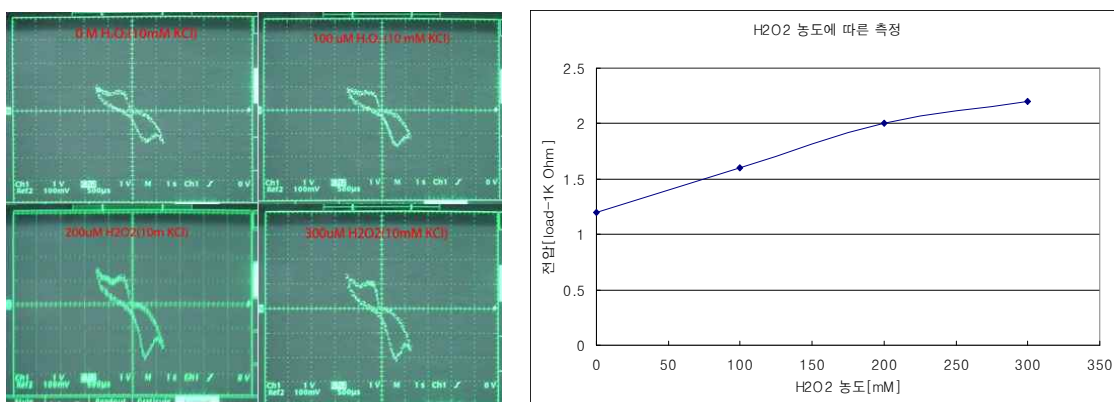


[그림 4-2] Wire Type Electrode

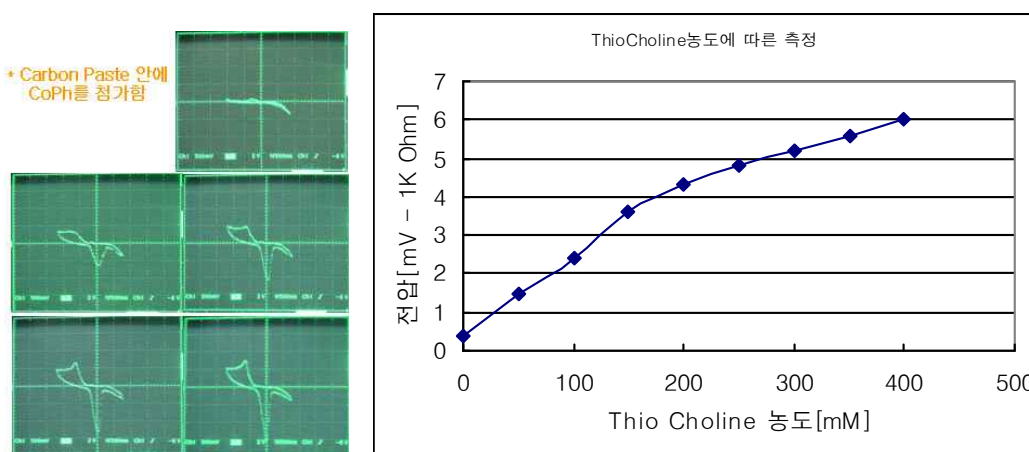


[그림 4-3] 바이오 전극의 측정 원리

이상의 2가지 방법의 효율성을 알아보기 위하여 그림 4-2와 같은 형태의 Wire Type Electrode를 구성하여 실험하였다. 첫 번째 방법(그림 4-1(a)) 즉, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 센서의 경우 기준 전극(reference electrode)은 Ag/AgCl을 사용하였고, 작동전극(working electrode)은 Carbon 유기물을 사용하였고, 보상전극(counter electrode)은 Ag(은)를 사용하여 제작하였다. 두 번째 방법(그림 4-1(b)) 인 Thiocholine 센서의 경우 기준전극은 Ag/AgCl을 사용하였고, 보상전극은 Ag를 사용하였으며, 작동전극은 Carbon 유기물과 CoPh(Cobalt phthalocyanine)을 혼합하여 사용하였다. 그림 4-2와 같이 제작된 2종류(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 센서, Thiocholine 센서)의 Wire Type Electrode를 이용하여 순환전압전류법(Cyclic Voltammetric Method(그림 4-3))으로 실험하였다. 각 센서에 대한 실험 결과는 그림 4-4와 그림 4-5와 같다. 그림 4-4와 4-5의 오실로그래프는 CV 실험 과정에서 얻은 결과로 전형적인 CV 도형을 보여주고 있다.



[그림 4-4] H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 센서 측정결과



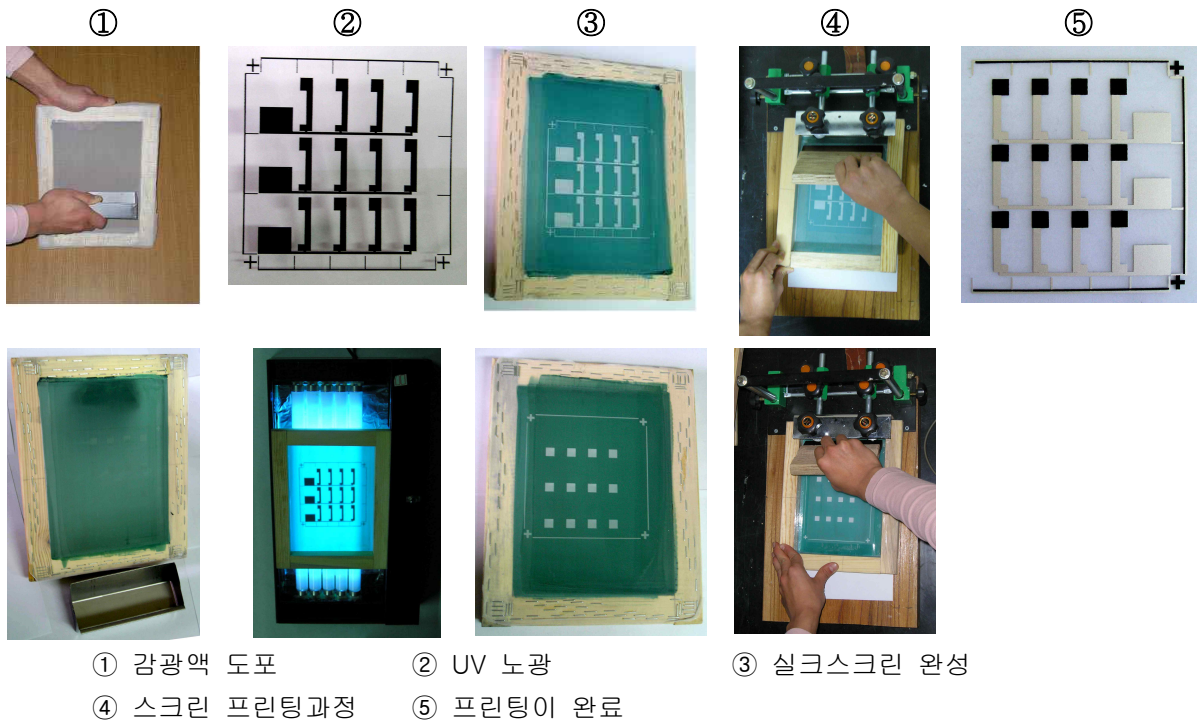
[그림 4-5] Thiocholine 센서 측정결과

Choline Sensor 방식(그림 4-4)과 ThioCholine Sensor 방식(그림 4-5)중 ThioCholine 방식의 민감도가 더 높은 것을 알 수 있었다. 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 측정하는 Choline Sensor 방식의 경우는 기생산화 등의 억제를 위해 Nafion 코팅 등의 복잡한 과정을 거쳐야하지만, 직접 ThioCholine의 산화 시 얻어지는 Electron을 측정하는 ThioCholine Sensor 방식은 기생산화 등의 문제가 거의 발생하지 않는다. 즉 이러한 결과에 의해 보다 효과적이고, 기생산화 등의 문제가 거의 발생하지 않는 ThioCholine Sensor 방식을 채택하여 바이오 전극 개발을 진행하였다.

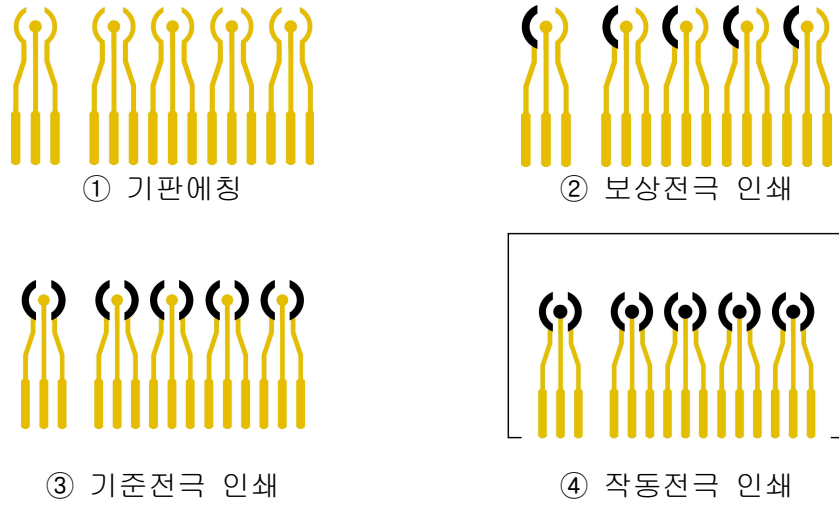
**나. Screen Printed Method를 이용한 바이오전극의 제작**

Wire Type 전극의 측정 결과를 바탕으로 생산성과 보존성을 향상시키기 위하여 Screen Printed Method를 이용하여 SPE(Screen Printed Electrode)를 제작하였다. SPE는 그림 4-6과 같은 방법에 의해 제작되었다.

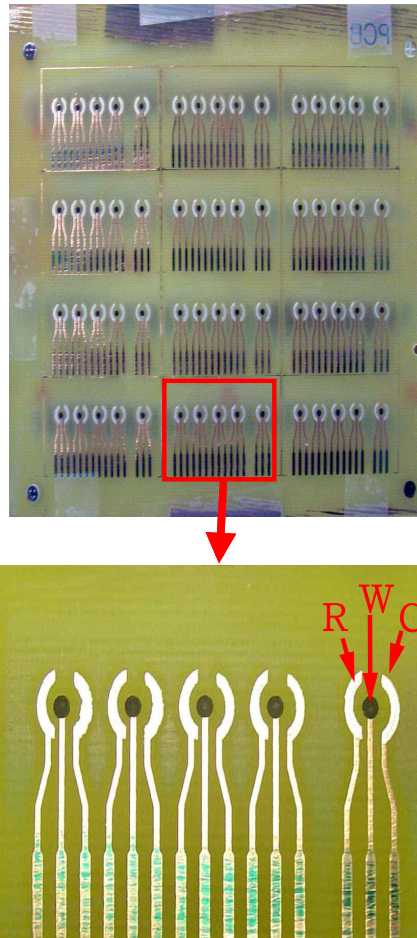
본 연구에서 사용되는 전극은 그림 4-3과 같이 기준 전극(RE)은 Ag/AgCl 페이스트를 이용하여 제작하였고, 보상전극(CE)은 Silver를, 작동전극(WE)은 탄소유기물과 CoPh를 혼합하여 제작하였다. 작동전극은 GWENT사의 Carbon Graphite Ink와 CoPh를 혼합하여 제작하였으며, 보상전극의 경우 Solids Content가 Ag 80 %wt/wt 인 GWENT 제품을 사용하였고, 기준전극의 인쇄 시 사용 된 Ag/AgCl은 Gwent 사의 Silver/silver chloride paste (Ag/Agcl : 60/40)를 사용하였다.



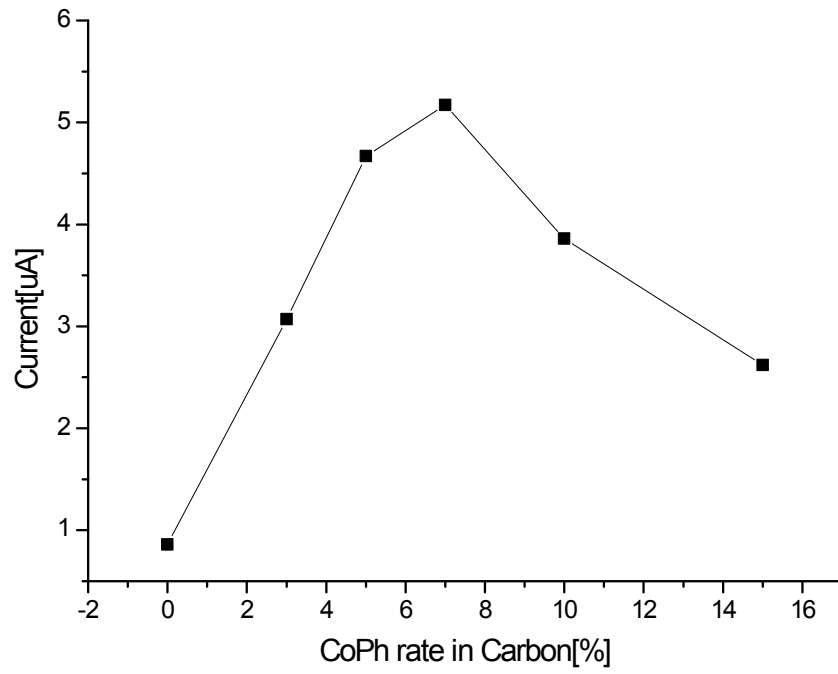
[그림 4-6] Screen Printing 방법



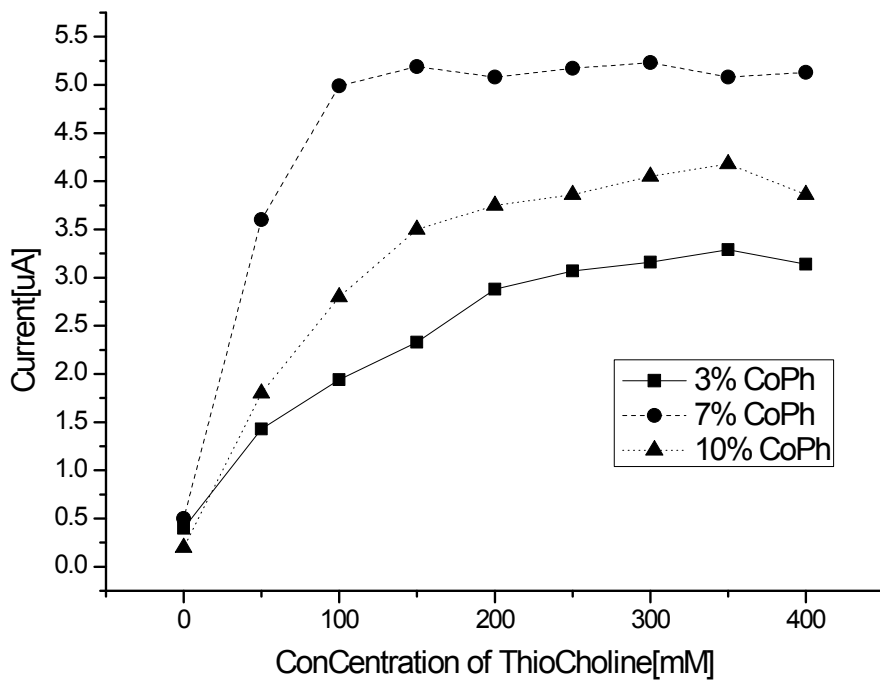
[그림 4-7] 전극 인쇄 순서



[그림 4-8] Screen Printed Electrode



[그림 4-9] CoPh 첨가 비율에 따른 측정결과



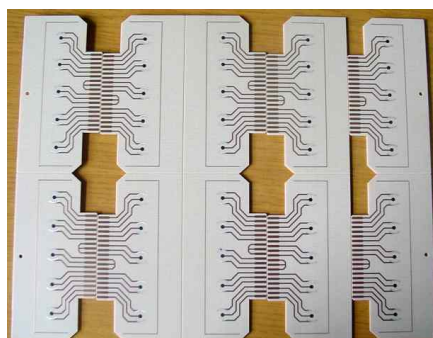
[그림 4-10] ThioCholine 농도에 따른 측정결과



Screen Printing 기법을 이용하여 전극을 인쇄하는 순서는 그림 4-7과 같다. 동박이 도포된 전자회로용 에폭시 기판을 ①과 같이 에칭한 후, Silver Ink를 이용하여 보상전극을 인쇄(②)하였고 120℃에서 15분간 건조 하였다. 그 다음은 Silver/silver chloride paste를 이용하여 기준전극을 인쇄(③)하고 80℃에서 20분간 건조하였다. 마지막으로 Carbon Graphite Ink와 CoPh를 혼합하여, 작동전극을 인쇄하였고 70℃에서 1시간동안 건조하였다. 이와 같은 방법으로 제작된 전극이 그림 4-8이다. 그림 4-9는 Screen Printing 기법을 이용하여 전극 제작 시, Carbon에 혼합된 CoPh의 첨가 비율에 따른 전류를 측정 결과이다. 그림 4-9에서 알 수 있듯이 CoPh의 첨가 비율이 7% 인 경우 민감도가 가장 좋았다. 또한 그림 4-10은 ThioCholine 양에 따른 측정결과이다. ThioCholine 양에 따라 전류가 증가하고, ThioCholine이 200μM 이상에서 포화되었다. ThioCholine 양에 따른 측정에서 역시 7% CoPh 인 경우 민감도가 가장 좋다.

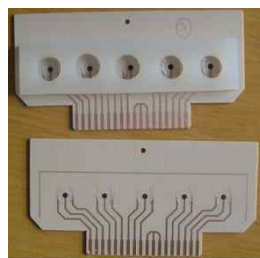
## 2. 상용화를 위한 시제품 개발

### 가. A version 용 시제품 개발



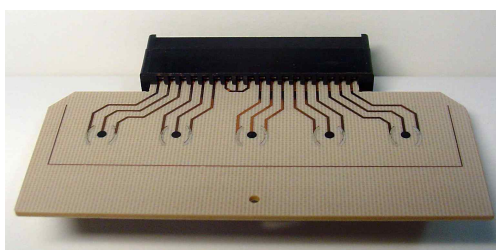
2 \* 5 Array Making Plate

(a)



1Piece Strip

(b)



(c)

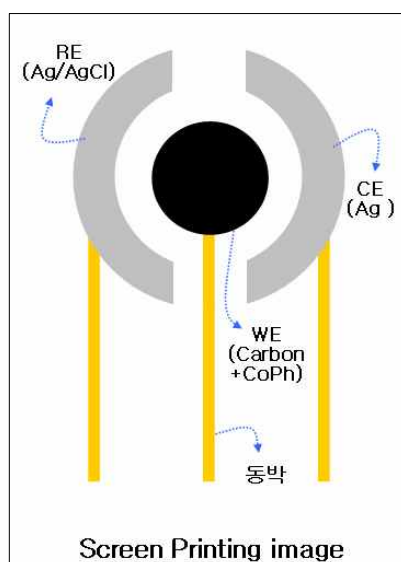
[그림 4-11] A version 용 시제품

그림 4-9와 그림4-10에서 측정된 결과를 이용하여 A version 용 바이오 전극 시제품을 개발하였다. 또한 대량생산성을 높이기 위해 전자회로 기판에 사용되는 PCB 자동화 생산 시스템에 적용시켜 개발하였다. PCB 자동화 생산 시스템을 통해 대량생산된 Electrode는 그림 4-11과 같다. 이렇게 생산되는 PCB는 1일 10만개(2×5 Array Making Plate) 생산이 가능하며, (b)는 측정시 시료 추출액을 떨어뜨리기 위한 블록을 장착한 그림이고, 블록은 발수 성질을 갖는 실리콘을 이용하여 제작하여, 200 $\mu$ L 추출액을 떨어뜨렸을 경우 이웃한 Electrode에 영향을 미치지 않도록 구성하였다. 또한 양산되는 Slot을 이용하여 Electrode를 연결하여 측정할 수 있도록 설계하였다(그림 4-11(c)). 이상의 샘플을 갖고 측정한 결과는 그림 4-10과 동일한 결과를 보였다.

#### 나. B version 용 시제품 개발(기생산화 방지와 재현성 향상)

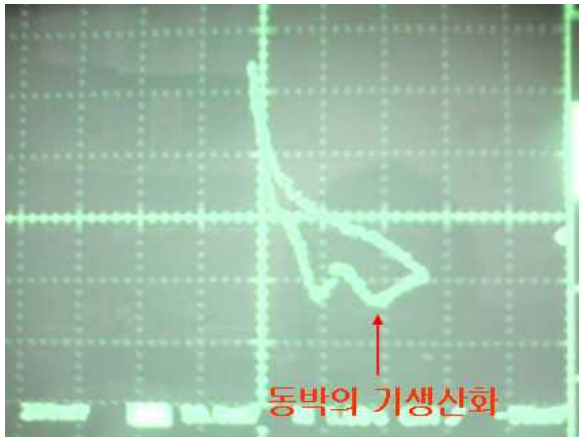
##### (1) 기생산화 방지

그림 4-12은 그림 4-8에서 제작된 Screen Printing 이미지이다. 그러나 그림 4-12에서 보는 것과 같이 동박이 노출되어 있다. 이러한 동박의 노출은 동박에 의한 기생산화가 진행될 수 있다. 즉, 전해질에 의해 동박이 산화 되어 전하의 흐름을 방지하고 이것이 센서의 재현성에 문제를 발생 할 소지가 다분히 많다. 그림 4-13(a)는 그림 4-11에서 생산된 전극을 그대로 측정한 결과이고, 그림 4-13(b)는 동박 부분을 절연물질(Polymer Dielectric Ink, Gwent)을 이용하여, 노출된 동박 부분에서 반응하지 않도록 처리하여 측정한 결과이다.

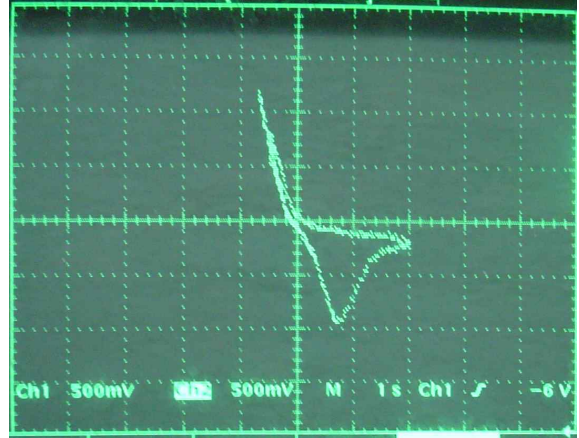


[그림 4-12] A version 용 시제품



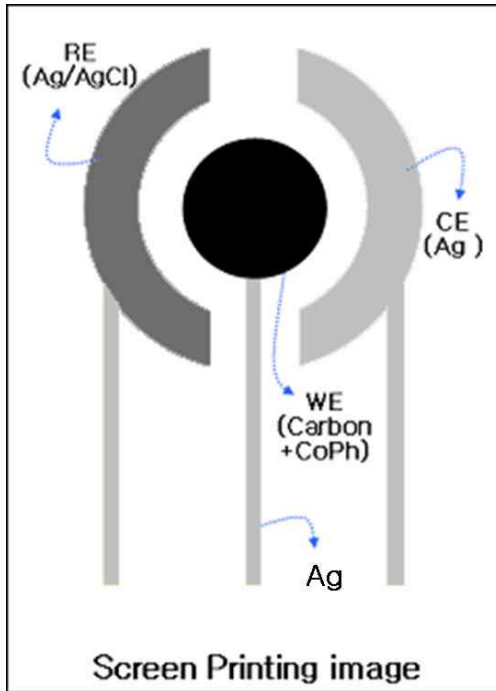


(a) 동박이 반응 한 경우

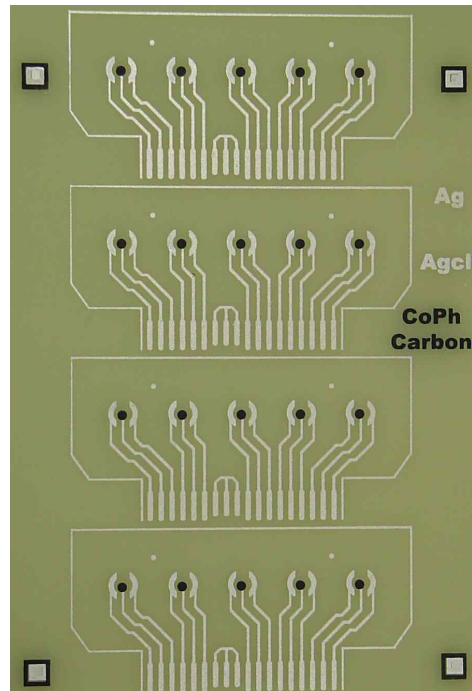


(b) 동박이 반응하지 않은 경우

[그림 4-13] 동박에 의한 기생산화



(a)



(b)

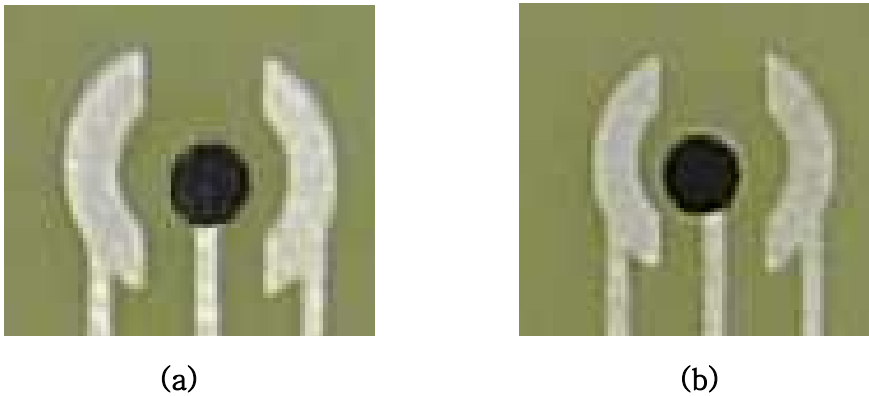
[그림 4-14] B version 용 시제품

그림 4-13의 실험 결과는 예측한 것 같이 동박이 전해질과 반응하여 과전류가 흘러 산화되어 CV 도형에 영향을 주는 것을 알 수 있다. 그림 4-13의 결과를 바탕으로 동박이 완전히 제거된 PCB(에폭시 판)를 사용하여, 보상전극의 Silver(Ag) 인쇄 시 그림 4-14와 같이 동박 부분을 silver가 대신하도록 인쇄하여 제작하였다. Ag 페이스트는 노블 메탈로

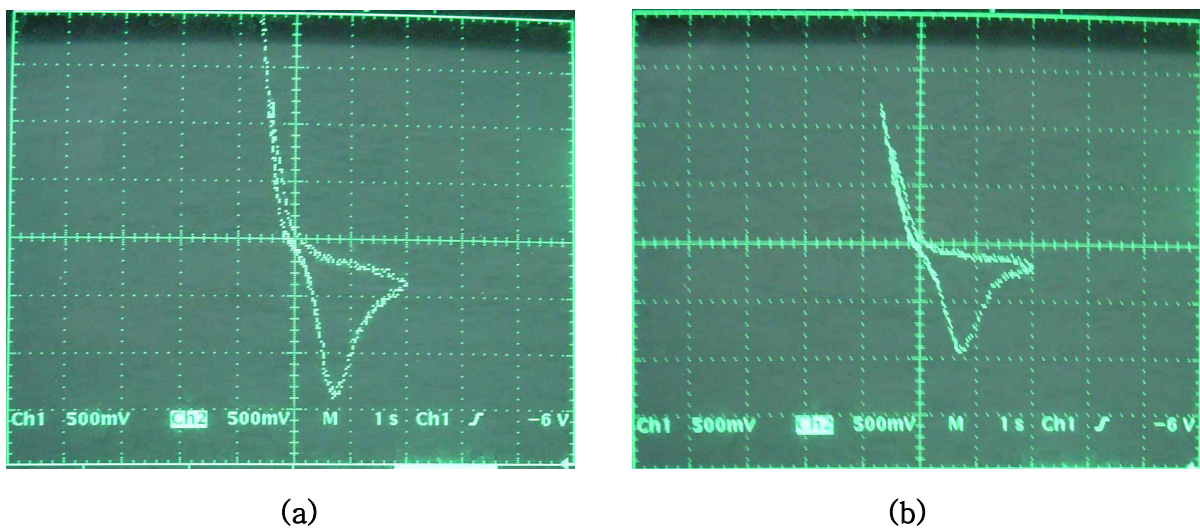
서 구리에 비해 산화성이 매우 적어 동박에서 발생하였던 기생 산화 현상을 현저히 줄일 수 있다. 그 결과 그림 4-13(a)와 같은 동박에 의한 기생산화가 제거 되었다.

## (2) 재현성 향상

그림 4-15는 그림 4-14의 작동 전극을 확대한 이미지이다. (a)는 작동전극이 위치가 정 중앙에 위치한 경우이고, (b)는 기준전극으로 치우쳐 인쇄된 경우이다. 이와 같은 경우 작동전극과 기준전극 사이의 저항과, 작동전극과 보상전극 사이의 저항이 차이가 발생한다. ThioCholine 센서의 경우 발생된 전하량을 측정하는 것인데 전극 사이의 저항 값이 변하면 발생된 전하의 흐름에 변화가 생겨 유도기전력이 달라지므로, 바이오 전극 간에 오차가 발생하게 된다. 즉 그림 4-15(a)와 (b)는 그림 4-16과 같이 측정 결과의 차이가 나타나게 된다.

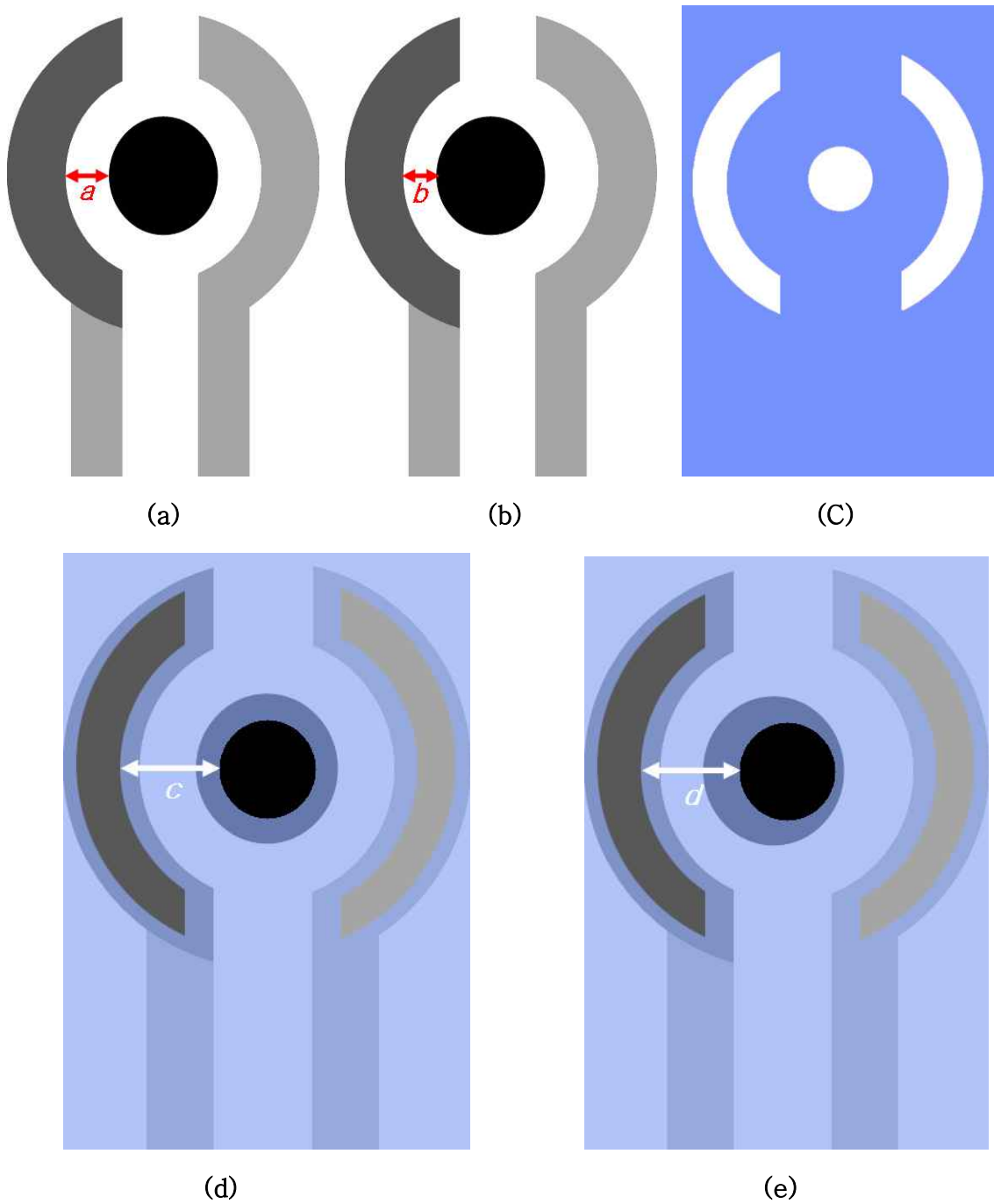


[그림 4-15] 작동전극의 인쇄 위치



[그림 4-16] 작동전극의 인쇄 위치에 따른 측정결과

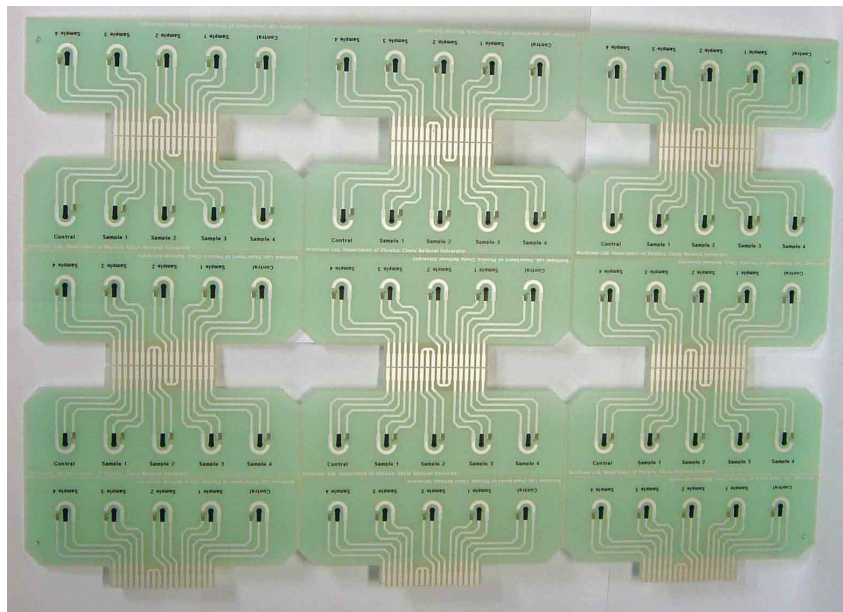
그림 4-16은 그림 4-15와 같이 작동전극의 인쇄 위치가 다른 전극을 이용하여 측정한 결과로, (a)는 그림 4-15(a)의 측정결과이며, (b)는 그림 4-15(b)의 측정결과이다. 그림 4-16(a)의 경우 1400 mV 가 측정되었으며, (b)의 경우 950 mV 가 측정되었다. 즉, 작동전극이 기준전극 방향으로 치우친 경우 중앙에 있는 경우에 비해 높은 전압이 측정되었다.



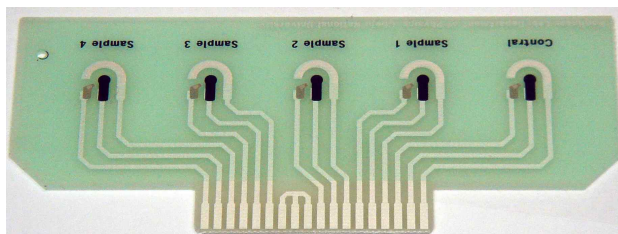
[그림 4-17] 절연물질 인쇄를 이용한 위치에 따른 오차 감소 방법

그림 4-16에서와 같이 인쇄 시 발생하는 작동전극과 보상전극, 기준전극 거리차를 최소화하기 위하여, 그림 4-14와 같이 인쇄가 완료된 후, 절연물질(Polymer Dielectric Ink, Gwent)을 이용하여 그림 4-17(c)와 같은 형태를 인쇄하였다. 그림 4-17(a)와 (b)는 그림 4-15와 같은 경우로 그림 4-17(a)는 작동전극이 중앙에 위치한 경우이며, 그림 4-17(b)는 작동전극이 왼쪽으로 치우친 경우로, 그림상의  $b$ 가  $a$ 에 비하여 더 짧다. 앞에서 언급한 바와 같이 그림 4-17(a)와 (b)를 절연물질을 이용하여, 그림 4-17(c)와 같은 형태를 그림 4-17(a)와 (b)에 각각 인쇄하여, 그림 4-17(d)와 (e)와 같은 결과를 얻는다면, 그림상의  $c$ 와  $d$ 는 작동전극의 위치와 무관하게 같아지게 된다. 즉 발생된 하전량에 비례해서 유도되는 기전력 값의 오차, 즉 인쇄 오류에 의한 센서의 오차를 최소화 할 수 있다.

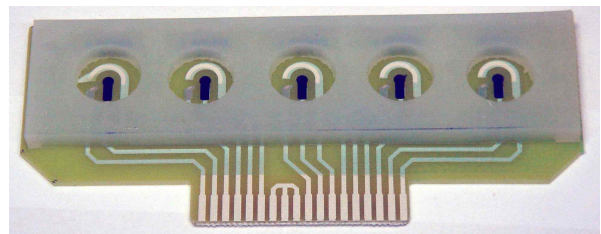
다. C version 용 시제품 개발



(a)



(b)



(c)

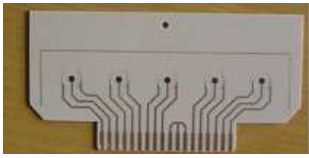
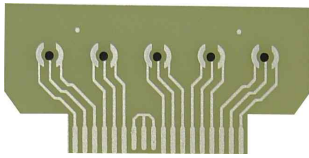
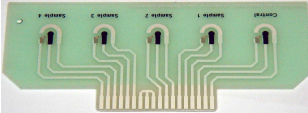
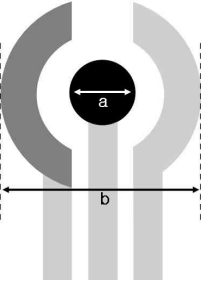
[그림 4-18] C version 용 시제품 개발



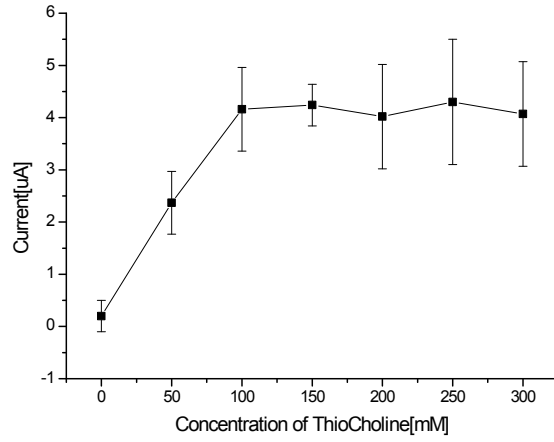
그림 4-18은 C version 용 시제품으로, B version과 마찬가지로 절연물질을 사용하였다. 또한 기준전극의 크기를 줄이고, 보상전극의 크기를 늘려 인가전압의 영향이 작동전극에 편향 되지 않도록 그림 4-18과 같이 디자인 하였다. 또한 3×15 Array(그림 18 (a))로 제작하여 생산단가 및 생산 효율을 증대 시켰다.

표 4-1은 A~C Version 용 시제품을 비교한 것이다. 동박에 의한 기생산화 발생을 막기 위해 B와 C version에서는 동박 대신 Sliver를 사용하였고, 절연물질을 사용하여 인쇄오차 문제를 해결함으로써, 인쇄 오류에서 발생하는 오류를 최소화하여 재현성을 향상하였으며, 더욱이 보상전극의 기하학적 모양을 변경하여 작동전극의 인가전압 편향을 최소화하여 줌으로써 C version의 경우 재현성이 향상되었다.

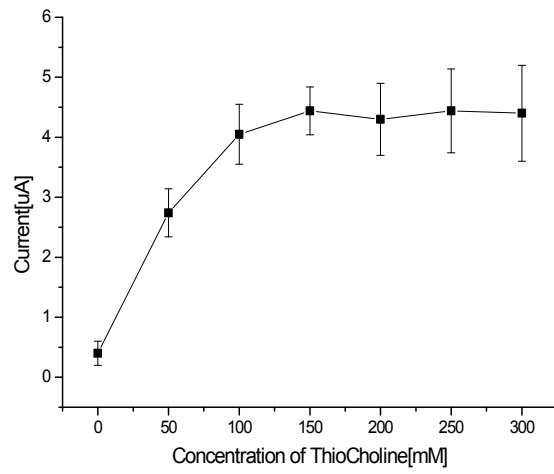
또한 작동전극의 크기를 1.8에서 2.5mm로 향상시켜줌으로써 신호의 세기를 크게 하여 잡음 대 신호 비를 향상 시켰다. 그리고 생산성 향상과, 단가 절감을 위하여 3×5 Array로 설계하여 전극의 생산성을 향상시켰다.

항목	A Version	B Version	C Version
이미지			
동박	사용함 - 기생산화 발생	Sliver 대체 - 기생산화 제거	Sliver 대체 - 기생산화 제거
절연물질	사용하지 않음 - 인쇄오차 발생	사용함(투명) - 인쇄오차문제해결 - 인쇄상태 확인 어려움	사용함(반투명) - 인쇄오차문제해결 - 인쇄상태 확인 가능
보상전극형태	보상전극이 편향됨	보상전극이 편향됨	보상전극의 편향 최소화
크기 	a : 1.8 mm b : 5.5 mm	a : 1.8 mm b : 5.5 mm	a : 2.5 mm b : 8.4 mm
1회 인쇄시 생산성	2×5 Array 10개 생산	4개	3×5 Array 15개 생산

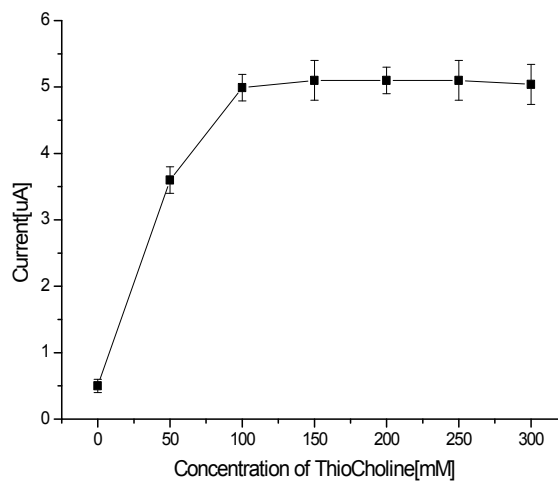
[표 4-1] 시제품용 바이오 전극의 Version 비교



(a) A version 시제품

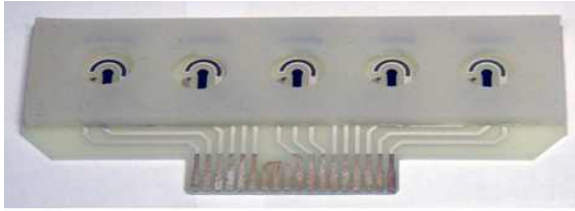


(b) B version 시제품

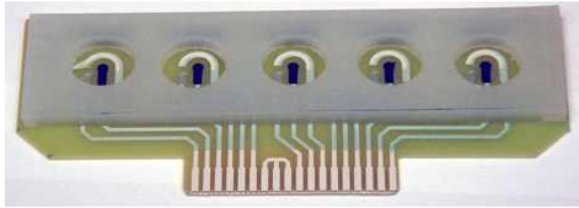


(c) C version 시제품

[그림 4-19] ThioCholine 농도에 따른 측정 전류



(a) 산화된 전극



(b) 산화되지 않은



(c) 은박 진공포장

[그림 4-20] 바이오전극의 산화방지를 위한 은박 진공포장

그림 4-19는 ThioCholine 양에 따른 version A, B 및 C의 측정결과 이다. 측정결과를 비교해 보면, (a) 와 (b)에 비해 (c)의 전류 값이 상대적으로 크다. 이는 작동전극의 크기가 A와 B version에 비해 상대적으로 크기 때문이다. A와 B version의 경우는 비슷한 측정결과를 보인다. ThioCholine이 300 mM에서 측정 전류는 A version 인 경우  $4.07 \mu\text{A}$  이며, B version의 경우  $4.4 \mu\text{A}$  이며, C version의 경우  $5.04\mu\text{A}$  이다. 또한 상대 오차율은 A version 인 경우 24.6% 이며, B version 인 경우 16.2% 이며, C version 인 경우 6% 이다. 여기서 오차율은 표준편차를 구한 후 백분율로 환산한 값이다. A version에 비해 B version이 오차율이 감소한 것은 절연물질 사용하여 인쇄오차를 최소화하고, 동박 대신 Silver를 사용함으로써 기생산화를 최소화시킴으로서 감소한 것으로 보인다. 또한 B version에 비하여 C version이 오차가 감소한 것은 전극의 기하학적 모양을 변경하여, 작동전극에 가해지는 Potential Voltage를 전 방향에서 골고루 받을 수 있도록 한 것과, 작동전극의 크기를 크게 함으로써 신호 대 잡음비를 향상시킴으로써 감소한 것으로 보인다. 그리고 ThioCholine이 100 mM 이상인 경우 측정전류가 포화됨을 알 수 있었다.

그림 4-20은 은박포장을 한 전극과 하지 않은 전극의 Slive 산화를 비교한 그림이다. (a)의 경우 6개월 동안 상온에 보관한 전극으로 절연물질이 도포되지 않은 나머지 Slive 영역이 산화되어 탈색되었고, 이는 전극의 측정에도 영향을 미친다. (b)의 경우는 (c)와 같이 은박 진공포장을 한 상태로 6개월 동안 상온에 보관한 전극으로, Slive 영역이 산화되지 않았다.

## 제 2 절 바이오 전극용 측정기 시제품 개발

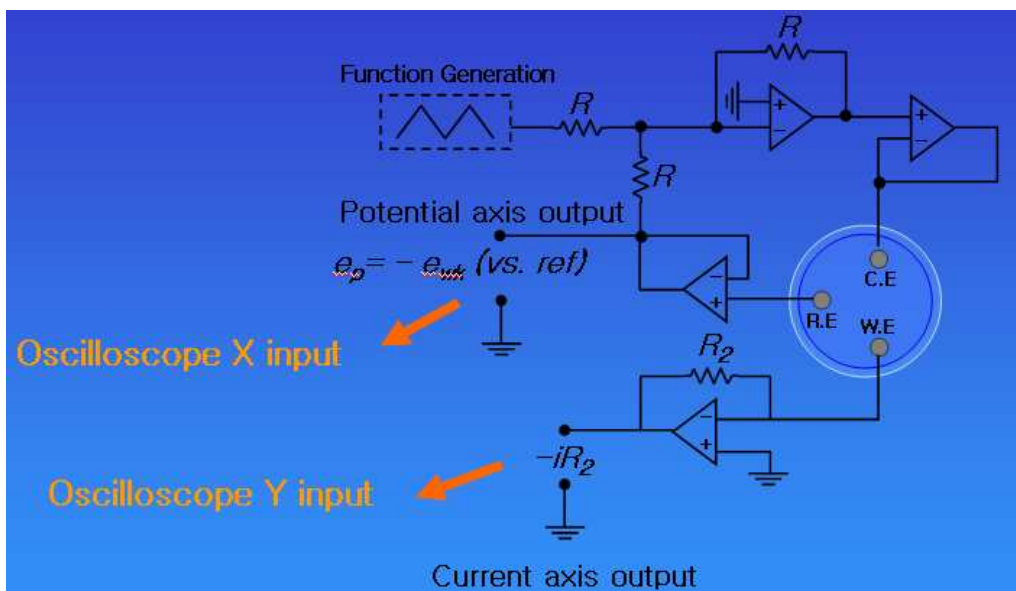
### 1. 바이오 전극의 미소 전류 측정 기술 개발

#### 가. 순환 전압 전류법(CV : Cyclic voltammetry)

순환 전압 전류법은 많은 전기화학측정법 중에서, 전극 표면 또는 전극표면 근방에서 어떠한 반응이 일어나고 있는가를 가장 직접적으로 파악할 수 있는 방법의 하나이다. 그러므로 CV는 전기 화학적으로 활성인 산화환원 화학종의 전극반응의 '초기진단법'으로 유용하고, 전류가 낮은 경우에 측정성능이 우수하다.

측정되는 전류-전위곡선을 순환전압전류곡선(Cyclic Voltammogram)이라 부르는데, 이것은 전위주사의 함수로서 산화환원 화학종에 관한 정보를 준다는 점에서 보통의 전류-전위 주사 분포 그래프와 유사하다. 전기화학이외에도 무기화학, 유기화학, 고분자화학, 생화학 등 분야에서 이용되고 있다. 예를 들면, 산화환원 쌍의 형식, 산화환원전위, 평형상수, 농도, 전극반응에 관여하는 전자수, 화학반응의 속도상수, 흡착현상, 전자이동반응의 속도론적 파라미터등도 구할 수 있다. 그런데 이것의 적용조건에서는 매우 주의해야 한다.

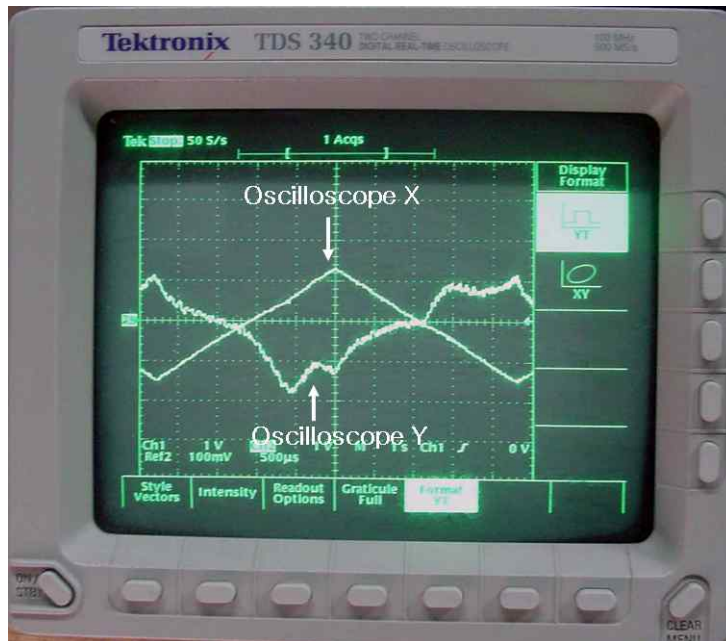
정성적 및 반정량적 측정에서는 매우 편리한 측정법이지만 정량적 측정에서는 펄스(pulse)법, 스텝(step)법 등을 일반적으로 사용된다.



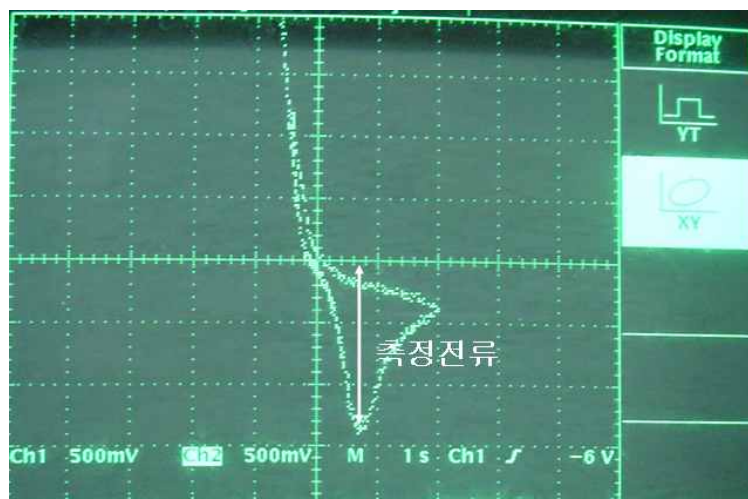
[그림 4-21] 순환 전압 전류법 회로도



그림 4-21은 본 연구에서 제작된 바이오 전극을 순환 전류법을 이용하여 측정하기 위한 회로도이다. 이 회로는 기준전극에서 얻어진 Potential과 Function Generator 에서 입력된 전압을 합하여 보상전극에 Potential을 인가하는 시스템으로 구성되어있다. 또한 작동전극에서 발생한 전류는 Current to Voltage 회로를 이용하여, Voltage로 변환하여 측정한다. 또한 Function Generation은 Gwinstek사의 SFG-1003을 사용하였고, Oscilloscope는 Tektronix사의 TDS-340을 이용하였다.



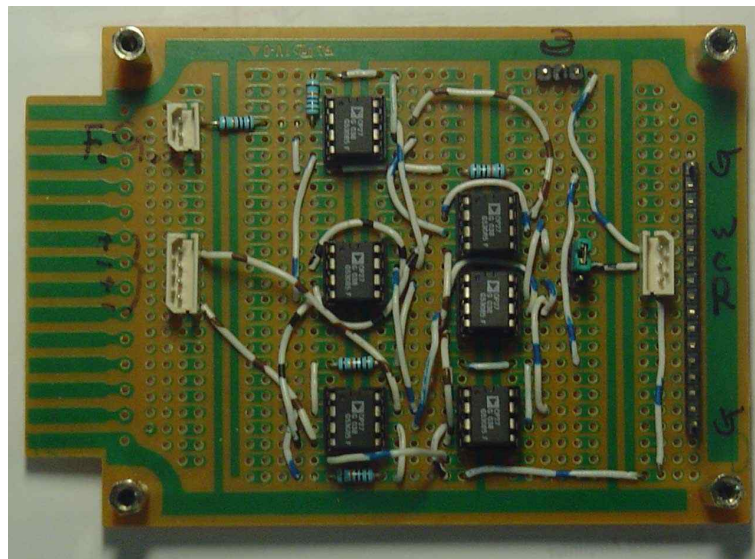
(a) Y-T 모드



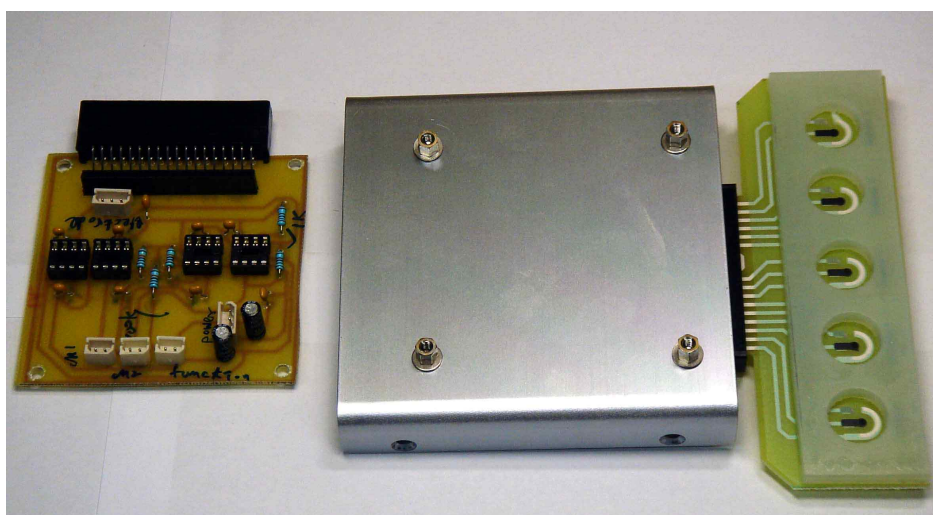
(b) X-Y 모드

[그림 4-22] CV 오슬로그래프

그림 4-22은 순환 전류법 측정을 이용하여 측정한 결과이다. (a)의 경우 Oscilloscope Y-T Mode (전압-시간)로 측정한 결과 이며, 그림 4-20에 표현된 X input과 Y input를 시간에 따라 측정한 결과 이다. 그리고 Function Generator 의 주사(scan) 설정은 삼각파 (peak to peak : -1V ~ +1V)로 설정하였고, Scan Speed는 0.22 V/Sec 로 설정하였다. Oscilloscope X가 1V 보다 약 250 mV 높게 나오는 것은 기준전극에 사용된 Ag/AgCl 의 Potential 때문이다. (b)의 경우 Oscilloscope X-Y Mode로 측정한 결과로 CV 방법에 의한 전형적인 오실로그래프이고, 오실로그래프이 비대칭인 것은 산화 환원 반응이 대칭적이지 않기 때문이다. 본 연구에서 사용된 전극의 경우 그림 4-22(b)에 표시된 “측정 전류”와 같이 X축이 400 mV 부에서 peak 값을 측정값으로 하였다.(그림4- 22(b)).



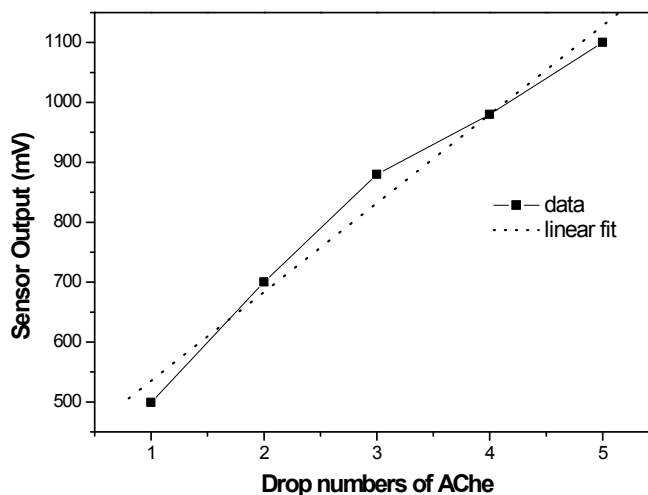
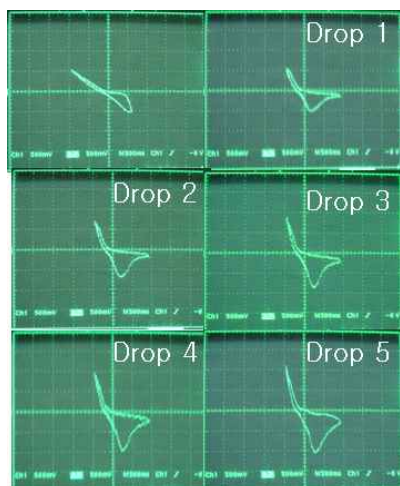
(a)



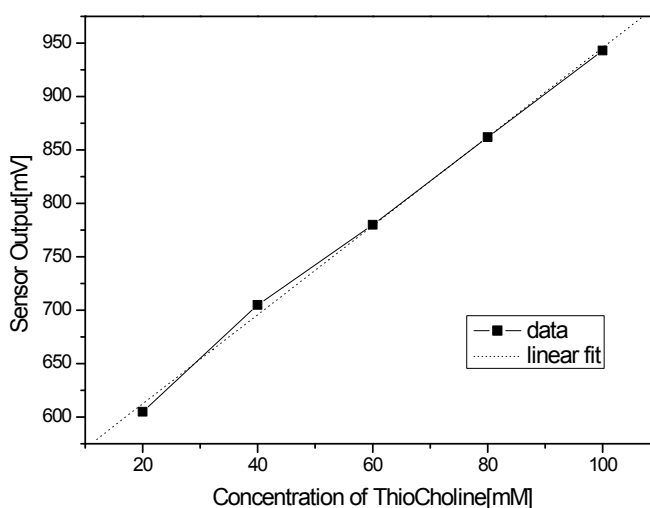
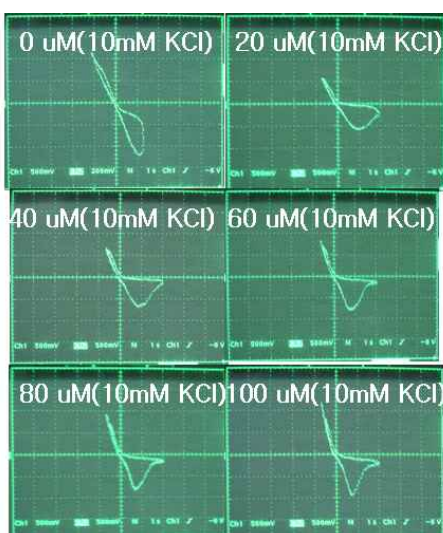
(b)

[그림 4-23] 간이 제작된 CV 회로

측정 회로는 그림 4-21의 회로도를 바탕으로 그림 4-23과 같이 제작하였다. 그림 4-23(a)는 상용기판에 직접 제작 한 회로이며, (b)는 카드 프로그램을 사용하여 회로 설계 후 프린트 기판(PCB)을 사용하여 제작하였다. 그리고 알루미늄 케이스를 사용하여 주변 전기 잡음을 차폐하였다.



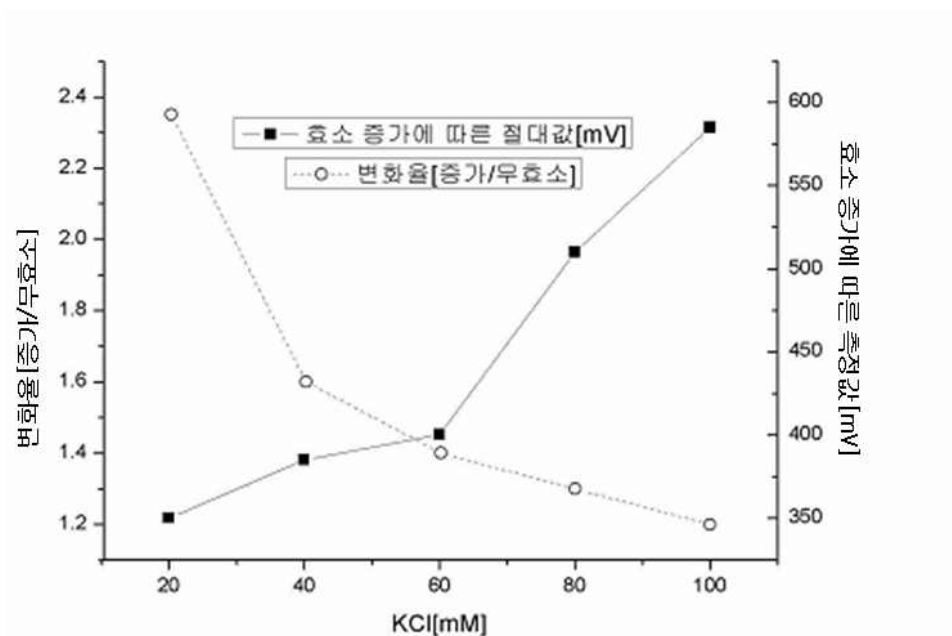
[그림 4-24] AChE의 drop에 따른 바이오 전극의 측정 결과



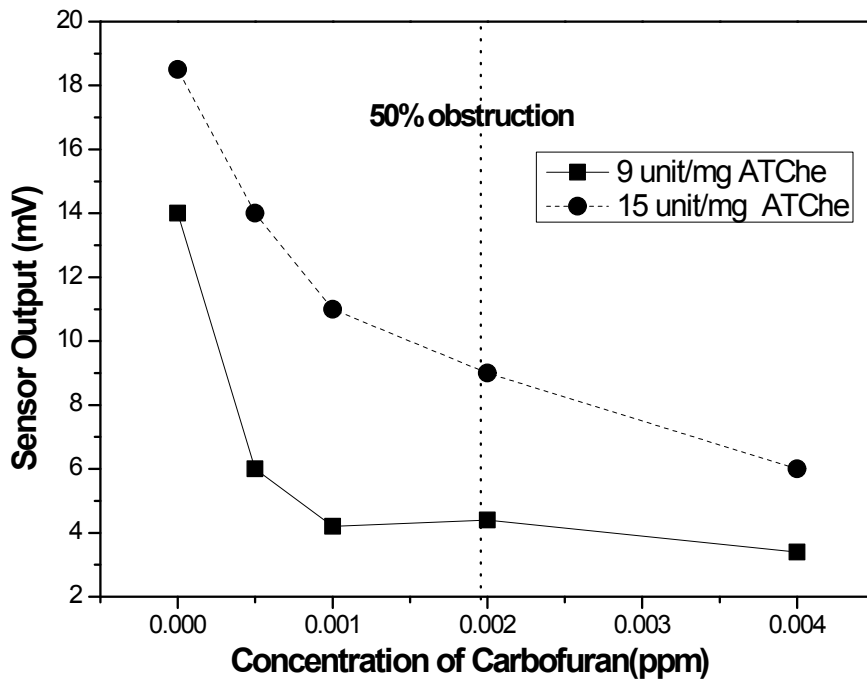
[그림 4-25] ThioCholine 농도에 따른 바이오 전극의 측정 결과

제작된 회로를 이용하여 측정된 ThioCholine양에 따른 측정결과가 그림 4-24와 25에 나타나 있다. 그림 4-24는 10 mM KCl PBS 200 $\mu$ l 용액에 1 mM ATCh를 첨가한 후, ATChE를 20 $\mu$ l씩 drop하여 측정한 결과이다. 측정결과 ATChE를 첨가함에 따라 전압 변화를 확인 할 수 있었다. 또한 100번의 재현성 실험에서는 5% 미만의 표준오차율로 높은 재현성을 갖는 것을 알 수 있었다. 그림 4-25은 그림 4-24와 같은 조건의 실험에서 Drop 방식이 아닌 정량으로 만들어진 ATChE를 첨가함에 따른 전압 변화이다. 또한 그림 4-12는 ATChE 희석비율에 따른 데이터로 ATChE를 희석한 비율이 증감함에 따라 측정 전압이 작아지는 것을 알 수 있었다. 그러나 ATChE의 농도가 높아짐에 따라 전압이 증가하지만 농약에 대한 민감도는 반감된다. 또한 KCl 역시 같은 결과를 나타내는데, 그림 4-26은 KCl과 효소의 비석 비율에 따른 증가를 한 그래프 상에 표시하였다. 그림 4-13으로부터 KCl의 농도가 작을수록 효소의 희석 비율이 높을수록 민감한 반응을 한다는 결론을 얻을 수 있었다.

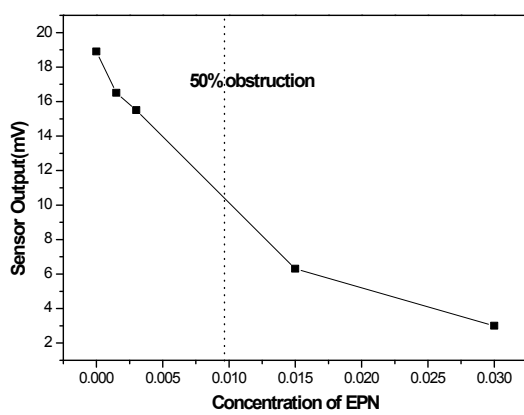
이 실험 결과를 토대로 실제 농약과의 반응을 알아보기 위하여 센서에 카보후란을 첨가하면서 전극의 출력 값을 측정하였다. 즉 외부에서 ATChE와 농약을 반응시킨 후 센서에 떨어뜨려 측정하였다. 그 결과는 그림 4-27과 같다. 그림에서 50% 저해율로 표시된 부분은 잔류농약 분광법으로 측정하였을 때 50% 저해율의 결과가 나오는 카보후란 농도이다. 그림 4-27에서 실선은 9 unit/mg ATChE와 1mM KCl PBS를 전해질로 사용한 경우의 실험 결과로, 극소량의 농약에도 매우 민감한 반응을 보임을 확인하였다.



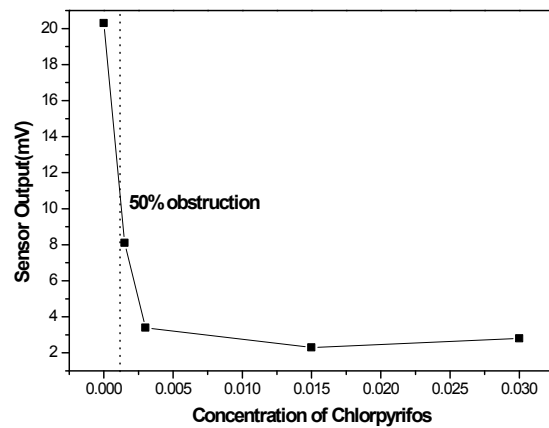
[그림 4-26] KCl 농도에 따른 효소 반응성



[그림 4-27] 카보후란 농도에 따른 반응 측정



(a) EPN



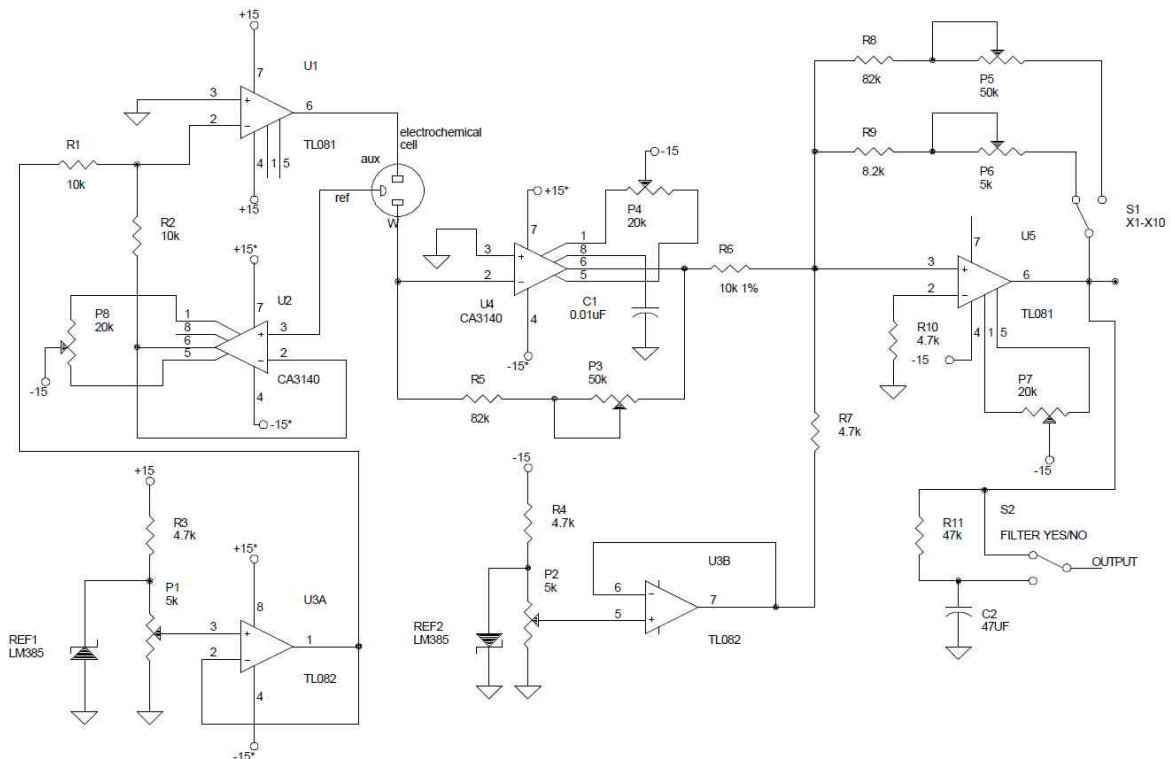
(b) 클로르피리포스

[그림 4-28] 유기인계 농약에 따른 반응 측정

그러나 현재 분광법 잔류농약 측정의 경우 판정기준이 50% 임을 고려해 볼 때, 9 unit/mg ATChe 인 경우 농약의 농도가 일정 수준이상에서는 효과적인 반응을 할 수가 없으므로, 즉 0.001 ppm 이하에서는 민감한 반응성을 보이나 그 이상에서는 반응정도의 차이가 미미하여 센서로서는 적합 하지 못하다.

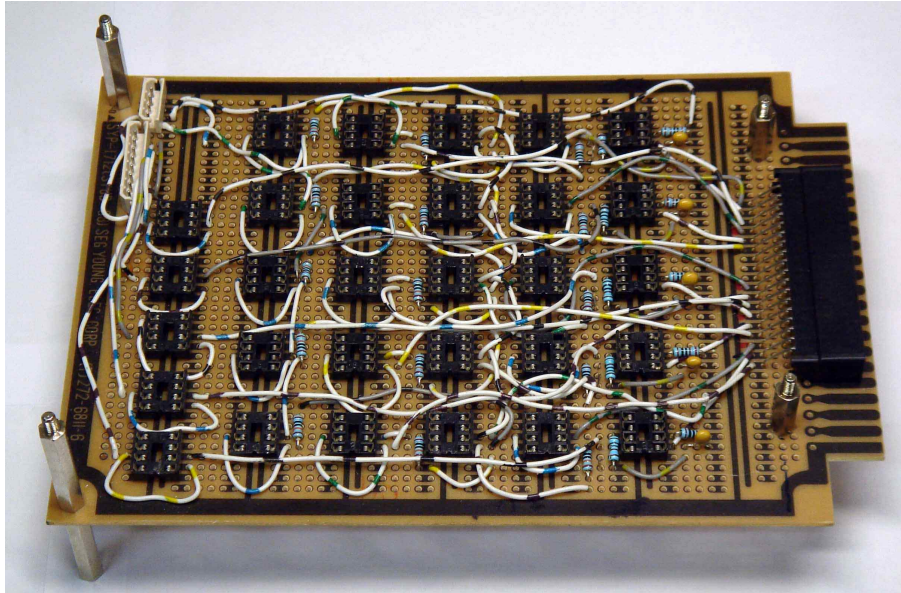
이를 해결하기 위하여 ATChe 의 농도를 15 unit/mg 로 변경하여 실험을 하였고, 그 결과가 그림 4-27 의 점선이다. 그림 4-27의 점선 결과 카보후란 농도가 0 ~ 0.04 ppm(전체 투입 용액 중 농약의 농도) 범위에서 센서의 반응이 거의 선형적임을 알 수 있다. 또한 측정값의 재현성을 위하여 1개의 시료 당 100번씩 측정한 결과 측정값의 오차가 2 % 미만이었다. 그러므로 탄소 유기체와 CoPh 를 혼합하여 제작한 전극이 농약 잔류량 측정센서로서 매우 적합함을 알 수 있었다. 이결과를 바탕으로 유기인계 농약인 EPN(그림 4-28(a))와 클로로피리포스(그림 4-28(b))에 적용하였다. 그림 4-28은 ATChe의 농도를 15 unit/mg 으로 하였고, 그 결과 카보후란의 경우와 마찬가지로 유기인계 농약에서 역시 본 연구에서 제작한 전극이 농약 잔류량 측정 센서로서 매우 적합함을 알 수 있었다.

나. 전류측정법(Amperometric)



[그림 4-29] 전류측정법의 회로도



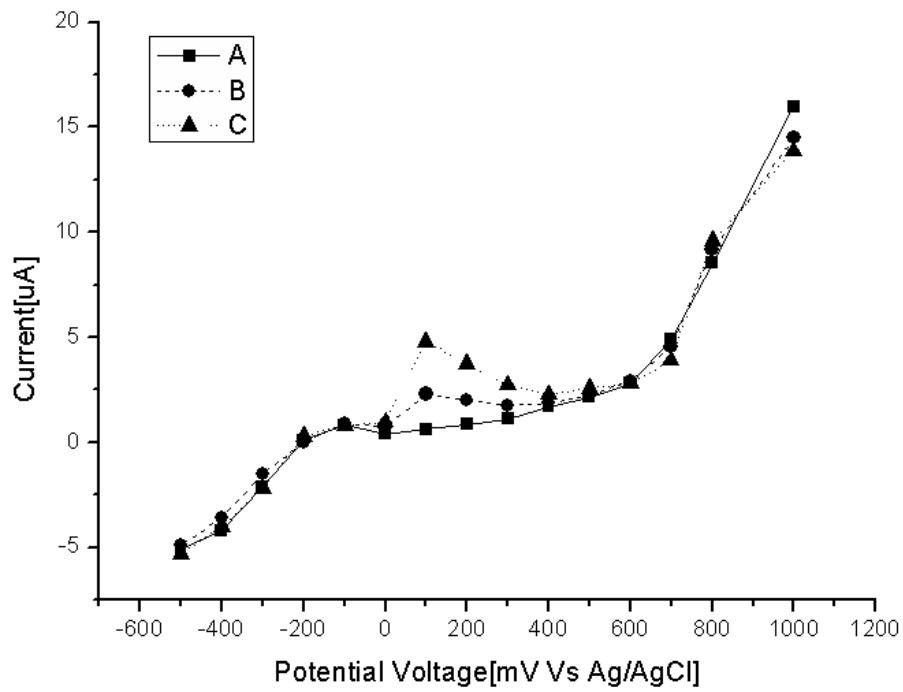


[그림 4-30] 바이오 전극 측정을 위한 전류측정법 회로

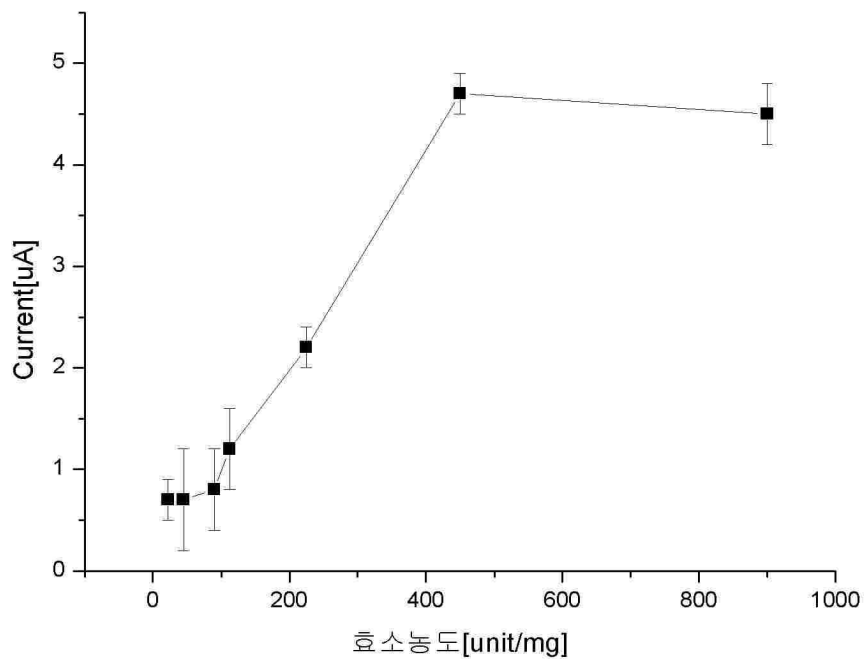
바이오 전극의 측정법으로는 크게 순환 전압 전류 측정법과 전류측정법으로 구분된다. 순환 전압 전류 측정법의 경우 nano-ampere 대역의 미소 전류를 효과적으로 측정 할 수 있다. 그러나 측정된 순환전압전류곡선을 실제 측정값으로 취하는 방법이 매우 까다롭고, 순환 전압을 만들어 주기위한 함수발생기가 필요하며, Oscilloscope가 필요하므로, 휴대가 용이한 포터블 타입을 위한 시스템에는 부적합하다. 또한 본 연구에서 제작한 바이오전극은 5개의 전극이 1set으로 구성되어 5개의 측정을 동시에 측정하는 시스템을 구성해야 하므로 현실적으로 순환 전압 전류 측정법을 이용한 포터블 타입 측정기 개발은 매우 힘들다.

전류측정법(Amperometric)은 미소 전류를 측정하기 위해서는 초저잡음 전류측정기술 확보되어야만 한다. 그러나 고정 전압을 가하므로 함수발생기가 필요하지 않으며, 측정된 data를 손쉽게 얻을 수 있으므로 포터블 타입 적용이 가능하다.

그림 4-29는 전류측정법으로 미소 전류를 측정하기 위해서 초저잡음 전류측정기술이 확보된 회로도이다. 이 회로는 그림 4-21과 유사한 특성을 갖는 회로이나, 보상전극에 가해지는 전압을 주사 할 필요가 없으므로 Function Generation을 대신하여 P3와 P1(그림 4-30)의 저항과 OP-Amp.(회로도상 TL082)을 이용하여, 안정적인 고전압을 발생 시켰다. 또한 기준전극의 전압을 변환해 주는 에미터플로어 (회로도상 CA3140)와 작동 전극의 전류측정을 위한 Current to Voltage 회로와 증폭을 위한 OP-Amp.에는 Off-Set을 조정하여 OP-Amp.에서 발생하는 오차를 최소화 하였다. 그림 4-30은 그림 4-29를 상용기판에 직접 제작 한 회로이고, 인가전압을 설정하기 위한 반응조사 결과가 그림 4-31이다.

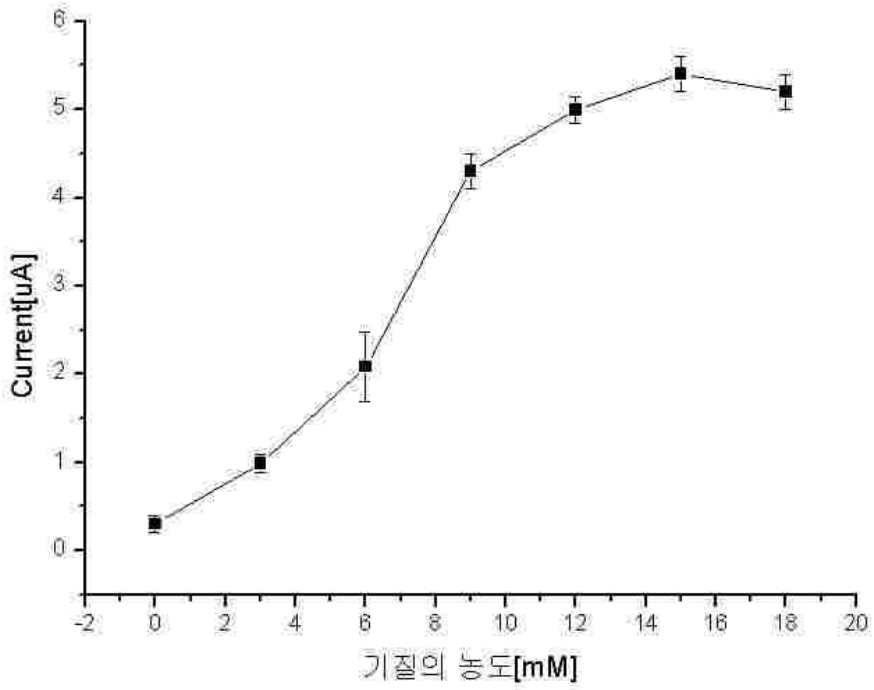


A : ATChE = 0 , B : ATChE = 225 unit/mg , C : ATChE = 450 unit/mg  
 [그림 4-31] Potential Voltage를 설정하기 위한 반응 조사

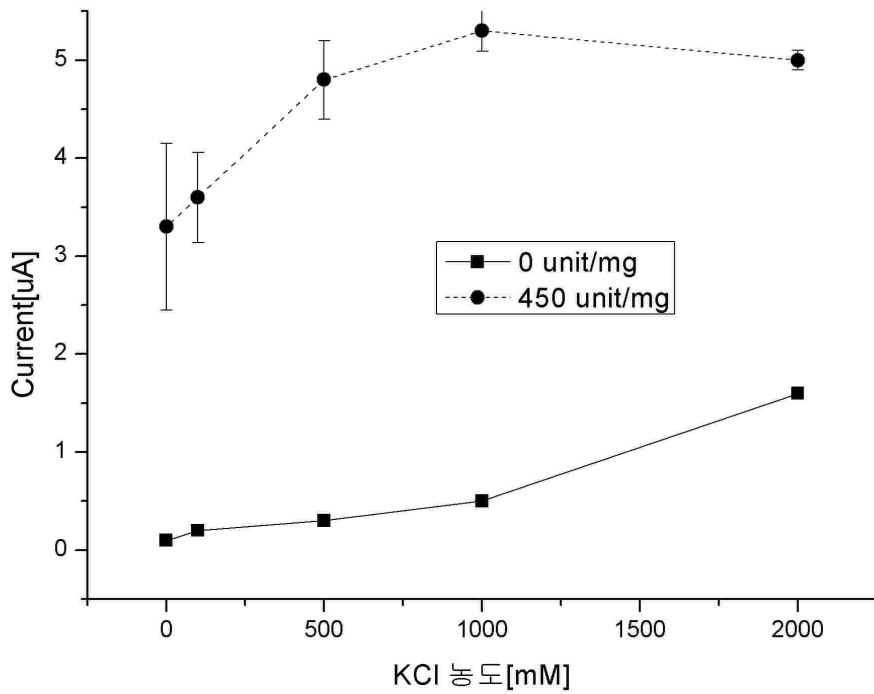


[그림 4-32] 효소 농도에 따른 반응 조사

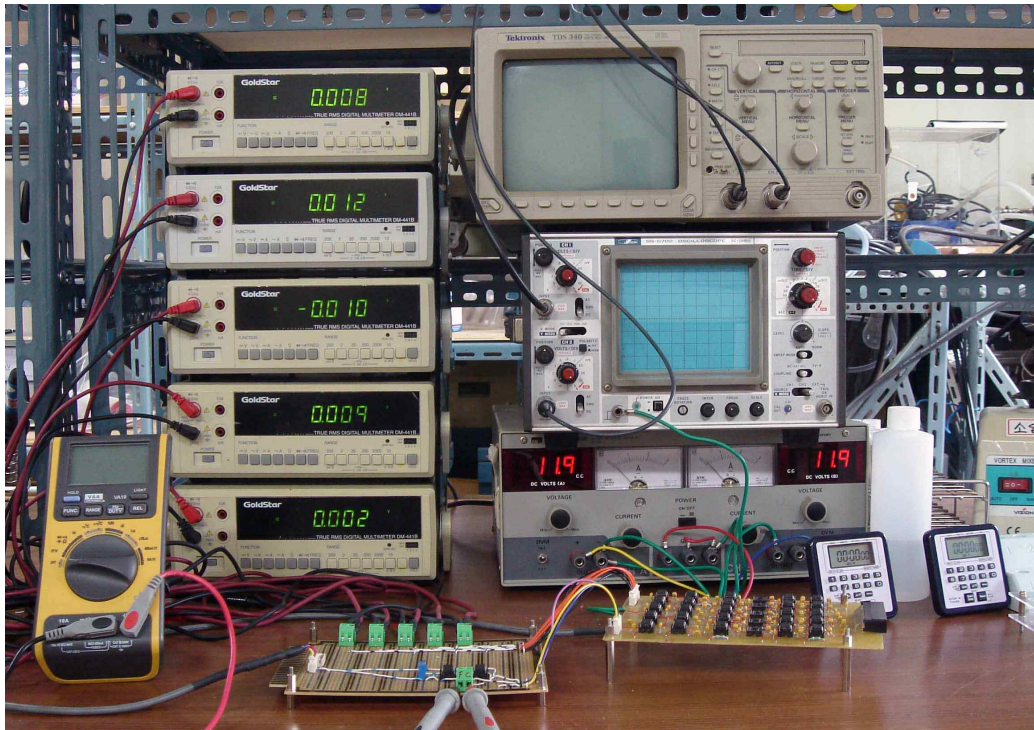




[그림 4-33] 기질 농도에 따른 반응 조사



[그림 4-34] KCl 농도에 따른 반응 조사

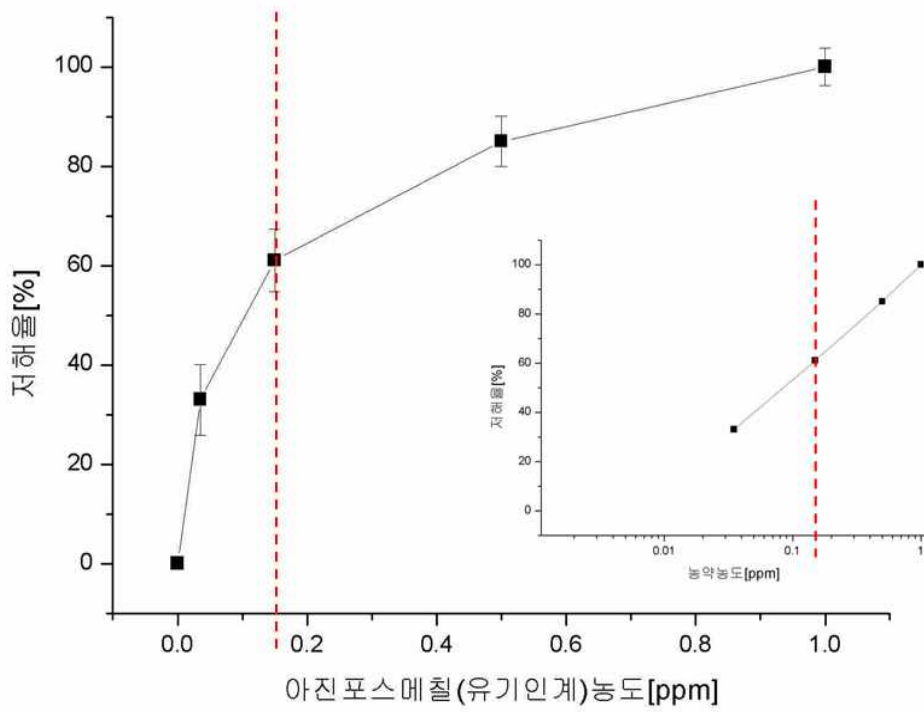


[그림 4-35] 5개의 바이오 전극을 동시에 측정하기 위한 측정장치 설치

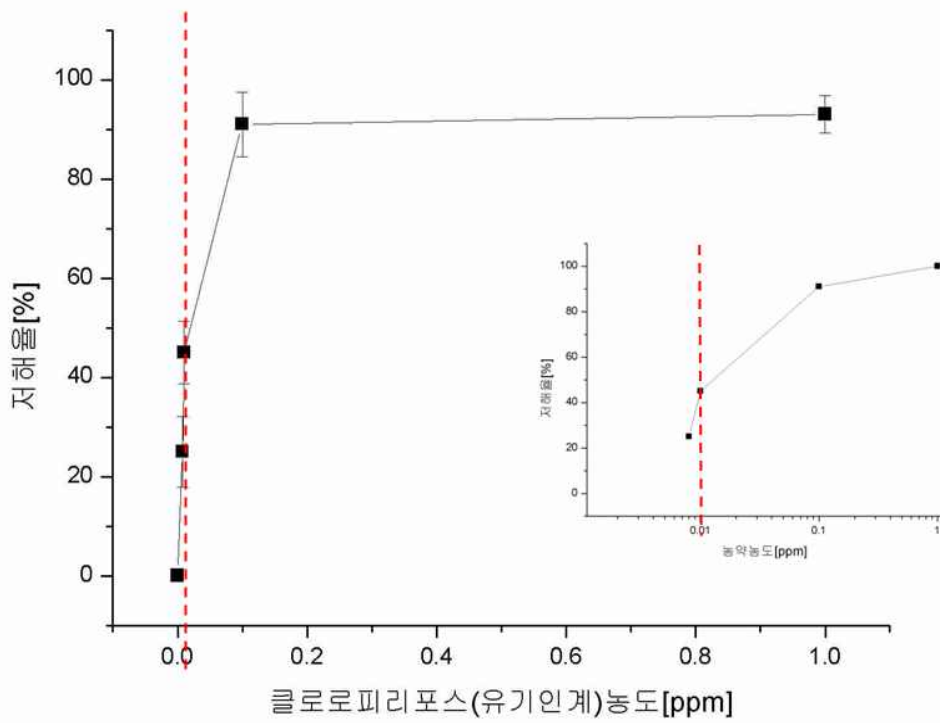
그림 4-31은 1M KCl PBS 500 $\mu$ L 에 15 mM 기질 40  $\mu$ L과 효소 40  $\mu$ L를 농도에 따라 각각 적용한 결과이다. 그림 4-30의 측정결과에서 알 수 있듯이 인가전압이 100 mV에서 효소 농도에 따른 반응이 최고임을 알 수 있다. 본 연구에서 개발된 바이오 전극의 경우 전류측정법에서 100 mV vs. Ag/AgCl 인 경우 ThioColine(red)에 의한 산화 반응이 극대화 되었다.

그림 4-32는 효소 농도에 따른 측정결과이다. 측정결과에서 알 수 있듯이 효소농도가 450 unit/mg 에서 최고 전류 값을 갖으며, 그 이상에서는 포화 값을 얻었다. 또한 20회의 측정 결과 450 unit/mg 에서 3% 미만의 표준편차 오차율을 보였다.

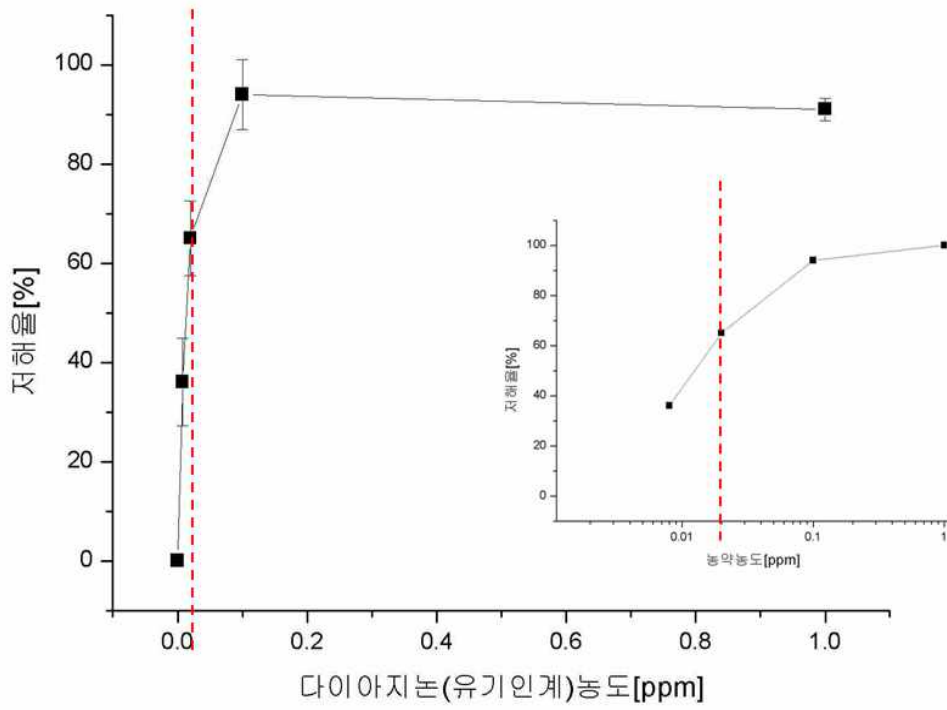
그림 4-33은 1M KCl PBS 500  $\mu$ L, 450 unit/mg 효소 40  $\mu$ L 에 그림과 같은 농도의 기질을 40 $\mu$ L 를 첨가 한 측정결과로, 기질의 농도가 15 mM 인 경우 최고 전류 값을 갖는다. 그림 4-34는 KCl 농도에 따른 측정결과이다. KCl 농도가 낮을수록 표준편차의 오차율이 증가하고, 효소(450 unit/mg)에 의한 출력 전류가 줄어든다. 또한 KCl 농도가 1M 이상인 경우는 출력전압이 높고, 표준편차 오차율이 매우 작으나, 효소의 농도가 450 unit/mg 인 경우와 0 unit/mg 인 경우의 차가 작다. 이는 CV로 측정한 그림 4-26과 같은 결과이다.



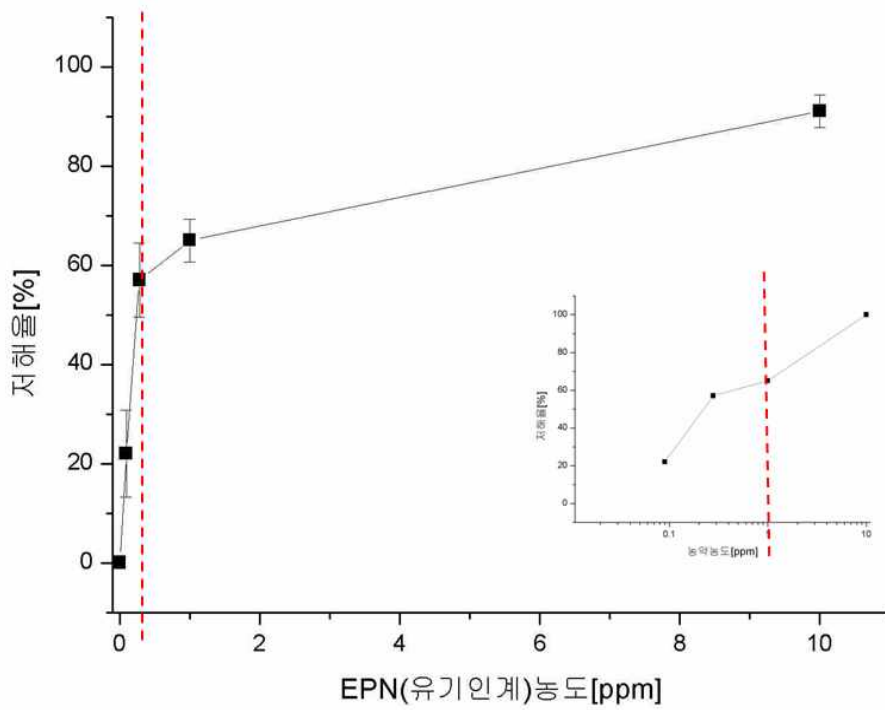
[그림 4-36] 아진포스메틸 농도에 따른 측정결과



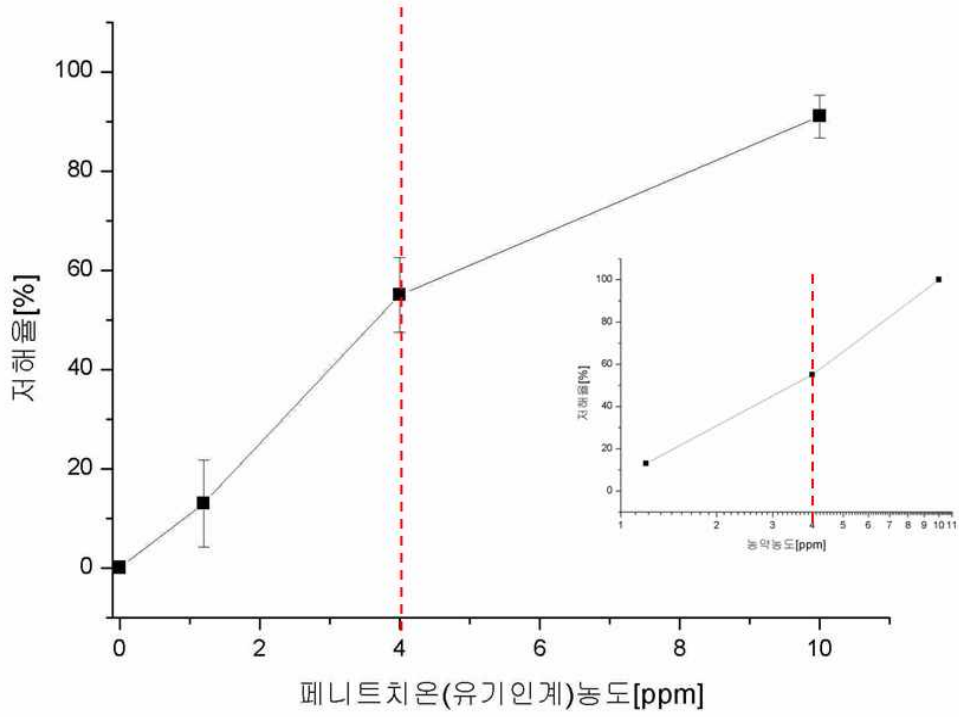
[그림 4-37] 클로로피리포스 농도에 따른 측정결과



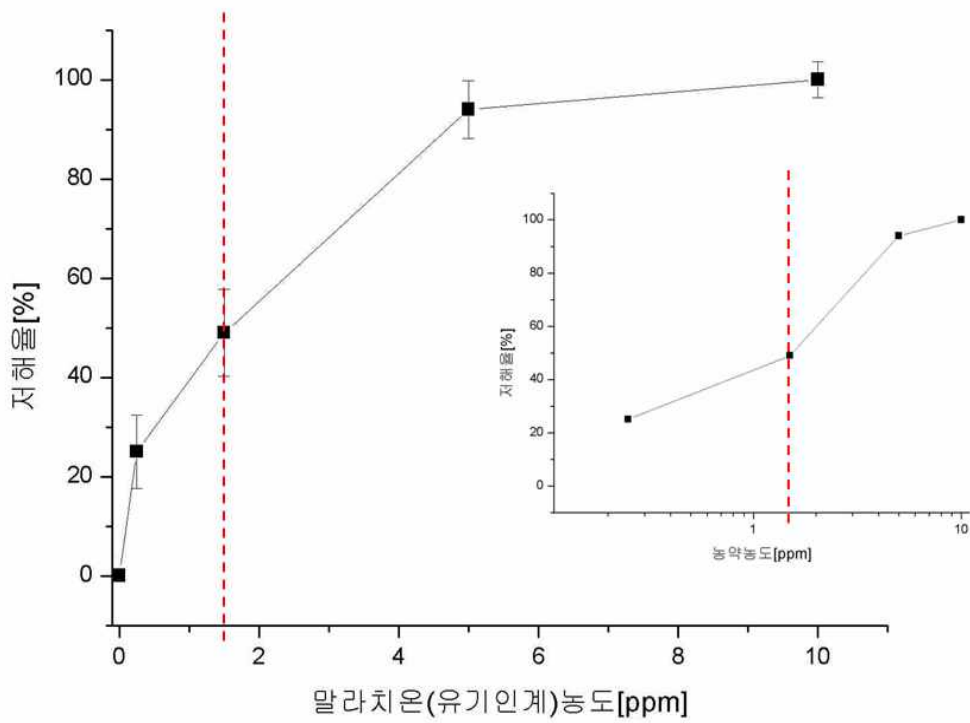
[그림 4-38] 다이하지논 농도에 따른 측정결과



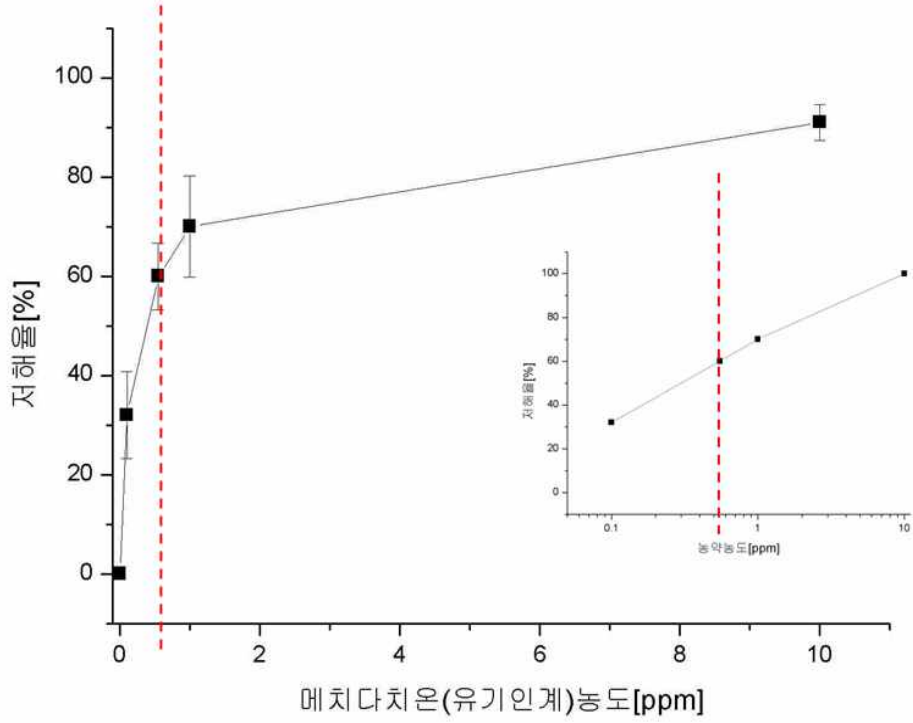
[그림 4-39] EPN 농도에 따른 측정결과



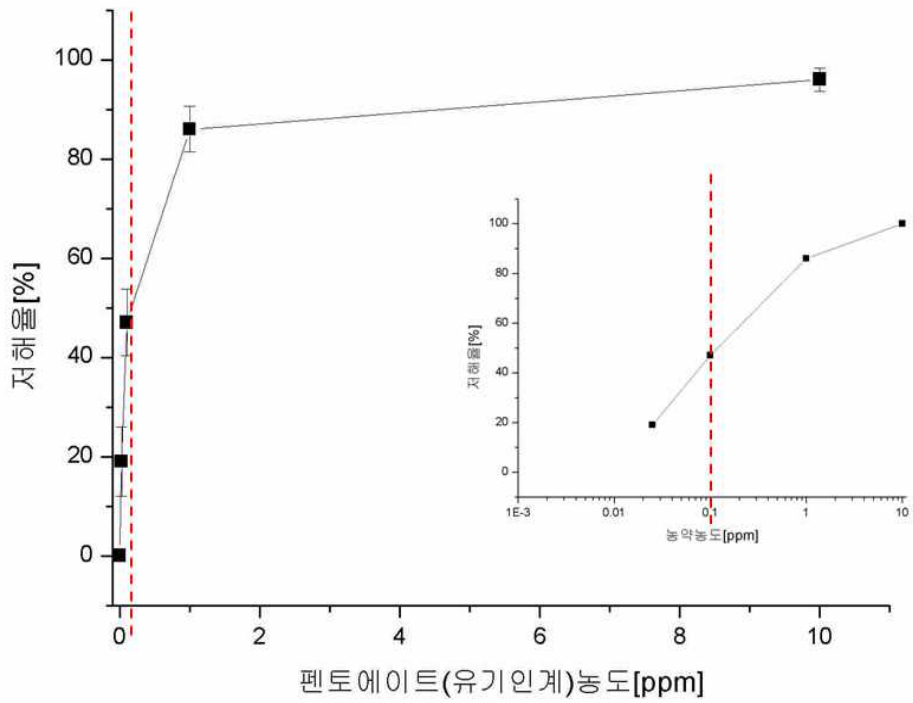
[그림 4-40] 페니트치온 농도에 따른 측정결과



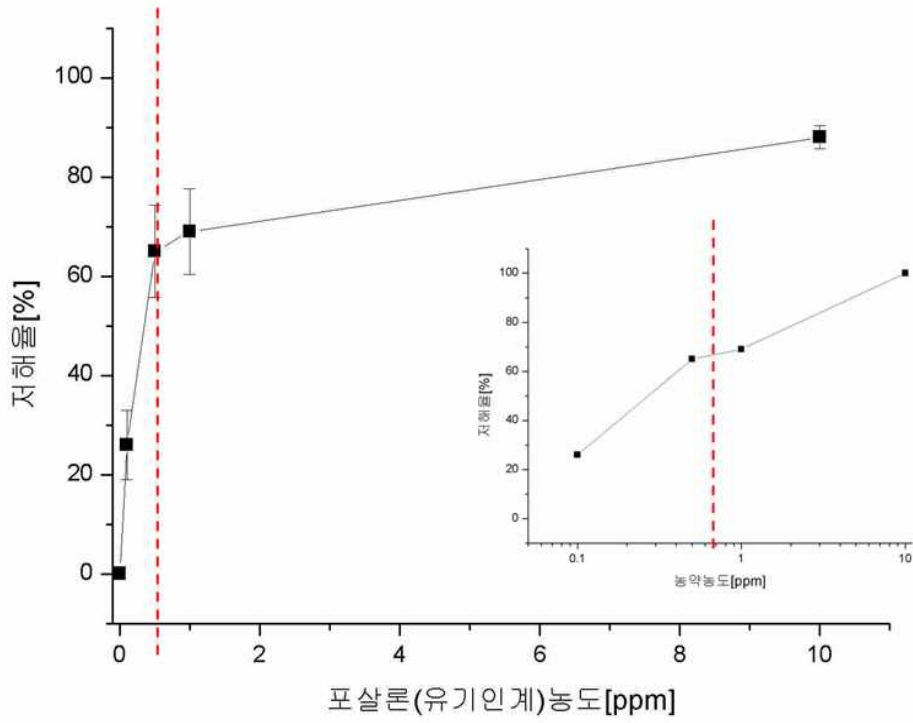
[그림 4-41] 말라치온 농도에 따른 측정결과



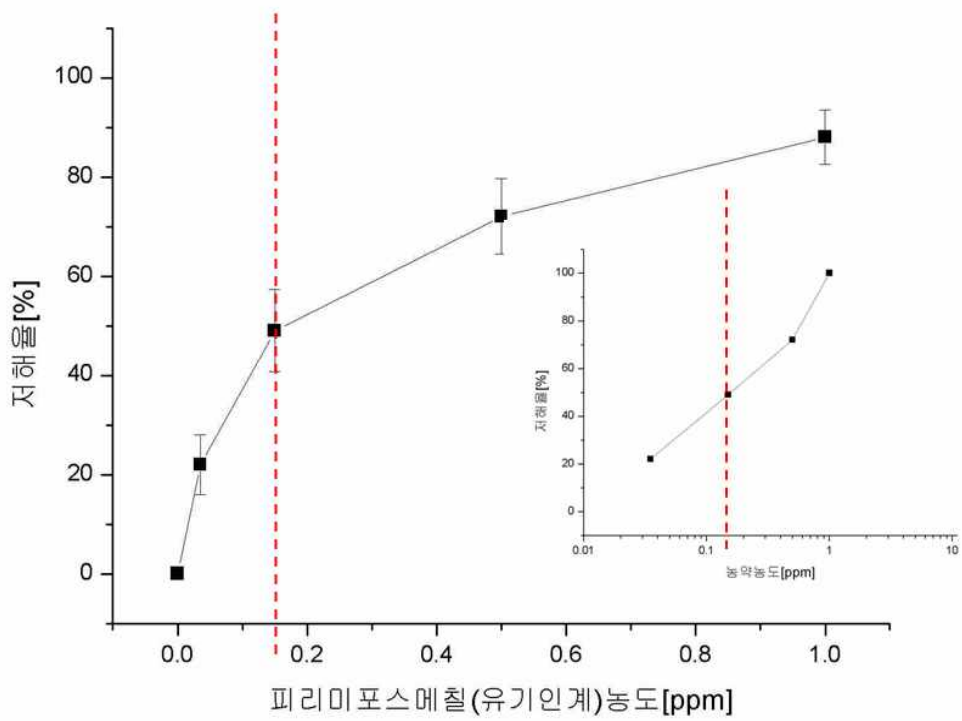
[그림 4-42] 메치다치온 농도에 따른 측정결과



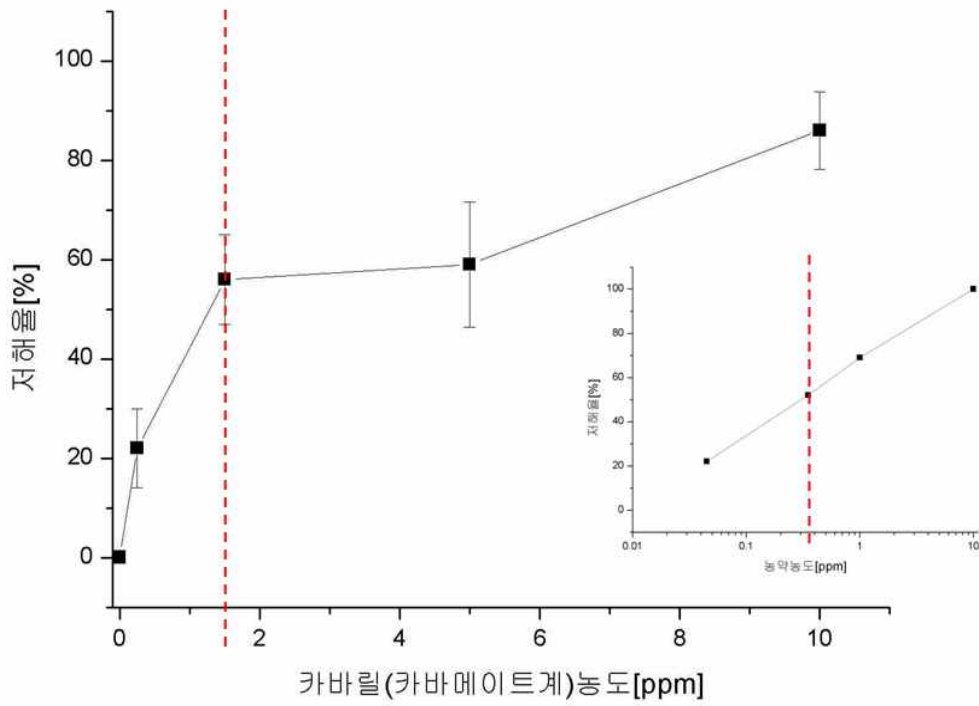
[그림 4-43] 펜토에이트 농도에 따른 측정결과



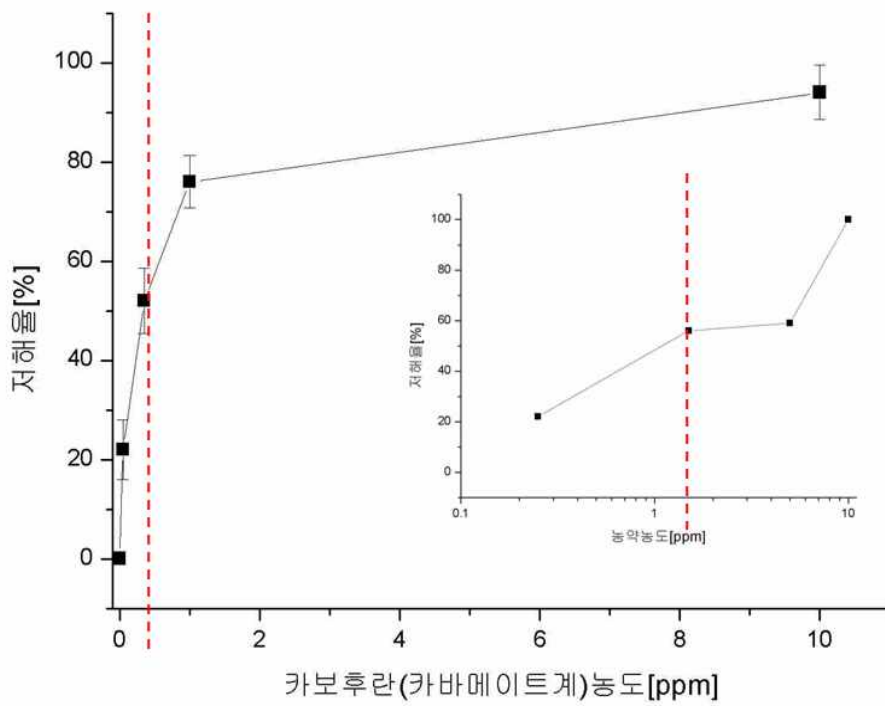
[그림 4-44] 포살론 농도에 따른 측정결과



[그림 4-45] 피리미포스메칠 농도에 따른 측정결과



[그림 4-46] 카바릴 농도에 따른 측정결과



[그림 4-47] 카보후란 농도에 따른 측정결과



계열	농약명	분광법측정에서 50% 저해율에 해당하는 농약의 농도[ppm]	바이오전극으로 측정한 저해율[%]	바이오전극으로 측정한 저해율의 표준편차
유기인계	아진포스메칠	0.15	61	± 8.8
	클로로피리포스	0.01	45	± 7.3
	다이아지논	0.02	65	± 11.5
	EPN	0.28	57	± 8.3
	페니트로치온	4	55	± 9.6
	말라치온	1.5	49	± 8.9
	메치다치온	0.55	60	± 7.4
	펜토에이트	0.1	47	± 6.2
	포살론	0.5	65	± 6.6
	피리미포스메칠	0.15	49	± 9.6
카바메이트계	카바릴	1.5	56	± 10.2
	카보후란	0.35	52	± 5.3
평 균			55	± 8.31

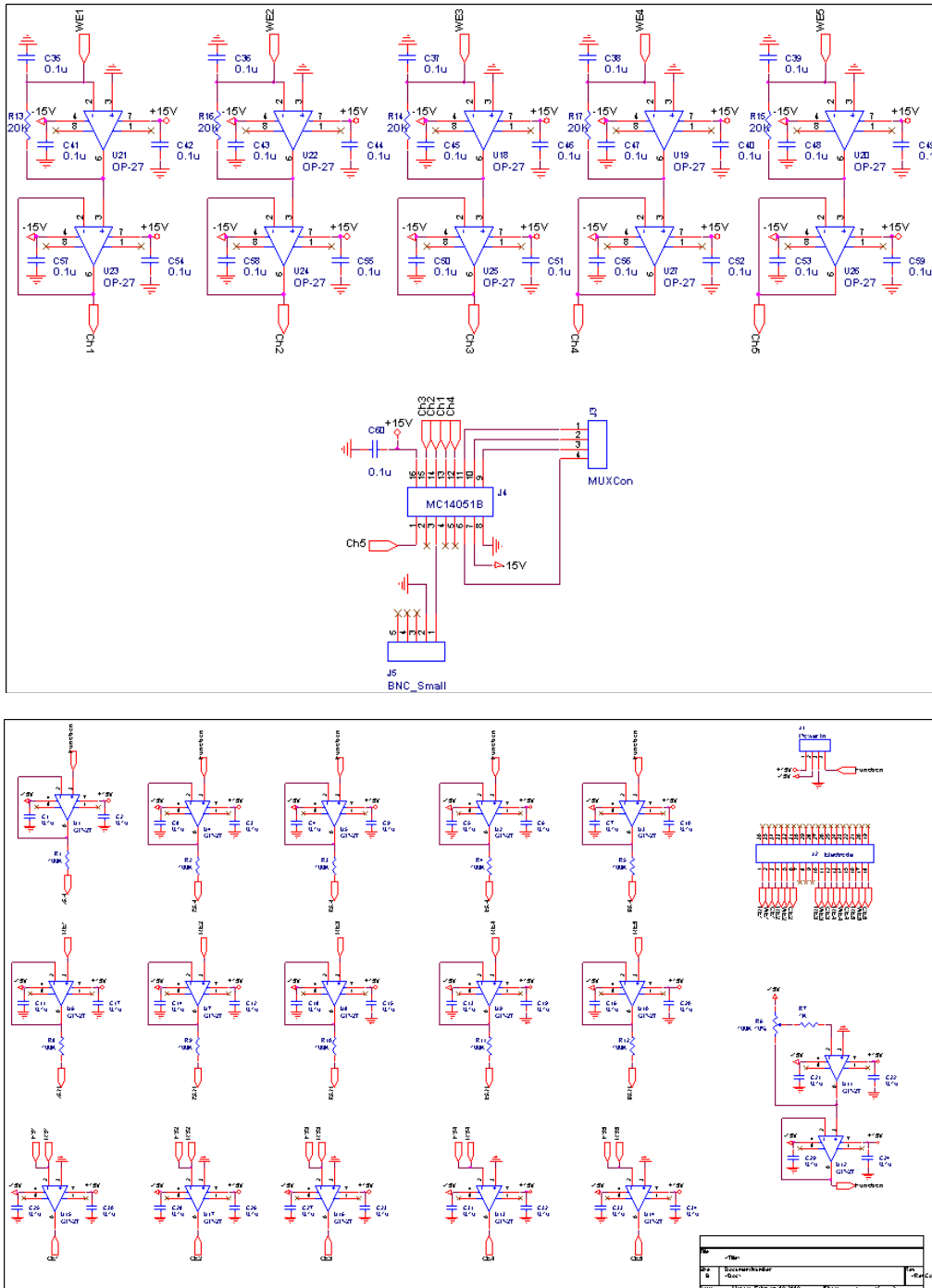
[표 4-2] 분광법에서 50%의 저해율을 갖는 표준 농약의 바이오 전극 측정 결과

그림 4-35는 5개의 Electrode 1Set을 동시에 측정하기 위하여 Digital Multimeter DM-441(LG) 5개를 사용하여 구성된 실험 장치이다. 이때 전극은 그림 4-18(c)의 왼쪽에서부터 Ch1~5번으로 설정하여 측정하였다.

그림 4-36부터 그림 4-47은 본 연구에서 개발된 C version용 바이오전극과 그림 4-35의 측정 장치로부터 얻어진 표준 농약 12가지에 대한 농약 농도에 따른 저해율에 관한 그림이다. 또한 그림 4-36부터 그림 4-47에 표시된 점선은 분광법을 통해 저해율이 50% 일 때의 표준 농약 농도이고, 우측의 작은 그래프는 농약의 농도를 지수형태로 표현한 그래프이다. 이상 표준 농약(그림 4-36 부터 그림 4-47)의 농약에 따른 바이오 전극의 측정결과에서 알 수 있듯이 농약의 농도가 높아짐에 따라 저해율이 높아지며, 농약 농도를 지수형태로 표현한 경우 농약 농도와 저해율이 선형적으로 비례함을 알 수 있었다. 이상의 결과를 정리한 것이 표 4-2 이다. 분광법측정에서 50% 저해율에 해당하는 농약의 농도에 대한 바이오전극으로 측정된 저해율은 농약에 45 ~ 65 % 으로 평균적으로 약 55 ± 8.31 % 로 측정되었다. 이상의 결과로부터 본 연구에서 개발 된 바이오 전극과 측정 시스템을 이용한 잔류 농약 측정 방법의 타당성을 확인 할 수 있었다.

## 2. 바이오 전극을 위한 시제품용 측정기 개발

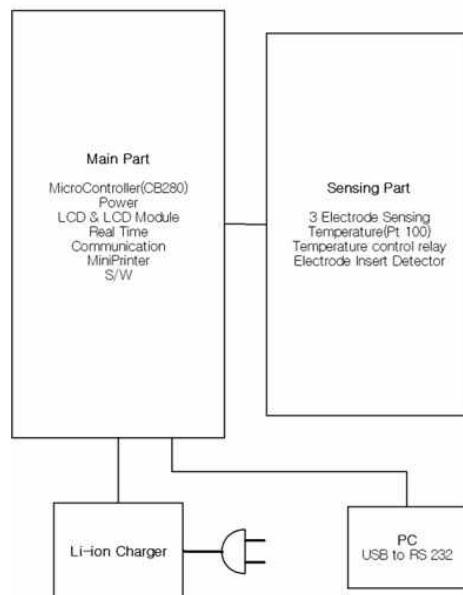
초저잡음 전류측정기술이 확보된 전류측정법으로 미소 전류를 측정을 위한 그림 4-29의 회로 기술을 이용하여 5개의 채널을 동시에 측정하여 저해율로 표현 할 수 있는 측정기의 회로 설계가 그림 4-48 이다.



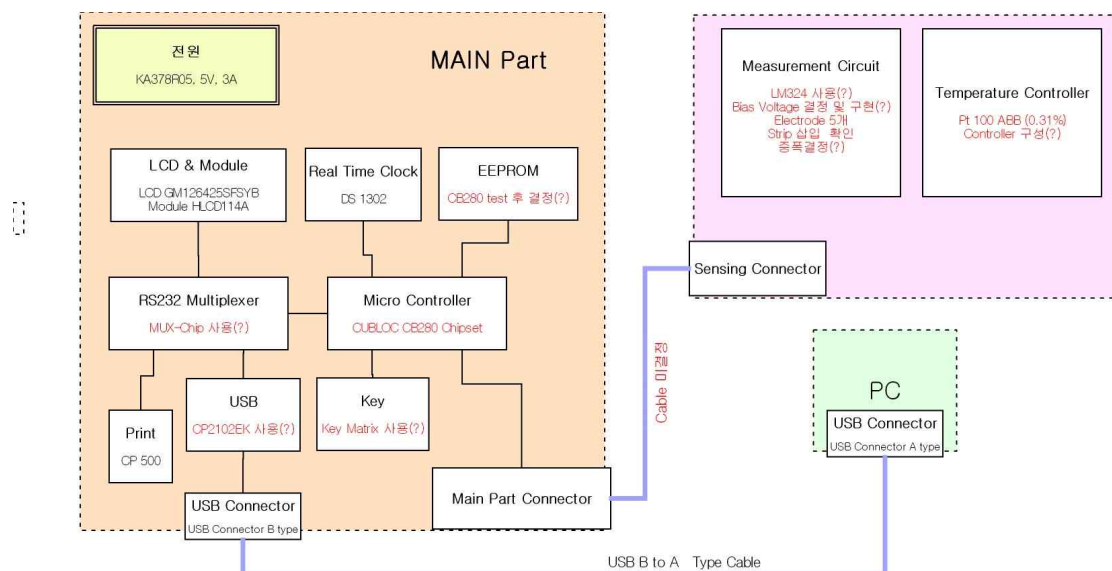
[그림 4-48] 시제품용 Sensing Part 회로도

시제품용 측정기 회로 설계의 특징은 우선 포터블 타입을 위한 설계를 실행하였고, 5개의 Amperometric 회로에서 입력되는 신호를 1개의 증폭회로에서 모두 증폭하기 위하여 MUX Chip(MC14051B)을 사용하였다. 이 방법은 같은 증폭회로를 사용하므로 5개의 증폭회로에서 개별적으로 증폭하는 방법에 비하여 채널 간 증폭율의 미세한 차이를 줄일 수 있고, 1개의 증폭회로를 사용하므로, 5개의 증폭회로에 비해 부품수가 상대적으로 적으며, 회로의 크기를 줄일 수 있으므로, 휴대성능을 향상시킬 수 있다.

Electrode Type 잔류농약검사기 회로 모식도



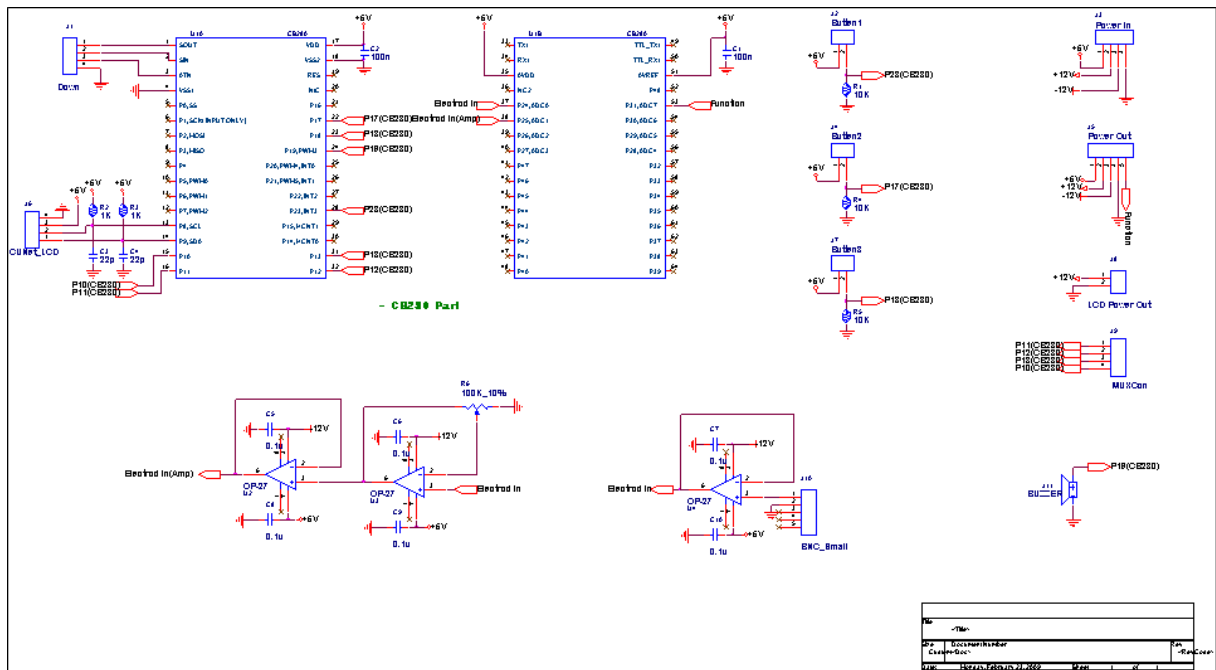
(a)



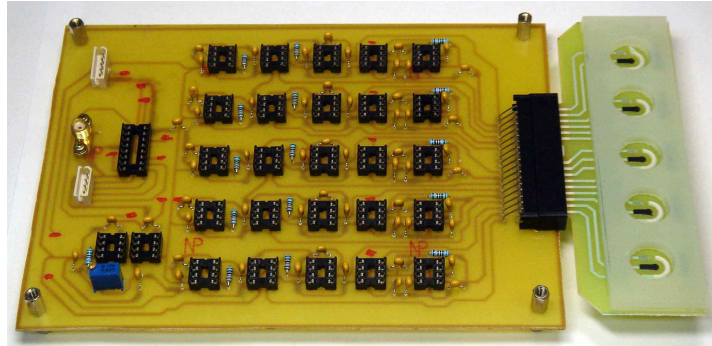
(b)

[그림 4-49] 시제품용 바이오 전극 측정기의 전체 모식도

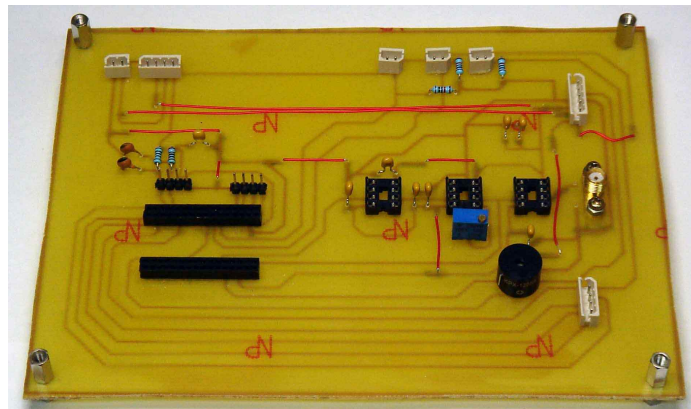
휴대가 가능한 시제품을 개발하기 위해서는 그림 4-48에 표현된 Amperometric 회로 이외에 여러 구성이 필요하고, 이에 따른 전체 회로의 모식도는 그림 4-49와 같다. 전체적으로는 Sensing part와 Main Part로 구분되고, Sensing Part는 앞에서 설계된(그림 4-48) 바이오 전극을 위한 Amperometric 회로이다. Main Part는 Sensing Part에서 입력된 측정 신호를 저해율로 표시해줄 수 있는 Microcontroller와 정보를 표시해 줄 수 있는 Display, 그리고 저해율 정보를 인쇄 할 수 있는 프린터, 스위치, 컴퓨터와 정보를 공유할 수 있는 통신모듈이 포함된다. 그림 4-49의 모식도를 실현하기 위한 Main Part 회로 설계가 그림 4-50이다. Microcontroller는 컴파일테크놀러지사 제품을 사용하였고, 작동전극으로부터 입력된 신호는 10배 증폭과 100배 증폭을 하여, 신호가 큰 경우는 10배 증폭된 신호를, 신호가 작은 경우는 100배 증폭된 신호를 선택적으로 입력받을 수 있도록 하였고, Display와 프린터, 스위치, 부저 등을 연결할 수 있도록 설계 하였다. 그림 4-48과 50의 회로도를 바탕으로 상용화를 위한 CAD 작업 후, 제작 한 시제품용 측정기 회로가 그림 4-51 이다. 그리고 제작된 측정기 회로 이용하여 A Version 측정기(그림 4-52) 시제품을 제작하였다. A Version 측정기의 크기는 290 × 380 mm 이고, 입력전원은 AC 220V / 60Hz 이고, 회로 구동을 위해 화인션트로닉스 사의 VSF100-DD를 사용하였고, Sensing Part는 알루미늄 케이스를 사용하여 주변 전기 잡음을 차폐하였으며, 저해율을 표시하는 디스플레이 장치는 컴파일 테크놀러지사의 제품을 사용하였다.



[그림 4-50] 시제품용 Main Part 회로도

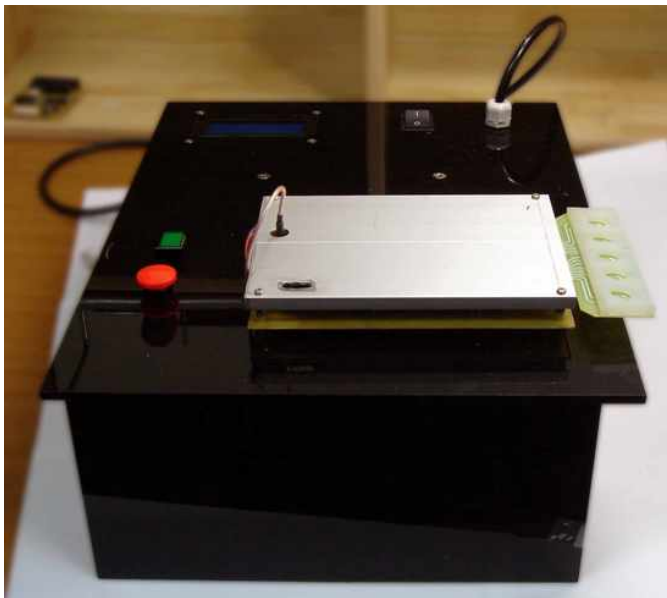


(a) Sensing part



(b) Main part

[그림 4-51] 시제품용으로 제작된 회로



(a) 전면

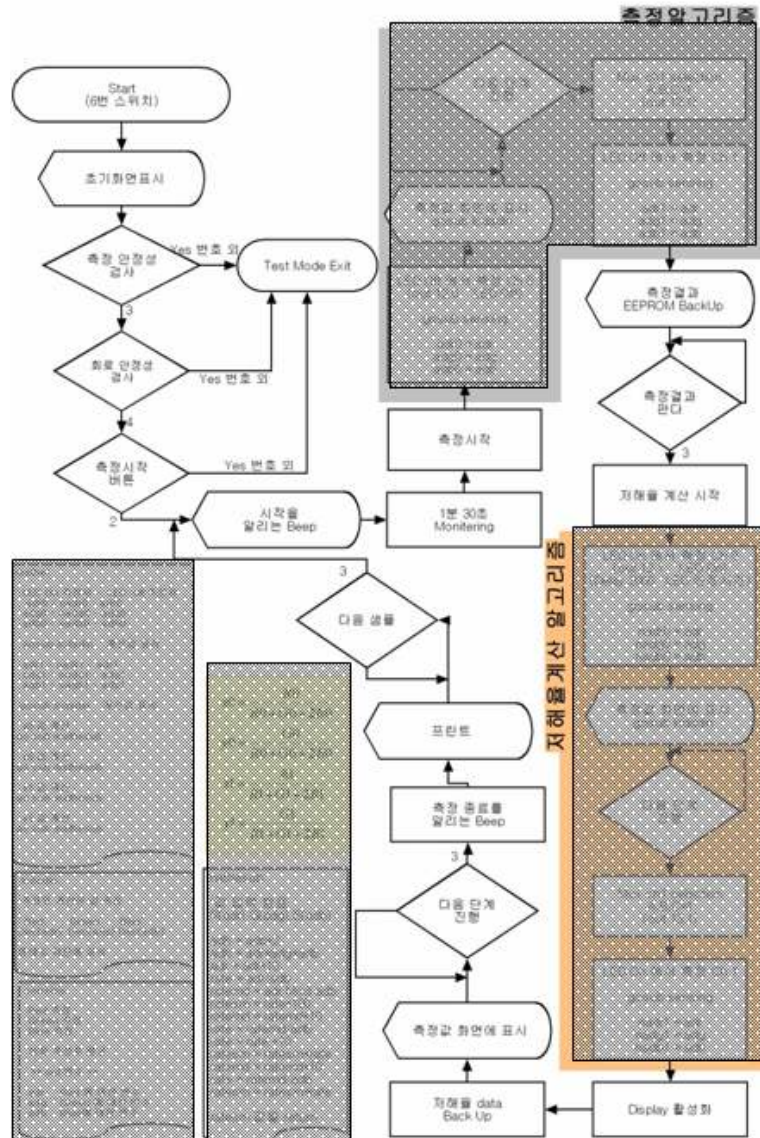


(b)내부

[그림 4-52] A Version 측정기 시제품



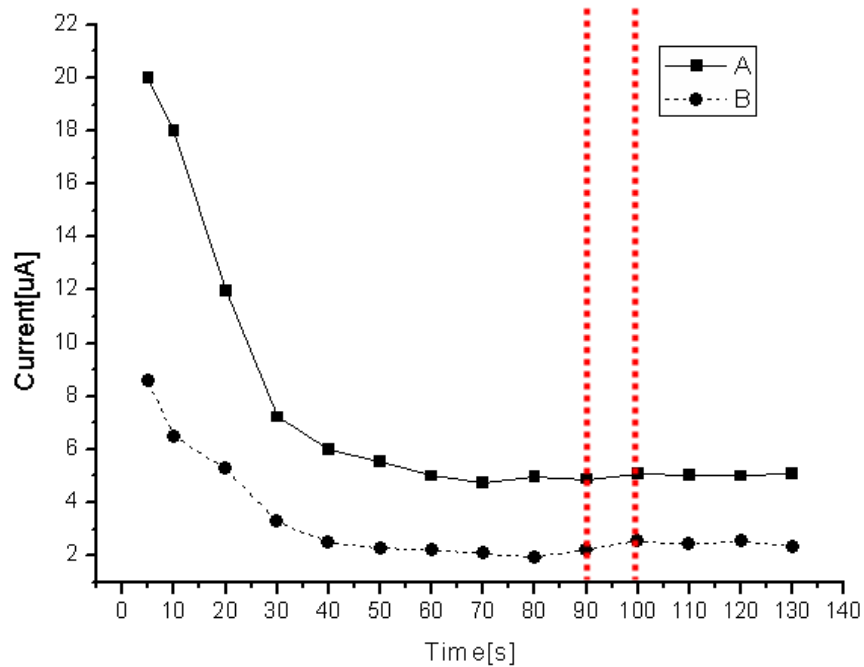
바이오전극 측정 프로그래밍 순서도



※ 참여기업의 요청으로 중요 알고리즘은 블록( ) 처리하였음.

[그림 4-53] A Version 측정기 시제품을 위한 프로그램 순서도

그림 4-52에서 제작된 A version 측정기를 동작하기 위한 프로그램의 순서도는 그림 4-53과 같다. 프로그램은 전원 ON 후 초기 화면을 표시하고, 사용자가 전극을 삽입 후 측정 버튼을 누르면 측정을 계산된 저해율을 EEPROM에 저장 후 측정값을 화면에 표시하는 순으로 진행되도록 구성하였다(프로그램 전문 및 측정 알고리즘, 저해율 계산 알고리즘은 참여기업의 요청으로 공개하지 않음).



[그림 4-54] 반응 안정 시간. A : 효소를 첨가한 경우, B : 효소를 첨가하지 않은 경우

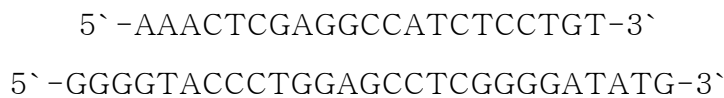
추출한 농약의 추출액과 효소, 기질이 반응한 수용액을 전극에 투여하는 순간 시간에 따라 급격하게 변화하므로, 전극의 반응이 안정화 되었을 때의 전류 값을 측정해야만 한다. 전극에서의 반응이 안정되는 시간을 알아야하며, 그 시간을 실험한 결과는 그림 4-54와 같다. 전극과 투여 된 수용액의 반응은 투여한 순간 급격히 상승하고(투여전의 전류는 약 0  $\mu$  A 임), 약 1분후 안정된다. 이러한 결과를 바탕으로 수용액을 투여하고, 90초(1분 30초) 후 측정을 시작하도록 구동 프로그램 작성 하였다.

### 제 3 절 바이오 전극용 효소 개발

#### 1. 연구수행 방법

##### 가. site direct mutagenesis

lipid anchor부위 제거를 위한 polymerase chain reaction 은 pGEM-T Easy(promega) vector에 들어있는 AChE의 유전자 서열 중에서 소수성 부위를 제거하기 위한 primer를



위와 같이 설계하여 이 두 primer를 가지고 PCR을 행하였다. PCR에 사용한 taq은 Invitrogene사의 제품을 사용하였으며, 95℃ 2분, 94℃ 1분, 60℃ 1분, 72℃ 2분, 35 회로 반응시켜 반응시킨 후 4℃로 온도를 낮추어 반응을 끝냈다.

2차년도에 개발된 AchE의 mutation product를 포함하여 이외에 다른 부위의 mutagenesis를 유도하기 위하여 site direct mutagenesis를 위한 polymerase chain reaction 에 사용할 세 개의 oligonucleotide primer를 다음과 같이 설계하였다.

※ mutagenesis 후 치환된 아미노산은 기업의 요청에 따라 X로 표기하였음

a. S370X : 5`-TCCTACTCGGGCATCCTCAXXXTTCCCTCGG-3`

H V M S C M R S V D A K T I S V Q Q W N	360
CACGTGATGAGCTGCATGCGTTCGGTGGACGCCAAGACCATATCGGTGCAGCAGTGGAAAC	1080
S Y S G I L S F P S A P T I D G A F L P	380
TCCTACTCGGGCATCCTCAGCITTCCTCGGGCGCCACCATIGATGGTGCCTTCCTGCCG	1140
<b>S370X</b>	
A D P M T L M K T A D L K D Y D I L M G	400
GCGGATCCCATGACGCTGATGAAGACGGCGGATCTGAAGGACTACGACATCCTGATGGGA	1200



b. C330X : 5`-TGATCAACGAXXXAACTGCAATGCA-3`

Q S G T M N A P W S H M T S E K A V E I	320
CAGTCGGGCACTATGAACGCCCCCTGGAGCCACATGACCTCCGAGAAGGCCGTGGAGATC	960
G K A L I N D C N C N A S M L K T N P A	340
GGCAAGGCGCTGATCAACGACTGCAACTGCAATGCAATCTATGCTGAAGACCAATCCCGCT	1020
<b>C330X</b>	
H V M S C M R S V D A K T I S V Q Q W N	360
CACGTGATGAGCTGCATGCGTTCGGTGGACGCCAAGACCATATCGGTGCAGCAGTGGAAAC	1080

c. I374X : 5`-GGCGCCCACCXXXGATGGTXXXTTCCCTGCCG-3`

H V M S C M R S V D A K T I S V Q Q W N	360
CACGTGATGAGCTGCATGCGTTCGGTGGACGCCAAGACCATATCGGTGCAGCAGTGGAAAC	1080
S Y S G I L S F P S A P T I D G A F L P	380
TCCTACTCGGGCATCCTCAGCTTCCCTCGGGCCCCACCATTGATGGTGGTTCCTGCCG	1140
<b>I374X      A376L</b>	
A D P M T L M K T A D L K D Y D I L M G	400
GCGGATCCCATGACGCTGATGAAGACGGCGGATCTGAAGGACTACGACATCCTGATGGGA	1200

d. E107X : 5`-TCCGCCACCTGCGTCCAAXXXCGTTACGAGTAC-3`

G R E V H V Y T G I P Y A K P P V E D L	80
GGCAGGGAGGTGCATGTCTACACGGGCATCCCTACGCCAAGCCCGCTCGAGGACCTG	240
R F R K P V P A E P W H G V L D A T R L	100
CGTTCCGAAAGCCGGTTCGCCCGGAGCCATGGCAGGCGTCCCTCGACGCCACGCGGTTA	300
S A T C V Q E R Y E Y F P G F S G E E I	120
TCCGCCACCTGCGTCCAAGCGTTACGAGTACTTCCCGGCTTCTCCGGCGAGGAGATC	360
<b>E107X</b>	

e. F368X : 5`-TCGGGCATCCTCAGCXXXCCCTCGGGCGCCCACC-3`

H V M S C M R S V D A K T I S V Q Q W N	360
CACGTGATGAGCTGCATGCGTTCGGTGGACGCCAAGACCATATCGGTGCAGCAGTGGAAAC	1080
S Y S G I L S F P S A P T I D G A F L P	380
TCCTACTCGGGCATCCTCAGCTTCCCTCGGGCCCCACCATTGATGGTGGTTCCTGCCG	1140
<b>F368X</b>	
A D P M T L M K T A D L K D Y D I L M G	400
GCGGATCCCATGACGCTGATGAAGACGGCGGATCTGAAGGACTACGACATCCTGATGGGA	1200

f. Y408X : 5`-GGGATGAGGGCACXXXCTTCTTGCTGTGCG-3`

A D P M T L M K T A D L K D Y D I L M G	400
GCGGATCCCATGACGCTGATGAAGACGGCGGATCTGAAGGACTACGACATCCTGATGGGA	1200
N V R D E G T Y F L L Y D F I D Y F D K	420
AATGTCAGGGATGAGGGCACXXXCTTCTTGCTGTGCGATTTCATCGATTACTTCGATAAG	1260
<b>Y408X</b>	
D D A T A L P R D K Y L E I M N N I F G	440
GACGATGCCACGGCCCTGCCACGGGACAAATACCTGGAAATTATGAACAATATTTTGGC	1320

위의 여섯 가지 primer를 이용하여 mutagenesis를 행하였다. 먼저 세균에 mutagenesis를 유도할때는 primer d를 이용하여 mutagenesis를 위한 PCR을 하였으며, PCR은 *pfu*Taq을 사용하였다. PCR product는 TA cloning 후 sequencing을 하여 mutation site가 확인되면 primer e를 이용하여 위와 동일한 방법으로 실험 후 다시 primer c를 이용하여 또 다른 부위의 mutagenesis를 유도하였다. PCR조건은 95℃ 30초 1회, 95℃ 30초, 55℃ 30초, 68℃ 10분, 15회로 반응시킨 후 4℃로 온도를 낮추어 반응을 끝냈다.

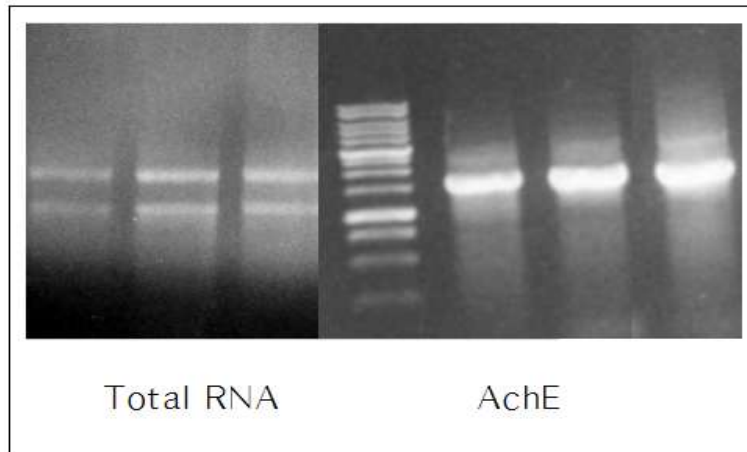
#### 나. pFASTBAC cloning

PCR로 증폭시킨 AchE 유전자를 pGEM-T Easy(promega) vector을 이용하여 cloning후 얻은 colony를 screening후 AchE의 mutagenesis가 성공한 product를 확인 후 plasmid를 추출하여 제한효소인 *kpn*I과 *xho*I을 이용하여 절단하였다. 절단하여 얻은 유전자를 Bac-to-Bac Baculovirus Expression System(Invitrogen co.)의 pFastBac<sup>TM</sup> HTb vector(4,856bp)를 이용하여 cloning후 screening하여 재조합된 mutagenesis AchE bacmid DNA(AChE bacmid)를 얻었다.

#### 다. Bacmid 분리 및 transfection

재조합된 bacmid DNA가 들어있는 cell을 100 mL LB배지에서 37℃에서 24시간 shaking 배양후, 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 cell을 얻어 buffer I(resuspension), buffer II(lysis), bufferIII(nutralization)를 처리하여 얻은 상등액에 동량의 isoprophanol을 처리하여 DNA를 얻었다. 이 DNA를 500 $\mu$ l의 nucleotid free water에 녹인 다음 분주 한 후 -70℃에 보관하면서 cell의 transfection에 사용하였다. 먼저 분리한 recombinant bacmid DNA는 배지에 섞어 5분간 incubation후 여기에 다시 미리 lipopectamin(TM 2000)을 배지와 섞어 5분간 incubation한 배지를 넣은 후 다시 15분간 incubation한다. 미리 배지와 7 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml의 cell을 부착시켜놓은 6well plate에 배지를 제거 후 조심스럽게 한 방울씩 떨어뜨린 다음 5시간 동안 shaking incubation한다. 그런 다음 새 배지를 2 ml넣고, 27℃의 배양기에서 4일간 배양한다.

배양 후 원심분리하여 얻은 상등액을 곤충세포가 25cm<sup>2</sup> tissue culture flask에서 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cell/flask의 조건으로 MOI가 10이 되도록 유지하여 감염시킨 후 27℃에서 3일간 배양하였다. 위와 동일한 방법으로 한번 더 infection 시킨 후 2일간 배양 후 세포 배양 후 얻은 상등액을 -70℃에 보관하면서 현탁배양에 사용하였다.



[그림 4-55] 재조합된 AchE를 transfection 된 세포에서의 totalRNA 와 RT-PCR product

이번에는 감염된 flask안의 세포를 얻었다. 이렇게 얻은 세포를 이용하여 RNA를 얻은 다음 cDNA를 합성하였다. cDNA를 합성 후 AchE primer를 이용하여 RT-PCR을 하여 가장 발현이 잘된 것을 확인 하였다.

#### 다. Bacmid 분리 및 transfection

세포배양해 얻은 상등액을 이용하여 효소를 얻기 위한 대량 배양에 사용하였다. 모두 두 가지방법을 사용하여 진행하였는데 지속적인 효소생산을 위한 바이러스 생산유지와 많은곤충세포를 얻기 위하여 T175 flask에 곤충세포를 배양후 T175 flask에 -70℃에 보관하고 있는 원심분리 후 얻은 상등액을 처리하여 감염시켰고, 이를 24시간 27℃의 배양기에서 배양하였다. 그런 다음 감염된 T175 flask에 배양하고 있는 곤충세포들을 bottle에 넣고 여기에 새배지를 넣어 27℃의 배양기에서 120rpm으로 shaking 하면서 3일간 배양 후 효소를 얻었다.

얻은 효소를 분리하기 위하여 먼저 Affinity gel은 CNBr-activated sepharose 4B에 procainamide(Fluka Co.)를 결합시켜 만들었는데, 1M HCl(pH4.5)에 두시간 동안 녹인 0.1M 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodi-imide hydrochloride solution에 procainamide(5.44g; 100umol/ml)을 넣어 20-25℃에서 24시간 shaking 하며 gel에 붙여 affinity column을 만들었다. Proainamide 흡착 여부는 278nm에서 흡광도상수가

16150M<sup>-1</sup>이 되었는지의 여부로 확인하였다. 다음단계로 histidine tail을 이용한 affinity column으로 Ni-NTA column을 이용해 분리 정제하였다. 그리고 sensor에 부착하기위한 효소의 부분정제는 80%되게 ammonium sulfate를 넣은 후 salting out 등의 방법을 이용하여 분리 후 사용하였다.

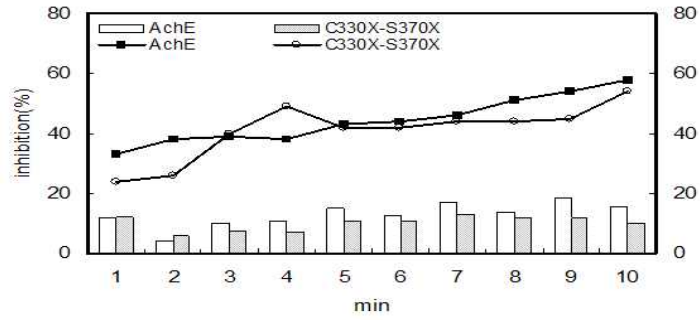
## 2. 연구수행 결과

### 가. AChE의 유전자 변형 조작에 따른 농약에 대한 민감성 비교

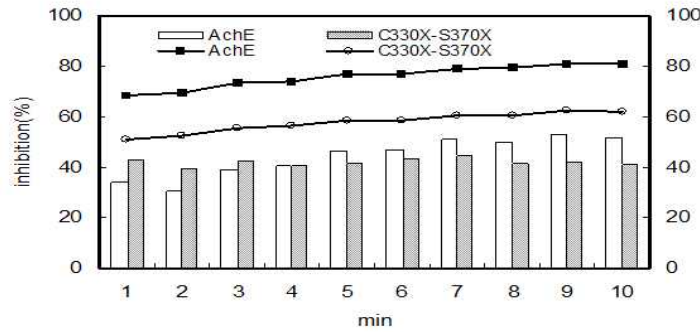
#### (1) 효소농도에 따른 민감도 측정

농약에 대한 민감도를 높이기 위해 먼저 효소 농도에 따른 농약에 대한 민감성을 측정하였다. 먼저 유전자 변형조작에 의해 생산된 AchE와 기존에 생산되고 있는 AchE에 의해 생산된 제품을 가지고 카바메이트계 농약에 대한 민감성을 기존의 제품과 비교실험 하였다. 이를 위해 효소활성은 Ellman방법을 약간 변형시킨 방법으로써 0.1M 인산나트륨 완충용액(pH 8.0) 220 $\mu$ l에 효소용액 10 $\mu$ l와 20 $\mu$ l color substrate reagent인 (2.7mM acetylthiocholine iodide(ATCI)와 4.5mM 5, 5`-dithiobis-2-nitrobenzoic acid(DTNB)를 가한다. 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 incubation시킨 후 cholin과 DTNB가 결합하여 생성된 5-thio-2-nitrobenzoate를 ELISA(SUNRISE, TECAN co.)을 이용하여 412nm의 파장에서의 흡광도를 측정하여 반응의 초기 속도로서 AChE의 활성도를 구하였다. 그리고 농약의 효소에 대한 저해율은 완충용액 220 $\mu$ l를 넣고 효소용액 10 $\mu$ l와 ethanol에 녹인 표준농약시료 20 $\mu$ l를 넣고 혼합한 용액을 반응용액으로 하고, 여기에 ATCI와 DTNB 40 $\mu$ l를 넣어 5분간ELISA(TECAN, SUNRISE) 412nm에서 측정하였다. 효소활성의 저해율은 다음 식과 같이 계산하였다.

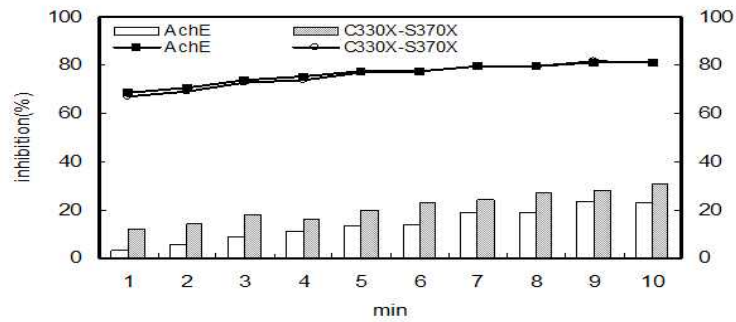
$$\text{저해율}[\%] = \frac{\text{Control 효소활성도} - \text{양성시료 효소활성도}}{\text{Control 효소활성도}} \times 100$$



a. 카보후란



b. 벤토에이트



c. 카바릴

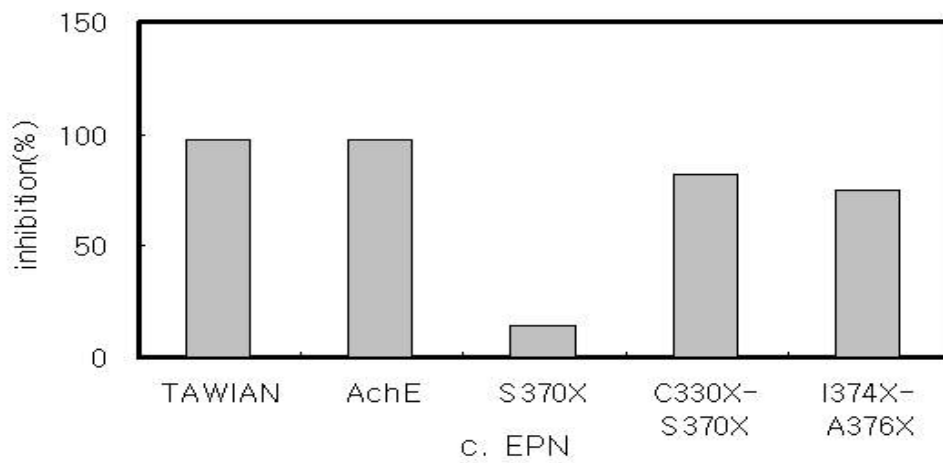
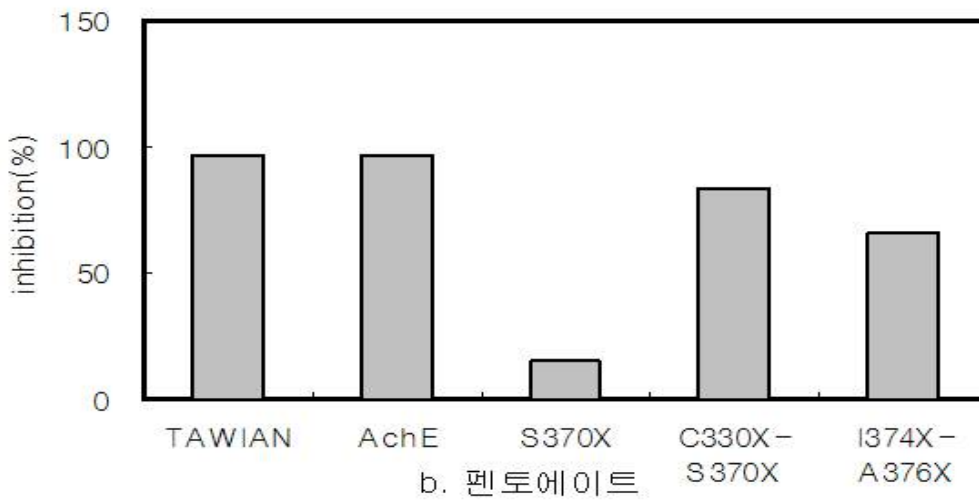
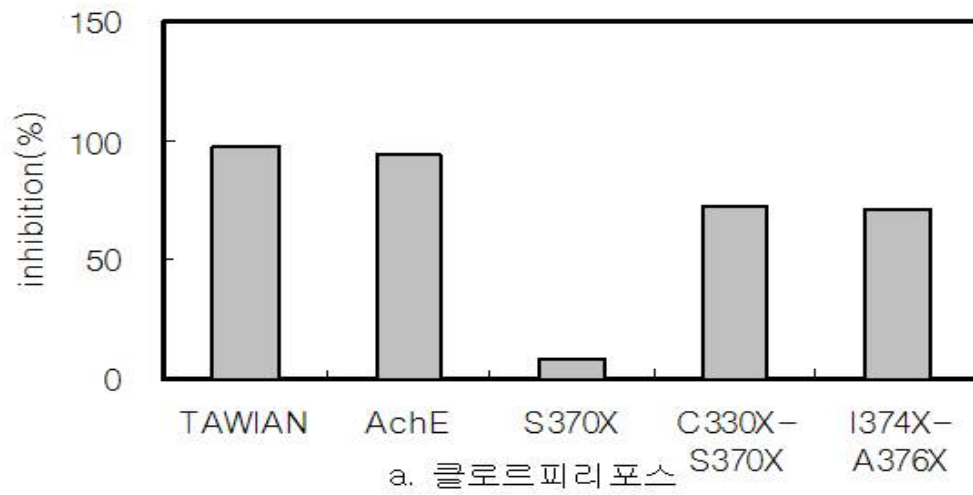
[그림 4-56] 효소농도에 따른 농약에 대한 민감도 조사

Ellmen 방법에 따라 412nm의 파장에서 10분 동안 37℃에서 보관하면서 1분마다 그 값을 kinetics으로 측정하였으며, 측정한 값은 효소에 농약추출액을 처리하지 않은 저해율을 얻을 수 있었다. 그 결과(그림 4-56) 막대그래프는 효소가 저 농도일 때 농약에 대한 반응을 나타낸 그림이며, 선 그래프는 효소가 고 농도일 때 농약에 대한 민감도를 나타낸 그래프이다(그림 4-56).

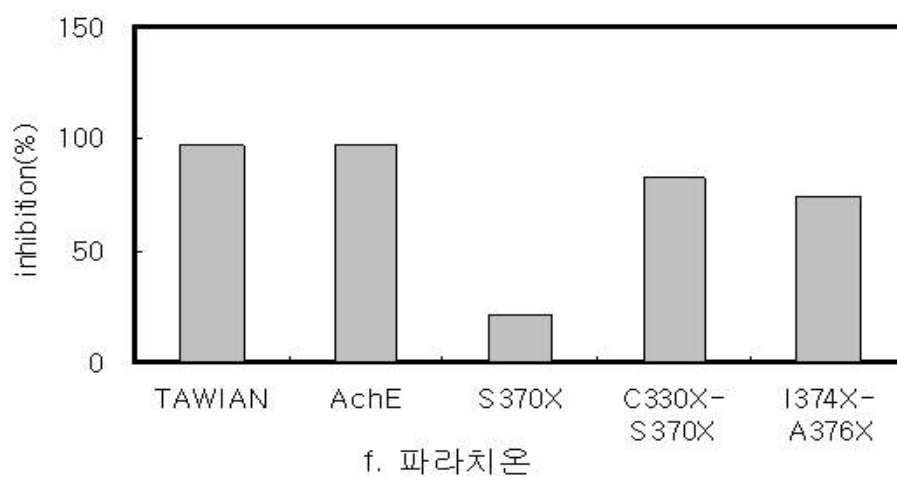
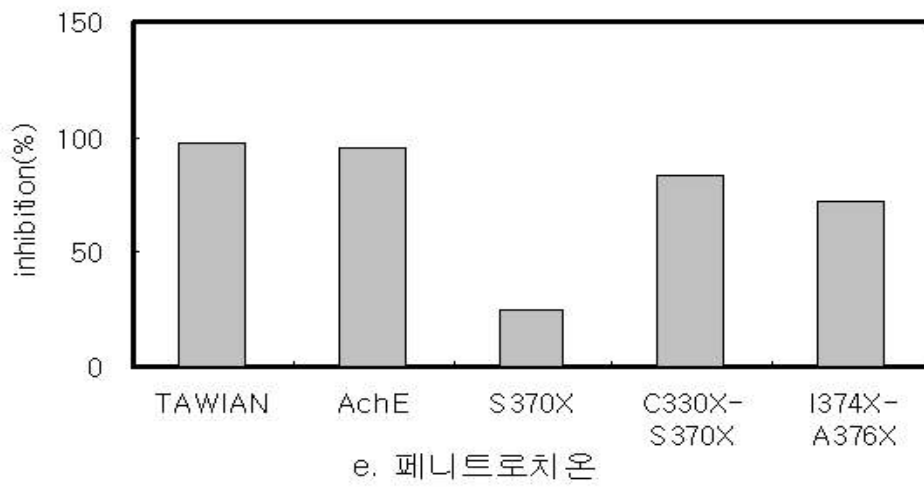
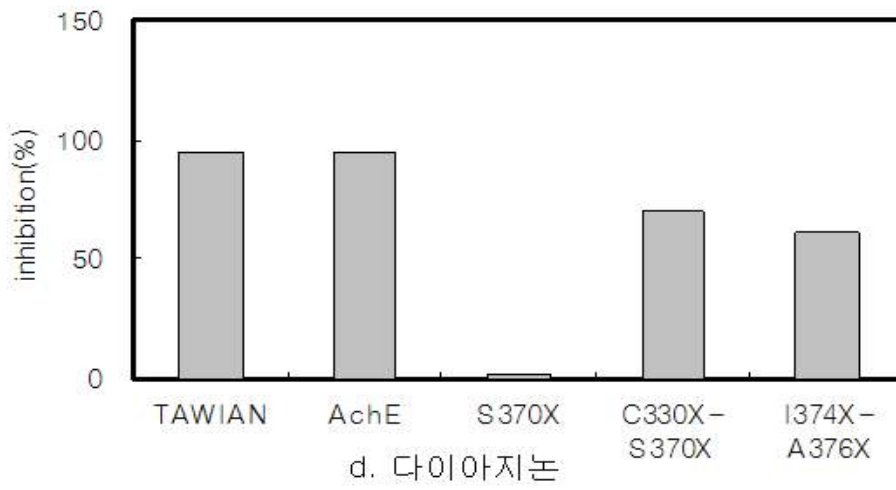
고농도의 효소에서는 카보후란(그림 4-56(a))과 카바릴(그림 4-56(c))에서 기존에 생산되고 있는 AchE를 이용하여 농약에 대한 민감도를 실험한 결과와 변형시킨 AchE를 이용하여 만든 제품을 이용하여 농약에 대한 민감도를 실험한 결과 이들 효소의 저해율 값이 유사하게 나왔다. 특히 저 농도에서는 초기시간에 저해율이 증가하는 것을 알 수 있었지만 고농도에서는 시간 의존적으로 저해율이 증가하는 것을 알 수 있었다. 벤토에이트에서는 변형시키지 않은 AchE와 변형시킨 AchE를 이용한 농약에 대한 민감도를 실험한 결과 AchE에서 농약에 대한 민감도가 더 크다는 것을 알 수 있었는데, 고농도와 저농도의 효소에서 유사한 양상을 보였다(그림 4-56(c)). 카바릴에서는 저 농도와 고농도의 효소에서 농약에 대한 민감도의 차이를 확연히 보여주었으며 변형 전 AchE와 변형을 시킨 AchE모두에서 저 농도와 고농도의 효소에서 농약에 대한 민감도 값이 유사하게 나왔다. 그리고 이들 효소들의 농약에 대한 민감도는 저농도의 효소에서는 농약에 대한 저해율이 민감하게 일어나지 않았으며, 고농도의 효소에서는 이들 농약 모두에서 시간 의존적으로 민감도를 보이는 비슷한 결과를 보였다(그림 4-56).

## (2) 유기인계 농약에 대한 민감도 측정

이번에는 변형 전 AchE와 변형시킨 AchE 효소를 이용하여 여섯 종류의 유기인계 표준농약을 이용하여 농약에 대한 민감도를 측정하였다. 각각의 농약을 추출한 후 대만효소와 그리고 기존의 효소, mutation시킨 효소들을 이용하여 조사하였다(그림 4-57). 결과를 보면 클로르피리포스에서는 기존 효소인 AchE와 대만효소의 농약에 대한 민감성은 저해율을 보였다. 그리고 두 군데를 mutation 시킨 C330X-S370X와 I374X-A376X AchE는 두 값의 저해율 값이 유사하게 나타났지만 기존의 AchE효소에서 보다는 농약에 대한 민감도가 더 낮게 측정되었다. 펜토에이트에 대한 민감도를 측정한 결과는 대만효소와 변형 전 AchE효소에서는 클로르피리포스에서와 유사한 민감도를 보였고, 두 군데를 mutation시킨 C330X-S370X와 I374X-A376X AchE에서는 오히려 클로르피리포스에서보다 더 높은 저해율 값을 보였다.



[그림 4-57] 유기인계 농약에 대한 민감성 측정



[그림 4-58] 유기인계 농약에 대한 민감성 측정

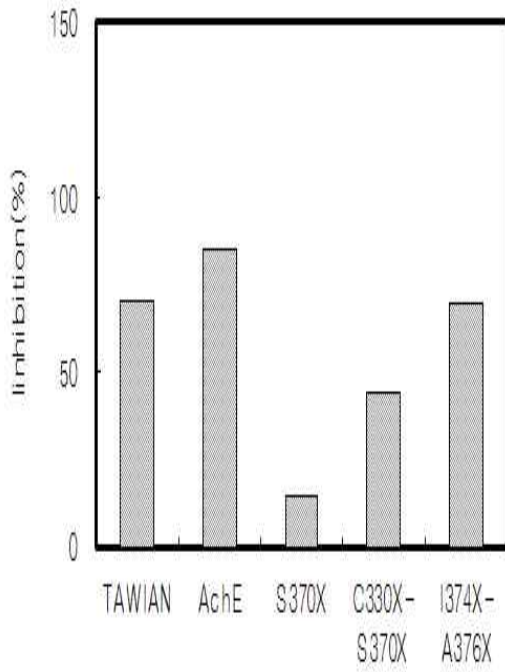


이피엔에 대한 민감도를 측정한 결과에서도 대만효소와 변형전효소를 이용한 저해율값은 거의 동일하게 나왔지만 역시 한군데를 mutation시킨 S370X효소가 가장 낮은 저해율값을 나타냈고 두군데 mutation시킨 C330X-S370X와 I374X-A376X 효소에서는 저해율 값이 더 높게 나타났다(그림 4-57(c)). 다이아지논에 대한 민감도를 측정한 결과는 대만효소보다 AchE에서 약간 높은 저해율 값이 나타났고, 한군데를 mutation시킨 S370X효소에서는 농약에 대한 민감도를 거의 나타나지 않았다(그림 4-57(d)). 페니트로치온에 대한 민감도를 측정한 결과는 대만효소, 변형 전 효소, 그리고 두 군데를 mutation시킨 C330X-S370X 효소에서는 농약에 대한 높은 민감도를 나타내었다(그림 4-58(e)). 파라치온에서는 한군데를 mutation시킨 S370X효소에서 가장 낮은 저해율을 나타냈으며, 나머지 효소에서는 대체적으로 높은 저해율 값을 나타내었다(그림 4-58(f)). 유기인계 농약을 이용한 민감도를 측정한 결과는 전체적으로 대만효소와 변형 전 효소가 mutation시킨 효소보다는 높은 저해율 값을 보였으며, 한군데를 변형시킨 효소보다는 두 군데를 변형시킨 효소를 이용한 민감도 측정이 더 높은 값을 보였다(그림 4-57,58).

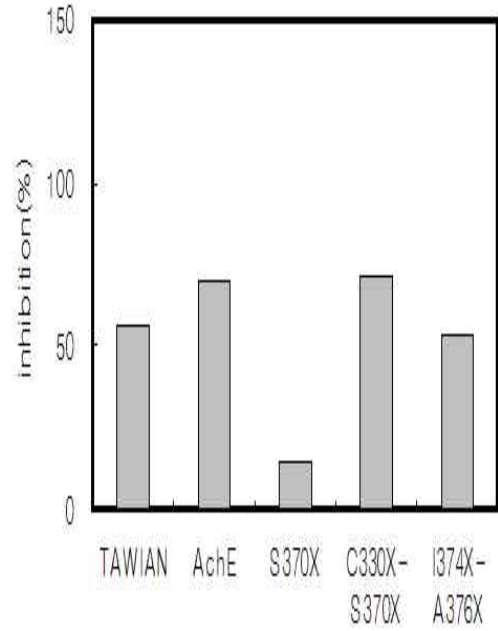
### (3) 카바메이트계 농약에 대한 민감도 측정

다음은 카바메이트계 농약을 이용하여 각각의 효소의 농약에 대한 민감도를 측정한 결과이다(그림 4-59,60 ).

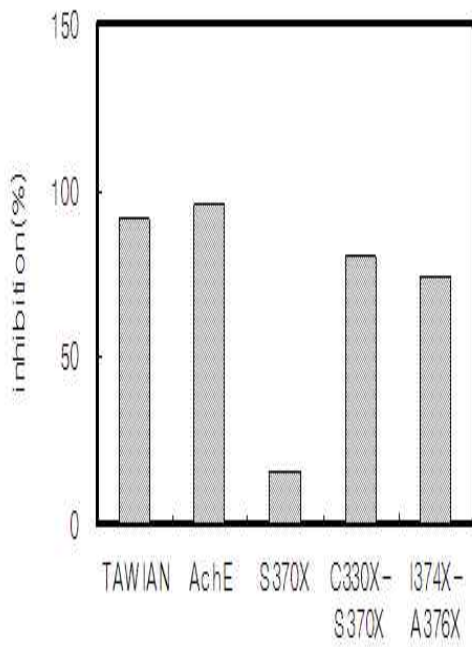
이소카브, 펜토에이트, 카바릴, 메소밀을 이용해 각각의 AchE를 이용해 이들 농약에 대한 저해율을 측정하였다(그림 4-59). 이소카브(그림 4-59(a))에서는 대만효소보다 기존효소인 AchE가 조금 더 높은 저해율을 보였으며, S370X AchE는 이소카브에 대한 저해율이 그다지 높지 않은 것으로 나왔다. 그리고 두 군데 mutation시킨 효소는 비슷한 저해율 값을 보였지만 C330X-S370X가 좀 더 높은 저해율을 보이는 것을 알 수 있었다. 펜토에이트(그림 4-59(b))에서도 각각의 효소들에 대한 농약의 민감도 값이 이소카브와 비슷한 양상을 보였지만 이소카브에 비해 더 낮은 저해율을 보였다. 카바릴(그림 4-59(c))에서는 대만효소, AchE, 그리고 두 군데 mutation시킨 효소들에서의 저해율이 아주 높게 나타났지만 S370X AchE는 낮은 저해율을 보였다. 메소밀(그림 4-59(d))에 대한 농약 민감도를 측정한 결과 S370X AchE는 거의 메소밀에 대한 저해율을 보이지 않았으며, 대만효소도 낮은 저해율이 측정되었다. 하지만 AchE와 두 군데 mutation시킨 C330X-S370X와 I374X-A376X AchE에서는 대만효소보다도 더 높은 저해율이 측정되었다(그림 4-59).



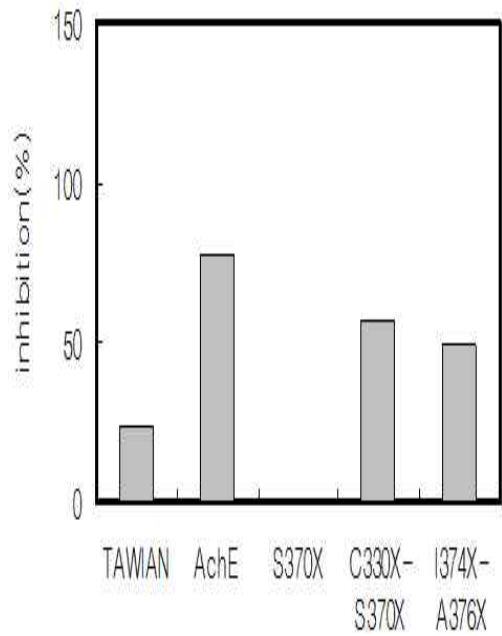
a. 이소카브



b. 메치오카브

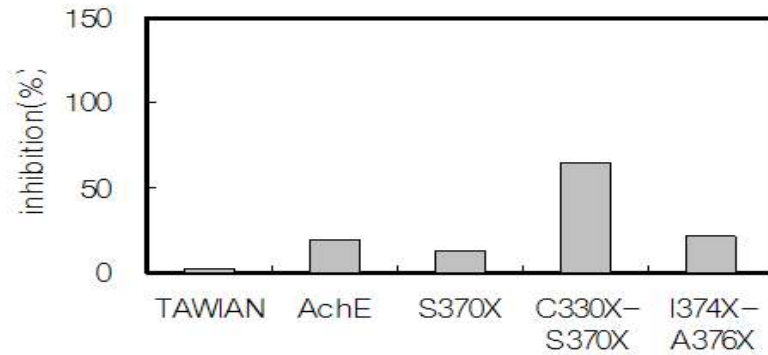


c. 카바릴

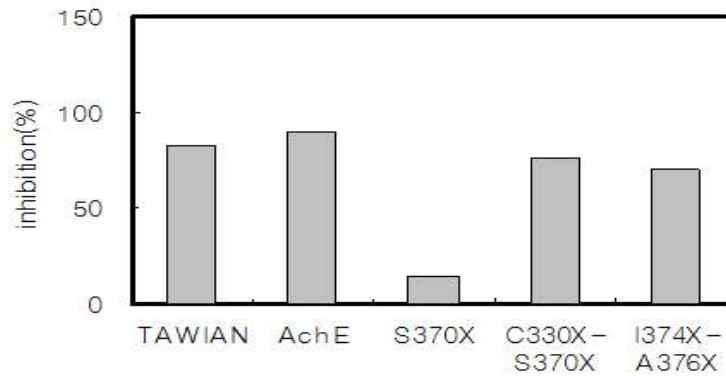


d. 메소밀

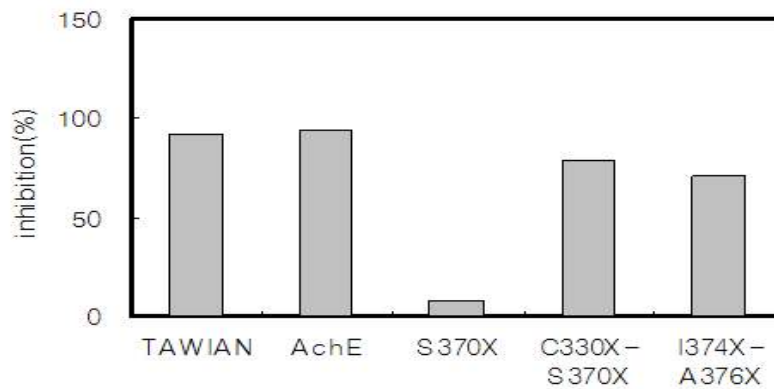
[그림 4-59] 카바메이트계 농약에 대한 민감성 측정



e. 알디카브



f. 옥사밀



g. 벤디오카브

[그림 4-60] 카바메이트계 농약에 대한 민감성 측정

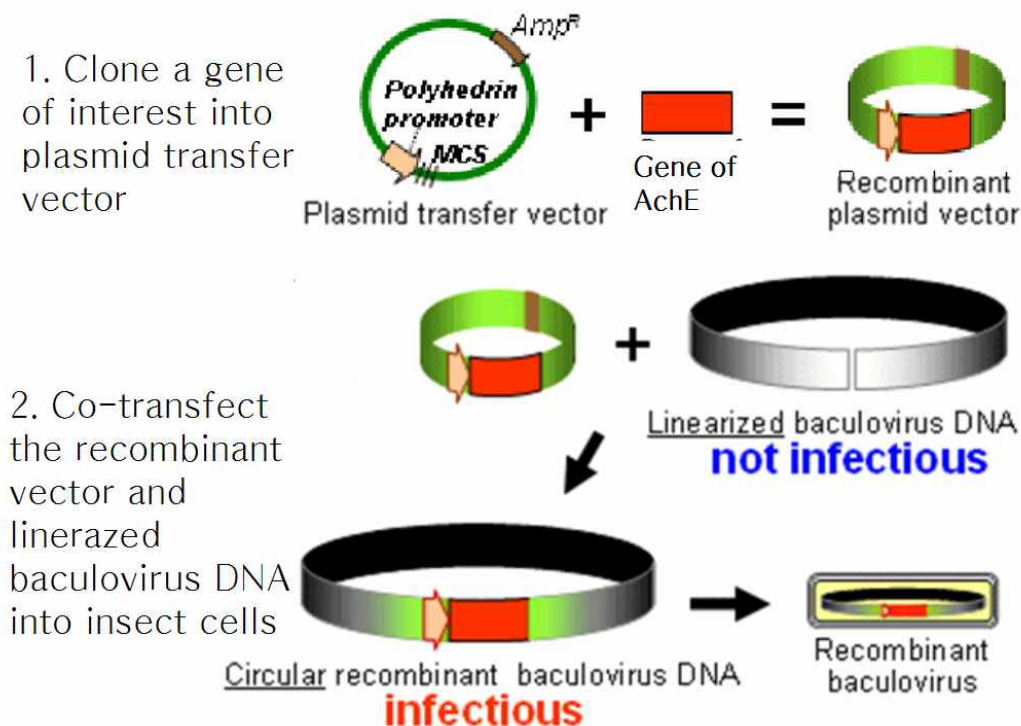
알디카브, 옥사밀, 벤디오카브에 대한 민감성을 실험한 결과 대만효소는 알디카브에 대한 민감성은 거의 나타내지 않았으며, AchE, S370X효소에서는 대만효소보다는 좀 더 알디카브에 민감성을 나타냈으며, 이 두 효소는 유사한 값의 저해율을 나타냈다. 알디카브에서는 오히려 두 군데 mutation시킨 C330X-S370X에서 알디카브에 대한 가장 높은 민감도를 나타냈다(그림 4-60(e)). 옥사밀에서는 S370A를 제외한 나머지 효소들에서 거의 유사하게 옥사밀에 대한 민감성을 보여주었지만, 이 효소들 중에서

는 AchE에서 가장 높은 저해율 값을 나타내었다(그림 4-60(f)). 벤디오카브에서도 모든 효소의 농약에 대한 민감도가 옥사밀과 유사한 경향을 보였지만 한군데를 mutation 시킨 S370X효소에서는 농약에 대한 저해율이 거의 나타나지 않았다(그림 4-60(g)). 카바메이트계의 농약을 이용한 효소의 민감도 측정에서는 한군데를 mutation시킨 효소에서 가장 낮은 저해율을 보이거나 농약 종류에 따라서 거의 민감도를 보이지 않았으며, 유기인계 농약에서와 유사하게 변형 전 효소가 mutation시킨 효소들보다는 농약에 대한 더 높은 민감도를 나타내었다.

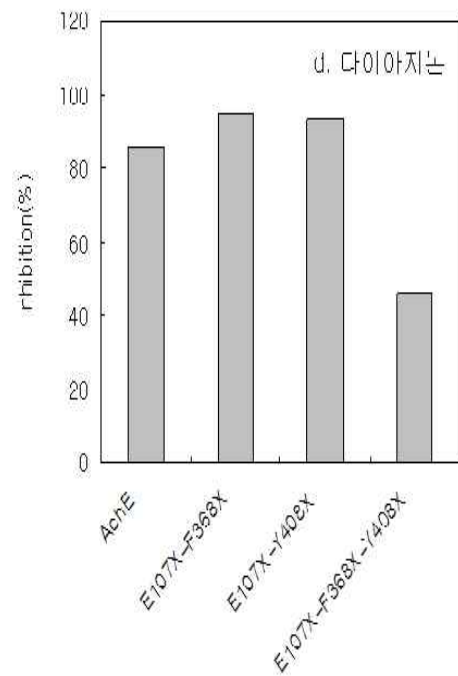
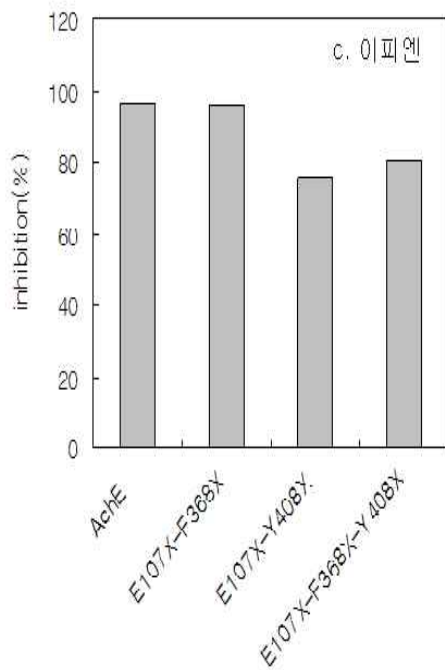
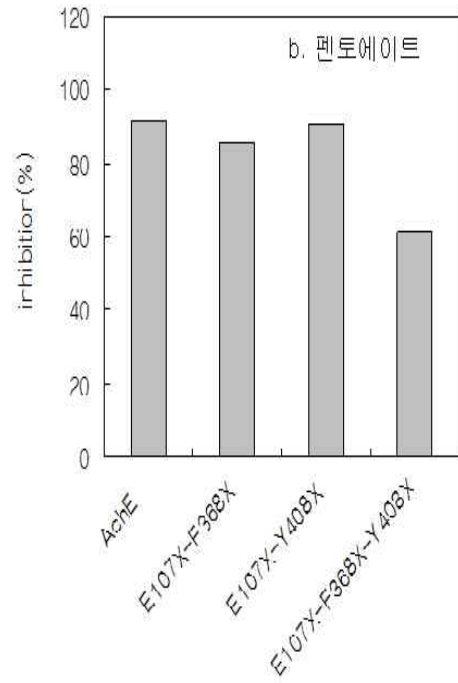
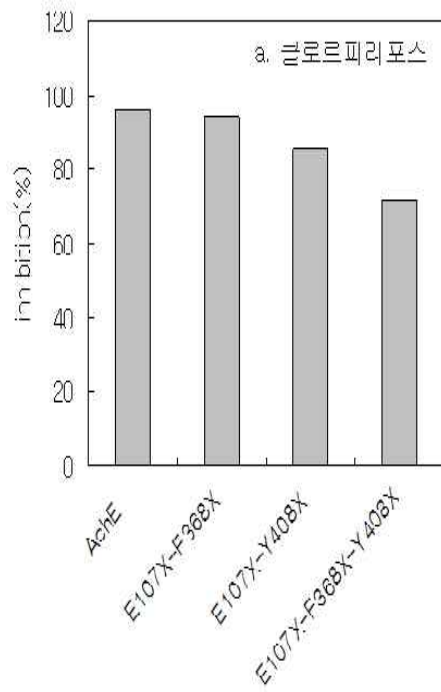
#### 나. 다른 부위의 AChE의 유전자 변형 조작에 따른 농약에 대한 민감성 비교

이외에도 본 연구에서 농약에 대한 민감도가 증가된 효소를 생산하기 위하여 AchE의 다른 부위의 mutagenesis를 시도하였으며 전체적인 실험방법은 아래의 모식도와 같은 실험방법에 의해 제조된 mutagenesis AchE를 제조하였다(그림 4-61).

위와 같은 방법으로 만들어진 재조합된 AchE를 이용하여 농약에 대한 민감도를 조사하였다. 먼저 유기인계 표준농약을 이용하여 각각의 농약을 추출한 후 AchE와 mutation시킨 효소들을 이용하였다.(그림 4-61)

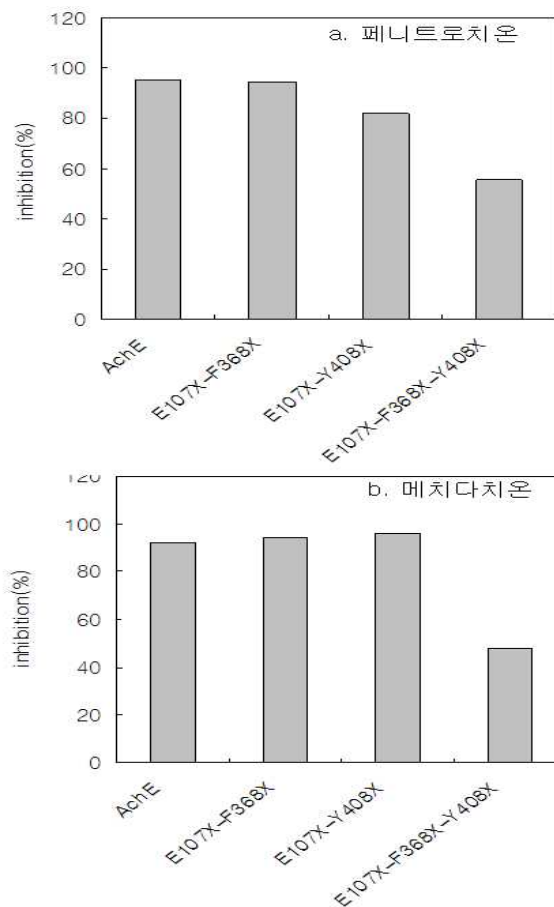


[그림 4-61] 재조합된 AchE의 곤충세포로의 감염 모식도

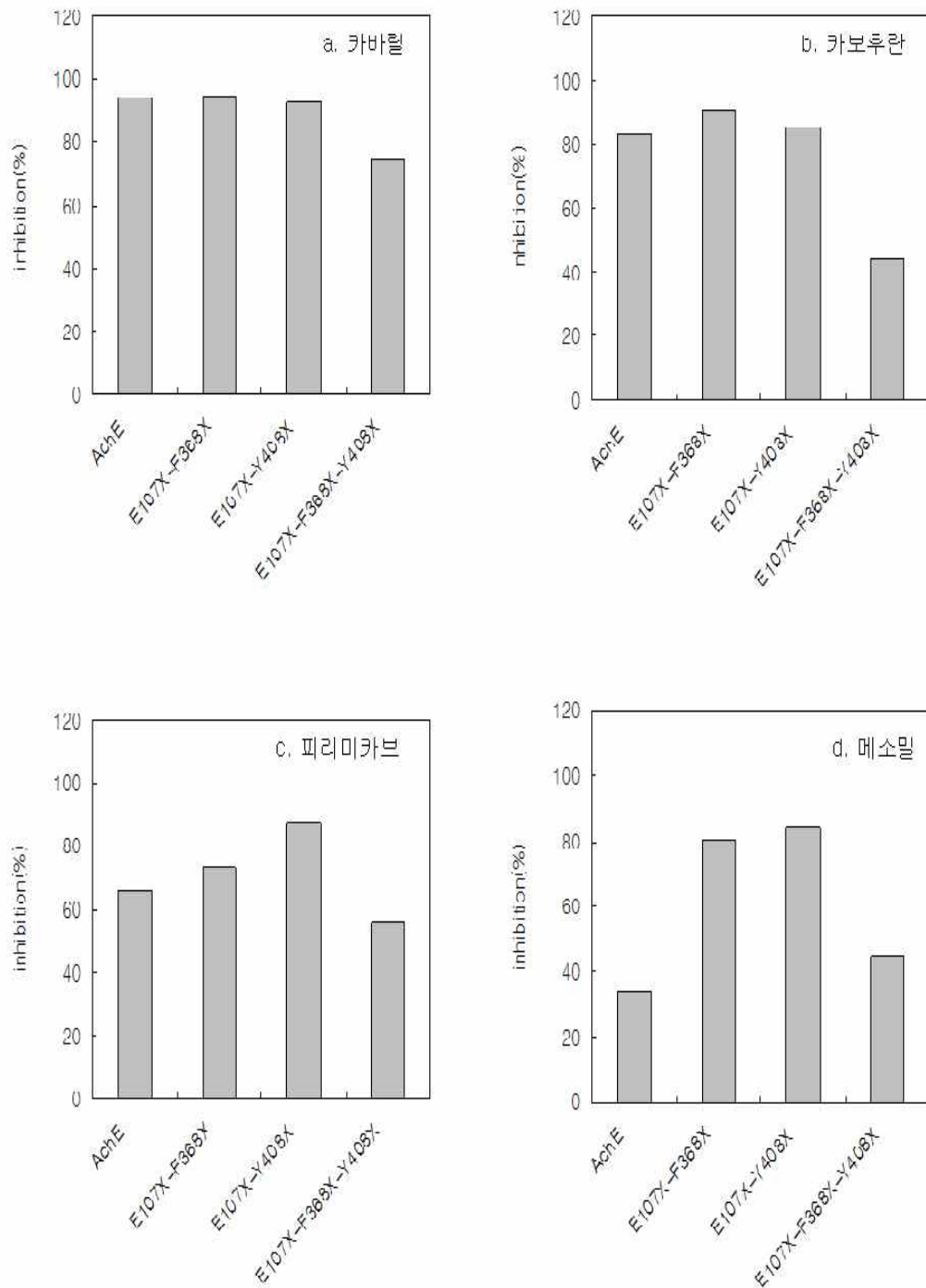


[그림 4-62] 유기인계 농약에 대한 민감도 조사(I)

재조합된 효소와 AchE를 이용해 유기인계에 대한 민감도를 조사한 결과이다. 먼저 AchE와 각각의 부위를 mutagenesid 시킨 E107X-F368X, E107X-Y408X, E107X-F368X-Y408X AchE들의 클로르피리포스에 대한 민감도는 거의 유사한 값의 저해율을 보였다. 하지만 이 중에서도 세 군대를 mutation시킨 E107X-F368X-Y408X AchE에서는 이들 효소 중에서 가장 낮은 값을 보여주었다(그림 4-62(a)). 펜토에이트에서는 변형 전 효소와 두 군대를 mutation시킨 E107X-Y408X 효소에서 가장 높은 값의 저해율이 나타났고, E107X-F368X 효소에서도 민감함을 보였다(그림 4-62(b)). 이피엔에서는 변형 전 효소와 변형시킨 효소에서 높은 민감도를 보였으며, 특히 변형 전 효소와 한 군대를 mutation시킨 E107X-F368X 효소에서는 높은 값의 저해율을 나타냈다(그림 4-62(c)). 다이아지논을 이용한 민감도 측정에서는 변형 전 효소보다는 오히려 두 군대 변형시킨 E107X-F368X, E107X-Y408X 효소에서 더 높은 민감도를 보였으며, 세 군대를 변형시킨 E107X-F368X-Y408X 효소에서는 가장 낮은 저해율 값을 나타냈다.(그림 4-62(d))



[그림 4-63] 유기인계 농약에 대한 민감도 조사(II)



[그림 4-64] 카바메이트계에 대한 민감도 조사(I)

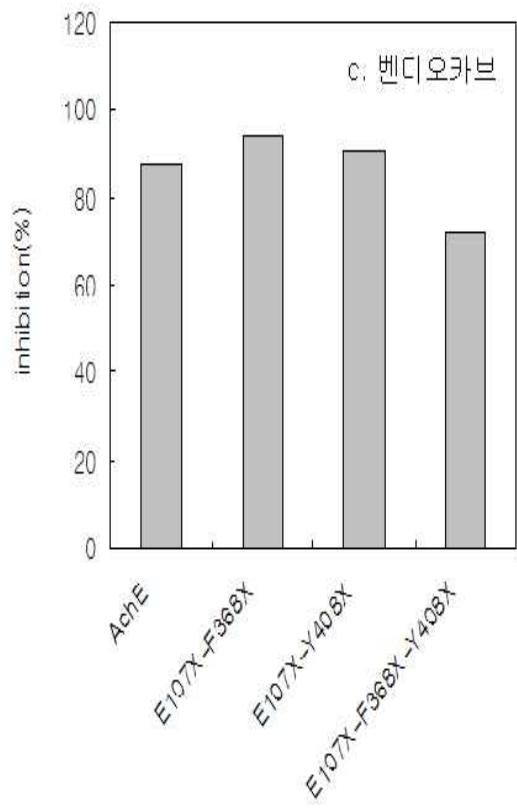
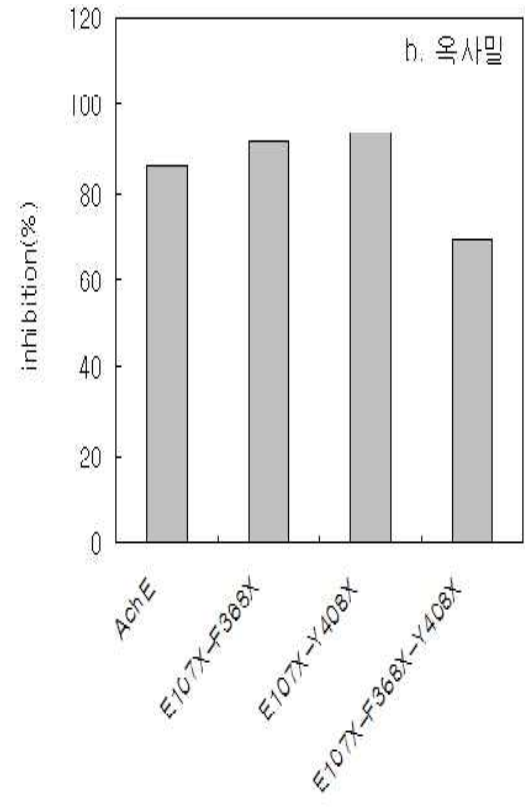
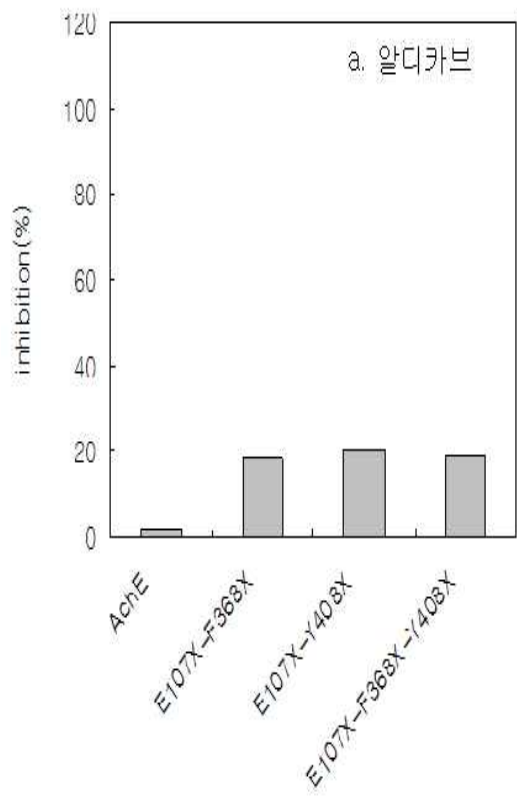
페니트로치온에 대한 민감도를 측정한 결과 AchE와 E107X-F368X는 페니트로치온에 대한 저해율 값이 변형 전 AchE 보다 약간 더 높게나 타났으며, E107X-Y408X, E107X-F368X-Y408X AchE도 페니트로치온에 대한 민감도가 높게 나타났다(그림 4-63(a)). 메치다치온에 대한 민감도를 측정한 결과 AchE, E107X-F368X,

E107X-Y408X가 모두 높은 저해율 값을 나타냈으며 특히, 두 군데 mutation시킨 E107X-Y408X에서 가장 높게 나타났다(그림 4-63(b)). 변형 전 AchE와 E107X-F368X, E107X-Y408X, E107X-F368X-Y408X를 변형시킨 AchE를 이용한 효소 민감도 측정에서는 세 군데를 mutation시킨 E107X-F368X-Y408X를 제외한 대부분의 효소에서 유기인계 농약에 대한 민감도가 높게 나타났다.

재조합된 효소들과 AchE를 이용한 카바메이트계에 대한 민감도를 조사한 결과이다. 먼저 카바틸을 이용한 민감도 측정에서는 AchE와 각각의 부위를 mutagenesid 시킨 E107X-F368X, E107X-Y408X, E107X-F368X-Y408X AchE에서 모두 높은 저해율 값을 보여주었으며, 이 중에서 세 군데를 mutation시킨 E107X-F368X -Y408X AchE에서 다른 효소들에 비해 약간 낮은 값을 나타냈다(그림 4-64(a)). 카보후란에서는 변형 전 효소에서보다는 두 군데 mutation시킨 E107X-F368X, E107X -Y408X에서 더 높은 저해율 값을 보여주었으며, E107X-F368X AchE에서는 E107X -Y408X AchE보다 약간 더 높은 저해율 값이 측정되었다(그림 4-64(b)). 피리미카브에서는 모두 50%이상의 저해율을 보여주었으며 변형 전 효소보다는 E107X -F368X AchE가 더 높은 저해율 값이 측정되었고 E107X-Y408X AchE가 가장 높은 저해율 값을 보여주었다(그림 4-64(c)). 메소밀에 대한 민감도 측정결과는 두 군데를 mutation시킨 E107X-F368X, E107X-Y408X에서 AchE보다 훨씬 높은 저해율 값을 보여주었으며, 특히 E107X-F368X-Y408X AchE에서도 저해율 값이 AchE보다 더 높은 값을 보여주었다.(그림 4-64(d))

알디카브를 이용한 민감도 측정에서는 AchE에서는 저해율 값이 거의 측정되지 않았으며 각각의 부위를 mutagenesid 시킨 E107X-F368X, E107X-Y408X, E107X-F368X -Y408X AchE에서는 모두 비슷한 값의 저해율 값을 보여주었다(그림 4-65(a)). 옥사밀에서는 이 중에서 세 군데를 mutation시킨 E107X-F368X-Y408X AchE에서 다른 효소들에 비해 약간 낮은 값을 나타냈으며, 두 군데 mutation시킨 E107X-F368X, E107X-Y408X AchE에서 높은 민감도를 보여주었다(그림 4-65(b)). 벤디오카브에서는 변형 전 AchE, E107X-F368X, E107X-Y408X, E107X-F368X -Y408X AchE에서 아주 높은 저해율 값이 측정되었으며, 특히 두 군데를 mutation시킨 E107X-F368X, E107X-Y408X AchE에서 가장 높은 민감도를 보여주었다(그림 4-65(c)). 카바메이트계에 대한 각각의 변형 전 효소와 mutation시킨 효소들 간의 민감도를 측정한 결과는 모두 높은 민감도를 보이면서도 유기인계농약과는 다르게 두 군데를 mutation 시킨 E107X-F368X, E107X-Y408X AchE에서 높은 민감도를 보이는 결과를 얻을 수 있었다.

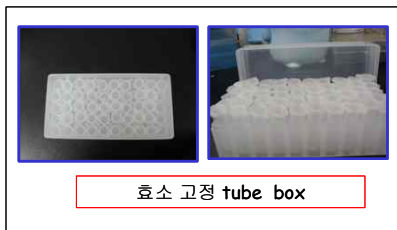




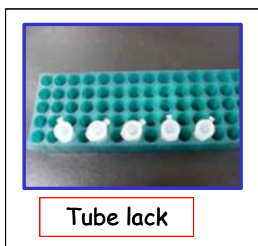
[그림 4-65] 카바메이트계에 대한 민감도 조사(II)

### 다. 고정화 효소를 이용한 농약 민감성 측정

고정화 효소를 이용하여 유기인계와 카바메이트계 농약에 대한 민감성 실험을 위해 다음과 같은 방법으로 진행하였다.



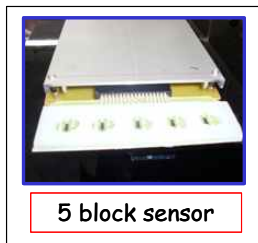
효소 고정 tube box



Tube rack



농약 추출액



5 block sensor

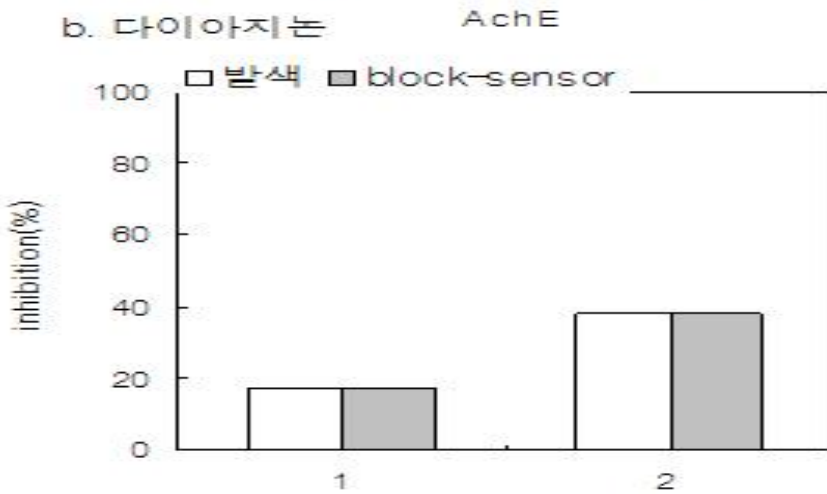
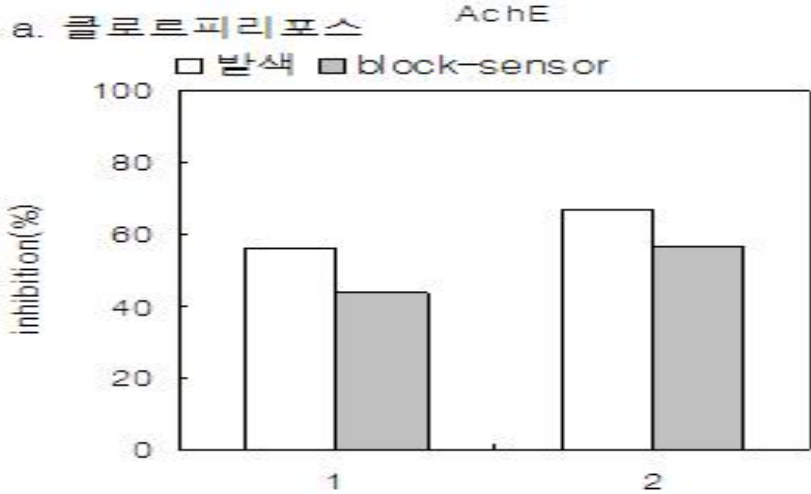
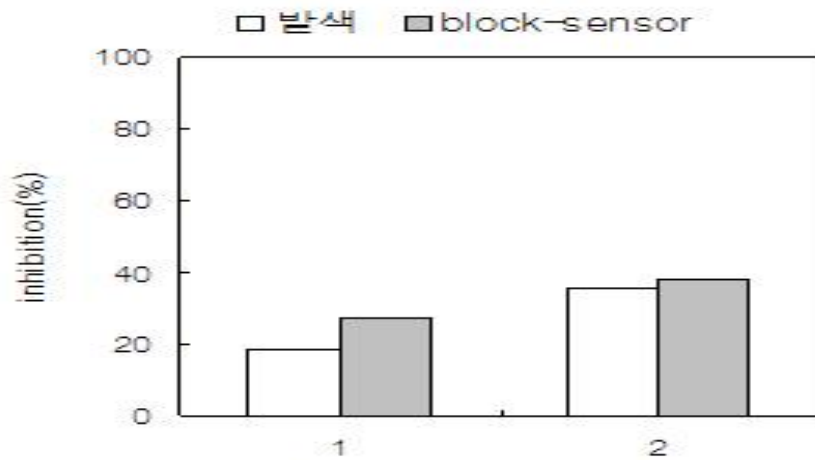


효소-농약 반응액



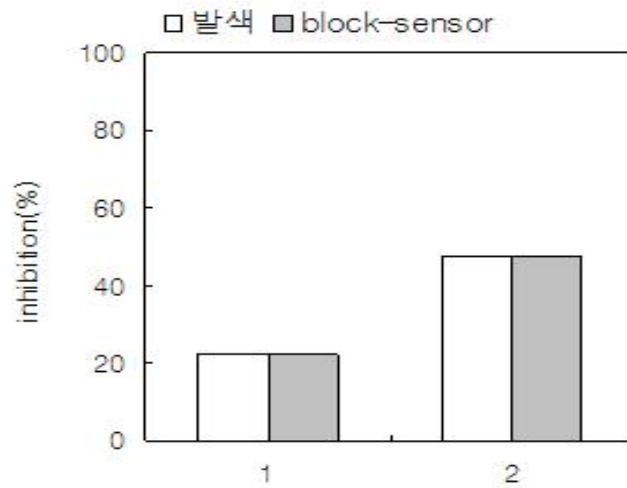
측정값

1. 먼저 효소를 tube에 고정화 시킨 다음 tube box에 넣어 4℃에 보관하면서 실험을 행할 때 마다 효소를 고정화 tube를 꺼내어 사용하였다.
2. 실험하기 위해 꺼낸 고정화된 효소tube를 tube rack에 꽂은 다음 사용하였다.
3. 농약 추출액을 효소고정화 tube에 넣은 다음 37℃에서 약 5분간 incubation시킨다. 그런 다음 기질을 넣고 3분간 다시 incubation시킨다.
4. 왼쪽과 같은 5 block sensor에
5. 대조구, 시료 1, 시료 2, 시료 3, 시료 4를 넣은 다음 기계의 스위치를 키고 측정 한다.
6. set button을 누르면 왼쪽과 같은 측정값이 5개의 block의 효소의 농약에 대한 저해율 값을 계산하여 나타내게 된다.

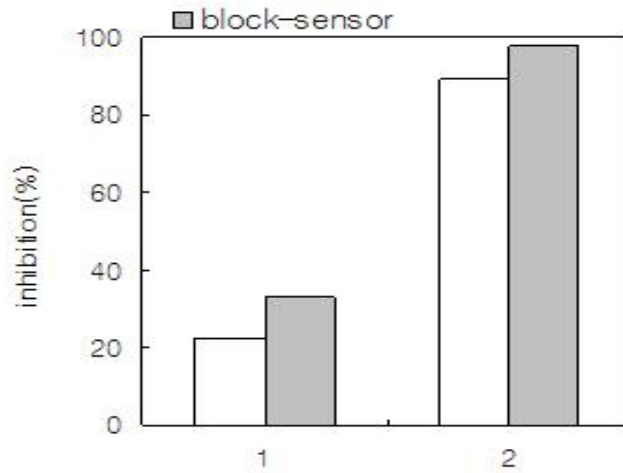


1: 농약 검출한계(20%)      2: 농약검출한계(50%)

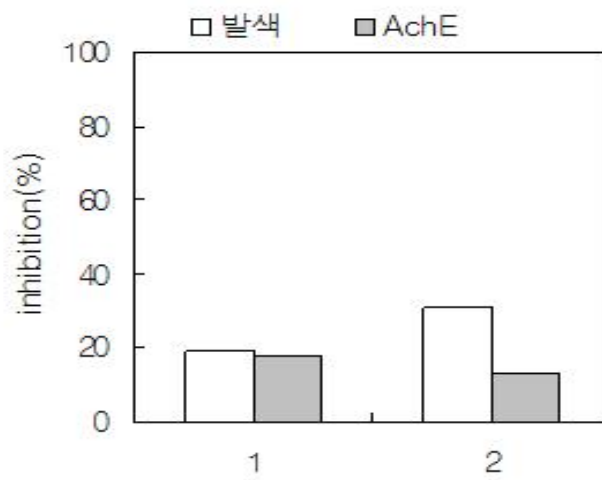
[그림 4-66] 유기인계 농약에 대한 민감도 조사(I)



a. 이피엔 AChE



b. 펜치온 AChE



c. 포살론 AChE

1: 농약 검출한계(20%)      2: 농약검출한계(50%)

[그림 4-67] 유기인계 농약에 대한 민감도 조사(II)

### (1) 효소-tube를 이용한 유기인계 농약에 대한 민감도 측정

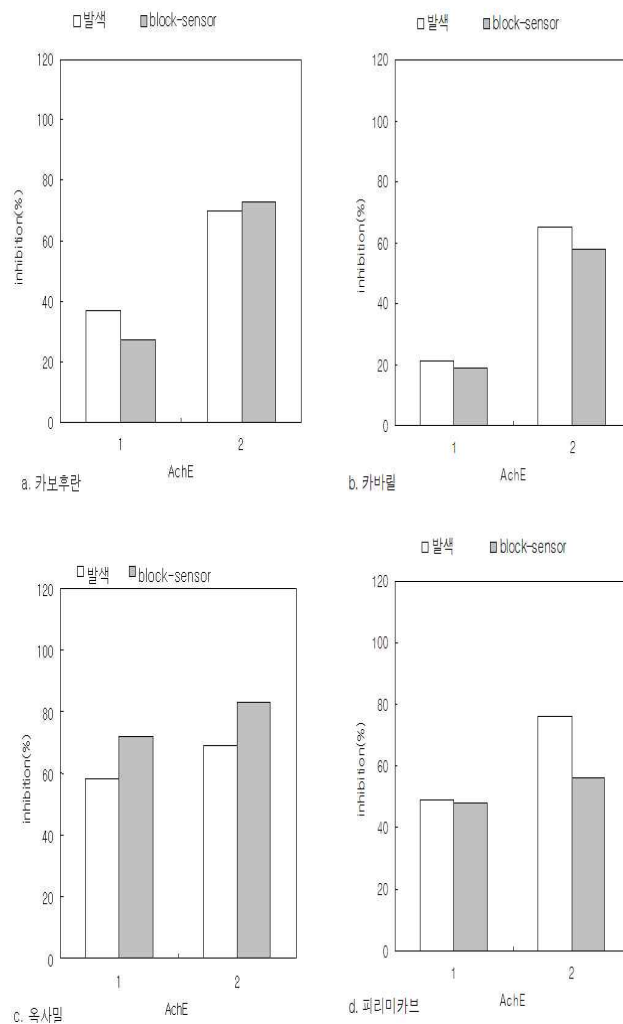
클로르피리포스, 다이아지논, 펜토에이트를 이용하여 유기인계 농약에 대한 민감도를 측정하였다. 먼저 발색법과 block-sensor(C version용 시제품 바이오 전극 1Set)를 이용한 농약에 대한민감도를 비교해보기 위해 block-sensor와 같은 조건 즉, 하나의 농약에 대해 효소-tube를 준비한 뒤 block-sensor법으로 측정하기 위해 위와 같은 방법으로 농약과 효소를 반응시킨 다음 위의 방법 5번에서 하나는 발색법으로 다른 하나는 block-sensor를 이용해 농약에 대한 민감도를 측정하였다. 그리고 1은 농약 검출한계(20%), 2는 농약검출한계(50%)일 때의 농도로 실험한 결과이다. 클로르피리포스에서 민감도 측정결과는 발색법과 block-sensor법으로 측정된 저해율 값이 거의 비슷하게 나타났지만(그림 4-66(a)), block-sensor법으로 측정된 값이 발색법으로 측정된 값보다 좀더 농약에 대한 민감성을 보여주었다. 다이아지논에서는 클로르피리포스 보다는 효소들의 농약에 대한 민감도가 더 높게 나타났으며, 이번에는 발색법으로 측정된 값이 block-sensor법으로 측정된 저해율 값 보다 더 민감함을 보여주었다(그림 4-66(b)). 펜토에이트에서는 발색법과 block-sensor법으로 측정된 값이 거의 유사함을 보여주었다(그림 4-66(c)).

이피엔에서는 block-sensor법으로 측정된 저해율 값과 발색법으로 측정된 저해율 값이 아주 유사하게 나타났으며(그림 4-67(a)). 펜치온에 대한 민감도 측정에서는 발색법과 block-sensor법을 측정된 값에서 block-sensor법으로 측정된 값이 좀 더 높게 나타났다. 그리고 펜치온에 대한 민감도 측정에서는 발색법과 block-sensor법으로 측정된 값 모두 20% 농약 검출한계와 50% 농약 검출한계 농도에서 높게 측정되는 농약에 대한 민감한 결과를 보여주었다(그림 4-67(b)). 포살론을 이용한 민감도 측정에서는 20% 농약 검출한계에서는 유사한 저해율 값을 나타냈지만 50% 농약 검출한계 농도에서는 발색법으로 측정된 값이 block-sensor법으로 측정된 값 보다 더 민감하게 측정되는 것으로 나타났다(그림 4-67(c)). 유기인계 농약을 이용한 block-sensor법으로 측정된 값과 발색법으로 측정된 저해율의 비교결과 거의 유사한 값을 보이면서도 농약에 따라 민감도가 다르게 나타났다.

### (2) 효소-tube를 이용한 카바메이트계 농약에 대한 민감도 측정

발색법과 block-sensor를 이용한 농약에 대한민감도를 비교해보기 위해 block-sensor와 같은 조건 즉, 두개의 효소를 준비한 뒤 block-sensor법으로 측정하기 위해 위와 같은 방법으로 농약과 효소를 반응시킨 다음 위의 방법5번에서 하나는 발색법으로 다른 하나는 block-sensor를 이용해 농약에 대한 민감도를 측정하였다.

카바메이트계 농약을 이용하여 발색법과 block-sensor법으로 민감도를 측정하였다(그림 4-68). 카보후란에서는 발색법과 block-sensor법으로 측정된 저해율 값이 농약 검출한계(20%)에서는 발색법으로 측정된 값이 더 높았지만, 농약검출한계(50%)에서는 block-sensor를 이용하여 민감도를 측정했을 때 값이 더 높게 나타났다(그림 4-68(a)). 카바릴에서는 발색법으로 측정된 값이 block-sensor법으로 민감도를 측정된 값보다 조금 더 높은 측정치가 나왔지만 발색법과 block-sensor법으로 민감도를 측정된 저해율의 차이는 크게 보이지 않았다(그림 4-68(b)). 옥사밀을 이용하여 발색법과 block-sensor법으로 민감도를 측정했을 때는 block-sensor로 저해율을 측정했을 때 더 좋은 민감성을 보였으며(그림 4-68(c)), 피리미 카브에서는 발색법으로 측정된 값이 block-sensor법으로 민감도를 측정된 값보다 더 높게 나타났다.(그림 4-68(d))



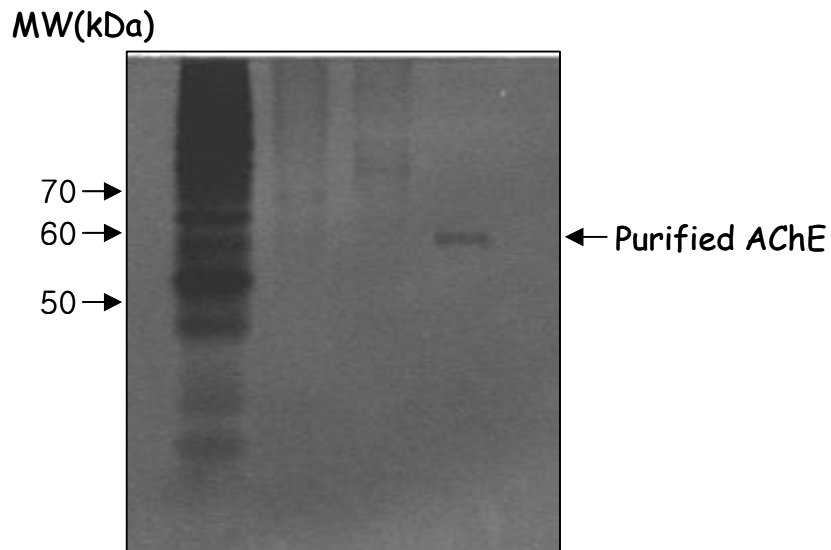
1: 농약 검출한계(20%)      2: 농약검출한계(50%)

[그림 4-68] Block-sensor를 이용한 카바메이트계 농약에 대한 민감도 조사

**라. 재조합된 효소의 대량 생산 및 분리에 따른 효소와 효소 양 측정**

Ni-NTA column을 이용하여 효소를 정제한 결과 그림 4-69와 같이 63kDa의 정제된 효소를 얻을 수 있었다. 하지만 정제된 효소를 만들기 위해서는 여러 과정이 필요하며, 이에 따른 시간과 비용이 많이 소요되는바, 본 연구에서는 센서에 필요한 효소를 부분정제를 이용한 방법으로 정제 후 효소를 사용하였다.

부분 정제 시 Ni-NTA column을 이용하여 정제하였을 때 보다 많은 양의 효소를 얻을 수 있었다(표 4-3). 이렇게 부분 정제된 효소들은 powder 형태로 -70℃에 보관하면서 센서를 만들기 전 투석 후 사용하였다.



[그림 4-69] Ni-NTA column을 이용한 효소정제

정 제 단 계	partial purification	Ni-NTA purification
효소양(100ml 배양시)	5g	0.4mg

[표 4-3] 부분정제와 Ni-NTA column을 이용한 정제과정에 따른 효소 양 측정

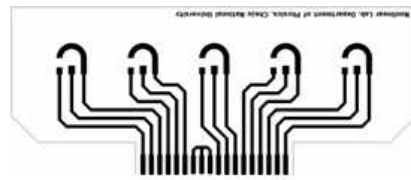
## 제 4 절 참여기업의 기술 이전

### 1. 바이오 전극 개발 결과 참여기업에 기술 이전

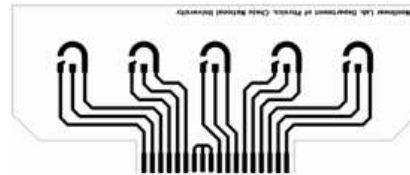
본 연구에서 개발되어진 바이오 전극(C version 시제품)의 기술 중 일부와 생산 시 필요한 바이오 전극 설계 필름 및 인쇄 공정의 조건(『4장 / 제 1 절』에 명기된 인쇄 물질, 건조 온도, 건조시간, CoPh 혼합 비율)을 참여회사인 (주)소일테크에 이전 하였으며, 『4장 / 제 4 절』에 측정된 결과의 실험에 사용되었다. 바이오 전극 설계 필름(거버파일) 및 인쇄 순서가 그림 4-70 이다. 그림에서 왼쪽에 보이는 그림이 바이오 전극 설계 필름이고, 오른쪽에 보이는 것이 인쇄 순서에 따른 그림이다. 치수가 기입 된 설계도면 및 전극 인쇄 시 사용되어 지는 지연용제, 일부 첨가제는 참여기업의 요청으로 명기하지 않았습니다.



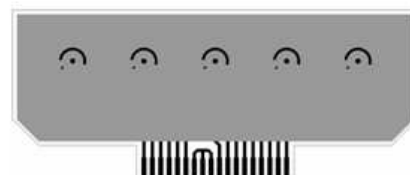
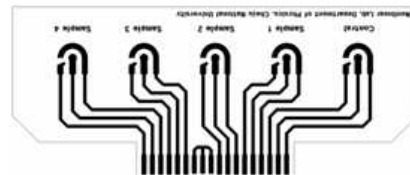
(a) 보상전극(Ag)



(b) 기준전극(Ag/AgCl)



(b) 동작전극(Ag/AgCl)



[그림 4-70] 바이오 전극 제작을 위한 전극 설계 필름



## 2. 바이오 전극용 측정기 개발 결과 참여기업에 기술 이전

그림 4-52의 바이오 전극용 A version 측정기 시제품을 이용하여, 그림 4-71와 같이 B version 측정기 시제품을 제작하였다. A version의 작은 표시창을 보다 크고, 한글 표시가 가능한 표시창으로 변경하였으며, 플라스틱으로 제작되었던 케이스를 알루미늄으로 제작하여, 전기적 잡음의 차폐를 강화하였고, 모든 조립 부품을 앞 상판에 붙여 조립 및 분해가 쉽도록 위치하였고, 미니 프린터(옵티마전자의 CP-500)를 추가하여 측정결과의 인쇄가 가능하도록 하였고, 케이스를 알루미늄 가방으로 제작하여 시약 및 바이오 전극, 전원 연결선 등을 수납할 수 있도록 제작하여 휴대성을 높였다.



(a)



(b)

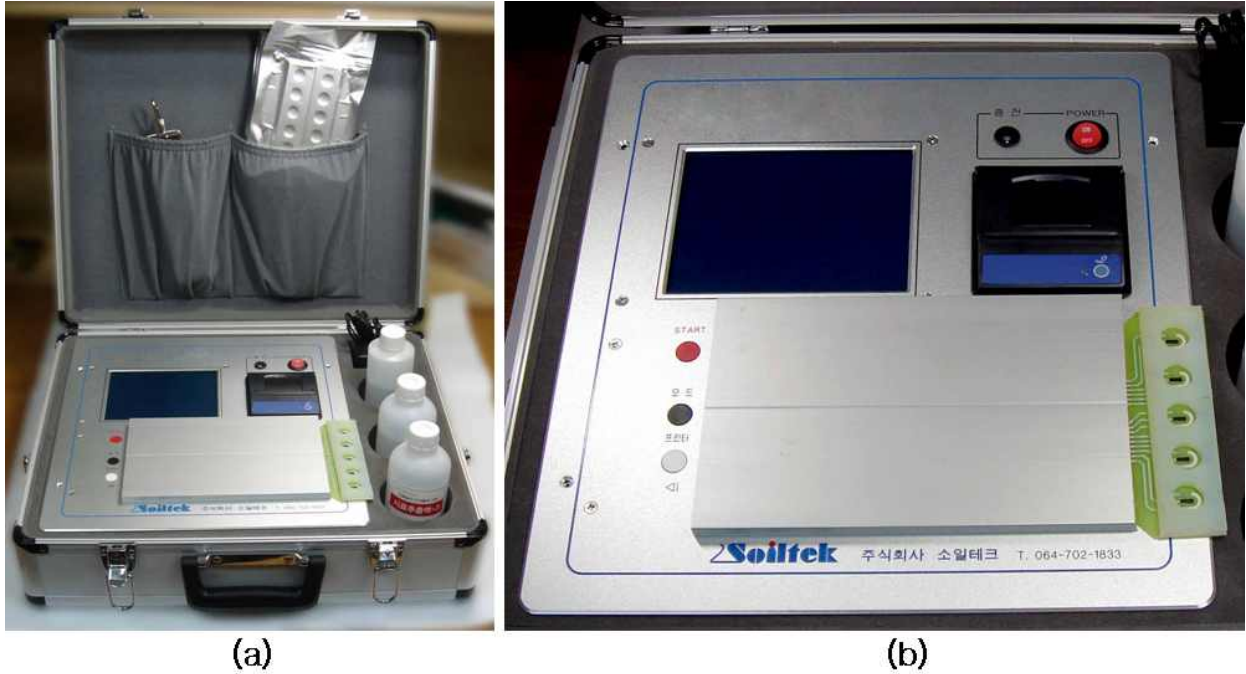


(c)



(d)

[그림 4-71] 바이오 전극용 측정기 기술 이전



[그림 4-72] 완성된 B version 측정기 시제품

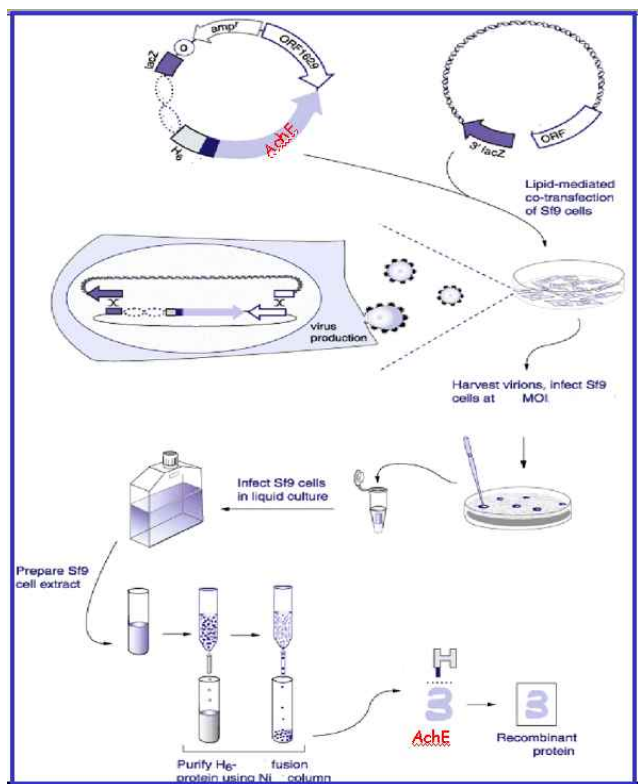
그림 4-72은 그림 4-71에서 설명한 B version 측정기 시제품의 완성된 사진이다. 그림 4-72(a)에서 보는 바와 같이 완성된 시제품은 알루미늄 가방 형태로 제작 되었으며, 시약 및 바이오 전극, 전원 연결선 등을 수납 할 수 있고, 케이스를 닫으면 그림 4-71(d)에서와 같이 완전한 가방의 형태로 되어 휴대성이 좋을 뿐 아니라, 측정기의 손상을 방지 할 수도 있다. 그림 4-72(b)에서와 같이 표시창을 크게 하였고, 알루미늄 케이스를 사용 할 뿐 아니라 sensing part를 완전히 알루미늄으로 차폐하였고, 프린터를 장착하였다. 또한 측정기의 전면부에 참여 기업이 명기 되어있다. 본 연구에서 개발된 B version의 측정기의 경우 A version의 측정기를 기초로 참여기업과 공동으로 개발하였고, 생산에 필요한 기술이 이전 되었다.

### 3. 바이오 전극용 효소 개발 결과 참여기업에 이전

본 연구에서 개발된 AchE 관련 DNA들과 그 sequencing 자료들(그림 4-73)과 기술은 개발과정에서 일부 결과가 참여회사인 (주)소일테크에 이전되었으며, 본 연구가 완료된 후에 3개월 이내에 기술을 모두 이전할 계획이다.

<pre>NALSDGQVLEPDLKFLILELVLVLELQYCYVTEIRLWVQIASSVQVSWVSTVVQ 60 DREVTYVDFIAAFVVEEAFFVFAEPVFAEPEVIALDIAVLAQTVQEETVFFDSEKEI 120 NRPYVVEEDCLITFVAFAAPALRGLRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHR 180 LLETVVGGPDTGLCLDQVACQDAVWVYVAFVGFVAFGLAEPVSEFAEA 240 PQVTVGQVLAALRSDGAFQVSEVETLFEAASSVYDQVAVFVAVTVLWQ 300 QVTVNSPQVETDIAEVLVGGALDQVACVAVTAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVV 360 FVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAV 420 DQATLAVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAV 480 FVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAV 540 RELRNLSAVTEFAPVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVV 600 NRPYVVEEDCLITFVAFAAPALRGLRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHR 660</pre> <p><b>AchE</b></p> <p><b>E107X-F368X</b></p>	<pre>NALSDGQVLEPDLKFLILELVLVLELQYCYVTEIRLWVQIASSVQVSWVSTVVQ 60 DREVTYVDFIAAFVVEEAFFVFAEPVFAEPEVIALDIAVLAQTVQEETVFFDSEKEI 120 NRPYVVEEDCLITFVAFAAPALRGLRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHR 180 LLETVVGGPDTGLCLDQVACQDAVWVYVAFVGFVAFGLAEPVSEFAEA 240 PQVTVGQVLAALRSDGAFQVSEVETLFEAASSVYDQVAVFVAVTVLWQ 300 QVTVNSPQVETDIAEVLVGGALDQVACVAVTAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVV 360 FVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAV 420 DQATLAVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAV 480 FVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAV 540 RELRNLSAVTEFAPVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVV 600 NRPYVVEEDCLITFVAFAAPALRGLRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHR 660</pre> <p><b>S370A AchE</b></p> <p><b>E107X-Y408X</b></p>	<pre>NALSDGQVLEPDLKFLILELVLVLELQYCYVTEIRLWVQIASSVQVSWVSTVVQ 60 DREVTYVDFIAAFVVEEAFFVFAEPVFAEPEVIALDIAVLAQTVQEETVFFDSEKEI 120 NRPYVVEEDCLITFVAFAAPALRGLRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHR 180 LLETVVGGPDTGLCLDQVACQDAVWVYVAFVGFVAFGLAEPVSEFAEA 240 PQVTVGQVLAALRSDGAFQVSEVETLFEAASSVYDQVAVFVAVTVLWQ 300 QVTVNSPQVETDIAEVLVGGALDQVACVAVTAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVV 360 FVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAV 420 DQATLAVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAV 480 FVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAV 540 RELRNLSAVTEFAPVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVVAVV 600 NRPYVVEEDCLITFVAFAAPALRGLRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHRSHR 660</pre> <p><b>C330L-370F AchE</b></p> <p><b>E107X-F368X-Y408X</b></p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

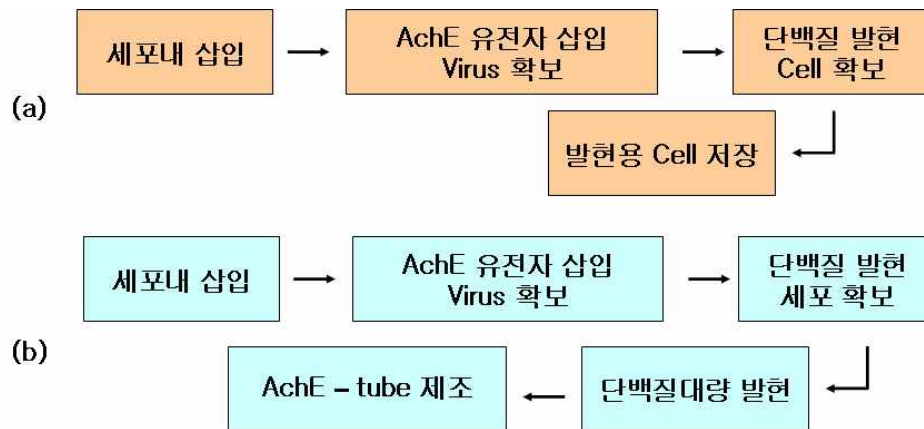
[그림 4-73] AchE, mutagenesis AchE 관련 DNA들과 그 sequencing결과



[그림 4-74] mutagenesis AchE를 sf9 cell line에 transfection 후 AchE를 분리 과정

위의 유전자들은 변형 전 AchE와 변형 후 mutation이 된 amino acid를 나타낸 그림으로 위의 유전자를 이용하여 곤충세포인 sf9에 삽입되어 키워진 세포는 질소가스를 이용한 세포 보관용 탱크에 보관 후 (주)소일테크로 그 세포는 이전되었다.

그림 4-74는 유전자의 세포내로 transfection을 나타낸 모식화한 그림으로 그림 4-74의 기술들도 (주)소일테크에 이전되었다.



[그림 4-75] (주) 소일테크로의 이전된 기술 모식도

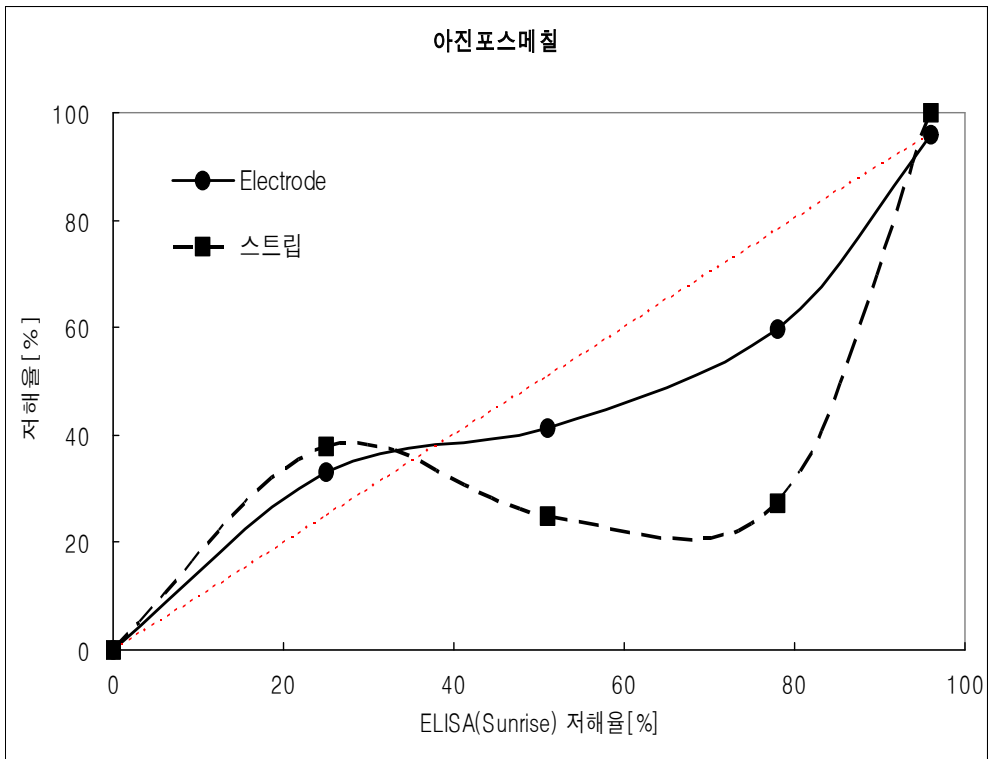
그림 4-75은 그림 4-74의 그림으로 나타낸 것을 유전자가 삽입된 세포와 그 세포에서 발현되는 바이러스 그리고 단백질을 안정적으로 확보하기위한 모식도를 간략하게 나타낸 것으로 본 실험에 사용된 주요 기술이다.

## 제 5 절 바이오 전극 및 스트립 측정기 민감도 비교

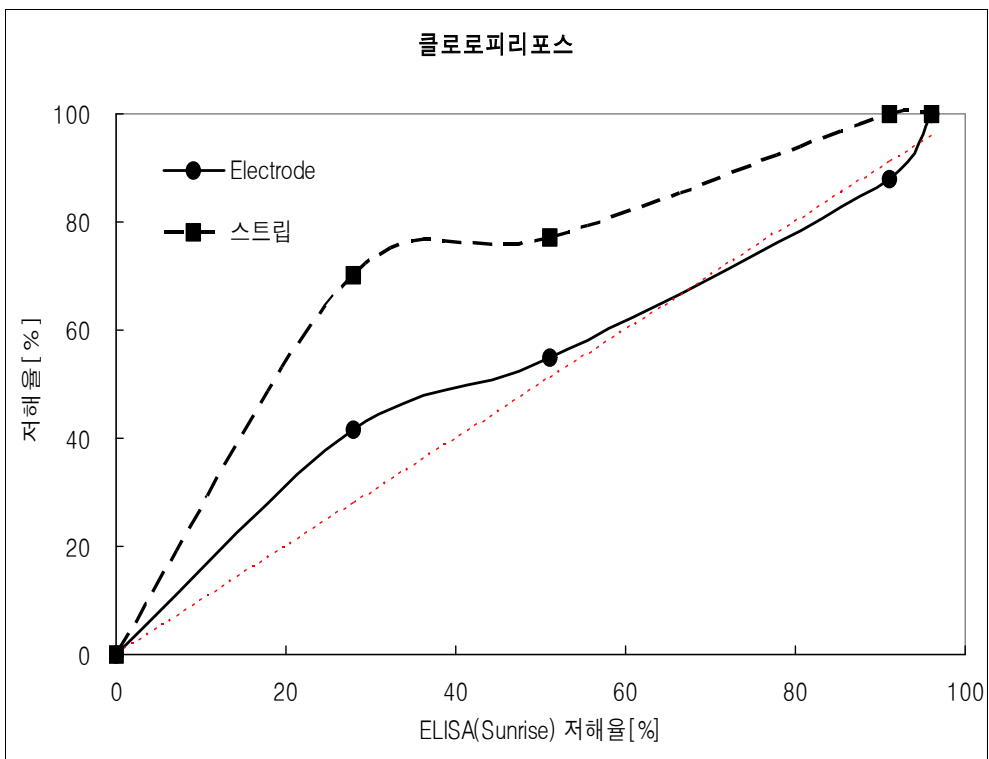
### 1. 바이오 전극 및 스트립 측정기 민감도 비교

이상 앞에서 설명한 본 연구의 기술 개발로 얻은 바이오 전극과, 바이오전극용 측정기, 바이오 전극용 효소를 이용하여, 그림 4-76부터 그림 4-95에 해당하는 20개의 농약에 대하여 스트립 측정기((주)소일테크, 바이오리트머스 스트립 분석기)와 비교 분석하였다. 그림 4-76부터 그림 4-95에 측정된 결과 값의 그래프의 X-축은 분광법으로 측정된 ELISA(Sunrise)의 저해율이고, Y-축은 본 연구에서 개발된 바이오전극과 스트립으로 측정된 저해율이다. 그래프 상에 표시된 점선(---)은 분광법으로 측정된 ELISA의 저해율과 측정된 저해율이 일치하는 값을 표시한 것이다.

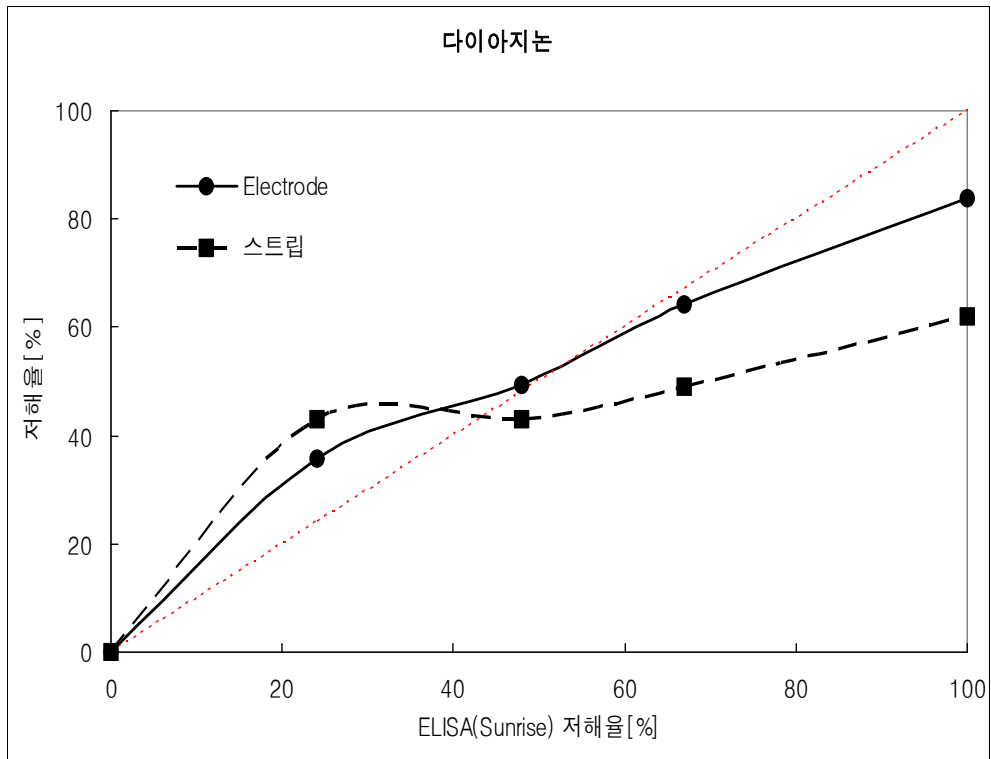
그림 4-76은 아진포스메칠을 측정된 결과로 ELISA 측정 결과의 25%에 해당되는 값을 제외하면 바이오 전극으로 측정된 결과가 스트립으로 측정된 결과에 비해 민감도가 좋으며, ELISA로 측정된 결과에 근접 할 뿐 아니라 선형성이 뛰어나다. 그림 4-77은 클로로피리포스의 측정결과이며, 바이오전극에 비해 스트립의 측정 결과 민감도가 좋으나, 바이오 전극으로 측정된 결과가 ELISA로 측정된 결과에 비해 근접하고, 선형성이 뛰어나다. 그림 4-78는 다이아지논의 측정결과로 23% 근처에서 측정된 결과를 제외하면 바이오 전극에 측정된 결과가 스트립으로 측정된 결과에 비해 민감도가 좋으며, ELISA의 측정 결과에 근접하고, 선형성이 좋다. 그림 4-79은 디메토에이트의 경우 이며, 전체적으로 바이오 전극으로 측정된 결과가 민감도와 선형성에서 뛰어나다. 또한 EPN(그림 4-80)과 토프로포스(그림 4-81), 페니트로치온(그림 4-82), 펜치온(그림 4-83), 말라치온(그림 4-84)의 경우 모두 동일한 결과가 나타난다. 그림 4-85 메치다치온(유기인계)의 경우 선형성은 스트립 뛰어나지만, 93%(ELISA 측정결과)에서 26%의 판정기준인(50%)를 넘지 못하였다. 파라치온(그림 4-86)의 경우 96%(ELISA)에서 스트립의 저해율은 21%임에 반해 바이오전극의 측정결과는 76%로 월등한 민감도를 보였고, 선형성 및 ELISA의 측정결과와 근접해 있다. 펜토에이트(그림 4-87)와 포살론(그림 4-88)의 경우 스트립과 바이오 전극의 측정 결과가 거의 비슷하다. 포스메트(그림 4-89)와 피리미포스(그림 4-90)의 경우 바이오전극의 측정결과가 우수하며, 클로로피리포스메칠(그림 4-91)과 옥사밀(그림 4-92), 카바릴(그림 4-93)의 경우 스트립과 바이오 전극이 비슷한 결과 갖으나, 바이오 전극의



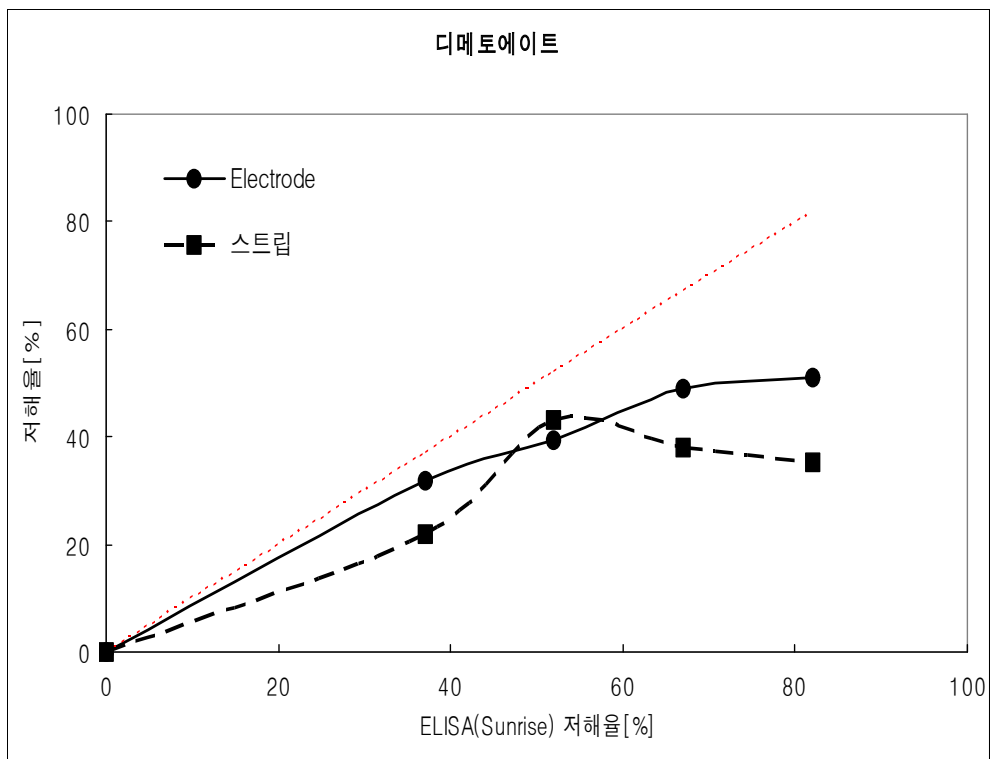
[그림 4-76] 아진포스메칠의 스트립 비교 측정 결과



[그림 4-77] 클로로피리포스의 스트립 비교 측정 결과

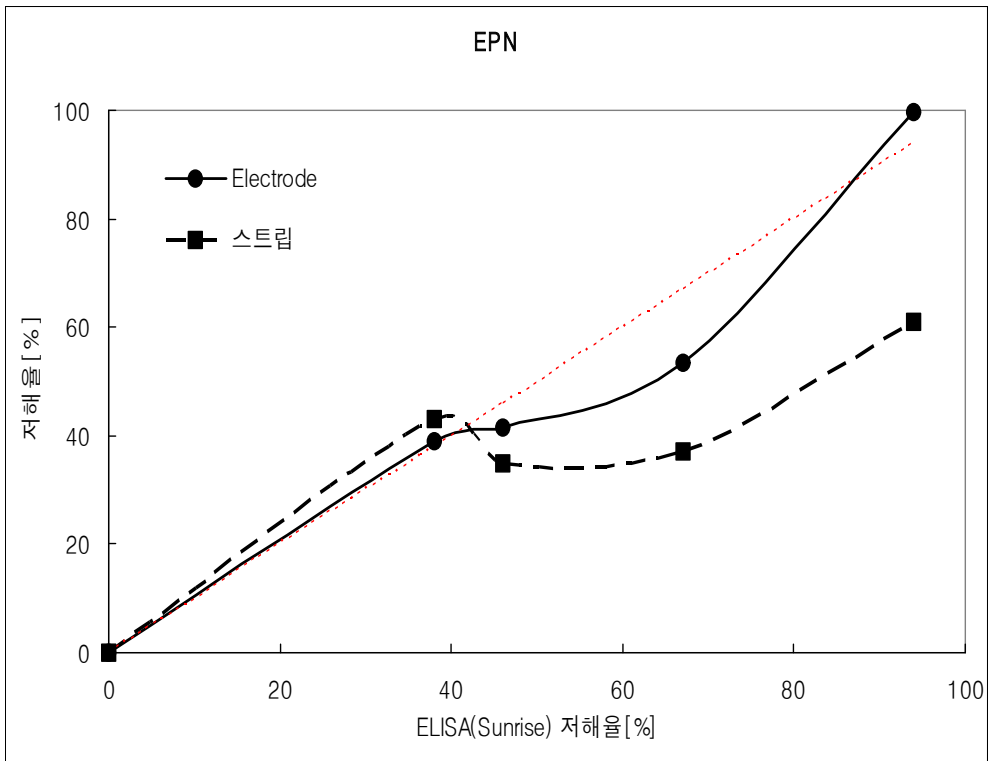


[그림 4-78] 다이아지논의 스트립 비교 측정 결과

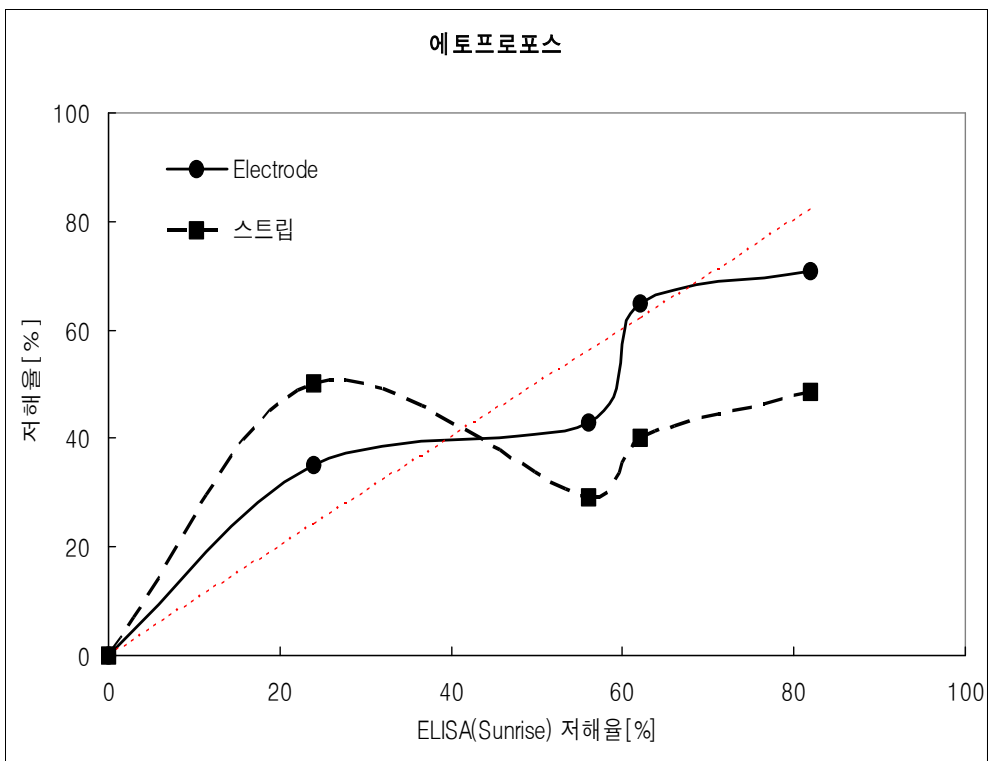


[그림 4-79] 디메토에이트의 스트립 비교 측정 결과



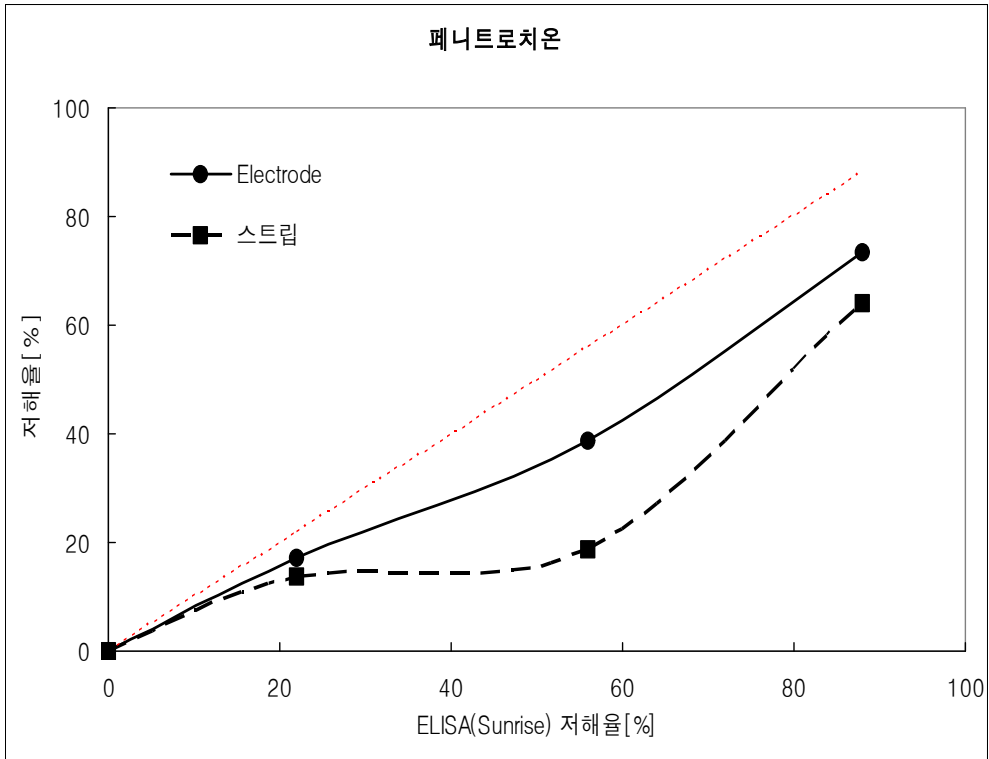


[그림 4-80] EPN의 스트립 비교 측정 결과

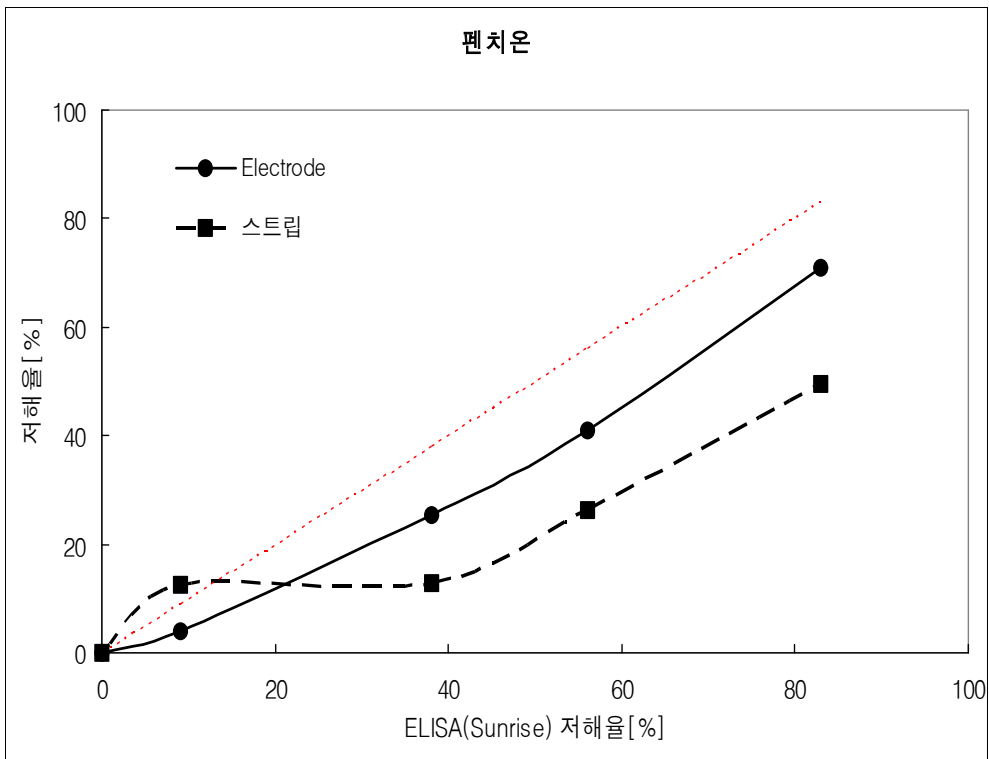


[그림 4-81] 에토프로포스의 스트립 비교 측정 결과

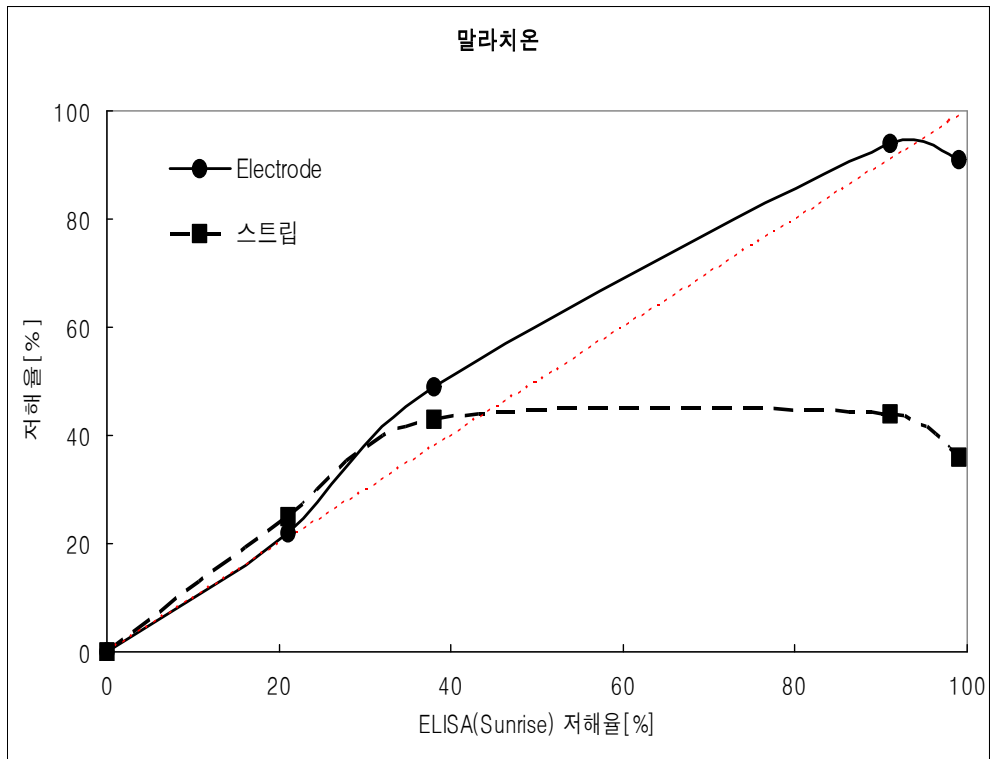




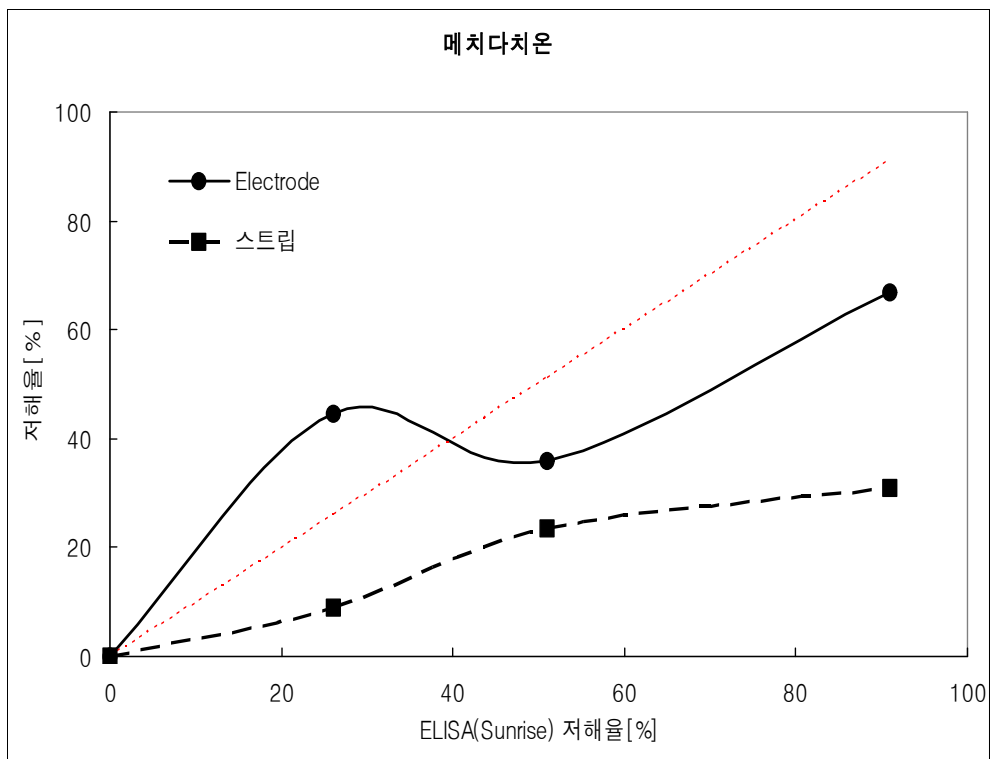
[그림 4-82] 페니트로치온의 스트립 비교 측정 결과



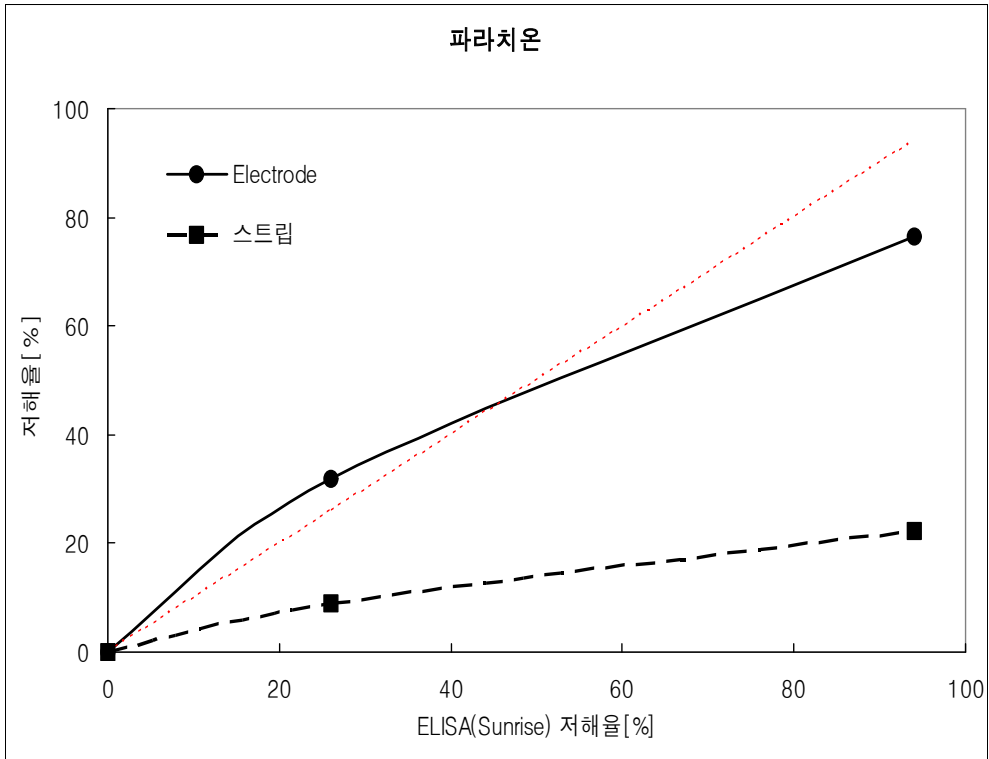
[그림 4-83] 펜치온의 스트립 비교 측정 결과



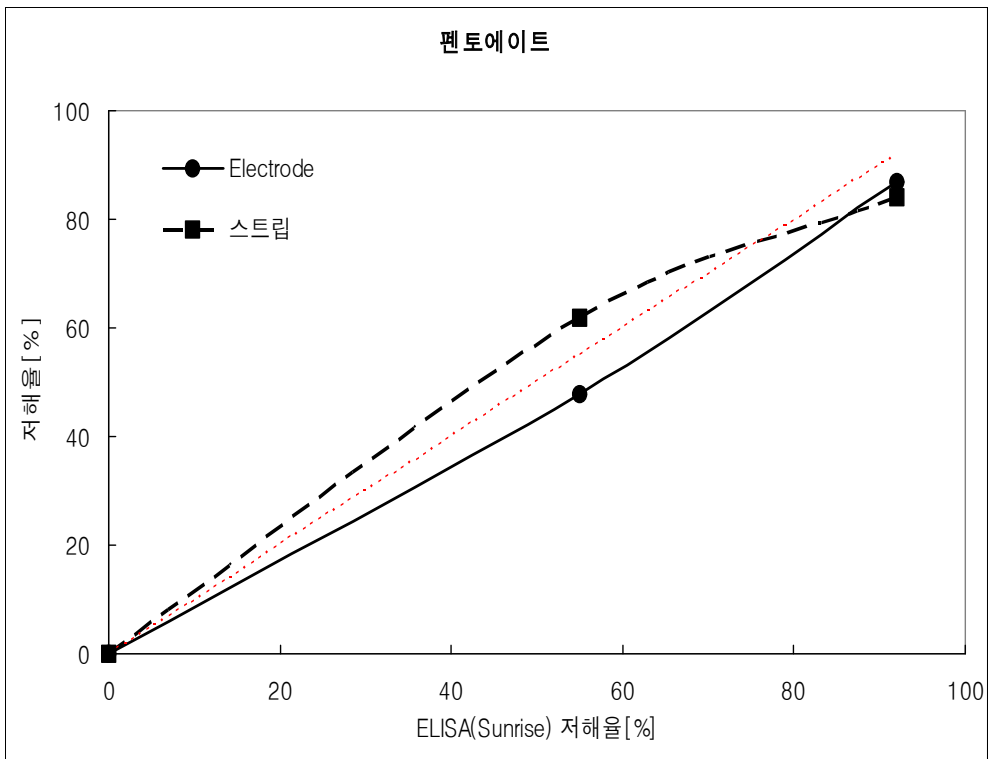
[그림 4-84] 말라치온의 스트립 비교 측정 결과



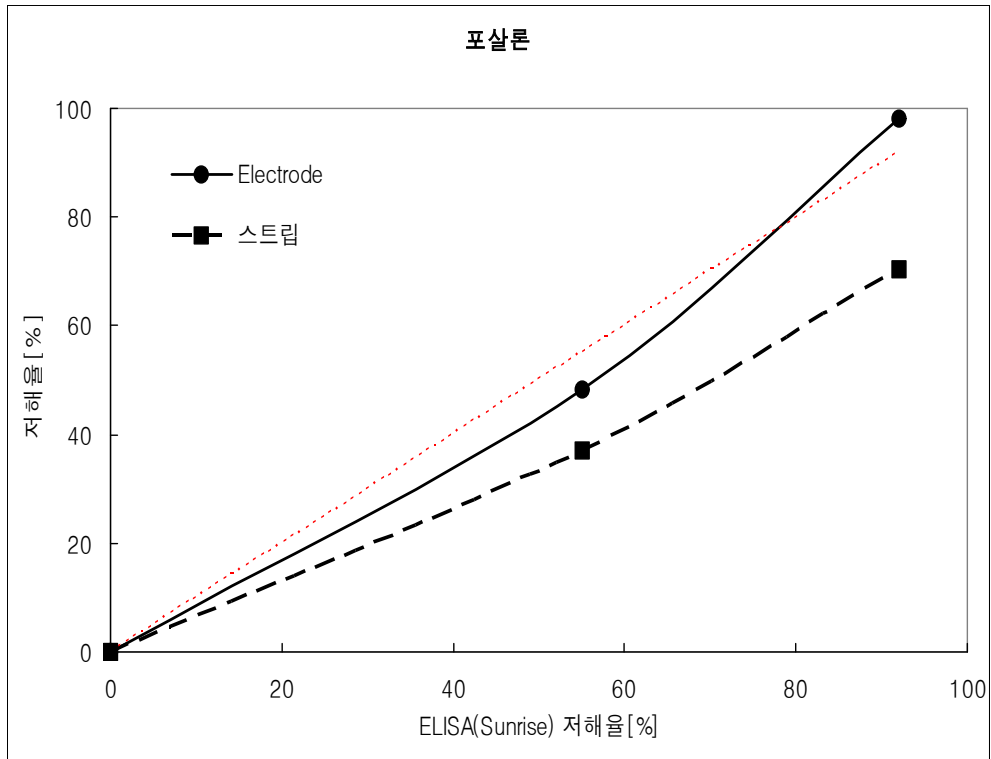
[그림 4-85] 메치다치온의 스트립 비교 측정 결과



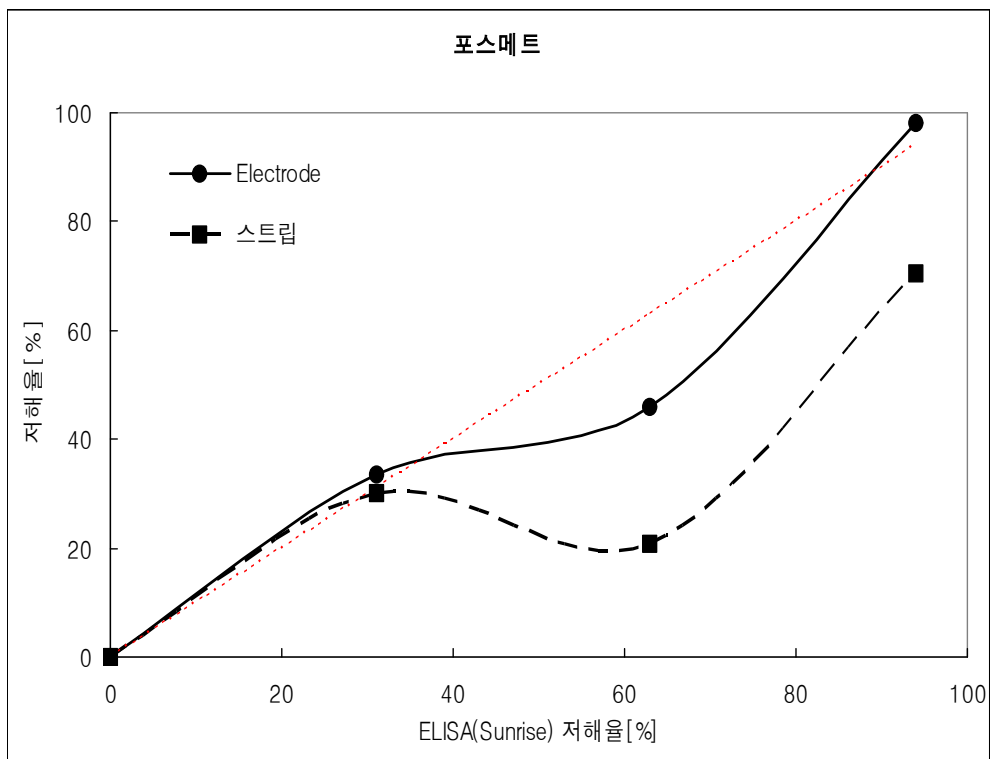
[그림 4-86] 파라치온의 스트립 비교 측정 결과



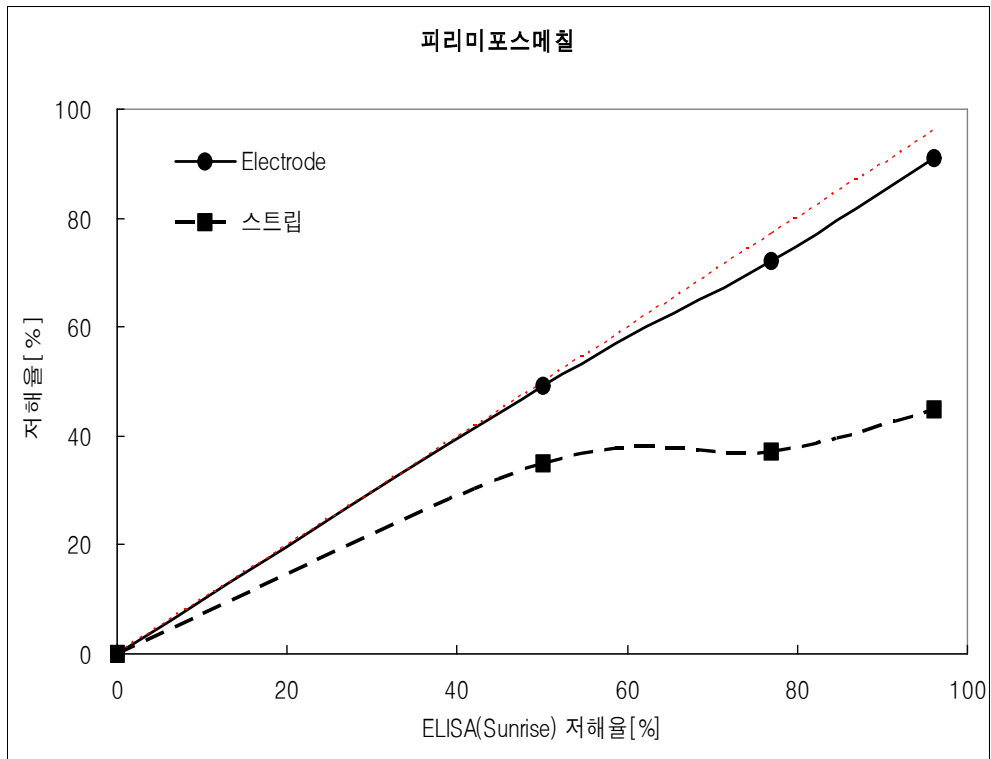
[그림 4-87] 펜토에이트의 스트립 비교 측정 결과



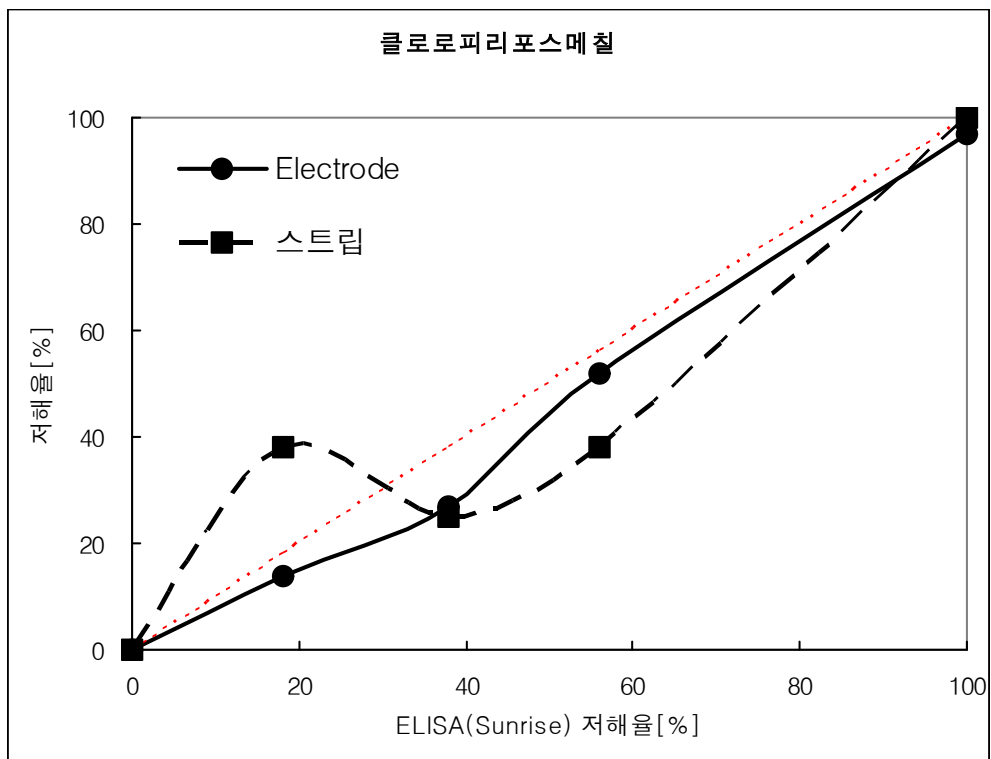
[그림 4-88] 포살론의 스트립 비교 측정 결과



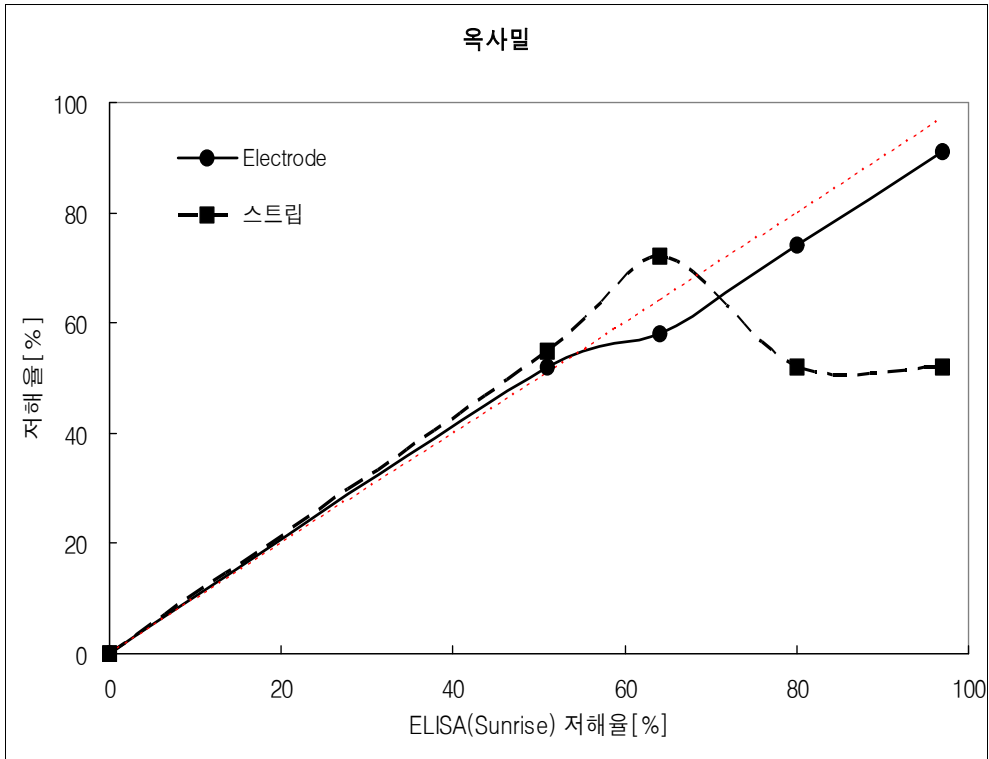
[그림 4-89] 포스메트의 스트립 비교 측정 결과



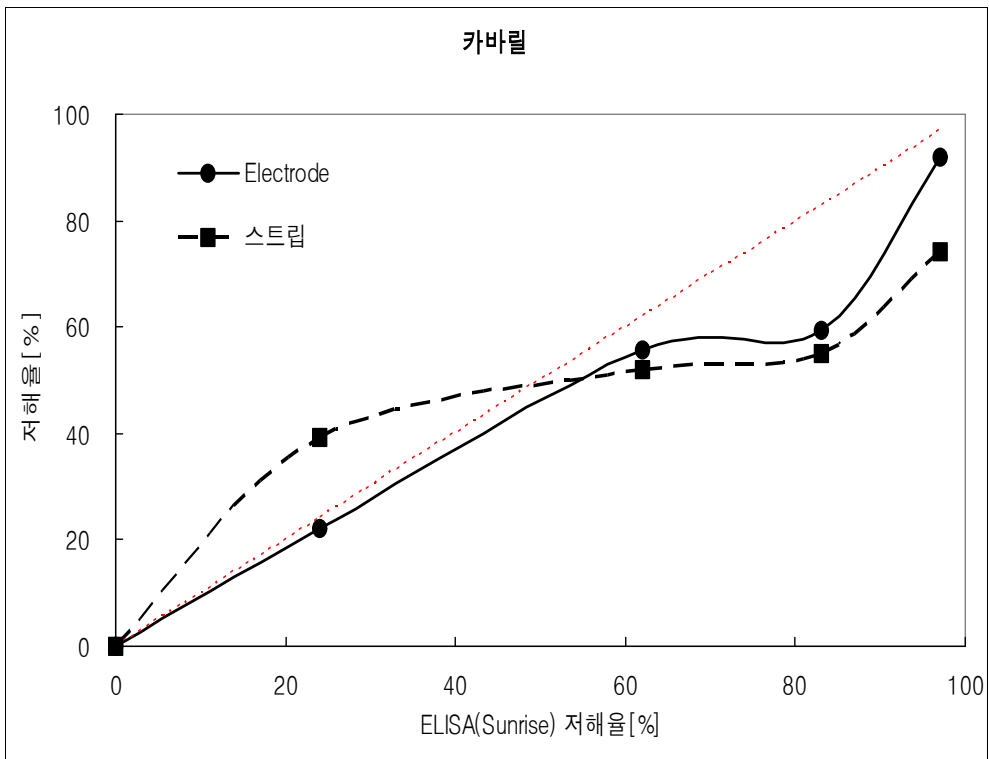
[그림 4-90] 피리미포스메칠의 스트립 비교 측정 결과



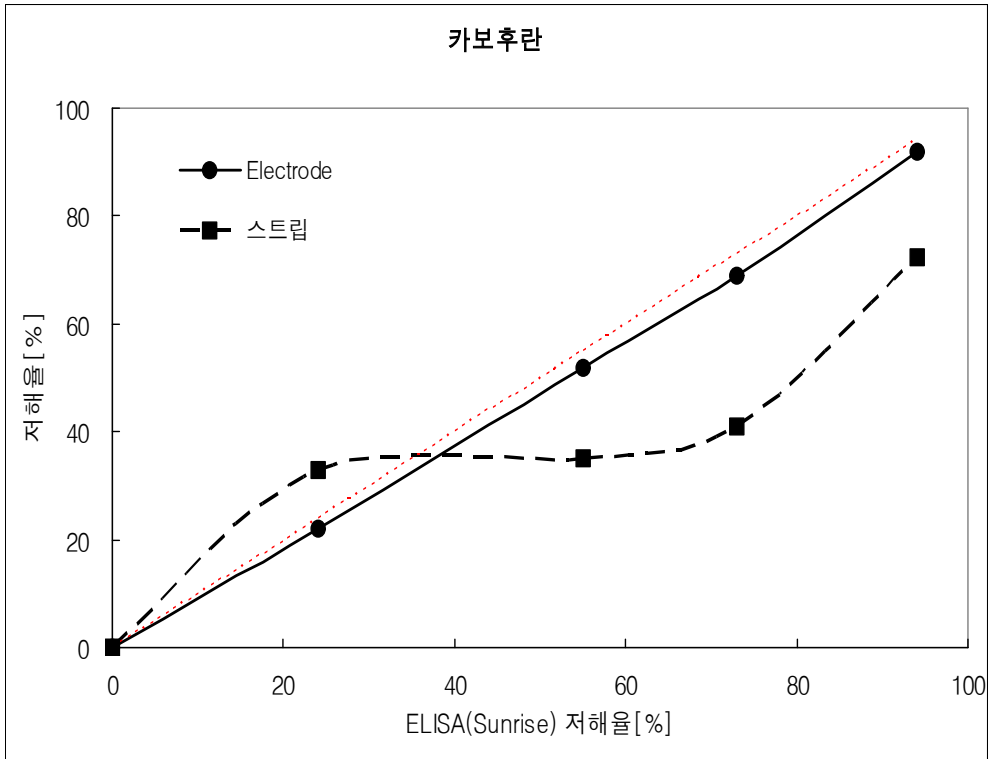
[그림 4-91] 클로로피리포스메칠의 스트립 비교 측정 결과



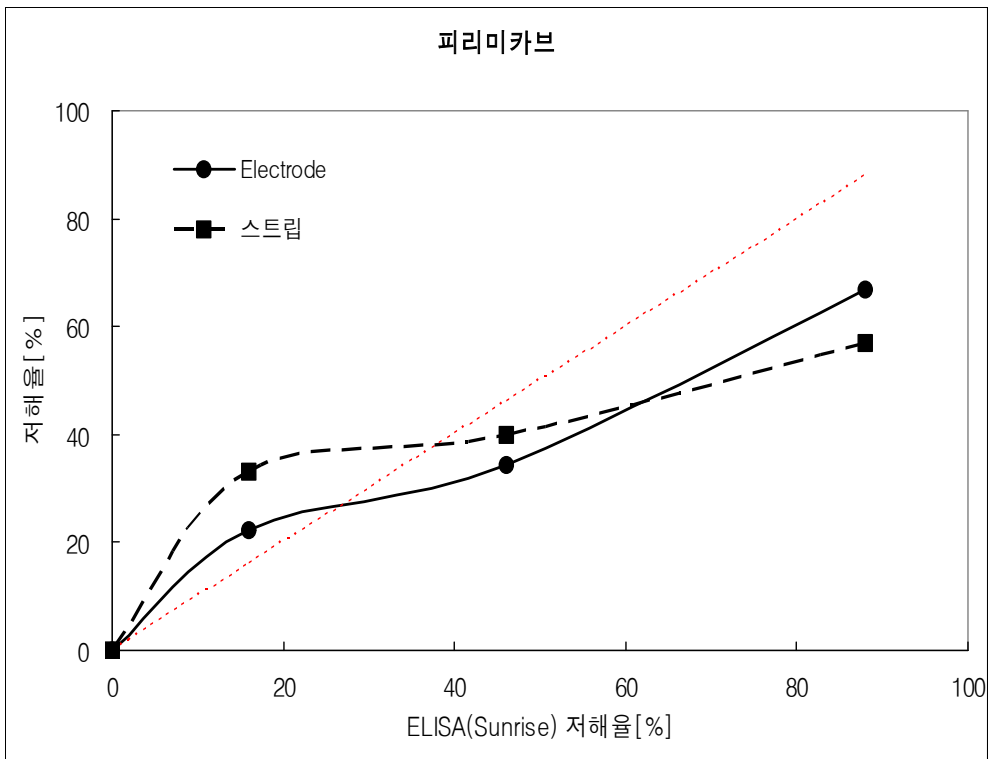
[그림 4-92] 옥사밀의 스트립 비교 측정 결과



[그림 4-93] 카바릴의 스트립 비교 측정 결과



[그림 4-94] 카보후란의 스트립 비교 측정 결과



[그림 4-95] 피리미카브의 스트립 비교 측정 결과

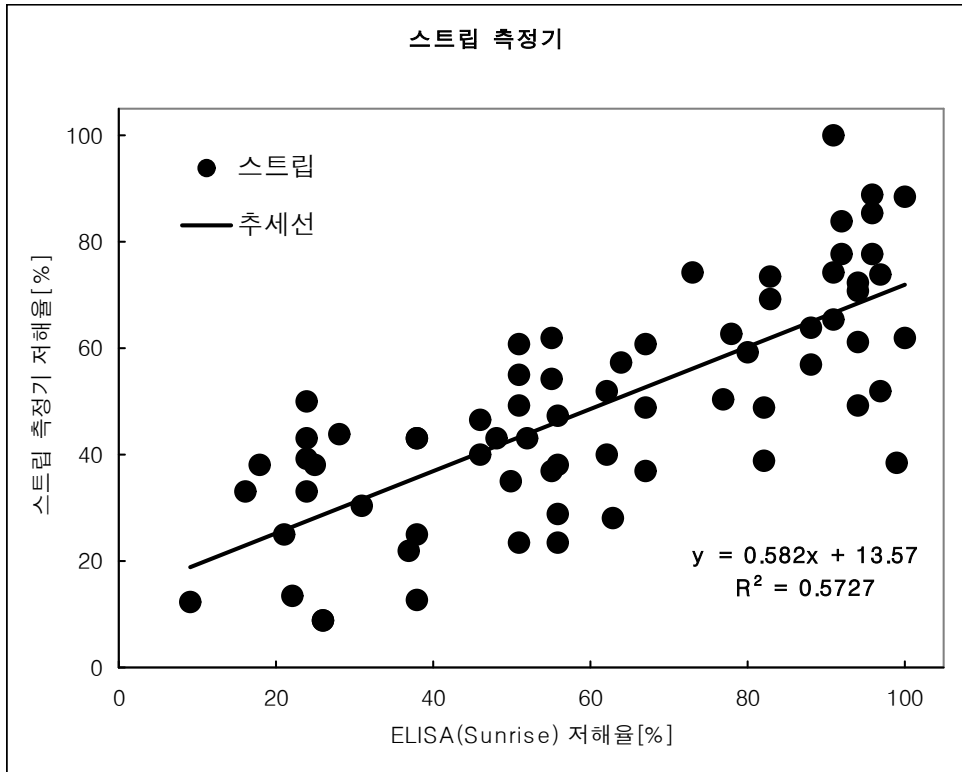
경우 선형성이 뛰어나다. 그림 4-94은 카보후란의 측정결과로, 20개의 결과 중 선형성과 민감도, ELISA 측정결과와의 근접성이 가장 뛰어나며, 스트립 측정 결과에 비하여 우수하다. 피리미카브(그림 4-95)의 측정결과는 바이오 전극에 비해 스트립의 측정 결과가 우수하다. 그림 4-76에서 그림 4-95중, 카바릴(그림 4-93)과 카보후란(그림 4-94), 피리미카브(그림 4-95)는 카바메이트계 농약이며, 나머지는 유기인계 농약이다.

이상의 결과에서 1ppm 이상의 고농도 농약에서 ELISA 저해율이 50% 미만의 저해율을 갖는 농약은 8종류로, 디토메이트, 에토프로포스, 페니트로치온, 펜치온, 말라치온, 파라치온, 카바릴, 피리미카브 이다. 이 농약들은 효소를 사용하여 잔류 농약을 측정하는 경우 검출이 잘 되지 않는 농약들이다. 저농도에서 반응성이 떨어지는 농약들의 바이오 전극과 스트립의 측정 결과를 비교한 것이 표 4-4이다. 피리미카브 결과를 제외한 7종의 농약에서는 바이오 전극을 이용한 측정의 경우가 선형성 및 민감도에서 우수하다. 이 중에 말라치온과 파라치온의 경우 스트립의 저해율이 각각 45% , 21% 이하임에 반해, 바이오 전극의 저해율은 ELISA 저해율과 같이 반응하였다.

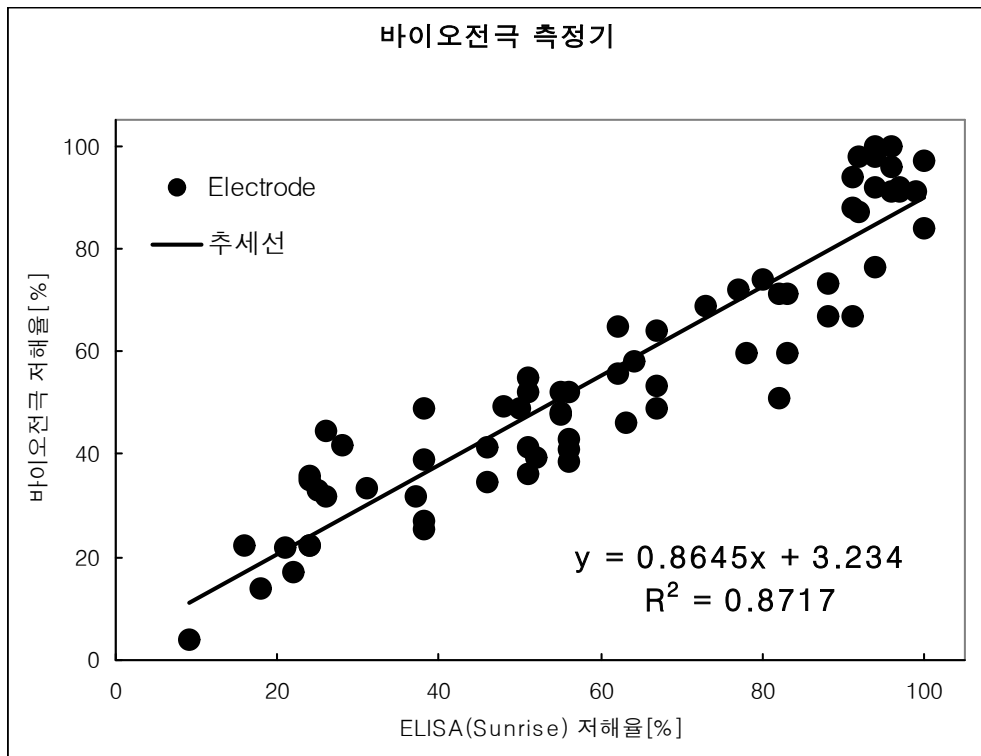
농약	바이오 전극과 스트립의 비교
디토메이트	바이오 전극의 선형성 및 민감도가 비교 우위
에토프로포스	바이오 전극의 선형성 및 민감도가 비교 우위
페니트로치온	바이오 전극의 선형성 및 민감도가 우수
펜치온	바이오 전극의 선형성 및 민감도가 우수
말라치온	<b>바이오 전극의 선형성 및 민감도가 매우 우수</b>
파라치온	<b>바이오 전극의 선형성 및 민감도가 매우 우수</b>
카바릴	바이오 전극의 선형성 및 민감도가 비교 우위
피리미 카브	스트립의 선형성 및 민감도가 비교 우위

[표 4-4] 농약의 농도가 1ppm 이상에서 저해율이 50% 미만인 농약의 측정 결과 비교





[그림 4-96] 스트립 측정기를 이용한 표준 농약 측정 결과



[그림 4-97] 바이오전극을 이용한 표준 농약 측정 결과

또한 20개의 농약에 대해 ELISA 측정 결과에 대한 스트립의 측정 결과와 바이오 전극 측정 결과의 분포를 조사한 그래프가 그림 4-96과 그림 4-97 이다. 농약에 반응의 선형성 및 민감도를 알아 보기위하여 측정 결과의 분포를 조사한 하여, 1차 근사 함수(일차 회기분석)를 구하여 그래프 상에 실선(추세선)으로 표시하였다. 스트립의 경우 1차 근사 함수는 각각

$$\text{스트립} \quad : \quad y = 0.582x + 13.57 \quad \text{식(1)}$$

$$\text{바이오 전극} \quad : \quad y = 0.865x + 3.23$$

이다. 스트립의 측정 기울기는 0.582 임에 반해 바이오 전극의 측정 기울기는 0.8717로 바이오 전극의 측정 기울기가 월등히 크다. 여기서 기울기는 농약의 농도에 따라 반응하는 민감도에 해당하므로, 바이오 전극의 민감도가 스트립에 비하여 월등 함을 알 수 있다. 그리고 우변의 둘째 항의 경우 스트립이 13.57 임에 반해 바이오 전극은 3.23 으로 매우 작다. 이는 농약이 없는 경우 측정에 대한 저해율 값으로 생각 할 수 있으므로, 바이오 전극이 스트립에 비해 0% 에 근접에 값을 갖는다. 측정의 신뢰성을 나타내는 결정계수  $R^2$  은 스트립의 경우 약 0.57 임에 반해 바이오 전극의 경우 0.87로 상대적으로 높다. 이는 바이오 전극의 신뢰성이 스트립의 신뢰성에 비해 월등히 높음을 보여주는 것이다. 또한 표준 편차를 비교해 보면 그림 4-96 와 그림 4-97에서 보는 것과 같이 연구된 바이오 전극이 상대적으로 매우 적어 재현성 면에서 매우 우수함을 볼 수 있다.

또한 분광 광도계를 사용한 측정에서 잔류 농약 검출 여부를 판정하는 저해율이 50% 임을 감안 한다면, 바이오 전극의 경우 식(1)에 의해 43.2 % 에 해당하므로, 바이오 전극에서 잔류 농약 검출의 판정 기준을 50% 로 정하였다.

이상의 결과를 종합하여 보면, 본 연구에서 개발 된 바이오 전극은 현재 사용되어지는 잔류 농약의 속성 검사용 스트립 측정기를 대체 할 수 있을 뿐 아니라, 민감도와 신뢰도가 높은 측정 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

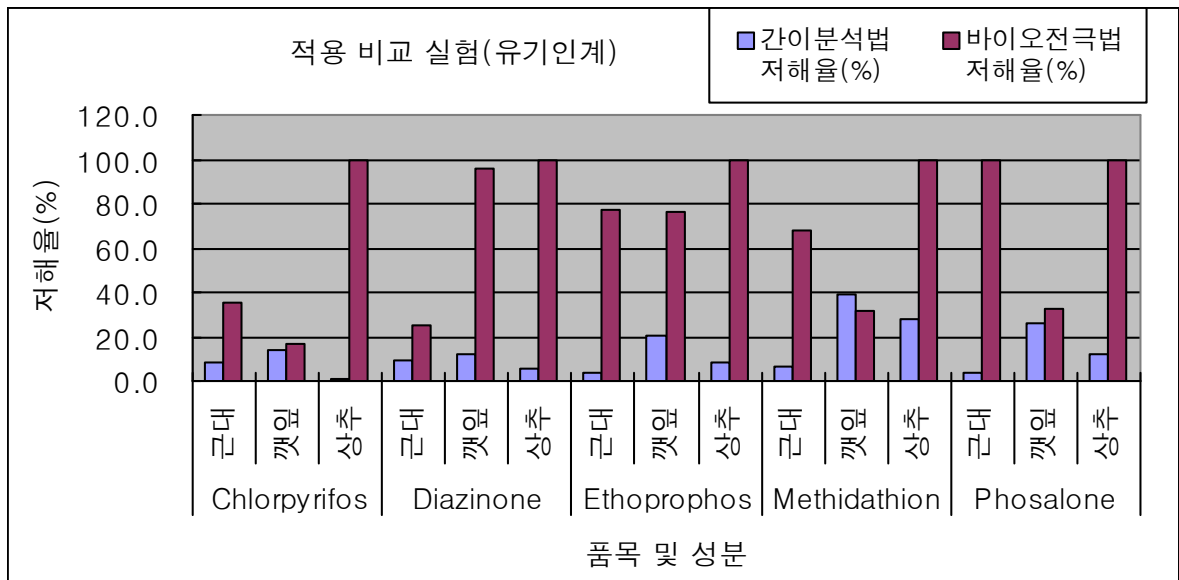
표 4-5 는 농산물품질관리원 시험연구소(농관원)에서 실시한 실제 농산물(근대, 깻잎, 상추)에 해당 농약을 살포 후(약 2시간) 표면의 물기가 제거되면 세절 후 측정한 실험의 방법을 비교한 것이다. 분광광도계 법과 바이오 전극법의 실험 과정을 비교하면, 간단한 편칭 기구를 사용하여 시료를 칭량함으로, 정확도 면에서는 떨어질 수 있으나, 저울 등의

단계별	농관원 간이분석법(분광광도계)	바이오 전극법
시료조제	시료를 3 mm정도 세절 또는 편칭	시료 4장을 겹쳐 9번 편칭
칭량	시험관에 1 g 칭량	시료구에는 편칭한 시료 모두 칭량, no sample구에는 칭량하지 않음
추출액 조제	메탄올 2 mL로 추출	메탄올 1 mL 첨가
	브롬수 40 uL 가함(후드필수)	bromosuccinamide 40ul(후두 불필요)
	voltex 후 2분 방치	37℃에서 2분간 반응시킴
	-	인산완충용액 3 mL 첨가
	새 시험관에 옮김	새 시험관에 옮김
기기 예열	항온수조, 분광광도계 예열 및 시험관(Blank, Control, 시료구) 준비	좌동
	Blank, Control 및 시료구 시험관에 인산완충액 5mL와 효소용액 100 uL를 가함	no sample 및 시료구 시험관에 추출액 500 uL 가한 후 효소 40 uL를 가함
	Blank 시험관에는 반응정지액 100 uL를 Control 시험구에는 Methanol 100 uL를 시료구 시험관에는 추출액 100 uL를 가함	
	voltex 후 37 ℃, 5분 반응(항온수조)	좌동
	기질액 100 uL 가함	기질액 40 uL 가함
	voltex 후 37 ℃, 10분 반응(항온수조)	voltex 후 37 ℃, 3분 반응(항온수조)
	반응정지액 100 uL 가함	불필요
	voltex 후 37℃, 2분 반응(항온수조)	불필요
	발색시약 100 uL 주입 후 voltex후 즉시 기기 분석	불필요
기기분석	기기 : 분광광도계 파장 : 412 nm	-
	Blank, Control 구 측정 : Base line 시료구 측정	시료액 500 uL를 electrode에 떨어뜨린 후 기기분석
저해율 계산	저해율(%) =(Control구 흡광도-시료구 흡광도)/(Control구 흡광도 * 100	저해율계산 * 참여업체의 요청으로 비공개함.

[표 4-5] 농관원에서 실시한 측정 방법

연번	농약성분 명	품목	잔류농도 (정밀법) (mg/kg, GC/NPD)	농관원 간이분석법 (분광광도계)			제주대 (바이오전극법)			
				대조구	흡광도	저해율(%)	대조구	시료	시료/대조구	저해율(%)
1	Chlorpyrifos	근대	0.5	2.429	2.233	8.1	2093	1768	0.845	35
2	Chlorpyrifos	깻잎	0.5	2.429	2.083	14.2	972	899	0.925	17
3	Chlorpyrifos	상추	0.4	2.429	2.402	1.1	3797	1757	0.463	100
4	Diazinone	근대	0.3	2.429	2.201	9.4	2093	1861	0.889	25
5	Diazinone	깻잎	0.8	2.429	2.137	12.0	972	550	0.566	96
6	Diazinone	상추	0.3	2.429	2.293	5.6	3797	1850	0.487	100
7	Ethoprophos	근대	0.1	2.429	2.344	3.5	2093	1365	0.652	77
8	Ethoprophos	깻잎	0.5	2.429	1.942	20.0	972	638	0.656	76
9	Ethoprophos	상추	0.3	2.429	2.22	8.6	3797	1354	0.357	100
10	Methidathion	근대	0.3	2.429	2.274	6.4	2093	1451	0.693	68
11	Methidathion	깻잎	0.6	2.429	1.484	38.9	972	834	0.858	32
12	Methidathion	상추	0.3	2.429	1.746	28.1	3797	1440	0.379	100
13	Phosalone	근대	0.3	2.429	2.337	3.8	2093	1072	0.512	100
14	Phosalone	깻잎	0.5	2.429	1.799	25.9	972	829	0.853	33
15	Phosalone	상추	0.8	2.429	2.139	11.9	3797	2082	0.548	100

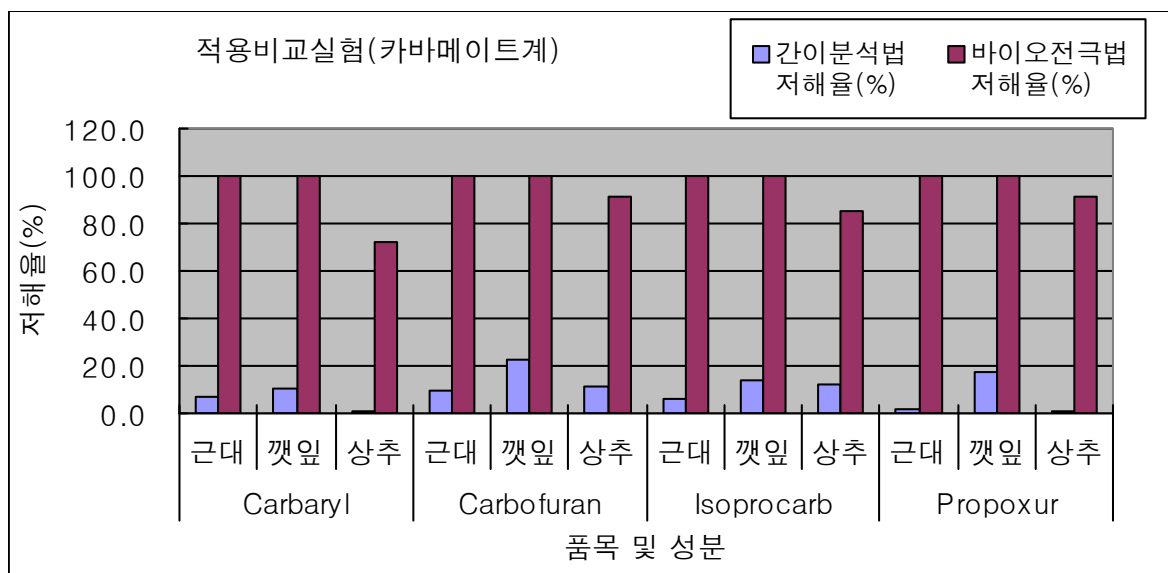
[표 4-6] 농관원에서 실시한 유기인계 잔류농약 측정 결과



[그림 4-98] 농관원에서 실시한 유기인계 잔류농약 측정 결과

연번	농약성분 명	품목	잔류농도 (정밀법) (mg/kg, LC/FLD)	농관원 간이분석법 (분광광도계)			제주대 (바이오전극법)			
				대조구	흡광도	저해율(%)	대조구	시료	시료/대조구	저해율(%)
1	Carbaryl	근대	0.08	2.933	2.721	7.2	6048	2088	0.345	100
2	Carbaryl	깻잎	0.18	2.789	2.5	10.4	6048	2266	0.375	100
3	Carbaryl	상추	0.27	2.933	2.897	1.2	6048	4101	0.678	72
4	Carbofuran	근대	0.03	2.948	2.658	9.8	7399	3305	0.447	100
5	Carbofuran	깻잎	0.12	2.948	2.294	22.2	7399	3220	0.435	100
6	Carbofuran	상추	0.05	2.789	2.47	11.4	7399	4357	0.589	91
7	Isoprocarb	근대	0.02	3.163	2.968	6.2	5093	1734	0.340	100
8	Isoprocarb	깻잎	0.12	3.163	2.726	13.8	5093	2067	0.406	100
9	Isoprocarb	상추	0.03	2.789	2.458	11.9	5093	3147	0.618	85
10	Propoxur	근대	0.03	2.948	2.895	1.8	6120	2091	0.342	100
11	Propoxur	깻잎	0.11	3.158	2.613	17.3	6120	1427	0.233	100
12	Propoxur	상추	0.04	2.789	2.76	1.0	6120	3626	0.592	91

[표 4-7] 농관원에서 실시한 카바메이트계 잔류농약 측정 결과



[그림 4-99] 농관원에서 실시한 카바메이트계 잔류농약 측정 결과

기구가 필요 없을 뿐 아니라, 브롬수 대신 bromosuccinamide를 사용하므로, 후드가 필요 없으므로 현장적용이 가능한 속성검사에 보다 적합하다 볼 수 있다. 기질의 반응시간이 분광법의 경우 10분임에 반해 바이오 전극의 경우 3분이고, 반응정지액 및 발색시약을 사용하지 않으므로 보다 간편하게 실험 할 수 있을 뿐 아니라 측정시간이 단축되어 빠른 시간 내에 간편하게 측정 할 수 있다.

표 4-6과 표 4-7은 각각 유기인계 농약과 카바메이트계 잔류농약의 측정 결과이며, 그림 4-98와 그림 4-99가 각각의 표에 대한 그래프이다. 위의 결과에서 잔류농도(정밀법)는 정량 분석 법으로 측정한 농약의 잔류 농도이다. 정량법으로 측정된 농약의 농도는 일반적으로 허용 기준치 이상의 농도로 속성 분석법으로 측정하였을 경우 정밀 분석을 요구하는 이상의 농도에 해당된다.

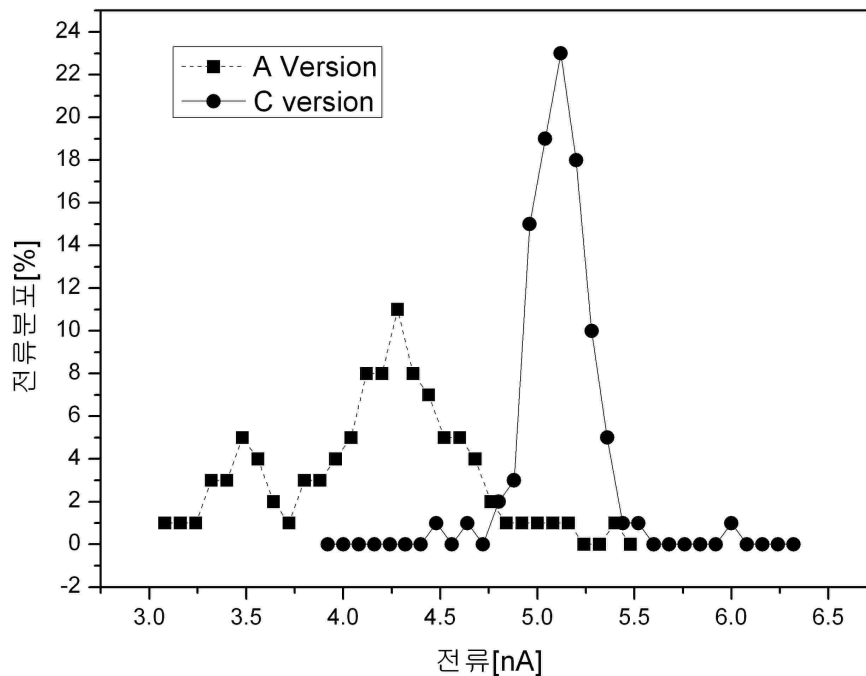
기존의 분광법으로 측정 하였을 때 메치다치온(유기인계)의 경우 약 30%의 저해율로 정밀 분석을 의뢰하는 수치(간이 분석법의 경우 일반적으로 30% 이상에서 재측정 및 정량법 측정을 의뢰함)에 해당하고, 나머지의 경우 대부분 20% 저해율 내외로 측정되었다. 이에 반해 본 연구에서 개발된 바이오 전극의 경우 클로르피리포스(유기인계)에서 근대와 깻잎, 다이아지논(유기인계)에서 근대, 메치다 치온에서 깻잎 포살톤(유기인계)에서 깻잎을 제외한 나머지 모두에서 40% 이상의 저해율로 측정되었다 (바이오 전극의 경우 식(1)에 의해 40% 이상에서 재측정 및 정량법 측정을 의뢰함). 또한 카바마이트계의 경우 모든 농약에서 40% 이상의 결과를 보여, 바이오 전극에서 역시 일반적으로 효소법을 사용한 측정에서와 마찬가지로 실제 농작물에 적용하는 경우 농약의 추출과정에서 유기인계 농약에 비해 카바마이트계 농약의 경우가 추출이 잘되는 현상과 일치함을 알 수 있었다.

그러나 표 4-6과 표 4-7에서 살펴보면, 농약의 해당 농도에 비해 더 높은 저해율을 보이고 있다. 첫 번째 이유는 농작물의 추출로 인한 농작물 성분의 간섭으로 일어난 현상으로 생각되며, 두 번째 이유는 농작물 추출과정에서 배재되어, 매탄올 및 bromosuccinamide 등의 효소 저해를 받지 않으므로, 상대적으로 대조군이 높은 값을 얻은 것으로 예상된다.

이상의 결과로부터 본 연구에서 개발된 바이오 전극과 그 측정기가 기존의 간이 분석법에 비해 민감도가 높은 현장용 속성 측정기임을 확인 할 수 있었다. 또한 보다 정확한 농도 및 저해율을 바이오 전극을 이용하여 측정하기 위해서는 실제 농작물에 대한 정량분석과의 많은 비교 측정결과를 통해 기준치에 대한 저해율 분석 알고리즘을 확립해야 될 것으로 보인다.

## 2. 바이오 전극의 재현성 측정

본 연구에서 개발된 바이오 전극의 재현성 측정을 위하여 전류의 세기를 측정 후 전류 세기에 따른 바이오 전극의 개수를 백분율로 표시하여 그림 4-100에 도시하였다. 그림 4-100은 A version 바이오 전극(점선)과 C version 바이오 전극(실선)에 농약을 포함하고 있지 않은 추출액과 기질을 사용하였으며, 상기 1절에서의 실험과 동일한 조건으로 실험되었다. A version의 경우 3.4 nA 와 4.2 nA 두 영역에서 전류값을 갖으며, 이는 기생 산화에 기인한 것이고, C version의 경우 4.8 nA 에서 5.4 nA 사이에 대부분이 분포한다. 즉 C version의 경우 동박에 의한 기생 산화를 억제하고, 절연체를 사용하여 인쇄오류를 최소화하고, 작동전극의 크기를 증가시켜 신호 대 잡음비를 개선하였다. 또한 상용화를 위한 C version의 경우 생산된 전체 바이오 전극 중 3% 를 제외하고 전부  $5.1 \pm 0.4$  nA 으로 상용화에 충분한 정확도를 갖고 있음을 확인 할 수 있었다. 또한 C version의 경우 생산된 전체 바이오 전극은 3개월 단위 3회에 걸쳐 생산된 각각 30%, 30%, 40% 비율로 측정된 것으로 바이오 전극 제작시기에 따른 재현성 역시 월등함을 알 수 있다.



[그림 4-100] 효소반응 재현성 결과(ATChE = 450 unit/mg )

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 평가 착안점, 척도 및 달성도

구분	평가의 착안점 및 기준		
	착안사항	척도(점수)	달성도(점수)
1차년도 (2006)	• 바이오전극의 개발여부 및 가능성	30	30
	• 수작업용으로 제작 여부	15	15
	• 효소의 민감도의 기존 대만제품 보다 우수성	30	30
	• 농약 검사 결과 및 점수	25	25
	계		100
2차년도 (2007)	• B version용 바이오전극 기기의 잔류농약 속성검사 가능성	40	40
	• 초저잡음 전류 측정기술(3차년 계속)	10	10
	• 효소의 민감도 및 부착시 동일한 민감도 유지 여부	20	15
	• 표준시료의 바이오전극 적용 여부	5	5
	• 오차분석 및 민감도 문제점 제시	25	25
	계		95
3차년도 (2008)	• 사용자 중심의 기기설계 및 작동	35	35
	• 참여기업 이용 가능성 확인	15	15
	• 효소의 대량생산 기술, 바이오전극 사용시 문제점 해결	15	15
	• 특허 출원을 위한 AChE DNA 서열 분석	15	15
	• 오차분석 결과	15	15
	• 개선방안 제시	5	5
	계		100
최종 평가	• 대량 생산 system의 구축(회사)	50	50
	• 기술료 납부 여부	50	50
	계		100



## 제 2 절 제1세부 : 바이오 전극 개발

### 1. 바이오 전극 개발

잔류 농약 속성 검사를 위해 기존 분광법에 의한 측정 어려움을 해결하기 위하여 바이오전극을 개발 하였다. 바이오 전극은 기준 전극, 보상 전극 및 작동 전극으로 구성 되었으며, 잔류 농약을 측정하기 위하여 두가 형태의 작동 전극을 실험 하였다. 즉 잔류 농약에 따라 과산화수소양을 측정하는 과산화수소 측정 센서와 잔류 농약 양에 비례해서 발생하는 전하량을 측정하는 전류 센서에 대하여 연구 하였다. 실험 결과 전하량을 측정 하는 방식이 유용하여 본 연구는 전류량을 측정하는 센서 연구에 집중 하였다. 잔류 농약에 비례해서 전하량을 발생시키기 위하여 작동 전극을 CoPh 와 유기탄소화합물을 이용하여 제작하였다. 그리고 기생산화 방식을 위하여 절연물을 전극에 코팅하였다. 개발된 전극을 이용하여 표준 농약을 측정 한 결과 감도 및 재현성 면에서 기존의 스트립 방법에 비하여 매우 우수 하였으며, 측정 시간과 사용 방법 면에서도 우수 하였다.

### 2. 초저잡음 전류 측정기술 개발

바이오 전극에서 발생하는 전하량은 매우 미미하다. 신호의 크기가 작으면 신호 대 잡음비가 나빠져 측정기로서의 가치가 없어진다. 이를 해결하기 위하여 바이오 센서의 작동 전극을 최적화 하여 신호의 세기를 크게 하였으며, 신호 대 잡음비 향상을 위하여 신호 증폭 회로를 구성 하였다. 그 결과 매우 미세한 전류를 측정 할 수 있는 회로를 구성할 수 있었으며, 이 회로를 이용하여 바이오 전극 신호를 잘 측정 할 수 있었다.

### 3. 시제품 개발

연구된 바이오 전극과 측정 기술을 이용하여 시제품을 구성 하였다. 시제품의 사용을 편리하게 하기 위하여 시제품의 작동 소프트웨어를 개발 하였다. 측정 소프트웨어는 단순히 사용자

가 측정 버튼만 누르면 잔류 농약 정도를 화면에서 확인 할 수 있게 구성 하였다.

#### 4. 반응시간의 규격화

반응 시간의 경우 크게 농약의 추출시간, 추출된 농약과 효소의 반응시간, 농약에 반응한 효소와 기질의 반응시간, 효소와 기질이 반응한 수용액이 전극과 반응하는 시간을 필요로 한다.

항목	분광법	스트립	바이오 전극
농약 추출시간	2 분	2분	2분
농약 · 효소 반응시간	10 분	10분	5분
효소 · 기질의 반응시간	10 분 (발색시약동시반응)	3분 (발색시약동시반응)	3분 (발색시약 불필요)
반응정지시간	2분	30초	불필요
측정시간	1 분	1분	1분 30초
<b>총 측정 시간</b>	<b>25 분</b>	<b>16 분 30초</b>	<b>11 분 30초</b>

분광법과 스트립 측정법, 바이오전극의 측정시간은 위의 표와 같다. 효소와 기질이 반응하는 시간이 짧은 경우 생성되는 ThioCholine의 양이 적으므로 측정이 힘들며, 반응시간이 긴 경우는 ThioCholine 농도차가 상대적으로 작아지므로 민감도에 영향을 미친다. 본 연구 결과 3분의 반응시간이 적절함을 알 수 있었다. 위의 표와 같이 잔류 농약 속성 검사 3가지의 방법 중 바이오 전극의 반응시간이 다른 방법에 비하여 5~10 분 이상 검사 시간을 줄일 수 있다.

#### 5. 검사법의 간편성

고가기구의 도움 없이 간단한 조작으로 측정이 가능하고 브롬수 대체효과로 후드가 없어도 되며 간단한 추출용기만 있으면 현장에서 간편히 사용가능.

#### 6. 진단의 한계 및 사용 농약의 검출능력

농림부가 고시한 유기인계 및 카바메이트계 농약의 종류별 한계허용용량(AChE의 50% 저해율로 계산한 경우)을 20개의 농약에 대하여 측정한 결과 저해율이  $55.0 \pm 8.5$  % 로 측정되었고, 일차회기분석의 결과  $y = 0.8645x + 3.234$ ( $R^2 = 0.8717$ ) 로부터 바이오 전극에서 잔류 농약 검출의 판정 기준을 40% 로 정하였다. 이러한 측정 결과로부터 본 연구에서 개발된 바이오 전극은 현재 사용되어지는 잔류 농약의 검사용 스트립 측정기를 대체 할 수 있을 뿐 아니라 민감도와 신뢰도가 높은 측정 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

## 7. 기존의 방법과 바이오 전극 진단 결과의 정밀도

기존의 습식 검정 방법에 비하여 모든 농약에 대하여 같거나 민감한 검정능력을 나타냄 때 우 만족스러운 결과를 보임.

## 제 3 절 제2세부 : 바이오 전극용 효소 개발

### 1. 바이오 전극용 효소 생산 시도 및 정제기술 개발

센서를 위한 효소의 정제정도를 알아보기 위한 여러 실험에서는 현탁액이나 미디어를 이용해서는 제작이 불가능하나 반면 완전한 단일성분의 순도를 지향할 필요도 없음을 알아내 단가와 공정을 단축시킬 수 있었다. (회사의 요구에 의하여 자세한 공정을 소개 하지 못함을 이해해주시기바람)

### 2. 바이오 전극용 효소 고정기술 개발

효소를 고정시키는 고정제와의 반응 때문에 여러 종류의 후보 membrane을 실험하여 X1213과 반응하지 않고 건조 후 변형이 없으며 센서에 잘 부착할 수 있는 membrane을 선택하여 개발의 발판을 마련함. 이 발견은 후속 연구에도 많은 도움을 줄 것으로 보인다. 많은 검사기는 항체를 이용하는데 이 경우는 많은 어려움이 없으나 효소와 같은 단백질을 이용하는 경우는 고정과정에 변성과 같은 많은 어려움이 따른다. 적절한 고정제와 membrane의 선택은 효소를 이용한 센서개발에 많은 도움을 줄 것임.

### 3. 바이오 전극용 효소 효율 비교

기존의 습식 검정 방법에 비하여 모든 농약에 대하여 같거나 민감한 검정능력을 나타냄 매우 만족스러운 결과를 보임.

### 4. 바이오 전극용 효소 생산 제반 기술 참여기업 기술 이전

다량의 센서제작을 위하여 고농도의 정제된 AChE가 다량으로 필요하다. 이를 충족시키기 위한 연구가 성공적으로 진행되었다. 곤충세포를 이용한 대량배양 시스템의 구축과 개량을 거듭하여 수율을 10배 이상 증가시키고 단가는 절감시키는 효과를 가져왔다. 한편 여러 정제법을 이용하여 실험한 결과 순도와 원가가 적절한 방법을 고안하여냄으로 센서의 대량생산에 필요한 효소의 수급에는 지장을 주지 않을 것으로 보인다.

곤충세포를 이용한 유전자 조작 단백질의 대량생산은 공업적으로 매우 중요한 기술로 바이오산업분야에서 많이 적용되고 있으나 현실적으로 국내의 많은 업체들은 시스템을 도입하고자 하나 현실적인 대량생산에 많은 문제점을 앓고 있는 것으로 알려지고 있다. 이러한 기술을 본 연구를 통하여 안정적으로 확립한 것은 매우 우수한 성과로 사료된다.

## 제 4 절 협동 : 바이오 전극 및 스트립 민감도 비교

### 1. 시제품을 이용한 잔류 농약에 대한 민감도 조사

시제품을 이용하여 기존의 분광법을 비교하여 실험 하였다. 실험 결과 기존의 스트립 방법에 비하여 재현성 및 감도 면에서 매우 우수한 것으로 판명 되었다. 특히 잔류 농약 측정 시 센서의 재현성은 매우 중요한데, 기존의 간이 측정법인 스트립 방법에 비하여 재현성면에서 매우 우수 하였다. 그리고 기존의 효소를 이용한 잔류 농약 측정이 어려운 농약에 대해서는 바이오 전극에서 역시 고농도의 농약에서만 측정이 되었으나, 스트립형 간이 측정법에 비하여 선형성, 민감도 및 재현성이 우수 하였다. 또한 품관원에서 실시한 실제 농작물에 대한 실험결과에서 역시 바이오 전극 측정법이 기존의 간이 분석법에 비해 민감도가 높은 현장용 측정법임을 확인 할 수 있었다. 또한 보다 정확한 잔유 농약 농도 및 저해율을 바이오 전극을 이용하여 측정하기 위해서는 실제 농작물에 대한 정량분석 데이터와 비교하여 저해율 분석 알고리즘을 확립해야 될 것으로 보인다.

## 제 5 절 연구개발 성과의 활용 계획

- 본 과제는 산업체와 공동으로 특허를 출원하여 지적재산권을 획득하며, 기술개발 진행도에 따라 실시간으로 산업체에 기술을 이전하여 ‘잔류농약 간이 속성 검사기’의 개발에 기여하며, 개발 완료 즉시 상품화하여 국내에 공급하고, 수출을 위한 설명회를 가질 예정임.
- **현장보급 방안:** 본 기술은 국내에서 농협, 작목반, 농산물 유통센터, 학교 급식소 등이며, 국외는 전문 수출입업자를 통하여 공급할 계획임.
- **기술이전 및 산업화계획 방안:** 연구 종료와 산업화가 동시에 완료될 수 있도록 할 예정임

### 가. 국내영업

국내영업을 위한 사전 조사결과 잔류농약 간이분석 사용처는 기존에 대만에서 효소를 수입하여 잔류농약을 분석하고 있는 농산물 유통센터와 작목반을 위주로 진입할 계획이다.

표. 잔류농약 분석 소요처

구 분		숫 자	비 고
도매시장법인		59	가락동 도매시장 등 대형 도매시장에서 사용중
농협		1,380	일부 농협 잔류농약 진단사업을 수행중
농산물품질관리원		80	친환경 농산물 품질인증 사전 진단용으로 사용중
농업기술센터		157	매년 지도사를 대상으로 잔류농약 간이속성 검사를 통해 진단물량을 확대시키고 있음
백화점, 대형수퍼마켓, 할인점		다수	차후 확대될 수 있는 시장임
친 환경품 질인증 농가		26,474	국립농산물품질관리원에서 2000년도에 31,056 농가의 잔류농약 속성검사를 시행하였으며, 대부분의 농가가 자체에서 진단을 시행하고자 함
작 목 반	식량작물	4,041	차후 확대될 수 있는 시장임.
	과수	5,196	현재 가격차별화의 필요성에 의해 확대되고 있음
	채소	8,545	현재 가격차별화의 필요성에 의해 확대되고 있음
	특작 등	1,706	현재 가격차별화의 필요성에 의해 확대되고 있음
	총반원수	518,000	

## 나. 농산물품질관리원과의 후속 기술 협의

특히 본 연구의 결과로 얻어진 효소와 센서 및 측정기에 대한 농산물품질관리원에서 50개 농약에 대해 대만 효소와 본 기술의 효소로 실험한 결과를 의뢰하고 추후 농산물품질관리원과 공동으로 후속 기술의 상용화를 논의할 계획이다.

## 나. 수출

현재 수출은 중국 및 일본을 대상으로 추진하고 있으며, 우선 잔류농약분석기를 수출하는 회사와 연결하여 시장에 진입할 계획이며, 이와는 별도로 수출은 자체적인 기술진과 영업진에 의해 이루어지는 것보다 협력회사를 통해 추진할 계획이다.

- **추가기술개발 방안:** 국내에 공급과 동시에 외국에 제품설명회를 갖고 수출을 준비할 예정인데, 이 때 필요한 기술개발은 참여회사의 지원 연구비 또는 기술료로 진행시킬 예정임



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1. AChE 효소 개발 분야

- 포유류 또는 곤충류에서 acetylcholinesterase를 추출하는 방법은 오래 전부터 많은 연구자들에 의해 보고된 것으로 특별한 실험 테크닉을 필요로 하지 않는 방법임(Adamson 등, 1975; Devonshire, 1975; Kumar 등 1973; McIntosh와 Plummer 1973; Sussman 등, 1988; Ngo와 Laidler, 1975). 그러나 추출원의 농약에 대한 저항성이 있을 경우에는 추출원으로 사용할 수 없기 때문에 추출 기술보다 추출 곤충의 선택이 더 중요함.
- 대만 TARI에서 집파리에서 직접 추출한 AChE는 기업화되어 동남아시아 시장에서 사용하고 있으며, 국내에서도 수입하여 사용하고 있음
- 미국 Envirologix사에서는 호주 CSIRO에서 AChE를 유전자 변형으로 생산하는 방법을 라이선싱 받아 생산하고 있으나 고가이어서 미국 시장에서만 사용되고 있음

### 2. AChE 바이오전극 개발 분야

- 2004년부터 인체 내의 잔류농약을 혈액에서 직접 바이오전극으로 측정할 수 있는 이론이 제시되었으며, 2006년도 인터넷 판에 실용화 가능성을 제시하였음. 아직 농업용으로 사용은 시도되지 않음.

## 제 7 장   참고문헌

1. Coulet, P. R. In: Biosensor principles and applications, Blum, L. J.; Coulet, P. R. Eds., Marcel Dekker, Inc., New York, 1991; pp 1-6.
2. Marco, M. -P.; Barceló, D. *Meas. Sci. Technol.* 1996, 7, 1547-1562.
3. Berson, S. A.; Yalow, R. S. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1959, 82, 338-344.
4. Engvall, E.; Perlmann, P. *Immunochemistry* 1971, 8, 871-874.
5. Van Weemen, B. K.; Schuurs, H. H. W. M. *FEBBS Lett.* 1971, 15, 232-236.
6. Hammock, B. D.; Mumma, R. O. In: Pesticide Analytical Methodology, Harvey, J.; Zweig, G.; Eds., ACS Symp. Series, Washington, DC, 1980; Vol. 136, pp 321-352.
7. Nelson, J. O.; Karu, A. E.; Wong; R. B. In: Immunoanalysis of Agrochemicals, Emerging Technologies, ACS Symp. Series, ACS, Washington DC, 1995, Vol. 586.
8. Marco, M. P.; Gee, S.; Hammock, B. D. *Trends Anal. Chem.* 1995, 14, 341-350.
9. Sherry, J. P. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1992, 23(4), 217-300.
10. Meulenbergh, E. P.; Mulder, W. H.; Stoks, P. G. *Environ. Sci. Technol.* 1995, 29(3), 553-561.
11. Sadik, O. A.; Van Emon, J. M. *Biosensors Bioelectronics* 1996, 11(8), i-xi.
12. Ngeh-Ngwainbi, J.; Foley, P. H.; Kuan, S. S.; Guilbault, G. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 5444-5447.

13. Guilbault, G. G.; Hock, B.; Schmid, R. *Biosensors Bioelectronics* 1992, 7, 11-419.
14. Steegborn, C.; Skladal, P. *Biosensors Bioelectronics* 1997, 12, 19-27.
15. Anis, N. A.; Wright, J.; Rogers, K. R.; Thompson, R. G.; Valdes, J. J.; Eldefrawi, M. E. *Anal. Lett.* 1992, 25, 627-635.
16. Anis, N. A.; Eldefrawi, M. E.; Wong, R. B. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 843-848.
17. Bier, F. F.; Schmid, R. D. *Biosensors Bioelectronics* 1994, 9, 125-130.
18. Dzantiev, B. B.; Zherdev, A. V.; Yulaev, M. F.; Sitdikov, R. A.; Dmitrieva, N. M.; Moreva, I. Y. *Biosensors Bioelectronics* 1996, 11, 179-185.
19. Ghindilis, A. L.; Krishnan, R.; Atanasov, P.; Wilkins, E. *Biosensors Bioelectronics* 1997, 12, 415-423.
20. Minunni, M.; Mascini, M. *Anal. Lett.* 1993, 26, 1441-1460.
21. Wong, R. B.; Anis, N.; Eldefrawi, M. E. *Anal. Chim. Acta* 1993, 279, 141-147.
22. Zhao, C. Q.; Anis, N. A.; Rogers, K. R.; Kline, R. H.; Wright, J.; Eldefrawi, A. T.; Eldefrawi, M. E. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 2308-2315.
23. Dzantiev, B. B.; Zherdev, A. V.; Yulaev, M. F.; Sitdikov, R. A.; Dmitrieva, N. M.; Moreva, I. Y. *Biosensors Bioelectronics* 1996, 11, 179-185.
24. Blackburn, G. F.; Talley, D. B.; Booth, P. M.; Durfor, C. N.; Martin, M. T.; Napper, A. D.; Rees, A. R. *Anal. Chem.* 1990, 62, 2211-2216.

25. Kalab, T.; Skladal, P. *Anal. Chim. Acta* 1995, *304*, 361-368.
26. Sandberg, R. G.; Van Houten, L. J.; Schwartz, J. L.; Bigliano, R. P.; Dallas, S. M.; Silvia, J. C.; Cabelli, M. A.; Narayanswamy, V. *ACS Symp. Ser.* 1992, *511*, 81-88.
27. Tran-Minh, C.; Pandey, P. C.; Kumaran, S. *Biosensors Bioelectronics* 1990, *5*, 461-471.
28. Mionetto, N.; Marty, J. -L.; Karube, I. *Biosensors Bioelectronics* 1994, *9*, 463-470.
29. Marty, J. -L.; Mionetto, N.; Lacort e, S.; Barceló , D. *Anal. Chim. Acta* 1995, *311*, 265-271.
30. Trojanowicz, M.; Hitchman, M. L. *TrAC* 1996, *15*, 38-45.
31. Durand, P.; Thomas , D. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 1984, *5*, 51-57.
32. ElYamani , H.; Tran-Minh, C.; Abdul, M.; Dupont, M. *J. Franç. d'Hydrobiol.* 1987, *18*, 67-75.
33. El Yamani, H.; Tran-Minh, C.; Abdul, M. A.; Chavanne, D. *Sensors Actuators* 1988, *15*, 193-198.
34. Tran-Minh, C. *Anal. Proc.* 1993, *30*, 73-74.
35. Kumaran, S.; Morita, M. *Talanta* 1995, *42*(4), 649-655.
36. Budnikov, H. C.; Evtugyn, G. A. *Electroanal.* 1996, *8*, 817-820.
37. Ghindilis, A. L.; Morzunova, T. G.; Barmin, A. V.; Kurochkin, I. N. *Biosensors Bioelectronics* 1996, *11*(9), 873-880.

38. Ivnitskii, D. M.; Rishpon, J. *Biosensors Bioelectronics* 1994, 9, 569–576.
39. Dumschat, C.; Müller, H.; Stein, K.; Schwedt, G. *Anal. Chim. Acta* 1991, 252, 7–9.
40. Vlasov, Y.; Bratov, A.; Levichev, S.; Tarantov, Y. *Sensors Actuators B* 1991, 4, 283–286.
41. Nyamsi Hendji, A. M.; Jaffrezic–Renault, N.; Martelet, C. ; Clechet, P.; Shul'ga, A. A.; Strikha, V. I.; Netchiporuk, L. I.; Soldatkin, A. P.; Wlodarski, W. B. *Anal. Chim. Acta* 1993, 281, 3–11.
42. Rogers, K.R.; Foley, M.; Alter, S.; Koga, P.; Eldefrawi, M. *Anal. Lett.* 1991, 24, 191–198.
43. H.C. Froede and L.B. Wilson, in P.D. Boyer (Ed.). *The Enzymes*, Vol. V, Academic Press, New York, 1978. p. 87.
44. P.A. Giang and S.A. Hall, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1830. G.G. Guilbault, M.H. Sadar, S.S. Kuan and D. Casey, *Anal. Chim. Acta*, 52 (1970) 75.
45. L.P. Kuznetsova, L.I. Kugusheva. E.B. Nikolskaya and O.V. Yagodina, *Zh. Anal. Khim.*, 45 (1990) 1426.
46. M.F. Leon–Gonzales and A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, 236 (1990) 267.
47. L.H. Goodson and W.B. Jacobs, *Methods Enzymol.*, 44 (1976) 647.
48. P. Durand and D. Thomas, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 5 (1984) 51.
49. P. Durand, J. Mallevalle and J.M. Nicaud, *J. Anal. Toxicol.*, 8 (1984) 112.

50. G.K. Budnikov, E.P. Medyantseva, A.V. Volkov and S.S. Aronzon, Zh. Anal. Khim., 38 (1983) 1283.
51. E.P. Medvantseva, G.K. Budnikov and S.S. Babkina, Zh. Anal. Khim., 45 (1990) 1386.
52. S.A. Wring, J.P. Hart and B.J. Birch, Analyst, 114 (1989) 1563.
53. S.A. Wring, J.P. Hart and B.J. Birch, Analyst, 114 (1989) 1571.
54. J.F. Myers, G.W. Rayner Canham and A.B.L. Lever, Inorg. Chem., 14 (1975) 451.
55. Abad, J.M., Pariente, F., Hernandez, L., Abruna, H.D., Lorenzo, E., 1998. Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using a piezoelectric biosensor. Anal. Chem. 70, 2848–2855.
56. Aprea, C., Colosio, C., Mammone, T., Minoia, C., Maroni, M., 2002. Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. J. Chromatogr. B: Anal. Tech. Biomed. Life Sci. 769 (2), 191–219.
57. Bachmann, T.T., Leca, B., Vilatte, F., Marty, J.-L., Fournier, D., Schmid, R.D., 2000. Improved multianalyte detection of organophosphates and carbamates with disposable multielectrode biosensors using recombinant mutants of *Drosophila* acetylcholinesterase and artificial neural networks. Biosens. Bioelectron. 15, 193–201.
58. Bachmann, T.T., Schmid, R.D., 1999. A disposable multielectrode biosensor for rapid simultaneous detection of the insecticides paraoxon and carbofuran at high resolution. Anal. Chim. Acta 401, 95–103.
59. Montesinos, T., Pérez-Munguía, S., Valdez, F., Marty, J.L., 2001. Disposable cholinesterase biosensor for the detection of pesticides in water-miscible organic

solvents. *Anal. Chim. Acta* 431, 231–237.

60. DiehlFaxon, J., Ghindilis, A.L., Atanasov, P., Wilkins, E., 1996. Direct electron transfer based tri-enzyme electrode for monitoring of organophosphorus pesticides. *Sens. Actuators B: Chem.* 36 (1–3), 448–457.
61. Espinosa, M., Atanasov, P., Wilkins, E., 1999. Development of a disposable organophosphate biosensor. *Electroanalysis* 11 (14), 1055–1062.
62. Evtugyn, G.A., Budnikov, H.C., Nikolskaya, E.B., 1998. Sensitivity and selectivity of electrochemical enzyme sensors for inhibitor determination. *Talanta* 46, 65–484.
63. Evtugyn, G.A., Budnikov, H.C., Nikolskaya, E.B., 1996. Influence of surface-active compounds on the response of cholinesterase biosensors for inhibitor determination. *Analyst* 121, 1911–1915.
64. Ghindilis, A.L., Morzunova, T.G., Barmin, A.V., Kurochkin, I.N., 1996. Potentiometric biosensors for cholinesterase inhibitor analysis based on mediatorless bioelectrocatalysis. *Biosens. Bioelectron.* 11, 873–880.
65. Gupta, S., Handa, S.K., Sharma, K.K., 1998. A new spray reagent for the detection of synthetic pyrethroids containing a nitrile group on thin-layer plates. *Talanta* 45 (6), 1111–1114.
66. Hart, A.L., Collier, W.A., Janssen, D., 1997. The response of screen-printed enzyme electrodes containing cholinesterases to organo-phosphates in solution and from commercial formulations. *Biosens. Bioelectron.* 12, 645–654.
67. Hart, J.P., Pemberton, R.M., 1999. Application Note 121: A Review of Screen-printed Electrochemical Sensors. Perkin-Elmer Instruments, Princeton Applied Research. Higson, S.P.J., 2003. *Analytical Chemistry*. Oxford University

Press, pp. 286–288.

68. Higson, S.P.J., 'Sensor' International Patent: PCT/GB96/00922, continuation of UK patent 9507991, filed November 19, 1996, patents granted to date in Europe, US, Canada, Japan, Australia. Ivanov, A.N., Evtugyn, G.A., Gyurcsányi, R.E., Tóth, K., Budnikov, H.C., 2000. Comparative investigation of electrochemical cholinesterase biosensors for pesticide determination. *Anal. Chim. Acta* 404 (1), 55–65.
69. Jeanty, G., Ghommidh, Ch., Marty, J.L., 2001. Automated detection of chlorpyrifos and its metabolites by a continuous flow system-based enzyme sensor. *Anal. Chim. Acta* 436 (1), 119–128.
70. Leuzinger, W., Goldberg, M., Cauvin, E., 1969. Molecular properties of acetylcholinesterase. *J. Mol. Biol.* 40, 217–225.
71. Losito, H., De Giglio, E., Cioffi, N., Malitesta, C., 2001. Spectroscopic investigation on polymer films obtained by oxidation of *o*-phenylenediamine on platinum electrodes at different pHs. *J. Mater. Chem.* 11, 1812–1817.
72. Marco, M.-P., Barcelo, D., 1996. Environmental applications of analytical biosensors. *Measur. Sci. Technol.* 7 (11), 1547–1562.
73. Markwell, M.A., 1982. A new solid-state reagent to iodinate proteins. I. Conditions for the efficient labeling of antiserum. *Anal. Biochem.* 125, 427–432.
74. Mionetto, N., Marty, J.-L., Karube, I., 1994. Acetylcholinesterase in organic solvents for the detection of pesticides: biosensor application. *Biosens. Bioelectron.* 9, 463–470.